

Exzitatorische Pharmakologie der retinalen Spreading Depression

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Physiologie
Abteilung Membranphysiologie

vorgelegt von

Michaela Helga Sieber

aus Sindelfingen

2010

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang Hanke
2. berichtende Person: Prof. Dr. Reinhard Hilbig
Eingereicht am: 28.01.2010
Mündliche Prüfung am: 09.06.2010

Die vorliegende Arbeit wurde am 30.03.2010 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

(Sir Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Geschichte der Spreading Depression	1
1.2. Mechanismus der Spreading Depression	3
1.3. Klinische Bedeutung der Spreading Depression	5
1.4. Die retinale Spreading Depression.....	6
1.5. Parameter der rSD	9
1.6. Untersuchte Substanzen	12
2. Material und Methoden	18
2.1. Versuchstiere	18
2.2. Präparation	18
2.3. Ringerlösung	19
2.4. Applizierte Substanzen	19
2.5. Messaufbau	20
2.5.1. Optische Messungen	20
2.5.2. Elektrophysiologische Messungen	23
2.6. Messprotokolle.....	27
2.6.1. Optische Messungen	27
2.6.1.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit und IOS.....	27
2.6.1.2. Neuroprotektion	27
2.6.2. Elektrophysiologische Messungen	28
2.7. Auswertung.....	28
2.7.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	28
2.7.2. Intrinsisches optisches Signal (IOS).....	29
2.7.3. Latenz.....	30

2.7.4. Elektrisches Potential	31
2.7.5. Neuroprotektion	32
2.8. Statistik	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Kontrollen	34
3.1.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	34
3.1.2. IOS	35
3.1.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks.....	35
3.1.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks.....	36
3.1.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks.....	36
3.1.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks	37
3.2. Nikotin.....	38
3.2.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	38
3.2.2. IOS	39
3.2.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks.....	40
3.2.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks.....	41
3.2.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks.....	43
3.2.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks	44
3.2.3. Latenz	46
3.2.4. Elektrisches Potential	47
3.2.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals.....	47
3.2.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals.....	48
3.2.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals.....	48
3.2.5. Neuroprotektion	49
3.3. Koffein.....	52
3.3.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	52
3.3.2. IOS	54
3.3.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks.....	54

3.3.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks.....	56
3.3.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks	57
3.3.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks.....	59
3.3.3. Latenz.....	60
3.3.4. Elektrisches Potential	61
3.3.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Potentials	61
3.3.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Potentials	62
3.3.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Potentials.....	63
3.3.5. Neuroprotektion	64
3.4. Kokain.....	65
3.4.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	65
3.4.2. IOS.....	67
3.4.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks.....	67
3.4.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks.....	68
3.4.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks	70
3.4.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks.....	71
3.4.3. Latenz.....	73
3.4.4. Elektrisches Potential	74
3.4.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals.....	74
3.4.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals.....	75
3.4.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals	75
3.4.5. Neuroprotektion	76
3.5. Amphetamin.....	77
3.5.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	77
3.5.2. IOS.....	79
3.5.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks.....	79
3.5.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks.....	80
3.5.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks	82

3.5.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks	83
3.5.3. Latenz	85
3.5.4. Elektrisches Potential	86
3.5.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals	86
3.5.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals.....	87
3.5.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals.....	87
3.5.5. Neuroprotektion	88
3.6. Methylphenidat	89
3.6.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit.....	89
3.6.2. IOS	91
3.6.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks	91
3.6.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks	92
3.6.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks.....	94
3.6.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks	95
3.6.3. Latenz	97
3.6.4. Elektrisches Potential	98
3.6.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals	98
3.6.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals.....	99
3.6.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals.....	99
3.6.5. Neuroprotektion	100
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	101
4. Diskussion	102
4.1. Nikotin.....	102
4.2. Koffein, Kokain, Amphetamin und Methylphenidat.....	106
4.3. Ausblick	110
5. Zusammenfassung / Summary	112
5.1. Zusammenfassung	112
5.2. Summary	113

6. Literatur	114
7. Abkürzungsverzeichnis.....	128
8. Anhang	130
8.1. Strukturformeln und Molekulargewichte der untersuchten Substanzen	130
8.2. IOS Beispielkurven unter Einfluss der einzelnen Substanzen.....	132
8.3. Beispielstacks unter Einfluss der einzelnen Substanzen	137
8.4. Beispielkurven der elektrophysiologischen Messungen unter Einfluss der einzelnen Substanzen	139
8.5. Beispielkurven der Neuroprotektionsmessungen	141
8.6. Erlaubnis nach BtMG	145
Danksagung	147
Lebenslauf.....	148
Erklärung.....	151

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Spreading Depression

Bereits im Jahre 1941 beschrieb der Psychologe Karl Spencer Lashley die Ausbreitung von Flimmerskotomen während einer Migräneaura (siehe Abbildung 1.1.). Er postulierte, dass diese Fehlfunktion auf eine neuronale Inaktivität zurückzuführen sei, die sich wellenartig mit einer Geschwindigkeit von ca. 3mm/min über den visuellen Kortex ausbreite (*Lashley, 1941*). Ungefähr zur gleichen Zeit machte der Biologe Aristides A.P. Leao während EEG-Messungen am Neokortex von Kaninchen eine interessante Entdeckung. Er stellte einen drastischen Rückgang neuronaler Aktivität nach elektrischer Stimulation fest.

Beginnend am Stimulationspunkt breitete sich diese Unterdrückung der Aktivität mit einer Geschwindigkeit von ca. 3mm/min über den Kortex aus, und kehrte nach wenigen Minuten wieder zurück (siehe Abbildung 1.2). Er benannte dieses Phänomen „spreading depression of encephalographic activity“ (*Leao, 1944 a, b*). Ebenso bemerkte er, dass dieses Phänomen sich zuverlässig reproduzieren ließ und zeigte, dass es sich nicht nur elektrisch, sondern ebenso mechanisch oder chemisch, z.B. durch die lokale Applikation von Kaliumchlorid, auslösen

ließ (*Leao and Morrison, 1945*). In später folgenden Messungen fand er heraus, dass die Unterdrückung der neuronalen Aktivität von einer langsamen negativen Potentialverschiebung (ca. 1min, bis zu 30mV) begleitet wird (*Leao, 1947*). Im Jahre 1956 lieferte Bernice Grafstein eine erste mechanistische Hypothese zur Entstehung und Ausbreitung der kortikalen Spreading Depression (cSD). Sie postulierte, dass Kalium durch depolarisierte Neuronen freigesetzt werde, sich

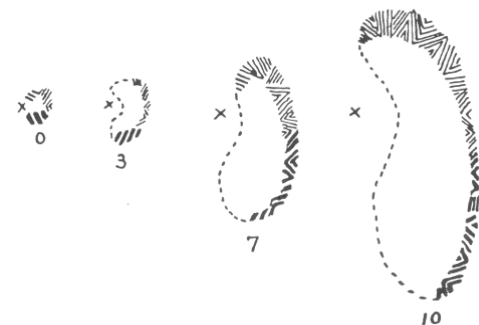


Abbildung 1.1: Ein sich über das Gesichtsfeld ausbreitendes Flimmerkotom. Das „x“ markiert den mit dem Auge fixierten Punkt, die Zahlen spiegeln die verstrichene Zeit in Minuten wider (nach einer Originalzeichnung von *Lashley, 1941*).

dadurch im Extrazellarraum anhäufe und angrenzende Neuronen wiederum depolarisiere. Währenddessen komme es, als Antwort auf die massive Depolarisation, zum Erliegen der neuronalen Aktivität (*Grafstein, 1956*). Ein Zusammenhang zwischen Lashleys Flimmerskotomen bei Migräne und Leaos Spreading Depression wurde erst viele Jahre nach deren Entdeckung erkannt (*Milner, 1958*).

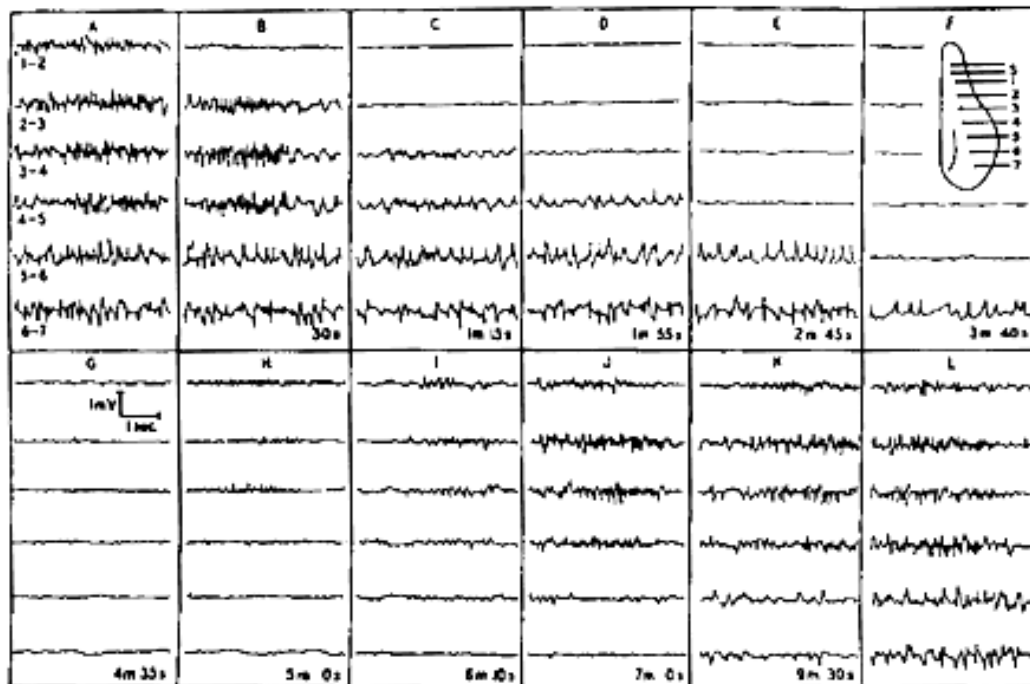


Abbildung 1.2: Leaos originale Darstellung einer cSD am Kortex von Kaninchen. Die Spuren zeigen die gemessene elektrische Aktivität an nacheinander folgenden Elektroden über die Zeit. Die Ausbreitung der Unterdrückung („flatline“) ist entlang der einzelnen Spuren deutlich zu erkennen (*Leao, 1944*).

Dass eine Spreading Depression nicht nur im Kortex, sondern ebenso in anderen Teilen des ZNS ausgelöst werden kann, wurde durch Peter Gouras gezeigt. Dieser konnte während Studien an Retinae von Amphibien das Phänomen der SD beobachten (*Gouras, 1958*). Er benannte es „retinale Spreading Depression“ (rSD). Die Etablierung der retinalen Spreading Depression als Modellsystem fand durch Martins-Ferreira an Retinae von Küken statt (*Martins-Ferreira, 1966*). Dieser zeigte ebenso die Ähnlichkeit zwischen kortikaler und retinaler SD auf (*Martins-Ferreira und de Oliveira-Castro, 1971; Martins-Ferreira, 1983*).

1.2. Mechanismus der Spreading Depression

Die Spreading Depression ist ein Phänomen der grauen Substanz (*Bures et al., 1974*) und ein vollständig reversibler Vorgang, der keine Schäden an Zellen und Gewebe hinterlässt (*do Carmo and Martins-Ferreira, 1984; Hansen and Nedergaard, 1988*). An ihrer Wellenfront folgt einer kurzen Hyperpolarisation eine komplette Unterdrückung der elektrischen Aktivität (*Egert et al., 1995*).

Obwohl auf zellulärer Ebene die einzelnen Veränderungen gut untersucht sind, liegt eine allgemein anerkannte Theorie zum Ablauf einer Spreading Depression Welle noch nicht vor. Es besteht mittlerweile jedoch ein überzeugendes Modell, welches mehrere bestehende Hypothesen vereinigt und die Ausbreitung dieses Phänomens gut beschreibt (siehe Abbildung 1.3):

Bei einer SD-Welle wird die Ausbreitung an der Wellenfront von einer massiven Ionenumverteilung über die Zellmembran begleitet (*Tomita, 1984*). Dabei steigt der extrazelluläre Kaliumspiegel um ein Vielfaches an, die Zellen depolarisieren. Dadurch öffnen sich spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle, und Kalium-Ionen können aus der Zelle hinausströmen und zu benachbarten Zellen diffundieren. Dort kommt es erneut zu einer Depolarisation. Die Welle kann sich somit konzentrisch vom Punkt des Ursprungs ausbreiten („Kaliumhypothese“: *Grafstein, 1956*).

Zur gleichen Zeit öffnen sich sowohl spannungsgesteuerte Na^+ -, Ca^{2+} - als auch Cl^- -Kanäle, und Natrium-, Chlorid- und Calcium-Ionen können entlang der Ionengradienten in die Zelle hineinströmen (*Kow and van Harrefeld, 1972; Kraig and Nicholson, 1978; do Carmo and Martins-Ferreira, 1984*). Der Depolarisation folgt eine Glutamatfreisetzung, was zu einer Aktivierung der ionotropen NMDA-Rezeptoren führt und einen zusätzlichen Calcium-Einstrom und Kalium-Ausstrom bewirkt.

Van Harreveld stellte fest, dass durch Applikation von Glutamat SD-Wellen ausgelöst werden können (*van Harreveld, 1959; van Harrefeld and Fifkova, 1970*), und stellte daraufhin die „Glutamathypothese“ auf, laut der Glutamat die Hauptrolle bei der Entstehung und Ausbreitung einer SD-Welle spielt. Es konnte mittlerweile jedoch gezeigt werden, dass für die Ausbreitung der Welle ein extrazellulärer hoher Kaliumspiegel wichtiger ist, als eine verstärkte Ausschüttung von Glutamat (*Obrenovitch and Zilkha, 1995*).

Laut Nedergaard liegt einer SD-Welle eine sich zwischen Gliazellen über Gap-Junctions ausbreitende, intrazelluläre Ca^{2+} -Welle zugrunde („Gap-Junction-Hypothese“: *Nedergaard et al., 1995*). Jedoch konnten bei Müllerzellen in der

Retina von Kücken keine Gap-Junctions nachgewiesen werden (*Ladewig et al., 1998*), deshalb ist eine Beteiligung neuronaler Gap-Junctions zwar möglich, aber eine tragende Rolle spielen sie wohl nicht.

Durch die veränderten osmotischen Bedingungen, die die einströmenden Ionen begleiten, strömt ebenso Wasser in die Zelle und lässt diese um einen gewissen Grad anschwellen (*van Harreveld and Khattab, 1967; do Carmo and Martins-Ferreira, 1984*). Ionenpumpen bewirken unter Verbrauch von ATP anschließend eine zügige Wiederherstellung der ursprünglichen Ionenverteilung. Durch den hohen Verbrauch an ATP durch die Ionenpumpen besteht nun ein erhöhter Bedarf an Glukose und Sauerstoff in den Zellen (*Lauritzen et al. 1990; Mayevsky and Weiss, 1991*). Die daraus resultierende erhöhte Produktion von Laktat führt zu einer kurzfristigen Ansäuerung des Gewebes.

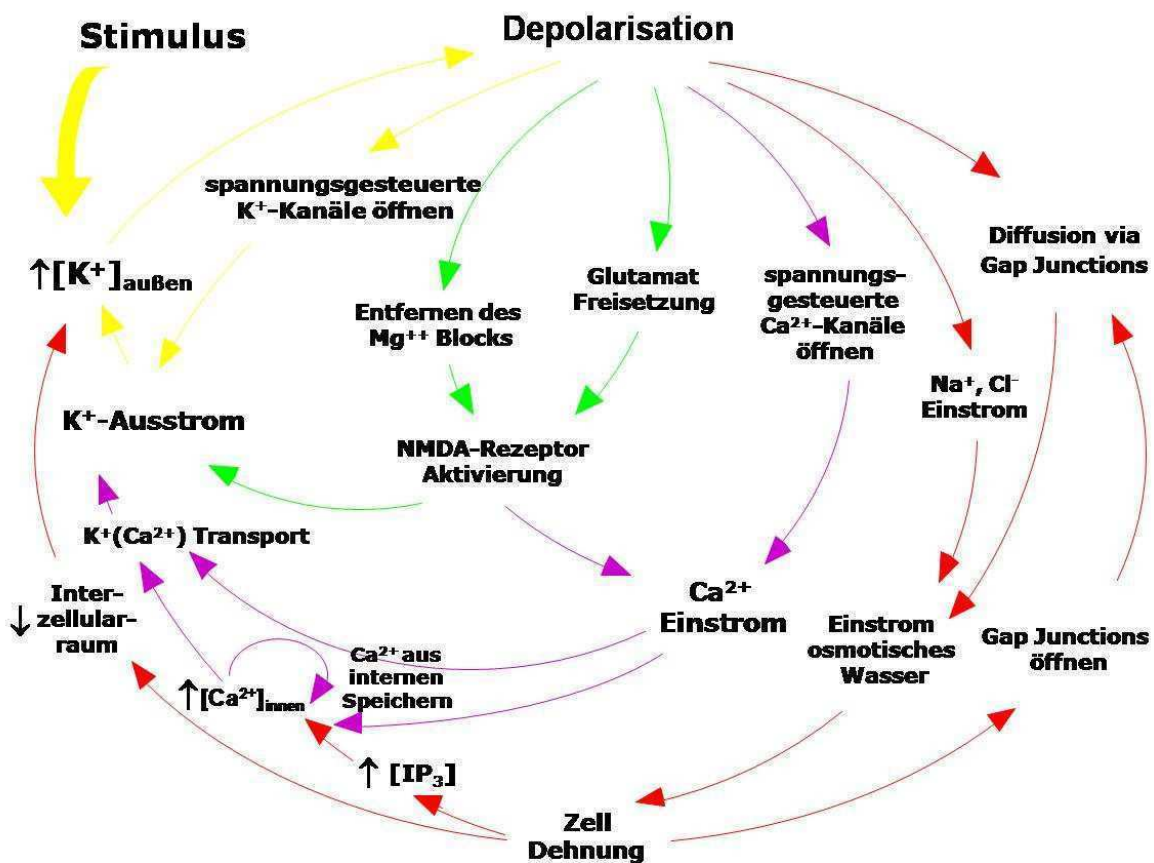


Abbildung 1.3: Derzeitiges Modell der Spreading Depression (verändert nach Shapiro, 2001).

Im Gewebe folgt der Wellenfront eine Phase von ca. 2-3 Minuten (*Brand et al., 1997*), in der auch bei überschwelligem Reizen keine neuen Wellen mehr ausgelöst werden können (absolute Refraktärphase). Dieser schließt sich eine relative Refraktärphase von ca. 10 Minuten an, in der Wellen zwar ausgelöst werden können, die sich jedoch u.a. in ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit stark von denen am erholteten Gewebe unterscheiden (*Gorelova and Bures, 1983; Brand et al., 1997*).

Die benötigte Reizstärke zum Auslösen einer SD-Welle nimmt entlang der relativen Refraktärphase in Abhängigkeit der Zeit ab (*Weimer and Hanke, 2005*). Das Auslösen einer SD Welle folgt dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“, d.h. um eine Welle auszulösen ist es egal wie stark der Reiz ist, solange die Reizschwelle überschritten wird (*Martins-Ferreira, 1983*). Auslöser einer SD Welle können u.a. mechanische Stimuli, wie z.B. der Einstich einer feinen Nadel ins Gewebe, sein, aber auch chemische Reize, wie z.B. die lokale Applikation von Kalium oder Glutamat, induzierte Strom- oder Spannungspulse (*Reid et al., 1987*) sowie Sauerstoffmangel im Gewebe (*Leao and Morrison, 1945; Martins-Ferreira et al., 2000; Somjen, 2001*). Wellen können jedoch auch spontan entstehen. Hierbei ist die Schwelle zur Auslösung einer SD-Welle wohl so gering, dass durch kleinste interne Störungen die Schwelle überschritten wird („kritisches Gleichgewicht“).

1.3. Klinische Bedeutung der Spreading Depression

Seit Milner im Jahre 1958 die Verbindung zwischen Migräne und der Spreading Depression aufzeigte, ist die Spreading Depression auch in der klinischen Forschung von Bedeutung. Heute wird als sicher angesehen, dass die SD ein integraler Bestandteil der Auraphase bei klassischer Migräne ist. Dazu lieferten u.a. Welch und Lauritzen weiterführende Arbeiten (*Gardner-Medwin, 1983; Hansen et al., 1984; Lauritzen 1984 und 1992; Welch et al., 1990 und 1992*).

Mittlerweile wurde auch zu weiteren pathophysiologischen Ereignissen eine Verbindung geknüpft. Den Zusammenhang der Spreading Depression zur Hypoxie fand wiederum Leao. Er stellte Minuten nach einer induzierten Hypoxie im zerebralen Kortex eine sich langsam ausbreitende, negative Potentialwelle im Gewebe fest und schlussfolgerte, dass diese Potentialwelle den gleichen Hintergrund wie eine cSD-Welle haben müsse (*Leao, 1947*). Ebenso konnte eine Beziehung zum Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (*Echlin, 1948; Oka et al., 1977*), zur Epilepsie (*Marshall, 1959; Koroleva and Bures, 1979*) und zur Ischämie (*Somjen,*

1990; Nedergaard and Hansen, 1993; Back et al., 1994 und 1996) hergestellt werden. Sogar zur transienten globalen Amnesie (TGA) konnte ein Zusammenhang gefunden werden, da sich zeigen ließ, dass eine ausgelöste SD ein störender Faktor bei der Gedächtnisbildung sein kann (Bures and Buresova, 1963; Olesen and Jorgensen, 1986).

Die eigentliche physiologische Bedeutung der Spreading Depression ist jedoch noch nicht wirklich eindeutig geklärt. Die Annahmen reichen von einer einfachen Schutzfunktion bei Übererregung (Bures et al., 1984), über einen Fehler der Ionenhomöostase im ZNS (Nicholson and Kraig, 1981) oder der neuronalen Aktivität, bis hin zum Effekt, der aus den physikalischen Eigenschaften des neuronalen Gewebes resultiert (Fernandes de Lima and Hanke, 1997).

Im Hinblick auf den Zusammenhang der Spreading Depression zu den unterschiedlichen pathophysiologischen Ereignissen ist es jedoch ein Bestreben der klinischen Forschung, die Wirkung neuronal aktiver Substanzen auf die Entstehung und Ausbreitung einer Spreading Depression Welle zu untersuchen.

1.4. Die retinale Spreading Depression

Das Phänomen der Spreading kann prinzipiell in allen Teilen des Zentralen Nervensystems (ZNS) ausgelöst werden. Dies zeigte schon Leao (Leao and Martins-Ferreira, 1958), später auch Marshall und Somjen in vielfältigen Versuchen (Marshall 1959; Somjen 2001). Da sich die Retina während der Ontogenese durch seitliches Ausstülpfen der Augenblasen aus dem Neuroektoderm entwickelt (siehe Abbildung 1.4.), stellt sie echtes zentralnervöses Gewebe dar (Dowling, 1987). Daher lassen sich auch hier Spreading Depression Wellen auslösen (Gouras, 1958).

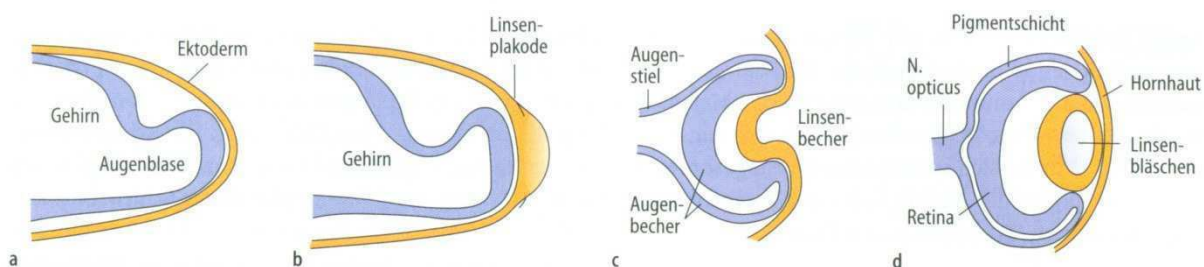


Abbildung 1.4: Ontogenese der Retina (verändert nach Czihak et al., 1996; aus: Histologie, 6.Auflage, Springer Verlag 2003).

Die Retina weist eine Schichtenstruktur auf, wie sie auch in den anderen Teilen des ZNS zu finden ist (siehe Abbildung 1.5). In der Retina ist, vermutlich durch den hohen Grad der Verschaltung, die Spreading Depression innerhalb der inneren plexiformen Schicht (IPL) am stärksten ausgeprägt (Mori et al., 1976). Hier finden sich neben den Amakrinzellen, Horizontalzellen und Bipolarzellen auch die Gliazellen, in der Retina Müllerzellen genannt, die die gesamte Retina vertikal durchziehen. Ihnen kommt eine wichtige Rolle in der Kaliumhomöostase zu. Sie fangen einen langsam ansteigenden Kalium-Spiegel, verursacht durch z.B. eine erhöhte neuronale Aktivität, auf, indem sie durch Na^+/K^+ -Pumpen, die sie innerhalb der IPL verstärkt aufweisen, Kalium aktiv aufnehmen, innerhalb der Zelle weiterleiten und an Orten niedriger K^+ -Konzentration, wie z.B. dem Glaskörper, oder außerhalb der plexiformen Schicht, wieder abgeben („ K^+ -Siphoning“: Reichenbach, 1999).

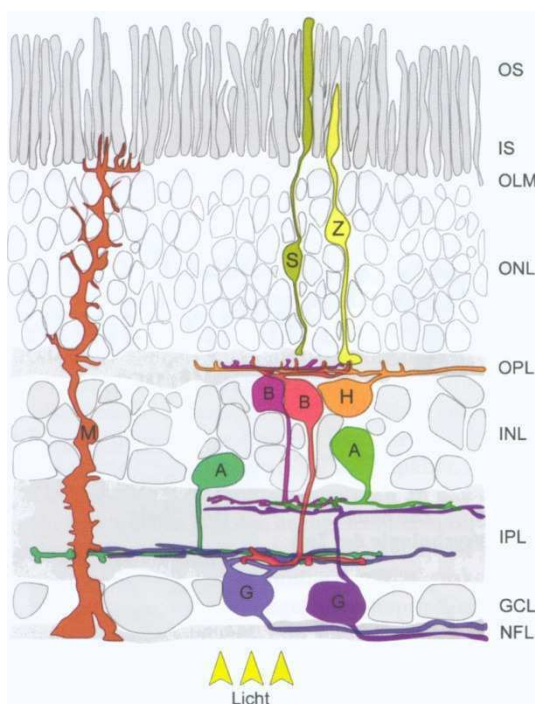


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der Retina. S: Stäbchen-Photorezeptoren, Z: Zapfen-Photorezeptoren, B: Bipolarzellen, H: Horizontalzellen, A: Amakrinzellen, G: Ganglienzellen, M: Müllerzellen, OS: äußeres Segment, IS: inneres Segment, OLM: äußere Grenzmembran, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht (verändert nach Euler et al., 2008; aus: Puller C. und Haverkamp S., Neuroforum 4/09: S. 114-123).

Durch den avaskulären Aufbau der Vogelretina sind diese Augen besonders für Studien der rSD geeignet, da vaskuläre Effekte nicht in Konkurrenz mit neuronalen Effekten treten. Aufgrund der Avaskularität wird die Retina bei fast allen Vögeln über ein spezielles, lamellenartiges Organ, dem *Pecten oculi*, welches in den Glaskörper hineinragt und durch sein dichtes Netz an Kapillaren sehr gut durchblutet ist, über Diffusion durch den Glaskörper versorgt. Durch

diese Begebenheit ist die Retina auch während der experimentellen Versuche sehr einfach durch den sie im Versuchsaufbau (siehe „Material und Methoden“) umgebenden Ringer zu versorgen und ermöglicht damit die Durchführung mehrstündiger Experimente.

Die Retina ist im Gegensatz zu anderen neuronalen Geweben transparent, was sich aus ihrem inversen Aufbau ergibt. Durch das sich der Retina anschließende Pigmentepithel wirkt sie beim Anblick jedoch schwarz. Während einer SD Welle kommt es an der Wellenfront durch die massive Ionenumverteilung an der Membran, dem nachfolgenden Wassereinstrom und dem damit verbundenen Anschwellen der Zellen zur Änderung des Brechungsindex der Retina, wodurch sie milchig und trübe erscheint (*Martins-Ferreira and do Castro, 1966*). Dies kann sehr gut mit dem bloßen Auge betrachtet werden (siehe Abbildung 1.6). Inzwischen konnte das intrinsische optische Signal auch bei der kortikalen SD beschrieben werden. Es ist jedoch viel schwächer ausgeprägt und weicht in seiner Form von dem der retinalen SD ab (*Ba et al., 2002; Anderson and Andrew, 2002*).

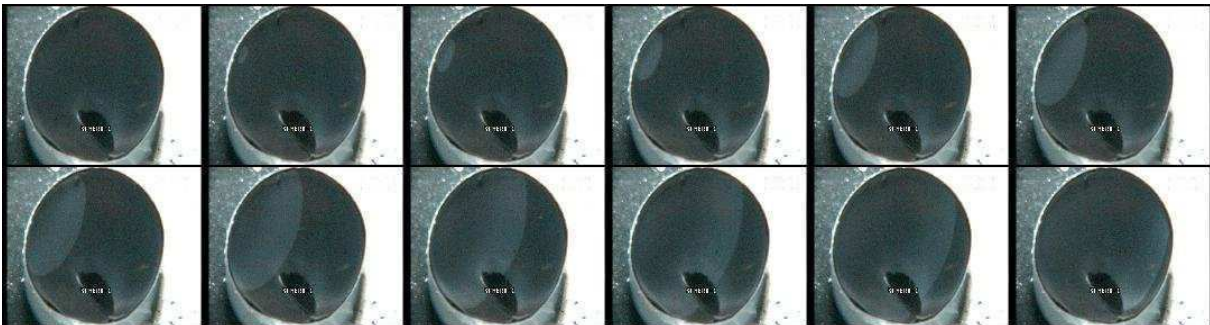


Abbildung 1.6: Blick auf eine präparierte Retina. Die Ausbreitung der SD-Welle ist in den aufeinanderfolgenden Bildern gut zu erkennen.

Durch den Aufbau der Retina mit ihren wenigen Zellschichten kann sie nahezu als zweidimensionales Modell, sozusagen als „natürlicher Gewebeschnitt“, gesehen werden. Der Vorteil der Retina liegt dabei jedoch in der extrem einfachen Präparation und der sehr guten Handhabung über den Zeitraum länger andauernder Experimente. Dadurch dient sie als willkommenes Bindeglied zwischen pharmakologischen Messungen an Einzelzellen und Messungen am kompletten Organismus.

1.5. Parameter der rSD

Ausbreitungsgeschwindigkeit der rSD

Der am einfachsten zu bestimmende Parameter der rSD ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront über das neuronale Gewebe. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit lässt sich u.a. durch Veränderung der die Retina umspülenden Ringerlösung (*Marrocos and Martins-Ferreira, 1990*), durch Änderung der Temperatur (*Brand et al., 1997*) als auch durch Zugabe pharmakologischer Substanzen leicht beeinflussen (*Wiedemann et al., 1995*). Die Geschwindigkeit der Wellenausbreitung dient vorrangig zum Nachweis, ob Substanzen neuroaktiv sind. Die erhobenen Daten dienen ebenfalls der Erstellung sogenannter Dosis-Wirkungskurven und erlauben einen ersten Vergleich zu vorliegenden Daten anderer Substanzen.

Intrinsisches optisches Signal (IOS) der rSD

Trägt man die Helligkeitsänderungen der Retina, die sich beim Durchlaufen einer SD-Welle ergeben, gegen die Zeit auf, so erhält man das sogenannte intrinsische optische Signal (IOS). Dieses lässt sich grob in drei Abschnitte einteilen. Der Aufstrich des 1. Peaks der Kurve deutet auf die Leitfähigkeit der Membranen hin und spiegelt somit die Öffnung der Ionenkanäle und den damit verbundenen Zusammenbruch der Ionengradienten wider. Eine Zunahme der positiven Steigung weist damit auf eine Zunahme der Leitfähigkeit hin. Der Abfall des 1. Peaks zeigt die Wiederherstellung der Gradienten durch die ATPasen auf. Eine Abnahme der negativen Steigung weist somit auf eine reduzierte Aktivität der Ionenpumpen hin. Der 2. Peak entspricht der Wiederherstellung des ATP-Spiegels durch eine erhöhte Zufuhr von Glukose und Sauerstoff (*Vercesi and Martins-Ferreira, 1983; Mayevsky and Weiss, 1991; Dahlem, 2001*) (siehe Abbildung 1.7). Der Zeitgang eines typischen IOS unter Standardbedingungen beläuft sich auf ca. 15 Minuten, was der gesamten Refraktärzeit des Gewebes entspricht. Hierbei entspricht der gesamte erste Peak der absoluten Refraktärzeit, während der 2. Peak die relative Refraktärphase widerspiegelt.

Durch Veränderung der Versuchsbedingungen lässt sich diese Signalkurve in ihrer Form und Dauer gut beeinflussen (*Martins-Ferreira and de Oliveira-Castro, 1966; van Harreveld, 1984; Weimer and Hanke, 2005*).

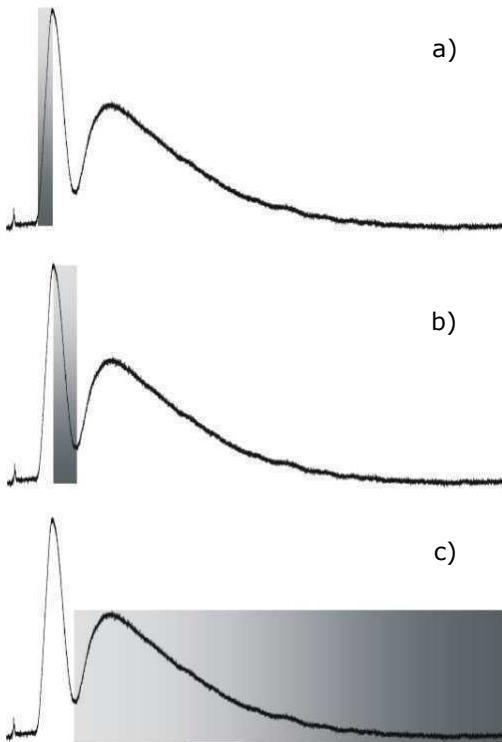


Abbildung 1.7: Darstellung des intrinsischen optischen Signals (IOS) der rSD unter Standardbedingungen, aufgeteilt in seine drei Abschnitte: a) Wellenfront und Zusammenbruch der Ionenhomöostase, b) Wiederherstellung der Ionengradienten unter Verbrauch von ATP, c) Bereitstellung von neuem ATP unter Verbrauch von Glukose (verändert nach Dahlem, 2001).

Latenz der rSD

Misst man die Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, die sogenannte Latenz, kann man direkte Rückschlüsse auf die Erregbarkeit des Gewebes ziehen (Weimer and Hanke, 2005). Durch Zugabe pharmakologisch wirksamer Substanzen können Veränderungen in der Erregbarkeit des neuronalen Gewebes sehr gut nachgewiesen werden. Verlängerte Latenzen deuten dabei auf eine geringere Erregbarkeit des Gewebes hin, verkürzte Latenzen auf eine höhere Erregbarkeit.

Elektrisches Potential der rSD

Trägt man die Veränderung des extrazellulären Potentials während einer SD-Welle gegen die Zeit auf, so kann die langsame negative Verschiebung sehr gut aufgezeigt werden. Diese Kurve lässt sich, ähnlich des IOS, in Phasen einteilen. Der Aufstrich der Potentialänderung zeigt die Leitfähigkeit der betroffenen Membranen auf und spiegelt so die Aktivität der Ionenkanäle wider, die sich nach der Depolarisation der Zellen öffnen und die Ionengradienten zusammenbrechen lassen. Eine Zunahme der positiven Steigung entspricht somit einer erhöhten Leitfähigkeit der Membranen. Der exponentielle Abfall der Kurve stellt die

Aktivität der ATPasen dar, die während der Wiederherstellung der Ionengradienten aktiv sind. Eine Zunahme der Ratenkonstante k entspricht dabei einer reduzierten Aktivität der Ionenpumpen (siehe Abbildung 1.8). Der Zeitgang einer typischen Potentialänderung während einer SD-Welle unter Standardbedingungen beläuft sich auf ca. 2 Minuten und entspricht in etwa der absoluten Refraktärzeit. Demzufolge verlaufen der 1. Peak des IOS und das elektrische Potential einer SD Welle zeitlich ungefähr parallel (Peixoto et al., 2001). Die größte Potentialänderung von bis zu 20mV findet sich in der IPL (Mori et al., 1976; Martins-Ferreira, 1983; Martins-Ferreira et al., 2000).

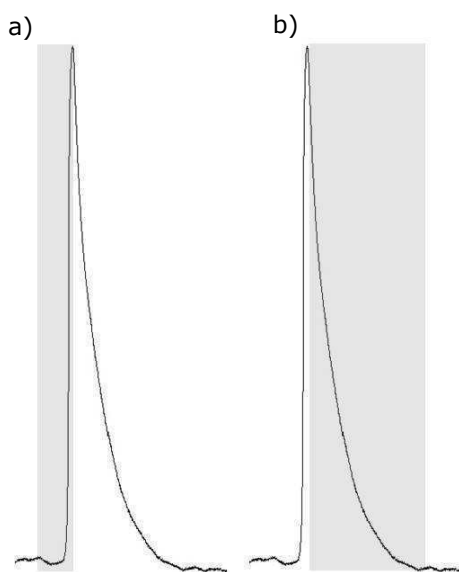


Abbildung 1.8: Darstellung der langsamen negativen Potentialverschiebung während einer rSD unter Standardbedingungen, aufgeteilt in ihre zwei Abschnitte: a) Zusammenbruch der Ionenhomöostase durch Öffnung der Ionenkanäle, b) Wiederherstellung der Ionengradienten durch ATPasen (wie in der Elektrophysiologie üblich, ist eine negative Potentialänderung nach oben aufgetragen).

Messungen zur Neuroprotektion

Der Abfall des 1. Peaks beim intrinsischen optischen Signal (IOS) einer SD-Welle ist die maßgebliche Größe für die Regeneration des Gewebes nach der Depolarisation. Daher stellt das Verhältnis des Abfalls des 1. Peaks zum Aufstrich des 1. Peaks ein sinnvolles Maß für die Veranschaulichung einer möglichen neuroprotektiven Wirkung von Substanzen dar. Bei einer unter Standardbedingungen ausgelösten SD-Welle erhält man einen Quotient von ca. 1. Durch Zugabe neurotoxischer Substanzen, wie z.B. NMDA, sinkt dieser Quotient auf nahezu 0, da sich durch die verstärkte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und dem damit verbundenen verstärkten Einstrom von Calcium-Ionen das Gewebe nicht mehr erholt und die ursprüngliche Transparenz der Retina nicht mehr erreicht wird. Durch die zusätzliche Gabe neuroprotektiver Substanzen sollte sich dieser Quotient wieder erhöhen.

1.6. Untersuchte Substanzen

„Unter der Bezeichnung „zentralnervös stimulierende Pharmaka“ werden Stoffe mit unterschiedlichem pharmakodynamischem Profil zusammengefasst, deren Gemeinsamkeit eine motorische und/oder psychische Erregung ist. Sie steigern die Vigilanz und Aufmerksamkeit und verhindern die Müdigkeit. Ein ausgeprägter psychostimulierender Effekt ist nicht bei allen Stoffen vorhanden“.

(aus: *Pharmakologie und Toxikologie*, 6.Auflage. Estler C.J. und Schmidt H., Schattauer Verlag, 2007)

In der vorliegenden Arbeit wurde, zur Darstellung der Wirkung unterschiedlicher Pharmaka auf neuronales Gewebe am Modellsystem der retinalen Spreading Depression, auf Substanzen zurückgegriffen, die alle der Gruppe „exzitatorisch“ angehören. Dadurch gelingt eine umfassende Kategorisierung der Wirkung dieser Stoffe auf die unterschiedlichen Parameter der retinalen Spreading Depression. Um einen genauen Einblick zur Wirkung dieser Stoffe auf neuronales Gewebe zu bekommen, beschränkte man sich auf, vom Wirkungsmechanismus her, relativ gut bekannte Substanzen. Die ausgewählten Substanzen sind entweder im Alltag gebräuchlich (Nikotin und Koffein) oder als pharmazeutische Stoffe oder Drogen bekannt (Kokain, Amphetamin und Methylphenidat). Diese Substanzen lassen sich zudem in zwei Unterkategorien einteilen. Zum Einen in die Kategorie der „biogenen Substanzen“, zu denen Nikotin, Koffein als auch Kokain zählen, zum Anderen in die Gruppe der „synthetischen Substanzen“, zu denen Amphetamin und Methylphenidat gehören.

Nikotin

Nikotin ist ein vorwiegend in der Tabakpflanze (*Nicotiana*) vorkommendes toxisches Alkaloid, welches in geringen Mengen auch in anderen Nachtschattengewächsen nachzuweisen ist. Es dient dort zur Abwehr von Insekten und wurde daher früher im Pflanzenschutz als Pestizid eingesetzt. In der Natur kommt ausschließlich (-)-Nikotin vor, welches stärker wirksam ist als das rechtsdrehende Enantiomer. Isoliert wurde es erstmals im Jahre 1928.

Nikotin ist eine bekannte Droge und ein stark wirkendes Nervengift; ca. 60mg sind für den Menschen tödlich. Es wird hauptsächlich in Form von Tabak durch rauchen, kauen oder schnupfen konsumiert. Nikotin kann über die Haut, Schleimhäute, Magen-Darm-Trakt und Lunge leicht resorbiert werden und kann

sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazenta-Schranke passieren. Nikotin wird im Körper zu 90% schnell durch Oxidasen abgebaut und renal ausgeschieden, die verbleibenden 10% werden unverändert ausgeschieden.

In kleinen Konzentrationen hat Nikotin einen stimulierenden Effekt. Es beschleunigt u.a. die Atmung, die Herzfrequenz und erhöht den Blutdruck. Bei hohen Dosen folgt der zentralen Erregung eine Hemmung durch Dauerdepolarisation. Bei toxischen Konzentrationen ist u.a. eine Atemlähmung durch die Blockierung der neuromuskulären Übertragung die Folge.

Nikotin ist in der Forschung eine der bestuntersuchten Substanzen. Es wirkt als Agonist auf den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), welcher sich in den sympathischen und parasympathischen Ganglien, im Nebennierenmark, an den motorischen Endplatten und auch im zentralen Nervensystem (ZNS) findet. Im ZNS stimuliert Nikotin durch die erhöhte Aktivität cholinergischer Signalwege eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin.

Koffein (Coffein)

Koffein, ein Purin-Alkaloid, ist ein anregend wirksamer Bestandteil von Genussmitteln wie Kaffee, Tee, Mate und Kakao. Durch den weltweit enormen Konsum dieser Genussmittel ist Koffein die am häufigsten konsumierte pharmakologische Substanz überhaupt. Isoliert wurde es erstmals 1819 aus der Kaffeebohne. Koffein aus Kaffee ist anders gebunden als das Koffein aus Tee. Dadurch wird das Koffein aus Kaffee bereits im Magen freigesetzt, während das Koffein aus Tee erst im Darm freigesetzt und aufgenommen werden kann. Dies erklärt die später eintretende Wirkung. Die Resorption von Koffein über den Magen-Darm-Trakt erfolgt sehr rasch und fast vollständig. Koffein kann die Blut-Hirn-Schranke fast ungehindert passieren und entfaltet seine Wirkung somit hauptsächlich im ZNS. Ca. 5% von Koffein werden unverändert ausgeschieden, 95% werden demethyliert und oxidiert ausgeschieden. Die LD₅₀ von Koffein liegt bei 192mg/kg.

Koffein bewirkt u.a. eine Erhöhung der Herzschlagfrequenz und der Kontraktionsstärke, es regt die Atmung an und lässt die Blutgefäße im Gehirn kontrahieren, die übrigen dilatieren. In hohen Dosen fördert Koffein u.a. Kopfschmerzen, Nervosität und Herzrasen.

Koffein stimuliert das ZNS erst in höheren Dosen, aber die molekulare Wirkung von Koffein wird immer noch diskutiert. Zwei Wirkungswege gelten jedoch als gesichert:

Die hauptsächliche Wirkung von Koffein beruht auf der Blockade der Adenosin- A_1 -Rezeptoren, die für die Dämpfung der Aktivität zerebraler Neuronen verantwortlich sind. Diese Blockade führt zu einer indirekten Erhöhung neuronaler Aktivität und führt dadurch zu einer vermehrten Ausschüttung von Neurotransmittern. Eine Hemmung der Phosphodiesterasen, welche cAMP zu AMP abbauen, tritt erst bei relativ hohen Dosen ein (Arnaud, 1987).

Kokain (Cocain)

Kokain gehört zu den Tropan-Alkaloiden und wird aus den Blättern der Coca-Pflanze (*Erythroxylon coca*) gewonnen. Es ist ein starkes Stimulans und eine weltweit verbreitete Rauschdroge. Traditionell werden Kokablätter gekaut oder als Tee gekocht, um Ermüdungserscheinungen und Hunger zu unterdrücken. Die dadurch aufgenommenen Mengen führen nicht zu einem „kick“, wie er durch andere Darreichungsformen mit höheren Konzentrationen entsteht. Erstmals isoliert wurde es 1859.

Kokain ist das älteste, bekannte Lokalanästhetikum und wurde zudem zur Behandlung von Kopfschmerzen, Neuralgie und Verdauungsstörungen eingesetzt. Heute findet es noch Gebrauch in der Ophthalmologie und unterliegt ansonsten in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG).

Kokain-Hydrochlorid, die gebräuchlichste Form von Kokain, kann über die Schleimhäute (durch „schnupfen“ oder „ziehen“) resorbiert werden. Jedoch wird Kokain ebenfalls geraucht oder gespritzt. Alle Konsumformen werden unter dem Begriff „Kokainismus“ zusammengefasst, was einer direkten Aufnahme in den Körper entspricht. Maximal 5% werden unverändert ausgeschieden, die verbleibenden 95% werden zuvor hydrolysiert. Die LD_{50} von Kokain liegt bei 15mg/kg.

Kokain bewirkt eine Erhöhung der Atem- und Pulsfrequenz und wirkt vasokonstriktiv, was zu einer Erhöhung des Blutdruckes führt. Im ZNS bewirkt es eine Stimmungsaufhellung, Euphorie und Müdigkeitsvertreibung sowie eine Hungerdämpfung. Kokain führt schnell zu einer psychischen, aber keiner körperlichen Abhängigkeit.

Kokain wirkt im ZNS als Wiederaufnahmehemmer für Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Ebenso fördert es den Ausstoß von Dopamin über zentrale Mechanismen. In sehr hohen Konzentrationen bindet Kokain außerdem an spannungsabhängige Natriumkanäle und blockiert diese. Darauf beruht seine lokalanästhetische Wirkung (*Benowitz, 1993*).

Amphetamin

Amphetamin ist eine künstlich hergestellte Substanz, die erstmals 1887 synthetisiert wurde. Ursprünglich sollte sie asthmatische Symptome lindern, aber durch ihre zusätzliche appetithemmende Wirkung wurde sie ebenfalls zur Gewichtskontrolle verwendet. Heutzutage wird Amphetamin noch zur Behandlung von Narkolepsie sowie vereinzelt zur Behandlung von ADS (Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom) als auch ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom) verwendet. Es ist eine der bekanntesten Dopingsubstanzen und wird umgangssprachlich auch als „Speed“ bezeichnet. Amphetamin wird in Pillenform oder als Pulver konsumiert, wobei das Pulver durch die Nase geschnupft wird und eher als Droge verwendet wird.

Amphetamin wird enteral vollständig aufgenommen und kann die Blut-Hirn-Schranke problemfrei passieren. Nach enzymatischem Abbau in der Leber wird Amphetamin als wasserlösliche Säure im Urin ausgeschieden, ein kleiner Teil auch unverändert.

Durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Adrenalin bewirkt Amphetamin eine Erweiterung der Bronchien sowie eine Erhöhung der Herzkraft und Herzfrequenz. In der Leber und Muskulatur wird verstärkt Glykogen zu Glukose abgebaut. Durch sehr hohe Dosen Amphetamin kommt es zu akuten psychotischen Zuständen mit Wahn und Halluzinationen.

Die zentralnervöse Wirkung beruht hauptsächlich auf der Wiederaufnahmehemmung von Dopamin und Noradrenalin, da Amphetamin als Substrat der Monoamintransporter in der Membran dopaminerger und noradrenerger Neuronen und in der Membran von Speichervesikeln gilt. Dadurch konkurriert es mit Dopamin und Noradrenalin um die Aufnahme in die entsprechenden Neuronen. Durch einen Na^+ -Co-Transport steigt der intrazelluläre Natriumspiegel, was schließlich zu einer Umkehrung des Transporters führt. Durch eine zusätzliche Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) durch Amphetamin, kommt es zu einer vermehrten Konzentration von Dopamin und

Noradrenalin in der Präsynapse. Eine der Hauptwirkungen von Amphetamin beruht also auf einer nicht-exozytotischen, transporter-vermittelten Freisetzung der Neurotransmitter. Zudem werden durch Amphetamin auch Dopamin und Noradrenalin aus der Präsynapse ausgeschüttet. In hohen Konzentrationen kommt es zudem zu einer Serotonin-Ausschüttung (Fleckenstein et al., 2007).

Methylphenidat

Methylphenidat ist ein Arzneistoff mit stimulierender Wirkung. Es gehört zu den Amphetamin-ähnlichen Substanzen, die derzeit hauptsächlich zur Behandlung von ADS/ADHS eingesetzt werden. Ebenso findet es Anwendung bei der Behandlung von Narkolepsie und zur Augmentation bei therapieresistenten Depressionen. Nebenwirkungen sind dabei u.a. Schlaflosigkeit, Appetitlosigkeit, Übererregbarkeit und Kopfschmerzen. Synthetisiert wurde es erstmals 1944.

Methylphenidat wird hauptsächlich oral eingenommen, es kann aber auch intravenös injiziert werden. Dies findet hauptsächlich beim Missbrauch Verwendung, jedoch hat es durch seine eingeschränkte Verfügbarkeit kaum Bedeutung in der Drogenszene. Durch seine starke Lipophilie wird Methylphenidat sehr gut resorbiert und kann die Blut-Hirn-Schranke passieren. Die Wirkung von Methylphenidat im ZNS beruht auf der Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin und Noradrenalin in die Präsynapse. Zusätzlich bewirkt es eine Ausschüttung von Dopamin und Noradrenalin.

Wirkungsmechanismen der einzelnen Substanzen

	Katecholamine		Serotonin		MAO-Hemmung	Na ⁺ -Kanal-Blockade
	Wiederaufnahme-hemmung	Aus-schüttung	Wiederaufnahme-hemmung	Aus-schüttung		
Nikotin	-	+++	-	+++	-	-
Koffein	-	+++	-	+++	-	-
Kokain	+++	+	+++	+	-	+
Amphetamin	+++	++	+	-	+	-
Methylphenidat	+++	+	-	-	-	-

Abbildung 1.9: Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen der untersuchten Substanzen. (-: kein Einfluss; + bis +++: Einfluss im aufsteigendem Maße).

NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)

Um eine mögliche neuroprotektive Eigenschaft der vorgenannten Substanzen nachzuweisen, wurde durch die vorherige Applikation von NMDA eine Schädigung des neuronalen Gewebes simuliert.

NMDA ist ein Aminosäure-Derivat, das als künstlicher Agonist selektiv mit dem ionotropen Glutamaterezeptor (NMDA-Rezeptor) agiert (*Watkins and Jane, 2006*). Dieser ist durchlässig für Kationen (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}), und seine permanente Öffnung durch höhere Dosen NMDA führen zum exzitotoxischen Zelltod (*Choi, 1992*).

NMDA-Rezeptoren sind verantwortlich für die präzise Differenzierung der Synapsenverknüpfung im sich entwickelnden Gehirn; daher verursacht eine ständige NMDA-Gabe eine strukturelle Veränderung der Synapsenmorphologie.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit wurden an frisch präparierten Retinae von Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) im Alter zwischen 7 und 28 Tagen durchgeführt. Die Eintagsküken der Rassen *Dekalb White*, *Bovans Brown* sowie *HISEX* wurden von der Firma Weiss in Kirchberg / Iller bezogen, und bis zu ihrer Verwendung im institutseigenen Stall versorgt.

2.2. Präparation

Die Tiere wurden zuerst mittels einer scharfen Geflügelschere dekapitiert, und danach wurden die ganzen Augen aus den Augenhöhlen herauspräpariert. Hierfür wurden zunächst die Augenlider mit Hilfe einer Schere entfernt, anschließend die Augenmuskulatur sowie der Sehnerv (*Nervus opticus*) durchtrennt. Vom herauspräparierten Auge wurde noch anhaftendes Muskel- und Bindegewebe entfernt, danach das Auge mit Hilfe einer scharfen Rasierklinge äquatorial in zwei Hälften geteilt. Der Glaskörper wurde mit einer Pinzette sehr vorsichtig entfernt, um ein eventuelles Ablösen der Retina zu vermeiden. Der vordere Teil des Auges, mit Hornhaut und Linse, wurde verworfen. Der hintere Teil des Auges mit inliegender Retina, der sogenannte eye-cup, wurde sofort in ein Becherglas mit vorgewärmter physiologischer Ringerlösung (ca. 30°C) überführt. Anschließend an die Präparation wurde der eye-cup mit handelsüblichem Cyanacrylatkleber (Marston-Domsel, Rapidkleber) in eine kleine Zellkulturschale (Nunc, Ø 35 mm) geklebt und diese vorsichtig mit Ringerlösung aufgefüllt. Nicht benötigte eye-cups verblieben bis zu ihrem Gebrauch im Becherglas auf einer Wärmeplatte (Medax, SP12).

2.3. Ringerlösung

Um dem neuronalen Gewebe möglichst naturnahe physiologische Bedingungen zu gewähren, wurden die Retinae sofort nach der Präparation in eine vorgewärmte Standard-Ringerlösung überführt. Diese besaß folgende Zusammensetzung:

100 mM	NaCl
6 mM	KCl
30 mM	NaHCO ₃
1,5 mM	MgSO ₄
1 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	TRIS
30 mM	D(+)-Glukose
1 mM	CaCl ₂

Aus allen aufgeführten Salzen wurden zunächst Stammlösungen hergestellt. Daraus wurden erst vor Gebrauch die jeweils benötigten Mengen entnommen und zusammen in entsprechender Menge destilliertem Wasser (aqua dest.) aufgenommen. Um ein Ausfallen von CaCO₃ zu vermeiden, wurde vor dessen Zugabe zunächst der pH-Wert mit Hilfe von HCl auf pH7,5 gesenkt. Nach Zugabe von CaCl₂ wurde der pH-Wert auf pH7,4 eingestellt. Die Chemikalien für die benötigte Ringerlösung wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka oder Merck bezogen und besaßen alle den Reinheitsgrad p.a.

2.4. Applizierte Substanzen

Die zu untersuchenden Substanzen wurden vor den Messungen für die jeweils benötigte Konzentration auf einer Feinwaage (Mettler Toledo, AG245) abgewogen und in entsprechender Menge Ringerlösung gelöst. In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden Substanzen gearbeitet:

Nikotin: *(-)-1-Methyl-2-(3-Pyridyl) Pyrrolidin*

Koffein: *1,3,7-Trimethylxanthin*

Kokain: *Ecgonin Methyl Ester Benzoat Hydrochlorid*

Amphetamin: *(±)-α-Methylphenethylamin Sulfat*

Methylphenidat: *threo-Methyl α-Phenyl α-(2-Piperidyl) Acetat Hydrochlorid*

NMDA: *N-Methyl-D-Aspartat*

Hexamethonium: *Hexamethonium Dichlorid*

Methyllycaconitin (MLA): *Methyllycaconitin Citrat Hydrat*

Die Strukturformeln, die Summenformeln sowie die Molekulargewichte der Substanzen finden sich im Anhang. Die verwendeten Substanzen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Serva-Feinbiochemie bezogen.

2.5. Messaufbau

2.5.1. Optische Messungen

Die Messungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie die Messungen des intrinsischen optischen Signals (IOS) wurden an einem Setup durchgeführt, der für vier Retinae ausgelegt war. Grundlage dafür war eine sehr schwere Metallplatte, um eventuelle Erschütterungen zu minimieren. Auf diese Grundplatte war eine weitere Metallplatte mit vier Vertiefungen geschraubt, in welche die kleinen Zellkulturschalen (=Kammern) passgenau eingesetzt werden konnten. Unter diese Metallplatte war eine Heizfolie geklebt, deren Temperatur mittels eines Netzgerätes (LD Didactic GmbH, 521 56) stufenlos reguliert werden konnte. Dadurch konnte eine konstante Temperatur von 30°C in den Kammern gehalten werden. Zur Überwachung dienten digitale Thermometer (Lutron, TM-914C), deren Temperaturfühler an jeder Kammer angebracht wurden. Mit Hilfe von zwei 4-kanaligen Peristaltikpumpen (Spetec, Perimax12) wurden die Kammern während des gesamten Versuches mit Ringerlösung perfundiert. Um einen guten Austausch der Ringerlösung in den Kammern zu gewährleisten, wurde die frische Lösung am Boden der Kammern mit einer Rate von ca. 1 ml/min eingeleitet und die verbrauchte Ringerlösung an der Oberfläche der gegenüberliegenden Seite wieder abgesaugt. Dies wurde durch kleine, gebogene

Glasröhrchen ermöglicht, die in die Zu- und Ablaufschläuche der Kammern gesteckt und passend positioniert wurden (siehe Abbildung 2.1).

Über den vier Kammern war jeweils eine Videokamera (JVC, TK-C721EG) mit passendem Objektiv und Linse (2-fach) angebracht, die alle an einen 4-Kanal-Video-Multiplexer (EcoLine, Colorquad) angeschlossen waren. Auf diese Weise war es möglich, entweder alle vier Kammern gleichzeitig oder einzelne Kammern am nachgeschalteten Monitor (Sony Trinitron, PVM-1442QM) zu beobachten. Das Videosignal wurde vom Kontrollmonitor an einen DVD-Rekorder (Philips, DVDR75) weitergeleitet, womit von allen Messungen der Retinae Videoaufzeichnungen gemacht wurden.

Um das intrinsische optische Signal (IOS) der Retina während einer SD-Welle zu messen, war über einer der vier Kammern zusätzlich ein Photomultiplier (Hamamatsu, H5784) mit aufgeschraubtem Objektiv (Optem International) angebracht. Dieser maß die relative Helligkeit eines sehr kleinen Areals (ca. $0,25 \text{ mm}^2$) auf der Retina. Das Signal des Photomultipliers wurde in einem nachfolgenden Filter (Ithaco, 4302 Dual 24dB / Octave Filter) bei 10Hz gefiltert und an einen handelsüblichen PC mit integrierter A/D-Wandler-Karte (PCL-812PG) und geeigneter Aufnahmesoftware (DASYLab, 4.0) weitergeleitet. Dort wurde es mit einer Aufzeichnungsrate von 20Hz als ASCII-File gespeichert.

Die Spreading Depression Wellen wurden an diesem Messaufbau mechanisch, mit Hilfe einer sehr feinen Nadel, ausgelöst.

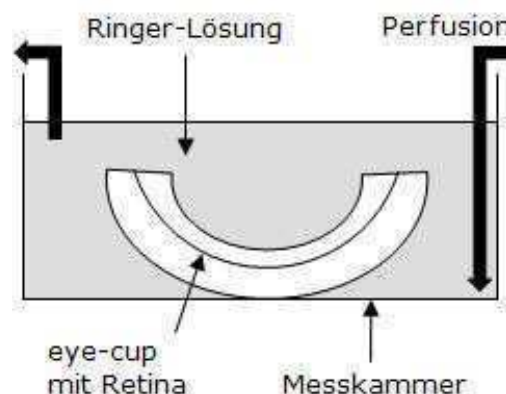


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer Messkammer mit angeschlossener Perfusion.

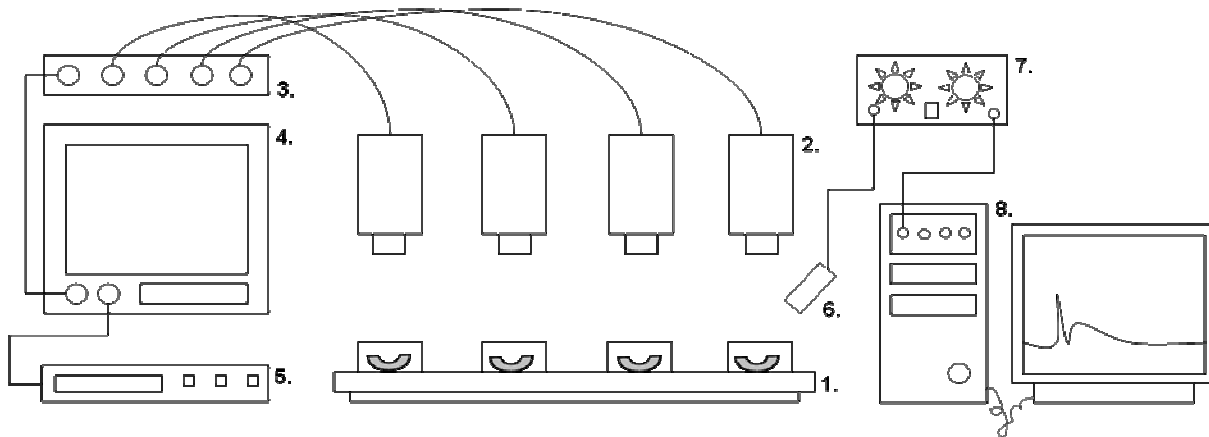


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des optischen Messaufbaus: 1. beheizbare Metallplatte mit eingesetzten Messkammern, 2. CCD-Kameras, 3. Multiplexer, 4. Monitor, 5. DVD-Rekorder, 6. Photomultiplier, 7. Filter, 8. PC.

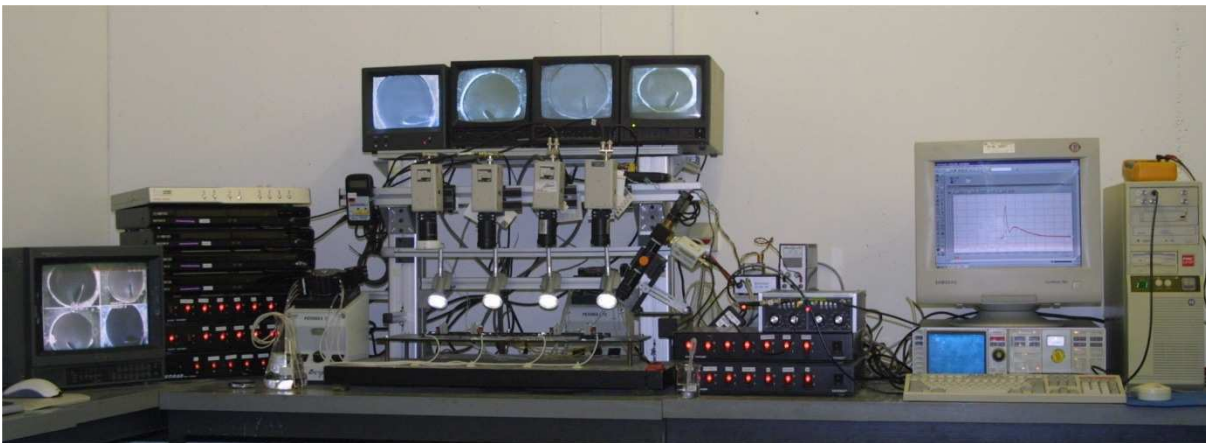


Abbildung 2.3: Photographie des gesamten optischen Messaufbaus (einzelne Bauteile: siehe schematische Darstellung).



Abbildung 2.4: Nahaufnahme einer Messkammer mit Photomultiplier (rechts).

2.5.2. Elektrophysiologische Messungen

Die Messungen des elektrischen Potentials sowie der Latenz der SD-Wellen wurden an einem weiteren Setup durchgeführt, der jedoch nur für eine Retina ausgelegt war. Um mechanische Erschütterungen zu vermeiden, wurde der gesamte Messstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut. Durch einen Faradaykäfig, der den gesamten Setup umgab, konnten die elektrischen Potentialmessungen möglichst frei von elektrischen Störungen gehalten werden. Auf den schwingungsgedämpften Tisch war ein kleiner Kreuztisch geschraubt, auf dem eine kleine Metallplatte angebracht war. In diese war eine Vertiefung gefräst, in welche die kleine Zellkulturschale mit eingeklebtem eye-cup (=Messkammer) passend eingesetzt werden konnte. Unter die Metallplatte war eine Heizfolie geklebt, deren Temperatur über einen Regler (npi, HFTC 30TS) und mittels eines in der Messkammer eingehängten Fühlers konstant gehalten werden konnte. Somit wurde eine permanente Kammertemperatur von 30°C gewährleistet. Mit Hilfe zweier Peristaltikpumpen (Spetec, Perimax 12) wurde die Retina über die gesamte Versuchsdauer hinweg mit frischer Ringerlösung versorgt. Um einen optimalen Austausch der Lösung zu gewähren, wurde ca. 1 ml/min frische Ringerlösung am Boden der Messkammer eingeleitet und auf der gegenüberliegenden Seite die verbrauchte Lösung an der Oberfläche wieder abgesaugt. Dies wurde mit Hilfe gebogener Glasröhrchen, welche in die Versorgungsschläuche gesteckt und passend positioniert wurden, durchgeführt. Der Kreuztisch diente der exakt mittigen Positionierung der Retina unterhalb des montierten Mikroskops (Leica, MS 5). Eine CCD-Kamera (JVC, TK-C721EG) war über einen Strahlenteiler am Mikroskop angebracht, deren Bild an einen Monitor (JVC, TM-A10E) weitergeleitet wurde. Dieser Monitor diente vor allem der Positionierung der Reiz- sowie der Messelektrode. Von diesem Monitor aus wurde das Videosignal zum Einen von einem DVD-Rekorder (Philips, DVDR 3305) zur Sicherung aufgezeichnet, zum Anderen über eine Breakout-Box (National Instruments, BNC-2110) an einen handelsüblichen PC weitergeleitet. Daraus wurde dort, mit Hilfe einer passend programmierten Software (National Instruments, LabVIEW 8.5.1), das intrinsische optische Signal (IOS) eines frei ausgewählten Areals der Retina (10x10 Pixel) gewonnen und mit einer Aufzeichnungsrate von 10 HZ als ASCII-File gespeichert. Über einen zweiten Strahlenteiler war zusätzlich ein Photomultiplier (Physiks Instruments, P-267) am Mikroskop angebracht, der sein Signal über einen Tiefpass-Filter von 10Hz (EFS-

20) und die Breakout-Box an den angeschlossenen PC weitergab. Dort wurde es ebenfalls durch LabVIEW mit einer Rate von 10Hz als ASCII-File aufgezeichnet. Um das elektrische Potential während einer SD-Welle ableiten zu können, musste eine Glaspipette mit Ableitelektrode in das retinale Gewebe eingestochen werden. Um dies zu ermöglichen, wurde ein elektrischer Grobtrieb (Phytron, ZSS 26.200.1,2) am Rande des schwingungsgedämpften Tisches aufgeschraubt. Darauf wurde ein hydraulischer Feintrieb (Narishige, MO203) montiert, an dem der Pipettenhalter samt Messelektrode und Messpipette angebracht waren. Die Messelektrode (Silberchloridelektrode) war an ein Elektrometer (WPI, FD 223) angeschlossen, der das Messsignal an einen Filter von 10Hz mit zusätzlicher 300facher Verstärkung (M 07632-A2) weitergab. Von dort wurde das Signal an die Breakout-Box und den daran angeschlossenen PC weitergeleitet und dort wiederum über LabVIEW mit einer Aufzeichnungsrate von 10Hz als ASCII-File gespeichert. Die Messpipetten, die für die Spannungsmessungen benötigt wurden, wurden aus Glaskapillaren der Firma WPI (1B100F-4) hergestellt. Sie wurden mit Hilfe eines horizontalen Pullers (DMZ, Universal Puller) frisch gezogen und besaßen alle einen Widerstand zwischen 600k Ω und 1000 k Ω . Um die Messpipette passend im Gewebe positionieren zu können, wurde zusätzlich zur optischen Kontrolle über den Monitor auch das elektrische Signal beobachtet. Beim Einstich der Messpipette konnte ein ca. 0,5mV großer Potentialsprung beobachtet werden. Somit war sichergestellt, die optimale Einstichtiefe erreicht zu haben (siehe Abbildung 2.5).

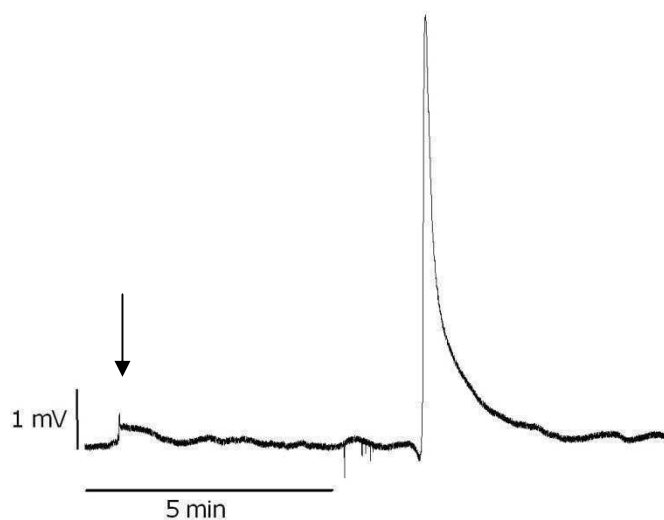


Abbildung 2.5: Beispiel eines Potentialsprungs von 0,6mV beim Einstich der Messpipette (links); im Vergleich dazu ein normales Spannungssignal (Maximum 6mV) einer SD-Welle (rechts).

Die für die elektrische Ableitung benötigte Referenzelektrode (Badelektrode), ebenfalls eine Silberchloridelektrode, wurde am Rand der Messkammer in die Ringerlösung eingetaucht.

Um eine SD-Welle durch einen reproduzierbaren Stimulus auslösen zu können, wurde an diesem Setup elektrisch und nicht mechanisch stimuliert. Hierfür war ebenfalls am Rand des schwingungsgedämpften Tisches ein manueller Grobtrieb (Bachofer) geschraubt, auf dem ein elektrischer Feintrieb (Bachofer) montiert war. Die hierauf befestigte Reizelektrode (WPI, Microelectrode Tungsten, $1\text{M}\Omega$) konnte somit exakt auf der Oberfläche der Retina platziert und nach Bedarf repositioniert werden. Zur Stimulation einer SD-Welle wurde ein Spannungssignal am PC ausgegeben, welches den angeschlossenen Spannungs-Strom-Wandler (HSE, Stimulation II Type 215/I) steuerte. Dieser gab einen Strompuls ($30\mu\text{A}/30\text{ms}$) an die Reizelektrode weiter und löste somit eine SD-Welle an ihrer Spitze aus. Die für die elektrische Stimulation benötigte Badelektrode (Silberchloridelektrode) wurde am Rand der Messkammer in die Ringerlösung eingetaucht.

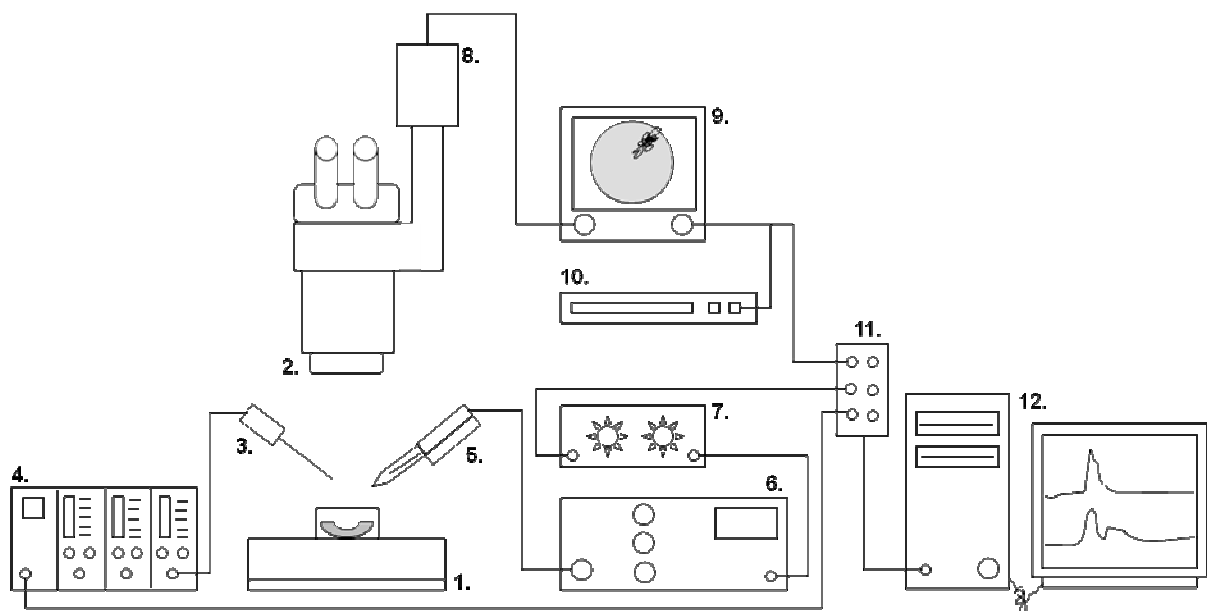


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des elektrophysiologischen Messaufbaus: 1. schwingungs-gedämpfter Tisch, 2. Mikroskop, 3. Reizelektrode, 4. Spannungs-Strom-Wandler, 5. Ableitelektrode, 6. Elektrometer, 7. Filter/Verstärker, 8. CCD-Kamera, 9. Monitor, 10. DVD-Rekorder, 11. Breakout-Box, 12. PC.



Abbildung 2.7: Photographie des gesamten elektrophysiologischen Messaufbaus (einzelne Bauteile: siehe schematische Darstellung).

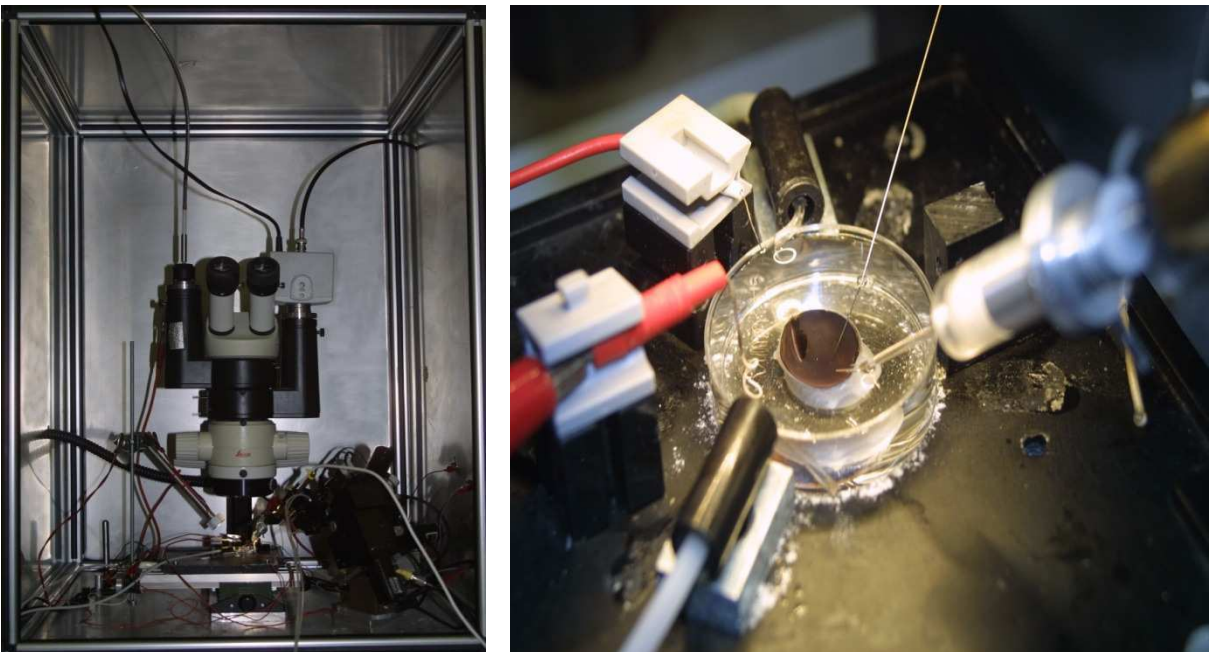


Abbildung 2.8: links: Photographie des Setups innerhalb des Faradayschen-Käfigs, rechts: Nahaufnahme einer Messkammer mit Ableitelektrode (rechts), Reizelektrode (hinten rechts) und den dazugehörigen Badelektroden (links).

2.6. Messprotokolle

2.6.1. Optische Messungen

2.6.1.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit und IOS

Die Messungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit und des intrinsischen optischen Signals (IOS) wurden immer gleichzeitig an vier Retinae durchgeführt. Zuerst wurden je Retina zwei Kontrollwellen (Vorkontrollen) im Standard-Ringer ausgelöst. Dabei wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit jeder Welle gemessen und notiert. Das IOS wurde im PC gespeichert. Zwischen zwei mechanisch ausgelösten Wellen wurde immer eine Regenerationsphase von exakt 30 Minuten eingehalten, um sicherzustellen, dass die Retina völlig erholt war, sich also nicht mehr in der Refraktärphase befand. Anschließend an diese Vorkontrollen wurde die Standard-Ringerlösung gegen eine Ringerlösung, in der die zu untersuchende Substanz in entsprechender Menge gelöst war, ausgetauscht. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurden je Retina vier Wellen, wiederum im Abstand von jeweils 30 Minuten, ausgelöst. Auch hierbei wurden die Geschwindigkeiten gemessen und notiert, ebenso das IOS im PC gespeichert. Anschließend an diese Messungen (Substanzmessungen) wurde die Substanz-Lösung wieder gegen die Standard-Ringerlösung ausgetauscht. Nun wurden die Kammern für 30 Minuten gespült, und danach erneut zwei Kontrollwellen (Nachkontrollen) gemessen.

2.6.1.2. Neuroprotektion

Für die Messungen zur Neuroprotektion, welche ebenfalls am optischen Messstand durchgeführt wurden, wurde ein anderes Messprotokoll verwendet. Hierfür wurde jeweils nur eine SD-Welle als Vorkontrolle mechanisch ausgelöst und ihr IOS auf dem PC gespeichert. Anschließend wurde die Standard-Ringerlösung gegen eine Ringerlösung ausgetauscht, in der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) mit einer Endkonzentration von 30 μ M gelöst war. Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurde diese gegen eine Ringerlösung mit NMDA (30 μ M) und der benötigten Menge der zu untersuchenden Substanz ausgetauscht. Nach weiteren 30 Minuten Einwirkzeit wurde eine Welle ausgelöst und ihr IOS auf dem Computer gespeichert.

2.6.2. Elektrophysiologische Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen konnte immer nur jeweils eine Retina im Setup gemessen werden. Entsprechend den optischen Messungen wurden zuerst zwei Kontrollwellen (Vorkontrollen) ausgelöst und das Spannungssignal der sich ausbreitenden Welle im Computer aufgezeichnet. Zur Kontrolle wurde ebenso das zugehörige IOS gespeichert. Nachfolgend an diese Kontrollmessungen wurde auch hier die Standard-Ringerlösung gegen eine Ringerlösung mit entsprechender Menge zu untersuchender Substanz ausgetauscht. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurden vier Wellen unter Substanzeinfluss ausgelöst, und ihr Spannungssignal sowie das IOS aufgezeichnet. Auch hier wurde im gesamten Messprotokoll die Erholungsphase von 30 Minuten zwischen zwei Wellen berücksichtigt.

2.7. Auswertung

2.7.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die relative Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde unmittelbar nach Stimulation einer Welle ermittelt. Die hierfür benötigte Wegstrecke wurde durch ein kleines Gitterraster, welches direkt am Überwachungsmonitor des optischen Messstandes angebracht wurde, vorgegeben. Die Zeit wurde manuell mit Hilfe einer Stoppuhr erfasst. Durch die den CCD-Kameras vorgeschraubten Linsen wurde am Überwachungsmonitor eine vergrößerte Darstellung der einzelnen Retinae wiedergegeben. Um jedoch die tatsächliche Laufstrecke der Wellenfront am Monitor ermitteln zu können, wurde vor Beginn der Messungen Millimeterpapier anstelle der Messkammern unter die CCD-Kameras gelegt, und die vorgegebene Strecke am Monitor ausgemessen. Die aus diesen Werten errechnete Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde in mm/min angegeben.

2.7.2. Intrinsisches optisches Signal (IOS)

Die Signalkurve des IOS wurde zur Auswertung in vier Parameter aufgeteilt. Der erste Parameter entsprach der maximalen Amplitude des ersten Peaks. Die maximale positive Steigung (m_1) des ersten Peaks stellte den zweiten Parameter dar, die maximale negative Steigung (m_2) des ersten Peaks den dritten. Die Fläche (A) unterhalb des zweiten Peaks wurde als vierter Parameter gewertet (siehe Abbildung 2.9).

Alle vier Parameter wurden mit Hilfe des Computerprogramms LabVIEW 5.5.1 (National Instruments) ermittelt. Dazu wurde jeder einzelne ASCII-File in das Programm eingespielt, durch eine kubische Spline-Anpassung (Balance Parameter $1E-5$) geglättet und als Funktion der Zeit wiedergegeben. Zur Bestimmung der maximalen Amplitude wurde die Differenz zwischen der Base-Line der Signalkurve und dem Punkt mit der maximalen Ordinate ermittelt. Die Bestimmung der maximalen positiven und maximalen negativen Steigung erfolgte durch die analytische erste Ableitung des Abschnitts des 1. Peaks. Aus dieser Ableitung wurde nun das positive und negative Maximum bestimmt. Um den vierten Parameter des IOS, die Fläche, zu bestimmen, wurde, beginnend mit dem Tal der Kurve (kleinster Messwert zwischen erstem und zweitem Peak), ein immer gleich bleibender Abschnitt von 12.000 Messpunkten (entsprechend 600 Sekunden) gewählt und durch Integration dieses Abschnitts die darunter liegende Fläche berechnet.

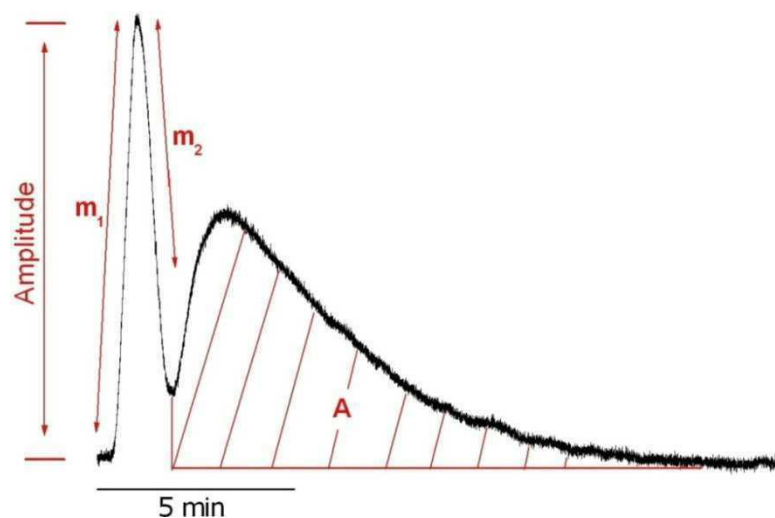


Abbildung 2.9: Die ausgewerteten Parameter des IOS: 1.Peak: maximale Amplitude, maximale positive Steigung (m_1) und die maximale negative Steigung (m_2). 2.Peak: Fläche (A).

2.7.3. Latenz

Die Berechnung der Latenz, der Zeitspanne zwischen Stimulus der Welle und Beginn der Wellenausbreitung, erfolgte mit Hilfe der einzelnen Videotracks, welche bei den elektrischen Messungen aufgezeichnet wurden. Da hierbei neben dem Videosignal auch das gemessene Spannungssignal mit aufgezeichnet wurde, war es möglich den exakten Zeitpunkt einer elektrischen Stimulation zu bestimmen.

Zunächst wurden die einzelnen Tracks mit Hilfe des Computerprogramms DaVideo (G-Data) umcodiert, sodass es mit Hilfe der Software VirtualDub 1.6.15 möglich war, die Länge der Tracks zurechtzuschneiden. Danach stellte der Stimulus der Welle den Beginn des Tracks dar. Die Gesamtlänge der Tracks wurde auf 10s (entsprechend 250 Bilder) gekürzt und als Einzelbilderfolge abgespeichert. Aus diesen Einzelbildern konnte nun die Latenz durch Erstellung sogenannter Stacks ermittelt werden. Dafür wurden mit Hilfe des Programms ImageJ 1.41 in jedem Einzelbild eine Linie, welche durch die Stimulusstelle gelegt wurde, ausgewählt (siehe Abbildung 2.10). Diese Linien wurden zeitlich geordnet untereinander gelegt, und so ergab sich eine Art Dreieck, dessen Spitze den Beginn der Wellenausbreitung widerspiegelte (siehe Abbildung 2.11). Nun wurden die Anzahl der Linien zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung bestimmt. Da 25 Linien einer Sekunde entsprachen, konnte durch die Anzahl der Linien die genaue Latenz errechnet werden.



Abbildung 2.10: Beispiel einer durch den Stimulationspunkt gelegten Linie in aufeinander folgenden Bildern.

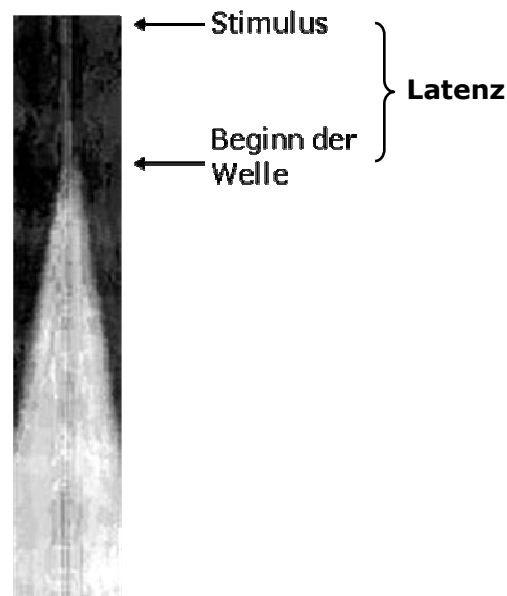


Abbildung 2.11: Beispiel eines Stacks.

2.7.4. Elektrisches Potential

Das Spannungssignal einer Spreading Depression Welle wurde zur Auswertung in drei Parameter aufgeteilt. Der erste Parameter entsprach der maximalen Amplitude, der zweite der größten positiven Steigung (m). Der dritte Parameter stellte die Ratenkonstante k des abfallenden Signals dar (siehe Abbildung 2.12). Alle Parameter wurden mit Hilfe des Programmes LabVIEW ermittelt. Dazu wurden die einzelnen ASCII-Files in das Programm eingespielt und als Funktion der Zeit wiedergegeben.

Zur Bestimmung der maximalen Amplitude wurde die Differenz zwischen der Base-Line der Signalkurve und dem Punkt mit der maximalen Ordinate ermittelt. Die größte positive Steigung wurde durch die analytische erste Ableitung bestimmt.

Da der Abfall des Signals nicht linear war, wurde hier ein einphasiger exponentieller Fit durchgeführt ($Y=(Y_0-Plateau)*e^{(-k*X)}+Plateau$; $R^2 \geq 0,95$), und hiervon die Ratenkonstante k als Größenordnung für den Abfall verwendet. Für diese Kurvenanpassung wurde im Programm GraphPad Prism5 vom Punkt der maximalen Amplitude ein immer gleich großer Abschnitt von 4000 Messpunkten (entsprechend 400 Sekunden) ausgewählt. Innerhalb dieses Abschnittes wurde anschließend der Fit ausgeführt. Da ein zweiphasiger exponentieller Fit keine besseren Ergebnisse erzielte, wurde auf diesen verzichtet.

Als Grundlage für die verwendete Substanzkonzentration dienten die Dosis-Wirkungskurven der Geschwindigkeitsmessungen. Hierbei wurde für alle Substanzen jeweils die Konzentration gewählt, die der mittleren effektiven Dosis (ED_{50}) am nächsten lag.

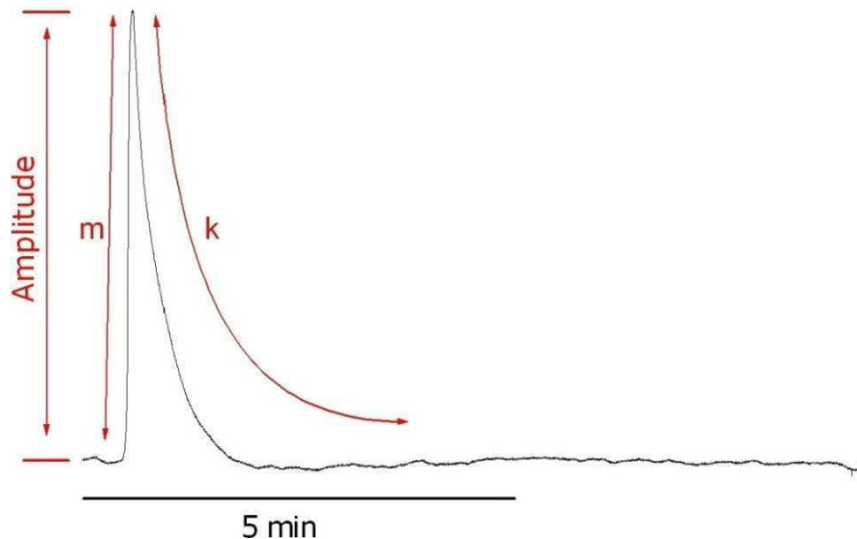


Abbildung 2.12: Die ausgewerteten Parameter des elektrischen Potentials: maximale Amplitude, maximale positive Steigung (m), Ratenkonstante des Abfalls (k).

2.7.5. Neuroprotektion

Zur Auswertung der neuroprotektiven Wirkung der einzelnen Substanzen wurden die maximale positive und die maximale negative Steigung des gesamten intrinsischen optischen Signales verwendet. Da die maximale negative Steigung der Signalkurve als Maß der Regeneration diente, wurde der Quotient der negativen Steigung und der positiven Steigung errechnet.

Auch hier wurden die Werte mit Hilfe des Programmes LabView ermittelt, indem durch die analytische erste Ableitung die Maxima bestimmt wurden. Als Grundlage für die verwendete Substanzkonzentration dienten ebenfalls die Dosis-Wirkungskurven der Geschwindigkeitsmessungen. Hierbei wurde jeweils, entsprechend den elektrophysiologischen Messungen, die Konzentration gewählt, die der mittleren effektiven Dosis (ED_{50}) am nächsten lag.

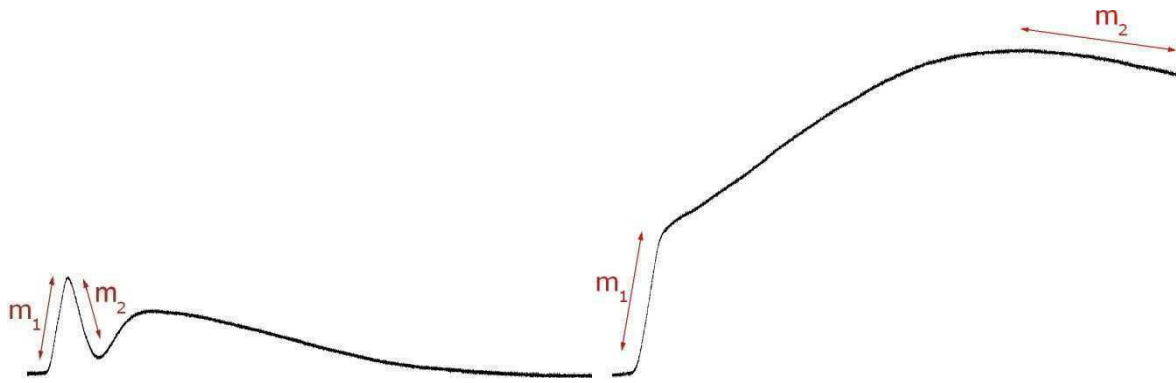


Abbildung 2.13: Die verwendeten Parameter zur Ermittlung der neuroprotektiven Wirkung der einzelnen Substanzen. Links: die Parameter m_1 und m_2 eines IOS unter Standardbedingungen, rechts: die Parameter bei einem IOS unter der Einwirkung von 30mM NMDA.

2.8. Statistik

Durch die sehr breite Streuung der einzelnen Messwerte zwischen den Retinae wurden alle gemessenen Parameter der retinalen Spreading Depression vor der statistischen Auswertung normiert. Dazu wurde zuerst von jeder Retina aus den gemessenen Vorkontrollen das arithmetische Mittel gebildet und dieses gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der darauffolgenden Substanzmessungen sowie der Nachkontrollen wurden entsprechend normiert. Von den einzelnen Parametern wurden alle Messreihen einer Substanzkonzentration zusammengefasst und daraus der jeweilige Mittelwert sowie der Standardfehler (SEM) ermittelt. Die normierten Werte wurden in Graphen gegen die Zeit aufgetragen. Für die weitere Auswertung wurde von allen Parametern jeweils die 3. Substanzmessung (t=150 Minuten) ausgewählt, und mit der entsprechenden Messung einer reinen Kontrollreihe verglichen. Diese Ergebnisse wurden in Balkendiagrammen festgehalten. Zwischen der aufgeführten Kontrolle und den dazugehörigen einzelnen Substanzmessungen wurde jeweils ein zweiseitiger Signifikanztest durchgeführt, und die errechneten Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Werte) in die entsprechenden Graphen übertragen. Hierbei ergab sich für p-Werte $<0,001$ drei Sterne (***), für p-Werte $\geq 0,001$ und $\leq 0,01$ zwei Sterne (**) und für p-Werte $\geq 0,01$ und $\leq 0,05$ ein Stern (*). P-Werte $>0,05$ wiesen keinen signifikanten Unterschied auf und wurden mit n.s (nicht signifikant) ausgeschrieben. Die Normierung der einzelnen Werte erfolgte mit MS-Excel, die weiterführende statistische Auswertung und bildliche Verarbeitung mit GraphPad Prism5.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollen

Um einen exakten Vergleich der Änderung aller gemessenen Parameter unter Substanzeinwirkung gegenüber den Standardbedingungen zu haben, wurden zusätzlich zu den Substanzmessungen reine Kontrollmessungen durchgeführt. Hierfür wurde über alle 8 Messungen einer Messreihe hinweg der Standardringer beibehalten, also nicht nach zwei Messungen gegen eine Ringerlösung mit gelöster Substanz ausgetauscht. Diese Kontrollmessungen dienen der Darstellung der Konstanz der einzelnen Parameter über den gesamten Zeitraum einer Messreihe. Aus Gründen der Übersicht werden die Kontrollmessungen der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie alle Parameter des intrinsischen optischen Signals (maximale Amplitude, m_1 , m_2 , Fläche) im Folgenden eigenständig aufgeführt und anschließend nur als Kontrollwert in den Balkendiagrammen der zeitlichen Zusammenfassung ($t=150\text{min}$) der Substanzmessungen aufgezeigt.

Die Kontrollmessungen aller weiteren ausgewerteten Parameter der retinalen Spreading Depression (Latenz, unterschiedliche Parameter des elektrischen Potentials, Neuroprotektion) werden gemeinsam mit den jeweiligen Substanzmessungen dargestellt.

3.1.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Im Folgenden ist der Verlauf der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen gegen die Zeit aufgetragen. Wie dem Graphen zu entnehmen ist, bleibt dabei die relative Ausbreitungsgeschwindigkeit über den Messzeitraum hinweg konstant. Die maximale Abweichung beträgt gerade 1% zum Zeitpunkt $t=90\text{min}$. Als Vergleichswert in den Balkendiagrammen der Geschwindigkeitsänderung unter Einfluss der unterschiedlichen Substanzen wurde die Messung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ gewählt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mittlere Abweichung 0,25%.

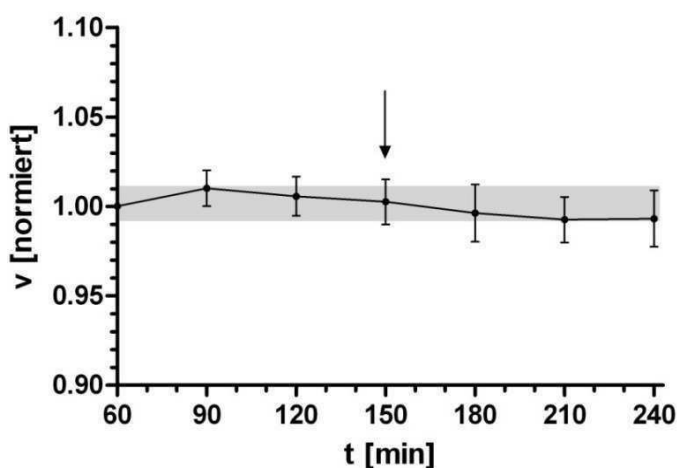


Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der normierten Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen ($n=16$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die maximale Abweichung beträgt 1,0% zum Zeitpunkt $t=90$ min. Der Pfeil markiert die Messung, die als Vergleich in den folgenden Balkendiagrammen dient ($t=150$ min; Mean 1,0025 / SEM $\pm 0,01267$). Die graue Fläche dient der Veranschaulichung einer Abweichung von 1%.

3.1.2. IOS

3.1.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

Nachfolgend ist der Verlauf der normierten maximalen Amplitude des 1.Peaks unter Standardbedingungen gegen die Zeit aufgetragen. Dem Graphen kann man entnehmen, dass, ähnlich der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit, die Amplitude des 1.Peaks über den Zeitraum einer Messreihe konstant bleibt. Die maximale Abweichung beträgt dabei 3,7% zum Zeitpunkt $t=120$ min. Als Vergleichswert für die folgenden Balkendiagramme zur Änderung der maximalen Amplitude unter Substanzeeinfluss wurde ebenfalls die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ min gewählt. Hierbei betrug die mittlere Abweichung 0,1%.

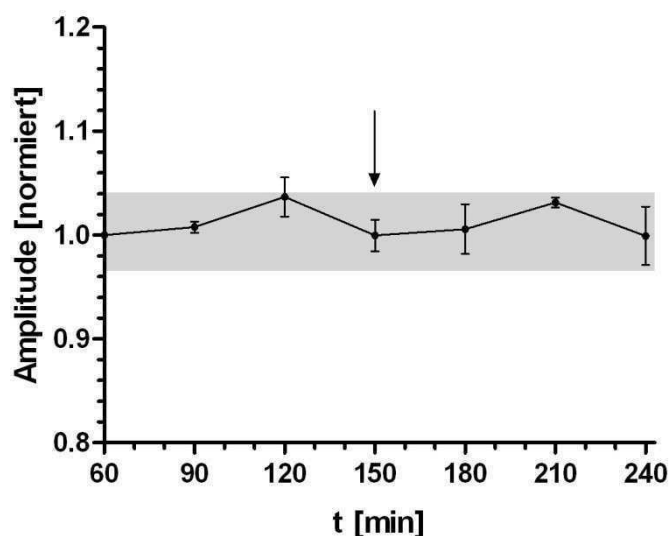


Abbildung 3.2: Zeitlicher Verlauf der normierten maximalen Amplitude unter Standardbedingungen ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die maximale Abweichung beträgt 3,7% zum Zeitpunkt $t=120$ min. Der Pfeil markiert die Messung, welche als Vergleich in den folgenden Balkendiagrammen dient ($t=150$ min; Mean 0,999 / SEM $\pm 0,015$). Die graue Fläche dient der Veranschaulichung einer Abweichung von 4%.

3.1.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks

Der Verlauf der normierten maximalen positiven Steigung des 1.Peaks (m_1) unter Standardbedingungen ist in der folgenden Abbildung gegen die Zeit aufgetragen. Die maximale Änderung beträgt hierbei 4,5% zum Zeitpunkt $t=210\text{min}$. Für die nachfolgenden Balkendiagramme zur Änderung der maximalen positiven Steigung wurde wiederum die Kontrollmessung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ gewählt. Die mittlere Abweichung betrug zu diesem Zeitpunkt 0,2%.

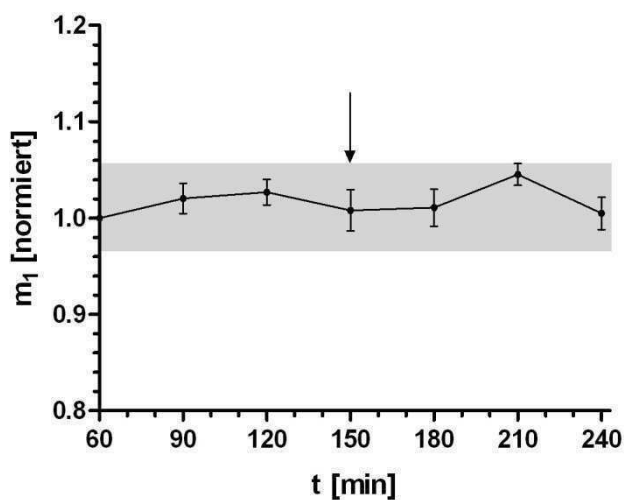


Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf der normierten maximalen positiven Steigung unter Standardbedingungen ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Die maximale Abweichung beträgt 4,5% zum Zeitpunkt $t=210\text{min}$. Der Pfeil markiert die Messung, welche als Vergleich in den folgenden Balkendiagrammen dient ($t=150\text{min}$; Mean 1,008 / SEM $\pm 0,021$). Die graue Fläche dient der Veranschaulichung einer Abweichung von 6%.

3.1.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

In Abbildung 3.4 ist der Verlauf der normierten maximalen negativen Steigung des 1.Peaks (m_2) unter Standardbedingungen dargestellt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die größte Abweichung 3,6% zum Zeitpunkt $t=210\text{min}$ beträgt. Als Vergleichswert in den folgenden Balkendiagrammen zur Änderung der maximalen negativen Steigung wurde die Kontrollmessung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ gewählt. Hierbei betrug die mittlere Abweichung 2,4%.

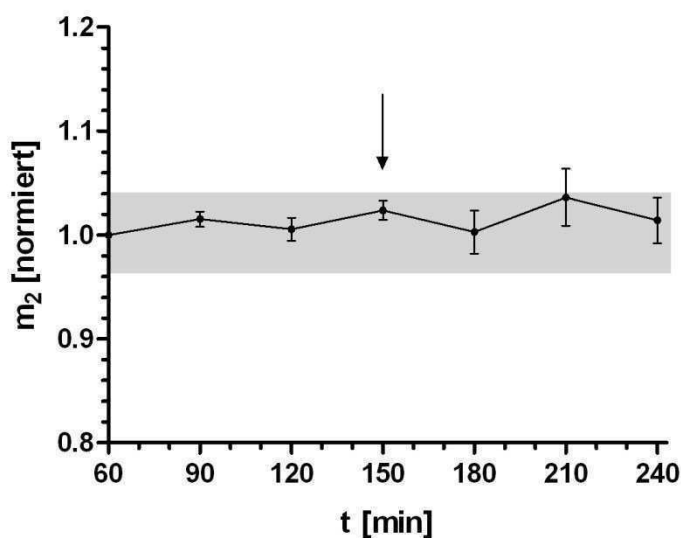


Abbildung 3.4: Zeitlicher Verlauf der normierten maximalen negativen Steigung unter Standardbedingungen ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die maximale Abweichung beträgt 3,6% zum Zeitpunkt $t=210$ min. Der Pfeil markiert die Messung, welche als Vergleich in den folgenden Balkendiagrammen dient ($t=150$ min; Mean 1,024 / SEM \pm 0,009). Die graue Fläche dient der Veranschaulichung einer Abweichung von 4%.

3.1.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks

Nachfolgend ist der Verlauf der normierten Fläche (A) unterhalb des 2.Peaks bei Standardbedingungen gegen die Zeit aufgetragen. Hierbei beträgt die maximale Änderung 13,1% zum Zeitpunkt $t=240$ min. Als Vergleichswert in den folgenden Balkendiagrammen zur Änderung der Fläche unterhalb des zweiten Peaks wurde wiederum die Kontrollmessung zum Zeitpunkt $t=150$ min gewählt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mittlere Abweichung 1,75%.

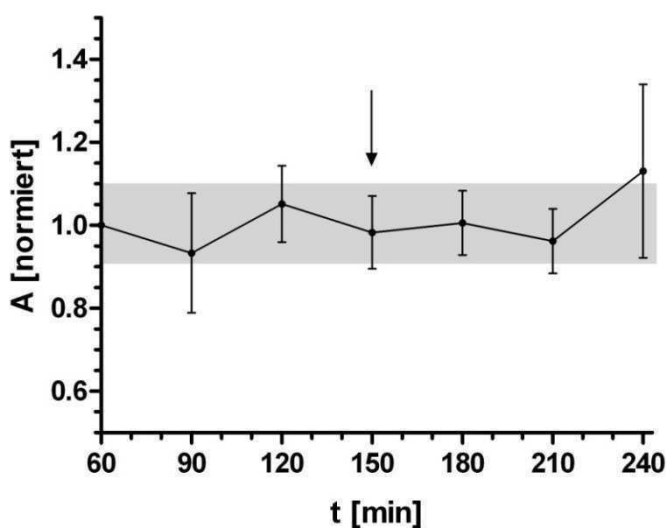


Abbildung 3.5: Zeitlicher Verlauf der normierten Fläche unter Standardbedingungen ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die maximale Abweichung beträgt 13,1% zum Zeitpunkt $t=240$ min. Der Pfeil markiert die Messung, welche als Vergleich in den folgenden Balkendiagrammen dient ($t=150$ min; Mean 0,983 / SEM \pm 0,088). Die graue Fläche dient der Veranschaulichung einer Abweichung von 10%.

3.2. Nikotin

3.2.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-Wellen unter der Einwirkung von Nikotin wurde anhand aufsteigender Substanz-Konzentrationen zwischen 500nM und 10mM gemessen. Die normierten Geschwindigkeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen und sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine immer deutlichere Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit festzustellen. Bei einer Konzentration von beispielsweise 3mM reduziert sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 47%, bei einer Konzentration von 5mM sogar um 55%. Bei einer Konzentration von 10mM konnte indes keine SD-Welle mehr ausgelöst werden. Ebenso wird deutlich, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Auswaschen der Substanz sich langsam wieder der ursprünglichen Geschwindigkeit nähert.

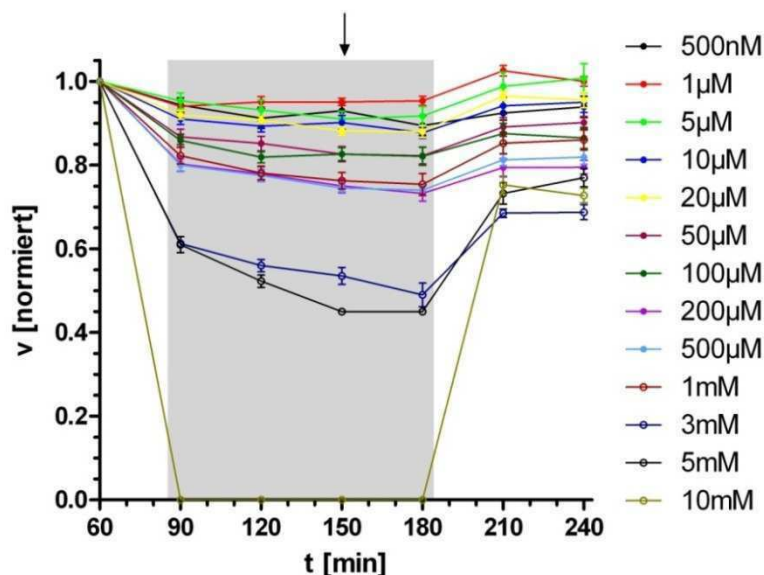


Abbildung 3.6: Zeitliche Darstellung der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.7 stellt die Veränderung der relativen Geschwindigkeit unter allen gemessenen Konzentrationen zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Schon unter Einfluss von 500nM Nikotin ist eine signifikante Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu beobachten.

Aus diesem Diagramm wurde sowohl für die später folgenden elektro-physiologischen, als auch für die Messungen zur Neuroprotektion die Substanzkonzentration von $500\mu\text{M}$ bestimmt.

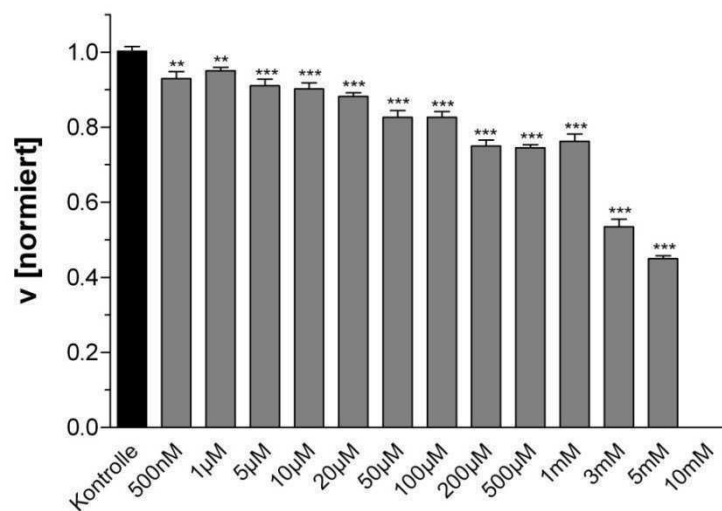


Abbildung 3.7: Vergleich der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=12$ für $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$; $n=11$ für 500nM , $10\mu\text{M}$; $n=8$ für $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM ; $n=4$ für 3mM , 5mM und 10mM). Unter dem Einfluss von 10mM Nikotin konnte zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.2.2. IOS

Die Änderung der einzelnen Parameter des intrinsischen optischen Signals wurde ebenfalls mit Hilfe aufsteigender Nikotin-Konzentrationen gemessen. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für jede Substanzkonzentration eine Originalspur zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

Bei einer Konzentration von 5mM konnte zum Zeitpunkt $t=180\text{min}$ kein IOS aufgezeichnet werden, da sich die Amplitude des IOS kurz nach Auslösen der Welle soweit reduzierte, dass eine Detektion durch den Photomultiplier nicht mehr möglich war. Da bei einer Konzentration von 10mM keine Welle mehr auszulösen war, wurde auf deren Darstellung in der Gesamtübersicht verzichtet.

3.2.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

In der folgenden Abbildung ist die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit aufgetragen. Mit zunehmender Konzentration von Nikotin kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 3mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 54,5% ab, bei einer Konzentration von 5mM sogar um 63,6%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.9 zeigt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Schon unter Einfluss von $1\mu\text{M}$ Nikotin ist eine signifikante Abnahme der maximalen Amplitude zu beobachten.

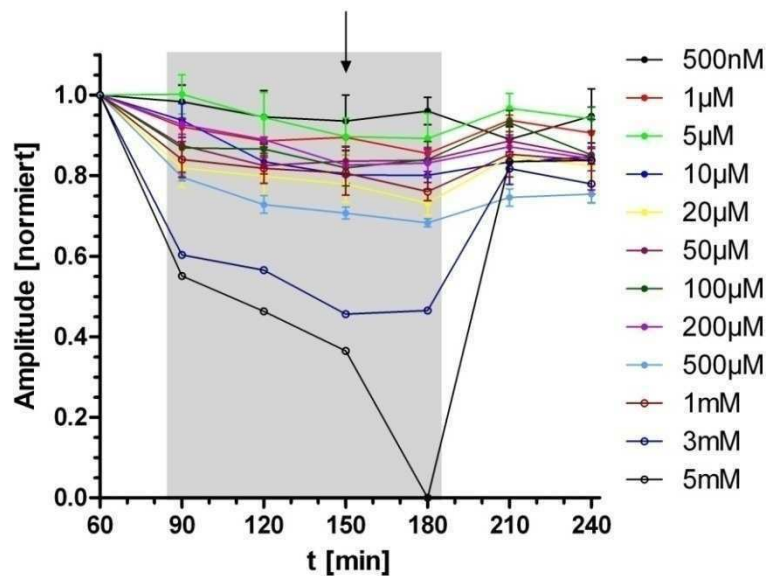


Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

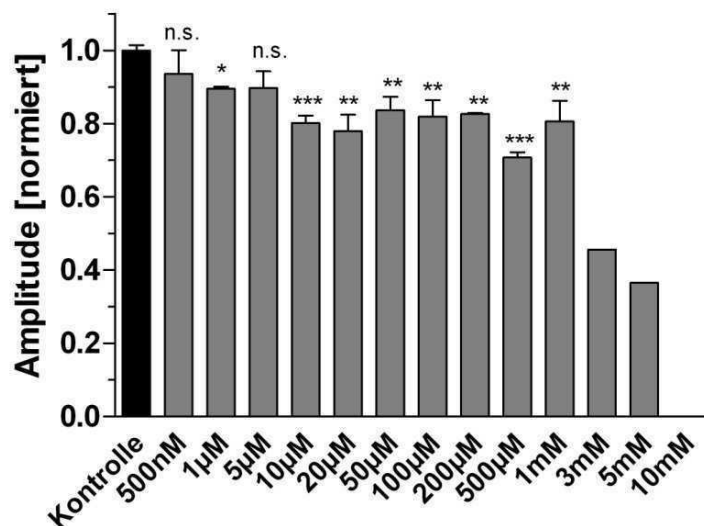


Abbildung 3.9: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für 500nM , $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$; $n=2$ für $1\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM ; $n=1$ für 3mM , 5mM und 10mM). Für die Messungen unter Einfluss von 3mM bzw. 5mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 10mM Nikotin konnte keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.2.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) über der Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Nikotin kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 3mM nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 59% ab, bei einer Konzentration von 5mM sogar um 71% .

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.11 stellt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Schon unter Einfluss von $1\mu\text{M}$ Nikotin ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

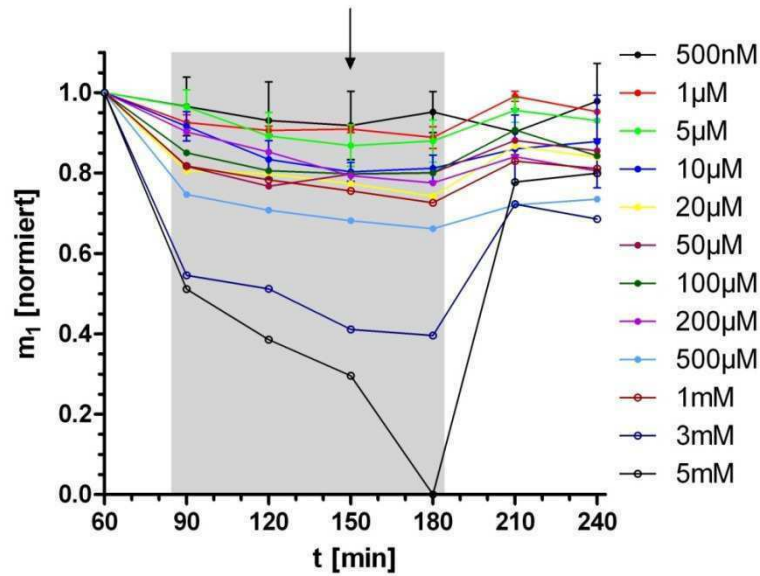


Abbildung 3.10: Graphische Darstellung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1. Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

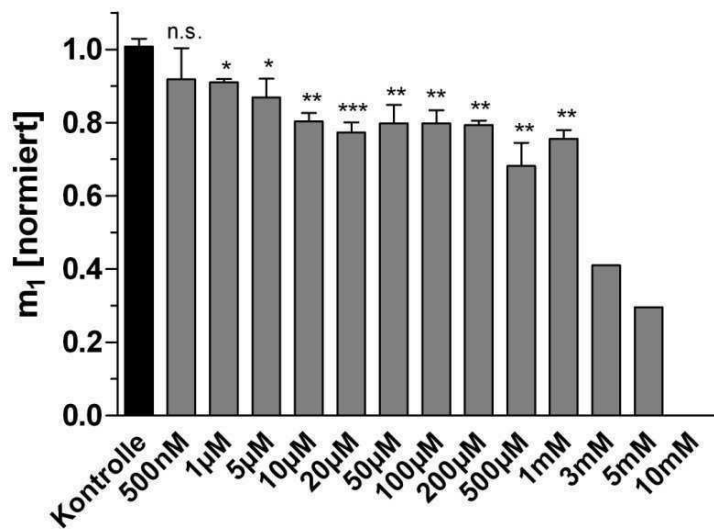


Abbildung 3.11: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1. Peaks zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für 500nM, 5µM, 10µM, 20µM; $n=2$ für 1µM, 50µM, 100µM, 200µM, 500µM, 1mM; $n=1$ für 3mM, 5mM und 10mM). Für die Messungen unter Einfluss von 3mM bzw. 5mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 10mM Nikotin konnte bei der untersuchten Retina keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.2.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

Die Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) über die Zeit ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Nikotin kann eine deutliche Abnahme der negativen Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 3mM nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 62,7% ab, bei einer Konzentration von 5mM sogar um 70,9%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.13 zeigt die Änderung der maximalen negativen Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Schon unter Einfluss von $1\mu\text{M}$ Nikotin ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

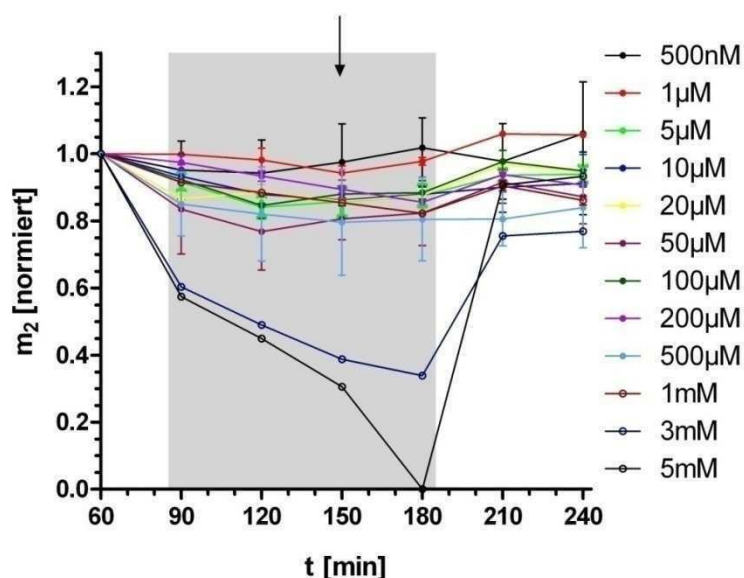


Abbildung 3.12: Graphische Darstellung der maximalen negativen Steigung (m_2) des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung dar. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

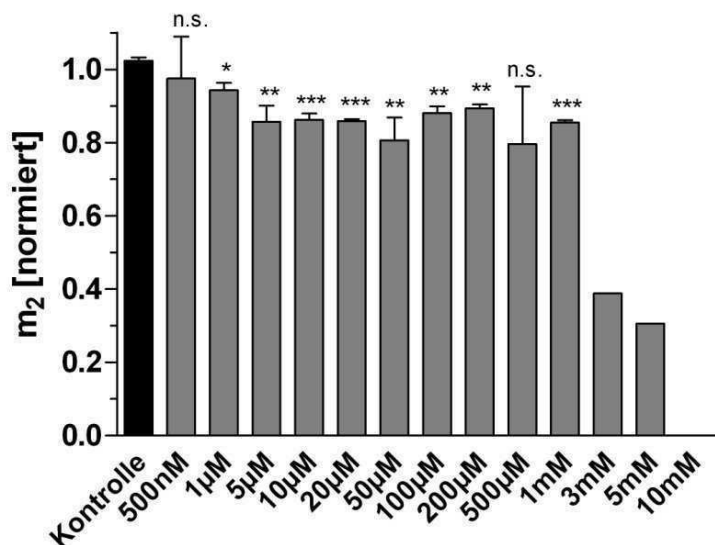


Abbildung 3.13: Vergleich der Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) des 1. Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für 500nM, 5µM, 10µM, 20µM; $n=2$ für 1µM, 50µM, 100µM, 200µM, 500µM, 1mM; $n=1$ für 3mM, 5mM und 10mM). Für die Messungen unter Einfluss von 3mM bzw. 5mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Unter dem Einfluss von 10mM Nikotin konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.2.2.4. Fläche unterhalb des 2. Peaks

Die Änderung der Fläche unterhalb des 2. Peaks (A) wird im Folgenden dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Nikotin kann eine stetige Abnahme der Fläche festgestellt werden.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.15 stellt die Änderung der Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ für alle gemessenen Konzentrationen dar. Erst ab einer Konzentration von 100µM kann eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

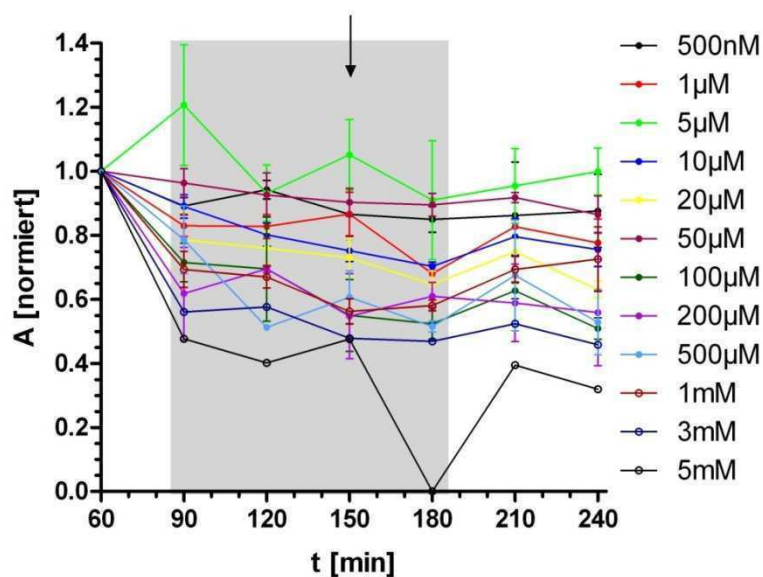


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der Änderung der Fläche (A) unter Einfluss unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Einwirkung von Nikotin wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

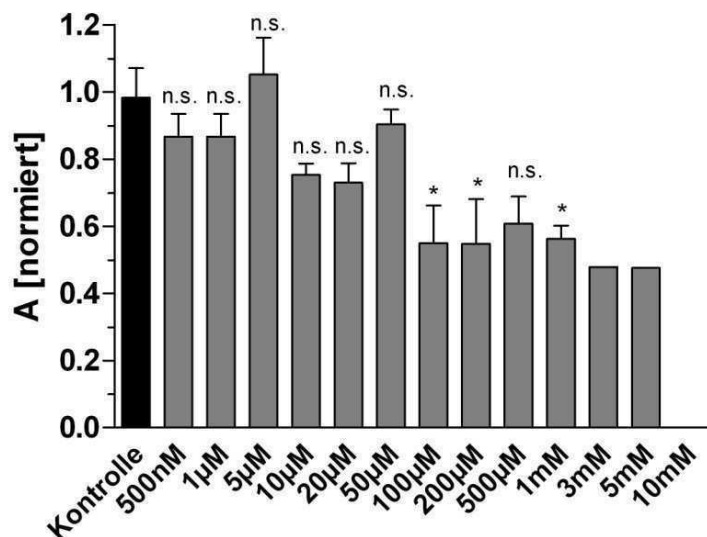


Abbildung 3.15: Vergleich der Änderung der Fläche (A) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für 500nM, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M; $n=2$ für 1 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1mM; $n=1$ für 3mM, 5mM und 10mM). Für die Messungen unter Einfluss von 3mM bzw. 5mM Nikotin konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 10mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.2.3. Latenz

Die Änderung der Latenz, der Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, wurde für die Nikotin-Konzentration bestimmt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Für Nikotin wurde somit eine Konzentration von $500\mu\text{M}$ ausgewählt.

Der Auswertung liegen die angefertigten Stacks aus den einzelnen Videoaufzeichnungen zugrunde. Im Anhang findet sich ein Beispielstack für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie dazugehöriger Kontrolle.

Wie im folgenden Graphen deutlich zu erkennen ist, nimmt die Latenz durch die Zugabe von Nikotin mit fortschreitender Einwirkzeit zu. Die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes nimmt also ab.

Im Balkendiagramm wird der Vergleich der Latenz der Kontrollmessungen zu den Substanzmessungen zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ aufgezeigt. Die signifikante Zunahme der Latenz beträgt zu diesem Zeitpunkt 91,9%.

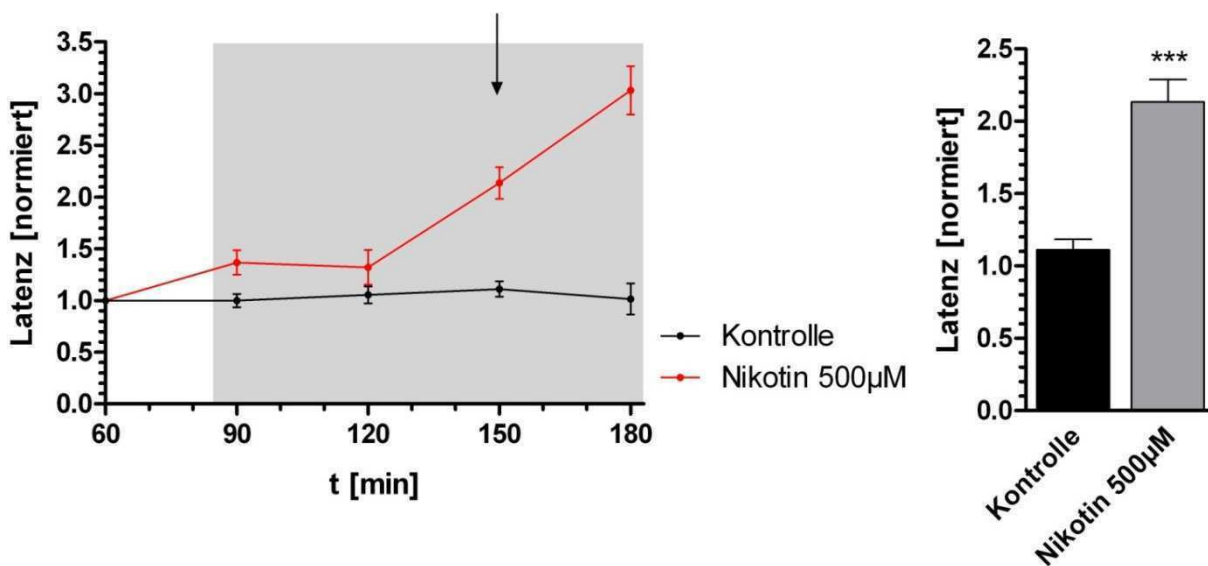


Abbildung 3.16: Links: Zeitliche Änderung der Latenz unter Standardbedingungen (Kontrolle) und unter Nikotin-Einfluss. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinfluss wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Latenz zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=5$; Mean 1,11 / SEM $\pm 0,074$; Nikotin $500\mu\text{M}$: $n=4$; Mean 2,13 / SEM $\pm 0,15$).

3.2.4. Elektrisches Potential

Die Änderung der einzelnen Parameter des elektrischen Potentials wurde ebenso mit der Nikotin-Konzentration durchgeführt, die nach den Messungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit am nächsten der ED_{50} lag. Dies entsprach einer Konzentration von $500\mu\text{M}$. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien zugrunde. Im Anhang findet sich eine Beispielkurve für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

3.2.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit. Mit zunehmender Einwirkzeit kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die signifikante Abnahme $43,3\%$.

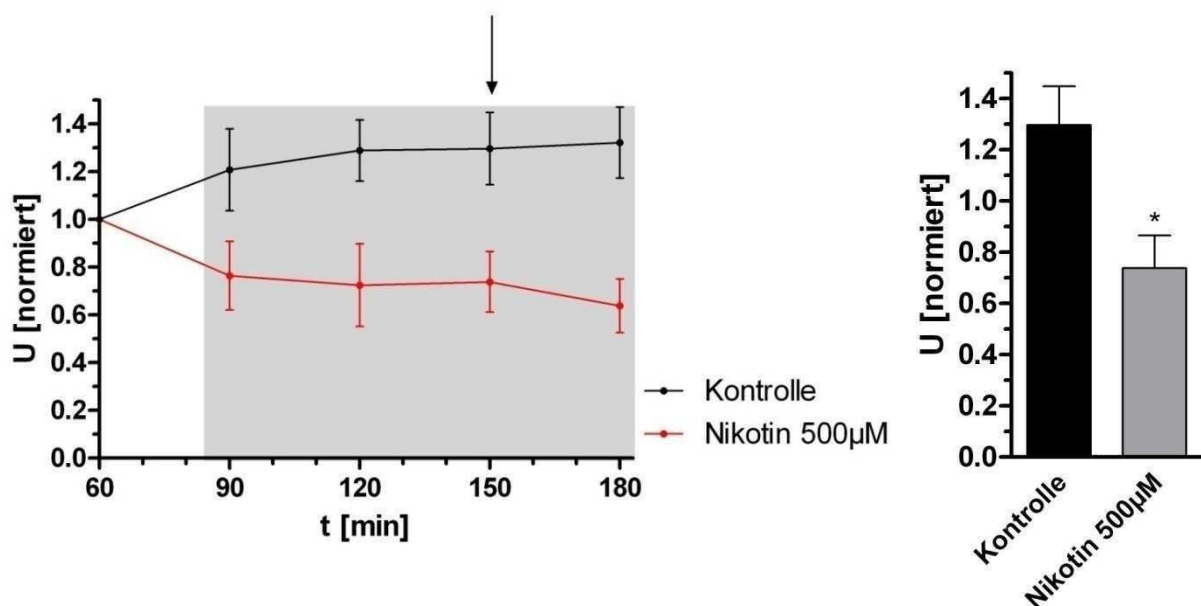


Abbildung 3.17: Rechts: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude unter Einwirkung von $500\mu\text{M}$ Nikotin. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Links: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ (Kontrolle: $n=7$; Mean $1,29 / \text{SEM} \pm 0,151$; Nikotin $500\mu\text{M}$: $n=5$; Mean $0,73 / \text{SEM} \pm 0,126$).

3.2.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m) über der Zeit aufgezeigt. Mit zunehmender Einwirkzeit von Nikotin kann eine deutliche Abnahme der Steigung festgestellt werden.

Das Balkendiagramm zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Abnahme von 49% beobachtet werden.

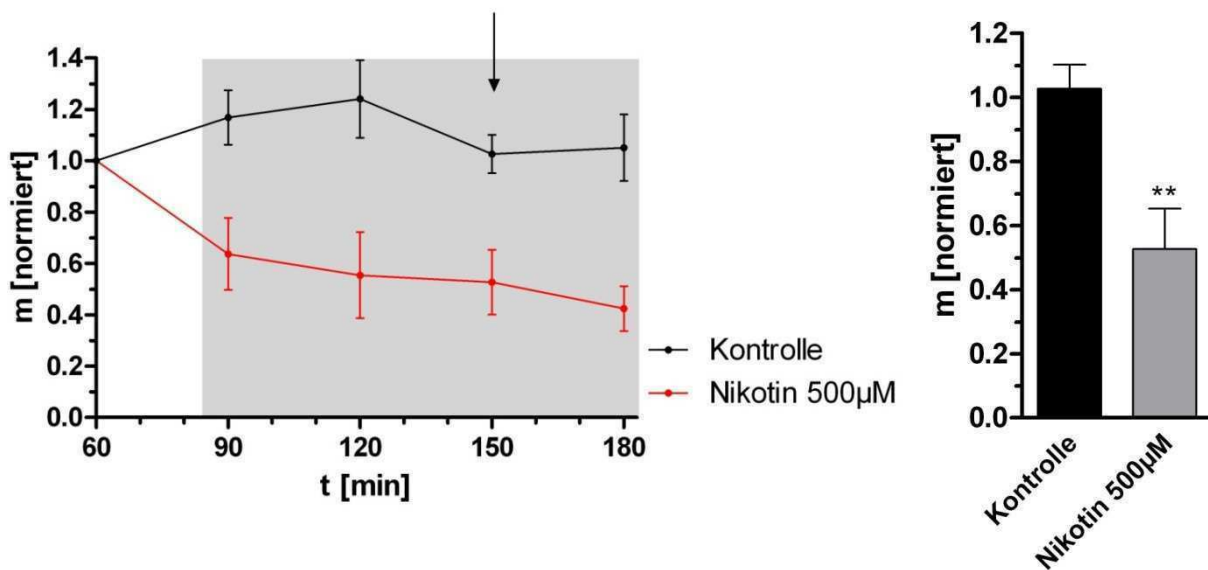


Abbildung 3.18: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen positiven Steigung (m) unter Einwirkung von $500\mu\text{M}$ Nikotin. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ (Kontrolle: $n=6$; Mean $1,03$ / SEM $\pm 0,074$; Nikotin $500\mu\text{M}$: $n=5$; Mean $0,52$ / SEM $\pm 0,126$).

3.2.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals

Die Änderung der Ratenkonstante k über der Zeit wird in den folgenden Abbildungen dargestellt. Es kann weder eine signifikante Abnahme noch Zunahme der Ratenkonstante beobachtet werden.

Das Balkendiagramm zeigt dies zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Hierbei beträgt die Abweichung zur Kontrollmessung gerade 1%, ist also nicht signifikant.

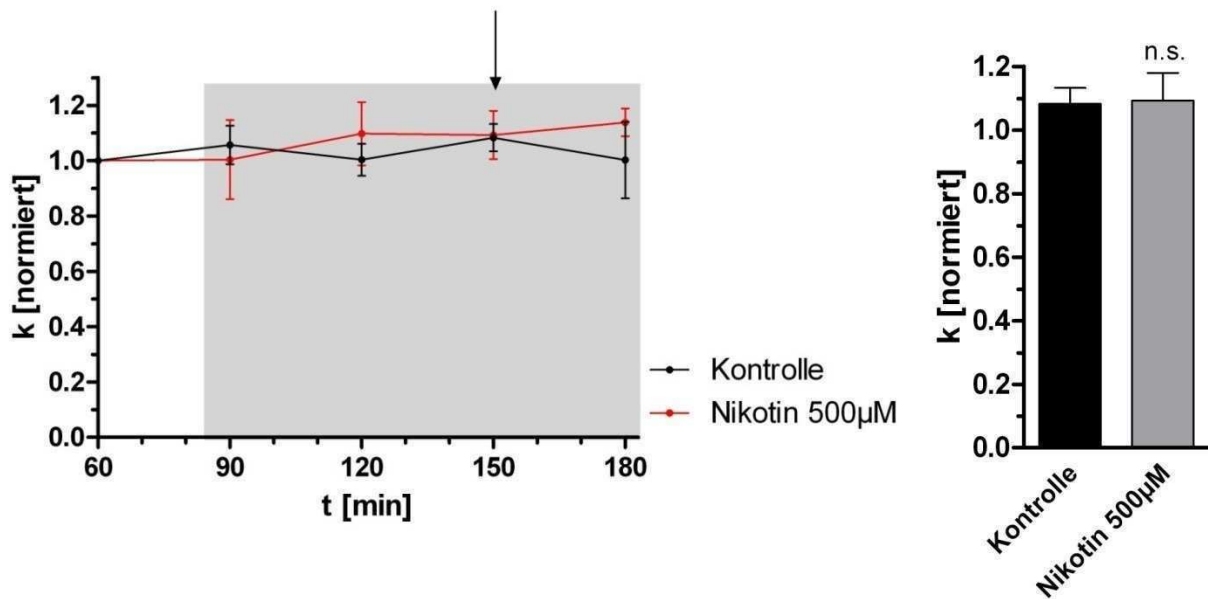


Abbildung 3.19: Links: Graphische Darstellung der Änderung der Ratenkonstante k unter Einwirkung von 500 μM Nikotin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,08 / SEM $\pm 0,049$; Nikotin 500 μM : $n=5$; Mean 1,09 / SEM $\pm 0,087$).

3.2.5. Neuroprotektion

Die neuroprotektive Wirkung von Nikotin wurde für zwei unterschiedliche Konzentrationen (500 μM und 3mM) nachgewiesen. Der Auswertung liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für die aufgeführten Messungen je eine Beispielkurve.

Durch Zugabe von 30 μM NMDA sinkt der Quotient aus maximaler negativer und maximaler positiver Steigung um 95% im Vergleich zu einer Messung unter Standardbedingungen. Dies veranschaulicht die ausbleibende Regeneration der Retinae nach Behandlung mit 30 μM NMDA. Wie nun in der folgenden Abbildung gut zu erkennen ist, wirkt Nikotin den neurotoxischen Eigenschaften von NMDA entgegen. Durch Zugabe von 500 μM Nikotin sinkt der Quotient aus der maximalen negativen und maximal positiven Steigung im Vergleich zur Kontrolle nur um 71,3%. Durch Zugabe von 3mM Nikotin sogar nur um 39,6%.

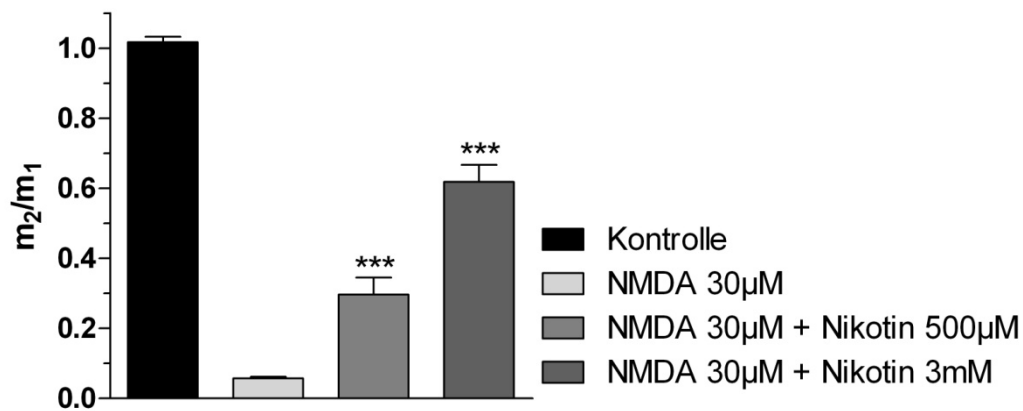


Abbildung 3.20: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30µM NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 µM NMDA und 500µM Nikotin ($n=5$; Mean 0,29 / SEM $\pm 0,048$) sowie 30µM NMDA und 3mM Nikotin ($n=7$; Mean 0,62 / SEM $\pm 0,049$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

Hexamethonium ist eine Ammoniumverbindung, die als spezifischer Antagonist am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) in autonomen Ganglien wirkt. Es bindet nicht direkt an die ACh-Bindungsstelle, sondern an den NN-Rezeptor. Hexamethonium wirkt weder auf den muskarinischen ACh-Rezeptor (mAChR) noch auf nACh-Rezeptoren in der muskulären Endplatte. Da jedoch eine 10fache Menge von Hexamethonium benötigt wird, um eine Inhibition von ca. 80% zu erlangen, musste eine relativ hohe Konzentration von Hexamethonium eingesetzt werden (Marquis et al., 1977).

Durch diesen spezifischen Antagonisten wird die neuroprotektive Wirkung von Nikotin wieder aufgehoben. Mit einer zusätzlichen Gabe von 10mM Hexamethonium sinkt der Quotient nur um 71,35% im Vergleich zu den Messungen ohne Zugabe von Hexamethonium, wo der Quotient um 81,2% sinkt.

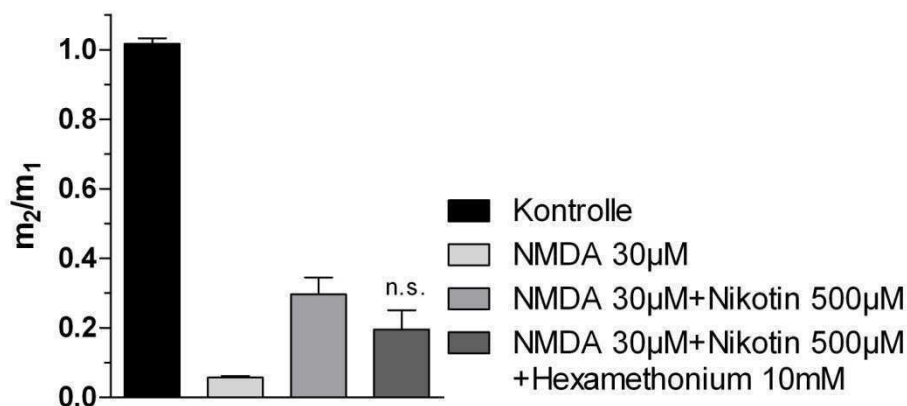


Abbildung 3.21: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30µM NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 µM NMDA und 500µM Nikotin ($n=5$; Mean 0,29 / SEM $\pm 0,048$) sowie 30µM NMDA, 500µM Nikotin und 10mM Hexamethonium ($n=3$; Mean 0,19 / SEM $\pm 0,055$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

Die Annahme, dass Hexamethonium selbst den Quotienten in keinerlei Weise beeinflusst, spiegelt das folgende Schaubild wider. Durch Zugabe von 10mM Hexamethonium ändert sich dieser, in Bezug auf eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle), um gerade 1%.

In Bezug auf die Messungen mit 30µM NMDA, ändert sich der Quotient unter Zugabe von 30µM NMDA und 10mM Hexamethonium überhaupt nicht.

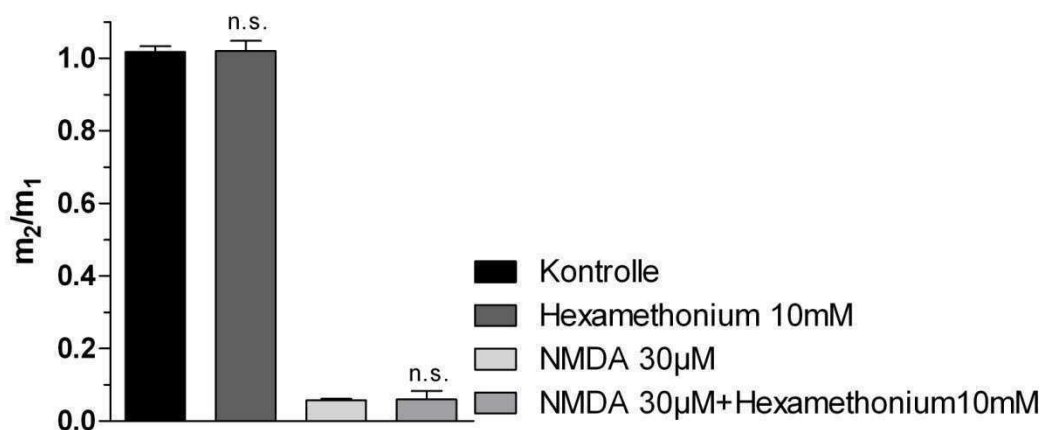


Abbildung 3.22: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$), unter Zugabe von 10mM Hexamethonium ($n=2$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,028$), 30 µM NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$) sowie 30µM NMDA und 10mM Hexamethonium ($n=5$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,024$).

Durch die Zugabe von 500µM Methyllycaconitin, ebenfalls einem Antagonisten des nikotinischen ACh-Rezeptors, der jedoch selektiv den $\alpha 7$ -Subtyp hemmt, und 30µM NMDA beträgt die Änderung des Quotienten, in Bezug auf die Messungen mit Zugabe von 30µM NMDA, gerade einmal 1,9%. Im Vergleich dazu ändert sich der Quotient von den Messungen unter Einfluss von 30µM NMDA und 500µM Nikotin zu den Messungen unter Einfluss von 30µM NMDA, 500µM Nikotin und 500µM Methyllycaconitin um 10,9%. Aus ökonomischen Gründen konnten leider keine Messungen mit höheren Konzentrationen, als auch unter alleinigem Einfluss von Methyllycaconitin durchgeführt werden.

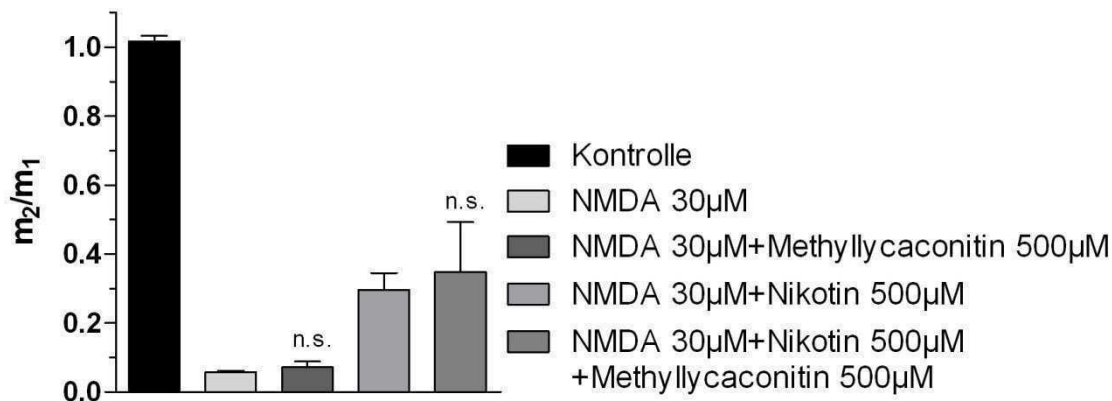


Abbildung 3.23: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30µM NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 µM NMDA und 500µM Methyllycaconitin ($n=2$; Mean 0,07 / SEM $\pm 0,017$), 30µM NMDA und 500µM Nikotin ($n=5$; Mean 0,29 / SEM $\pm 0,048$) sowie 30µM NMDA, 500µM Nikotin und 500µM Methyllycaconitin ($n=2$; Mean 0,35 / SEM $\pm 0,144$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

3.3. Koffein

3.3.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die Änderung der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-Wellen unter der Einwirkung von Koffein wurde anhand aufsteigender Konzentrationen zwischen 500µM und 50mM gemessen. Die normierten Geschwindigkeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen und sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine deutliche Abnahme der Ausbreitungs-

geschwindigkeit festzustellen. Bei einer Konzentration von beispielsweise 10mM reduzierte sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 25%, bei einer Konzentration von 20mM sogar um 48%. Bei einer Konzentration von 30mM konnte nur bis zu einer Einwirkzeit von 30min eine SD-Welle ausgelöst werden, während bei einer Konzentration von 50mM Koffein überhaupt keine Welle mehr ausgelöst werden konnte. Ebenso wird deutlich, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Auswaschen der Substanz sich langsam wieder der ursprünglichen Geschwindigkeit nähert.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.25 stellt die Veränderung der relativen Geschwindigkeit aller gemessener Koffein-Konzentrationen zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar.

Erst unter Einfluss von 3mM Koffein ist eine signifikante Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu beobachten.

Aus diesem Diagramm wurde sowohl für die später folgenden elektro-physiologischen als auch für die Messungen zur Neuroprotektion die Substanzkonzentration von 10mM bestimmt.

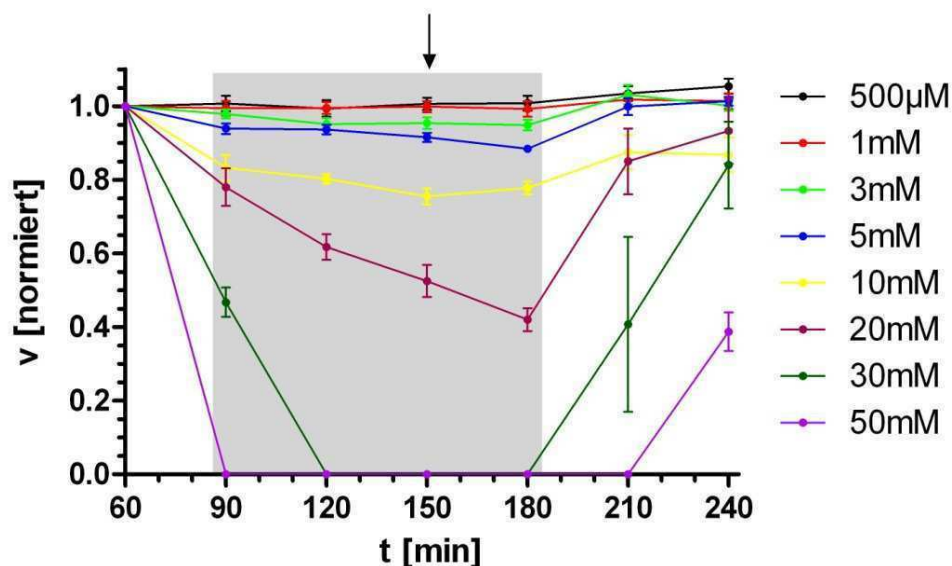


Abbildung 3.24: Zeitliche Darstellung der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Koffein-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeininwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

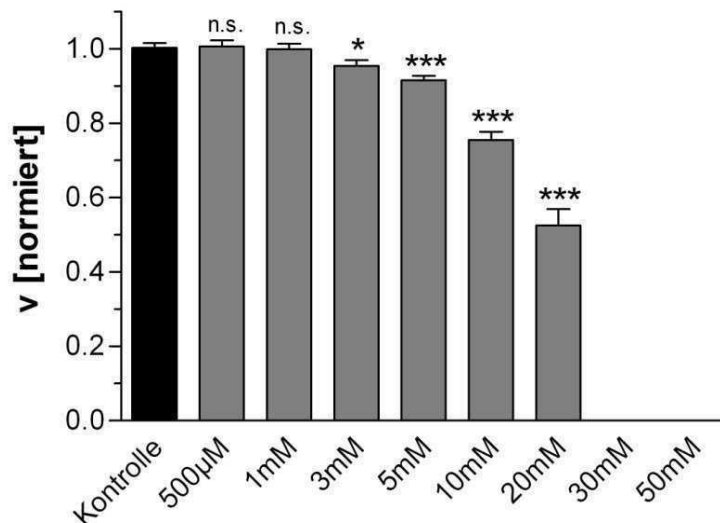


Abbildung 3.25: Vergleich der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=12$ für $500\mu\text{M}$, 1mM ; $n=8$ für 3mM , 5mM , 20mM ; $n=4$ für 10mM , 30mM und 50mM). Ab der Substanzkonzentration von 30mM Koffein konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.3.2. IOS

Die Änderung der einzelnen Parameter des intrinsischen optischen Signals wurde ebenfalls für aufsteigende Koffein-Konzentrationen gemessen. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für jede Substanzkonzentration eine Originalspur zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Da bei einer Konzentration von 50mM keine Welle mehr auszulösen war, wurde auf deren Darstellung in der Gesamtübersicht verzichtet.

3.3.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

In der folgenden Abbildung wird die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Koffein kann eine deutliche Abnahme des ersten Peaks beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 10mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um $39,6\%$ ab, bei einer Konzentration von 20mM sogar um $73,7\%$.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.27 zeigt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Schon unter Einfluss von $500\mu\text{M}$ Koffein ist eine signifikante Änderung der maximalen Amplitude zu beobachten.

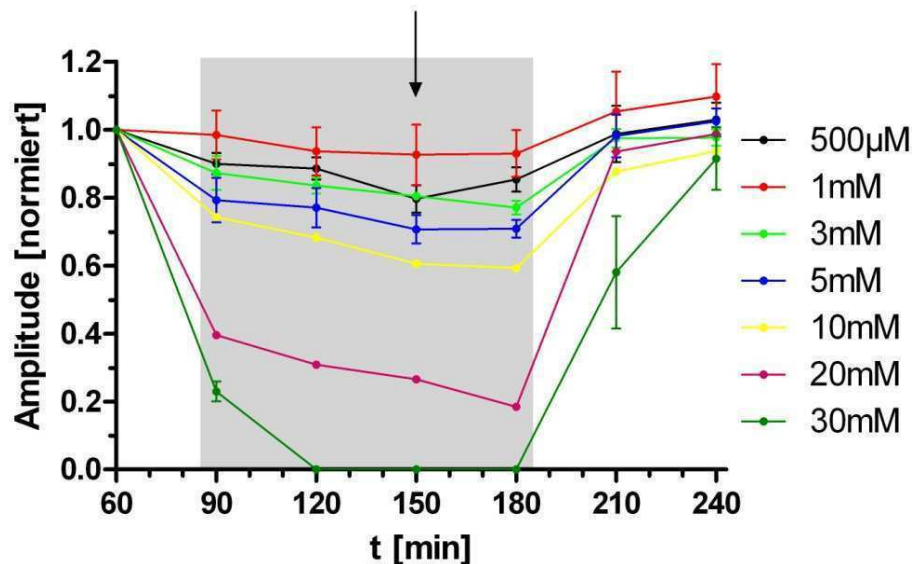


Abbildung 3.26: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude des 1. Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Koffein-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeineinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

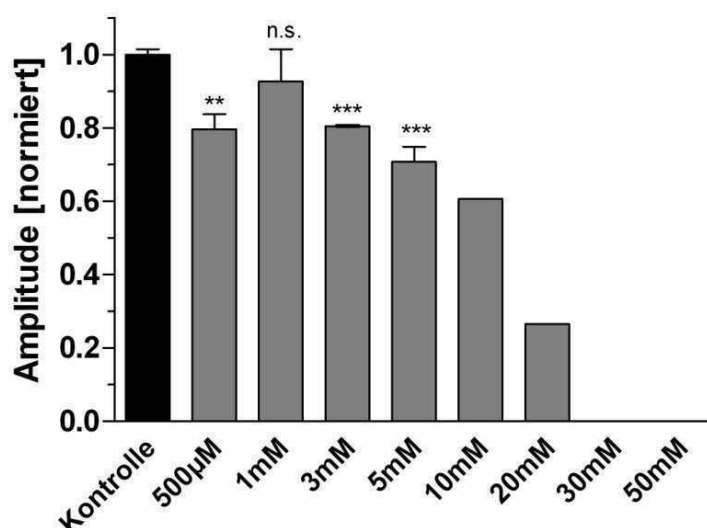


Abbildung 3.27: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude des 1. Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für $500\mu\text{M}$, 1mM , 3mM ; $n=2$ für 3mM , 5mM ; $n=1$ für 10mM , 20mM , 30mM und 50mM). Für die Messungen unter Einfluss von 10mM bzw. 20mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Unter dem Einfluss von 30mM bzw. 50mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.3.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) über der Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Koffein kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 10mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 40% ab, bei einer Konzentration von 20mM sogar um 78%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.29 zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Schon unter Einfluss von $500\mu\text{M}$ Nikotin ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

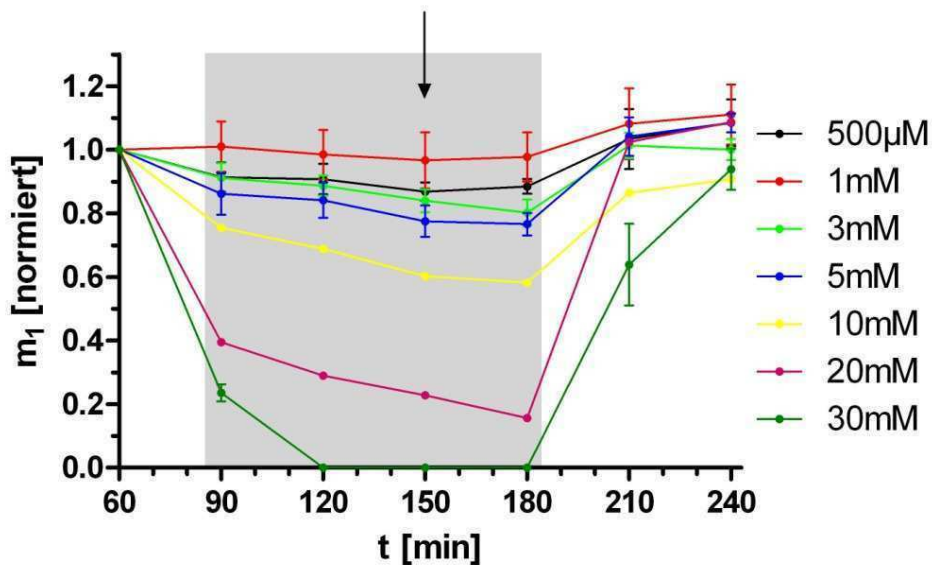


Abbildung 3.28: Graphische Darstellung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Koffein-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

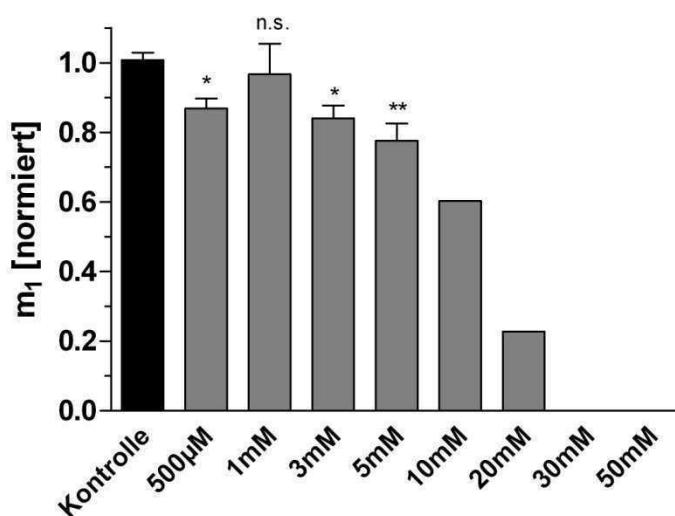


Abbildung 3.29: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $500\mu\text{M}$, 1mM ; $n=2$ für 3mM , 5mM ; $n=1$ für 10mM , 20mM , 30mM und 50mM). Für die Messungen unter Einfluss von 10mM bzw. 20mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 30mM bzw. 50mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.3.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

Die Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) über der Zeit ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Koffein kann eine deutliche Abnahme der negativen Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 10mM nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um $34,3\%$ ab, bei einer Konzentration von 20mM sogar um 78% .

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.31 stellt die Änderung der maximalen negativen Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Erst unter Einfluss von 3mM Koffein ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

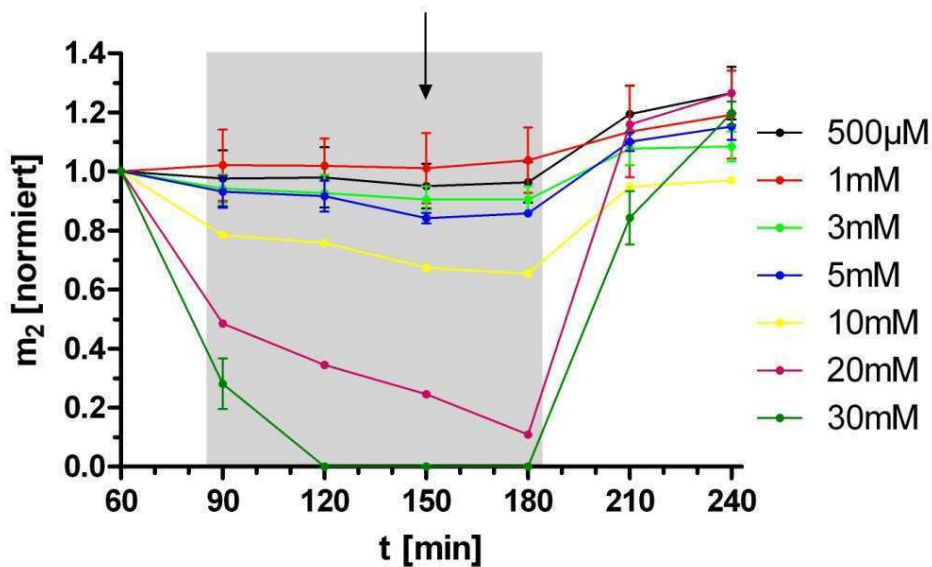


Abbildung 3.30: Graphische Darstellung der maximalen negativen Steigung (m_2) des 1. Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Koffein-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Zeitabschnitt unter Koffeineinwirkung dar. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

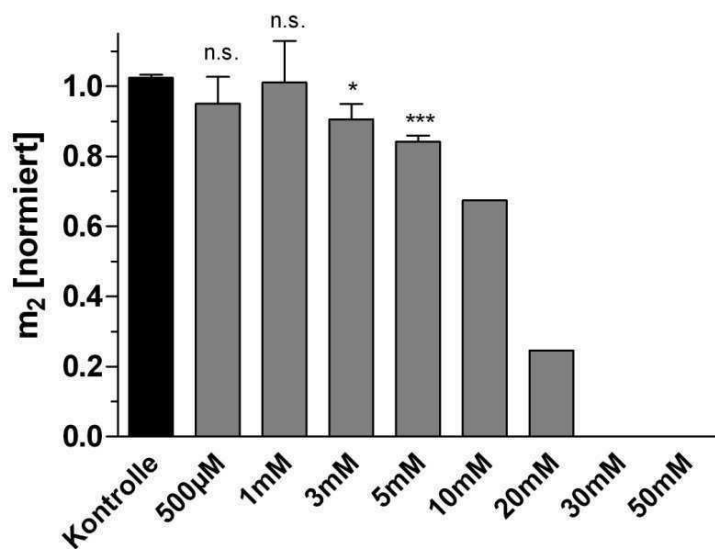


Abbildung 3.31: Vergleich der Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für 500µM, 1mM; $n=2$ für 3mM, 5mM; $n=1$ für 10mM, 20mM). Für die Messungen unter Einfluss von 10mM bzw. 20mM Koffein konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Ab einer Konzentration von 30mM Koffein, konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.3.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks

In der folgenden Abbildung ist die Änderung der Fläche unterhalb des 2.Peaks (A) dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Koffein kann eine stetige Abnahme der Fläche beobachtet werden. Beispielsweise nimmt bei einer Konzentration von 5mM zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ die Fläche um 57,2% ab. Das Balkendiagramm in Abbildung 3.33 stellt die Änderung der Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ für alle gemessenen Konzentrationen dar. Erst ab einer Konzentration von 5mM kann eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

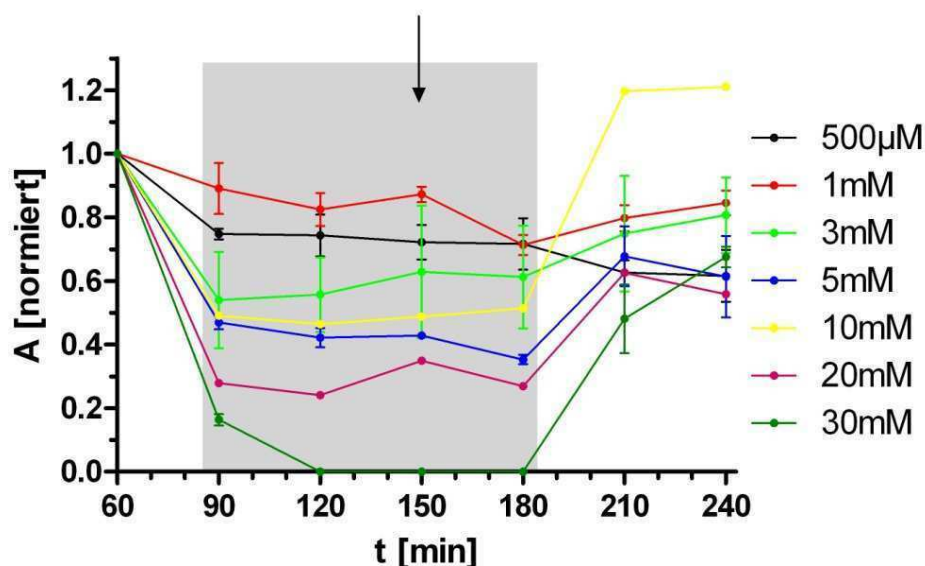


Abbildung 3.32: Graphische Darstellung der Änderung der Fläche (A) unter Einfluss unterschiedlicher Koffein-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Einwirkung von Koffein wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

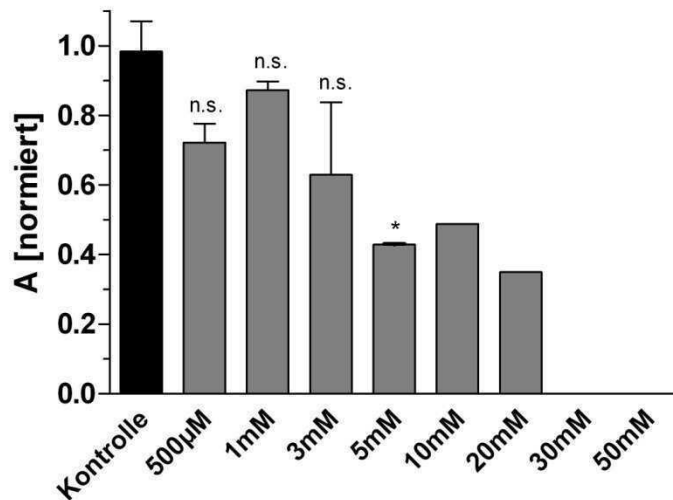


Abbildung 3.33: Vergleich der Änderung der Fläche (A) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $500\mu\text{M}$, 1mM ; $n=2$ für 3mM , 5mM ; $n=1$ für 10mM , 20mM , 30mM und 50mM). Für die Messungen unter Einfluss von 10mM bzw. 20mM Koffein konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Ab einer Konzentration von 30mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.3.3. Latenz

Die Änderung der Latenz, also der Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, wurde für die Koffein-Konzentration bestimmt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Für Koffein wurde somit eine Konzentration von 10mM ausgewählt.

Der Auswertung liegen die angefertigten Stacks aus den einzelnen Videoaufzeichnungen zugrunde. Im Anhang findet sich je ein Beispielstack für die Messung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ sowie dazugehöriger Kontrolle.

Wie in der folgenden Abbildung sehr deutlich zu erkennen ist, nimmt die Latenz durch die Zugabe von Koffein mit fortschreitender Einwirkzeit stark zu. Die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes nimmt also ab.

Im Balkendiagramm wird der Vergleich der Latenz der Kontrollmessungen (Standardbedingungen) zu den Substanzmessungen zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ aufgezeigt. Die signifikante Zunahme der Latenz beträgt zu diesem Zeitpunkt $289,2\%$.

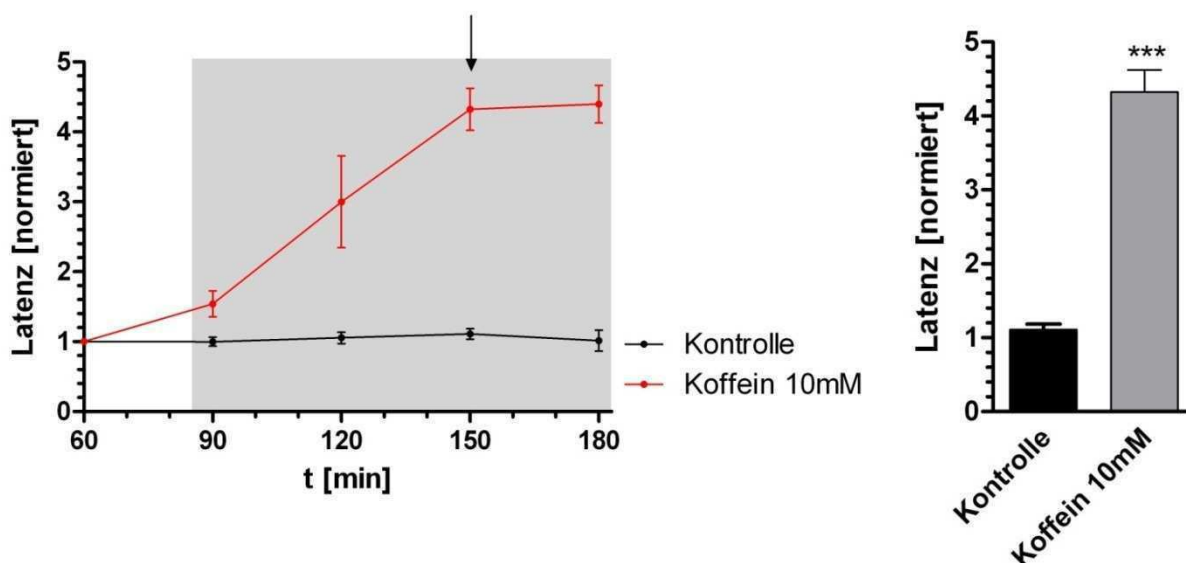


Abbildung 3.34: Links: Zeitliche Änderung der Latenz unter Standardbedingungen (Kontrolle) und unter Koffein-Einfluss. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeineinfluss wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Latenz zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=5$; Mean 1,11 / SEM $\pm 0,074$; Koffein 10mM $n=3$; Mean 4,32 / SEM $\pm 0,30$).

3.3.4. Elektrisches Potential

Die Änderung der einzelnen Parameter des elektrischen Potentials wurde ebenfalls für die Koffein-Konzentration durchgeführt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten an der ED_{50} lag. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien zugrunde. Im Anhang findet sich eine Beispielkurve für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

3.3.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Potentials

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit. Es kann eine leichte Abnahme der Amplitude beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Abnahme 20,2%.

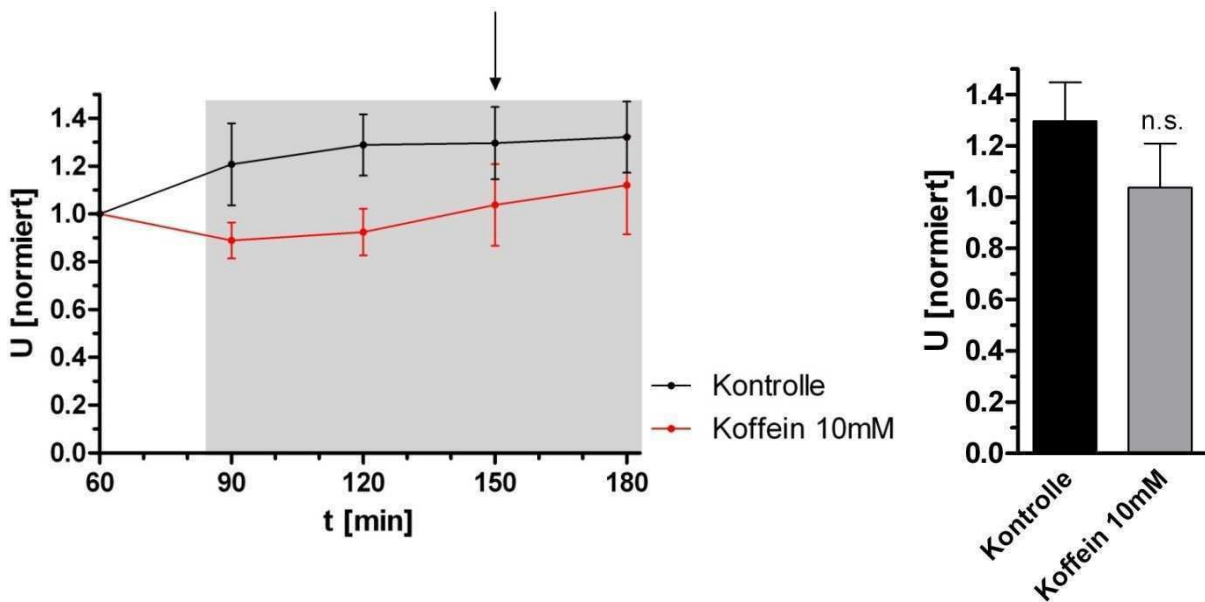


Abbildung 3.35: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude unter Einwirkung von 10mM Koffein. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=7$; Mean 1,29 / SEM $\pm 0,151$; Koffein 10mM: $n=5$; Mean 1,04 / SEM $\pm 0,171$).

3.3.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Potentials

Im Folgenden wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m) über der Zeit dargestellt. Nach 30minütiger Einwirkzeit kann eine Abnahme der Steigung festgestellt werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt kann eine Abnahme von 17,6% beobachtet werden.

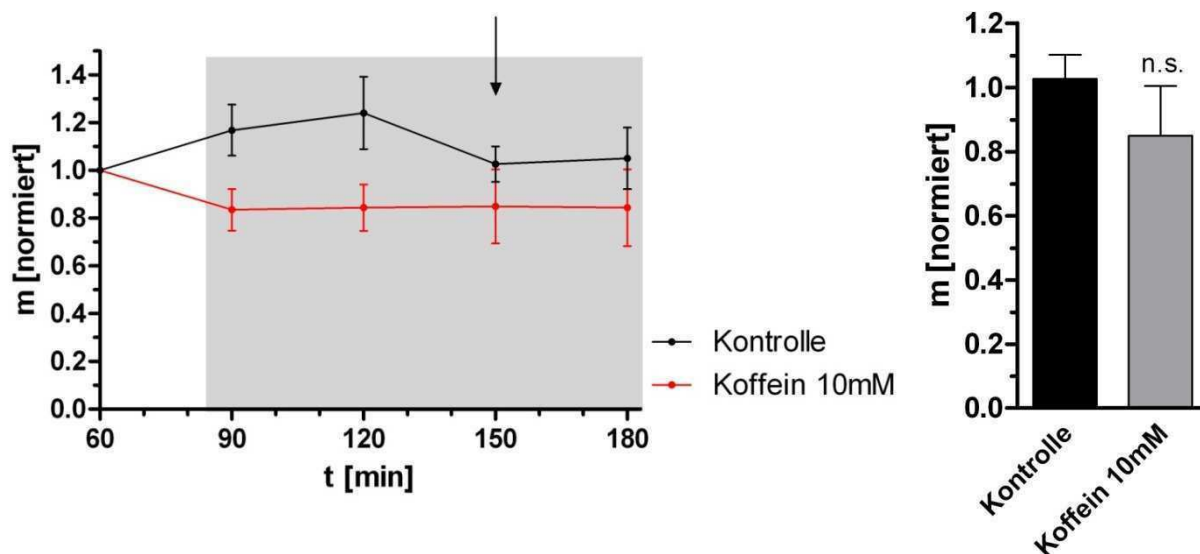


Abbildung 3.36: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen positiven Steigung (m) unter Einwirkung von 10mM Koffein. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeininwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,03 / SEM $\pm 0,074$; Koffein 10mM: $n=5$; Mean 0,85 / SEM $\pm 0,155$).

3.3.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Potentials

Die Änderung der Ratenkonstante k über der Zeit wird im folgenden Graphen dargestellt. Es zeigt eine deutliche Zunahme der Ratenkonstante.

Das Balkendiagramm zeigt die Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150$ min. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Zunahme von 81,5% festgestellt werden.

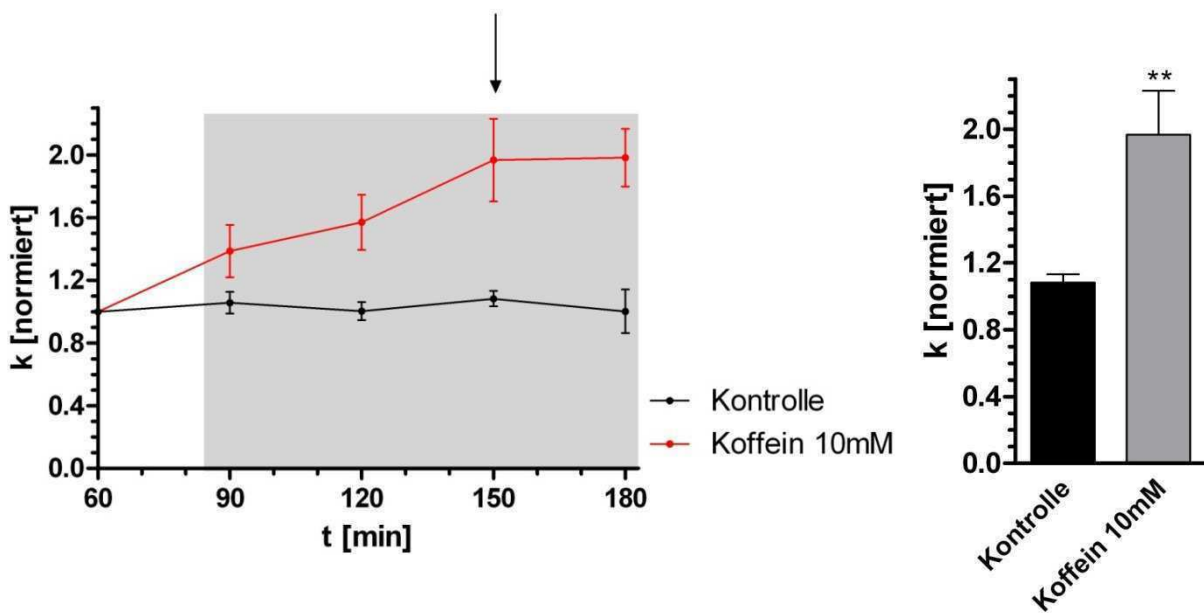


Abbildung 3.37: Links: Graphische Darstellung der Änderung der Ratenkonstante k unter Einwirkung von 10mM Koffein. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Nikotineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Ratenkonstante k zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,08 / SEM $\pm 0,049$; Koffein 10mM: $n=5$; Mean 1,96 / SEM $\pm 0,263$).

3.3.5. Neuroprotektion

Die neuroprotektive Wirkung von Koffein wurde ebenso für die Koffein-Konzentration nachgewiesen, die nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten zur ED_{50} lag. Bei Koffein entsprach dies einer Konzentration von 10mM. Der Auswertung liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für die aufgeführten Messungen je eine Beispielkurve.

Wie in der folgenden Abbildung sehr gut zu erkennen ist, wirkt Koffein den neurotoxischen Eigenschaften von NMDA entgegen. Durch Zugabe von 10mM Koffein sinkt der Quotient aus der maximalen negativen und maximalen positiven Steigung um nur 29,7% im Vergleich zur Kontrolle.

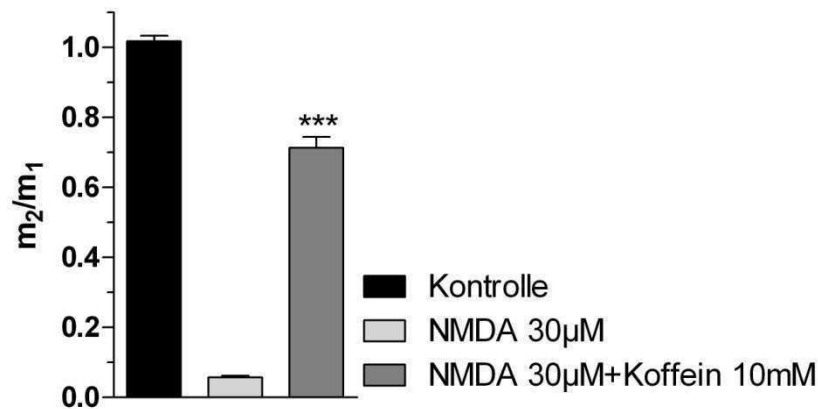


Abbildung 3.38: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30 μ M NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 μ M NMDA und 10mM Koffein ($n=6$; Mean 0,71 / SEM $\pm 0,031$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

3.4. Kokain

3.4.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die Änderung der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-Wellen unter der Einwirkung von Kokain wurde in Abhängigkeit von Konzentrationen zwischen 10 μ M und 3mM gemessen. Die normierten Geschwindigkeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen und sind in Abbildung 3.39 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine deutliche Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit festzustellen. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM reduziert sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min um 30%, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 70%. Bei einer Konzentration von 2mM konnte nur bis zu einer Einwirkzeit von 90min SD-Wellen ausgelöst werden, während bei einer Konzentration von 3mM Koffein nur bis zu einer Einwirkzeit von 60min Wellen ausgelöst werden konnten. Ebenso wird deutlich, dass sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Auswaschen der Substanz langsam wieder der ursprünglichen Geschwindigkeit nähert.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.40 stellt die Veränderung der relativen Geschwindigkeit unter allen gemessenen Kokain-Konzentrationen zum Zeitpunkt $t=150$ min dar. Schon unter Einfluss von 10 μ M Kokain ist eine signifikante Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu beobachten.

Aus diesem Diagramm wurde sowohl für die später folgenden elektrophysiologischen als auch für die Messungen zur Neuroprotektion die Substanzkonzentration von 1mM bestimmt.

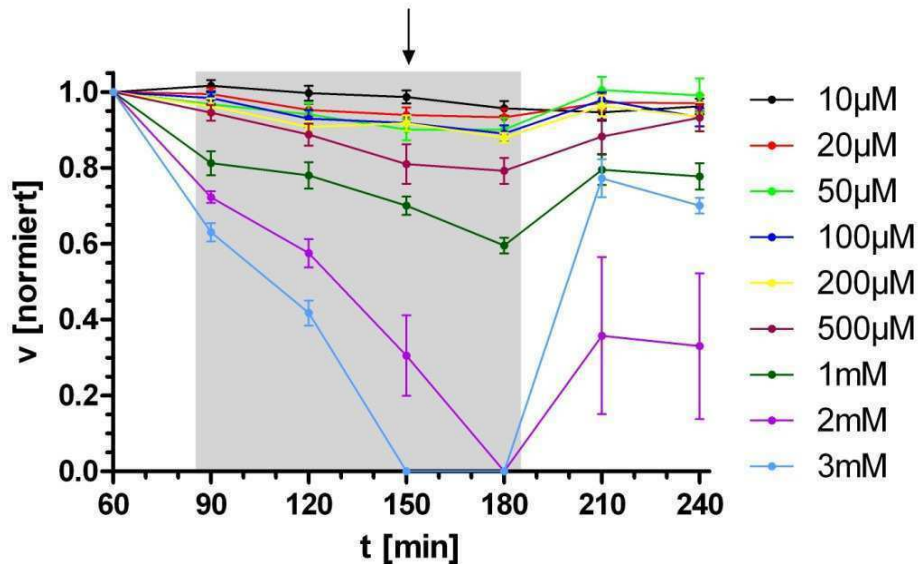


Abbildung 3.39: Zeitliche Darstellung der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Kokain-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Kokaineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

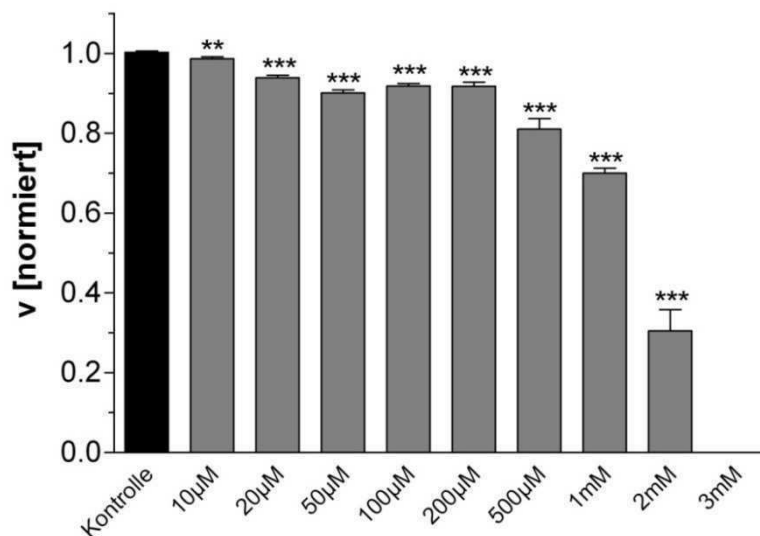


Abbildung 3.40: Vergleich der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=12$ für $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=4$ für $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM , 2mM , 3mM). Bei einer Substanzkonzentration von 3mM Kokain konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.4.2. IOS

Die Änderung der einzelnen Parameter des intrinsischen optischen Signals wurde ebenfalls in Abhängigkeit aufsteigender Kokain-Konzentrationen gemessen. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für jede Substanzkonzentration eine Originalspur zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

3.4.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

In der folgenden Abbildung wird die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Kokain kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um $34,3\%$ ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um $66,6\%$.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.42 zeigt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Erst unter Einfluss von $100\mu\text{M}$ Kokain ist eine signifikante Abnahme der maximalen Amplitude zu beobachten.

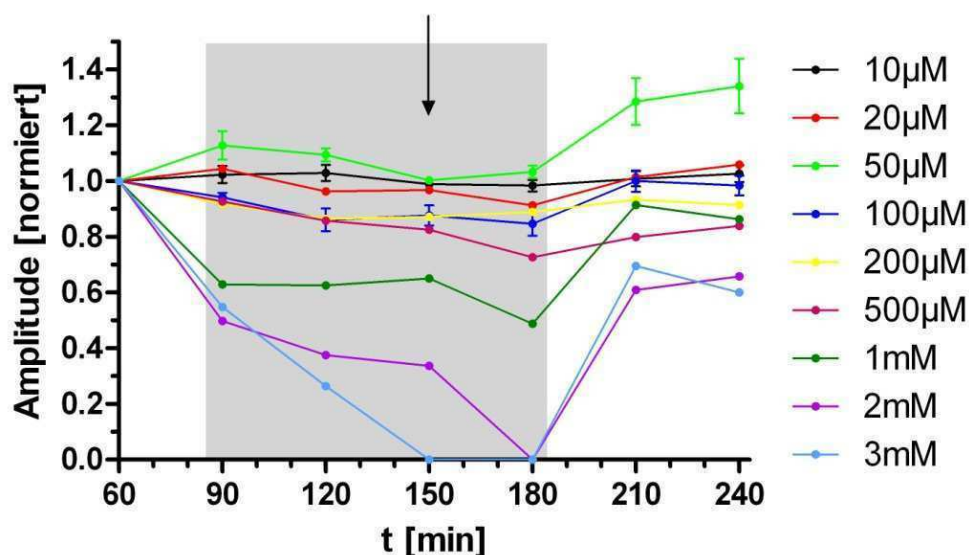


Abbildung 3.41: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Kokain-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Kokaineinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

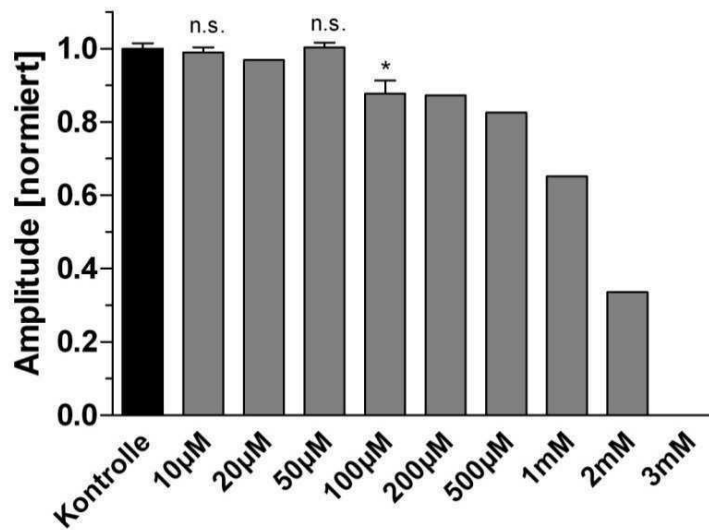


Abbildung 3.42: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude des 1. Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$; $n=1$ für $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM , 2mM und 3mM). Für die Messungen unter Einfluss von $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM und 2mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 3mM Kokain konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.4.2.2. Maximale positive Steigung des 1. Peaks

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) über die Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Kokain kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 39% ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 64%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.44 zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Bis zu einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ konnte jedoch keine signifikante Abnahme festgestellt werden. Für die Messungen ab $200\mu\text{M}$ Kokain konnte kein t-Test durchgeführt werden.

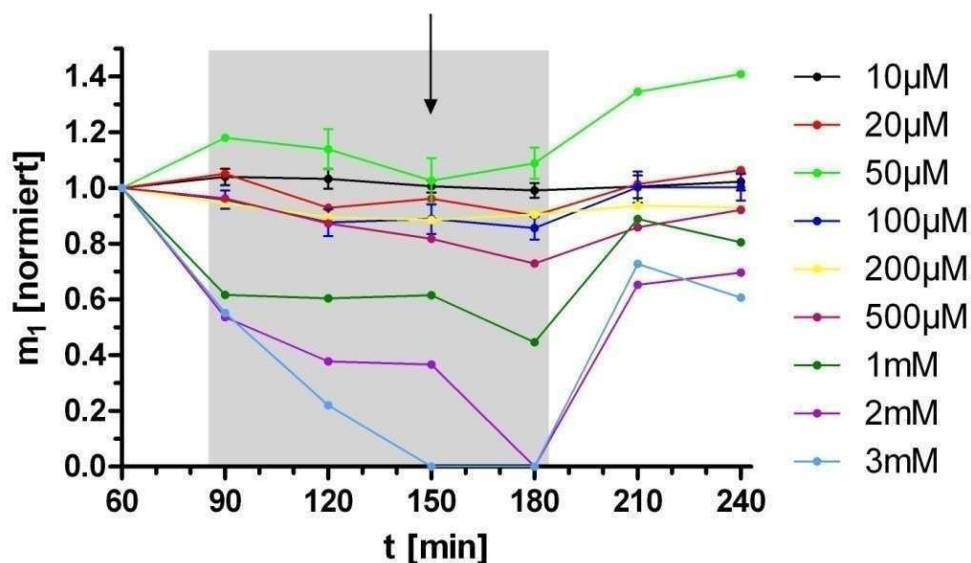


Abbildung 3.43: Graphische Darstellung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1. Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Kokain-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Kokain-Einwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

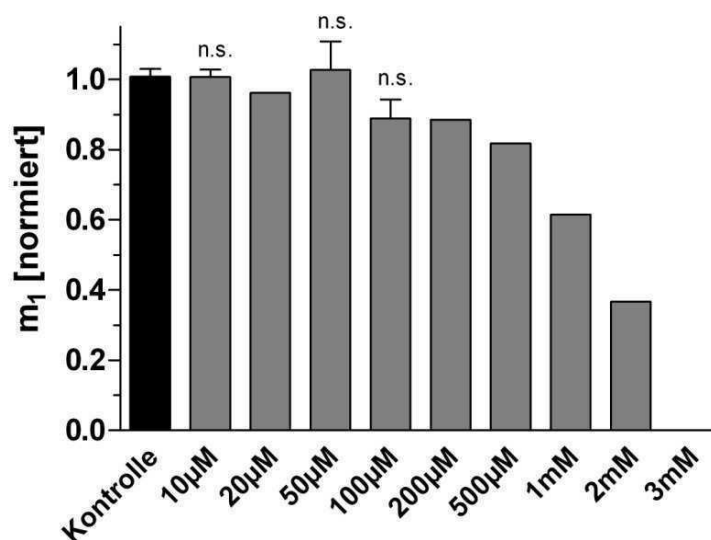


Abbildung 3.44: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$; $n=1$ für $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM und 2mM). Für alle Messungen mit $n=1$ konnte kein t -Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 3mM Kokain konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.4.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

Die Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) über die Zeit zeigt die folgende Abbildung. Mit zunehmender Konzentration von Kokain kann eine deutliche Abnahme der negativen Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 30,4% ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 53,9%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.46 stellt die Änderung der maximalen negativen Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Bis zu einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ Kokain konnte keine signifikante Abnahme der negativen Steigung ermittelt werden. Für die weiteren Konzentrationen konnte kein t-Test durchgeführt werden.

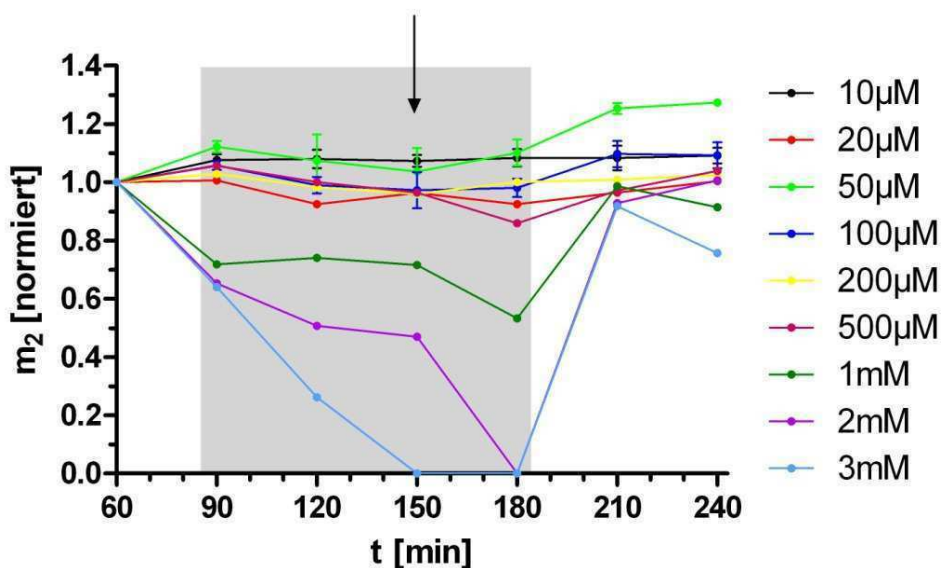


Abbildung 3.45: Graphische Darstellung der maximalen negativen Steigung (m_2) des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Kokain-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Zeitabschnitt unter Koffeineinwirkung dar. Der Pfeil markiert die Messungen, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurden.

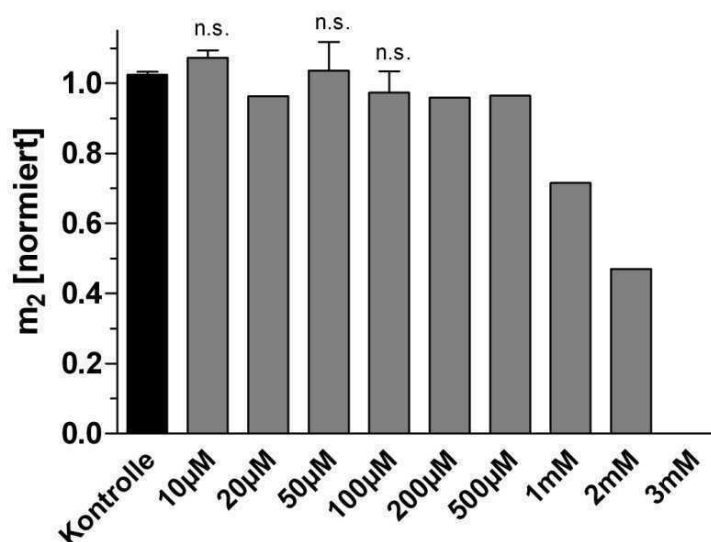


Abbildung 3.46: Vergleich der Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$; $n=1$ für $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM , und 2mM). Für die Messungen unter Einfluss von $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM und 2mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 3mM Kokain konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.4.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks

Die Änderung der Fläche unterhalb des 2.Peaks (A) wird im Folgenden dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Kokain nimmt die Fläche stetig ab.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.48 stellt die Änderung der Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ für alle gemessenen Konzentrationen dar. Bis zu einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ kann jedoch keine signifikante Abnahme festgestellt werden.

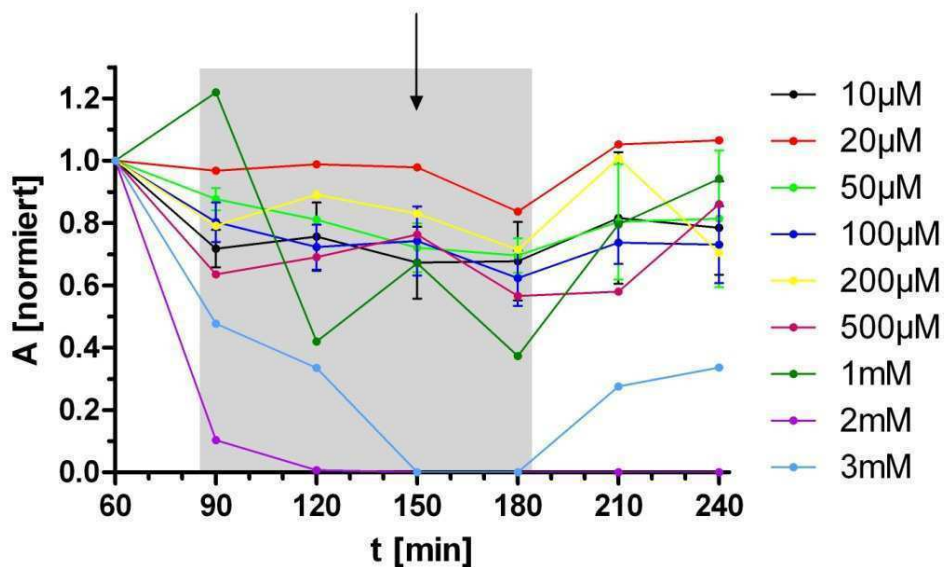


Abbildung 3.47: Graphische Darstellung der Änderung der Fläche (A) unter Einfluss unterschiedlicher Kokain-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Einwirkung von Kokain wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

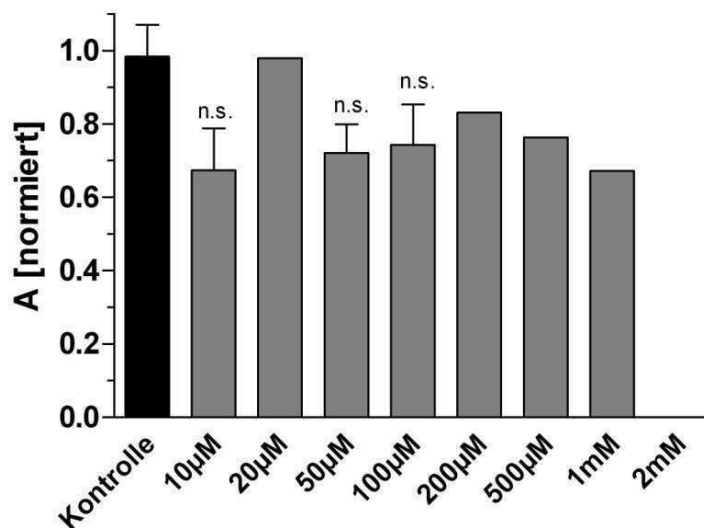


Abbildung 3.48: Vergleich der Änderung der Fläche (A) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$; $n=1$ für $20\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$, 1mM und 2mM). Für die Messungen unter Einfluss von $20\mu\text{M}$ und ab $200\mu\text{M}$ Kokain konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 2mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.4.3. Latenz

Die Änderung der Latenz, der Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, wurde für die Kokain-Konzentration bestimmt, die nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Für Kokain wurde somit eine Konzentration von 1mM ausgewählt.

Der Auswertung liegen die angefertigten Stacks aus den einzelnen Videoaufzeichnungen zugrunde. Im Anhang findet sich je ein Beispielstack für die Messung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

Wie in der folgenden Abbildung deutlich zu erkennen ist, nimmt die Latenz durch die Zugabe von Kokain mit fortschreitender Einwirkzeit zu. Die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes nimmt also ab.

Das Balkendiagramm zeigt den Vergleich der Latenz von einer Kontrollmessung zu einer Substanzmessung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Die signifikante Zunahme der Latenz beträgt zu diesem Zeitpunkt 109,9%.

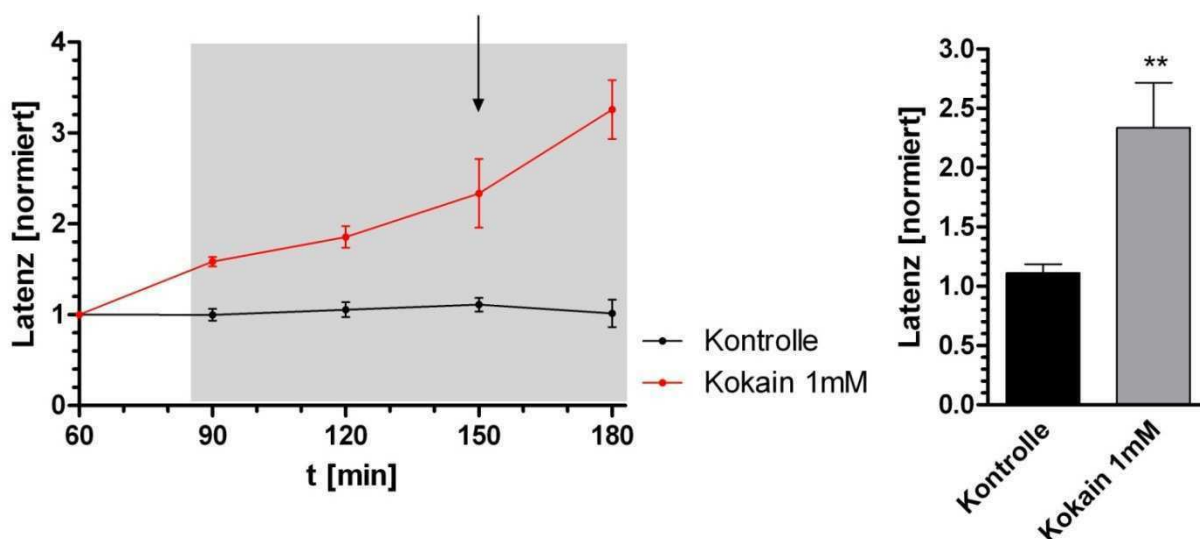


Abbildung 3.49: Links: Zeitliche Änderung der Latenz unter Standardbedingungen (Kontrolle) und unter Kokain-Einfluss. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Kokaineinfluss wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Latenz zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=5$; Mean 1,11 / SEM $\pm 0,074$; Kokain 1mM: $n=4$; Mean 2,33 / SEM $\pm 0,378$).

3.4.4. Elektrisches Potential

Die Änderung der einzelnen Parameter des elektrischen Potentials wurde ebenfalls für die Kokain-Konzentration durchgeführt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Bei Kokain entsprach dies einer Konzentration von 1mM. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien zugrunde. Im Anhang findet sich eine Beispielkurve für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

3.4.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit. Mit zunehmender Einwirkzeit von Kokain kann eine deutliche Abnahme der Amplitude festgestellt werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150$ min dar. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Abnahme 44,2%.

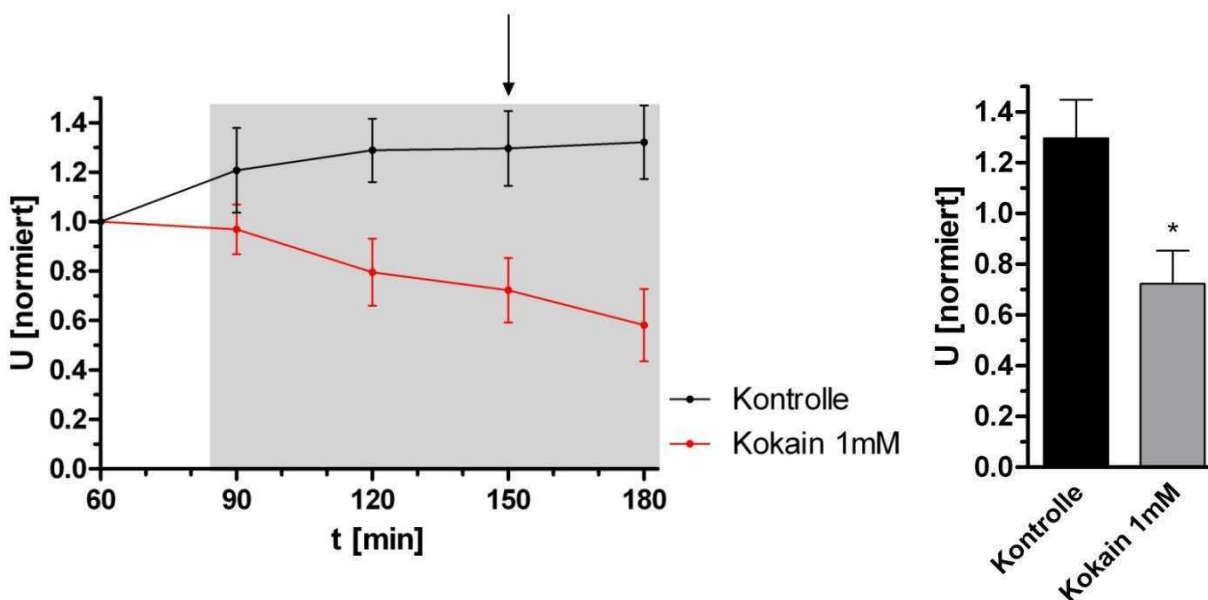


Abbildung 3.50: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude unter Einwirkung von 1mM Kokain. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Kokaineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=7$; Mean 1,29 / SEM \pm 0,151; Kokain 1mM: $n=5$; Mean 0,72 / SEM \pm 0,131).

3.4.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m) über der Zeit dargestellt. Es kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden.

Das Balkendiagramm zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Abnahme 48%.

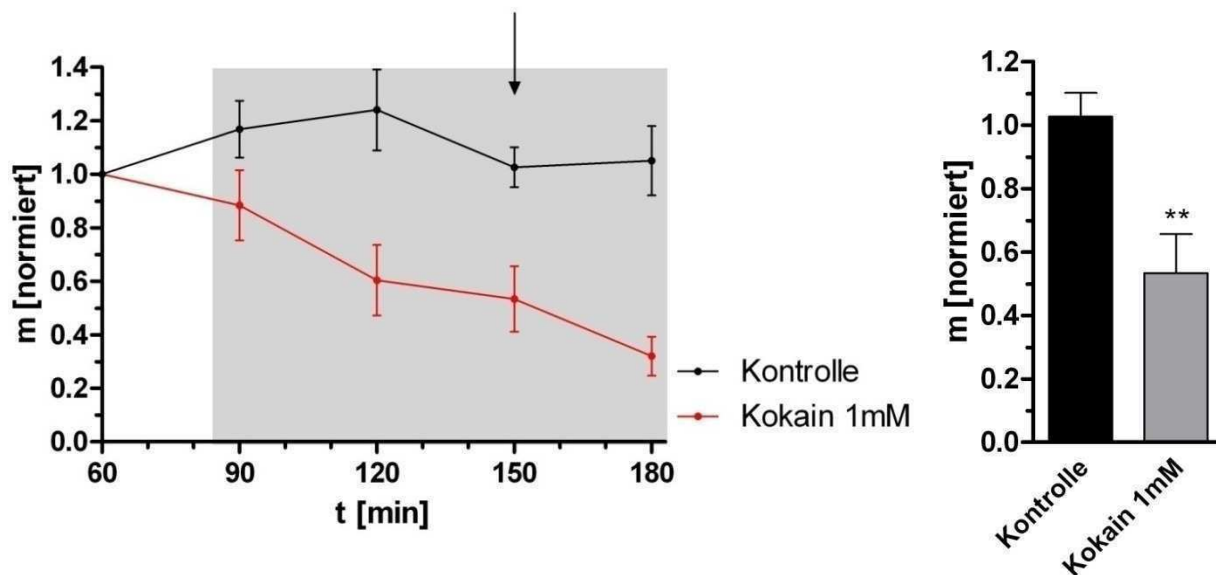


Abbildung 3.51: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen positiven Steigung (m) unter Einwirkung von 1mM Kokain. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Koffeineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,03 / SEM \pm 0,074; Koffein 10mM: $n=5$; Mean 0,53 / SEM \pm 0,123).

3.4.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals

Die Änderung der Ratenkonstante k wird in den folgenden Abbildungen dargestellt. Hierbei kann eine deutliche Zunahme der Ratenkonstante beobachtet werden.

Das Balkendiagramm zeigt die Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Zunahme von 50,9% beobachtet werden.

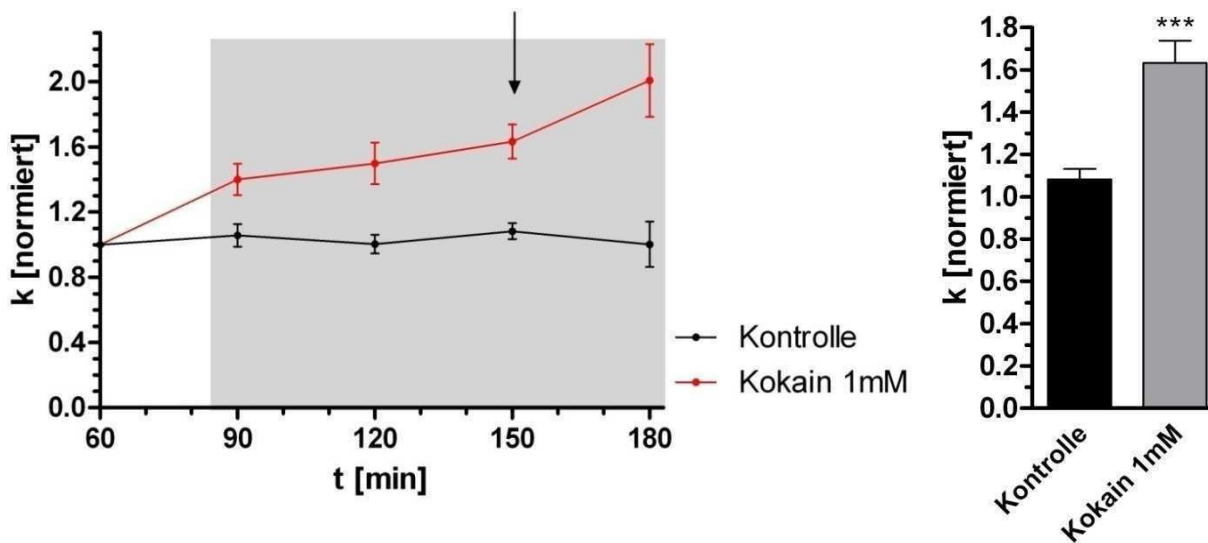


Abbildung 3.52: Links: Graphische Darstellung der Änderung der Ratenkonstante k unter Einwirkung von 1mM Kokain. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Kokaineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ (Kontrolle: $n=6$; Mean $1,08$ / SEM $\pm 0,049$; Kokain 1mM : $n=5$; Mean $1,63$ / SEM $\pm 0,105$).

3.4.5. Neuroprotektion

Die neuroprotektive Wirkung von Kokain wurde ebenfalls anhand der Kokain-Konzentration nachgewiesen, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Bei Kokain entsprach dies einer Konzentration von 1mM . Der Auswertung liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für die aufgeführten Messungen je eine Beispielkurve.

Wie in der folgenden Abbildung gut zu erkennen ist, wirkt Kokain den neurotoxischen Eigenschaften von NMDA entgegen. Durch Zugabe von 1mM Koffein sinkt der Quotient aus der maximalen negativen und maximalen positiven Steigung nur um $58,8\%$.

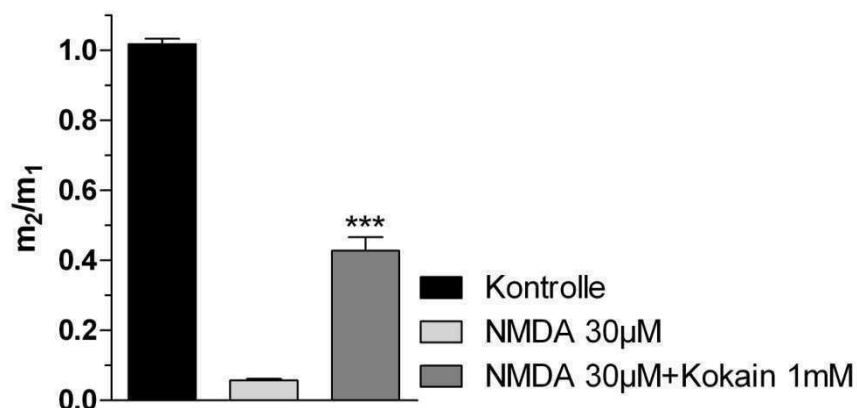


Abbildung 3.53: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30 μ M NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 μ M NMDA und 1mM Kokain ($n=7$; Mean 0,43 / SEM $\pm 0,039$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

3.5. Amphetamin

3.5.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die Änderung der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-Wellen unter der Einwirkung von Amphetamin wurde anhand aufsteigender Konzentrationen zwischen 20 μ M und 5mM gemessen. Die normierten Geschwindigkeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen und sind in Abbildung 3.54 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit festzustellen. Bei einer Konzentration von 2mM reduzierte sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min um 27%, wobei sich jedoch bei einer Konzentration von 5mM schon gar keine SD-Welle mehr auslösen ließ. Ebenso wird deutlich, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Auswaschen der Substanz sich langsam wieder der ursprünglichen Geschwindigkeit nähert. Sogar bei der Substanzkonzentration von 5mM, bei der sich gar keine Wellen mehr auslösen lassen, näherte sich nach 30-minütigem Auswaschen die Ausbreitungsgeschwindigkeit wieder dem Ausgangswert an. Das Balkendiagramm in Abbildung 3.55 stellt die Veränderung der relativen Geschwindigkeit von allen gemessenen Amphetamin-Konzentrationen zum Zeitpunkt $t=150$ min dar.

Unter Einfluss von 100µM Amphetamin ist bereits eine signifikante Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu beobachten.

Aus diesem Diagramm wurde sowohl für die später folgenden elektro-physiologischen als auch für die Messungen zur Neuroprotektion die Substanzkonzentration von 2mM bestimmt.

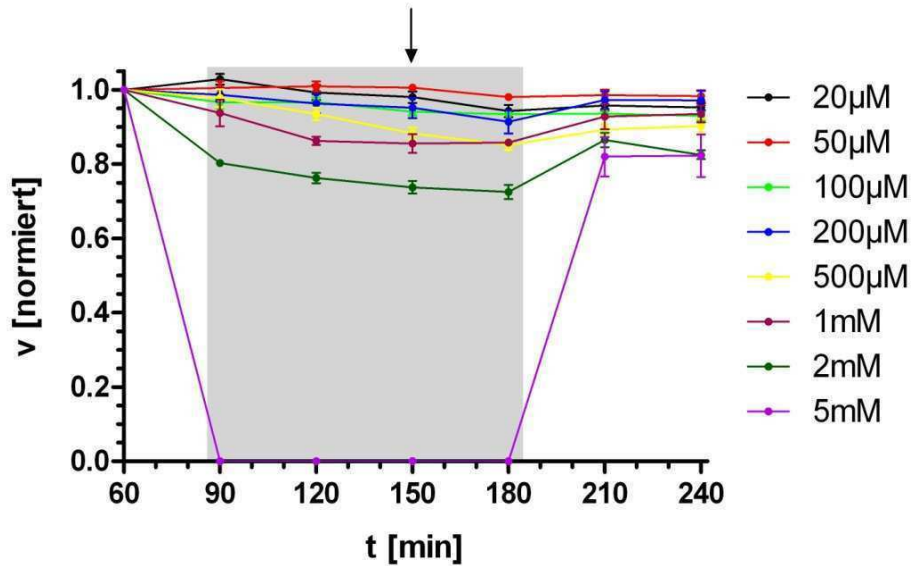


Abbildung 3.54: Zeitliche Darstellung der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Amphetamin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den weiteren Vergleich ausgewählt wurde.

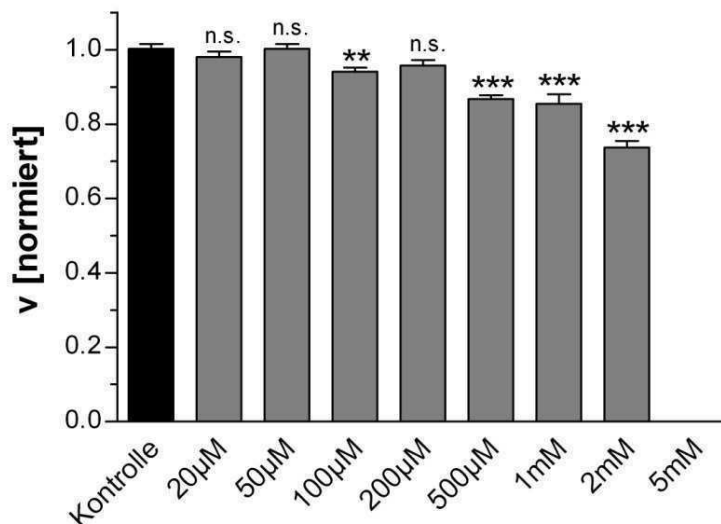


Abbildung 3.55: Vergleich der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=16$ für 50µM; $n=12$ für 20µM, 100µM; $n=4$ für 200µM, 500µM, 1mM, 2mM und 5mM). Bei der Substanzkonzentration von 5mM Amphetamin konnte keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.5.2. IOS

Die Änderung der einzelnen Parameter des intrinsischen optischen Signals wurde ebenfalls für aufsteigende Amphetamin-Konzentrationen gemessen. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für jede Substanzkonzentration eine Originalspur zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Da bei einer Konzentration von 5mM überhaupt keine Welle mehr auszulösen war, wurde auf deren Darstellung in der Gesamtübersicht verzichtet.

3.5.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit. Mit zunehmender Konzentration von Amphetamin kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um $54,5\%$ ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um $65,6\%$.

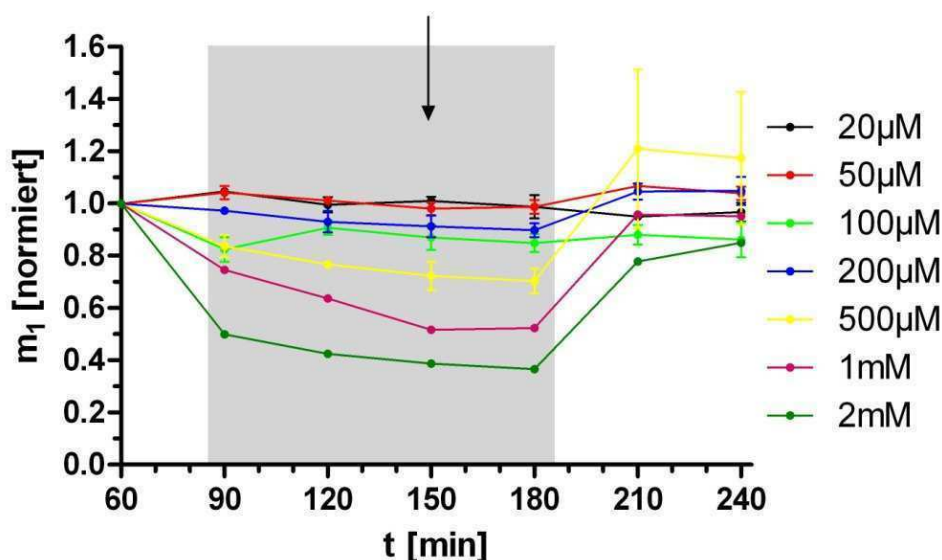


Abbildung 3.56: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Amphetamin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.57 stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Schon unter Einfluss von $100\mu\text{M}$ Amphetamin ist eine signifikante Abnahme der maximalen Amplitude festzustellen.

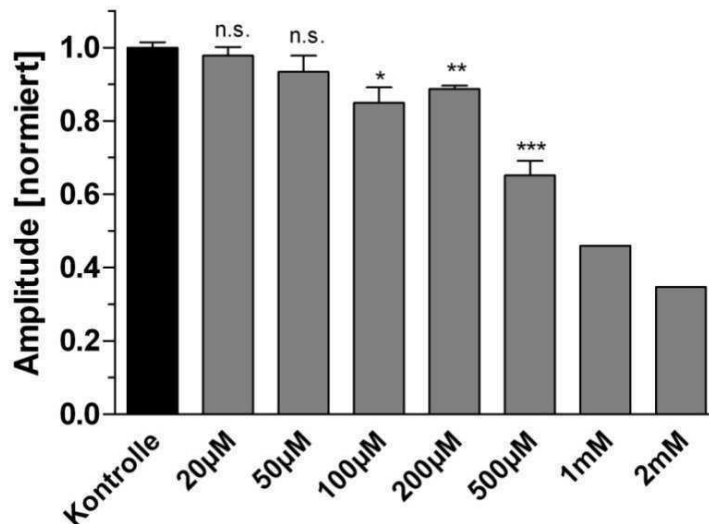


Abbildung 3.57: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude des 1. Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $20\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM und 2mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 2mM Amphetamin konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden.

3.5.2.2. Maximale positive Steigung des 1. Peaks

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) über der Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Amphetamin zeigt sich eine deutliche Abnahme der Steigung. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 49% ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 62%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.59 stellt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Schon unter Einfluss von $100\mu\text{M}$ Amphetamin ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

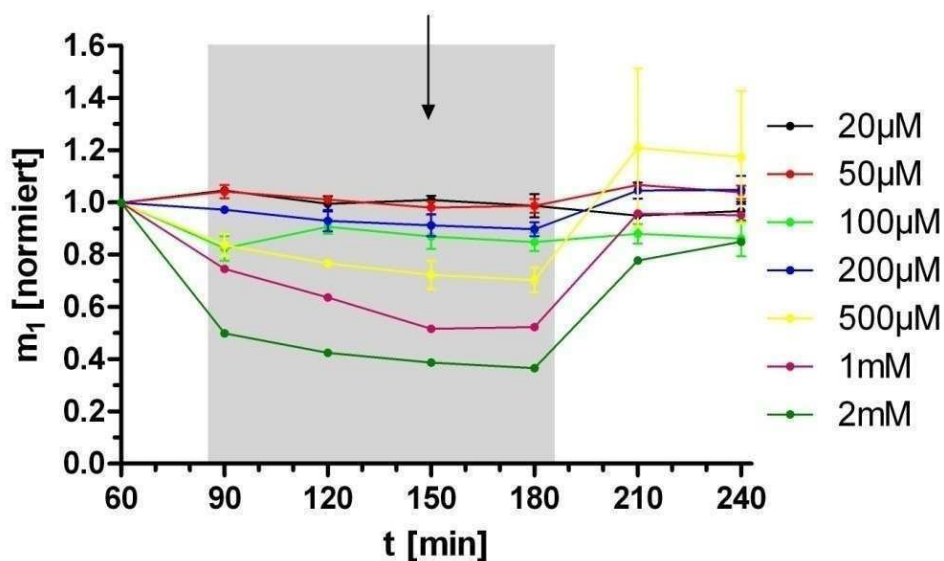


Abbildung 3.58: Graphische Darstellung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1. Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Amphetamin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

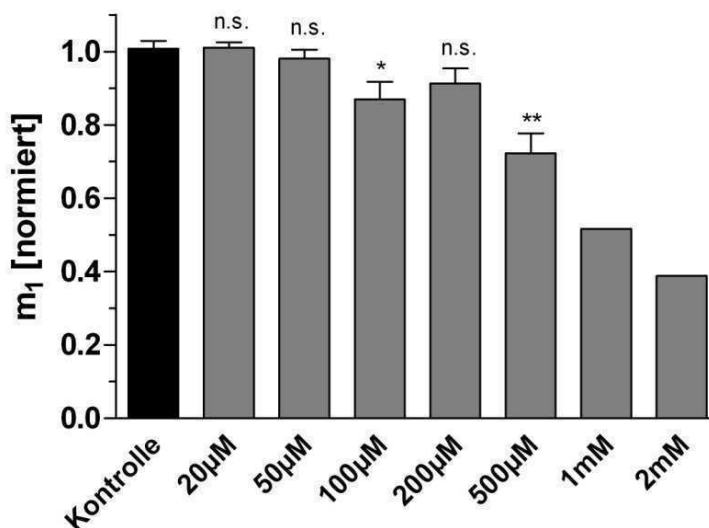


Abbildung 3.59: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für 20µM, 100µM; $n=2$ für 20µM, 200µM, 500µM; $n=1$ für 1mM und 2mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 2mM Amphetamin konnte aufgrund $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden.

3.5.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

Die Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) über die Zeit ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Amphetamin kann eine deutliche Abnahme der negativen Steigung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise 1mM nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 39,2% ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 50%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.61 stellt die Änderung der maximalen negativen Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Bis zu einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ kann eine Zunahme von bis zu 11,7% der negativen Steigung beobachtet werden. Ab einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ nimmt die negative Steigung jedoch signifikant ab.

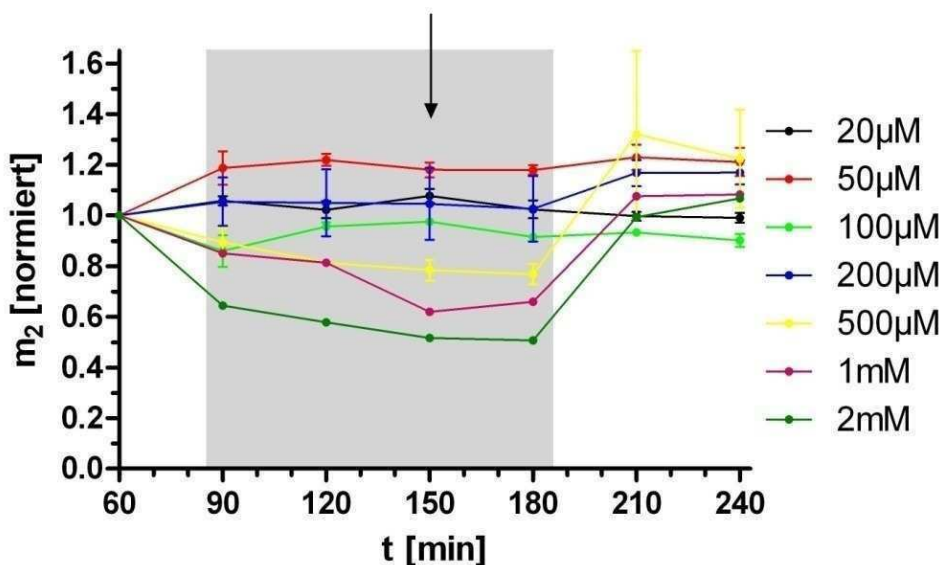


Abbildung 3.60: Graphische Darstellung der maximalen negativen Steigung des 1.Peaks (m_2) unter Einwirkung unterschiedlicher Amphetamin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung dar. Der Pfeil markiert die Messungen, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurden.

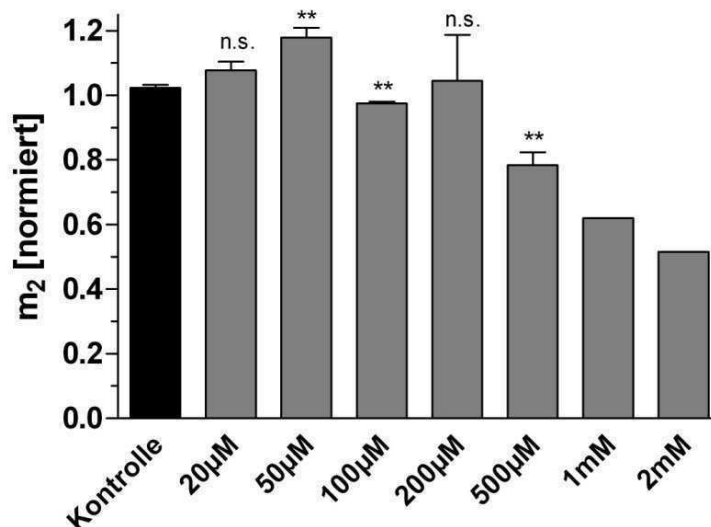


Abbildung 3.61: Vergleich der Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $20\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$; $n=2$ für $50\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM und 2mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 2mM Amphetamin konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden.

3.5.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der Fläche unterhalb des 2.Peaks. Mit zunehmender Konzentration von Amphetamin kann eine stetige Abnahme der Fläche beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise $500\mu\text{M}$ Amphetamin nimmt die Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 52% ab, bei einer Konzentration von 2mM sogar um 79,6%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.63 stellt die Änderung der Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ für alle gemessenen Konzentrationen dar. Erst ab einer Konzentration von $500\mu\text{M}$ kann eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

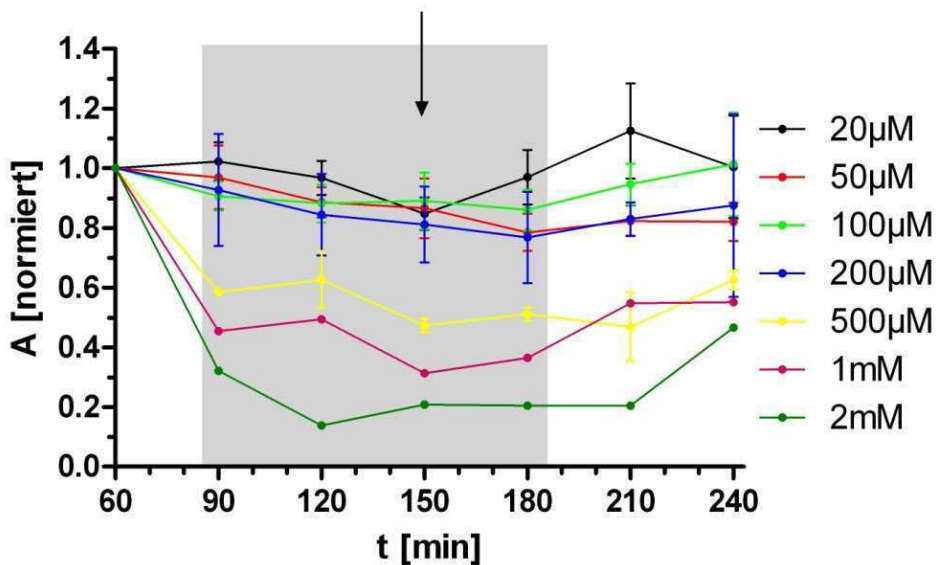


Abbildung 3.62: Graphische Darstellung der Änderung der Fläche (A) unter Einfluss unterschiedlicher Amphetamin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Einwirkung von Amphetamin wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

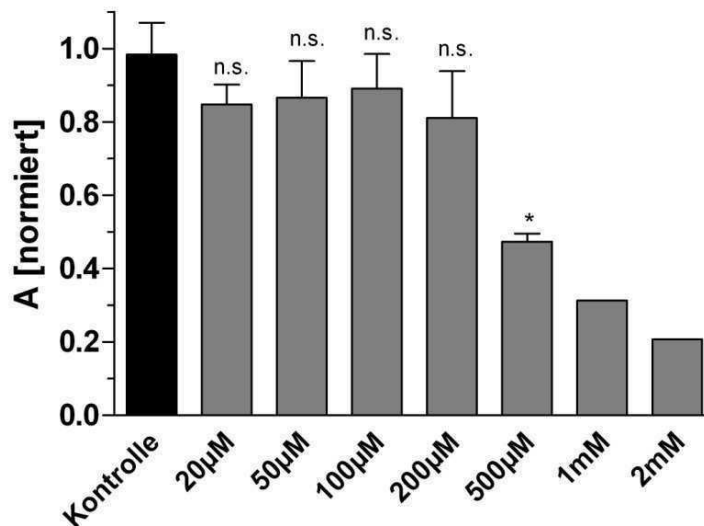


Abbildung 3.63: Vergleich der Änderung der Fläche (A) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für 20 μM, 100 μM; $n=2$ für 50 μM, 200 μM, 500 μM; $n=1$ für 1 mM und 2 mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1 mM bzw. 2 mM Amphetamin konnte aufgrund von $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden.

3.5.3. Latenz

Die Änderung der Latenz, der Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, wurde für die Amphetamin-Konzentration bestimmt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Für Amphetamin wurde somit eine Konzentration von 2mM ausgewählt. Der Auswertung liegen die angefertigten Stacks aus den einzelnen Videoaufzeichnungen zugrunde. Im Anhang findet sich je ein Beispielstack für die Messung zum Zeitpunkt $t=120\text{min}$, $t=150\text{min}$, $t=180\text{min}$ sowie den dazugehörigen Kontrollen.

Wie im folgenden Graphen zu erkennen ist, nimmt die Latenz durch die Zugabe von Amphetamin mit fortschreitender Einwirkzeit zu. Die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes nimmt also ab.

Das Balkendiagramm zeigt den Vergleich der Latenz von einer Kontrollmessung zu einer Substanzmessung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Die Zunahme der Latenz beträgt zu diesem Zeitpunkt 7,2%. Da die Latenz jedoch zum Zeitpunkt $t=120\text{min}$ (82,8%) und $t=180\text{min}$ (114,8%) signifikant zunimmt, muss die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ kritisch betrachtet werden.

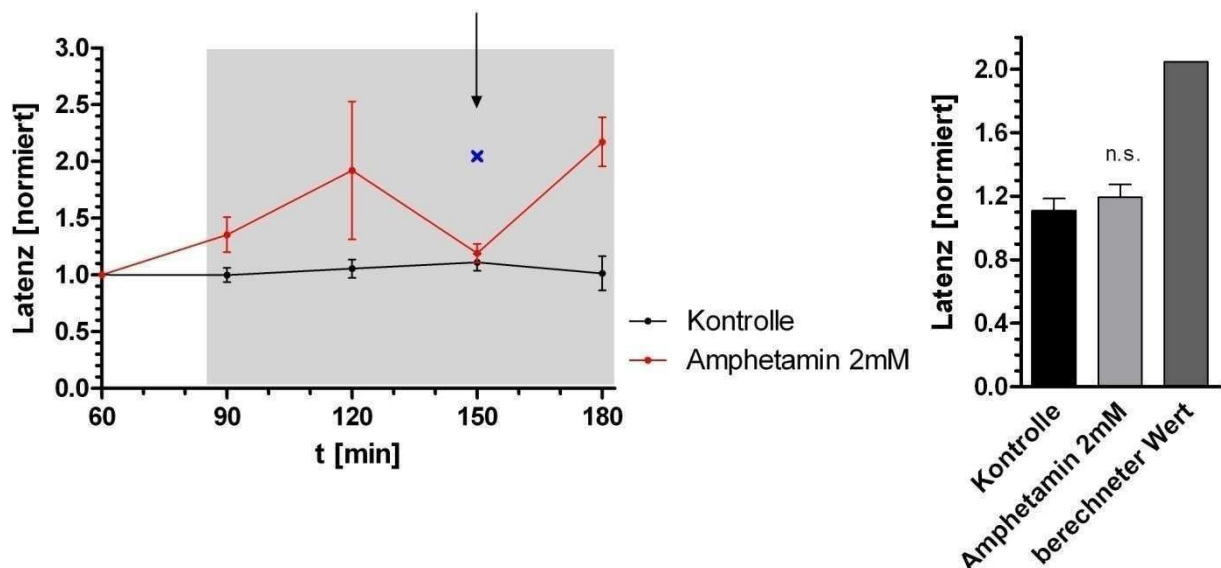


Abbildung 3.64: Links: Zeitliche Änderung der Latenz unter Standardbedingungen (Kontrolle) und unter Amphetamin-Einfluss. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Das blaue Kreuz stellt das arithmetische Mittel aus den Messungen zum Zeitpunkt $t=120\text{min}$ und $t=180\text{min}$ dar. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinfluss wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Latenz zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=5$; Mean 1,11 / SEM \pm 0,074; Amphetamin 2mM $n=4$; Mean 1,19 / SEM \pm 0,081). Zusätzlich ist der berechnete Mittelwert aus der zeitlichen Übersicht (links) angegeben.

3.5.4. Elektrisches Potential

Die Änderung der einzelnen Parameter des elektrischen Potentials wurde ebenfalls für die Amphetamin-Konzentration durchgeführt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag.

Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien zugrunde. Im Anhang findet sich eine Beispielkurve für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

3.5.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit. Mit zunehmender Einwirkzeit kann eine sehr deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150$ min dar. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Abnahme von 70,6% beobachtet werden.

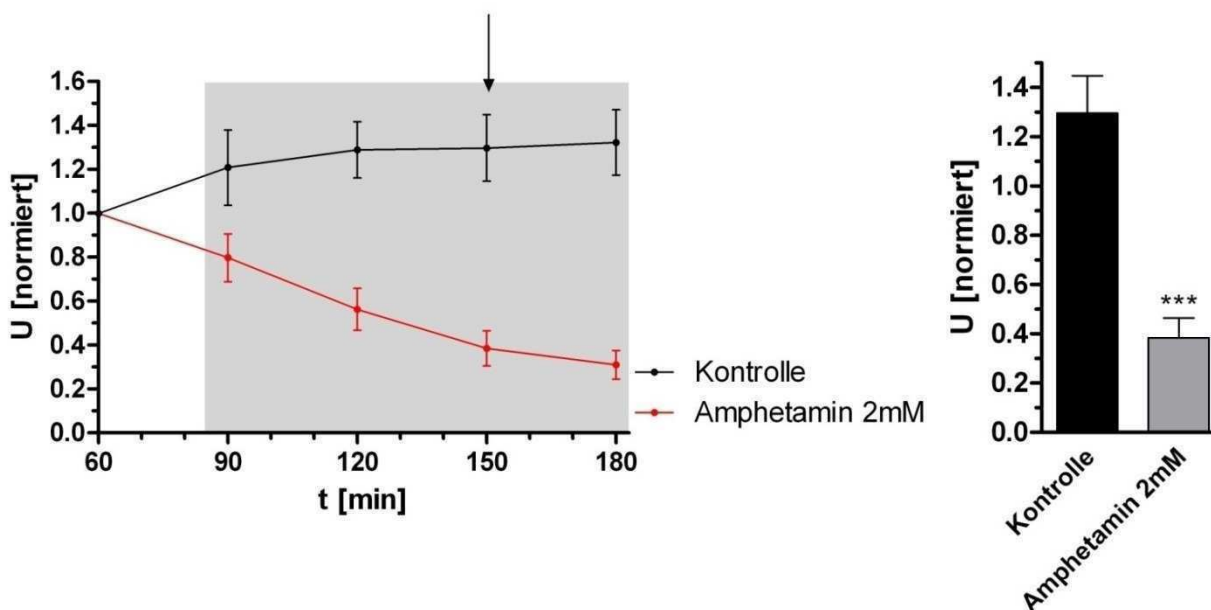


Abbildung 3.65: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude unter Einwirkung von 2mM Amphetamin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=$; Mean 1,29 / SEM $\pm 0,151$; Amphetamin 2mM: $n=6$; Mean 0,38 / SEM $\pm 0,080$).

3.5.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals

Im Folgenden wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m) über der Zeit dargestellt. Es kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden.

Das Balkendiagramm zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die signifikante Abnahme 75,5%.

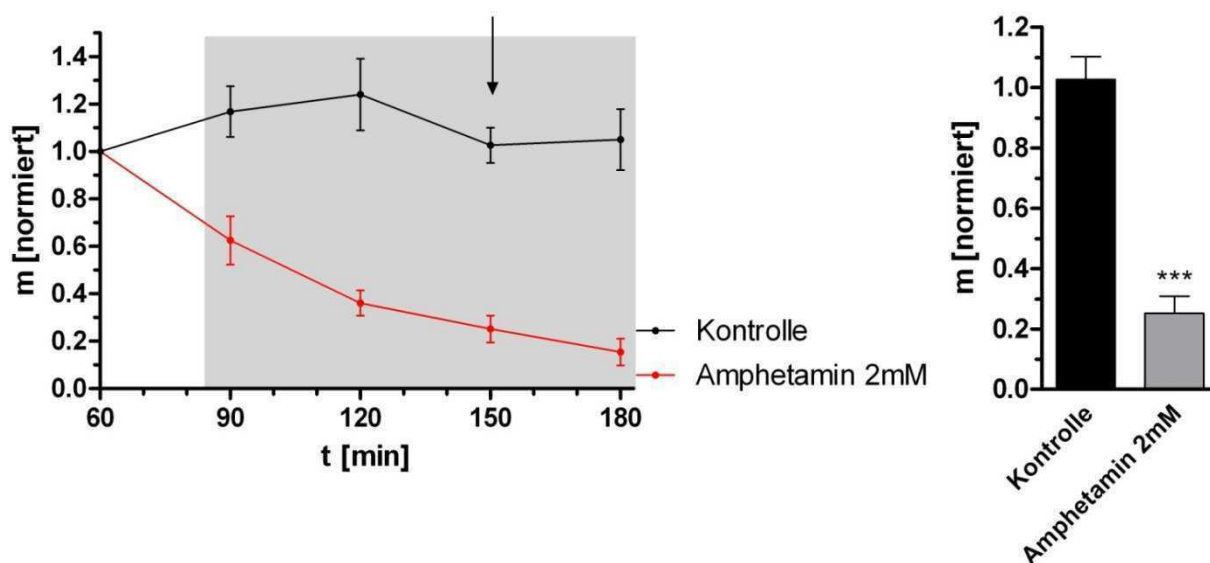


Abbildung 3.66: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen positiven Steigung (m) unter Einwirkung von 2mM Amphetamin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,03 / SEM $\pm 0,074$; Amphetamin 2mM: $n=5$; Mean 0,25 / SEM $\pm 0,057$).

3.5.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals

Die Änderung der Ratenkonstante k über der Zeit wird in den folgenden Abbildungen dargestellt. Es kann eine deutliche Zunahme der Ratenkonstante beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Zunahme von 158,3% festgestellt werden.

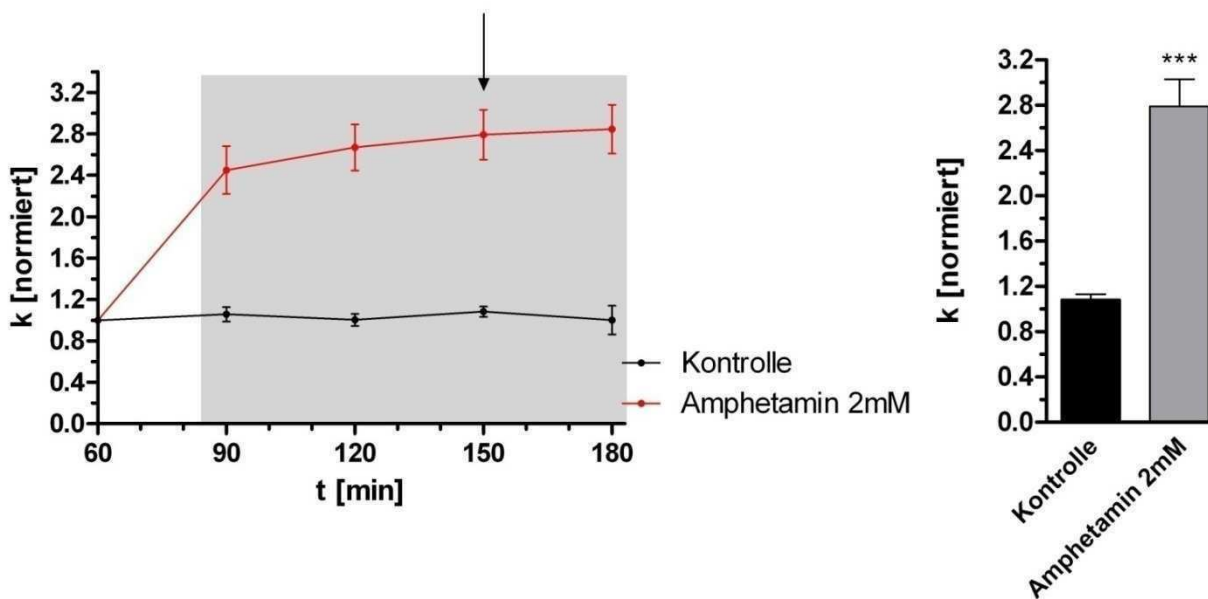


Abbildung 3.67: Links: Graphische Darstellung der Änderung der Ratenkonstante k unter Einwirkung von 2mM Amphetamin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Amphetamineinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,08 / SEM $\pm 0,049$; Amphetamin 2mM: $n=4$; Mean 2,79 / SEM $\pm 0,241$).

3.5.5. Neuroprotektion

Die neuroprotektive Wirkung von Amphetamin wurde wiederum für die Amphetamin-Konzentration nachgewiesen, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten an der ED_{50} lag.

Der Auswertung liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für die aufgeführten Messungen je eine Beispielkurve.

Wie in der folgenden Abbildung gut zu erkennen ist, wirkt Amphetamin den neurotoxischen Eigenschaften von NMDA entgegen. Durch Zugabe von 2mM Amphetamin steigt der Quotient aus der maximalen negativen und maximalen positiven Steigung um 15,8% im Vergleich zur Kontrolle.

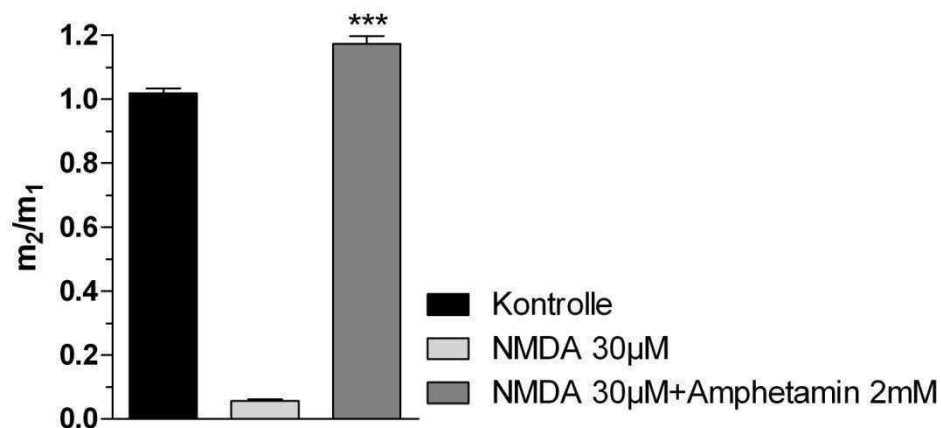


Abbildung 3.68: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30 μ M NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM $\pm 0,005$), 30 μ M NMDA und 2mM Amphetamin ($n=7$; Mean 1,17 / SEM $\pm 0,024$). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM $\pm 0,016$).

3.6. Methylphenidat

3.6.1. Ausbreitungsgeschwindigkeit

Die Änderung der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-Wellen unter der Einwirkung von Methylphenidat wurde für aufsteigende Konzentrationen zwischen 10 μ M und 5mM gemessen. Die normierten Geschwindigkeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen und sind in Abbildung 3.69 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine deutliche Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu erkennen. Bei einer Konzentration von beispielsweise 3mM reduzierte sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min bereits um 42%. Bei einer Konzentration von 5mM konnte nur bis zu einer Einwirkzeit von 30min eine SD-Welle ausgelöst werden. Ebenso wird deutlich, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Auswaschen der Substanz sich langsam wieder der ursprünglichen Geschwindigkeit nähert. Sogar bei einer Substanzkonzentration von 5mM ist bereits nach 30-minütigem Auswaschen eine starke Regeneration festzustellen.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.70 stellt die Veränderung der relativen Geschwindigkeit unter allen gemessenen Methylphenidat-Konzentrationen zum Zeitpunkt $t=150$ min dar. Bereits unter Einfluss von 50 μ M Methylphenidat ist eine signifikante Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu beobachten.

Aus diesem Diagramm wurde sowohl für die später folgenden elektro-physiologischen als auch für die Messungen zur Neuroprotektion die Substanzkonzentration von 3mM bestimmt.

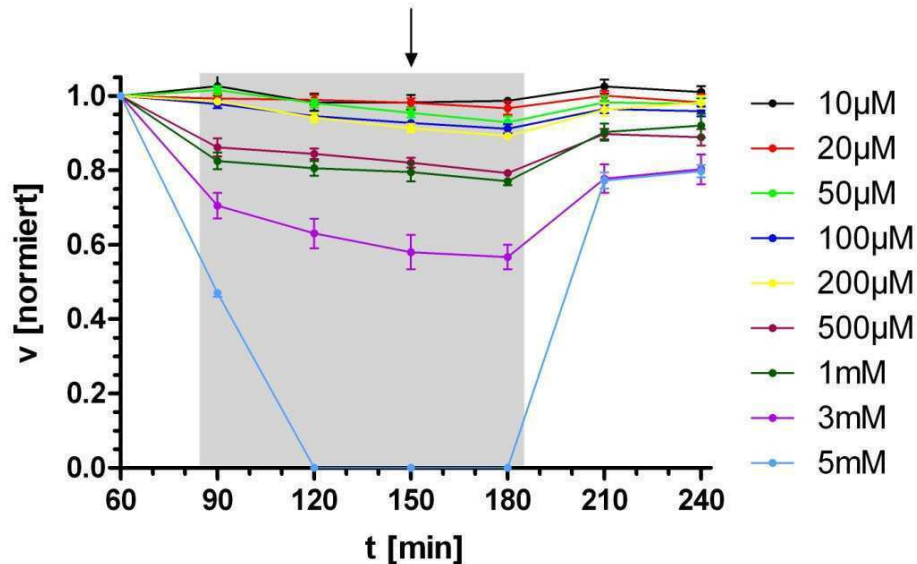


Abbildung 3.69: Zeitliche Darstellung der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Einfluss unterschiedlicher Methylphenidat-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

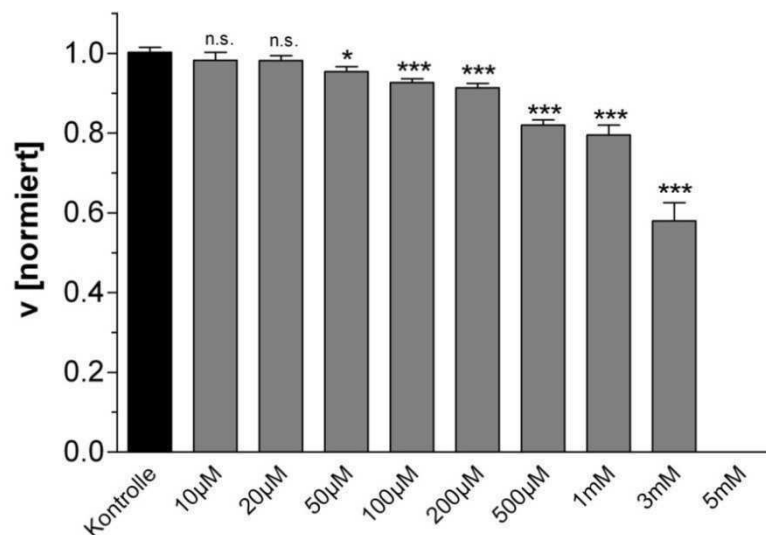


Abbildung 3.70: Vergleich der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=12$ für 20µM, 50µM, 100µM, 200µM; $n=8$ für 10µM, 500µM; $n=4$ für 1mM, 3mM und 5mM.) Ab einer Substanzkonzentration von 5mM Methylphenidat konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.6.2. IOS

Die Änderung der einzelnen Parameter des intrinsischen optischen Signals wurde ebenfalls anhand aufsteigender Methylphenidat-Konzentrationen gemessen. Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang finden sich für jede Substanzkonzentration eine Originalspur zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

3.6.2.1. Maximale Amplitude des 1.Peaks

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit auf. Mit zunehmender Konzentration von Methylphenidat kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise $500\mu\text{M}$ nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um $56,6\%$ ab, bei einer Konzentration von 3mM sogar um $91,9\%$.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.72 stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Ab einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ Methylphenidat ist eine signifikante Abnahme der maximalen Amplitude zu beobachten.

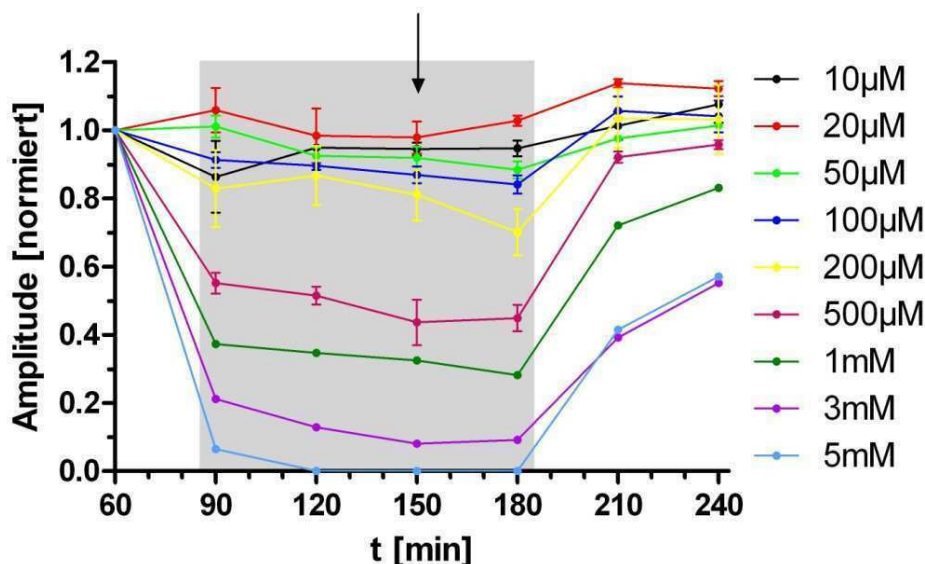


Abbildung 3.71: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Methylphenidat-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

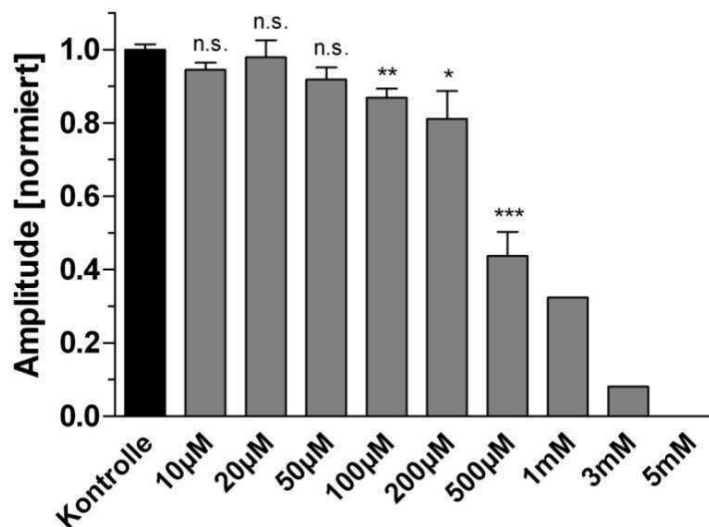


Abbildung 3.72: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude des 1.Peaks zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$; $n=2$ für $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM , 3mM und 5mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 3mM konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 5mM Methylphenidat konnte zu diesem Zeitpunkt keine Welle mehr ausgelöst werden.

3.6.2.2. Maximale positive Steigung des 1.Peaks

Im Folgenden wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) über die Zeit dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Methylphenidat kann eine deutliche Abnahme der Steigung festgestellt werden. Bei einer Konzentration von beispielsweise $500\mu\text{M}$ nimmt die Amplitude zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 51% ab, bei einer Konzentration von 3mM sogar um 93%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.74 zeigt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Ab einer Methylphenidat-konzentration von $100\mu\text{M}$ ist eine signifikante Abnahme zu beobachten.

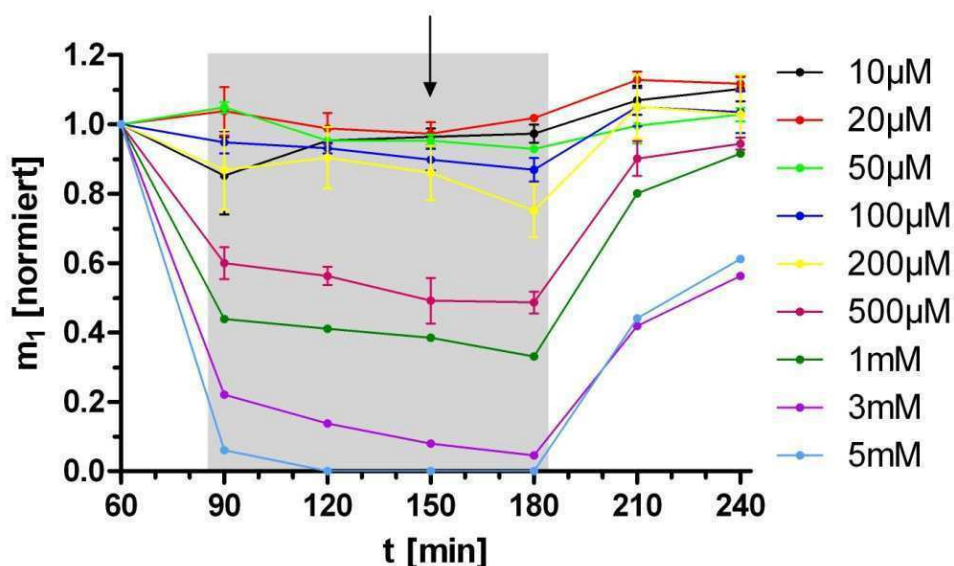


Abbildung 3.73: Graphische Darstellung der maximalen positiven Steigung (m_1) des 1. Peaks unter Einwirkung von unterschiedlicher Methylphenidat-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

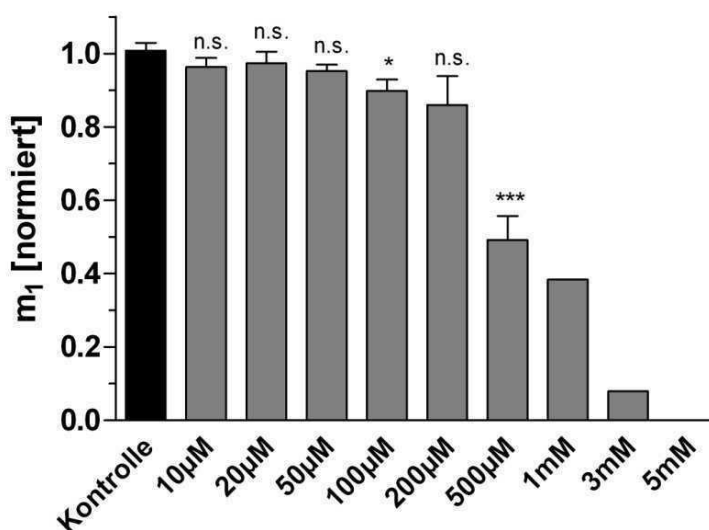


Abbildung 3.74: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung (m_1) zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$; $n=2$ für $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM , 3mM und 5mM). Für die Messungen von 1mM bzw. 3mM konnte aufgrund $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 5mM Methylphenidat konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.6.2.3. Maximale negative Steigung des 1.Peaks

Die Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) über die Zeit ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Methylphenidat zeigt sich eine deutliche Abnahme der negativen Steigung. Bei einer Konzentration von beispielsweise $500\mu\text{M}$ nimmt die Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ um 49% ab, bei einer Konzentration von 3mM sogar um 97,1%.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.76 zeigt die Änderung der maximalen negativen Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Erst ab einer Konzentration von $500\mu\text{M}$ kann eine signifikante Abnahme festgestellt werden.

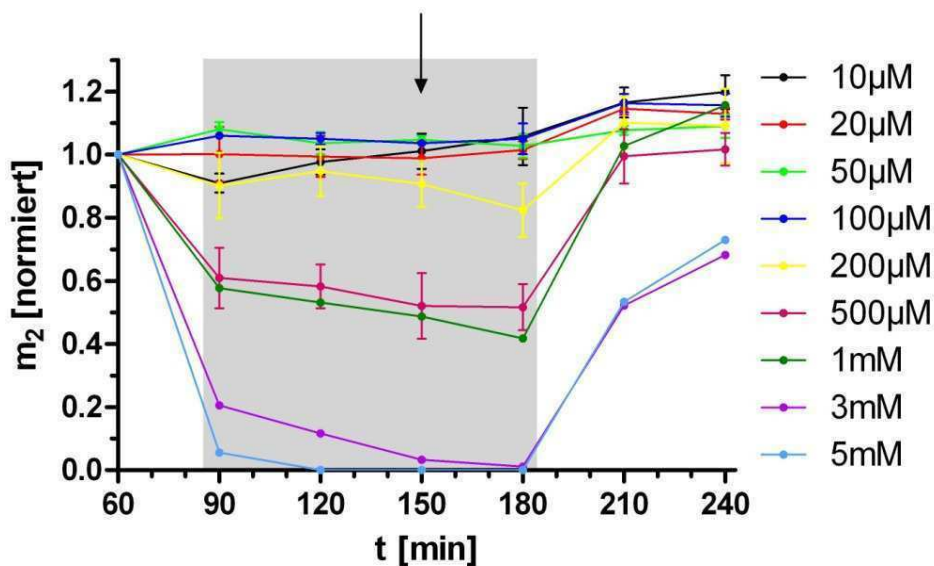


Abbildung 3.75: Graphische Darstellung der maximalen negativen Steigung (m_2) des 1.Peaks unter Einwirkung unterschiedlicher Methylphenidat-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Zeitabschnitt unter Methylphenidat-Einwirkung dar. Der Pfeil markiert die Messungen, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurden.

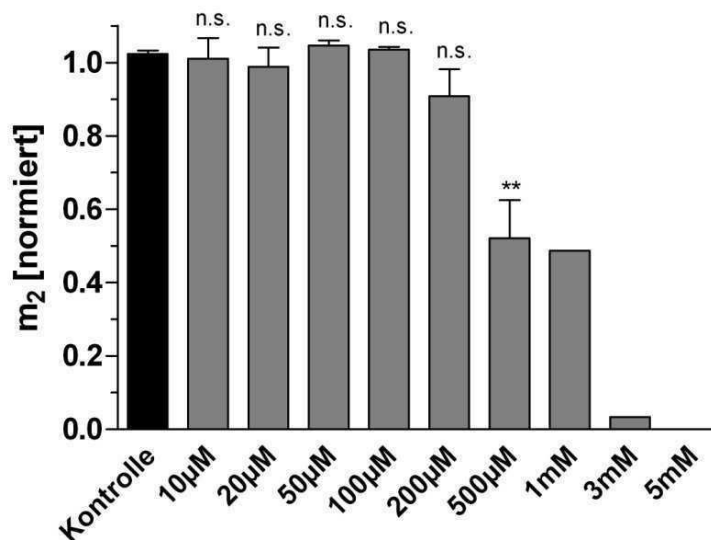


Abbildung 3.76: Vergleich der Änderung der maximalen negativen Steigung (m_2) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ ($n=3$ für $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$; $n=2$ für $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM , 3mM und 5mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 3mM konnte aufgrund $n=1$ kein t -Test durchgeführt werden. Unter Einfluss von 5mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD -Welle mehr ausgelöst werden.

3.6.2.4. Fläche unterhalb des 2.Peaks

Nachfolgend ist die Änderung der Fläche unterhalb des 2.Peaks (A) dargestellt. Mit zunehmender Konzentration von Methylphenidat kann eine stetige Abnahme der Fläche beobachtet werden.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.78 stellt die Änderung der Fläche zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ für alle gemessenen Konzentrationen dar. Schon ab einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ ist eine signifikante Abnahme festzustellen.

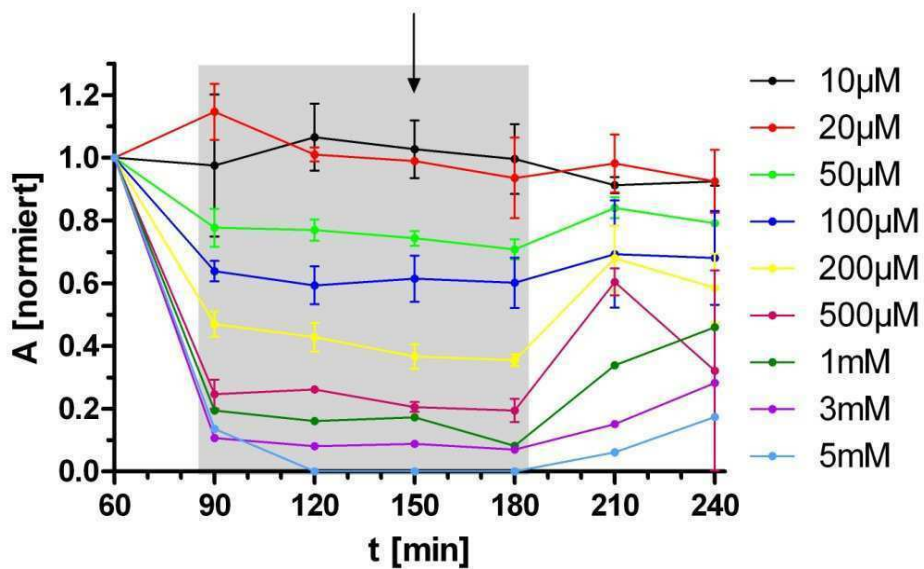


Abbildung 3.77: Graphische Darstellung der Änderung der Fläche (A) unter Einfluss unterschiedlicher Methylphenidat-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich spiegelt den Zeitabschnitt unter Einwirkung von Methylphenidat wider. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde.

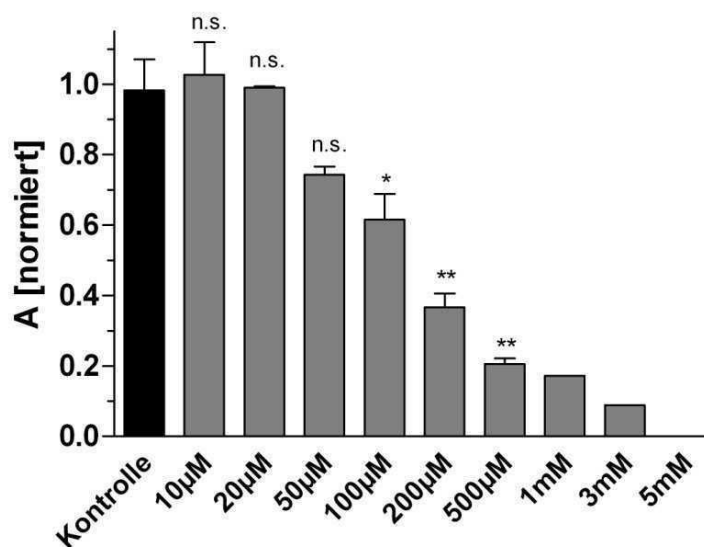


Abbildung 3.78: Vergleich der Änderung der Fläche (A) zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$ für $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$; $n=2$ für $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$; $n=1$ für 1mM , 3mM und 5mM). Für die Messungen unter Einfluss von 1mM bzw. 3mM Methylphenidat konnte aufgrund von $n=1$ kein t-Test durchgeführt werden. Bei einer Konzentration von 5mM konnte zu diesem Zeitpunkt keine SD-Welle mehr ausgelöst werden.

3.6.3. Latenz

Die Änderung der Latenz, der Zeitspanne zwischen Stimulus und Beginn der Wellenausbreitung, wurde für die Methylphenidat-Konzentration bestimmt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Für Methylphenidat wurde somit eine Konzentration von 3mM gewählt.

Der Auswertung liegen die angefertigten Stacks aus den einzelnen Videoaufzeichnungen zugrunde. Im Anhang findet sich je ein Beispielstack für die Messung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

Wie in den folgenden Graphen deutlich zu erkennen ist, nimmt die Latenz durch die Zugabe von Methylphenidat mit fortschreitender Einwirkzeit zu. Die Erregbarkeit des neuronalen Gewebes nimmt also ab.

Das Balkendiagramm zeigt den Vergleich der Latenz der Kontrollmessungen zu den Substanzmessungen zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ auf. Die Zunahme der Latenz beträgt zu diesem Zeitpunkt 118,9%.

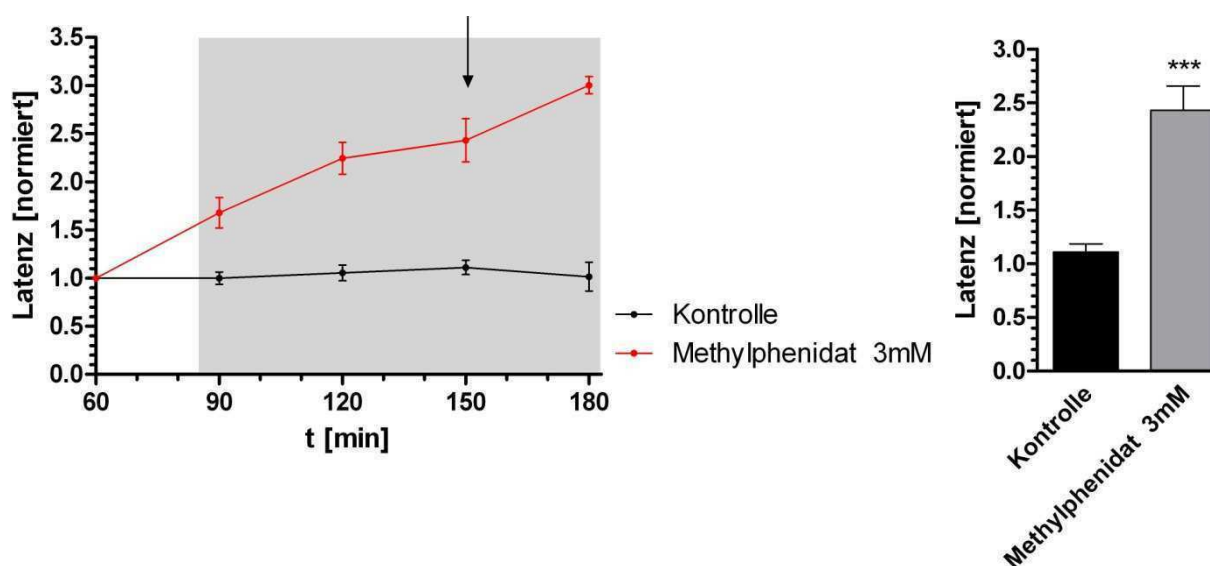


Abbildung 3.79: Links: Zeitliche Änderung der Latenz unter Standardbedingungen (Kontrolle) und unter Methylphenidat-Einfluss. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinfluss wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Latenz zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=5$; Mean 1,11 / SEM \pm 0,074; Methylphenidat 3mM: $n=3$; Mean 2,43 / SEM \pm 0,224).

3.6.4. Elektrisches Potential

Die Änderung der einzelnen Parameter des elektrischen Potentials wurde ebenfalls für die Methylphenidat-Konzentration durchgeführt, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag.

Den ausgewerteten Parametern liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien zugrunde. Im Anhang findet sich eine Beispielkurve für die Messung zum Zeitpunkt $t=150$ sowie die dazugehörige Kontrolle.

3.6.4.1. Maximale Amplitude des elektrischen Signals

In der folgenden Abbildung ist die Änderung der maximalen Amplitude über die Zeit dargestellt. Mit zunehmender Einwirkzeit von Methylphenidat kann eine deutliche Abnahme der Amplitude beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen Amplitude zum Zeitpunkt $t=150$ min dar. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Abnahme von 55,8% beobachtet werden.

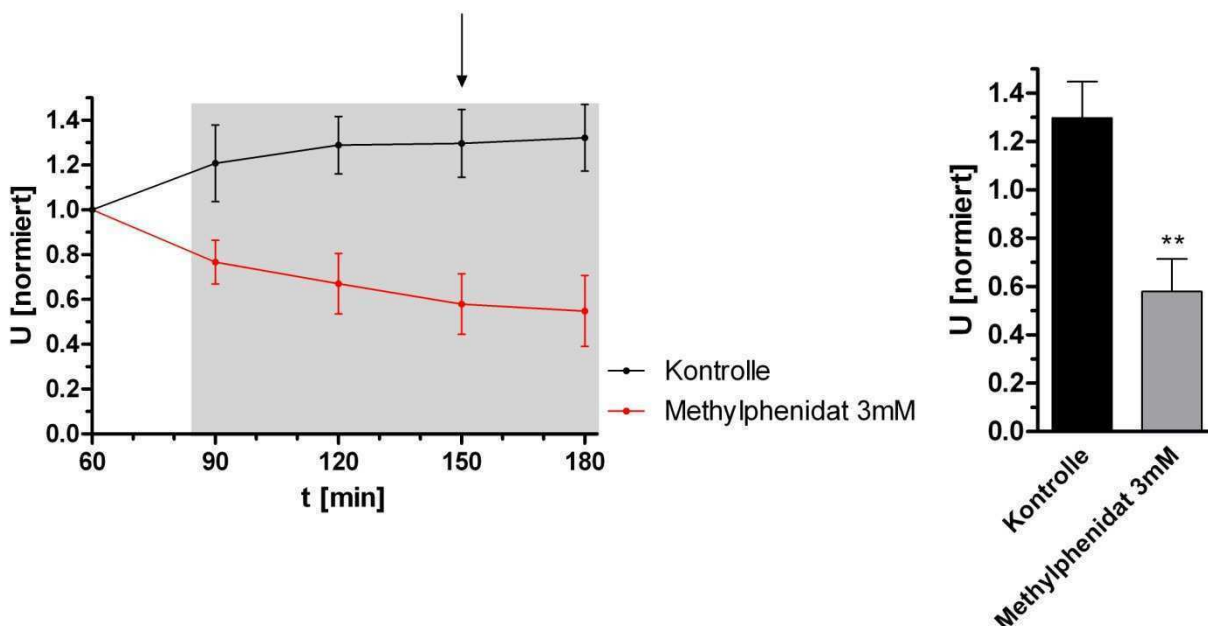


Abbildung 3.80: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen Amplitude unter Einwirkung von 3mM Methylphenidat. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen Amplitude Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=7$; Mean 1,29 / SEM \pm 0,151; Methylphenidat 3mM: $n=5$; Mean 0,57 / SEM \pm 0,135).

3.6.4.2. Maximale positive Steigung des elektrischen Signals

Nachfolgend wird die Änderung der maximalen positiven Steigung (m) über der Zeit aufgezeigt. Mit zunehmender Einwirkzeit kann eine deutliche Abnahme der Steigung beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die signifikante Abnahme 57,8%.

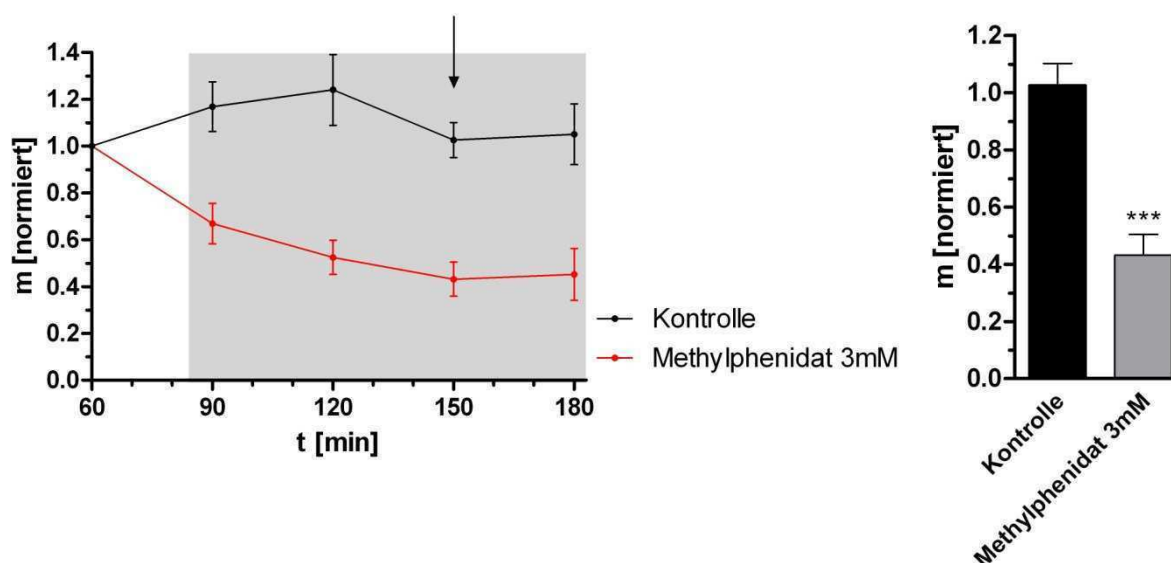


Abbildung 3.81: Links: Graphische Darstellung der Änderung der maximalen positiven Steigung (m) unter Einwirkung von 3mM Methylphenidat. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der maximalen positiven Steigung zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,03 / SEM $\pm 0,074$; Methylphenidat 3mM: $n=5$; Mean 0,43 / SEM $\pm 0,072$).

3.6.4.3. Ratenkonstante k des elektrischen Signals

Die Änderung der Ratenkonstante k über der Zeit wird in der folgenden Abbildung dargestellt. Mit zunehmender Einwirkzeit kann eine deutliche Zunahme der Ratenkonstante beobachtet werden.

Das Balkendiagramm stellt die Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$ dar. Zu diesem Zeitpunkt kann eine signifikante Zunahme von 156,5% festgestellt werden.

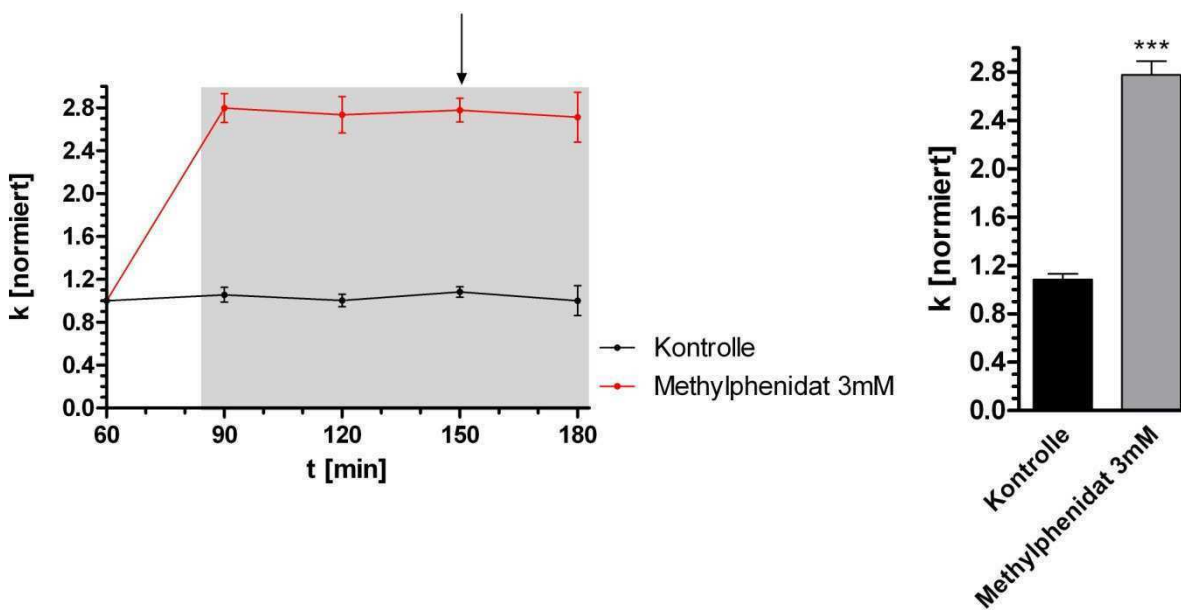


Abbildung 3.82: Links: Graphische Darstellung der Änderung der Ratenkonstante k unter Einwirkung von 3mM Methylphenidat. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der grau hinterlegte Bereich gibt den Zeitabschnitt unter Methylphenidateinwirkung wieder. Der Pfeil markiert die Messung, welche für den Vergleich im folgenden Balkendiagramm ausgewählt wurde. Rechts: Vergleich der Änderung der Ratenkonstante zum Zeitpunkt $t=150$ min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (Kontrolle: $n=6$; Mean 1,08 / SEM $\pm 0,049$; Methylphenidat 3mM: $n=5$; Mean 2,78 / SEM $\pm 0,110$).

3.6.5. Neuroprotektion

Die neuroprotektive Wirkung von Methylphenidat wurde wiederum anhand der Methylphenidat-Konzentration nachgewiesen, welche nach den Geschwindigkeitsmessungen am nächsten der ED_{50} lag. Bei Methylphenidat entsprach dies einer Konzentration von 3mM.

Der Auswertung liegen die aufgezeichneten ASCII-Dateien des Photomultipliers zugrunde. Im Anhang findet sich für die aufgeführten Messungen je eine Beispielkurve.

Wie in der folgenden Abbildung sehr gut zu erkennen ist, wirkt Methylphenidat den neurotoxischen Eigenschaften von NMDA entgegen. Durch Zugabe von 3mM Methylphenidat sinkt der Quotient aus der maximalen negativen und maximalen positiven Steigung um nur 3,99% im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

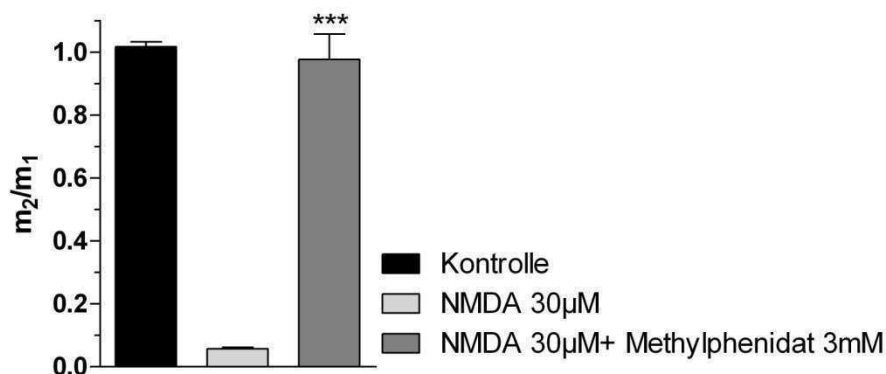


Abbildung 3.83: Darstellung der Änderung des Quotienten der maximalen negativen (m_2) und maximalen positiven Steigung (m_1) des IOS unter Zugabe von 30µM NMDA ($n=11$; Mean 0,06 / SEM ±0,005), 30 µM NMDA und 3mM Methylphenidat ($n=8$; Mean 0,98 / SEM ±0,081). Im Vergleich dazu eine Messung unter Standardbedingungen (Kontrolle, $n=14$; Mean 1,02 / SEM ±0,016).

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Tabelle dient zur Übersicht der Änderung aller wichtigen Parameter zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. Zusammenfassend wird angegeben, wie und in welchem Maße die einzelnen Substanzen die aufgeführten Parameter beeinflussen:

	v	m_1	m_2	Latenz	m	k	Neuro- protektion
Nikotin (500µM)	-25%	-32%	-22,6%	+91,9%	-49%	+1%	+
Koffein (10mM)	-24%	-40%	-34,4%	+289,2%	-17,6%	+81,5%	++
Kokain (1mM)	-30%	-39%	-30,4%	+109,9%	-48%	+50,9%	++
Amphetamin (2mM)	-26%	-62%	-50%	(+7,2%)	-75,5%	+158,3%	+++
Methylphenidat (3mM)	-42%	-93%	-97,1%	+118,9%	-57,8%	+156,5%	++

Abbildung 3.84: Darstellung der Wirkung der untersuchten Substanzen auf die unterschiedlichen Parameter: v= Ausbreitungsgeschwindigkeit, m_1 = maximale positive Steigung im IOS, m_2 = maximale negative Steigung im IOS, m= maximale positive Steigung des elektrischen Signals, k= Ratenkonstante des elektrischen Signals (negative Prozentangaben zeigen eine Abnahme auf, positive Prozentangaben eine Zunahme; + bis +++ verweisen auf eine gute bis sehr gute neuroprotektive Wirkung).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss exzitatorischer Pharmaka auf die verschiedenen Parameter der retinalen Spreading Depression untersucht. Es sollte aufgezeigt werden, inwiefern erregende Substanzen auf die Parameter der retinalen Spreading Depression und somit auf neuronales Gewebe wirken, da eine direkte Extrapolation von Einzelzellmessungen auf das Verhalten von komplexem Gewebe nur teilweise möglich ist. Durch die ausschließliche Verwendung exzitatorischer Substanzen gelingt, durch ihre teils sehr ähnlichen, teils unterschiedlichen Wirkmechanismen, eine ausführliche Beschreibung ihrer Wirkung.

4.1. Nikotin

Nikotin ist der prototypische Agonist für neuronale nikotinsche Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), der unselektiv auf die unterschiedlichen Untertypen wirkt. Bis heute wurde es ausgiebig in der experimentellen und klinischen Forschung verwendet. Die nACh-Rezeptoren gehören zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, die für Kationen durchlässig sind. Sie sind im gesamten Nervensystem zu finden. Nikotinsche Acetylcholin-Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten, deren Verteilung im ZNS unterschiedlich ist. So finden sich beispielsweise die $\alpha 4$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten in allen Teilen des ZNS (*Wada et al., 1989*), während die $\alpha 7$ -Untereinheit nur in wenigen Schichten des zerebralen Kortex, im Hypothalamus, im Hippocampus und in manchen Stammhirnzentren zu finden ist (*Seguela et al., 1993*). Die δ -, ϵ - (bzw. γ -) Untereinheiten finden sich nur in der muskulären Endplatte (*Mishina et al., 1986*).

Für die nikotinschen Acetylcholin-Rezeptoren konnten 3 funktionelle Zustände aufgezeigt werden: geschlossen, offen und desensitisiert. Bereits durch eine kurze Exposition von Acetylcholin oder z.B. auch Nikotin kommt es zu einer Desensitisierung der Rezeptoren, was einer Unempfindlichkeit für Agonisten bei geschlossenem Kanal gleichkommt (*u.a. Dani and Bertrand, 2007*).

In der Retina ist Acetylcholin schon lange als Neurotransmitter bekannt (*Neal, 1976*). Hierbei finden sich die nikotinischen AChRs hauptsächlich in den Synapsen zwischen Amakrinen-Amakrinen und Amakrinen-Bipolaren Zellen (*Pourcho, 1979*). Ebenso wurden nACh-Rezeptoren in der Hühnerretina nachgewiesen (z.B. *Morgan and Mundy, 1982*), hier vor allem in der Inneren-Körner-Schicht (INL) und der Inneren-Plexiformen-Schicht (IPL) (*Keyser et al., 1988*). Durch Nikotin konnte im ZNS eine erhöhte exzitatorische synaptische Übertragung aufgezeigt werden (*Ikeda and Sheardown, 1982*), die eine vermehrte Ausschüttung exzitatorischer Transmitter auslöst (*Khan et al., 1996*), zu denen Dopamin, Glutamat, Noradrenalin und auch Serotonin gehören (*Wonnacott et al., 2006; Nashmi and Lester, 2006*).

Da die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SD-Welle sehr sensibel auf die Applikation von Substanzen reagiert, wurde zu Beginn die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen Nikotin auf sich ausbreitende Wellen untersucht, und anhand dieser Ergebnisse die Größenordnungen der wirksamen Konzentrationen an der Retina festgestellt. Durch diese Daten wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Dabei konnte eine komplette Hemmung neuronaler Aktivität durch hohe Dosen Nikotin aufgezeigt werden, da sich ab einer Konzentration von 10mM Nikotin keine Welle mehr auslösen ließ. Diese Wirkung ist reversibel. Da jedoch die Ausbreitungsgeschwindigkeit keine direkten Rückschlüsse auf die möglichen Wirkmechanismen der untersuchten Substanz zulässt, müssen die Parameter des IOS, des elektrischen Signals und die Latenz für eine nähere Bestimmung herangezogen werden.

Bei der Untersuchung der Latenz zeigt sich eine eindeutige Verlängerung, was durch die Einwirkzeit von 30min auf eine Desensitisierung der betroffenen nACh-Rezeptoren hinweist. Da sich zu Beginn der Applikation höherer Nikotinkonzentrationen eine spontane Welle bildet, die Erregung des neuronalen Gewebes also kurzfristig stark erhöht wird (*Sheardown, 1997*), nach einer kurzen Einwirkphase von Nikotin sich die Latenz jedoch stark verlängert, deutet alles auf eine Desensitisierung der nACh-Rezeptoren und somit auf eine Reduktion neuronaler Erregung hin. Im Gegensatz dazu stehen frühere Ergebnisse unter der Zugabe von Chinolinsäure. Chinolinsäure, ein Glutamat-Rezeptor-Agonist, erhöht ebenfalls die Erregbarkeit des Gewebes, aber durch eine fehlende Desensitisierung der Rezeptoren wird das Gewebe zu einer vermehrten Bildung spontaner Wellen angeregt (*Piffel, 2005*).

Wirft man einen Blick auf die Entwicklung der maximalen positiven Steigung des intrinsischen optischen Signals (IOS), kann eine eindeutige Wirkung von Nikotin auf die Leitfähigkeit der betroffenen Membranen an der Wellenfront bestätigt werden, da die maximale positive Steigung im Gegensatz zur maximalen negativen Steigung bei aufsteigender Nikotinkonzentration eine stärkere Abnahme zeigt. Nach längerer Exposition von Nikotin desensibilisieren die nikotinischen ACh-Rezeptoren. Dadurch kommt es zu einer reduzierten neuronalen Aktivität mit einer verringerten Ausschüttung exzitatorischer Transmitter und einer daraus resultierenden geringeren Öffnung von Ionenkanälen der postsynaptischen Membran. Durch die verringerte Leitfähigkeit der Membranen strömen weniger Ionen und daraus folgend weniger Wasser durch die Membran, was in einer verringerten Amplitude des 1. Peaks des IOS aufgezeigt wird.

Beim Blick auf die Veränderung der Fläche unterhalb des 2. Peaks kann eine stetige Abnahme derselben mit steigender Nikotinkonzentration beobachtet werden. Wenn bei der Depolarisation an der Wellenfront weniger Ionen über die Membran transportiert werden, sind ATPasen weniger aktiv und es wird weniger ATP verbraucht. Demzufolge muss weniger Glukose und Sauerstoff zur Regeneration des ATPs in die Zellen transportiert werden (*Dahlem, 2001*).

Beim Blick auf das elektrische Signal zeigt sich bei einer Konzentration von 500 μM Nikotin eine eindeutige Auswirkung auf die positive Steigung und damit auf die Leitfähigkeit der Membran. Im Vergleich mit den vorliegenden Daten des IOS der entsprechenden Konzentration stimmen die Ergebnisse überein.

Eine neuroprotektive Wirkung von Nikotin gegen den exzitotoxischen Zelltod, vermittelt durch die NMDA-Rezeptoren, konnte schon an kultivierten kortikalen Neuronen nachgewiesen werden (*Akaike et al., 1994*). Dabei zeigte sich, dass die neuroprotektive Wirkung durch die $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren (*Kaneko et al., 1997*) vermittelt wird. Später ließ sich auch eine Beteiligung der $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren aufzeigen (*Donnelly-Roberts et al., 1996*). Dabei zählen die $\alpha 7$ - und $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren zu den häufigsten nACh-Rezeptoren, die im ZNS zu finden sind (*Watson and Gridlestone, 1996*). Jedoch ist die mechanistische Wirkung der Neuroprotektion noch nicht aufgeklärt. Ebenfalls wird eine neuroprotektive Wirkung von Nikotin durch einen reduzierenden Einfluss auf die NO-Bildung diskutiert (*Shimohama et al., 2006*). Des Weiteren wird eine direkte Wirkung von Acetylcholin (sowie anderen Substanzen, die mit den nikotinischen oder

muskarinischen Rezeptoren interagieren) auf die, durch den NMDA-Rezeptor vermittelten, Ströme beschrieben (Flores-Hernandez, 2009). Jedoch ist eine generelle Protektion des Gewebes durch Hemmung der neuronalen Aktivität ebenfalls denkbar.

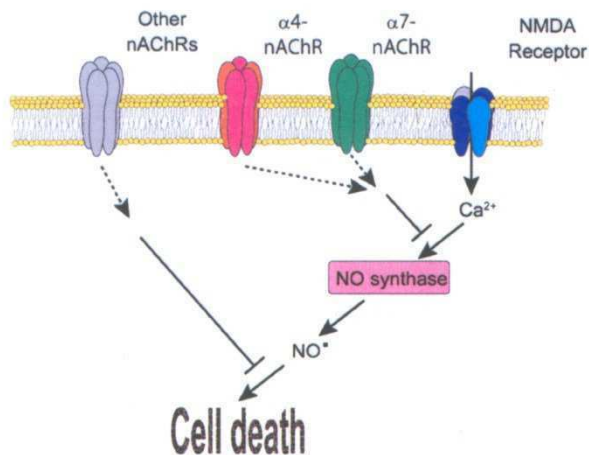


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der neuroprotektiven Wirkung von Nikotin über die Wirkung an nACh-Rezeptoren gegen die NMDA-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität (verändert nach Takada-Takatori et al., 2009).

NMDA-Rezeptoren wurden in der Retina in Horizontalzellen, Amakrinzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen nachgewiesen (Shen et al., 2006)

Eine neuroprotektive Wirkung von Nikotin an intaktem neuronalen Gewebe wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Durch die gleichzeitige Applikation von NMDA und Nikotin fällt bei aufsteigender Nikotinkonzentration eine gesteigerte neuroprotektive Wirkung auf, die vermutlich durch die universelle Bindung von Nikotin an $\alpha 7$ - und $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren begründet ist (Nakamizo et al., 2005). Durch die Zugabe von Hexamethonium, eigentlich einem spezifischen Antagonisten der nACh-Rezeptoren in autonomen Ganglien, wird diese neuroprotektive Wirkung teilweise wieder aufgehoben. Durch die Applikation von Methyllycaconitin (MLA), einem Antagonisten der nACh-Rezeptoren, der jedoch spezifisch an der $\alpha 7$ -Untereinheit bindet, fällt die minimal erhöhte neuroprotektive Wirkung im Gegensatz zur alleinigen Applikation von Nikotin auf. Man war der Auffassung, MLA blockiere die neuroprotektive Wirkung von Nikotin (Prendergast et al., 2001), dies wurde jedoch an kortikalen Neuronenkulturen widerlegt; mittlerweile wird eine neuroprotektive Wirkung von MLA selbst diskutiert (Martin et al., 2004). Wirft man jedoch einen Blick auf die Wirkung von MLA in Kombination mit NMDA, so kann eine alleinige, gute neuroprotektive Wirkung von MLA nicht bestätigt werden. Eine blockierende Wirkung von MLA auf die neuroprotektive Wirkung von Nikotin (Jonnala and Buccafusco, 2001) kann jedoch ebenfalls nicht bekräftigt werden. Dem allem steht jedoch eine mögliche geringe Affinität von MLA zu den vorhandenen nACh-Rezeptoren entgegen, da

nachgewiesen wurde, dass MLA in unterschiedlichen Regionen des Nervensystems stark schwankende Affinitäten aufweist (*Yum et al., 1996*).

4.2. Koffein, Kokain, Amphetamin und Methylphenidat

Da Koffein durch die Inhibition der Adenosin-A₁-Rezeptoren indirekt zu einer erhöhten Ausschüttung von Transmittern führt, und Kokain, Amphetamin und Methylphenidat durch die Wiederaufnahmehemmung und Ausschüttung von Dopamin, Serotonin und Noradrenalin ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration von Transmittern im synaptischen Spalt führen, werden sie im folgenden Abschnitt gemeinsam besprochen:

Die für die Wirkung von Koffein benötigten Adenosin-A₁-Rezeptoren wurden in der Retina nachgewiesen (*Paes-De-Carvalho, 2002*), und zudem wird Adenosin auch als Transmitter in der Retina diskutiert (*Blazynski and Perez, 1991*). Ebenso wurden Dopamin (*Frederick et al., 1982*), Serotonin (*Osborne et al., 1981*) und Noradrenalin (*Osborne, 1981*) als Transmitter in der Retina nachgewiesen. Dabei finden sich Dopamin und Serotonin vor allem in den Amakrinzellen der Retina (*Pourcho, 1982; Vaney, 1986; Wässle and Chun, 1988*), also in der IPL (inneren plexiformen Schicht), der relevanten Schicht für die retinale Spreading Depression. Über Noradrenalin liegen jedoch bisweilen noch wenige Daten vor.

Serotonin ist in der Retina in sehr geringen Mengen vorhanden (*Redburn, 1984*) und war lange nicht nachzuweisen (*Häggendahl and Malmfors, 1965*). Inzwischen wurden einige Serotonin-Rezeptoren in der Retina identifiziert. Dazu gehören die 5HT_{1A}-, 5HT₇- (*Pootanakit and Brunken, 2000*), 5HT₃- (*Pootanakit and Brunken, 2001*), 5HT₁- und die 5HT₂-Rezeptoren (*Brunken, 1993*). Dabei öffnet beispielsweise der 5HT₁-Rezeptor über eine G-Protein (G_i) gekoppelte Second-Messenger Kaskade (metabotrop) Kationenkanäle, während der 5HT₃-Rezeptor ein ionotroper Kationenkanal ist. Noradrenalin kommt ebenfalls nur in sehr geringen Mengen in der Retina vor (*Osborne, 1981; Jaffe et al., 1991*). Hierzu wurde inzwischen der α_2 -Rezeptor nachgewiesen (*Osborne, 1982*), der über eine G-Protein (G_i) gekoppelte Second-Messenger Kaskade Kationenkanäle öffnet. Dopamin hingegen gilt als einer der wichtigsten Transmitter in der Retina (*Djamgoz, 1992*). Hierfür wurden inzwischen der D₁- (*Vanderheyden et al., 1986*), D₂- (*Nguyen-Legros et al., 1999; Hayashida et al., 2009*), D₃- (*Veruki, 1997*) und der D₄-Rezeptor (*Zawilska and Nowak, 1997*) in der Retina

identifiziert. Dabei öffnen die D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren wiederum über eine G-Protein (G_i) gekoppelte Second Messenger Kaskade Kationenkanäle.

Bei der Untersuchung von Koffein, Kokain, Amphetamin und Methylphenidat wurde gleichermaßen, anhand der Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit durch unterschiedliche Substanz-Konzentrationen, die Größenordnung der wirksamen Konzentrationen bestimmt. Hierbei fällt auf, dass im Falle von Koffein sehr viel höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um eine signifikante Änderung zu erzielen. Die Konzentrationsverschiebung im Gegensatz zu den verbleibenden drei Substanzen liegt ca. beim Faktor 30. Allen gemein ist der abrupte Wechsel zwischen einer verminderten Ausbreitungsgeschwindigkeit und einer Unterdrückung jeglicher neuronalen Aktivität.

Ebenfalls reduziert sich bei allen Substanzen die maximale positive Steigung des intrinsischen optischen Signals. Die Leitfähigkeit der betroffenen Membranen wird also deutlich herabgesetzt. Eine mögliche Erklärung liegt hierbei in den, durch die im synaptischen Spalt verbleibenden Transmitter, geöffneten Kationenkanäle und einer dadurch verursachten leichten Hyperpolarisation des Gewebes. Da durch die Transmitter u.a. auch Kationenkanäle, insbesondere für Kalium, aktiviert werden, kann durch das längere Verweilen der Transmitter im synaptischen Spalt, und die dadurch längere Aktivierung der Kationenkanäle eine langsame Hyperpolarisation des Gewebes auftreten. Dadurch werden an der Wellenfront einer SD-Welle die Membranen nicht mehr so stark depolarisiert, und es kommt zu einer geringeren Offenwahrscheinlichkeit spannungsgesteuerter Kaliumkanäle. Da spannungsgesteuerte Kaliumkanäle eine große Bandbreite der benötigten Spannung (Schwellenwert) haben, was sich in der geringeren Steigung ihrer Strom-Spannungskennlinien widerspiegelt (*u.a. Mathie et al., 2003*), ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie bei geringerer Depolarisation öffnen, kleiner. Bei Messungen an Neuronen im Neokortex wurden K⁺-Kanäle mit benötigten Spannungen (Schwellenwert) zwischen -45mV und -20mV gefunden (*Kang et al., 2000*). Bei Messungen von Amakrinzellen in der Retina wurden ebenfalls K⁺-Kanäle mit einem hohen Schwellenwert von -20mV gefunden (*Ozaita et al., 2004*). Wenn sich also durch die geringere Depolarisation der Membran weniger K⁺-Kanäle öffnen, ist somit die Leitfähigkeit der Membran reduziert und es können weniger Kalium-Ionen aus der Zelle strömen, was wiederum zu einem geringeren Einstrom von Natrium-, Chlorid- und Calcium-Ionen führt. Dadurch strömt weniger Wasser in die Zelle, was zu einer verminderten Amplitude im IOS führt. Vergleicht man diese Werte mit den

vorliegenden Ergebnissen der elektrischen Messungen der gleichen Konzentration, so stimmen diese überein. Auch die Fläche des 2. Peak des intrinsischen optischen Signals ist durch die verminderte Leitfähigkeit, und somit geringerer Aktivität der ATPasen und einem daraus resultierenden geringeren Bedarf von Glukose und Sauerstoff kleiner.

Die Verlängerung der Latenz unter Einfluss der einzelnen Substanzen spricht für eine verminderte Erregbarkeit des Gewebes. Dies unterstreicht wiederum die Hypothese einer leichten Hyperpolarisation. Dadurch verlängert sich die Zeitspanne bis die benötigte Depolarisation der Membran, also der Schwellenwert zu einer SD-Welle, erreicht wird.

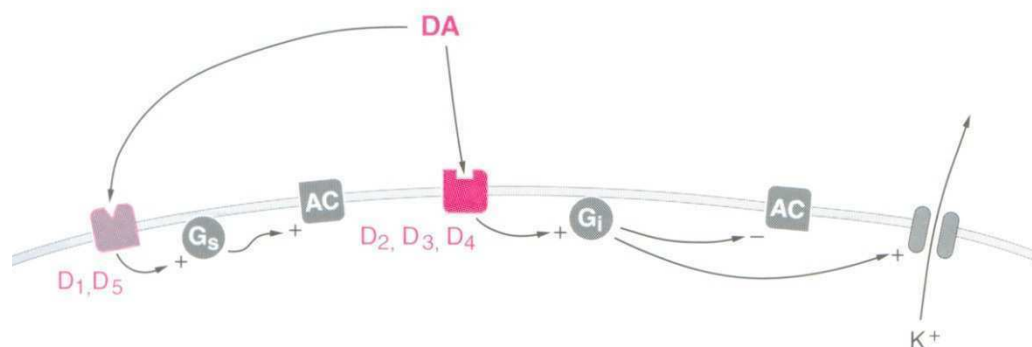
Auch für Koffein, Kokain, Ritalin und Methylphenidat konnte eine neuroprotektive Wirkung gegen den exzitotoxischen Zelltod, vermittelt durch die NMDA-Rezeptoren, nachgewiesen werden. Bei allen Substanzen konnte ein Anstieg des ermittelten Quotienten aus maximaler negativer und maximaler positiver Steigung festgestellt werden. Da die untersuchten Substanzen alle zu einer vermehrten Ausschüttung von Dopamin, Serotonin und Noradrenalin führen, liegt die Vermutung nahe, dass die neuroprotektive Wirkung dieser Substanzen durch die ausgeschütteten Neurotransmitter vermittelt wird.

Für Dopamin konnte eine neuroprotektive Wirkung gegen eine durch Glutamat induzierte Neurodegeneration durch die Aktivierung der D₂-Rezeptoren (*Bozzi et al., 2000*) aufgezeigt werden. Auch für Serotonin konnte eine neuroprotektive Wirkung gegen den NMDA vermittelten exzitotoxischen Zelltod nachgewiesen werden. Hier beruht die Wirkung vermutlich auf der Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors und der damit verbundenen neuronalen Hyperpolarisation (*Oosterink et al., 1998*). Eine durch Serotonin vermittelte Modulation des NMDA-Rezeptor induzierten Ca²⁺-Einstroms wird ebenso diskutiert (*Strosznajder et al., 1996*). Eine Aktivierung der α₂-Adreno-Rezeptoren durch Noradrenalin zeigt ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung. Auch hier vermutet man eine rezeptorvermittelte Hyperpolarisation, und zusätzlich eine Inhibition von spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanälen, die bei NMDA-induzierter Depolarisation öffnen (*Zhang and Kimelberg, 2005; Weber et al., 2007*). Jedoch wird auch durch Antagonisten der α₂-Adreno-Rezeptoren eine neuroprotektive Wirkung vermutet (*Martel et al., 1998*). Hier ist die Wirkung jedoch ebenfalls noch unbekannt.

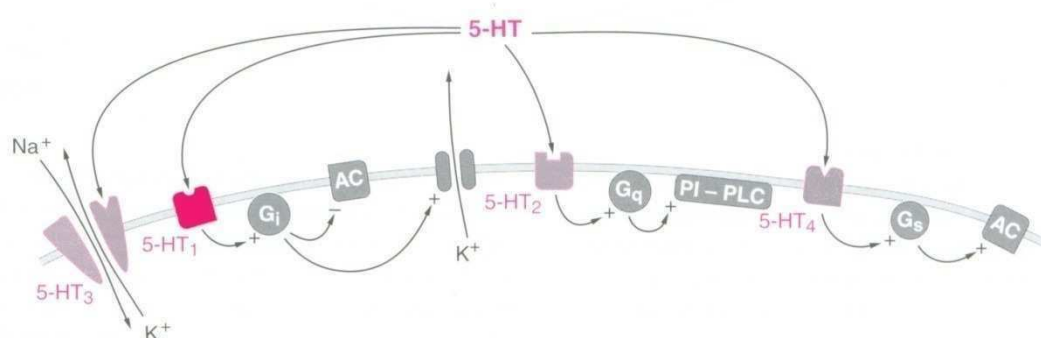
Obwohl durch die verschiedenen aktivierten Rezeptoren eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden konnte, liegt eine endgültige mechanistische

Erklärung dafür noch nicht vor. Jedoch scheint eine, durch die aktivierten Kationenkanäle hervorgerufene, Hyperpolarisation und eine somit verminderte Erregbarkeit des Gewebes sehr wahrscheinlich.

a)



b)



c)

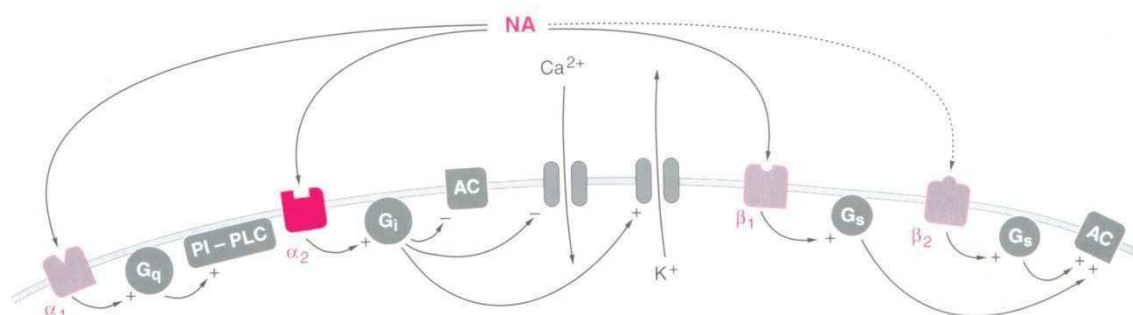


Abbildung 4.2: a) Wirkung von Dopamin (DA) auf den D_2 -Rezeptor. Durch seine Aktivierung öffnen sich über G-Proteine der G_i -Familie K^+ -Kanäle. b) Wirkung von Serotonin (5-HT) auf den $5-HT_1$ -Rezeptor. Durch die Aktivierung dieses Rezeptors öffnen sich über G_i -Proteine K^+ -Kanäle. c) Wirkung von Noradrenalin (NA) auf den α_2 -Rezeptor. Durch seine Aktivierung öffnen sich ebenfalls K^+ -Kanäle (verändert nach „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1996).

Bei Betrachtung aller Ergebnisse zeigt sich, dass ein Vergleich des optischen intrinsischen Signals und des elektrischen Signals sehr gut durchgeführt werden kann, da sich Veränderungen des elektrischen Signals gleichwohl im intrinsischen optischen Signal zeigen. Jedoch ist das IOS sehr viel einfacher und mit weniger Aufwand zu gewinnen.

Ebenso wird deutlich, dass eine klare Trennung zwischen „exzitatorisch“ im psychologischen Sinne und „exzitatorisch“ im physiologischen Sinne gemacht werden muss. Da die untersuchten Substanzen psychologisch als „exzitatorisch“ beschrieben werden, sich entlang der Messungen jedoch physiologisch eine „modulatorische“ Wirkung aufzeigen ließ, ist es wichtig, eine sehr genaue Beschreibung ihrer Wirkung darzulegen.

4.3. Ausblick

Um eine endgültige Bestätigung zur Hypothese der Hyperpolarisation der Zellen durch die längerfristige Exposition der ausgeschütteten Transmittern zu erhalten, stehen Messungen des Potentials unter Substanzeinwirkung ohne Auslösen einer SD Welle an. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so müsste sich durch die Hyperpolarisation die Grundlinie des Potentials über die Zeit langsam ins Positive verschieben.

Weiterhin wären Messungen der Dispersionsrelation anhand von Doppel-Stimulus-Experimenten (siehe *Brand et al., 1997*) zur Entwicklung der Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Substanzeinwirkung möglich. Dadurch wären genauere Schlussfolgerungen über die Ausbreitung von SD-Wellen durch den Vergleich der Ausbreitung in refraktärem und erholtem Gewebe möglich. Jedoch ist der dafür benötigte Aufwand beträchtlich.

Ebenso wären Messungen inhibitorischer Substanzen am Modell der retinalen Spreading Depression sinnvoll, um deren Auswirkung auf die hier ausgewerteten Parameter festzustellen. Da Barbiturate und Benzodiazepine bisher die einzigen Substanzklassen sind, die die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle erhöhen (*Wiedemann et al., 1996; Guedes and Cavaleiro, 1997*), und beide über GABA-Rezeptoren wirken, stellt sich die Frage, ob alle inhibitorischen Substanzen oder nur solche, die direkt auf GABA-Rezeptoren wirken, eine Beschleunigung der Ausbreitungsgeschwindigkeit bewirken. Da die Aktivierung der GABA-Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt, stellt sich weiterhin die Frage,

ob jede Hyperpolarisation zur Beschleunigung führt. Dies stünde jedoch im Widerspruch zur Hyperpolarisation durch eine langfristige Exposition von Transmittern.

Da die Retina nach neuesten Erkenntnissen sich in einem Zustand der optimalen Erregung befindet (*Dahlem, 2009*), wären desweiteren Messungen denkbar, die die Retina durch Zugabe von Calcium oder anderen Pharmaka zuerst in einen Zustand geringerer Erregbarkeit versetzen. Dadurch erhielte man die volle Bandbreite der möglichen Reaktionen.

5. Zusammenfassung / Summary

5.1. Zusammenfassung

Das Phänomen der Spreading Depression (SD) ist eine sich wellenförmig ausbreitende Unterdrückung neuronaler Aktivität, die in der grauen Substanz des Zentralen Nervensystems auftritt. Dies resultiert aus einer massiven Ionenumverteilung an der Zellmembran, bei der Kalium-Ionen aus der Zelle hinausströmen und Natrium-, Chlorid- und Calcium-Ionen in die Zelle hineinströmen. Dabei kommt es zu einer langsamen negativen Potentialverschiebung von bis zu 30mV. Das Phänomen der Spreading Depression lässt sich auch in der Retina, einem Teil des ZNS, hervorrufen, und kann sehr gut mit dem bloßen Auge beobachtet werden. Die Wirkung exzitatorischer Pharmaka auf neuronales Gewebe am Modell der retinalen Spreading Depression ist Thema der vorliegenden Arbeit.

Durch die Applikation der unterschiedlichen exzitatorischen Substanzen lässt sich eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie eine Reduktion der Leitfähigkeit der Membranen feststellen. Dies wird im Falle von Nikotin vermutlich durch die Desensibilisierung der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren verursacht. Bei Koffein, Kokain, Amphetamin und Methylphenidat liegt die Wirkung vermutlich in der, durch geöffnete Kationenkanäle begründeten, Hyperpolarisation des Gewebes. Die Latenz, ein Parameter für die Erregbarkeit des Gewebes, nimmt bei allen applizierten Substanzen zu. Dies ist vermutlich ebenso in der Desensibilisierung der nACh-Rezeptoren bzw. der Hyperpolarisation des Gewebes begründet.

Für alle Substanzen konnte eine neuroprotektive Wirkung gegen den, durch NMDA-Rezeptoren vermittelten, exzitotoxischen Zelltod nachgewiesen werden. Bei Nikotin geht man von einer Beteiligung der $\alpha 7$ - und $\alpha 4\beta 2$ -nACh-Rezeptoren aus, jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung ist jedoch in der reduzierten Erregbarkeit des neuronalen Gewebes durch die Desensibilisierung der nACh-Rezeptoren zu finden. Bei den übrigen untersuchten Substanzen liegt die Annahme einer neuroprotektiven

Wirkung durch die im synaptischen Spalt verbleibenden Transmitter nahe. Die daraus resultierende Hyperpolarisation hat eine geringere Erregbarkeit des neuronalen Gewebes zur Folge und verhindert somit sehr wahrscheinlich eine Übererregung des Gewebes.

5.2. Summary

The phenomenon of Spreading Depression (SD) is a suppression of neuronal activity, propagating wave-like in the grey matter. This results from a massive ion translocation where potassium ions pour into the cell and sodium-, chloride- and calcium ions pour out of the cell. At the same time there is also a slow negative potential shift up to 30mV. Spreading Depression also occurs in the retina, a part of the central nervous system and can easily be observed there with the naked eye. This dissertation describes the effects of excitatory pharmaceuticals on neuronal tissue, using retinal spreading depression as a model system.

By applying different excitatory substances, a reduction of the velocity and an inhibitory effect on the conductivity of the membranes can be observed. In the case of nicotine this may be due to the desensitization of the nicotinic ACh-receptors. For caffeine, cocaine, amphetamine and methylphenidate this effect may derive from the hyperpolarisation of the tissue through open cation channels. The latency, a parameter for the excitability of the tissue, increases with the application of any of the investigated substances. This is also caused by the desensitization of the nicotinic ACh-receptors or the hyperpolarisation of the tissue, respectively.

A neuroprotective effect reducing excitotoxic cell death induced by activation of NMDA-receptors was successfully verified for all substances. In the case of nicotine, the $\alpha 7$ - and $\alpha 4\beta 2$ -nACh-receptors are assumed to be involved. The basic mechanism however is still unknown. A possible explanation could be the reduced excitability of the tissue through desensitization of the nACh-receptors. In the case of the remaining substances, the abundance of transmitters in the synaptic cleft suggests a neuroprotective effect through hyperpolarisation. The resulting hyperpolarisation leads to a reduced excitability of the neuronal tissue and most likely prevents over-excitation.

6. Literatur

Akaike A., Tamura Y., Yokota T., Shimohama S. and Kimura J.: Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* 644(2): 181-187 (1994)

Aktories K., Förstermann U., Hofmann B., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9.Auflage. *Urban&Fischer Verlag* (2005)

Alkodon M., Pereira E.F., Wonnacott S. and Albuquerque E.X.: Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol.Pharmacol.* 41(4): 802-808 (1992)

Anderson T.R. and Andrew R.D.: Spreading depression: Imaging and blockade in the rat neocortical brain slice. *J.Neurophysiol.* 88: 2731-2725 (2002)

Arnaud M.J.: The pharmacology of caffeine. *Prog. Drug Res.* 31: 273-313 (1987)

Ba A.M., Guiou M., Pouratian N., Muthialu A., Rex D.E., Cannestra A.F., Chen J.W.Y. and Toga A.W.: Multiwavelength optical intrinsic signal imaging of cortical spreading depression. *J.Neurophysiol.* 88: 2726-2735 (2002)

Back T., Kohono K., Hossmann K.A.: Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation and electroencephalogram. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 14: 12-19 (1994)

Back T. Ginsberg M.D., Dietrich W.D., Watson B.D.: Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: Effect on infarct morphology. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 16: 202-212 (1996)

- Benowitz N.L.: Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. *Pharmacology & Toxicology* 72: 3-12 (1993)
- Blazynski C. and Perez M.T.R.: Neuroregulatory functions of adenosine in the retina. *Prog.ret.Res.* 11: 293-332 (1991)
- Bozzi Y., Vallone D. and Borelli E.: Neuroprotective role of Dopamine against hippocampal cell death. *J.Neurosci.* 20(22): 8643-8649 (2000)
- Brand S., Dahlem M.A., Fernandes de Lima V.M., Müller S.C. and Hanke W.: Dispersion relation of spreading depression waves in the chicken retina. *International Journal of Bifurcation and Chaos* 7(6): 1359-1365 (1997)
- Brunken W.J., Jin X.T. and Pis-Lopez A.M.: The Properties of the Serotonergic System in the Retina. *Prog.Ret.Res.* 12: 75-99 (1993)
- Bures J., Buresova O.: Cortical spreading depression as a memory disturbing factor. *J. Comp. Physiol.Psychol.* 56: 268-272 (1963)
- Bures J., Buresova O. and Krivanek J.: The mechanisms and application of Leao's spreading depression of electroencephalographic activity. *Academic Press, New York, USA* (1974)
- Bures J., Buresova O. and Krivanek J.: The meaning and significance of Leao's spreading depression. *Ann.Acad.Brasil.Cienc.* 56(4): 385-400 (1984)
- Bures J.: History of Experimental Spreading Depression. Migraine: Basic Mechanisms and Treatment. *Urban&Schwarzenberg*: 279-292 (1993)
- Choi, D.W.: Excitotoxic cell death. *J.Neurobiol.* 23(9): 1261-1276 (1992)
- Dahlem Y.: Lang anhaltende Prozesse der retinalen Spreading Depression: Untersuchung des intrinsischen optischen Signals. *Dissertation. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg* (2001)
- Dani J.A. and Bertrand D.: Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 47: 699-729 (2007)

- Djamgoz M.B. and Wagner H.J.: Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem.Int.* 20(2): 139-197 (1992)
- do Carmo R.J., Martins-Ferreira H.: Spreading depression of Leao probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. *An.Acad.brasil.Cienc.* 56(4): 401-421 (1984)
- do Carmo R.J.: Spreading Depression. *Experimental Brain Research, Series 23, Springer Verlag* (1992)
- Donnelly-Roberts D.L., Xue I.C., Arneric S.P. and Sullivan J.P.: n vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain res.* 719: 36-44 (1996)
- Dowling J.: The retina - An approachable part of the brain. *Harvard University Press, Cambridge, USA* (1987)
- Echlin F.: Spreading depression of electrical activity in the cerebral cortex following local trauma and its possible role in concussion. *Trans.Am.Neuro.Assoc.* 73: 199-202 (1948)
- Euler T., Hausselt S.E., Margolis D.J., Breuninger T., Castell X., Detwiler P.B. and Denk w.: Eyecup scope-optical recording of light stimulus-evoked fluorescence signals in the retina. *Pflügers Archiv* 457(6): 1393-1414 (2009)
- Estler C.-J., Schmidt H.: Pharmakologie und Toxikologie. 6.Auflage. *Schattauer Verlag* (2007)
- Farber N.B., Nemmers B. and Noguchi K.K.: Acute D2/D3 dopaminergic agonism but chronic D2/D3 antagonism prevents NMDA antagonist neurotoxicity. *Biol.Psychatry.* 60(6): 630-638 (2006)
- Fernandes de Lima V.M. and Hanke W.: Excitation waves in central grey matter: The retinal spreading depression. *Prog.Retinal and Eye Res.* 16: 657-690 (1997)
- Fernandes de Lima V.M., Goldermann M. and Hanke W.: The retinal spreading depression. *Shaker Verlag, Aachen* (1999)

- Fleckenstein A.E., Volz T.J., Riddle E.L., Gibb J.W. and Hanson G.R.: New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 47: 681-698 (2007)
- Flores-Hernandez J., Salgado H., De La Rosa V., Avila-Ruiz T., Torres-Ramirez O., Lopez-Lopez G. and Atzor M.: Cholinergic direct inhibition of *N*-methyl-D aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse* 63(4): 308-318 (2009)
- Forth W., Henschler D., Rummel W. and Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag (1996)
- Frederick J.M., Rayborn M.E., Laties A.M., Lam D.M.K., Hollyfield J.G.: Dopaminergic neurons in the human retina. *The Journal of Comparative Neurology* 210(1): 65-79 (1982)
- Gardner-Medwin, A.R.: A study of the mechanism by which potassium moves through brain tissue in the rat. *J.Physiol. (London)* 335: 353-374 (1983)
- Gorelova N.A. and Bures J.: Spiral waves of spreading depression in the isolated chicken retina. *J. Neurobiol.* 14(5): 353-363 (1983)
- Gouras P.: Spreading depression of activity in amphibian retina. *Am.J.Physiol.* 195: 28-32 (1958)
- Grafstein B.: Mechanism of spreading cortical depression. *J.Neurophysiol.* 19: 154-171 (1956)
- Häggendahl J. and Malmfors T.: Identification and cellular localization of the catecholamines in the retina and the choroid of the rabbit. *Acta Physiol.Scand.* 64: 58-66 (1965)
- Hansen A.J. and Lauritzen M.: The role of spreading depression in acute brain disorders. *An.Acad.Bras.Cienc.* 56: 457-479 (1984)

- Hansen A.J., Lauritzen M., Tfelt-Hansen P.: Spreading cortical depression and antimigraine drugs. In: *Amery WK, Van Nueten JM, Waquier A (eds) The pharmacological basis of migraine therapy. Putman Publishing, London, pp 161-170 (1984)*
- Hansen A.J. and Nedergaard M.: Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem.Pathol. 9: 195-209 (1988)*
- Hausstein K.O., Groneberg D.: Takababhängigkeit: Gesundheitliche Schäden durch das Rauchen. 2.Auflage. *Springer Verlag (2008)*
- Hayashida Y., Rodríguez C.V., Ogata G., Partida G.J., Oi H., Stradleigh T.W., Lee S.C., Colado A.F. and Ishida A.T.: Inhibition of adult rat retinal ganglion cells by D1-type dopamine receptor activation. *J.Neurosci. 29(47): 15001-15016 (2009)*
- Ikeda H. and Sheardown M.J.: Acetylcholine may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of 'transient' cells with the periphery effect in the cat retina: Iontophoretic studies in vivo. *Neuroscience 7: 1299-1308 (1982)*
- Jaffe E.H., Urbina M. and Drujan B.D.: Possible neurotransmitter role of noradrenaline in the teleost retina. *J.Neurosci.Res. 29(2): 190-195 (1991)*
- Jonnala R.R. and Buccafusco J.J.: Relationship between the increased cell surface α_7 nicotinic receptor expression and the neuroprotection induced by several nicotinic receptor agents. *J.Neurosci.Res. 66: 565-572 (2001)*
- Junqueira L.C.U., Carneiro J., Gratzl M.: Histologie, 6.Auflage. *Springer Verlag: 423 (2003)*
- Kahn I.M., Marsala M., Printz M.P., Taylor P. and Yaksh T.L.: Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by in vivo spinal microdialysis in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther. 278: 97-106 (1996)*
- Kaneko S., Maeda T., Kume T., Kochiyama H., Akaike A., Shimohama S. and Kimura J.: Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via α_7 -neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res. 765(1): 125-140 (1997)*

- Kang J., Huguenard J.R. and Prince D.A.: Voltage-Gated Potassium Channels Activated During Action Potentials in Layer V Neocortical Pyramidal Neurons. *J. Neurophysiol.* 83(1): 70-80 (2000)
- Keyser K.T., Hughes T.E., Whiting P.J., Lindstrom J.M. and Karten H.J.: Cholinceptive neurons in the retina of the chick. *Vis.Neurosci.* 1: 349-366 (1988)
- Köhler T.: Rauschdrogen. Geschichte, Substanzen, Wirkung. *Verlag C.H.Beck oHG* (2008)
- Koroleva V.I, Bures J.: Circulation of cortical spreading depression around electrically stimulated areas and epileptic foci on the neocortex of rats. *Brain Res.* 173: 209-215 (1979)
- Kow L.M. and van Harreveld A.: Ion and water movement in isolated chicken retinas during spreading depression. *Neurobiol.* 2: 61-69 (1972)
- Kraig R.P. and Nicholson C.: Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3(11): 1045-1059 (1978)
- Ladewig T., Hanke W., Goldermann M., Guimaraes A.C. and Fernandes de Lima V.M.: Distribution of gap junctions in the chicken retina. *J.Brain Res.* 39(1): 77-86 (1998)
- Lashley K.S.: Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch.Neurol.Psych.* 46: 331-339 (1941)
- Lauritzen M.: Cerebral blood flow in migraine and cortical spreading depression. *Acta Neurol.Scand.* 76:111: 9-40 (1984)
- Lauritzen M., Hansen A.J., Kronborg D. and Wieloch T.: Cortical spreading depression is associated with arachidonic accumulation and preservation of energy charge. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 113-122 (1990)
- Lauritzen M.: Cortical spreading depression and migraine. *Path.Biol.* 40(4): 332-337 (1992)

- Leao A.A.P.: Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J.Neurophysiol.* 7: 359-390 (1944 a)
- Leao A.A.P.: Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J.Neurophysiol.* 7: 391-396 (1944 b)
- Leao A.A.P., Morrison R.S.: Propagation of spreading cortical depression. *J.Neurophysiol.* 8: 33-45 (1945)
- Leao A.A.P.: Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J.Neurophysiol.* 10: 409-414 (1947)
- Leao A.A.P., Martins-Ferreira H.: Nota sobre a ocorrencia da depressao alastrante no hipocampo e no corpo estriado. *An.Acad.Brazil.Ci.* 30: I (1958)
- Mathie L. Kennard E. and Veale E.L.: Neuronal ion channels and their sensitivity to extremely low frequency weak electric field effects. *Radiation Protection Dosimetry* 106(4): 311-315 (2003)
- Marquis J.K., Hilt D.C., Papadeas V.A. and Mautner H.G.: Interaction of cholinergic ligands and local anesthetics with plasma membrane fragments from lobster axon. *Proc.Natl.Acad.Sct.USA* 74(6): 2278-2282 (1977)
- Marrocos M.A. and Martins-Ferreira H.: Effect of Na⁺ and Cl⁻ on the velocity of propagation of the retinal spreading depression in chick retina. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* 23: 473-476 (1990)
- Marshall W.H.: Spreading cortical depression of Leao. *Physiol.Rev.* 29: 239-279 (1959)
- Martel J.-C., Chopin P., Colpaert F. and Marien M.: Neuroprotective Effects of the α_2 -Adrenoceptor Antagonists, (+)-Efaroxan and (\pm)-Idazoxan, against Quinolinic Acid-Induced Lesions of the Rat Striatum. *Exp.Neurol.* 154(2): 595-601 (1998)
- Martin S.E., de Fiebre N.E.C., de Fiebre C.M.: The α_7 nicotinic acetylcholine receptor-selective antagonist, methyllycaconitine, partially protects against β -amyloid toxicity in primary neuron-enriched cultures. *Brain Res.* 1022: 254-256 (2004)

- Martins-Ferreira H., de Oliveira-Castro G.D.: Light scattering changes accompanying spreading depression in isolated retina. *J.Neurophysiol.* 29: 715-726 (1966)
- Martins-Ferreira H., de Oliveira-Castro G.D. and Albuquerque A.: Effet des ions chlorures sur les variations d'intensité de la lumière diffusée par la rétine pendant la "spreading depression". *C.R.Acad.Sci.Ser.D.* 273: 414-417 (1971)
- Martins-Ferreira H.: Spreading Depression in the chicken retina. In *Takanori Okawa, Editor, The brain and behavior of the fowl, pages 317-333. Japan Scientific Society Press, Tokyo (1983)*
- Martins-Ferreira H., Nedergaard M. and Nicholson C.: Perspectives on spreading depression. *Brain Research Reviews* 32: 215-234 (2000)
- Mayevsky A. and Weiss H.R.: Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 11: 829-836 (1991)
- Milner P.M.: Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *EEG Clin. Neurophysiol.* 10: 705 (1958)
- Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C. and Sakmann B.: Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321: 406-411 (1986)
- Mogg A.J., Witheaker P., MCintosh J.M., Marks M., Collins A.C. and Wonnacott S.: Methyllcaconitine is a potent antagonist of α -conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 302(1): 197-204 (2002)
- Morgan I.G. and Mundy P.G.: Ganglion cells of chicken retina possess nicotinic rather than muscarinic acetylcholine. *Neurochem.Res.* 7: 267-274 (1982)
- Mori S., Miller W.H. and Tomita T.: Microelectrode study of spreading depression (SD) in the frog retina. General observation of field potentials associated with SD. *Jap.J.Physiol.* 26: 203-217 (1967)

- Mori S., Miller W.H. and Tomita T.: Microelectrode study of spreading depression (SD) in retina-Müller cell activity and $[K^+]$ during SD. *Jap.J.Physiol.* 26: 219-233 (1967)
- Nakamizo T., Kawamata J., Yamashita H., Kanki R., Kihara T., Sawada H., Akaike A. and Shimohama S.: Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors protects motor neurons. *Biochem.Biophysic.Res.Comm.* 330(4): 1285-1289 (2005)
- Nashmi R. and Lester H.A.: CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J.Mol.Neurosci.* 30: 181-184 (2006)
- Neal M.J.: Acetylcholine as a retinal transmitter substance. In: *Bonting S.L. (Ed.), Transmitters in The Visual Process. Pergamon Press, London, pp. 127-143 (1976)*
- Nedergaard M., Hansen A.J.: Characterization of cortical depolarisations evoke in focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 13: 568-574 (1993)
- Nedergaard M., Cooper A.J.L and Goldman S.A.: Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J.Neurobiol.* 28(4): 433-444 (1995)
- Nguyen-Legros J., Versaux-Botteri C. and Vernier P.: Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol.Biol.* 19(3): 181-204 (1999)
- Nicholsen C. and Kraig R.P.: The behavior of extracellular ions during spreading depression. In: *Zeuthen T. (Editor), The Applications of ion selective microelectrodes. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam: 217-238 (1981)*
- Obrenovitch T.P. and Zilkha E.: High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression. *J.Neurophysiol.* 73(5): 2107-2114 (1995)
- Oka H., Kako M., Matsushima M. and Kyoza A.: Traumatic spreading depression syndrome. Review of a particular type of head injury in 37 patients. *Brain* 100: 287-298 (1977)

- Olesen J. and Jorgensen M.B.: Leao's spreading depression in the hippocampus explains transient global amnesia. A hypothesis. *Acta Neurol.Scand.* 73: 219-220 (1986)
- Osborne N.N., Nesselhut T., Nicholas D.A. and Cuello A.C.: Serotonin: A transmitter candidate in the vertebrate retina. *Neurochemistry International* 3(2): 171-176 (1981)
- Osborne N. N.: Noradrenaline, a Transmitter Candidate in the Retina. *Journal of Neurochemistry* 36(1): 17-24 (1981)
- Osborne N. N.: Binding of (-)[³H]noradrenaline to bovine membrane of the retina. Evidence for the existence of α_2 -receptors. *Vis.Res.* 22(11): 1401-1407 (1982)
- Oosterink B.T., Korte S.M., Nyakas C, Korf J and Luiten P.G.M.: Neuroprotection against *N*-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Europ.J.Pharmacol.* 358(2): 147-152 (1998)
- Ozaita A., Petit-Jacques J., Volgyi B., Ho C.S., Joho R.H., Bloomfield S.A. and Rudy B.: A Unique Role for Kv3 Voltage-Gated Potassium Channels in Starburst Amacrine Cell Signaling in Mouse Retina. *J.Neurosci.* 24(33): 7335-7343 (2004)
- Paes-De-Carvalho R.: Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *An.Acad.Bras.Cienc.* 74(3): 437-451 (2002)
- Peixoto N.L., Fernandes de Lima V.M. and Hanke W.: Correlation of the electrical and intrinsic optical signals in the chicken spreading depression phenomenon. *Neuroscience letters* 299(1-2): 89-92 (2001)
- Piffel A.: Glutamaterge und serotonerge Pharmakologie der retinalen Spreading Depression. *Diplomarbeit, Universität Hohenheim* (2005)
- Pootanakit K. and Brunken W.J.: 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor expression in the mammalian retina. *Brain Res.* 875(1-2): 152-156 (2000)

- Pootanakit K. and Brunken W.J.: Identification of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor subunits in mammalian retina: potential pre-synaptic modulators of photoreceptors. *Brain Res.* 896: 77-85 (2001)
- Pourcho R.: Localization of cholinergic synapses in mammalian retina with peroxidase-conjugated α -bungarotoxin. *Vis.Res.* 19(3): 287-292 (1979)
- Pourcho, R. G.: Dopaminergic amacrine cells in the cat retina. *Brain Res.* 252: 101-109 (1982)
- Prendergast M., Harris B.R., Mayer S., Holley R., Pauly J. and Littleton J.: Nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate toxicity in the hippocampus: relation to distribution of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Med.Sci.Monit.* 7: 1153-1160 (2001)
- Puller C. und Haverkamp S.: Die synaptische Architektur des Zapfen-Endfüßchens. *Neuroforum* 4: 114-123 (2009)
- Redburn DA.: Serotonin systems in the inner and outer plexiform layers of the vertebrate retina. *Fed.Proc.* 43(12): 2699-703 (1984)
- Reichenbach A.: Neuroglia – das andere zelluläre Element im Nervensystem. Die Müllersche Gliazelle. *SMV Verlagsgesellschaft mbH, 82405 Wessobrunn, first edition (1999)*
- Reid K.H., Marrannes R., de Prins E. and Wauquier A.: Potassium translocation and spreading depression induced by electrical stimulation of the brain. *Exp.Neurol.* 97: 345-364 (1987)
- Romer A.S., Parson T.S.: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. Nachdruck 5.Auflage. *Verlag Paul Parey (1991)*
- Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A. and Patrick J.W.: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J.Neurosci.* 13: 596-604 (1993)
- Shapiro B.E.: Osmotic forces and gap junctions in spreading depression: A computational model. *J. of Computational Neuroscience* 10: 99-120 (2001)

- Sheardown M.J.: The triggering of spreading depression in the chick retina by nicotinic receptor agonists. *Europ.J.Pharmacol.* 337: 209-212 (1997)
- Shen Y, Liu XL, Yang XL.: N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol.Neurobiol.* 34(3): 163-79 (2006)
- Shimohama S., Akaike A. and Kimura J.: Nicotine-induced Protection Against Glutamate Cytotoxicity. *Ann.New York Acad.Sci.* 777: 356-361 (2006)
- Somjen G.G., Atiken P.G., Balestrino M., Herreras O. and Kawasaki K.: Spreading depression like depolarization and selective vulnerability of neurons. A brief review. *Stroke* 21: III 179-183 (1990)
- Somjen G.G.: Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews* 81(3): 1065-1096 (2001)
- Strosznajder J. Chalimoniuk M. and Samochocki M.: Activation of serotonergic 5-HT_{1A} Receptor reduces Ca²⁺- and glutamatergic receptor-evoked arachidonic acid and NO/cGMP release in adult Hippocampus. *Neurochem.Int.* 28(4): 439-444 (1996)
- Takada-Takatori Y., Kume T., Izumi Y., Ohgi Y., Niidome T., Fujii T., Sugimoto H. and Akaike A.: Roles of Nicotinic Receptors in Acetylcholinesterase Inhibitor-Induced Neuroprotection and Nicotinic Receptor Up-Regulation. *Biol.Pharm.Bull.* 32(3): 318-324 (2009)
- Tegtmeier F.: Differences between spreading depression and ischemia. In: Migraine: Basic mechanisms and Treatment. Ed: Lehmenkühler A., Grotenmeyer K.H., Tegtmeier F.; Verlag Urban&Schwarzenberg (1993)
- Tomita T.: Spreading depression potential (SDP) in the frog retina. *Ann.Acad.Bras.Cienc.* 56: 505-518 (1984)
- Vanderheyden P., Ebinger G., Kanarek L. and Vauquelin G.: Epinephrine and norepinephrine stimulation of adenylate cyclase in bovine retina homogenate: Evidence for interaction with the dopamine D1 receptor. *Life Sciences* 38(13): 1221-1227 (1986)

- Vaney D.I.: Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science* 233: 444-446 (1986)
- van Harreveld A.: Components in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and concentration of crustacean muscle. *J.Neurochem.* 3: 300-315 (1959)
- van Harreveld A. and Khattab F.I.: Changes in cortical extracellular space during spreading depression investigated with the electron microscope. *J.Neurophysiol.* 30(4): 911-929 (1967)
- van Harreveld A. and Fifkova E.: Glutamate release from the retina during spreading depression. *J.Neurobiol.* 2: 13-29 (1970)
- van Harreveld A.: Visual concomitants of retinal spreading depression. *An.Acad.Brasil.Cienc.* 56(4): 519-524 (1984)
- Vercesi A. and Martins-Ferreira H.: Oxygen and glucose requirements in chick retinal spreading depression. *An.Acad.brasil.Cienc.* 55(3): 309-316 (1983)
- Veruki M.L.: Dopaminergic neurons in the rat retina express dopamine D₂/D₃ receptors. *Eur.J.Neurosci.* 9(5): 1096-1100 (1997)
- Wada E., Wada K., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W.: Distribution of alpha2, alpha3, alpha4 and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J.Comp.Neurol.* 284: 314-335 (1989)
- Wässle H. and Chun M.H.: Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in cat retina. *J.Neurosci.* 8: 3383-3394 (1988)
- Watkins J.C. and Jane D.E.: The glutamate story. *Brit.J.Pharmacol.* 147 (Supplement 1): 100-108 (2006)
- Watson S. and Gridlestone D. (Eds): TiPS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement. 7th edn., Elsevier Trends Journals, Cambridge: pp6-7 (1996)

- Weber B., Steinfath M, Scholz J. and Bein B.: Neuroprotective effects of α_2 -adrenergic receptor agonists. *Drug News Perspect.* 20(3): 149 (2007)
- Weimer M.S and Hanke W.: Correlation between the durations of refractory period and intrinsic optical signal of retinal spreading depression during temperature variations. *Exp.Brain Res.* 161(2): 201-208 (2005)
- Weimer M.S and Hanke W.: Propagation velocity and triggering threshold of retinal spreading depression are not correlated. *Exp.Brain Res.* 164(2): 185-193 (2005)
- Welch K.M.A., D'Andrea G., Tepley N., Barkley G. and Ramadan N.M.: The concept of migraine as a state of central neuronal hyperexcitability. *Neurologic Clinics* 8(4): 817-828 (1990)
- Welch K.M.A., Barkley G.L., Ramadan N.M. and Dandrea G.: NMR spectroscopic and magnetoencephalographic studies in migraine with aura: Support for the spreading depression hypothesis. *Path. Biol.* 40: 349-354 (1992)
- Wiedemann M., Fernandes de Lima V.M. and Hanke W.: Effects of antimigraine drugs on retinal spreading depression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 353(5): 552-556 (1996)
- Wonnacott S., Barik J., Dickinson J. and Jones I.W.: Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS. *J.Molec.Neurosci.* 30: 137-140 (2006)
- Yum L., Wolf K.M. and Chiappinelli V.A.: Nicotinic acetylcholine receptors in separate brain regions exhibit different affinities for methylcaconitine. *Neurosci.* 72(2): 545-555 (1996)
- Zhang Y. and Kimelberg H.K.: Neuroprotection by alpha 2-adrenergic agonists in cerebral ischemia. *Curr.Neuropharmacol.* 3: 317-323 (2005)
- Zawilska J.B. and Nowak J.Z.: Dopamin D₄-Like receptors in vertebrate retina. Does the retina offer a model for the D₄-receptor analysis? *Pol.J.Pharmacol.* 49(4): 201-211 (1997)

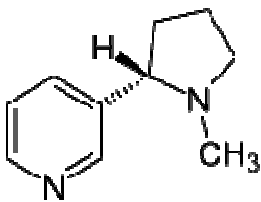
7. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ACh	Acetylcholin
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndrom
ADS	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cSD	kortikale Spreading Depression
DA	Dopamin
ED ₅₀	mittlere effektive Dosis
et al.	et alii / und andere
GABA	γ-Aminobuttersäure
HCl	Hydrogenchlorid
Hz	Hertz
INL	Inner Nuclear Layer / innere Körner Schicht
IOS	Intrinsisches Optisches Signal
IPL	Inner Plexiform Layer / innere plexiforme Schicht
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kΩ	Kiloohm
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
m	Steigung
μA	Mikroampere
MAO	Monoaminoxidase

mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
MLA	Methyllycaconitin
mm	Millimeter
μM	mikromolar
mM	millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
p.a.	pro analysi
R ²	Determinationskoeffizient / Bestimmtheitsmaß
rSD	retinale Spreading Depression
s	Sekunde
SD	Spreading Depression
SEM	Standardfehler
t	Zeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v	Ausbreitungsgeschwindigkeit
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT	Serotonin

8. Anhang

8.1. Strukturformeln und Molekulargewichte der untersuchten Substanzen



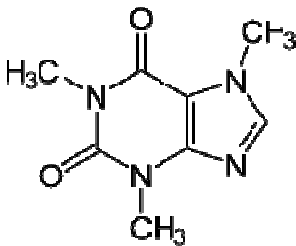
Nikotin

(-)-1-Methyl-2-(3-Pyridyl) Pyrrolidin

$C_{10}H_{14}N_2$

MW 162,23

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



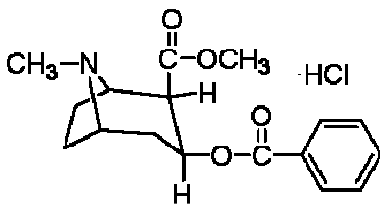
Koffein (Coffein)

1,3,7-Trimethylxanthin

$C_8H_{10}N_4O_2$

MW 194,2

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



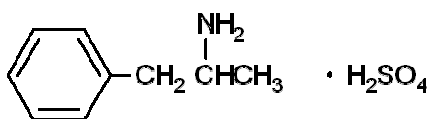
Kokain (Cocain)

Ecgonin Methyl Ester Benzoat Hydrochlorid

$C_{17}H_{21}NO_4 \cdot HCl$

MW 339,82

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



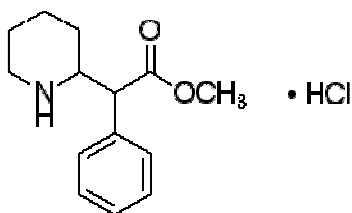
Amphetamin

(±)- α -Methylphenethylamin Sulfat

$C_{10}H_{15}N \cdot H_2SO_4$

MW 368,49

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



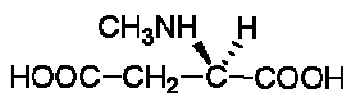
Methylphenidat

threo - Methyl α -Phenyl α -(2-Piperidyl) Acetat Hydrochlorid

$C_{14}H_{19}NO_2 \cdot HCl$

MW 269,77

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



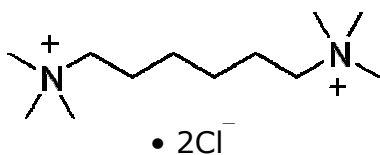
NMDA

N-Methyl-D-Aspartat

$C_5H_9NO_4$

MW 147,13

(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)



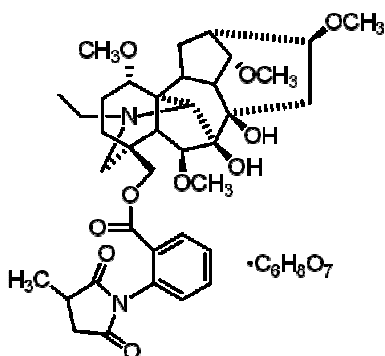
Hexamethonium

Hexamethonium Dichlorid

$(CH_3)_3 N (Cl)(CH_2)_6 N(Cl)(CH_3)_3$

MW 273,29

(Strukturformel aus: www.wikipedia.de)



Methyllycaconitin (MLA)

Methyllycaconitin Citrat Hydrat

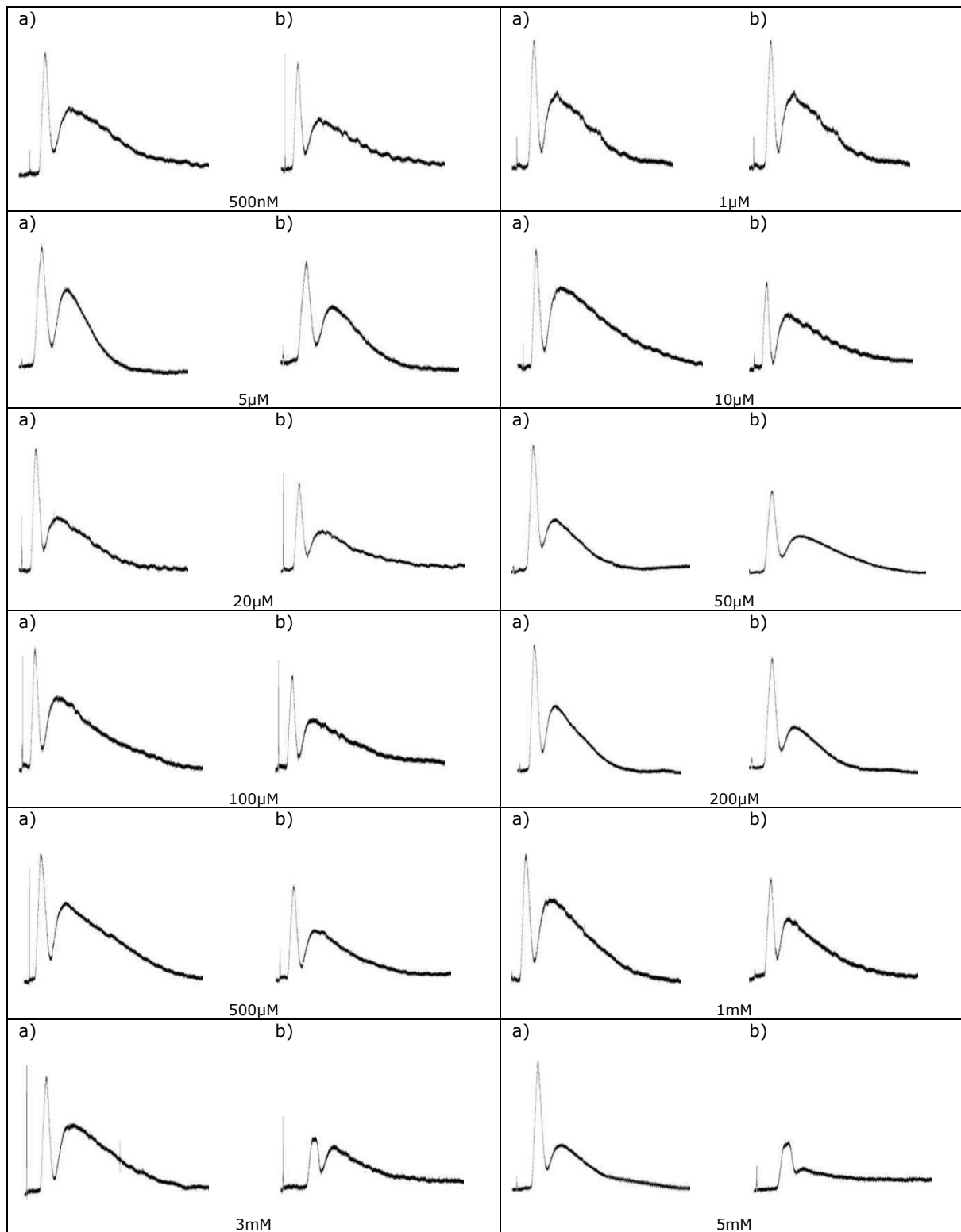
$C_{37}H_{50}N_2O_{10} \cdot C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$

MW 874,92

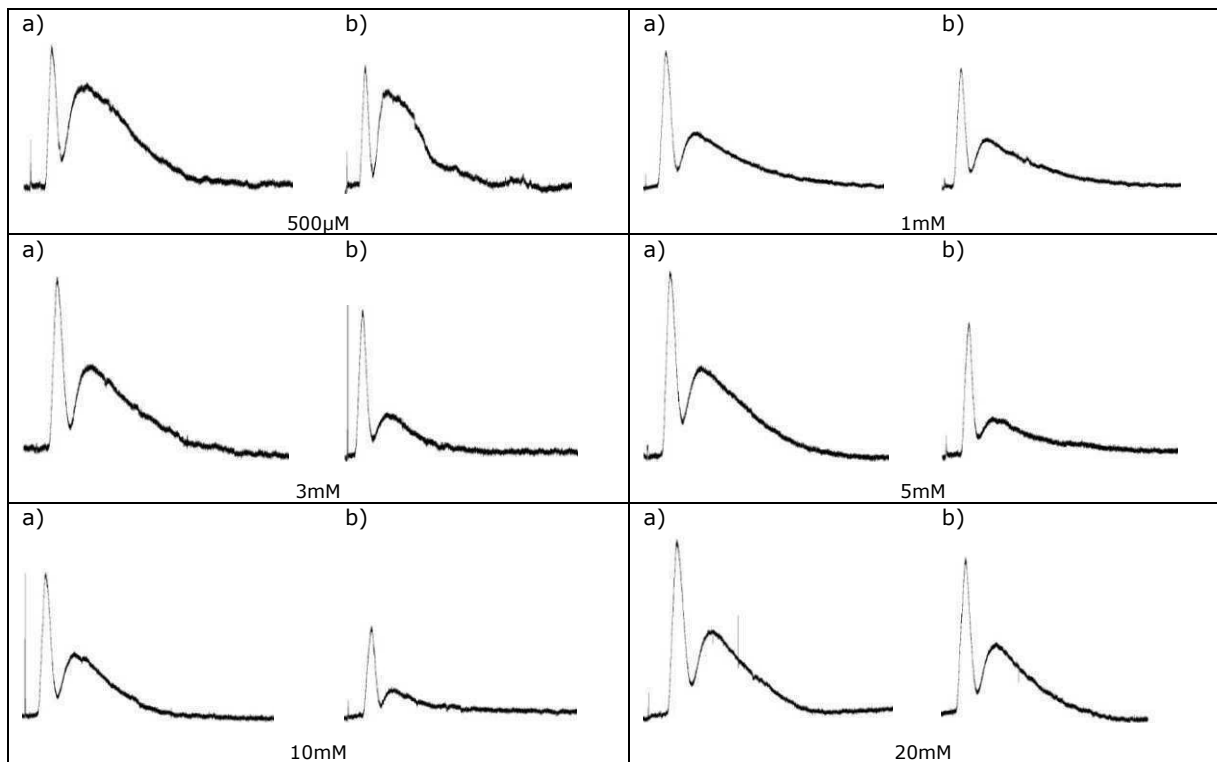
(Strukturformel aus: www.sigmaaldrich.com)

8.2. IOS Beispielkurven unter Einfluss der einzelnen Substanzen

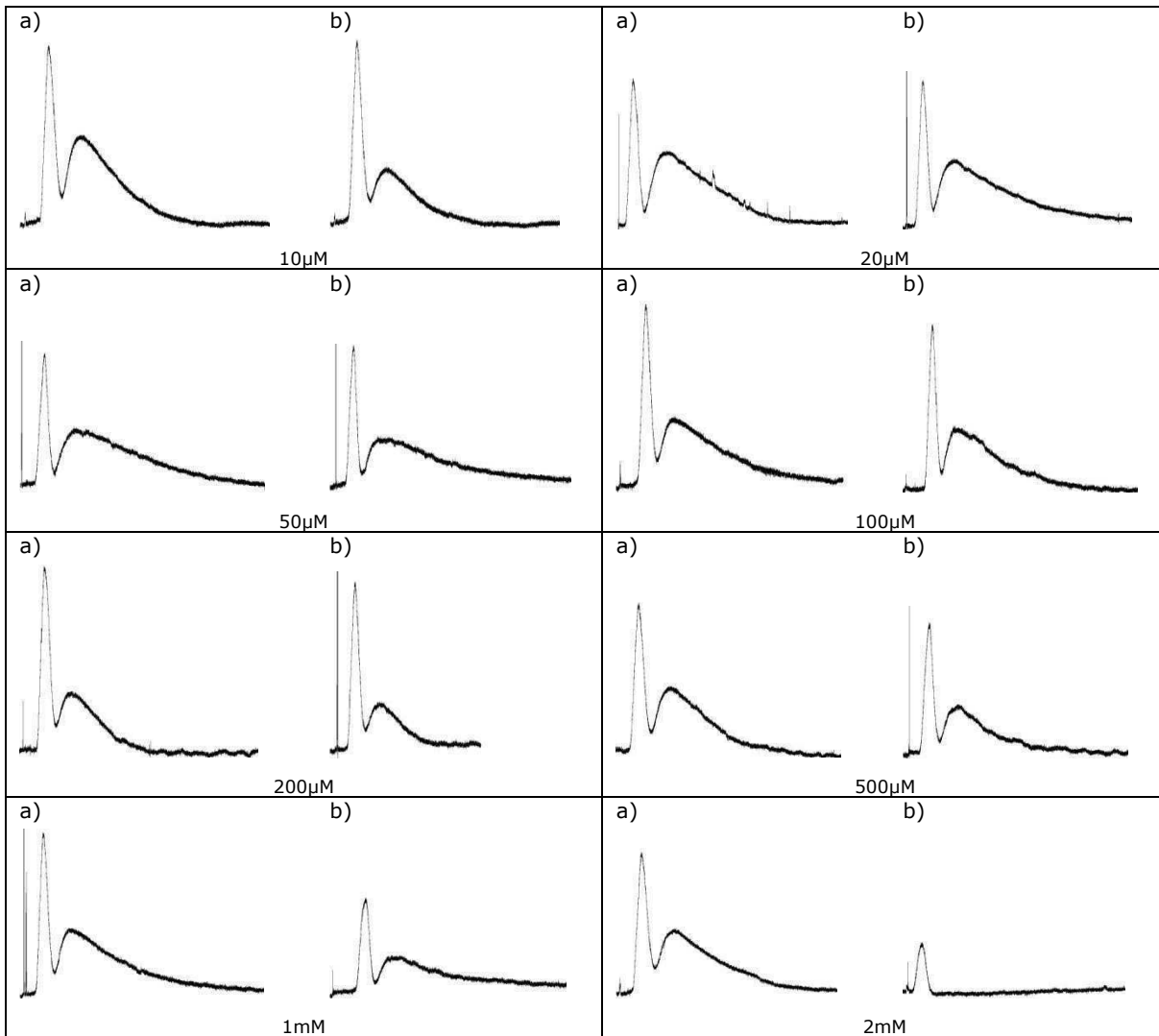
8.2.1. Nikotin



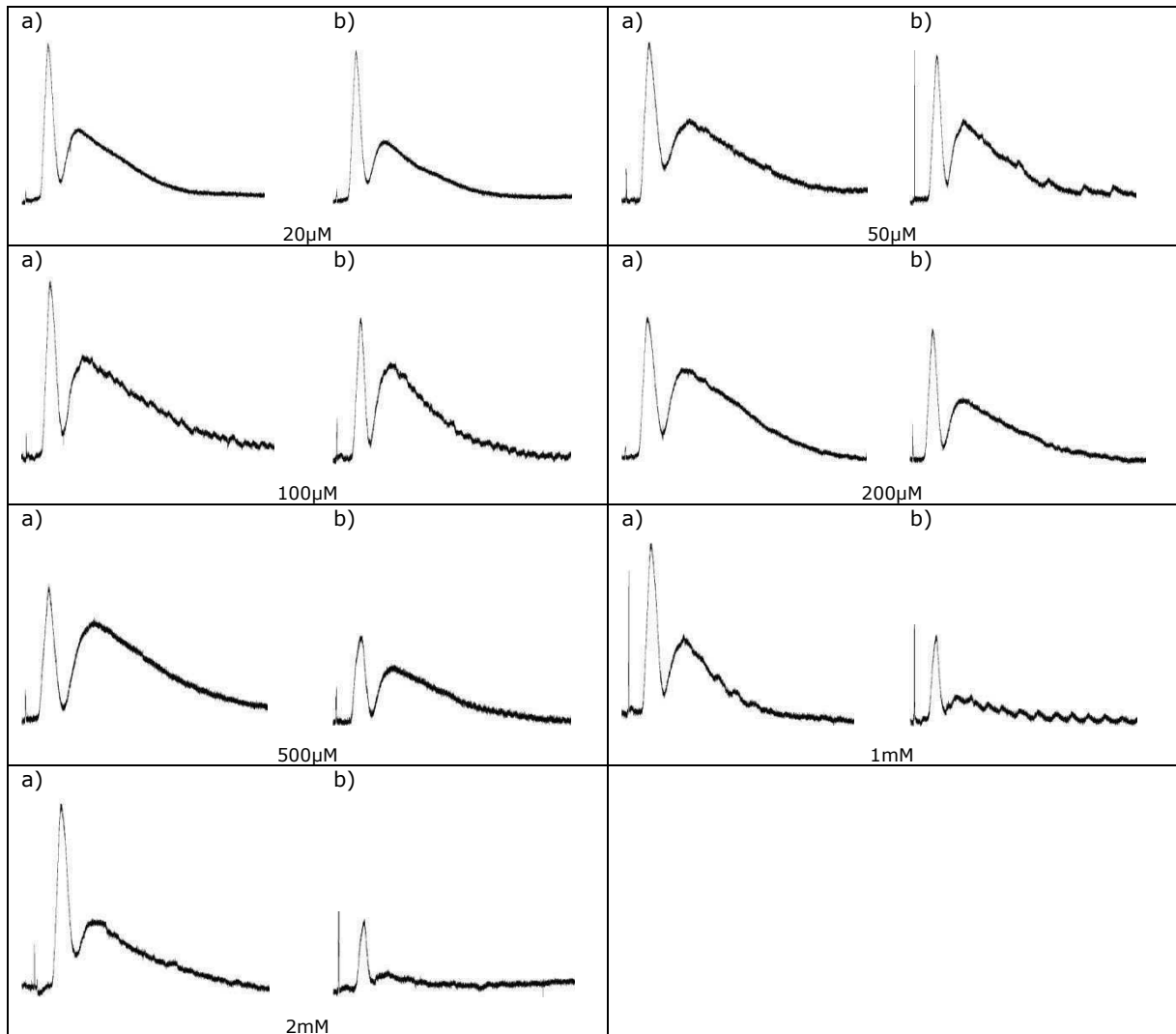
Änderung des IOS unter Zugabe aufsteigender Konzentrationen **Nikotin**. Immer a): Kontrolle, immer b): zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$

8.2.2. Koffein

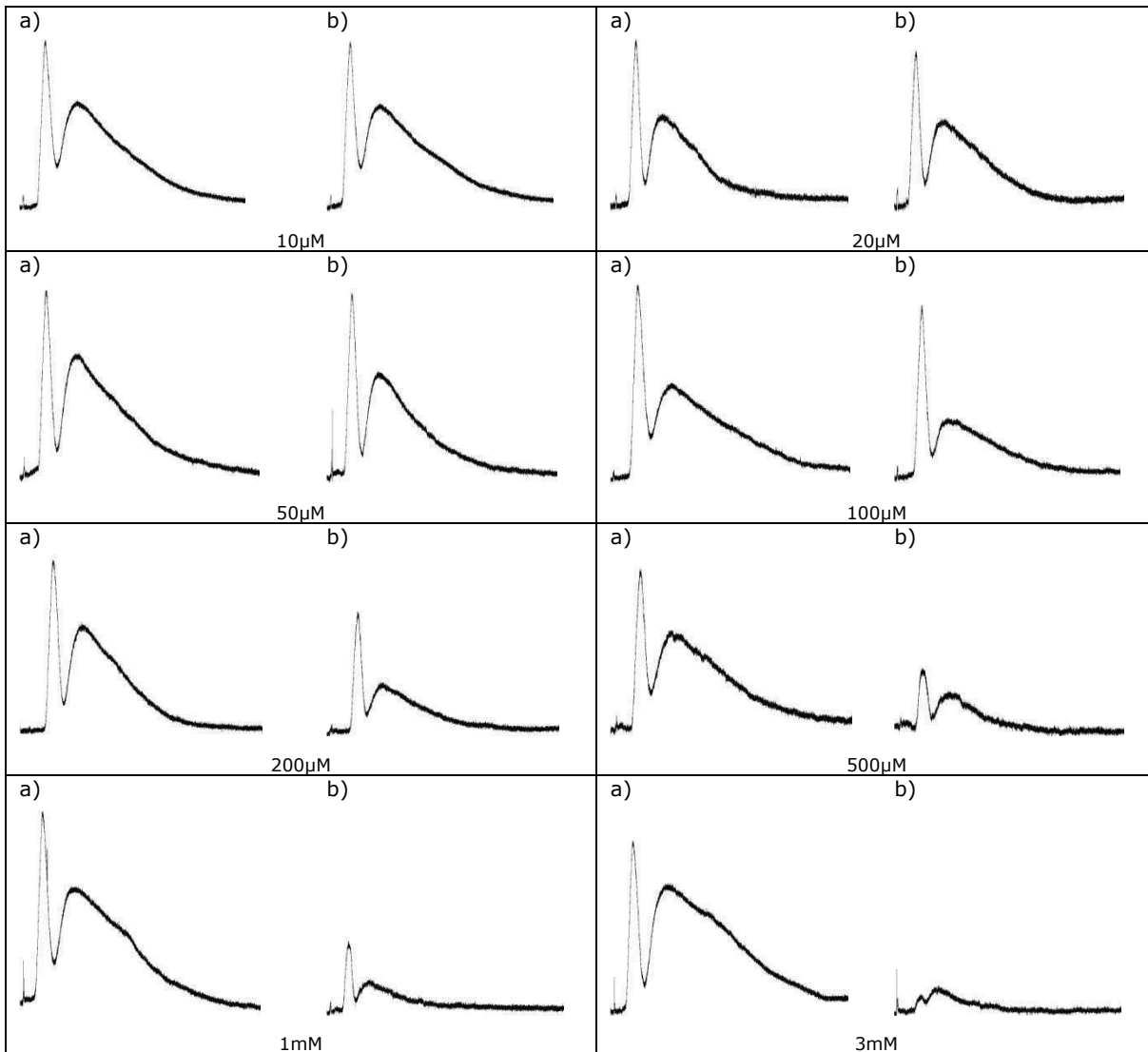
Änderung des IOS unter Zugabe aufsteigender Konzentrationen **Koffein**. Immer a): Kontrolle, immer b): zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$

8.2.3. Kokain

Änderung des IOS unter Zugabe aufsteigender Konzentrationen **Kokain**. Immer a): Kontrolle, immer b): zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$

8.2.4. Amphetamin

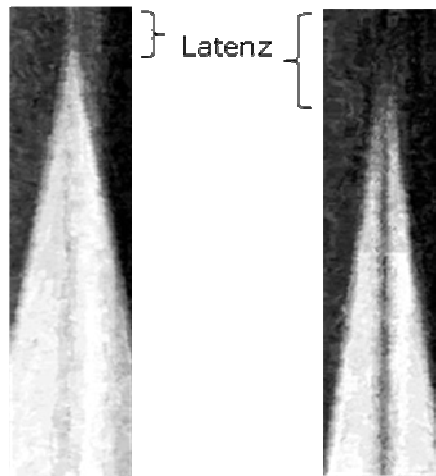
Änderung des IOS unter Zugabe aufsteigender Konzentrationen **Amphetamin**. Immer a): Kontrolle, immer b): zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$

8.2.5. Methylphenidat

Änderung des IOS unter Zugabe aufsteigender Konzentrationen **Methylphenidat**. Immer a): Kontrolle, immer b): zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$

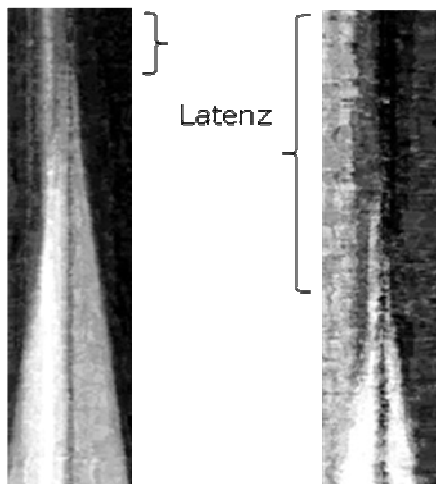
8.3. Beispielstacks unter Einfluss der einzelnen Substanzen

8.3.1. Nikotin



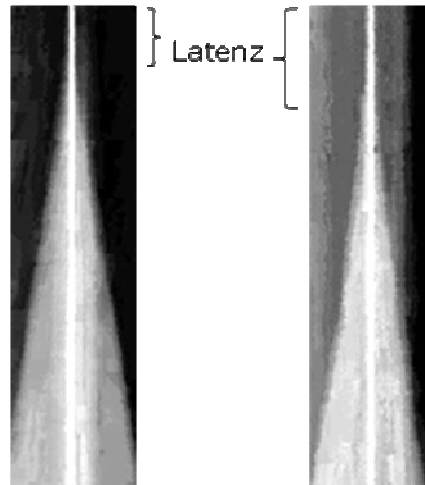
Änderung der Latenz unter Einfluss von $500\mu\text{M}$ **Nikotin**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.3.2. Koffein



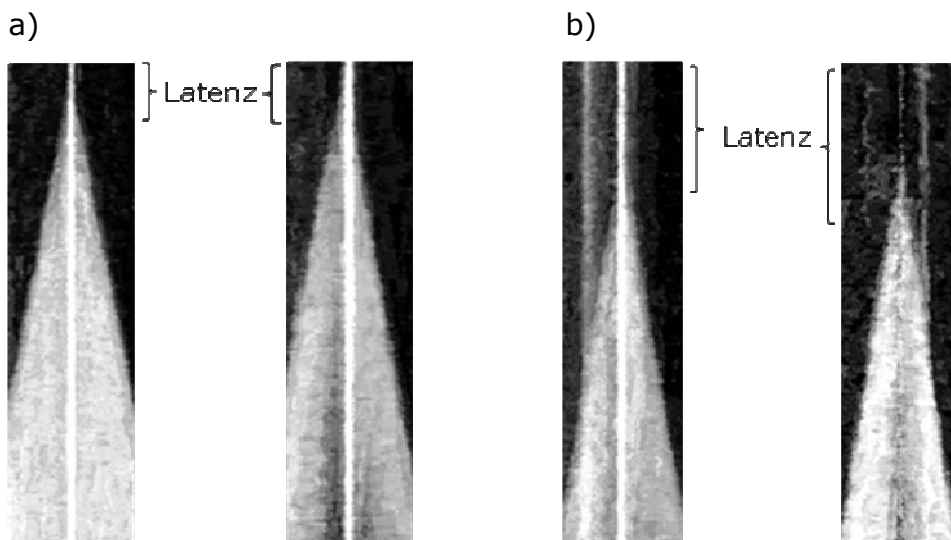
Änderung der Latenz unter Einfluss von 10mM **Koffein**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.3.3. Kokain



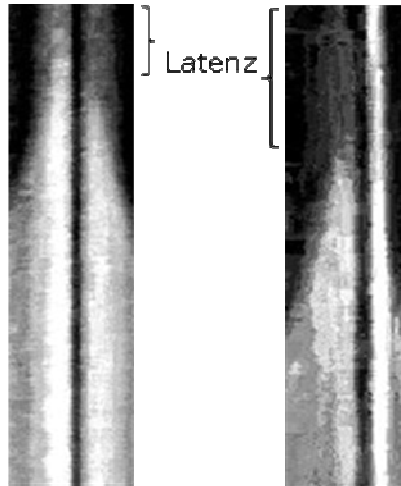
Änderung der Latenz unter Einfluss von 1mM **Kokain**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.3.4. Amphetamin



Änderung der Latenz unter Einfluss von 2mM **Amphetamin**. a) Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$. b) Links: zum Zeitpunkt $t=120\text{min}$, rechts: zum Zeitpunkt $t=180\text{min}$

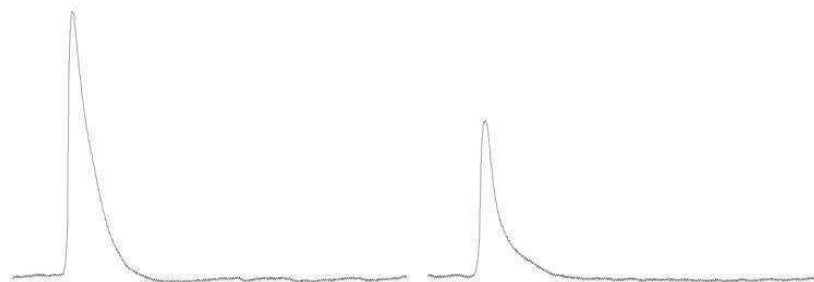
8.3.5. Methylphenidat



Änderung der Latenz unter Einfluss von 3mM **Methylphenidat**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

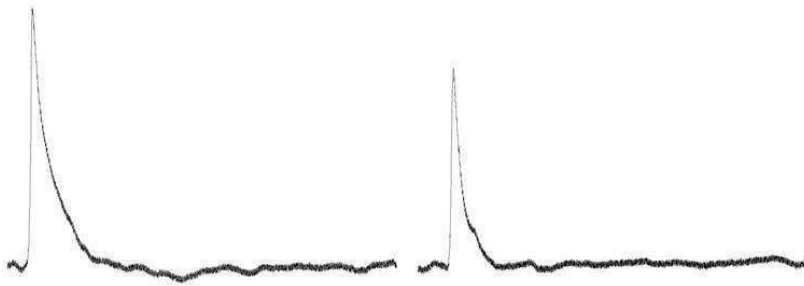
8.4. Beispielkurven der elektrophysiologischen Messungen unter Einfluss der einzelnen Substanzen

8.4.1. Nikotin



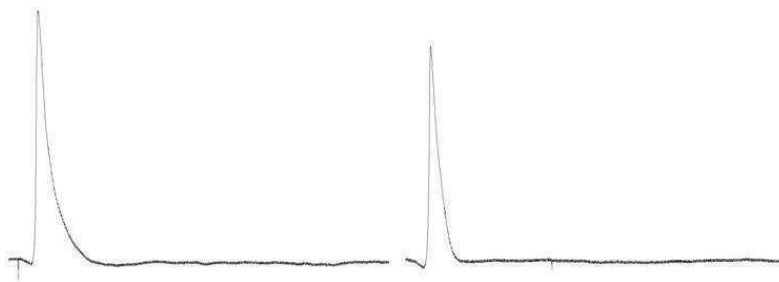
Änderung des elektrischen Potentials unter Einfluss von 500 μM **Nikotin**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.4.2. Koffein



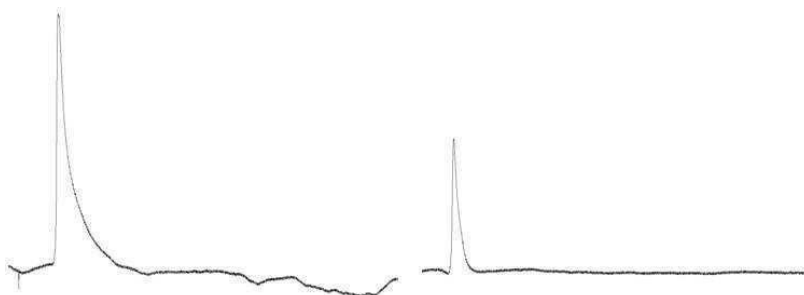
Änderung des elektrischen Potentials unter Einfluss von 10mM **Koffein**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.4.3. Kokain



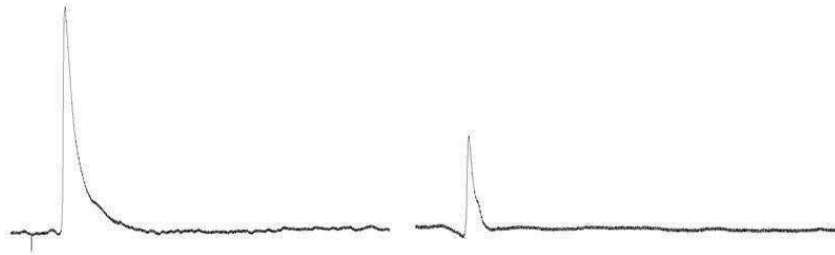
Änderung des elektrischen Potentials unter Einfluss von 1mM **Kokain**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

8.4.4. Amphetamin



Änderung des elektrischen Potentials unter Einfluss von 2mM **Amphetamin**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

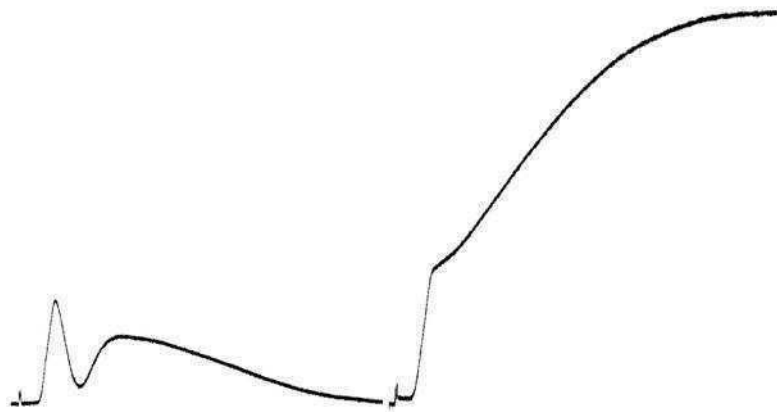
8.4.5. Methylphenidat



Änderung des elektrischen Potentials unter Einfluss von 3mM **Methylphenidat**. Links: Kontrolle, rechts: zum Zeitpunkt $t=150\text{min}$.

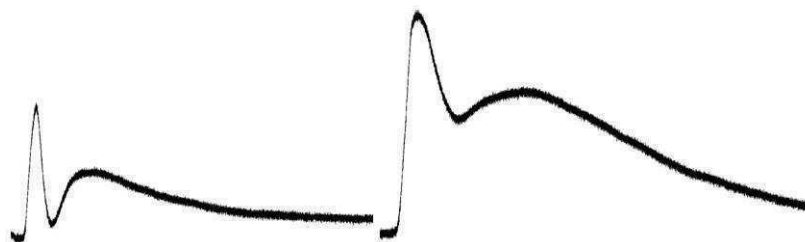
8.5. Beispielkurven der Neuroprotektionsmessungen

8.5.1. NMDA

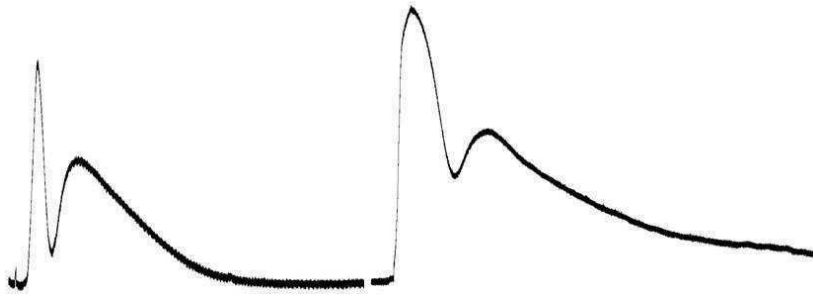


Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

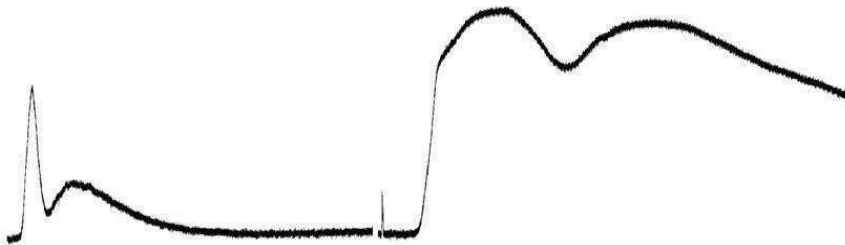
8.5.2. Nikotin



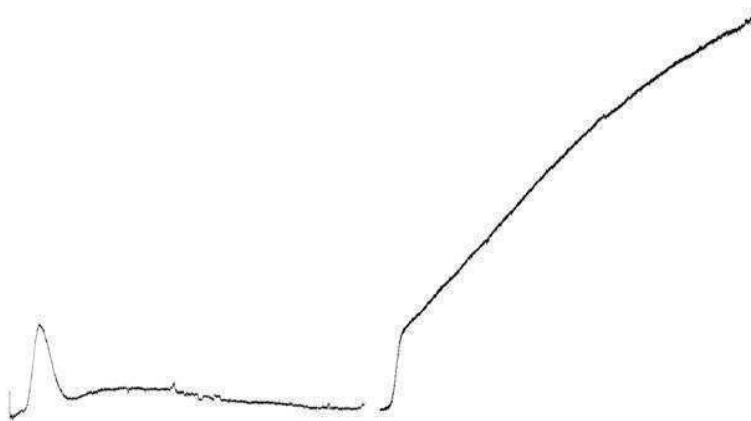
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und $500\mu\text{M}$ **Nikotin**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit



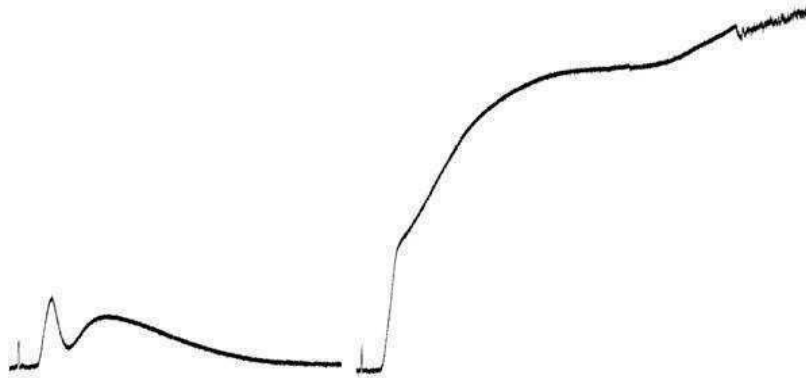
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von 30 μM **NMDA** und 3 mM **Nikotin**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30 min Einwirkzeit



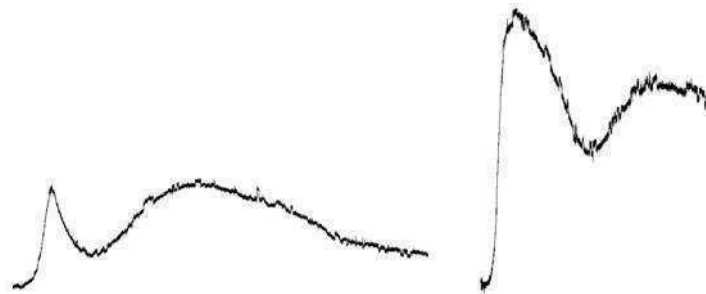
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von 30 μM **NMDA**, 500 μM **Nikotin** und 10 mM **Hexamethonium**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30 min Einwirkzeit



Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von 30 μM **NMDA** und 10 mM **Hexamethonium**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30 min Einwirkzeit



Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und $500\mu\text{M}$ **Methyllycaconitin**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit



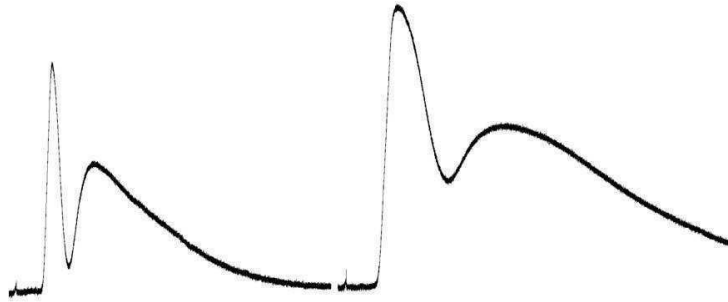
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA**, $500\mu\text{M}$ **Nikotin** und $500\mu\text{M}$ **Methyllycaconitin**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

8.5.3. Koffein



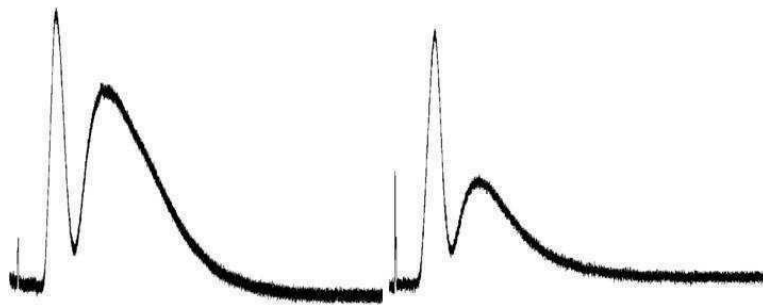
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und 10mM **Koffein**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

8.5.4. Kokain



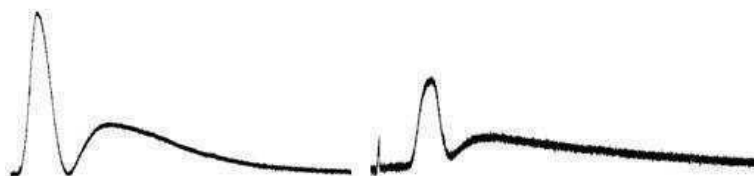
Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und 1mM **Kokain**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

8.5.5. Amphetamin



Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und 2mM **Amphetamin**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

8.5.6. Methylphenidat



Änderung des intrinsischen optischen Signals unter Einfluss von $30\mu\text{M}$ **NMDA** und 3mM **Methylphenidat**. Links: Kontrolle, rechts: nach 30min Einwirkzeit

8.6. Erlaubnis nach BtMG**BEFRISTETE ERLAUBNIS**

nach § 3 des Betäubungsmittelgesetzes

für die Universität Hohenheim
Institut für Physiologie 230
Abteilung Membranphysiologie

unter der BtM-Nummer **450 45 71**

für die Betriebsstätte Garbenstr. 30
70599 Stuttgart

Die Erlaubnisurkunde vom 06.06.2006 ist nunmehr ungültig.

Diese Erlaubnis wird bis zum 31.12.2007 befristet.

Verantwortlich für den Betäubungsmittelverkehr ist

Herr Prof. Dr. Wolfgang Hanke

Die Erlaubnis beinhaltet den nachfolgenden Betäubungsmittelverkehr

1. Erwerb (im Geltungsbereich dieses Gesetzes) der nachgenannten Stoffe bis zu den jeweils angegebenen Jahreshöchstmengen nur zu den unter 2. genannten Zwecken

1.1	Cocainhydrochlorid	5 Gramm
1.2	Dexamfetaminsulfat	5 Gramm
1.3	Lysergid	250 Milligramm
1.4	Lysergidhemi[(R,R)-tartrat]-Anhydrat	250 Milligramm
1.5	Lysergidhemi[(R,R)-tartrat]-Dihydrat	250 Milligramm
1.6	Mescalinhochlorid	1 Gramm
1.7	(RS)-Metamfetaminhydrochlorid	5 Gramm
1.8	Methylphenidathydrochlorid	5 Gramm
1.9	N,N-Dimethyltryptamin (DMT)/ [2-(Indol-3-yl)ethyl]dimethylazan	1 Gramm
1.10	Phencyclidinhydrochlorid	1 Gramm
1.11	Psilocybin	1 Gramm

1.12 Δ 8-Tetrahydrocannabinol 1 Gramm

1.13 Δ 9-Tetrahydrocannabinol 1 Gramm

2. Herstellung von Zubereitungen, die die unter 1. genannten Stoffe enthalten, nur zu eigenen wissenschaftlichen Zwecken, ausgenommen die Anwendung am Menschen

3. Rückgabe der in der Erlaubnis genannten Betäubungsmittel nur in der erworbenen Form.

Bonn, den 21. Oktober 2006

BUNDESINSTITUT FÜR
ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE
83.05a – 42/3052552/08

Im Auftrag


Skiba



Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hanke für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung durchzuführen, seiner ausdauernden Diskussionsbereitschaft sowie seiner Hilfestellung bei allen großen und noch so kleinen Fragen. Dank seiner „hankiesken“ Art blieb ebenso Raum für die persönliche Entwicklung.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Hilbig danke ich für die freundliche und freudige Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Arbeit.

Frau Alexandra Piffel möchte ich für die fabelhafte und geduldige Einführung in die Präparationstechnik sowie für jegliche Unterstützung zu Beginn meiner Promotion ein großes Dankeschön zukommen lassen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Membranphysiologie sei sowohl für die gesamte technische Unterstützung, die immerwährende Hilfsbereitschaft, als auch für die wirklich angenehme Atmosphäre, in der ich die Jahre über arbeiten durfte, gedankt. Ein spezieller *„Gruß aus dem Schwarzwald“* darf dabei auf keinen Fall fehlen.

All meinen Freunden, dabei im Besonderen Elke und Andi, möchte ich für die fortwährende emotionale Unterstützung danken. So manches *„das wird“* war Zuspruch und Motivation zugleich.

Einen herzlichen Dank möchte ich Katrin fürs erneute, geduldige Korrekturlesen aussprechen.

Meinem ehemaligen Biolehrer Lothar H. Egeler möchte ich für den interessanten, originellen und amüsanten Unterricht danken, durch den meine Neugierde für die Biologie erst richtig geweckt wurde.

Ebenso geht ein Dankeschön an meinen „großen“ Bruder Markus für die lebenswürdige und vor allem hilfreiche Überlassung des Klapprechners.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer in der Verwirklichung meiner Pläne unterstützt haben.