

**Einsatz eines superfundierten Retina-RPE-Choroidea Präparats vom
Haushuhn (*Gallus domesticus*) zur Untersuchung pharmakologischer
Wirkungen mittels *in vitro* elektroretinographischer Erfassung
(ERG und EOG) von okulären Funktionen**

D i s s e r t a t i o n

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Daniel Michael Hartmann
aus Bremen
2004

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Eberhart Zrenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner J. Schmidt

Statt eines Vorworts:

"Wer will was Lebendigs erkennen und beschreiben,

Sucht erst den Geist herauszutreiben,

Dann hat er die Teile in seiner Hand,

Fehlt, leider! nur das geistige Band"

Mephisto in Faust I von Johann Wolfgang Goethe

Inhaltsverzeichnis

A EINLEITUNG	1
A.1 Historischer Überblick	1
A.2 Aufbau des Auges und der Netzhaut	4
A.3 Die membranständigen Rezeptoren	6
A.4 Ziele dieser Arbeit	8
B MATERIAL UND METHODEN	11
B.1 Aufbau der Perfusionsanlage	11
B.1.1 Grundprinzip	11
B.1.2 Bereitung des Nährmediums	12
B.1.3 Perfusionssystem, Ventile und automatischer Lösungswechsel	14
B.1.4 Temperierung der Präparate	15
B.1.5 Die modifizierte Ussing-Kammer	15
B.1.6 Mechanische Schwingungsdämpfung des Aufbaus	17
B.2 Aufzucht und Behandlung der Versuchstiere	17
B.3 Präparation des Retina-Pigmentepithel-Choroidea Komplexes	18
B.4 <i>In vitro</i> Elektrophysiologie	21
B.4.1 Allgemeine Anforderungen	21
B.4.2 Elektrodenanordnung und Bezeichnung der abgeleiteten Potentiale	21
B.4.3 Verstärker und A/D-Wandler	22
B.4.4 Filter	24
B.4.5 Mikromanipulator und Elektrodenbewegung	25
B.5 Ionensensitive Mikroelektroden	25
B.5.1 Grundprinzip	25
B.5.2 Präparation der Elektroden	26
B.5.3 Elektrische Eigenschaften und Sensitivität	27

B.6 Stimulation des Präparats	28
B.6.1 Lichtstimulation und Lichtintensität	28
B.6.2 Strominjektion	30
B.7 Entstehung und Abhängigkeit des trans-epithelialen Potentials	31
B.7.1 Elektrisches Ersatzschaltbild des Netzhaut-präparats	31
B.7.2 Widerstandsmessung am retinalen Pigment-epithel (RPE)	34
B.8 Rechnergesteuerte Datenerfassung	34
B.8.1 Hardware und Entwicklungsumgebung	34
B.8.2 Das Programm IVChick	35
B.8.3 Zählereinheit und Programmierung der Stimulation	40
B.9 Auswertung der <i>in vitro</i> Daten	42
B.9.1 Online-Datenanalyse	42
B.9.2 Das Programm IVAnalyze	42
B.9.3 Statistik	43
C HERKUNFT UND INTERPRETATION DER SIGNALE DES <i>IN VITRO</i> ERGS	45
C.1 Intraretinales ERG	45
C.2 Herkunft lichtinduzierter Potentiale der Netzhaut	47
D EFFEKTE VON CITICOLIN AUF DAS <i>IN VITRO</i> PRÄPARAT	51
D.1 Einführung	51
D.2 Versuchsspezifische Methoden	52
D.3 Ergebnisse der Citicolin-Behandlungen	53
D.3.1 Änderungen der Bestandpotenziale und der extrazellulären Kalziumkonzentration	53
D.3.2 Effekte von Citicolin auf die lichtinduzierten Signale des Präparats	59
D.3.2.2 Änderungen im <i>in vitro</i> ERG und seinen Komponenten	59
D.3.2.3 Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden	62

D.4 Diskussion der Wirkung von Citicolin auf die Retina-RPE-Choroid Präparation	70
E MODULATION VON PURINREZEPTOREN IN DER NETZHAUT	75
E.1 Einführung: Die Purinrezeptoren	75
E.2 Untersuchungen der Effekte von ATP auf das <i>in vitro</i> Präparat	77
E.2.1 Versuchsspezifische Methoden	77
E.2.2 Ergebnisse der Behandlungen mit ATP	78
E.2.2.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen in Folge der Behandlung mit ATP	78
E.2.2.3 Effekte von ATP auf die lichtinduzierten Signale	83
E.2.3 Diskussion der Wirkung von ATP auf die <i>in vitro</i> Netzhaut	97
E.2.3.2 Änderung der Bestandspotenziale durch ATP-Behandlung	97
E.2.3.3 Wirkung von ATP auf die lichtinduzierten Signale	103
E.2.4 Zusammenfassung	110
E.3 Untersuchung der Effekte von Suramin auf das <i>in vitro</i> Präparat	111
E.3.1 Einführung	111
E.3.2 Versuchsspezifische Methoden	112
E.3.3 Ergebnisse der Behandlungen mit Suramin	113
E.3.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration	113
E.3.3.3 Effekte von Suramin auf die lichtinduzierten Signale	119
E.3.4 Diskussion der Wirkung von Suramin auf das Retina-RPE-Choroid Präparat	132
E.3.4.2 Die Ursachen für die Wirkung von Suramin auf die Bestandspotenziale	133
E.3.4.3 Einfluss von Suramin auf die lichtinduzierten Signale	136
E.3.4.4 Zusammenfassung der Diskussion	137
E.4 Zusammenfassende Diskussion der Wirkungsmechanismen von ATP und Suramin	138
F MODULATION DES CAMP-SPIEGELS DURCH FORSKOLIN UND GLUCAGON	139
F.1 Wirkung von Forskolin auf das <i>in vitro</i> Präparat	139

IV

F.1.1 Einführung	139
F.1.2 Versuchsspezifische Methoden für die Behandlungen mit Forskolin	140
F.1.3 Ergebnisse mit hydrophilen Forskolin	143
F.1.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration	143
F.1.3.3 Effekte des hydrophilen Forskolins auf die lichtinduzierten Signale des Präparats	151
F.1.4 Ergebnisse mit lipophilen Forskolin	165
F.1.4.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration	165
F.1.4.3 Effekte des lipophilen Forskolins auf die lichtinduzierten Signale des Präparats	174
F.1.5 Diskussion der Wirkungen verschieden löslicher Formen des Forskolins	192
F.1.5.2 Die Wirkung des hydrophilen Forskolins auf das <i>in vitro</i> Präparat	193
F.1.5.3 Die Wirkung des lipophilen Forskolins auf das <i>in vitro</i> Präparat	196
F.2 Wirkung von Glucagon auf das <i>in vitro</i> Präparat	198
F.2.1 Einführung	198
F.2.2 Versuchsspezifische Methoden für die Glucagon-Behandlungen	199
F.2.3 Ergebnisse der Glucagon-Behandlungen	201
F.2.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration	201
F.2.3.3 Effekte von Glucagon auf die lichtinduzierten Signale des <i>in vitro</i> Präparats	208
F.2.4 Diskussion der Wirkungen von Glucagon auf das <i>in vitro</i> Präparat	224
G ZUSAMMENFASSUNG	229
H LITERATURVERZEICHNIS	231
I ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	239
DANKSAGUNG	240
LEBENS LAUF	241

A Einleitung

A.1 Historischer Überblick

Schon Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieb Emil du Bois-Reymond (1848) in seinem Buch „Untersuchungen über thierische Electricität“ die Beobachtung, dass die Kornea gegenüber der Rückseite des Auges eine positive elektrische Ladung aufweist, und dieses Potenzial nicht durch die An- oder Abwesenheit von Licht beeinflusst wird. Damals interpretierte man es als eine Art Ruhepotenzial. Heute weiß man, dass es nicht direkt von den neuronalen Zellen im Auge erzeugt wird, sondern durch die Trennung der Ladung von Retina und Choroid durch das retinale Pigmentepithel, das eine effektive Barriere gegen die Diffusion von Ionen darstellt und damit die Netzhaut vom Choroid elektrisch isoliert. Das dadurch generierte Bestandspotenzial wird z. B. als so genanntes Elektrokulogramm (EOG) für die Diagnose in der Ophthalmologie aber auch bei wissenschaftlichen Fragestellungen abgeleitet.

Fast zwei Jahrzehnte nach du Bois-Reymonds Veröffentlichung konnte der schwedische Elektrophysiologe Frithiof Holmgren an enukleierten Froschaugen als Antwort auf einen kurzen Lichtreiz rasche Potenzialänderungen zu messen, die einen typischen, reproduzierbaren Verlauf in Form einer Welle zeigten. Ihm war damit die erste Ableitung eines Elektretinogramms (ERG) gelungen. Als Ursache für diese Welle nahm er allerdings fälschlich die Summe der Aktionspotenziale des Sehnervs an (Holmgren, 1865). Durch Platzierung der Elektrode direkt auf der Retina erkannte er wenige Jahre später, dass das beschriebene Signal von der Retina selbst erzeugt wird. Ungefähr zur gleichen Zeit hatten zwei schottische Forscher, James Dewar und John McKendrick (1873), unabhängig von Holmgren dieselbe Schlussfolgerung gezogen. Dewar fand in den Jahren danach einen Weg das ERG von lebenden Tieren abzuleiten, indem er die Referenzelektrode in der Nähe des Auges auf die Haut setzte (neben der selbstverständlich auf der Vorderseite des Auges liegenden

Ableitelektrode). Er berichtet auch als erster von der Ableitung eines ERGs am Menschen (Dewar, 1877). Nachdem das ERG schon im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts eingehend beschrieben und seine Herkunft aus der Retina belegt worden war, sorgte in den 30er Jahren des 20. Jahrhundert erneut ein schwedischer Wissenschaftler für einen bedeutenden Erkenntnisgewinn. Ragnar Granit konnte das ERG auf pharmakologischen Weg in verschiedene Komponenten zerlegen. Aus den von ihm beobachteten Veränderungen des ERGs im Verlauf einer Äthernarkose, durch die schrittweise die Funktion bestimmter Zellpopulationen der neuronalen Netzhaut ausgeschaltet wurden, leitete er drei Komponenten ab (Granit, 1933), deren Bezeichnungen heute noch Verwendung finden (Abbildung A.1).

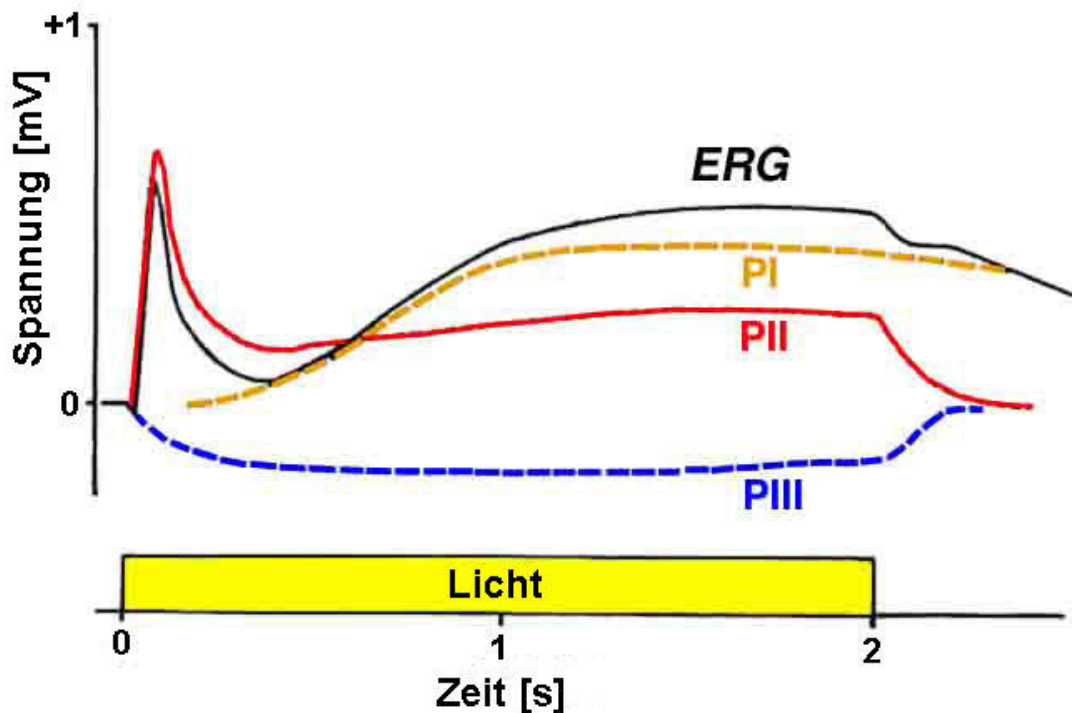


Abbildung A.1 Analyse der Komponenten des ERGs, Ableitung vom dunkeladaptierten Auge der Katze. Die schwarze, durchgezogene Linie zeigt das ERG vor der Behandlung. Die farbigen Linien geben die drei Komponenten wieder, die durch die Äthernarkose zum Verschwinden gebracht werden konnten (nach Granit, 1933).

Neben der auf pharmakologische Effekte zurückzuführenden Unterteilung des ERGs in Komponenten durch Ragnar Granit, existiert eine weitere international gebräuchliche Gliederung des ERGs, die sich an der zeitlichen Abfolge der Extremwerte des während des Lichtreizes und nach diesem aufgezeichneten

Signals orientiert. Die im ERG erkennbaren Minima und Maxima werden dazu als Wellen bezeichnet, die dann in der zeitlichen Reihenfolge ihres Auftretens mit Kleinbuchstaben vom Beginn des Alphabets benannt werden. Bei einem Blitz als auslösenden Reiz treten nur a- und b-Welle im ERG in Erscheinung; bei Belichtung der Netzhaut länger als 0,1 s bilden sich zusätzlich noch c- und d-Welle aus. Um den Ort und die Art der Entstehung dieser Wellen des ERGs in der Retina aufzuklären, waren Jahrzehnte intensiver Forschung durch eine Vielzahl an Wissenschaftlern nötig. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse über die Herkunft der einzelnen Wellen, ohne ins Detail zu gehen, findet sich in unterer Abbildung A.2.

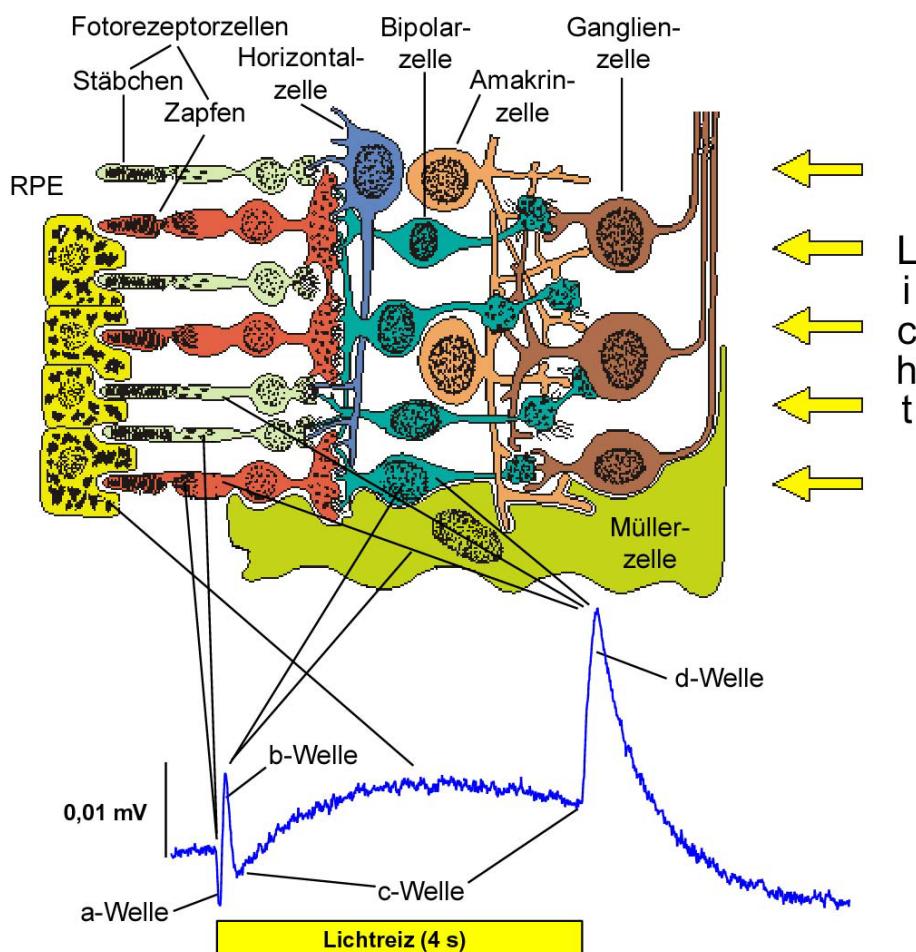


Abbildung A.2 Oben: Schematischer Schnitt durch die Netzhaut mit den in ihr vorkommenden verschiedenen Zelltypen. Unten: Typische Form eines *in vitro* ERGs abgeleitet von einem Retina-RPE-Choroid Präparat des Huhns mit den wichtigsten Wellen. Die Linien von den Zellen zu den Wellen geben an, durch welchem Zelltyp nach dem Stand der Forschung die jeweilige Welle generiert wird (nach einer Vorlage aus Malmivuo & Plonsey).

Der ausführlichen Darstellung des Ursprungs der Wellen des ERGs in der Netzhaut widmete John E. Dowling ein Kapitel in seinem Buch „The retina: an approachable part of the brain“ (1987), in dem der Stand der Forschung Mitte der 80er Jahre zur Beteiligung der verschiedenen Zellarten der Netzhaut an der Erzeugung der jeweiligen Welle übersichtlich zusammengefasst ist. Außerdem wird im Kapitel E.1 im Abschnitt „Diskussion der Wirkung von ATP auf die *in vitro* Netzhaut“ auf die wesentlichen Prozesse bei der Generierung der jeweiligen Welle des ERGs in der Netzhaut eingegangen.

A.2 Aufbau des Auges und der Netzhaut

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden Untersuchungen der Effekte pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die Netzhaut mittels Analyse der Veränderung elektrophysiologischer Signale. Um den Einstieg in dieses Thema zu erleichtern, wird im folgenden Abschnitt anhand von Abbildungen eine Übersicht über den Aufbau des Auges und der Netzhaut gegeben.

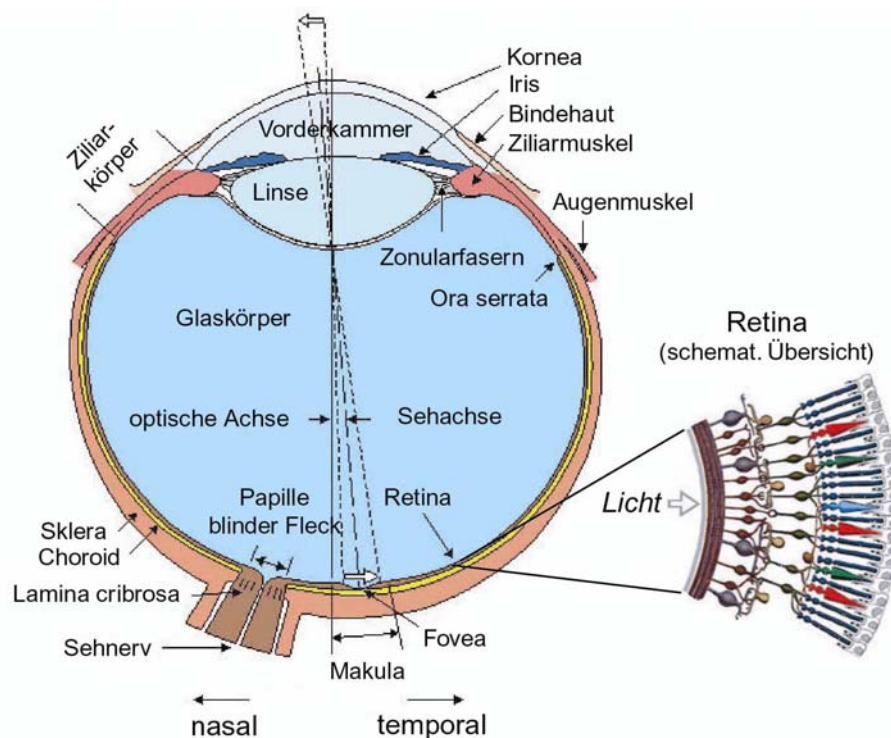


Abbildung A.3 Linke Seite: Übersicht über den Aufbau des Auges des Menschen anhand eines schematischer Längsschnitts. Rechte Seite: schematische Darstellung der Netzhaut (modifiziert nach Malmivuo & Plonsey und Kolb *et al.*, part I, 3).

Die Abbildung A.3 ermöglicht einen Überblick über die anatomische Gliederung des Auges. Oberflächlich betrachtet erscheint das Auge mit seinen wichtigsten Bestandteilen wie z. B. Kornea, Vorderkammer, Linse, Glaskörper, Netzhaut, Choroid und Sklera ein vergleichsweise einfacher optischer Apparat zu sein. Dies trifft jedoch allenfalls auf makroskopischer Ebene zu. Schon aus der schematischen Darstellung eines Schnitts durch Netzhaut, wie er auf der rechten Seite dieser Abbildung eingefügt ist, kann man erkennen, dass die Retina ein sehr komplexes Gebilde sein muss. Entwicklungsbiologisch betrachtet ist die Netzhaut eine Spezialisierung des Zentralnervensystems. Sie ist aus mehreren verschiedenen differenzierten Zelltypen (Abbildung A.4) mit entsprechend unterschiedlichen Funktionen aufgebaut: Fotorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Ganglienzellen und Müllerzellen, dies sind an die Erfordernisse der Netzhaut angepasste Gliazellen. Jeder dieser Zelltypen differenziert sich i. d. R. in weitere oft morphologisch unterscheidbare oder zumindest von ihren biochemischen Funktionen verschiedener Unterformen. Im Fall der Amakrinzellen wurden inzwischen mehrere Dutzend funktionelle Formen charakterisiert.

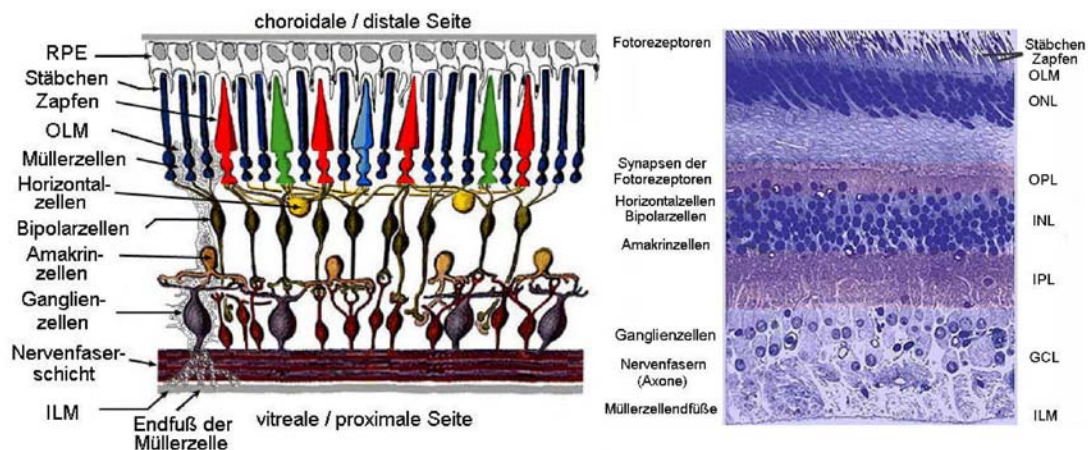


Abbildung A.4 Links: Schematische Darstellung der Netzhaut mit den wichtigsten Zelltypen und ihrer (stark vereinfachten) synaptischen Vernetzung; RPE: retinales Pigmentepithel; OLM: outer limiting membrane; ILM: inner limiting membrane. Rechts: Histologischer Schnitt durch die Retina, lichtmikroskopisch vergrößert. Erkennbar sind die verschiedenen Zelltypen und die Schichtung der Netzhaut, diese entsteht durch eine Wechselfolge von nukleären und plexiformen Schichten, d. h. Lagen in den sich das Soma der Zellen konzentriert und Lagen in denen dendritische Fortsätze und Axone vorherrschen; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer (modifiziert nach Kolb *et al.*, part I, 3)

Die verschiedenen Zelltypen sind auf äußerst komplizierte Art über eine unüberschaubar große Zahl von Synapsen miteinander verschaltet. Dabei treten meist chemische Synapsen in Erscheinung; daneben kommen aber auch elektrische Synapsen vor, z. B. zwischen den Horizontalzellen. Überdies bildet jeder Zelltyp viele unterschiedlich spezialisierte Synapsen aus, die erregenden oder hemmenden Einfluss auf die Postsynapse der Nachbarzelle ausüben. An der Übertragung von Signalen zwischen den Zellen und der Modulation dieser Signale wirkt eine Vielzahl von membranständigen, d. h. in der Phospholipidschicht der Zellwand integrierten Rezeptoren mit.

A.3 Die membranständigen Rezeptoren

Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Funktionen und der Aufbau von membranständigen Rezeptoren beschrieben. Sie stellen strukturierte Proteine dar, setzen sich also aus einer Kette von Aminosäuren zusammen. Sie werden nach dem Weg, auf dem sie ihr Signal an Ionenkanäle übermitteln, als ionotrop oder metabotrop klassifiziert. Metabotrope Rezeptoren sind i. d. R. einheitlich aufgebaut; sie bestehen aus sieben transmembranen Helices, die durch Schleifen miteinander verbunden sind (Abbildung A.6). Beide Rezeptorgruppen besitzen auf der extrazellulären Seite spezifische Bindungsstellen, d. h. diese sind nur für bestimmte Substanzen geeignet. Dockt ein passender Agonist an dieser Stelle an, wird der Rezeptor aktiviert. Ist der Rezeptor ionotrop, gibt er auf direktem Weg ein Signal an einen mit ihm gekoppelten Ionenkanal weiter, der sich daraufhin öffnet oder schließt (Abbildung A.5). Ein metabotroper Rezeptor regelt Ionenkanäle nicht direkt, sondern über einen so genannten „second messenger“. Der aktivierte Rezeptor regt über ein auf der Innenseite der Zellmembran sitzendes globuläres Protein eine funktionelle Einheit zur Produktion dieses „second messengers“ an, z. B. im Fall des „second messengers“ cAMP die Adenylat-Cyclase (Abbildung A.5). Die Erhöhung der Konzentration von cAMP in der Zelle wirkt dann als Signal auf bestimmte Ionenkanäle oder –transporter. Setzt sich hingegen ein Antagonist an die Bindungsstelle, bleibt der Rezeptor inaktiv. Die Anwesenheit des Antagonisten

verhindert das Andocken eines Agonisten an diesen Rezeptor, so dass eine Aktivierung effektiv unterbunden wird.

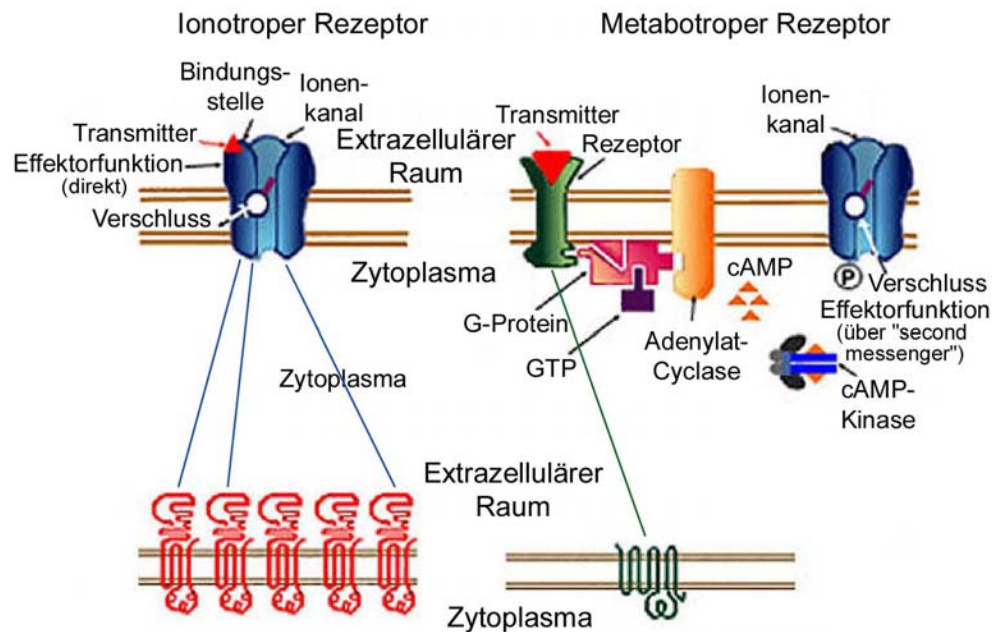


Abbildung A.5 Links: Iontroper Rezeptor mit integriertem Ionenkanal. Rechts: Der metabotrope Rezeptor aktiviert über ein G-Protein eine Einheit, die einen "second messenger" produziert (hier: cAMP und die Adenylat Cyclase). Der "second messenger" veranlasst Ionenkanäle sich zu öffnen (aus Kolb *et al.*, part V, 3; nach einer Vorlage aus Kandel *et al.*).

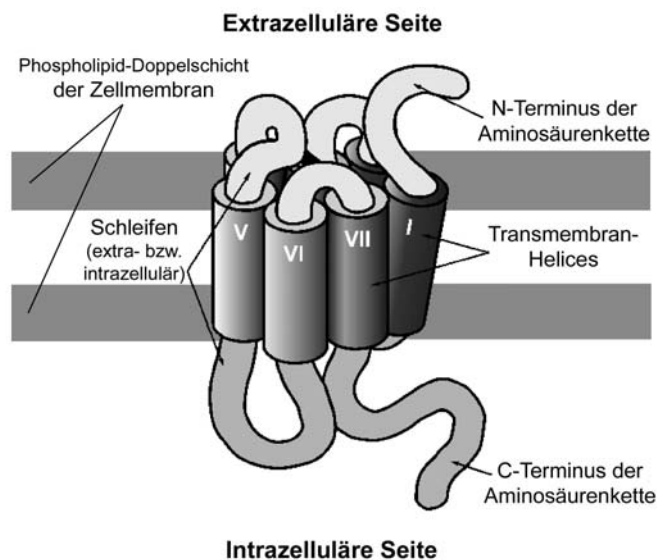


Abbildung A.6 Membranständiger, metabotroper Rezeptor bestehend aus sieben transmembranen Helices, die miteinander durch Schleifen verbunden sind. Die Grundstruktur bildet eine Kette aus Aminosäuren, die zur Helix aufspiralisiert die Zellmembran durchdringt.

A.4 Ziele dieser Arbeit

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden mit einer speziellen elektrophysiologischen Methode durchgeführt, mittels derer von superfundierten Retina-RPE-Choroid Präparationen aus dem Auge des Haushuhns (*Gallus domesticus*) über mehrere Stunden elektrische Signale *in vitro* abgeleitet werden können. Dieses Verfahren, vereinfachend oft als *in vitro* ERG bezeichnet, war in den 80er Jahren im Labor von Roy H. Steinberg an der University of California, San Francisco entwickelt und erfolgreich betrieben worden (z. B.: Griff & Steinberg, 1982; Linsenmeier & Steinberg, 1983; Shirao & Steinberg, 1987 und Gallemore *et al.* 1988). Die dazu benötigte technisch aufwendige Versuchsanlage war in Tübingen Mitte der 90er Jahre von Hartmut Schwahn, prinzipiell dem Aufbau aus dem Labor von Roy H. Steinberg folgend, errichtet worden (Schwahn, 1994). Da diese Methode in Verbindung mit dem dazu eingesetzten Versuchsaufbau ein sehr hohes Maß an Komplexität aufweist und wohl auch nicht zuletzt deswegen keine weite Verbreitung in den elektrophysiologisch arbeitenden Laboren gefunden hat, wird im Kapitel B (Material und Methoden) ein Schwerpunkt auf die Dokumentation der Anlage und die Beschreibung der Präparation gelegt.

Die elektrophysiologische Untersuchung von Präparationen *in vitro* wird in dieser Arbeit zur pharmakologischen Charakterisierung bestimmter Rezeptorpopulationen mittels Aktivierung bzw. Deaktivierung durch Agonisten und Antagonisten verwendet. Im Vergleich mit den systemanalytischen Ansätzen von *in vivo* Experimenten stellt diese Methode einen eigenständigen Ansatz dar. Dessen Vorteile sind vor allem die einheitlichen, kontrollierten Bedingungen, unter denen die pharmakologischen Experimente durchgeführt werden, und die Möglichkeit zur Identifizierung rascher Wirkungen von Pharmaka auf Effektorgruppen (z. B. Ionenkanäle). Diese elektrophysiologische Methode erlaubt die Untersuchung der elektrischen Eigenschaften des RPE und der neuronalen Netzhaut und ermöglicht deren Beeinflussung durch Pharmaka. Aus den dabei beobachteten Veränderungen der elektrophysiologischen Signale lassen sich Rückschlüsse auf die betroffenen Rezeptorpopulation und deren Lokalisation im Präparat ziehen (z.B. Gallemore

& Steinberg, 1990). Die Modulierbarkeit membranständiger Ionenkanäle und -transporter durch intrazelluläre „second messenger“ wie cAMP (Nao-i *et al.*, 1990; Kuntz *et al.*, 1994) erlaubt es, die registrierten Potenzialänderungen am RPE als Indikator für die Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen zu verstehen. Bei den Zellen der neuronalen Netzhaut besteht zusätzlich zum „Umweg über einen „second messenger“ noch die Möglichkeit der direkten Steuerung von Ionenkanälen über ionotrope Rezeptoren, die in der Zellmembran verankert sind und auf der extrazellulären Seite für bestimmte Substanzen spezifische Bindungsstellen besitzen. Effekte auf die neuronale Retina machen sich durch die Veränderung in den Amplituden der Wellen des ERGs, vor allem ihrer transretinalen Komponente, bemerkbar. Die durch die elektrophysiologischen „Marker“ angezeigten Einflüsse von Pharmaka auf zelluläre Signalwege ermöglichen es, Hypothesen über die Regelung von zellulären Prozessen durch bestimmte Rezeptorpopulationen abzuleiten.

Die vorliegende Arbeit umfasst drei verschiedene Untersuchungsschwerpunkte, die sich in ihrer Zielsetzung erheblich unterscheiden. Deshalb werden sie in dieser Arbeit als drei voneinander abgegrenzte Projekte in separaten Kapiteln dargestellt. In folgender Aufzählung werden die einzelnen Schwerpunkte und ihre Ausrichtung kurz beschrieben:

- Die *in vitro* Behandlungen des Retina-RPE-Choroid Präparats mit Citicolin (CDP-Cholin bzw. Cytidin 5'-diphosphocholin), einer Substanz mit neuroprotektiver Funktion im Zentralnervensystem, sollten klären, ob dieses Pharmakon in der Netzhaut Einfluss auf bestimmte Effektorgruppen (Ionenkanäle und -transporter) nimmt. Eine solcher sollte sich in Veränderungen der elektrophysiologischen Signale niederschlagen.
- Die Behandlungen mit einem Agonisten (ATP) und einem Antagonisten (Suramin) der Purinrezeptoren wurden durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über deren Vorkommen und Funktion in der Retina und im RPE zu gewinnen. Das Auftreten dieser Rezeptoren, vor allem aus der Untergruppe der P2-Rezeptoren, in der Netzhaut ist erst in vor einigen Jahren belegt worden. Daher ist bis heute auch nur wenig über die Wirkung dieser Rezeptoren auf elektrophysiologische Signale bekannt.

- Seit mehreren Jahren wird eine Beteiligung von Glucagon, dessen Funktion als Neuropeptid, neben der des Stoffwechselhormons, seit längerem bekannt ist, an der Regelung des Längenwachstums des Auges diskutiert. Die Behandlungen mit Forsolin, einen unspezifischen Aktivator der Adenylat-Cyclase sollten Aufschluss geben, wie sich eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Zellen der Retina in den elektrophysiologischen Signalen manifestiert und welche Zellarten der Netzhaut dabei eine Rolle spielen. Von den Behandlungen mit Glucagon wurden Hinweise auf das Vorkommen des Glucagonrezeptors und seine Lokalisation im Retina-RPE-Choroid Präparat erwartet.

B Material und Methoden

Für die folgende Darstellung wurden dem Kapitel Material und Methoden der Dissertation von Schwahn (1998) die entsprechenden Abschnitte entnommen. Wo erforderlich, wurden diese aktualisiert und an die Anforderungen der vorliegenden Arbeit angepasst. Die Beschreibung der Präparation wurde durch eine Abbildung ergänzt, in der einzelne Schritte zeichnerisch dargestellt sind.

B.1 Aufbau der Perfusionsanlage

B.1.1 Grundprinzip

Die in dieser Arbeit eingesetzte Anlage ist eine Weiterentwicklung / Modifikation eines Aufbaus zur *in vitro* Messung aus dem ehemaligen Labor von Prof. R.H. Steinberg (z.B.: Griff & Steinberg, 1982; Linsenmeier & Steinberg, 1983; Gallemore & Steinberg, 1990; Schwahn *et al.*, 1995; Dmitriev *et al.*, 1999). Im intakten Zellverband des Netzhautpräparates lassen sich Zellinteraktionen mit elektrophysiologischen Methoden untersuchen. Kern der Anlage ist eine Kammer, die das Netzhautpräparat aufnimmt, und in der es mit temperiertem Nährmedium umspült wird (Abbildung B.1).

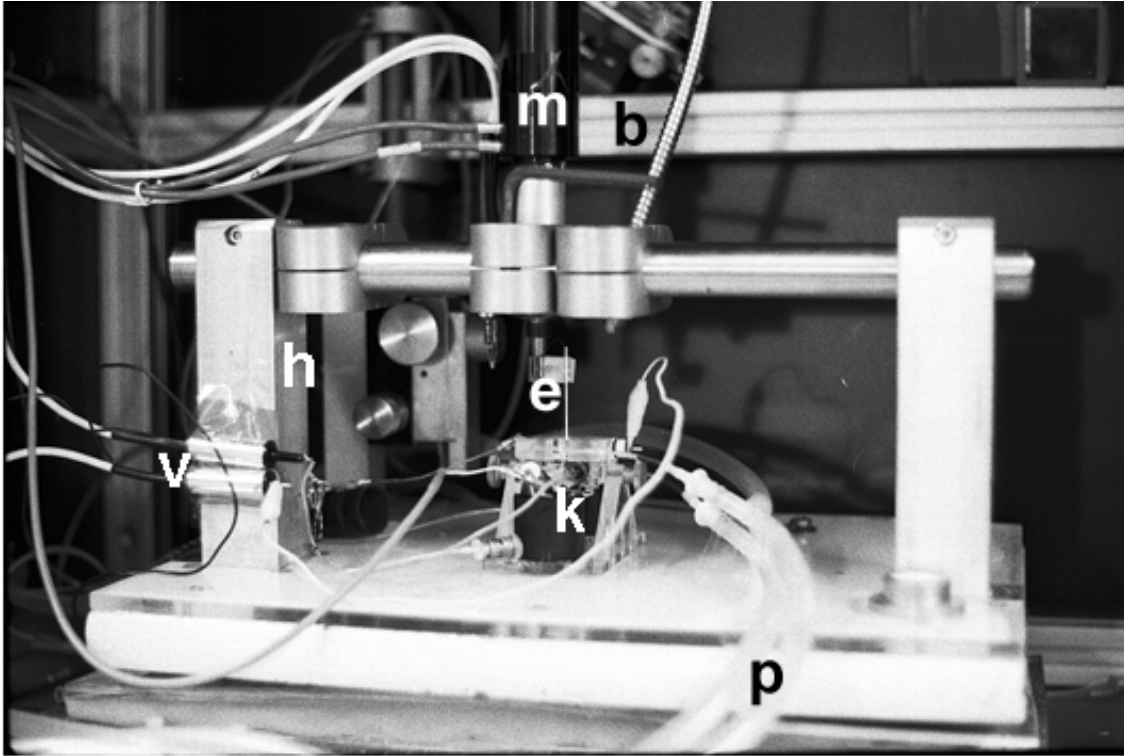


Abbildung B.1 Aufbau der *in vitro*-Anlage: **k**: Perfusionskammer; **p**: Perfusionssystem (mit Temperierung); **b**: Lichtleiter; **m**: Mikropositionierer mit Halterung (**h**); **e**: Glasmikroelektrode; **v**: Verstärkermodule für Badelektroden (aus Schwahn, 1998).

B.1.2 Bereitung des Nährmediums

In den Versuchen wurde ein auf Salze, Bikarbonat-Puffer und Glucose reduziertes Medium eingesetzt (Tabelle B.1), da in Vorversuchen mit modifiziertem Ames' Medium (A-08/15; Sigma), das neben Aminosäuren, Vitamine und Serum enthält, keine verbesserten elektrischen Antworten oder längere Überlebenszeit des Präparates gegenüber dem reduzierten Medium festgestellt worden waren. Eine hohe Konzentration an freiem Mg^{2+} im Medium wurde gewählt, um im Netzhautpräparat die spontane Entstehung von „Spreading Depression“, zu unterdrücken (Martins-Ferreira & Oliveira Castro, 1971; Rodrigues *et al.*, 1988). „Spreading Depression“ (SD): eine spontane und synchrone Entladung der Netzhautzellen gefolgt von anschließender Unterdrückung neuronaler Aktivität.

Komponente	Konzentration		Einwaage	
	<i>g/mol</i>		<i>in 1000 ml</i>	<i>in 5000 ml</i>
NaCl	58,8	115 mM	6,76 g	33,8 g
NaHCO₃	84,0	25 mM	2,10 g	10,50 g
Glucose anhyd.	180,2	44 mM	7,9 g	40 g
KCl	74,6	3,0 mM	0,224 g	1,119 g
MgCl₂ · 6H₂O	203,3	1,0 mM	0,203 g	1,017 g
CaCl₂ · 2H₂O	147,1	1,8 mM	0,265 g	1,323 g
Carbogen-Gas		pH 7,4		
Osmolarität		330 mosmol		

Tabelle B.1 Zusammensetzung des Nährmediums zur in vitro-Präparation.

Zur Bereitung des Nährmediums wurden jeweils 5 l vollentsalztes Ionenaustauscher-Wasser (25 °C) mit Carbogen (5% CO₂/95% O₂, Messer Griesheim od. AGA Linde Healthcare GmbH & Co. KG) über eine Gasfritte begast und unter Rühren die Salze NaCl, NaHCO₃, sowie Glucose zugegeben. Die Salze KCl, MgCl₂ und CaCl₂ wurden in Form 250fach konzentrierter Stammlösungen zugegeben, um die Genauigkeit der Einwaage im Medium zu erhöhen (alle Chemikalien: Qualität p.a.; Merck, Darmstadt oder Sigma, Deisenhofen). Vor Zugabe der Ionen Mg²⁺ und Ca²⁺ war es notwendig, das Medium mit CO₂ zu sättigen, um die Fällung von Mg(CO₃)₂ und Ca(CO₃)₂ bei höherem pH (>pH 8) zu verhindern. In Folge musste ein Ausgasen des Kohlendioxids durch ständiges Begasen des bereiteten Mediums mit Carbogen verhindert werden. Die Vorratsgefäße der Perfusionsanlage mit einem Fassungsvermögen von 2 x 600 ml und 2 x 250 ml waren deshalb ebenfalls mit Gasfritten ausgestattet. Diese Glaskolben wurden von außen mit warmem Wasser umspült und das Nährmedium somit auf 38 °C erwärmt.

B.1.3 Perfusionssystem, Ventile und automatischer Lösungswechsel

Die vier Vorratsgefäße mündeten in vier Kanäle, die frei auf die zwei Perfusionkanäle der Perfusionskammer verteilt waren, wobei immer zwei Kanäle über elektrische Schlauchklemmventile (S305-01-EG3, Sirai, Milano) auf einen Perfusionkanal geschaltet werden konnten. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen, bei denen es auf einen stabilen und gleichmäßigen Durchfluss ankam, um Bewegungsartefakte des Präparates durch Druckwellen im System zu vermeiden, wurde eine Gravitations-Perfusion gewählt: Durchflussgeschwindigkeit und Perfusionsdruck wurden dabei durch die Höhe der Wassersäule in einem offenen System bestimmt. Die Öffnung des Systems (also der höchste Punkt der hydrostatischen Säule des Gravitationsdrucksystems) befand sich kurz unterhalb der Schlauchklemmventile. Die Schlauchausgänge der Ventile aller Vorratsgefäße ragten in diese Öffnung. Aus jeweils einem Kanal wurde Nährmedium aus den Vorratsgefäßen nachgeliefert, dabei war die Zuflussrate mittels Infusionsregler (dosi-flow10, Dahlhausen) leicht höher eingestellt als die Abflussrate in das Perfusionssystem. Durch die offene Ausführung des Systems kam es bei automatischem Lösungswechsel über die Betätigung der Ventile nicht zu Ausbreitung einer Druckwelle. Die Durchflussrate im System konnte durch Verschieben dieser Anordnung nach oben oder unten entlang einer Schiene eingestellt werden. Sie lag für die offene, vitreale Perfusion (s. u.) zwischen 50 und 70 ml/h. Die Durchflussrate der geschlossenen, choroidalen Perfusion wurde kleiner gewählt (20-40 ml/h), um die Stabilität und Gleichmäßigkeit der Perfusion zu optimieren. Außerdem war die Stoffwechselrate auf dieser Seite des Präparates geringer und machte eine höhere, in absoluten Werten stärker schwankende, Perfusionsrate nicht erforderlich.

Bei den relativ langsamen Durchflussraten war es wichtig, einen Gasaustausch des Nährmediums mit der Umgebungsluft und folglich eines steigenden pH-Wertes im Medium (s. o.), durch Wahl gasdichter Teflonschläuche zu unterbinden (Durchmesser innen: 0,8 mm, außen: 1,6 mm, C022.1, Roth, Karlsruhe).

Die Länge der Teflonschläuche betrug ca. 45 cm je Perfusionskanal. Zusätzlich wurde die Perfusionskammer selbst von Carbogengas umflossen (s. u.).

B.1.4 Temperierung der Präparate

Das Medium wurde auf dem Weg zur Perfusionskammer über eine Strecke von ca. 30 cm durch einen den Perfusionsschlauch umgebenden zweiten Schlauch, durch den auf 38 °C temperiertes Wasser geführt wurde, erwärmt. In der Kammer am Präparat hatte das Medium bei gegebenen Durchflussraten eine Temperatur von 36 °C. Um die Bildung von Gasblasen im Teflonschlauch bei Erwärmung eines übersättigten Mediums und ein damit verbundenes Abstoppen der Perfusion zu verhindern, wurden die Medien in den Vorratsgefäßen im konstant auf 38 °C geregelten Wasserbad mit Carbogen gesättigt (s. o.). Die Umwälzpumpe des Wasserbades (Typ VC/5, Julabo) versorgte ebenfalls die temperierten Teflonschläuche (Abbildung B.1, **p**) in unmittelbarer Nähe der Perfusionskammer.

B.1.5 Die modifizierte Ussing-Kammer

Bei der Kammer zur *in vitro* Netzhautpräparation handelte es sich um eine modifizierte Perfusionskammer nach Ussing mit einer horizontalen Anordnung der beiden Plexiglashälften der Kammer und des Präparates, sowie getrennter Perfusion von choroidaler Seite und retinaler Seite über zwei unabhängige, elektrisch isolierte Systeme (Abbildung B.1, **k**). Die feste, untere Hälfte (Basis; Abbildung B.2, **B**) beinhaltete neben den Bohrungen für die geschlossene, choroidale Perfusion zwei zusätzliche Bohrungen für zwei Badelektroden. In einer Vertiefung in der Mitte der Basis (600 µm) ruhte das Präparat. Der obere Teil der Kammer (Deckplatte; Abbildung B.2, **A**) konnte, durch zwei Führungsstifte gehalten, auf die Basis abgesenkt werden und fixierte so das Präparat zwischen den Platten. Die abführenden Kanäle der Perfusion endeten in Aussparungen an der Kammer, dort wurde das Perfusionsmedium mit Filterpapierstreifen abgesaugt. Die Filterstreifen ragten in kleine, voneinander elektrisch isolierte Auffangbehälter unterhalb der Kammer, die über das

Vakuum einer 2-Kanal Kolbenpumpe (HYFLO Mod. C, Medcalf, UK) getrennt entleert wurden.

Neben den Bohrungen für die offene, retinale Perfusion waren auch in der Deckplatte zwei Bohrungen für Badelektroden vorgesehen, die mit dem abführenden Perfusionskanal in Kontakt standen. Jeweils zwei Badelektroden auf jeder Seite des Präparates dienten zur Spannungsmessung, zwei weitere Elektroden wurden in einigen Experimenten zur Strominjektion verwendet (s. u.)

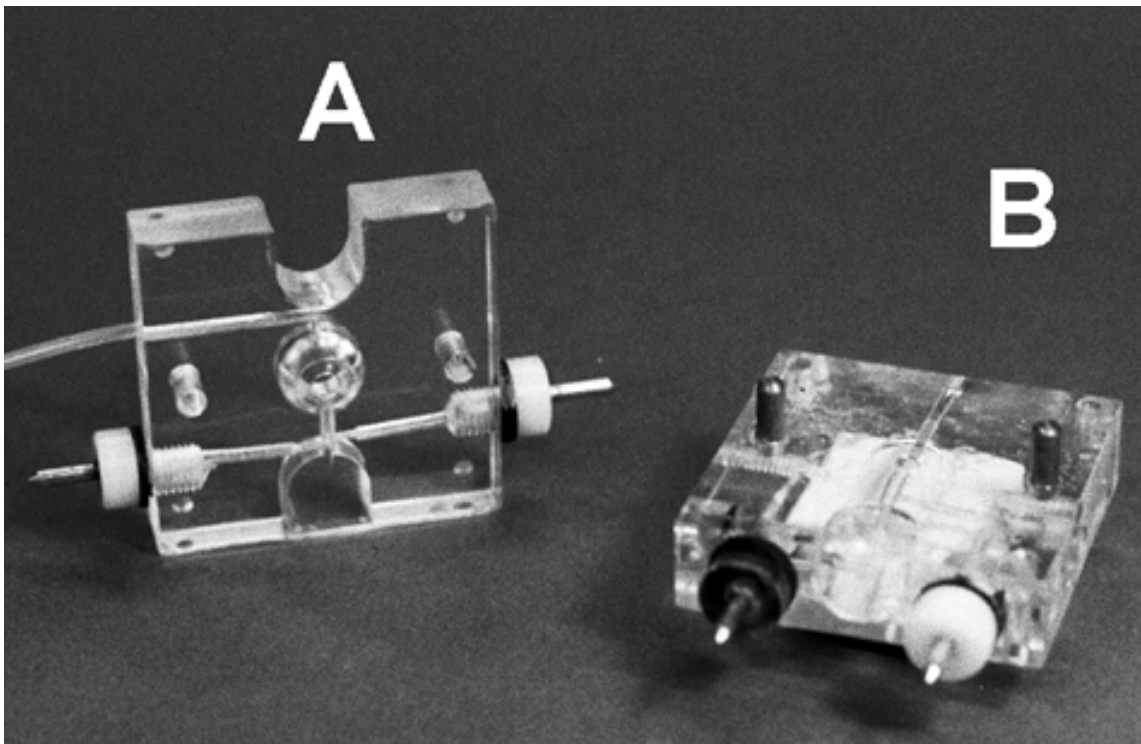


Abbildung B.2 *in vitro* Perfusionkammer mit Badelektroden: A: obere Hälfte (Deckplatte); B: Basisplatte mit Vertiefung zur Aufnahme des Netzhautpräparats (aus Schwahn, 1998).

Durch das offene Perfusionsbad in der oberen Kammerhälfte konnten für intraretinale Ableitungen Glasmikroelektroden von der vitrealen Seite in das Präparat durch ein Loch von 3 mm Durchmesser, entsprechend 7 mm² zugänglicher Fläche abgesenkt werden. Über einen zusätzlichen Teflonschlauch oberhalb der Kammer wurde Carbogen über die Oberfläche der retinalen Perfusion geleitet, wiederum um ein Ausgasen von CO₂ und ein Ansteigen des pH im Medium zu verhindern (s. o.).

B.1.6 Mechanische Schwingungsdämpfung des Aufbaus

Kammer und Mikropositionierer waren fest über einen Träger mit einer 25 kg schweren Eisenplatte verbunden, die auf einer ca. 4 cm dicken Schicht weichen Schaumstoffs ruhte. Durch diese Dämpfung wurden Vibrationen und Erschütterungen im Labor vom elektrophysiologischen Aufbau weitgehend ferngehalten. Zusätzlich befand sich dieser Aufbau in einem lichtdichten Faraday-Käfig (BxHxT: 95x65x50 cm) auf einem ca. 120 kg schweren Eisentisch, der auf Luftfederisolatoren (Faebi100soft, Bilz, Leonberg) stand. Diese doppelte Entkopplung erlaubte äußerst stabile intraretinale Messungen mit den mechanisch sehr sensitiven ionenselektiven Mikroelektroden über viele Stunden an einer definierten Tiefe im Präparat. Mit Hilfe der Dämpfungselemente konnte eine absolut waagrechte Lage der Kammer eingestellt werden, überwacht durch eine Libelle auf der Eisenplatte.

B.2 Aufzucht und Behandlung der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden gemäß den Richtlinien der Tierschutzverordnung behandelt und die Organentnahmen wie von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt durchgeführt. Frischgeschlüpfte (Tag 1), männliche Hühnerküken der Sorte „Weiße Leghorn“ wurden von einer Hühnerzuchtfarm (Fa. Zeh, Laichingen-Suppingen oder Fa. Weiß, 88486 Kirchberg) bezogen und in hausinternen Tierställen in Käfigen (BxHxT: 120x40x50 cm) in der ersten Lebenswoche bei 28–32 °C, danach bei 22-25 °C Raumtemperatur gehalten. Durch direkt über den Käfigen angebrachte 60 W Glühlampen betrug die Beleuchtungsstärke in ca. 10 cm über dem mit Kleintierstreu belegten Käfigboden 300-600 lux. Eine Zeitschaltuhr schaltete die Käfigbeleuchtung täglich zwischen 8.00 Uhr und 20.00 Uhr (Licht/Dunkel-Rhythmus: 12 Stunden - 12 Stunden = L/D 12/12), Wasser und Aufzuchtfutter (Raiffeisen, RKW-Süd) war ständig verfügbar. Die für die *in vitro* Experimente vorgesehenen Tiere wurden ausschließlich in diesen Käfigen gehalten. Die Tierhaltung wurde regelmäßig durch die Dienststelle des

Tierschutzbeauftragten (Dr. Iglauer) am Universitätsklinikum Tübingen überprüft.

B.3 Präparation des Retina-Pigmentepithel-Choroidea Komplexes

Für die erfolgreiche Durchführung eines Experimentes mit langer Überlebenszeit des Präparates (ca. 12 Stunden) waren drei Dinge von entscheidender Bedeutung: (1) die minimale mechanische Beanspruchung des Gewebes bei der Präparation und der anschließenden Fixierung in der Perfusionskammer, (2) die Präparation dunkel-adaptierter Tiere unter Vermeidung von Pigmentbleichung, (3) die Verwendung frischen Gewebes aus nicht pharmakologisch vorbehandelten Hühnern (z.B. Narkose). Die Präparation wurde deshalb unter Dunkelrotlicht in einem Präparationsgefäß im Nährmedium unter visueller Kontrolle eines Binokulars (10fach) und mit maximaler Sorgfalt an enukleierten Augen unmittelbar dekapitierter, nicht narkotisierter, 3 bis 21 Tage alter Tiere vorgenommen. Zur mechanischen Stabilisierung des herauspräparierten Gewebes bei der Überführung in die Kammer wurde es auf ein mit einem 7 mm-Locheisen ausgestanztes Nylonnetz, das als Träger diente, verbracht (Maschenweite: 80 µm, offene Fläche: 42%, Nybolt PA-80/42, Schweizerische Seidengazefabrik, Zürich). Präpariert wurde ein etwa 38 mm² großes Gewebestück bestehend aus zentraler Retina, retinalem Pigmentepithel und anhängender Choroidea:

Die Präparation beginnt im Detail durch Aufkleben des enukleierten Auges mit der Kornea nach unten auf einen Träger im Präparationsgefäß mittels Sekundenkleber (Abbildung B.3; **A** bis **C**). Es wird dann mit einer gebogenen Irisschere mit stumpfen Spitzen (G-19605, Geuder) gründlich von extraokulärem Bindegewebe, Muskeln und Fettgewebe befreit. Danach erfolgt der Einschnitt in die Sklera unmittelbar neben dem Stumpf des N. opticus in Richtung posteriorem Augenpol. Dieser wird durch den Einstich einer frischen Kanüle (Gr. 2, 21 G), die fast tangential unter die Skleraoberfläche geführt wird, vollzogen. Dabei ist es in jedem Fall zu vermeiden, tiefere Schichten des Choroids oder gar das Pigmentepithel und die Netzhaut zu durchstoßen. Das Präparat würde

dadurch mechanisch so instabil, dass dies die Fortsetzung der Präparation verhinderte. Bei richtig geführter Kanüle bleibt ihre Spitze nach dem Einstich durch die durchscheinende Sklera unmittelbar unter dieser, zwischen Choroidea und Sklera sichtbar. Anschließend wird durch den Einstich eine Klinge der stumpfen Irisschere eingeführt (Abbildung B.3; **D**, auch hier bleibt die Klinge unter der Sklera sichtbar) und die Sklera kreisrund, entlang des äquatorialen Medians des Augapfels freipräpariert (Durchmesser ca. 10 mm) und vorsichtig entfernt (Abbildung B.3; in **E** noch anhängend). Anhaftende Choroidea-Gefäße müssen abgeschnitten werden, sie würden sonst große Löcher in die zurückbleibende Choroidea reißen. Nun wird mit einer Klinge der kleineren, spitzen Federschere nach Vannas (G-19765, Geuder) der auf dem Glaskörper aufliegende Gewebekomplex nahe dem N. opticus durchstoßen und das Gewebe halbkreisförmig (Durchmesser: ca. 8 mm) eingeschnitten, den Schnittkanten der Sklera folgend (Abbildung B.3; **E**). Das ausgestanzte Nylonnetz wird über den freipräparierte Netzhaut des posterioren Augenpols positioniert (Abbildung B.3; **F**) und leicht angedrückt (Abbildung B.3; **G**). Der Rand des halbkreisförmig eingeschnittenen Netzhautgewebes krümmt sich um die Schnittkante des Nylonnetzes und verhakt sich etwas mit den Nylonfasern und fixiert das Präparat dadurch auf dem Netz. Nun wird die andere Hälfte des Gewebes freipräpariert und es kann dann zusammen mit dem Nylonnetz als Träger mechanisch unversehrt vom Glaskörper abgehoben und in die Basisplatte der Perfusionskammer (Abbildung B.2; B) überführt werden. Die choroidale Seite mit dem anhängenden Nylonnetz kommt in der Basis nach unten zu liegen, während die retinale Seite nach oben weist. Anschließend wird die Deckplatte der Kammer von oben auf die Basisplatte und das Präparat abgesenkt, um dieses zwischen den beiden Platten zu fixieren.

Der Abstand der beiden Plexiglashälften der Perfusionskammer war kritisch und wurde durch den Anpressdruck und die Menge an Silikonpaste (ca. 40 µl; Baysilone, hochviskos, Bayer AG) zwischen den Hälften bestimmt: Bei zu geringem Abstand wurde das Präparat zerquetscht. Bei zu hohem Abstand war das Präparat nicht genügend elektrisch isoliert und fixiert, choroidale und retinale Perfusion vermischten sich, der Isolationswiderstand R_{iso} (s. u.) war unzureichend hoch und eine stabile elektrophysiologische Ableitung war nicht mehr möglich.

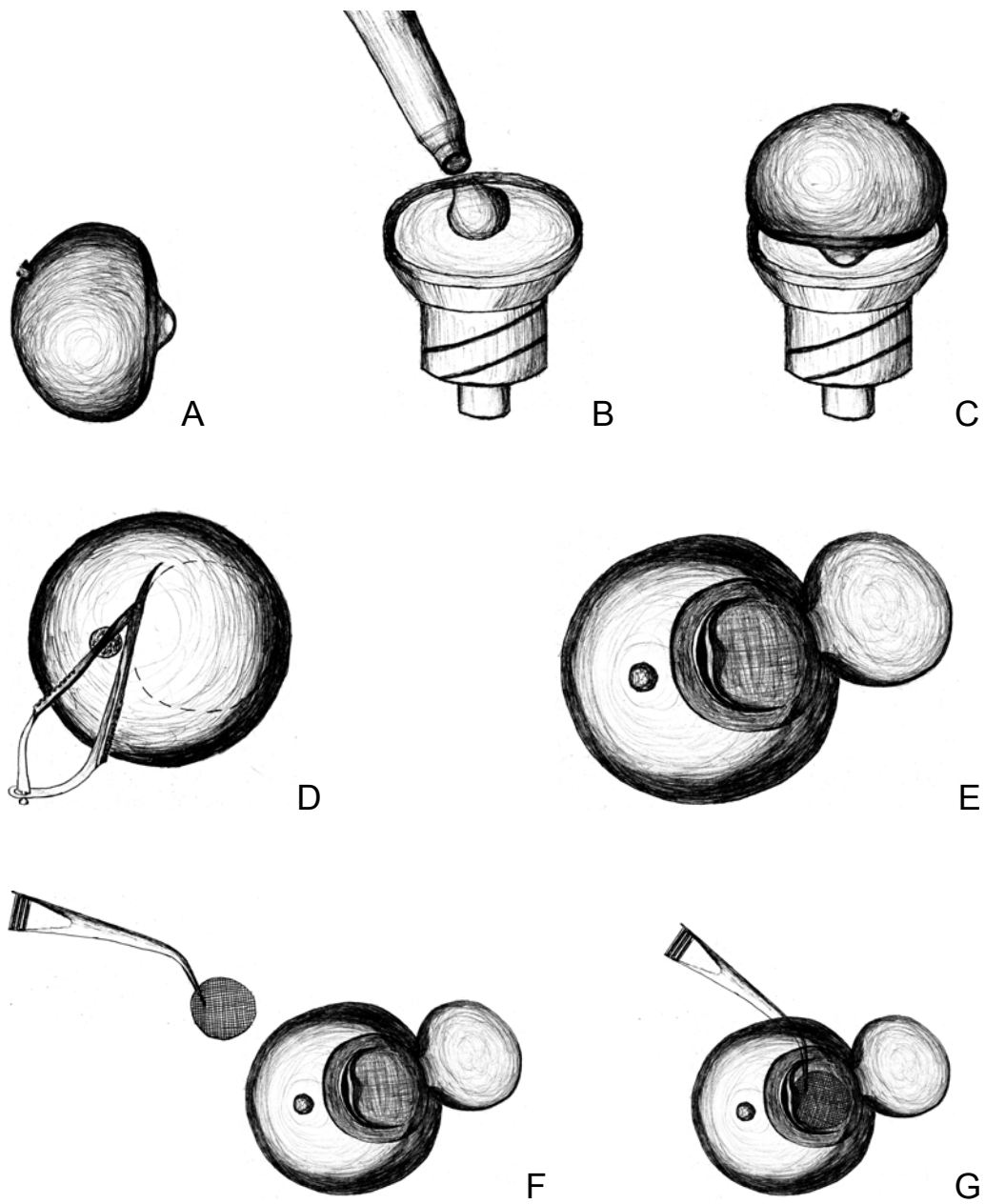


Abbildung B.3 Zeichnerische Darstellung einiger wichtiger Schritte aus der Präparation des Retina-RPE-Choroid Komplexes aus dem enukleierten Auge des Haushuhns *Gallus domesticus* (zur Veranschaulichung, Erläuterungen im Text).

B.4 *In vitro* Elektrophysiologie

Wie auch die Perfusionsanlage waren sämtliche Stimulationsgeräte und die Verstärkerverschaltung z. T. in Eigenbau und in Eigenentwicklung ausgeführt. Ein großer Teil entstand dabei in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt der Universitäts-Augenklinik (Mst. H. Willmann). Die Schaltung für den Differenzverstärker und den getakteten Filter (Abbildung B.4) war eine Entwicklung von Dipl.-Ing. S. Beuel. Die Blockschaltbilder sollen im Folgenden die prinzipielle Funktion dieser Bausteine erläutern.

B.4.1 Allgemeine Anforderungen

Aufgrund des Versuchsdesigns der *in vitro*- Experimente wurden besondere Anforderungen an den elektrophysiologischen Aufbau gestellt. Ziele waren stabile Ableitungen der Gleichspannungspotentiale des Netzhautpräparats und die Messung intraretinaler Ionenkonzentration mittels hochohmiger Mikroelektroden. Spezielle DC-Verstärker und Filter hoher Ordnung kamen zum Einsatz. Programme zur Datenaufnahme von der A/D-Wandlerkarte, zur Versuchssteuerung und zur Datenanalyse, wurden geschrieben (für Details s. Anhang in Schwahn, 1998).

B.4.2 Elektrodenanordnung und Bezeichnung der abgeleiteten Potentiale

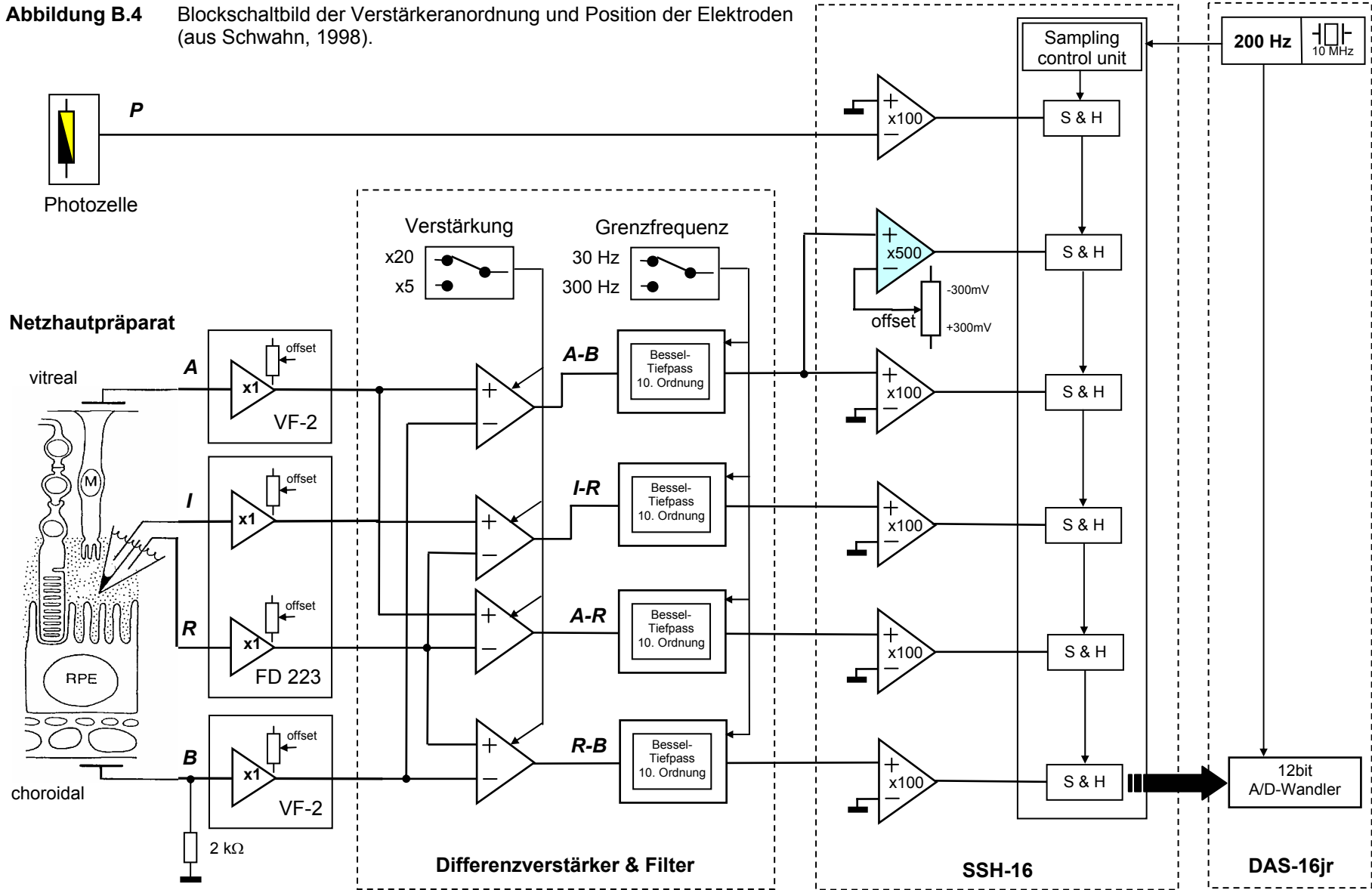
Das elektrische Potential über das gesamte Präparat, gemessen mit Badelektroden jeweils im choroidalen (B) und im retinalen (A) Perfusionskanal, wurde als Trans-Tissue-Potential ($A-B = \text{TTP}$) bezeichnet (Abbildung B.4). Separat registriert wurden die Potenzialdifferenzen zwischen retinaler Badelektrode (A) und dem Referenzkanal (R) der Mikroelektrode (s. u.), sowie zwischen choroidaler Badelektrode (B) und dem Referenzkanal (R). Die resultierenden Potentiale wurden, entsprechend der Position der Mikroelektrode im subretinalen Raum (SRS), zwischen apikaler Membran des Pigmentepithels und den Außensegmenten der Photorezeptoren, als transretinales Potential ($A-R = \text{TRP}$), bzw. transepitheliales Potential ($R-B = \text{TEP}$) bezeichnet.

Die Badelektroden bestanden aus Ag/AgCl-Pellets (Durchmesser: 2 mm, RC2, WPI), eingeschraubt in die Elektrodenbohrungen der Perfusionskammer, die zur Verbesserung der Ableitbedingungen und zur Minimierung von Schwankungen im „junction-potential“ der Ag/AgCl-Elektroden, mit 3 M KCl in 3% Agarose befüllt waren („salt bridge“; Alvarez-Leefmans, 1992). Um eine Kontamination des Perfusionsmediums mit aus der „salt bridge“ heraus diffundierenden K^+ -Ionen zu vermeiden, standen die Bohrungen mit den jeweils abführenden Kanälen der choroidalen bzw. retinalen Perfusion in Verbindung. Kammer und Verstärker waren in allen Experimenten dieser Arbeit über die choroidale Badelektrode (B) über einen $2\text{ k}\Omega$ Widerstand mit Masse (= 0 V) verbunden, auf sternförmig verschaltete Masseleitungen wurde geachtet. Die Effekte elektromagnetischer und elektrostatischer Störeinstreuungen konnten so gering gehalten werden.

B.4.3 Verstärker und A/D-Wandler

Der Aufbau zur Registrierung der Potentiale der beiden Badelektroden (A) und (B) bestand aus zwei batteriebetriebenen DC-Vorverstärkern ($R_e > 10^{12}\ \Omega$) mit Offset-Verstellung (VF-2, WPI, Berlin; Abbildung B.4). Die Vorverstärker selbst befanden sich in direkter Nähe der Elektroden, innerhalb des lichtdichten Faraday-Käfigs, die Steuereinheiten jedoch in einem Schaltschrank, worin auch alle anderen Verstärker und Steuerelektronik, incl. Computer, untergebracht waren. Für die ionensensitiven Mikroelektroden wurde ein hochpräziser 2-Kanal Vorverstärker (FD 223, WPI, Berlin) eingesetzt, der speziell für solche Mikroelektroden entwickelt worden war ($R_e > 10^{15}\ \Omega$). Auch hier waren die eigentlichen Verstärkerelemente in unmittelbarer Nähe der Mikroelektrode fixiert (ca. 40 mm).

Abbildung B.4 Blockschaltbild der Verstärkeranordnung und Position der Elektroden (aus Schwahn, 1998).



Nach der Impedanzwandlung durch die Vorverstärker (1:1) konnten die Spannungssignale umschaltbar 5fach oder 20fach verstärkt werden. Zusammen mit der anschließenden Spannungsverstärkung (100fach) in der A/D-Wandler Einheit (SSH-16 & DAS-16jr) ergab sich so ein Messbereich von ± 10 mV bzw. $\pm 2,5$ mV bei 12 bit Auflösung. Tatsächlich aufgezeichnet wurden nicht die Signale der Elektroden (A), (B), (R) und (I) sondern die im Verstärker errechneten Differenzen ($A-B = TTP$, $A-R = TRP$, $R-B = TEP$; Abbildung B.4), sowie aus dem Potential des ionensensitiven Kanals der Mikroelektrode (I) das Ionensignal ($I-R = V_{ion}$).

Die A/D-Wandlereinheit bestand aus einem rauscharmen 8-Kanal Differenzverstärker mit Sample & Hold-Bausteinen (SSH-16, Computer Boards Inc., Plug-In, Eichenau), der die Spannungswerte sukzessive an den eigentlichen A/D-Wandler (DAS-16jr, Computer Boards Inc., Plug-In, Eichenau) im Computer übermittelte. Der Differenzverstärker der Kleinsignale SSH-16 befand sich, abgeschirmt von den Takteinstrahlungen des Computers, in einem separaten Gehäuse; die Übertragung der verstärkten Signale ($V_{ss}=10$ V) zum Computer verringerte somit das elektrische Rauschen des Aufbaus. Neben den vier Potentialen der Präparats wurden zusätzlich ein 5fach verstärktes TTP und das Signal einer Photozelle (P) im Strahlengang der Lichtstimulation (s. u.) als separate Kanäle aufgezeichnet. Die Samplingrate in den vorgestellten Experimenten der vorliegenden Arbeit betrug pro Kanal 200 Hz über insgesamt 6 Kanäle (= 6×200 Hz = 1200 Hz Datenerfassungsrate).

B.4.4 Filter

Um Aliasing des diskreten Signalsamplings zu verhindern und höherfrequente Störeinstrahlungen zu verringern, waren in die Signalwege der Verstärker Tiefpassfilter eingeschaltet (Abbildung B.4). Diese Filter waren in getakteter Ausführung mit Filterbaustein MAX281 (Maxim, USA) gefertigt (Eigenbau) und wiesen Bessel-Charakteristik mit Güte 10ter Ordnung auf. Die Taktfrequenz konnte umgeschaltet werden, um die obere Grenzfrequenz der Filter auf 30 Hz bzw. 300 Hz zu begrenzen. Bei einer Samplingrate von 200 Hz betrug die eingestellte Bandbreite des Systems 0 Hz bis 30 Hz.

B.4.5 Mikromanipulator und Elektrodenbewegung

Zur Positionierung der Mikroelektrode im Netzhautpräparat diente ein piezoelektrisch getriebener Linearmotor (IW 711-01_{LSO}, Burleigh Instr., USA; Abbildung B.1, **m**) mit reproduzierbarer Genauigkeit von 0,5 μm über 25 mm linearen Weg bei einer Geschwindigkeit von ca. 3,5 mm/sec (max. Lateralbewegung: 0,2 μm). Dieser war an ein Steuergerät 6100ULN (Burleigh Instr., USA) mit „closed loop“ Positionskontrolle und Digitalanzeige angeschlossen, das die notwendigen Hochspannungsimpulse zum Betrieb des Piezo-Motors erzeugte. Feste Schrittweiten konnten programmiert werden.

Die Glasmikroelektrode (Abbildung B.1, **e**) wurde über eine Halterung an der Spitze der Motorachse fixiert, der gesamte Motor zur Messung über die Perfusionskammer geschwenkt und die Elektrode durch die nach oben offene retinale Perfusion von der ehemals vitrealen Seite in das Präparat abgesenkt. Die Penetration erfolgte somit von der proximalen (inneren) Ganglienzell-/Nervenfaserschicht (0 μm) der Netzhaut in Richtung distaler (äußerer) Netzhaut und RPE. Die apikale Membran des Pigmentepithels wurde bei 1-2 Wochen alten Hühnern bei etwa 300 μm erreicht. Dort verblieb die Mikroelektrode für Messungen entweder im subretinalen Raum (SRS) oder knapp über den inneren Segmenten der Fotorezeptoren. Eine programmierte Schrittweite von 30 μm (bei 3,5 mm/sec) innerhalb des Netzhautpräparats, erwies sich als zweckmäßig.

B.5 Ionensensitive Mikroelektroden

B.5.1 Grundprinzip

Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen zwei Lösungen verschiedener Ionenkonzentration, die durch eine selektiv-permeable Membran getrennt sind, bestimmt die elektrische Potentialdifferenz nach der Nernst-Gleichung aus dem Konzentrationsverhältnis des Ions, welches durch die Membran diffundieren kann:

aus $W_{\text{elektrisch}} = W_{\text{chemisch}}$ ergibt sich:
$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[\text{ion}]_a}{[\text{ion}]_b}$$

Diese Beziehung stellt das stark vereinfachte Grundprinzip der ionenselektiven Messung dar. Tatsächlich werden mit ionenselektiven Harzen als selektiv-permeable Membranen, in denen Ionentransporter-Moleküle gelöst sind, die Ionen-Aktivitäten gemessen. Die Aktivität des Kaliumions (a_{K^+}) in einem „Standard“-Extrazellulärmedium (z.B. Ringer's) entspricht jedoch weitgehend seiner Konzentration $[K^+]_o$ (Coles, 1992). Da zusätzlich die Anwesenheit von Fremdionen die Sensitivität sowie die Selektivität des Harzes beeinflusst, ist es zweckmäßig, die Elektrode in der Lösung zu kalibrieren, worin auch später die Messungen durchgeführt werden. Obwohl das hier verwendete kaliumselektive Harz (s. u.) auch für Natriumionen, Cholin und quarternäre Amine empfindlich war (Ammann *et al.*, 1987), konnten diese Störungen bei den Messungen im Netzhautpräparat vernachlässigt werden (ausführliche Theorie zu ionenselektiven Mikroelektroden siehe: Ammann, 1986).

B.5.2 Präparation der Elektroden

Zum Einsatz kamen 2-kanalige „double barrelled“ Glasmikroelektroden mit kreisrundem Querschnitt, durch ein Septum in zwei Kanäle getrennt („ Θ -Konfiguration“, Borosilicatglaskapillaren; Fa. Hilgenberg, 34323 Malsfeld). Dieses Elektrodendesign (Wen & Oakley II, 1990) erlaubte die Fertigung kleinerer Spitzen (s. u.) als mit herkömmlichen 2-kanaligen Elektroden der „8-Konfiguration“ (Karwoski *et al.*, 1985). Die Verletzung des Präparats durch diese feinen Elektroden war deutlich geringer. Die Elektroden wiesen außerdem verbesserte elektrische Eigenschaften auf (s. u.).

Gezogen wurden die Glaskapillaren auf einem vertikalen (gravitativen) Elektroden-Ziehgerät (PC-10, Narishige, Tokyo). Die feinen Spitzen der gezogenen Kapillaren wurden unter dem Mikroskop auf einen Durchmesser von 7-12 μm abgebrochen, indem sie unter visueller Kontrolle gegen einen harten Gegenstand gedrückt wurden. Durch diese „Bruchtechnik“ erübrigte sich ein anschließendes Anschleifen der Elektrode („beveling“).

Das ionenselektive Harz wurde mit einer Spritze (RN701, Hamilton, Schweiz) mit feiner Kanüle (Länge: 100 mm, 32 G) in die äußerste Spitze eines Kanals der ausgezogenen Kapillare eingebracht (ca. 1-2 mm der Kapillarsäule). Um das Harz in der Spitze zu halten, musste zuvor der ionenselektive Kanal der Glaselektrode lipophilisiert werden. Dazu wurde unmittelbar nach dem Ziehen der Kapillare die Glaswandung des späteren lipophilen Kanals mit einer Kanüle (20 G) vom stumpfen Ende der ca. 55 mm langen Kapillare an über ungefähr 15 mm weggebrochen, um den nun überstehenden Referenzkanal in der Flamme verschließen zu können und vor der anschließenden Lipophilisierung zu schützen. Je sechs der so vorbereiteten Kapillaren wurden mit dem Ende nach unten durch exakte Bohrungen im PE-Deckel eines Präparatfläschchens gesteckt. In das Fläschchen wurden unter dem Abzug wenige Tropfen eines Gemisches aus Dimethyldichlorosilan (D-3870, Sigma) und CHCl_3 (1:4) gegeben. Die leicht flüchtige Flüssigkeit entwich bei Zimmertemperatur aus dem Gefäß über die unverschlossenen Kanäle der Glaskapillaren (Einwirkdauer: ca. 90 sec). Die Oberfläche dieses Kanals wurde dadurch „silanisiert“ d.h. seine Adhäsionsspannung zum lipophilen Harz verstärkt. Der versiegelte Referenzkanal wurde durch Wegbrechen des verschmolzenen Endes wieder geöffnet und konnte nun bis zur Spitze mit Elektrolyt (hier: Perfusionsmedium) gefüllt werden. Auch der ionenselektive Kanal wurde nach Befüllen der Spitze mit Harz mit Elektrolyt aufgefüllt. Beide Kanäle wurden anschließend mit frisch chlorierten Silberdrähten (Ag/AgCl) beschickt und mit Wachs verschlossen. Die präparierten Elektroden wurden sofort zur Messung eingesetzt.

B.5.3 Elektrische Eigenschaften und Sensitivität

Der elektrische Widerstand des ionensensitiven Kanals lag bei Verwendung von kaliumselektivem Harz (Potassium Ionophore I – Cocktail B, 60398, Fluka) zwischen $0,8 \text{ G}\Omega$ und $2,8 \text{ G}\Omega$ bei Spitzendurchmessern von $12 \text{ }\mu\text{m}$, bzw. $7 \text{ }\mu\text{m}$. Die Antwortzeit am Verstärker FD 223 für K^+ -sensitive Elektroden mit $10 \pm 3 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser lag bei einem Wechsel der Kaliumkonzentration $[\text{K}^+]$ zwischen 2 mM und 5 mM (innerhalb ca. 10 ms) bei $160 \pm 42 \text{ ms}$, die Antwortamplitude betrug dabei $21 \pm 1 \text{ mV}$. Daraus errechnete sich eine Zeitkonstante von ca. 100 ms ($7,6 \text{ ms/mV}$). Gemessen wurde diese Zeiten durch schnelle Bewegung

der Elektrodenspitze um 20 μm zwischen zwei laminaren Strömungen unterschiedlicher Konzentration, die aus einer 2-kanaligen Glaskapillare in „ \oplus -Konfiguration“ (s. o.) mit einem Durchmesser von ca. 200 μm strömten. Die Messanordnung war eine Modifikation der von Wen und Oakley II (1990) beschriebenen.

Auf eine Kalibrierung der ionensensitiven Elektroden wurde im Verlauf der Versuche verzichtet, da sich herausstellte, dass die Unterschiede in den Kalium-Antworten zwischen den einzelnen Netzhautpräparaten weitaus größer waren, als die Unterschiede zwischen den Kaliumsensitivitäten der Elektroden. Gleiches galt für die in vorliegender Arbeit verwendeten kalziumsensitiven Elektroden (Calcium Ionophore I - Cocktail B, Fluka). Außerdem trat bei den kalziumsensitiven Elektroden während des Versuchs meist eine deutliche Drift auf. Daher wurde von einer Umrechnung der gemessenen Spannungen in Kalziumkonzentrationen Abstand genommen. Für diese Arbeit wurden der ionenselektive Kanal nur zum Nachweis von Änderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration eingesetzt und nicht zur Bestimmung absoluter Werte.

B.6 Stimulation des Präparats

B.6.1 Lichtstimulation und Lichtintensität

Die Amplitude der lichtinduzierten isolierten RPE c-Welle (s. Kapitel C) ist ein Maß für die „Kaliumsensitivität“ der RPE Zellen. Prozesse, welche die elektrischen Eigenschaften (Membranpotential, Ionenleitfähigkeit, elektrischer Widerstand (s. u.) der apikalen und/oder der basalen Membran modulieren, führen zu Veränderungen in der c-Wellen Amplitude des RPE (Linsenmeier & Steinberg, 1983).

In dieser Arbeit wurde zur Stimulation der ERG-Wellen des Netzhautpräparats eine Halogen-Quartzlampe (12 V, 50 W, Bellaphot, Osram; Abbildung B.6) mit Hohlspiegel und Kondensorsystem eingesetzt. Dem Kondensorsystem waren ein Wärmeschutzfilter und ein Graufilter (NG 4) nachgeschaltet. Das Licht wurde über eine Sammellinse durch die Öffnung (Durchmesser: 6 mm) eines

elektromagnetischen Verschlusses (Uniblitz 26L, Vincent Assoc. Inc., Rochester) auf ein Lichtleiterbündel (Durchmesser: 5 mm, Länge: 120 cm; Abbildung B.1, **b**) projiziert. Das Lichtleiterbündel endete in 40 mm Abstand über der Perfusionskammer und erzeugte dort eine diffuse Lichtstimulation des Netzhautpräparates. Zum Betrieb des elektromagnetischen Verschlusses (Abbildung B.5) diente eine Spannungsquelle, welche durch TTL-Impulse (set, reset) eines über Software programmierbaren Zählerbausteins gesteuert wurde (Abbildung B.13). Öffnungs- und Schließzeit des Verschlusses betragen ca. 1 ms.

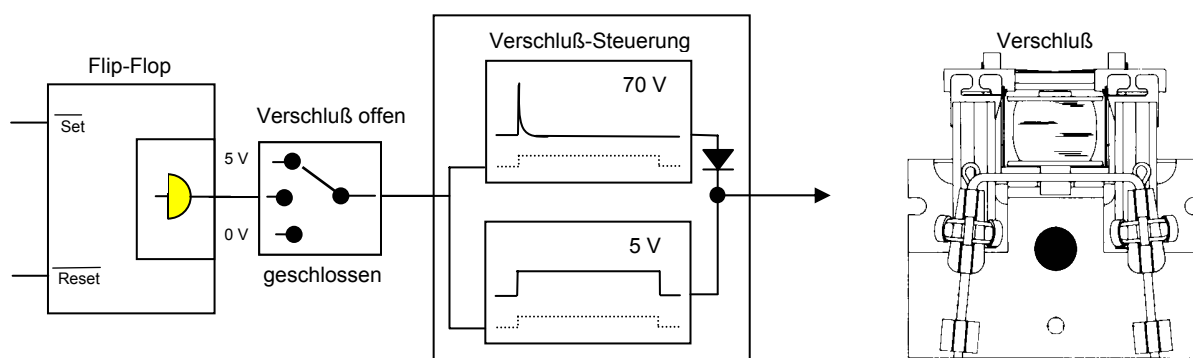


Abbildung B.5 Blockschaltbild der Verschlußsteuerung zur Lichtstimulation (aus Schwahn, 1998).

Die Lampe wurde in den meisten Experimenten mit 5,0 V Unterspannung betrieben, die erzielte Strahlungsleistung auf der Höhe des Präparates war dann ca. $8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (radiometrisch). Bei dieser Lichtintensität lag die Amplitude der ERG-Antwort der Präparate auf eine Lichtstimulation von 4 s Dauer im Schnitt bei etwa 65% der maximal erreichbaren Amplitude (c-Welle). Für den Erhalt der Stoffwechselaktivität im Präparat und zur Vermeidung übermäßiger Pigmentbleichung in den Photorezeptoren erwies sich diese Intensität aus Vorversuchen als zweckmäßig. In den Vorversuchen wurde die Lampenspannung im Bereich zwischen 2,7 V und 7,9 V variiert (Abbildung B.6), entsprechend einer Strahlungsleistung von $0,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ bis $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ auf dem Präparat.

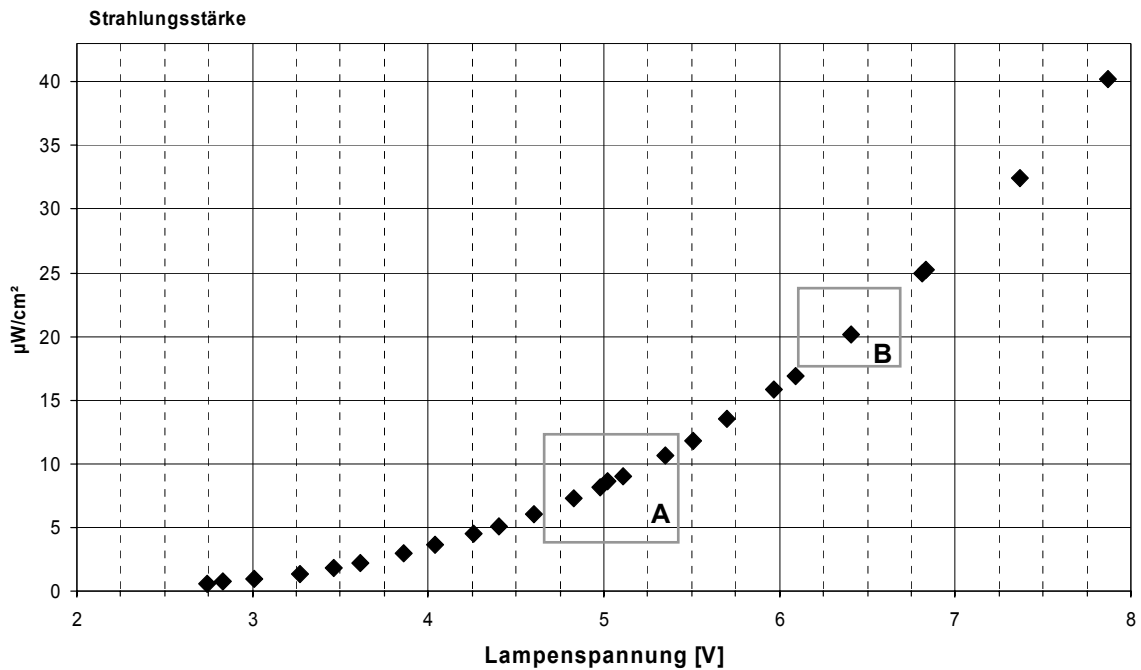


Abbildung B.6 Strahlungsleistung auf der retinalen Oberfläche des Netzhautpräparats bei verschiedenen Lampenspannungen. Die grau umrandeten Bereiche geben den Intensitätsbereich an, in denen (A) die ERG-Stimulationen durchgeführt wurden (B) für in vitro-Freisetzungsexperimente, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit stattfanden; aus Schwahn, 1998).

B.6.2 Strominjektion

In einigen Experimenten wurde der elektrische Widerstand des Netzhautpräparats bestimmt. Dazu wurde eine batteriebetriebene Konstantstromquelle verwendet (Abbildung B.7), die über TTL-Impulse des programmierbaren Zählerbausteins gesteuert war (Abbildung B.12); Stromstärken von $0,1 \mu\text{A}$, $1,0 \mu\text{A}$ und $10 \mu\text{A}$ waren umschaltbar. In den vorgestellten Experimenten wurde ein $0,5 \text{ sec}$ Stromimpuls von $1,0 \mu\text{A}$ mit positiver Polarität auf der retinalen Seite über separate Badelektroden in der choroidalen und retinalen Perfusion periodisch appliziert. Die zur Strominjektion eingesetzten Badelektroden waren baugleich mit den zur Spannungsmessung verwendeten Badelektroden (s. o.).

Neben der RPE c-Wellen Amplitude (s. o.) ist der elektrische Widerstand ein wichtiges Maß, welches Hinweise gibt über Modulationen an Transportprozessen und Kanaleigenschaften an den Membranen des RPE (s. u.).

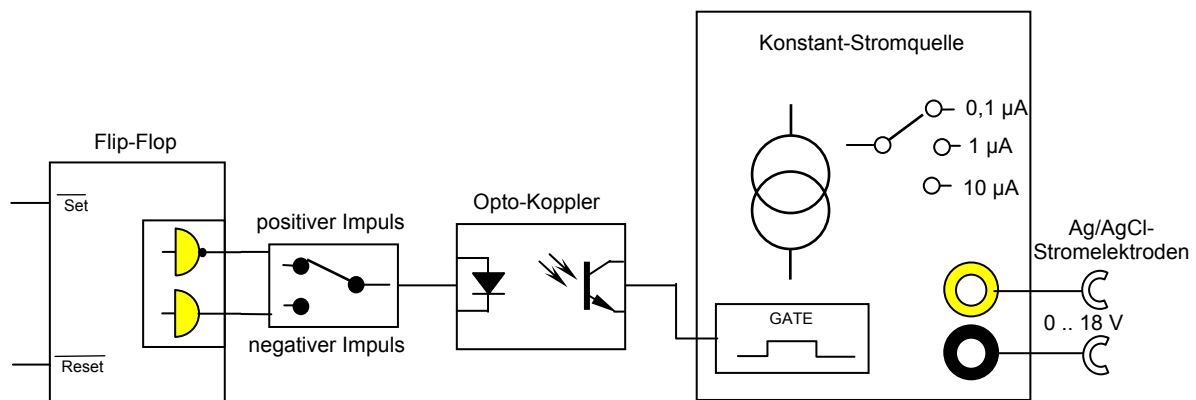


Abbildung B.7 Blockschaltbild der Konstantstromquelle zur Widerstandsmessung im Präparat (aus Schwahn, 1998).

B.7 Entstehung und Abhängigkeit des transepithelialen Potentials

B.7.1 Elektrisches Ersatzschaltbild des Netzhautpräparats

Das transepitheliale Potenzial, gemessen über das RPE (TEP) zwischen einer Mikroelektrode im subretinalen Raum (**R**) und der choroidalen Badelektrode (**B**), wurde bestimmt durch die Summe des Membranpotentials der apikalen Membran V_{ap} und der basalen Membran V_{ba} (Abbildung B.8). Dabei wurde das TEP durch den Kurzschlussstrom I_2 über den Isolationswiderstand R_{iso} des Präparates und der Kammer (über die Ränder des Präparats) deutlich abgeschwächt. Nach Miller & Steinberg (1977) sind Unterschiede zwischen den Präparaten in der Größe der gemessenen TEPs (Gleichspannungs-Bestandspotential) maßgeblich durch Unterschiede in der Fixierung und Isolation der Präparate in der *in vitro* Perfusionskammer (und damit R_{iso}) zu erklären und weniger durch interindividuelle Differenzen in den tatsächlichen TEPs. Man konnte jedoch davon ausgehen, dass die Einwirkung von Pharmaka, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, R_{iso} nicht beeinflussten. Deshalb wurde zur Vereinfachung auf die Einberechnung von R_{iso} verzichtet.

Die Membranbatterien errechnen sich aus den Leitfähigkeiten für die einzelnen Ionen

$$E_{ap} = \frac{\sum_i g_{api} \cdot E_i}{\sum_i g_{api}}; E_{ba} = \frac{\sum_i g_{bai} \cdot E_i}{\sum_i g_{bai}}$$

mit deren Gleichgewichtspotential

$$E_i = \frac{RT}{zF} \ln \left[\frac{[Ion]_{\text{außen}}}{[Ion]_{\text{innen}}} \right]$$

Nach dem Schema in Abbildung B.8 ergibt sich dann für einen Stromfluss über das RPE getrieben durch das Gleichspannungs-Bestandspotential (TEP; s. auch Kapitel C) ein geschlossener Stromkreis aus E_{ba} , R_{ba} , E_{ap} , R_{ap} und R_{sh} mit dem transepithelialen Strom I_{RPE} , im Betrag gleich dem Kurzschlussstrom I_1 durch den parazellulären Shunt R_{sh} .

Das TEP berechnet sich dann aus

$$TEP = V_{ba} - V_{ap}$$

mit
$$V_{ap} = E_{ap} - I_1 \cdot R_{ap} \quad \text{und} \quad I_1 = \frac{E_{ap} - E_{ba}}{R_{ap} + R_{ba} + R_{sh}}$$

$$V_{ba} = E_{ba} + I_1 \cdot R_{ba}$$

Prozesse, die zu Änderungen in einem oder mehreren dieser Parameter führen, z.B. Schließen von Ionenkanälen, Veränderung der extrazellulären Ionenkonzentration, bewirken eine Änderung des TEP.

Für transiente Änderungen der apikalen Membranbatterie ΔE_{ap} , z.B. bei der Erzeugung der ERG c-Welle, mit R_{ap} , R_{ba} , $R_s = const.$ ergibt sich

$$\Delta V_{ap} = \Delta E_{ap} \cdot \frac{R_{ba} + R_{sh}}{R_{ap} + R_{ba} + R_{sh}}; \Delta V_{ba} = \Delta E_{ap} \cdot \frac{R_{ba}}{R_{ap} + R_{ba} + R_{sh}}$$

durch R_{sh} kommt es dabei zu indirekten, passiven Änderungen des basalen Membranpotentials ΔV_{ba} , diese sind möglichen aktiven Änderungen von V_{ba} überlagert.

Für die Amplitude ΔTEP der isolierten RPE c-Welle ergibt sich dann

$$\Delta TEP = - \left[\frac{R_{sh}}{R_{ap} + R_{ba} + R_{sh}} \right] \cdot \Delta V_{ap}$$

Die Amplitude der RPE c-Welle ist also ebenso wie das TEP von den elektrischen Eigenschaften des RPE abhängig.

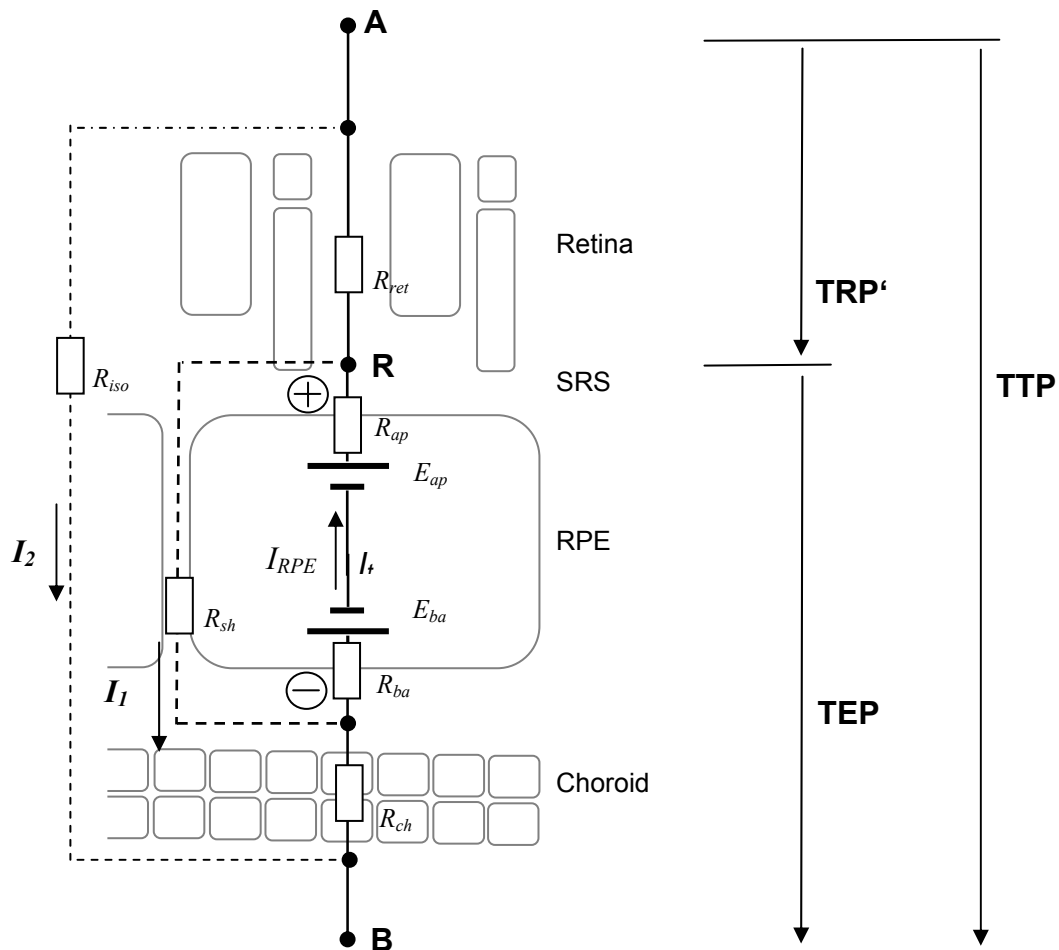


Abbildung B.8 Ersatzschaltbild des Netzhautpräparats zur Generierung des trans-epithelialen Potentials (TEP). Ströme sind eingezeichnet für ein vitreal positives Bestandpotential. Die Differenz der Membranbatterien der apikalen (E_{ap}) und der basalen (E_{ba}) Membran des RPE, abzüglich der Spannungsabfälle entlang der Serienwiderstände im Präparat und der Kurzschlußströme (I_1 , I_2) der Parallelwiderstände produziert die am Präparat gemessenen Potentiale TTP, TEP. Das in der neuralen Netzhaut aktiv erzeugte Potential, das TRP, wurde nicht berücksichtigt; über den Kurzschlußstromkreis über R_{iso} und R_{ret} , I_2 , wird in der Netzhaut ein passives TRP' erzeugt (aus Schwahn, 1998).

B.7.2 Widerstandsmessung am retinalen Pigmentepithel (RPE)

Es wurde davon ausgegangen, dass der Hauptwiderstand des Präparats im RPE lokalisiert ist: Die Epithelzellen bilden durch tight-junctions eine relativ dichte Barriere für einen parazellulären Ionenfluss, der weitaus größte Teil der Ionen, und damit der elektrische Strom, fließt über die apikale und basale Membran des RPE. Die neuronale Netzhaut sollte relativ dazu einen geringeren elektrischen Widerstand besitzen, ihr elektrischer Widerstand wird durch parazellulären Ionenfluss und durch transzellulären Ionenfluss durch die Müllerzellen bestimmt. Abbildung B.8 zeigt ein Ersatzschaltbild der elektrischen Widerstände des Präparats. Durch Verwendung der Konstantstromquelle ist der Spannungsabfall zwischen den Elektrodenpositionen (**A**, **R** und **B**) proportional zum Widerstandsnetzwerk, das sich jeweils zwischen den Elektroden befindet:

$$R_{tot} = I \cdot (U_A - U_B); R_{RPE} = I \cdot (U_R - U_B)$$

Werden der Isolationswiderstand der Kammer R_{iso} und der Widerstand des Choroids R_{ch} als unveränderliche, „passive“ Größen im Präparat definiert, vereinfacht sich die Formel für den Gesamtwiderstand des RPE (R_{RPE}) zu

$$R_{RPE} = R_{sh} \cdot \frac{R_{ap} + R_{ba}}{R_{ap} + R_{ba} + R_{sh}}$$

B.8 Rechnergesteuerte Datenerfassung

B.8.1 Hardware und Entwicklungsumgebung

Ein IBM-kompatibler PC (AcerPower 486DX2/66MHz oder Amatic 486DX2/100MHz ab Jan. 2002) mit 24 bzw. 32 MB RAM-Speicher, betrieben unter dem MS-DOS gestützten Betriebssystem Windows 3.11 (Microsoft), war Mess- und Steuercomputer und diente ebenfalls der Datenauswertung. Für die speziellen Anforderungen des *in vitro* Experiments konnte nicht auf fertige, konfektionierte Software zurückgegriffen werden; alle Programme zur

Datenaufnahme und Stimuluserzeugung mussten daher selbst entwickelt und an die Hardware angepasst werden.

Daher wurden mit der Entwicklungsumgebung LabView (Version 3.1, National Instruments, München) unter Windows 3.11 die Programme zur Datenaufnahme und Datenauswertung programmiert. LabView unterstützte und verwaltete die Ansteuerung der in diesem System verwendeten ISA-Bus Einsteckkarten (Computer Boards Inc., Plug-In, Eichenau; Tabelle B.2). Die Programmierung erfolgte graphisch und datenflussorientiert. Die graphischen Quellcodes der Programme sind der Dissertation von Schwahn (1998) im Appendix aufgeführt.

Datenaquisitionskarte (12 bit A/D-Wandler)	CIO-DAS16jr
8-Kanal Differenzverstärker mit Sample&Hold-Funktion	SSH-16
5 x programmierbarer Zähler (Am9513)	CIO-CTR05
8 bit Digital out (74LS273)	CIO-CTR05
8 bit Digital in (74LS373)	CIO-CTR05
8 bit Digital out, Relaiskarte	CIO-PDISO08

Tabelle B.2 Einsteckkarten als Komponenten des computergesteuerten *in vitro*-Setups.

B.8.2 Das Programm IVChick

Das Blockschema der Hauptroutine „IVChick main“ (Abbildung B.9) ist dargestellt für einen Durchgang (Iteration). Pro Iteration wurde, im Falle einer wiederholten ERG-Wellen Registrierung, einmal lichtstimuliert. Am Ende der Iteration wurden die gesammelten Daten auf Festplatte geschrieben, während parallel mit einer neuen Iteration begonnen wurde; eine kontinuierliche Datenaufzeichnung war somit möglich.

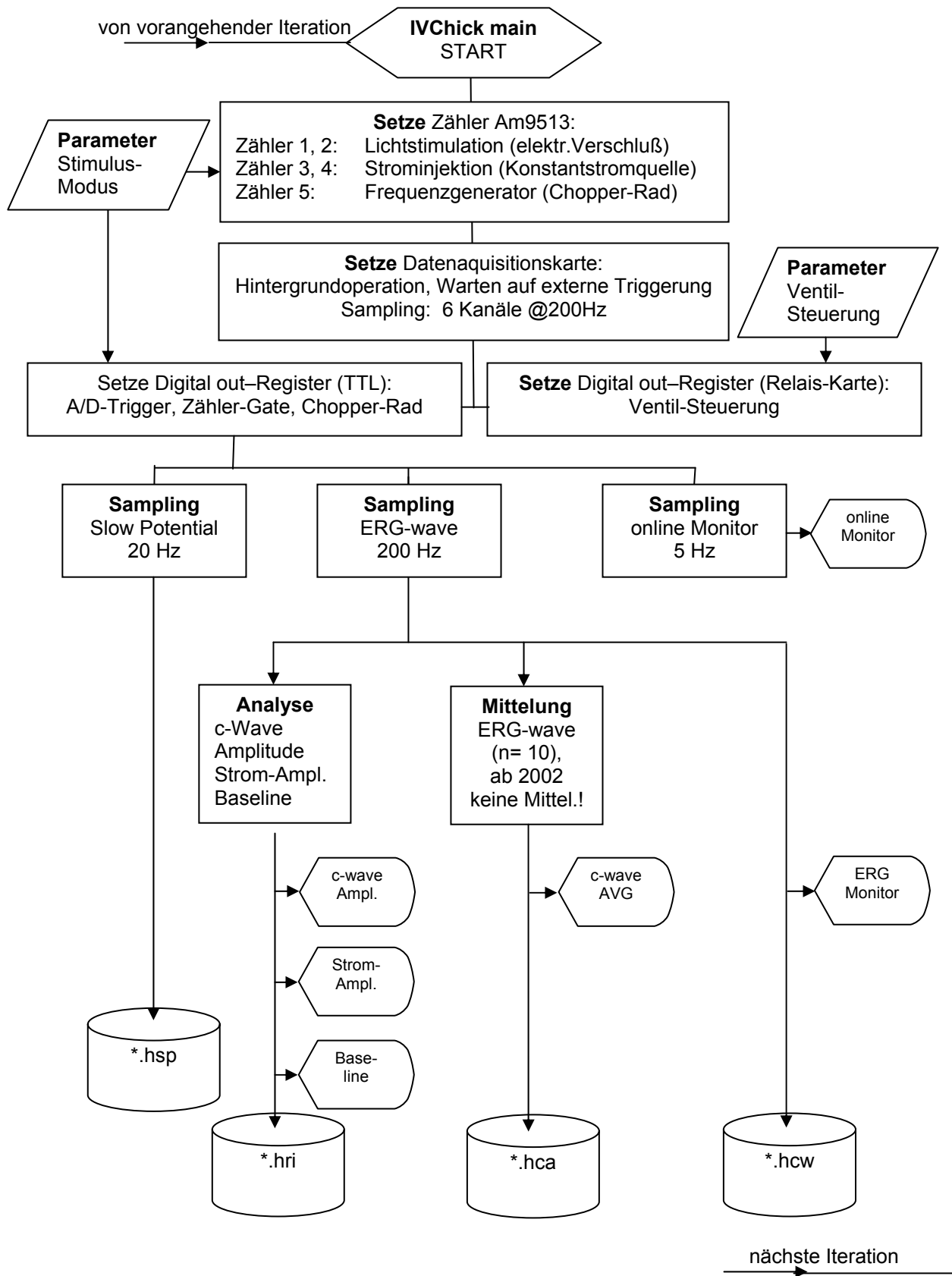


Abbildung B.9 Flußdiagramm von IVChick main (1 Iteration; aus Schwahn, 1998).

Dieses Programm wurde auf Multitaskingfähigkeit hin entwickelt und läuft mit den meisten Standard „Office-Anwendungen“. Die Datenaquisitionskarte, die mit einem eigenen Prozessor ausgestattet war, wurde zu Beginn einer Iteration von der Hauptroutine „programmiert“ und die gesammelten Daten wurden, parallel zur online Monitorarstellung (Abbildung B.10, *rechts*), zur online Datenanalyse und am Ende jeder Iteration *en bloc* zur Speicherung auf Festplatte abgerufen. Ein Datenverlust konnte so vermieden werden.

Die Hauptroutine „IVChick main“ wurde über das Steuerprogramm „IVChick stage control“ (Abbildung B.10, *links*) mit Parametern über die Art der Stimulation, Anzahl und Länge der Iterationen, sowie über weitere Komponenten zur Versuchssteuerung (Abbildung B.11) im Voraus oder während der Messungen programmiert, die dann von der Hauptroutine sukzessive „abgearbeitet“ wurden. Folgende Routinen wurden in „IVChick main“ implementiert:

- Programmierung der Zähler im Zählerbaustein Am9513 (s. u.) zur Stimulationserzeugung
- Programmierung der Hintergrundoperation der Datenaquisitionskarte
- Steuerung des Lösungswechsels der Perfusion durch Magnetventile
- Synchrones Starten der A/D-Wandlung und Stimulation
- Datenübertragung von der Aquisitionskarte zur online Darstellung der Daten
- Datenübertragung von der Datenaquisitionskarte der ERG-Daten (6 x 200Hz) über die Zeit der ERG-Stimulation
- Sichern der ERG-Daten auf Festplatte
- online Analyse und fließende Mittelung (aus 10 Einzelwerten) der ERG-Daten für die Monitorausgabe
- Sichern der ERG-Analyse und Mittelung auf Festplatte, da diese Mittelungsfunktion eine Dämpfung und eine Phasenverschiebung der schnellen Komponenten des ERGs (a-, b- und d-Welle) verursachte, wurden die Messwerte ab März 2002 ohne vorherige Mittelung gespeichert
- Datenübertragung von der Datenaquisitionskarte der DC-Potential-Daten (Slow Potential, 4 x 20 Hz)
- Sichern der Slow Potential-Daten auf Festplatte
- Abfragen der Parameter für die nächste Iteration

Abbildung B.10 Bildschirmdarstellung von „IVChick“; *links*: Fenster der Routine „IVChick stage control“ zur Parametereingabe; *rechts*: Fenster der Hauptroutine „IVChick main“ zur online-Anzeige der aufgenommenen Daten, ERG-Welle und online-Analyse (aus Schwahn, 1998).

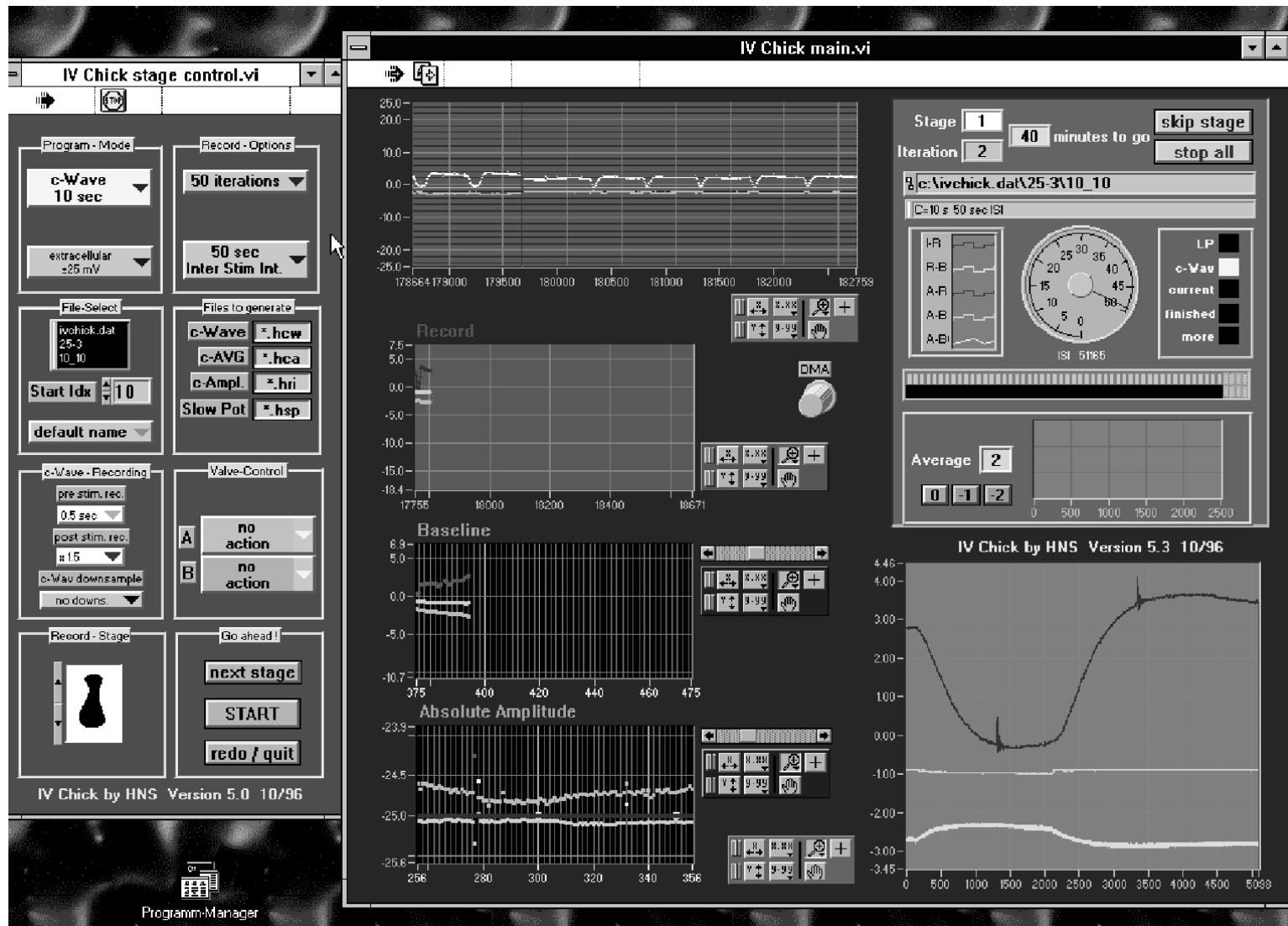
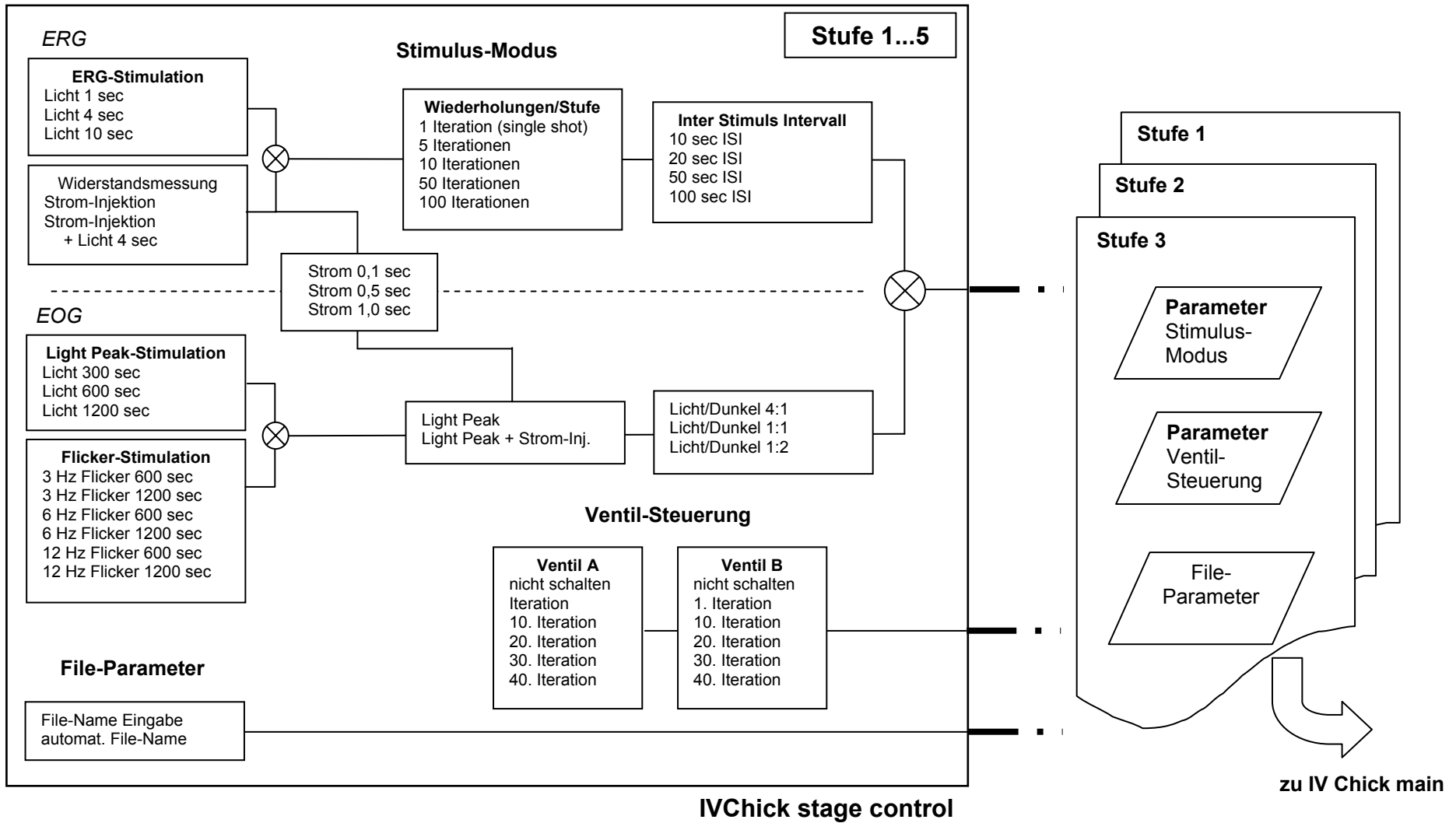


Abbildung B.11 Blockdiagramm der Auswahlmö-Module von IVChick stage control zur Festlegung der Stimulusparamtern und der Programmoptionen von IVChick main (aus Schwahn, 1998).



B.8.3 Zählereinheit und Programmierung der Stimulation

Im Zählerbaustein Am9513 (AMD, Sunnyvale, CA) waren fünf frei programmierbare 16 bit Zähler für die synchrone Stimuluserzeugung verfügbar. Nach einmaliger Programmierung der Zählerfunktion am Beginn der Messungen, wurden die Register vor jeder Iteration über die Hauptroutine „IVChick main“ mit den entsprechenden Stimulusparametern geladen und über Setzen des „digital out“-Ports zusammen mit der A/D-Wandlung getriggert. Die Abbildung B.13 zeigt die Registerwerte für einen 4 sec Lichtstimulus und einen 0,5 sec Stromimpuls 8 sec nach Ende des Lichtstimulus. Der Frequenzgenerator für die Flimmerscheibe ist hier eingestellt auf 12 Hz. Über die von den Zählern erzeugten Triggerimpulse wurden die Flip-Flop-Bausteine der Stimulusgeneratoren gesteuert; die Abbildung B.12 zeigt den Ablauf dieser Stimulationssequenz.

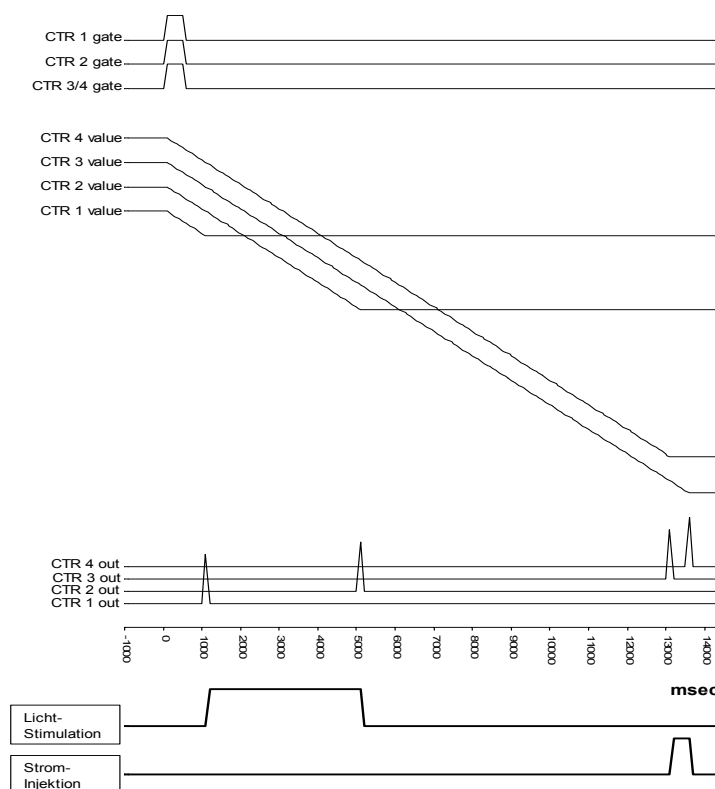


Abbildung B.12 Stimulationsablauf dargestellt anhand der Registerwerte der Zähler für einen 4 s Lichtblitz und einer anschließenden Strominjektion von 0,5 s (aus Schwahn, 1998).

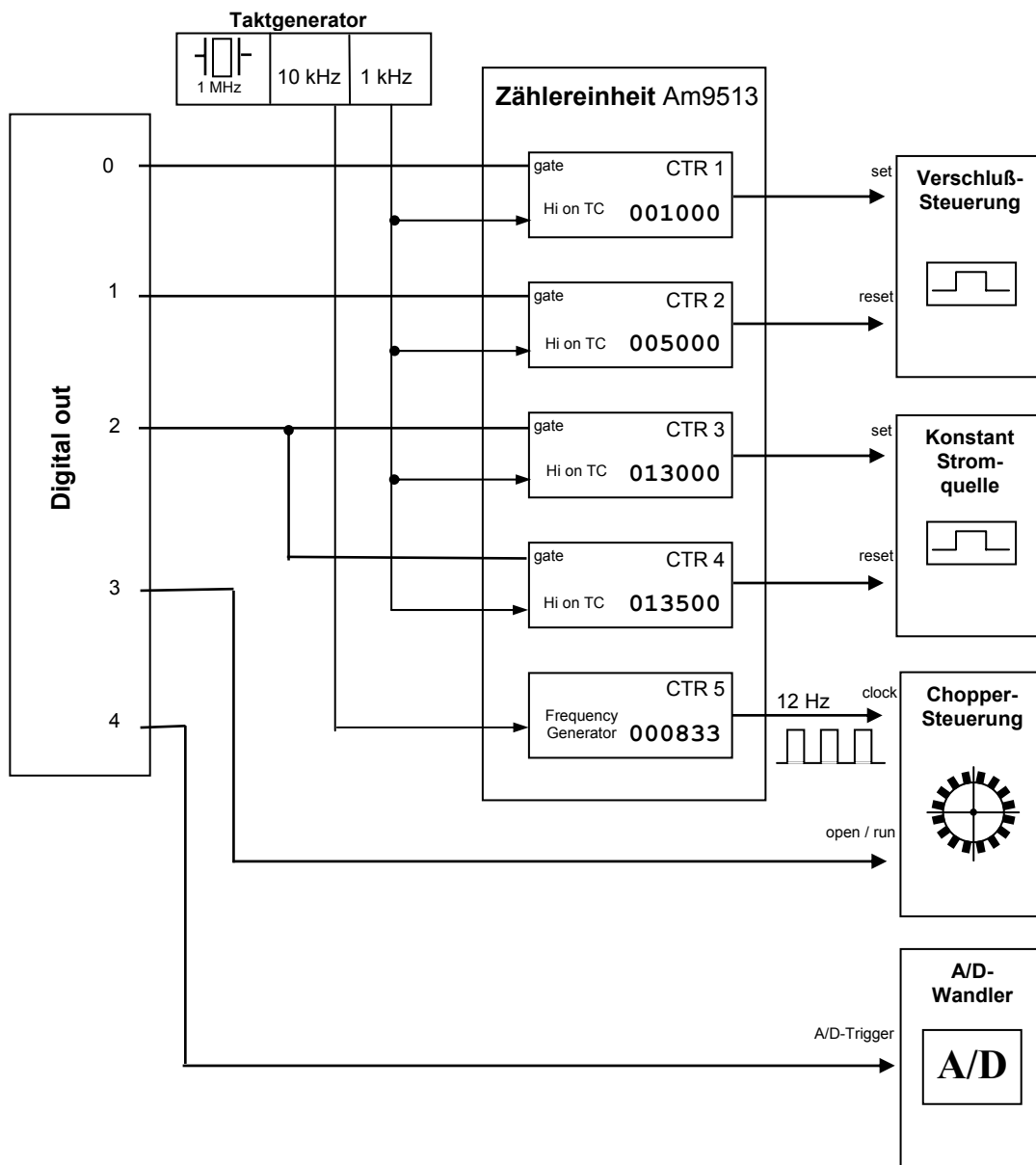


Abbildung B.13 Blockschaftbild der Zählereinheit zur Stimulusgenerierung und zur Triggerung der A/D-Wandlung mit dem Digital out-Port der Einsteckkarte (aus Schwahn, 1998).

B.9 Auswertung der *in vitro* Daten

B.9.1 Online-Datenanalyse

Zur Auswertung der ERG-Aufzeichnung wurde von der Hauptroutine „IVChick main“ bei jeder Iteration (Stimulation) die Maximalamplitude der Spannungsänderung zum Zeitpunkt 3900 ms (gemittelt über 10 Datenpunkte = 50 ms bei 200 Hz) nach Beginn einer Lichtstimulation von 4 sec als „light amplitude“ (c-Wellen-Amplitude), die Nulllinie unmittelbar vor Beginn der Stimulation als „baseline“, sowie die Amplitude der durch die Strominjektion verursachten Spannungsänderung als „current amplitude“ registriert. Zur Kontrolle während der Messungen wurde eine Mittelung der ERG-Aufzeichnungen von jeweils zehn Iterationen durchgeführt und auf dem Bildschirm dargestellt. Die gemittelten Daten wurden von der Hauptroutine zusammen mit den ERG-Rohdaten abgespeichert und erlaubten eine schnellere Orientierung innerhalb der Aufzeichnungen mit dem Auswerteprogramm.

B.9.2 Das Programm IVAnalyze

Dieses Programm ermöglichte das Lesen der in komprimierter Form gespeicherten Daten und beinhaltete folgende Subroutinen:

- Darstellung und Auswertung der online Analyse Daten „light amplitude“, „baseline“ und „current amplitude“.
- drift-Kompensation und optionaler Tiefpassfilter mit wählbarer Eckfrequenz
- Druckinterface der online Analyse Daten.
- Interface zur Übertragung der online Analyse Daten in eine Tabellenkalkulation.
- Darstellung und Auswertung der ERG-Aufzeichnungen und der online Mittelungen.
- offline Mittelung beliebiger Iterationen, manuelle Fehlerkorrektur
- Druckinterface der ERG-Aufzeichnungen, der online und offline Mittelungen.
- Interface zur Übertragung der ERG-Aufzeichnungen, der online und offline Mittelungen in eine Tabellenkalkulation.

B.9.3 Statistik

Die elektrophysiologischen Daten sind zu Kurvenscharen zusammengefasst oder im Fall der relativen Änderungen der Amplituden als Sammlung von Datenpunkten dargestellt. Damit sind grundsätzlich alle experimentellen Daten aus den ausgewerteten Versuchen in den Gruppen von Kurven oder von Punkten als Einzelergebnis angegeben. Aufgrund der relativ großen Varianz in den Absolutwerten der elektrophysiologischen Parameter zwischen den Einzelexperimenten wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Deshalb werden bei der Darstellung der Ergebnisse keine Mittelwerte und deren Standardabweichungen angegeben, sondern die Ergebnisse sämtlicher ausgewerteter Versuche wiedergegeben.

C Herkunft und Interpretation der Signale des *in vitro* ERGs

Die methodischen und technischen Grundlagen für vorliegende Arbeit lieferten im Wesentlichen die Vorarbeiten von Hartmut Schwahn. Im Rahmen seiner Dissertation errichtete er den elektrophysiologischen Aufbau und schrieb die nötigen Aufzeichnungs- und Auswertungsprogramme (s. Kapitel B Material und Methoden). Als Übersicht über die Herkunft der wichtigsten Bestandteile des *in vitro* ERGs aus den verschiedenen Zelltypen der Netzhaut und als Einführung in die Interpretation von Veränderungen des *in vitro* ERGs verfasste er folgende Erläuterungen für Kapitel C.5.1 seiner Dissertation (Schwahn, 1998). Da sich bis zur Abfassung vorliegender Arbeit keine bedeutenden neuen oder erweiternden Erkenntnisse zu diesem Thema ergaben, wurde dieses Kapitel mit geringfügigen Veränderungen übernommen. Für die freundliche Genehmigung sei dem Autor an dieser Stelle gedankt.

In den folgenden soll die Herkunft der lichtinduzierten (bzw. lichtevozierten) Potenziale in der *in vitro* Netzhaut charakterisiert werden, um die zellulären Grundlagen für die durch Pharmaka veränderten ERG-Antworten besser verstehen zu können.

C.1 Intraretinales ERG

Durch den Einsatz ionenselektiver Mikroelektroden konnten in verschiedenen Tiefen des Netzhautpräparats extrazelluläre Potenzialänderungen abgeleitet und gleichzeitig der zeitliche Verlauf lokaler extrazellulärer Kaliumkonzentration registriert werden. Zur Erregung der ERG c-Welle im Präparat wurde periodisch mit einem Lichtblitz stimuliert (s. Kapitel B.6). Abbildung C.1 **A** zeigt das über das gesamte Präparat gemessene *in vitro* ERG nach einer 4 sec dauernden Lichtstimulation mit charakteristischer Ausprägung von a-, b- und c-Welle als

Antwort auf das Anschalten des Lichtreizes, sowie d- und c off-Welle als Reaktion auf das Abschalten des Lichtreizes.

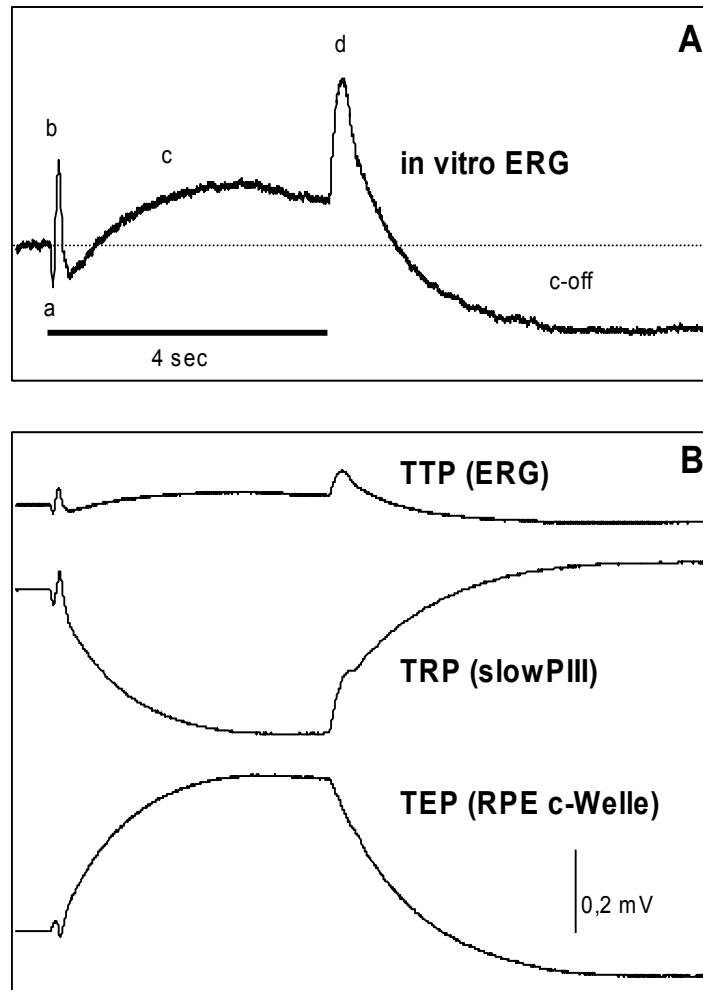


Abbildung C.1 *in vitro* ERG Aufzeichnungen aus dem Netzhautpräparat des Haushuhns. **A:** über das gesamte Präparat abgeleitetes Potential (TTP) mit den Komponenten des Wirbeltier-ERGs: a-, b-, c- und d-Welle (Skalierung: 5fach vergrößert zu **B**). **B:** intraretinale ERG-Komponenten, **TRP:** transretinales Potential der neuronalen Netzhaut, **TEP:** transepitheliale Komponente des Pigmentepithels. Beide Komponenten addieren sich zum Gesamt-ERG (**TTP**; aus Schwahn, 1998).

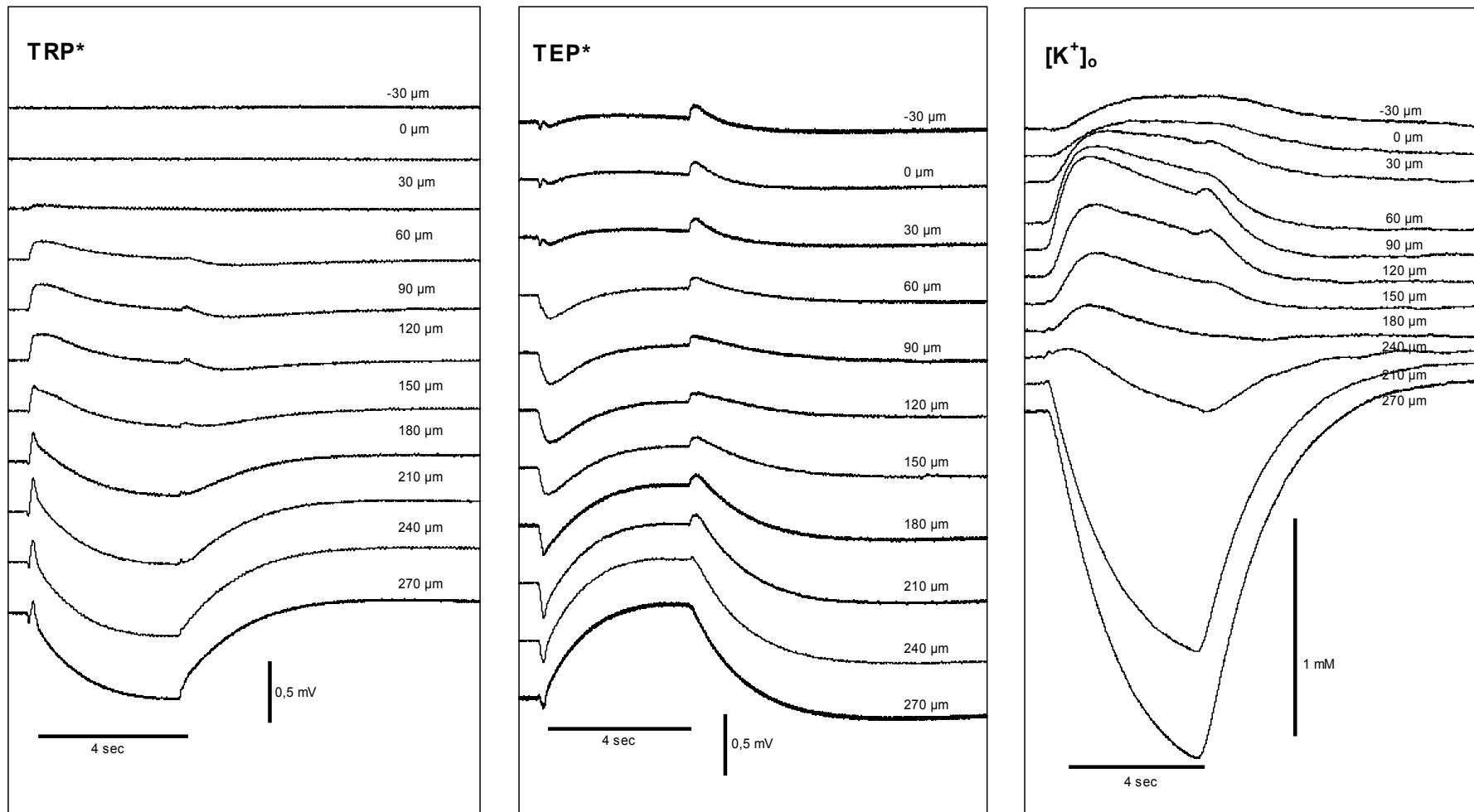
Wurde die Mikroelektrode im subretinalen Raum („subretinal space“, SRS) der Netzhaut platziert, zwischen Photorezeptor-Außensegment und apikaler Membran des retinalen Pigmentepithels, ließen sich die von neuronaler Netzhaut und Pigmentepithel generierten Potentiale getrennt ableiten. Diese

beiden intraretinalen Potentiale wurden entsprechend als transretinal (TRP) und transepithelial (TEP) bezeichnet (Abbildung C.1, **B**). Aufgrund der lichtinduzierten Abnahme des Kaliumspiegels durch die Photorezeptoren im SRS (Oakley *et al.*, 1979) entstehen langsame Potenzialänderungen im TRP durch Hyperpolarisation der distalen Enden der Müllerzellen, die in den SRS ragen (Witkovski *et al.*, 1975; Wen & Oakley, 1987; Karowski & Proenza, 1977). Diese lichtinduzierte Potenzialänderung wird im Folgenden analog der ERG-Komponentenanalyse von R. Granit (in: Granit, 1947) als „slow PIII“ bezeichnet. Aus demselben Grund hyperpolarisiert die dem SRS zugewandte apikale Membran des RPE, was zum lichtabhängigen Anstieg des TEP führt (RPE c-Welle; Oakley & Green, 1976; Steinberg *et al.*, 1980). Beide Potentiale (TRP+TEP) addieren sich zu dem über das gesamte Präparat registrierte TTP (*in vitro* ERG), d.h. slow PIII und RPE c-Welle folglich zur c-Welle des ERGs (Dowling, 1987).

C.2 Herkunft lichtinduzierter Potentiale der Netzhaut

Wurde die Mikroelektrode, an der Oberfläche des Präparates (proximale Netzhaut) beginnend, schrittweise in Richtung RPE / SRS vorgetrieben, konnten zwischen retinaler Badelektrode und Mikroelektrode (TRP*), sowie zwischen choroidaler Badelektrode und Mikroelektrode (TEP*) charakteristische Potentiale in verschiedenen Tiefen der Netzhaut aufgezeichnet werden. An jeder Position addierten sich TRP* und TEP* zum Gesamt-ERG (TTP). Gleichzeitig wurde für jede Position die extrazelluläre Kaliumkonzentration registriert. In Abbildung C.2 sind diese Profile dargestellt: Oberhalb der Netzhaut, im retinalen Bad (-30 μm), entsprach TEP* dem Gesamt-ERG (Abbildung C.1, **A**), entsprechend war TRP*=0. Die lichtkorrelierte Kaliumerhöhung an dieser Position war zeitlich verzögert und entstand allein durch Diffusion von Kaliumionen aus der Netzhaut. Ab einer Tiefe von ca. 60 μm erschien im TRP* eine erste schnelle positive Komponente (diese „fehlte“ dementsprechend in der ERG-Antwort der „restlichen“ tieferen Schichten der Netzhaut, TEP*).

Abbildung C.2 Profile intraretinaler ERG-Aufzeichnungen, gemessen von der Position der Mikroelektrode (Angaben in μm relativ zur proximalen Netzhautoberfläche) jeweils in Richtung retinaler Badelektrode (*links*, TRP*) und in Richtung choroidaler Badelektrode (*Mitte*, TEP*); *rechts*: lokale Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$). An jeder Position wurden 10-15 wiederholte Stimulationen gemittelt (aus Schwahn, 1998).



Die lichtinduzierte Kaliumänderung in dieser Netzhautregion zeigte denselben charakteristischen zeitlichen Verlauf wie das TRP*; ein ON-Anstieg und ein OFF-Anstieg ließ sich unterscheiden (Stockton & Slaughter, 1989). Mit zunehmend distaler Position der Mikroelektrode wurde diese schnelle positive Komponente schließlich von einer langsameren negativen Komponente überlagert (slow PIII in TRP*); diese hatte ihr Maximum im SRS (270 μM). Die Überlagerung eines positiven proximalen Anstiegs (60-120 μm , im Bereich der Bipolarzellen) und des zeitlich verzögerten, negativen distalen slow PIII (Dowling, 1987) führte zu einer scheinbaren Verkürzung der proximalen, schnellen positiven Welle, die der b-Welle im Gesamt-ERG (Abbildung C.1, **A**) entsprach (Newman & Frishman, 1991; Dowling, 1987).

Weitere Komponenten des intraretinalen ERGs waren die negative a-Welle und die positive d-Welle, die beide im Bereich der Photorezeptoren (ab 210 μm) generiert wurden. a- und d-Welle sind spiegelbildliche, extrazelluläre ON- bzw. OFF-Antworten der Photorezeptoren, jedoch wurde die negative a-Welle von der positiven b-Welle überlagert (s. o.), was ihren charakteristischen kurzen Verlauf (im Gegensatz zur d-Welle) erklärte. Die positive d-Welle der Photorezeptoren wurde zusätzlich von einer positiven proximalen d-Welle (60-120 μm , TRP*) überlagert (Stockton & Slaughter, 1989).

Bei 270 μM wurde in TEP* das isolierte langsame positive Potential des RPE registriert. Beide langsame Potentiale (slow PIII und RPE c-Welle) hatten ihren Ursprung in der massiven lichtkorrelierten Kaliumabsenkung im SRS und sind in ihrem Betrag (Abbildung C.3) und in ihrer zeitlich Beziehung (Abbildung C.4) streng mit der extrazellulären Kaliumkonzentration im SRS korreliert.

Das *in vitro* Netzhautpräparat zeigte dem *in vivo* ERG des Huhns vergleichbare Signale (Sato *et al.*, 1987; Wioland & Bonaventure, 1984). Gleichzeitig erlaubten intraretinale Ableitungen die Aufklärung des zellulären Ursprungs einzelner ERG-Komponenten.

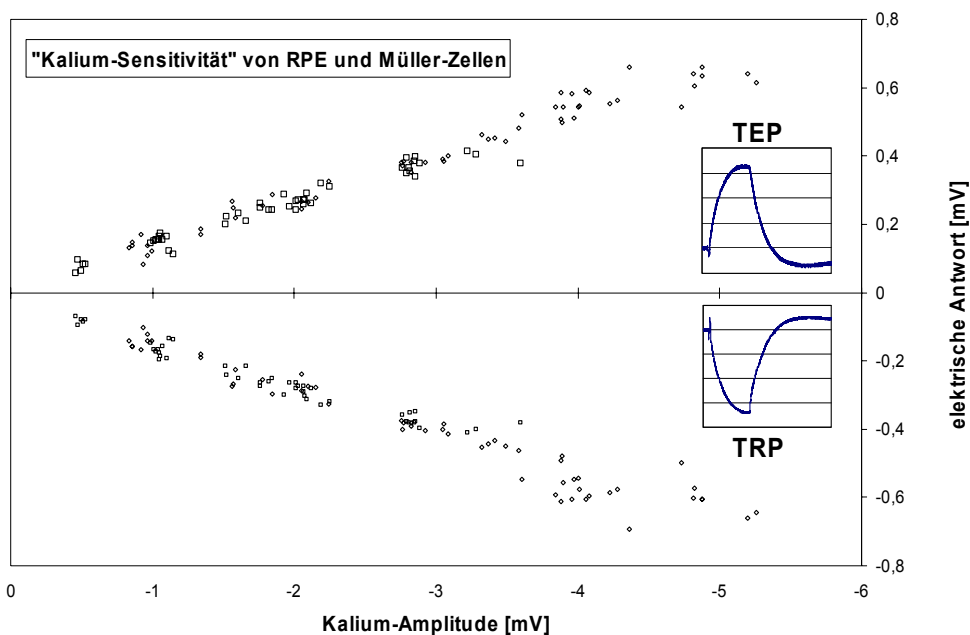


Abbildung C.3 "Größen"-Beziehung zwischen lichtinduzierter Kalium-Absenkung im SRS und slow PIII-Amplitude im TRP, bzw. RPE c-Welle im TEP. Beide Potentiale sind streng proportional zur extrazellulären Kaliumkonzentration. Die Amplitude des Abfalls der Kaliumkonzentration wurde variiert durch Lichtstimulation mit verschiedenen Intensitäten. Die verschiedenen Symbole kennzeichnen verschiedene Experimente, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten an einem Netzhautpräparat durchgeführt wurden (aus Schwahn, 1998).

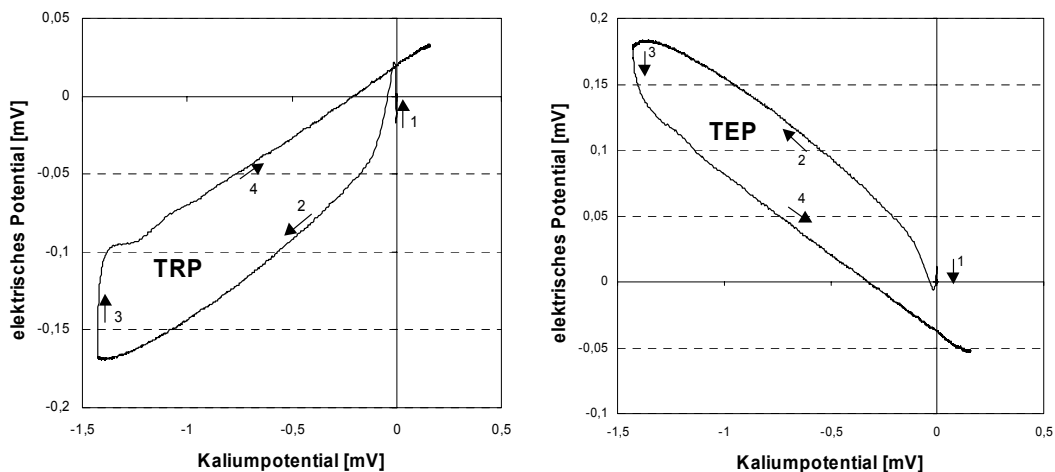


Abbildung C.4 Zeitliche Beziehung zwischen lichtinduzierter Kalium-Absenkung im SRS und slow PIII-Amplitude im TRP, bzw. RPE c-Welle im TEP, im zeitlichen Verlauf einer einmaligen Lichtstimulation von 4 s in einem Netzhautpräparat: Beide Potentiale folgen nach anfänglichen Überlagerungen (1) durch die positive b-Welle (TRP), bzw. negative a-Welle (TEP) streng der extrazellulären Kaliumkonzentration (2). Bei Abschalten des Lichtreizes sind beide Potentiale, nach anfänglicher d-Welle (3) linear mit der Kaliumkonzentration im SRS (4) korreliert (aus Schwahn, 1998).

D Effekte von Citicolin auf das *in vitro* Präparat

In jedem Kapitel, in dem eine der verschiedenen durchgeführten Untersuchungen dargestellt wird, folgt auf dem jeweiligen Ergebnisteil direkt im Anschluss die dazugehörige Diskussion, da auf diese Weise die inhaltlich geschlossenen Zusammenhänge am übersichtlichsten beschrieben werden können.

D.1 Einführung

In seiner natürlichen zellbiologischen Funktion tritt Citicolin (bzw. CDP-cholin oder Cytidin 5'-diphosphocholin) als eine essenzielle Vorstufe im Biosyntheseweg von Phospholipiden, den Bausteinen der Zellmembran, auf. Die beiden Hauptbestandteile von Citicolin sind Cytidin und Cholin. Wird es als Pharmakon verabreicht, zerfällt es im Körper in diese beiden Bestandteile, die sich dann im gesamten Organismus verteilen. Cytidin und Cholin überwinden die Blut-Hirn-Schranke und gelangen so auch in das Zentralnervensystem (ZNS), wo sie durch den Zellen in die Phospholipidfraktion der Membran und in die Mikrosomen aufgenommen werden. Einige der bisher bekannten Wirkungen von Citicolin sind (Zusammenfassung nach Secades & Frontera, 1995):

- Aktivierung der Biosynthese von Membranphospholipiden in Neuronen,
- Steigerung des cerebralen Stoffwechsels,
- Beeinflussung der Verfügbarkeit verschiedener Neurotransmitter, z. B. Erhöhung des Spiegels von Noradrenalin und Dopamin im ZNS,
- neuroprotektive Funktion bei Sauerstoffmangel im neuronalen Gewebe,
- Einsatz als Kotherapeutikum bei Parkinson.

Inzwischen wurden in pharmakologischen Studien auch vermutete Effekte von Citicolin auf die Netzhaut untersucht, z. B. zur Behandlung des Glaukoms, einer Augenerkrankung, in deren Verlauf die Ganglienzellen absterben (Parisi *et al.*, 1999; Virno *et al.*, 2000). Überdies ergab sich bei Versuchen an Kaninchen, dass durch die Verabreichung von Citicolin die Konzentration von Dopamin, ein Katecholamin, in der Netzhaut signifikant erhöht wird (Rejda *et al.*, 2002). Für die Interpretation der unten dargestellten Ergebnisse ist dieser Beleg für einen Anstieg des Dopamingehalts in der Retina als Effekt von Citicolin von besonderer Bedeutung (s. u. Kapitel D.4).

D.2 Versuchsspezifische Methoden

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden aus sechs Versuchen gewonnen. Für jeden dieser Versuche wurde ein frisches Präparat hergestellt. Die Behandlung erfolgte von der retinalen Seite des Präparats, indem Citicolin (Cytidin-5'-Diphosphocholin) in einer Konzentration von 1,0 mM der physiologischen Lösung zugegeben wurde. Sie dauerte etwas über eine Stunde.

Von den Aufzeichnungen der lichtinduzierten Antworten wurden aus jedem Versuch sieben Phasen (I-VII) ausgewertet. Die Versuchsphasen wurden, wie folgt, gewählt:

- I und II als Kontrollen, 30 bzw. 5 min vor Beginn der Behandlung,
- III und IV während der Behandlung, 15 bzw. 60 min nach Behandlungsbeginn,
- V, VI und VII als Kontrollen 15, 45 und 60 min nach Ende der Behandlung.

Die Entwicklung der Bestandspotenziale wird in zwei Serien von Abbildungen über jeweils 50 Iterationen mit einem Messwert pro Iteration dargestellt. Die erste Serie zeigt die Bestandspotenziale um den Beginn der Applikation von Citicolin herum. Die ersten 20 Messungen (Iterationen) wurden vor Beginn der Behandlung weitere 30 Messungen während dieser aufgezeichnet. Die zweite Serie gibt den Verlauf um das Ende der Behandlung wieder. Die ersten 20

Werte wurden während der Behandlung, weitere 30 nach deren Ende registriert.

In beiden Serien wurde eine eventuell aufgetretene Drift in den Kurven folgendermaßen korrigiert: Aus den ersten 20 dargestellten Messpunkten des betreffenden Versuchs der jeweiligen Serie wurde eine Regressionsgerade berechnet, und diese als Korrekturfaktor für alle 50 dargestellten Werte des selben Versuchs verwendet. Der kalzium-selektive Kanal der Mikroelektrode wies regelmäßig eine starke Drift auf. Deshalb musste das Bestandspotenzial dieses Kanals oft während des laufenden Versuchs durch Regelung am Vorverstärker kompensiert werden. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Offset bezeichnet. Diese Offsets im Bestandspotenzial des kalzium-selektiven Kanals wurden für die Darstellung der Ergebnisse durch Subtraktion des Offset-Betrags von den nachfolgenden Werten korrigiert.

D.3 Ergebnisse der Citicolin-Behandlungen

D.3.1 Änderungen der Bestandspotenziale und der extrazellulären Kalziumkonzentration

Die Verabreichung von Citicolin über die retinale Superfusion führte zu Änderungen in den transepithelialen und transretinalen Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration. Im zweiten Versuch traten in den Bestandspotenzialen häufig starke Oszillationen auf (zur Verdeutlichung s. Abbildung D.1). Deshalb werden die Daten des Versuchs 2 nicht in den Abbildungen für die Bestandspotenziale dargestellt. Stattdessen werden die Entwicklungen im Versuch 2 kurz im Text beschrieben.

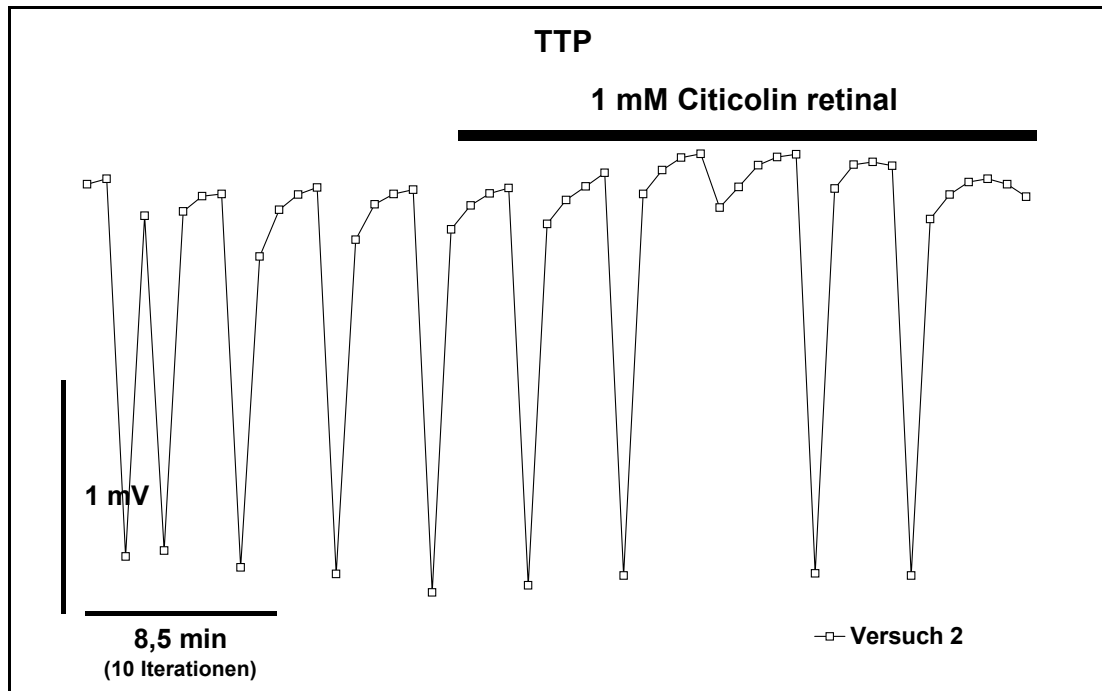


Abbildung D.1 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP) im Versuch 2: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Citicolin von der retinalen Seite des Präparats. Deutlich sichtbar sind starke wiederkehrende Oszillationen des Potenzials.

Im TTP war nach Einsetzen der Behandlung kein einheitlicher Trend zu erkennen (Abbildung D.2); im Versuch 2 war ein Anstieg erkennbar. Das TEP stieg mit Beginn der Behandlung in allen Versuchen an (Abbildung D.4), in zwei Fällen besonders deutlich, einer der beiden war Versuch 2. Dagegen sank das TRP ab (Abbildung D.3), in denselben zwei Fällen ebenso deutlich wie der Anstieg des TEP ausfiel also auch im Versuch 2. Diese gegenläufigen Entwicklungen hoben sich im Gesamtsignal (TTP) auf und ließen sich deshalb in diesem nicht erkennen. In fünf Versuchen wurde ein Anstieg der extrazellulären Kalziumkonzentration (V_{ion}) beobachtet (Abbildung D.5).

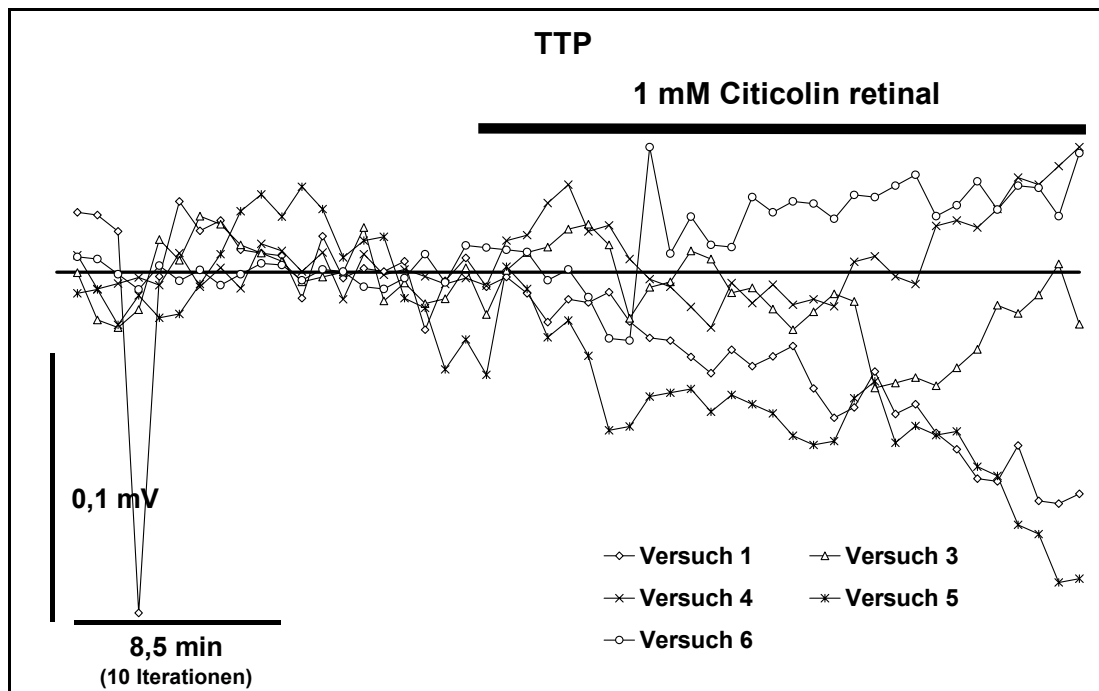


Abbildung D.2 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Citicolin von der retinalen Seite des Präparats.

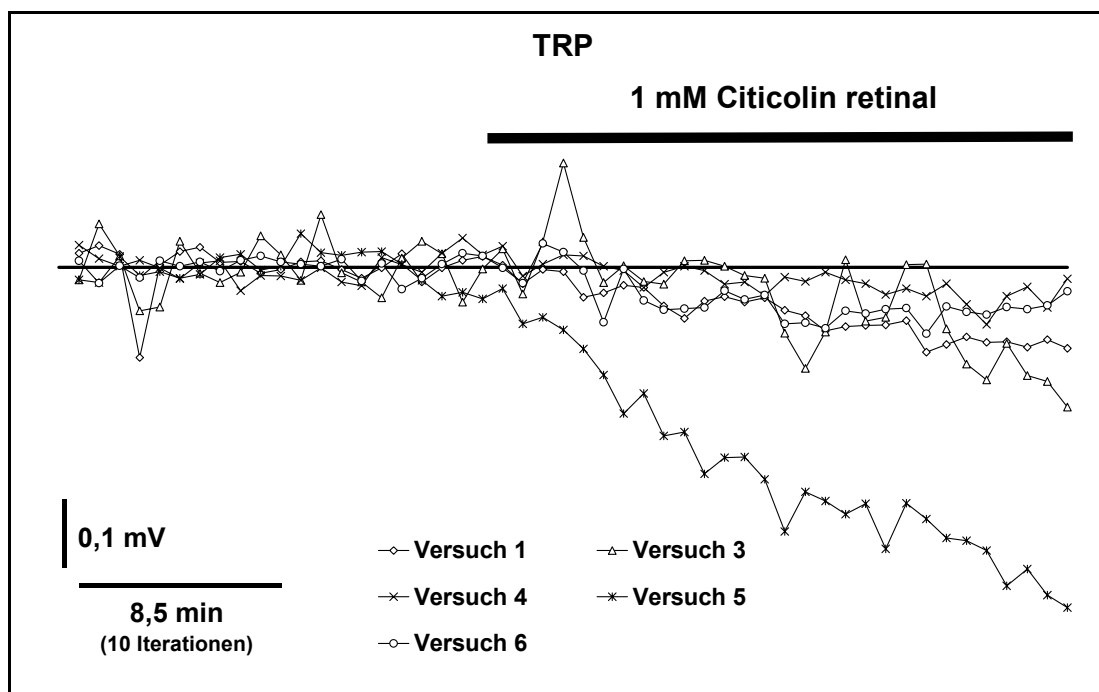


Abbildung D.3 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Citicolin von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist eine meist geringe Abnahme des TRPs nach ca. 15 min Behandlungsdauer.

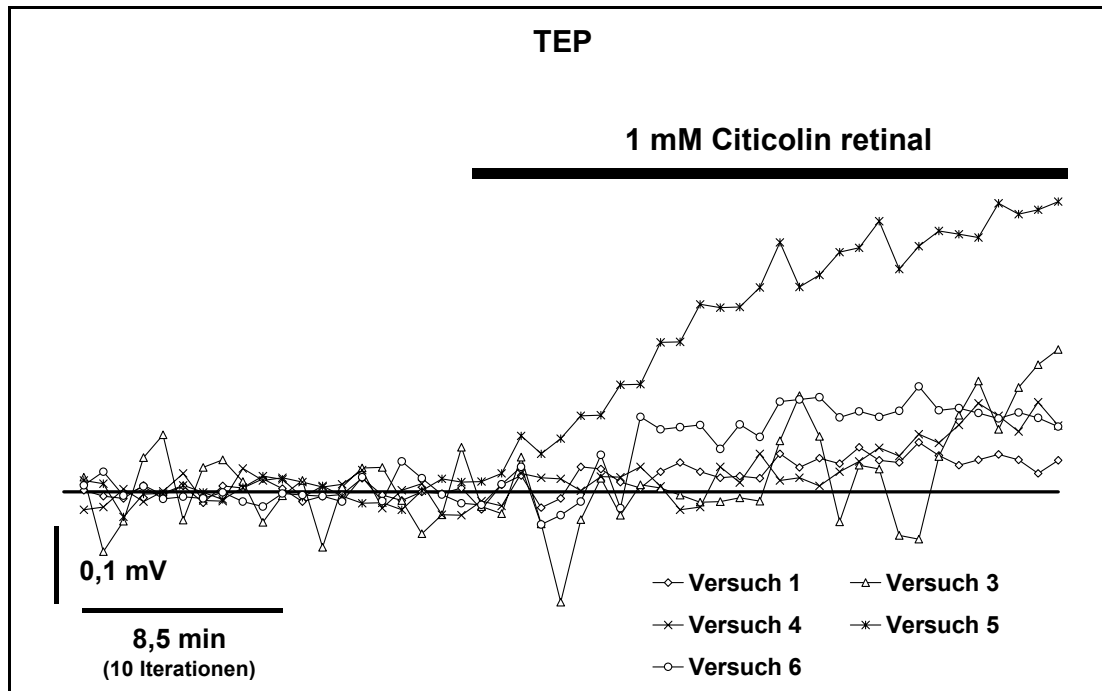


Abbildung D.4 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Citicolin von der retinalen Seite des Präparats, das TEP stieg während der Behandlung in den meisten Versuchen an.

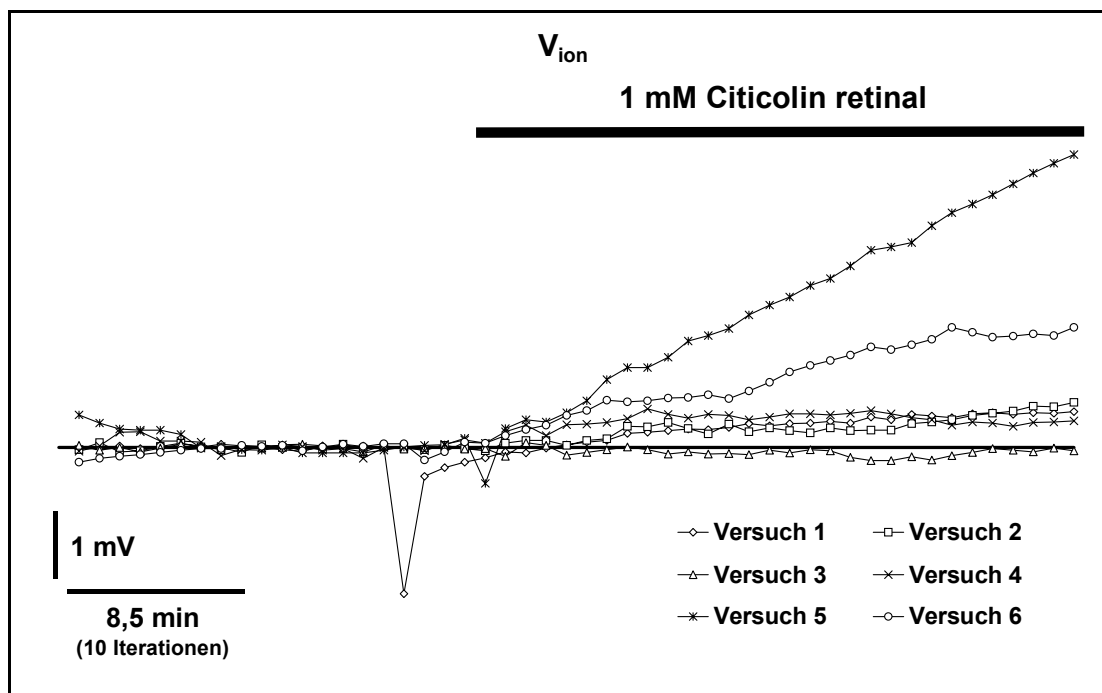


Abbildung D.5 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Citicolin von der retinalen Seite des Präparats. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhte sich in fünf von sechs Versuchen nach Beginn der Behandlung.

Die Änderungen der Bestandpotentiale nach Beendigung der Citicolineinwirkung fielen uneinheitlich aus. Allerdings war in fast jedem Versuch eine Reaktion des Präparats zu sehen. Das TTP fiel in vier Versuchen ab, im Versuch 2 besonders deutlich (nicht dargestellt), während es in einem Fall zunahm und in einem weiteren unverändert blieb (Abbildung D.6). Das TRP und TEP wiesen in jeweils einigen Versuchen sowohl Abnahmen wie Zunahmen auf oder zeigten in einem bzw. zwei Versuchen keine Veränderung (Abbildung D.7 und Abbildung D.8); im Versuch 2 stieg das TRP nach Beendigung der Behandlung stark an, während das TEP noch stärker abnahm. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration verringerte sich in vier Versuchen nach Ende der Behandlung, während sie in zwei Fällen anstieg (Abbildung D.9).

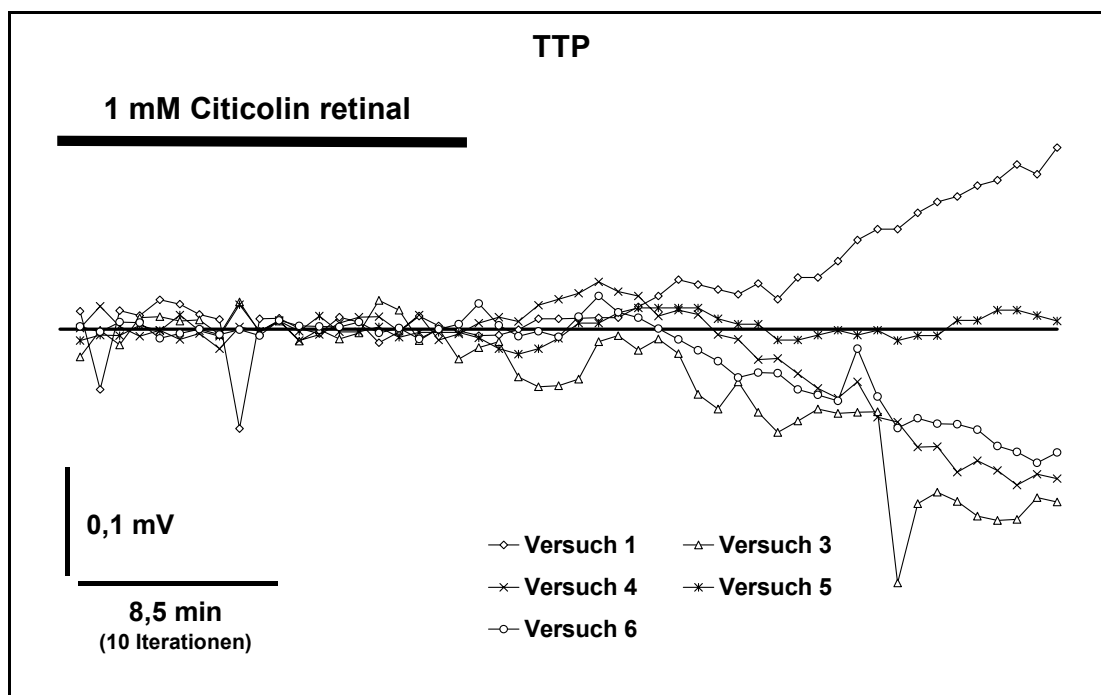


Abbildung D.6 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Citicoline und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TTP veränderte sich nicht einheitlich nach dem Behandlungsende.

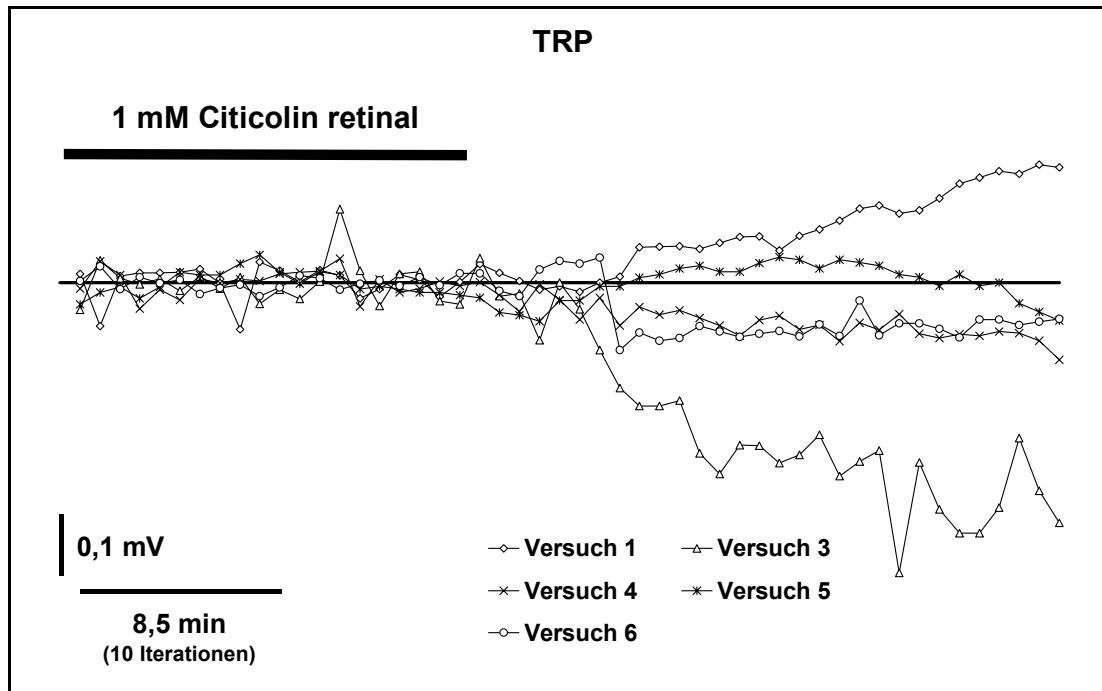


Abbildung D.7 Verlauf des transretinalen Bestandpotenzials: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Citicolin und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung.

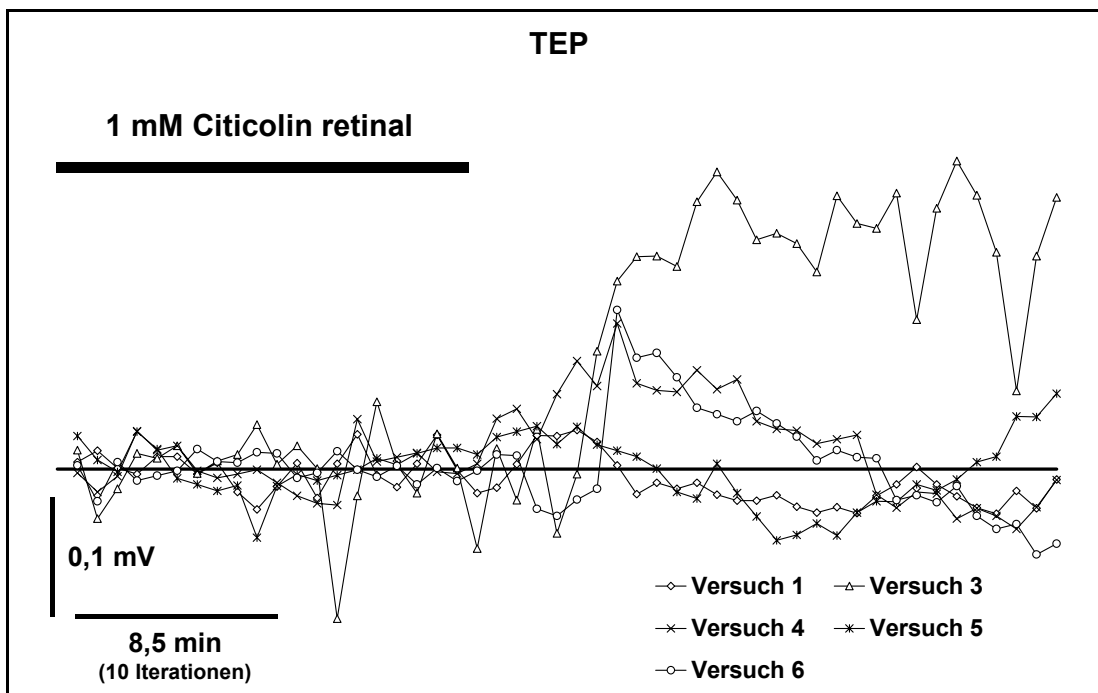


Abbildung D.8 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Citicolin und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung.

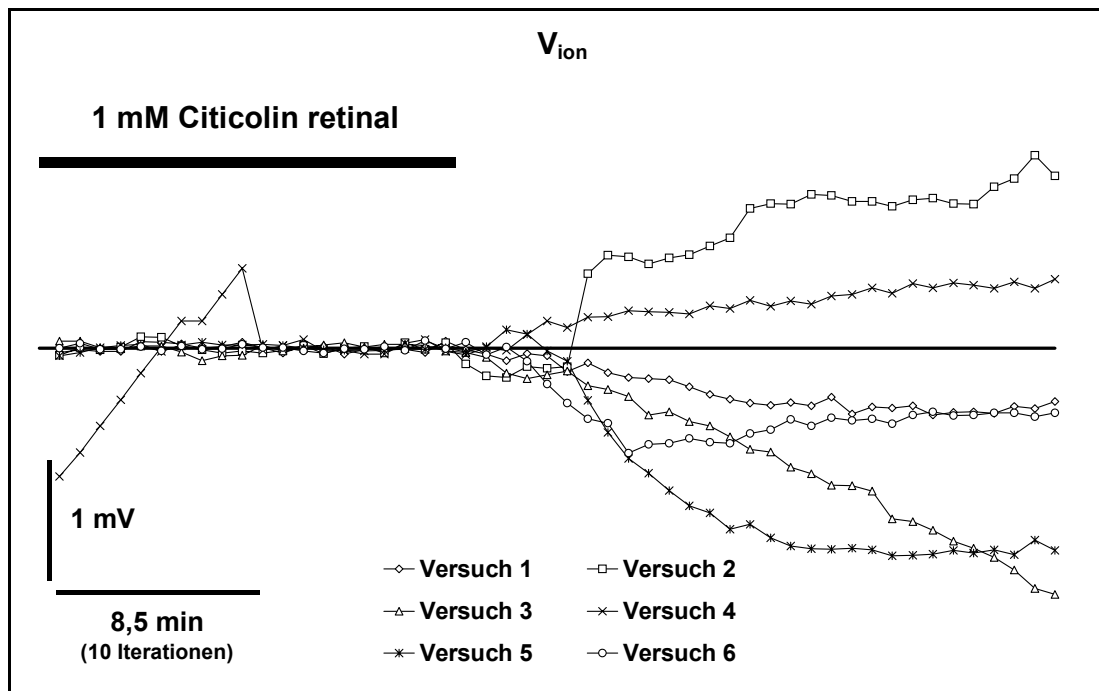


Abbildung D.9 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Citicolin und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration änderte nach Behandlungsende in allen Versuchen deutlich aber uneinheitlich.

D.3.2 Effekte von Citicolin auf die lichtinduzierten Signale des Präparats

D.3.2.2 Änderungen im *in vitro* ERG und seinen Komponenten

Die folgenden Abbildungen (Abbildung D.10 bis Abbildung D.12) geben den Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TRP, in den sechs Versuchen über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I-VII, s. o. für Erläuterungen) wieder. Teil B jeder Abbildung zeigt die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial. Bereits nach 15 min Behandlung mit Citicolin stieg die Amplitude der c-Welle im TTP an, wie die positive Differenz zwischen III und II erkennen lässt. Während der Dauer der Behandlung gab es keine deutlichen Veränderungen. Aber bereits 15 min nach dem Ende der Behandlung war die Amplitude der c-Welle deutlich abgesunken (Abbildung D.10 B).

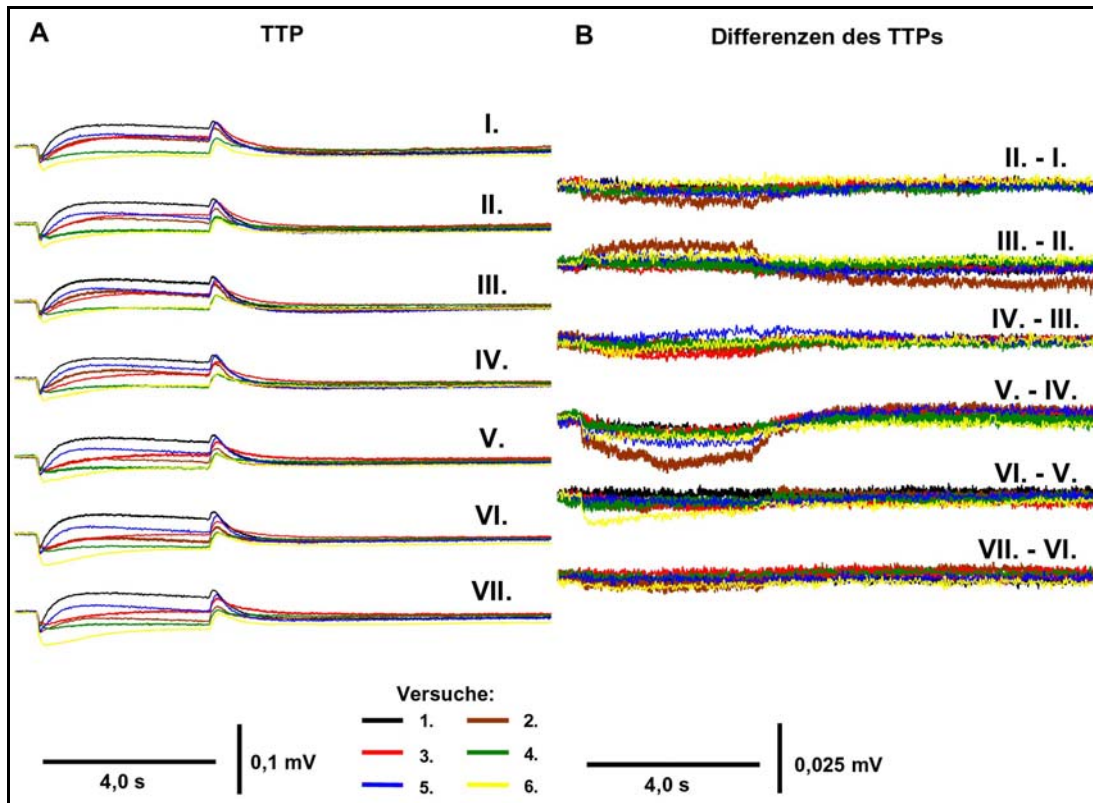


Abbildung D.10 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat mit Citicolin (1 mM) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar, z. B. ein Anstieg der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Citicolin (III. – II.).

Ein Vergleich der Aufzeichnungen der jeweiligen Versuchsphasen des TRPs und TEPs und ihrer Differenzen deutet darauf hin, dass die aufgeführten Veränderungen in der c-Welle hauptsächlich durch entsprechende Änderungen im TRP verursacht wurden (Abbildung D.11 B und Abbildung D.12 B). Aus den Kurven der drei gemessenen Potenziale für die Kontrollphasen (I, II und V bis VII) und deren Differenzen ist zu erkennen, dass die Drift während der Versuche keine bedeutenden Ausmaße erreichte. Lediglich im Versuch 3 drifteten das TRP und das TEP fast über die gesamte Versuchsdauer deutlich. Dies ist teilweise auch in den Auswertungen der lichtinduzierten Amplituden erkennbar (z. B. Abbildung D.14 und Abbildung D.15).

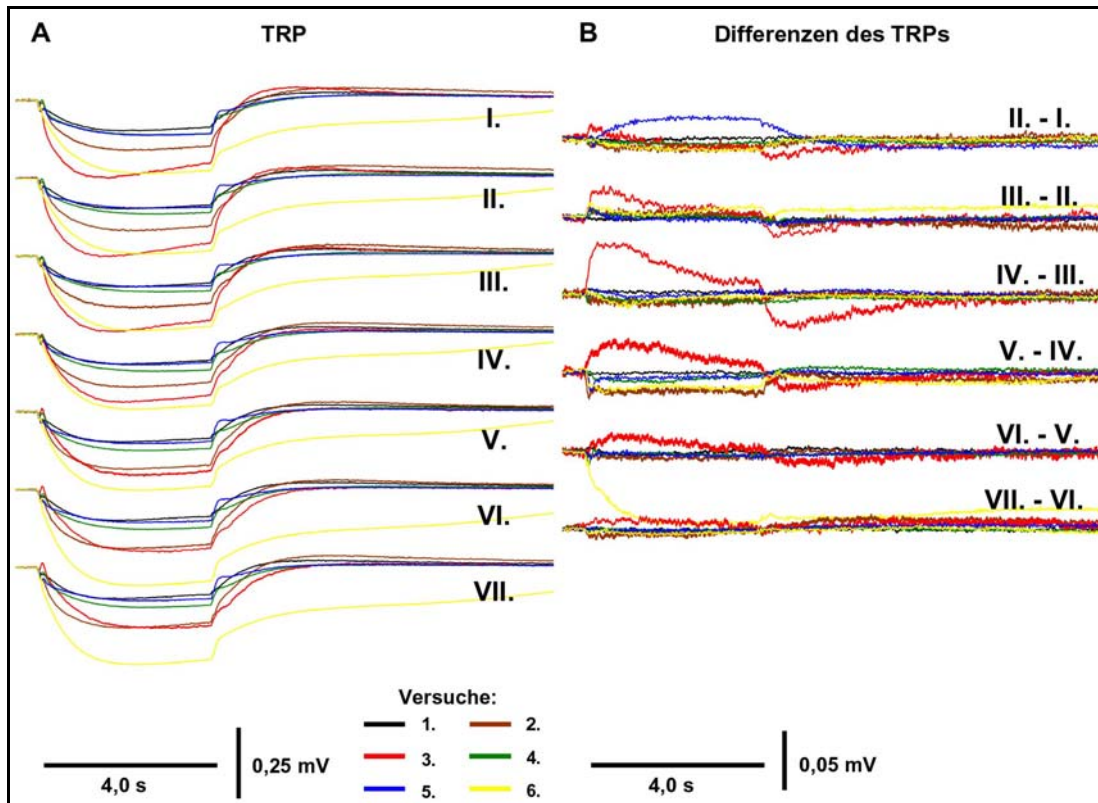


Abbildung D.11 **A (linke Hälfte):** TRPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat mit Citicolin (1 mM) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar, z. B. ein leichter Anstieg der Amplitude der Komponente der c-Welle des TRPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Citicolin (III. – II.).

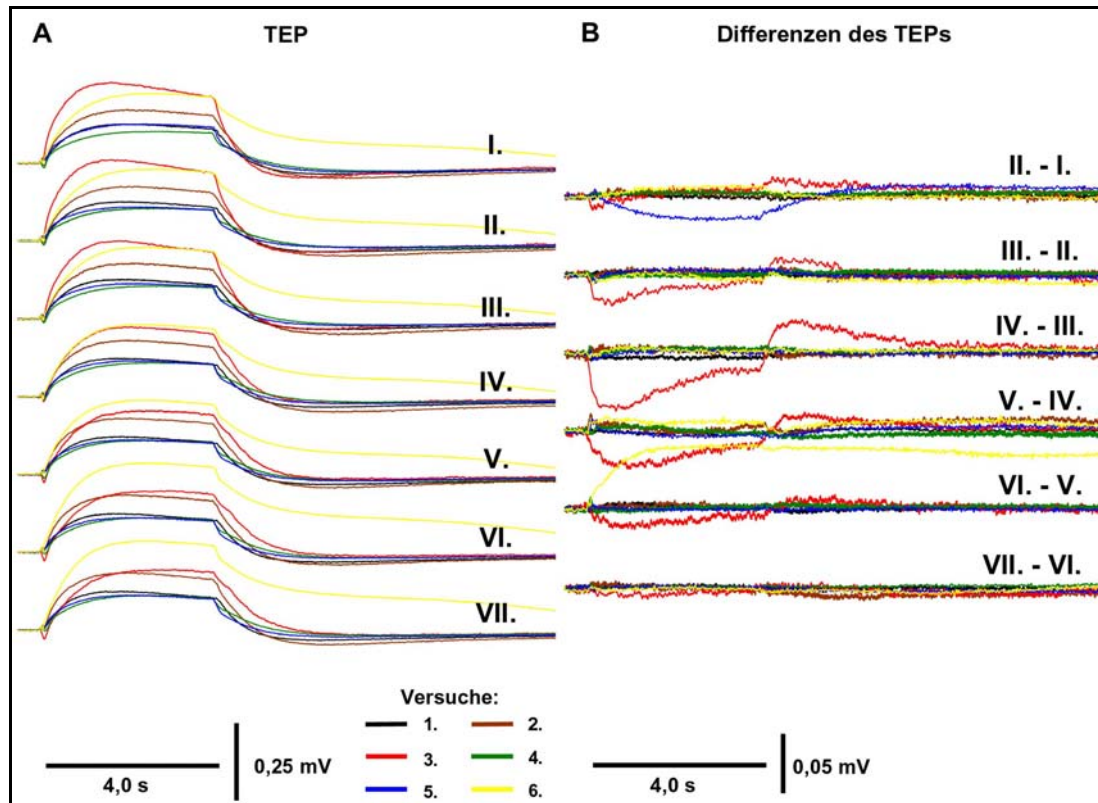


Abbildung D.12 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat mit Citicolin (1 mM) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar.

D.3.2.3 Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden

Wegen teilweise großer Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Darstellung der Werte der Amplituden verzichtet. Stattdessen wurden sie auf die Versuchsphase II normiert. Dazu wurden die Differenzen zwischen den Amplituden jeder Versuchsphase und der Phase II berechnet. Die Datenpunkte in den Abbildungen geben den Unterschied zwischen der Amplitude der jeweiligen Versuchsphase und der II. Phase wieder. Deshalb sind die Werte für die Phase II immer gleich Null.

a) Änderungen in der Amplitude der langsamen c-Welle

Die Amplitude der c-Welle stieg in drei Versuchen nach Behandlungsbeginn an (Versuchsphase III). Allerdings ging sie in zwei Versuchen leicht zurück und

blieb in einem unverändert (Abbildung D.13). Nach Ende der Behandlung (Versuchsphase V) war bei allen Versuchen eine deutliche Verringerung der Amplitude der c-Welle zu beobachten, die sich in vier Fällen auf einen Anstieg der negativen Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP zurückführen ließ; da die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP negativ ist, zeigt eine negative Differenz zwischen zwei Versuchsphasen eine Zunahme der Amplitude an (Abbildung D.14). Die Komponente der c-Welle im TEP veränderte sich nicht bedeutend (Abbildung D.15). Aus der Betrachtung der Entwicklung zwischen Versuchsphasen, die den oben analysierten voraus gingen (z. B. I bis II und III bis IV), ist zu erkennen, dass die beschriebenen Veränderungen immer stärker waren als der zuvor beobachtete Trend oder sogar entgegengesetzt zu diesem verliefen (unter dem Trend wird hier die Entwicklung der Amplitude zwischen zwei Versuchsphasen verstanden).

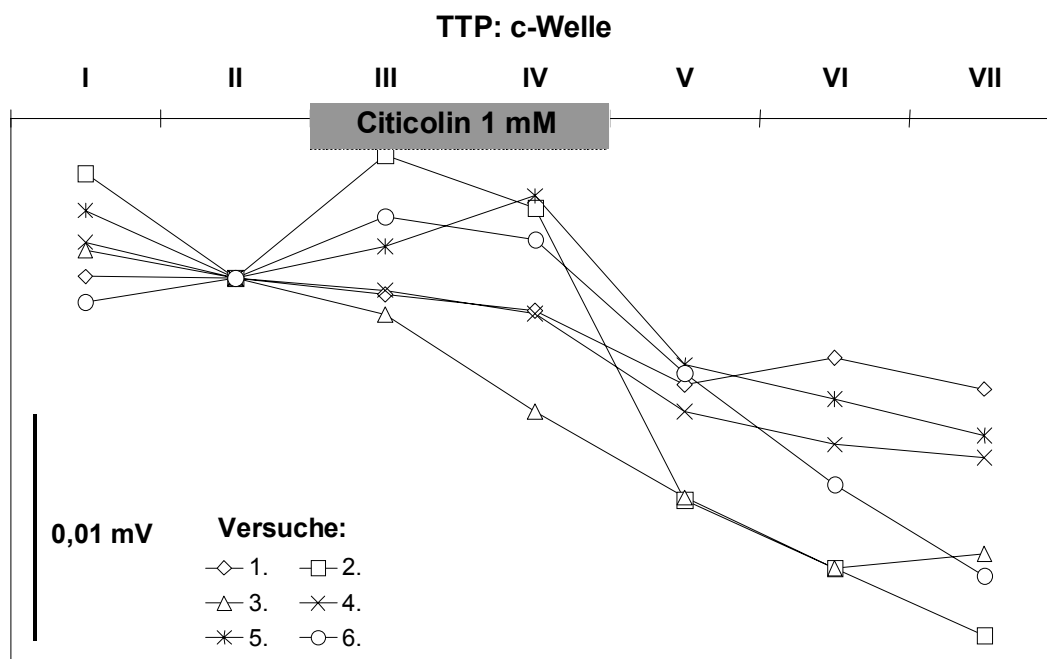


Abbildung D.13 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) stieg die Amplitude in drei Versuchen an, nach dem Behandlungsende zeigte sie in fünf Versuchen einen deutlichen Rückgang.

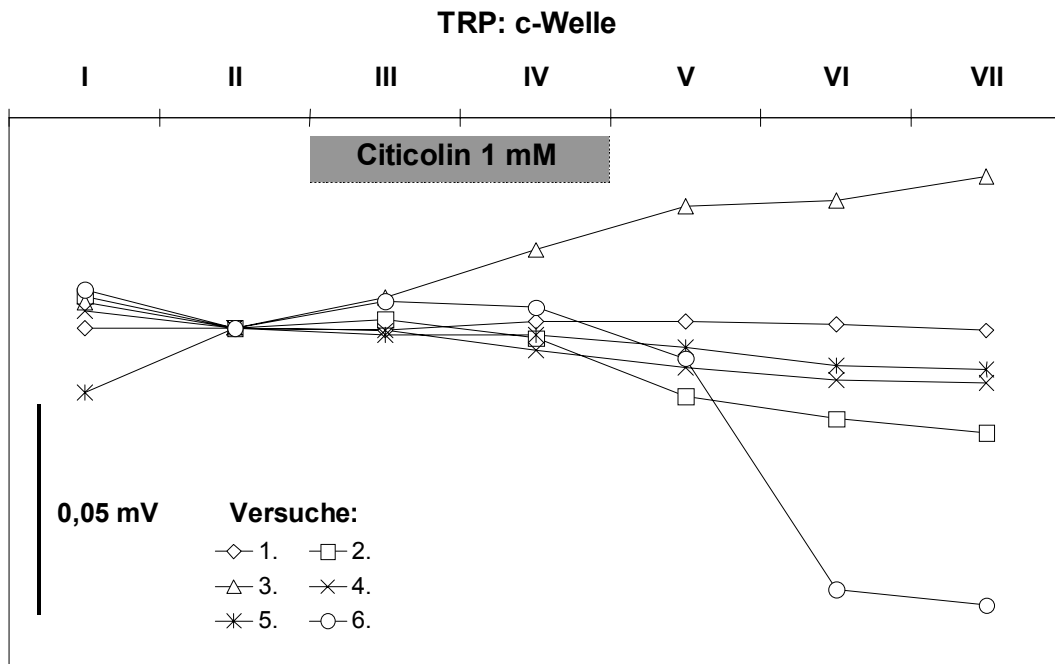


Abbildung D.14 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beendigung der Behandlung nahm in vier Versuchen die c-Wellen Komponente im TRP geringfügig zu (negative Differenz bei negativer Amplitude = Anstieg).

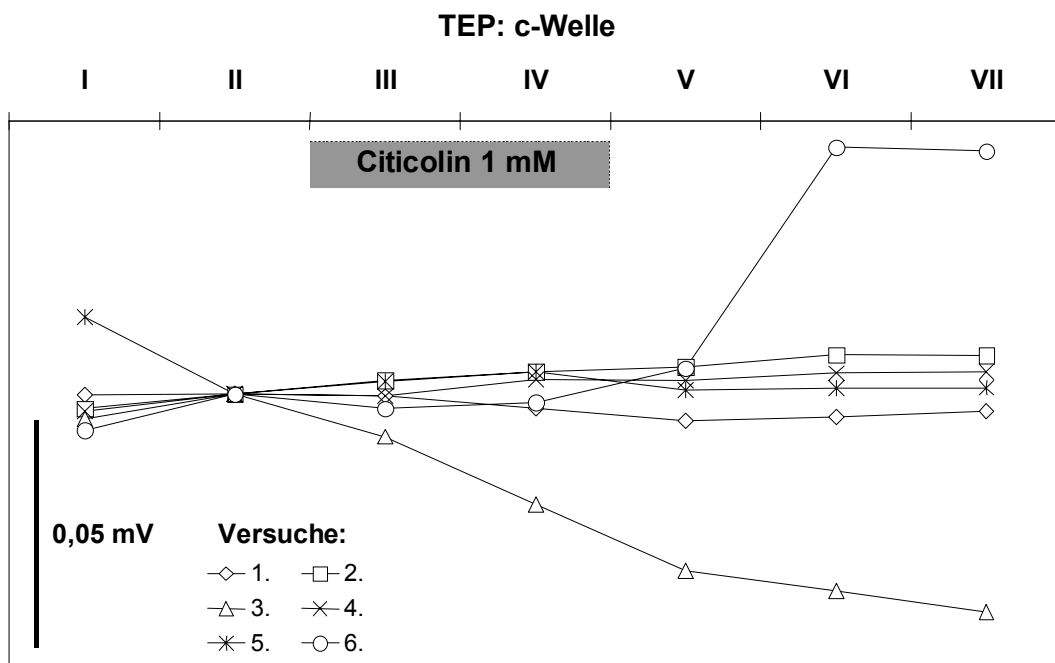


Abbildung D.15 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text).

b) Änderungen in den Amplituden der a-, b-, und d-Welle (rasche Wellen)

Auch die Amplituden der raschen Wellen veränderten sich im Zuge der Citicolinbehandlung. Die a-Wellen-Amplitude verringerte sich in vier Versuchen mit Beginn der Behandlung, wie die positiven Differenzen zwischen Phase III und Phase II erkennen lassen (da die a-Welle eine negativ ausgerichtete Amplitude ist, zeigen positive Differenzen ihre Abnahme an). Nach dem Ende der Behandlung nahm die Amplitude in vier Fällen wieder zu (Abbildung D.16). In den meisten Fällen war diese Veränderung auf einen Rückgang der entsprechenden Amplitude der Komponente der a-Welle im TRP zurückzuführen (Abbildung D.17).

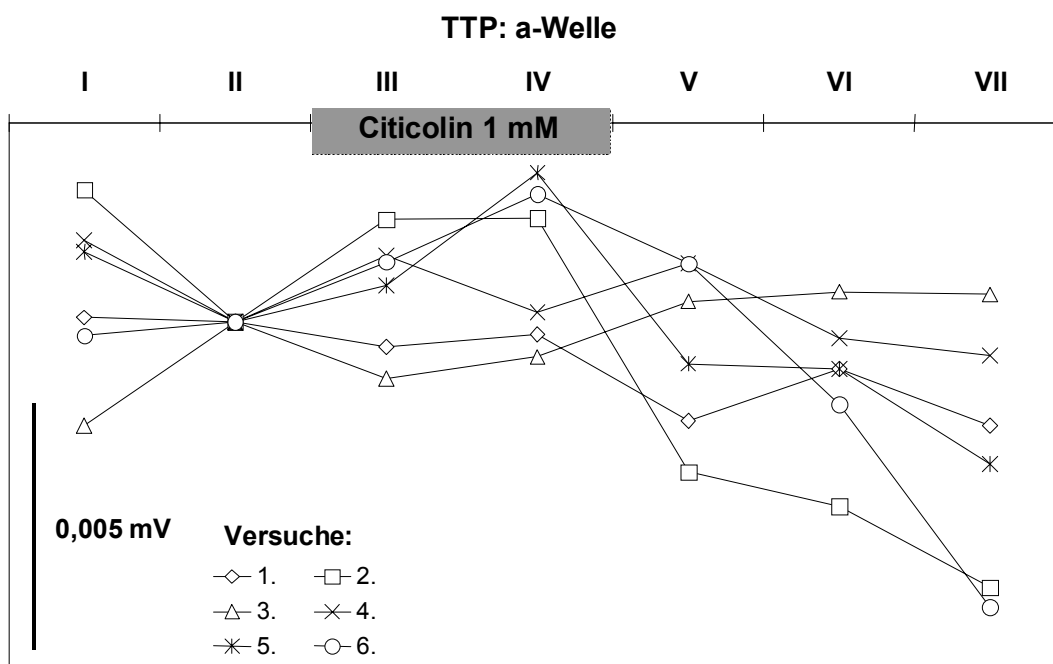


Abbildung D.16 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) sank die Amplitude in vier Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang) und nahm nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) wieder zu.

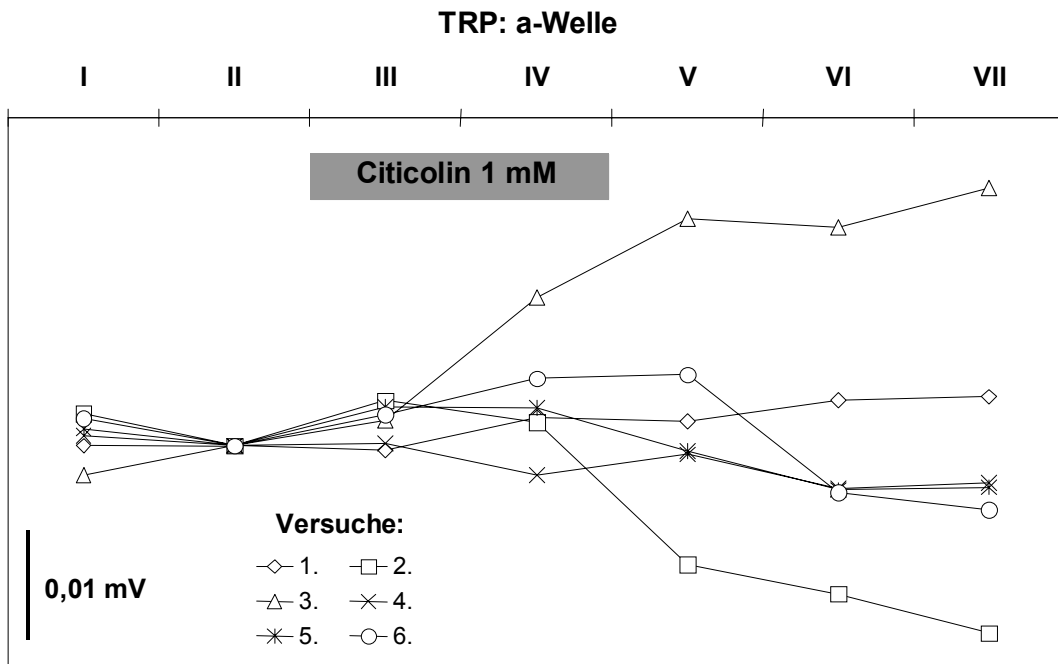


Abbildung D.17 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) sank die Amplitude in vier Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

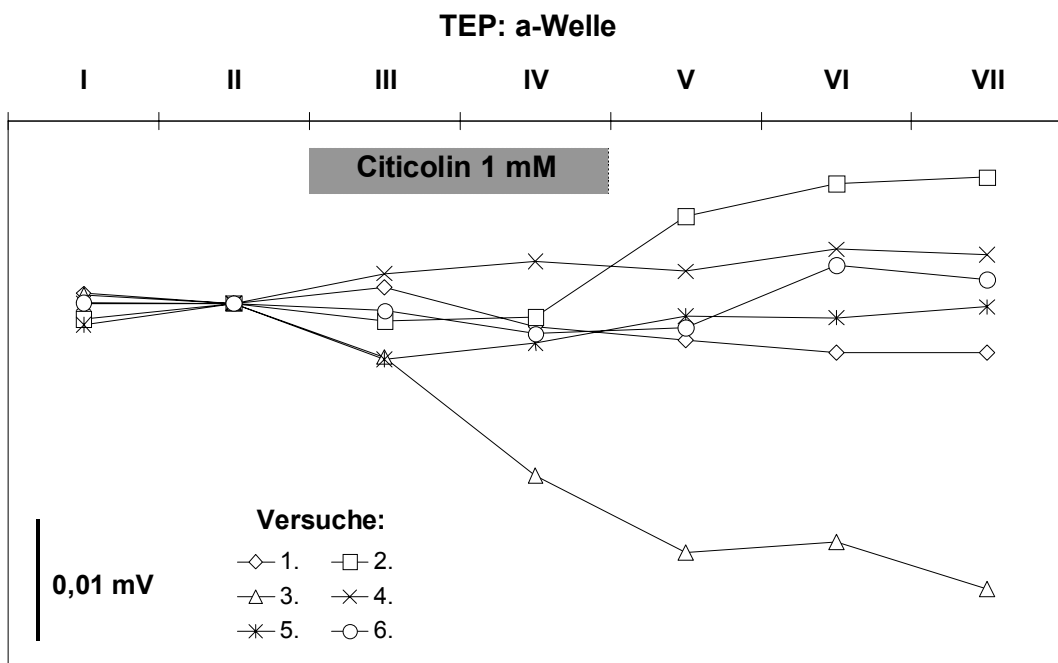


Abbildung D.18 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Keine einheitlichen Veränderungen nach Beginn oder dem Ende der Behandlung mit Citicolin (III) erkennbar.

Die b-Welle wies ein der a-Welle entgegengesetztes Verhalten auf. Ihre Amplitude wuchs zu Beginn der Einwirkung von Citicolin um nach dem Ende dieser wieder zu fallen (Abbildung D.19). Dieser Effekt ging hauptsächlich auf entsprechende Veränderungen im TRP (und nicht im TEP) zurück (Abbildung D.20 und Abbildung D.21).

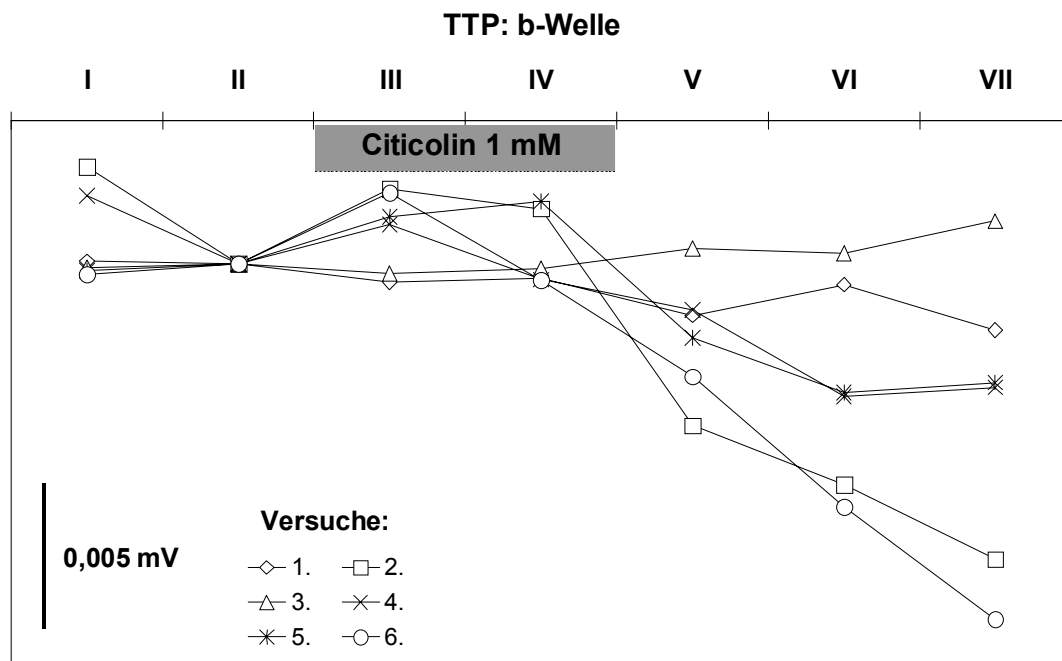


Abbildung D.19 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) stieg die Amplitude in vier Versuchen an (positive Differenzen) und nahm anschließend wieder ab (V bis VII; teilweise während der Behandlung, IV).

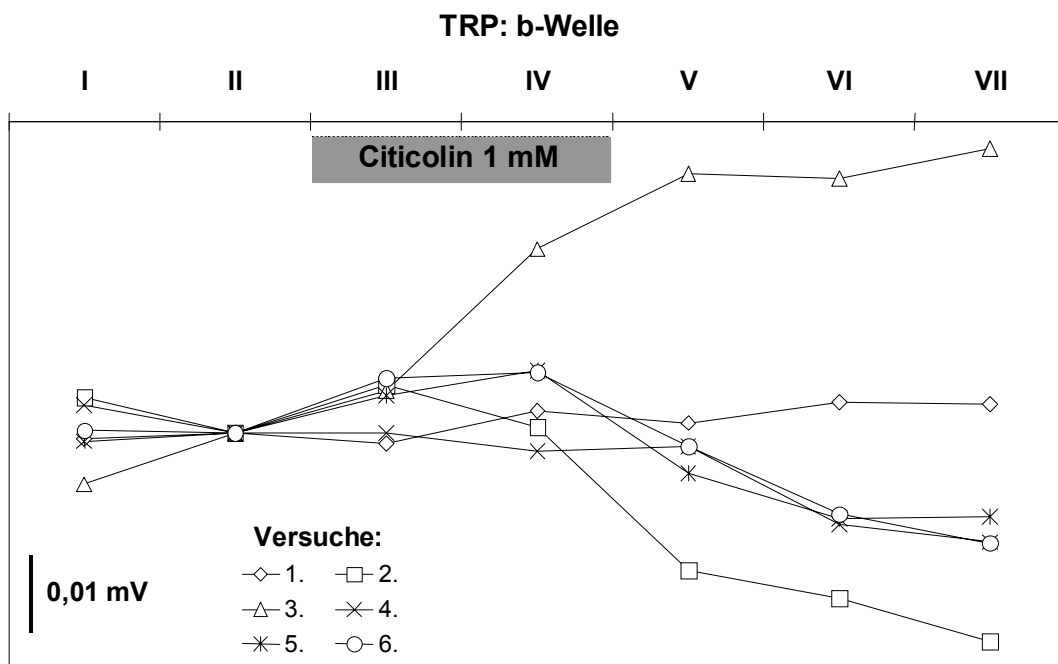


Abbildung D.20 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) stieg die Amplitude in vier Versuchen an und nahm in drei Versuchen nach dem Ende der Behandlung wieder ab (V bis VII).

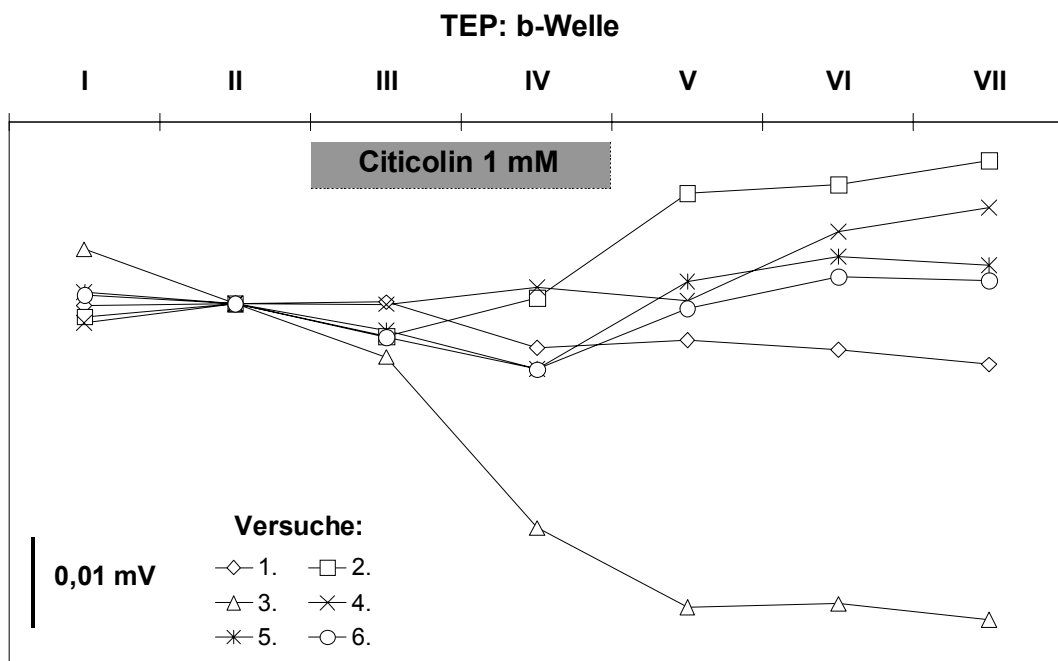


Abbildung D.21 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Keine deutlichen Veränderungen nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) erkennbar. Nach dem Ende der Behandlung (V) kam es in drei Versuchen zu einem Anstieg der Amplitude.

Im Falle der d-Welle waren die Reaktionen nach Beginn der Behandlung einheitlich. Die Amplitude sank entgegen eines vorher ansteigenden Trends in allen Versuchen ab. In den meisten Versuchen stieg die Amplitude der d-Welle nach Ende der Behandlung wieder an (Abbildung D.22). Der Betrag der Änderungen war jedoch sehr gering. Außerdem konnte ihre Herkunft nicht allein einer der beiden Komponenten (TRP oder TEP) der d-Welle zugeordnet werden. Allerdings war zumindest in vier Versuchen der Anteil des TRPs am Rückgang der Amplitude der d-Welle wesentlich (Abbildung D.23). Daher kann hier nicht eindeutig festgestellt werden, dass diese Veränderungen einen Behandlungseffekt darstellen.

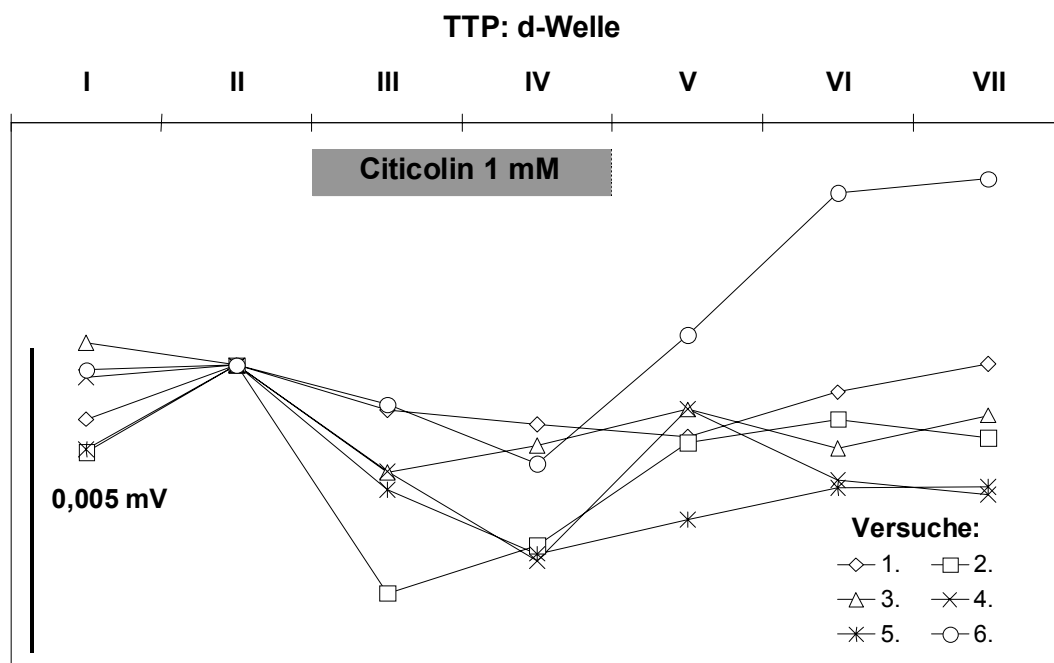


Abbildung D.22 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) trat auf in allen sechs Versuchen eine geringfügige Reduktion der Amplitude auf, die nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) meist wieder kompensiert wurde.

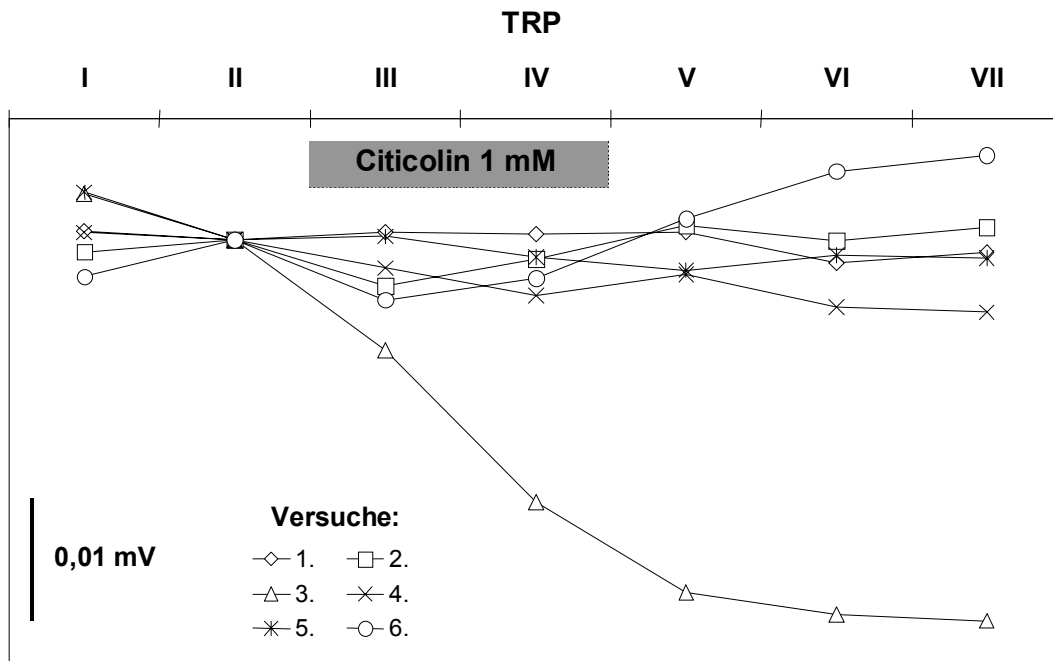


Abbildung D.23 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit Citicolin (III) stieg die negative Amplitude in vier Versuchen an (negative Differenz).

D.4 Diskussion der Wirkung von Citicolin auf die Retina-RPE-Choroid Präparation

Im Gesamt-Bestandspotenzial (TTP) konnten nach Beginn der Behandlung mit Citicolin keine einheitlichen Veränderungen festgestellt werden. Aus der Analyse der beiden Komponenten ergab sich jedoch eine schwache einheitliche Zunahme im TEP bzw. Abnahme im TRP. Der Anstieg im TEP wurde bei der Hälfte der Versuche von einer Erhöhung der Amplitude der langsamen c-Welle begleitet. Schwahn (1998) beobachtete die gleichen Effekte auf das TEP und die c-Welle des Retina-RPE-Choroid Präparats des Huhns bei Behandlungen mit niedrigen Konzentrationen (1 bzw. 2 μ M) von Dopamin. Dies legt nahe, dass die beschriebenen Veränderungen der Potenziale bei Citicolin-Behandlung Effekte einer gesteigerten Freisetzung von Dopamin durch dopaminerge Zellen des Präparats sein könnten. Da für die Retina des Kaninchens eine Erhöhung der endogenen Dopaminkonzentration bei systemischer Verabreichung von

Citicolin nachgewiesen wurde (Rejda *et al.*, 2002), kann eine solche auch bei der Netzhaut des Huhns postuliert werden. Wird von dopaminergen Zellpopulationen, z. B. bestimmten Formen der Amakrin- und der interplexiformen Zellen (Hankins, 1995), Dopamin in das extrazelluläre Volumen der Retina abgegeben, verändert es die elektrophysiologischen Parameter der Zellen, die Dopaminrezeptoren auf ihrer Membran besitzen. Da die beschriebenen Veränderungen im TEP auftraten, müssen Vorgänge im RPE für sie verantwortlich sein. Die entsprechenden Rezeptoren sollten daher in der apikalen, d. h. der Retina zugewandten Membran des RPEs vorkommen. Nach den Untersuchungen von Schwahn (1998) könnten an der Entstehung dieser Effekte die beiden großen Dopaminrezeptorfamilien D1 und D2, beteiligt sein. Wegen der erfolgreichen Hemmung der Effekte durch Sulpirid, einem Antagonisten der D2-Rezeptoren, ist es wahrscheinlich, dass diese über D2-Rezeptoren vermittelt werden. Über die D2-Rezeptoren beeinflusst Dopamin den second messenger cAMP in den Zellen des RPEs (Hughes *et al.*, 1987). Der cAMP-Spiegel seinerseits regelt die Öffnung von Chloridkanälen in der basolateralen Membran des RPEs (Adorante & Miller, 1990, Gallemore & Steinberg, 1990 und 1993) und möglicherweise auch die Leistung des Na⁺-K⁺-Cl⁻-Kotransporters in der apikalen Membran (Kuntz *et al.*, 1994), und damit den transepithelialen Chloridtransport aus dem SRS in das extrazelluläre Volumen des Choroids. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels im RPE durch Dopamin könnte daher über die beiden folgenden Wege zu einer Vergrößerung des TEPs führen: Steigerung des apikalen Kotransports von Chlorid und (oder) der basolateralen Chlorid-Leitfähigkeit. Letztere depolarisiert die basale Membran des RPEs. Dies erhöht V_{ba} und damit das TEP. Dagegen erscheinen im ersten Fall zwei das TEP verändernde Prozesse möglich: Einerseits könnte ein vergrößerter apikaler Einstrom von Chlorid über die Konzentrationserhöhung im RPE auch indirekt die basolaterale Leitfähigkeit von Chlorid steigern, andererseits könnte durch die angestiegene Konzentration von Chlorid die apikale Membran des RPEs direkt hyperpolarisieren. Dies würde V_{ap} verringern und das TEP steigern.

Die Abnahme des TRP während der Behandlung mit Citicolin deutet daraufhin, dass nicht nur auf der Oberfläche des RPEs sondern auch an den Membranen der neuronalen Zellen der Netzhaut Dopaminrezeptoren exprimiert werden. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass Dopamin die Erregbarkeit der Horizontalzellen der Retina durch Neurotransmitter wie Glutamat und GABA modulieren kann (Djamgoz *et al.*, 1995). Dopamin selbst löst an den Horizontalzellen keine Membranströme aus, allerdings verstärkt es die durch Ausschüttung von Glutamat erzeugten Membranströme (Knapp & Dowling, 1987), d. h. die Horizontalzelle wird stärker depolarisiert. Dagegen reduziert es den Strom durch von GABA aktivierten Ionenkanälen (Dong & Werblin, 1994). In beiden Fällen wirkt Dopamin über D1-Rezeptoren auf den Spiegel des second messenger cAMP. Da die Horizontalzellen ihrerseits die Übertragung der Signale von den Fotorezeptoren auf die Bipolarzellen modulieren, ist es vorstellbar, dass eine durch Citicolin hervorgerufene Erhöhung der Dopaminkonzentration zu einer Veränderung der extrazellulären Gleichgewichtsströme von Ionen zwischen der inneren und äußeren Netzhaut führt. Für die Abnahme des transretinalen Bestandpotenzials könnte z. B. die Verringerung eines parallel zu den Müllerzellen in Richtung der äußeren Retina verlaufenden Kaliumstroms oder die Verstärkung eines entgegengesetzten Stroms verantwortlich sein. Solche Ströme erzeugen zumindest bedeutende Bestandteile der Lichtantwort der Netzhaut, nämlich die b-Welle und das slow PIII, das bei anhaltender Hyperpolarisation der Fotorezeptoren durch einen längeren Lichtreiz auftritt (Dowling, 1987; Reichenbach & Robinson, 1995).

Der beobachtete Anstieg der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während der Einwirkung von Citicolin auf das Präparat kann ebenfalls über die Modulation der Horizontalzellen durch Dopamin erklärt werden. Laut Dowling (1987) besteht eine negative Rückkopplung von den Horizontalzellen auf die Zapfen der Netzhaut. Diese wird durch Ausschüttung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA von den Horizontalzellen vermittelt. Überdies sind die Horizontalzellen im Dunklen depolarisiert, also unter den Versuchsbedingungen nahezu dauernd (Präparat dunkeladaptiert, nur 4 s Licht pro Iteration von 51 s Dauer). Wie oben ausgeführt, verstärkt Dopamin die durch Glutamat ausgelöste

Depolarisation der Horizontalzellen. Stärker depolarisierte Horizontalzellen wirken über die negative Rückkopplung hyperpolarisierend auf die Zapfen. Dadurch wird der Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zapfen vermindert, und die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt an.

Die Änderungen der Amplituden der raschen Wellen waren bei der Citicolin-Behandlung relativ gering ausgefallen. Die Amplituden der a- und d-Welle hatten abgenommen, während die der b-Welle angestiegen war. Die Komponente des TRP hatte dabei immer über die entgegengerichtete des TEPs dominiert. Auch hier erscheint eine Neuromodulation der Horizontalzellen durch Dopamin, das aus Zellen der inneren Netzhaut freigesetzt wird, wahrscheinlich. Nimmt man an, dass Dopamin, wie oben dargestellt, bereits im Dunklen hyperpolarisierend auf die Zapfen wirkt, sollte deren durch den Lichtreiz ausgelöste Hyperpolarisation im Vergleich zum unbehandelten Präparat noch gesteigert werden; dieses verstärkte Signal wird an die Bipolarzellen weitergeleitet und führt dort zu einer erhöhten Depolarisierung, die wiederum auf die Müllerzellen wirkt. Diese schlägt sich, wie beobachtet, in einer größeren Amplitude der b-Welle und vor allem ihrer Komponente im TRP nieder. Welche Mechanismen zur Abschwächung der Amplitude der a-Welle führen, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Für den Teil der Reduktion der Amplitude der d-Welle, der auf die negative Amplitude der Komponente im TRP zurückgeht, kommt als Ursache eine schwächere Off-Antwort durch die Bipolarzellen in Frage. Diese sollte auf eine geringere Depolarisierung beim Abschalten des Lichts zurückgehen. Da durch den Einfluss von Dopamin die Horizontalzellen auf die Zapfen auch im Dunklen hyperpolarisierend wirken, fällt die Depolarisierung nach dem Ende des Lichtreizes entsprechend kleiner aus.

Die obigen Erläuterungen beruhen auf der Annahme, dass die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit Citicolin zu einer gesteigerten Freisetzung von Dopamin durch dopaminerge Zellen führt. Da diese Hypothese jedoch für die Netzhaut des Huhns noch nicht überprüft wurde, ist es möglich, dass Citicolin die beobachteten Veränderungen auch über andere bisher nicht bekannte Wirkungsketten verursacht. Sofern eine erhöhte Ausschüttung von Dopamin durch das Präparat vorliegt, ließe sich diese wahrscheinlich

nachweisen, denn Schwahn (1998) beschreibt bereits in seiner Dissertation eine Methode zum Nachweis von Dopamin im Superfusat mittels HPLC. Diese aufwendigen Versuche würden jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

E Modulation von Purinrezeptoren in der Netzhaut

E.1 Einführung: Die Purinrezeptoren

Die Rolle von Purinen als extrazelluläre Botenstoffe wurde von Drury & Szent-Györgyi bereits 1929 untersucht. Sie wiesen nach, dass Adenosinmonophosphat (AMP) vielfältige biologische Wirkungen entfaltet, z. B. Gefäßerweiterung, Blutdrucksenkung und Hemmung intestinaler Kontraktionen. In den frühen 50er Jahren belegten erste Veröffentlichungen, dass Adenosintriphosphat (ATP) neben seiner Funktion als Energieträger auch die Eigenschaft eines Neurotransmitter hat. Holton & Holton (1953) berichteten über die Freisetzung von ATP durch sensorische Nerven im Kaninchenohr. Sie zeigten, dass die arterielle Infusion von ATP zur Vasodilatation der Kapillaren des Innenohrs führt. In den folgenden vier Jahrzehnten wurden diese Befunde um zahlreiche Nachweise für die Funktion von ATP als bedeutender Neurotransmitter oder Kotransmitter erweitert; eine ausführliche Darstellung findet sich in Ralevic & Burnstock (1998).

Eine erste Klassifizierung der membranständigen Purinrezeptoren war bereits Ende der 70er Jahre durch Burnstock (1978) erfolgt. Danach werden sie in zwei Hauptgruppen eingeteilt, den P1- und den P2-Rezeptoren. Für die metabotropen (G-Protein gekoppelten) P1-Rezeptoren ist Adenosin ein wichtiger Agonist. Die P2-Rezeptoren, die vor allem durch ATP und UTP agonisierbar sind, bestehen aus zwei jeweils mehrere Subtypen umfassende Untergruppen, den P2X- und den P2Y-Rezeptoren. Die P2X-Rezeptoren bilden durch die Zellmembran hindurch führende Ionenkanäle, die sich bei Bindung von ATP auf der extrazellulären Seite für kleinere Ionen (meist Kationen) öffnen und daher zur raschen Signalübertragung dienen. Die P2Y-Rezeptoren dagegen sind metabotrop. Sie verfügen über sieben transmembrane Domänen,

die auf der Innenseite der Zellmembran an globuläre Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind, die ihrerseits ein second messenger System modulieren z. B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP).

Mit der fortschreitenden Entwicklung molekularbiologischer Methoden konnte in den vergangenen zwei Jahrzehnten die Suche nach P2-Rezeptoren in neuronalen Geweben intensiviert werden. In der zweiten Hälfte der 90er Jahre wurden diese Bemühungen dann auf die Retina ausgedehnt. Wie unten ausgeführt, konnten in den letzten Jahren auch in den Netzhäuten vieler Tierarten verschiedene Subtypen der P2X- und P2Y-Rezeptoren mittels molekularbiologischer Verfahren nachgewiesen werden. Leider fehlen entsprechende Arbeiten im Fall des Huhns weitgehend mit Ausnahme der embryonalen Retina (z. B. Sugioka *et al.*, 1996; Bo *et al.*, 2000). Allerdings wurden P2-Rezeptoren nicht nur in Säugetiernetzhäuten (vor allem Ratten, Kaninchen und Primaten) sondern auch in Amphibien (Reifel Saltzberg *et al.*, 2003) identifiziert. Zusammen mit den Nachweisen aus der embryonalen Hühnernetzhaut berechtigt dies zu der Annahme, dass auch die Retina des Huhns eine ähnliche Vielfalt an P2-Rezeptoren aufweist, wie sie bereits aus der Säugernetzhaut bekannt ist. In dieser wurden inzwischen nahezu in jeder Zellart Subtypen der P2X- und P2Y-Rezeptoren gefunden (z. B. Greenwood *et al.*, 1997; Brandle *et al.*, 1998; Wheeler-Schilling *et al.*, 2000). Insbesondere die Müller-Zellen exprimieren eine Vielfalt an Subtypen des P2X-Rezeptors (Pannicke *et al.*, 2000; Jabs *et al.*, 2000) aber wahrscheinlich auch solche des P2Y-Rezeptors (Reifel Saltzberg *et al.*, 2003).

Im Fall des RPE wird der immunhistochemische Nachweis von Purinrezeptoren durch die starke, dunkle bis schwarze Eigenfarbe des einschichtigen Epithels erschwert. Trotzdem wurden im RPE bereits P1- und P2Y-Rezeptoren identifiziert (Sullivan *et al.*, 1997). Deutliche Hinweise für das Vorhandensein von P2Y- aber auch P2X-Rezeptoren lieferten Untersuchungen mit elektrophysiologischen und calcium imaging Methoden (Peterson *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1999).

E.2 Untersuchungen der Effekte von ATP auf das *in vitro* Präparat

E.2.1 Versuchsspezifische Methoden

Um Aussagen über das Vorkommen von Purinrezeptoren in der Netzhaut und im RPE des Huhns treffen zu können und deren Einfluss auf das *in vitro* ERG zu bestimmen wurden folgende sechs unabhängige Versuche durchgeführt. Für jeden dieser Versuche wurde ein frisches Präparat hergestellt. Die Behandlung erfolgte für ca. 40 min von der retinalen Seite des Präparats, indem ATP (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 1,0 mM der physiologischen Lösung zugegeben wurde.

Von den Aufzeichnungen der lichtinduzierten Antworten wurden aus jedem Versuch sieben Phasen (I-VII) ausgewertet. Die Versuchsphasen wurden, wie folgt, gewählt:

- I und II als Kontrollen, 30 bzw. 5 min vor Beginn der Behandlung,
- III und IV während der Behandlung, 15 bzw. 35 min nach Behandlungsbeginn,
- V, VI und VII als Kontrollen 15, 45 und 75 min nach Ende der Behandlung.

Die Entwicklung der Bestandpotenziale wird in zwei Serien von Abbildungen über jeweils 50 Iterationen mit einem Messwert pro Iteration dargestellt. Die erste Serie (Abbildung E.1 bis Abbildung E.3) zeigt die Bestandpotenziale um den Beginn der ATP-Behandlung. Die ersten 20 Messungen (Iterationen) wurden vor Beginn der Behandlung weitere 30 Messungen während dieser aufgezeichnet. Die zweite Serie (Abbildung E.4 bis Abbildung E.6) gibt den Verlauf um das Ende der Behandlung wieder. Die ersten 20 Werte wurden während der Behandlung, weitere 30 nach deren Ende registriert. In beiden Serien wurde eine eventuell aufgetretene Drift in den Kurven folgendermaßen korrigiert: Aus den ersten 20 dargestellten Messpunkten des betreffenden Versuchs der jeweiligen Serie wurde eine Regressionsgerade berechnet, und

diese als Korrekturfaktor für alle 50 dargestellten Werte des selben Versuchs verwendet.

E.2.2 Ergebnisse der Behandlungen mit ATP

E.2.2.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen in Folge der Behandlung mit ATP

Die Gabe von ATP über die retinale Superfusion löste deutliche Reaktionen in den Bestandspotenzialen aus. Nach Beginn der Behandlung stieg in allen sechs Versuchen das TTP an (Abbildung E.1). Bei vier Versuchen erreichte es nach ca. 10 bis 12 min den Höchstwert und ging anschließend wieder zurück, während es bei den zwei übrigen Versuchen weiter aber nur noch geringfügig zunahm. Im TEP wurde kurz nach Behandlungsbeginn eine Oszillation sichtbar (Abbildung E.3). Das Bestandspotenzial sank für zwei bis drei Minuten geringfügig ab. Danach ging das TEP in den schon beim TTP beobachteten Anstieg über, der nach ca. 10 min einen Plateauwert erreichte. Auch das TRP zeigte eine deutliche Veränderung in Folge der Einwirkung von ATP (Abbildung E.2). Während der ersten zwei Minuten war bei allen sechs Versuchen eine Erhöhung des transretinalen Bestandspotenzials zu beobachten. Da dieser Anstieg des TRPs das Absinken des TEPs zu Beginn der o. g. Oszillation kompensiert, ist diese im TTP nicht zu erkennen. Anschließend nahm das TRP über einen Zeitraum von mindestens 10 min langsam ab.

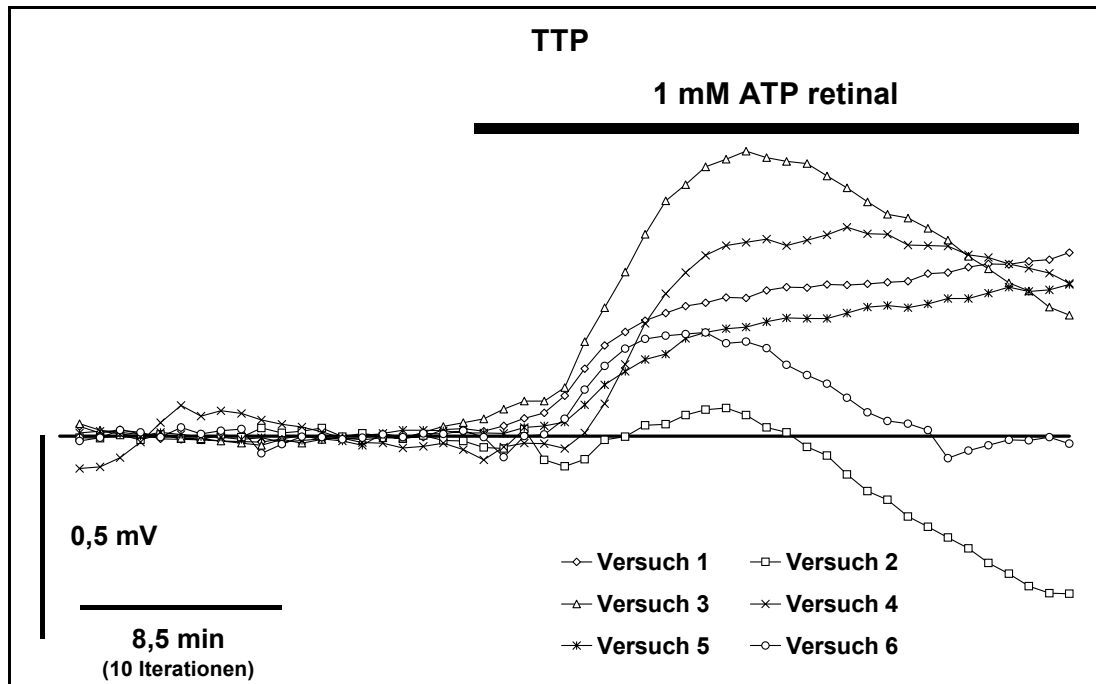


Abbildung E.1 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit ATP (1 mM) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist eine deutliche Zunahme wenige Minuten nach Beginn der Behandlung, die in drei Versuchen in einen langsamen Rückgang übergeht.

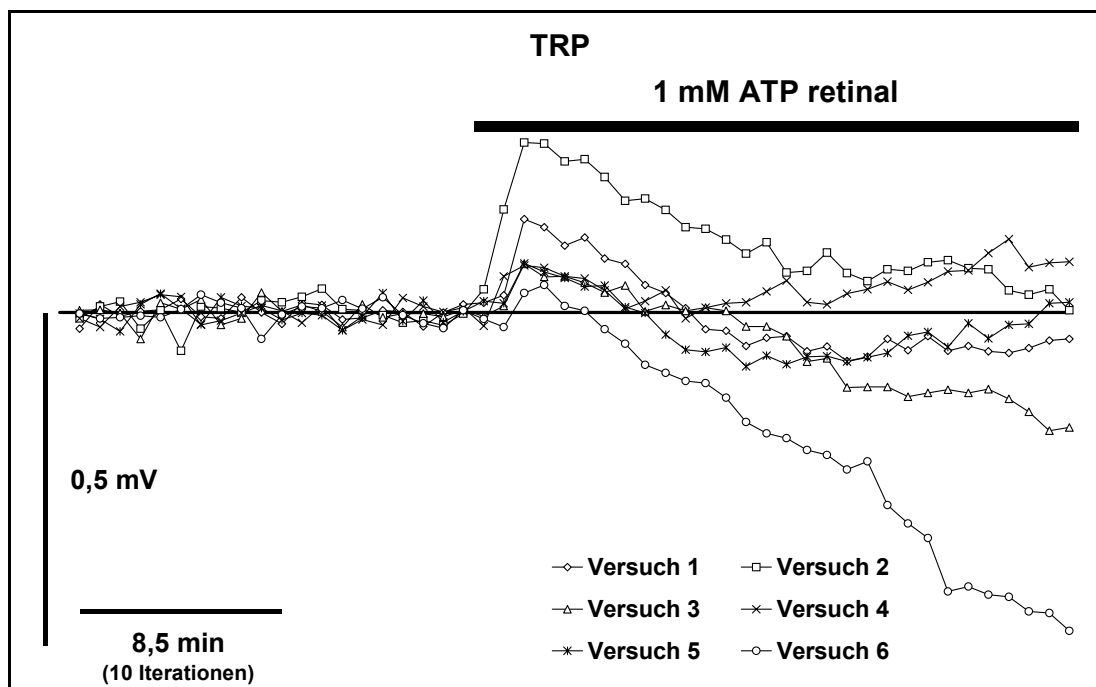


Abbildung E.2 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit ATP (1 mM) von der retinalen Seite des Präparats, nach einem raschen Anstieg zu Beginn der Behandlung fiel das TRP über einen längeren Zeitraum wieder langsam ab.

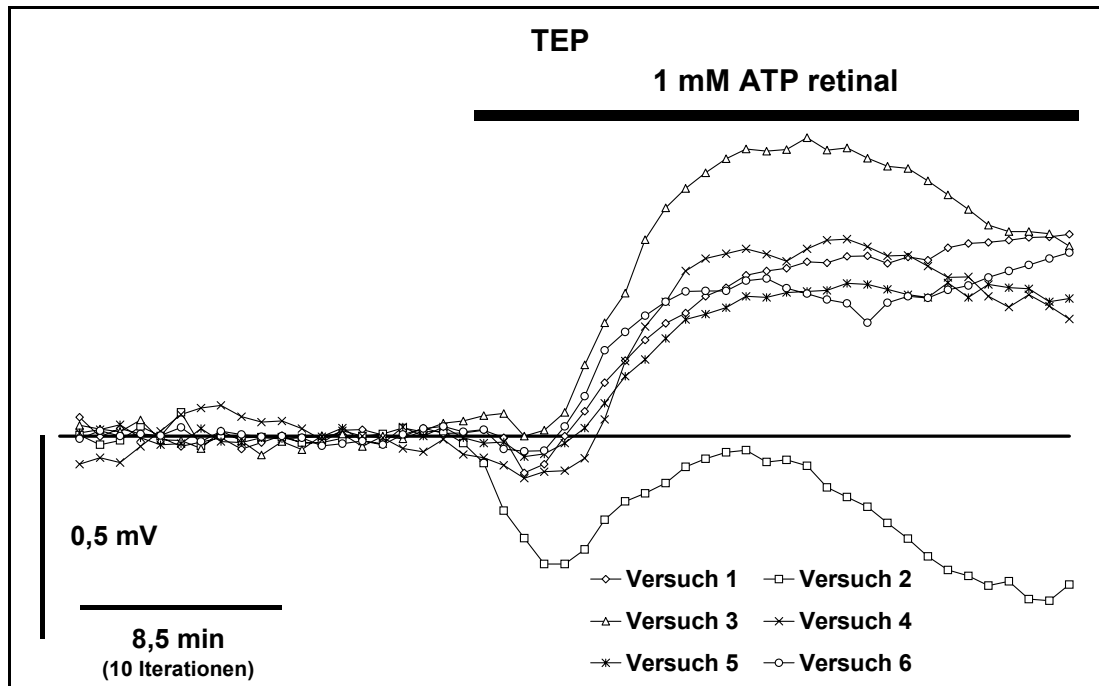


Abbildung E.3 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit ATP (1 mM) von der retinalen Seite des Präparats, nach einer kurzen Oszillation zu Beginn der Behandlung nahm das TEP deutlich zu.

Nach dem Ende der Behandlung mit ATP veränderten sich in fast allen Versuchen die drei Bestandpotenziale deutlich (Abbildung E.4 bis Abbildung E.6). Allerdings waren diese Veränderungen nicht einheitlich. Die Potenziale stiegen in einigen Fällen an, während sie in anderen ab fielen. Überdies traten im Versuch 3 im TRP mehrfach und nahezu regelmäßig Oszillationen auf (Abbildung E.5). Deren Ursache dürfte eine mangelhafte Isolierung zwischen der oberen und unteren Hälfte der Perfusionskammer sein.

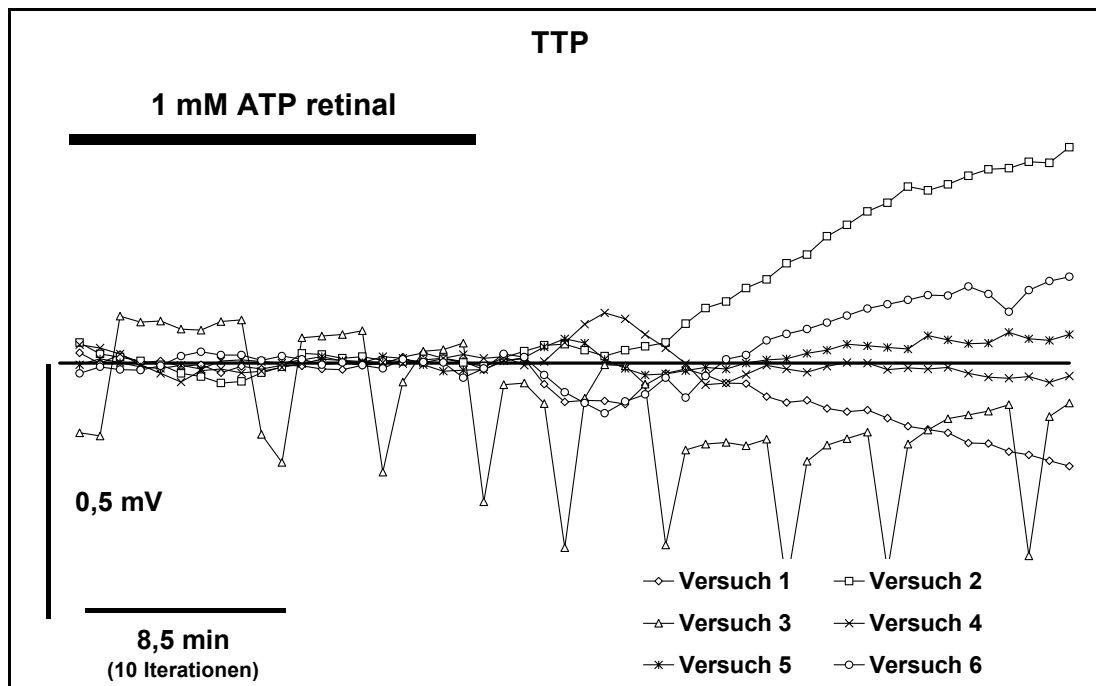


Abbildung E.4 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit ATP (1 mM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In fünf der sechs Versuche veränderte sich das TTP nach der Beendigung der Behandlung deutlich aber uneinheitlich. Die im Versuch 3 erkennbaren häufigen Oszillationen wurden entstammen dem TRP (Abbildung E.5). Ihre Ursache ist vermutlich eine mangelhafte Isolierung zwischen den beiden Hälften der Perfusionskammer)

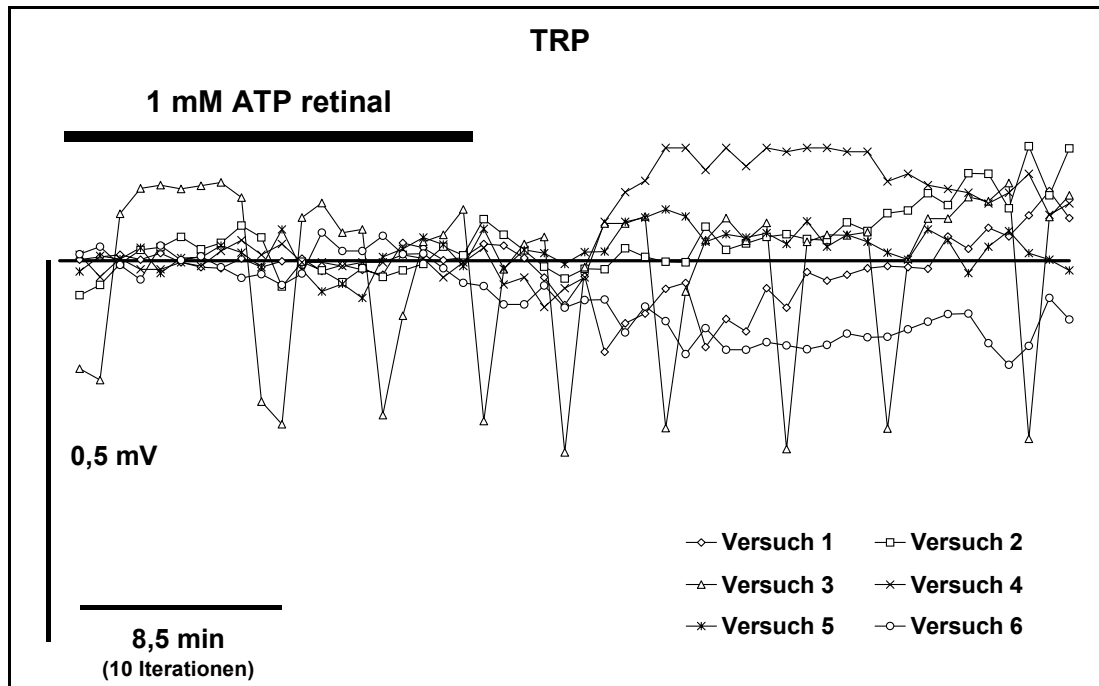


Abbildung E.5 Verlauf des transretinalen Bestandpotenzials: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit ATP (1 mM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Auf das Ende der Behandlung reagierte das TRP uneinheitlich. Im Versuch 3 traten sich ständig wiederholende Oszillationen auf (vermutlich die Folge einer unvollständigen elektrischen Isolierung der oberen Hälfte der Perfusionskammer von der unteren Hälfte).

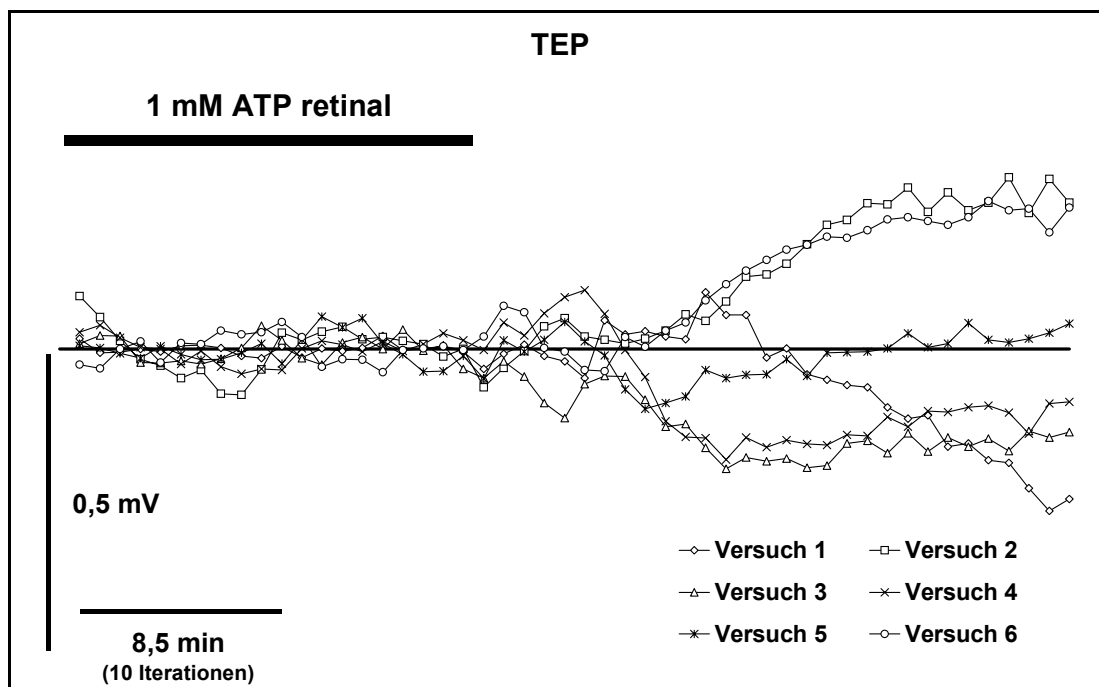


Abbildung E.6 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit ATP (1 mM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die Beendigung der Behandlung hatte deutliche aber uneinheitliche Veränderungen im TEP zur Folge.

E.2.2.3 Effekte von ATP auf die lichtinduzierten Signale

a) Verlauf des *in vitro* ERGs und seiner Komponenten

Die Daten in den weiteren Abbildungen wurden, wie im Kapitel Material und Methoden (Abschnitt B.8 und B.9) beschrieben, aufgezeichnet und ausgewertet. In Abbildung E.7 bis Abbildung E.9 wird der Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TRP, in den sechs Versuchen über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I bis VII, s. o. Versuchsspezifische Methoden für Erläuterungen) wiedergegeben. Die Kurven im Teil B jeder Abbildung zeigen die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial.

Bereits nach 15 min Behandlung mit ATP hatte die Amplitude der c-Welle im TTP z. T. deutlich zu genommen, wie die Differenzkurve des TTPs zwischen Phase III und II erkennen lässt (Abbildung E.7 B). Doch noch während der Behandlung begann eine gegenläufige Entwicklung. Bereits 35 min nach dem Beginn der Behandlung war die Amplitude der c-Welle wieder abgesunken (IV. – III.). Dieser Trend setzte sich auch nach der Beendigung der ATP-Behandlung fort (V. – IV.), im Falle der Versuche 3 und 4 besonders stark.

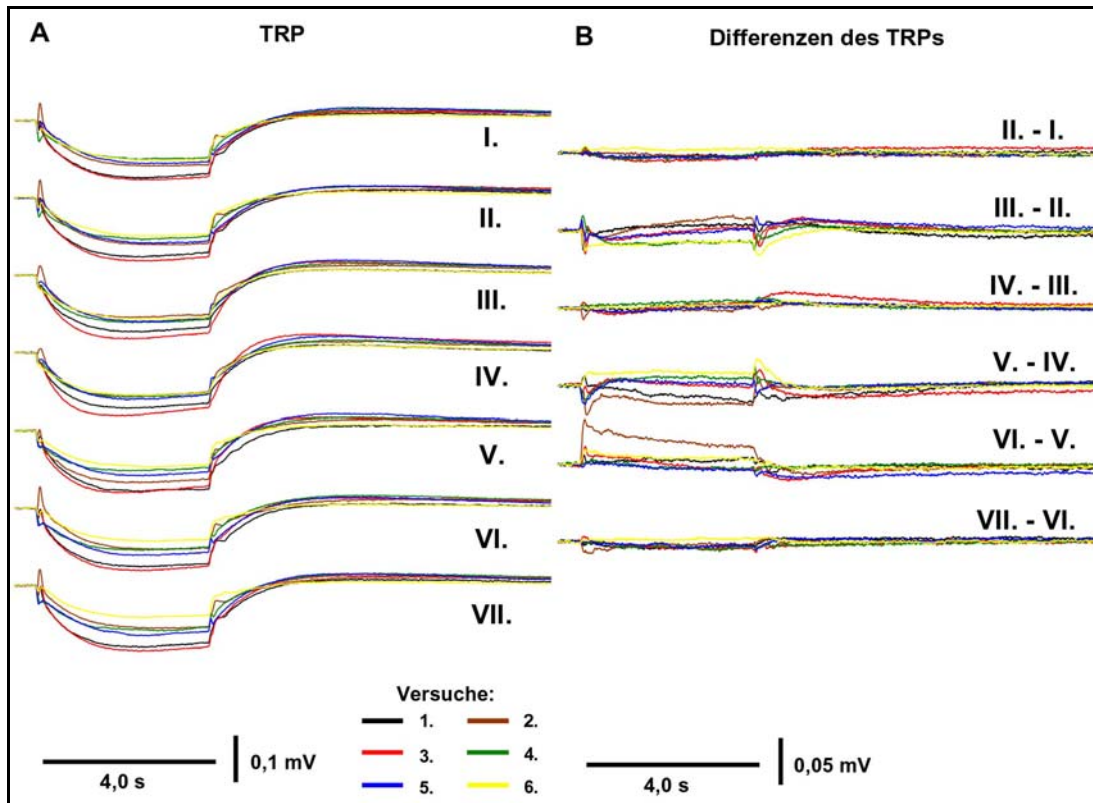


Abbildung E.8 **A (linke Hälfte):** TRPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen ein Präparat mit ATP (1 mM) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge zu sieben aufeinander folgenden Versuchszeitpunkten (I. – VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text). **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs des nachfolgenden und des jeweils vorherigen Versuchszeitpunkt für das entsprechende Experiment. Bei den meisten Versuchen ist eine Abnahme der Amplitude der langsamen Lichtreaktion nach 15 min Einwirkungsdauer von ATP zu beobachten (III. - II.). Nach dem Ende der Behandlung (V. - IV.) nimmt diese Amplitude wieder ab. In einigen Fällen setzt diese Erholungsphase deutlich verzögert ein oder hält länger an (VI. - V.).

Aus den Kurven der Kontrollphasen (I, II und V bis VII) für die drei gemessenen Potenziale und deren Differenzen ist zu erkennen, dass die Drift während der Versuche keine bedeutenden Ausmaße erreichte. Überdies war ihr geringer Betrag dem Behandlungseffekt, d. h. der Zunahme der Amplitude der c-Welle, entgegen gerichtet. Die obigen Abbildungen lassen auch einen deutlichen Einfluss der ATP-Behandlung auf die Amplituden der raschen (a-, b- und d-) Wellen des ERGs vermuten. Vor allem die Aufzeichnung des TRPs und TEPs und ihrer Differenzen zwischen den Versuchsphasen (Abbildung E.8 und Abbildung E.9) deuten eine Reduktion der Amplituden der raschen Wellen (d. h. a-, b- und d-Welle) an. Jedoch lässt sich dies aus den Gesamtdarstellungen der 12,5 s langen Aufzeichnungen nicht eindeutig ablesen, da die Auflösung nicht

ausreichend ist. Daher werden im nächsten Abschnitt die Amplituden der jeweiligen Wellen gesondert ausgewertet. Mittels eines dort beschriebenen Verfahrens wird die Entwicklung dieser Amplituden über den Versuchsverlauf sichtbar gemacht.

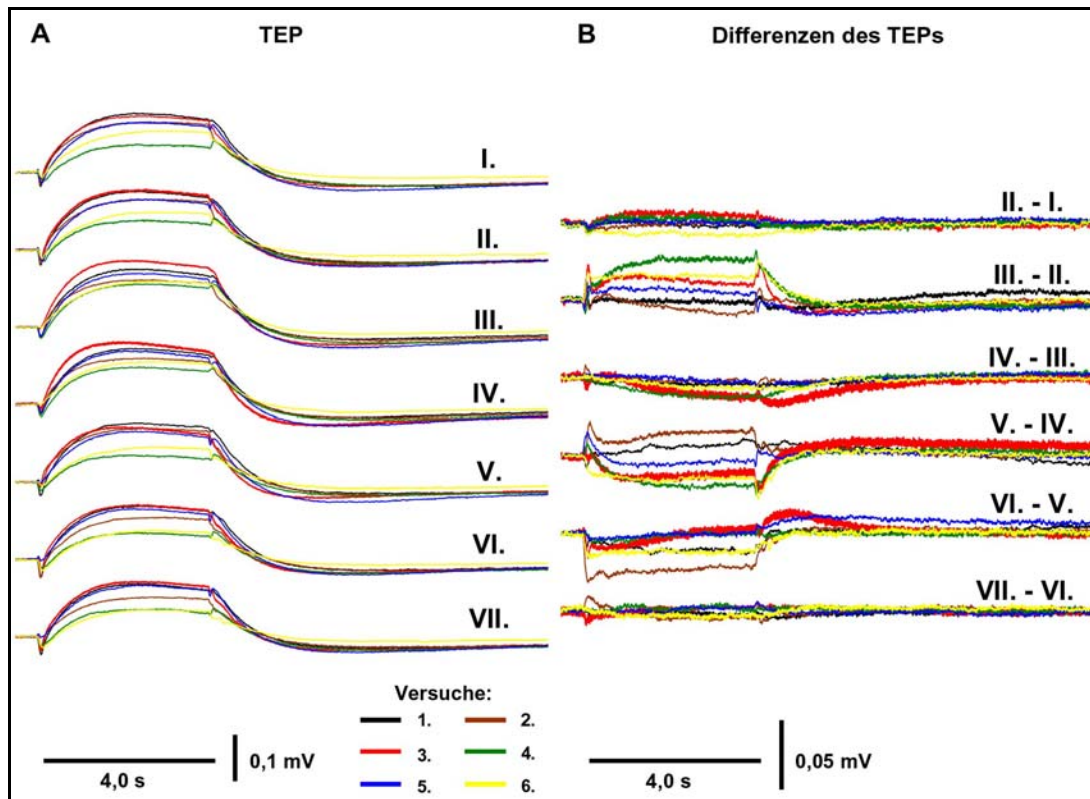


Abbildung E.9 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen ein Präparat mit ATP (1 mM) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge zu sieben aufeinander folgenden Versuchszeitpunkten (I. – VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text). **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs des nachfolgenden und des jeweils vorherigen Versuchszeitpunkt für das entsprechende Experiment. Sichtbar ist ein deutlicher Anstieg der Amplitude der langsamen Lichtreaktion nach 15 min Einwirkungsdauer von ATP (III. – II.). Nach dem Ende der Behandlung (V. – IV.) nimmt diese Amplitude wieder ab. In einigen Fällen setzt diese Erholungsphase deutlich verzögert ein (VI. – V.).

b) Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden bei ATP-Behandlung

Wegen teilweise großer Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Darstellung der Amplituden verzichtet. Stattdessen wurden sie nach folgendem Verfahren in Bezug zur Versuchsphase II (Kontrolle, 5 min vor Beginn der Behandlung) gesetzt. Dazu wurde die jeweilige Differenz zwischen den Amplituden der verschiedenen

Wellen in jeder Versuchsphase und in der Phase II berechnet. Somit ergibt sich für die Versuchsphase II ein Wert von Null. Die Werte für die übrigen Versuchsphasen zeigen dann die Abweichung der Amplitude in der jeweiligen Phase von dem in der Phase II gemessenen Wert der Amplitude. Im Falle der a-Welle ist zu berücksichtigen, dass ihre Amplitude ein Minimum in der aufgezeichneten Kurve bildet. Daher bedeutet eine positive Differenz für die a-Welle in einer bestimmten Versuchsphase eine Abnahme ihrer Amplitude bezogen auf die Versuchsphase II, eine negative Differenz dagegen eine Zunahme. Dasselbe gilt für die langsame Welle (Komponente der c-Welle) im TRP.

Änderungen in der Amplitude der langsamen c-Welle

Wie oben beschrieben, war die Amplitude c-Welle in allen Versuchen 15 min nach Beginn der Behandlung mit ATP angestiegen, wenn auch im Fall von vier Versuchen nur geringfügig (Abbildung E.10). Zieht man in Betracht, dass sie im Kontrollzeitraum vor der Behandlung (Versuchsphase I bis II) in allen Versuchen leicht abgenommen hatte, und nimmt an, dass, sich dieser Trend ohne den Einfluss von ATP auch in Phase III fortgesetzt hätte, kann man auch bei einem geringen Anstieg der Amplitude von Phase II auf III von einer deutlichen Reaktion des Präparats auf die Behandlung ausgehen.

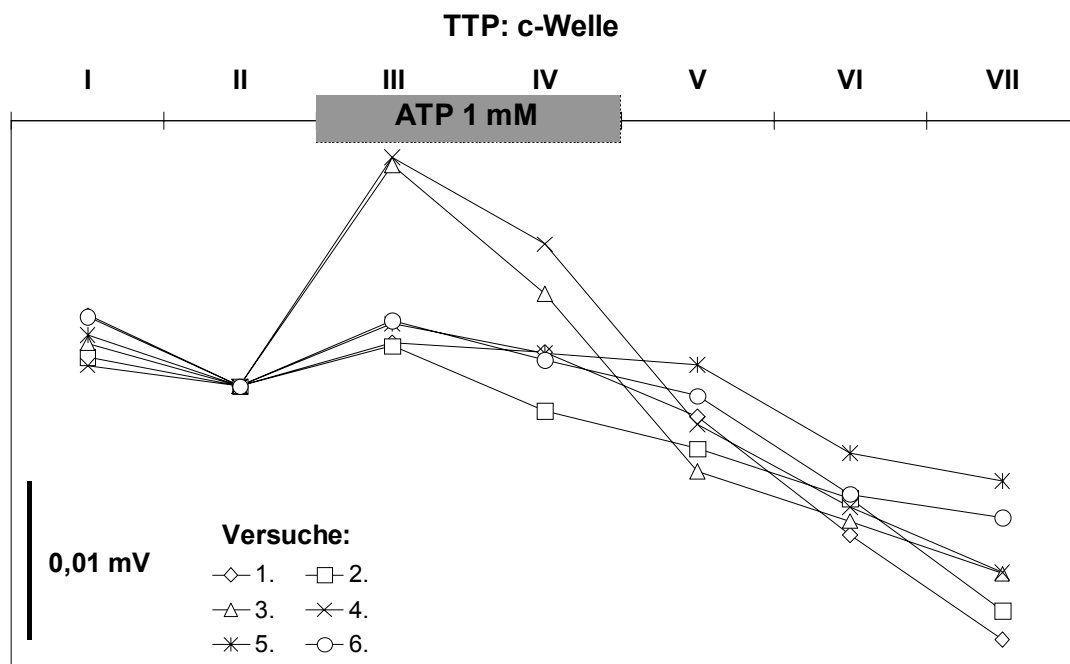


Abbildung E.10 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen sämtlichen Versuchsphasen und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) stieg die Amplitude deutlich an (positive Differenzen).

Betrachtet man die zugehörigen Amplitudenänderungen im TRP und im TEP (Abbildung E.11 und Abbildung E.12), so zeigt sich, dass diese Zunahme der Amplitude der c-Welle in vier Versuchen durch einen Anstieg der entsprechenden Komponente im TEP verursacht wurde, während sie in zwei Fällen auf ein Rückgang der Amplitude der negativen Komponente der c-Welle im TRP zurückzuführen ist. Noch vor Ende der Behandlung war in Versuchsphase IV eine Abnahme der c-Wellen-Amplitude erkennbar, die sich in den folgenden Phasen ohne Behandlung (V bis VII) fortsetzte.

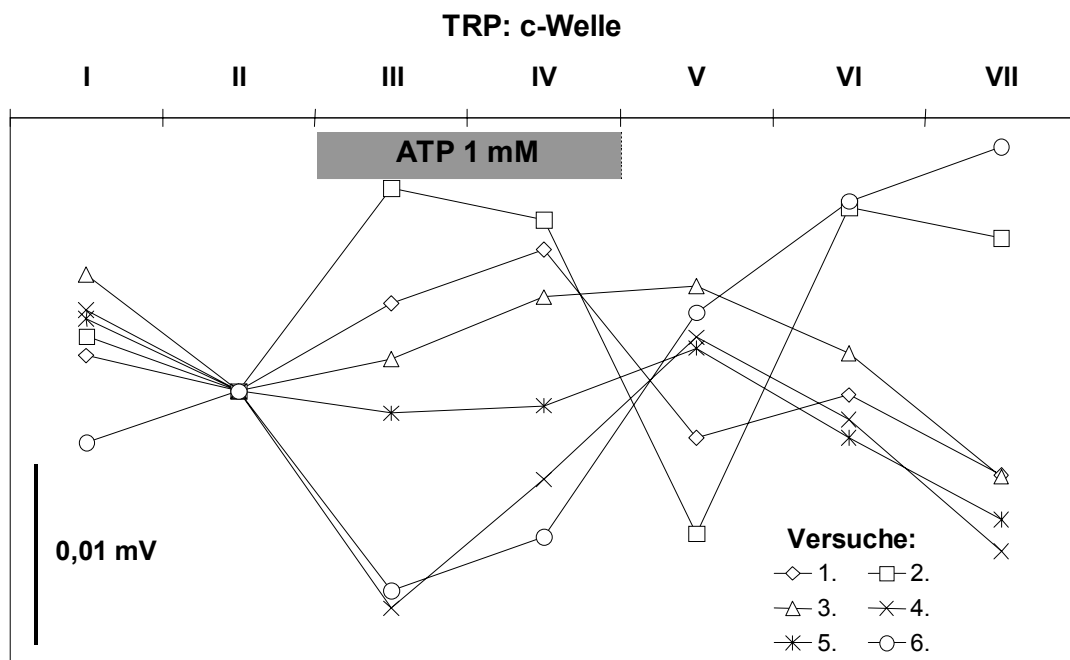


Abbildung E.11 Differenzen der Amplituden der Komponenten der c-Welle im TRP zwischen sämtlichen Versuchsphasen und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In vier Versuchen nahm die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP nach Beginn der Behandlung mit ATP (1 mM) erkennbar ab. Da die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP negativ ausgerichtet ist, zeigt eine positive Differenz eine Abnahme der Amplitude an).

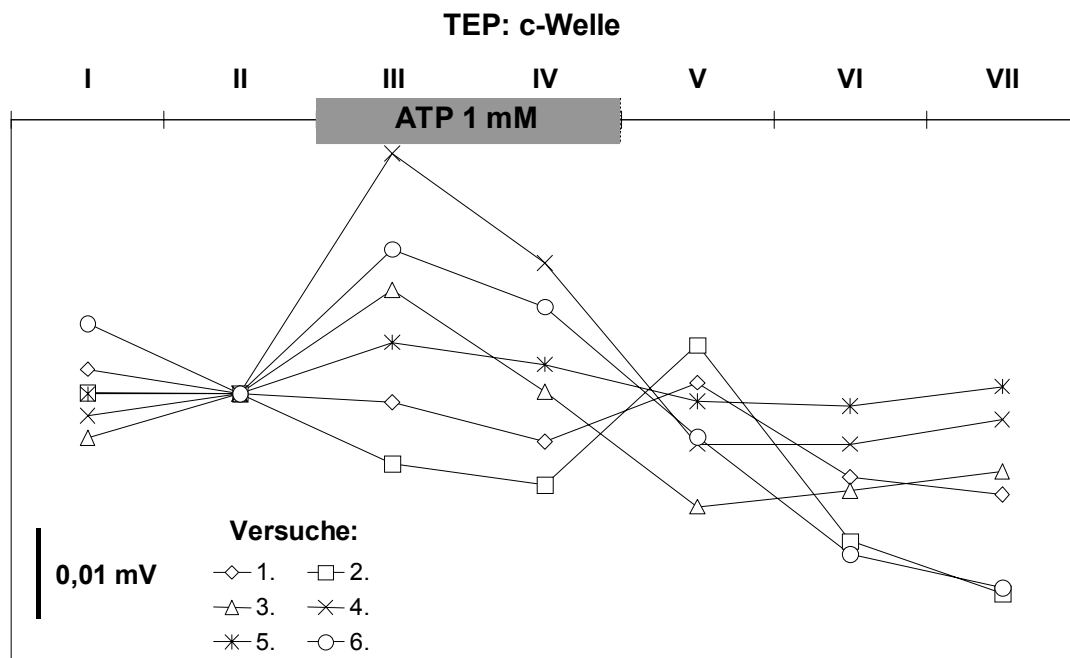


Abbildung E.12 Differenzen der Amplituden der Komponenten der c-Welle im TEP zwischen sämtlichen Versuchsphasen und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In vier Versuchen stieg die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP nach Beginn der Behandlung mit ATP (1 mM) deutlich an.

Änderungen in den Amplituden der a-, b-, und d-Welle (rasche Wellen)

Die Amplituden der raschen Wellen im ERG nahmen mit Ausnahme einzelner Versuche nach Beginn der Behandlung ab. Im Fall der a-Welle im TTP ging die (negative) Amplitude in fünf Versuchen während der ATP-Behandlung zurück (eine positive Differenz negativer Amplituden zwischen zwei Versuchsphasen stellt einen Rückgang dar). Nach dem Ende dieser stieg sie in vier Versuchen innerhalb von 15 min wieder deutlich an (Abbildung E.13).

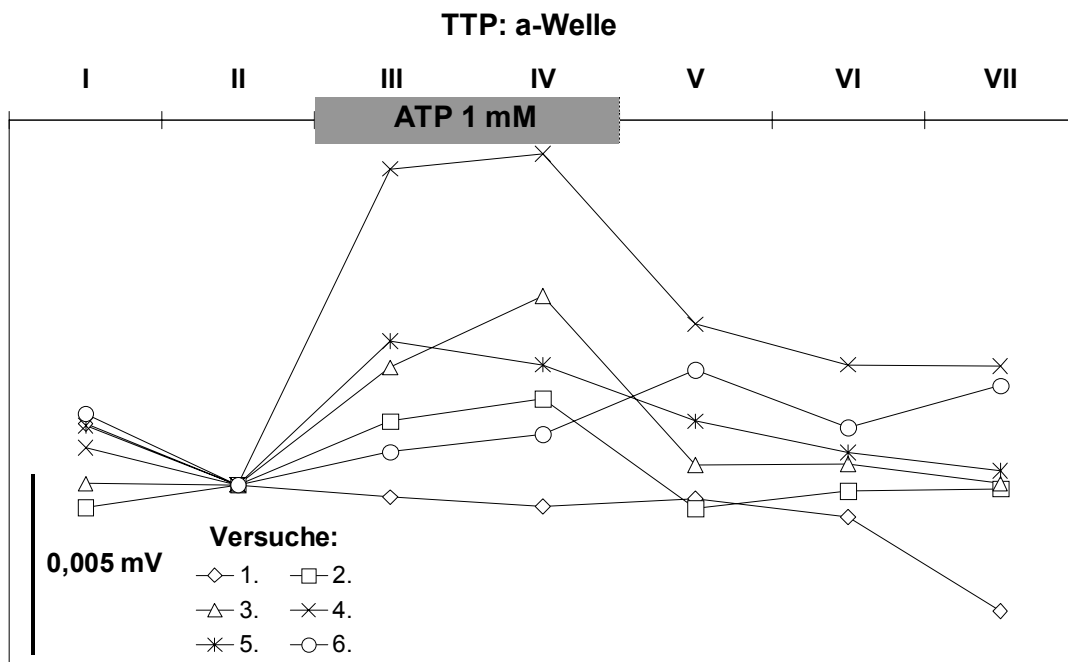


Abbildung E.13 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) sank die Amplitude in fünf Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang) und nahm nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) wieder zu.

Dieses Verhalten der a-Welle wurde in vier von fünf Versuchen durch entsprechende Amplitudenänderungen der betreffenden Komponente der a-Welle im TRP hervorgerufen, die eine gegenläufige Änderung im TEP in vier von sechs Versuchen klar übertraf (Abbildung E.14 und Abbildung E.15).

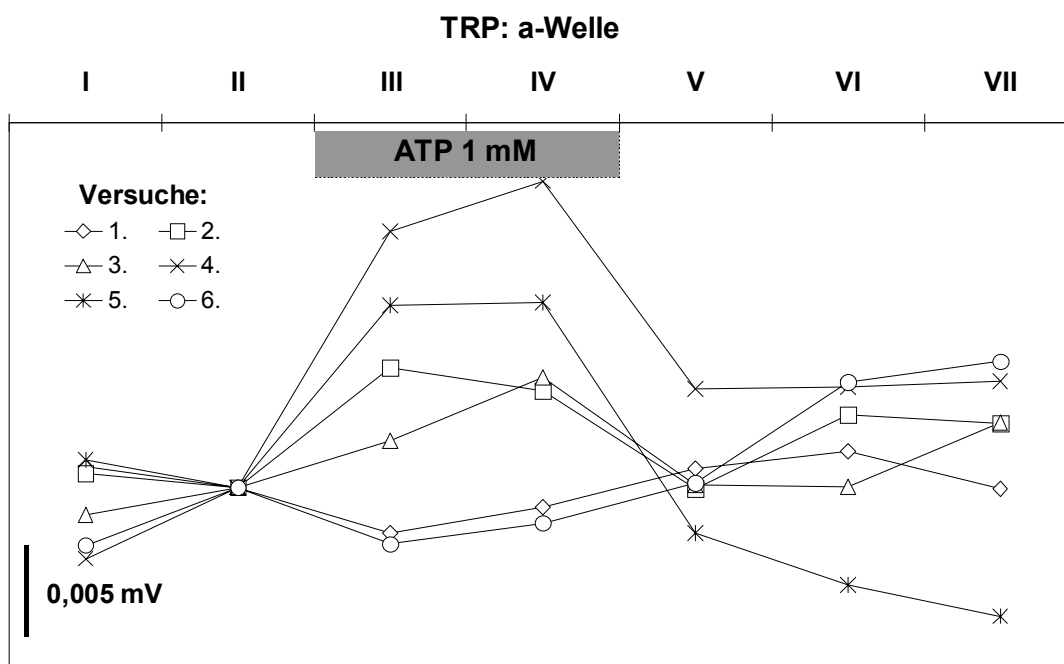


Abbildung E.14 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) sank die Amplitude der Komponente der a-Welle im TRP in fünf von sechs Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

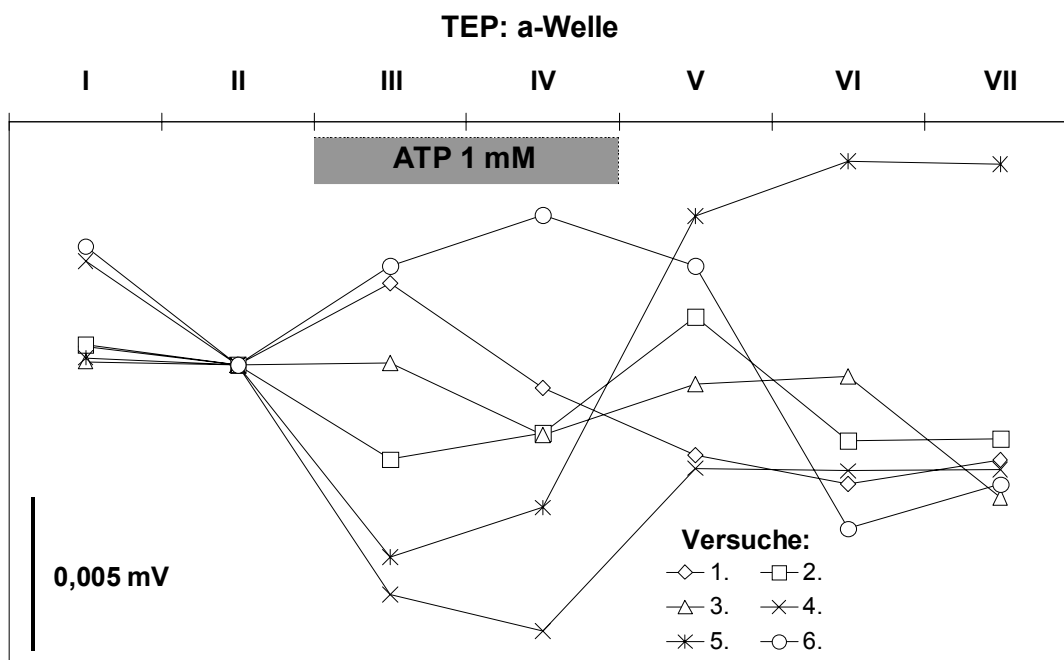


Abbildung E.15 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) sank die Amplitude der Komponente der a-Welle im TEP in drei von sechs Versuchen sofort (III) in Versuch 3 etwas verzögert (IV) ab.

Die Verhältnisse bei der b-Welle sind etwas komplizierter. Da das TTP oftmals keine eindeutige b-Welle aufwies, wurde der Zeitpunkt für ihre Amplitude mittels der Aufzeichnungen des TRPs bestimmt und für diesen dann die Amplituden der b-Welle für das TTP, TRP und TEP berechnet. Eine deutliche Reduktion der Amplitude der b-Welle im TTP trat nur bei zwei Experimenten auf (Abbildung E.16).

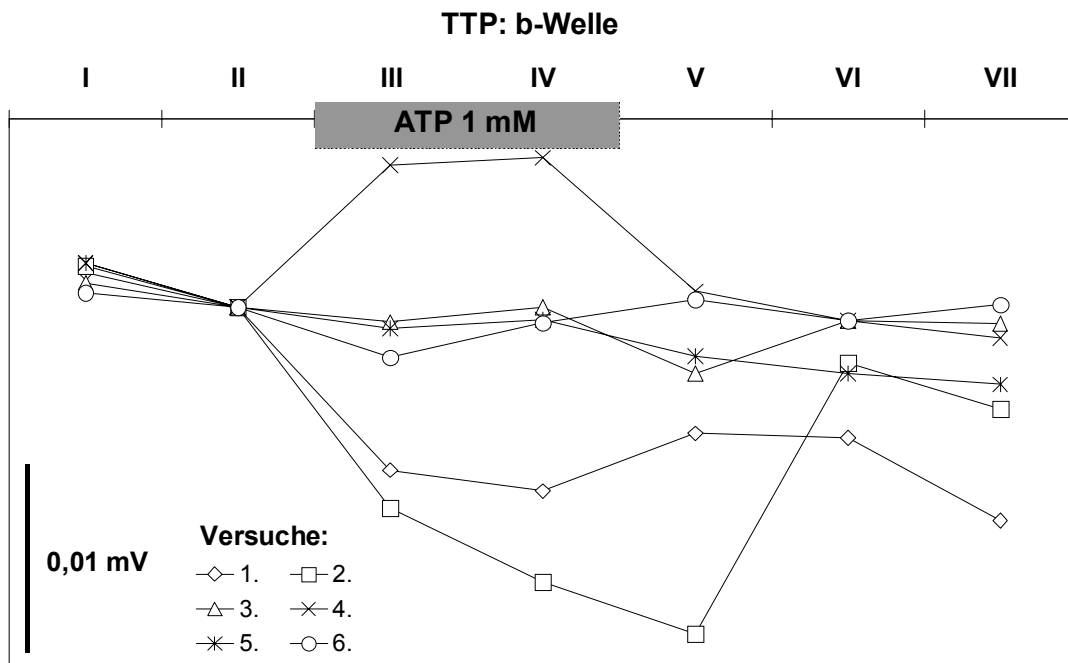


Abbildung E.16 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) nahm nur in zwei Versuchen die Amplitude deutlich ab.

Allerdings war auch nur in diesen beiden Versuchen eine b-Welle in den Aufzeichnungen des TTPs über den gesamten Versuchszeitraum klar erkennbar. Während in drei anderen Versuchen, in denen sich schon anfänglich nur eine schwache und in den späteren Phasen keine b-Welle im TTP zeigte, nur eine geringfügige Abnahme der Amplitude zu beobachten war. Überdies lag diese lediglich im Rahmen des Trends, der sich bereits während des Kontrollphasen I bis II gezeigt hatte. In einem Versuch war von Anfang an keine b-Welle sichtbar. Hier ergab sich für den aus dem TRPs ermittelten Zeitpunkt der b-Welle im TTP sogar eine Zunahme der Amplitude während der Behandlung mit ATP. Wahrscheinlich war dies nur eine Auswirkung der

reduzierten Amplitude der a-Welle bei Abwesenheit der b-Welle, da eine Verringerung der negativen a-Wellen-Amplitude eine Erhöhung des gemessenen Potentials im zeitlichen Umfeld dieser bedeutet.

Die Betrachtung der Komponenten der b-Welle im TRP und im TEP (Abbildung E.17 und Abbildung E.18) zeigt beträchtliche Veränderungen der Amplitude der b-Welle im Zusammenhang mit der ATP-Behandlung. Die Änderungen nach Beginn der Behandlung liefen überdies den zwischen den Kontrollphasen I und II vorherrschenden Trends entgegen. In fünf Versuchen nahm die Amplitude im TRP während der Behandlung mit ATP (Versuchsphase III und IV) deutlich ab. Die Amplitude des korrespondierenden Minimums im TEP wurde in allen Versuchen kleiner. Die Veränderungen im TEP und im TRP wirken im Gesamtpotenzial (TTP) gegenläufig, da ihre Amplituden entgegen gerichtet sind. Im TTP wurde deshalb die starke Abnahme der Amplitude des TRP oft durch die gleichzeitige Abnahme der negativen Amplitude im TEP zumindest teilweise kompensiert. Daher war im TTP in mehreren Fällen keine deutliche Verringerung der b-Wellen-Amplitude zu beobachten. Die Veränderungen der Amplituden im Bereich der b-Welle waren sowohl im Fall des TRPs wie auch des TEPs in vier von sechs Versuchen reversibel, d. h. die Werte waren spätestens 45 min nach Beendigung der ATP-Behandlung (Phase VI) wieder nahezu auf dem Ausgangsniveau (Phase II).

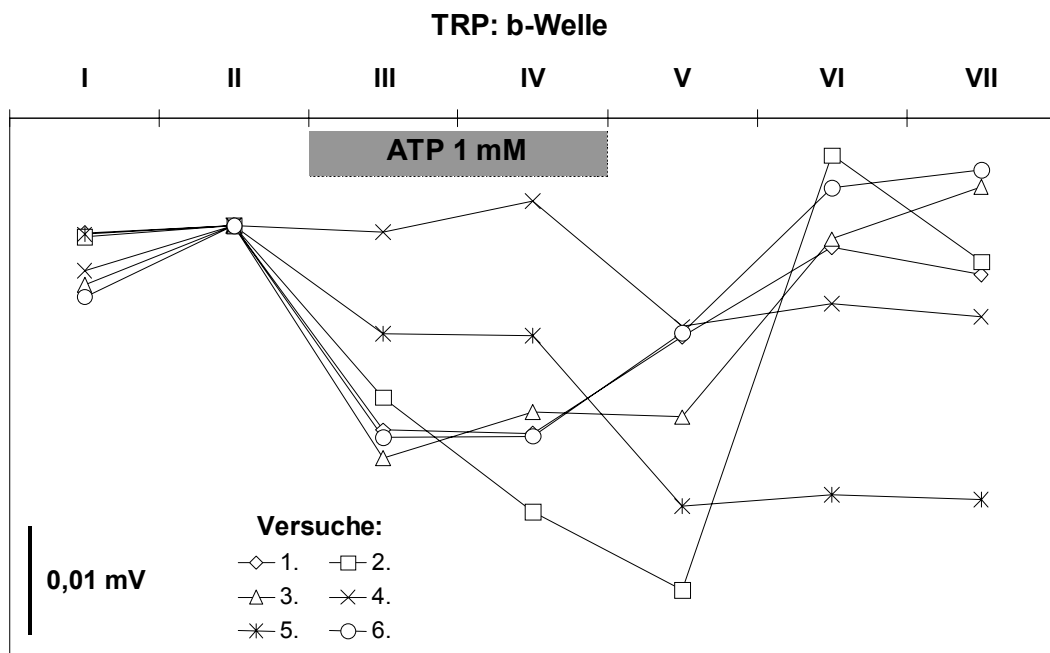


Abbildung E.17 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) sank die Amplitude in fünf Versuchen deutlich ab und stieg in vier Fällen nach dem Ende der Behandlung wieder an (V bis VII).

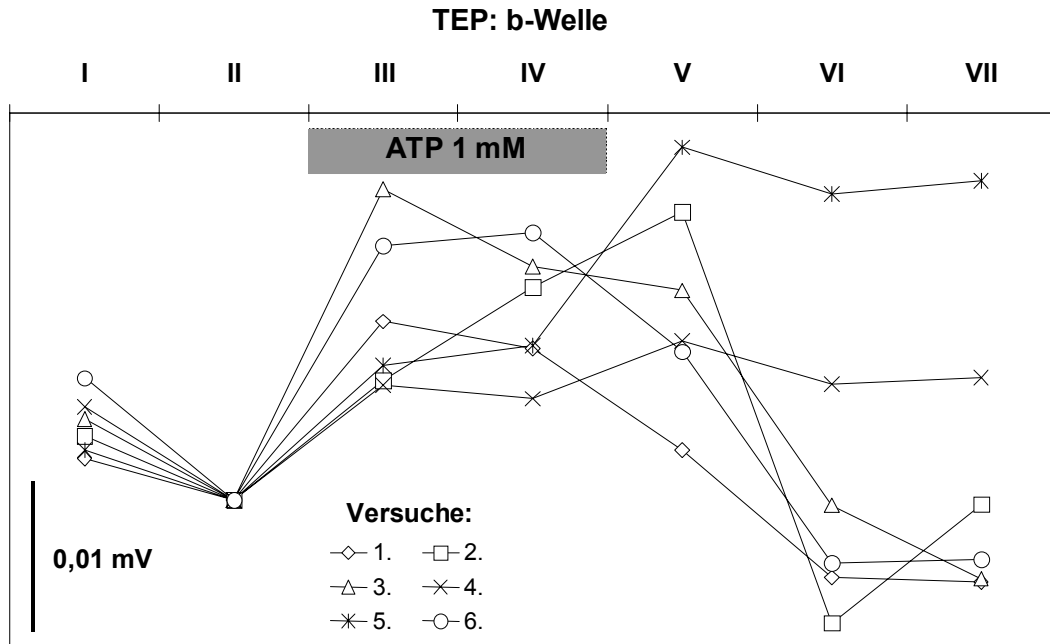


Abbildung E.18 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) ging die Amplitude in allen Versuchen deutlich zurück (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang). Nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) stieg die Amplitude der Komponente der b-Welle im TEP in vier Versuchen wieder an.

Die Amplitude der d-Welle im TTP fiel bis 15 min nach Beginn der ATP-Behandlung (Versuchsphase III) in allen sechs Versuchen im Vergleich zum Kontrollphase II (5 min vor Behandlungsbeginn) ab (Abbildung E.19). Bei drei Versuchen (1, 4 und 5) war die Abnahme der Amplitude allerdings nur gering. Trotzdem stellt dies eine deutliche Veränderung dar, da dieser Rückgang der Amplitude eine Trendumkehr bedeutete. Denn während des Kontrollzeitraums vor der ATP-Applikation (Versuchsphase I bis II) war ein Anstieg der Amplitude der d-Welle beobachtet worden. Bereits während des Behandlungszeitraums begann die Amplitude wieder an zu steigen. Die drei Versuche mit der stärksten Verringerung der Amplitude zeigten erst nach Ende der ATP-Behandlung (Phase V) eine deutliche Erhöhung der d-Wellen-Amplitude auf ungefähr den Ausgangswert aus Phase II.

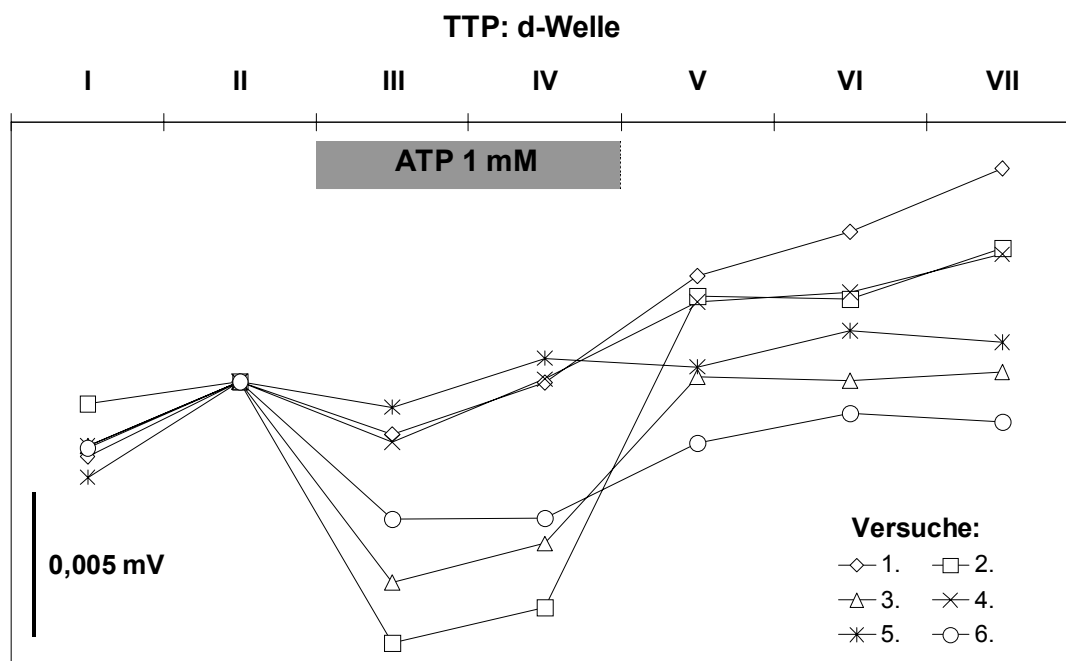


Abbildung E.19 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) trat auf in allen sechs Versuchen eine mindestens geringfügige Reduktion der Amplitude auf. Diese wurde spätestens nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) wieder kompensiert.

In den jeweiligen Komponenten der d-Welle im TRP und im TEP traten die Reaktionen auf den Beginn und das Ende der ATP-Einwirkung stärker hervor als in der d-Wellen-Amplitude im TTP (Abbildung E.20 und Abbildung E.21).

Dies ist durch die gegeneinander gerichteten Amplituden der Komponenten bedingt, die im Gesamtpotenzial (TTP) in ihrer Summe eingehen und sich daher meist teilweise aufheben. In vier Versuchen war der Rückgang der d-Welle im TTP nach Beginn der Behandlung (Phase III) darauf zurückzuführen, dass die negative Amplitude der d-Wellen-Komponente im TRP stärker anstieg als die positive Amplitude im TEP abnahm. Dagegen zeigten zwei Versuche eine Abnahme der negativen Komponente der d-Welle im TRP. Die geringfügige Abnahme der (positiven) Amplitude der d-Welle des TTPs in diesen beiden Versuchen war durch den stärkeren Rückgang der Komponente des TEPs verursacht. Nach dem Ende der Behandlung (Phase V) war in allen Versuchen sowohl im TRP wie auch im TEP eine deutliche Änderung der Amplitude in Richtung des Ausgangswerts (Phase II) zu beobachten, d. h. eine im Laufe der Behandlung angewachsene Amplitude nahm wieder ab und eine verringerte wieder zu.

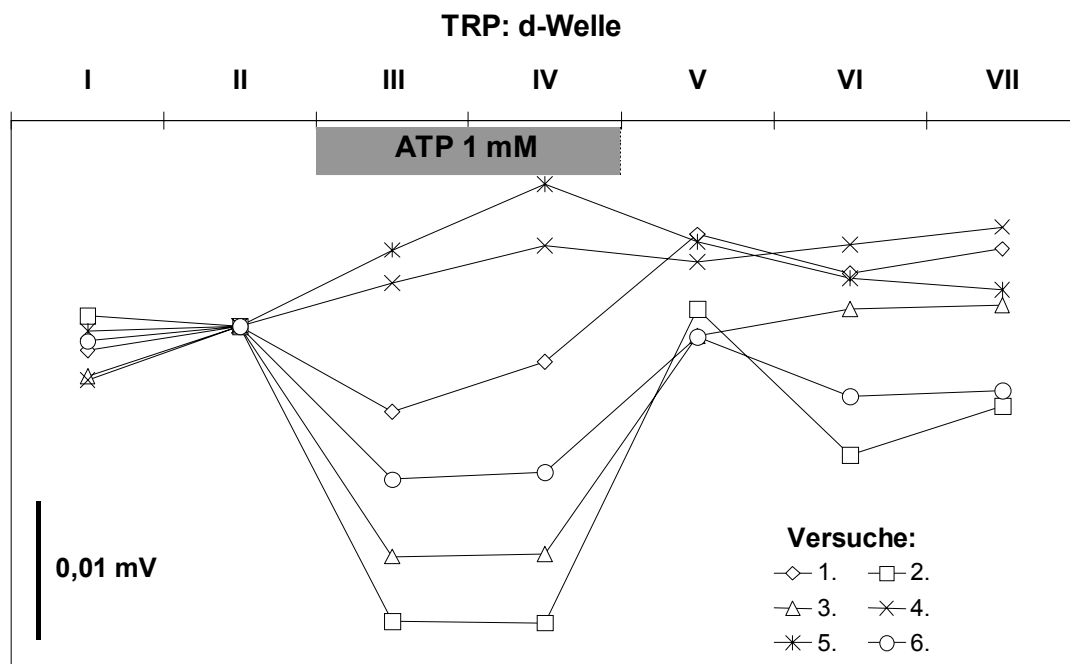


Abbildung E.20 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) stieg die negative ausgerichtete Amplitude in vier Versuchen an (negative Differenz).

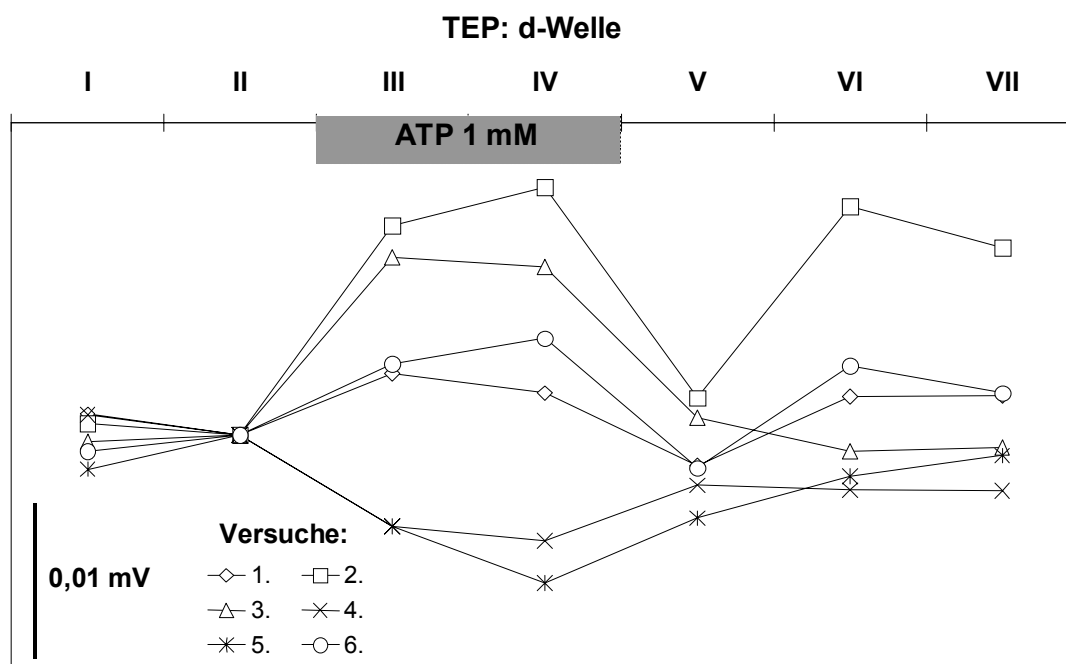


Abbildung E.21 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 mM ATP (III) stieg die positiv gerichtete Amplitude der Komponente der d-Welle im TEP in vier Versuchen an. Im TTP kompensiert sich der Anstieg der Amplituden beider Komponenten der d-Welle teilweise, da die Amplituden des TRPs und des TEPs einander entgegen gerichtet sind.

E.2.3 Diskussion der Wirkung von ATP auf die *in vitro* Netzhaut

E.2.3.2 Änderung der Bestandspotenziale durch ATP-Behandlung

Der im Kapitel E.1 „Einführung: Die Purinrezeptoren“ gegebene Überblick über den Stand der Forschung, wird durch folgende Schlüsse erweitert und vertieft, die aus der vorliegenden Arbeit mit dem *in vitro* Retina-RPE-Choroid Komplex des Huhns gezogen werden können. Schon im TTP war die Wirkung von ATP auf die Bestandspotenziale der *in vitro* Präparation deutlich zum Vorschein gekommen. Die Analyse der beiden Komponenten des TTPs (TRP und TEP) ermöglicht die Herkunft des Effekts der ATP-Behandlung einzugrenzen, d. h. bestimmten Zelltypen und deren in die Membran integrierten P2-Rezeptoren zu

zuschreiben. Wie im Folgenden ausgeführt, lassen sich Anhaltspunkte für die Zuordnung der Wirkung von ATP zu einen der beiden Untergruppen von P2-Rezeptoren, d. h. den ionotropen P2X oder metabotropen P2Y, finden. Der rasche Anstieg des TRPs nach dem Beginn der Behandlung dürfte auf Erhöhung der Konzentration von Kationen im extrazellulären Raum der inneren Netzhaut zurückzuführen sein. Diese erzeugt oder verändert extrazelluläre Ausgleichströme von bestimmten Kationen, wahrscheinlich K^+ -Ionen, die in der Regel entlang der Müllerzellen zwischen der vitrealen Seite und der OPL oder ONL fließen. Die Zu- oder Abnahme eines solchen Stroms verändert den Spannungsabfall zwischen den Elektroden, über die das TRP abgeleitet wird (Glasmikroelektrode und obere Badelektrode), und führt so zu einer Änderung des TRPs (Dowling, 1987; Reichenbach & Robinson, 1995). Die schnelle Freisetzung von Kationen in das extrazelluläre Volumen erfolgt meist durch die Öffnung von spezifischen Ionenkanälen. Ionotrope P2X-Rezeptoren wurden in der Netzhaut der Ratte sowohl in den Müllerzellen (Jabs *et al.*, 2000) wie auch den Bipolar- (Wheeler-Schilling *et al.*, 2000) und Ganglienzellen (Wheeler-Schilling *et al.*, 2001) nachgewiesen. Metabotrope P2Y-Rezeptoren fand man z. B. in den Müllerzellen des Menschen (Bringmann, *et al.*, 2002) und des Kaninchens (Uckermann *et al.*, 2002) aber auch in den Ganglienzellen und in einer Subpopulation von Horizontalzellen von Affen (Ishii *et al.*, 2003). Der Anstieg des TRPs kann also durch eine Aktivierung von P2X- und/oder P2Y-Rezeptoren in den Bipolar- und vor allem den Müllerzellen durch ATP verursacht worden sein. Die Aktivierung der P2X-Rezeptoren führt zu einer direkten Öffnung von Kationenkanälen, die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren zu einer über die Erhöhung der intrazellulärem Ca^{2+} -Konzentration vermittelten Öffnung von Kaliumkanälen. In beiden Fällen hat dies eine Depolarisation der Zellen und den verstärkten Ausstrom von Kaliumionen aus den Zellen zur Folge. Im Zuge dessen steigt die extrazelluläre Kationenkonzentration an.

Schon wenige Minuten nach Beginn der Behandlung setzte deutlich eine langsame Abnahme des TRPs in Richtung des Ausgangswerts ein. Dieser dem raschen Anstieg folgende Rückgang des Potenzials kann als Adaptation an die anhaltende Anwesenheit des Agonisten der P2-Rezeptoren interpretiert

werden. Die Mechanismen dieser Anpassungsvorgänge sind nicht aufgeklärt; mehrere Prozesse für sich allein oder in Kombination könnten daran beteiligt sein. Möglich wäre eine abnehmende Aktivierbarkeit der Ionenkanäle durch den Agonisten (ATP) mit der Dauer seiner Einwirkung, d. h. eine langsame Desensitivierung. Es könnte aber auch ein aktiv durch die Zellen eingeleiteter Ausgleichsprozess vorliegen, z. B. durch Erhöhung der Leistung der Na^+ - K^+ -Pumpen oder durch Öffnung bzw. Schließung anderer Ionenkanäle in der Zellmembran. Solche Adaptationsprozesse als Reaktion auf eine andauernde Präsenz des Agonisten sind auch von anderen membranständigen Rezeptoren bekannt (pers. Mitteilung: W. K. Stell, 2001). Die physiologische Notwendigkeit einer solchen Reaktion liegt auf der Hand; ohne eine Abschwächung oder eine Kompensation der durch den Agonisten induzierten Ionenströme käme es zu einer nachhaltigen Störung des Ionenhaushalts bzw. des Gleichgewichts der Zelle und damit zum Zusammenbruch des Membranpotenzials, d. h. die Fähigkeit der Zelle Signale aufzunehmen und weiterzuleiten ginge verloren und würde nicht bloß moduliert.

Im TEP trat kurz nach Beginn der ATP-Behandlung eine Oszillation auf. Nach einem kurzzeitigen geringfügigen Rückgang stieg das transepitheliale Bestandpotenzial über einige Minuten stark an. Nach dem Ende des Anstiegs blieb es dann während der Behandlung auf einem anhaltend erhöhten Wert. Dieser biphasische Verlauf des TEPs deutet auf die Beteiligung verschiedener P2-Rezeptorsubtypen hin, die möglicherweise in den Membranen der Fotorezeptorzellen aber vor allem in der des apikalen RPE lokalisiert sein müssen. Die anfängliche Verringerung des TEPs könnte durch die Aktivierung von ionotropen P2X-Rezeptoren bedingt sein. Eine Steigerung des K^+ -Ausstroms aus den Fotorezeptoren über durch ATP geöffnete Ionenkanäle würde zu einer Zunahme der K^+ -Konzentration im SRS führen. Alle Änderungen von Ionenkonzentrationen im SRS wirken sich auf die Leitfähigkeit des RPEs für bestimmte Ionen aus. Soweit sie bekannt sind, werden die komplexen Regelkreise des Ionentransports durch die Membranen des RPEs im Folgenden beschrieben. Der Anstieg der K^+ -Konzentration würde die apikale Membran des RPEs depolarisieren, d. h. V_{ap} steigt und das TEP verringert sich

(da $TEP = V_{ba} - V_{ap}$). Im umgekehrten Fall, dem Anstieg des TEPs als Reaktion auf einen Lichtreiz nimmt die K^+ -Konzentration im SRS stark ab, die apikale Membran hyperpolarisiert und V_{ap} sinkt. Gleichzeitig tritt eine Zunahme der Na^+ -Konzentration im SRS auf, die ca. doppelt so groß ist, wie die gleichzeitige Abnahme der K^+ -Konzentration (Dmitriev *et al.*, 1999). Um das Gleichgewicht der elektrischen Ladungen zu erhalten, muss die Anionen-Konzentration zunehmen. Bereits Dmitriev *et al.* (1999) vermuteten eine Beteiligung von HCO_3^- .

Der Ionentransport durch die Membranen des RPEs wurde kürzlich von Hartzell & Qu (2003) eingehend diskutiert. In der Abbildung E.22 ist der derzeitige Kenntnisstand über die wichtigsten Ionenkanäle und -transporter im RPE dargestellt. Im Dunklen sind die Zellen des RPEs leicht depolarisiert, und es findet ein Nettotransport von Chlorid aus dem basolateralen extrazellulären Raum zwischen RPE und Choroid durch das RPE hindurch in den SRS statt. Kommt es durch ATP-Einwirkung auf P2-Rezeptoren zu einer Aktivierung von Kaliumkanälen der Fotorezeptorzellen zu einer Erhöhung der K^+ -Konzentration im SRS, wird durch die gestiegene extrazelluläre K^+ -Konzentration das RPE stärker depolarisiert. Dies hat wahrscheinlich eine Steigerung des Chlorid-Transports durch das RPE in den SRS und ein Absinken des TEPs zur Folge. Eine weitere Erklärung für die vorübergehende Verringerung des TEPs könnte die durch P2X-Rezeptoren gesteuerte Öffnung eines einwärts gerichteten nicht-selektiven Kationenkanals am RPE sein, den Ryan *et al.* (1999) für das RPE der Ratte postulieren, der aber im Modell von Hartzell & Qu (2003) nicht berücksichtigt wird. Einerseits würde so die Kationenkonzentration im SRS reduziert, andererseits würden die in das RPE einströmenden Kationen zu seiner weiteren Depolarisation führen, die mit die oben beschriebene Zunahme des Chlorid-Transports verbunden wäre. Beide Effekte hätten eine Abnahme des TEPs zur Folge. Der nachfolgende starke Anstieg des TEPs würde ausreichen den oben beschriebenen Effekt schließlich zu überlagern, jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass bereits vorher einsetzende Adaptationsprozesse der Öffnung der Ionenkanäle entgegen wirkten.

Für die anhaltenden Erhöhung des TEPs nach seiner kurzzeitigen Abnahme könnte die Aktivierung einer bereits von Gallemore & Steinberg (1990) beschriebenen Haupt-Effektorstruktur, ein Chloridkanal an der basalen Membran des RPEs, verantwortlich sein. Dieser wird über den second messenger cAMP gesteuert (Hughes *et al.*, 1987). Die Aktivierung von metabotropen P2Y-Rezeptoren senkt normalerweise die cAMP-Konzentration in der Zelle (Ralevic & Burnstock, 1998). ATP könnte also über einen P2Y-Rezeptor auf der apikalen Seite des RPEs den cAMP-Spiegel im RPE vermindern. Dies sollte das basolaterale Diffusionspotenzial für Chlorid erhöhen. Denn im umgekehrten Fall, d. h. einer Steigerung des Gehalts an cAMP im RPE des Huhns durch die Behandlung mit Forskolin wurde eine deutliche Verminderung der basolateralen Leitfähigkeit für Chlorid beobachtet (Kuntz *et al.*, 1994). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Chlorid-Kanälen an der Erhöhung des TEPs geben Peterson *et al.* (1997). Sie behandelten bovines RPE *in vitro* von der apikalen Seite mit ATP und stellten einen Anstieg des TEPs fest. Diesen schrieben sie auf Grund ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Ergebnisse einer Erhöhung der basolateralen Chlorid-Leitfähigkeit zu. Eine durch ATP über P2Y-Rezeptoren induzierte Öffnung von basolateralen Chloridkanälen erhöht den transepithelialen Chloridtransport (Adorante & Miller, 1990; Gallemore & Steinberg, 1993) aus dem SRS zum Choroid. Der verstärkte basolaterale Ausstrom von Chlorid depolarisiert die basale Seite des RPEs und sollte damit das TEP erhöhen. Außerdem erfordert er eine Kompensation durch einen gesteigerten apikalen Einstrom von Chlorid aus dem SRS, der über einen Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter in der apikalen Membran des RPEs erfolgt (Hartzell & Qu, 2003; Gallemore *et al.*, 1997). Während Na^+ durch die Na^+ - K^+ -Pumpe in den SRS zurück gepumpt werden dürfte, hyperpolarisiert der Nettoeinstrom von Chlorid die apikale relativ zur basalen Membran des RPEs. Die Verringerung von V_{ap} führt zu einem Anstieg des TEPs. Die Erhöhung des TEPs dürfte also auf eine Zunahme der relativen Differenz zwischen apikalen und basalen Membranpotenzial zurückgehen. V_{ap} wird negativer gegenüber V_{ba} .

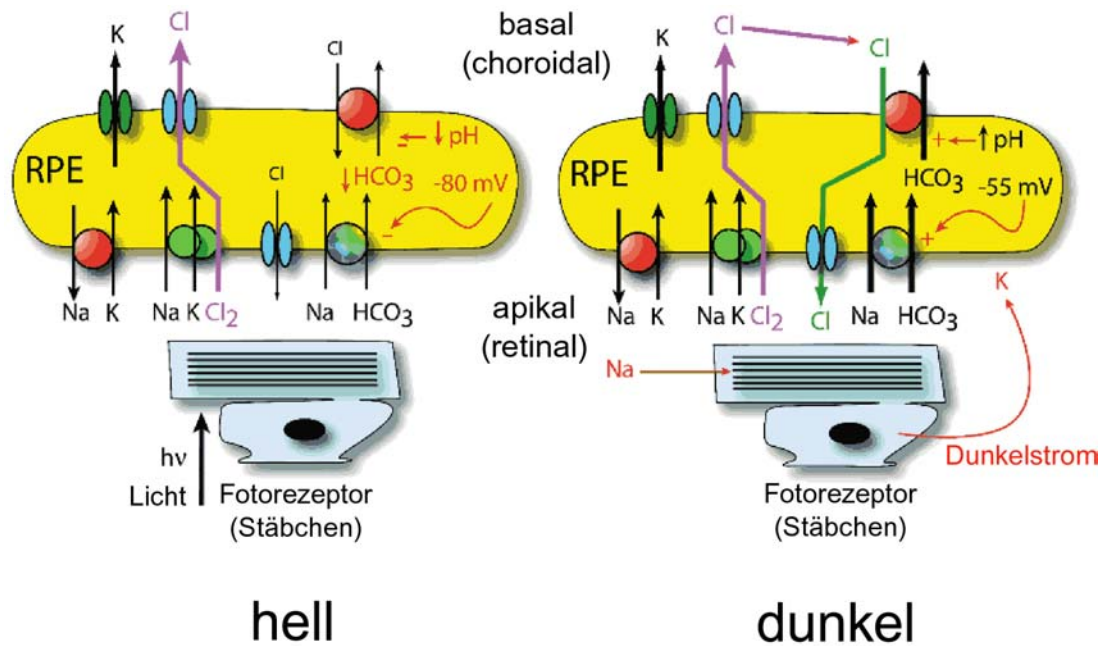


Abbildung E.22: Modell der Transportprozesse von Ionen am bzw. im RPE. Dieses Modell wurden weitgehend nach den Arbeiten von Miller und Kollegen entwickelt (Gallemore *et al.*, 1997). Linke Seite: Ionen-Transport bei Licht. Rechte Seite: Transportprozesse bei Dunkelheit. In die apikale Membran sind integriert: Na⁺-K⁺-ATPase (-Pumpe), Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter und Natrium-Bikarbonat (Na⁺-HCO₃⁻)-Transporter. In der basolateralen Membran sitzen: K⁺-Kanal, Cl⁻-Kanal (möglicherweise mehrere Typen) und Cl⁻-HCO₃⁻-Austauscher. Die Stärke der Pfeile deutet das Volumen des Transports an. Im Dunklen ist das Membranpotenzial der Zelle des RPE depolarisiert, da der Dunkelstrom der Fotorezeptoren die extrazelluläre K⁺-Konzentration erhöht. Bei Licht ist das RPE hyperpolarisiert. Die Änderung des Membranpotenzials moduliert den Na⁺-HCO₃⁻-Transporter und damit den zytosolischen pH-Wert, der seinerseits den Cl⁻-HCO₃⁻-Austauscher beeinflusst. Bei Licht wird der basolaterale Rücktransport von Cl⁻ in das RPE reduziert. Dies führt zu einer Umkehr des Nettostroms von Chlorid von basal nach apikal im Dunklen zu apikal nach basal im Licht. Graphik modifiziert nach Hartzell & Qu (2003).

Nach Beendigung der Behandlung kam es fast in allen Versuchen zu deutlichen Reaktionen der Bestandpotenziale. Sie erfolgten meist verzögert, d. h. mehr als 5 min nach dem Umschalten auf die Kontrollsuperfusion. Dies kann als weiterer Hinweis auf die Beteiligung von metabotropen P2Y-Rezeptoren gewertet werden. Jedoch waren diese Veränderungen nicht einheitlich. Eine Erklärung dafür könnten die bereits erwähnten Adaptationsprozesse der Zellen auf die dauerhafte Aktivierung bestimmter P2-Rezeptoren sein. Wie der Verlauf der Bestandpotenziale nach ca. 15 min Behandlungsdauer zeigte, reagierten die verschiedenen Präparate in den Versuchen auf die anhaltende Einwirkung von ATP unterschiedlich stark, so dass sie zum Ende der Behandlung nicht die gleiche Adaptation aufwiesen. Die so entstandenen unterschiedlichen

Verhältnisse in den Präparaten könnten die Ursache für die uneinheitliche Reaktion der Bestandpotenziale nach dem Ende der Einwirkung von ATP sein.

Die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit ATP veränderte seine Bestandpotenziale deutlich. Im Fall des TEPs trat sogar biphasischer Verlauf auf (Oszillation). Aus der Betrachtung der bekannten Modelle über die Erzeugung der Potenziale in der Netzhaut und im RPE ergibt sich, dass diese Effekte durch die selektive Öffnung von bestimmten Ionenkanälen in den Membranen verschiedener Zellen z. B. Müllerzellen, Bipolarzellen und vor allem der Zellen des RPEs, erklärt werden können. Dies führt zu der Hypothese, dass die beschriebenen Wirkungen spezifisch sind, d. h. durch die Bindung von ATP an P2-Rezeptoren auf den Membranen von unterschiedlichen Zellarten der Retina und vor allem der apikalen Membran des RPEs ausgelöst werden. Dabei können verschiedene Subtypen sowohl der ionotropen P2X- als auch der metabotropen P2Y-Rezeptoren eine Rolle spielen.

E.2.3.3 Wirkung von ATP auf die lichtinduzierten Signale

a) Veränderungen der Amplitude der c-Welle

Durch das über die Glasmikroelektrode proximal der äußeren begrenzenden Membran (OLM) abgeleitete Potenzial lässt sich die c-Welle des TTPs in zwei Komponenten zerlegen: Die negativ ausgerichtete, retinale Komponente der c-Welle im TRP wird als „slow PIII“ bezeichnet (Dowling, 1987) und die positiv ausgerichtete, choroidale Komponente im TEP als transepitheliale c-Welle (Kuntz *et al.*, 1994) oder „RPE c-Welle“ (Linsenmeier & Steinberg, 1983; Gallemore & Steinberg, 1990). Die Bezeichnung PIII für eine negative Komponente der c-Welle wurde bereits in den 30er Jahren eingeführt. Granit (1933) hatte die Veränderungen des ERGs von Katzen während der Äthernarkose untersucht. Abhängig von der Dauer der Narkose verschwanden schrittweise bestimmte Komponenten des ERGs. Nach der Reihenfolge ihres Verschwindens benannte Granit diese mit PI, PII und PIII. Wie im vorausgehenden Abschnitt dargestellt, ermöglicht erst die Analyse der

Komponenten im TRP und TEP Aussagen über den Wirkungsort und die beteiligten Effektorstrukturen, hier die P2-Rezeptoren.

Die Amplitude der c-Welle im TTP war 15 min nach Beginn der ATP-Behandlung gegenüber der Kontrolle erhöht, oft jedoch nur geringfügig. Trotzdem ist dies eindeutig als Effekt der Behandlung zu werten, da dieser Anstieg immer eine Umkehr des während der Kontrollphasen vorherrschenden Trends zur Verringerung der Amplitude darstellte. In den meisten Versuchen ging diese Erhöhung auf eine deutliche Zunahme der Amplitude der transepithelialen c-Welle zurück. Diese kann entweder durch ein negatives ΔV_{ap} oder durch ein positives ΔV_{ba} hervorgerufen werden, da $\Delta TEP = \Delta V_{ba} - \Delta V_{ap}$ (s. Ersatzschaltbild des Präparats in Kapitel B.7). Diese Potenzialänderungen könnten durch Verstärkung der Hyperpolarisation der apikalen Membran bzw. der Depolarisation der basalen Membran des RPEs während der Belichtung der Netzhaut bewirkt werden. Daher dürfte, ähnlich wie im Fall der Änderungen der Bestandpotenziale (s. o.), dem Anstieg der Amplitude des transepithelialen c-Welle Veränderungen von Ionenströmen bzw. -leitfähigkeiten in den Membranen des RPEs zu Grunde liegen. Folgt man dem Modell von Hartzell & Qu (2003, Abbildung E.22), lässt sich folgende Hypothese für eine stärkere Depolarisation des basalen RPEs formulieren: Durch die Hyperpolarisation der Fotorezeptoren im Zuge des Lichtreizes sinkt die K^+ -Konzentration im SRS, dadurch wird die apikale Membran des RPEs ebenfalls hyperpolarisiert. Dies führt zu einer Steigerung des Nettotransports von Chlorid aus dem SRS durch das RPE hindurch in das extrazelluläre choroidale Volumen, da der Rücktransport von Chlorid durch den $Cl^-HCO_3^-$ -Austauscher im basalen RPE vermindert oder sogar gestoppt wird. Geht man davon aus, dass durch eine ATP-induzierte Aktivierung von P2Y-Rezeptoren in der apikalen Membran der cAMP-Spiegel im RPE erniedrigt wird, hat dies eine vermehrte Öffnung von basolateralen Chloridkanälen und damit eine Erhöhung der basolateralen Leitfähigkeit für Chlorid zur Folge (Gallemore & Steinberg, 1990; Peterson *et al.*, 1997). Das basale RPE sollte daher bereits im Dunklen gegenüber dem Kontrollzustand anhaltend stärker depolarisiert sein (s. o. bei Bestandpotenziale). Unterbricht jetzt der Lichtreiz den Rücktransport von

Chlorid am basalen RPE, dürfte sich die erhöhte Leitfähigkeit für Chlorid die Depolarisation der basalen Membran nochmals vergrößern, weil im gleichen Zeitraum mehr Chlorid ausströmt als unter Kontrollbedingungen. Dadurch wird die Spannung an der basalen Membranbatterie des RPEs, d. h. V_{ba} , positiver und damit erhöht sich die Amplitude der RPE c-Welle.

Alternativ könnte ausschließlich eine verstärkte Hyperpolarisation der apikalen Membran für die gestiegene Amplitude der transepithelialen c-Welle verantwortlich sein. Dies lässt sich aber nicht mit dem Modell nach Hartzell & Qu (2003, Abbildung E.22) begründen. Es wäre allerdings möglich, dass die über P2Y induzierte Senkung des cAMP-Spiegels im RPE einen in diesem Modell nicht erfassten unbekanntem Ionenkanal oder -transporter moduliert. Eine Hyperpolarisierung durch Aktivierung von P2X-Rezeptoren erscheint unwahrscheinlich, da diese in der Regel eine Öffnung von Kationenkanälen zur Folge hat (Ralevic & Burnstock, 1998; Ryan *et al.*, 1999) und daher das Membranpotenzial depolarisieren sollte.

Noch während der Behandlung (nach 35 min) mit ATP hatte die Amplitude der transepithelialen c-Welle wieder abgenommen. Möglicherweise ist dies auf eine langsame Desensitivierung der Rezeptoren oder auf Adaptationsprozesse der Zellen zurückzuführen. Die beobachteten Veränderungen der Amplitude der c-Welle und ihrer Komponenten waren reversibel, d. h. nach dem Ende der Behandlung ging die Amplitude in Richtung des Ausgangswerts zurück. Auch dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Wirkung von ATP auf das Präparat wahrscheinlich durch spezifische P2X- und P2Y-Rezeptoren vermittelt wurde.

b) Veränderungen der Amplituden der a-, b-, und d-Welle

Die raschen Wellen (a-, b- und d-Welle) zeigten nach Beginn der Behandlung mit ATP einen deutlichen Rückgang ihrer Amplituden im TTP. Nur bei der b-Welle im TTP war dieser Effekt selten klar zu erkennen; dies dürfte in der meist nur sehr schwachen Ausprägung der b-Welle im TTP begründet sein. Aus der Analyse der beiden Komponenten jeder raschen Welle, dem TRP und dem TEP ergibt sich, dass die beobachtete Reduktion der Amplitude bei allen drei

Wellen überwiegend durch die Veränderung der entsprechenden Amplituden im TRP verursacht wurde. Zwar zeigte das TEP meist eine entgegengerichtete Entwicklung, die jedoch von der des TRP übertroffen wurde.

Im Fall der a-Welle ließ sich die Verringerung der Amplitude weitgehend auf eine Reduktion ihrer Komponente des TRPs zurückführen. Im TEP war dagegen kein einheitlicher Trend zu erkennen. Dies deutet daraufhin, dass der Effekt auf die a-Welle nicht auf eine Wirkung von ATP auf die Fotorezeptoren zurückgeht, weil die Komponente der a-Welle im TEP die Reaktion der Fotorezeptoren auf den Lichtreiz repräsentiert (Dowling, 1987), wenn das TEP durch eine proximal über der OLM platzierte Elektrode abgeleitet wird. Das Auftreten einer negativen Komponente der a-Welle im TRP kann daher nicht als direkte Wirkung der hyperpolarisierten Fotorezeptoren gedeutet werden. Deren Potenziale werden bei der oben beschriebenen Positionierung der Elektrode nicht im TRP sondern nur im TEP erfasst. Die Entstehung der negativen Komponente der a-Welle im TRP könnte analog zu den Verhältnissen beim slow PIII mit der Aktivität der Müllerzellen erklärt werden. Abgeleitet von der Darstellung in Dowling (1987) wäre es denkbar, dass die Abnahme der K^+ -Ionenkonzentration im Bereich der inneren Segmente der Fotorezeptoren die Müllerzellen dazu veranlasst, an ihrem distalen, d. h. den Fotorezeptoren zugewandten Ende verstärkt von K^+ -Ionen auszuschütten. Dies induziert einen proximal (vitreal) gerichteten extrazellulären Strom entlang der Müllerzellen, der die Ursache für das negative slow PIII ist. Es ist anzunehmen, dass im Fall der raschen a-Welle die negative Amplitude im TRP durch dieselben Prozesse generiert wird.

Eine Abschwächung der Amplitude dieser Komponente der a-Welle kann mit der Aktivierung von P2X-Rezeptoren auf den Müllerzellen begründet werden. Diese bewirkt eine Öffnung von Kationenkanälen (Ralevic & Burnstock, 1998) und in der Folge eine gewisse ständige Depolarisation der Müllerzellen. Dadurch dürfte die durch den Lichtreiz zusätzlich ausgelöste Ausschüttung von K^+ -Ionen am distalen Bereich der Müllerzellen vermindert sein. Denn durch die latente Depolarisation sind dort bereits viele K^+ -Ionenkanäle geöffnet. Dies führt zu einer Verringerung des Konzentrationsgefälle zwischen der Zelle und dem

extrazellulären Volumen, d. h. des Antriebs für den Ausstrom von K^+ -Ionen aus der Zelle. Also fallen die relative Depolarisation der Müllerzellen durch den Lichtreiz und damit der proximal gerichtete Strom geringer aus.

Im Fall der b-Welle war ein deutlicher Rückgang ihrer Amplitude im TTP als Folge der Behandlung mit ATP nur selten aufgetreten. Jedoch zeigten ihre beiden Komponenten eine starke Reduktion der entgegen gerichteten Amplituden. Da nach Dowling (1987) die b-Welle ein Produkt der Depolarisation der Müllerzellen ist, die sich in Folge der Kaliumausschüttung durch die Bipolarzellen nach einem Lichtreiz entwickelt, deutet diese Abnahme der Amplituden ebenfalls auf eine Aktivierung von ionotropen P2X-Rezeptoren hin. Die b-Welle entsteht nach einem sicherlich etwas vereinfachenden Modell durch einen extrazellulären Strom von proximal nach distal entlang der Müllerzellen, d. h. vom der vitrealen Seite in die OPL (Newman, 1980; modifiziert in: Dowling, 1987; Reichenbach & Robinson, 1995). In Folge ihrer Depolarisation kommt es an der Müllerzelle in zwei Bereichen, nämlich in der IPL und vor allem in der OPL, zu einem verstärkten Einstrom von K^+ -Ionen. Gleichzeitig steigt am proximalen Endfuß der Müllerzelle der Ausstrom von K^+ an. Dieser wird durch den oben beschriebenen extrazellulären Strom in distaler Richtung kompensiert, der seinerseits für den erhöhten Spannungsabfall an den extrazellulären Elektroden, der im ERG bzw. TTP als b-Welle sichtbar wird, verantwortlich ist.

Mit diesem Modell lässt sich auch die Abnahme der Amplitude der Komponente der b-Welle im TRP unter Einwirkung von ATP erklären: Werden die Müllerzellen durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren und der damit verbundenen Öffnung von Kationenkanälen bereits im Dunklen etwas depolarisiert, so kann sich die durch einen Lichtreiz induzierte Depolarisation nicht mehr so stark entwickeln, wie dies im Kontrollzustand möglich wäre. Daher fallen der Kaliumstrom durch die Müllerzelle und somit auch der distal gerichtete Ausgleichsstrom geringer aus als unter Kontrollbedingungen. Dies führt zu einer Verringerung der Amplitude sowohl der b-Welle als auch ihrer Komponente im TRP. Allerdings könnte dieser Effekt auch durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren auf den Bipolarzellen ausgelöst werden. Falls die

Bipolarzellen durch die Öffnung von Kationenkanälen als Folge der Bindung von ATP an P2X-Rezeptoren bereits im Grundzustand leicht depolarisiert werden, ist auch in ihrem Fall die relative Depolarisation durch einen Lichtreiz geringer. Da die Menge der von den Bipolarzellen freigesetzten K^+ -Ionen maßgeblich für Stärke der Depolarisierung der Müllerzellen sein dürfte (Korrelation der Depolarisation der Müllerzelle mit der Stärke des Lichtreizes; Dowling, 1987), sollte eine relativ geringere Depolarisation der Bipolarzellen im gleichen Maße die der Müllerzellen verringern, und damit die Amplitude der b-Welle reduzieren.

Im Gegensatz zum TRP ist im TEP die Amplitude der Komponente der b-Welle negativ. Ihre Entstehung und damit auch ihr starker Rückgang durch die ATP-Behandlung können nicht mit dem obigen Modell für die b-Welle und ihre Komponente im TRP erklärt werden. Es gibt jedoch Grund zur Annahme, dass sich auch die Komponente im TEP unter Mitwirkung der Müllerzellen entwickelt. Wie bei den Erläuterungen zur a-Welle beschrieben, setzen die Müllerzellen an ihrem distalen Bereich um die inneren Segmente der Fotorezeptoren, als Reaktion auf deren Hyperpolarisation, wahrscheinlich K^+ -Ionen frei. Dadurch wird ein extrazellulärer Strom in proximaler Richtung erzeugt. Da die Mikroelektrode proximal der Stromquelle, dem distalen Abschnitt der Müllerzellen, positioniert ist, bildet sich zwischen dieser und der basalen Badelektrode ein elektrisches Feld, dessen Spannungsänderung als negative Amplitude im TEP sichtbar wird. Daher könnte die Abschwächung dieser Amplitude der Komponente der b-Welle mit den gleichen Prozessen wie bei der a-Welle begründet werden, nämlich einer relativ geringeren Depolarisation durch den Lichtreiz auf Grund einer schwachen latenten Depolarisation der Müllerzellen durch die Wirkung von ATP auf P2X-Rezeptoren. Allerdings wurde im Fall der a-Welle dieser Effekt nur in der Komponente des TRPs sichtbar. Die Komponente des TEPs reagierte uneinheitlich auf die ATP-Behandlung. Dies könnte bedeuten, dass doch noch andere als die beschriebenen Prozesse beteiligt sind. Diese werden dann möglicherweise durch die von den Müllerzellen induzierten Ströme überlagert, die ihr Maximum im Fall der b-Welle

meist erst mit einer längeren Verzögerung in Bezug auf den Beginn des Lichtreizes erreichen (Dowling, 1987).

Die Amplitude der d-Welle war mit der Applikation von ATP zurückgegangen. Anders als im Fall von a- und b-Welle wurde diese Abnahme meist nicht durch eine stärkere Verringerung der Amplitude einer der beiden einander entgegen gerichteten Komponenten verursacht. Die Komponenten der d-Welle im TRP und im TEP nahmen dagegen in der Regel deutlich zu. Da die Zunahme der negativen Amplitude im TRP immer größer ausfiel als der korrespondierende Anstieg der positiven Amplitude im TEP, ergab sich im TTP eine Reduktion der d-Welle. Die Interpretation dieser Ergebnisse kann sich nicht auf eindeutige Aussagen über die Entstehung der d-Welle stützen, da hierzu keine mit dem Stand der Kenntnis bei a- und b-Welle vergleichbare Untersuchungsergebnisse vorliegen. Vermutlich werden in die d-Welle die Effekte des raschen Abschaltens der Photorezeptorantwort („umgekehrte a-Welle“) und so genannter Off-Antworten der Müllerzellen integriert (Dowling, 1987). Letztere dürften analog zu den Verhältnissen bei der b-Welle wiederum durch die Off-Antworten der Bipolarzellen ausgelöst werden. Die gleichen extrazellulären Ströme wie im Fall der a- und b-Welle könnten, wenn sie in umgekehrter Richtung fließen, auch die Amplituden der d-Welle hervorrufen. Daher könnte für die Veränderungen der d-Welle und ihrer Komponenten im Zuge der ATP-Behandlung gleichfalls die Aktivierung von P2X-Rezeptoren in den Müller- und Bipolarzellen verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung für den in beiden Komponenten beobachteten Anstieg der Amplitude könnte eine relativ stärkere Hyperpolarisation der Müller- und Bipolarzellen durch das Ende des Lichtreizes sein. Nimmt man an, dass die Zellen bis auf ein bestimmtes Niveau hyperpolarisieren, und sie durch die von ATP verursachte Öffnung von Kationenkanälen schon im Grundzustand gegenüber dem Kontrolle leicht depolarisiert sind, fällt der Betrag der Hyperpolarisation größer aus. Dies hätte einen stärkeren extrazellulären Strom zur Folge, der in einer höheren Amplitude der jeweiligen Komponente sichtbar wird.

In den Amplituden der raschen Wellen und vor allem ihrer Komponenten hatte die Behandlung mit ATP deutliche Veränderungen hervorgerufen. Diese waren in den meisten Fällen reversibel, d. h. nach dem Ende der ATP-Behandlung des

Retina-RPE-Choroid Präparats entwickelten sich die Amplituden überwiegend in Richtung der unter Kontrollbedingungen registrierten Ausgangswerte. Diese Rückentwicklung stellt ein weiteres Indiz für die Beteiligung von spezifischen Rezeptoren an den beobachteten Effekten dar.

E.2.4 Zusammenfassung

Die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit ATP veränderte sowohl die Bestandpotenziale, im Fall des TEPs sogar biphasisch, als auch die Amplituden aller lichtinduzierten Wellen des *in vitro* ERGs deutlich. Bei letzteren waren diese Veränderungen sogar vollständig reversibel. Aus der Betrachtung der bekannten Modelle über die Erzeugung der Potenziale und Wellen in der Netzhaut und im RPE ergibt sich, dass diese Effekte durch die Öffnung von bestimmten Ionenkanälen in den Membranen verschiedener Zellen des Präparats, z. B. Müllerzellen, Bipolarzellen und Zellen des RPEs, erklärt werden können. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die beschriebenen Wirkungen spezifisch sind, d. h. durch die Bindung von ATP an P2-Rezeptoren auf den Membranen von unterschiedlichen Zellsorten der Retina und des RPEs ausgelöst werden. Dabei können verschiedene Subtypen sowohl der ionotropen P2X- als auch der metabotropen P2Y-Rezeptoren eine Rolle spielen. Um diese in sich schlüssige Hypothese weiter zu erhärten, müssten Kobehandlungen mit ATP und einem Antagonisten der P2-Rezeptoren durchgeführt werden. Dazu bietet sich Suramin an, weil sich dadurch verschiedene Subtypen der P2X- und P2Y-Rezeptoren antagonisieren lassen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse von Vorversuchen mit Suramin dargestellt. Die Kobehandlungen wurden nicht mehr durchgeführt werden, da der zeitliche Rahmen dieser Arbeit ausgeschöpft war.

E.3 Untersuchung der Effekte von Suramin auf das *in vitro* Präparat

E.3.1 Einführung

Die Behandlung mit ATP hatte deutliche Veränderungen an den elektrophysiologischen Signalen des *in vitro* Präparats hervorgerufen. Falls die Wirkung von ATP über Purinrezeptoren in den Wänden der Zellen vermittelt wird, sollte sich diese durch gleichzeitige Zugabe eines Antagonisten unterdrücken lassen. In der Literatur wird Suramin als potenter Antagonist gegen eine Vielzahl von Purinrezeptoren genannt (Trendelenburg & Bultmann, 2000; James & Butt, 2001). Suramin ist ein unspezifischer Antagonist von vielen P2-Rezeptoren (Ralevic & Burnstock, 1998), d. h. es bindet nicht an die spezifischen Bindungsstellen für den Agonisten auf der extrazellulären Seite des membranständigen Rezeptors und verhindert damit das Andocken des Agonisten an den Rezeptor. Der Mechanismus der antagonistischen Wirkung von Suramin auf die P2-Rezeptoren ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Möglicherweise verändert Suramin die Konformation der Rezeptoren. Dies könnte zur Inaktivierung entweder der Bindungsstelle des Agonisten oder des mit dem Rezeptor verbundenen Ionenkanals führen.

Bevor Suramin als Antagonist in Behandlungen zusammen mit ATP eingesetzt werden konnte, musste die dazu geeignete Konzentration von Suramin ermittelt werden. Diese sollte bei alleiniger Einwirkung auf das Präparat möglichst keine oder nur eine geringe Wirkung auf die elektrophysiologischen Signale haben. Denn ein eigener Effekt des Suramins könnte bei späteren Versuchen in Kobehandlung mit ATP einen möglicherweise auftretenden antagonistischen Effekt des Suramins auf die Wirkung des ATPs an den Purinrezeptoren verdecken.

E.3.2 Versuchsspezifische Methoden

Für die ersten Experimenten wurden Konzentrationen von Suramin (Sigma, Deisenhofen) gewählt, die im Bereich der für Versuche mit isoliertem neuronalen Gewebe publizierten Konzentrationen lagen (James & Butt, 2001; Li *et al.*, 2001). Bei den Behandlungen mit Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} M zeigten die *in vitro* Präparate der Hühnernetzhaut allerdings extreme aber völlig unregelmäßige Veränderungen im ERG. Durch die höhere der beiden Konzentrationen wurde das Präparat sogar nachhaltig geschädigt. Daher wurden in weiteren Versuchen die Wirkung von zwei niedrigeren Konzentrationen, nämlich 10^{-6} und 10^{-5} M, auf das ERG untersucht.

Die unten dargestellten Ergebnisse wurden in fünf Versuchen ermittelt, in denen jeweils mehrere Konzentrationen von Suramin in einer aufsteigenden Reihe getestet wurden. Für jeden dieser Versuche wurde ein frisches Präparat hergestellt. Die Behandlung erfolgte für ca. 40 min von der retinalen Seite des Präparats, indem Suramin in der jeweiligen Konzentration der physiologischen Lösung zugegeben wurde. Nach dem Abschluss einer Behandlung wurde das Präparat mindestens eine Stunde lang unter Kontrollbedingungen belassen, bevor eine weitere Behandlung mit einer höheren Konzentration durchgeführt wurde. Aus den fünf Versuchen konnten jeweils vier Behandlungsphasen für die Konzentration von 10^{-6} und 10^{-5} M ausgewertet werden.

Von den Aufzeichnungen der lichtinduzierten Antworten wurden für jede eingesetzte Konzentration sieben Phasen (I-VII) vor, während und nach der Behandlung ausgewertet. Die Versuchsphasen wurden, wie folgt, gewählt:

- I und II als Kontrollen, 30 bzw. 5 min vor Beginn der Behandlung,
- III und IV während der Behandlung, 15 bzw. 35 min nach Behandlungsbeginn,
- V, VI und VII als Kontrollen 15, 45 und 60 min nach Ende der Behandlung.

Die Entwicklung der Bestandspotenziale wird in zwei Serien von Abbildungen über jeweils 50 Iterationen mit einem Messwert pro Iteration dargestellt. Die erste Serie zeigt die Bestandspotenziale um den Beginn der Behandlung mit

Suramin. Die ersten 20 Messungen (Iterationen) wurden vor Beginn der Behandlung und weitere 30 Messungen unter der Einwirkung von Suramin aufgezeichnet. Die zweite Serie gibt den Verlauf um das Ende der Behandlung wieder. Die ersten 20 Werte wurden während der Behandlungsphase, weitere 30 nach deren Ende registriert.

In beiden Serien wurde eine eventuell aufgetretene Drift in den Kurven folgendermaßen korrigiert: Aus den ersten 20 dargestellten Messpunkten des betreffenden Versuchs der jeweiligen Serie wurde eine Regressionsgerade berechnet, und diese als Korrekturfaktor für alle 50 dargestellten Werte des selben Versuchs verwendet. Der kalzium-selektive Kanal der Mikroelektrode wies regelmäßig eine starke Drift auf. Deshalb musste das Bestandspotenzial dieses Kanals oft während des laufenden Versuchs durch Regelung am Vorverstärker kompensiert werden. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Offset bezeichnet. Diese Offsets im Bestandspotenzial des kalziumselektiven Kanals wurden für die Darstellung der Ergebnisse durch Subtraktion des Offset-Betrags von den nachfolgenden Werten korrigiert.

E.3.3 Ergebnisse der Behandlungen mit Suramin

E.3.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration

Die Einwirkung von Suramin auf das Retina-RPE-Choroid Präparat über die retinale Superfusion führte bei beiden Konzentrationen (10^{-6} und 10^{-5} M) zu einem geringen Anstieg des Bestandspotenzials im TTP während aller Behandlungen mit einer Ausnahme bei der Konzentration von 10^{-5} M (Versuch 1), in dem das TTP nach einer kurzzeitigen Zunahme wieder zurückging (Abbildung E.23 und Abbildung E.24). Nach Ende der Behandlung mit 10^{-6} M Suramin kehrte sich dieser Trend allen Fällen um. Das TTP sank wieder und zwar deutlich ab (Abbildung E.25). Nach dem Ende der Behandlung mit 10^{-5} M Suramin veränderte sich das TTP in drei Fällen klar aber nicht einheitlich (Abbildung E.26). Die Aufzeichnungen der Bestandspotenziale des TRPs und des TEPs (Komponenten des TTPs) gaben keinen Anhaltspunkt dafür, dass

eine dieser beiden Komponenten durch eine die andere überwiegende Änderung für das Verhalten des TTPs verantwortlich war. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M zeigte sich nur in zwei Versuchen eine deutliche Veränderung im TRP und TEP nach Beginn und nach Ende der Behandlung (aus Platzgründen nicht abgebildet). Die höhere Konzentration von Suramin (10^{-5} M) löste bei drei von vier Präparaten Verschiebungen des TRPs und TEPs aus (Abbildung E.27 und Abbildung E.28). Allerdings wiesen diese nicht in eine einheitliche Richtung. Im Fall von zwei Präparaten nahm das TRP zu und das TEP ab, während bei einem weiteren umgekehrte Verhältnisse zu beobachten waren. Ebenso uneinheitlich waren die Reaktionen des TRPs und des TEPs auf die Beendigung der Behandlung mit Suramin (10^{-5} M). Deshalb wird auf die Abbildung dieser Ergebnisse verzichtet.

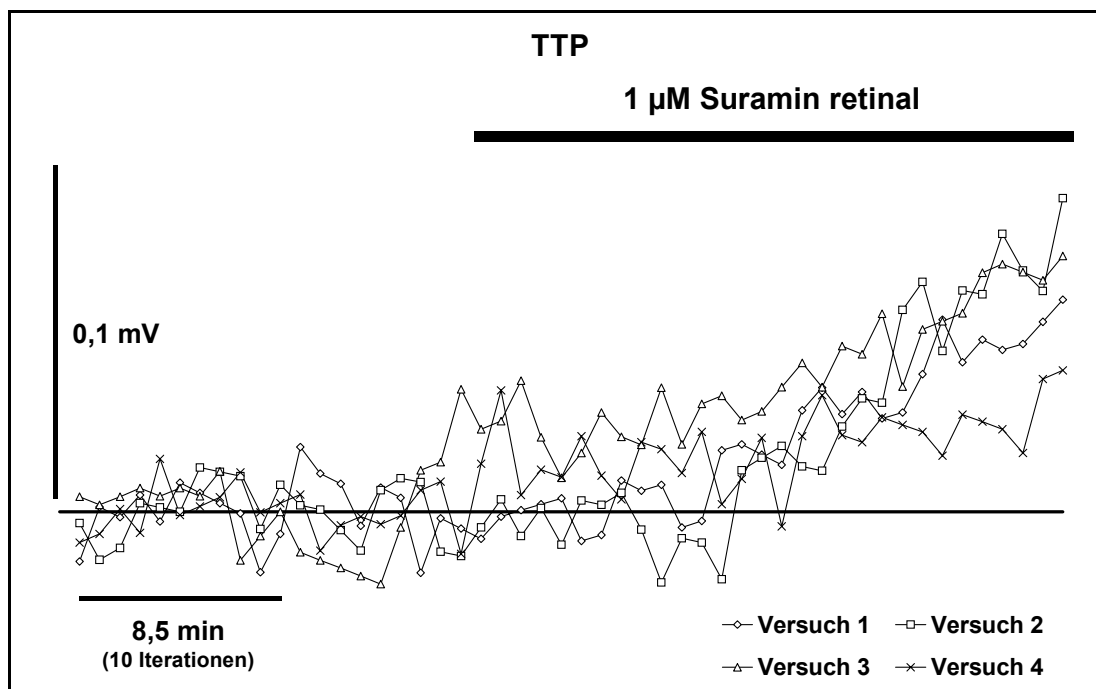


Abbildung E.23 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Suramin ($1 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist eine geringe aber deutliche Zunahme kurz nach Beginn der Behandlung.

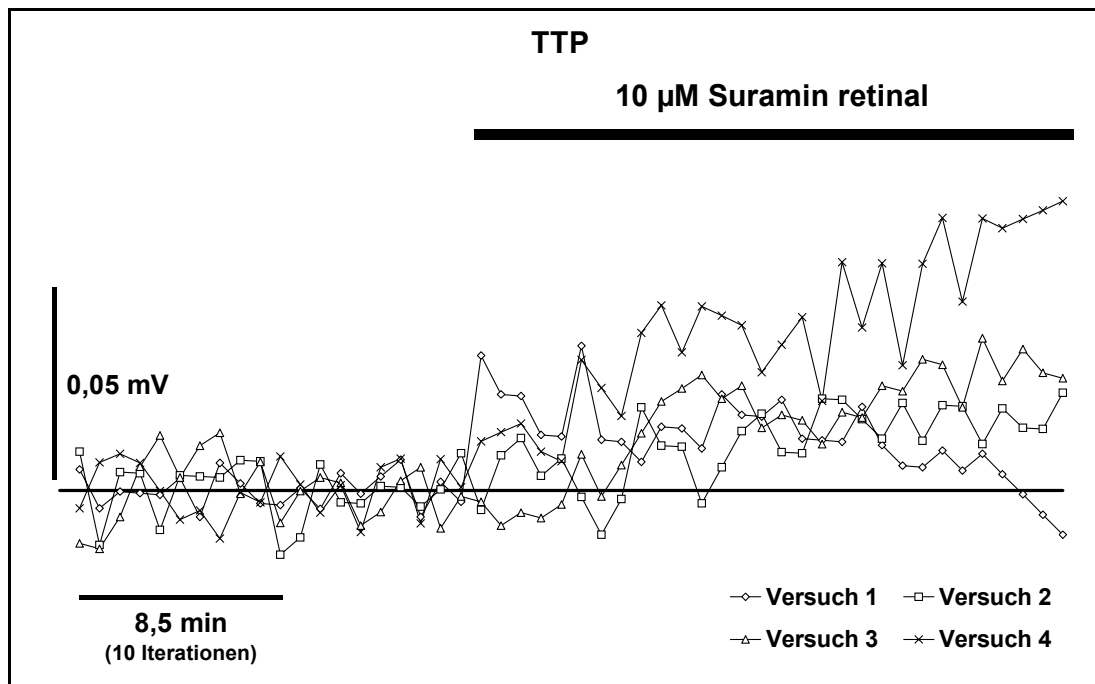


Abbildung E.24 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Suramin (10 μ M) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist eine Zunahme kurz nach Beginn der Behandlung. In Versuch 1 nimmt das TTP bereits während der Behandlung wieder ab.

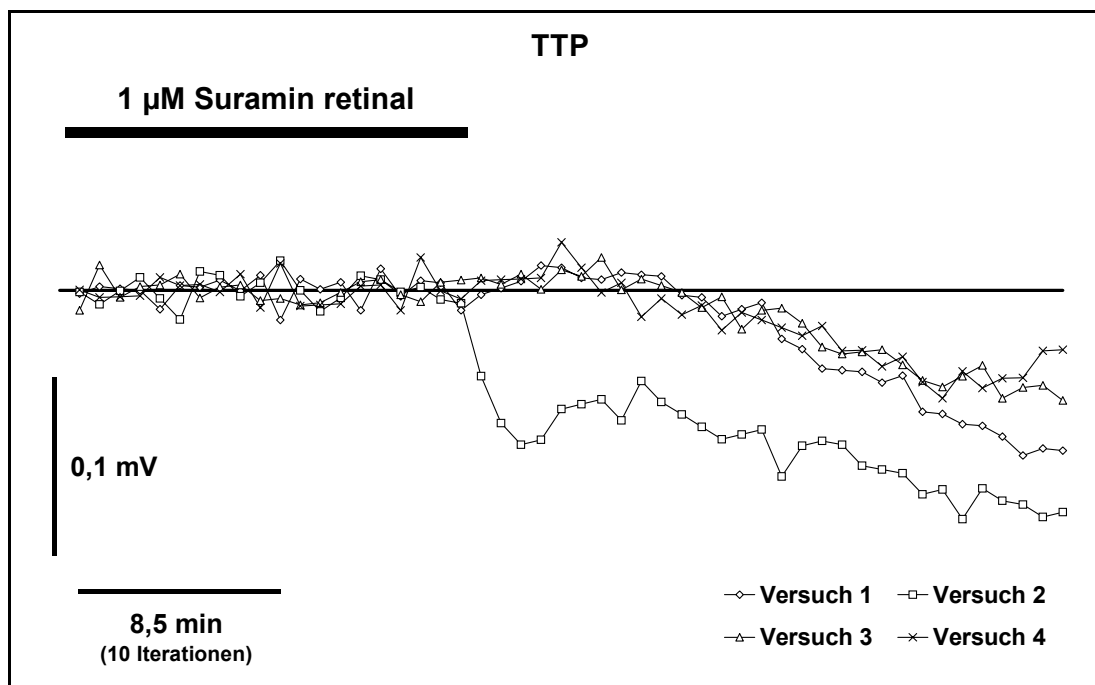


Abbildung E.25 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Suramin (1 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In allen vier Versuchen sank das TTP einige Minuten nach der Beendigung der Behandlung deutlich ab.

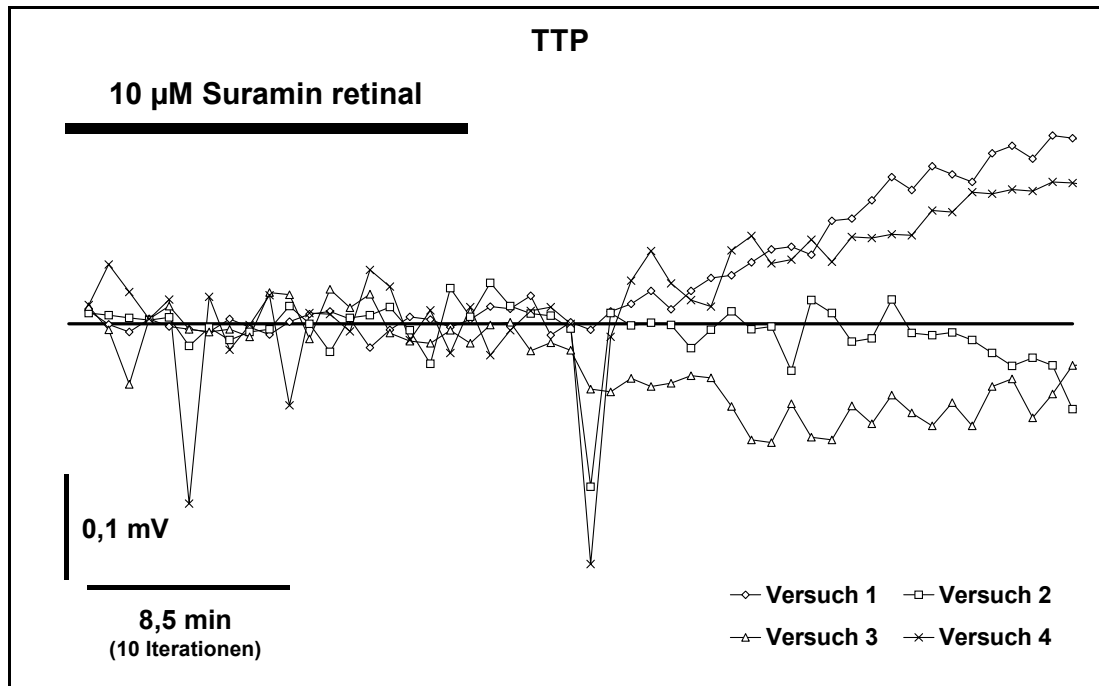


Abbildung E.26 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Suramin (10 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TTP reagierte in drei Versuchen deutlich aber uneinheitlich auf die Beendigung der Behandlung.

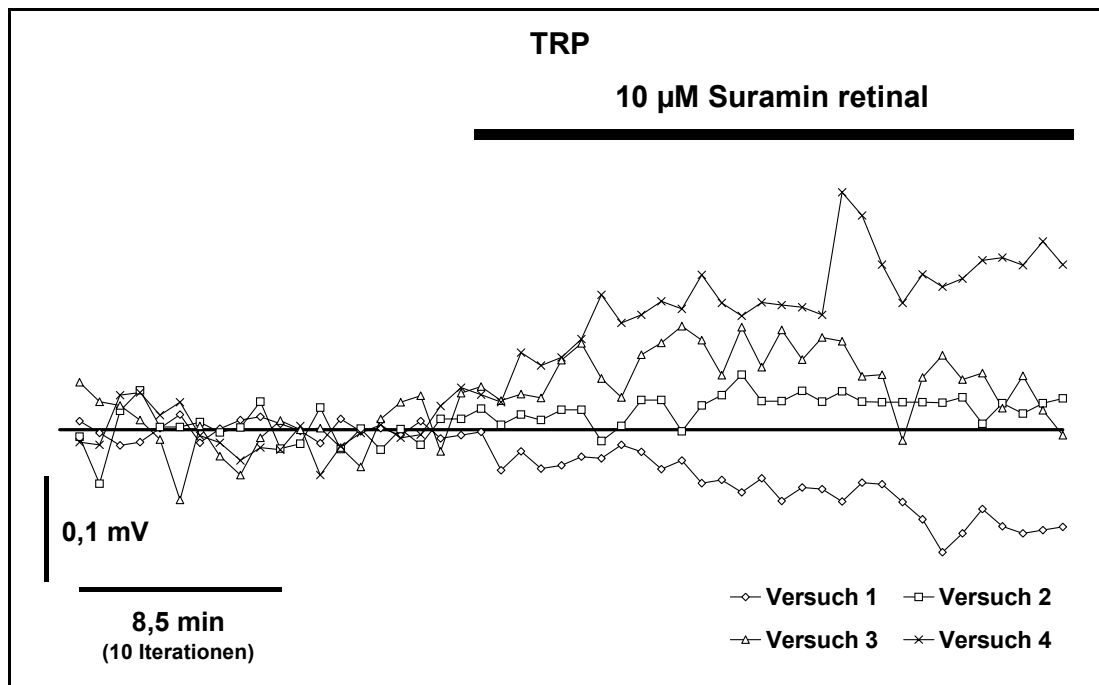


Abbildung E.27 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Suramin (10 μ M) von der retinalen Seite des Präparats. In zwei Versuchen ist ein Anstieg erkennbar, ein weiterer zeigt eine Abnahme und einer keine Veränderung des TRPs.

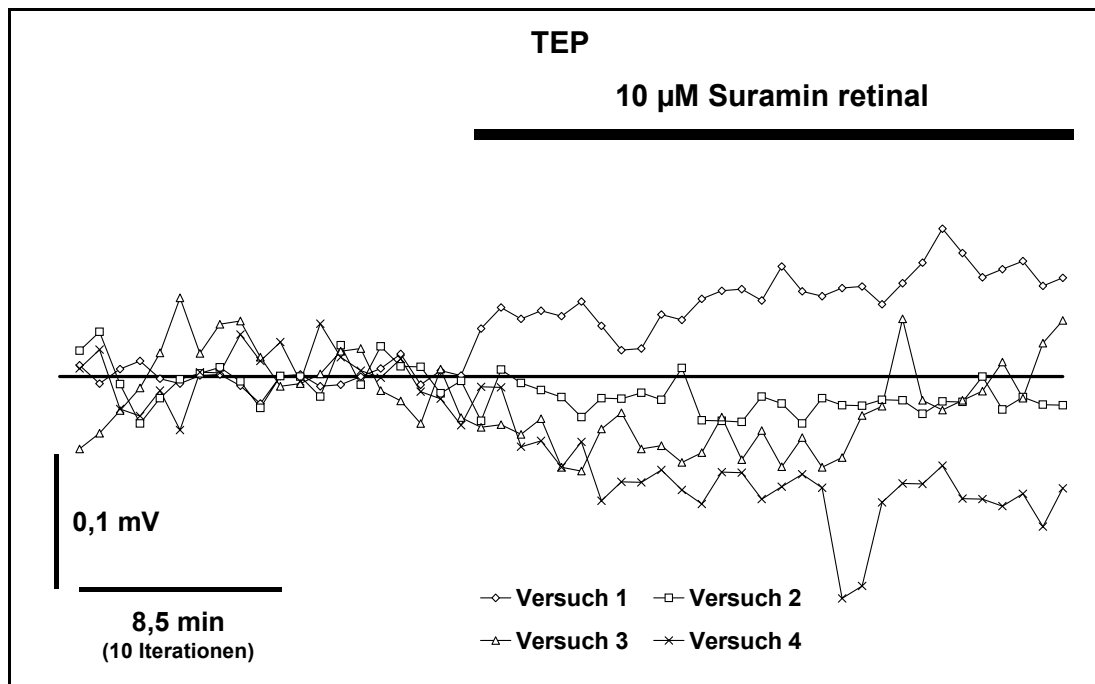


Abbildung E.28 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Suramin (10 µM) von der retinalen Seite des Präparats. In zwei Versuchen trat zumindest zeitweise eine Abnahme auf, ein weiterer zeigt eine Zunahme des TEPs.

Eine Erhöhung der Konzentration an extrazellulären Kalzium nach Beginn der Behandlung mit 10^{-5} M Suramin war in allen vier Versuchen klar zu erkennen, da V_{ion} stark anstieg (Abbildung E.29). V_{ion} ist das Potenzial, das am ionensensitiven Kanal der Glasmikroelektrode abfällt. Dessen Spitze ist mit einem ionenselektiven Harz gefüllt (hier für Ca^{2+}). Daher manifestieren sich Schwankungen in der Konzentration dieses Ions im extrazellulären Medium als Spannungsänderungen am ionensensitiven Kanal. Bezogen auf die letzten 20 Iterationen während der Behandlung, nahm die Konzentration von extrazellulärem Kalzium nach dem Umschalten der Superfusion auf die Kontrollösung in drei Fällen erneut zu (Abbildung E.30). Bei der Behandlung mit einer Konzentration von 10^{-6} M waren in zwei Versuchen keine eindeutigen Effekte aufgetreten. In den beiden anderen Versuchen entwickelte sich die extrazelluläre Kalzium-Konzentration gegensätzlich (keine Abbildungen).

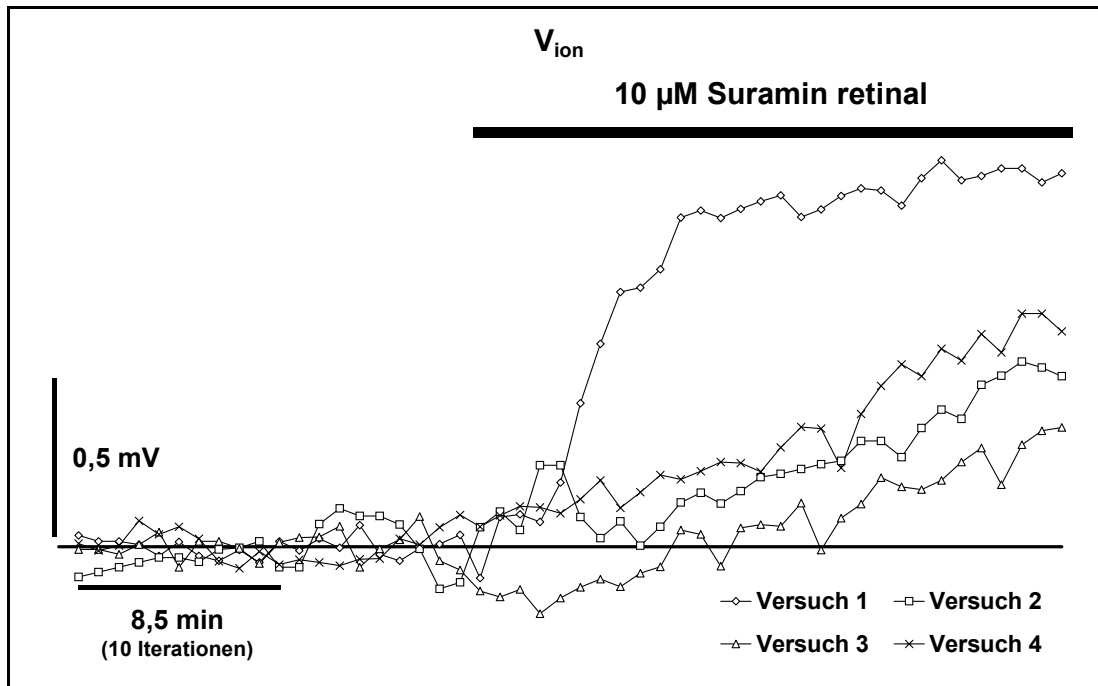


Abbildung E.29 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Suramin ($10 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats. In allen Versuchen ist spätestens einige Minuten nach Behandlungsbeginn ein Anstieg erkennbar.

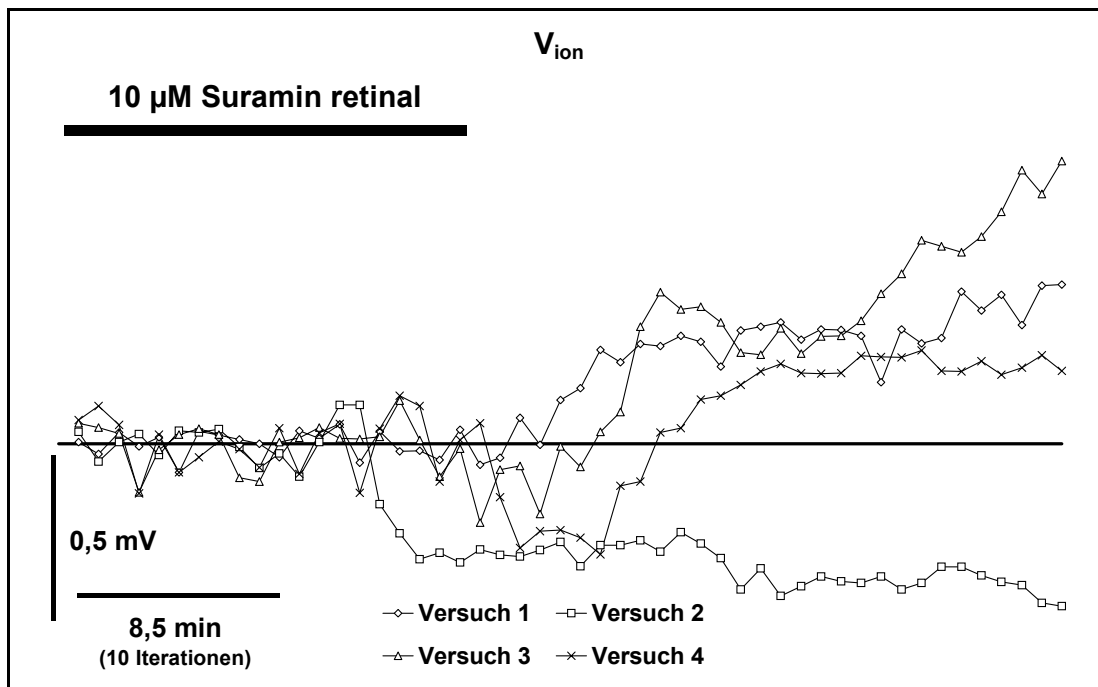


Abbildung E.30 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Suramin ($10 \mu\text{M}$) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In drei Versuchen stieg die extrazelluläre Kalziumkonzentration nach dem Behandlungsende deutlich an.

E.3.3.3 Effekte von Suramin auf die lichtinduzierten Signale

a) Verlauf des *in vitro* ERGs und seiner Komponenten

Die Abbildungen in diesem Abschnitt stellen den Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TRP über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I-VII, Erläuterungen in E.3.2 Versuchsspezifische Methoden) dar. Teil B jeder Abbildung zeigt die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial. Auf die Wiedergabe der Abbildungen für die Experimente mit der niedrigeren Konzentration von Suramin (10^{-6} M) wird hier verzichtet, da sich keine einheitlichen Veränderungen in Folge der Suramin-Behandlung zeigten. Lediglich bei einzelnen Versuchen waren aus den Differenzen zwischen den TRPs und TEPs um den Behandlungszeitraum Veränderungen der a-, b- und c-Welle betreffenden Abschnitte der Aufzeichnungen zu erkennen. Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher ausschließlich auf die vier mit einer Konzentration von 10^{-5} M durchgeführten Versuche.

Aus den Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das TTP (Abbildung E.31 B) geht hervor, dass die Applikation von Suramin in drei Versuchen nach spätestens 35 min (Phase IV) die raschen Wellen des ERGs verändert hatte. Die Amplitude der (negativen) a-Welle hatte zugenommen, die der (positiven) d-Welle dagegen ab. Außerdem zeigte sich in derselben Versuchsphase dieser drei Experimente eine Erhöhung der Amplitude der c-Welle gegenüber der vorherigen Phase. Anzumerken ist, dass beim einzigen Versuch, in dem keine deutlichen Änderungen im Zuge der Behandlung auftraten, das lichtinduzierte Signal des TTPs (ERG) bereits während der Kontrollphasen (I und II) nicht mehr seine typische Form hatte. Die b- und d-Welle waren verschwunden, und im Bereich der c-Welle stieg das Potenzial nicht wie üblich an.

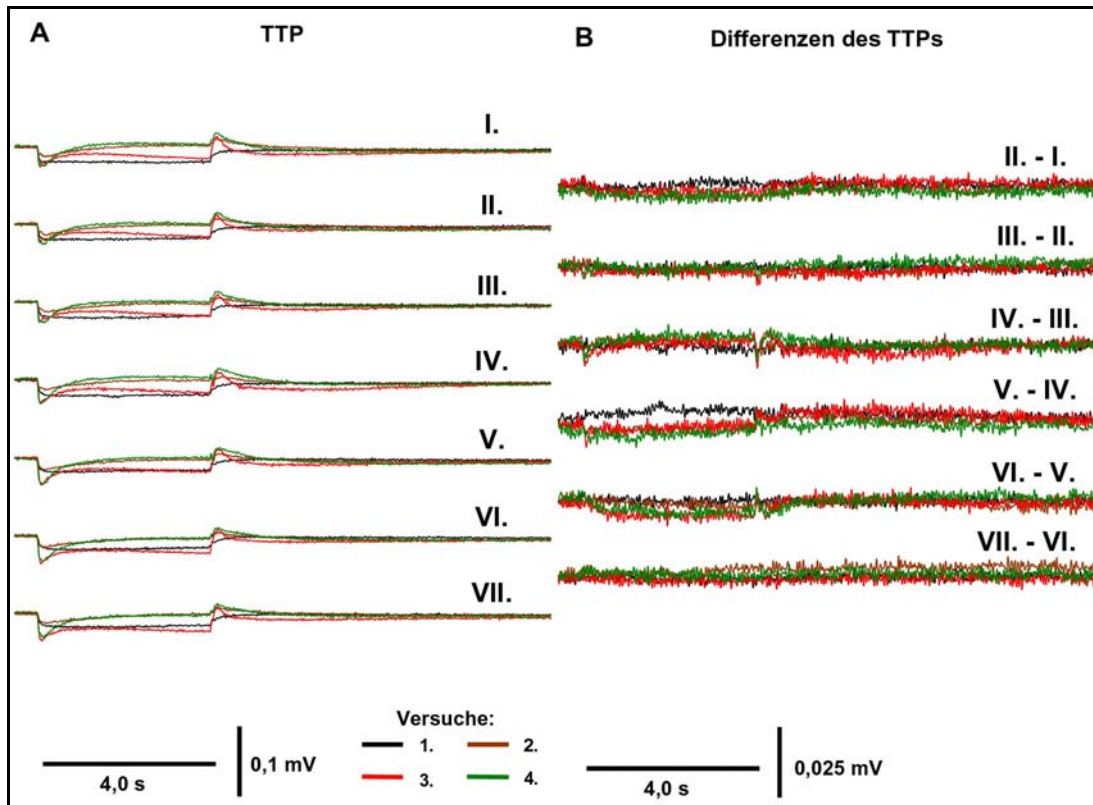


Abbildung E.31 A (linke Hälfte): TTPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen je ein Präparat mit Suramin (10 μ M) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge zu sieben aufeinander folgenden Versuchszeitpunkten (I. – VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text). **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs des nachfolgenden und des jeweils vorherigen Versuchszeitpunkt für das entsprechende Experiment. Erkennbar sind die deutlichen Effekte von Suramin auf a-, b-, d- und c-Welle vor allem im späteren Verlauf der Behandlung (IV. – III.).

In den Aufzeichnungen für das TRP und das TEP waren die im TTP beobachteten Effekte noch deutlicher zu sehen (Abbildung E.32 A und Abbildung E.33 A). Bei drei Experimenten veränderten sich im Bereich der a- und d-Welle die entsprechenden Amplituden des TRPs und des TEPs stark. Diese Wirkung setzte mit dem Beginn der Behandlung mit Suramin in Versuchsphase III eher schwach ein und manifestierte sich am stärksten in Phase IV kurz vor Ende des Behandlungszeitraums. Im Fall der a-Welle dauerte die Wirkung sogar darüber hinaus bis in Phase V (Kontrolle) an. Überdies ging sie auch bis eine Stunde nach Ende der Behandlung nur unwesentlich zurück. Das TRP und TEP im Bereich der d-Welle entwickelten sich dagegen in den Versuchsphasen V und VI kontinuierlich in Richtung des Ausgangswerts aus Phase II (Abbildung E.32 B und Abbildung E.33 B).

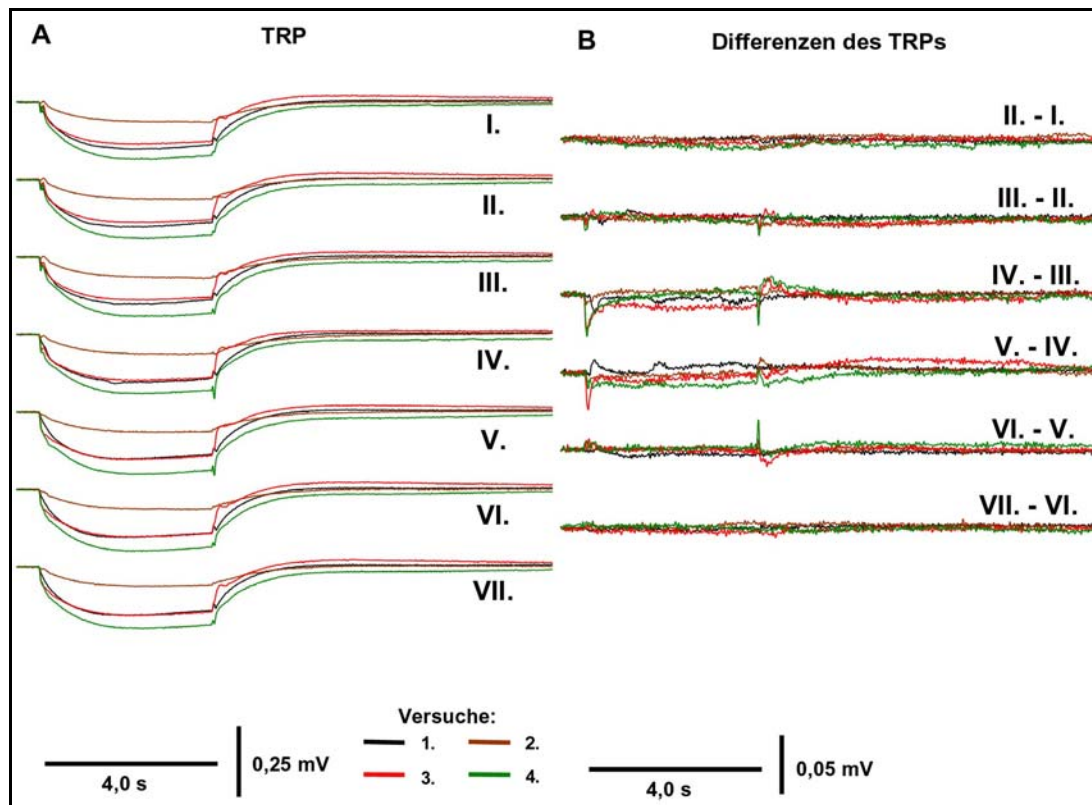


Abbildung E.32 A (linke Hälfte): TRPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen ein Präparat mit Suramin ($10 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge zu sieben aufeinander folgenden Versuchszeitpunkten (I. – VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text). **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs des nachfolgenden und des jeweils vorherigen Versuchszeitpunkt für das entsprechende Experiment. Deutlich treten die Veränderungen der Amplituden der Komponenten der a- und d-Welle im TRP in der fortgeschrittenen Phase der Behandlung (IV. – III.) und in den anschließenden Kontrollphasen (V. – IV. und VI. – V.) hervor.

Auch in dem für die c-Welle maßgeblichen Bereich des TRPs und TEPs waren vor allem von Versuchsphase III auf IV und von IV auf V deutliche aber meist uneinheitliche Verschiebungen in den Aufzeichnungen zu erkennen. Zwischen der Phase III und IV stieg die Amplitude im TEP bei drei Versuchen an, wie die Differenzkurve erkennen ließ (Abbildung E.33 B). Für denselben Zeitraum während der Suramin-Behandlung wies das TRP in zwei Versuchen eine Abnahme (entspricht einer Zunahme der Amplitude, da diese in die negative Richtung zeigt) und einen Anstieg auf. Anzumerken ist, dass die großen Veränderungen in den Komponenten des TTPs nur mit einem geringen Betrag in diesem selbst niederschlugen. Dies ist mit der gegeneinander gerichteten Einwicklung der jeweiligen Amplituden im TRP und TEP zu erklären.

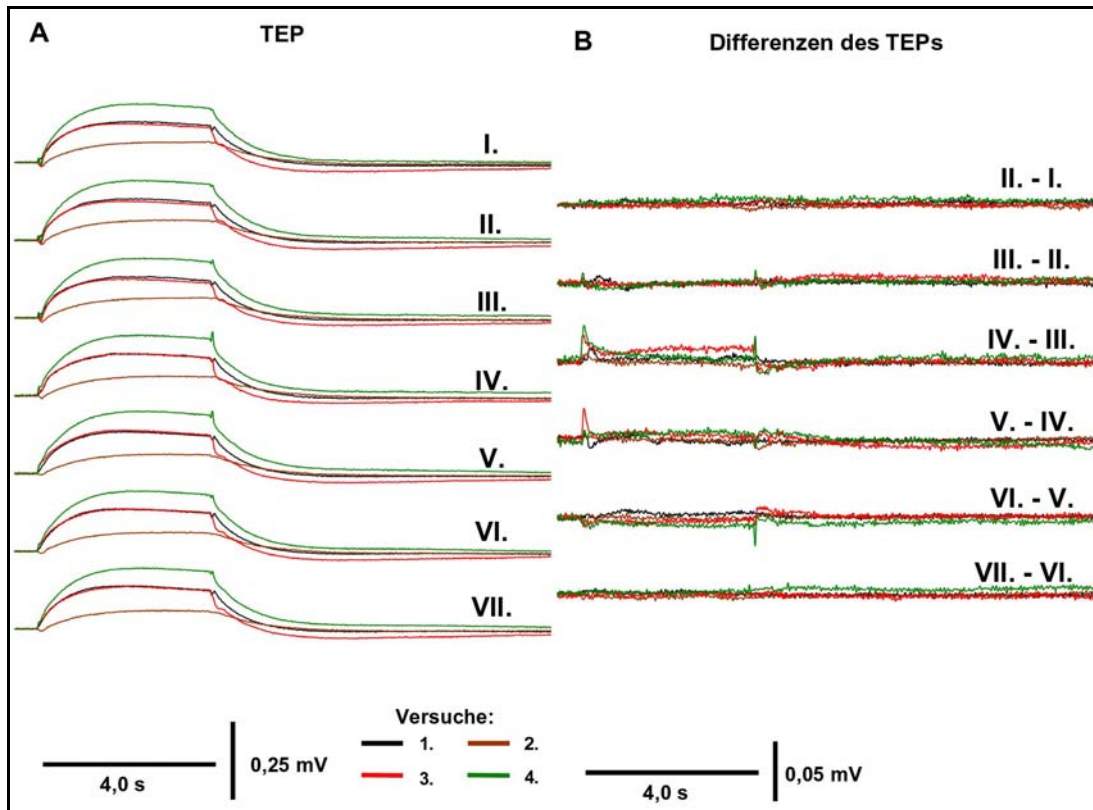


Abbildung E.33 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen ein Präparat mit Suramin ($10\ \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge zu sieben aufeinander folgenden Versuchszeitpunkten (I. – VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text). **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs des nachfolgenden und des jeweils vorherigen Versuchszeitpunkt für das entsprechende Experiment. Veränderungen der Amplituden der Komponenten der a- und d-Welle und der c-Welle im TEP in der fortgeschrittenen Phase der Behandlung (IV. – III.) und in den folgenden Kontrollphasen (V. – IV. und VI. – V.) sind erkennbar.

b) Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden

Wegen der oft großen Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Darstellung der Amplituden verzichtet. Stattdessen wurden ihre Veränderungen in Bezug auf Versuchsphase II (Kontrolle, 5 min vor Beginn der Behandlung) berechnet (Details im Kapitel: Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden bei ATP-Behandlung). Diese werden in den folgenden Abbildungen wiedergegeben. Für die Experimente mit einer Konzentration von $10^{-6}\ \text{M}$ Suramin bestätigte sich im Wesentlichen das aus der Analyse der Differenzkurven zwischen den Versuchsphasen im obigen Abschnitt bereits bekannte Ergebnis; auch aus den Differenzen der Amplituden der b-, c- und d-Welle zur Versuchsphase II konnten keine einheitlichen Effekte

im Zuge der Suramin-Behandlung erkannt werden, deshalb wird auf eine Wiedergabe dieser Ergebnisse in Abbildungen verzichtet.

Änderungen in den Amplituden der a-, b-, und d-Welle (rasche Wellen)

Bei der Behandlung mit 10^{-6} M Suramin zeigte einzig die Amplitude der Komponente der a-Welle im TEP in drei Versuchen einen Rückgang nach Beginn der Behandlung (Versuchsphase III) und bei einem weiteren Versuch eine Stagnation nach einem Anstieg während des Kontrollzeitraums in den Phasen I und II (Abbildung E.36). Schon während des Fortgangs der Behandlung (Versuchsphase IV) stieg in drei Experimenten die Amplitude wieder an. Spätestens 45 min nach Ende der Behandlung (Phase VI) hatte die Amplitude in allen vier Versuchen wieder das Ausgangsniveau erreicht oder überschritten. Im TRP traten für den Bereich der a-Welle, mit Ausnahme eines Rückgangs in Versuch 2 (positive Differenz im Fall einer negativen Amplitude bedeutet Abnahme dieser), keine Veränderung in Folge der Suramin-Behandlung auf (Abbildung E.35). Die Amplituden entwickelten sich meist Richtung, die bereits im Kontrollzeitraum vorherrschte. Diese Entwicklung war teilweise zu der im TEP gegenläufig. Daher war im TTP keine Veränderung der Amplitude der a-Welle wahrzunehmen (Abbildung E.34).

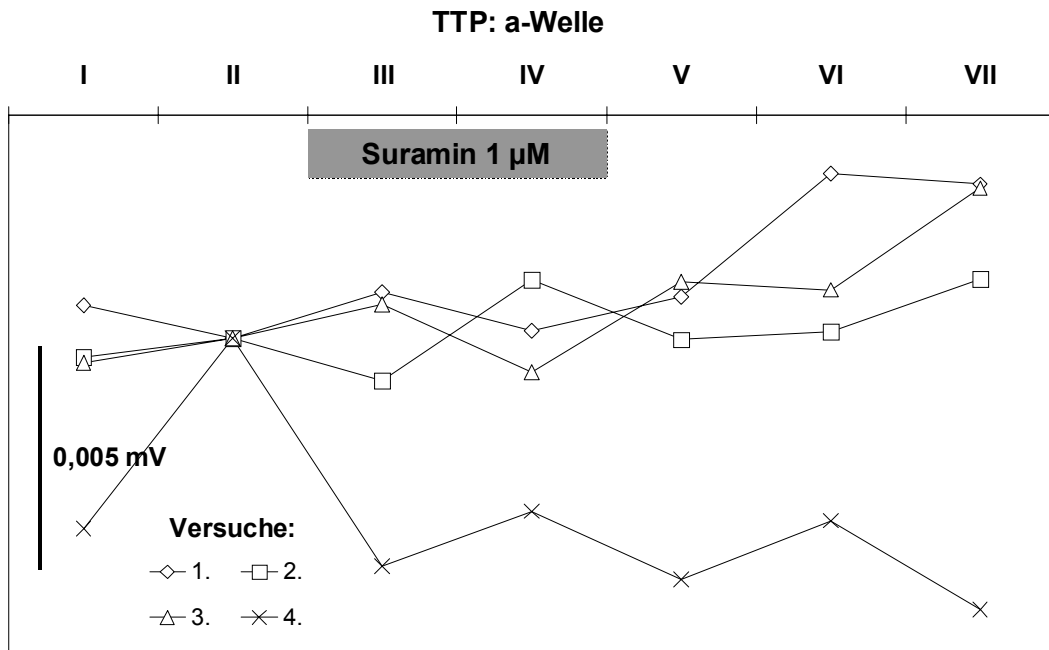


Abbildung E.34 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In drei von vier Versuchen sind keine Veränderungen nach Beginn der Behandlung mit 1 µM Suramin (III) zu erkennen.

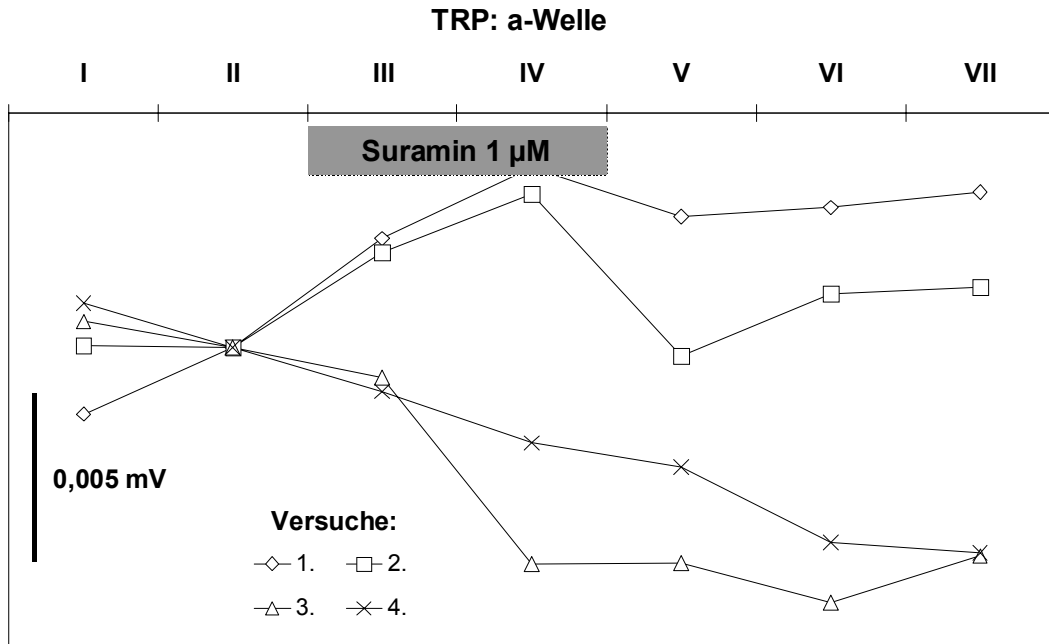


Abbildung E.35 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 µM Suramin (III) sind in drei Versuchen keine deutlichen Veränderungen des zwischen den Kontrollphasen I und II vorherrschenden Trends erkennbar. In Versuch 2 sank die Amplitude der Komponente der a-Welle im TRP geringfügig ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

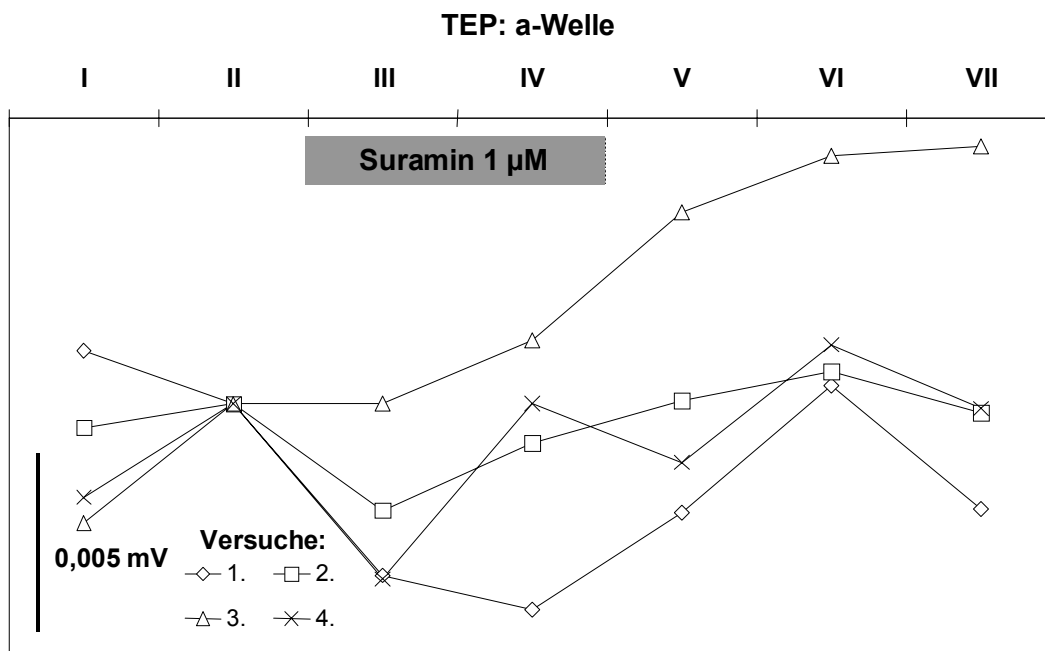


Abbildung E.36 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 1 µM Suramin (III) zeigte sich in drei Versuchen ein Rückgang der Amplitude. In Versuch 3 blieb die Amplitude der Komponente der a-Welle im TEP konstant, obwohl sie zwischen den Kontrollphasen angestiegen war.

Für die Suramin-Behandlung in einer Konzentration von 10^{-5} M ergab sich folgendes Bild: In zwei Experimenten (Versuche 3 und 4) änderten sich die Amplituden im Bereich der a-, b- und d-Welle im TEP und im TRP spätestens 35 min nach Behandlungsbeginn stark. Da die Ausrichtung der jeweiligen Amplituden im TEP und im TRP entgegengesetzt sind, fielen die korrespondierenden Änderungen im TTP immer deutlich geringer aus.

Im Fall der a-Welle führte dies zu einem Anstieg der negativen Amplitude im TTP beim Einsetzen der Behandlung (Versuchsphase III), der nach Ende dieser sich aber nicht zurück bildete (Abbildung E.37). Da die a-Welle ein Minimum bildet, bedeutet eine negative Differenz eine Vergrößerung des Betrags ihrer Amplitude. Diese Zunahme der Amplitude ging auf eine entsprechende Abnahme des TRPs zurück (Abbildung E.38), die etwas größer ausfiel als die korrespondierende Zunahme des TEPs (Abbildung E.39). Bei beiden Versuchen war nach Behandlungsende spätestens ab Versuchsphase VI im

TRP und im TEP ein rückläufiger Trend zu beobachten, der sich im TTP allerdings nur in einem Fall manifestierte.

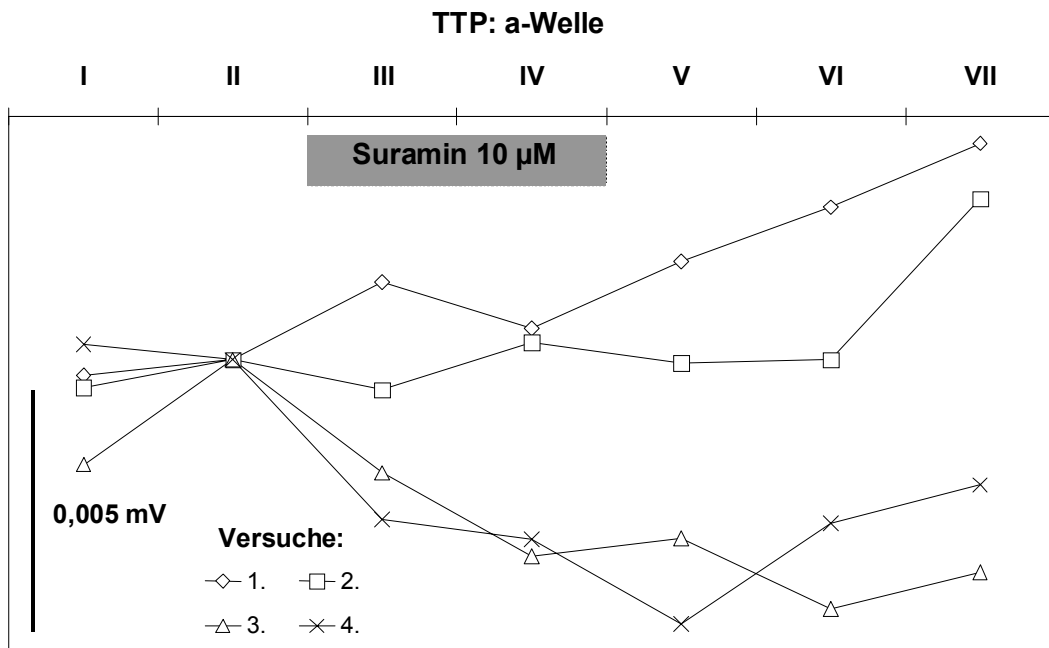


Abbildung E.37 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In zwei von vier Versuchen ist ein Anstieg der Amplitude der a-Welle nach Beginn der Behandlung mit 10 µM Suramin (III) zu erkennen (negative Differenzen bei negativen Amplituden = Zunahme).

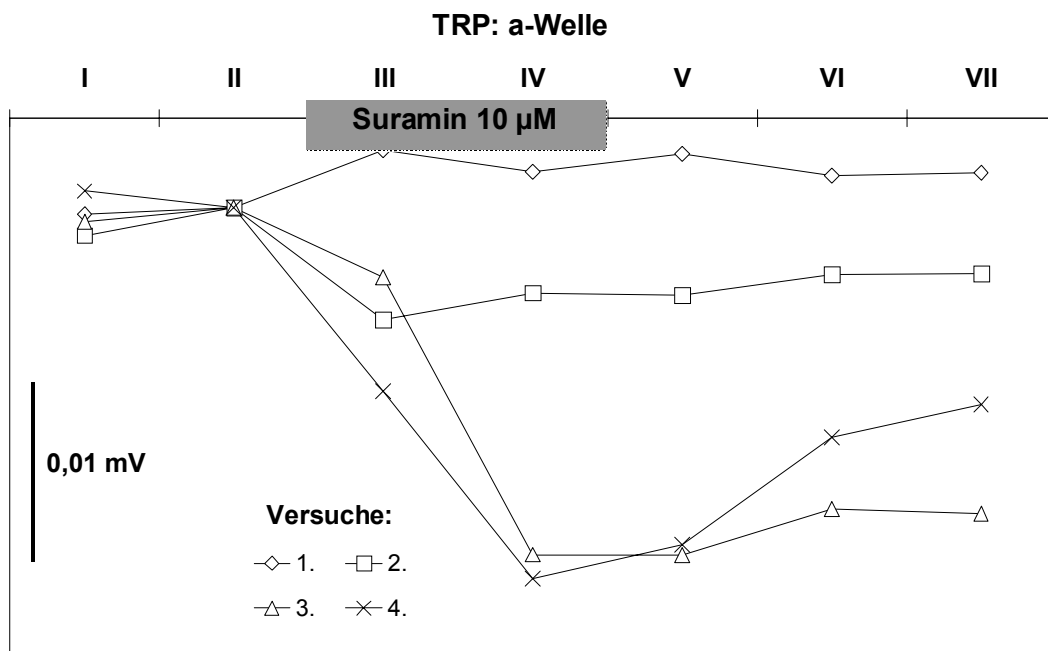


Abbildung E.38 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach längerer Behandlung mit 10 µM Suramin (IV, ca. 35 min nach Beginn der Behandlung) ist in zwei Versuchen eine deutliche Zunahme der Amplitude zu erkennen (negative Differenzen bei negativen Amplituden = Zunahme).

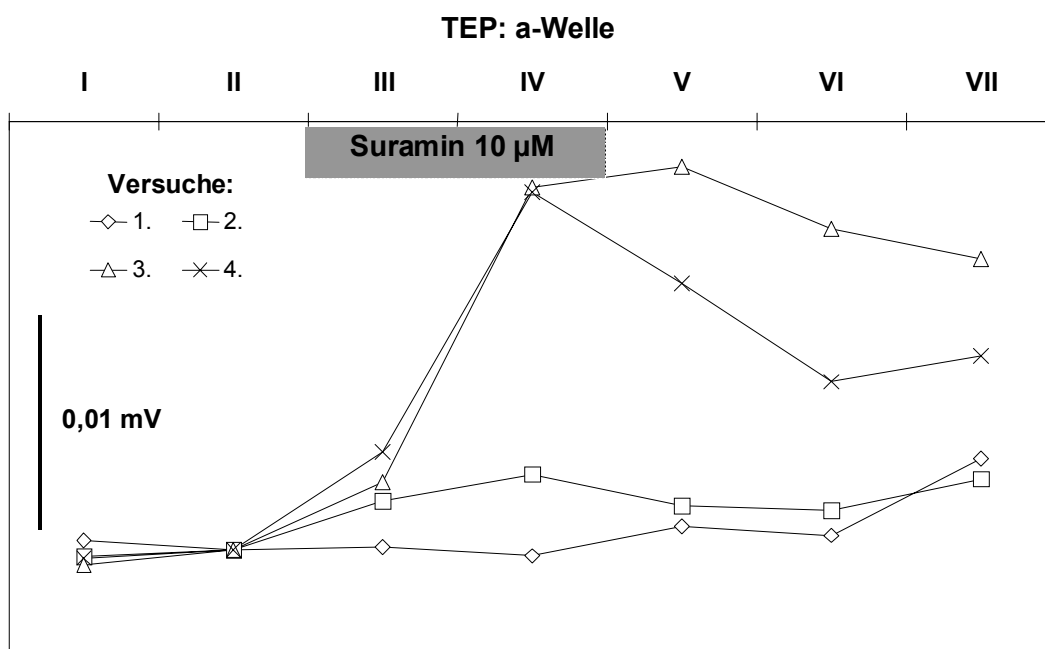


Abbildung E.39 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach anhaltender Behandlung mit 10 µM Suramin (IV, ca. 35 min nach Beginn der Behandlung) zeigte sich in zwei Versuchen ein deutlicher Anstieg der Amplitude der Komponente der a-Welle im TEP.

Auch für die b-Welle zeigten sich in den Versuchen 3 und 4 im Laufe der Behandlung mit Suramin deutliche Änderungen in den aufgezeichneten Potenzialen: Spätestens 35 min nach dem Start der Suramin-Zugabe war die Amplitude der b-Welle im TTP gegenüber der Kontrollphase II stark reduziert (Abbildung E.40). Dies war ebenfalls auf eine Abnahme der Amplitude im TRP zurückzuführen (Abbildung E.41), die einen gegenläufigen Anstieg im TEP übertraf. Die Amplituden entwickelten sich etwas verzögert nach Ende der Behandlung in Versuchsphase IV (45 min nach Ende der Behandlung) in Richtung der Kontrollwerte zurück, wobei dies im TTP nur für den Versuch 4 klar zu erkennen war.

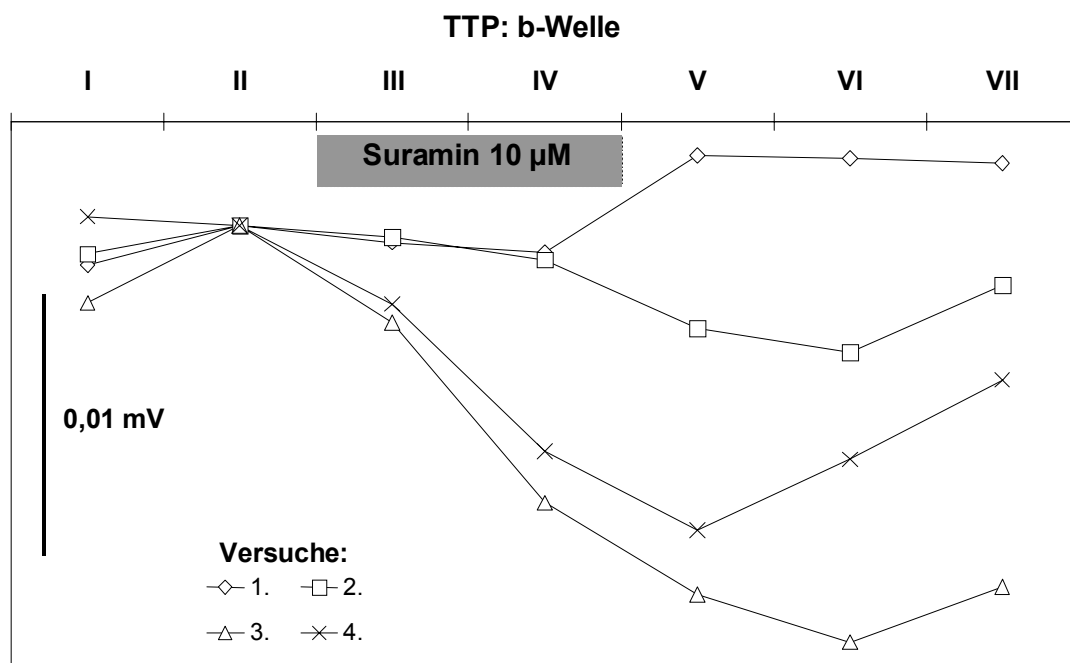


Abbildung E.40 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In zwei von vier Versuchen ist ein Rückgang der Amplitude der b-Welle nach Beginn der Behandlung mit 10 µM Suramin (III) zu erkennen, der sich mit anhaltender Behandlung noch verstärkte (IV).

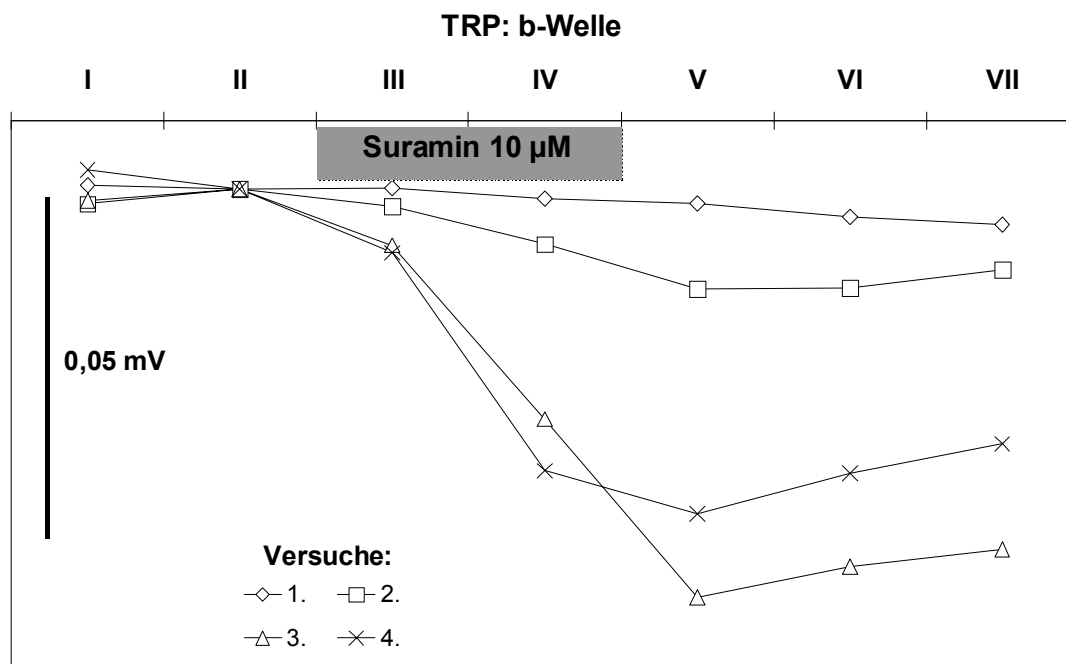


Abbildung E.41 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 10 µM Suramin (III) ist in zwei Versuchen eine Abnahme der Amplitude zu erkennen, die mit andauernder Behandlung sich noch deutlich verstärkt (IV, nach ca. 35 min Behandlungsdauer).

Die Amplitude der d-Welle ging im Fall von drei Versuchen nach Einsetzen der Behandlung fortlaufend zurück (Abbildung E.42 Versuchsphasen III und IV). Während sich in den Versuchen 3 und 4 die Amplitude im TEP (Abbildung E.44) stärker verringerte als im TRP (Abbildung E.43), war im Versuch 2 allein eine Zunahme der negativen Amplitude im TRP für den Rückgang im TTP verantwortlich. Die Amplituden der Komponenten der d-Welle im TRP und im TEP sind einander entgegen gerichtet. Daher kompensieren sich gleichartige Veränderungen der Komponenten im TTP. Bereits 15 min nach Ende der Behandlung (Phase V) wurde bei diesen drei Experimenten im TTP ein beginnender Anstieg der Amplituden in Richtung der Kontrollwerte sichtbar. In Versuchsphase VII, 60 min nach Behandlungsende, hatten sie wieder nahezu den Ausgangswert von Phase II erreicht.

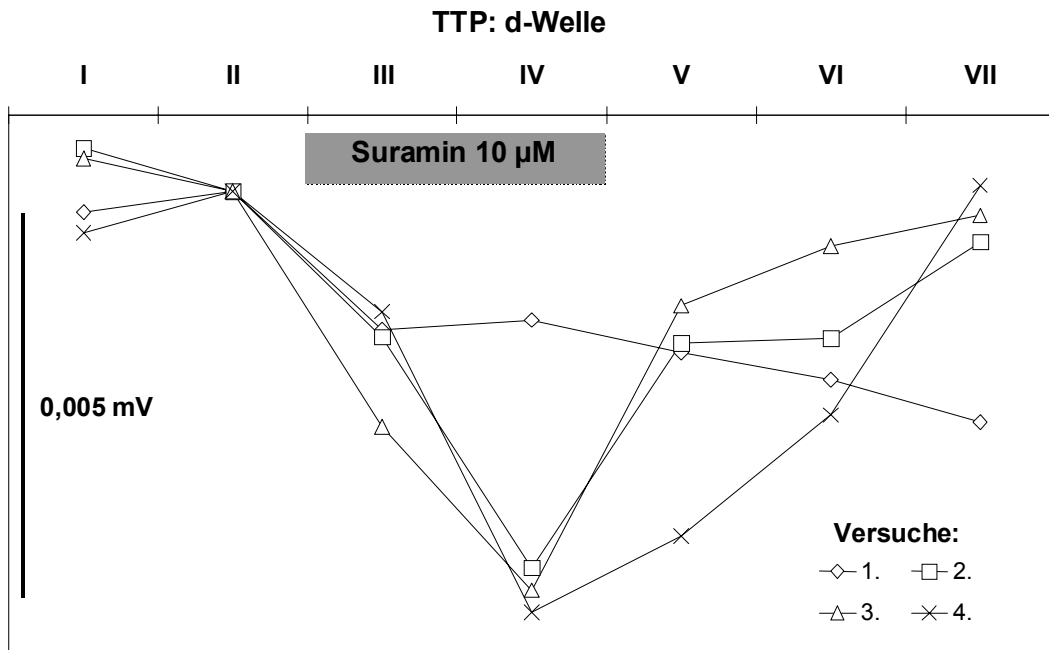


Abbildung E.42 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). In drei Versuchen ist ein deutlicher Rückgang der Amplitude der d-Welle nach Beginn der Behandlung mit 10 µM Suramin (III) zu erkennen, der sich mit anhaltender Behandlung noch verstärkte (IV).

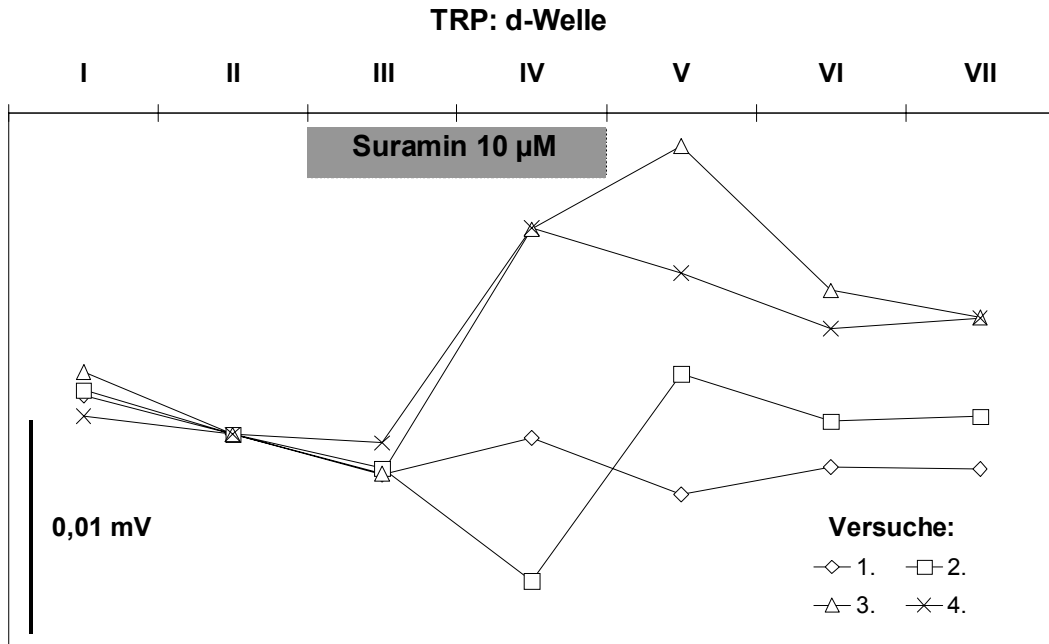


Abbildung E.43 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 10 µM Suramin (III) ist noch keine Veränderung zur erkennen. Mit andauernder Behandlung (IV, nach ca. 35 min Behandlungsdauer) trat in zwei Versuchen eine deutliche Abnahme der Amplitude im TRP auf (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

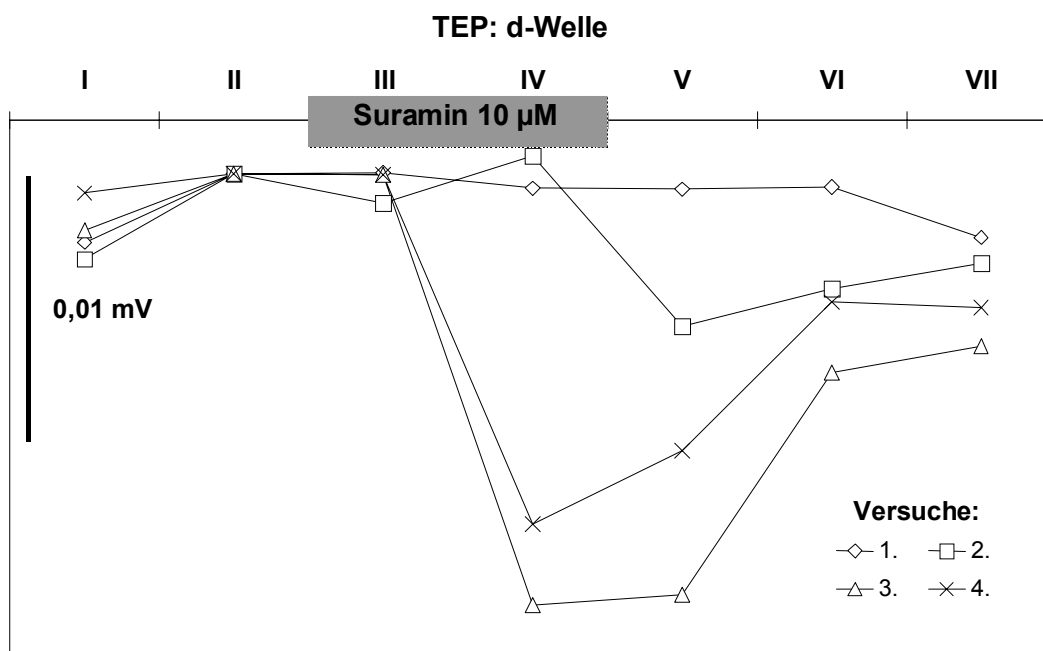


Abbildung E.44 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Erst nach anhaltender Behandlung mit 10 µM Suramin (IV, ca. 35 min nach Beginn der Behandlung) zeigte sich in zwei Versuchen ein deutlicher Rückgang der Amplitude der Komponente der d-Welle im TEP.

Änderungen in der Amplitude der langsamen c-Welle

Die c-Welle wies bis zum Ende der Behandlung mit Suramin keine deutlichen Veränderungen in ihrer Amplitude auf (Abbildung E.45). Lediglich in Versuch 3 war bereits während der Behandlung eine Reaktion erfolgt. In Versuchsphase IV war die Amplitude im TEP im gleichen Maß angestiegen wie im TRP (keine Abbildungen). Da diese Amplituden einander entgegengerichtet sind, kam es im TTP zu keiner entsprechenden Änderung. Erst längere Zeit nach Behandlungsende zeigte sich in der c-Welle ein Effekt. Spätestens 45 min nach Ende der Behandlung (Phase VI) war in den Versuchen 3 und 4 im TTP ein deutlicher Rückgang der Amplitude der c-Welle zu erkennen. Dieser war auf einen Anstieg der negativen Amplitude im TRP zurück zu führen, der den im TEP übertraf. Auf die Wiedergabe dieser Ergebnisse für die Komponenten der c-Welle im TRP und TEP in Abbildungen wird wegen ihrer geringen Bedeutung verzichtet.

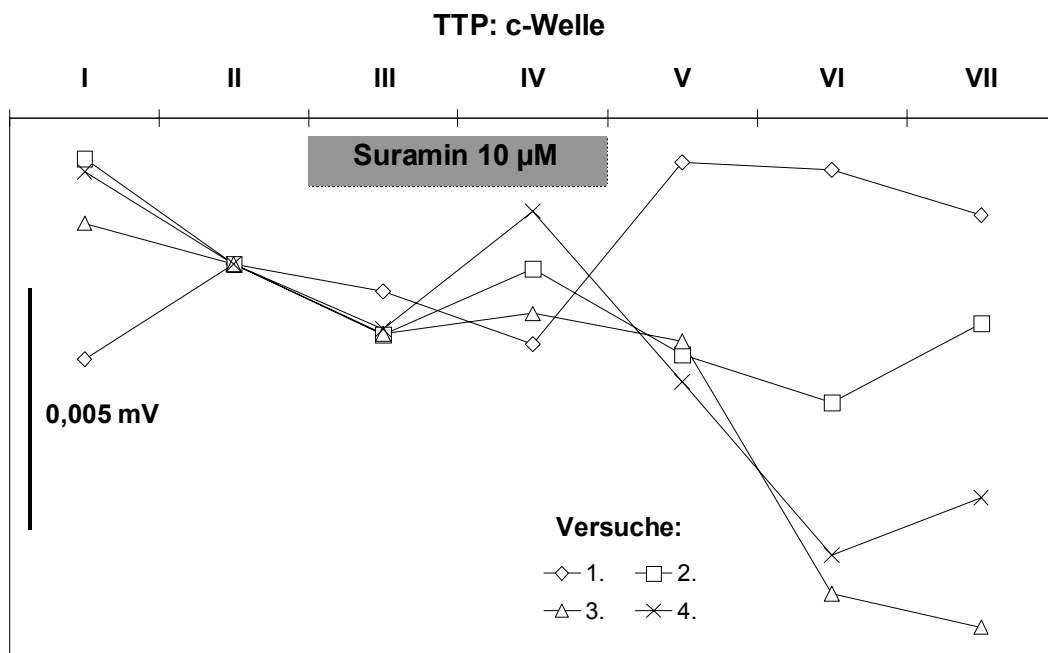


Abbildung E.45 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen sämtlichen Versuchsphasen und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit 10 μM Suramin (III) waren keine Veränderungen erkennbar. Ca. 45 min nach Ende der Behandlung ging die Amplitudeder c-Welle in zwei Versuchen deutlich zurück.

E.3.4 Diskussion der Wirkung von Suramin auf das Retina-RPE-Choroid Präparat

Die Versuche waren mit dem Ziel begonnen worden, eine geeignete Konzentration für den Purinrezeptor-Antagonisten Suramin für später durchzuführende Kobehandlungen des Retina-RPE-Choroid Präparats mit ATP und Suramin zu finden. Durch diese sollte überprüft werden, ob die festgestellten Effekte von ATP auf das Präparat spezifisch sind, d. h. über die Bindung von ATP an P2-Rezeptoren vermittelt werden. Erste Versuche mit der Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit Suramin hatten gezeigt, dass eine Konzentration von 100 μM , die bei elektrophysiologischen Experimenten an einzelnen Zellen und dem RPE (Peterson *et al.*, 1997) oder bei Kalzium-Fluoreszenz-Färbungsverfahren (Newman, 2001) erfolgreich eingesetzt worden waren, nicht auf das Retina-RPE-Choroid Präparat übertragbar war. Bei dieser Konzentration traten im *in vitro* ERG deutliche

unregelmäßige Abweichungen von der bekannten Form auf. Vor allem in der c-Welle waren in kurzen Abständen, oft von einer Iteration des Versuchsprogramms zur nächsten, starke Schwankungen zu beobachten, die eine korrekte Auswertung des Signals unmöglich machten. Um die Konzentration von Suramin zu bestimmen, mit denen das Retina-RPE-Choroid Präparat behandelt werden kann, ohne dass es zu unregelmäßigen „Ausschlägen“ in den Signalen des *in vitro* ERGs kommt, mussten daher weitere Versuchen mit verschiedenen geringeren Konzentrationen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden diskutiert. Durch die oben beschriebenen aufwendigen Voruntersuchungen zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration von Suramin blieb im Rahmen dieser Arbeit keine Zeit mehr für die ursprünglich angestrebten Kobehandlungen.

E.3.4.2 Die Ursachen für die Wirkung von Suramin auf die Bestandspotenziale

In den Bestandspotenzialen waren im Zuge der retinalen Behandlung mit Suramin zwar Änderungen aufgetreten, deren Betrag jedoch in fast allen Versuchen gering ausfiel. Das TTP wies nach Behandlungsbeginn einen Anstieg auf. Dieser konnte aber nicht auf einheitliche Veränderungen der beiden Komponenten des TTPs zurückgeführt werden. In der Regel entwickelten sich das TRP und das TEP innerhalb eines Versuchs entgegengesetzt, d. h. wenn das TRP zunahm, ging das TEP zurück und umgekehrt. Die Zunahme des TTPs wurde in einigen Versuchen durch eine Erhöhung des TEPs in anderen aber durch einen Anstieg des TRPs verursacht. Diese uneinheitlichen Veränderungen der Bestandspotenziale könnten die Folge einer unspezifischen pharmakologischen Wirkung von Suramin auf physiologische Parameter der Zellen des Retina-RPE-Choroid Präparats sein. Allerdings könnte für beide Effekte auch die antagonistische Wirkung von Suramin auf bestimmte Typen von P2-Rezeptoren verantwortlich sein, und zwar durch eine Reduzierung der Basisaktivität der Kationenkanäle, die durch P2-Rezeptoren moduliert werden. Es kann vorausgesetzt werden, dass bei einer

Rezeptorpopulation auch ohne die Anwesenheit ihres spezifischen Agonisten sich immer ein gewisser Teil der Population im aktivierten Zustand befindet. Denn bei der normalen Umgebungstemperatur wird jeder Rezeptor bzw. Ionenkanal durch stochastische Prozesse innerhalb eines gewissen Zeitraums für einen kurzen Moment aktiviert bzw. geöffnet. Suramin könnte also über seine unspezifische antagonistische Wirkung die Häufigkeit der zufälligen Aktivierung von P2-Rezeptoren bzw. Öffnung von Ionenkanälen verringern.

Im Fall des TEPs könnte sein Anstieg mit einer verstärkten Hyperpolarisation der apikalen Membran des RPEs durch die Inaktivierung von Kationenkanälen begründet werden. Vor allem Kaliumkanäle können direkt über P2X-Rezeptoren oder auch indirekt über eine von P2Y-Rezeptoren induzierte Erhöhung von intrazellulären Ca^{2+} moduliert werden. Im umgekehrten Fall, d. h. der anfänglichen Abnahme des TEPs bei ATP-Behandlung war diese der Aktivierung solcher Kanäle und der damit verbundenen Depolarisation des apikalen RPEs zugeschrieben worden (s. o.). Die bei einigen Versuchen mit Suramin-Behandlung aufgetretene Abnahme des TEPs könnte daher als Umkehrung des bei ATP-Applikation beobachteten Effekts interpretiert werden. Durch die Hemmung von P2Y-Rezeptoren kann, über einen second messenger gesteuert, eine Abnahme der Chloridleitfähigkeit an der basalen Membran des RPEs induziert werden (Gallemore & Steinberg, 1993; Peterson *et al.*, 1997). Dadurch würde das basale RPE hyperpolarisiert (schwächer depolarisiert) und damit das TEP verringert.

Die Abnahme des TRPs in einigen Versuchen nach Beginn der Suramin-Behandlung könnte gleichfalls durch eine Inaktivierung von P2-Rezeptoren, in diesem Fall an den Müllerzellen, bedingt sein. Auf diese Weise würde die Öffnungsrate von Kationenkanälen reduziert. Dies hätte eine verstärkte Hyperpolarisation der Müllerzellen zur Folge. Eine dadurch verursachte Abnahme des extrazellulären Kaliumstroms entlang der Müllerzellen von ihrem proximalen, d. h. vitrealen Endfuß in Richtung des OPL (Dowling, 1987) würde als Verminderung des TRPs sichtbar. Die in anderen Fällen gleichfalls mit dem Einsetzen der Suramin-Behandlung aufgetretene Zunahme des TRPs würde eine Erhöhung dieses Kaliumstroms erfordern. Dies lässt sich mit obigen

Erläuterungen nicht in Einklang bringen, da dazu die Müllerzellen depolarisiert werden müssten. Die uneinheitlichen Veränderungen der Bestandpotenziale erschweren grundsätzlich ihre Interpretation als Effekte der Hemmung von P2-Rezeptoren durch Suramin, da man in diesem Fall doch einheitliche Reaktionen erwarten würde. Allerdings ist Suramin nur ein unspezifischer Antagonist der P2-Rezeptoren, dessen Wirkungsmechanismus nicht bekannt ist. Abhängig von individuellen Unterschieden der Präparate könnte daher Suramin in den verschiedenen Zelltypen seine Wirkung unterschiedlich stark entfalten. Dies könnte die Ursache sein, dass je nach Versuch der Anstieg des TTPs entweder auf die Erhöhung des TEPs oder aber des TRPs zurückging.

Die während der Behandlung gemessene Zunahme der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Bereich proximal der OLM (ungefähre Position der Ca^{2+} -sensitiven Mikroelektrode) könnte eine Folge der Hemmung der Basisaktivität von P2-Rezeptoren sein. Bestimmte nicht selektive Kationenkanäle werden durch P2X-Rezeptoren gesteuert (Ryan *et al.*, 1999). Durch diese fließen auch Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Es ist nicht auszuschließen, dass sowohl das RPE als auch die Müllerzellen solche Kanäle besitzen und durch diese Ca^{2+} -Ionen aufnehmen. Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen können entweder in intrazelluläre Speichern aufgenommen oder von den Müllerzellen zur der vitrealen Seite bzw. vom RPE zur der choroidalen Seite transportiert und dort in den extrazellulären Raum abgesondert werden. Dadurch würden dem extrazellulären Volumen im Bereich zwischen dem SRS und der OPL Ca^{2+} -Ionen entzogen. Wird die Basisaktivität dieser nicht selektiven Kationenkanäle verringert, strömt weniger Kalzium in die Zellen und die extrazelluläre Konzentration steigt an.

Alle oben diskutierten Effekte auf die Bestandpotenziale und der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration könnten, über die Hemmung der Basisaktivität von Ionenkanälen hinaus, auch auf eine tatsächlich antagonistische Wirkung des Suramins zurückgeführt werden. Durch Untersuchungen an Zellen des RPEs vom Menschen aus einer Zellkultur konnte gezeigt werden, dass das RPE über seine apikale Membran ATP in das SRS abgibt (Mitchell, 2001). Dieses autokrine ATP dürfte hauptsächlich an P2-Rezeptoren des RPEs selbst, aber durch Diffusion vielleicht sogar der Müller-

und Bipolarzellen binden. Falls das RPE des Huhns ebenfalls ATP sezerniert, würde Suramin die Wirkung des autokrinen ATPs auf die umliegenden Zellen antagonisieren.

E.3.4.3 Einfluss von Suramin auf die lichtinduzierten Signale

Die Behandlung mit der geringeren Konzentration von Suramin (1 μM) hatte zu keinen signifikanten Veränderungen der lichtinduzierten Signale geführt, d. h. sowohl die raschen Wellen (a-, b- und d-Welle) als auch die langsame c-Welle blieben unverändert. Von den Komponenten dieser Wellen im TRP und im TEP hatte lediglich eine auf die Behandlung reagiert. Die Amplitude der Komponente der a-Welle im TEP hatte sich 15 min nach Beginn der Behandlung nur geringfügig verringert. Eine nennenswerte Beeinflussung der lichtinduzierten Signale durch Suramin selbst ist also bei einer Konzentration von 1 μM in der physiologischen Lösung nicht zu erwarten.

Aus den Versuchen mit der höheren Konzentration (10 μM) ergab sich kein einheitliches Bild. In zwei Versuchen zeigten sich keine Auswirkungen des Suramins auf die lichtinduzierten Wellen im TTP und ihre Komponenten im TRP und im TEP. Dagegen wurden bei den beiden anderen Versuchen im Verlauf der Behandlung deutliche Effekte auf die Amplituden der Komponenten sichtbar. In den Wellen des TTPs (*in vitro* ERG) fielen diese häufig gering aus, da sich die deutlichen Veränderungen ihrer beiden Komponenten einander fast kompensierten. Diese Effekte entwickelten sich jedoch erst nach längerer Einwirkung von Suramin. 15 min nach Beginn der Behandlung waren sie noch nicht erkennbar gewesen, während sie 20 min später, d. h. nach 35 min Behandlungsdauer, deutlich zu Tage traten. Dies legt nahe, dass ihre Ursache nicht die Antagonisierung von P2-Rezeptoren sein kann, da diese nach maximal einigen Minuten voll ausgeprägt sein sollte. Daher ist zu vermuten, dass es sich bei den beobachteten verzögerten Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden um einen unspezifischen pharmakologischen Effekt des Suramins auf die Physiologie der Zellen in den Präparaten handelt.

E.3.4.4 Zusammenfassung der Diskussion

Die Versuche mit den beiden Konzentrationen von Suramin (1 und 10 μM) ergaben zwar Veränderungen in den Bestandspotenzialen. Diese fielen aber selbst im Fall der höheren Konzentration nur gering aus. Es erscheint möglich, dass diese Wirkungen auf die Bestandspotenziale durch die Antagonisierung von P2-Rezeptoren hervorgerufen wurden. Allerdings konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht belegt werden. Daher könnten auch andere pharmakologische Effekte des Suramins auf die Zellen diese Veränderungen verursacht haben. Im Fall der lichtinduzierten Signale löste keine der beiden Konzentrationen einen erkennbaren Effekt in den ersten 15 min der Behandlung aus.

Nach den obigen Ausführungen könnte Suramin bei einer verkürzten Behandlungszeit von maximal 20 min in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt werden, ohne dass ein nennenswerter Einfluss auf die gemessenen Potenziale durch Suramin selbst zu erwarten wäre. Diese Angaben sind bei der Planung von Kobehandlungen des Präparats mit Suramin und ATP zu berücksichtigen.

E.4 Zusammenfassende Diskussion der Wirkungsmechanismen von ATP und Suramin

Durch die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit ATP veränderten sich die Bestandpotenziale, das TEP sogar biphasisch, und die Amplituden aller lichtinduzierten Wellen des *in vitro* ERGs deutlich, letztere sogar vollständig reversibel. Diese Veränderungen können mit den bekannten Modellen über die Erzeugung der Potenziale und Wellen in der Netzhaut und im RPE erklärt werden, wenn man die Öffnung von bestimmten Ionenkanälen als Folge der Einwirkung von ATP annimmt. Man kann deshalb postulieren, dass die beschriebenen Wirkungen über die Bindung von ATP an P2-Rezeptoren ausgelöst werden und dass diese Rezeptoren in den Membranen des RPEs und mehrerer unterschiedlicher Zelltypen der Retina vorkommen. Als Effektorgruppen kommen dabei verschiedene Subtypen sowohl der ionotropen P2X- als auch der metabotropen P2Y-Rezeptoren in Frage. Diese Hypothese sollte durch Kobehandlung des Präparats mit einem Antagonisten der P2-Rezeptoren, z. B. Suramin überprüft werden. In mehreren Versuchen wurde bereits die Konzentration ermittelt, bei der Suramin allein noch keine bedeutenden Veränderungen in den aufgezeichneten Potenzialen des Präparats hervorruft. Neben indirekten pharmakologischen Wirkungen, die hier nicht ausgeschlossen werden können, moduliert Suramin ohne die Anwesenheit eines Agonisten möglicherweise die P2-Rezeptoren, indem es die Rate der spontanen Aktivität reduziert. Es könnte aber auch die Wirkung von autokrinem ATP aus dem RPE auf P2-Rezeptoren hemmen.

F Modulation des cAMP-Spiegels durch Forskolin und Glucagon

Wie bereits im Kapitel A.3 beschrieben, ist cAMP ein bedeutender intrazellulärer „second messenger“, der bei einer Vielzahl der metabotropen Rezeptoren als Mittler zwischen dem membranständigen Rezeptor (u. a. dem Glucagonrezeptor) und den eigentlichen Effektoren (z. B. Ionenkanal) fungiert. Da sich aus der Forschung der letzten Jahre Hinweise ergaben, dass Glucagon ein Glied in der Signalkette zur Regelung des Augenwachstums zumindest beim Huhn sein könnte (Fischer *et al.*, 1999; Feldkaemper & Schaeffel, 2002), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Versuche mit Glucagon-Behandlungen vorgenommen. Um zu klären, ob die in diesen Experimenten aufgetretenen Effekte durch eine über den Glucagonrezeptor induzierte Steigerung des cAMP-Spiegels verursacht worden waren, wurden anschließend die Versuchsreihen mit Forskolin, einem unspezifischen Aktivator der Adenylat-Cyclase, durchgeführt. Ihre Ergebnisse werden im ersten Teil dieses Kapitels dargestellt und diskutiert. Im zweiten Teil wird dann auf die Wirkung von Glucagon eingegangen und Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen gezogen.

F.1 Wirkung von Forskolin auf das *in vitro* Präparat

F.1.1 Einführung

Von den Versuchen mit Forskolin-Behandlungen wurde eine Klärung der Frage erhofft, ob die bei den vorhergehenden Glucagon-Behandlungen beobachteten Effekte mit einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) in Zusammenhang stehen. Sind die durch Behandlung mit Glucagon hervorgerufenen Antworten spezifischer Art, d. h.

durch die Aktivierung von Glucagon-Rezeptoren vermittelt, dann sollten sie mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels verbunden sein. Forskolin ist seit langem als ein reversibler Aktivator der Adenylat-Cyclase bekannt (Seamon & Daly, 1981; Seamon *et al.*, 1981). Dieser wirkt im Gegensatz zu Peptiden wie Glucagon nicht über einen membranständigen Rezeptor auf die Adenylat-Cyclase, sondern über einen bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus; diskutiert wird eine direkte Interaktion von Forskolin mit dem katalytischen Zentrum der Adenylat-Cyclase (Kraupp *et al.*, 1992) Sollten Behandlungen des Retina-RPE-Choroid Komplexes mit Forskolin ähnliche Veränderungen wie die Glucagon-Behandlungen hervorrufen, so wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Reaktion des Retina-RPE-Choroid Präparats auf die Behandlung mit Glucagon durch den Anstieg der Konzentration von cAMP in den Zellen verursacht wurde und damit wahrscheinlich über die spezifische Aktivierung von Glucagon-Rezeptoren vermittelt wurde.

F.1.2 Versuchsspezifische Methoden für die Behandlungen mit Forskolin

Aus Gründen, die im Folgenden erläutert werden, wurden die Forskolin-Behandlungen in den folgenden vier Ansätzen (1a und b sowie 2a und b) durchgeführt: Hydrophiles Forskolin über die retinale (1a) bzw. choroidale (1b) Superfusion und hydrophobes Forskolin ebenso abwechselnd von der retinalen (2a) wie von der choroidalen (2b) Seite. Dabei wurde jeweils dieselbe Konzentration von 50 μM verwendet. Dieser Wert war in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Kuntz *et al.* (1994) aus der Arbeitsgruppe von Roy Steinberg gewählt worden. Die Autoren hatten mit der gleichen Methode Retina-RPE-Choroid Präparate vom Haushuhn mit Forskolin behandelt. Allerdings verwendeten sie die hydrophobe Form und mussten daher das Forskolin in DMSO lösen, bevor es dem physiologischen Medium zugegeben werden konnte. Um das vorherige Lösen der Substanz in DMSO zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit für die ersten beiden Versuchsansätze die hydrophile Form des Forskolins (7-Deacetyl-7-(O-N-methylpiperazino)- γ -butyryl-, Dihydrochloride, Calbiochem, La Jolla, USA) herangezogen. Bei den

ersten beiden Versuchen wurden Forskolin nur retinal appliziert, um die Vergleichbarkeit mit den vorausgegangenen Glucagon-Experimenten zu gewährleisten. Da die Ergebnisse dieser Versuche sich deutlich von denen aus der Arbeit von Kuntz *et al.* (1994) unterschieden, erfolgte die Behandlung bei den weiteren vier Versuchen dann im Wechsel sowohl von der retinalen als auch der choroidalen Seite. In diesen vier Experimenten (wie auch in allen folgenden mit hydrophoben Forskolin) wurden Veränderungen der extrazellulären Kalzium-Konzentration gemessen. Dazu war die Spitze des zweiten Kanals der Glasmikroelektrode mit einem kalzium-selektiven Harz (Calcium-Ionophore I – Cocktail A, Fluka Chemie, Neu Ulm) gefüllt worden. Die Behandlungen erfolgten für 30 bzw. 40 min, indem Forskolin in der jeweiligen Konzentration der physiologischen Lösung zugegeben wurde. Zwischen den einzelnen Behandlungen wurde das Präparat mindestens 50 min lang nur mit der Kontroll-Lösung superfundiert, um eine seine Erholung vor Beginn der nächsten Versuchsphase zu gewährleisten.

Da auch die Ergebnisse der choroidalen Behandlungen noch deutliche Abweichungen von denen aus der Publikation von Kuntz *et al.* (1994) aufwiesen, wurden eine weitere Versuchsreihe mit zwei verschiedenen Behandlungsansätzen durchgeführt. Dazu wurde wie bei Kuntz *et al.* das native Forskolin (Calbiochem, La Jolla, USA) ein Produkt aus der Pflanze *Coleus forskohlii*, ein Lippenblütler (Lamiaceae) aus Indien, verwendet. Aus diesem wurde eine Stammlösung von 100 mM in DMSO (Sigma, Deisenhofen) hergestellt. Um die gewünschte Konzentration von 50 μ M zu erreichen, wurde diese Stammlösung im Verhältnis 1:2000 mit physiologischem Medium verdünnt. Dementsprechend wurde das Kontroll-Superfusat mit 0,05% DMSO versetzt. In den fünf Versuchen dieser Reihe wurde das Präparat wechselnd über die retinale bzw. choroidale Superfusion für je 40 min mit Forskolin behandelt. Die erste Behandlung innerhalb eines Experiments erfolgte in der Versuchsreihe im Wechsel zwischen der basalen und der apikalen Seite. Zwischen den Behandlungsphasen wurde eine mindestens 60 min dauernde Phase unter Superfusion mit dem Kontroll-Medium eingeschoben.

Für jeden Versuch im Rahmen der oben beschriebenen Reihen wurde ein frisches Präparat hergestellt. Von den Aufzeichnungen der lichtinduzierten Antworten wurden für jede der vier Behandlungsansätze sieben Phasen (I-VII) für Zeiträume vor, während und nach der Behandlung ausgewertet. Die Versuchsphasen wurden, wie folgt, gewählt:

- I und II als Kontrollen, 30 bzw. 5 min vor Beginn der Behandlung,
- III und IV während der Behandlung, 15 min bzw. 25 bis 35 min nach Behandlungsbeginn,
- V, VI und VII als Kontrollen 15, 30 und 45 min nach Ende der Behandlung.

Die Entwicklung der Bestandpotenziale wird für jede der vier Behandlungsansätze in zwei Serien von Abbildungen über jeweils 50 Iterationen mit einem Messwert pro Iteration dargestellt. Die erste Serie zeigt die Bestandpotenziale um den Beginn der Behandlung mit Forskolin. Die ersten 20 Messungen (Iterationen) wurden vor Beginn der Behandlung und weitere 30 Messungen unter der Einwirkung von Forskolin aufgezeichnet. Die zweite Serie gibt den Verlauf um das Ende der Behandlung wieder. Die ersten 20 Werte wurden während der Behandlungsphase, weitere 30 nach deren Ende registriert.

In beiden Serien wurde eine eventuell aufgetretene Drift in den Kurven folgendermaßen korrigiert: Aus den ersten 20 dargestellten Messpunkten des betreffenden Versuchs der jeweiligen Serie wurde eine Regressionsgerade berechnet, und diese als Korrekturfaktor für alle 50 dargestellten Werte des selben Versuchs verwendet. Der kalzium-selektive Kanal der Mikroelektrode wies regelmäßig eine starke Drift auf. Deshalb musste das Bestandpotenzial dieses Kanals oft während des laufenden Versuchs durch Regelung am Vorverstärker kompensiert werden. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Offset bezeichnet. Diese Offsets im Bestandpotenzial des kalzium-selektiven Kanals wurden für die Darstellung der Ergebnisse durch Subtraktion des Offset-Betrags von den nachfolgenden Werten korrigiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse getrennt nach der bei den Behandlungsansätzen verwendeten Form des Forskolins wiedergegeben.

F.1.3 Ergebnisse mit hydrophilen Forskolin

F.1.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration

a) Behandlung von der retinalen Seite des Präparats

Nach Beginn der Behandlung des Präparats mit hydrophilen Forskolin von der retinalen Seite (6 Versuche) zeigte nur das transepitheliale Bestandspotenzial (TEP) eine Veränderung. Es stieg spätestens 15 min nach Einsetzen der Behandlung deutlich an (Abbildung F.1). Auf das Ende der Behandlung reagierte das TEP hingegen uneinheitlich (Abbildung F.2), während das TTP einen Trend zur Abnahme aufwies (Abbildung F.3), dem auch mit Ausnahme eines Versuchs das TRP folgte (Abbildung F.4). In vier der sechs Versuche eine Zweikanal-Glasmikroelektrode mit einen Ionen-selektiven Kanal eingesetzt worden. Um Änderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration sichtbar zu machen wurde über diesen Kanal das Potenzial V_{ion} mittels eines kalzium-selektiven Harz gemessen. V_{ion} für Kalzium stieg in drei von vier Versuchen nach dem Absetzen der Behandlung an (Abbildung F.5).

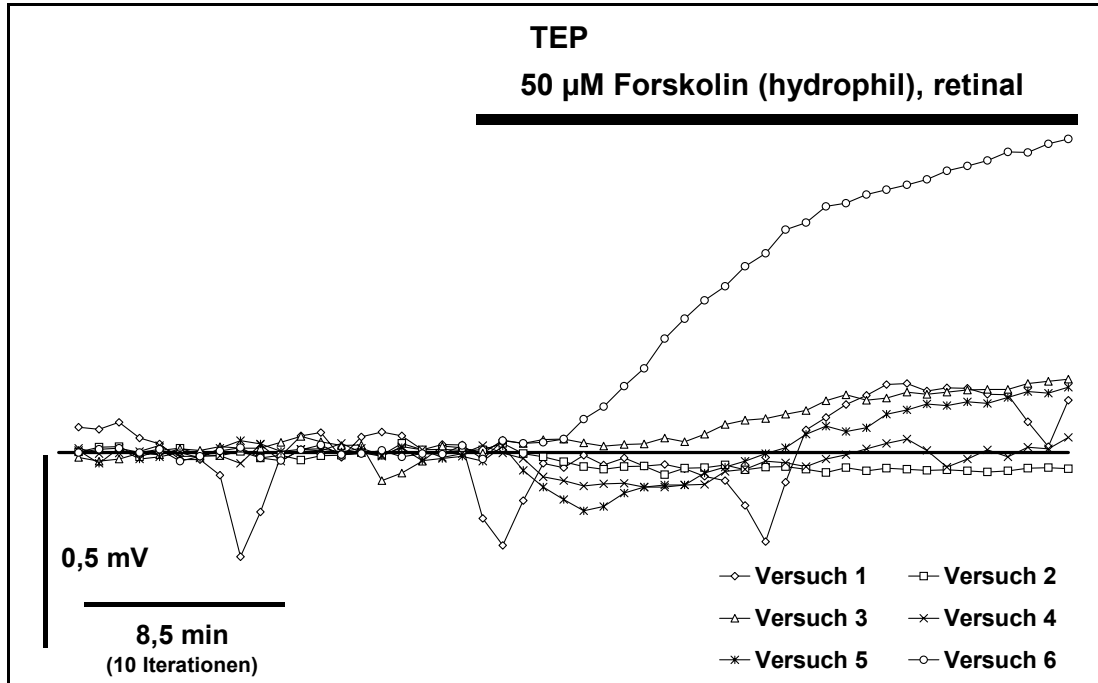


Abbildung F.1 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist eine deutliche Zunahme wenige Minuten nach Beginn der Behandlung.

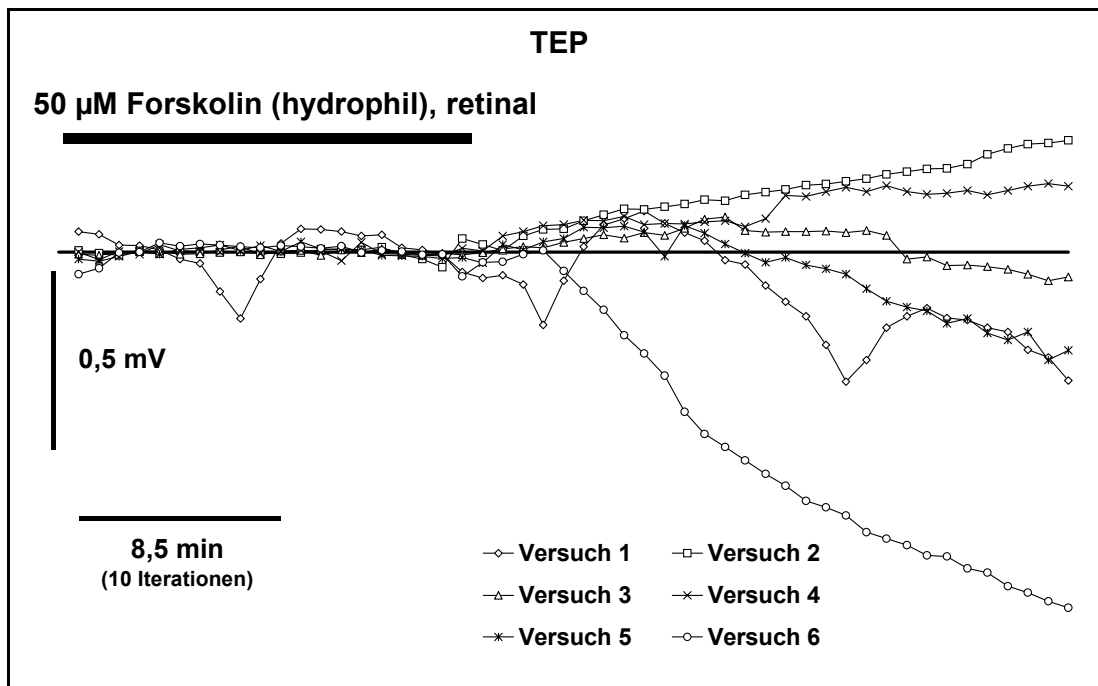


Abbildung F.2 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die Beendigung der Behandlung hatte deutliche aber uneinheitliche Veränderungen im TEP zur Folge.

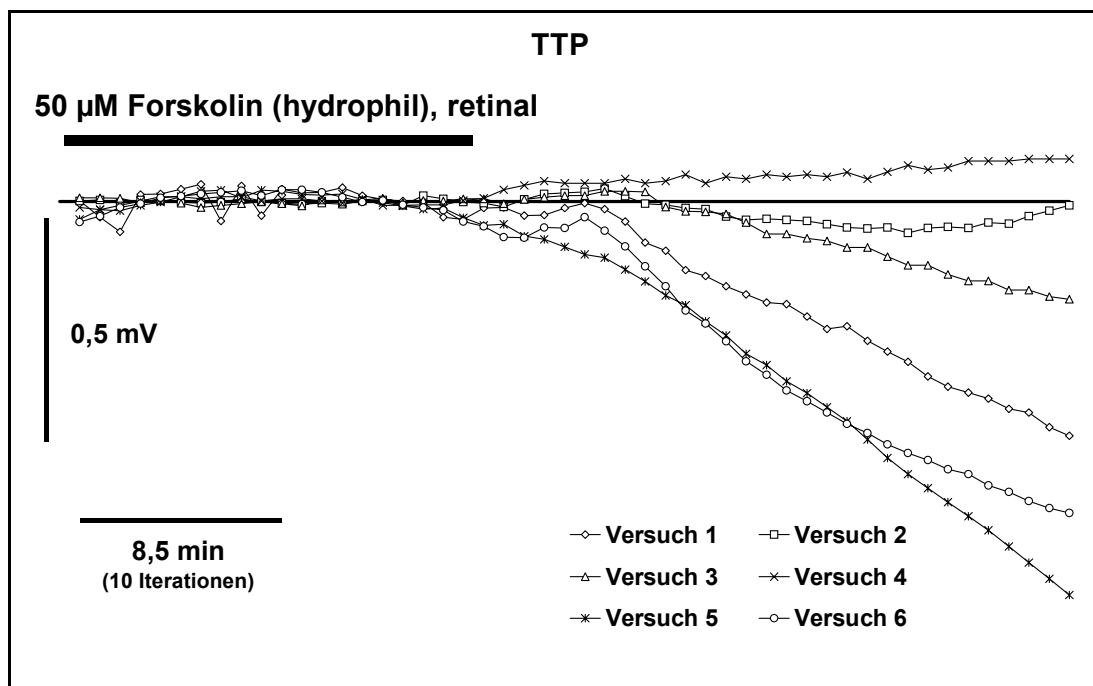


Abbildung F.3 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In vier der sechs Versuche nahm das TTP nach der Beendigung der Behandlung deutlich ab.

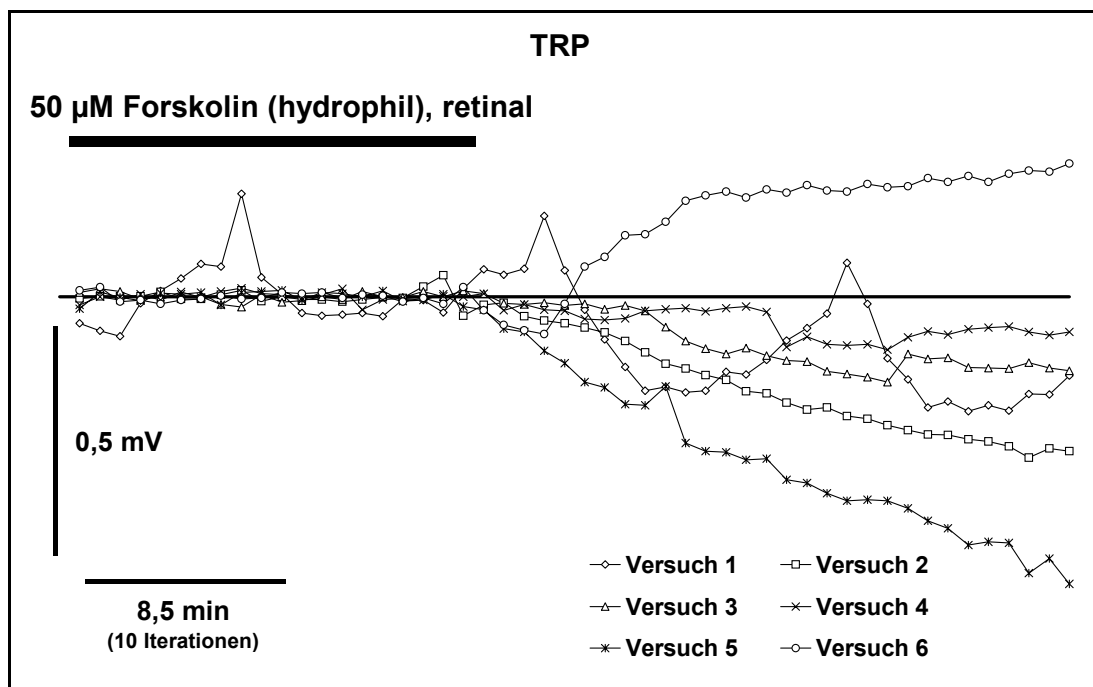


Abbildung F.4 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials (TRP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Auf das Ende der Behandlung reagierte das TRP, mit Ausnahme von Versuch 1, mit einer Abnahme.

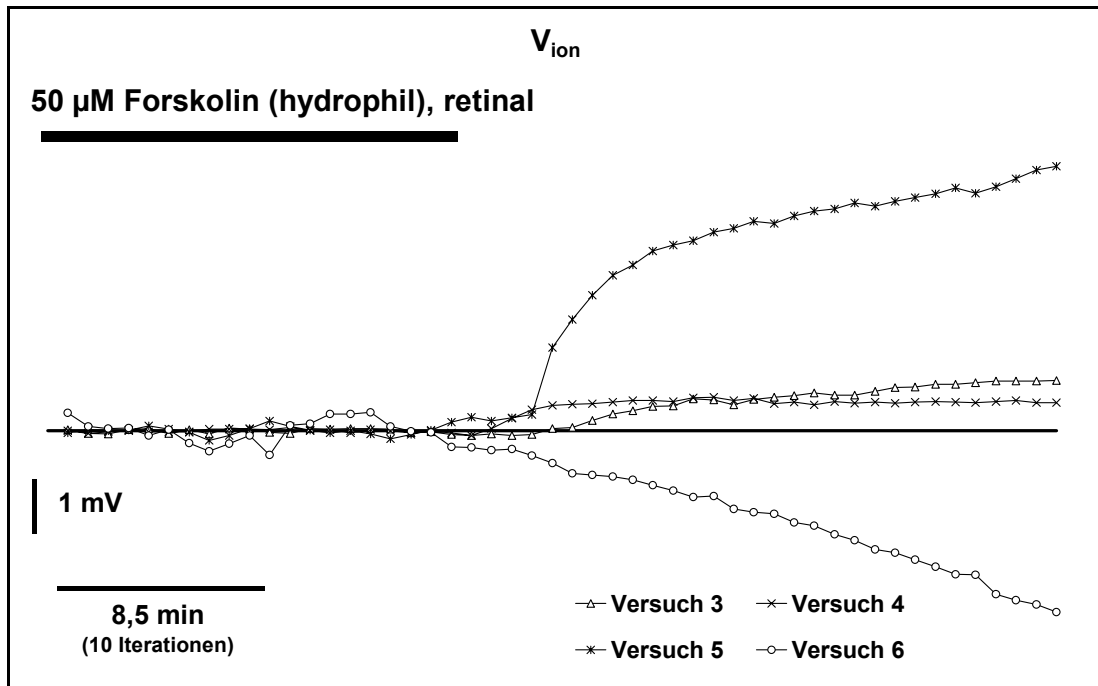


Abbildung F.5 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In drei von vier Versuchen ist ein Anstieg nach dem Behandlungsende erkennbar.

b) Behandlung von der choroidalen Seite des Präparats

Die Behandlung mit hydrophilem Forskolin von der choroidalen Seite des Präparats (4 Versuche) führte zu folgenden Veränderungen in den Bestandspotenzialen: Das TTP ging nach Beginn der Behandlung zurück (Abbildung F.6). Dieser Rückgang wurde durch das Absinken des TRPs verursacht (Abbildung F.7). Das TEP reagierte nicht (Abbildung F.8). Die extrazelluläre Kalzium-Konzentration (V_{ion}) verringerte sich (Abbildung F.9). Nach Behandlungsende stieg das TTP wieder an (Abbildung F.10), da sowohl das TRP wie das TEP zunahm (Abbildung F.11 und Abbildung F.12). In drei Versuchen erhöhte sich die Konzentration von extrazellulären Kalzium nach dem Absetzen von Forskolin wieder (Abbildung F.13).

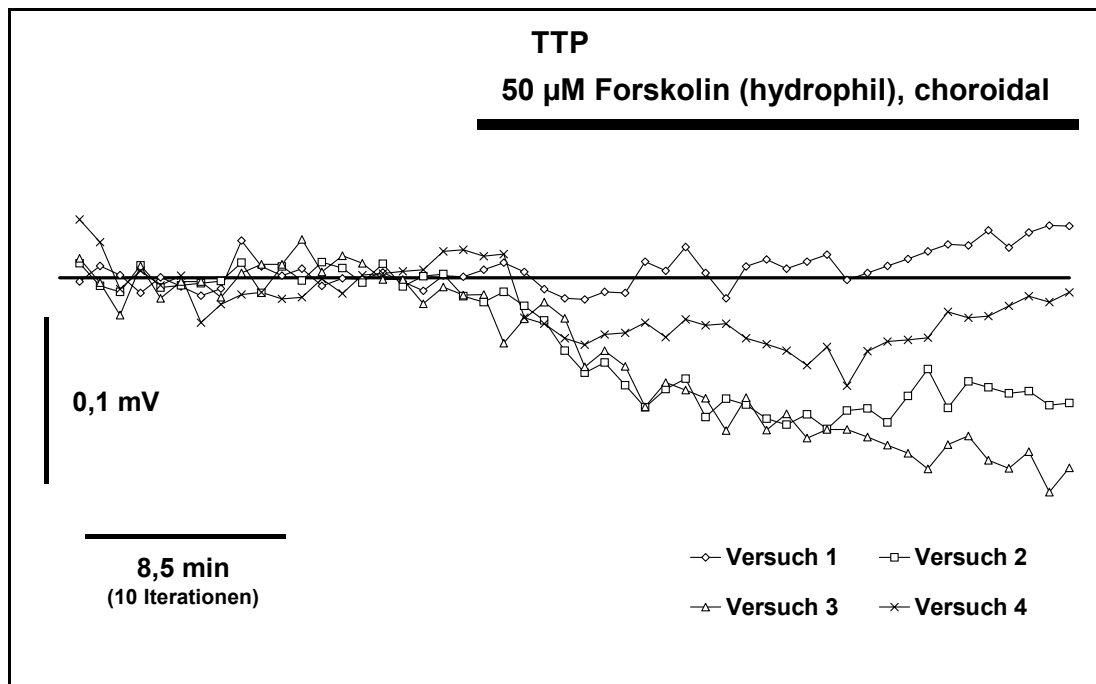


Abbildung F.6 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) von der choroidalen Seite des Präparats, in drei Versuchen kam es zu einer Abnahme des TTPs wenige Minuten nach Beginn der Behandlung.

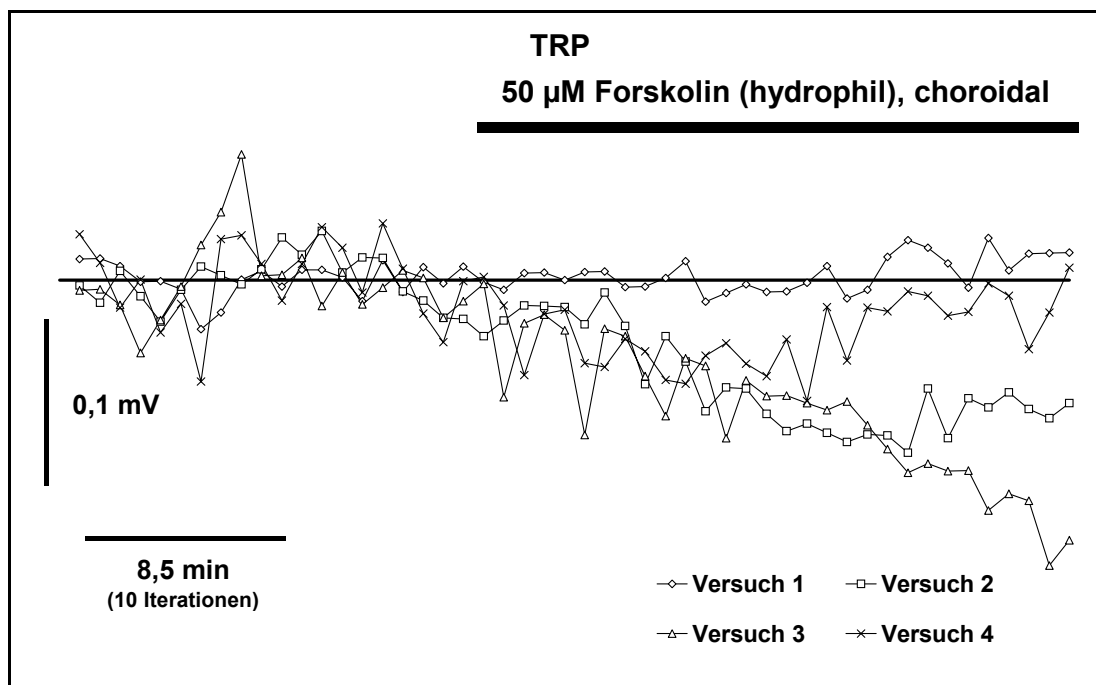


Abbildung F.7 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials (TRP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) von der choroidalen Seite des Präparats, in drei von vier Versuchen fiel das TRP nach Beginn der Behandlung ab.

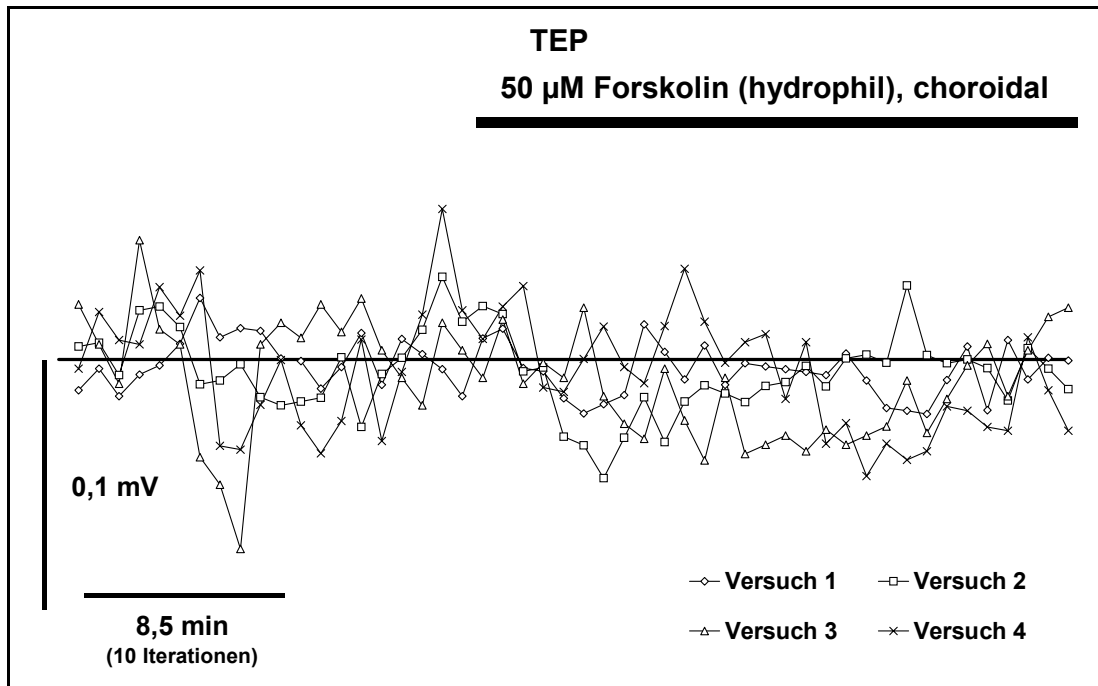


Abbildung F.8 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) von der choroidalen Seite des Präparats.

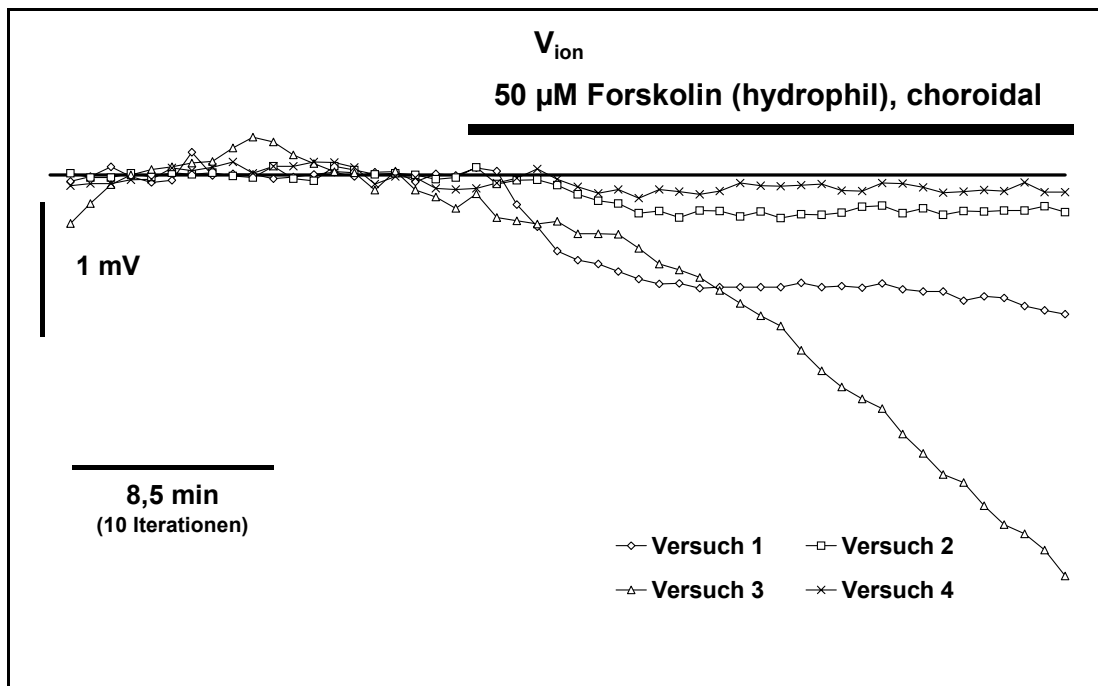


Abbildung F.9 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitive Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) von der choroidalen Seite des Präparats. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration verringerte sich nach Beginn der Behandlung.

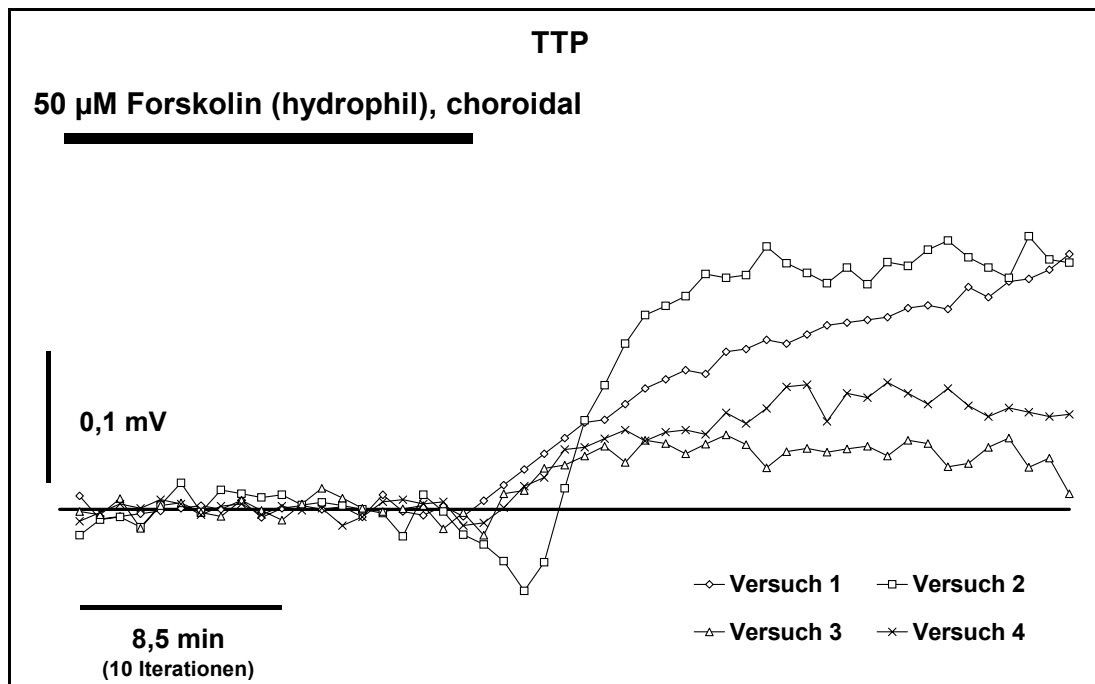


Abbildung F.10 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TTP stieg nach der Beendigung der Behandlung deutlich an.

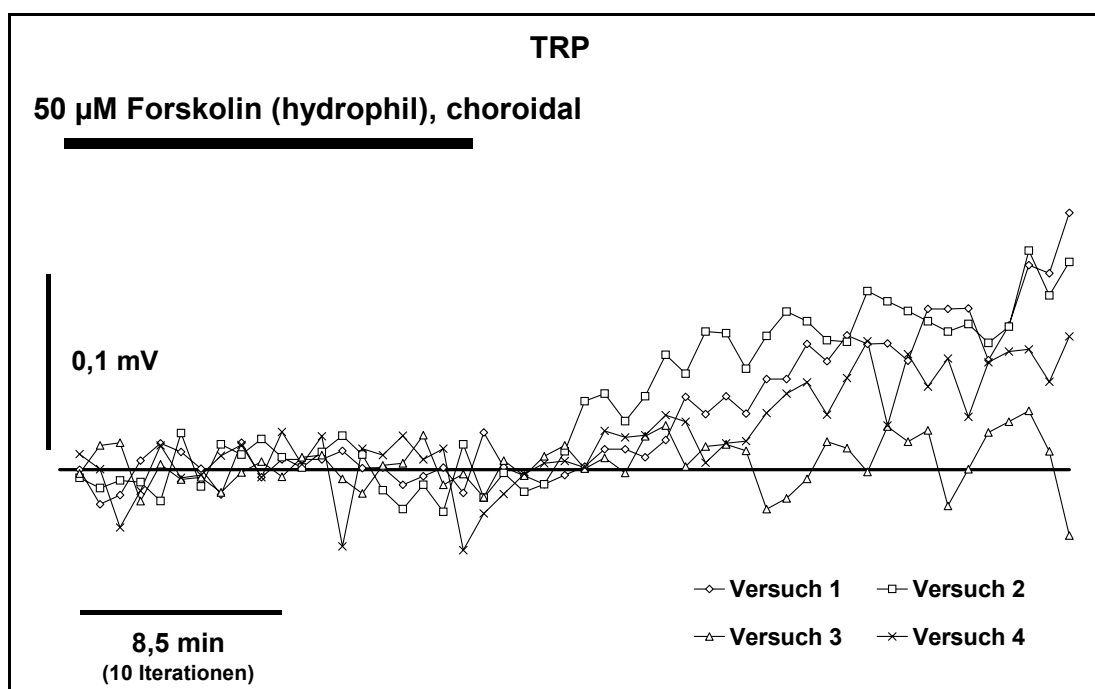


Abbildung F.11 Verlauf des transretinalen Bestandpotenzials (TRP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Nach dem Ende der Behandlung stieg das TRP, mit Ausnahme von Versuch 3, an.

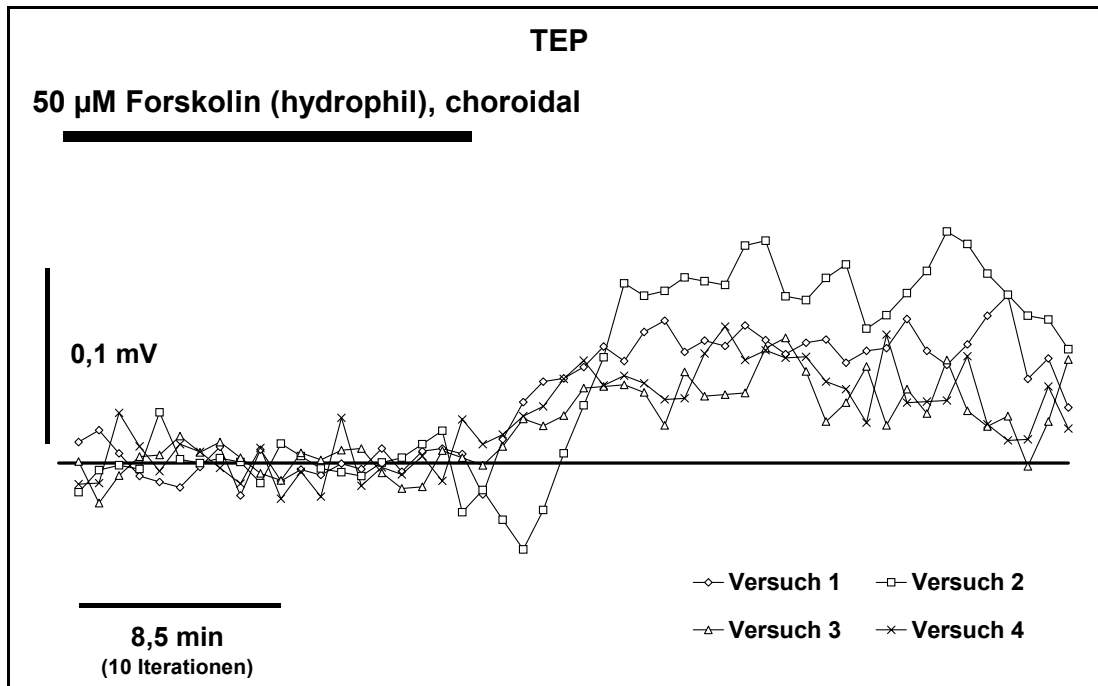


Abbildung F.12 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die Beendigung der Behandlung hatte einen deutlichen Anstieg des TEPs zur Folge.

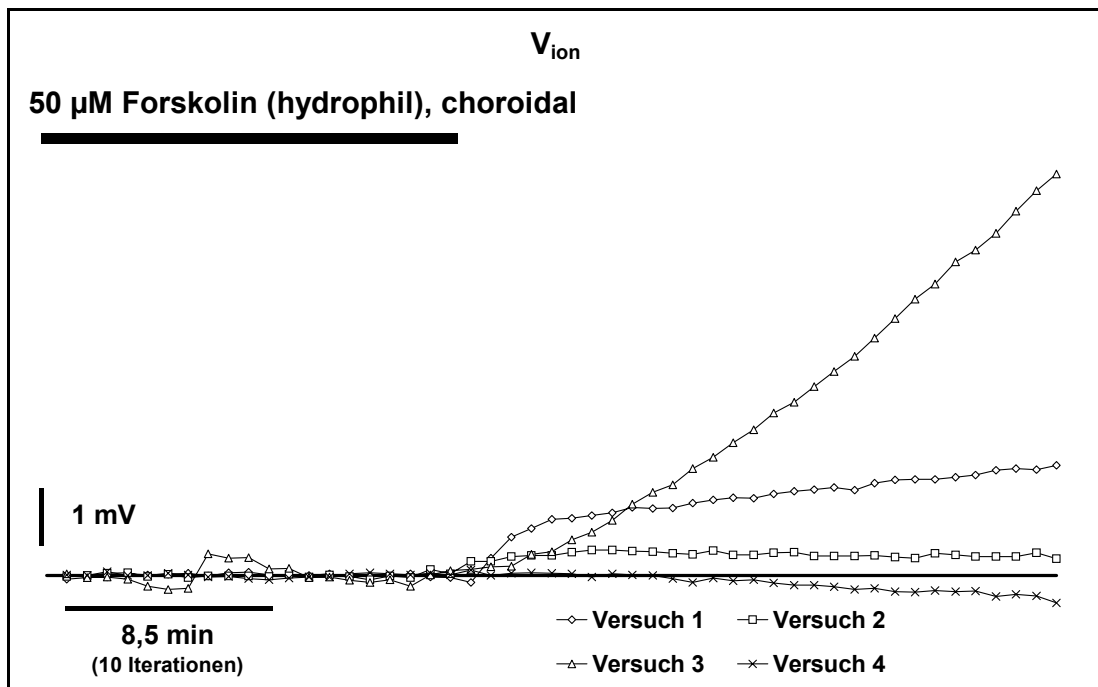


Abbildung F.13 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit hydrophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In drei von vier Versuchen ist ein Anstieg nach dem Behandlungsende erkennbar.

F.1.3.3 Effekte des hydrophilen Forskolins auf die lichtinduzierten Signale des Präparats

a) Änderungen im *in vitro* ERG und seinen Komponenten

Der Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TRP über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I-VII, s. o. für Erläuterungen) wird für den Versuchsansatz mit der Behandlung von der retinalen Seite des Präparats in den Abbildungen (Abbildung F.14 bis Abbildung F.16) wiedergegeben. Außerdem wird hier beispielhaft der Verlauf von V_{ion} an der kalzium-selektiven Elektrode während des Lichtreizes gezeigt (Abbildung F.17). Für den anderen Versuchsansatz (d. h. Behandlung von der choroidalen Seite) ist die Entwicklung über die Versuchsphasen nur für das Gesamt-ERG (TTP) dargestellt (Abbildung F.18). Teil B jeder Abbildung zeigt die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial. Die Darstellungen der vollständigen Aufzeichnungen sollen einen Überblick über den Versuchsverlauf ermöglichen und Hinweise auf durch die Behandlung verursachte Veränderungen geben. Auf die Beschreibung der in diesen Abbildungen erkennbaren Veränderungen wird hier verzichtet, da diese in den unten dargestellten Differenzen der Amplituden deutlicher hervortreten.

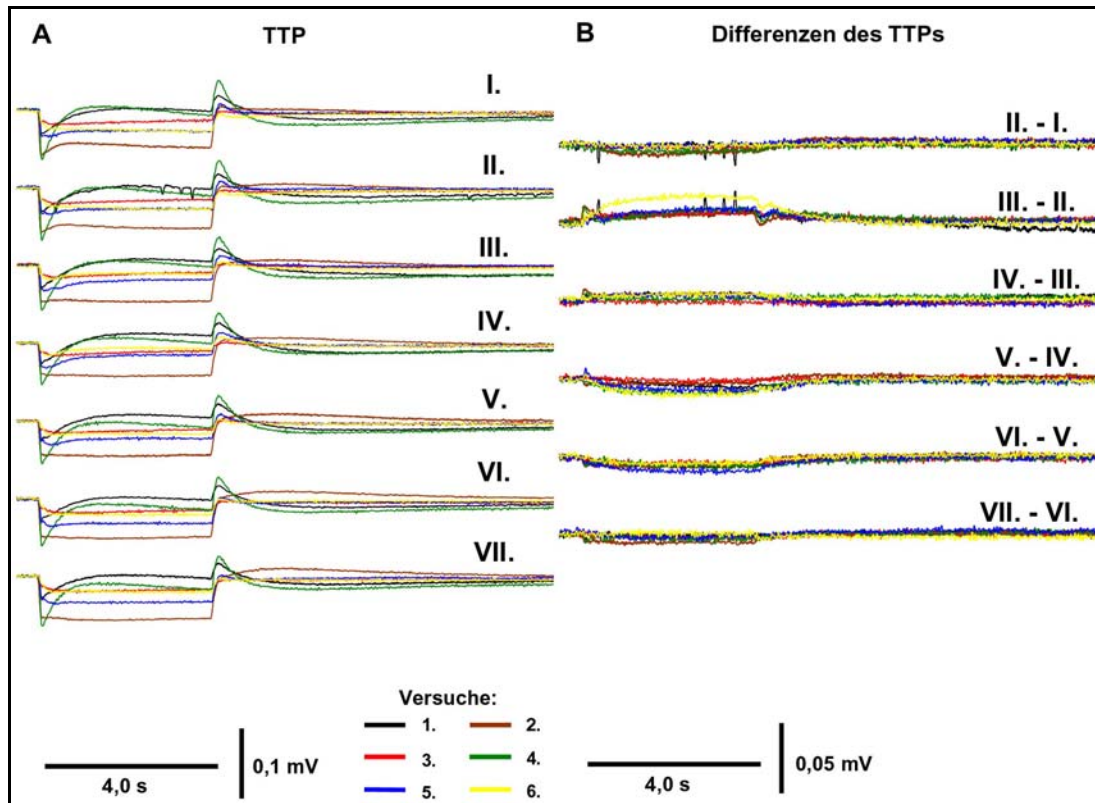


Abbildung F.14 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar, z. B. ein Anstieg der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.).

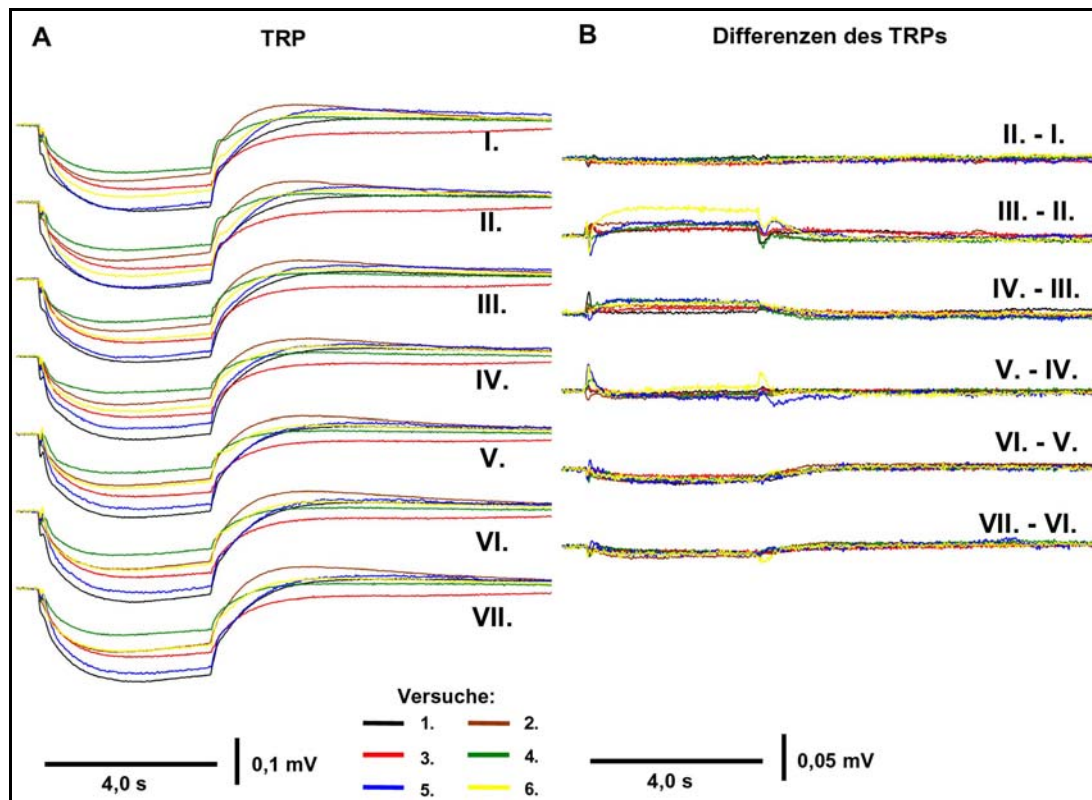


Abbildung F.15 **A (linke Hälfte):** TRPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar, z. B. den Anstieg der Amplitude der Komponente der c-Welle des TRPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.).

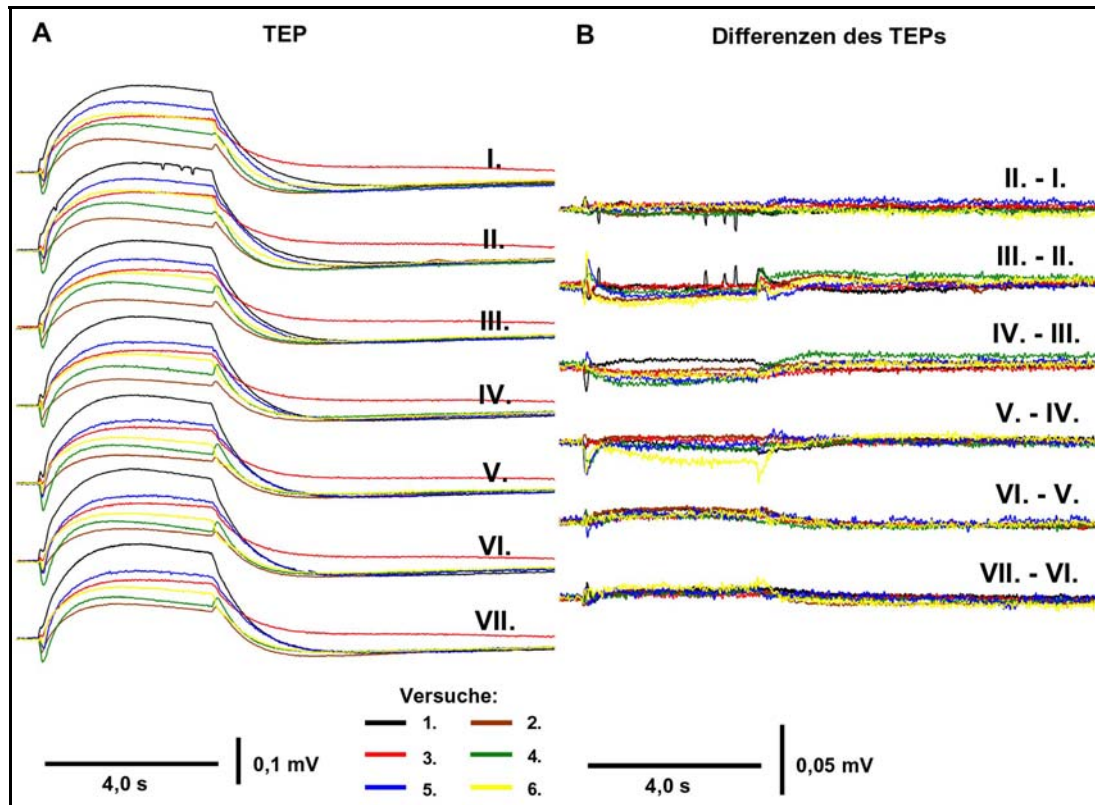


Abbildung F.16 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 6 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar.

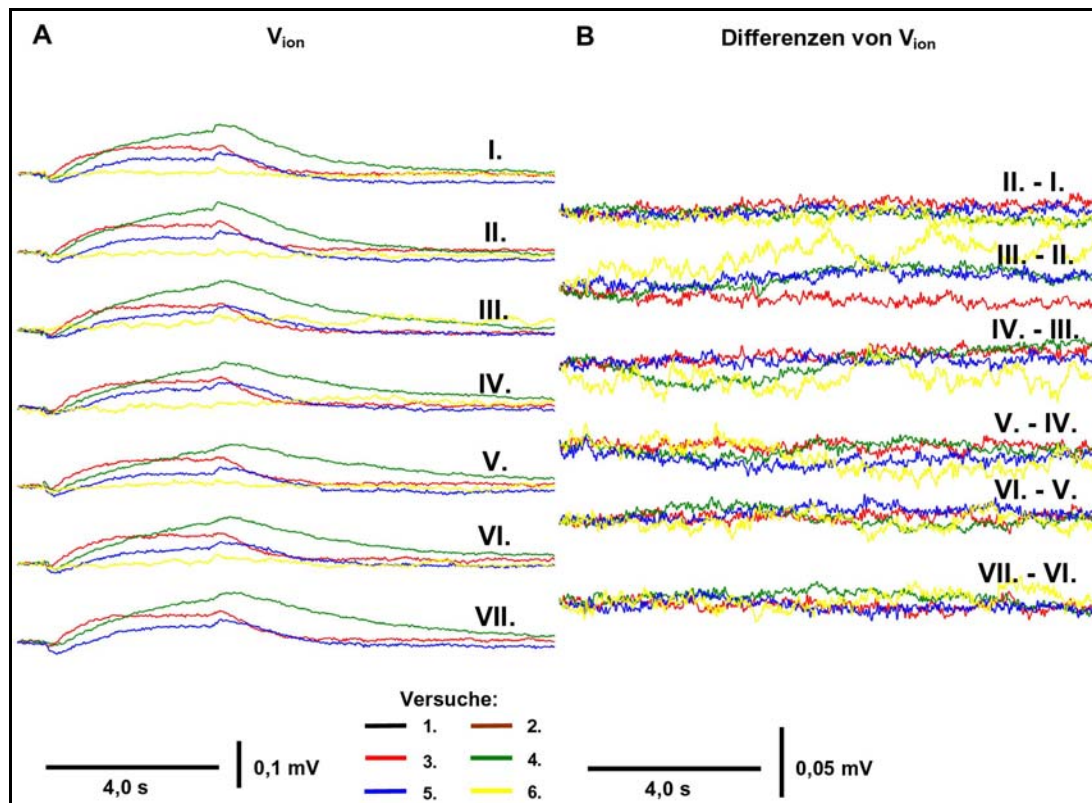


Abbildung F.17 A (linke Hälfte): Die Aufzeichnungen von V_{ion} als Indikator für die extrazelluläre Kalziumkonzentration aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit hydrophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Darstellung von V_{ion} in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den Aufzeichnungen von V_{ion} der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, in diesem Fall werden keine einheitlichen Veränderungen zwischen den einzelnen Phasen sichtbar.

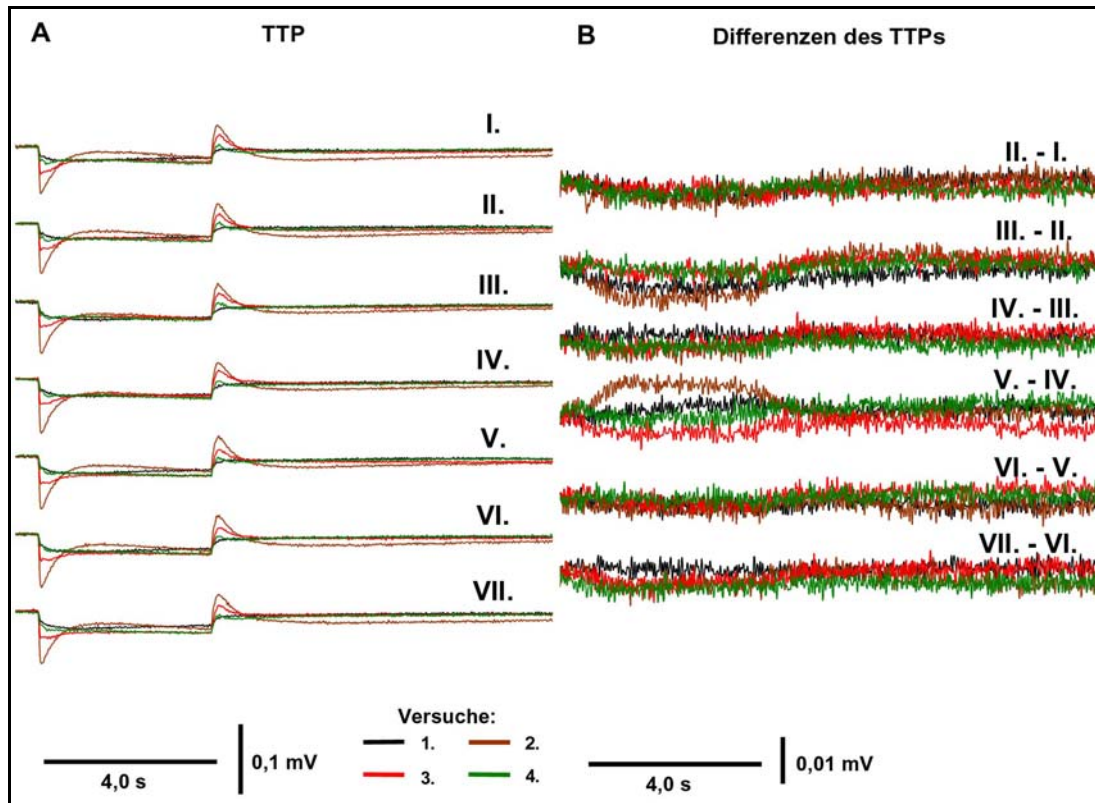


Abbildung F.18 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen das Präparat von der **choroidalen** Seite mit hydrophilem Forskolin (50 μ M) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment machen auch kleinere Veränderungen zwischen den Phasen sichtbar, z. B. eine Abnahme der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.).

b) Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden

Wegen der oft großen Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Darstellung der Amplituden selbst verzichtet. Stattdessen wurden ihre Veränderungen in Bezug auf Versuchsphase II (Kontrolle, 5 min vor Beginn der Behandlung) berechnet (für Details s. Kapitel E.2.2.2: Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden bei ATP-Behandlung). Diese werden in den folgenden Abbildungen wiedergegeben (Abbildung F.19 bis Abbildung F.32).

Behandlung von der retinalen Seite des Präparats

Während der retinalen Behandlung des Präparats mit hydrophilen Forskolin verringerten sich die Amplituden der a- und d-Welle gegenüber der Kontrollphase. Dieser im TTP deutlich erkennbare Effekt (Abbildung F.19 und Abbildung F.21) war auf das gleichzeitige Absinken der Komponenten beider Wellen im TRP zurückzuführen (Abbildung F.20 und Abbildung F.22). Die Amplitude der b-Welle stieg dagegen nach Beginn der Behandlung an (Abbildung F.23). In den meisten Fällen wurde dies durch eine entsprechende Abnahme der negativen Komponente des TEPs verursacht (Abbildung F.24).

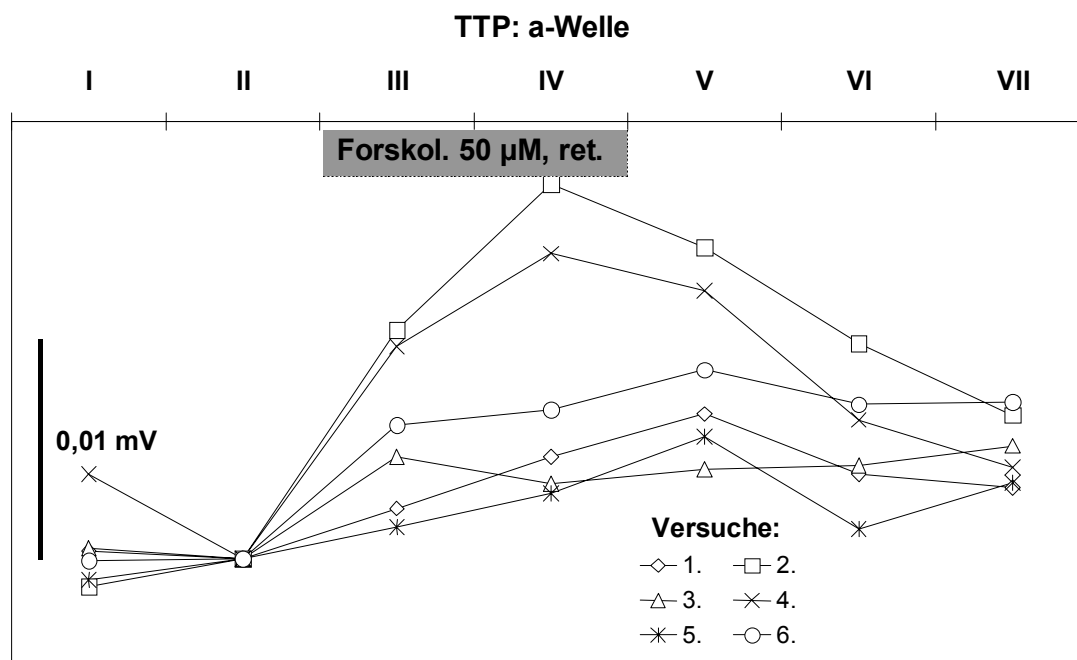


Abbildung F.19 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats sank die Amplitude teilweise deutlich ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang) und nahm nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) wieder zu.

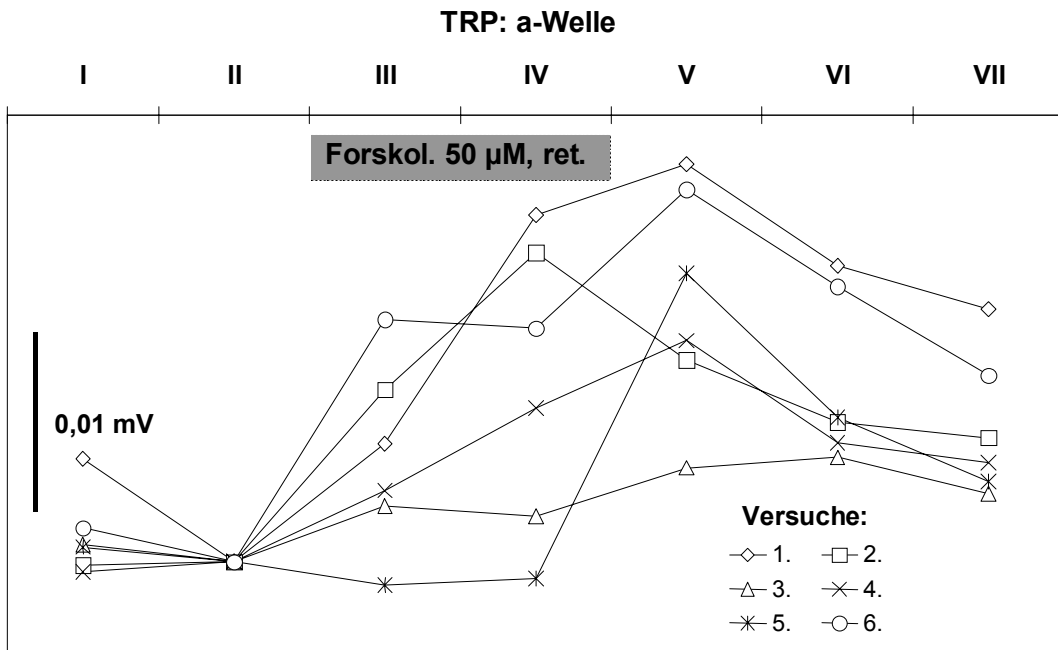


Abbildung F.20 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats sank die Amplitude in vier Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

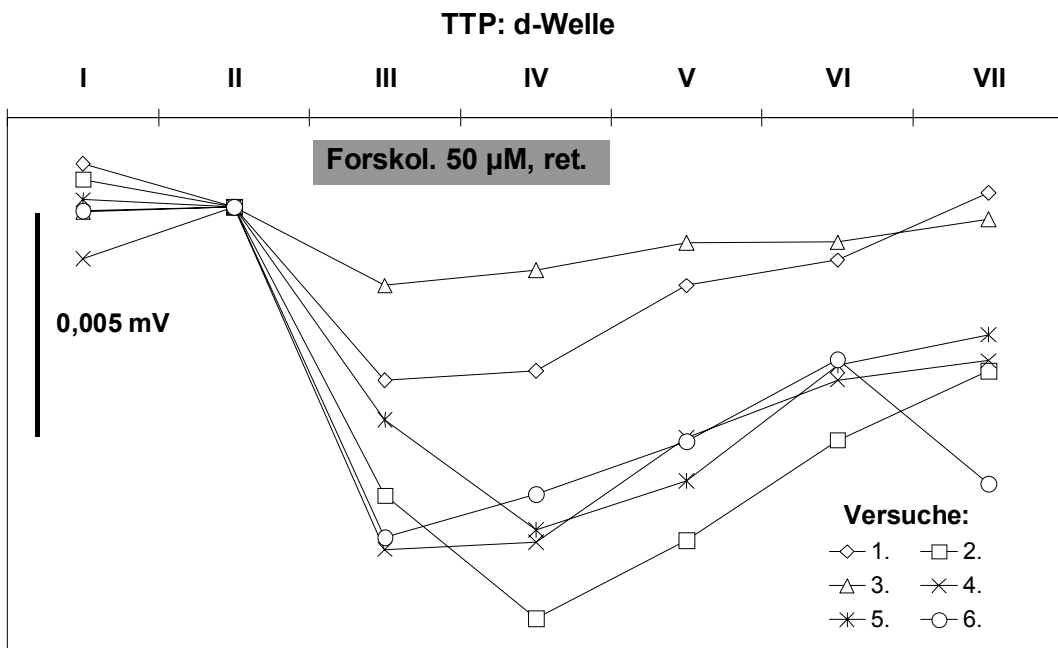


Abbildung F.21 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats kam es in allen sechs Versuchen zu einer Reduktion der Amplitude, die nach dem Ende der Behandlung (V bis VII) meist wieder kompensiert wurde.

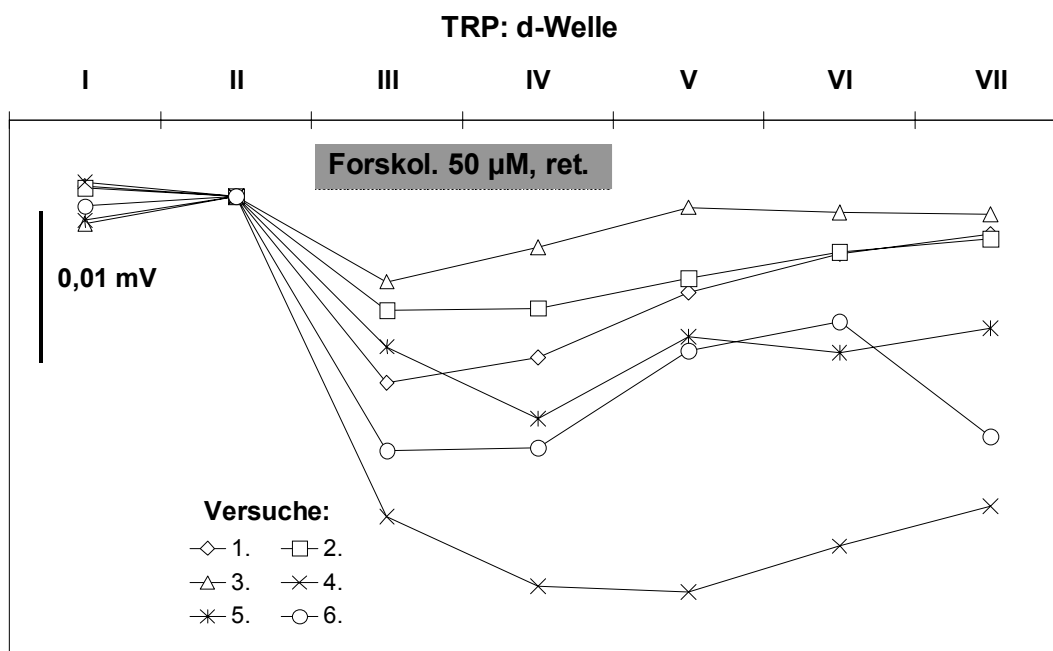


Abbildung F.22 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die negative Amplitude in allen Versuchen an (negative Differenz bei negativer Amplitude = Anstieg).

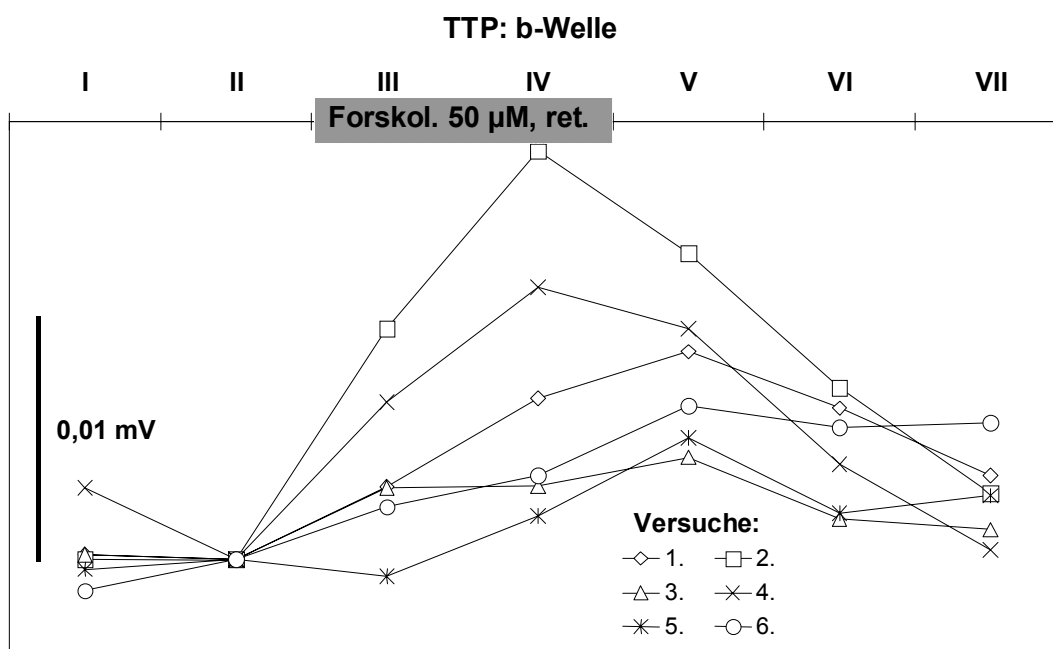


Abbildung F.23 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude an und nahm nach dem Ende der Behandlung wieder ab (V bis VII).

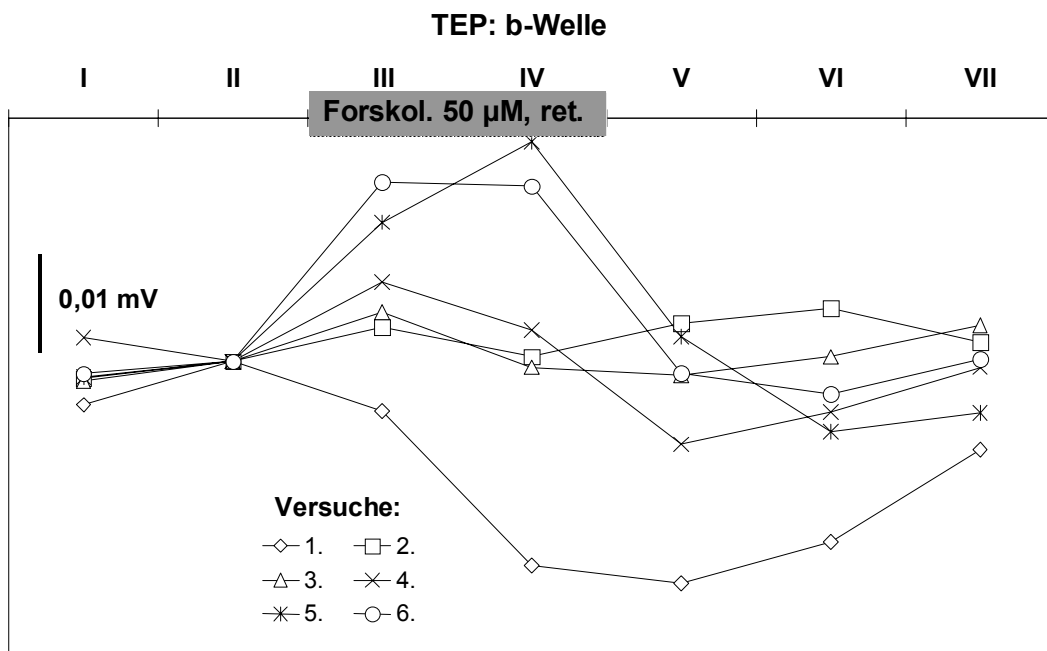


Abbildung F.24 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats sank die Amplitude in fünf Versuchen ab und nahm teilweise schon vor dem Ende der Behandlung wieder zu (IV bis VII, positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

Die langsame c-Welle zeigte im Zuge der retinalen Behandlung einen deutlichen Anstieg ihrer Amplitude (Abbildung F.25), der durch eine zeitgleiche Verringerung der negativen Komponente der c-Welle im TRP hervorgerufen wurde (Abbildung F.26). Die Amplitude ihrer positiven Komponente im TEP ging parallel dazu zurück (Abbildung F.27), allerdings ohne den im TRP beobachteten Effekt vollständig zu kompensieren. Alle oben beschriebenen Wirkungen auf die Amplituden ließen nach dem Ende der Behandlung nach, d. h. die Amplituden entwickelten sich in Richtung ihres Ausgangswerts (Versuchsphase II) zurück.

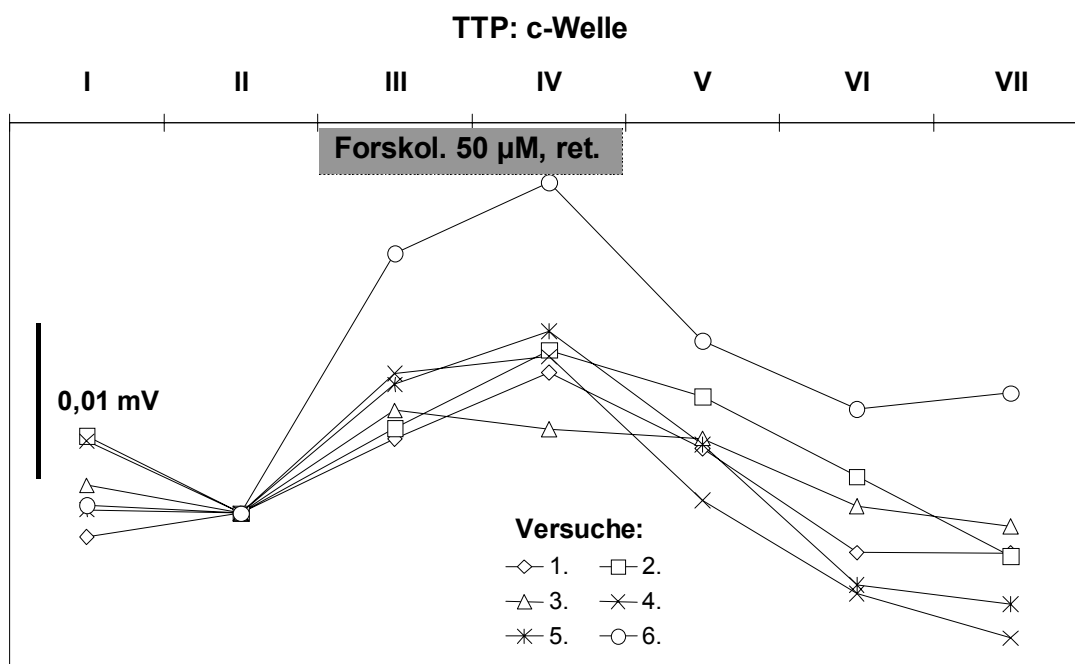


Abbildung F.25 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude der c-Welle deutlich an.

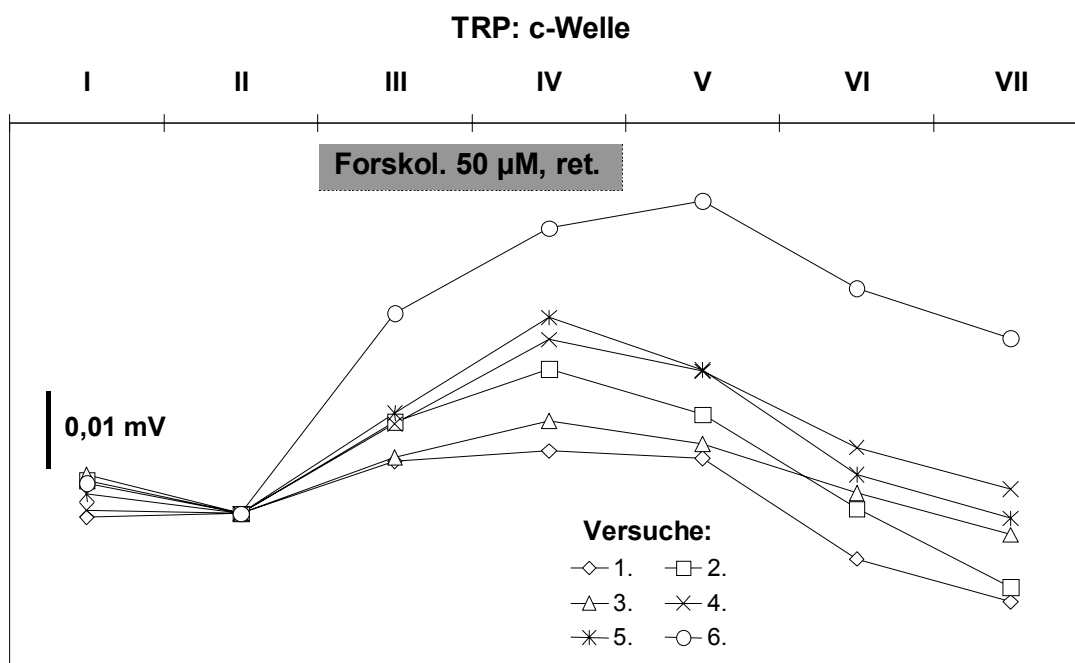


Abbildung F.26 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats nahm in allen Versuchen die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP ab (positive Differenz bei negativer Amplitude = Abnahme).

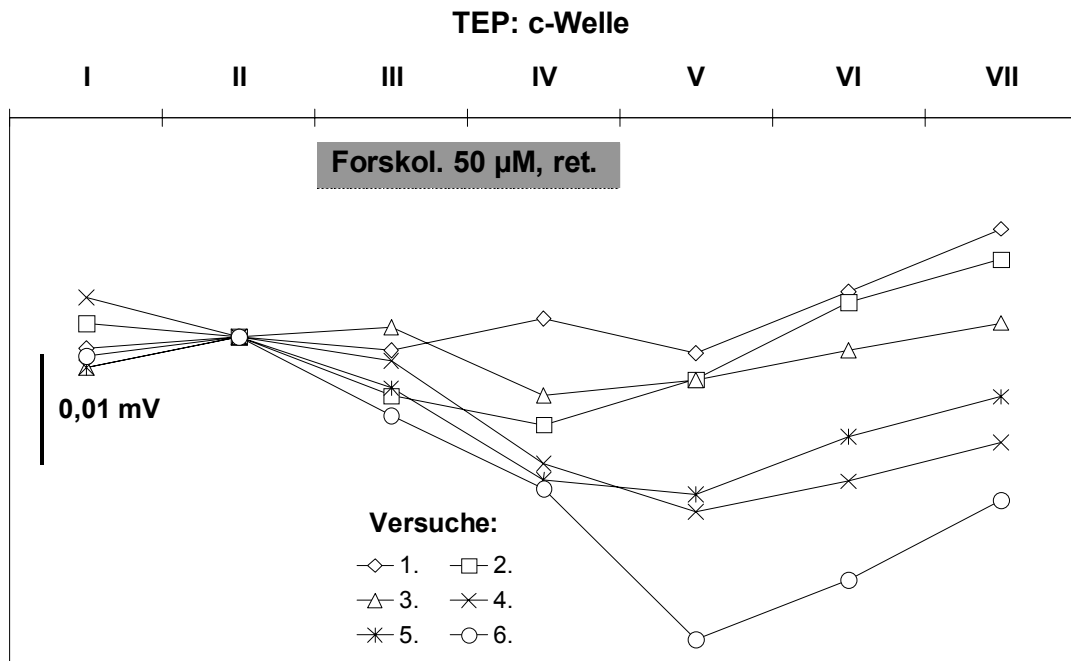


Abbildung F.27 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats nahm in vier Versuchen die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP ab.

Behandlung von der choroidalen Seite des Präparats

Die choroidale Behandlung mit hydrophilen Forskolin führte zu keinen eindeutigen Veränderungen der Amplituden von a-, b- und d-Welle (Abbildung F.28 bis Abbildung F.30). Die Amplitude der c-Welle nahm nach Beginn der choroidalen Behandlung ab (Abbildung F.31). Dieser Effekt war durch eine entsprechende Reduktion der Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP bedingt (Abbildung F.32). In drei von vier Versuchen konnte nach Beendigung der Behandlung eine rückläufige Entwicklung der Amplitude beobachtet werden (d. h. in Richtung des Ausgangswerts).

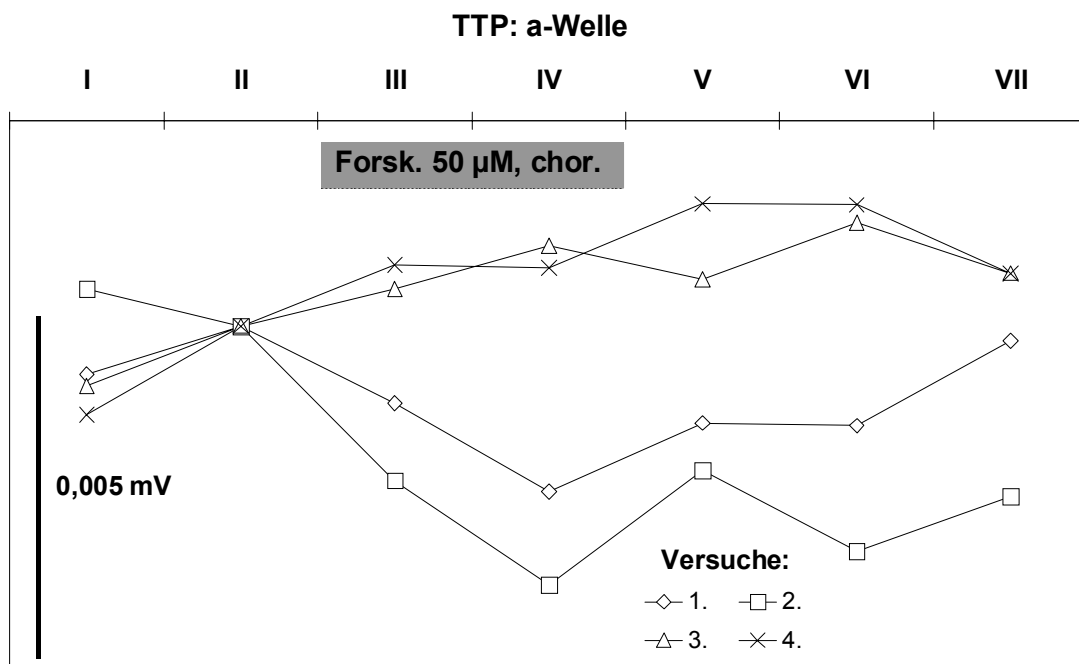


Abbildung F.28 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in zwei Versuchen leicht an (negative Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

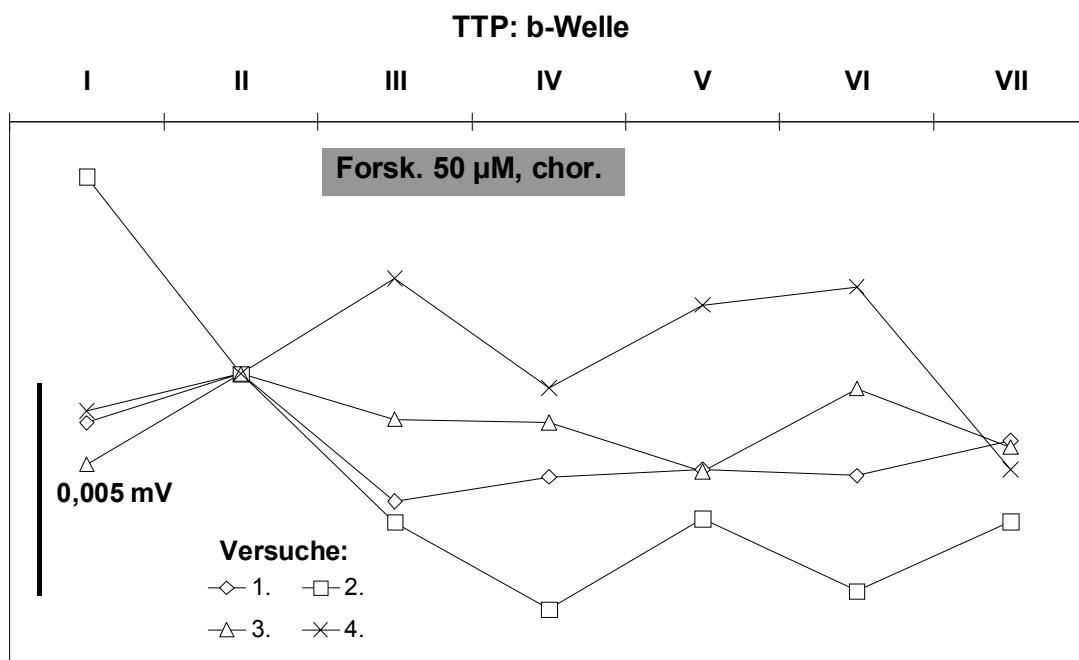


Abbildung F.29 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats traten keine eindeutigen Effekte auf.

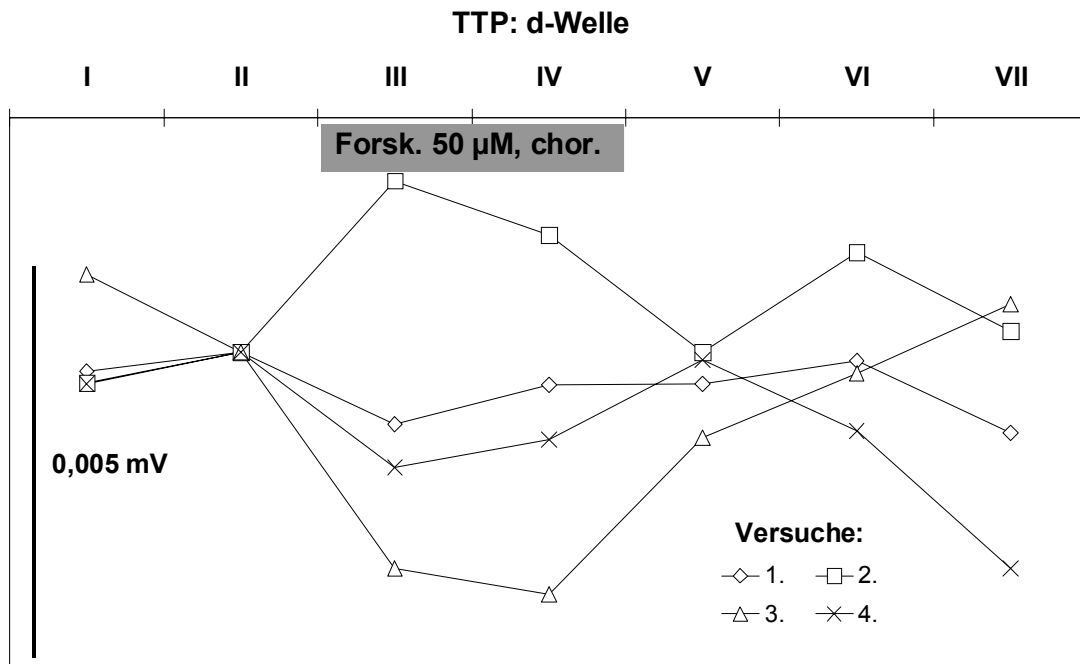


Abbildung F.30 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats veränderte sich die Amplitude im Versuch 1 nicht und in den drei übrigen Versuchen nur geringfügig und nicht einheitlich.

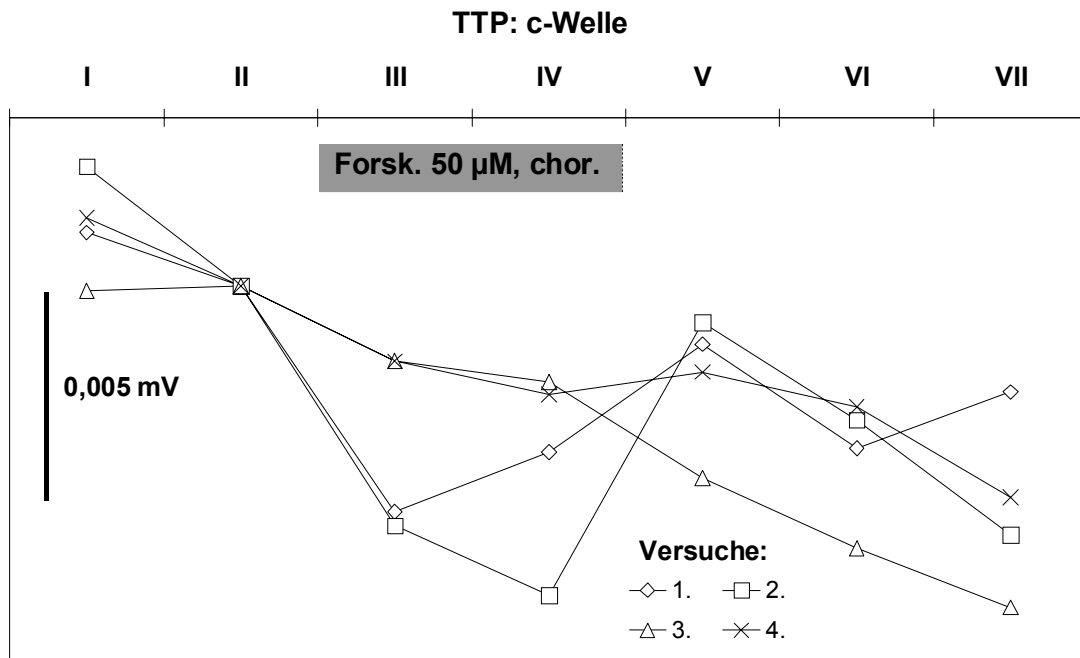


Abbildung F.31 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats fiel die Amplitude der c-Welle ab, in zwei Versuchen jedoch nur geringfügig.

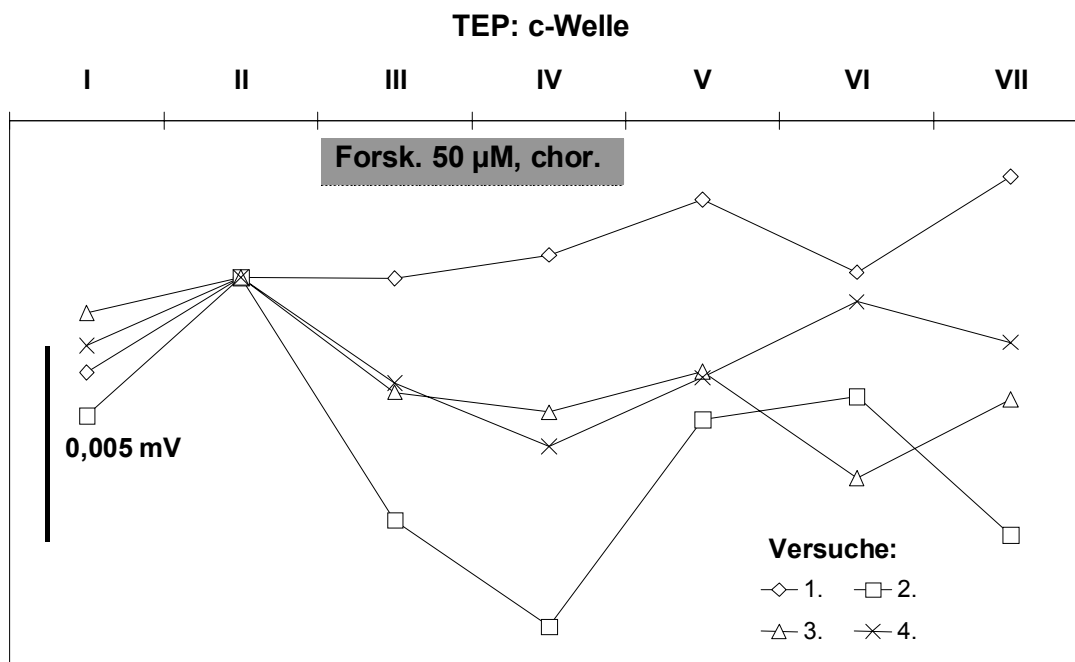


Abbildung F.32 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit hydrophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats nahm in drei Versuchen die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP ab.

F.1.4 Ergebnisse mit lipophilen Forskolin

F.1.4.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration

a) Behandlung von der retinalen Seite des Präparats

Zu Beginn der retinalen Behandlung mit lipophilen Forskolin sank das Gesamt-Bestandspotenzial (TTP) außer in einem Versuch zumindest vorübergehend ab (Abbildung F.33). In zwei von fünf Versuchen zeigte das TTP eine Oszillation, d. h. es stieg nach einem anfänglichen Rückgang wieder deutlich an. Da das TRP (Abbildung F.34) in allen Versuchen anstieg, war die kurzzeitige Abnahme des TTPs auf eine zeitgleiche Verringerung des TEPs (Abbildung F.35), die den Anstieg des TRPs übertraf, zurückzuführen. Die in zwei Versuchen aufgetretenen Oszillationen wurden ebenfalls durch das TEP verursacht, das in diesen beiden Fällen nach wenigen Minuten von einem abnehmenden in einen

ansteigenden Trend wechselte. Der Beginn der Behandlung führte zu keinen einheitlichen Veränderungen in V_{ion} für Kalzium, d. h. der extrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung F.36).

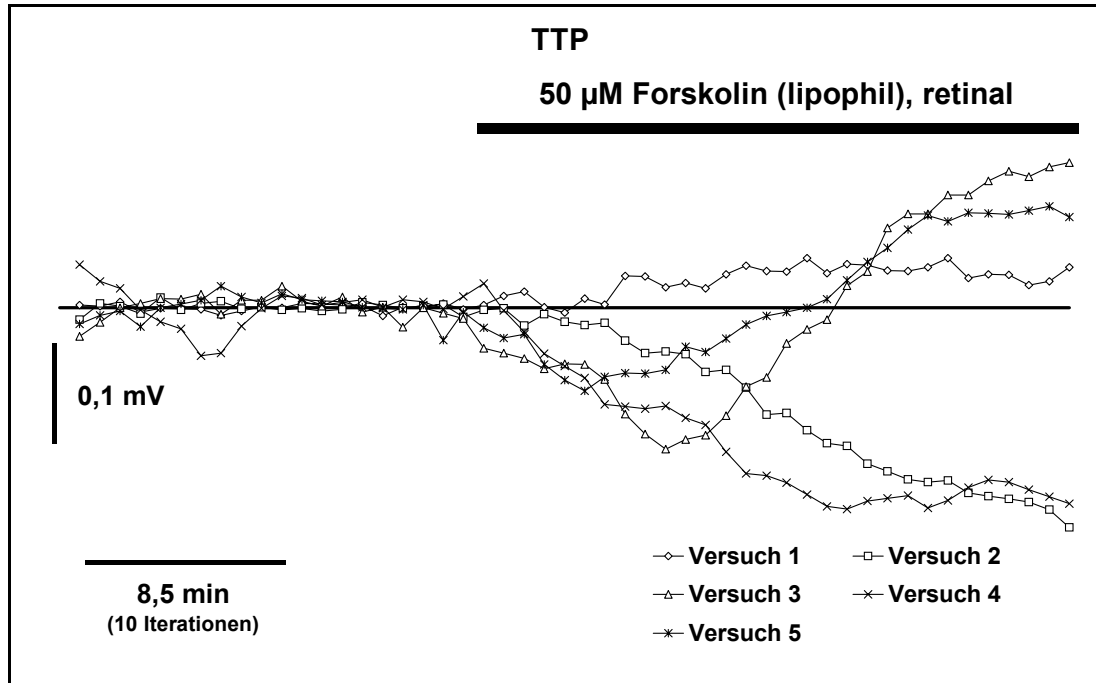


Abbildung F.33 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats, in drei Versuchen kam es zu einer Abnahme des TTPs wenige Minuten nach Beginn der Behandlung.

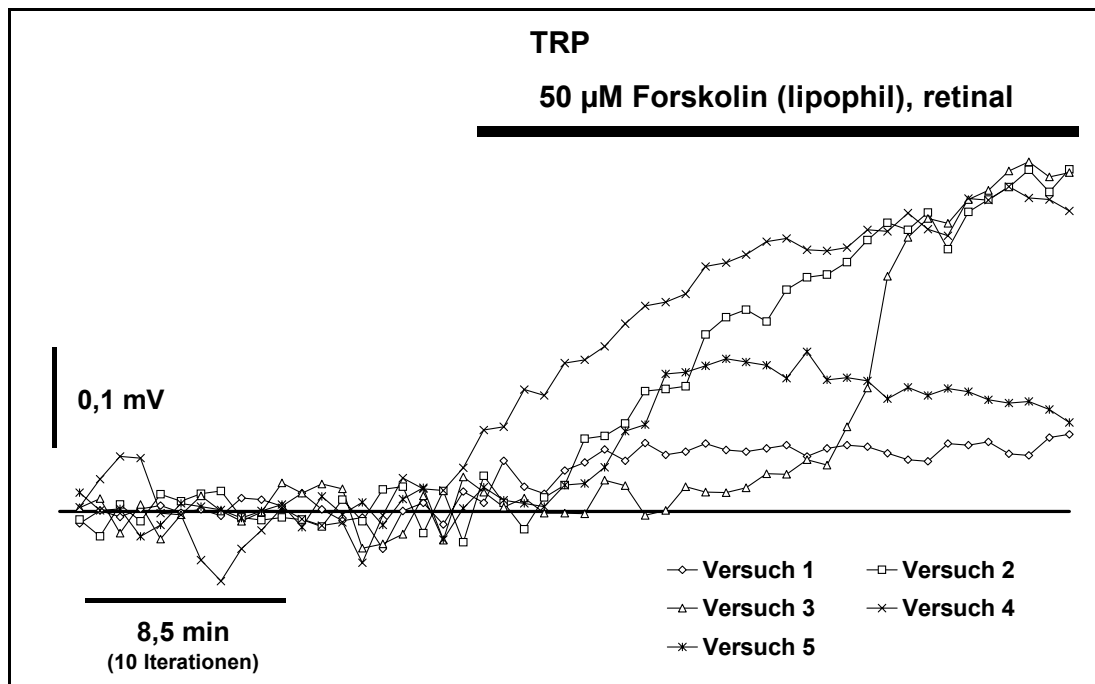


Abbildung F.34 Verlauf des transretinalen Bestandpotenzials (TRP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μ M) von der retinalen Seite des Präparats, das TRP nahm nach Beginn der Behandlung deutlich zu.

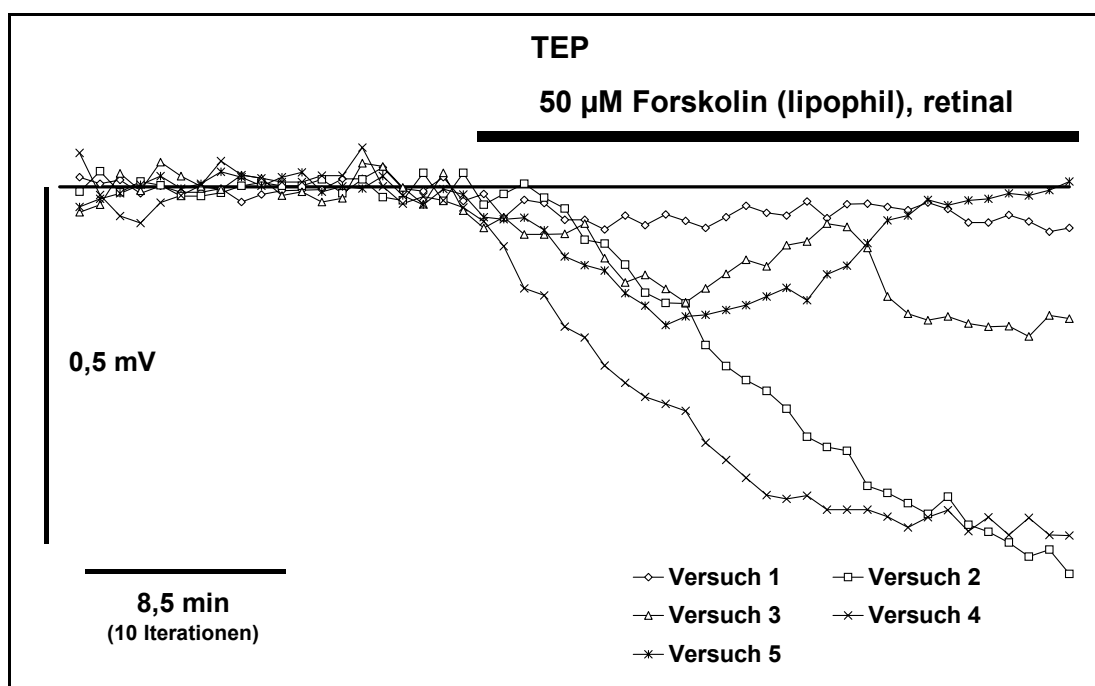


Abbildung F.35 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μ M) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar ist ein Rückgang (zumindest vorübergehend) des TEPs nach Beginn der Behandlung.

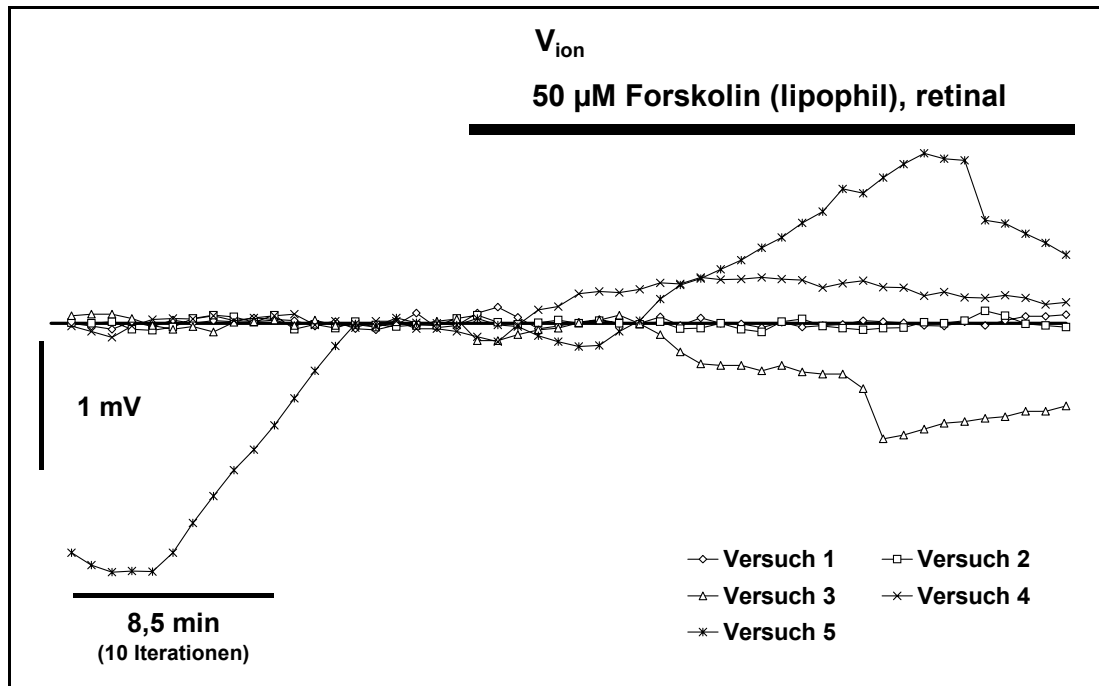


Abbildung F.36 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μ M) von der retinalen Seite des Präparats. Es zeigten sich keine einheitlichen Veränderungen in V_{ion} .

Nach dem Ende der retinalen Behandlung nahm das TTP in allen Versuchen deutlich zu (Abbildung F.37). Das TRP ging jedoch mit Ausnahme eines Versuchs zurück (Abbildung F.38). Die Zunahme des TTP wurde durch den anhaltenden Rückgang des TEPs nach Absetzen der retinalen Behandlung in allen Versuchen hervorgerufen (Abbildung F.39). Die extrazelluläre Kalziumkonzentration stieg im selben Zeitraum an (Abbildung F.40).

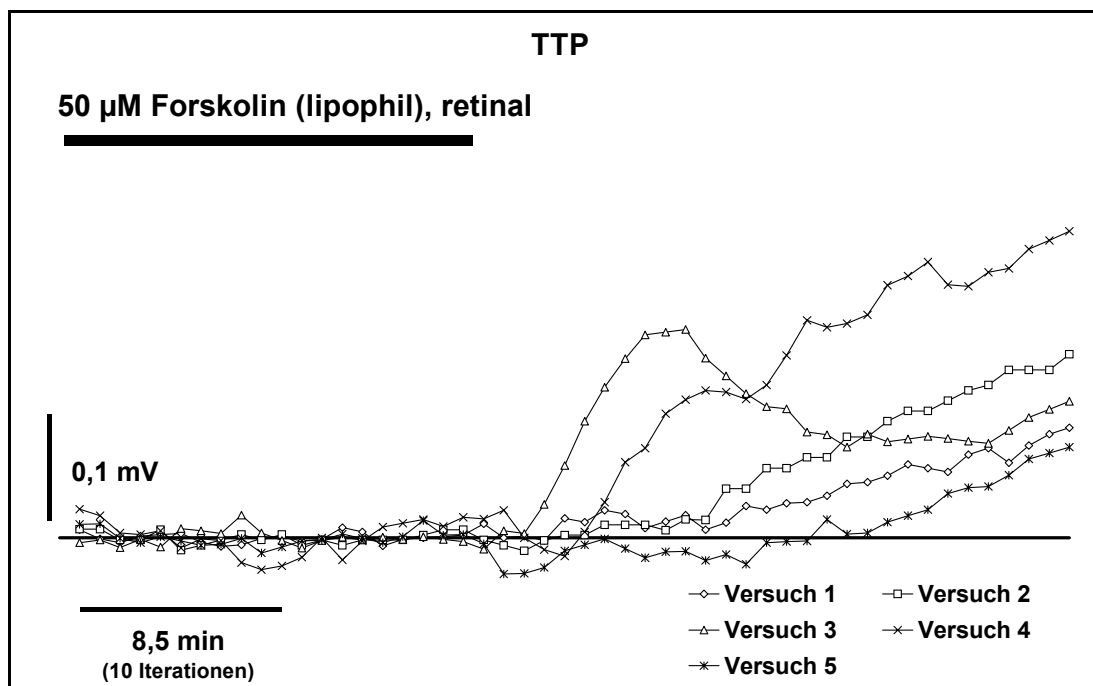


Abbildung F.37 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In allen Versuchen nahm das TTP nach der Beendigung der Behandlung deutlich zu.

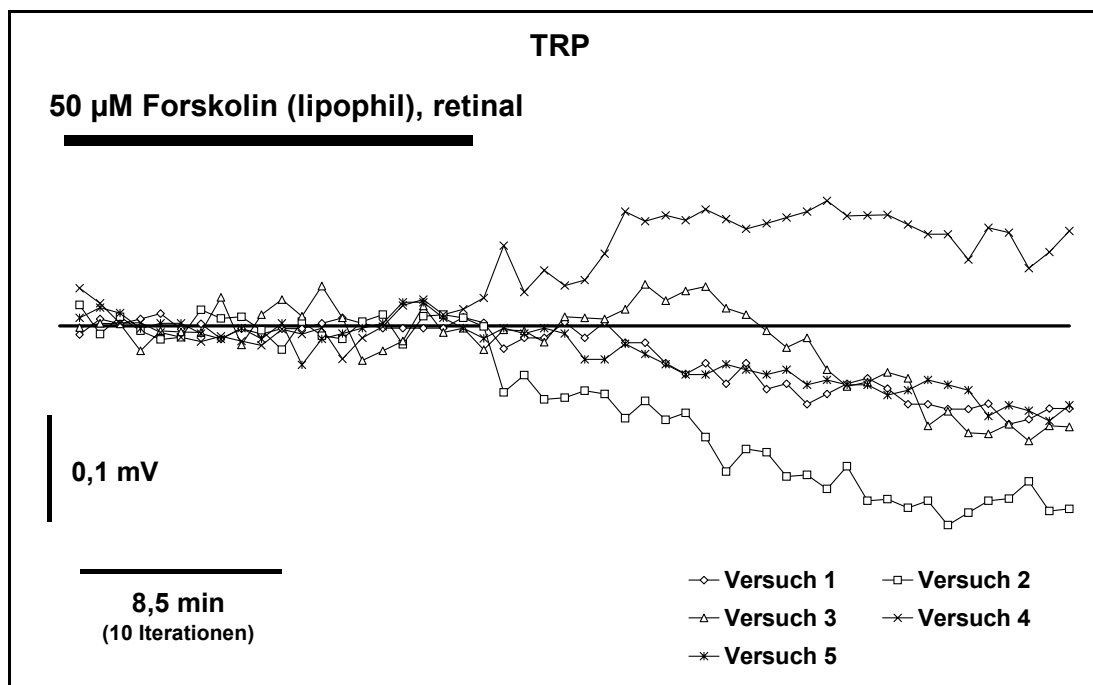


Abbildung F.38 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials (TRP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TRP ging nach Ende der Behandlung, mit Ausnahme von Versuch 4, zurück.

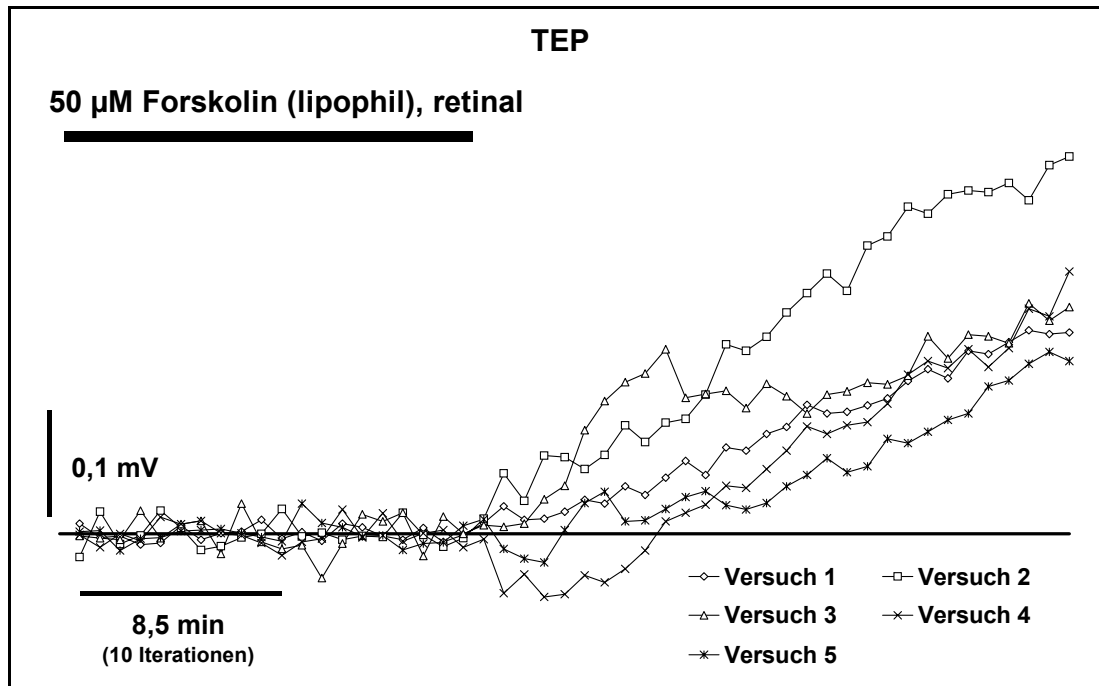


Abbildung F.39 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die Beendigung der Behandlung hatte eine deutliche Zunahme des TEPs zur Folge.

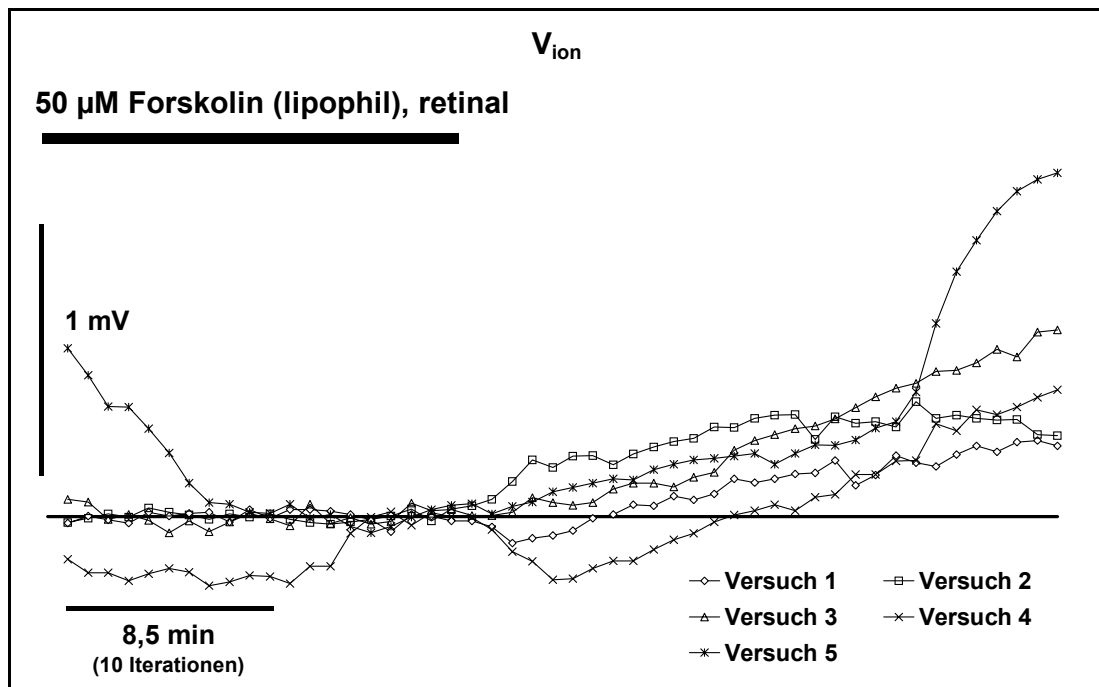


Abbildung F.40 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitive Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In allen Versuchen ist spätestens 10 min nach dem Behandlungsende ein Anstieg erkennbar.

b) Behandlung von der choroidalen Seite des Präparats

Die choroidale Behandlung mit lipophilen Forskolin führte ebenfalls zu einem Rückgang des Gesamt-Bestandspotenzial (TTP), der in zwei Versuchen allerdings nur vorübergehend war, da er von einem raschen Anstieg abgelöst wurde, d. h. es trat in diesen Experimenten eine Oszillation auf (Abbildung F.41). Auch bei der choroidalen Behandlung mit Forskolin war für den Verlauf des TTPs nach Beginn der Behandlung eine gleichartige Veränderung des TEPs verantwortlich (Abbildung F.42). Das TRP verhielt sich in den fünf Versuchen unterschiedlich und beeinflusste das TTP nur geringfügig quantitativ (keine Abbildung). Die Konzentration von extrazellulärem Kalzium veränderte sich nach dem Einsetzen der choroidalen Behandlung nur uneinheitlich (keine Abbildung).

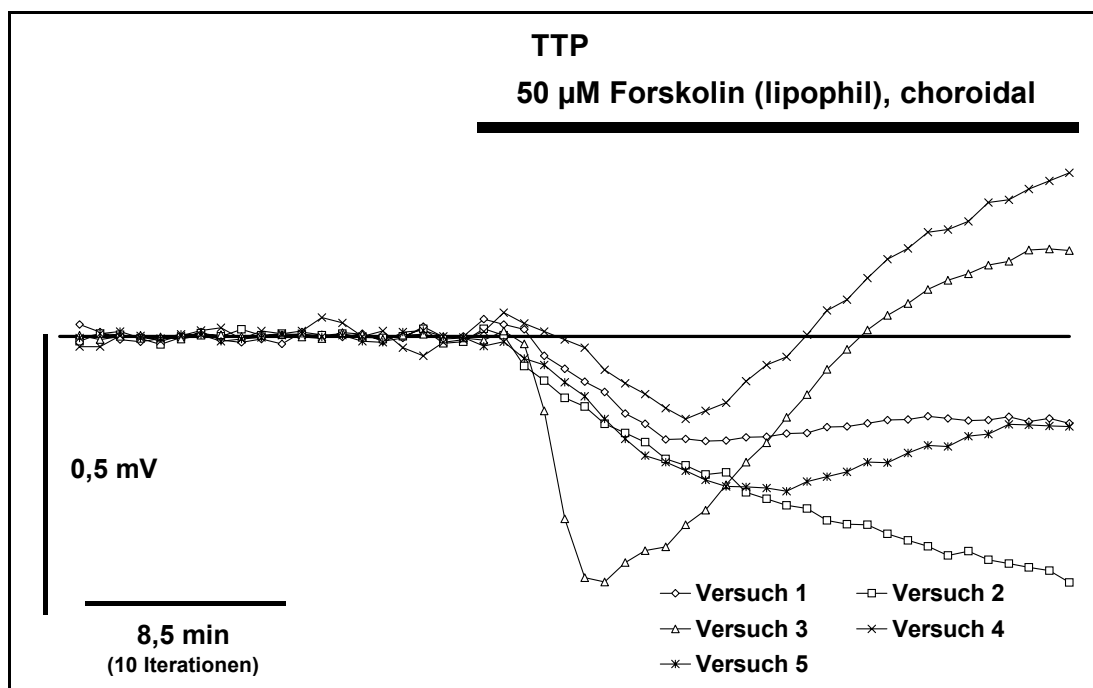


Abbildung F.41 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 µM) von der choroidalen Seite des Präparats, in allen Versuchen kam es zu einer Abnahme des TTPs nach Beginn der Behandlung, in zwei Versuchen jedoch nur vorübergehend, da in diesen eine Oszillation auftrat, die sich in einem raschen Wiederanstieg des TTPs manifestierte.

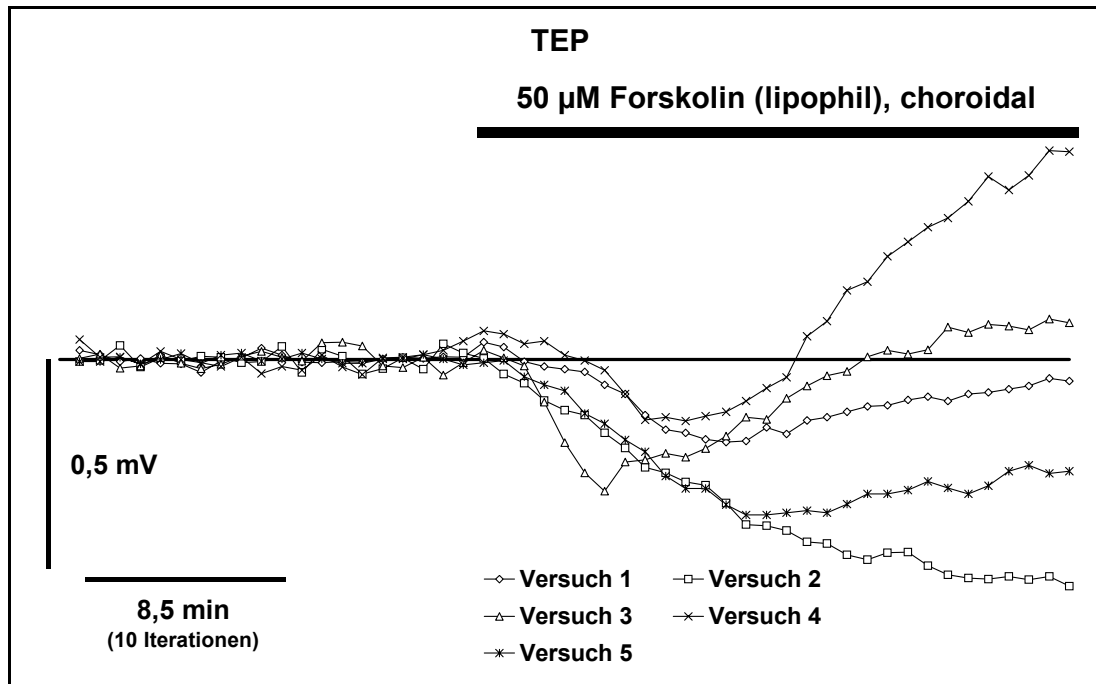


Abbildung F.42 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 µM) von der choroidalen Seite des Präparats. Nach Beginn der Behandlung nahm das TEP in allen Versuchen ab, in drei Versuchen jedoch nur vorübergehend, da ein rascher Wiederanstieg folgte (Oszillation des TEPs).

Auf das Ende der choroidalen Behandlung folgte in allen Versuchen ein deutlicher Anstieg des TTPs. In den beiden Versuchen, in denen bereits nach Beginn der Behandlung Oszillationen aufgetreten waren, entwickelten sich erneut welche. Allerdings war der Rückgang des TTPs in beiden Fällen nur vorübergehend, so dass das TTP nicht unter seinen Ausgangswert fiel (Abbildung F.43). Die dominierende Komponente war wiederum das TEP, auf dessen Verlauf (Anstieg und Oszillation) auf die im TTP beobachteten Veränderungen zurückging (Abbildung F.44). Das TRP reagierte unterschiedlich auf die Beendigung der Forskolin-Behandlung (Abbildung F.45). Seine Entwicklung wirkte sich nur unwesentlich auf das TTP aus, da die Änderungen des TEPs im Betrag deutlich überwogen. In drei Versuchen stieg die extrazelluläre Kalziumkonzentration kurz nach dem Ende der choroidalen Behandlung an (keine Abbildung).

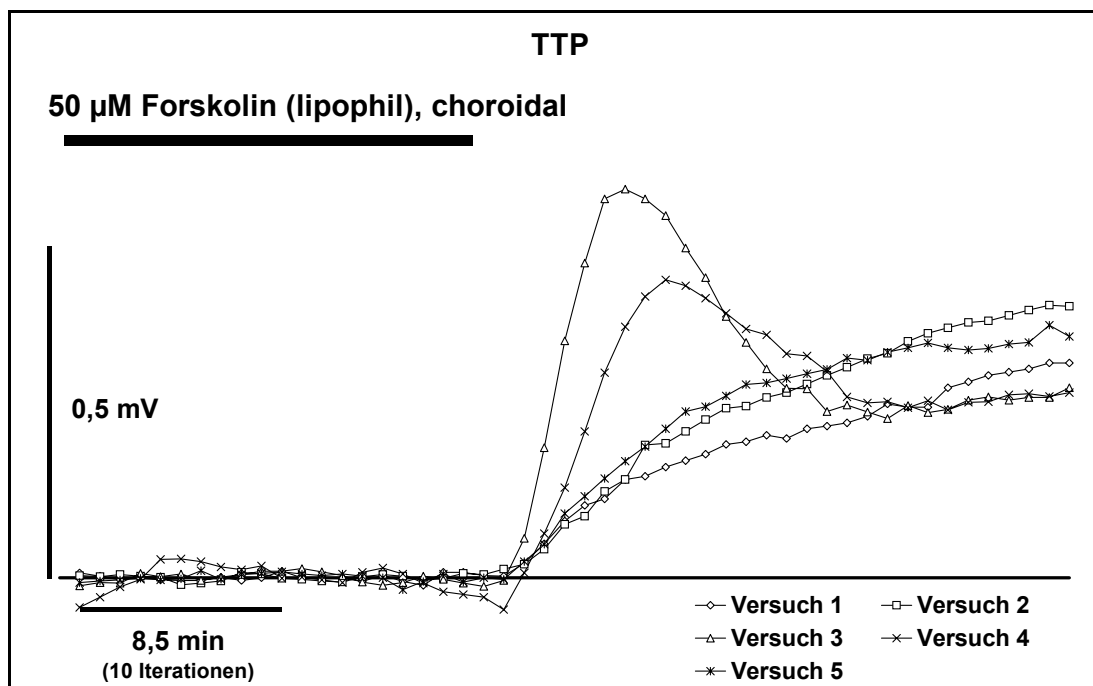


Abbildung F.43 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TTP stieg nach der Beendigung der Behandlung deutlich an, in den Versuchen 3 und 4 trat überdies eine Oszillation auf.

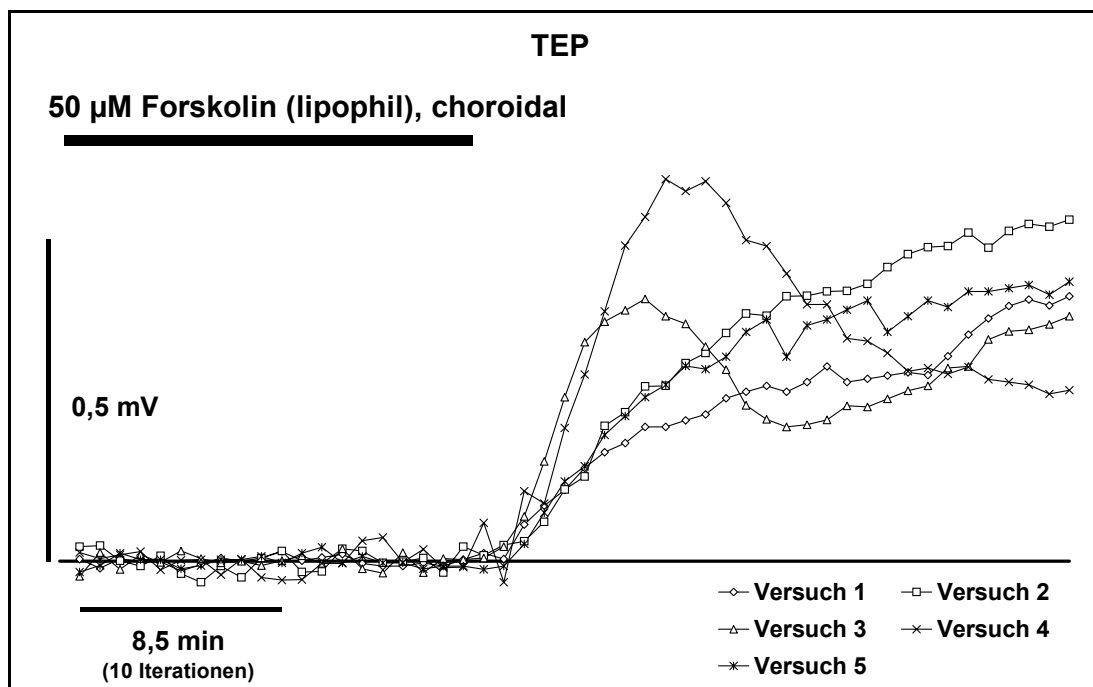


Abbildung F.44 Verlauf des transepithelialen Bestandspotenzials (TEP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Die Beendigung der Behandlung hatte einen deutlichen Anstieg des TEPs zur Folge, in den Versuchen 3 und 4 trat eine Oszillation auf (der Verlauf des TEPs bestimmte den des TTPs s. o.).

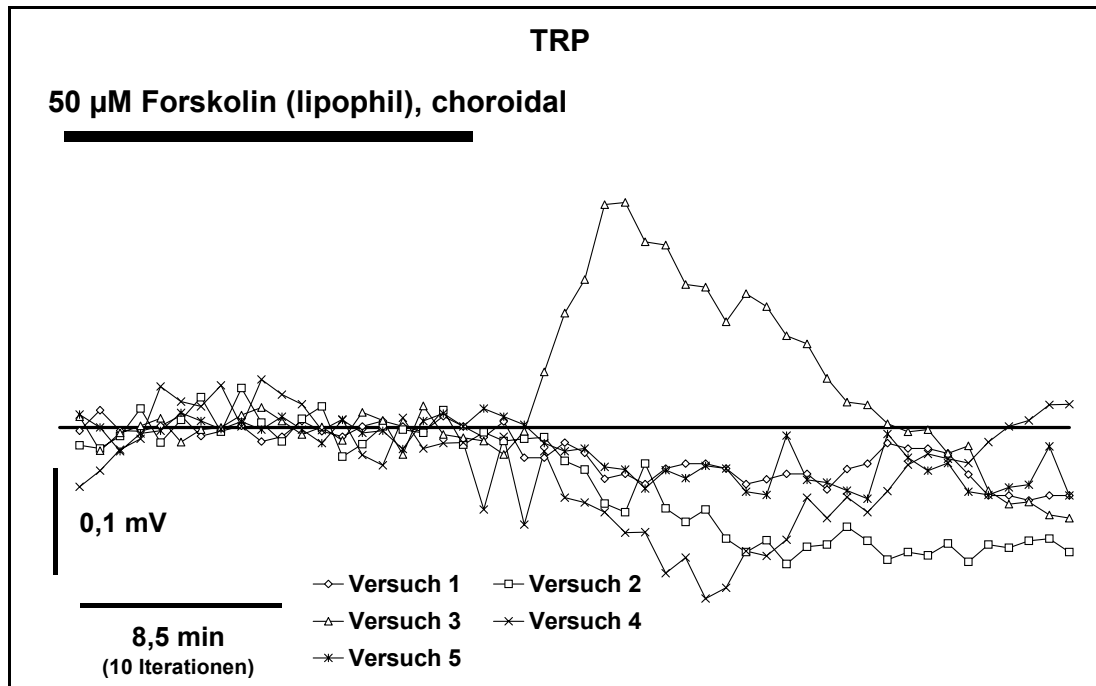


Abbildung F.45 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials (TRP): 20 Iterationen während der choroidalen Behandlung mit lipophilem Forskolin (50 µM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TRP reagierte meist nur schwach und nicht einheitlich auf das Behandlungsende.

F.1.4.3 Effekte des lipophilen Forskolins auf die lichtinduzierten Signale des Präparats

a) Änderungen im *in vitro* ERG und seinen Komponenten

Die drei folgenden Abbildungen Abbildung F.46 bis Abbildung F.48 stellen den Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TEP über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I-VII, s. o. für Erläuterungen) für den Versuchsansatz mit retinaler Behandlung dar. Für den Versuchsansatz mit choroidaler Behandlung wird nur der Verlauf des Gesamt-ERGs (TTPs) in der Abbildung F.49 wiedergegeben. Teil B jeder Abbildung zeigt die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial. Die Darstellungen der vollständigen Aufzeichnungen sollen einen Überblick über den Versuchsverlauf ermöglichen und Hinweise auf durch die Behandlung verursachte Veränderungen geben. Auf die Beschreibung der in

diesen Abbildungen erkennbaren Veränderungen wird hier verzichtet, da diese in den unten dargestellten Differenzen der Amplituden deutlicher hervortreten.

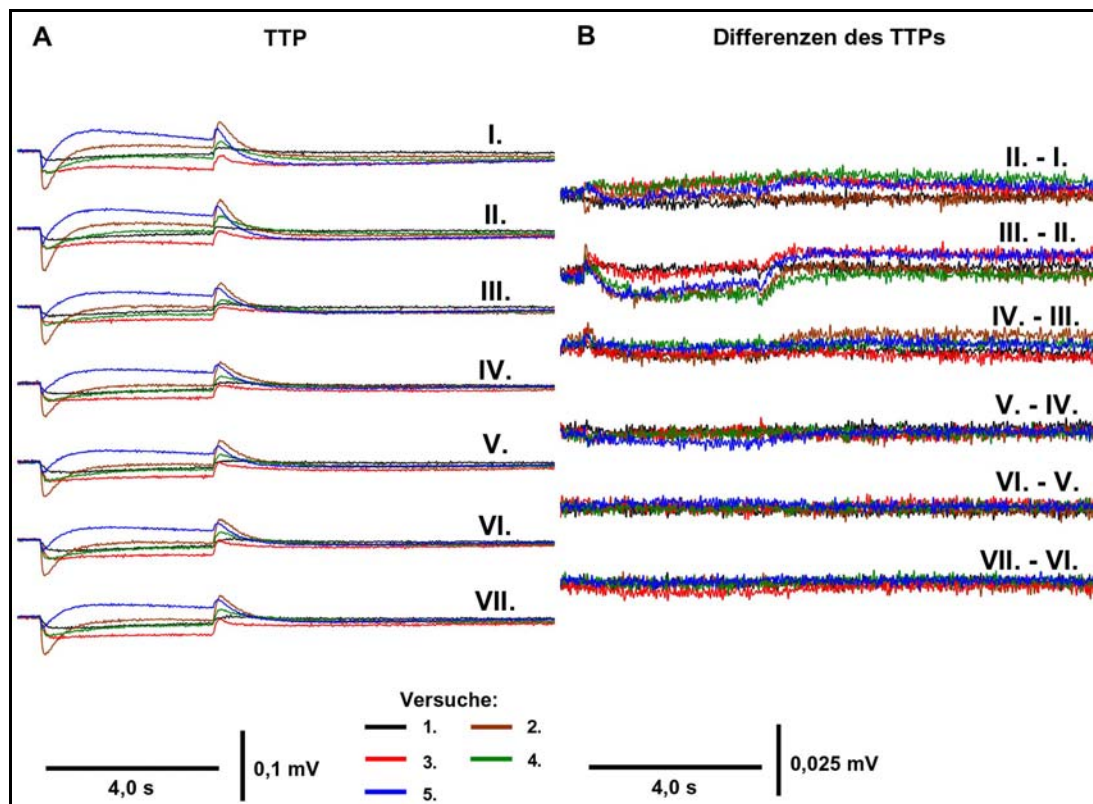


Abbildung F.46 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 5 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit lipophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, in drei Versuchen wird ein Rückgang der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.) deutlich.

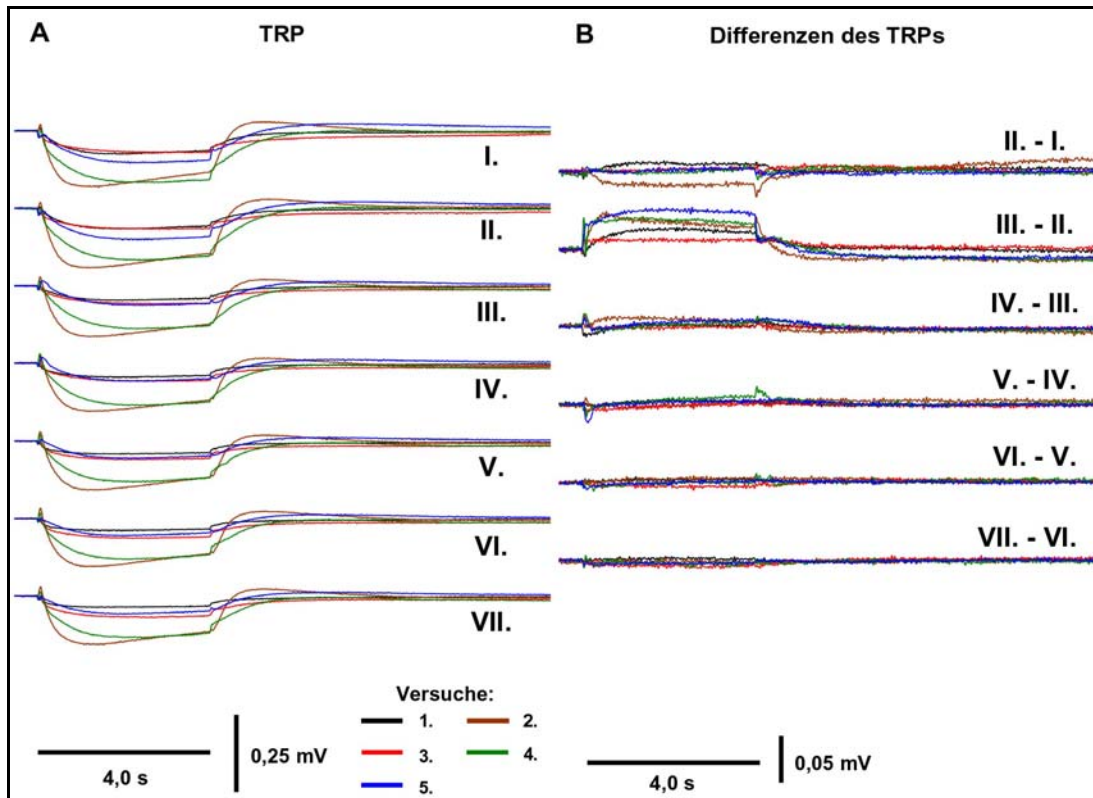


Abbildung F.47 **A (linke Hälfte):** TRPs aus einer Reihe von 5 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit lipophilem Forskolin (50 μ M) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, deutlich erkennbar ist die Abnahme der negativen Amplitude der Komponente der c-Welle des TRPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.).

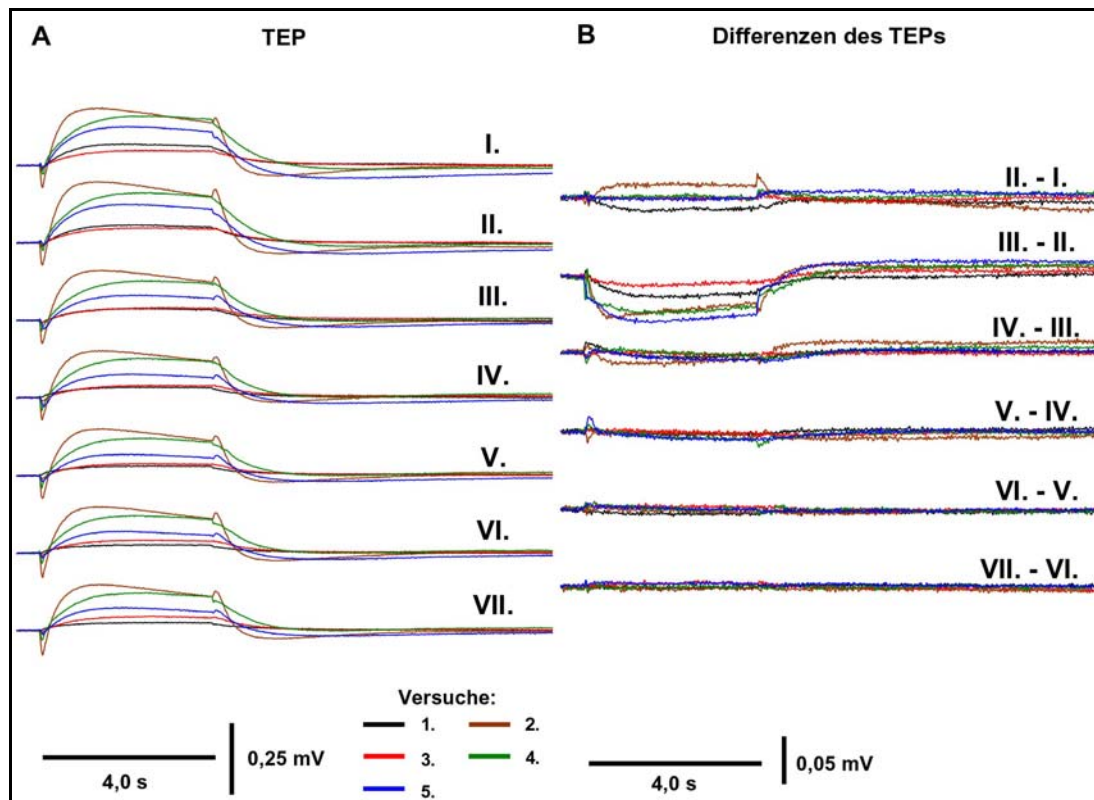


Abbildung F.48 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 5 Experimenten, in denen das Präparat von der **retinalen** Seite mit lipophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, deutlich wird ein starker Rückgang der Amplitude der Komponente der c-Welle des TEPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. – II.).

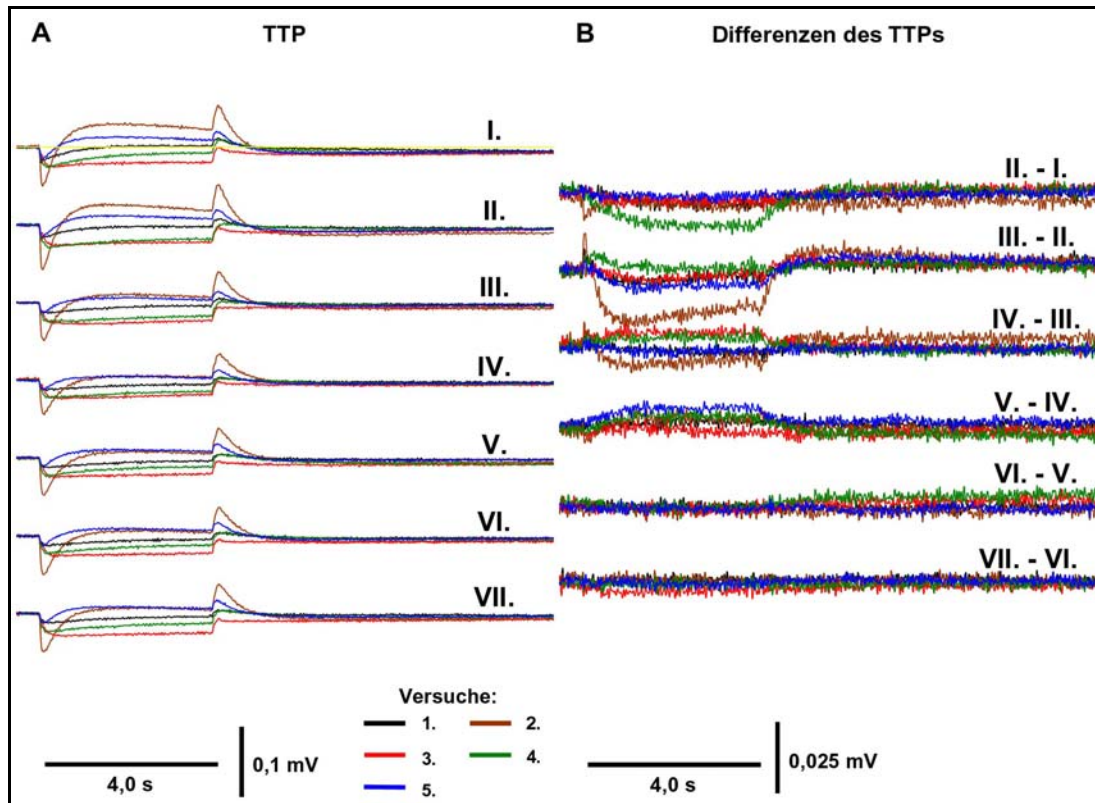


Abbildung F.49 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 5 Experimenten, in denen das Präparat von der **choroidalen** Seite mit lipophilem Forskolin ($50 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. und IV., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, deutlich erkennbar sind starke Veränderungen der Amplitude der c-Welle während und nach der Einwirkung von Forskolin (III. – II., IV. – III., V. – IV.).

b) Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden der Wellen des ERGs

Wegen der oft großen Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Wiedergabe der Amplituden selbst verzichtet. Stattdessen wurden ihre Veränderungen in Bezug auf Versuchsphase II (Kontrolle, 5 min vor Beginn der Behandlung) berechnet (für Details s. o. Kapitel E.2.2.2 Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden bei ATP-Behandlung). Diese werden in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abbildung F.50 bis Abbildung F.70).

Behandlung von der retinalen Seite des Präparats

Während der retinalen Behandlung des Präparats mit lipophilen Forskolin verringerte sich die Amplitude der a-Welle stark (Abbildung F.50). Hierbei überwog die Abnahme der negativen Amplitude im TRP (Abbildung F.51) den meist nur schwachen Rückgang der entgegen gerichteten (positiven) Amplitude im TEP in drei Versuchen (Abbildung F.52). Die b-Welle zeigte meist erst im späten Verlauf der Behandlung (Versuchsphase IV) einen Anstieg der Amplitude im TTP (Abbildung F.53), der in vier Versuchen allein oder überwiegend durch eine Erhöhung der entsprechenden Amplitude des TRPs bedingt war (Abbildung F.54). Die Amplitude der d-Welle ging nach Beginn der Behandlung nur geringfügig zurück (Abbildung F.55). Auch dieser Effekte wurde durch die Veränderung des TRPs verursacht (Abbildung F.56). Die negative Amplitude der Komponente des TRPs wuchs in vier Versuchen etwas stärker an als die entgegengerichtete Amplitude des TEPs. Sowohl bei der a-, wie bei der b- und d-Welle war nach dem Ende der retinalen Behandlung mit lipophilen Forskolin (Versuchsphasen V bis VII) in den meisten Versuchen keine deutliche Entwicklung der Amplituden in Richtung des Ausgangswerts (Versuchsphase II) zu beobachten (Abbildung F.50, Abbildung F.53 und Abbildung F.55).

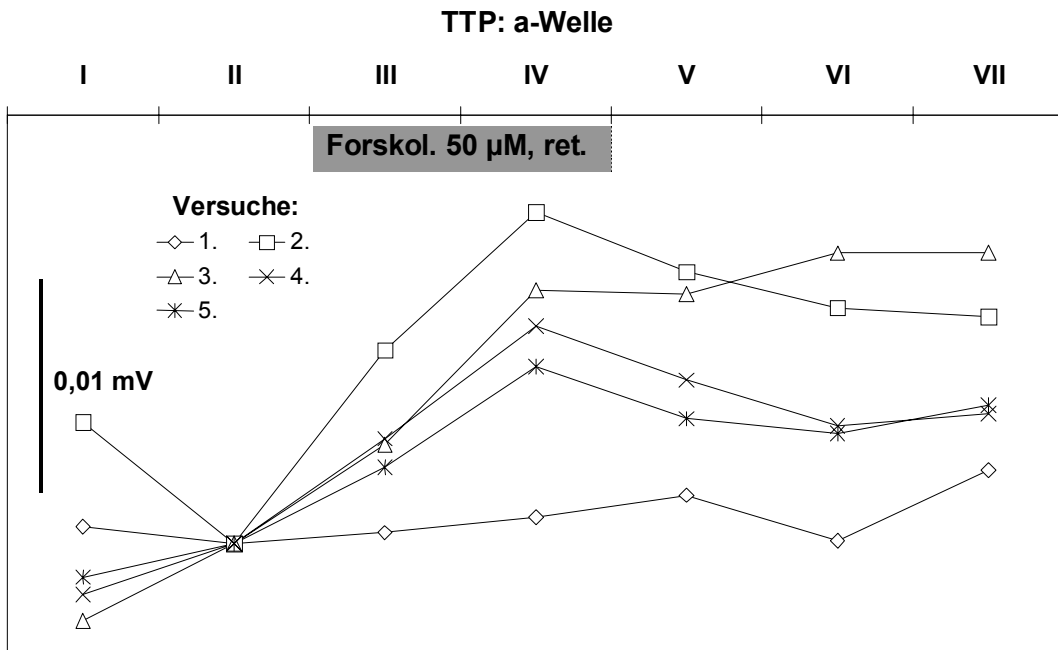


Abbildung F.50 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats sank die Amplitude mit Ausnahme von Versuch 1 deutlich ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

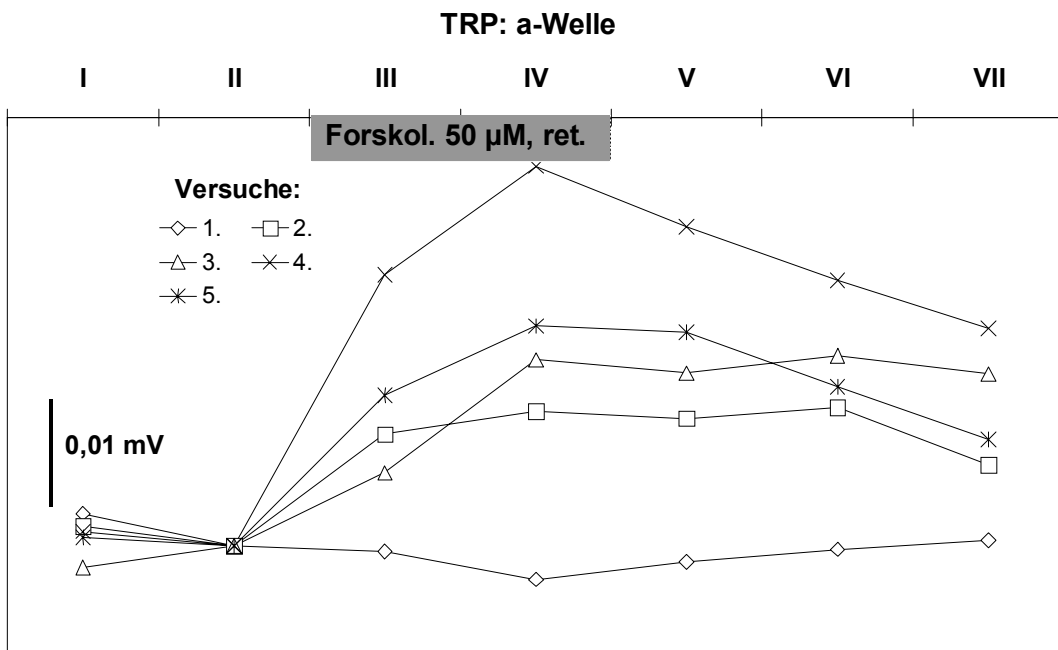


Abbildung F.51 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude in vier Versuchen deutlich ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

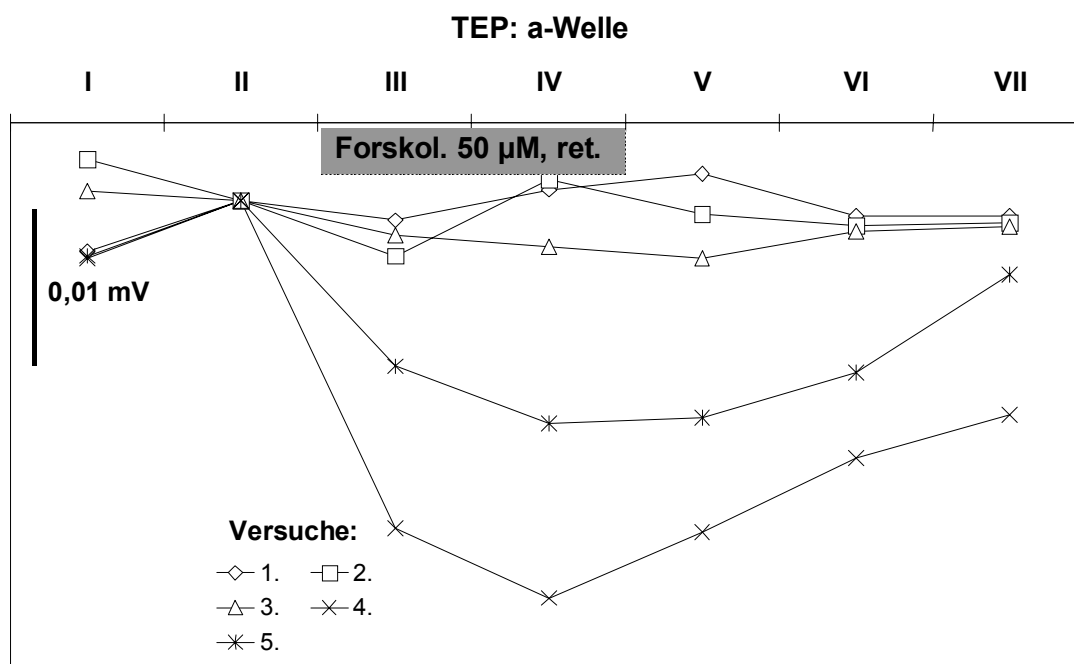


Abbildung F.52 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats ging die Amplitude nur in zwei Versuchen deutlich zurück.

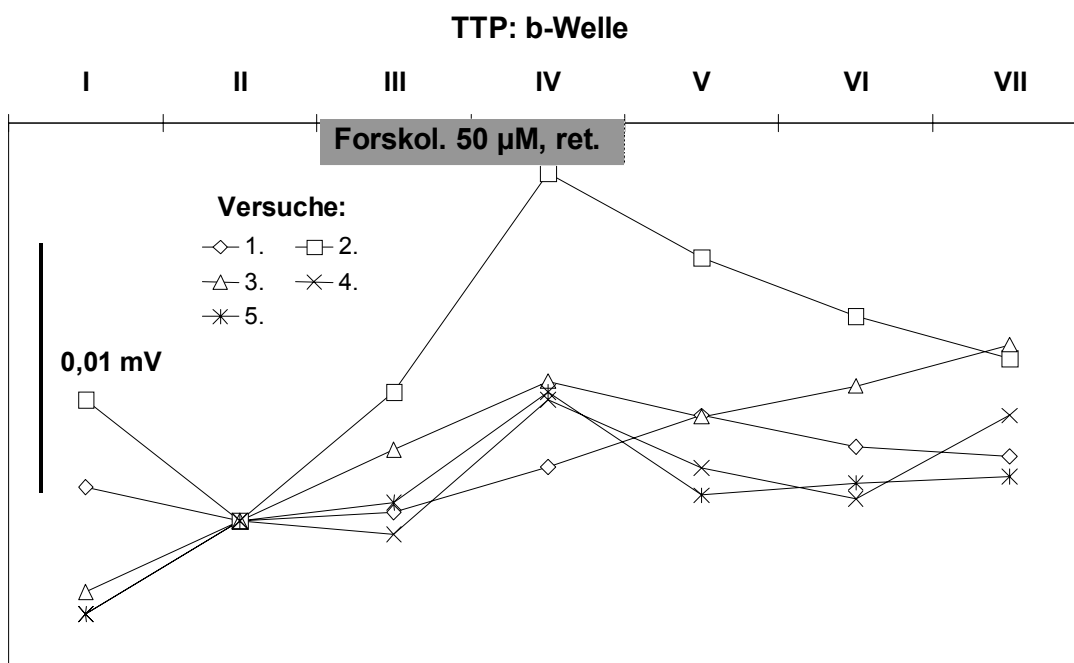


Abbildung F.53 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude nur in zwei Versuchen an, in zwei weiteren zeigte sich ein Anstieg erst nach 35 min Behandlungsdauer (IV).

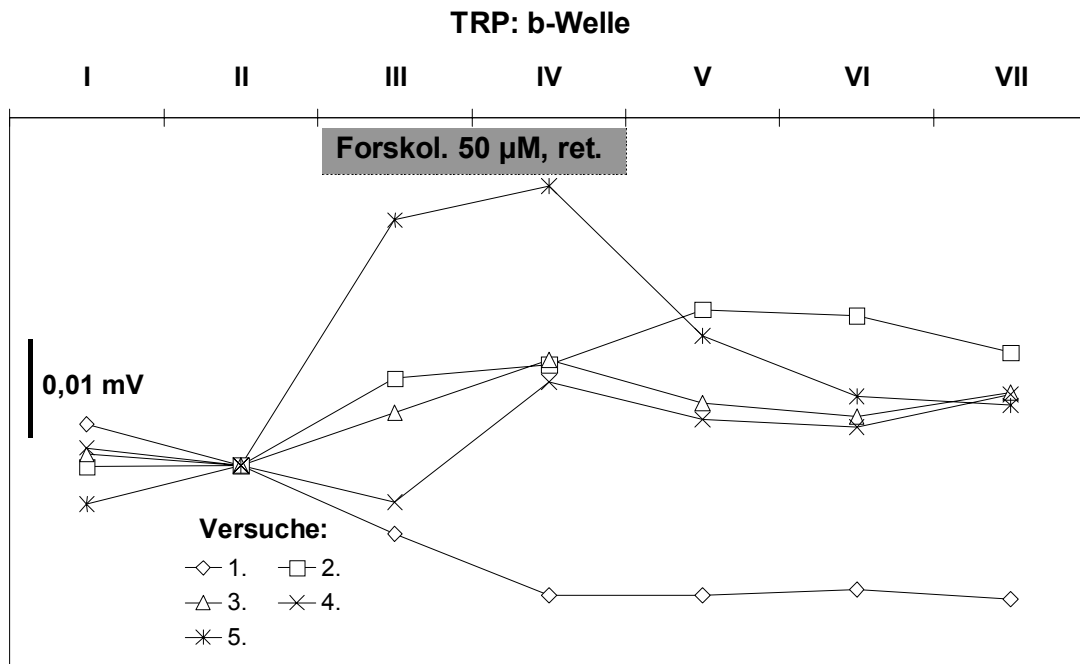


Abbildung F.54 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in drei Versuchen an.

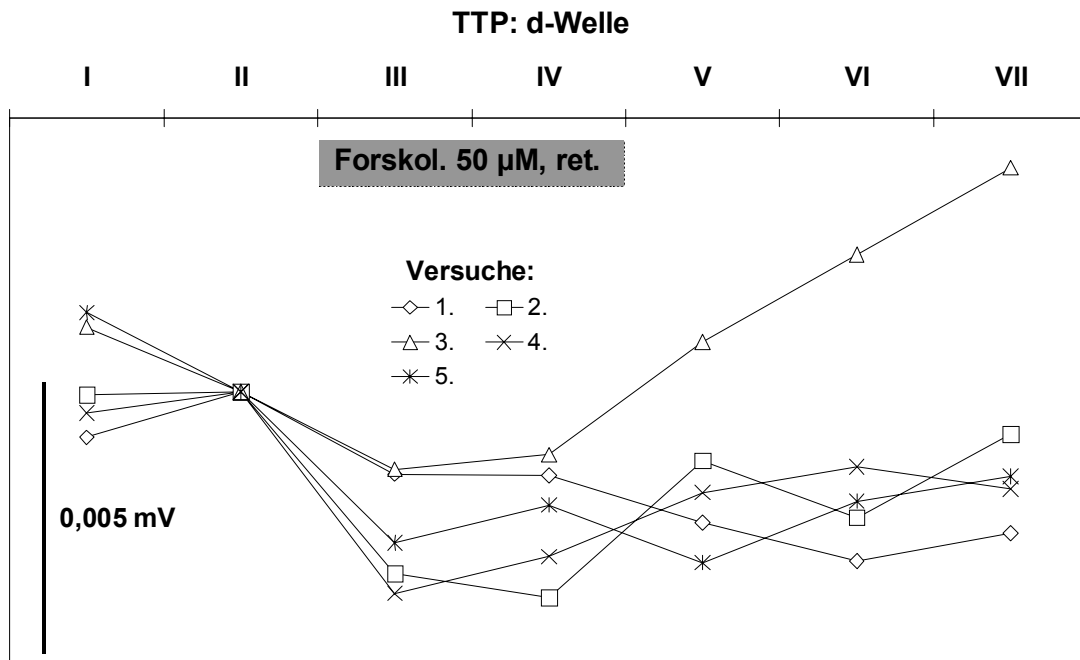


Abbildung F.55 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats kam es zu einer geringfügigen Reduktion der Amplitude.

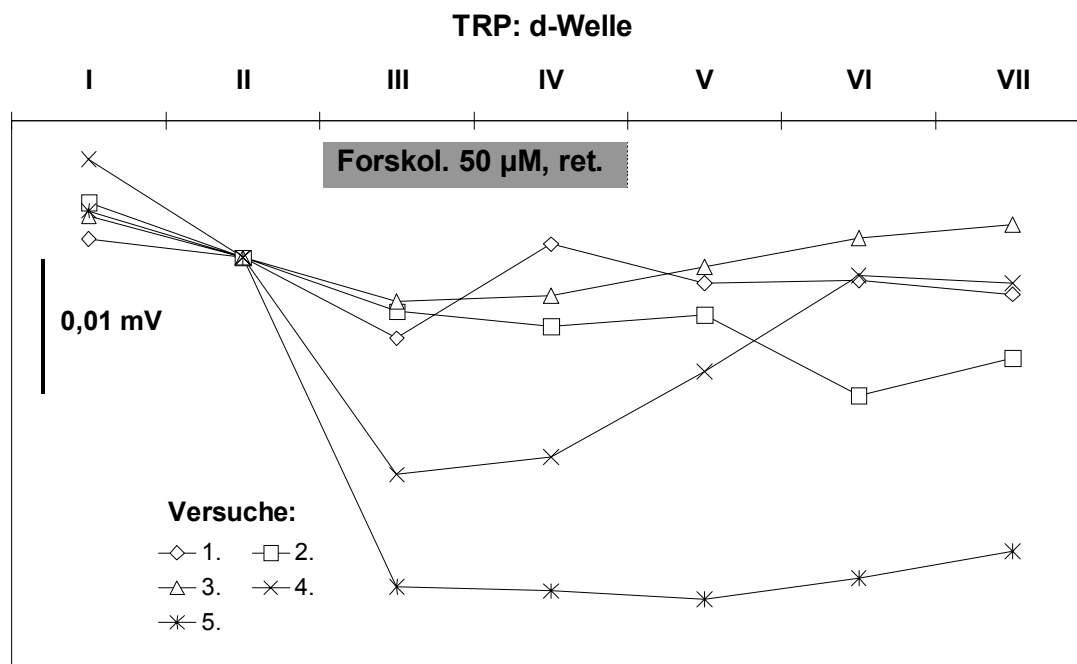


Abbildung F.56 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats stieg die negative Amplitude nur in zwei Versuchen deutlich an (negative Differenz bei negativer Amplitude = Anstieg).

Die Amplitude der langsamen c-Welle sank nach dem Beginn der retinalen Behandlung in drei Versuchen ab (Abbildung F.57). In diesen Fällen war der Rückgang der positiven Amplitude im TEP (Abbildung F.59) größer als die Abnahme der negativen Amplitude im TRP (Abbildung F.58). Die Reaktionen der beiden Komponenten der c-Welle im TRP und im TEP waren deutlich; deren entgegen gerichtete Amplituden nahmen in allen fünf Versuchen stark ab. Wie im Fall der raschen Wellen führte auch bei der c-Welle das Absetzen der retinalen Behandlung nicht zu einem Wiederanstieg der verringerten Amplituden.

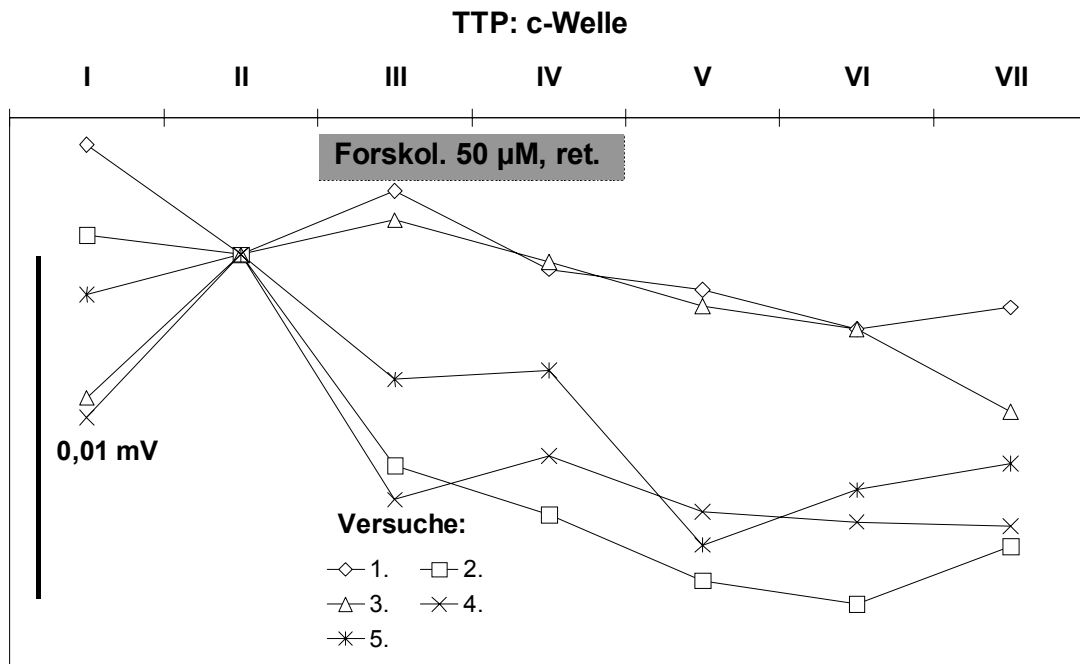


Abbildung F.57 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats zeigte sich in drei Versuchen ein Rückgang der Amplitude der c-Welle.

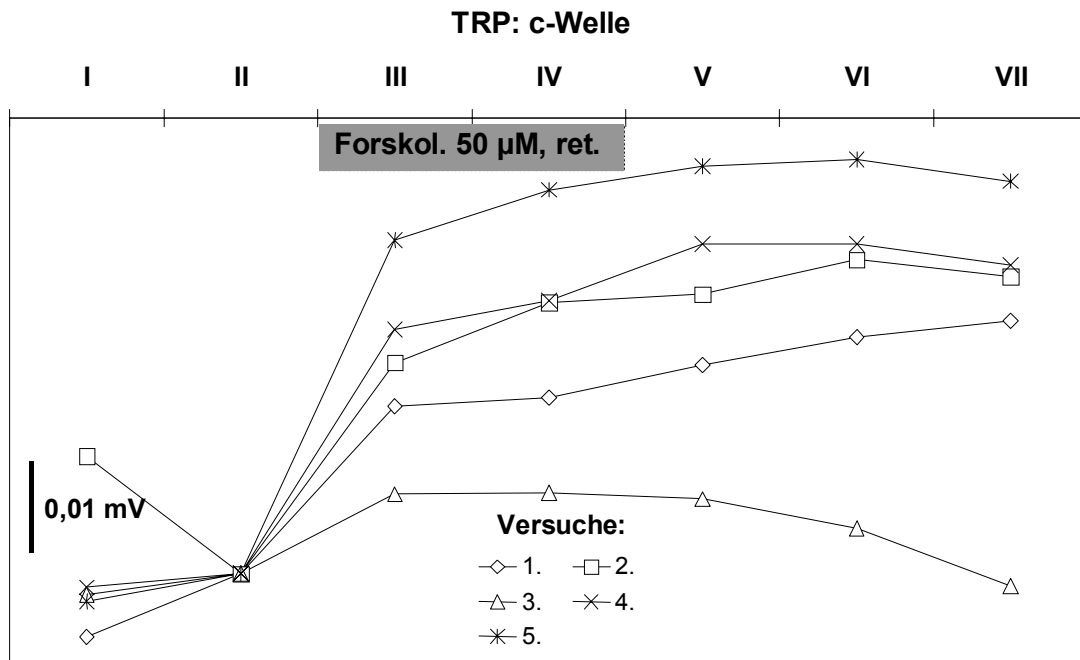


Abbildung F.58 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats nahm in allen Versuchen die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP stark ab (positive Differenz bei negativer Amplitude = Abnahme).

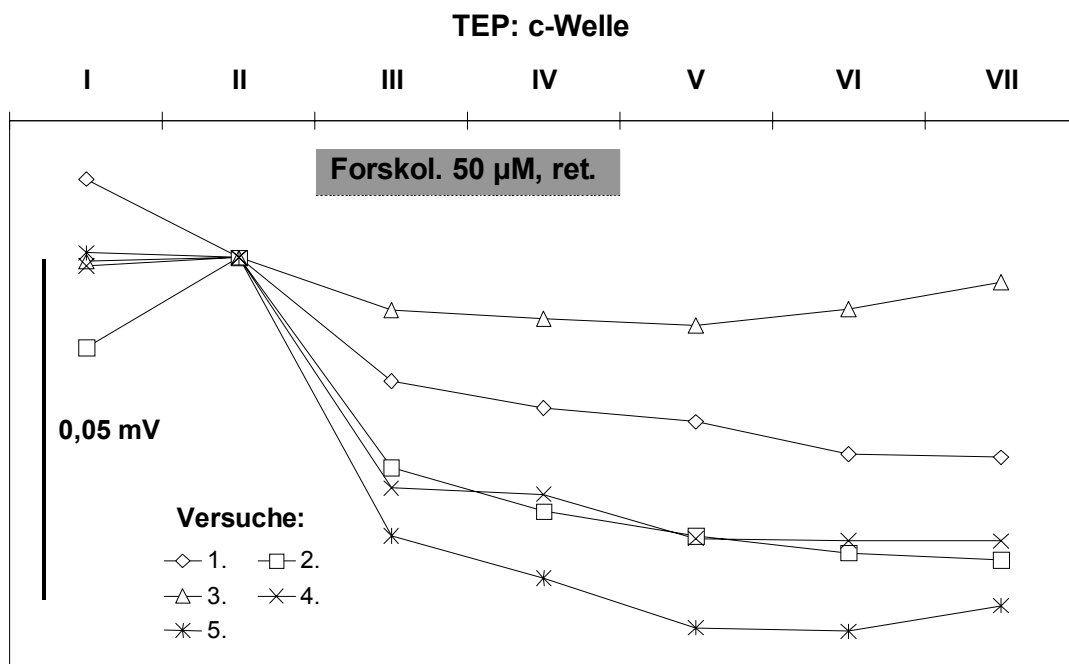


Abbildung F.59 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP in vier von fünf Versuchen deutlich ab.

Behandlung von der choroidalen Seite des Präparats

Die choroidale Behandlung löste einen Rückgang der Amplitude der a-Welle aus (Abbildung F.60). Die negativ ausgerichtete Amplitude im TRPs nahm stärker ab (Abbildung F.61) als positive Amplitude des TEPs (Abbildung F.62). Die Amplitude der b-Welle stieg bis spätestens kurz vor Ende der Behandlung (Versuchsphase IV) an (Abbildung F.63). Die Zuordnung dieses Effekts zu einer der beiden Komponenten der b-Welle (TRP oder TEP) war nicht möglich. In jeweils zwei Versuchen dominierte die Veränderung im TRP (Abbildung F.64) und im TEP und in Versuch 5 hoben diese sich gegenseitig fast auf.

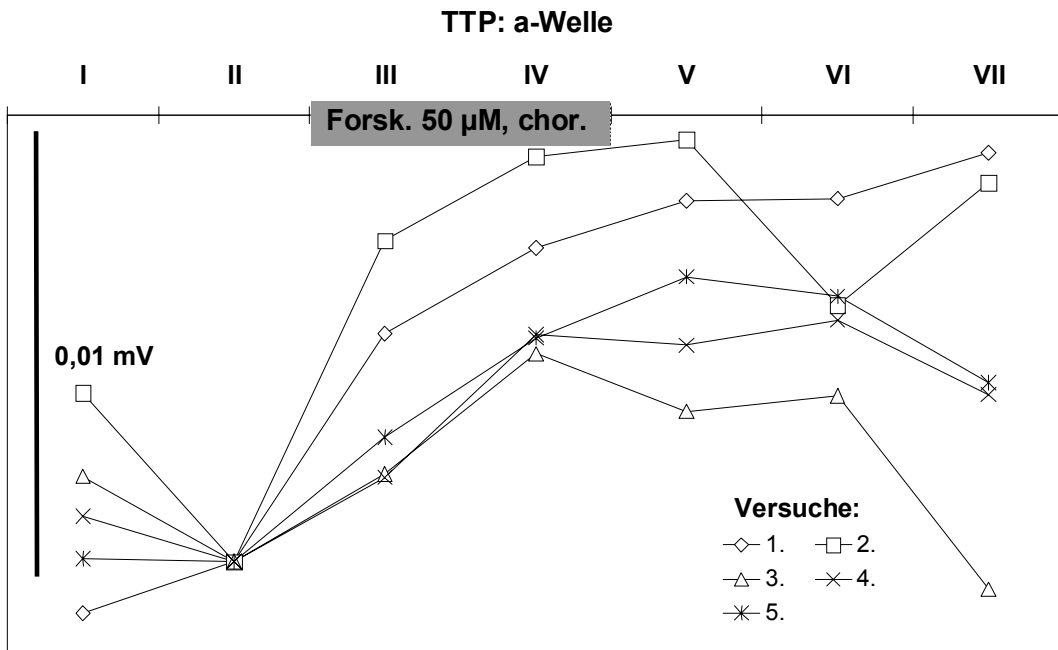


Abbildung F.60 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats sank die Amplitude der a-Welle deutlich ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

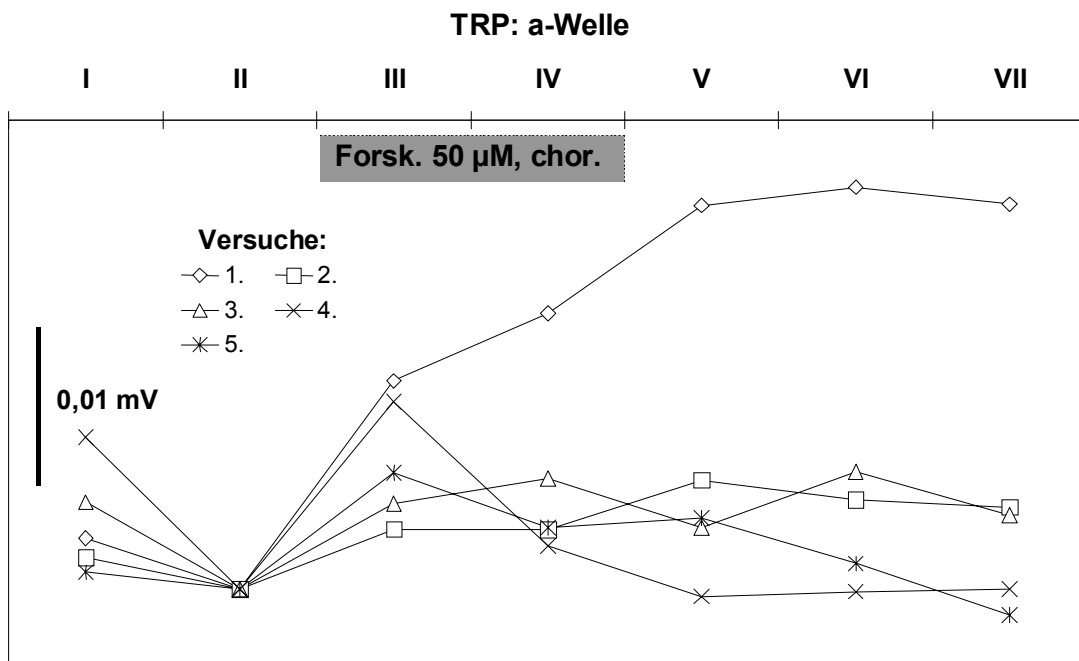


Abbildung F.61 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats nahm die Amplitude allen Versuchen ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

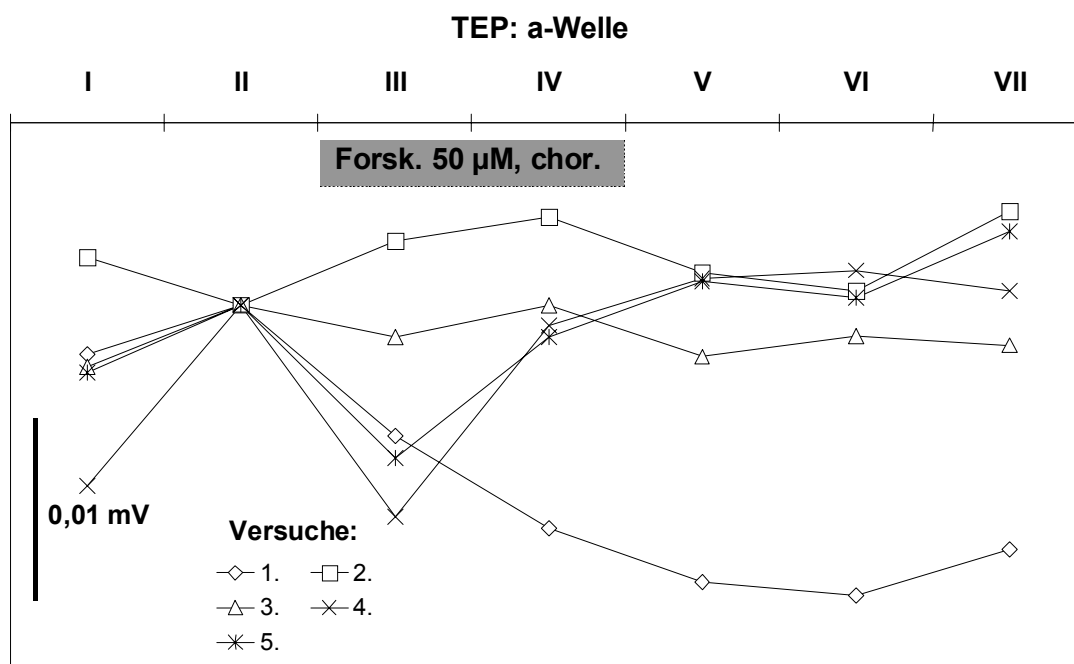


Abbildung F.62 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats ging die (positive) Amplitude in drei Versuchen deutlich zurück.

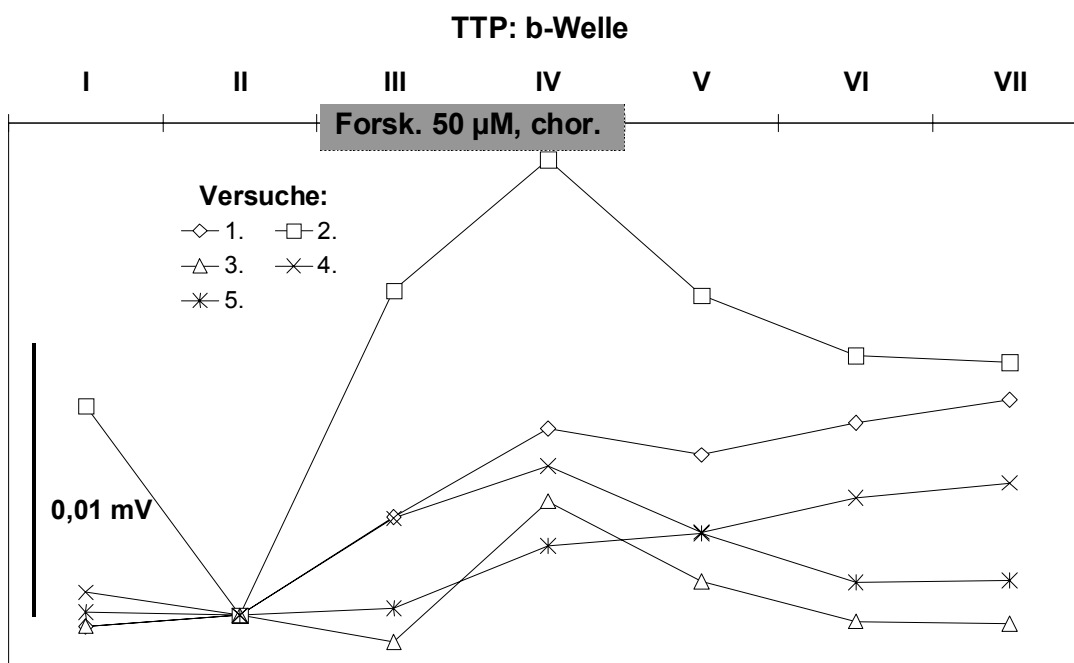


Abbildung F.63 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in drei Versuchen an, in einem weiteren zeigte sich ein Anstieg erst nach 35 min Behandlungsdauer (IV).

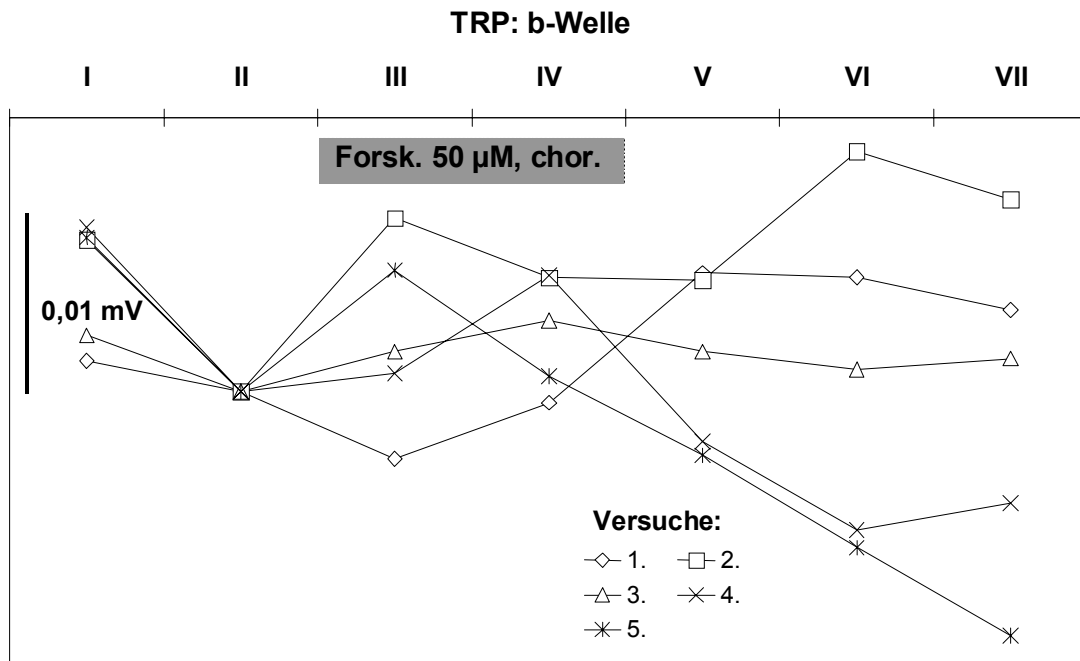


Abbildung F.64 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in zwei Versuchen an.

Die d-Welle ging nach dem Einsetzen der choroidalen Behandlung zumindest geringfügig zurück (Abbildung F.65). Die Komponenten der d-Welle im TRP und im TEP reagierten deutlich stärker (Abbildung F.66 und Abbildung F.67). Die Zunahme der negativen Amplitude im TRP überwog den in vier Versuchen aufgetretenen Anstieg der positiven Amplitude im TEP. Wie schon bei der retinalen Behandlung beobachtet, setzte nach dem Ende der choroidalen Behandlung (Versuchsphasen V bis VII) in den meisten Fällen keine Entwicklung der veränderten Amplituden der raschen Wellen in Richtung des Ausgangswerts (Phase II) ein (Abbildung F.65 bis Abbildung F.67).

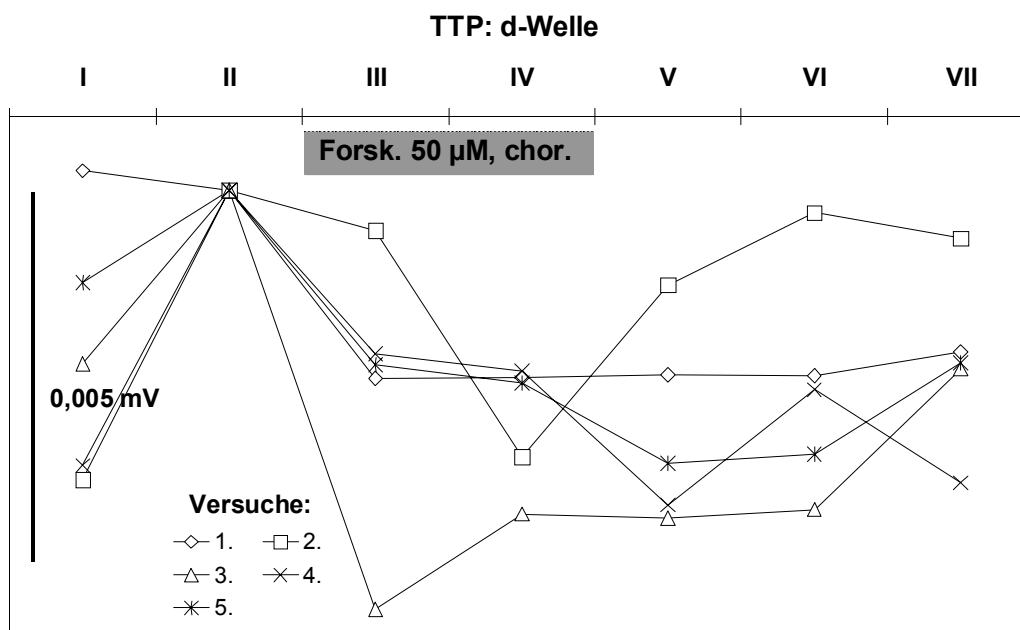


Abbildung F.65 Differenzen der Amplituden der d-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats kam es zu einer mindestens geringfügigen Reduktion der Amplitude.

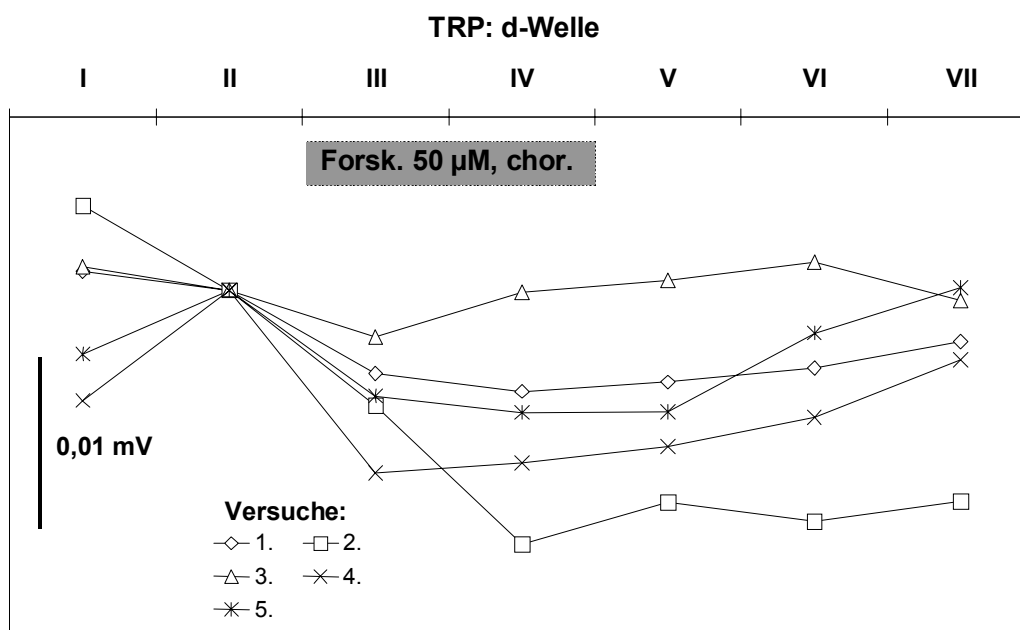


Abbildung F.66 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats stieg die negative Amplitude allen Versuchen an (negative Differenz bei negativer Amplitude = Anstieg).

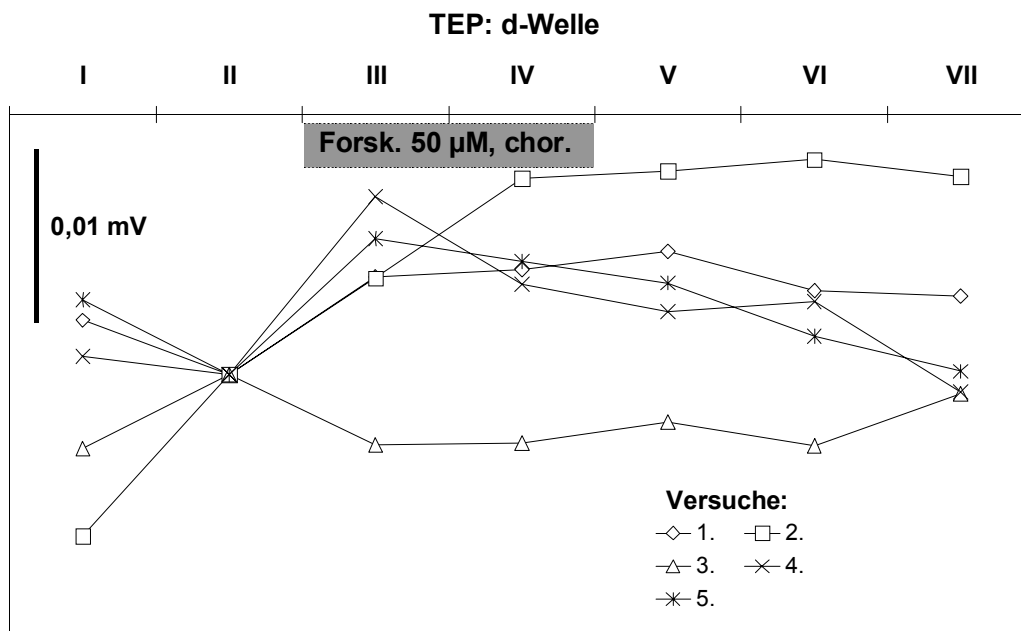


Abbildung F.67 Differenzen der Amplituden der Komponente der d-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats nahm die Amplitude in drei Versuchen deutlich zu.

Die choroidale Behandlung zeigte keinen eindeutigen Effekt auf die Amplitude der langsamen c-Welle (Abbildung F.68). In zwei Versuchen kam es zu keiner deutlichen Änderung, in einem zu einem deutlichen Rückgang und in den zwei übrigen zu einem leichten Anstieg der Amplitude der c-Welle im Verlauf der Behandlung (Versuchsphasen III und IV). Allerdings sanken die Amplituden der beiden Komponenten im TRP und im TEP (mit einer Ausnahme) stark ab (Abbildung F.69 und Abbildung F.70). Die uneinheitlichen Veränderungen der Amplitude der c-Welle waren darauf zurückzuführen, dass die Amplituden ihrer beiden Komponenten (d. h. TRP und TEP) nicht immer im gleichen Verhältnis abnahmen. Die Amplituden des TRPs und des TEPs sind einander entgegengerichtet, kompensieren sich im TTP also gegenseitig. Deshalb hängt die im TTP sichtbare Wirkung auf die c-Welle davon ab, bei welcher der beiden Komponenten der größere Rückgang der Amplitude auftritt. Nach dem Ende der choroidalen Behandlung (Versuchsphasen V bis VII) war in den meisten Versuchen weder in der c-Welle noch in ihren Komponenten im TRP und TEP eine deutliche Zunahme der Amplituden in Richtung des Ausgangswerts (Phase II) zu beobachten (Abbildung F.68 bis Abbildung F.70).

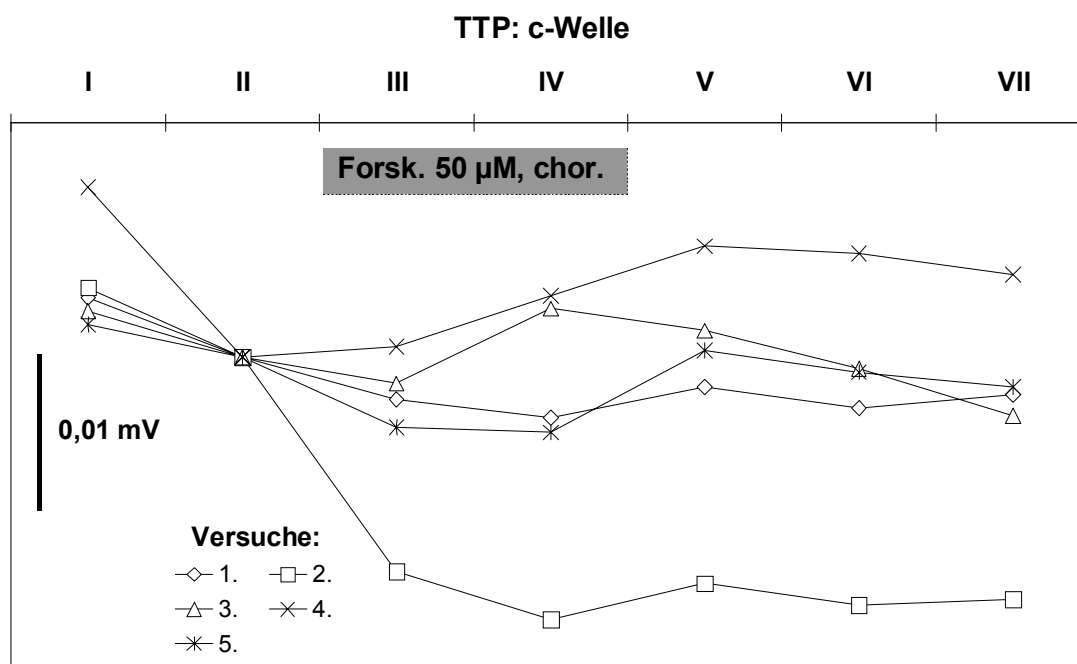


Abbildung F.68 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats zeigte sich keine einheitliche Veränderung der Amplitude der c-Welle.

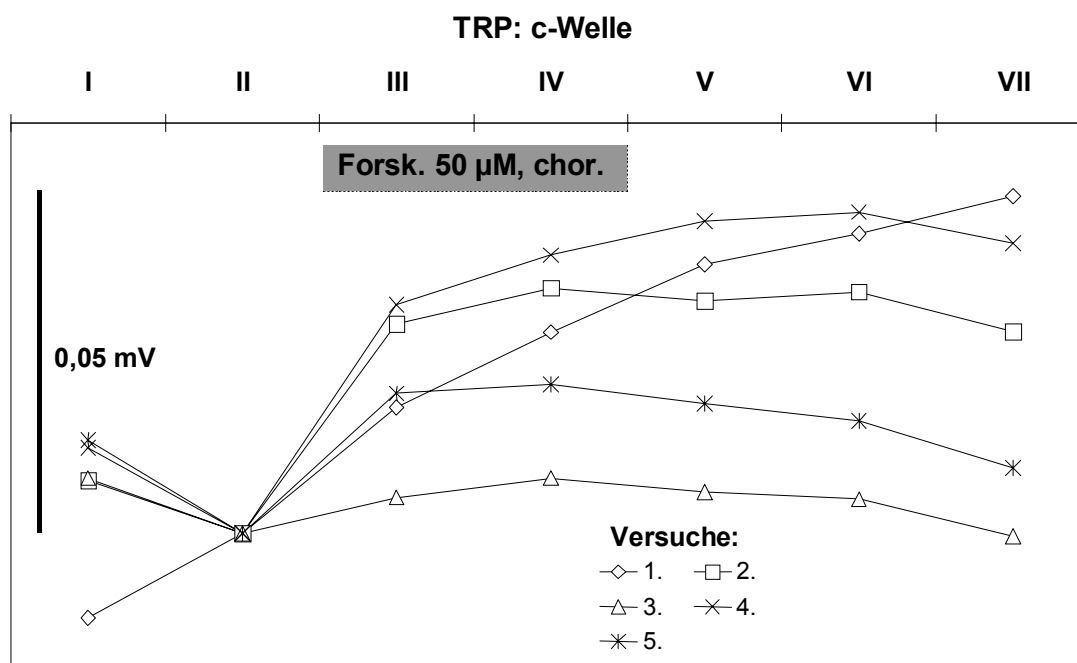


Abbildung F.69 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats sank in vier von fünf Versuchen die Amplitude der Komponente der c-Welle im TRP stark ab (positive Differenz bei negativer Amplitude = Abnahme).

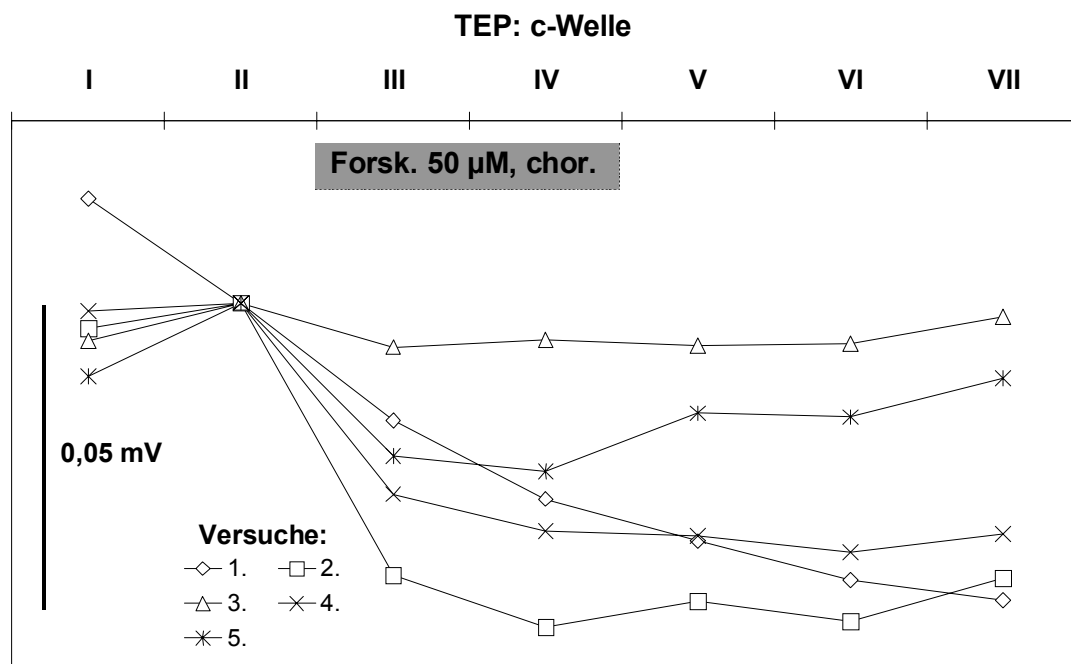


Abbildung F.70 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung mit lipophilem Forskolin (III) von der choroidalen Seite des Präparats nahm die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP in vier von fünf Versuchen deutlich ab.

F.1.5 Diskussion der Wirkungen verschieden löslicher Formen des Forskolins

Bereits Kuntz *et al.* (1994) aus der Arbeitsgruppe von Roy Steinberg hatten die Wirkung von Änderungen des cAMP-Spiegels auf die elektrophysiologischen Signale des Retina-RPE-Choroid Präparats vom Haushuhn untersucht. Zur endogenen Erhöhung der cAMP-Konzentration hatten sie den Wirkstoff Forskolin eingesetzt, der seit langem als potenter Aktivator der Adenylat-Cyclase bekannt ist (Seamon & Daly, 1981; Seamon *et al.*, 1981). In den oben beschriebenen ersten beiden Versuchsansätzen war allerdings die hydrophile Form des Forskolins (7-Deacetyl-7-(O-N-methylpiperazino)- γ -butyryl-, Dihydrochloride, Calbiochem, La Jolla, USA) verwendet worden und nicht die native, lipophile Form. Somit konnte auf die Herstellung einer Stammlösung in DMSO verzichtet werden. Entsprechend des Vorgehens von Kuntz *et al.* (1994) wurde für die Behandlungen des Präparats eine Konzentration von 50 μ M

Forskolin gewählt (Anmerkung: in dem Artikel von Kuntz *et al.* (1994) wird wiederholt Wert 50 mM angegeben. Dies widerspricht aber der dortigen Beschreibung der Verdünnung. Danach können es nur 50 μ M gewesen sein). Die Ergebnisse der Behandlung mit hydrophilen Forskolin von der retinalen Seite des Präparats wichen jedoch deutlich von denen ab, die Kuntz *et al.* (1994) für Behandlungen über die choroidale Perfusion berichtet hatten. Es sollte daher geklärt werden, ob diese Abweichungen durch die Applikation von Forskolin über verschiedene Seiten des Präparats bedingt waren oder auf die unterschiedliche Form des Forskolins zurückgingen. Deshalb wurde in einem zweiten Versuchsansatz hydrophiles Forskolin über die choroidale Seite verabreicht. Da auch dessen Ergebnisse nicht mit denen aus der oben zitierten Veröffentlichung übereinstimmten, wurden schließlich Versuche mit der lipophilen Form des Forskolins unternommen, wobei wiederum beide Versuchsansätze, d. h. Behandlung von der retinalen bzw. choroidalen Seite, durchgeführt wurden. Unter Verwendung des nativen, lipophilen Forskolin ließen sich die Ergebnisse von Kuntz *et al.* (1994) reproduzieren. Die hydrophile Form von Forskolin hatte also deutlich andere Effekte hervorgerufen als die lipophile Form. Deshalb werden im Folgenden auch die Wirkungen des hydrophilen getrennt von denen des lipophilen Forskolins diskutiert.

F.1.5.2 Die Wirkung des hydrophilen Forskolins auf das in vitro Präparat

Forskolin bewirkt über die Aktivierung der Adenylat-Cyclase einen Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle (s. o.). Die mit der hydrophilen Form des Forskolins erzielten Ergebnisse lassen sich aber nicht mit der Verringerung der Aktivität des bereits von Gallemore & Steinberg (1990) für die basolaterale Membran des RPEs postulierten Chlorid-Kanals in Einklang bringen. Die erhöhte cAMP-Konzentration sollte zu einer reduzierten Leitfähigkeit für Chlorid der basolateralen Membran des RPEs des Huhns führen und damit zur Hyperpolarisation dieser, d. h. die negative Ladung von V_{ba} nähme zu (Kuntz *et al.*, 1994). Dies müsste sich im Absinken des transepithelialen Bestandpotenzials zeigen (da $TEP = V_{ba} - V_{ap}$, s. Kapitel B.7). Dagegen stieg

das TEP bei retinaler Applikation von hydrophilen Forskolin in den meisten Versuchen sogar an, während es bei Verabreichung über die choroidale Perfusion unverändert blieb. Da die transepitheliale c-Welle direkt durch Änderungen des transepithelialen Bestandpotenzials beeinflusst wird (Linsenmeier & Steinberg, 1983), wäre überdies eine Abnahme der c-Welle zu erwarten. Die c-Welle nahm jedoch nur bei choroidaler Behandlung geringfügig ab. Hingegen stieg sie bei retinaler Behandlung an. Allerdings ging in diesem Fall die transepitheliale Komponente der c-Welle sogar leicht zurück.

Die vorliegenden oft kleinen Effekte auf das TEP, die teilweise in Widerspruch zu anderen Veröffentlichung stehen, wie der Anstieg des TEPs (Kuntz *et al.*, 1994), belegen, dass die hydrophile Form des Forskolins auf das RPE nicht die Wirkung entfalten konnte wie seine lipophile Form. Eine nahe liegende Erklärung dafür könnte die geringe bis nicht vorhandene Membrangängigkeit der hydrophilen Form sein. Um die Aktivität der Adenylat-Cyclase erhöhen zu können, muss Forskolin die Zellmembran passieren. Diese wird aus einer Doppelschicht von Phospholipiden gebildet, die aus einer polaren (hydrophilen) Kopfgruppe und zwei lipophilen Schwänzen aus Fettsäureresten bestehen (s. z. B. Wehner & Gering, 1990). Die auf der Innenseite der Doppelschicht liegenden Fettsäurereste bilden für hydrophile Moleküle eine Barriere. Hydrophiles Forskolin kann daher nur mittels transmembraner Kanäle oder Poren, die einen der Molekülgröße von Forskolin entsprechenden Durchmesser haben müssen, in das Innere der Zelle gelangen. Da das RPE eine funktionelle Blut-Retina Schranke, homolog zur Blut-Hirn Schranke, darstellt (Dowling, 1987), ist anzunehmen, dass es für größere Moleküle eine effektive Barriere darstellt, indem es solche nicht in passiv sondern nur aktiv über Transportkanäle gesteuert aufnimmt. Deshalb erscheint es möglich, dass die hydrophile Form des Forskolins nicht in ausreichender Menge in die Zellen des RPEs gelangen konnte, um dort die von seiner lipophilen Form bekannten Effekte auszulösen.

Einen Beleg für das Funktionieren des RPEs als Blut-Retina Schranke lieferten die Ergebnisse der choroidalen Behandlungen. In diesem Fall zeigten die raschen Wellen, die von den Zellen der Retina i. d. R. ohne Beteiligung des

RPEs generiert werden (s. Dowling, 1987), keine Veränderungen, d. h. das RPE muss hier die Diffusion wesentlicher Mengen an Forskolin vom Choroid zur Retina wirkungsvoll verhindert haben. Dagegen hatte die Behandlung des *in vitro* Präparats von der retinalen Seite deutliche Effekte auf die raschen Wellen hervorgerufen; die Amplituden der a- und d-Wellen wurden verringert, während die der b-Welle zunahm. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Aufnahme von hydrophilen Forskolin in die Zellen der neuronalen Retina stattgefunden hat. Für einige Zelltypen der Netzhaut sind Kanäle für Moleküle dieser Größe bekannt, z. B. tritt in der Retina der Ratte ein über Purinrezeptoren gesteuerter Kanal auf, der für Moleküle von einer Größe bis zu 900 Da durchlässig ist (pers. Mitteilung: B. Innocenti, 2003). Da eine Vielzahl von Ionenkanälen über cAMP als „second messenger“ gesteuert werden, sind vielfältige Wirkungswege denkbar, über die Forskolin in den Zellen der Netzhaut für die Veränderung der raschen Wellen sorgt. Für die Aufklärung der hier beteiligten Prozesse bzw. Ionenkanäle wären aufwendige Untersuchungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren. Zum Teil ergeben sich aus der Literatur Anhaltspunkte für die Wirkung von Forskolin auf bestimmte Zelltypen der Retina. Der Einfluss auf die b-Welle ließe sich z. B. mit der hemmenden Wirkung von Forskolin auf elektrische Synapsen der Horizontalzellen (DeVries & Schwartz, 1989) begründen, die ihrerseits die Übertragung des Signals von den Fotorezeptoren auf die Bipolarzellen modulieren.

Einen weiteren Hinweis, dass das hydrophile Forskolin in Zellen der Retina aufgenommen wird, liefert der Anstieg der extrazellulären Kalzium-Konzentration nach dem Ende der Behandlung. Dieser lässt sich mit der Verringerung der Aktivität der Adenylat-Cyclase in den Zellen im Umfeld der Glasmikroelektrode in Einklang bringen. Mit der Erhöhung der Konzentration des „second messengers“ cAMP als Effekt des Forskolins ist unmittelbar eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verbunden. Dies führt zu einem Anstieg der Konzentration an freiem Kalzium in der Zelle. Mit dem Rückgang des cAMP-Spiegels nach dem Ausspülen von Forskolin sinkt auch sofort die Konzentration an freiem Kalzium. Dies könnte die Schließung von Ionenkanälen u. a. Kalziumkanäle zur Folge haben, so dass weniger Kalzium in

die Zelle aufgenommen würde und damit mehr im extrazellulären Volumen verbliebe. Es ist überdies ist möglich, dass die Zelle die rasche Absenkung der Kalzium-Konzentration nicht nur durch die Wiederaufnahme in die intrazellulären Speichern sondern auch durch eine erhöhte aktive Abgabe von Kalzium in das extrazelluläre Volumen erreicht. Beide Vorgänge könnten also für die beobachtete relative Zunahme der extrazellulären Kalzium-Konzentration nach dem Ende der Behandlung verantwortlich sein.

F.1.5.3 Die Wirkung des lipophilen Forskolins auf das in vitro Präparat

Die Diffusion von lipophilen Forskolin durch die Zellmembranen des RPEs dürfte erheblich stärker sein als bei der hydrophilen Form (s. vorherigen Abschnitt). Dies erklärt die im TEP erkennbaren deutlichen Reaktionen des RPEs bei Behandlung mit lipophilen Forskolin. Wie bereits oben angeführt, ergab erst die Verwendung dieses nativen und lipophilen Forskolins für die Behandlungen des *in vitro* Präparats Ergebnisse, die mit denen aus der Veröffentlichung von Kuntz *et al.* (1994) übereinstimmten; das transepitheliale Bestandpotenzial und in Verbindung mit diesem die Komponente der c-Welle aus dem RPE nahmen mit Beginn der Behandlung deutlich ab. Nach Kuntz *et al.* können diese Effekte dem Rückgang der Leitfähigkeit für Chlorid durch die basolaterale Membran des RPEs zugeschrieben werden, dadurch wird die basolaterale Membran hyperpolarisiert, d. h. V_{ba} wird negativer, und damit das TEP reduziert (da $TEP = V_{ba} - V_{ap}$). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt dies entweder durch die unmittelbare Verringerung der Aktivität des basolateralen Chlorid-Kanals (Gallemore & Steinberg, 1990) oder indirekt über eine Reduktion der intrazellulären Chlorid-Konzentration durch die Hemmung des apikalen $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ Kotransporters (s. Kapitel E.2.3, Abbildung E.22).

Die oben beschriebenen Effekte des Forskolins auf das TEP und die c-Welle liefern wichtige Hinweise für die Interpretation der Ergebnisse der Glucagon-Behandlungen. Der Verlauf des TEPs inklusive der hier teilweise aufgetretenen Oszillationen ähnelt stark dem bei Glucagon-Behandlung. Auch der Rückgang der Amplitude der RPE c-Welle trat ebenfalls kurz nach Beginn der Glucagon-

Behandlung auf. Die Schlussfolgerungen aus diesen Beobachtungen werden im nächsten Kapitel eingehend erläutert.

Auch die Amplituden der raschen Wellen veränderten sich bei Forskolin-Behandlung. Dies deutet auf eine Aufnahme von Forskolin in die Zellen der neuronalen Netzhaut hin, da sich eine Erhöhung des cAMP-Spiegels auf die Aktivität vieler Ionenkanäle und -transporter auswirkt und somit auf die Komponenten des ERGs. Im Gegensatz zu den Versuchen mit hydrophilen Forskolin, wo diese Veränderungen nur bei der retinalen Behandlung zu beobachten waren, traten sie im Falls des lipophilen Forskolins auch bei Behandlung von der choroidalen Seite auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Forskolin auch die Zellen distal des RPEs in bedeutender Konzentration erreicht. Das RPE stellt also für die lipophile Form des Forskolins keine effektive Diffusionsbarriere dar und erfüllt für diese Substanz nicht die Funktion einer wirksamen Blut-Retina Schranke.

F.2 Wirkung von Glucagon auf das *in vitro* Präparat

F.2.1 Einführung

In seiner Funktion als Botenstoff im Glucose-Stoffwechsel ist Glucagon bereits seit langem bekannt. Bei steigendem Glucosebedarf des Organismus geben die α -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas Glucagon als Signal zur Gluconeogenese in das Blut ab. Erst durch die Wechselwirkung von Glucagon mit seinen spezifischen Rezeptor in der Zellmembran wird das Signal in das Zellinnere übertragen. Das Vorkommen eines solchen membranständigen Glucagon-Rezeptors ist seit langem für viele verschiedene Gewebe belegt und seine Struktur (z. B. Stryer, 1996) ist bereits aufgeklärt. Er spielt eine Schlüsselrolle im Glucose-Stoffwechsel. Wird der Rezeptor durch die Bindung von Glucagon aktiviert, regt dies die auf der Innenseite der Zellmembran sitzende Adenylat-Cyclase zur Produktion des „second messengers“ cAMP an. Über diesen können verschiedene biochemische Prozesse in den Zellen gesteuert werden, z. B. die Gluconeogenese. Wegen der Schlüsselfunktion des Glucagon-Rezeptors im Stoffwechsel gilt er als möglicher Ansatzpunkt für die Behandlung von Stoffwechselkrankheiten wie z. B. Diabetes (Brubaker & Drucker, 2002).

In den 70er Jahren verdichteten sich die Hinweise das Glucagon auch als neuronaler Botenstoff fungieren könnte. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass Glucagon ein Neuropeptid sein könnte, d. h. die Funktion eines Neurotransmitters oder –modulators haben könnte. Für das Gehirn konnte dies durch viele Untersuchungen bereits in den 80er Jahren belegt werden. In diese Zeit fallen auch die ersten Hinweise auf das Vorkommen von Glucagon und seiner Wirkung als Neuropeptid in der Netzhaut verschiedener Tierarten (z. B.: Longshore & Makman (1981) für Kaninchen, Ratte und Kalb; Schorderet *et al.* (1981) für die Taube und Bauer *et al.* (1985) für das Huhn). Vor einigen Jahren wurde Anzeichen gefunden, dass Glucagon an der Wachstumssteuerung des

Auges beteiligt sein könnte. Für die Netzhaut des Huhns konnte gezeigt werden, dass in glucagonergen Amakrinzellen der Expressionsfaktor ZENK (Synonyme: Egr-1 oder zif268) in Abhängigkeit des Vorzeichens der visuellen Stimulation, d. h. entweder Zerstreuungslinsen oder Sammellinsen vor dem Auge des Huhns, exprimieren (Fischer et al., 1999; Bitzer & Schaeffel, 2002). Wegen dieser vielfältigen Funktionen sind der Glucagon-Rezeptor und seine mögliche Beeinflussung durch Agonisten und Antagonisten weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

F.2.2 Versuchsspezifische Methoden für die Glucagon-Behandlungen

Folgende Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit einer jeweils unterschiedlichen Konzentration von Glucagon. Für jeden Versuch in den beiden Reihen wurde ein frisch hergestelltes Netzhautpräparat (Retina-RPE-Choroid Komplex) verwendet. Die Behandlungen erfolgten von der retinalen Seite des Präparats. Dazu wurde ein Aliquot des lyophilisierten Glucagons (Sigma, Deisenhofen) dem entsprechenden Volumen der physiologischen Lösung zugegeben, und dieses in ein separates Vorratsgefäß der Versuchsanlage gefüllt. Die erste Versuchsreihe bestand aus vier unabhängigen Versuchen, in denen die Präparate mit einer relativ hohen Glucagon-Konzentration von 3,2 μM behandelt wurden. Hierbei waren deutliche Veränderungen der elektrophysiologischen Signale aufgetreten. Es war ursprünglich angestrebt worden, durch gleichzeitigen Einsatz von Glucagon und eines spezifischen Antagonisten des Glucagonrezeptors zu klären, ob die beobachteten Effekte spezifische des Glucagons sind, d. h. ob sie durch die Bindung von Glucagon an spezifische Transmembran-Rezeptoren vermittelt werden. Zu einer wirksamen Blockierung des Rezeptors muss der spezifische Antagonist in einer vielfach höheren (i. d. R. 10-100fachen) Konzentration als der Agonist (hier Glucagon) eingesetzt werden. Da solche Peptid-Antagonisten überdies recht teuer sind, sollte in einer zweiten Versuchsreihe untersucht werden, ob die Auswirkungen der Glucagon-Behandlung nicht auch bei einer

deutlich geringeren Konzentration sichtbar würden. In fünf Versuchen wurden die Präparate mit Glucagon in einer Konzentration von 0,1 μM behandelt.

Aus den Aufzeichnungen der lichtinduzierten Antworten wurden von jedem Versuch aus beiden Versuchsreihen sieben Phasen (I-VII) ausgewertet. Aus der Betrachtung der vollständigen Aufzeichnungen des *in vitro* ERGs und seiner beiden Komponenten (TRP und TEP) hatte sich gezeigt, dass die jeweiligen Signale bei noch andauernder Glucagon-Behandlung bereits eine deutliche Tendenz zur Erholung zeigten. Um für die Darstellung der Vorgänge während der Behandlung eine bessere zeitliche Auflösung zu erhalten, wurde eine dichtere Folge der Versuchsphasen während der Behandlung gewählt, d. h. statt zwei wurden drei Versuchsphasen im Behandlungszeitraum ausgewertet, dafür wurde auf eine Versuchsphase nach dem Ende der Behandlung verzichtet. Für die Darstellung der Veränderungen der lichtinduzierten Antworten wurden also folgende sieben Versuchsphasen herangezogen:

- I und II als Kontrollen, 30 bzw. 5 min vor Beginn der Behandlung,
- III, IV und V während der Behandlung, 5, 15-20 min bzw. 35 min nach Behandlungsbeginn,
- VI und VII als Kontrollen 15 bzw. 45 min nach Ende der Behandlung.

Die Entwicklung der Bestandspotenziale wird in zwei Serien von Abbildungen über jeweils 50 Iterationen mit einem Messwert pro Iteration dargestellt. Die erste Serie zeigt die Bestandspotenziale um den Beginn der Glucagon-Behandlung. Die ersten 20 Messungen (Iterationen) wurden vor Beginn der Behandlung und weitere 30 Messungen während dieser aufgezeichnet. Die zweite Serie gibt den Verlauf um das Ende der Behandlung wieder. Die ersten 20 Werte wurden während der Behandlung, weitere 30 nach deren Ende registriert.

In beiden Serien wurde eine eventuell aufgetretene Drift in den Kurven folgendermaßen korrigiert: Aus den ersten 20 dargestellten Messpunkten des betreffenden Versuchs der jeweiligen Serie wurde eine Regressionsgerade berechnet, und diese als Korrekturfaktor für alle 50 dargestellten Werte des

selben Versuchs verwendet. In der zweiten Versuchsreihe (Glucagon 0,1 μM) wurden mittels eines kalzium-selektiven Harzes (Calcium-Ionophore I – Cocktail A, Fluka Chemie, Neu Ulm) im zweiten Kanal der Glasmikroelektrode Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration gemessen. Das Bestandspotenzial dieses kalzium-selektiven Kanals der Mikroelektrode driftete häufig stark. Um es im technisch vorgegebenen Messbereich zu halten, musste die Drift dieses Kanals oft während des laufenden Versuchs durch Regelung am Vorverstärker kompensiert werden. Dieser Vorgang wird hier als Offset bezeichnet. Diese Offsets im Bestandspotenzial des kalzium-selektiven Kanals wurden für die Darstellung der Ergebnisse durch Subtraktion des Offset-Betrags von den nachfolgenden Werten korrigiert.

F.2.3 Ergebnisse der Glucagon-Behandlungen

F.2.3.2 Änderungen in den Bestandspotenzialen und der extrazellulären Kalziumkonzentration

Die Verabreichung von Glucagon über die retinale Superfusion löste deutliche Reaktionen in bestimmten Bestandspotenzialen aus. Die Veränderungen der Bestandspotenziale im Zuge der Glucagon-Behandlung waren bei beiden verwendeten Konzentrationen (0,1 und 3,2 μM) gleichartig. Im Fall der höheren Konzentration zeigte sich ein Trend zu deutlich stärkeren Effekten als bei der geringeren Konzentration. Die Amplituden der unten beschriebenen Oszillationen zu Beginn und nach Ende der Behandlung, die vor allem im TTP und im TEP zum Vorschein kamen, fielen bei der höheren Konzentration bis zu viermal größer aus. Da sich aus dem Vergleich der Wirkungen der beiden Glucagon-Konzentrationen auf die Bestandspotenziale nur quantitative aber keine qualitativen Unterschiede ergaben, werden hier nur die Ergebnisse der Behandlungen mit der niedrigeren Konzentration (0,1 μM) dargestellt.

Im Gesamt-Bestandspotenzial (TTP) trat in den meisten Versuchen nach Beginn der Behandlung eine Oszillation auf, bei 0,1 μM Glucagon in vier von fünf Versuchen und bei 3,2 μM in allen vier Versuchen. Das Potenzial nahm kurz nach Einsetzen der Behandlung vorübergehend deutlich ab. Weniger als

10 min später begann es stark anzusteigen, fast immer bis über das Ausgangsniveau vor Beginn der Behandlung hinaus (Abbildung F.71). Nach dem Ende der Behandlung kam es erneut zu einer Oszillation, allerdings mit umgekehrten Vorzeichen. Das Bestandspotenzial wuchs für wenige Minuten teilweise stark an (in den Versuchen 1 und 5 bei $0,1 \mu\text{M}$ Glucagon nur geringfügig). Spätestens nach gut 10 min nach der Einstellung der Behandlung setzte jedoch seine Abnahme ein. Binnen weiterer 10 min fiel es dabei unter den Ausgangswert (Abbildung F.72).

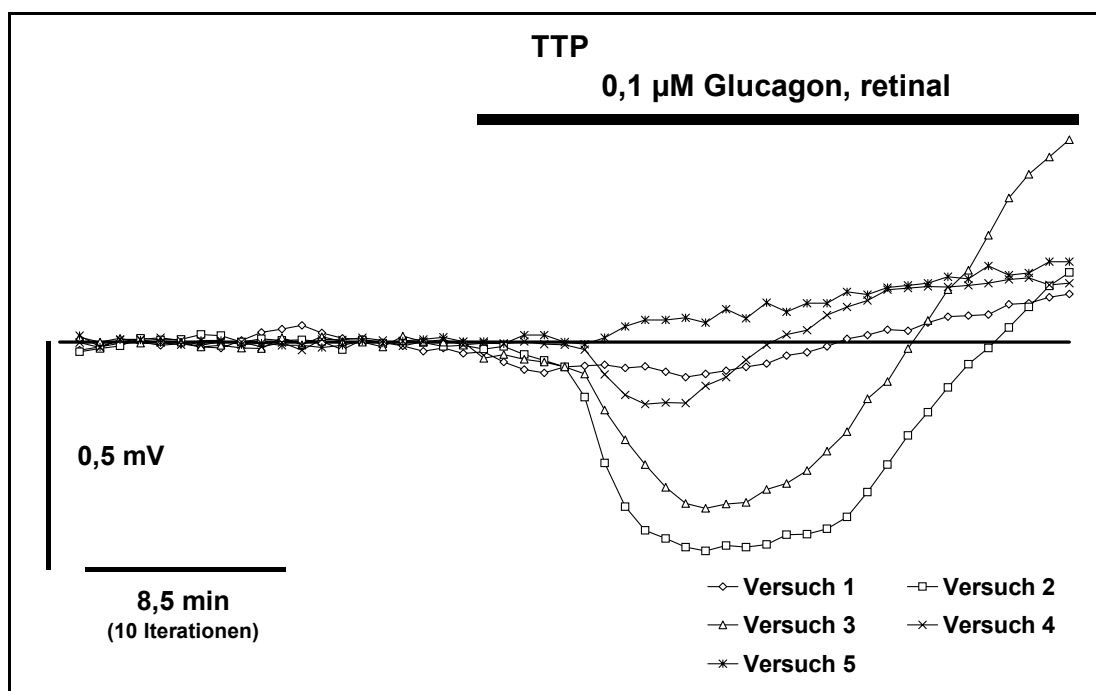


Abbildung F.71 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Glucagon ($0,1 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats, über eine in vier Versuchen erkennbare Oszillation zu Beginn der Behandlung kam es mittelfristig in allen Versuchen zu einem deutlichen Anstieg des TTPs.

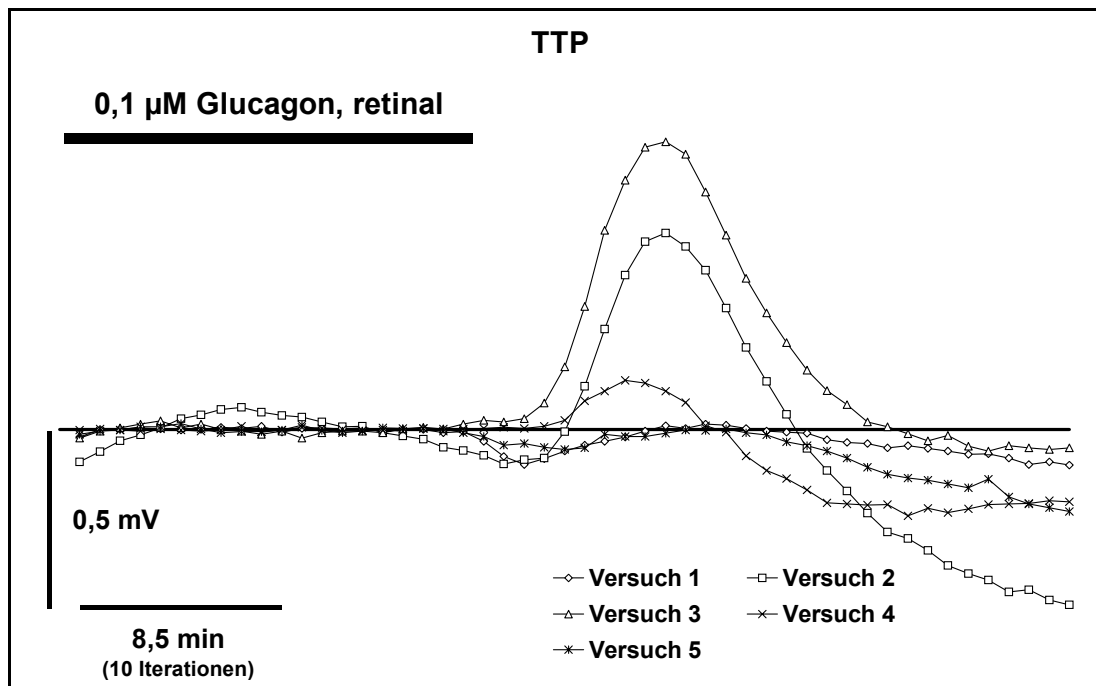


Abbildung F.72 Verlauf des Gesamt-Bestandspotenzials (TTP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Glucagon (0,1 µM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In vier Versuchen trat eine deutliche Oszillation des TTPs nach der Beendigung der Behandlung auf.

Die Analyse der Komponenten des TTPs ergab, dass die beschriebenen Effekte maßgeblich durch Veränderungen im TEP bewirkt worden waren. Denn der Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials entsprach dem des TTPs (s. o.). Sowohl während (Abbildung F.73) als auch nach (Abbildung F.74) der Behandlung mit Glucagon konnten dieselben Oszillationen beobachtet werden wie beim TTP, d. h. dass deren Ursache in der Wirkung des Glucagons auf den transepithelialen Bereich, z. B. das RPE zu suchen sein sollte.

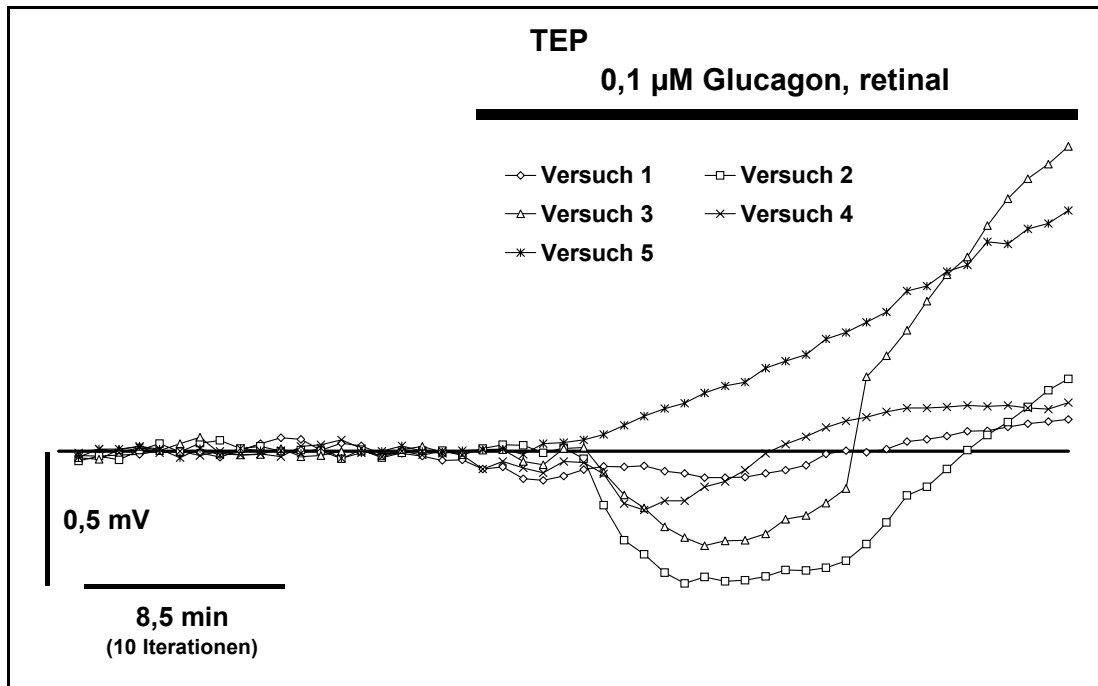


Abbildung F.73 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Glucagon (0,1 μ M) von der retinalen Seite des Präparats, erkennbar sind eine Oszillation und ein auf diese folgender Anstieg des TEPs nach Beginn der Behandlung (der Verlauf des TEPs bestimmte den des TTPs s. o.).

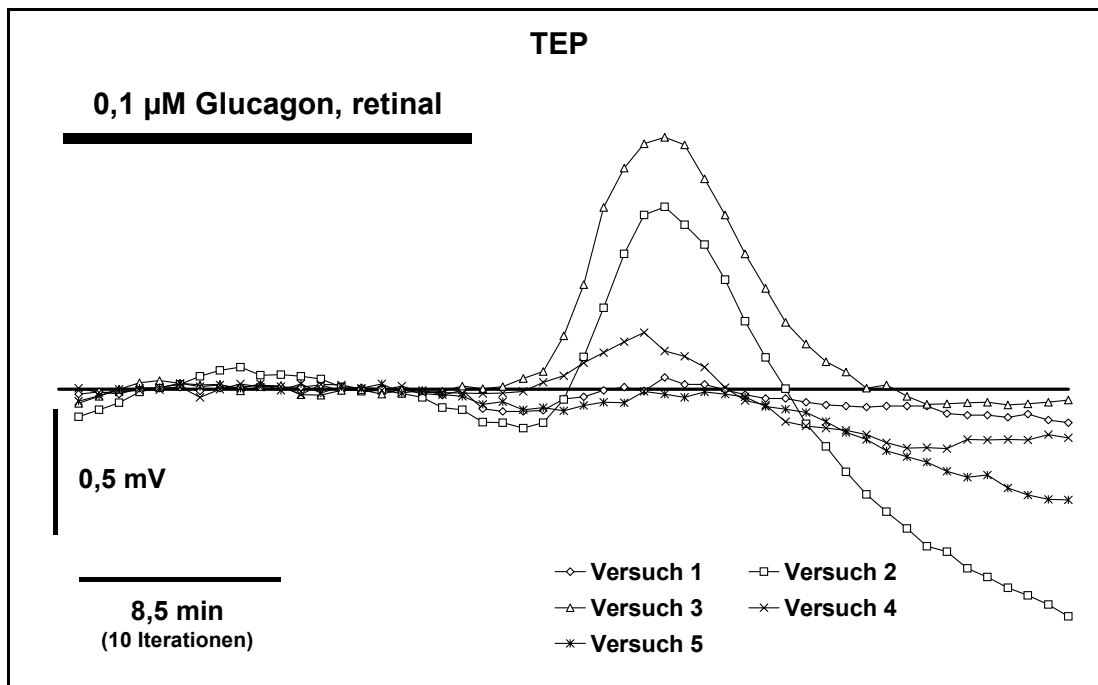


Abbildung F.74 Verlauf des transepithelialen Bestandpotenzials (TEP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Glucagon (0,1 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Auf die Beendigung der Behandlung folgte in drei Versuchen eine deutliche Oszillation des TEPs und eine schwächere in Versuch 1.

Die Reaktionen des TRP auf Beginn und Ende der Behandlung waren im Fall beider Glucagon-Konzentrationen nicht einheitlich. Kurz nach Beginn der Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ Glucagon zeigte das TRP in den Versuchen 2 und 3 eine schwache Oszillation und in Versuch 5 verringerte es sich deutlich (Abbildung F.75). Nach dem Ende der Behandlung nahm das TRP in den Versuchen 2 und 5 zu. Überdies trat in den Versuchen 2 und 3 eine Oszillation auf (Abbildung F.76).

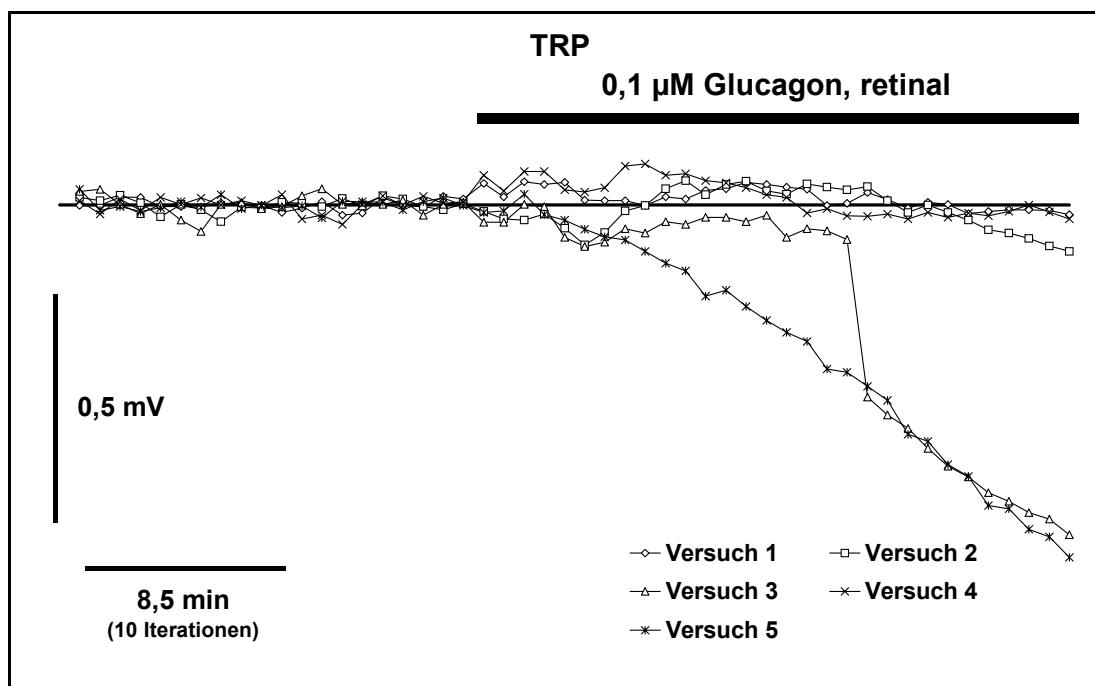


Abbildung F.75 Verlauf des transretinalen Bestandspotenzials (TRP): 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Glucagon ($0,1 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats, das TRP nahm nach Beginn der Behandlung nur in Versuch 5 deutlich ab. Überdies traten schwache Oszillationen in Versuch 2 und 3 auf.

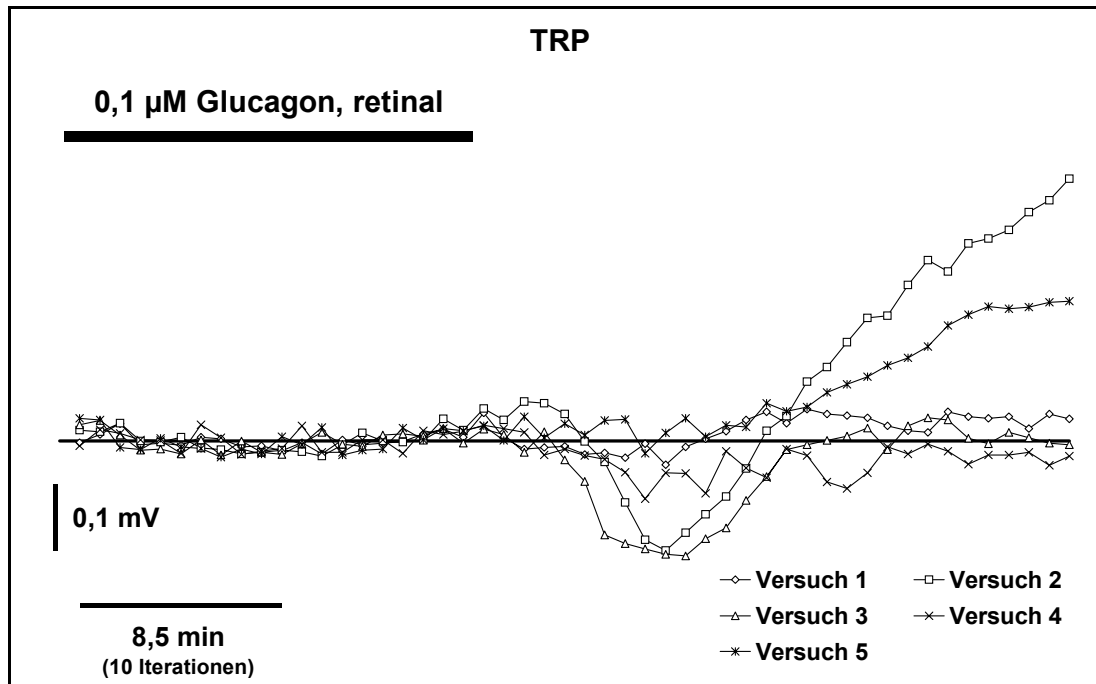


Abbildung F.76 Verlauf des transretinalen Bestandpotenzials (TRP): 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Glucagon (0,1 µM) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. Das TRP reagierte nicht einheitlich auf das Behandlungsende (in zwei Versuchen trat eine Oszillation auf).

Der Verlauf von Vion belegt, dass die Behandlung mit 0,1 µM Glucagon in den meisten Versuchen zu Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration im Bereich um der OLM (Position der Glasmikroelektrode), d. h. über dem SRS, führte. Nach Beginn der Behandlung änderte sich in vier von fünf Versuchen die extrazelluläre Kalziumkonzentration deutlich wenn auch nicht einheitlich (Abbildung F.77). In den Versuchen 2 und 5 stieg sie an, während sie in den Versuchen 3 und 4 zumindest mittelfristig zurückging. In Versuch 1 blieb sie dagegen fast unverändert. Kurz nach Einsetzen der Behandlung zeigte sich in den Versuchen 2 und 3 sogar eine Oszillation mit einer kleinen negativ ausgerichteten Amplitude auf. Nach dem Ende der Behandlung nahm Vion, d. h. die extrazelluläre Kalziumkonzentration, in nahezu allen Versuchen zu, nur in Versuch 5 verringerte sie sich geringfügig (Abbildung F.78).

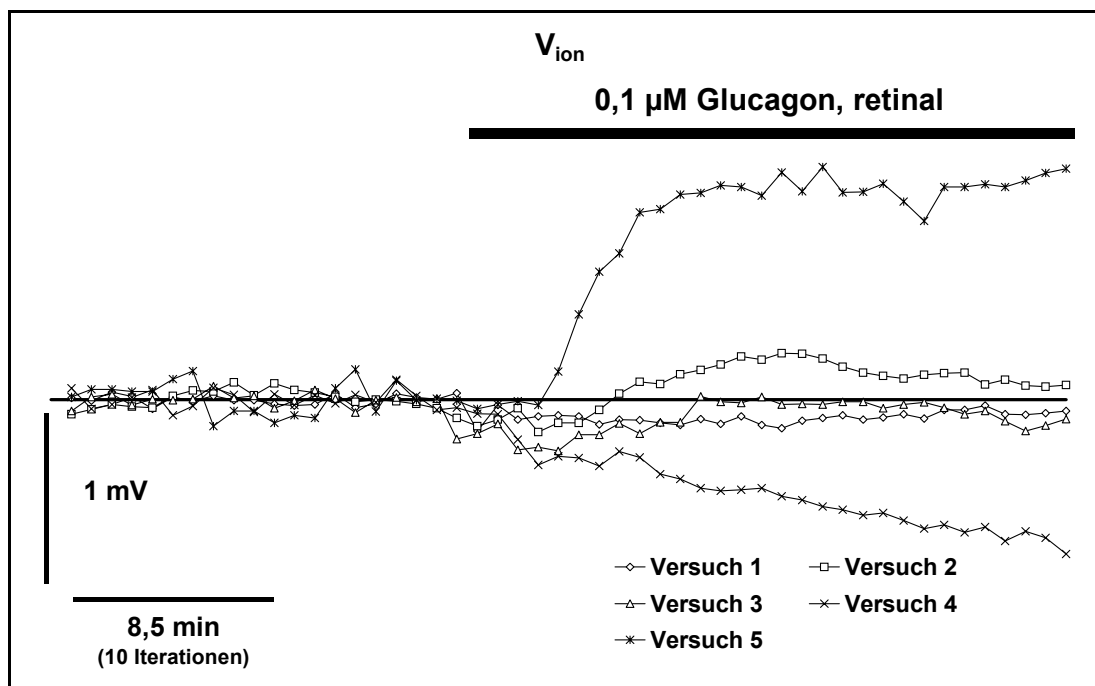


Abbildung F.77 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen vor und 30 während der Behandlung mit Glucagon (0,1 μ M) von der retinalen Seite des Präparats. Die Veränderungen von V_{ion} waren meist deutlich aber nicht einheitlich.

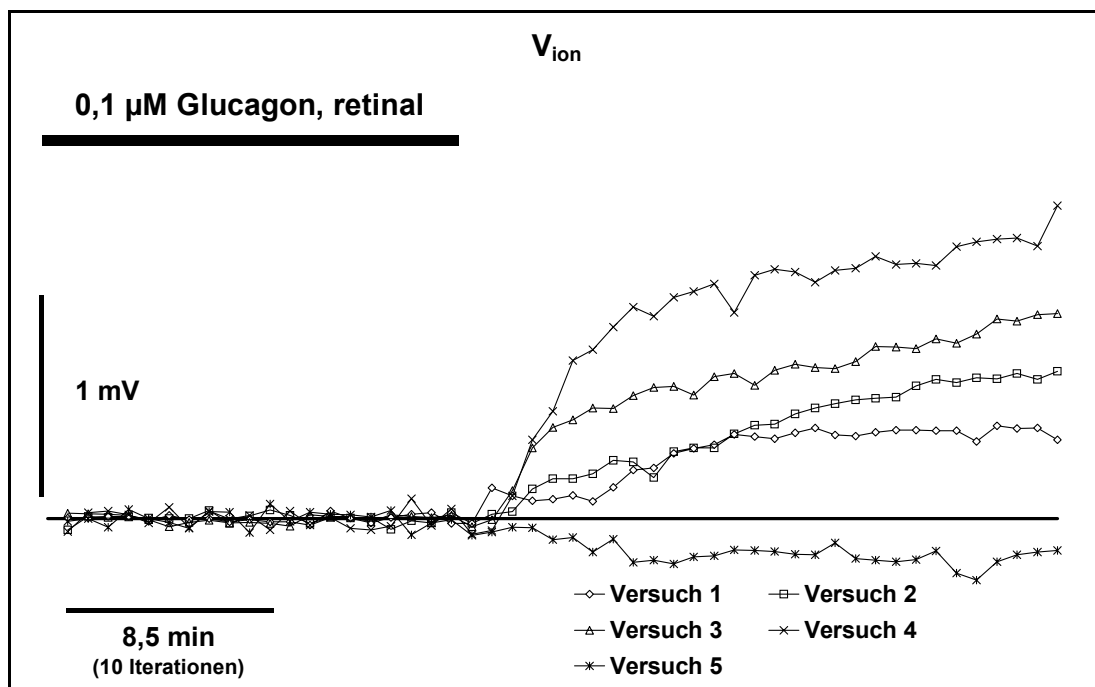


Abbildung F.78 Verlauf des Potentials (V_{ion}) der kalziumsensitiven Elektrode als Indikator für Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration: 20 Iterationen während der retinalen Behandlung mit Glucagon (0,1 μ M) und 30 Iterationen nach dem Ende der Behandlung. In vier von fünf Versuchen ist wenige Minuten nach dem Behandlungsende ein deutlicher Anstieg erkennbar.

F.2.3.3 Effekte von Glucagon auf die lichtinduzierten Signale des in vitro Präparats

Die Daten in den weiteren Abbildungen wurden wie im Kapitel B Material und Methoden beschrieben aufgezeichnet und ausgewertet. Die folgenden Abbildungen (Abbildung F.79 bis Abbildung F.81) geben den Verlauf des Gesamt-ERG (TTP) und seiner beiden Komponenten, dem TRP und dem TRP, in den vier Versuchen der ersten Versuchsreihe (3,2 μM Glucagon) über die sieben dargestellten Versuchsphasen (I-VII, s. o. für Erläuterungen) wieder. Die Kurven im Teil B jeder Abbildung zeigen die Differenzen zwischen den Versuchsphasen für das entsprechende Potenzial. Von der zweiten Versuchsreihe (0,1 μM Glucagon) mit ihren fünf Versuchen werden nur die Kurven vom TTP mit den Differenzen zwischen den sieben Versuchsphasen abgebildet (Abbildung F.82). Auf die Wiedergabe der Aufzeichnungen des TRPs und des TEPs wird hier verzichtet. Denn diese Form der Darstellung dient nur der Übersicht über den Versuchsverlauf und ermöglicht erste qualitative Aussagen über eventuelle Veränderungen der lichtinduzierten Signale. Aus dieser Gesamtdarstellung der 12,5 s langen Aufzeichnungen und ihrer Differenzen lassen sich wegen der geringen Auflösung vor allem im Fall der raschen Wellen, d. h. a-, b- und d-Welle, Veränderungen ihrer Amplituden meist nicht eindeutig bestimmen. Daher werden im nächsten Abschnitt die Amplituden der jeweiligen Wellen gesondert ausgewertet. Mittels eines dort beschriebenen Verfahrens wird die Entwicklung dieser Amplituden über den Versuchsverlauf sichtbar gemacht.

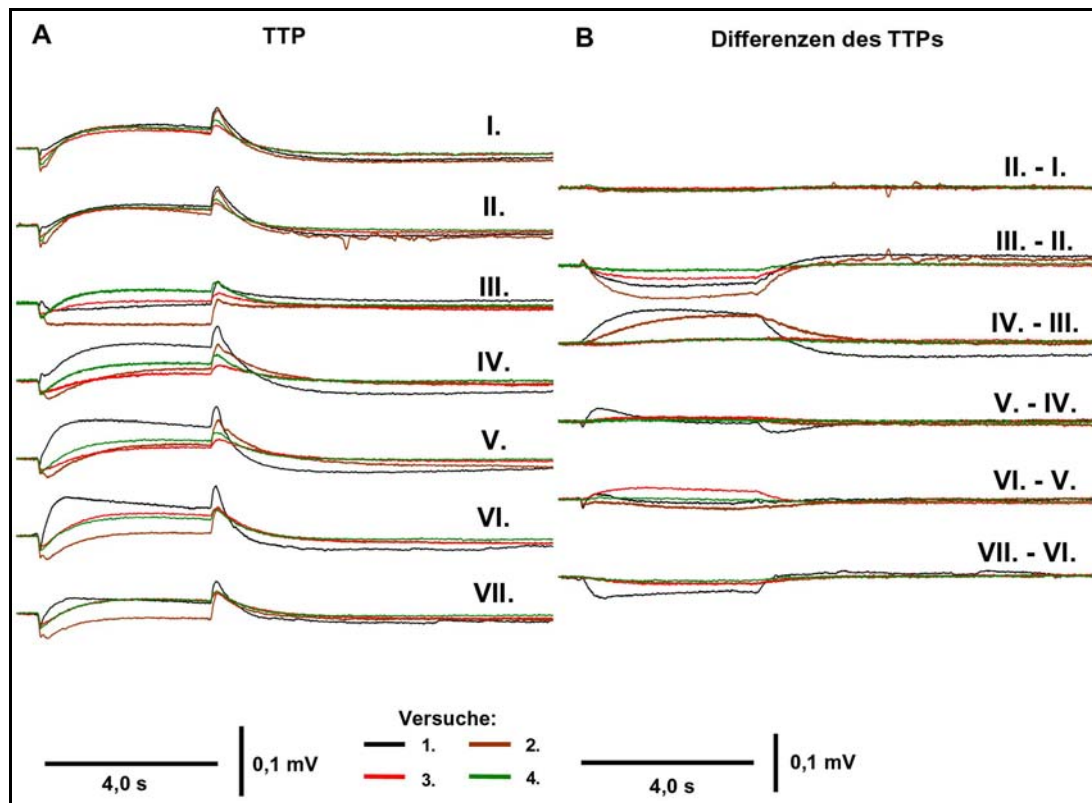


Abbildung F.79 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen das Präparat von der retinalen Seite mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. bis V., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, in drei Versuchen ist ein deutlicher Rückgang der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Glucagon (III. - II.) erkennbar.

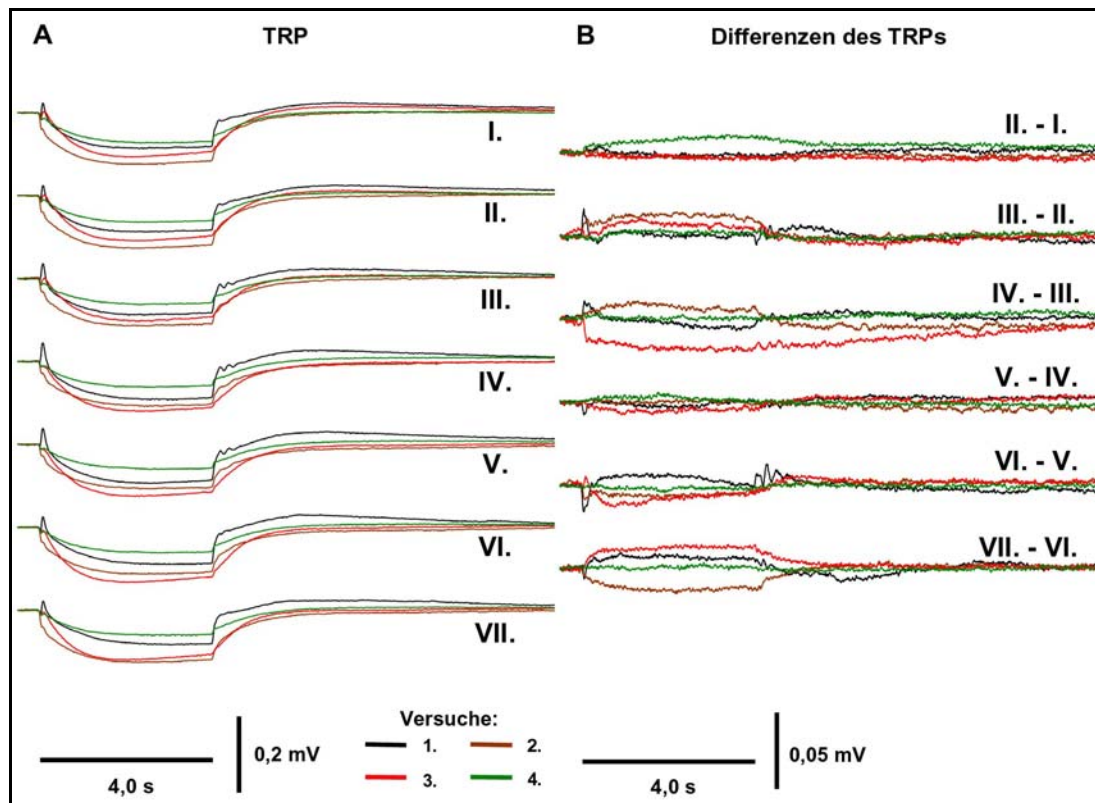


Abbildung F.80 **A (linke Hälfte):** TRPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen das Präparat von der retinalen Seite mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TRPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. bis V., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TRPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, erkennbar ist die Abnahme der negativen Amplitude der Komponente der c-Welle des TRPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Forskolin (III. - II., positive Differenz).

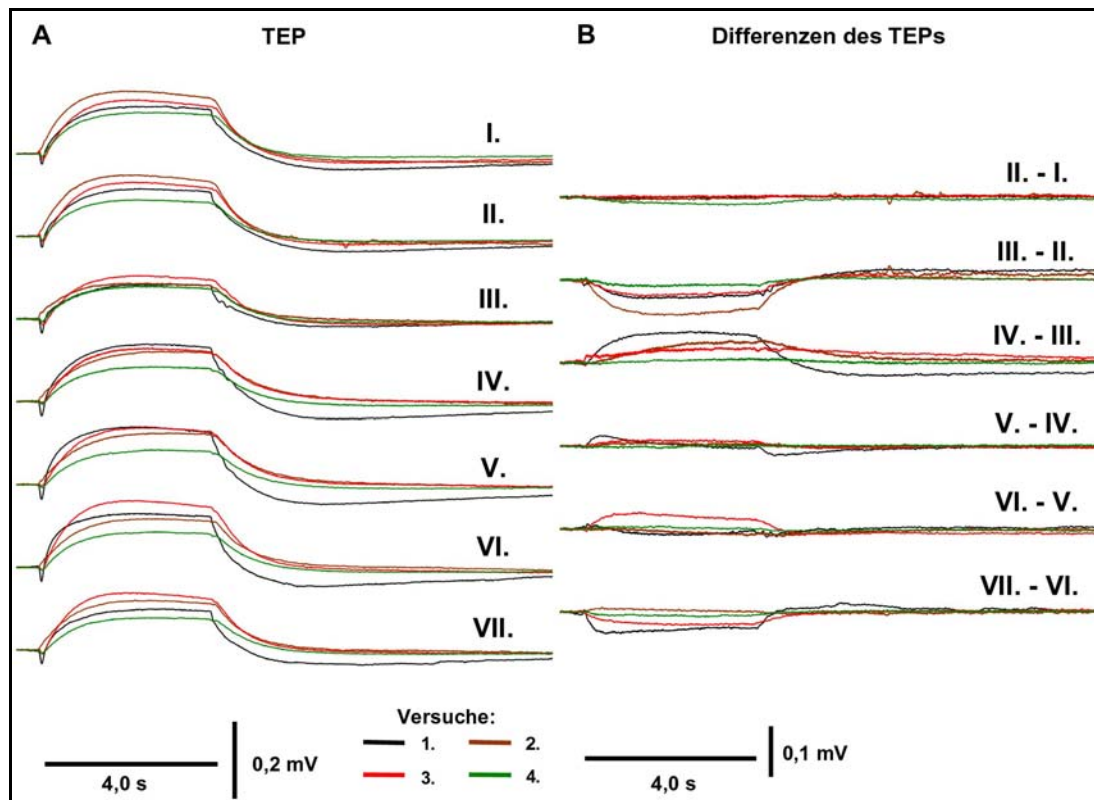


Abbildung F.81 **A (linke Hälfte):** TEPs aus einer Reihe von 4 Experimenten, in denen das Präparat von der retinalen Seite mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TEPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. bis V., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TEPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, deutlich erkennbar: Ein starker Rückgang der Amplitude der Komponente der c-Welle des TEPs nach 15 min Einwirkungsdauer von Glucagon (III. - II.) und anschließend die noch während der Behandlung erfolgende starke Erholung dieser Komponente (IV. - III.).

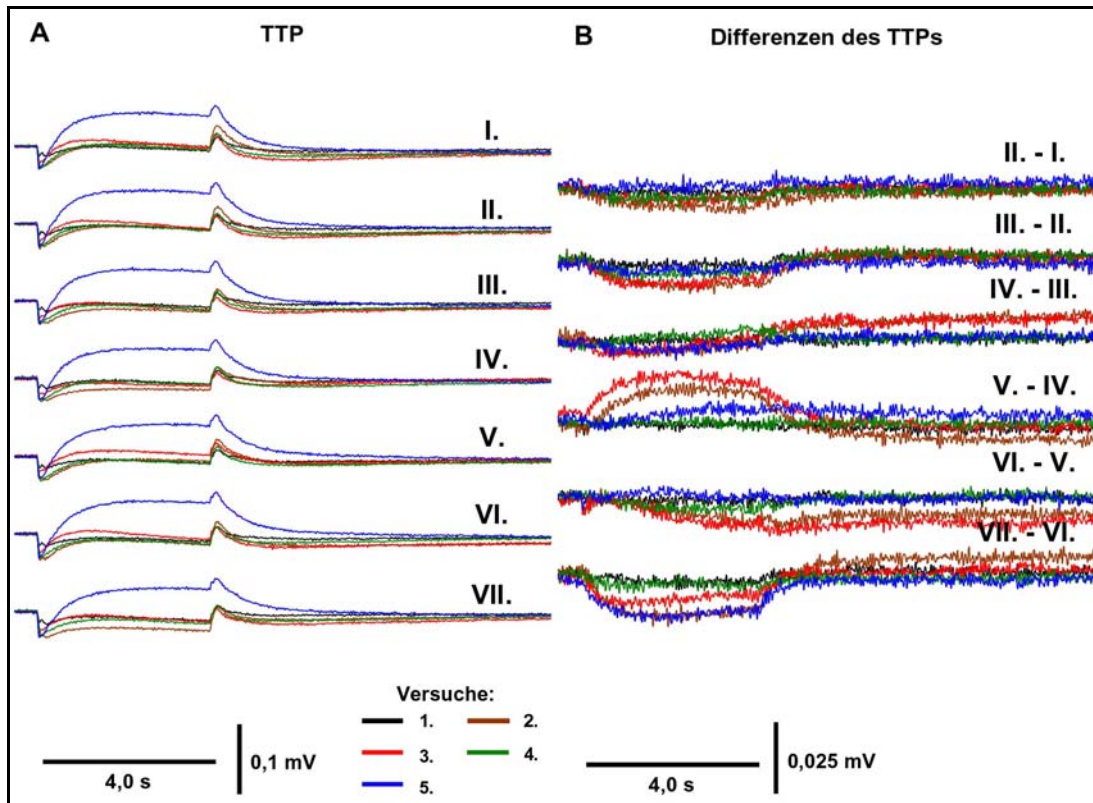


Abbildung F.82 **A (linke Hälfte):** TTPs aus einer Reihe von 5 Experimenten, in denen das Präparat von der retinalen Seite mit Glucagon ($0,1 \mu\text{M}$) behandelt wurde. Die TTPs sind dargestellt in einer Abfolge von sieben aufeinander folgenden Versuchsphasen (I. bis VII., Behandlung während III. bis V., Erläuterungen im Text); **B (rechte Hälfte):** Differenzbeträge zwischen den TTPs der nachfolgenden und der jeweils vorherigen Versuchsphase für das entsprechende Experiment, es wird ein Rückgang der Amplitude der c-Welle nach 15 min Einwirkungsdauer von Glucagon (III. – II.) deutlich, dem sich im noch späteren Verlauf der Behandlung eine Erholung anschließt (V. – IV.).

a) Veränderungen der lichtinduzierten Amplituden bei Glucagon-Behandlung

Wegen teilweise großer Unterschiede im Betrag der Amplituden zwischen den einzelnen Versuchen wurde auf eine Darstellung der Amplituden verzichtet. Stattdessen wurden sie nach folgendem Verfahren in Bezug zur Versuchsphase II (Kontrolle, 5 min vor Beginn der Behandlung) gesetzt. Dazu wurde die jeweilige Differenz zwischen den Amplituden der verschiedenen Wellen in jeder Versuchsphase und in der Phase II berechnet. Somit ergibt sich für die Versuchsphase II ein Wert von Null. Die Werte für die übrigen Versuchsphasen zeigen dann die Abweichung der Amplitude in der jeweiligen Phase von dem in der Phase II gemessenen Wert der Amplitude. Im Falle der

a-Welle ist zu berücksichtigen, dass ihre Amplitude ein Minimum in der aufgezeichneten Kurve bildet. Daher bedeutet eine positive Differenz für die a-Welle in einer bestimmten Versuchsphase eine Abnahme ihrer Amplitude bezogen auf die Versuchsphase II, eine negative Differenz dagegen eine Zunahme. Dasselbe gilt für die langsame Welle (Komponente der c-Welle) im TRP.

Effekte von Glucagon auf die langsame c-Welle

Im Fall der höheren Konzentration von Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) hatte sich die Amplitude der c-Welle schon 5 min nach Beginn der Behandlung (Versuchsphase III) in allen vier Versuchen deutlich verringert (Abbildung F.83). Diese Reduktion wurde durch eine entsprechende Abnahme der Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP verursacht, wie die Betrachtung der beiden Komponenten im TRP und im TEP ergab (Abbildung F.84 und Abbildung F.85). Noch während der Behandlung (Versuchsphase IV und V) stieg die Amplitude der Komponente im TEP und damit auch die c-Welle wieder auf das Niveau um den Ausgangswert (Phase II) an.

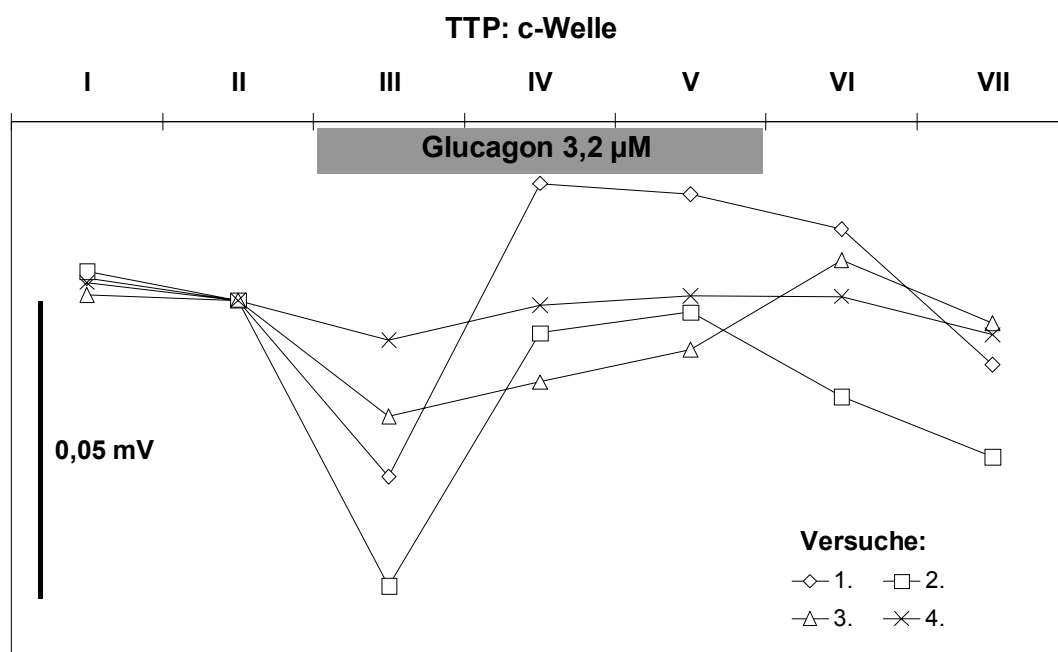


Abbildung F.83 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats zeigte sich ein Rückgang der Amplitude der c-Welle, der noch während der Behandlung (IV und V) durch einen Anstieg kompensiert wurde.

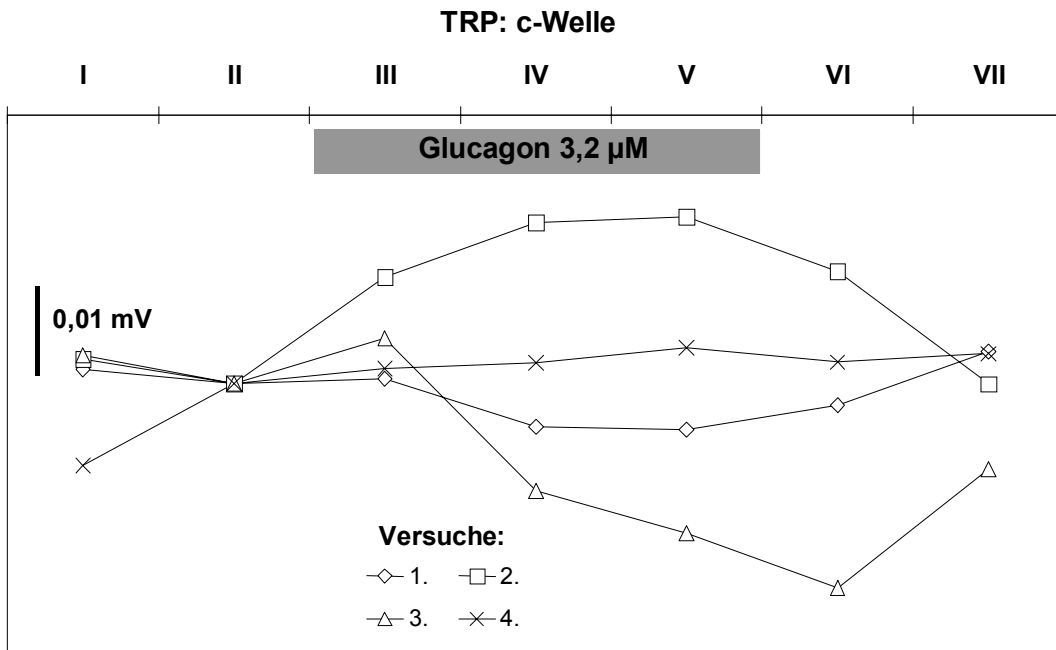


Abbildung F.84 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (3,2 µM) von der retinalen Seite des Präparats kam es nur im Versuch 2 zu einer Veränderung der Amplitude.

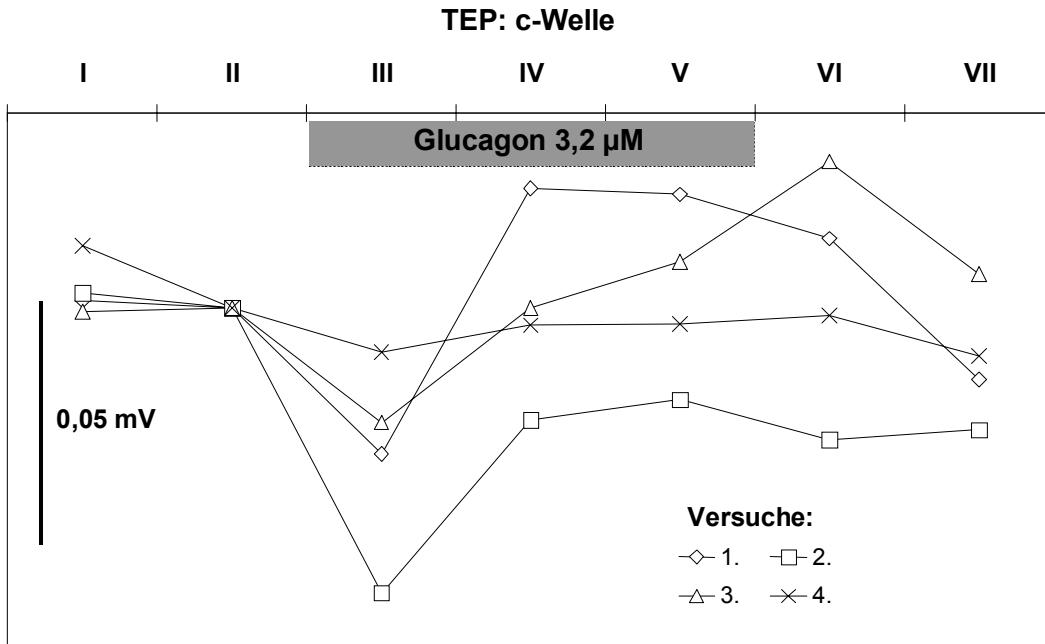


Abbildung F.85 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (3,2 µM) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP in drei Versuchen deutlich ab und stieg während der Behandlung (IV und V) wieder an.

In den Experimenten mit der niedrigeren Konzentration von Glucagon ($0,1 \mu\text{M}$) zeigten sich ähnliche Effekte auf die c-Welle; in vier von fünf Versuchen hatte die Amplitude der c-Welle bereits nach 5 min Behandlung abgenommen (Abbildung F.86). Auf ersten Blick scheint dies nur eine Fortsetzung des schon im Kontrollzeitraum (Versuchsphase I und II) vorherrschenden Trends zu sein, dabei ist aber zu berücksichtigen ist, dass der zeitliche Abstand zwischen Versuchsphase I und II ca. 25 min betrug, während er zwischen Versuchsphase II und III bei ca. 10 min lag. Somit wurde der Trend im Kontrollzeitraum durch den Beginn der Behandlung deutlich verstärkt. In drei Fällen ging dies auf eine Verringerung der Komponente der c-Welle im TEP zurück (Abbildung F.87). Der Rückgang der Amplituden fiel bei der niedrigeren Konzentration wesentlich geringer. Er betrug hier nur ca. ein Fünftel der bei der höheren Konzentration beobachteten Abnahme. Auch bei $0,1 \mu\text{M}$ Glucagon entwickelten sich die reduzierten Amplituden schon während der Behandlung ungefähr auf ihren Ausgangswerts (Versuchsphase II) zurück. Allerdings trat dies später zum Vorschein als bei der Behandlung mit der höheren Konzentration, nämlich erst in Versuchsphase V (35 min Behandlung) statt in Phase IV (15-20 min Behandlung).

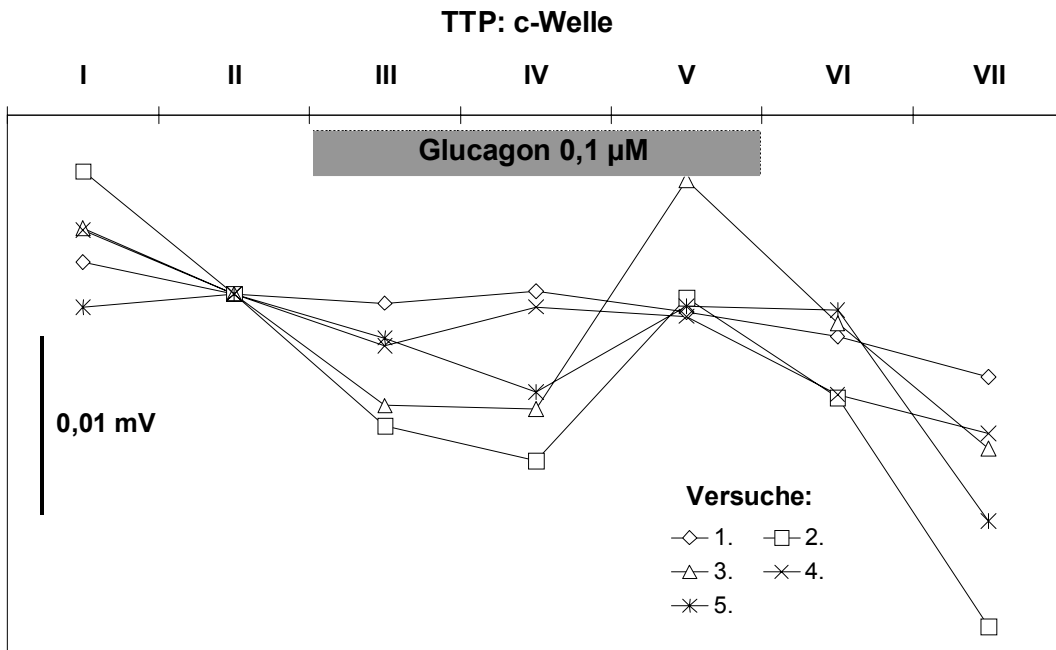


Abbildung F.86 Differenzen der Amplituden der c-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Unmittelbar nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (0,1 µM) von der retinalen Seite des Präparats zeigte sich in vier Versuchen ein Rückgang der Amplitude der c-Welle, auf dem noch während der Behandlung (IV und V) ein Wiederanstieg folgte.

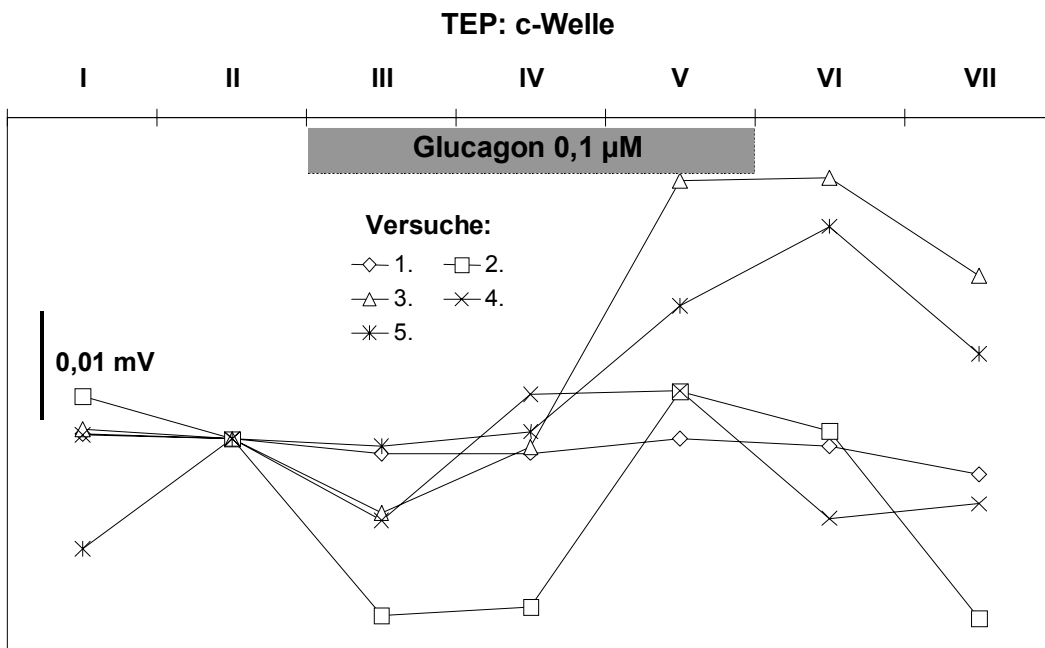


Abbildung F.87 Differenzen der Amplituden der Komponente der c-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (0,1 µM) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude der Komponente der c-Welle im TEP in drei von fünf Versuchen deutlich ab.

Wirkung von Glucagon auf die raschen Wellen

Die Amplitude der a-Welle im *in vitro* ERG (TTP) nahm bei Behandlung des Netzhautpräparats mit 3,2 μM Glucagon in zwei von vier Versuchen ab (Abbildung F.88). Da die Amplitude der a-Welle negativ ausgerichtet ist, zeigt eine positive Amplitudendifferenz zur Versuchsphase II eine Verringerung der Amplitude an. In den anderen beiden Versuchen traten keine oder nur eine sehr geringe Veränderungen auf. Die in zwei Fällen beobachtete Abnahme der Amplitude im TTP ist auf den deutlichen Rückgang der Komponente der a-Welle des TRPs zurückzuführen, wie die Analyse der beiden Komponenten (TRP und TEP) ergab (Abbildung F.89 und Abbildung F.90). Mit dem Ende der Behandlung (Versuchsphasen VI und VII) stiegen in beiden Fällen die Amplituden wieder an, beim TRP bis auf Ausgangswert und beim TTP sogar darüber hinaus.

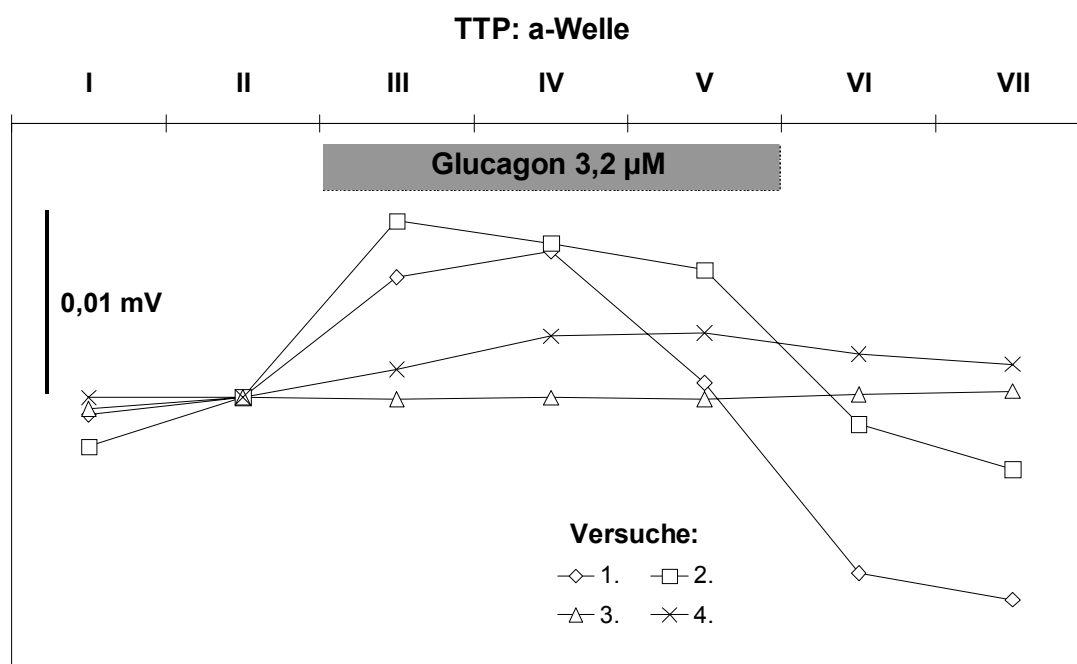


Abbildung F.88 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (3,2 μM) von der retinalen Seite des Präparats ging die Amplitude in den Versuchen 1 und 2 zurück (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

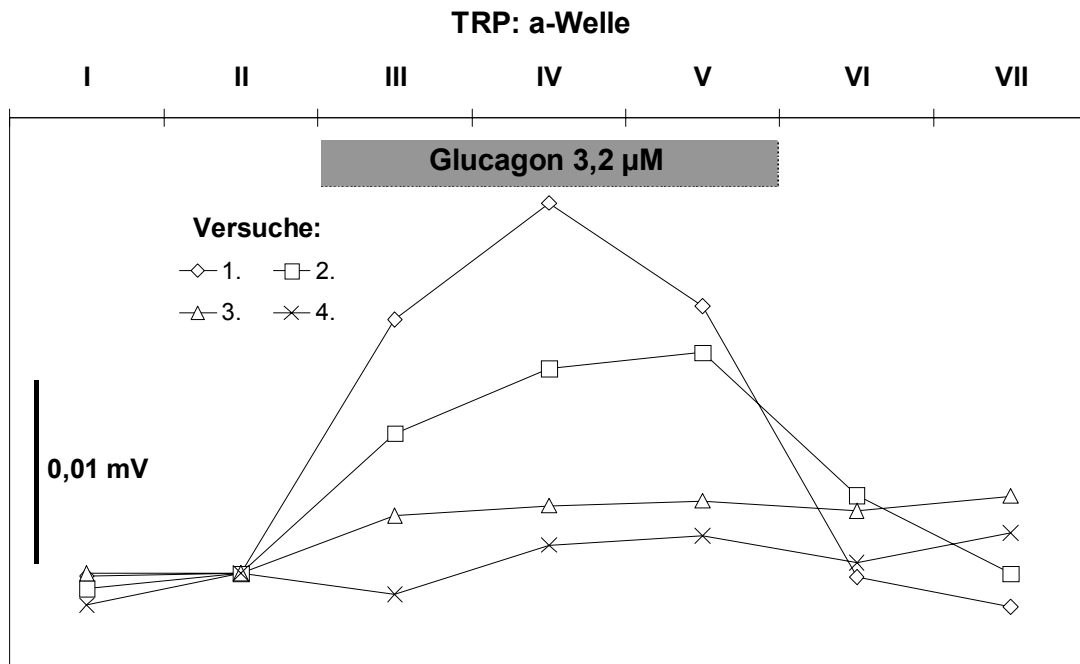


Abbildung F.89 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude in den Versuchen 1 und 2 stark ab (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

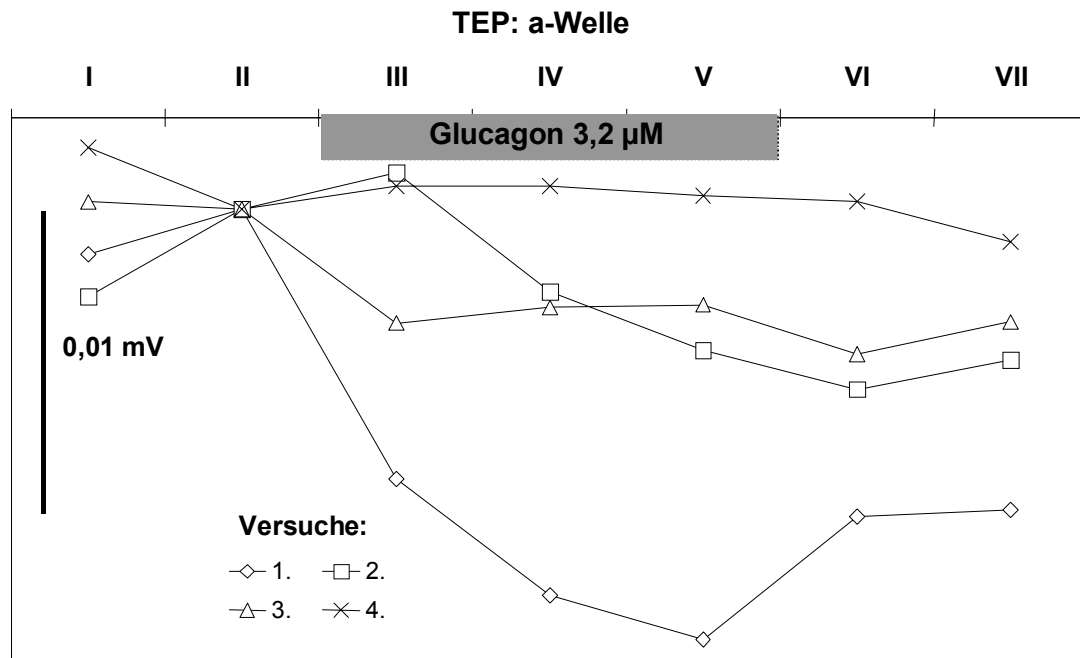


Abbildung F.90 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats ging die Amplitude in zwei Versuchen deutlich zurück.

In der zweiten Versuchsreihe ging nach Beginn der Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ Glucagon die Amplitude der a-Welle in allen fünf Versuchen zurück, in den meisten Fällen jedoch nur geringfügig (Abbildung F.91). Da diese Abnahme aber eine deutliche Veränderung des zwischen den Kontrollphasen I und II registrierten Trends darstellt, dürfte sie trotz ihres geringen Ausmaßes ein Effekt der Glucagon-Behandlung sein. In drei Versuchen (Versuche 2, 3 und 5) wurde dieser Rückgang eindeutig durch eine entsprechende Verringerung der Amplitude der Komponente im TRP verursacht (Abbildung F.92). In denselben drei Versuchen zeigte sich nach dem Ende der Behandlung (Versuchsphasen VI und VII) oder bereits kurz davor (Versuchsphase V) eine Zunahme der Amplituden sowohl der a-Welle wie auch ihrer Komponente im TRP.

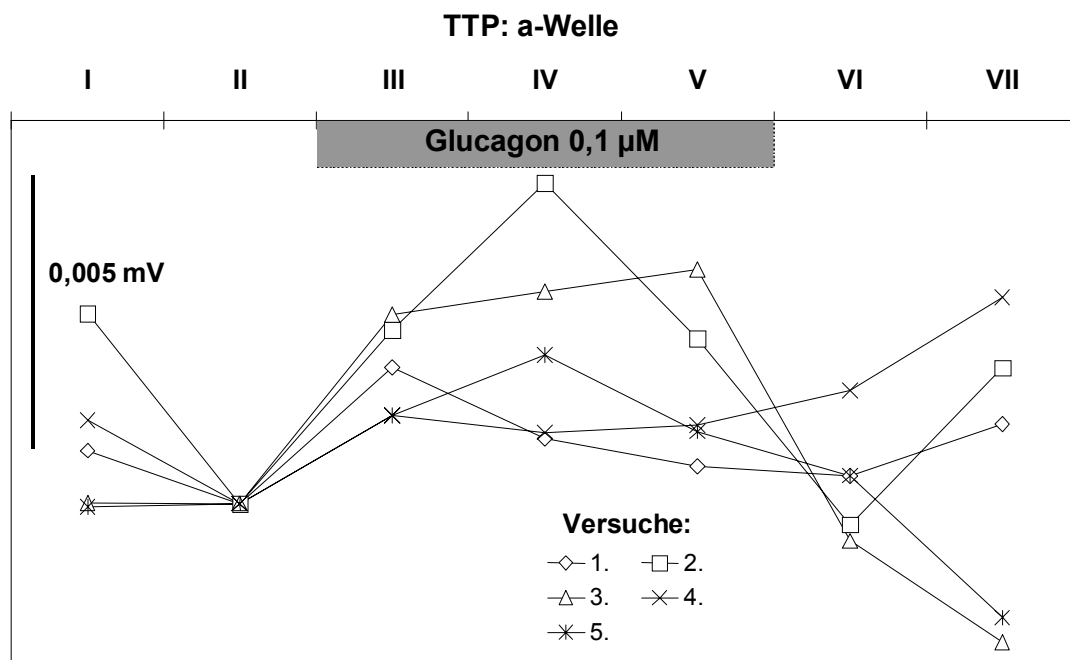


Abbildung F.91 Differenzen der Amplituden der a-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Unmittelbar nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon ($0,1 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats sank die Amplitude ab, in den meisten Versuchen jedoch nur im geringen Umfang (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

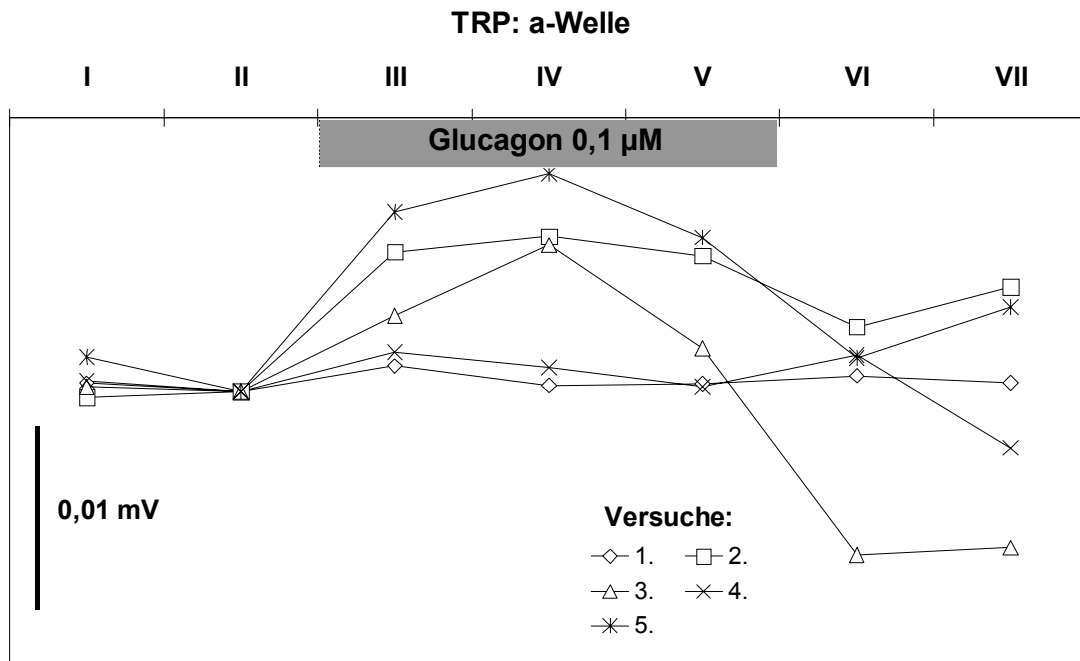


Abbildung F.92 Differenzen der Amplituden der Komponente der a-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) Glucagon (0,1 µM) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude ab, in drei Versuchen aber nur geringfügig (positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

Die Amplitude der b-Welle wies nach Beginn der Behandlung mit der höheren Glucagon-Konzentration (3,2 µM) nur in zwei Versuchen eine deutliche Zunahme aus (Abbildung F.93), und zwar in denselben in denen schon die Amplitude der a-Welle abgenommen hatte. Dieser Anstieg war auf einen Zuwachs der Komponente der b-Welle im TRP zurückzuführen (Abbildung F.94), der die gleichzeitige Vergrößerung der negativen Komponente im TEP (Abbildung F.95) übertraf, so dass sich in der Summe die Amplitude der b-Welle vergrößerte.

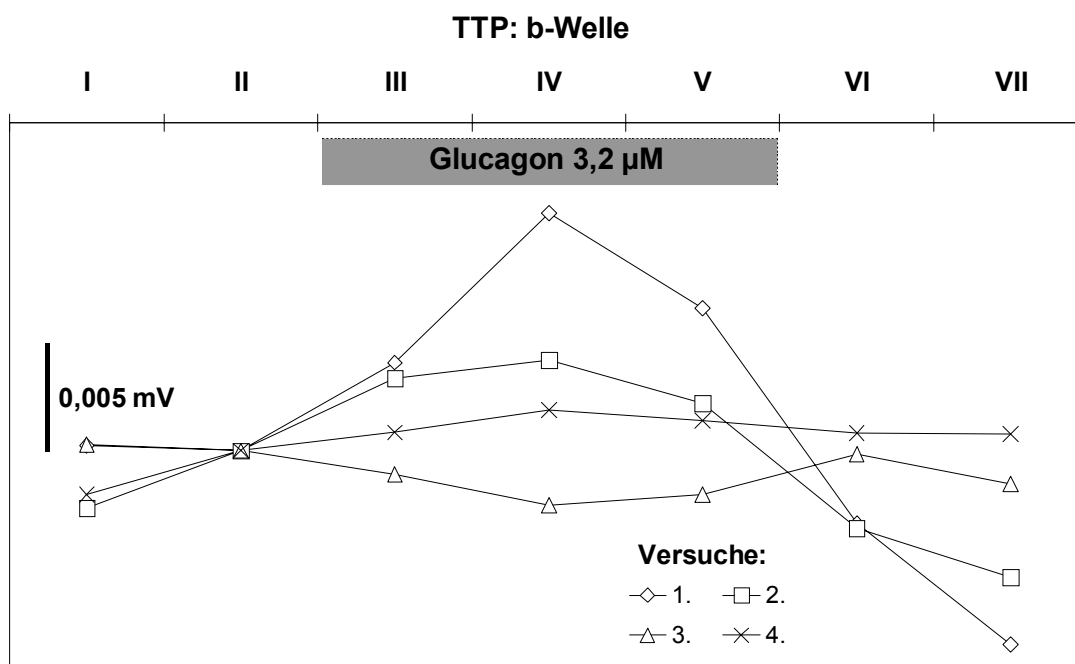


Abbildung F.93 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (3,2 µM) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude nur in zwei Versuchen an.

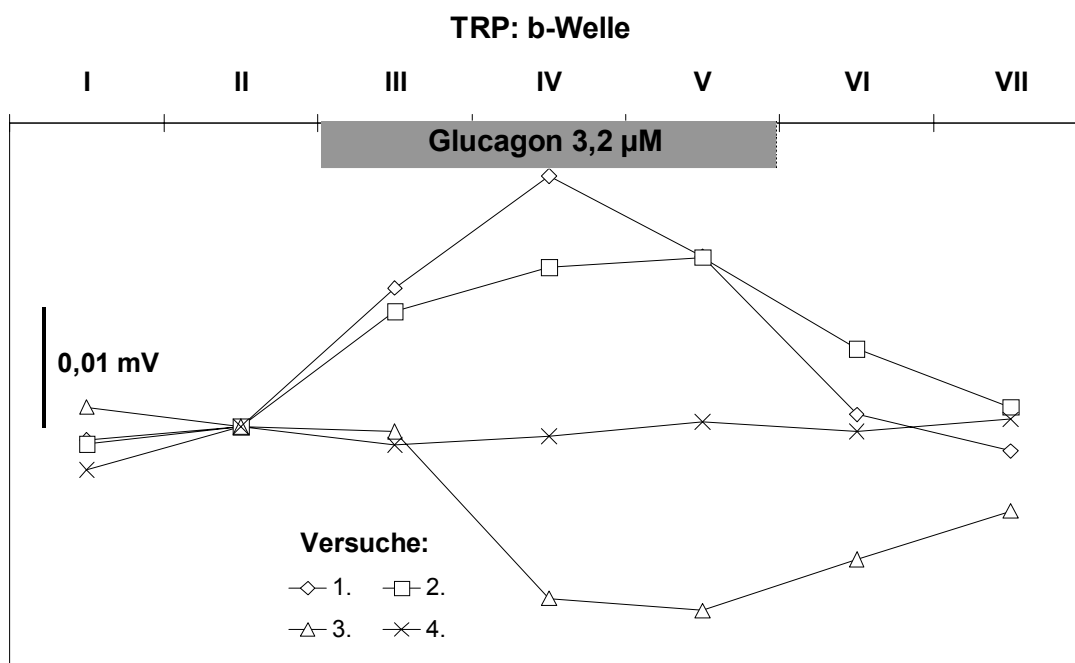


Abbildung F.94 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (3,2 µM) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in zwei Versuchen an.

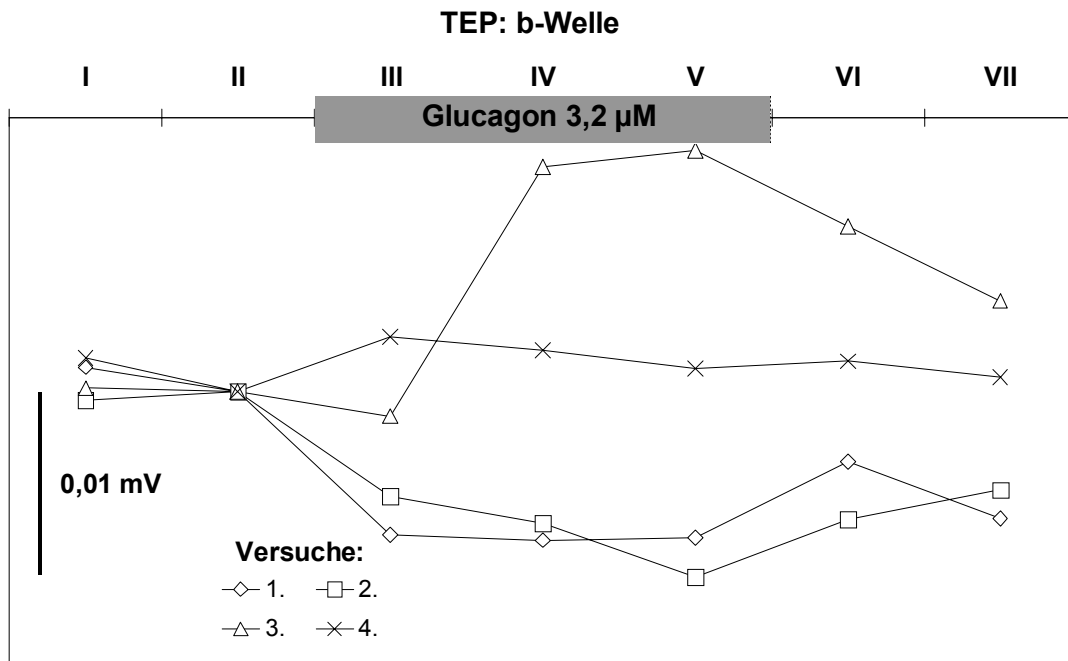


Abbildung F.95 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TEP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon ($3,2 \mu\text{M}$) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in zwei Versuchen an; in einem weiteren nahm sie ab, aber erst nach ca. 20 min Behandlungsdauer (IV bis VII, positive Differenzen bei negativen Amplituden = Rückgang).

Im Fall der niedrigeren Glucagon-Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) hatte sofort nach Beginn der Behandlung des Netzhautpräparats (Versuchsphase III) die Amplitude der b-Welle in drei Versuchen (Abbildung F.96) und die ihrer Komponente im TRP in vier Versuchen geringfügig zugenommen (Abbildung F.97). Im TRP gingen die erhöhten Amplituden entweder schon kurz vor Ende (Versuchsphase V) oder spätestens 15 min nach dem Ende der Behandlung (Versuchsphase VI) unter den Ausgangswert zurück. Da bei der niedrigeren Konzentration alle Veränderungen der Amplituden der b-Welle und ihrer Komponenten sehr gering ausfielen, können diese jedoch nicht mehr eindeutig als Effekt der Glucagon-Behandlung interpretiert werden. Die Analyse der Amplituden der d-Welle und ihrer Komponenten ergab für beide Glucagon-Konzentrationen keine deutlichen Reaktionen (keine Abbildungen).

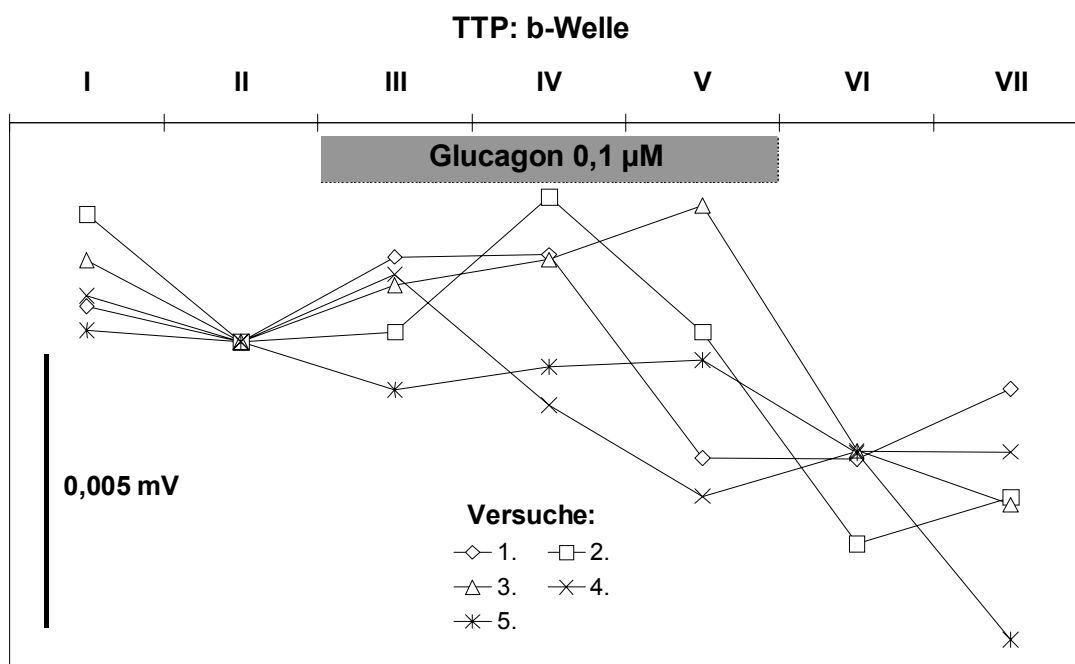


Abbildung F.96 Differenzen der Amplituden der b-Welle im TTP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Kurz nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (0,1 µM) von der retinalen Seite des Präparats nahm die Amplitude in drei Versuchen leicht zu, in einem weiteren zeigte sich ein Anstieg erst nach ca. 20 min Behandlungsdauer (IV).

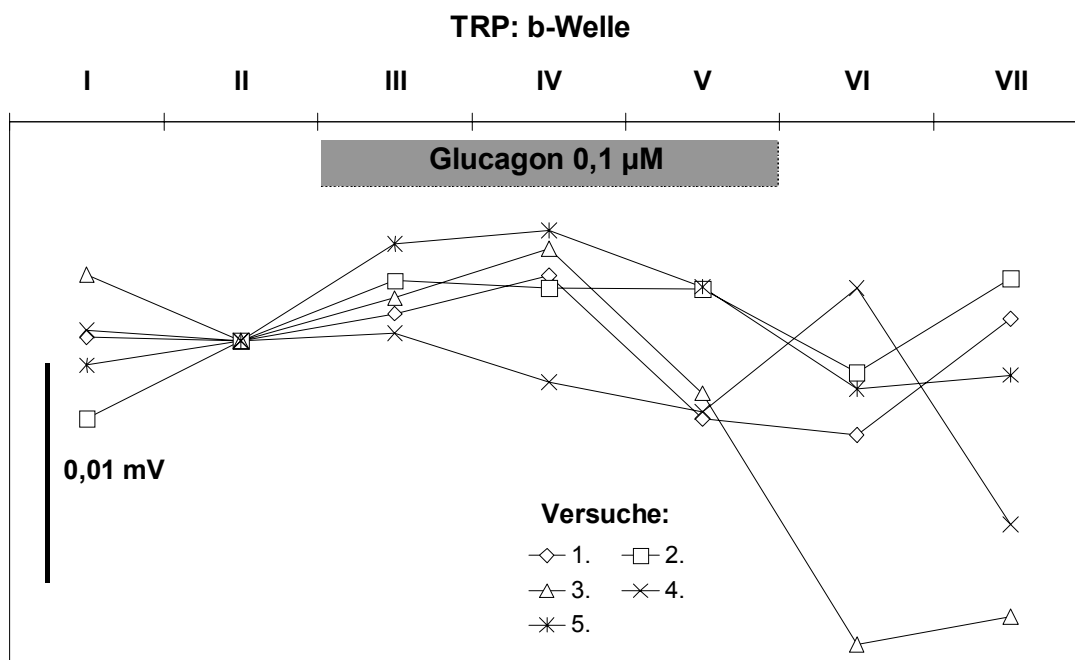


Abbildung F.97 Differenzen der Amplituden der Komponente der b-Welle im TRP zwischen der jeweiligen Versuchsphase und der Phase II (Kontrolle) als Bezugspunkt (Erläuterungen im Text). Nach Beginn der Behandlung (III) mit Glucagon (0,1 µM) von der retinalen Seite des Präparats stieg die Amplitude in vier Versuchen geringfügig an.

F.2.4 Diskussion der Wirkungen von Glucagon auf das *in vitro* Präparat

Die im Gesamt-Bestandspotenzials (TEP) sichtbaren Veränderungen im Zuge der Glucagon-Behandlung waren eindeutig aus dem TEP hervorgegangen, d. h. sie wurden mit großer Wahrscheinlichkeit durch Prozesse im RPE verursacht. Einen weiteren Hinweis für einen bedeutenden Einfluss des Glucagons auf das RPEs liefert die langsame c-Welle, deren Amplitude wenige Minuten nach Beginn des Behandlungszeitraums deutlich abnahm. Dieser Rückgang hatte seine Ursache in einer entsprechenden Verringerung der Amplitude ihrer Komponente im TEP, also der transepithelialen c-Welle. Da die Größe ihrer Amplitude wesentlich vom transepithelialen Bestandspotenzial abhängig ist (Linsenmeier & Steinberg, 1983), und dieses überwiegend durch die Leitfähigkeit der Membranen des RPEs bestimmt wird (z. B. Schwahn, 1998 oder Shirao & Steinberg, 1987), spricht ihr Rückgang für einen Effekt des Glucagons auf Ionenkanäle oder -transporter in den Membranen des RPEs.

Der beschriebene Verlauf des TEPs (inklusive der Oszillationen) und die Veränderungen der transepithelialen c-Welle während und nach der Glucagon-Behandlung glichen denen im Fall der Behandlung des Netzhaut-Präparats mit lipophilen Forskolin. Diese Beobachtung ist ein deutliches Indiz für die Beteiligung des „second messengers“ cAMP an den oben beschriebenen Wirkungen des Glucagons. Dass Änderungen des cAMP-Spiegels in den Zellen des RPEs erheblichen Einfluss auf die Höhe des TEPs und der Amplitude der c-Welle haben, zeigten bereits Nao-i *et al.* (1990), indem sie Retina-RPE-Choroid Präparate des Huhns *in vitro* mit cAMP und dem Phosphodiesterase-Hemmer IBMX (3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin) behandelten. Kuntz *et al.* (1994) gelang es dann die gleichen Effekte durch lipophiles Forskolin, einem nicht über spezifische Rezeptoren wirkenden Aktivator der Adenylat-Cyclase, hervorzurufen. Sie konnten diese Effekte dem Rückgang der Leitfähigkeit für Chlorid durch die basolaterale Membran des RPEs zuordnen. Die damit verbundene Hyperpolarisierung der basolateralen Membran (d. h. V_{ba} wird negativer) manifestierte sich in der Verringerung des TEPs (da $TEP = V_{ba} -$

V_{ap}). Dabei wirkt die erhöhte Konzentration von cAMP entweder direkt durch Hemmung der Aktivität des basolateralen Chlorid-Kanals (Gallemore & Steinberg, 1990) oder indirekt durch Verringerung des apikalen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Kotransports (s. Kapitel E.2.3, Abbildung E.22). Die mit letzterem verbundene Reduktion der intrazellulären Chlorid-Konzentration hätte wiederum einen geringeren Ausstrom von Chlorid durch den basolateralen Kanal zur Folge.

Aus obigen Ausführungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Effekte des Glucagons auf das *in vitro* Präparat durch die spezifische Bindung dieses Peptids an Glucagon-Rezeptoren in der apikalen, d. h. retinalen Membran des RPEs vermittelt werden. Allerdings ist ein eindeutiger Nachweis des Glucagon-Rezeptors im RPE mit elektrophysiologischen Methoden nur durch dessen Blockierung mittels eines spezifischen und hoch-wirksamen Peptid-Antagonisten (Unson *et al.*, 1994) zu erbringen. Bei gleichzeitigem Einsatz dieses Antagonisten mit dem Agonisten (Glucagon) sollten die bei alleiniger Behandlung mit Glucagon auftretenden Effekte unterdrückt oder zumindest deutlich reduziert werden. Zu diesem Zweck waren bereits Vorversuche unternommen worden, in denen die Wirksamkeit von niedrigen Glucagon-Konzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$) gezeigt wurde. Allerdings konnte die angestrebte Versuchsreihe mit den Kobehandlungen der *in vitro* Präparate mit Antagonist und Glucagon wegen des damit verbundenen großen Aufwands im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die funktionellen Voraussetzungen für den Glucagon-Rezeptor sind im RPE zumindest gegeben, da einer der wichtigsten Übertragungswege für Signale der benachbarten Gewebe auf das RPE über die Beeinflussung der Adenylat-Cyclase und des cAMP-Spiegel läuft (Beitz *et al.*, 1998). Überdies treten für die Kontrolle der vielfältigen Funktionen des RPEs (z. B. Phagozytose der Scheiben der äußeren Segmente der Stäbchen-Fotorezeptoren, Transport von Vitamin A und Regulation des Ionen- und Wassergehalts im SRSs) viele verschiedene Rezeptortypen in den Membranen des RPEs auf. Im Übrigen lassen sich auch aus den Arbeiten anderer Autoren Argumente für die Hypothese ableiten, dass der Glucagon-Rezeptor in bestimmten Geweben des Auges und wahrscheinlich in den Membranen des RPEs vorkommt:

Schon in den 80 Jahren hatte sich gezeigt, dass Glucagon die Funktion eines Neuropeptids erfüllt. Daher muss der Glucagon-Rezeptor auch an der Übertragung oder Modulation neuronaler Signale beteiligt sein. Inzwischen wurden in der Retina vieler Tierarten bestimmte glucagonerge Zelltypen identifiziert (z. B. für das Huhn: Kuwayama *et al.*, 1982 und Katayama-Kumoi *et al.*, 1985; für die Schildkröte: Eldred & Karten, 1983; und für die Maus und die Ratte: Das *et al.*, 1985). Deshalb wird die Beteiligung von Glucagon an der Steuerung wichtiger Prozesse im Auge angenommen. Anhaltspunkte für eine Rolle bei der Regelung des Augenwachstums des Huhns fanden Feldkaemper & Schaeffel (2002). In diesem Fall wird Glucagon wahrscheinlich von einem bestimmten Typ glucagonerger Amakrinzellen sezerniert. Diese sind möglicherweise an der biologischen Signalkaskade beteiligt, über die das Wachstum des Auges gesteuert wird. Sie sind wahrscheinlich in der Lage, zu erkennen, ob das Wachstum des Auges beschleunigt oder gebremst werden muss, um Emmetropie zu erreichen („Vorzeichenerkennung“ beim von der Netzhaut empfangenen optischen Signal, d. h. dem Abbild auf der Retina), denn sie exprimieren einen Transkriptionsfaktor (ZENK) abhängig vom „Vorzeichen“ des dargebotenen Bilds (Bitzer & Schaeffel, 2002). Sollte die Freisetzung von Glucagon durch bestimmte Amakrinzellen ein Signal zur Regelung des Wachstums darstellen, müssten für die Aufnahme und Weiterleitung dieses Signals in den Membranen bestimmter Zellarten des Auges Glucagon-Rezeptoren vorkommen. Da die Länge des Auges vor allem durch das Wachstum der Sklera bestimmt wird, muss das Signal letztendlich aus der Neuroretina durch das RPE und das Choroid zur Sklera gelangen. Für diesen Weg der Wachstumsregelung sollten daher in der apikalen Membran des RPEs Glucagon-Rezeptoren vorhanden sein. Wie oben ausgeführt, ergaben sich aus den elektrophysiologischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit deutliche Hinweise für das Vorhandensein des Rezeptors an diesem Ort. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch vorläufige Ergebnisse von molekularbiologischen Untersuchungen, mittels derer eine hohe Konzentration von mRNA des Glucagon-Rezeptors im RPE des Huhns nachgewiesen wurde (persönliche Mitteilung: M. Feldkaemper, 2002). In Pilotversuchen, in denen das

Präparat von der choroidalen Seite mit Glucagon behandelt wurde, zeigten sich ebenfalls starke Reaktionen des TEPs, die auf eine Veränderung des cAMP-Spiegels im RPE schließen lassen. Inzwischen haben weitere elektrophysiologische Untersuchungen Anhaltspunkte für das Auftreten des Rezeptors auch in der basolateralen Membran des RPEs geliefert. Die Annahme, dass Glucagon für die Übermittlung bestimmter Signale an das RPE oder durch dieses hindurch eine wichtige Rolle spielt, erfährt durch diese Ergebnisse weitere Unterstützung.

G Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen an der Netzhaut des Huhns umfassten drei thematisch verschiedene Schwerpunkte, nämlich die

- Wirkung von Citicolin (CDP-cholin);
- Purinrezeptoren: Effekte eines Agonisten (ATP) und eines Antagonisten (Suramin);
- Veränderungen des cAMP-Spiegels durch Forskolin (unspezifisch, d. h. nicht über Rezeptoren wirkend) und Glucagon (Effekt über den Glucagonrezeptor vermittelt).

Mittels elektrophysiologischer Messungen (*in vitro* ERG) an Retina-RPE-Choroid Präparationen konnten die pharmakologischen Wirkungen dieser Substanzen auf die Funktion der Netzhaut untersucht werden. Aus den Effekten ließ sich eine Reihe von Hinweisen auf die Beteiligung von Rezeptorpopulationen und deren Lokalisation ableiten:

1. Die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit Citicolin (CDP-cholin) führte zu deutlichen Effekten auf einige der aufgezeichneten elektrophysiologischen Signale. Dass ähnliche Veränderungen bereits in früheren Untersuchungen mit Dopamin beobachtet wurden (Schwahn, 1998), kann als Hinweis auf eine endogene Erhöhung der Dopaminkonzentration in der Netzhaut gewertet werden. Deren Modulation schlägt sich dann in veränderten Amplituden des ERGs nieder. Die in bestimmten Zelltypen der Retina, z. B. den Horizontalzellen, vorkommenden Dopaminrezeptoren könnten als geeignete Effektoren das Signal in Form eines gestiegenen Dopaminspiegels an Ionenkanäle oder -transporter übermitteln.
2. Durch die Behandlung des Retina-RPE-Choroid Präparats mit ATP veränderten sich die Bestandpotenziale und die Amplituden aller lichtinduzierten Wellen des *in vitro* ERGs deutlich. Setzt man die Öffnung von bestimmten Ionenkanälen als Folge der Einwirkung von ATP voraus,

können diese Effekte mit den bekannten Modellen über die Erzeugung der Potenziale und Wellen in der Netzhaut und im RPE erklärt werden. Die beschriebenen Wirkungen können über die Bindung von ATP an P2-Rezeptoren ausgelöst, die in den Membranen des RPEs und mehrerer unterschiedlicher Zelltypen der Retina auftreten. In Frage kommen dabei verschiedene Subtypen sowohl der ionotropen P2X- als auch der metabotropen P2Y-Rezeptoren.

3. Forskolin entfaltet eine starke Wirkung auf das RPE, allerdings nur in der lipophilen Form. Vermutlich diffundiert diese Form leicht durch die Membranen des RPEs, während diese für die hydrophile Form eine effektive Diffusionsbarriere darstellen. Der „second messenger“ cAMP dürfte bei Regulationsprozesse im RPE eine bedeutende Rolle spielen, da eine Vielzahl von metabotropen Rezeptoren ihre Signale über die Modulation des cAMP-Spiegels an die Zelle weitergibt, u. a. auch der Glucagonrezeptor. Deutliche Hinweise für sein Vorkommen in den Membranen des RPEs des Huhns ergaben sich aus den Behandlungen des *in vitro* Präparats mit Glucagon. Dies ist von besonderem Interesse, da der Glucagonrezeptor ein wichtiges Glied in der Kette für die Übermittlung des Wachstumssignals des Auges sein könnte, das von dem noch nicht identifizierten Detektor in der Neuroretina durch das RPE zur Sklera transportiert werden muss.

Obwohl die für die dargestellten Untersuchungen verwendete elektrophysiologische Methode mit Limitationen behaftet ist, wie die schwierige Präparation des Retina-RPE-Choroid Komplexes und die oft rasche Abnahme der Intensität der ERG-Signale, bedingt durch die artifizielle Versorgung des Präparats über die Superfusion in der Ussing-Kammer, lassen mittels des *in vitro* ERGs wichtige Prozesse der Netzhaut erfassen. Überdies ermöglicht diese Methode Hinweise zur Lokalisation von Prozessen bzw. der Wirkung von Substanzen im Netzhaut-Präparat zu gewinnen.

H Literaturverzeichnis

- Adorante, J. S. & Miller, S. S. 1990. Potassium-dependent volume regulation in retinal pigment epithelium is mediated by Na,K,Cl cotransport. *J Gen.Physiol* 96: 1153-1176.
- Alvarez-Leefmans, F. J. 1992. Extracellular Reference Electrodes. In Kettenmann, H. & Grantyn, R. (Eds) *Practical Electrophysiological Methods* (pp. 171-182). New York: Wiley-Liss.
- Ammann, D. 1986. *Ion-Selective Microelectrodes. Principles, Design and Application*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ammann, D., Chao, P. S. & Simon, W. 1987. Valinomycin-based K⁺ selective microelectrodes with low electrical membrane resistance. *Neurosci.Lett.* 74: 221-226.
- Bauer, B., Ehinger, B., Tornqvist, K. & Waga, J. 1985. Neurotransmitter release by certain neuropeptides in the chicken retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 63: 581-587.
- Beitz, E., Volkel, H., Guo, Y. & Schultz, J. E. 1998. Adenylyl cyclase type 7 is the predominant isoform in the bovine retinal pigment epithelium. *Acta Anat.(Basel)* 162: 157-162.
- Bitzer, M. & Schaeffel, F. 2002. Defocus-induced changes in ZENK expression in the chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 43: 246-252.
- Bo, X., Schoepfer, R. & Burnstock, G. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle. *J Biol.Chem.* 275: 14401-14407.
- Brandle, U., Kohler, K. & Wheeler-Schilling, T. H. 1998. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 62: 106-109.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Weick, M., Biedermann, B., Uhlmann, S., Kohen, L., Wiedemann, P. & Reichenbach, A. 2002. Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Muller (glial) cells. *Glia* 37: 139-152.
- Brubaker, P. L. & Drucker, D. J. 2002. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors.Channels* 8: 179-188.

- Burnstock, G. 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In Bolis, L. & Straub, R. W. (Eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones* (pp. 107-118). New York: Raven Press.
- Coles, J. A. 1992. Calibration of Ion-Selective Microelectrodes. In Kettenmann, H. & Grantyn, R. (Eds) *Practical Electrophysiological Methods* (pp. 228-234). New York: Wiley-Liss.
- Das, A., Pansky, B. & Budd, G. C. 1985. Glucagon-like immunoreactivity in mouse and rat retina. *Neurosci.Lett.* 60: 215-218.
- DeVries, S. H. & Schwartz, E. A. 1989. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol* 414: 351-375.
- Dewar, J. & McKendrick, J. G. 1873. On the physiological action of light. *Proceedings of the Royal Society (Edinburgh)* 8: 179-182.
- Dewar, J. 1877. The physiological action of light. *Nature* 15: 433-435.
- Djamgoz, M. B. A., Wagner, H.-J. & Witkovsky, P. 1995. Photoreceptor-horizontal cell connectivity, synaptic transmission and neuromodulation. In Djamgoz, M. B. A., Archer, S. N. & Vallergera, S. (Eds) *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina*. (pp. 155-193). London: Chapman & Hall.
- Dmitriev, A. V., Govardovskii, V. I., Schwahn, H. N. & Steinberg, R. H. 1999. Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis.Neurosci.* 16: 1157-1167.
- Dong, C. J. & Werblin, F. S. 1994. Dopamine modulation of GABAC receptor function in an isolated retinal neuron. *J.Neurophysiol.* 71: 1258-1260.
- Dowling, J. E. 1987. *The retina: an approachable part of the brain*. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Drury, A. B. & Szent-Gyorgy, A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J.Physiol (Lond)* 68: 213-237.
- Du Bois-Reymond, E. 1848. *Untersuchungen über thierische Elektrizität*. Berlin: Georg Reimer.
- Eldred, W. D. & Karten, H. J. 1983. Characterization and quantification of peptidergic amacrine cells in the turtle retina: enkephalin, neurotensin, and glucagon. *J Comp Neurol.* 221: 371-381.
- Feldkaemper, M. P. & Schaeffel, F. 2002. Evidence for a potential role of glucagon during eye growth regulation in chicks. *Vis.Neurosci.* 19: 755-766.

- Fischer, A. J., McGuire, J. J., Schaeffel, F. & Stell, W. K. 1999. Light- and focus-dependent expression of the transcription factor ZENK in the chick retina. *Nat.Neurosci.* 2: 706-712.
- Gallemore, R. P., Griff, E. R. & Steinberg, R. H. 1988. Evidence in support of a photoreceptor origin for the "light-peak substance". *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 29: 566-571.
- Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H. 1990. Effects of dopamine on the chick retinal pigment epithelium. Membrane potentials and light-evoked responses. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 31: 67-80.
- Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H. 1993. Light-evoked modulation of basolateral membrane Cl⁻ conductance in chick retinal pigment epithelium: the light peak and fast oscillation. *J.Neurophysiol.* 70: 1669-1680.
- Gallemore, R. P., Hughes, B. A. & Miller, S. S. 1997. Retinal Pigment Epithelial Transport Mechanisms and Their Contributions to the Electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Research* 16: 509-566.
- Granit, R. 1933. The components of the retinal action potentials and their relation to the discharge in the optic nerve. *J.Physiol (Lond)* 77: 207-240.
- Granit, R. 1947. Sensory mechanisms of the retina. London: Oxford University Press.
- Greenwood, D., Yao, W. P. & Housley, G. D. 1997. Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina. *Neuroreport* 8: 1083-1088.
- Griff, E. R. & Steinberg, R. H. 1982. Origin of the light peak: in vitro study of Gekko gekko. *J.Physiol* 331: 637-652.
- Hankins, M. W. 1995. Horizontal cell coupling and its regulation. In Djamgoz, M. B. A., Archer, S. N. & Vallerga, S. (Eds) Neurobiology and clinical aspects of the outer retina. (pp. 195-220). London: Chapman & Hall.
- Hartzell, H. C. & Qu, Z. 2003. Chloride currents in acutely isolated Xenopus retinal pigment epithelial cells. *J Physiol* 549: 453-469.
- Holmgren, F. 1865. Method att objectivera effecten af ljusintyck pa retina. *Upsala Lakareforenings Forhandlingar* 1: 184-198.
- Holton, F. A. & Holton, P. 1953. The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol (Lond)* 119: 50-51.
- Hughes, B. A., Miller, S. S. & Farber, D. B. 1987. Adenylate cyclase stimulation alters transport in frog retinal pigment epithelium. *Am.J.Physiol* 252: C385-C395.

- Ishii, K., Kaneda, M., Li, H., Rockland, K. S. & Hashikawa, T. 2003. Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina. *J Comp Neurol.* 459: 267-277.
- Jabs, R., Guenther, E., Marquardt, K. & Wheeler-Schilling, T. H. 2000. Evidence for P2X(3), P2X(4), P2X(5) but not for P2X(7) containing purinergic receptors in Muller cells of the rat retina. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 76: 205-210.
- James, G. & Butt, A. M. 2001. P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. *Cell Calcium* 30: 251-259.
- Kandel, E. R., Schwarz, J. H. & Jessell, T. M. 2000. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill.
- Karowski, C. J. & Proenza, L. M. 1977. Relationship between Muller cell responses, a local transretinal potential, and potassium flux. *J.Neurophysiol.* 40: 244-259.
- Karowski, C. J., Newman, E. A., Shimazaki, H. & Proenza, L. M. 1985. Light-evoked increases in extracellular K⁺ in the plexiform layers of amphibian retinas. *J.Gen.Physiol* 86: 189-213.
- Katayama-Kumoi, Y., Kiyama, H., Manabe, R., Shiotani, Y. & Tohyama, M. 1985. Co-existence of glucagon- and substance P-like immunoreactivity in the chicken retina. *Neuroscience* 16: 417-424.
- Knapp, A. G. & Dowling, J. E. 1987. Dopamine enhances excitatory amino acid-gated conductances in cultured retinal horizontal cells. *Nature* 325: 437-439.
- Kolb, H., Fernandez, E. & Nelson, R. 2003. Webvision: The organization of the retina and visual system. <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Kraupp, O., Raberger, G. & Schütz, W. 1992. Pharmakodynamische Beeinflussung von Rhythmik, Kontraktion und Durchblutung des Herzens. In Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K. (Hrsg) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (pp. 345-403). Mannheim: BI-Wissenschaftsverlag.
- Kuntz, C. A., Crook, R. B., Dmitriev, A. & Steinberg, R. H. 1994. Modification by cyclic adenosine monophosphate of basolateral membrane chloride conductance in chick retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 35: 422-433.
- Kuwayama, Y., Ishimoto, I., Fukuda, M., Shimiza, Y., Shiosaka, S., Inagaki, S., Senba, E., Sakanaka, M., Takagi, H., Takatsuki, K., Hara, Y., Kawai, Y. & Tohyama, M. 1982. Overall distribution of glucagon-like immunoreactivity in

- the chicken retina: an immunohistochemical study with flat-mounts. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 22: 681-686.
- Li, Y., Holtzclaw, L. A. & Russell, J. T. 2001. Muller cell Ca²⁺ waves evoked by purinergic receptor agonists in slices of rat retina. *J Neurophysiol.* 85: 986-994.
- Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H. 1983. A light-evoked interaction of apical and basal membranes of retinal pigment epithelium: c-wave and light peak. *J.Neurophysiol.* 50: 136-147.
- Longshore, M. A. & Makman, M. H. 1981. Stimulation of retinal adenylate cyclase by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Eur.J Pharmacol.* 70: 237-240.
- Malmivuo, J. & Plonsey, R. 2002. Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. <http://butler.cc.tut.fi/~malmivuo/bem/bembook/>.
- Martins-Ferreira, H. & de Oliveira, C. G. 1971. Spreading depression in isolated chick retina. *Vision Res. Suppl* 3: 171-184.
- Miller, S. S. & Steinberg, R. H. 1977. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J.Membr.Biol.* 36: 337-372.
- Mitchell, C. H. 2001. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol* 534: 193-202.
- Nao-i N, Gallemore, R. P. & Steinberg, R. H. 1990. Effects of cAMP and IBMX on the chick retinal pigment epithelium. Membrane potentials and light-evoked responses. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 31: 54-66.
- Newman, E. A. 1980. Current source-density analysis of the b-wave of frog retina. *J Neurophysiol.* 43: 1355-1366.
- Newman, E. A. & Frishman, L. J. 1991. The b-wave. In Heckenlively, J. R. & Arden, G. B. (Eds) Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision. St. Louis, MO: Mosby.
- Newman, E. A. 2001. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci.* 21: 2215-2223.
- Oakley, B. & Green, D. G. 1976. Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *J.Neurophysiol.* 39: 1117-1133.
- Oakley, B., Flaming, D. G. & Brown, K. T. 1979. Effects of the rod receptor potential upon retinal extracellular potassium concentration. *J.Gen.Physiol* 74: 713-737.

- Pannicke, T., Fischer, W., Biedermann, B., Schadlich, H., Grosche, J., Faude, F., Wiedemann, P., Allgaier, C., Illes, P., Burnstock, G. & Reichenbach, A. 2000. P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina. *J Neurosci.* 20: 5965-5972.
- Parisi, V., Manni, G., Colacino, G. & Bucci, M. G. 1999. Cytidine-5'-diphosphocholine (citicoline) improves retinal and cortical responses in patients with glaucoma. *Ophthalmology* 106: 1126-1134.
- Peterson, W. M., Meggyesy, C., Yu, K. & Miller, S. S. 1997. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci.* 17: 2324-2337.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* 50: 413-492.
- Reichenbach, A. & Robinson, S. R. 1995. The involvement of Müller cells in the outer retina. In Djamgoz, M. B. A., Archer, S. N. & Vallergera, S. (Eds) *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina.* (pp. 395-416). London: Chapman & Hall.
- Reifel Saltzberg, J. M., Garvey, K. A. & Keirstead, S. A. 2003. Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes on isolated tiger salamander Muller cells. *Glia* 42: 149-159.
- Rejdak, R., Toczolowski, J., Solski, J., Duma, D. & Grieb, P. 2002. Citicoline treatment increases retinal dopamine content in rabbits. *Ophthalmic Res.* 34: 146-149.
- Rodrigues, P. S., Guimaraes, A. P., de Azeredo, F. A. & Martins-Ferreira, H. 1988. Involvement of GABA and ACh in retinal spreading depression: effects of "low calcium-high magnesium" solutions. *Exp.Brain Res.* 73: 659-664.
- Ryan, J. S., Baldrige, W. H. & Kelly, M. E. 1999. Purinergic regulation of cation conductances and intracellular Ca²⁺ in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *J Physiol* 520 Pt 3: 745-759.
- Sato, T., Yoneyama, T., Kim, H. K. & Suzuki, T. A. 1987. Effect of dopamine and haloperidol on the c-wave and light peak of light-induced retinal responses in chick eye. *Doc.Ophthalmol* 65: 87-95.
- Schorderet, M., Sovilla, J. Y. & Magistretti, P. J. 1981. VIP-and glucagon-induced formation of cyclic AMP in intact retinae in vitro. *Eur.J Pharmacol.* 71: 131-133.
- Schwahn, H. N., Dmitriev, A. V., Govardovskii, V. I. & Steinberg, R. H. 1995. Light-induced changes of extracellular sodium in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 36: 278.

- Schwahn, H. N. Retinale Kontrolle von Refraktion und Augenwachstum: in vitro und in vivo Untersuchungen beim Haushuhn (*Gallus domesticus*). 1998. Dissertation. Fakultät für Biologie, Universität Tübingen.
- Seamon, K. B. & Daly, J. W. 1981. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic.Nucleotide.Res.* 7: 201-224.
- Seamon, K. B., Padgett, W. & Daly, J. W. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78: 3363-3367.
- Secades, J. J. & Frontera, G. 1995. CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 17 Suppl B: 1-54.
- Shirao, Y. & Steinberg, R. H. 1987. Mechanisms of effects of small hyperosmotic gradients on the chick RPE. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 28: 2015-2025.
- Shirao, Y. & Steinberg, R. H. 1987. Mechanisms of effects of small hyperosmotic gradients on the chick RPE. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 28: 2015-2025.
- Steinberg, R. H., Oakley, B. & Niemeyer, G. 1980. Light-evoked changes in $[K^+]_0$ in retina of intact cat eye. *J.Neurophysiol.* 44: 897-921.
- Stockton, R. A. & Slaughter, M. M. 1989. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J.Gen.Physiol* 93: 101-122.
- Stryer, L. 1996. Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sugioka, M., Fukuda, Y. & Yamashita, M. 1996. Ca^{2+} responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol* 493 (Pt 3): 855-863.
- Sullivan, D. M., Erb, L., Anglade, E., Weisman, G. A., Turner, J. T. & Csaky, K. G. 1997. Identification and characterization of P2Y2 nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci.Res.* 49: 43-52.
- Trendelenburg, A. U. & Bultmann, R. 2000. P2 receptor-mediated inhibition of dopamine release in rat neostriatum. *Neuroscience* 96: 249-252.
- Uckermann, O., Grosche, J., Reichenbach, A. & Bringmann, A. 2002. ATP-evoked calcium responses of radial glial (Muller) cells in the postnatal rabbit retina. *J Neurosci.Res.* 70: 209-218.
- Unson, C. G., Wu, C. R., Fitzpatrick, K. J. & Merrifield, R. B. 1994. Multiple-site replacement analogs of glucagon. A molecular basis for antagonist design. *J Biol.Chem.* 269: 12548-12551.

- Virno, M., Pecori-Giraldi, J., Liguori, A. & De Gregorio, F. 2000. The protective effect of citicoline on the progression of the perimetric defects in glaucomatous patients (perimetric study with a 10 year follow up). *Acta Ophthalmologica Scandinavica-Supplement* 78: 56-57.
- Wehner, R. & Gehring, W. 1990. Zoologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Wen, R. & Oakley, B. 1987. Müller cell involvement in the electroretinogram and pH regulation in the vertebrate retina. *Society of Neuroscience Abstracts* 13.
- Wen, R. & Oakley, B. 1990. Ion-selective microelectrodes suitable for recording rapid changes in extracellular ion concentration. *J.Neurosci.Methods* 31: 207-213.
- Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Jabs, R. & Guenther, E. 2000. Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 76: 415-418.
- Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Guenther, E. & Jabs, R. 2001. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 92: 177-180.
- Wioland, N. & Bonaventure, N. 1984. Evidence for both photopic and scotopic characteristics in the c-wave of chicken and frog ERG. *Vision Res.* 24: 91-98.
- Witkovsky, P., Dudek, F. E. & Ripps, H. 1975. Slow PIII component of the carp electroretinogram. *J.Gen.Physiol* 65: 119-134.
- Zrenner, E. 1985. Netzhaut-Funktionsstoffwechsel. Phototransduktion, Neurotransmission und neuronale Verschaltung. In Hockwin, O. (Hrsg) *Biochemie des Auges.* (pp. 135-176). Stuttgart: Enke.

I Abkürzungen und Einheiten

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
chor.	choroidal
DA	Dopamin
ERG	Elektroretinogramm
EOG	Elektrookulogramm
Forsk.	Forskolin
GCL	Ganglienzellschicht der Netzhaut (ganglion cell layer)
GTP	Guanosintriphosphat
g/mol	Molekulargewicht
ILM	Innere begrenzende Membran der Netzhaut (inner limiting membrane)
INL	Innere nukleäre Schicht der Netzhaut (inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht der Netzhaut (inner plexiform layer)
kDa	10^3 Dalton (Molekulargewicht von Makromolekülen)
lux	Lux (Beleuchtungsstärke)
M Ω	Megaohm (10^6 Ohm, elektrischer Widerstand)
mM	Millimolar (10^{-3} mol l ⁻¹ , Mol pro Liter)
mosmol	Milliosmol (10^{-3} osmol, Osmolariät)
OLM	Äußere begrenzende Membran der Netzhaut (outer limiting membrane)
ONL	Äußere nukleäre Schicht der Netzhaut (outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht der Netzhaut (outer plexiform layer)
P2X	Ionotrope Purinrezeptor-Untergruppe
P2Y	Metabotrope Purinrezeptor-Untergruppe
ret.	retinal
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
SD	Spreading Depression (spontane über die Netzhaut laufende Welle durch Entladung der Netzhautzellen)
SRS	Subretinaler Raum der Netzhaut (subretinal space)
TEP	Transepitheliales Potenzial
TRP	Transretinales Potenzial
TTP	Trans-Tissue-Potenzial (über das gesamte Präparat)
V _{ion}	Potenzial am ionenselektiven Kanal der Glasmikroelektrode
μ A	Mikroamperé (10^{-6} Amperé)
μ V	Mikrovolt (10^{-6} Volt)
μ W/cm ²	Mikrowatt pro cm ² (10^{-2} W/m ² , Bestrahlungsstärke)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eberhart Zrenner danke ich für seine freundliche Unterstützung und die engagierte Betreuung, die er mir beim Verfassen dieser Arbeit angedeihen ließ. In zahlreichen Sitzungen diskutierte er mit mir die einzelnen Kapitel und gab mir dabei viele wertvolle Hinweise und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Werner Schmidt möchte ich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit herzlich danken.

Ein Dankschön geht auch an Herrn Meister Hubert Willmann und seine Mitarbeiter von der feinmechanischen Entwicklungswerkstatt der Augenklinik für ihre freundliche Unterstützung bei Änderungen am Versuchsaufbau vor allem an der Ussing-Kammer und an Herrn Rilk für seine freundliche Hilfe bei der Analyse und Beseitigung von „Betriebsstörungen“ in der Elektronik des Aufbaus zur *in vitro*-Präparation der Netzhaut.

Hartmut Schwahn danke dafür, dass er nach seinem Ausscheiden aus der Augenklinik nicht nur für weiteren Rat in zahlreichen Telefongesprächen zur Verfügung stand, sondern auch im Januar 2002 zu einem nächtlichen „Feuerwehreinsatz“ nach Tübingen kam, um ein hartnäckiges Problem mit dem Aufzeichnungsprogramm zu beheben.

Unbedingt bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen und Kolleginnen aus der Forschungsstelle für experimentelle Ophthalmologie und der Sektion für Neurobiologie des Auges der Augenklinik, die mich während des Fortgangs dieser Arbeit unterstützten. Ein besonderer Dank geht dabei an Perikles Simon für die gute Zusammenarbeit und die vielen konstruktiven Gespräche.

Ein Dank gilt meinem Freund Norbert Weber für die vielen vergnüglichen Abende bzw. Nächte mit ihm in der Marquardtei oder dem Joker, wo wir einen langen Labor-Arbeitstag ausklingen ließen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meinen Eltern, Dorothea Kleemann-Streiff und Volker Hartmann, die mir das Studium ermöglichten und mich auf meinem Weg immer wohlwollend unterstützt und liebevoll begleitet haben.

Lebenslauf

Daniel Michael Hartmann

geboren am 24.11.1967
in Bremen
ledig, deutsch

Schule

1974 – 1978 Grundschule in Bad Aibling
1978 – 1988 Gymnasium in Bad Aibling, Abitur Juni 1988

Ersatzdienst

08/1988 – 03/1990 Zivildienst beim Landesbund für Vogelschutz in Bayern e.V. (LBV),
Verband für Arten- und Biotopschutz, in München

Studium

10/1990 – 10/1992 Grundstudium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/1992 Vordiplom
10/1992 – 07/1993 Hauptstudium in Tübingen, mit den Schwerpunkten Zoologie, Botanik,
Geologie und öffentliches Recht
08/1993 – 06/1994 Auslandsstudium an der Louisiana State University in Baton Rouge,
Louisiana, USA; Studienschwerpunkte: Ökologie, Limnologie,
Ozeanographie und Geophysik
07 – 09/1994 Spanischkurs in einer privaten Sprachschule in Panajachel während
eines achtwöchigen Aufenthalts in Guatemala
10/1994 – 03/1999 Fortsetzung des Studiums der Biologie in Tübingen,
02 – 05/1997 Diplomprüfungen in Zoologie (Hauptfach), Parasitologie, Botanik und
Geologie
08/1997 – 03/1999 Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Abt. Physiologische Ökologie:
„Cadmium-induzierte Effekte beim Seesaibling (*Salvelinus alpinus*)“
03/1999 Diplom

Zweitstudium

10/1996 – heute Studium der Geologie und Paläontologie an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
05/2000 Vordiplom
07/2003 Beginn der Diplomprüfungen im Studium der Geologie Paläontologie

Promotion

10/1999 – 11/2003 Promotion an der Universitätsaugenklinik, Abt. II
Betreuer: Prof. Dr. Eberhard Zrenner Arbeitsfeld: Pharmakologische
Untersuchungen an der Netzhaut des Huhns mittels
elektrophysiologischer Messungen an Präparationen von Retina-
Pigmentepithel-Choroid Komplexen aus dem Auge des Huhn (in vitro
ERG)

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Daniel M. Hartmann

Stöcklestraße 22

D-72070 Tübingen

E-Mail:

D.Hartmann-Tue@gmx.de