

Aus der Klinik für Augenheilkunde
(Direktor Universitätsprofessor Dr. med. Peter Markus Walter)

Effekte von Nikotin auf a- und b-Welle des
Elektroretinogramms der isolierten, umströmten
Vertebratennetzhaut

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Janina Mauer
aus
Bonn

Berichter:

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Peter Markus Walter

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Joachim Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2018

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar

Diese Arbeit möchte ich in Liebe und tiefer Dankbarkeit meinen Eltern, meinem Großvater und meiner Schwester widmen, die mich stets ermutigt und mich auf all meinen Wegen begleitet haben.

I Inhaltsverzeichnis

II	Abbildungsverzeichnis	v
III	Tabellenverzeichnis	vii
1	Einleitung	2
1.1	Anatomische Grundlagen der Vertebratennetzhaut	2
1.1.1	Entwicklung der Retina	2
1.1.2	Schichtung und Aufbau des Signalfusses innerhalb der Retina	3
1.1.3	Rolle der einzelnen Neuronen im retinalen Kommunikations- netzwerk	6
1.1.4	Nikotinerge Transmission in der Retina	11
1.2	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor	14
1.2.1	Subtypen des nAChR in der Retina	17
1.3	Das Elektoretinogramm (ERG)	18
1.3.1	Wellen des Elektoretinogramms	18
1.3.2	Zelluläre und molekulare Grundlagen der ERG-Entstehung . .	19
1.4	Das Modell der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut	20
1.5	Eigenschaften der Substanz Nikotin und ihre medizinische Relevanz .	21
1.5.1	Nikotin und Nikotinprodukte	21
1.5.2	Pharmakokinetik und Metabolismus von Nikotin im Vertebra- tenorganismus	22
1.5.3	Pharmakodynamische Effekte von Nikotin auf das ZNS	24
1.5.4	Allgemeine Auswirkungen von Tabakkonsum auf die Netzhaut	25
2	Zielsetzung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Zur Versuchsdurchführung benötigtes Material	28
3.1.1	Bovine Netzhäute	28
3.1.2	Nährlösung	28
3.1.3	Das Nikotinpräparat	30
3.2	Isolation der Netzhäute	30
3.3	Konstruktion der Versuchsanordnung	31

3.4	Platzierung der Retina und Inbetriebnahme der Versuchsaapparatur . . .	33
3.5	Versuchsdurchführung	34
4	Ergebnisse	36
4.1	Ergebnisse der b-Wellen-Experimente	36
4.1.1	Trends der b-Wellen-Dynamik unter Nikotin und nach Nikotin- exposition	41
4.2	Ergebnisse der a-Wellen-Experimente	41
4.2.1	5 μ M Nikotin	43
4.2.2	20 μ M Nikotin	46
4.2.3	50 μ M Nikotin	50
4.2.4	Trends der a-Wellen-Dynamik unter Nikotin und nach Nikotin- exposition	54
5	Diskussion	55
5.1	Einordnung der Ergebnisse in den Kontext der Literaturrecherche . .	55
5.2	Erklärungsansätze zur Nikotinwirkung	57
5.2.1	Verstärkung der b-Welle	57
5.2.2	Verstärkung der a-Welle	57
5.2.3	„b-Wellen“-Phänomen bei a-Wellen-Versuchen	59
5.2.4	Depression oder Auslöschung des ERG-Signals	62
6	Zusammenfassung	64
	Literaturverzeichnis	66
	Anhang	77

II Abbildungsverzeichnis

1.1	Schichtaufbau der Retina.	3
1.2	Zwei Populationen der Starburst-Amakrinzellen	10
1.3	Das cholinerge Netzwerk innerhalb der Retina und nAChR.	13
1.4	Aufbau des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.	15
1.5	Konformationszustände des nAChR.	16
1.6	Das ERG-Signal aus den Teilpotentialen PI, PII und PIII	18
1.7	Hepatische Metabolisation von Nikotin	23
3.1	Präparation des Bulbus und Anfertigung der Netzhautstanzen	30
3.2	Aufbau der Versuchsanordnung	32
3.3	Zusammenbau der Versuchskammer	34
4.1	Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 2µM Nikotin	38
4.2	Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 5µM Nikotin	39
4.3	Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 20µM Nikotin	40
4.4	Übersicht über die b-Wellen-Dynamik unter verschiedenen Nikotinkonzentrationen	41
4.5	Übersicht über Einzelstimulations-Graphen der a-Wellen- Experimente mit 5µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität	43
4.6	Übersicht über Einzelstimulations-Graphen der a-Wellen- Experimente mit 5µM Nikotin und 1 lx Reizintensität	44
4.7	Übersicht über die a-Wellen-Experimente mit 5µM Nikotin und 10 lx Reizintensität	45
4.8	Übersicht über die Amplituden der a-Wellen-Experimente aller Reizintensitäten mit 20µM Nikotin	46
4.9	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität	47
4.10	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 1 lx Reizintensität	48
4.11	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 10 lx Reizintensität	49

4.12	Übersicht über die Amplituden der a-Wellen-Experimente aller Reizintensitäten mit 50µM Nikotin	50
4.13	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität	51
4.14	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50µM Nikotin und 1 lx Reizintensität	52
4.15	Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50µM Nikotin und 10 lx Reizintensität	53
4.16	Übersicht über die a-Wellen-Dynamik bei verschiedenen Ni- kotinkonzentrationen und Reizintensitäten	54

III Tabellenverzeichnis

1.1	Prozentuale Verteilung der in der Ratten-Netzhaut vorkom- menden nAChR-Subtypen.	17
3.1	Zusammensetzung der Elektrolyt-Zuckerlösung (NL)	29
4.1	Aufbau der a-Wellen-Versuchsreihe	41

Abkürzungsverzeichnis

- AChR - Acetylcholinrezeptor
- Ba - Barium
- BHS - Blut-Hirn-Schranke
- bzw. - beziehungsweise
- Ca^{2+} - Calcium
- ca. - circa
- ERG - Elektroretinogramm
- EZM - Extrazellulärmatrix
- GluR - Glutamatrezeptor
- iGluR - ionischer Glutamatrezeptor
- INL - Inner nuclear layer
- IPL - Inner plexiform layer
- K^+ - Kalium
- lx - Lux
- Mg^{2+} - Magnesium
- mGluR - metabotroper Glutamatrezeptor
- mlx - Millilux
- mm - Millimeter
- mMol - Millimol
- μm - Mikrometer
- N. - Nervus
- Na^+ - Natrium
- nACh-Rezeptor - nikotinischer Acetylcholinrezeptor
- Ncl. - Nucleus
- NL - Nährlösung
- nm - Nanometer
- ONL - Outer nuclear layer
- OPL - Outer plexiform layer
- ZNS - zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Innerhalb der großen Gruppe der Vertebraten stellt die Retina, als ontogenetisch aus dem Gehirn entstandenes Gewebe, ein exzellentes Modell zum Verständnis von Aufbau und Physiologie des zentralen Nervensystems dar [Yang XL, 2004]. Das cholinerge System innerhalb der Retina weist eine starke anatomische und wahrscheinlich auch funktionelle Uniformität innerhalb der Säugetiere auf [Schmidt et al, 1987], sodass bei der experimentellen Nutzung boviner Netzhäute eine ausreichende Relevanz für die vorliegende humanmedizinische Arbeit angenommen werden kann.

1.1 Anatomische Grundlagen der Vertebratennetzhaut

Die Retina des Vertebratenorganismus ist ein komplex geschichtetes System aus Neuronen der Sehbahn, signalmodulierenden Interneuronen und Makrogliazellen [Masland RH, 2012a], [Newman E, Reichenbach A, 1996]. Ihre zentralen Funktionen bestehen in der Aufnahme und Umwandlung des Lichtsignals in elektrische und chemische Reize, die zur weiteren Verarbeitung über den N. opticus dem Gehirn zugeführt werden. So ist die Retina ein essentielles Glied des optischen Sinneseindrucks, welcher für Orientierung und Kommunikation des Vertebraten von enormer Wichtigkeit ist.

1.1.1 Entwicklung der Retina

Während der Ontogenese eines Vertebraten entsteht die Netzhaut als Teil des Gehirns aus dem zweiblättrigen Augenbecher. Das innere Blatt, auch *Stratum cerebrale* genannt, aus welchem die Neuronen der Sehbahn sowie die signalbeeinflussenden Interneuronen der Retina hervorgehen, ist zum späteren Glaskörper hin gewandt. Aus dem äußeren, später zur Choroidea und Sklera hin gelegenen Blatt, dem *Stratum pigmenti*, bildet sich das einschichtige Pigmentepithel der Retina [Schulze, 2011], [Lüllmann-Rauch, 2009].

Die Entwicklungsgeschichte der Retina erlaubt es, sie auch als Modell zur Erforschung von Strukturen und Signaltransduktionswegen des ZNS heranzuziehen.

1.1.2 Schichtung und Aufbau des Signalfusses innerhalb der Retina

Obwohl die Retina nur wenige hundert μm dick ist - beim Menschen sind es durchschnittlich 150 bis 250 μm [Goebel et al, 2001] - ist sie ein komplex gestaltetes Netzwerk unterschiedlicher Neuronen und Gliazellen. Damit in ihr die optische Sinneswahrnehmung nicht nur generiert, sondern die durch die einfallenden Lichtreize hervorgerufene elektrochemische Information bereits basal verarbeitet werden kann, bedarf es eines kompliziert aufgebauten Zellnetzwerkes [Van Essen et al, 1992], [Field GD, Chichilnisky EJ, 2007], welches im Weiteren näher erläutert werden soll. Im Hinblick auf den Schwerpunkt dieser Arbeit, den Einfluss von Nikotin auf die im ERG abgebildeten Informationsflüsse innerhalb der Netzhaut zu untersuchen, stehen dabei ausgewählte Signalwege innerhalb der Retina und die Relevanz nikotinerger Rezeptoren für diese im Fokus.

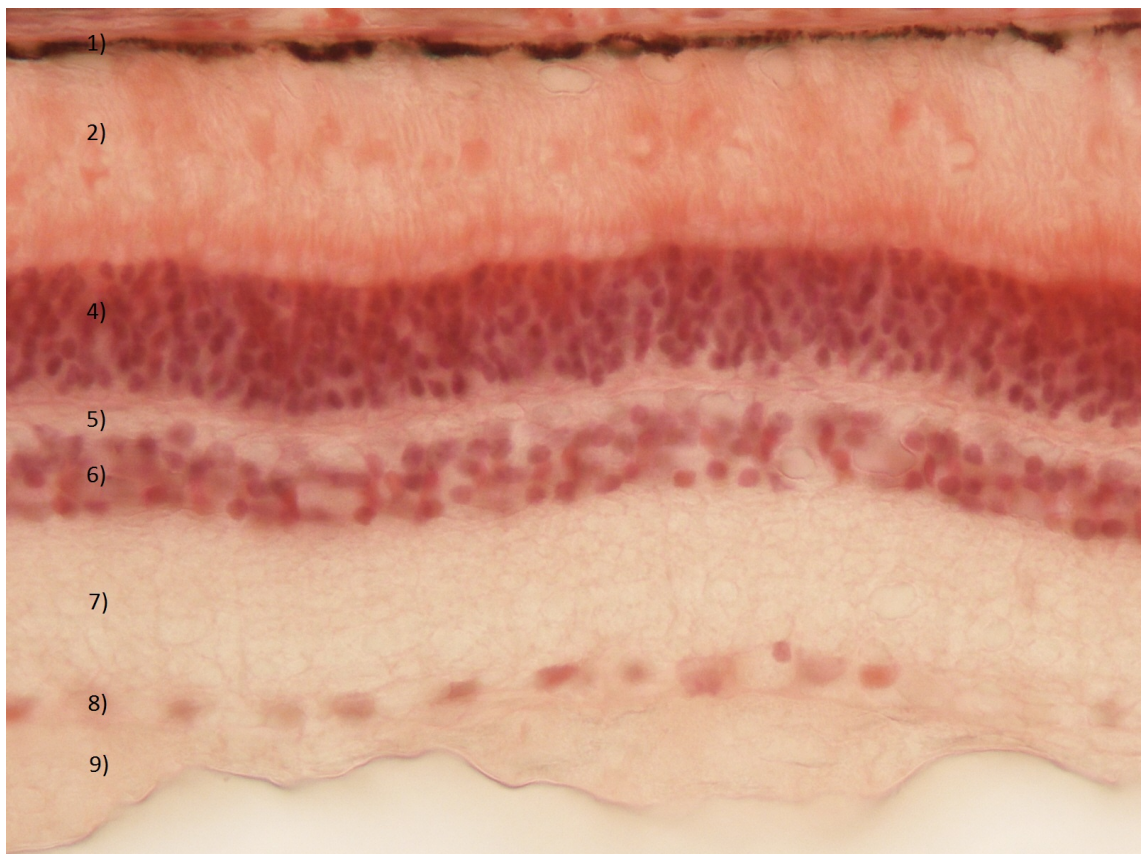


Abb. 1.1: **Schichtaufbau der Retina.**

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Reinhard Windoffer im Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen aufgenommen. 60-fache Vergrößerung.

Nachfolgende allgemeine Erläuterungen des Schichtaufbaus der Retina - wenn nicht anders gekennzeichnet - verändert nach dem Taschenlehrbuch Histologie von R. LÜLLMANN-RAUCH [LÜLLMANN-RAUCH, 2009]

- 1) **Stratum pigmentosum**: einschichtiges, kubisches Pigmentepithel.
- 2) **Stratum segmentorum externorum et internorum**: Schicht der Fortsätze der Photorezeptorzellen. Je nach Zelltyp ragen Zapfen oder Stäbchen bis ins Pigmentepithel hinein.
- 3) **Stratum limitans externum**: äußere Grenzschrift (nicht abgebildet), gebildet durch die nach außen gerichteten Zellfortsätze der Müller-Glia. Diese sind durch Zonulae adherentes miteinander verbunden. Die Schicht wird durch die Fortsätze der Photorezeptorzellen siebartig durchbrochen.
- 4) **Stratum nucleare externum, ONL**: äußere Körnerschicht (outer nuclear layer). Diese enthält die Perikaryen der Photorezeptorzellen inklusive Zellkern. Untereinander sind sie teilweise durch elektrische Synapsen verbunden [Li et al., 2012].
- 5) **Stratum plexiforme externum, OPL**: äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer). In dieser finden sich multiple synaptische Kontakte in Form invaginierten Ribbonsynapsen zwischen den Axonen der Photorezeptorzellen und den Dendriten der Bipolarzellen. Ebenso eingebunden in diese Ribbonsynapsen sind die Axone der Horizontalzellen. Letztere liegen mit nur ca. 16 nm Abstand näher an der präsynaptischen Membran der Photorezeptorterminalen als die Bipolardendriten, welche 130 bis 640nm von ihr entfernt liegen. Die Morphologie der Ribbonsynapsen unterscheiden sich zwischen Stäbchen- und Zapfensystem [Rao-Mirotznik et al., 1995]. Zudem kommen in der äußeren plexiformen Schicht auch nicht-invaginierte, chemische Synapsen sowie elektrische gap junctions vor [Kolb H, 1977].
- 6) **Stratum nucleare internum, INL**: innere Körnerschicht (inner nuclear layer). Hier befinden sich die Perikaryen der Bipolarzellen, Horizontal- und Amakrinzellen, sowie der Müller-Glia mit ihren jeweiligen Zellkernen.
- 7) **Stratum plexiforme internum, IPL**: die innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer) beinhaltet chemische Synapsen zwischen den Axonen der Bipolarzellen und den Dendriten der Amakrinzellen und der Ganglienzellen, welche strukturell ebenfalls zu den Ribbonsynapsen zählen. Amakrinzellen bilden in dieser Schicht auch untereinander Synapsen aus [Dowling JE, Boycott BB, 1966]. Die IPL lässt sich in verschiedene Sublaminae, beispielsweise eine ON-Sublamina, eine OFF-Sublamina und eine Stäbchen-Sublamina, unterteilen [Waessle H, Boycott BB, 1991]. Die Synapsendichte ist in dieser Schicht der Retina besonders hoch.
- 8) **Stratum ganglionicum, GCL**: Ganglienzellschicht (ganglion cell layer). Sie enthält die Perikaryen der Ganglienzellen inklusive ihrer Zellkerne. Außerdem liegen hier noch Perikarya einiger Amakrinzellen, sogenannter „displaced“ Amakriner [Waessle H, Boycott BB, 1991].
- 9) **Stratum neurofibrarum**: die Nervenfaserschicht wird durch die Axone der Ganglienzellen gebildet, die radiär zur Papilla nervi optici ziehen, um sich dort zum

Nervus opticus zu bündeln.

10) **Stratum limitans internum**: innere Grenzsicht (nicht abgebildet). Die Endfüßchen der nach innen gerichteten Fortsätze der Müller-Glia bilden diese Schicht und formen zur Abgrenzung gegenüber dem Glaskörper eine Basallamina.

Das Grundgerüst der Netzhaut stellen die Müller-Gliazellen dar, welche zur Familie der Makroglia gehören. Die zahlreichen Fortsätze der Müller-Zellen umgeben und stützen die Neuronen der Retina nicht nur, sie regulieren auch die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM), indem sie beispielsweise deren Ionenkonzentrationen und pH-Wert im Gleichgewicht halten, sowie für die Neuronen wichtige Stoffwechselprodukte liefern. Sie können Neurotransmitter aufnehmen und beeinflussen so die Aktivität und Erregbarkeit retinaler Nervenzellen, sind also auch für das neuronale Signaling von essentieller Bedeutung [Bringmann et al, 2006], [Newman E, Reichenbach A, 1996], [Newman EA, Zahs KR, 1998]. Sie tragen durch ihre Funktion auch zur Generation des elektroretinographischen Signals bei [Stockton RA, Slaughter MM, 1989].

Die komplex gestaltete Signalfortleitung innerhalb der Netzhaut kann vereinfachend in einen vertikalen Informationsfluss von Photorezeptoren über Bipolarzellen zu Ganglienzellen und einen horizontalen (bzw. lateralen) Informationsfluss unter Beteiligung von Horizontal- und Amakrinzellen unterteilt werden [Daw et al, 1990], [Masland RH, 2001]. Aufgabe der vertikalen Signalfortleitung innerhalb der Retina ist vor allem die Weiterleitung des optischen Reizes bis zum Gehirn, ihr Hauptneurotransmitter ist Glutamat. Sowohl Photorezeptorzellen als auch Bipolar- und Ganglienzellen nutzen Glutamat für ihr Signaling. Die laterale Signaltransduktion, deren Hauptaufgabe vor allem die Modulation des vertikalen Signals ist, stützt sich insbesondere auf die Neurotransmitter GABA, Glycin und Acetylcholin [Yang XL, 2004], [Kamermans M, Werblin F, 1992], [Endeman et al, 2012], [Marc RE, 1988], [O'Malley et al, 1992]. Dopamin beeinflusst in der Retina unter anderem die Einspeisung der Informationen des Stäbchensystems in das Zapfensystem durch die Projektionen von Stäbchenamakrinen auf Zapfenbipolare [Daw et al, 1990]. Zudem findet in der Vertebraten-Retina auch elektrische Informationsweitergabe über gap junctions statt [Voelgyi et al., 2013].

In der vorliegenden Arbeit soll der Fokus auf dem cholinergen Anteil der Signaltransduktion und seiner Bedeutung für vertikalen und lateralen Informationsfluss in der Retina liegen, da alle experimentellen Versuche mit Nikotin, einem klassischen Agonist nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR), durchgeführt wurden. In vivo stellt Acetylcholin (ACh) einen wichtigen Neurotransmitter dieses cholinergen Anteils dar. Es ist vor allem in der lateralen Signaltransduktion der Retina präsent, eine Hauptquelle des ACh sind die Starburst-Amakrinzellen, welche in Kapitel

1.1.3 beschrieben werden. In mindestens drei verschiedenen neuronalen Zelltypen der Retina wurden bisher nikotinische Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen: In Bipolarzellen [Hamassaki-Britto et al, 1994], sowie in Amakrin- und Ganglienzellen [Keyser et al, 1988], [Yamada et al, 2003]. Durch die variable Kombination verschiedener α - und β -Untereinheiten bilden diese Zellen eine Vielzahl von Subtypen des nAChR aus, worauf in Kapitel 1.2 näher eingegangen werden soll [Marriott et al, 2005].

1.1.3 Rolle der einzelnen Neuronen im retinalen Kommunikationsnetzwerk

Photorezeptoren schütten vor allem in der Dunkelheit Glutamat aus, was auch als Dunkelstrom bezeichnet wird. Sie formen Ribbonsynapsen mit Horizontal- und Bipolarzellen (siehe Kapitel 1.1.2). Glutamaterge Rezeptoren finden sich in diesen Synapsen sowohl prä- als auch postsynaptisch. Die Ausstattung einer Zelle mit den jeweiligen Subtypen von Glutamatrezeptoren (GluR) bestimmt dabei die Wirkung des Glutamats auf sie. An der präsynaptischen Membran der Photorezeptoren finden sich metabotrope GluR (mGluR), bei Säugetieren beispielsweise mGluR8 [Koulen et al, 1999], deren Aktivierung den Ca^{2+} -Einstrom in die Photorezeptor-terminalen reduziert und somit die eigene Glutamatausschüttung drosselt. Dieses negative Autofeedback könnte z.B. ein Schutzmechanismus gegenüber Glutamatbedingter Exzitotoxizität darstellen [Dhingra A, Vardi N, 2012].

Bipolarzellen weisen ca. 13 bisher bekannte Subtypen auf, eine Stäbchen-Bipolarzelle und 12 Typen von Zapfenbipolaren [MacNeil et al., 2004], [Waessle et al, 2009]. Die Diversität der Zapfenbipolaren ist Grundlage der Entstehung paralleler Informationskanäle für verschiedene Teilinformationen des optischen Sinneseindrucks. Ein Zapfen ist mit mehreren Subtypen von Bipolarzellen verbunden, welche durch ihre jeweilige Rezeptorausstattung und Funktion je eine andere Komponente des Zapfensignals weiterleiten können [Masland RH, 2012a].

Generell machen die synaptischen Kontakte zu den Photorezeptoren einen Großteil des Inputs der Bipolarzellen aus. Hierbei ist die unterschiedliche Ausstattung an GluR auf der postsynaptischen Membran von Bipolaren wichtig für die konträre Reaktion von ON- und OFF-Bipolarzellen auf Lichtstimulation. ON-Bipolarzellen depolarisieren auf Lichtstimuli hin, OFF-Bipolarzellen hyperpolarisieren bei Licht und depolarisieren in der Dunkelheit. Stark vereinfacht leiten dabei ionotrope GluR (iGluR) den jeweiligen Aktivitätszustand der Photorezeptoren auf OFF-Bipolare weiter (sign-reserving), während ein Zusammenspiel verschiedener mGluR und iGluR die Depolarisation der ON-Bipolaren bei lichtinduzierter Hyperpolarisation der Photorezeptoren vermittelt (sign-inversing) [Slaughter MM, Miller RF, 1981], [Yang XL, 2004].

Im Rahmen des lateralen Signalings werden Bipolare jedoch auch durch Horizontal-

und Amakrinzellen beeinflusst [Masland RH, 2012a]. Die Expression verschiedener nAChR-Subtypen [Hamassaki-Britto et al, 1994] und metabotroper Acetylcholinrezeptoren (mAChR) [Strang et al, 2010] auf den Bipolaren ermöglichen beispielsweise die Rezeption cholinergischer Signale von Starburst-Amakrinzellen und vermitteln so deren modulatorische Wirkung auf die Neurotransmitterausschüttung der Bipolarzellen. Werden nAChR auf den Axonterminalen von Bipolaren auf diese Weise aktiviert steigt die synaptische Glutamatausschüttung aus den Terminalen [Vizi ES, Lendvai B, 1999]. Diese Axonterminalen kontaktieren in der IPL die Dendriten von Ganglien- und weiteren Amakrinzellen. Zapfenbipolare können direkt auf Ganglienzellen projizieren, ihr Output wird dabei durch Amakrinzellen, z.B. Starburst-Amakrine, GABAerge und dopaminerge Amakrine moduliert [Gábel et al, 2000], [Contini et al, 2010]. Stäbchenbipolare müssen ihre Informationen über AII-Amakrinzellen auf die Ganglienzellen des Zapfensystems leiten, um so die Information des phylogenetisch jüngeren Stäbchensystems der Projektion ins Gehirn zugänglich zu machen [Masland RH, 2001]. Die Erregung nachgeschalteter Ganglien- respektive Amakrinzellen durch Bipolare erfolgt wiederum glutamaterg [Dhingra A, Vardi N, 2012]. Eine Subgruppe von Bipolarzellen, beispielsweise in Netzhäuten der Katze, besitzt zusätzlich die Fähigkeit der GABA-Produktion und -Ausschüttung, wodurch die Zellen möglicherweise Feedbacksignale unspezifisch an benachbarte Zelldendriten geben können, in dieser Arbeit soll jedoch nicht näher darauf eingegangen werden [Kao et al, 2004].

Ganglienzellen bilden die neuronale Endstrecke des retinalen Informationsflusses. Es existieren in dieser Zellgruppe wiederum zahlreiche Subtypen [Rockhill et al, 2002], [Taylor WR, Smith RG, 2011]. Die Parallelschaltung mehrerer Teilinformationen des Sinneseindrucks wird so bis zur Verarbeitung im Gehirn aufrecht erhalten. Zur Rezeption des glutamatergen Outputs von Bipolarzellen verfügen Ganglienzellen über exzitatorische iGluR und mGluR, deren jeweilige Blockade durch pharmakologische Antagonisten zur Reduktion oder zur Auslöschung lichtinduzierter und lichtunabhängiger Impulsweiterleitung führt [Cohen ED, Miller RF, 1994]. Die genaue Funktion insbesondere der metabotropen GluR ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht und scheint in vielen Aspekten speziesspezifisch zu sein [Yang XL, 2004].

Ganglienzellen exprimieren zudem ionotrope GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sowie metabotrope GABA_B-Rezeptoren. Die Funktionen des GABAergen Inputs sind vielfältig, als Beispiele können die Suppression der Ganglienzellantwort auf Lichtstimuli [Bolz et al, 1985] sowie die Richtungsselektivität einiger Ganglienzellen genannt werden [YOSHIDA ET AL, 2001].

Auch mit cholinergen Rezeptoren sind Ganglienzellen ausgestattet. Mittels spezifischer Antikörper konnten alle mAChR-Subtypen M1 bis M5 auf ihnen gefunden werden, durch deren Aktivierung die Grundaktivität und die Aktionspotentialrate der Zellen

beeinflusst wird [STRANG ET AL, 2010]. A. AMES und D.A. POLLEN postulierten bereits 1969, dass sich auf Ganglienzellen auch nikotinische Acetylcholinrezeptoren finden [Ames A, Pollen DA, 1969]. Im Rahmen mehrerer Arbeiten konnten seither Subtypen der nAChR-exprimierenden Ganglienzellen und der durch sie gebildeten nAChR spezifiziert werden [Baldrige WH, 1996], [Keyser et al, 2000], [Reed et al, 2002], [Kim HJ, Jeon CJ, 2014]. nAChR konnten unter anderem auf richtungsselektiven Ganglienzellen identifiziert werden [Reed et al, 2002, Kim HJ, Jeon CJ, 2014]. Die Bindung cholinergischer Agonisten wie Nikotin an nAChR der Ganglienzellen beeinflusst deren Aktivität beispielsweise über eine Steigerung des Ca^{2+} -Einstromes [Baldrige WH, 1996]. Neben der Expression nikotinischer AChR konnte auch die eigenständige Synthese von Acetylcholin in einigen Ganglienzellen nachgewiesen werden, bisher ist deren Bedeutung innerhalb des retinalen Signalings jedoch weitgehend unklar [Yasuhara et al, 2003].

Horizontalzellen exprimieren - je nach Kontakt zu Stäbchen oder Zapfensubtypen - verschiedene iGluR (vom AMPA- und Kainat-, jedoch nicht vom NMDA-Typ [Blanco R, de la Villa P, 1999], [Kreitzer et al, 2009]) und mGluR auf ihren Dendriten, jedoch auch diffus verteilt auf den Somata. Glutamat scheint daher nicht nur für die synaptische Transmission zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen wichtig zu sein, sondern auch andere Zellfunktionen regulieren zu können. An der gleichen Synapse können iGluR eine Depolarisation der Horizontalzellen vermitteln, während mGluR das Ausmaß der Aktivierung modulieren [Yang XL, 2004].

Untereinander sind Horizontalzellen auch intensiv elektrisch gekoppelt, was bewirkt, dass eine einzelne Horizontalzelle durch den Input vieler Photorezeptoren beeinflusst wird [Kamermans M, Werblin F, 1992].

Mit der Ausschüttung ihres Neurotransmitters GABA erfüllen die Horizontalzellen in der Retina wichtige Regulationsfunktionen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Vermittlung eines negativen Feedbackmechanismus gegenüber den Photorezeptoren. ENDEMAN et al. untersuchten diesen Einfluss der Horizontalzellen auf Zapfenterminalen und postulierten als Feedbackmechanismus auf unterschiedliche Arten generierte Chlorideinströme in die Terminalen: Einerseits über einen Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanal, welcher über einen ephaptisch vermittelten Ca^{2+} -Strom reguliert wird, andererseits über ionotrope GABA_A - und GABA_C -Rezeptoren [Endeman et al, 2012], [Kamermans M, Fahrenfort I, 2004]. Zudem scheint der pH-Wert im synaptischen Spalt zwischen Horizontalzelle und postsynaptischer Photorezeptorterminal eine Rolle für den Feedback-Mechanismus zu spielen [Thoreson WB, Mangel SC, 2012]. Horizontalzellen bilden auch selbst präsynaptische GABA_A -Rezeptoren aus, über welche das von ihnen ausgeschüttete GABA im Sinne einer Autofeedback-Schleife wirken und damit die eigene Antwort auf Lichtstimuli verändern kann [Kamermans M, Werblin F, 1992], [Yang XL, 2004].

Entgegen der lange Zeit vorherrschenden Überzeugung, dass der Einfluss von Horizontalzellen auf Bipolarzellen rein über ihren Feedback auf Photorezeptorterminalen vermittelt würde, ist mittlerweile bekannt, dass sie die Bipolaren auch direkt beeinflussen. Die Informationstransmission der Horizontalzell erfolgt dabei signalerhaltend auf ON-Bipolare und signalumkehrend auf OFF-Bipolare [Sakuranaga M, Naka K, 1985], [Thoreson WB, Mangel SC, 2012].

Cholinerge Rezeptoren auf Horizontalzellen konnten YAMADA et al. (M3-mAChR in Affen-Retinae) und CHEON et al. (transiente Expression von M2-mAChR in sich entwickelnden oder regenerierenden Molch-Retinae) immunhistochemisch nachweisen, sie identifizierten dort jedoch keine nikotinischen AChR [Cheon et al, 2001], [Yamada et al, 2003]. DEPLANO et al. erwähnten auch die Expression nikotinischer AChR durch Horizontale, wenn diese sich auch von nAChR auf Bipolaren und anderen retinalen Zelltypen unterschieden [Deplano S, 1988]. MYHR und REYNOLDS bestätigten 1996 einen Effekt von Nikotin auf Horizontalzellen. Sie beobachteten, dass sich durch Nikotin das elektrische Kopplungsverhalten zwischen Horizontalzellen veränderte, führten dies allerdings auf eine Stimulation nAChR auf dopaminergen Amakrinzellen zurück. Erst eine erhöhte Dopaminausschüttung aus diesen Zellen führe dabei zur Reduktion des Ionenstroms durch die gap junctions der Horizontalen und somit zu ihrer Entkopplung [Myhr KL, McReynolds JS, 1996].

Amakrinzellen sind Interneurone mit stark verzweigter, dendritischer Morphologie, welche in diversen Subpopulationen in der INL und der Ganglienzellschicht der Retina vorkommen. Subklassifiziert werden sie beispielsweise anhand ihrer Morphologie, ihrer Lage innerhalb der Netzhaut oder ihrer Neurotransmitter-Ausstattung [Waessle H, Boycott BB, 1991], [Masland RH, 2012b]. Alle Subtypen erhalten glutamatergen Input von Bipolarzellen, um ihren vielfältigen Funktionen nachzukommen. Für dessen Rezeption exprimieren sie verschiedene iGluR und mGluR [Yang XL, 2004]. Jedoch erhalten einzelne Amakrinzellen auch Informationen anderer Amakrinzell-Subgruppen in Form verschiedenster Neurotransmitter oder gap junctions [Masland RH, 2012b].

Von besonderer Relevanz für die cholinerge Signaltransmission innerhalb der Retina sind die Starburst-Amakrinzellen (SAC), welche sowohl GABA als auch Acetylcholin als Neurotransmitter ausschütten [O'Malley et al, 1992], [Ford KJ, Feller MB, 2012]. Sie kommen als zwei funktionell gegensätzliche Populationen vor: Typ a-SAC kommen mit ihren Somata in der INL zu liegen, sie sind „normal“ lokalisiert. Ihre Axonfortsätze verzweigen sich in der Sublamina a der IPL, jener Schicht, die der INL zugewandt liegt und der Kontaktbildung der OFF-Fraktion von Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen dient. Die Somata von Typ b-SAC liegen in der GCL, weshalb manche Autoren sie auch als „displaced Amakrine“ bezeichnen. Ihre Fortsätze projizieren in die Sublamina b der IPL, jener Schicht, die der GCL zugewandt liegt und der Kontaktbildung der

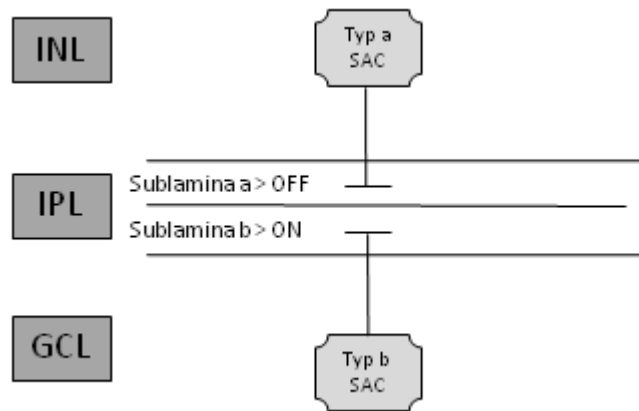


Abb. 1.2: **Zwei Populationen der Starburst-Amakrinzellen**

Zum besseren Verständnis der zwei SAC-Populationen wird die Lage ihrer Somata und die Projektionsschicht innerhalb der inneren plexiformen Schicht (IPL) schematisch dargestellt. Somata der Typ-a SAC liegen in der inneren Körnerschicht (INL), die der Typ b-SAC befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL), weshalb sie auch „displaced Amakrinzellen“ genannt werden. Axone der Typ a-SAC verzweigen sich in Sublamina a, Fortsätze der Typ b-SAC in Sublamina b der IPL.

ON-Fraktion von Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen dient [Famiglietti EV, 1991]. Typ b-SAC sind zahlreicher und bilden ein dichteres Netzwerk an Fortsätzen in der IPL als Typ a-SAC [Yamada et al, 2003].

Obwohl Starburst-Amakrinzellen während der pränatalen und frühen postnatalen retinalen Entwicklung neben GABA_A-Rezeptoren auch selbst viele nAChR exprimieren [Zheng et al, 2004], obliegt ihnen in der adulten Retina vielmehr die Rolle des Hauptproduzenten endogenen Acetylcholins [Hayden et al, 1980], [Voigt T, 1986], [Schmidt et al, 1987]. Die Bildung von AChR stellen die Starburst-Amakrinzellen postnatal fast vollständig ein [Keyser et al, 2000] [Masland RH, 2005]. Über ihre GABA- und Acetylcholinausschüttung wirken sie auf die GABA_A-Rezeptoren sowie auf nikotinische und muskarinische AChR ihrer Zielzellen, der Ganglienzellen, Bipolarzellen, anderer Amakrinzellen und Horizontalen [Dowling JE, Boycott BB, 1966]. Neuere Forschungsansätze, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll, weisen auf die herausragende Bedeutung der cholinergen Transmission durch Starburst-Amakrinzellen sowie nikotinischer AChR auf Amakrin- und Ganglienzellen für die prä- und frühe postnatale Entwicklung der Retina hin [Ford KJ, Feller MB, 2012]. In der adulten Retina bleibt die explizite Funktion des cholinergen Outputs von Amakrinen auf die Zielzellen - im Gegensatz zur relativ gut bekannten Funktion GABAerger Transmission durch Amakrinzellen - jedoch trotz extensiver Forschung bisher weitgehend ungeklärt [Taylor WR, Smith RG, 2012]. Die Ausschüttung des Neurotransmitters GABA übernehmen neben den Starburst-

Amakrinen weitere GABAerge Amakrinzellen [Masland RH, 2012b].

1.1.4 Nikotinerge Transmission in der Retina

Die Funktionen der cholinergen Transmission innerhalb der Retina sind bis heute nicht ausreichend geklärt [Masland RH, 2012b], doch die Entdeckung der Starburst-Amakrinzellen (SAC) als die cholinergen Neurone der Retina [O'Malley et al, 1992] und der Verteilung nikotinischer AChR auf Bipolar-, Ganglien-, Horizontal- und Amakrinzellen [Dmitrieva et al, 2007], [Deplano S, 1988] ermöglichen eine Skizzierung des cholinergen bzw. nikotinergen Signalings, welcher für die vorliegende Arbeit von Interesse ist. In Abb. 1.3 ist die cholinerge Signaltransduktion in der Retina zudem graphisch skizziert.

- Die ACh-Produzenten innerhalb der Retina, die SAC werden hauptsächlich (zu ca. 68%) durch direkte Kontakte mit Axonen der Zapfen-Bipolarzellen innerhalb von Ribbonsynapsen aktiviert [Yamada et al, 2003]. Hier werden sie glutamaterg erregt, ihre Neurotransmitter GABA und ACh auszuschütten. Die ACh-Ausschüttung wird dabei wahrscheinlich insbesondere durch die Aktivierung von AMPA-Glutamatrezeptoren getriggert, die ein rasches Ansprechen der SAC auf lichtinduzierte Glutamatstimuli aus Bipolarterminalen ermöglichen [Linn et al, 1991], [Firth et al, 2003]. Direkte Informationen von Stäbchenbipolaren erhalten nur Typ a-SAC, da Typ b-SAC nicht mit ersteren verbunden sind. Jedoch kommunizieren SACs auch mit Stäbchen-Amakrinen, welche indirekt Informationen der Stäbchenbipolaren an die SACs weitertragen [Famiglietti EV, 1991]. Außer durch Bipolare erhalten die Starburst-Zellen also auch Input durch nichtcholinerge Amakrinzellen (zu ca. 18%). Auch untereinander kommunizieren SACs [Yamada et al, 2003], [Millar TJ, Morgan IG, 1987], [Keyser et al, 2000].
- In partieller Kongruenz zu Studienergebnissen von FAMIGLIETTI und DMITRIEVA et al. [Famiglietti EV, 1991, Dmitrieva et al, 2003], postulierten YAMADA et al., dass die Fortsätze der Starburst-Amakrinzellen wiederum synaptisch auf Axonterminalen der Bipolarzellen (anteilig ca. 15%), auf Ganglienzellendriten (anteilig ca. 48%) und Fortsätze anderer Amakrinzellen - nicht-cholinergen Amakriner (anteilig ca. 15%) sowie cholinergen SACs (anteilig ca. 7%) - projizieren. Diese Zielzellen, bzw. einige ihrer Subpopulationen, exprimieren zur Rezeption des cholinergen Signals der SAC sowohl muskarinische als auch nikotinische AChR [Yamada et al, 2003], [Dmitrieva et al, 2007]. Laut den Arbeiten von YAMADA et al. registrieren Zapfenbipolare den cholinergen Input von Starburst-Amakrinen sowohl über nikotinische als auch muskarinische AChR. Zwischen SAC und den Axonterminalen von Stäbchenbipolaren konnten sie keine niko-

tinischen Rezeptoren oder nachweisliche direkte Kontakte finden, sodass sie schlossen, dass Starburstzellen nicht direkt auf Stäbchenbipolare projizieren [Yamada et al, 2003]. Starburst-Amakrine und Bipolarzellen scheinen sich also jeweils wechselseitig in ihrer Aktivität zu beeinflussen.

- Nikotinische AChR beschrieben DEPLANO et al. auch auf Horizontalzellen [Deplano S, 1988], es konnte jedoch kein Hinweis auf direkte Kontakte zwischen SAC und Horizontalzellen gefunden werden.
- Ganglienzellen erhalten den Hauptanteil des SAC-Outputs [Famiglietti EV, 1991], [Yamada et al, 2003]. Sowohl über die GABA-Rezeptoren als auch die nikotinischen und muskarinischen AChR auf der postsynaptischen Membran der Ganglienzellen können Starburst-Amakrine deren Aktivität direkt beeinflussen (siehe Kapitel 1.1.3). Ihr Acetylcholin hat dabei unterschiedliche Effekte auf die verschiedenen Subpopulationen von Ganglienzellen, auf einige kann es über nAChR exzitatorisch wirken [Schmidt et al, 1987], [Ikeda H, Sheardown MJ, 1982], [Yamada et al, 2003]. Indirekte Beeinflussung der Ganglienzellaktivität besteht zusätzlich über die Verbindungen zwischen Starburst-Amakrinen und Bipolarzellen sowie den inhibitorischen, glycinergen und GABA-ergen Amakrinzellen, welche wiederum auf die Ganglienzellen projizieren. Werden die inhibitorischen Amakrinen vom Acetylcholin der SAC über ihre nAChR aktiviert, bewirkt dies entweder eine direkte Inhibition nachgeschalteter Ganglienzellen oder deren Disinhibition, falls eine weitere inhibitorisch wirkende Zelle zwischengeschaltet ist [Dmitrieva et al, 2001], [Dmitrieva et al, 2003], [Dmitrieva et al, 2007], [Yamada et al, 2003].
- Neben direkten synaptischen Kontakten zu SACs scheint ACh in einigen Spezies auch ephaptisch auf AChR der Zielzellen wirken zu können [Yamada et al, 2003].
- Nicht nur endogen produziertes ACh, sondern auch zugeführte Agonisten wie Nikotin können über ihre Wirkung auf nAChR der SAC-Zielzellen, deren Aktivität und Neurotransmitterausschüttung modulieren [Sheardown MJ, 1997], [Jurkles et al, 1996], [Schmidt et al, 1987], [Dmitrieva et al, 2007], [Ames A, Pollen DA, 1969].
- Nikotinerge Stimulation durch Starburst-Amakrine kann die Neurotransmitterausschüttung glycinergen und nichtcholinergen, beispielsweise GABAergen oder dopaminergen Amakrinzellen verstärken [Neal et al, 2001], [Myhr KL, McReynolds JS, 1996]. Auf die Rolle der nikotinerger Anregung dopaminergen Amakriner bei Veränderungen im ERG wird in der Diskussion der Ergebnisse nochmals eingegangen (siehe Kapitel 5).

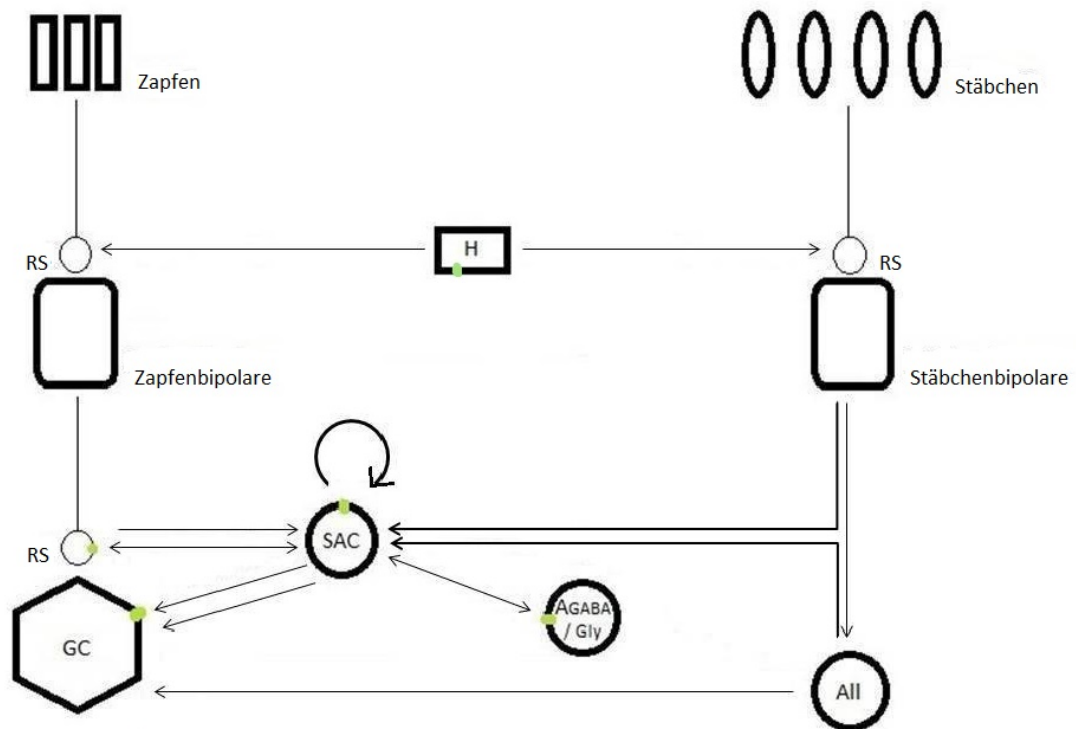


Abb. 1.3: Das cholinerge Netzwerk innerhalb der Retina und nAChR.
 Photorezeptoren projizieren mit Ribbonsynapsen (RS), in welche die Axone der Horizontalzellen (H) mit eingebunden sind, glutamaterg auf Bipolarzellen. Zapfenbipolare bilden ebenfalls Ribbonsynapsen mit Ganglienzellen (GC) aus, in welche die Axone von Amakrinen mit eingebunden sind. Stäbchenbipolare kontaktieren Ganglienzellen nicht direkt, sondern über dopaminerge AII-Amakrinen (AII). Starburst-Amakrinen (SAC) sind Hauptquelle des ACh innerhalb der Retina. Auf den Terminalen der ON-Zapfenbipolaren sowie auf Ganglienzellen (GC), auf GABA-/glycinergen Amakrinen ($A_{GABA/Gly}$) und teilweise auf Starburst-Amakrinen selbst befinden sich nAChR. Zudem exprimieren verschiedene Zellen mAChR. Einen Einfluss auf die Aktivität der SAC nehmen wiederum Bipolare, Ganglienzellen, nicht-cholinerge Amakrine und weitere SAC.

- Die Bedeutung der direkten Aktivierung von Horizontalzellen über eine Stimulation ihrer nAChR bleibt - im Gegensatz zu ihrer indirekten Beeinflussung durch dopaminerge Amakrine, welche in Kapitel 1.1.3 genannt wurde - bisher offen. Sie könnte für die Effekte von Nikotin auf das ERG bedeutsam sein, worauf in Kapitel 5 erneut eingegangen wird.

1.2 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Gruppe der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Es sind Pentamere aus fünf Untereinheiten. Es wird zwischen verschiedenen nAChR-Typen unterschieden, dem muskulären nAChR an der motorischen Endplatte und dem neuronalen AChR, welcher im autonomen Nervensystem sowie in Gehirn, Rückenmark und Retina vorkommt. Die genannten Typen unterscheiden sich in der Konstellation ihrer Untereinheiten, wodurch sie differente physiologische und pharmakokinetische Eigenschaften innehaben [Sharples GV, Wonnacott S, 2001]. Der neuronale nAChR setzt sich ausschließlich aus α - und β -Untereinheiten zusammen, kombiniert werden die Subtypen α_2 bis α_{10} sowie β_2 bis β_4 . Retinale Zellen bilden nAChR aus den Untereinheiten α_2 bis α_8 sowie β_2 bis β_4 [Gotti et al, 1997], [Moretti et al, 2004], [Marriott et al, 2005]. Ein Nachweis für die Expression der Untereinheiten α_9 und α_{10} konnte im Rahmen der durchgeführten Literaturrecherche nicht gefunden werden.

Die Polypeptidkette jeweils einer Untereinheit gliedert sich in vier hydrophobe Transmembranhelices (M1-M4), das jeweils extrazellulär gelegene N-terminale und C-terminale Ende und eine intrazelluläre Domäne, welche die Transmembranhelices M3 und M4 miteinander verbindet (siehe Abbildung 1.3, B.).

Der Rezeptor verfügt über zwei Bindungsstellen für den Agonist Acetylcholin, die sich in der Interface-Region zwischen α - und β -Untereinheiten befinden (siehe Abb. 1.3, C.). Die Bindung zweier Agonist-Moleküle bewirkt eine Konformationsänderung. Dadurch öffnet sich die zentrale Pore des Rezeptors zu einem unselektiven Kationenkanal, der Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle und K^+ heraus strömen lässt [Sharples GV, Wonnacott S, 2001]. Die ladungsdifferenten Ionenströme führen dabei zur Depolarisation entlang der Neuronenmembran [Dani JA, 2001]. Ist der nAChR an der präsynaptischen Membran von Axonterminalen lokalisiert, können relevante Calciumeinströme durch nAChR die Neurotransmitter-Ausschüttung aus den Terminalen zudem unabhängig von der Depolarisation der Zellmembran modulieren [Vizi ES, Lendvai B, 1999], [Dmitrieva et al, 2001], [Dani JA, 2001].

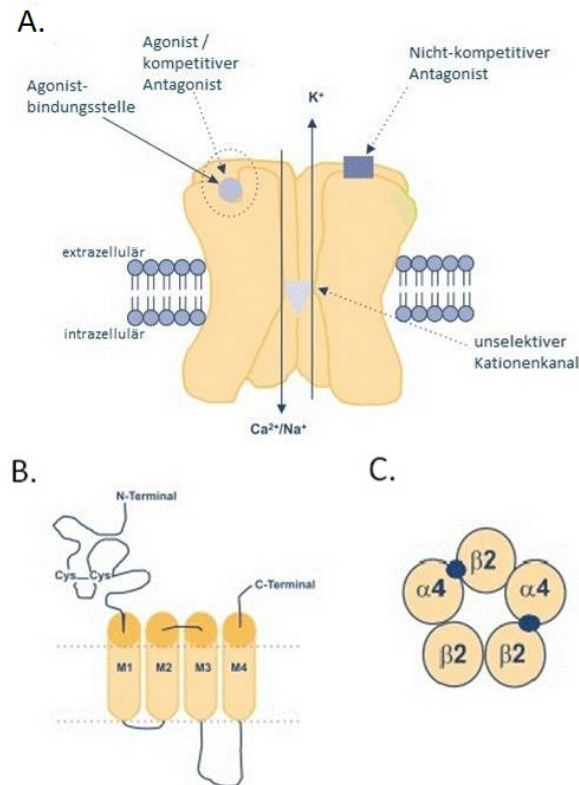


Abb. 1.4: **Aufbau des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.**

Abgebildet sind der nAChR in aktivem Konformationszustand mit geöffnetem Kationenkanal und schematischer Darstellung seiner Bindungsstellen (**A.**). Zudem wird der Aufbau einer Untereinheit (**B.**), sowie die Anordnung der Untereinheiten zum Pentamer (**C.** hier am Beispiel eines $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptors) dargestellt. Verändert nach [Sharples GV, Wonnacott S, 2001].

Neben dem inaktiven Konformationszustand ohne Ligandenbindung (Kationenkanal geschlossen) und dem aktiven nach Bindung des Agonisten (Kationenkanal geöffnet) gibt es weitere Konformationszustände (siehe Abb. 1.4).

Bei kontinuierlichem Angebot an Agonist kann der nAChR desensibilisieren und trotz gebundenem Liganden in seinem inaktiven Zustand mit geschlossenem Ionenkanal verbleiben [Ochoa et al, 1989]. Dies führt zum Verlust der physiologischen Rezeptorantwort auf cholinerge Reize hin. Eine Desensibilisierung kann durch ACh genauso wie durch Nikotin hervorgerufen werden [Quick W, Lester RAJ, 2002]. Die Affinität eines nAChR gegenüber Aktivierung oder Desensibilisierung sowie die Geschwindigkeit seiner Desensibilisierung oder Rehabilitation hängt dabei unter anderem von der Subtypen-Konstellation seiner Untereinheiten ab. Auch die Konzentration des angebotenen Agonisten (ACh oder Nikotin) und die Dauer seiner Applikation spielen eine Rolle. Auf molekularer Ebene unterliegt die Desensibilisierung des nAChR weiteren komplexen Vorgängen, wie zum Beispiel Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen und

Phosphorylierung des Rezeptors [Quick W, Lester RAJ, 2002], [Fenster et al, 1997], [Galzi JL, Changeux JP, 1995].

Nikotinische AChR erfüllen im ZNS folgende bisher bekannte Funktionen:

- Viele nAChR befinden sich an der präsynaptischen Membran von Axonterminalen. Aufgrund ihrer großen Ca^{2+} -Permeabilität führt ihre Aktivierung zu einem nennenswerten Ca^{2+} -Influx in die Terminale. Darüber modulieren nAChR die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter, wie Glutamat und GABA, aus den Terminalen [Neal et al, 2001], [Dmitrieva et al, 2007], [Wonnacott et al, 1990].
- Die Ligandenbindung an postsynaptischen nAChR vermittelt einen Ionenstrom mit depolarisierender Ladungsverteilung und führt so zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential.

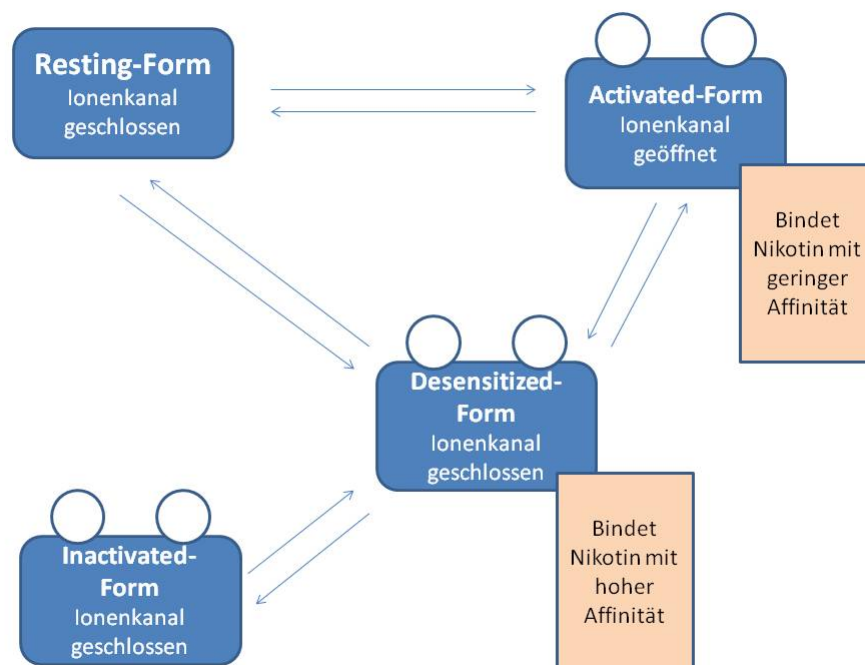


Abb. 1.5: **Konformationszustände des nAChR.**

Ohne Ligandenbindung liegt der nAChR in seiner geschlossenen „Resting-Form“ vor. Mit gebundenem Agonist kann er entweder aktiv sein („Activated-Form“) und durch seinen geöffneten Ionenkanal Na^+ , Ca^{2+} und K^+ befördern, oder desensibilisiert („Desensitized-Form“) beziehungsweise inaktiviert („Inactivated-Form“) vorliegen und einen geschlossenen Ionenkanal aufweisen. Die Ligandenbindung der „Activated-Form“ erfolgt mit geringerer Affinität als die der „Desensitized-Form“ oder „Inactivated-Form“. Eine Erholung von der „Inactivated Form“ findet nur sehr langsam statt, die „Desensitized-Form“ kann einfacher wieder in die „Resting-Form“ oder „Activated-Form“ übergehen.

Verändert nach [Sharples GV, Wonnacott S, 2001].

1.2.1 Subtypen des nAChR in der Retina

Durch die variable Kombination von α - und β -Untereinheiten bilden Retinazellen ein außerordentlich breites Spektrum an Subtypen des neuronalen nAChR. Sie alle sind für Na^+ , Ca^{2+} und K^+ permeabel, unterscheiden sich jedoch in vielen funktionellen Eigenschaften, wie ihren jeweiligen Leitfähigkeiten, ihrem Desensibilisierungsverhalten und ihrer Affinität gegenüber Agonisten und Antagonisten [Dmitrieva et al, 2007], [Marriott et al, 2005]. Diese Varietät befähigt die nAChR zu vielfältigen Regulationsmöglichkeiten innerhalb der retinalen Transmission.

Zu erwähnen ist, dass sich die Untereinheiten des nAChR sowohl homomer (fünf gleiche Untereinheiten) als auch heteromer (Kombination verschiedener α - und β -Untereinheiten) zum Rezeptor-Pentamer zusammensetzen können. Untersuchungen an Ratten-Netzhäuten durch MARRITT et al. ergaben, dass die Mehrheit heteromer zusammengesetzter nAChR aus je einem α - und einem β -Subtyp bestehen („simple heteromeric“). Es fanden sich jedoch in signifikantem Umfang auch nAChR aus zwei und mehr verschiedenen α - und β -Subtypen („mixed heteromeric“). Die genaue physiologische Funktion dieser Diversität an nAChR Subtypen-Konstellationen innerhalb der Vertebraten-Netzhaut bedarf weiterer Forschung [Marriott et al, 2005]. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht der durch MARRITT et al. identifizierten nAChR-Subtypen in der Ratten-Retina.

Proposed Receptor Subtypes

Simple Heteromeric

12-18% $\alpha 2 \beta 2$

15-20% $\alpha 4 \beta 2$

12-20% $\alpha 6 \beta 2$

Mixed Heteromeric

6-12% $\alpha 2 \alpha 4 \beta 2$

5-13% $\alpha 3 \alpha 6 \beta 2 \beta 3$

10-16% $\alpha 3 \beta 2 \beta 4$

10-12% $\alpha 3 \alpha 6 \beta 4$

Tab. 1.1: **Prozentuale Verteilung der in der Ratten-Netzhaut vorkommenden nAChR-Subtypen.**

Aufgelistet sind die prozentualen Anteile der einzelnen Rezeptor-Subtypen an der Gesamtanzahl der nAChR nach den Untersuchungen von MARRITT et al.. Die Subtypen der Untereinheiten wurden durch RNase Protection Assays, Gelelektrophorese und (Radio-)Immunhistochemie identifiziert und quantifiziert [Marriott et al, 2005]

1.3 Das Elektretinogramm (ERG)

1.3.1 Wellen des Elektretinogramms

Das elektretinographische Signal wird in mehrere Phasen eingeteilt, die auch als a-, b-, c- und d-Welle bezeichnet werden. In ERGs von Vertebraten kommen alle genannten Phasen vor, vereinfacht werden jedoch, wie in dieser Arbeit, insbesondere die a- und b-Welle betrachtet [Straub W, 1961].

Die Wellen des ERGs setzen sich aus mehreren Teilpotentialen (PI, PII und PIII) zusammen, die sich zeitlich teilweise überlagern. Das Zusammenspiel dieser Teilpotentiale ergibt das letztendliche ERG-Signal der Retina nach Lichtstimulation mit seinen charakteristischen Wellen [Granit R, 1933].

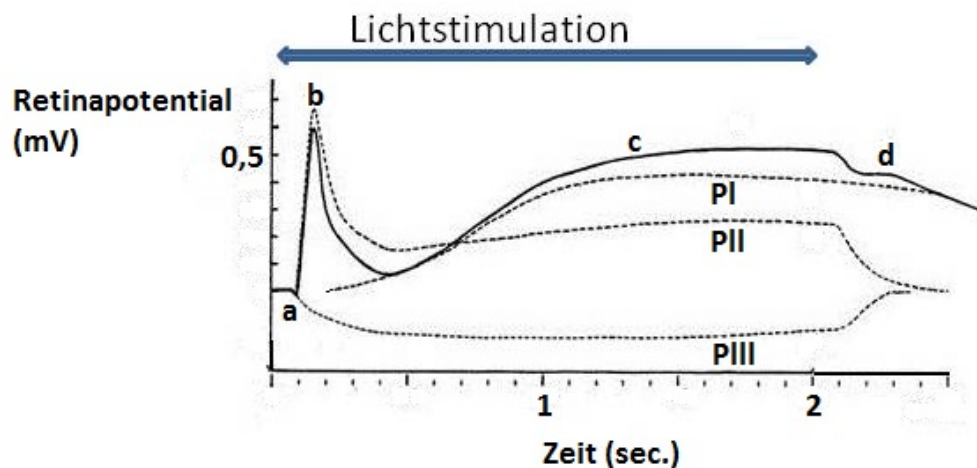


Abb. 1.6: Das ERG-Signal aus den Teilpotentialen PI, PII und PIII
Verändert nach [Granit R, 1933].

Die a-Welle entsteht insbesondere durch den Einfluss des initialen, negativen Potentials PIII, hervorgerufen durch die Aktivität der Photorezeptoren. Die b-Welle wird vor allem durch das positive Potential PII gebildet, welches durch die Aktivität der ON-Bipolarzellen entsteht. Jedoch ist zu beachten, dass die ERG-Wellen und ihre Parameter wie Latenzzeiten und Amplituden komplexe Produkte retinaler Mechanismen sind und in gewissem Maße immer aus dem Zusammenspiel mehrerer retinaler Zellen sowie mehrerer Teilpotentiale bestehen [Granit R, 1933], [Robson JG, Frishman LJ, 1999]. Die b-Welle ist schon bei geringen Reizintensitäten, in denen PII das ERG-Signal dominiert, sichtbar, während die a-Welle sich erst bei etwas höheren Intensitäten deutlich im Elektretinogramm zeigt [Straub W, 1961], [Granit R, 1933], [Brown KT, 1968].

Um die b-Welle experimentell möglichst isoliert darzustellen, kann daher eine geringe Reizintensität gewählt werden. Alternativ kann in experimentellen Ansätzen der Einfluss anderer Zellen auf die b-Wellen-Parameter pharmakologisch ausgeschaltet werden [Robson JG, Frishman LJ, 1999]. Der Versuchsansatz für isolierte b-Wellen-Darstellungen benötigt zudem eine O₂-Zufuhr, da die b-Welle sehr sauerstoffabhängig ist [Granit R, 1933], [Straub W, 1961], [Lueke et al, 2005]. Eine alleinige Darstellung der b-Welle bedingt die Messung ihrer Amplitude ab der Baseline statt ab dem Maximum einer vorangehenden a-Welle.

Das Teilpotential PIII, also die a-Welle des ERGs, kann ebenfalls experimentell isoliert werden, indem man die Generierung von PII und PI eliminiert. Durch die Versuchsdurchführung an aus dem Augenbecher isolierten Retinae fällt PI, welches durch das Pigmentepithel hervorgerufen wird [Wu et al, 2004], weg. PII kann durch Zugabe von Aspartat zum Versuchsansatz eliminiert werden, da Aspartat die Transmission zwischen Photorezeptoren und nachgeschalteten Retinazellen unterbricht [Sillman et al, 1969], [Shimazaki et al, 1984] (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.2).

Amplituden und Latenzzeiten der a- und b-Welle hängen von der Intensität eines applizierten Reizes und der Größe der gereizten Retinafläche ab [Granit R, 1933]. Ebenso sind die speziesspezifische Ausstattung mit Stäbchen und Zapfen sowie der Gesundheits- und Adaptationszustand der untersuchten Retina für die ERG-Wellenform ausschlaggebend [Straub W, 1961].

1.3.2 Zelluläre und molekulare Grundlagen der ERG-Entstehung

Hervorgehend aus dem Beginn des negativen Teilpotentials PIII ist die initiale a-Welle ausschließlich ein Produkt der Photorezeptoren. Auf molekularer Ebene aktiviert die Absorption von Photonen des Lichtstimulus (im Falle der Stäbchen) die Rhodopsinkaskade, was zur Veränderung der Membranpermeabilität für Na⁺ und Ca²⁺ im Außensegment der Photorezeptoren führt. Der Photorezeptor hyperpolarisiert und es verändert sich - im Vergleich zur Situation in Dunkelheit - der Ladungsfluss entlang der Membran zwischen innerem und äußerem Segment der Zellen. Der Dunkelstrom wird unterbrochen. Im ERG äußert sich die resultierende Potentialveränderung als die negative Deflektion der a-Welle [Penn RD, Hagins WA, 1969], [Lamb TD, Pugh EN Jr, 1992], [Robson JG, Frishman LJ, 1999]. Verschiedene Studien machten jedoch deutlich, dass auch distalere Neuronen wie ON-Bipolare, welche insbesondere positive Teilpotentiale generieren, mit dem negativen Teilpotential der Photorezeptoren interferieren und somit an der Gesamtform a-Welle beteiligt sind [Robson JG, Frishman LJ, 1999], [Robson et al, 2003].

Die Entstehung des Teilpotentials PII, welches die b-Welle des ERGs formt, wurde lange durch die sogenannte *Müller-Zell-Hypothese* erklärt: Durch Lichtstimulati-

on depolarisieren ON-Bipolarzellen, was zu einem signifikanten K^+ -Ausstrom in die EZM der äußeren und inneren plexiformen Schicht führt. Müller-Glia haben eine hohe K^+ -Leitfähigkeit und reagieren auf den Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration mit Potentialveränderungen entlang ihrer Zellmembran. Diese Potentialveränderungen sollten die Entstehung des Teilpotentials PII bedingen, welches die b-Welle maßgeblich bildet [Newman EA, 1987], [Stockton RA, Slaughter MM, 1989], [Oakley et al, 1992], [Wen R, Oakley B, 1990].

WEN und OAKLEY führten zur Belegung dieser Hypothese auch Untersuchungen mit Barium (Ba) durch, welches die K^+ -Leitfähigkeit der Müller-Glia reduziert. Bei Barium-Zugabe verringerte sich die b-Wellen-Amplitude ihrer ERGs, während der K^+ -Konzentrationsanstieg in OPL und IPL unverändert blieb, was die Müller-Zell-Hypothese bekräftigte. Neuere Studien mit Barium lieferten jedoch abweichende Ergebnisse. So unterbanden auch LEI und PERLMAN mit Barium die K^+ -Leitfähigkeit der Müller-Zellen ohne jedoch in ERG-Aufnahmen eine Reduktion der b-Welle zu beobachten. Es kam sogar zur Steigerung gemessener b-Wellen-Antworten [Lei B, Perlman I, 1999]. Dies ließ auch die Hypothese, die ON-Bipolaren seien alleinige Quelle der b-Welle, möglich erscheinen. Allerdings ist vor dem Hintergrund der Komplexität der retinalen Signaltransduktion wahrscheinlich, dass die ON-Bipolar-Aktivität wieder andere retinale Zellen beeinflusst, deren Signal zur Form der b-Welle beiträgt. Andersherum haben zum Beispiel Amakrinzellen durch ihren vielfältigen Einfluss auf die Aktivität und Transmitterausschüttung von Bipolarzellen einen, wenn auch indirekten Einfluss auf die b-Welle des ERG. GABAerge Amakrin-Zellgruppen etwa formen durch ihr Feedback auf Stäbchenbipolare die Kinetik der b-Welle des skotopischen ERG-Signals mit [Dong CJ, Hare WA, 2003]. BUI und FORTUNE untersuchten 2003 den Einfluss von Ganglienzellen auf das ERG-Signal und schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Aktivität von Ganglienzellen die a- und b-Welle des skotopischen ERGs nicht nennenswert beeinflussen [Bui BV, Fortune B, 2004].

1.4 Das Modell der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut

Die Verwendung des Modells der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut bietet sich zur elektrophysiologischen Untersuchung der Effekte von Nikotin auf die Netzhautfunktion und -signaltransduktion sowie zum Transfer gewonnener Kenntnisse auf weitere Strukturen des zentralen Nervensystems aus mehrerlei Hinsicht an:

- Bedingt durch ihre embryologische Entwicklung als Teil des Gehirns weist die Retina ähnliche Zellstrukturen, -netzwerke und Transduktionsmechanismen auf

wie sie auch im Gehirn zu finden sind. Die Erforschung neuronaler Signalwege gestaltet sich in der Retina allerdings einfacher als im Gehirn, da in ihr der Hauptfluss an Information unidirektional von den Photorezeptoren in Richtung Ganglienzellen fließt [Ames A, Pollen DA, 1969] und die neuronalen Strukturen vergleichsweise übersichtlich angeordnet sind. Die Diversität der Zelltypen ist geringer als im zerebralen Kortex und kann mikroskopisch gut dargestellt werden. Die physiologischen Eigenschaften der retinalen Signaltransduktion können im ERG detailliert untersucht werden.

- Die Retina ist im Vergleich zum restlichen zentralen Nervengewebe leicht zu isolieren und kann - in geeigneter Nährlösung gehalten - in ausreichender Qualität gelagert werden. Die geringe Dicke der Retina (siehe Kapitel 1.1.2) ermöglicht im ERG-Versuch ihre gleichmäßige Umflutung mit Nährmedium und Testsubstanzen, welche in die EZM hineindiffundieren und an den Rezeptoren der Zielzellen wirken können.
- Das Problem der Blut-Retina-Schranke als zusätzliche Variable entfällt [Ames A, Pollen DA, 1969]. Berücksichtigt man die gute Penetration von Nikotin in Gewebe, kann nach kurzer Expositionszeit davon ausgegangen werden, dass sich eine im Nährmedium vorliegende Nikotinkonzentration auch in der EZM eingestellt hat und so an chemischen Synapsen wirken kann. Diese Annahme wurde bei den durchgeführten Experimenten dadurch bekräftigt, dass sich die ERG-Veränderungen nach Nikotinzugabe zur Nährlösung schon innerhalb weniger Minuten zeigten.
- Die Untersuchung neuronaler Aktivität am Modell der umströmten Netzhaut hat den weiteren Vorteil, dass die Reizung der Zellen durch definierte Lichtimpulse zu kontrollierten und reproduzierbaren Signalkaskaden in isolierten Netzhäuten führt, die mittels ERG aufgezeichnet werden können.

Wie bereits genannt, zeigen sich bezüglich des Aufbaus und der Funktion der Retina innerhalb der Vertebraten, insbesondere der Säugetiere, nur wenige Unterschiede, sodass davon auszugehen ist, dass Untersuchungen an bovinen Netzhäuten zu für die Humanmedizin ausreichend relevanten Ergebnissen führen (siehe Kapitel 1).

1.5 Eigenschaften der Substanz Nikotin und ihre medizinische Relevanz

1.5.1 Nikotin und Nikotinprodukte

Nikotin ($C_{10}H_{14}N_2$) ist das toxische Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Herba nicotiana*), einem Nachtschattengewächs (*Solanacea*). Bei der reifen Pflanze befindet es

sich in den Blättern und dient hier dem Schutz vor Insektenfraß. In reiner Form liegt Nikotin als farblose Flüssigkeit mit charakteristischem Tabakgeruch vor, welche sich bei Luftkontakt bräunlich färbt [Russell MAH, Feyerabend C, 1978]. In der Natur sowie im Tabakrauch überwiegt das Vorkommen des biologisch aktiven S-Enantiomers von Nikotin [Sobkowiak R, Lesicki A, 2013], [Zevin et al, 1998].

Der Mensch kommt in der Regel durch den aktiven oder passiven Konsum von Tabakprodukten wie Rauchtabak, Kautabak, Schnupftabak und Oraltabak in Kontakt mit Nikotin. Der aufgenommene Nikotingehalt schwankt dabei unter anderem je nach Tabakpflanze, Erntebedingungen und Art des Tabakkonsums.

Die Aufnahme von Nikotin ist zusätzlich durch den Kontakt mit medizinischen Produkten zur Raucherentwöhnung möglich. Sie zeichnen sich durch ein flacheres Anfluten des Nikotinspiegels in Blut und Geweben aus, welches weniger Suchtpotential hat als der schnelle Anstieg und Abfall der Nikotinkonzentration im ZNS nach Tabakkonsum in Form von Zigaretten [Henningfield JE, Keenan RM, 1993].

Säuglinge Nikotin-exponierter Mütter können zudem über die Muttermilch mit relevanten Nikotinkonzentrationen in Berührung kommen [Dahlstroem et al, 2004].

1.5.2 Pharmakokinetik und Metabolismus von Nikotin im Vertebratenorganismus

Die Aufnahme von Nikotin in den Körper erfolgt je nach Applikationsform (Rauchtabak, Oraltabak, Nikotinpflaster etc.) über die orale oder nasale Mukosa, pulmonal oder transdermal [Tutka et al, 2005]. Durch Tabakrauch oder Inhaler inhalativ aufgenommenes Nikotin wird pulmonal sehr rasch resorbiert. Ebenso erreicht intranasal appliziertes Nikotinspray bereits nach wenigen Minuten maximale Blutspiegel. Weniger schnell flutet Nikotin aus Oraltabak oder Nikotinkaugummi an. Noch langsamer erfolgt die transdermale Nikotinaufnahme [Zevin et al, 1998]. Die Aufnahme der schwachen Base Nikotin über Membranen ist pH-abhängig - in alkalischem Milieu wird es gut resorbiert, in saurem Milieu liegt Nikotin in seiner dissoziierten Form vor, die weniger permeabel ist [Russell MAH, Feyerabend C, 1978], [Benowitz et al, 2009].

Die pH-abhängige Membranpermeation des Nikotins bedingt nach erfolgter Resorption auch dessen Distribution in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten. So können beispielsweise der saure Magensaft oder Speichel - unabhängig von der Art der Aufnahme - weit höhere Nikotinkonzentrationen aufweisen als das Blutplasma [Russell MAH, Feyerabend C, 1978]. Auch im ZNS finden sich weitaus höhere Konzentrationen als im Blutplasma.

Nikotin flutet im Gehirn besonders schnell an. Diese pharmakokinetische Besonderheit ist auf den Transport des Nikotins vom Blut ins Hirngewebe durch die Blut-Hirn-

Schranke (BHS) zurückzuführen. Denn Nikotin überwindet diese nicht nur durch passiven, sondern auch durch aktiven, Carrier-vermittelten Transport im Antiport mit Protonen [Cisternino et al, 2013]. Da entsprechende Studien noch fehlen, lässt sich nur mutmaßen, dass in der Retina ein vergleichbares Anflutungsverhalten von Nikotin besteht.

Metabolisiert wird Nikotin überwiegend hepatisch, zu den Hauptmetaboliten zählen Cotinin, Nikotin-N-Oxid und Nornikotin (siehe Abbildung 1.6). Die Verstoffwechslung unterliegt individueller, rassen- und speziesspezifischer Variabilität [Russell MAH, Feyerabend C, 1978], [Tutka et al, 2005]. Insbesondere Cotinin wird in der klinischen Praxis zum Biomonitoring der Tabakrauch-Exposition herangezogen. Dazu können die Konzentrationen des Metaboliten in Blutplasma, Urin, Speichel und Haaren ermittelt werden [Florescu et al, 2009].

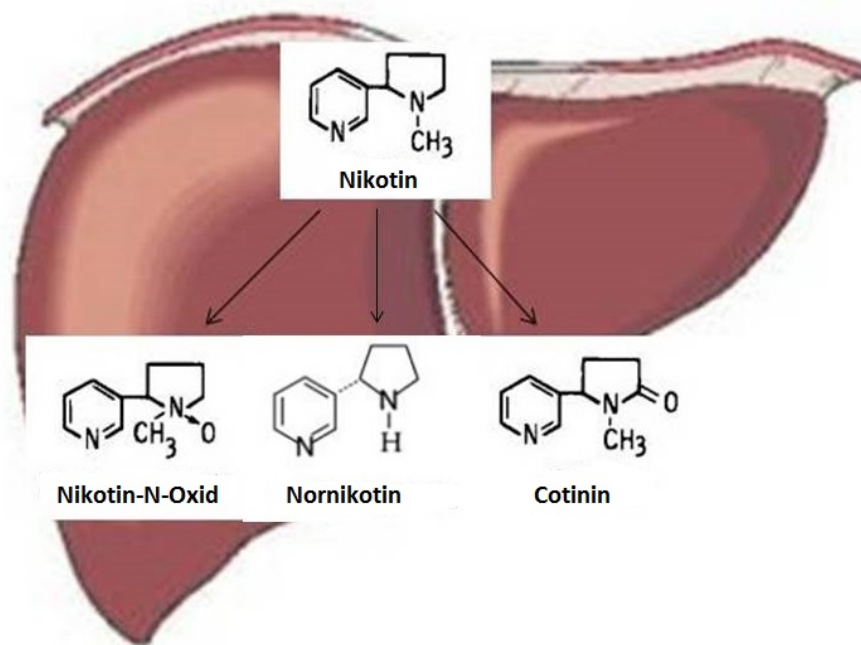


Abb. 1.7: **Hepatische Metabolisation von Nikotin**

Verändert nach [Russell MAH, Feyerabend C, 1978] und [Tutka et al, 2005].

Nikotin, bzw. dessen Metabolite werden insbesondere renal eliminiert. Dieser Vorgang ist wiederum pH-abhängig, mit fallendem Urin-pH steigt die Nikotin-Exkretion. Nicht zu vernachlässigen ist zudem die Ausscheidung von Nikotin über den Speichel [Russell MAH, Feyerabend C, 1978].

Nikotin ist plazentagängig und reichert sich in der Muttermilch an [Lim R, Sobey CG, 2011], [Dahlstroem et al, 2004].

1.5.3 Pharmakodynamische Effekte von Nikotin auf das ZNS

Pharmakologisch zeigt Nikotin weitreichende und vielgestaltige zentralnervöse Effekte:

- Nikotin wirkt stark suchterzeugend [Russell MAH, Feyerabend C, 1978], [Benowitz NL, 2010].
- Zahlreiche Studien weisen auf einen förderlichen Einfluss von Nikotin auf die kognitive Leistungsfähigkeit hin. Bei Rauchern scheint dieser Effekt zum Teil auf die Unterbrechung von Entzugszuständen rückführbar zu sein, jedoch wurde auch bei Nichtrauchern ein direkter positiver Effekt von Nikotin auf Aufmerksamkeit, Reaktionsgeschwindigkeit und Gedächtnisleistung nachgewiesen. Die Fehlerrate in neurokognitiven Tests konnte Nikotin jedoch in der Regel nicht senken. Studienergebnisse sind allerdings teilweise inkongruent und viele Variablen der kognitiven Beeinflussung durch Nikotin bleiben unbekannt [Foulds et al, 1996], [Le Houezec et al, 1994], [Le Houezec J, Benowitz NL, 1991], [Myers et al, 2008], [Ascioglu et al, 2004].
- Ein neuroprotektiver Effekt von Nikotin gegenüber verschiedenen schädigenden Agenzien, z.B. β -Amyloid, Glutamat-Exzitotoxizität, Alkohol oder Hypoxie, konnte in verschiedenen Studien und Reviews, z.B. durch HURLEY et al. belegt werden. Nikotinische AChR scheinen an der Vermittlung dieser neuroprotektiven Wirkung beteiligt zu sein, genaue Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt [Hurley et al., 2012]. Eventuell handelt es sich um die Modulation verschiedener Apoptosewege [Kihara et al, 2001], [Ren et al, 2005].
- Die Stimmungslage wird durch Nikotin beeinflusst. Lange schon ist bekannt, dass Nikotinentzug zu psychischen Symptomen wie Dysphorie, Reizbarkeit, Unruhe und Interessensverlust führt [Kenny PJ, Markou A, 2001], [Koob GF, 2000]. Ein molekularer Nachweis dafür, welche Neurotransmitterkreise in Raphekernen und Ncl. accumbens von Nikotin moduliert werden, konnte ebenfalls erbracht werden [Chang et al, 2011], sodass davon auszugehen ist, dass stimmungsverändernde Effekte von Nikotin sich nicht nur bei der Entzugsproblematik von Rauchern manifestieren.
- Die Interzeption von Nikotin mit dem cholinergen, serotonergen und dopaminergen System im ZNS ist nicht nur in der Retina-Forschung sondern beispielsweise auch im Zusammenhang mit affektiven Störungen von Bedeutung [Dursun SM, Kutcher S, 1999].
- Nikotin hat einen Einfluss auf die Schlafarchitektur - dies konnte zumindest bei Patienten mit Depression experimentell bestätigt werden. Studienergebnisse zu diesem Thema sind allerdings teilweise uneinheitlich [Salin-Pascual RJ, 2002], [Haro R, Drucker-Colín R, 2004], [Jaehne et al, 2009].
- HOLLE et al. beleuchteten 2014 den Effekt von Nikotin auf die Nozizeption. In

ihren Versuchen inhibierte Nikotin die Schmerzweiterleitung im Hirnstamm, förderte die Schmerzwahrnehmung jedoch auf supraspinaler Ebene. Im Vergleich mit anderen Studienergebnissen zeigten sich jedoch Inkongruenzen. Chronischer Nikotinkonsum könnte andere Effekte auf die Schmerzwahrnehmung haben als eine punktuelle Nikotinaufnahme [Holle et al, 2014].

1.5.4 Allgemeine Auswirkungen von Tabakkonsum auf die Netzhaut

Rauchen als Ausdruck der Nikotinsucht fördert die Entstehung und Progression der Atherosklerose, was sich auch auf die Netzhautgefäße und die retinale Blutversorgung auswirkt [Gaemperli et al, 2010]. Der inhalative Tabakkonsum ist zudem eine der Hauptrisikofaktoren altersbedingter Makuladegeneration, deren Pathologie - soweit bekannt - vor allem auf die Degeneration retinalen Pigmentepithels zurückgeht. Getriggert wird die Erkrankung durch verschiedene, mit der Aufnahme von Tabakrauch assoziierte Reaktionen, wie oxidativer Stress, Komplementaktivierung und vaskuläre Veränderungen [Khan et al, 2006], [Woodell A, Rohrer B, 2014]. Eine Mitwirkung von Nikotin an vielen weiteren Pathologien der Netzhaut ist nicht ausgeschlossen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die elektroretinographische Erfassung der Wirkung reinen Nikotins auf die Signaltransduktion innerhalb der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut. Nikotin wurde als zu testende Substanz ausgewählt, da es einerseits von hoher toxikologischer Relevanz ist, andererseits aber auch therapeutisches Potential hat. Seine Wirkung auf verschiedenste Organsysteme und -funktionen sowie seine gesundheitlich positiven und negativen Einflüsse sollten daher gut erforscht werden.

Zunächst sollten die zellulären und molekularen Wirkorte und Wirkungsmöglichkeiten von Nikotin innerhalb der Vertebratennetzhaut erläutert und der aktuelle Stand der medizinischen Wissenschaft zur Rolle des Nikotins in der retinalen Signaltransduktion dargestellt werden.

Mit dem generellen Nachweis einer Wirkung reinen Nikotins auf a- und b-Welle des ERGs sollte demonstriert werden, dass neben der Einwirkung anderer Noxen im Tabak auf die Netzhaut und der Verschlechterung retinaler Durchblungsverhältnisse durch inhalativen Tabakkonsum auch das Nikotin selbst die retinale Signaltransduktion und damit den optischen Sinneseindruck beeinflusst. Qualitative und quantitative Veränderungen der a- und b-Welle des ERGs bei und nach Nikotinexposition sollten erfasst und mittels graphischer und tabellarischer Darstellung übersichtlich aufgezeigt werden, sodass die Trends der ERG-Veränderungen bei verschiedenen Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten verfolgt werden können.

Bei der Durchführung der Versuche wurde das Modell der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut gewählt, um in vivo-Einflussfaktoren wie den Zustand der retinalen Blutversorgung und die Permeabilität der Blut-Retina-Schranke zu eliminieren, beziehungsweise bestmöglich zu reduzieren. So haben die Aufnahme variabler Nikotinmengen ins Blut oder Unterschiede in den Nikotinkonzentrationen von Blut und retinalem Gewebe keinen verfälschenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse. Verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen (a- und b-Wellen-Versuche) und unterschiedlichen Intensitätsstufen des applizierten Lichtreizes (nur a-Wellen-Versuche) sollten die Abhängigkeit des Nikotineinflusses auf das ERG-Signal von seiner Konzentration und / oder der applizierten Reizintensität aufdecken..

Im Rahmen der Ergebniszusammenfassung und der Diskussion der Ergebnisse sollten die bei den durchgeführten Versuchen gewonnenen Resultate mit den Erkenntnissen und Hypothesen der zur Recherche herangezogenen Literatur über die Nikotinwirkung auf retinale Zellen und auf ERG-Signale verglichen werden. Übereinstimmungen sowie Inkongruenzen zwischen den eigenen Versuchsergebnissen und der Literatur sollten dabei deutlich werden. Außerdem sollte der Vergleich mit bisher veröffentlichter Literatur eine Evaluation ermöglichen, wie die in Kapitel 5 genannten Erklärungsversuche zu den Mechanismen der Nikotinwirkung auf das Vertebraten-ERG zu bewerten sind. Durch den embryologischen Ursprung der Retina als Teil der Gehirnanlage soll die vorliegende Untersuchung am Modell der Vertebratennetzhaut auch zum Verständnis der Nikotinwirkung auf neuronale Zellen des übrigen ZNS beitragen. Dies ist für die Ergründung zahlreicher neurologischer Pathologien ebenso wichtig, wie für die zukünftige Entwicklung therapeutischer Konzepte.

3 Material und Methoden

3.1 Zur Versuchsdurchführung benötigtes Material

3.1.1 Bovine Netzhäute

Aus folgenden Gründen wurden Rindernetzhäute als repräsentatives Modell der Vertebratennetzhaut für die Durchführung der Experimente gewählt:

- Durch die Nutzung von Rindfleisch als tierisches Nahrungsmittel und die damit verbundene gute Infrastruktur an Schlachtbetrieben rund um Aachen, ergab sich eine quantitativ ausreichende Versorgung mit Rinderaugen. Es wurden zu keiner Zeit ausschließlich zur Gewinnung von Netzhäuten für die Experimente Rinder geschlachtet.
- Aufgrund ihrer Größe boten sich Rinderaugen zur Präparation und zur schonenden Isolation der Netzhäute an.
- Die wie nachfolgend beschrieben isolierten Netzhautstanzen konnten für 24 bis 48 Stunden ohne nennenswerte Qualitätseinbußen gelagert werden, um in dieser Zeit aussagekräftige und vergleichbare Experimente durchführen zu können.

Die Enukleation der Rinderaugen fand statt in den folgenden Fleischverarbeitungsbetrieben:

- FVE Fleischversorgung Eschweiler e.G., Indestr. 20, 52249 Eschweiler
- Metzgerei und Partyservice Nießen GbR, Cockerillstr. 101, 52222 Stolberg

Für den Transport wurden die unmittelbar nach Ableben der Rinder entnommenen Bulbi in einem lichtdicht verschlossenen Transportgefäß gelagert, um die Retinazellen an Dunkelheit zu adaptieren. Das Gefäß war mit nachfolgend beschriebener Nährlösung gefüllt und wurde bis zum Erreichen des Labors in einer Styroporkiste auf ca. 4 °C gekühlt. Die Zeit bis zum Eintreffen im Labor betrug 30 bis 45 Minuten.

3.1.2 Nährlösung

Für Transport, Lagerung und Versuchsdurchführung wurden die Rinderaugen bzw. Netzhäute in einer Elektrolyt-Zuckerlösung (Nährlösung, NL) gelagert. Diese wurde durch die Apotheke der Universitätsklinik Aachen wie folgt angemischt:

Zusammensetzung	Menge (g)	Menge (mMol)
Natriumchlorid	7,01	120
Kaliumchlorid	0,15	2
Calciumchlorid-Dihydrat	0,022	0,15
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,0203	0,1
Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat	4,8344	13,5
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	0,234	1,5
Glucose-Monohydrat	0,99	5
Aqua ad injectabilia	zu 1000 ml	

Tab. 3.1: **Zusammensetzung der Elektrolyt-Zuckerlösung (NL)**

Diese Zusammensetzung wurde von Professor SICKEL entwickelt und richtet sich nach empirisch ermittelten Optima für die Stabilität von a- und b-Wellen-Amplituden skotopischer ERGs von humanen oder bovinen Netzhäuten [Lueke et al, 2005]. Das Verhältnis von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} der NL ähnelt etwa der des Blutplasmas und des Liquor cerebrospinalis, die Ionenkonzentrationen sind durch die Fertigung im Labor jedoch konstanter als in vivo, um exakt definierte und stabile Versuchsbedingungen herzustellen. Die Zugabe von Phosphatpuffer ermöglicht eine bessere Neutralisation saurer Stoffwechselprodukte, welche durch den regen Metabolismus der Retinazellen anfallen und mit den ERG-Signalen interferieren können [Siapich S, 2010]. Der pH-Wert beträgt 7,8 [Lueke et al, 2005]. Im wässrigen, leicht alkalischen Milieu der NL ist die Testsubstanz Nikotin gut löslich [Russell MAH, Feyerabend C, 1978].

Für den Transport der Rinderaugen vom Schlachtbetrieb zum Labor wurde die NL im Transportgefäß 5 Minuten lang mit Sauerstoff (Flow: 2 L / min) angereichert. b-Wellen-Versuche wurden unter kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr von 1 L/min durchgeführt, da die Bipolarzellen, welche die b-Welle generieren, sehr viel empfindlicher gegenüber Hypoxie sind als Photorezeptoren. Ohne Sauerstoff ist daher keine stabile Aufzeichnung der b-Wellen möglich [Kang Derwent J, Linsenmeier RA, 2000], [Block F, Schwarz M, 1998].

Der NL wurde bei a-Wellen-Versuchen Aspartat zugegeben (Mono-Natrium-L-Aspartat-Monohydrat der Firma Merck KGaA, Darmstadt). Je 100 ml NL wurden 17 μg beigemischt, um eine Stoffmengenkonzentration von 1 mMol Aspartat pro Liter NL zu erreichen. Ziel der Aspartatzugabe war die isolierte Betrachtung der a-Welle des ERGs unter skotopischen Bedingungen. Dies wird durch die Eigenschaft des Aspartats ermöglicht, zu einer funktionellen Dissoziation zwischen proximaler und distaler Retina zu führen und so die Bildung des Teilpotentials PII bzw. der b-Welle zu unterdrücken [Sillman et al, 1969], [Shimazaki et al, 1984]. Unter Aspartatzugabe abgeleitete ERG-Signale bildeten somit (zumindest ohne zusätzlichen Nikotineinfluss) nur die Photorezeptorantwort auf Lichtreize ab, die a-Welle zeigte sich frei von Überlagerungen durch die positive b-Welle.

In der Experimentphase der ERG-Versuche wurden der NL zudem unterschiedliche Konzentrationen reinen Nikotins zugesetzt (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.5).

3.1.3 Das Nikotinpräparat

Für die Durchführung der ERG-Versuche wurde reines Nikotin der Firma Carl Roth GmbH und Co. KG verwendet. Dosisfindungsversuche für a-Welle und b-Welle zeigten relevante Veränderungen der

- a-Welle bei den Stoffmengenkonzentrationen: 5 μ Mol, 20 μ Mol, 50 μ Mol
- b-Welle bei den Stoffmengenkonzentrationen: 2 μ Mol, 5 μ Mol, 20 μ Mol

sodass einzelne Versuchsreihen mit diesen Nikotinkonzentrationen durchgeführt wurden.

3.2 Isolation der Netzhäute

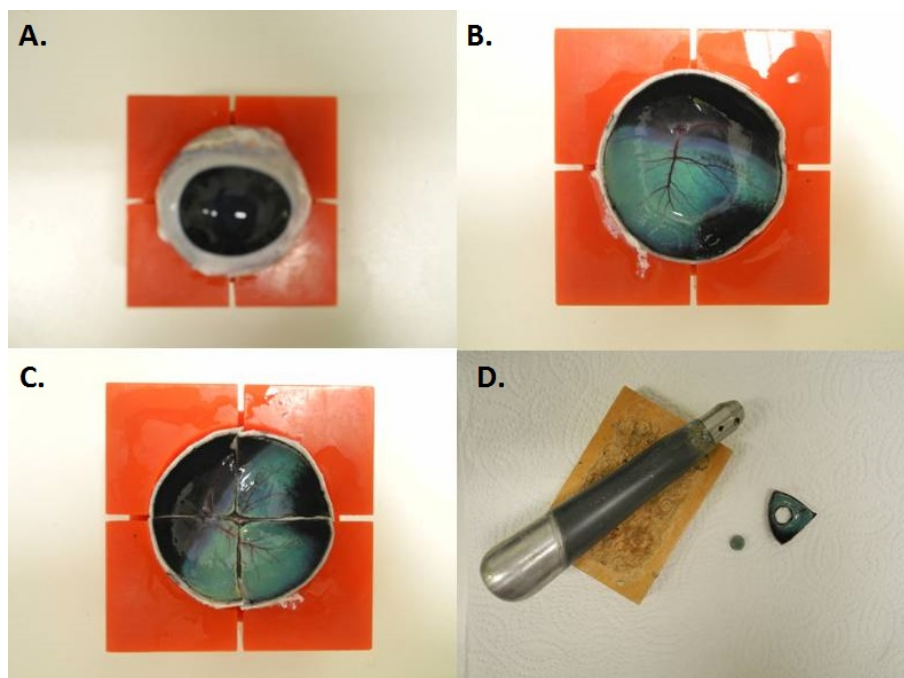


Abb. 3.1: **Präparation des Bulbus und Anfertigung der Netzhautstanzen**
A. Bovines Auge im Schneideblock. **B.** Posteriorer Augenbecher im Schneideblock nach Verwerfen von anteriorem Bulbus und Corpus vitreum. **C.** Augenbecher in Quadranten zerteilt. Initiale Schnittführung durch die Papilla nervi optici. **D.** Stanzgerät und Stanzblock, daneben Stanze aus einem Bulbus-Quadranten

Die Isolation der Netzhautpräparate fand unmittelbar nach Eintreffen der Rinderaugen im Labor statt und wurde in Dunkelheit nur unter einer schwachen Rotlichtlampe durchgeführt, um die Dunkeladaptation der Retinazellen beizubehalten.

Zunächst wurden Muskulatur und periokkulares Fettgewebe vom Bulbus entfernt. Der Nervus opticus wurde in der Ebene der Bulbusoberfläche abgetrennt. Um den Bulbus mittig in seinen anterioren Teil und den posterioren Augenbecher zu zerteilen, wurde das Auge mit seiner posterioren Seite in einem konkaven Schneideblock gelagert. Nach der Zerteilung wurde der anteriore Part mitsamt Iris und Linse verworfen. Das Corpus vitreum wurde durch vorsichtige Schüttelbewegungen atraumatisch entfernt und ebenfalls verworfen. Der übrige Augenbecher wurde im Schneideblock in vier gleich große Quadranten zerteilt. Der erste Schnitt wurde dabei durch die Papilla nervi optici vorgenommen, um zu vermeiden, dass sich dieser Bereich später im Zentrum einer Netzhautstanze befände. Aus allen Quadranten erfolgte nun mittig die Entnahme jeweils einer Stanze. Dazu wurde ein Stanzgerät auf die Netzhautseite des Bulbusstückes aufgelegt und mit gleichmäßigem Druck eine Stanze von 8 mm Durchmesser, die alle Schichten des Bulbus enthielt, hergestellt.

Die Netzhautstanzen wurden in mit Nährlösung gefüllten, lichtundurchlässigen Gefäßen bei ca. 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, bis sie zur Versuchsdurchführung herangezogen wurden. Die Lagerungszeit betrug maximal 48 Stunden, nach dieser Zeit noch übrig gebliebene Stanzen wurden fachgerecht entsorgt.

3.3 Konstruktion der Versuchsanlage

Die gesamte Versuchsanlage, schematisch dargestellt in Abb. 3.2, bestand aus den im Folgenden genannten Einheiten:

- Der Versuchskammer, welche die isolierte Retinastanze enthält und in Abschnitt 3.4 näher beschrieben ist.
- Der Versuchsbox mit Steuereinheit, Lichtquelle und der Halterung der Versuchskammer mit Anschlüssen für deren Kontaktelektroden. Die Versuchsbox war lichtdicht und elektrisch gegenüber der Umwelt isoliert. Die Versuchskammer konnte manuell in der Halterung der Versuchsbox fixiert und an Zu- und Ablauf des Leitungssystems angeschlossen werden. Durch das Leitungssystem konnte der Versuchskammer kontinuierlich frische NL zugeführt werden. Über die Steuereinheit wurden Frequenz, Dauer und Intensität des Lichtreizes eingestellt. Lichtreize wurden im Abstand von 5 Minuten abgegeben. Die Reizdauer betrug vier Sekunden und wurde zwischen den einzelnen Versuchen nicht variiert. Der Lichtreiz wurde auf das gesamte Areal der Netzhautstanze in der Versuchskammer appliziert. Die Versuchsreihen der unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen wurden jeweils bei verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt. b-Wellen-Versuche wurden dabei mit einer Reizintensität von 10 Millilux (mlx) durchgeführt, a-Wellen-Versuche mit den Intensitäten 100 mlx,

1 Lux (lx) und 10 lx.

- Dem Leitungssystem mit einem Reservoirbehälter für NL, welcher in einem Wasserbad unter kontinuierlicher Temperaturkontrolle auf 37°C erwärmt wurde. Eine Pumpe beförderte die angewärmte NL mit der Geschwindigkeit von 1 ml/min durch Zulauf-, Versuchskammer und Ablaufschlauch. Letzterer überführte die einmal zirkulierte NL in einen für die fachgerechte Entsorgung geeigneten Auffangbehälter.

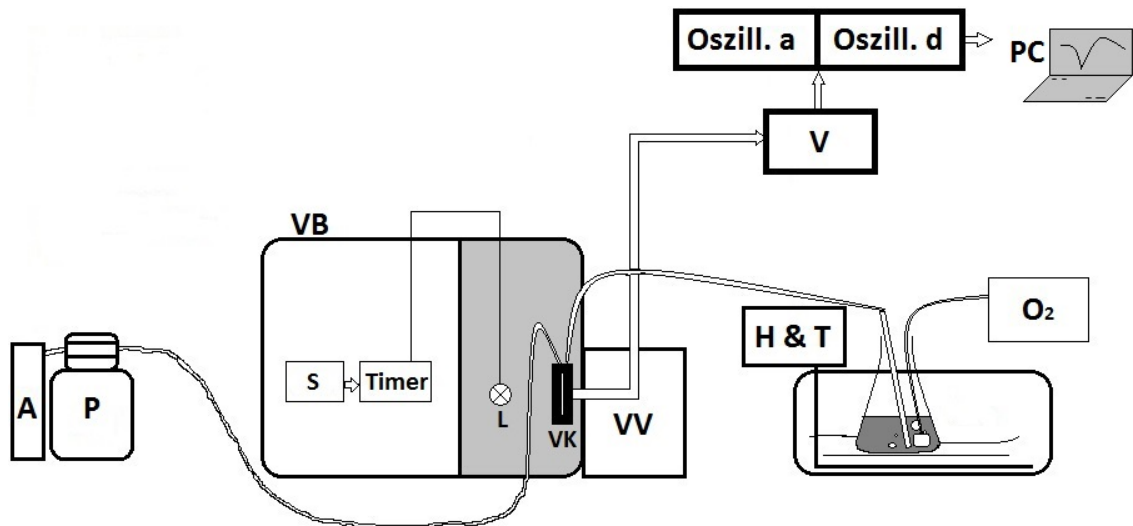


Abb. 3.2: Aufbau der Versuchsanordnung

- O₂ - Sauerstoffanschluss mit Zuleitung in NL-Reservoir
 H & T - Heizelement des Wärmebads mit Temperaturfühler
 VB - Versuchsbox
 S - Steuereinheit (Einstellung von Reizfrequenz, -dauer, -amplitude)
 L - Lichtquelle
 VK - Versuchskammer
 VV - Vorverstärker
 V - Hauptverstärker
 Oszill. a - analoges Oszilloskop
 Oszill. d - digitales Oszilloskop
 PC - Computer
 P - Pumpe
 A - Auffang- und Entsorgungsbehälter

- Zwei Verstärkern: Vor- und Hauptverstärkereinheit waren zum Herausfiltern von Störsignalen und zur Optimierung des Reizantwortsignals der Retina zwischen Aufnahmeelektroden und Auswertungseinheit geschaltet.
- Einer Auswertungseinheit: Sie bestand aus einem analogen Oszilloskop, um jede Reizantwort der Retina visuell verfolgen und Störungen durch Luftblasen o.ä. im System unmittelbar entdecken zu können. Zusätzlich wurden die Kurvendaten

der a- oder b-Welle durch ein digitales Oszilloskop aufgezeichnet und dem PC zur Analyse von Latenzzeit, Wellenamplitude und Kurvenform zugeleitet. Im Computer wurden die Reizantworten aller Versuche in graphischer Form und als Datentabelle gespeichert und die Messergebnisse der Versuchsreihen zusammengefasst.

- Zur Vorbereitung der NL und Durchführung der b-Wellen-Versuche verfügte die Versuchsanordnung zudem über einen Sauerstoffanschluss mit Zuleitung des Sauerstoffes in den Reservoirbehälter der NL.

3.4 Platzierung der Retina und Inbetriebnahme der Versuchsanordnung

Zu Beginn eines Versuchs wurde je eine Netzhautstanze aus dem Lagerungsgefäß entnommen und in eine mit 4°C kalter Nährlösung gefüllte Petrischale überführt. Die außen liegenden Bulbusschichten der Stanze wurden mit einer Pinzette gefasst, um die Retina durch leichte Schüttelbewegungen atraumatisch von Choroidea und Sklera abzulösen. Die freiliegende Retina wurde optisch auf eventuelle Beschädigungen durch die Präparation überprüft, bei Unversehrtheit mit der leicht konvexen Photorezeptorseite nach unten auf dem runden Kunststoffnetz des Retinahalters platziert und dort faltenfrei mit einem Plastikring fixiert. Dann erfolgte der Zusammenbau der Versuchskammer, schematisch dargestellt in Abb. 3.3.

Zu- und Ablaufschläuche wurden mit der Versuchskammer konnektiert. Durch Einschalten der Pumpe wurde das Innere der Kammer langsam mit NL geflutet. In der Versuchskammer eingeschlossene Luftbläschen wurden dabei unter Sichtkontrolle durch sanftes Neigen und Schütteln entfernt. Die Versuchskammer konnte daraufhin so in der Halterung der Versuchsbox platziert werden, dass die Kontaktelektroden des Retinahalters mit der Auswertungseinheit verbunden waren und die Retina mittig vor der Lichtquelle zu liegen kam.

VersuchskammerAbb. 3.3: **Zusammenbau der Versuchskammer**

Der Boden des Messinggehäuses, Bodenglas und unterer O-Ring wurden vorbereitet. Die Retina wurde auf dem Kunststoffnetz des Retinahalters fixiert und dieser in das Messinggehäuse eingelegt. Oberer O-Ring und Deckglas wurden aufgelegt, bevor der Messingring fest auf das Gehäuse der Kammer aufgeschraubt wurde, um diese luft- und wasserdicht zu verschließen.

Verändert nach [Lueke et al, 2005].

3.5 Versuchsdurchführung

Alle ERG-Versuche wurden nach dem gleichen Versuchsschema durchgeführt. Ein Versuch bestand dabei aus drei aufeinanderfolgenden Phasen:

- **Dem Equilibrium:** Die ersten retinalen ERG-Antworten auf Lichtstimuli wurden ohne den Einfluss von Nikotin abgeleitet, um für die jeweilige Retina und Reizintensität spezifische Referenzwerte für Latenzzeit und Amplitude der a- oder b-Welle zu erstellen. Latenzzeit und Amplitude wurden als Hauptparameter zur Objektivierung des späteren Nikotineinflusses auf das ERG herangezogen. Die Equilibriumszeit betrug mindestens 60 min. beziehungsweise zwölf ERG-Ableitungen im Abstand von je 5 Minuten. Streuten die Werte der Wellenamplitude über 25%, wurde die Equilibriumszeit verlängert, bis zwölf Ableitungen mit ausreichend konstanten Amplitudenwerten aufgezeichnet waren.
- **Der Experimentphase:** In dieser wurde der NL die zu untersuchende Konzentration reinen Nikotins beigemischt (Konzentrationen siehe Abschnitt 3.1.3). Sie umfasste ebenfalls 60 Minuten respektive 12 Ableitungen im Abstand von je 5 Minuten.

- Der Auswaschphase: Im Anschluss an die Experimentphase wurde die Versuchskammer für 120 Minuten erneut mit nikotinfreier NL geflutet. Hierbei wurde beobachtet, ob der durch Nikotin hervorgerufene Effekt der Experimentphase im Verlauf der 24 Ableitungen der Auswaschphase reversibel war.

Für jede Versuchsphase wurden eigene Reservoirbehälter mit der benötigten Menge an NL (bei a-Wellen-Versuchen mit Aspartatzusatz) und Nikotin (nur Reservoirbehälter der Experimentphase) angelegt. Zwischen den Versuchsphasen wurden die im Wasserbad vorgewärmten Reservoirbehälter getauscht. Leitungssystem und Versuchskammer wurden mittels der Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min durchflutet. Es dauerte ca. 10 Minuten, bis die neue NL die Versuchskammer vollständig ausfüllte. Die zwei bis drei ersten Ableitungen von Experiment- und Auswaschphase sind also noch als Abbildung des Zustandes vor dem Reservoirwechsel zu betrachten.

Während des kompletten Versuches wurde die Dunkeladaptation der Netzhäute beibehalten.

4 Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse der b-Wellen- und a-Wellen-Experimente dargestellt. Als Analyse- und Vergleichsparameter stehen dabei die Amplituden der b-beziehungsweise a-Wellen im Fokus, die das Ausmaß der intraretinalen Ladungsveränderung darstellen, welche durch den Einfluss von Nikotin auf die in Kapitel 1 genannten Zellgruppen entsteht. Bei a-Wellen-Versuchen wurde zudem bei einzelnen Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten die Entwicklung eines Phänomens mit b-Wellen-Charakteristik beobachtet, auf welches in Kapitel 4.2 eingegangen wird.

4.1 Ergebnisse der b-Wellen-Experimente

Es wurden drei Versuchsreihen von b-Wellen-Experimenten mit den jeweiligen Nikotinkonzentrationen von 2 μ M, 5 μ M und 20 μ M durchgeführt. Die Intensität des Lichtreizes lag bei diesen Versuchsreihen bei 10 mlx und wurde nicht variiert. Auch alle weiteren Versuchsbedingungen - ausgenommen die Nikotinkonzentrationen - waren für sämtliche b-Wellen-Versuche identisch. Jede Versuchsreihe umfasste drei Einzelversuche, sodass insgesamt 9 b-Wellen-Versuche in die Ergebnisanalyse mit einfließen.

Die Ergebnisse der b-Wellen-Versuche werden graphisch zusammengefasst durch

- eine Übersichtstabelle (A.): Sie zeigt die durchschnittlichen Amplitudenwerte der b-Wellen der Einzelversuche (#1, #2, #3) vor (1), während (2) und nach (3) Nikotinapplikation sowie darunter die entsprechenden Mittelwerte der gesamten Versuchsreihe. Zudem werden Standardabweichung (Stabw) und standard error of the mean (SEM) angegeben. Das Amplitudenverhältnis (Ratio) veranschaulicht das Ausmaß der Amplitudensteigerung oder -depression unter Nikotin im Vergleich zur Equilibriums- (#2/#1) bzw. zur Auswaschphase (#2/#3).
- einen Dotplot (B.): Dieser stellt die Amplituden aller Einzelstimulationen eines repräsentativen Versuches aus einer Versuchsreihe im Achsenkreuz dar. Auf der Ordinate befinden sich die Amplitudenwerte in μ V, auf der Abszisse die Zeit des Versuches in Minuten. Diejenigen Stimulationen, deren ERG-Kurven zusätzlich als Einzelgraphen dargestellt sind, sind mit Pfeilen markiert.

- ERG-Graphen dreier Einzelstimulationen eines Versuches (C.): Sie zeigen das jeweilige ERG-Abbild einer Stimulation aus dem Equilibrium, einer unter Nikotineinfluss und einer aus der Auswaschphase im Oszilloskop. Durch die Darstellung der ERG-Kurven kann der Effekt des Nikotins auf die b-Wellen optisch verfolgt werden. Zudem wird die Dynamik der ERG-Morphologie besser ersichtlich. Die Amplitudenhöhe in μV ist an der Ordinate ablesbar, der zeitliche Verlauf des ERG-Signals in Sekunden an der Abszisse. Unter dieser zeigt ein Balken in weiß den Zeitraum der Lichtstimulation (4 sek.) an.

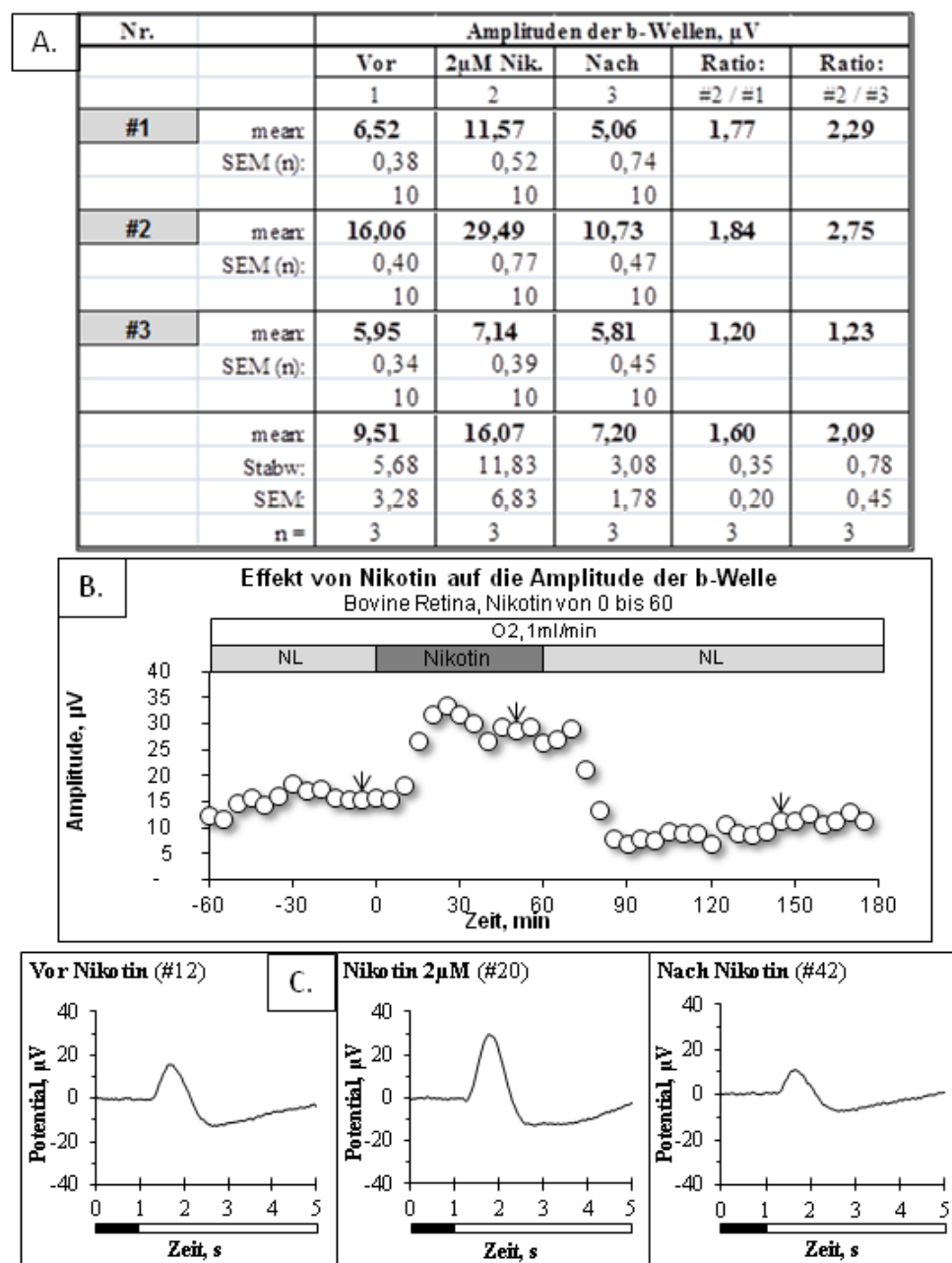


Abb. 4.1: **Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 2 μM Nikotin**
Ergebnisse der ERG-Aufnahmen bei 2 μM Nikotinexposition. Nikotinapplikation jeweils von Minute 0 bis 60, zuvor Equilibrium (Minute -60 bis 0) und anschließend Auswaschphase (Minute 60 bis 180) mit reiner Nährlösung. Stimulationen der Netzhaut mit einer Reizintensität von 10 mlx im Intervall von jeweils 5 Minuten. Versuchsdurchführung unter kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr von 1 ml O_2 pro Minute.

Nikotin bewirkt in der Konzentration von 2 μM eine Verstärkung der b-Wellen-Amplitude auf das durchschnittlich 1,6-fache des Equilibriumwertes. Der Nikotineffekt ist in der Auswaschphase komplett reversibel, die Amplitudenwerte sinken hier sogar leicht unter das Niveau des Equilibriums.

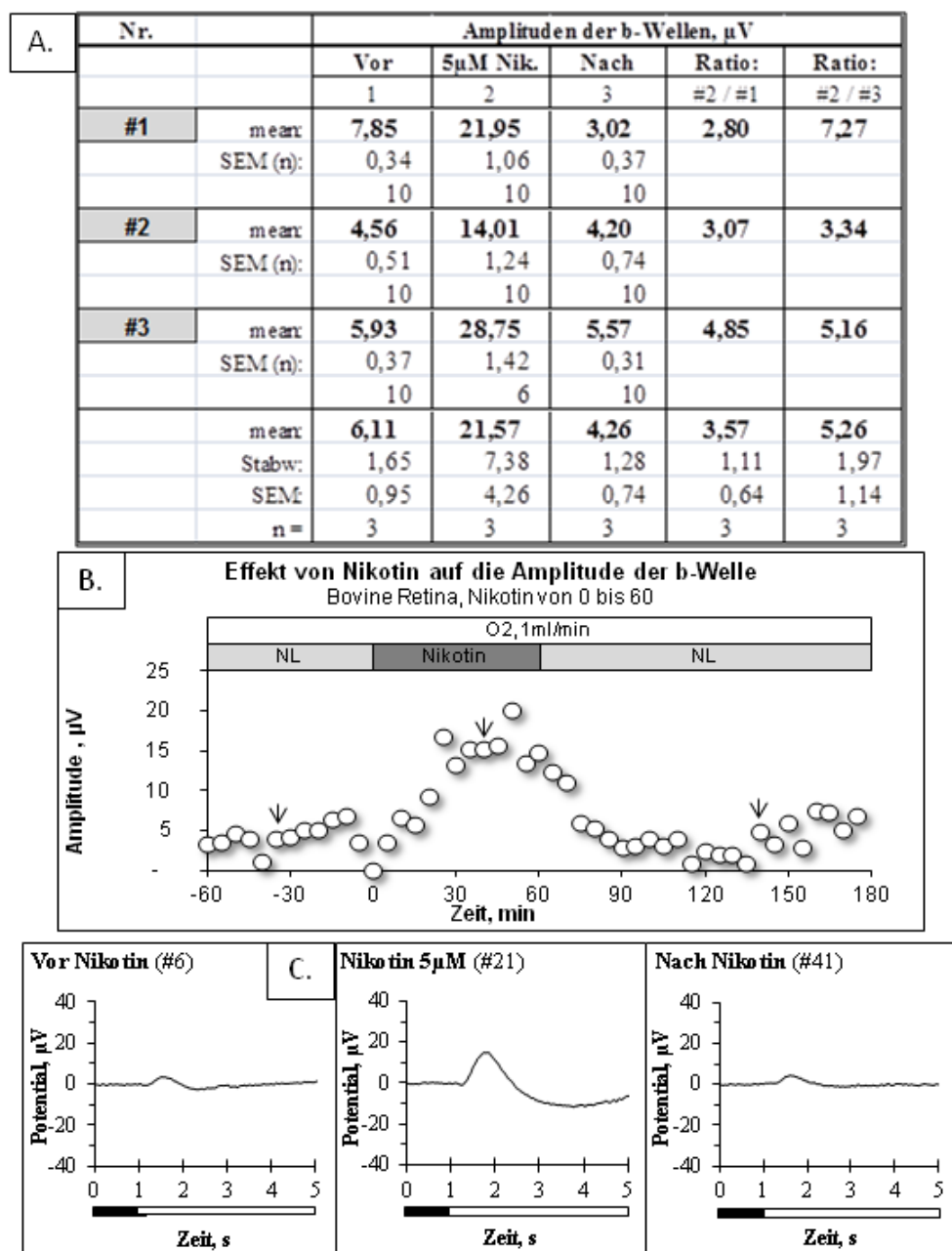


Abb. 4.2: Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 5 μM Nikotin
Ergebnisse der ERG-Aufnahmen bei 5 μM Nikotinexposition, ansonsten gleiche Bedingungen.

5 μM Nikotin bewirken in der Experimentphase ebenfalls eine Erhöhung der b-Wellen-Amplitude. Diese fällt deutlich stärker aus als bei den 2 μM -Versuchen, die Amplitude steigt unter 5 μM Nikotin durchschnittlich auf das 3,57-fache des Equilibriumwertes an. In der Auswaschphase sind auch nach 5 μM Exposition alle Nikotineffekte vollständig reversibel. Ähnlich den 2 μM -Experimenten sinken die Amplitudenwerte hier sogar leicht unter das Niveau des Equilibriums.

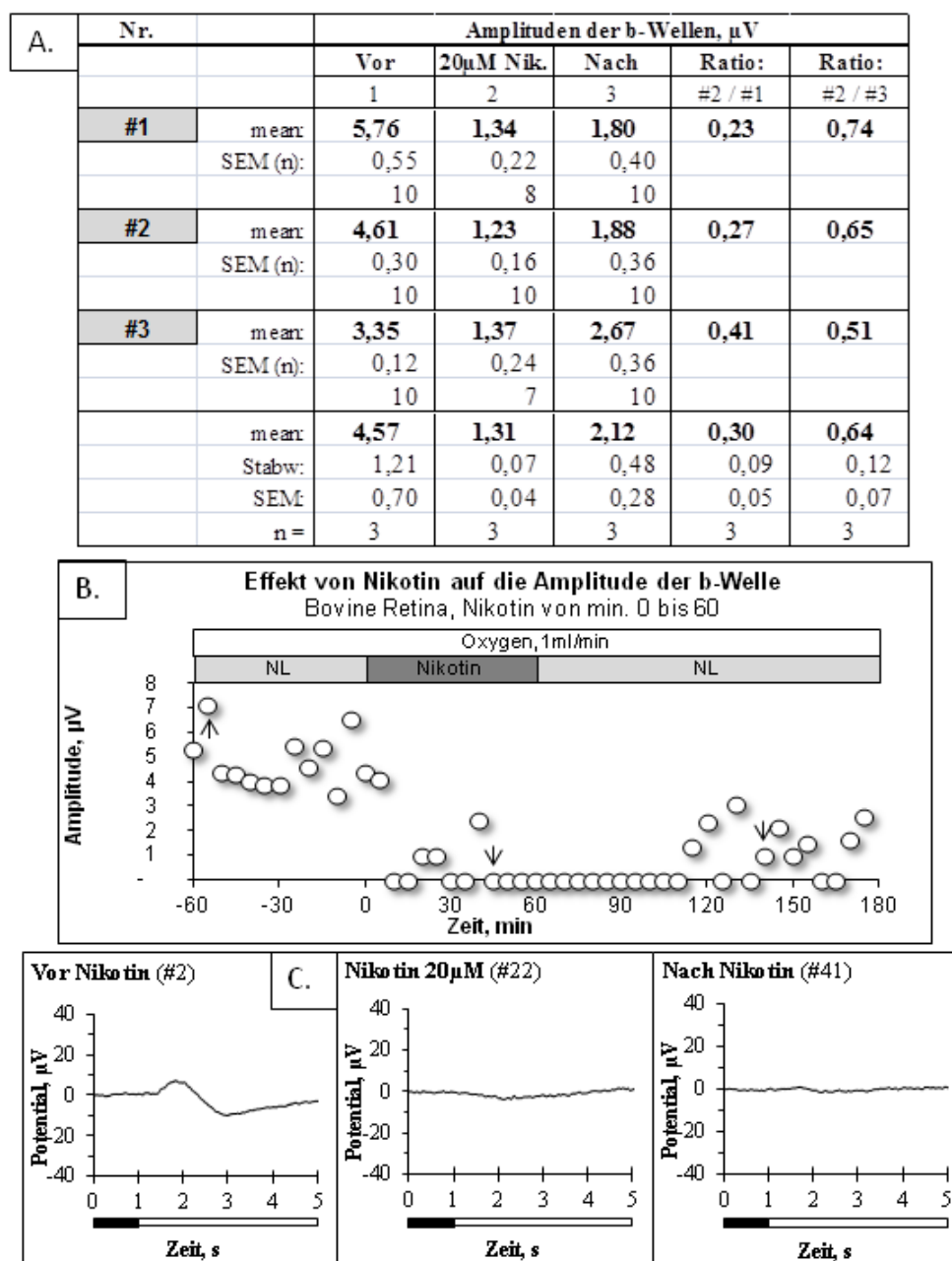


Abb. 4.3: Übersicht über die b-Wellen-Experimente mit 20 μM Nikotin
Ergebnisse der ERG-Aufnahmen bei 20 μM Nikotinexposition, ansonsten gleiche Bedingungen.

Unter dem Einfluss von 20 μM Nikotin reduziert sich die b-Wellen-Amplitude drastisch bis zum Erlöschen des ERG-Signals. Dies ist besonders gut im Dotplot des Beispielversuches (B.) zu erkennen. Durchschnittlich beträgt die Amplitudenhöhe unter Nikotineinfluss nur knapp ein Drittel des Equilibriumwertes. Eine Erholung der b-Welle stellt sich in der Auswaschphase nur zögerlich und unvollständig ein, die durchschnittliche Amplitudenhöhe erreicht hierbei keine 50% des Mittelwerts des Equilibriums mehr.

4.1.1 Trends der b-Wellen-Dynamik unter Nikotin und nach Nikotinexposition

Nikotinkonzentration	2µM	E : Verstärkung der b-Wellen A : voll reversibel, Amplituden sinken tiefer als im Equilibrium
	5µM	E : Verstärkung der b-Wellen A : voll reversibel, Amplituden sinken tiefer als im Equilibrium
	20µM	E : Depression der b-Wellen bis zur Auslöschung des ERG-Signals A : spät und unvollständig reversibel

Abb. 4.4: Übersicht über die b-Wellen-Dynamik unter verschiedenen Nikotinkonzentrationen

Betrachtet man die b-Wellen-Dynamik unter steigenden Nikotinkonzentrationen, zeigt sich ein gradueller Trend von der Erhöhung der b-Wellen-Amplitude hin zur Reduktion der b-Wellen bzw. der Auslöschung des ERG-Signals.

E: Experimentphase (mit NL und zugesetzter Nikotinkonzentration)

A: Auswaschphase (mit reiner NL)

4.2 Ergebnisse der a-Wellen-Experimente

Versuchsreihen für a-Wellen-Experimente wurden - wie die b-Wellen-Experimente - mit jeweils drei unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen durchgeführt: 5µM, 20µM und 50µM. Innerhalb dieser Nikotinkonzentrationen wurden jeweils 3 verschiedene Reizintensitäten getestet: 100 mlx, 1 lx und 10 lx. Jede Versuchsreihe pro Nikotinkonzentration und Reizintensität umfasste drei Einzelversuche, sodass eine Gesamtanzahl von 27 a-Wellen-Versuchen zustande kommt. Der Aufbau der a-Wellen-Versuchsreihen ist in Tabelle 4.1 veranschaulicht.

Nikotinkonzentration / Lichtintensität	100 mlx	1 lx	10 lx
5µM Nikotin	n= 3	n= 3	n= 3
20µM Nikotin	n= 3	n= 3	n= 3
50µM Nikotin	n= 3	n= 3	n= 3

Tab. 4.1: Aufbau der a-Wellen-Versuchsreihe

Pro Nikotinkonzentration und Lichtintensität wurden jeweils drei Einzelversuche durchgeführt. Die Gesamtanzahl der a-Wellen-Versuche beträgt daher 27.

Da die Ergebnisse und ERG-Dynamiken der a-Wellen-Versuche vielgestaltiger sind als

die der b-Wellen-Experimente, bedürfen sie einer anderen graphischen Darstellung:

- In Versuchen mit der Nikotinkonzentration von $5\mu\text{M}$ und den Reizintensitäten 100 mlx und 1 lx schlugen a-Wellen unter direktem Nikotineinfluss in positive Ausschläge um, die morphologisch b-Wellen-Charakter aufwiesen (im Folgenden dieses Kapitels daher auch vereinfacht als „b-Welle“ bezeichnet, obwohl es sich wahrscheinlich nicht um eine b-Welle im eigentlichen Sinne handelt). Auf die Interpretation dieses Phänomens wird in Kapitel 5.2.3 eingegangen. Da ein tabellarischer oder im Dotplot aufgetragener Vergleich der Amplituden in diesem Fall nicht zielführend ist, wird die ERG-Dynamik der betreffenden Versuchsreihen mittels der Graphen beispielhafter Einzelstimulationen vor, während und nach Nikotinexposition dargestellt. Jeder Versuch einer Versuchsreihe ist durch vier Einzelgraphen repräsentiert.
- Die Versuchsreihe mit der Nikotinkonzentration von $5\mu\text{M}$ in Kombination mit einer Reizintensität von 10 lx wird durch eine Übersichtsgrafik dargestellt, die derer in Kapitel 4.1 ähnelt. Die Experimente dieser Versuchsreihe zeigten unter Nikotineinfluss keine „b-Wellen“.
- Versuche der Nikotinkonzentrationen von $20\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ wiesen ebenfalls keine „b-Wellen“ auf, zeigten jedoch je nach Reizintensität differente Nikotineffekte. Ihre Amplitudenwerte werden tabellarisch zusammengefasst, die verschiedenen ERG-Dynamiken werden im Anschluss pro Reizintensität durch den Dotplot und die Einzelgraphen eines beispielhaften Versuches der Reihe veranschaulicht.
- Die versuchsreihenübergreifenden Trends der a-Wellen-Dynamik unter Nikotin werden abschließend in Kapitel 4.2.4 tabellarisch zusammengefasst.

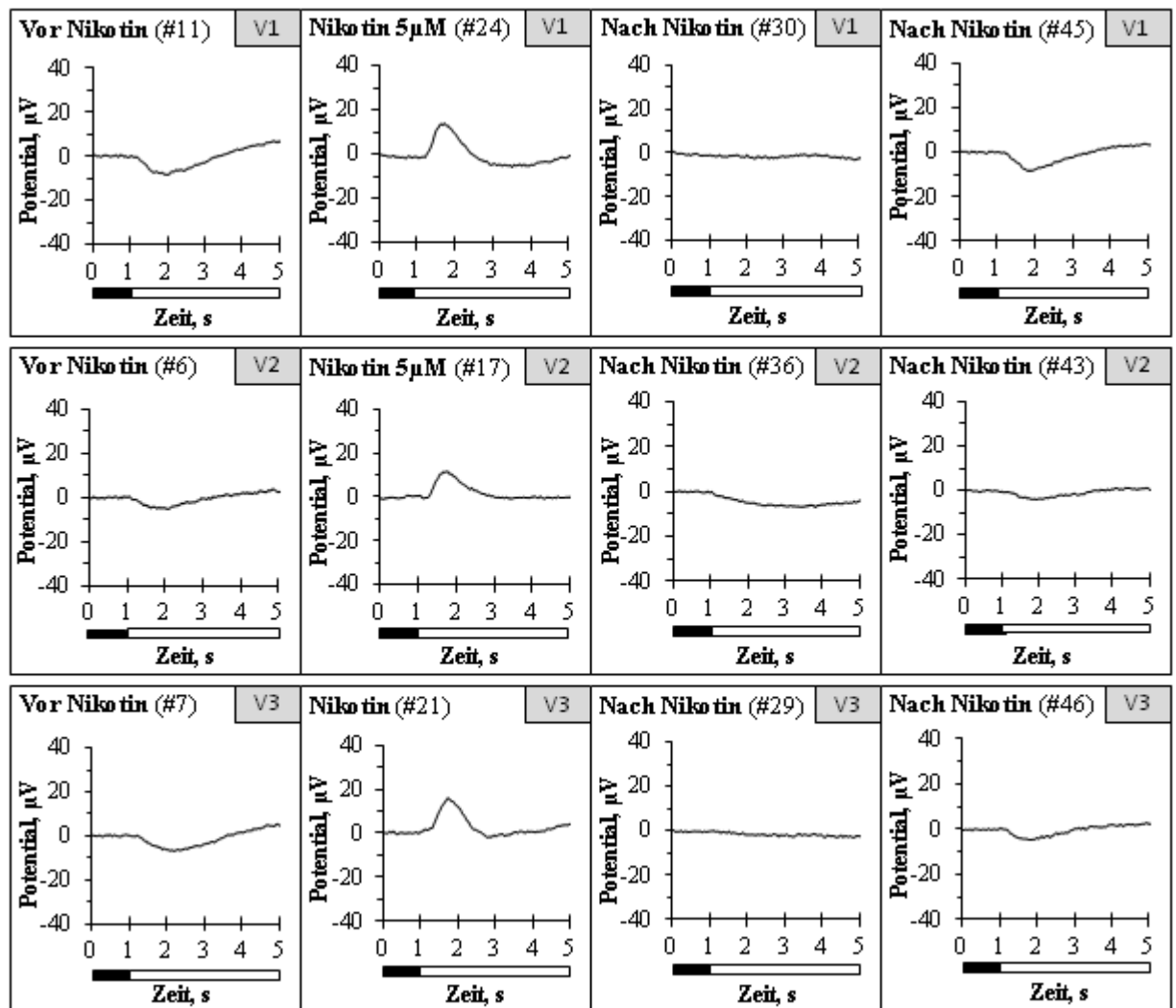
4.2.1 5 μ M Nikotin

Abb. 4.5: Übersicht über Einzelstimulations-Graphen der a-Wellen-Experimente mit 5 μ M Nikotin und 100 mlx Reizintensität

Die Versuchsbedingungen entsprechen bis auf zwei Ausnahmen denen der b-Wellen-Experimente: a-Wellen-Versuche wurden ohne Sauerstoffzufuhr und mit der Zugabe von Aspartat zur Nährlösung durchgeführt (siehe Kapitel 3). Die Einzelexperimente der Versuchsreihe sind der Übersichtlichkeit halber durchnummeriert (V1 - V3). Wie schon bei den b-Wellen-Experimenten ist für jede abgebildete Einzelstimulation angegeben, um die wievielte Stimulation es sich innerhalb des Versuches handelt (#). Unter Nikotineinfluss zeigt sich die positive „b-Welle“. In der Auswaschphase kommt es zwischen dem Verschwinden der „b-Welle“ und dem Wiederauftreten der a-Welle regelmäßig zum Erlöschen des gesamten ERG-Signals (weder „b-“ noch a-Welle sind während dieser Zeit abgrenzbar). Im Verlauf erholt sich die a-Welle bei im Vergleich zum Equilibrium leicht verminderter Amplitude.

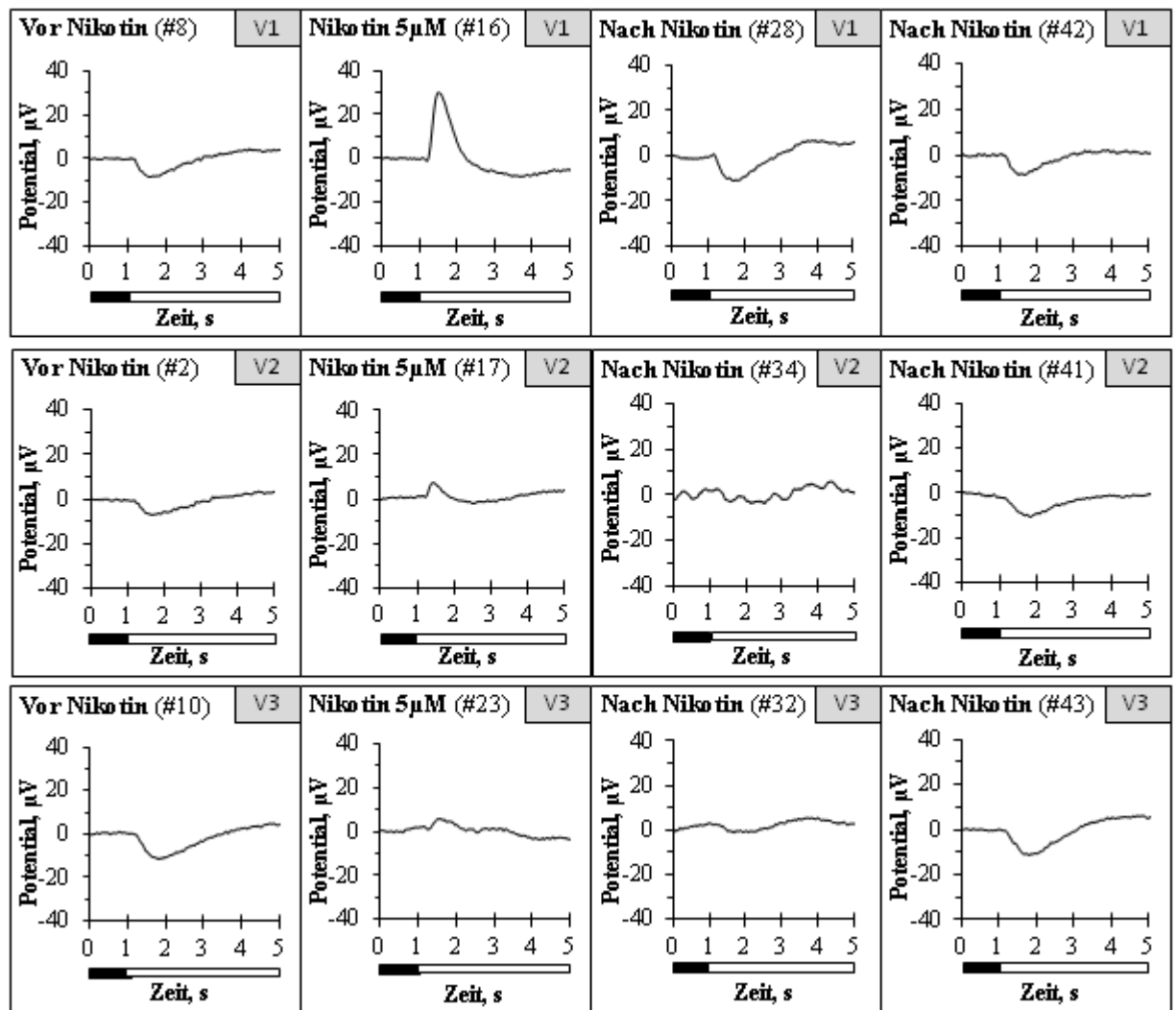


Abb. 4.6: Übersicht über Einzelstimulations-Graphen der a-Wellen-Experimente mit 5µM Nikotin und 1 lx Reizintensität

Im Gegensatz zur Versuchsreihe mit 5µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität erfolgt in dieser Versuchsreihe der Übergang vom Verschwinden der „b-Welle“ zum voll reversiblen Wiederauftreten der a-Welle ohne Auslösen des ERG-Signals. Dies tritt in zwei von drei Versuchen der Reihe (V2, V3) jedoch im weiteren Verlauf der Auswaschphase auf. Die Auslöschung ist von kürzerer Dauer als in der Versuchsreihe mit 5µM und 100 mlx Reizintensität. In Versuch 1 (V1) zeigt sich zu keiner Zeit ein Erlöschen des ERG-Signals. In V2 und V3 ist die Amplitude der a-Welle vor Signalauslöschung geringfügig kleiner als während des Equilibriums (hier nicht graphisch dargestellt). Es fällt auf, dass die „b-Wellen“-Amplitude in V1 (siehe #16) mit 30µV groß ist, während sie in V2 (siehe #17) und V3 (siehe #23) deutlich kleiner ausfällt (<10µV), obwohl beispielsweise V3 im Equilibrium eine höhere Ausgangsamplitude der a-Welle zeigt als V1. Die bei ERG-Auslöschung normalerweise recht glatte, horizontale Linie ist in V2 #34 artefaktbedingt unruhiger.

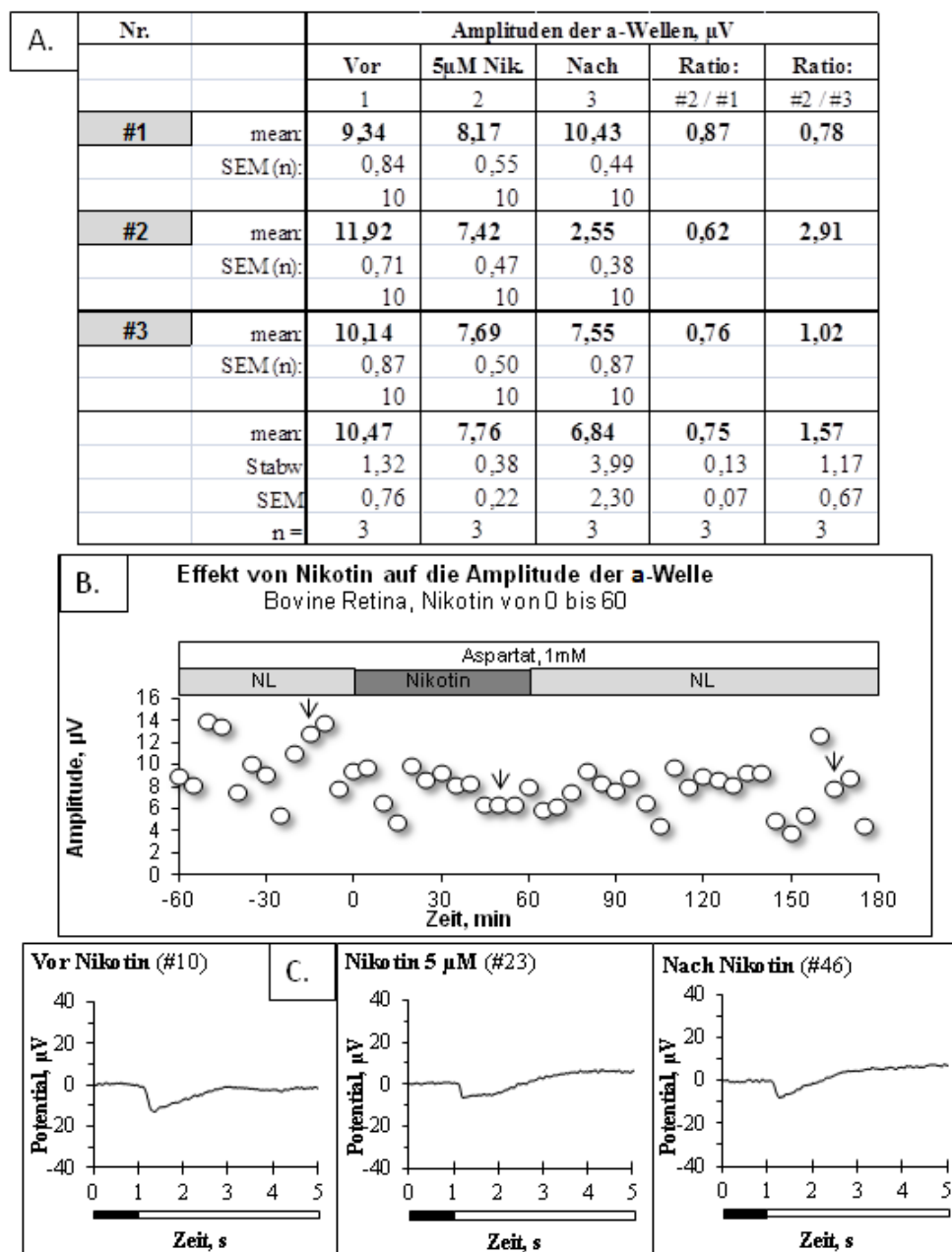


Abb. 4.7: Übersicht über die a-Wellen-Experimente mit 5 μM Nikotin und 10 lx Reizintensität

Bei einer Reizintensität von 10 lx zeigen sich unter 5 μM Nikotin keine „b-Wellen“-Phänomene. Daher erfolgt die Darstellung vergleichbar zu der der b-Wellen-Experimente in Form einer Tabelle (A.), welche die Mittelwerte der Amplituden vor, während und nach Nikotineinfluss enthält, sowie mit Hilfe eines Dotplots (B.) und der Graphen dreier Einzelstimulationen (C.) eines Beispielversuches (vor, während und nach Nikotinexposition). Erneut sind jene Punkte des Dotplots mit Pfeilen markiert, die nachfolgend als Einzelgraphen des Beispielversuches abgebildet werden.

Bei einer Reizintensität von 10 lx führt eine 5 μM Nikotinexposition zu einer leichten Depression der a-Wellen-Amplitude, sie misst in der Experimentphase durchschnittlich nur noch das 0,75-fache der Amplitude des Equilibriums. Bei zwei von drei Versuchen der Reihe ist diese Depression auch während der Auswaschphase nicht reversibel. Zudem verändert sich unter direktem Nikotineinfluss die Kinetik der a-Welle. Sie erscheint plumper und eine Wiederannäherung des Potentials an die Nulllinie wird verlangsamt, was in den abgebildeten Einzelgraphen nachvollzogen werden kann.

4.2.2 20 μ M Nikotin

Intens.		durchschnittliche Amplituden der a-Wellen, μ V				
		Vor	20 μ M Nik.	Nach	Ratio:	Ratio:
		1	2	3	#2 / #1	#2 / #3
100 mlx	mean:	18,56	28,41	17,88	1,50	1,83
n = 3	Stabw:	8,58	14,32	11,75	0,27	0,56
	SEM:	4,96	8,27	6,78	0,15	0,32
1 lx	mean:	21,02	14,20	10,51	0,68	1,70
n= 3	Stabw:	9,87	7,91	7,85	0,17	0,88
	SEM:	5,70	4,57	4,53	0,10	0,51
10 lx	mean:	17,01	10,31	7,25	0,60	1,65
n= 3	Stabw:	3,44	2,51	4,59	0,05	0,55
	SEM:	1,99	1,45	2,65	0,03	0,32

Abb. 4.8: Übersicht über die Amplituden der a-Wellen-Experimente aller Reizintensitäten mit 20 μ M Nikotin

Ähnlich der Tabelle bei b-Wellen-Experimenten zeigt diese Übersichtstabelle die Amplituden-Mittelwerte der jeweiligen Versuchsreihe jeder Reizintensität. Von diesen werden zusätzlich Standardabweichung (Stabw) und standard error of the mean (SEM) angegeben. Die Mittelwerte der Versuchsreihen fassen jeweils die Ergebnisse dreier Einzelversuche zusammen. Das Amplitudenverhältnis (Ratio) bezieht sich auf die genannten Mittelwerte und veranschaulicht das Ausmaß der durchschnittlichen Amplitudensteigerung oder -depression unter Nikotin im Vergleich zur Equilibriums- (#2/#1) bzw. zur Auswaschphase (#2/#3).

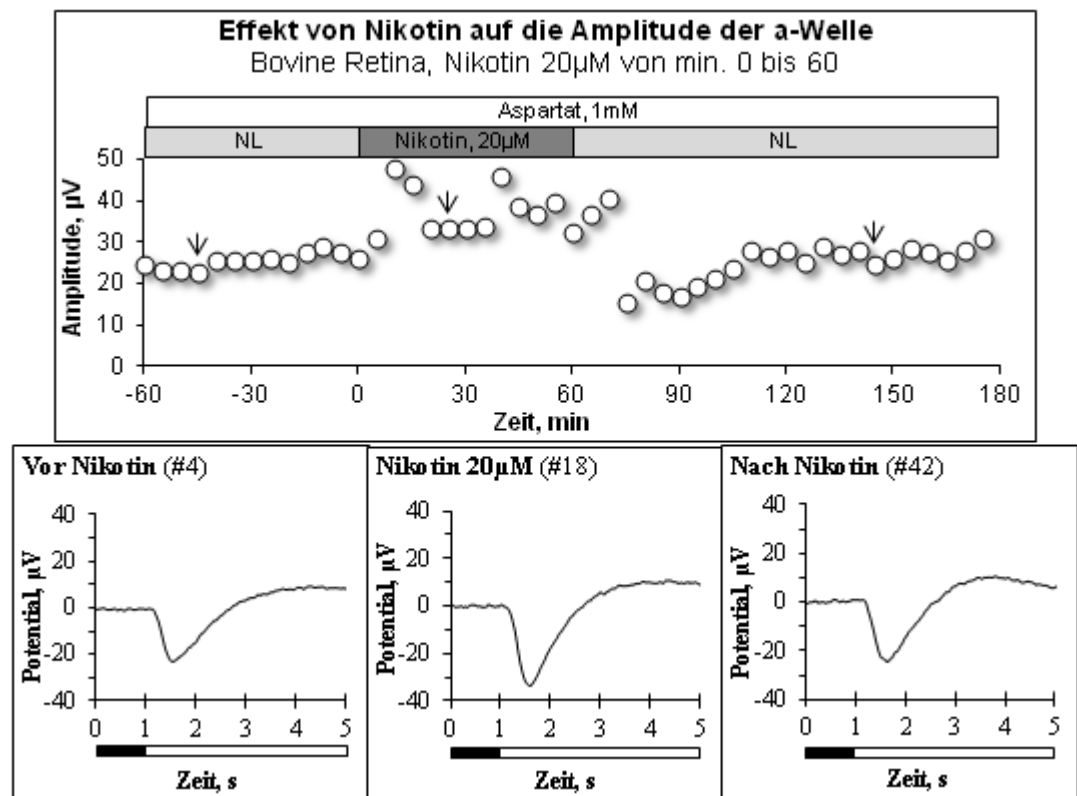


Abb. 4.9: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität

Wird eine Nikotinexposition von 20µM mit einer Reizintensität von 100 mlx kombiniert, zeigt sich unter direktem Nikotineinfluss eine Verstärkung der a-Welle, durchschnittlich um das 1,5-fache des Equilibriumwertes. Diese bildet sich in der Auswaschphase vollständig zurück

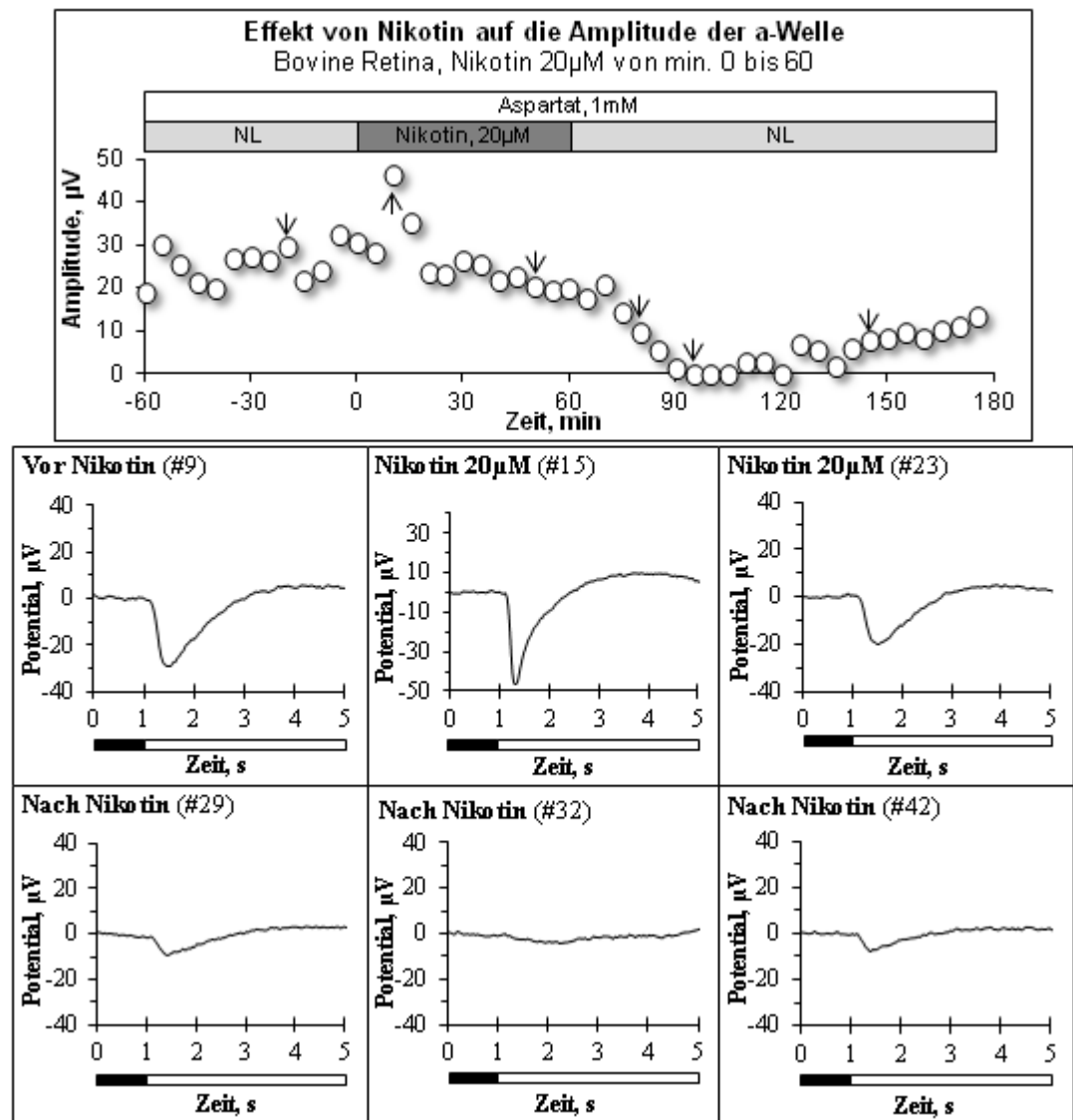


Abb. 4.10: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 1 lx Reizintensität

Da die ERG-Dynamik in dieser Versuchsreihe besonders vielgestaltig ist, sind zwecks ihrer Visualisierung neben dem Dotplot die Graphen von sechs Einzelstimulationen eines Beispielversuchs dargestellt (chronologisch von oben links nach unten rechts angeordnet). Bei einer Reizintensität von 1 lx zeigt sich unter Nikotineinfluss zunächst eine ein- bis zweimalige Verstärkung der a-Welle (im Beispielversuch durch #15 repräsentiert), bevor es noch in der Experimentphase zur leichten Depression der a-Wellen-Amplitude kommt (dargestellt durch #23). In der Auswaschphase sinkt die Amplitude der a-Welle weiter (siehe #29), bis dann das ERG-Signal für die Dauer einiger Einzelstimulationen komplett erlischt (repräsentiert durch #32). Gegen Ende der Auswaschphase setzt eine unvollständige Erholung der a-Welle (dargestellt durch #42) ein. Zu beachten ist die bei Graph #15 abweichende Skalierung der Ordinate bis -50µV.

Innerhalb der Versuchsreihe ist diese Dynamik bis auf minimale Abweichungen bei allen Einzelversuchen recht einheitlich.

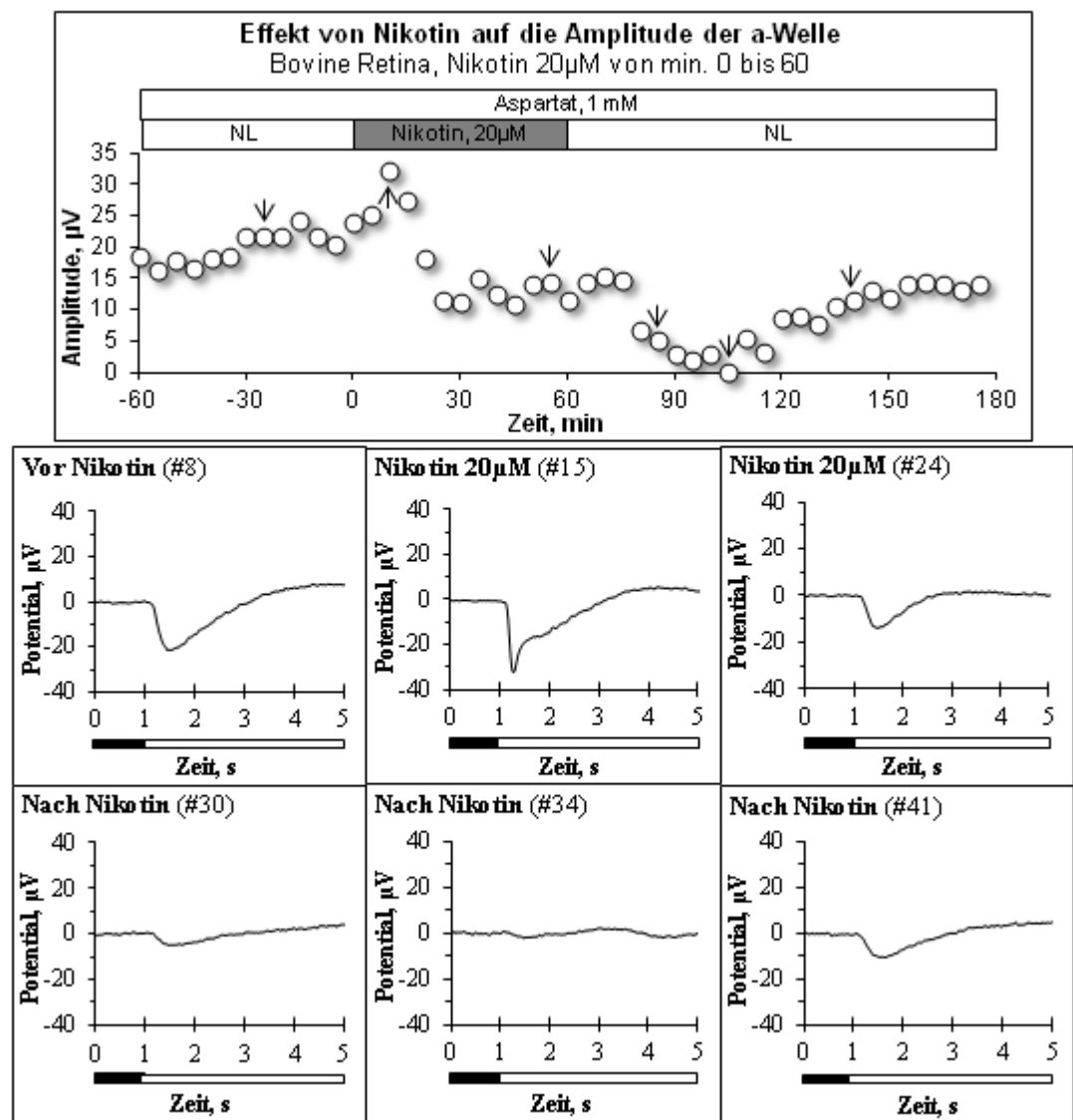


Abb. 4.11: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 20µM Nikotin und 10 lx Reizintensität

Wie schon bei einer Reizintensität von 1 lx zeigt sich die ERG-Dynamik bei einer Reizintensität von 10 lx und 20µM Nikotininexposition vielgestaltig. Sie wird daher ebenfalls durch einen Dotplot und die Graphen von sechs Einzelstimulationen eines Beispielversuches dargestellt. Die Veränderungen des ERGs ähneln denen der Versuchsreihe bei 1 lx. Zu Beginn des Nikotineinflusses kommt es bei einer oder wenigen Einzelstimulationen zur Verstärkung der a-Welle (hier #15). Daraufhin reduziert sich die a-Wellen-Amplitude noch in der Experimentphase (siehe #24). In der Auswaschphase kommt es nach weiterer Amplitudenreduktion (hier durch #30 dargestellt) wiederum zur Auslöschung des ERG-Signals während einer oder mehrerer Einzelstimulationen (repräsentiert durch #34). Zuletzt erholt sich die a-Wellen-Amplitude unvollständig (in #41 erkennbar).

Auch in dieser Versuchsreihe zeigen sich die Trends der ERG-Dynamik in allen Einzelversuchen weitestgehend einheitlich.

4.2.3 50 μ M Nikotin

Intens.		durchschnittliche Amplituden der a-Wellen, μ V				
		Vor	50 μ M Nik.	Nach	Ratio:	Ratio:
		1	2	3	#2 / #1	#2 / #3
100 mlx	mean:	12,21	2,29	4,46	0,20	0,52
n = 3	Stabw:	3,43	0,51	1,14	0,09	0,13
	SEM:	1,98	0,29	0,66	0,05	0,08
1 lx	mean:	15,62	2,39	3,57	0,17	0,70
n= 3	Stabw:	5,64	0,17	0,77	0,06	0,18
	SEM:	3,26	0,10	0,45	0,03	0,11
10 lx	mean:	17,18	2,72	3,45	0,17	0,88
n= 3	Stabw:	6,84	0,83	2,13	0,05	0,24
	SEM:	3,95	0,48	1,23	0,03	0,14

Abb. 4.12: Übersicht über die Amplituden der a-Wellen-Experimente aller Reizintensitäten mit 50 μ M Nikotin

Analog zur Visualisierung der Versuchsreihen mit 20 μ M tabellarische Darstellung der Amplituden-Mittelwerte ganzer Versuchsreihen mit Standardabweichung, SEM und Ratios.

Grundsätzlich führt eine Exposition der Retina gegenüber 50 μ M Nikotin zur Auslöschung des ERG-Signals, welches sich in der Auswaschphase nicht erholt. In sämtlichen Einzelversuchen der Versuchsreihen jeder Reizintensität kommt es bei je einer Einzelstimulation (#15) zu Beginn der Nikotinexposition jedoch zu davon abweichenden Phänomenen.

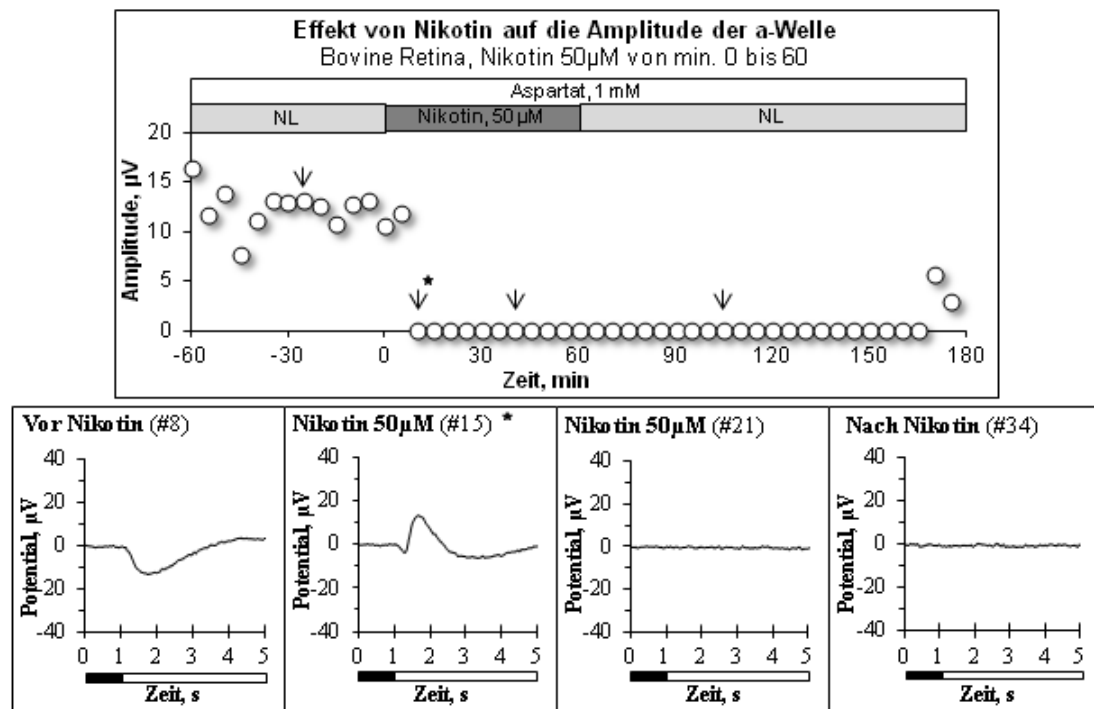


Abb. 4.13: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50µM Nikotin und 100 mlx Reizintensität

Bei einer Reizintensität von 100 mlx tritt zu Beginn der Nikotinexposition ein einmaliger positiver Ausschlag mit „b-Wellen“-Charakter auf (#15), bevor das ERG-Signal irreversibel ausgelöscht wird. Im Dotplot wird die entsprechende a-Wellen-Amplitude der Einzelstimulation #15 als null gewertet und ist markiert (Sternchen).

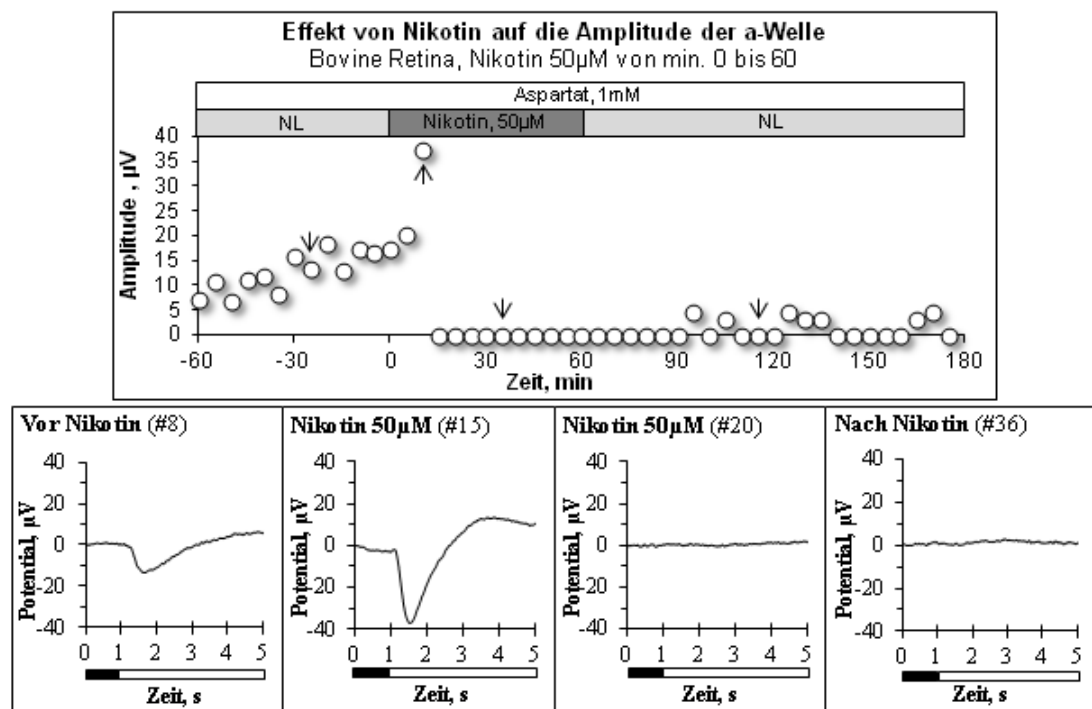


Abb. 4.14: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50 μ M Nikotin und 1 lx Reizintensität

Bei einer Reizintensität von 1 lx kommt es vor dem irreversiblen Erlöschen des ERG-Signals zur einmaligen Verstärkung der a-Welle (#15).

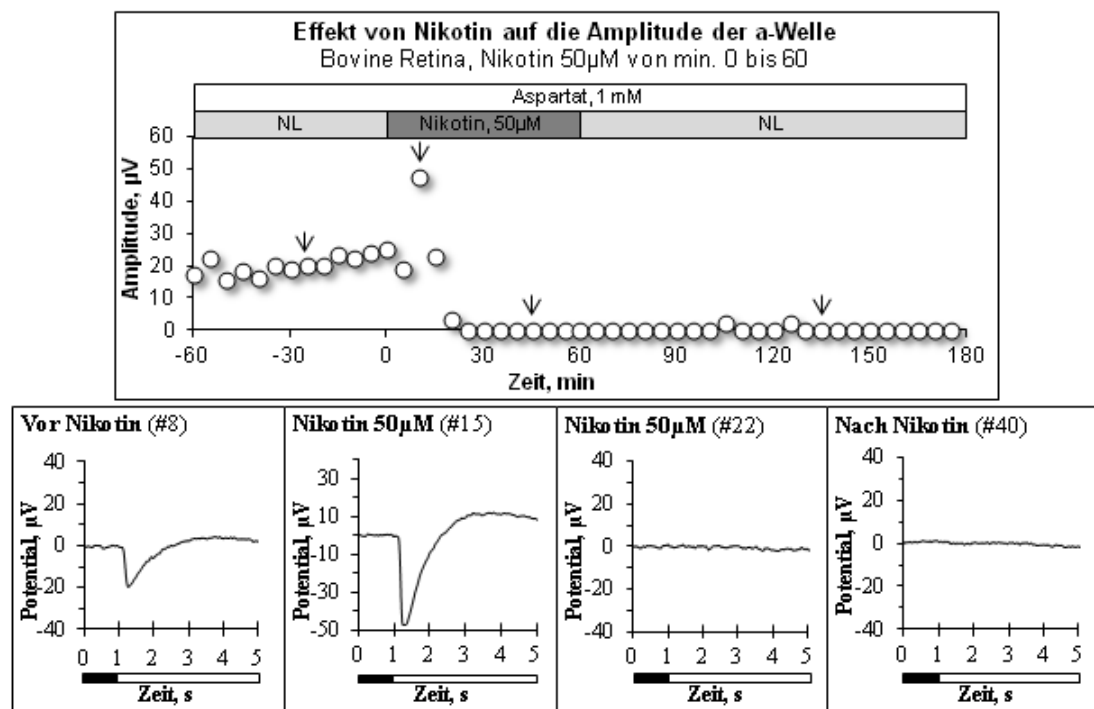


Abb. 4.15: Übersicht über die ERG-Dynamik mit 50µM Nikotin und 10 lx Reizintensität

Auch eine Intensität von 10 lx führt bei 50µM Nikotinexposition zur einmaligen (#15), in einem Experiment dieser Versuchsreihe zur zweimaligen (#15, #16) Verstärkung der a-Welle, bevor das ERG-Signal irreversibel erlischt.

4.2.4 Trends der a-Wellen-Dynamik unter Nikotin und nach Nikotinexposition

		Reizintensität		
		100 mlx	1 lx	10 lx
Nikotinkonzentration	5µM	<i>E</i> : "b-Welle" <i>A</i> : ERG-Auslöschung zwischen "b-" und Wiedereinsetzen der a-Welle, Amplituden überwiegend reversibel	<i>E</i> : "b-Welle" <i>A</i> : ERG-Auslöschung im Verlauf, danach a-Welle voll reversibel	<i>E</i> : leichte Depression, veränderte Kinetik <i>A</i> : überwiegend irreversibel
	20µM	<i>E</i> : Verstärkung der a-Wellen <i>A</i> : voll reversibel	<i>E</i> : einzelne Verstärkung, dann Reduktion der a-Wellen <i>A</i> : weitere Reduktion, dann ERG-Auslöschung, Amplituden der a-Wellen unvollständig reversibel	
	50µM	<i>E</i> : Einzelne a-Wellen-Verstärkung / "b-Welle", dann ERG-Auslöschung <i>A</i> : irreversibel	<i>E</i> : Auslöschung des ERG-Signals nach einzelner a-Wellen-Verstärkung <i>A</i> : irreversibel	

Abb. 4.16: **Übersicht über die a-Wellen-Dynamik bei verschiedenen Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten**

Betrachtet man die a-Wellen-Dynamik im Verlauf steigender Nikotinexposition zeigt sich vor allem ein Trend von der Umwandlung der a-Welle zu einer „b-Welle“ (5µM Nikotin) über die Verstärkung der a-Welle (20µM Nikotin) bis hin zum irreversiblen Erlöschen des ERG-Signals nach einmaliger a-Wellen-Verstärkung (50µM Nikotin). Zudem finden sich weitere Versuchsreihen-spezifische Nikotineffekte, wie eine leichte Amplitudendepression und Veränderung der a-Wellen-Kinetik (5µM Nikotin bei 10 lx), komplexere Veränderungen der a-Wellen-Amplitude im Verlauf von Experiment- und Auswaschphase (20µM Nikotin bei 1 lx und 10 lx), oder das einmalige Auftreten einer „b-Welle“ vor ERG-Auslöschung (50µM Nikotin bei 100 mlx).

E: Experimentphase (mit NL und zugesetzter Nikotinkonzentration)

A: Auswaschphase (mit reiner NL)

5 Diskussion

5.1 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext der Literaturrecherche

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sowohl Kongruenzen als auch Inkongruenzen zu im Rahmen der Literaturrecherche herangezogenen Studien. Spezifische Untersuchungen über den Effekt von Nikotin auf das ERG-Signal sind bisher rar, daher wird im Folgenden auf diejenigen Studien eingegangen, deren Fragestellung und methodischer Aufbau mit der vorliegenden Arbeit am besten vergleichbar sind.

- AMES und POLLEN (1969): Obwohl bei dieser Studie ausschließlich die Ganglienzellaktivität gemessen und kein herkömmliches ERG abgeleitet wurde, ist ein Vergleich der Trends der Nikotinwirkung mit denen meiner Untersuchungen lohnenswert. Die Autoren beobachteten unter 0,2 μ M und 2 μ M Nikotinexposition eine Zunahme der ON- und ON-OFF-Ganglienzellaktivität bei Lichtstimulation der Retina, während die Exposition gegenüber 20 μ M Nikotin zum Verlust der Ganglienzellantwort führte [Ames A, Pollen DA, 1969]. Diese Trends lassen sich auch in den b-Wellen-Experimenten dieser Arbeit finden: Bei 2 μ M und 5 μ M Nikotin zeigte sich eine Verstärkung der b-Welle, 20 μ M Nikotin führten jedoch zur Auslöschung des Signals.
- JURKLIES et al. (1996): Die Autoren beobachteten nach intraarteriell appliziertem ACh eine Zunahme der b-Wellen-Amplitude dunkeladaptierter Katzen-Retinae [Jurklies et al, 1996]. Der Vergleich mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird jedoch durch einige Faktoren erschwert: Durch die intraarterielle Applikation können viele Variablen wie beispielsweise die Permeabilität der Blut-Retina-Schranke für die Testsubstanz, die beim Versuchsaufbau mit isolierten Netzhäuten eliminiert werden, die Ergebnisse beeinflussen. ACh erfasst zudem auch das muskarinische Rezeptorsystem, während Nikotin seine Wirkung gezielt an nAChR entfaltet.
- VARGHESE et al. (2011): Bei der Studie dieser Autoren zeigte das 30-minütige Kauen von Nikotinkaugummi mit Konzentrationen von 2mg bzw. 4mg Nikotin eine Reduktion der b-Wellen-Amplitude des dunkeladaptierten in-vivo ERGs am Menschen. Die a-Welle veränderte sich durch die Nikotinexposition

nicht signifikant. Bei helladaptierten ERGs wurden die b-Wellen-Amplituden durch 4mg Nikotin in einem Versuch reduziert, in einem anderen verstärkt [Varghese et al., 2011]. Die Vergleichbarkeit dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der methodischen Unterschiede stark eingeschränkt. Zum einen müssen in-vitro mit in-vivo ERGs verglichen werden. Zum anderen bleibt durch die orale Aufnahme des Nikotins die Konzentration der Substanz im retinalen Gewebe unklar, weshalb kaum nachvollziehbar ist, ob die Ergebnisse meiner Untersuchungen kongruent oder inkongruent zu denen durch VARGHESE et al. beschrieben sind. Sollte in ihren Retinae eine Konzentration von etwa 20µM Nikotin vorherrschen, was jedoch eine spekulative Annahme bliebe, wäre die Reduktion der b-Wellen-Amplitude des skotopischen ERGs durch Nikotinexposition mit meinen Ergebnissen weitgehend vereinbar.

- MOYANO et al. (2013) führten b-Wellen-Experimente mit der methodisch besten Vergleichbarkeit zu meinen Versuchen durch. Sie beobachteten bei der Exposition von Netzhäuten gegenüber Nikotin in allen Konzentrationen von 5 bis 40 µM eine Reduktion oder den Verlust der b-Welle, wenn zur Reizung geringe Lichtintensitäten gewählt wurden. Dahingegen zeigte sich eine Zunahme der b-Wellen-Amplituden bei allen Nikotinkonzentrationen, wenn höhere Reizintensitäten gewählt wurden. Die maximale Stimulation der b-Wellen-Amplitude um 66% trat bei 20µM Nikotinexposition auf. Aus der Abhängigkeit der Ergebnisse von der Reizintensität schlossen die Autoren, dass Nikotin die Zapfenbipolar-dominierte b-Welle verstärken, die Stäbchen-dominierte b-Welle jedoch supprimieren könne. Nur selten fanden sich in ihren Versuchen nach Nikotinexposition a-Wellen, auch wenn dafür nötige Voraussetzungen geschaffen wurden [Moyano et al, 2013].

Die durch MOYANO et al. aufgestellte These, dass Nikotin die durch Stäbchen-Bipolare erzeugte b-Welle supprimiere, während es die durch Zapfenbipolare erzeugte b-Welle verstärke, deckt sich teilweise mit den Ergebnissen durch VARGHESE et al.. Sie lässt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen meiner b-Wellen-Experimente vereinbaren, da sich in dieser Arbeit unter 2µM und 5µM Nikotin und der niedrigsten Reizintensität von 10 mlx deutliche Steigerungen der b-Wellen-Amplitude des skotopischen ERGs zeigten, eine Nikotinexposition von 20µM bei gleicher Reizintensität jedoch zum Erlöschen des ERG-Signals führte.

Methodische Unterschiede, welche die Vergleichbarkeit der Ergebnisse reduzieren, sind aber auch hier zu nennen: Beispielsweise stimulierten MOYANO et al. ihre Versuchsnetzhäute alle 8 Sekunden, also mit deutlich höherer Frequenz als in vorliegender Arbeit gewählt. Die Autoren erwähnten jedoch bereits, dass das von ihnen gewählte Intervall zu kurz sein könnte. Zudem perfundierten sie ganze

Bulbi mit nikotinhaltiger Lösung, nutzten also keine isolierten, umströmten Netzhäute.

5.2 Erklärungsansätze zur Nikotinwirkung

Vorweg sollte noch einmal betont werden, dass - anders als in der prä- und frühen postnatalen Retina (siehe Kapitel 1.1.3) - die Rolle der cholinergen Transmission in der adulten Retina noch weitestgehend unverstanden ist [Moyano et al, 2013]. Damit geht einher, dass auch der Hintergrund des Nikotineffekts auf die a- und b-Welle des Elektoretinogramms noch nicht hinreichend erklärt werden kann. Bei den im Folgenden aufgeführten Erklärungsversuchen handelt es sich daher um Theorien über die durch Nikotinexposition hervorgerufenen Veränderungen innerhalb der Retina, welche die in Kapitel 4 dargestellten ERG-Dynamiken erklären könnten. Sie sind aus der Zusammenschau eigener Versuchsergebnisse und der zitierten Literatur abgeleitet und können den Anspruch auf Abbildung der tatsächlichen Vorgänge nicht mit Sicherheit erfüllen. Zur Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen bedarf es weiterhin extensiver Forschung.

5.2.1 Verstärkung der b-Welle

Die Erhöhung der b-Wellen-Amplitude, die sich bei den b-Wellen-Versuchen unter Nikotinkonzentrationen von 2 μ M und 5 μ M zeigt, könnte durch den direkten Einfluss von Nikotin auf die nAChRs auf ON-Bipolarzellen hervorgerufen werden. Eine Aktivierung ihrer nAChR und der damit verbundene verstärkte Kationeneinstrom in die Zellen führt neben der Reizung der ON-Bipolaren durch die Lichtstimulation von 10 mlx zur zusätzlichen Depolarisation der Zellen. Sie schütten konsekutiv mehr Glutamat aus [Dmitrieva et al, 2007] und die extrazelluläre K⁺-Konzentration erhöht sich (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.4). Dies könnte den Anstieg der b-Wellen-Amplitude erklären.

5.2.2 Verstärkung der a-Welle

Unter 20 μ M Nikotin zeigt sich bei a-Wellen-Versuchen mit einer Reizintensität von 100 mlux eine reine Verstärkung der a-Welle ohne „b-Wellen“-Phänomen. Da in der aktuellen Literatur keine Hinweise auf nAChR auf Photorezeptoren zu finden sind, müsste ein indirekter Mechanismus für die Erhöhung der a-Wellen-Amplitude verantwortlich sein.

SHIMAZAKI et al. zeigten, dass in von ihnen untersuchten Molch-Retinae bereits die Aspartat-Zugabe, die zur Isolation der a-Welle genutzt wird, nach einer wenige Minu-

ten andauernden Depression zur Verstärkung derselben führte [Shimazaki et al, 1984]. In den mindestens 60 minütigen Equilibriumsphasen der Versuche dieser Arbeit zeigten sich stabile a-Wellen mit maximal 25%-iger Streuung der Amplitudenwerte. Die a-Wellen-Verstärkung unter 20 μ M Nikotin und 100 mlx Reizintensität war deutlich auf die Zeitspanne der Nikotinexposition begrenzt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die a-Wellen-Verstärkung der Experimentphase dieser Versuche tatsächlich auf den Effekt von Nikotin bzw. gegebenenfalls auf eine Wechselwirkung zwischen Nikotin und Aspartat zurückzuführen ist .

Die Verstärkung der a-Wellen-Amplitude könnte durch die Einwirkungen von Aspartat und Nikotin auf Horizontalzellen verursacht werden, da diese die einzigen Zellen innerhalb der Retina darstellen, die direkt präsynaptisch für Photorezeptoren sind und zudem eine Nikotinempfindlichkeit aufweisen. Aspartat bewirkt in Horizontalzellen eine Depolarisation des Dunkelmembranpotentials, ihre Lichtreaktion kann es je nach Dosis drosseln bis ganz auslöschen. Die genaue dafür nötige Aspartatdosis ist in der Literatur teilweise inkongruent beschrieben [Cervetto L, MacNichol EF Jr, 1972], [Shimazaki et al, 1984]. [Bloomfield SA, Dowling JE, 1985], eine Konzentration im Bereich von mM scheint jedoch adäquat zu sein [Ishida AT, Fain GL, 1981]. Die andauernde Depolarisation bewirkt eine ständige GABA-Ausschüttung, welche normalerweise nur in Dunkelheit vorkommt [Liu et al, 2013].

Zur Erklärung der Nikotinwirkung auf die Photorezeptor-Aktivität und damit auf die a-Welle könnte die Betrachtung zweier Mechanismen von Bedeutung sein:

- Zum einen verfügen Horizontalzellen selbst über nAChR, über welche sie zusätzlich zur Aspartatwirkung depolarisiert werden könnten [Deplano S, 1988], was wiederum zu erhöhter GABA-Ausschüttung mit folgender Hyperpolarisation der Photorezeptoren führen könnte. Letztendlich würde dieser Mechanismus also von einer a-Wellen-Stimulation durch eine Zunahme des Horizontalzell-Feedbacks auf Photorezeptoren ausgehen. Um allerdings die dauerhafte Reaktionsfähigkeit der Horizontalzellen auf Lichtreize trotz des Aspartateinflusses zu erhalten, müsste Nikotin eine durchgehende Depolarisation der Zellen durch Aspartat verhindern. Dies könnte über eine direkte Interaktion von Nikotin mit dem NMDA-Rezeptor geschehen, in welchem es (zumindest in Studien mit kortikalen Neuronen) inhibitorisch die Quantität der Ionenströme reduziert [Aizenman et al, 1991], [Flores-Hernandez et al, 2009], der Aspartatwirkung auf NMDA-Rezeptoren so also entgegenwirken könnte. Dieser Effekt wird auch in Kapitel 5.2.3 noch einmal aufgegriffen.
- Zum anderen ist jedoch eine intensive elektrische Kommunikation unter den Horizontalzellen über gap junctions eine wichtige Voraussetzung für ihr effektives Feedback an Photorezeptoren. 1996 fanden MYHR und McREYNOLDS

heraus, dass die Leitfähigkeit dieser gap junctions durch ACh drastisch reduziert wird, da die Substanz zu einer Entkopplung zwischen den Horizontalen führt. Vermittelt wird diese Entkopplung indirekt über nikotinische AChR auf dopaminergen Amakrinzellen, welche durch ACh - jedoch theoretisch ebenso durch Nikotin - zur verstärkten Dopaminausschüttung angeregt werden. Der erhöhte Dopaminspiegel führt seinerseits zur Horizontalzell-Entkopplung [Myhr KL, McReynolds JS, 1996].

Die Analyse, inwiefern das durch Nikotin beeinflusste Feedback der Horizontalzellen auf Photorezeptoren und eine nikotinerge Entkopplung von Horizontalzellen das ERG-Signal im Rahmen der von mir durchgeführten Experimente verändern, bedarf weiterer Investigation. Die Erklärung des offensichtlich unterschiedlichen Einflusses verschiedener Nikotinkonzentrationen sowie variabler Intensitäten des Lichtreizes auf das beobachtete Phänomen bleibt ebenfalls unvollständig.

5.2.3 „b-Wellen“-Phänomen bei a-Wellen-Versuchen

Bei a-Wellen-Versuchen mit 5µM Nikotin kam es bei Reizintensitäten von 100 mlx und 1 lx während der Experimentphase regelmäßig zum Umschlag der a-Welle zu einem positiven Ausschlag mit b-Wellen-Charakter (siehe Kapitel 4.2.1).

Eine Erklärung dieses „b-Wellen“-Phänomens auf der Basis meiner Versuchsergebnisse und der Konsultation bestehender Literatur bleibt von theoretischer Natur. Einzelne Effekte von Nikotin und ggf. einer Nikotin-Aspartat-Wechselwirkung auf retinale Signaltransduktionswege, die zu positiven ERG-Ausschlägen führen könnten, lassen sich theoretisch abstrahieren. Allerdings erlaubt die bisherige Datenlage keine sicheren Aussagen über die dem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen, sodass zu deren Aufklärung weitere Forschungsarbeit nötig ist.

Betrachtet man die erstaunliche morphologische Ähnlichkeit der positiven Ausschläge betreffender a-Wellen-Versuche mit den Kurven tatsächlicher b-Wellen-Experimente, liegt zunächst einmal nahe, es könne sich bei jenen positiven Ausschlägen ebenso wie bei „echten“ b-Wellen hauptsächlich um das Abbild der Aktivität von ON-Bipolarzellen handeln. Folgende Elemente des Versuchsaufbaus für a-Wellen-Experimente sprechen allerdings grundsätzlich dagegen, dass es sich hierbei um b-Wellen im eigentlichen Sinne handelt, die durch die Aktivierung von ON-Bipolarzellen hervorgerufen werden:

- Alle a-Wellen-Versuche wurden ohne die Zugabe von Sauerstoff durchgeführt, um die Entstehung einer b-Welle zu verhindern und so die a-Welle isoliert darstellen zu können (siehe Kapitel 3.1.2). KANG-DERWENT und LINSSENMEIER, sowie BLOCK und SCHWARZ postulierten, dass die positive b-Welle unter Sauerstoffmangel abnehme bzw. erlösche [Kang Derwent J, Linsenmeier RA, 2000],

[Block F, Schwarz M, 1998]. Verantwortlich dafür machten BLOCK und SCHWARZ insbesondere eine hypoxiebedingte, glutamaterge Überexzitation mit konsekutiver Störung der Ca^{2+} -Homöostase in Müller-Zellen und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [Block F, Schwarz M, 1998]. Es scheint, dass die für die b-Welle maßgeblich verantwortlichen ON-Bipolarzellen empfindlicher gegenüber diesen Veränderungen sind, als beispielsweise Photorezeptorzellen.

- Der Nährlösung wurde für a-Wellen-Experimente Aspartat zugesetzt, welches zu einer Dissoziation zwischen proximalen Neuronen der Retina und den Photorezeptoren führt (siehe Kapitel 3.1.2) und so - zumindest unter nikotinfreien Versuchsbedingungen - die Entstehung der b-Welle supprimiert [Sillman et al, 1969],
- a-Wellen-Versuche wurden mit 100 mlx, 1 lx und 10 lx durchgeführt, b-Wellen-Experimente jedoch nur mit 10 mlx. a-Wellen sind ERG-Komponenten, die erst bei relativ hohen Lichtintensitäten auftreten [Granit R, 1933], [Brown KT, 1968]. b-Welle können schon bei einer Reizung der Retina mit geringeren Lichtintensitäten sichtbar sein [Granit R, 1933], welche für die Entstehung von a-Wellen eventuell nicht ausreichen. Andersherum scheint es denkbar, dass die b-Welle bei stärkeren Reizintensitäten durch das Auftreten der negativen a-Welle überlagert wird und daher in Versuchen mit 100 mlx oder 1 lx unter normalen Bedingungen garnicht sichtbar ist.

Wie könnte die Exposition gegenüber 5 μM Nikotin nun also dazu führen, trotz des bei a-Wellen-Experimenten bestehenden Sauerstoffmangels und dem Vorhandensein von Aspartat die Generierung positiver Ausschläge zu ermöglichen?

- Einerseits über die neuroprotektive Abmilderung der hypoxiebedingten glutamatergen Überexzitation von ON-Bipolaren. Nikotin scheint in geringer Dosis neuroprotektiv gegenüber glutamaterger Überexzitation zu wirken [Hurley et al., 2012], [Kihara et al, 2001] und kann ON-Bipolarzellen zusätzlich über nAChR direkt stimulieren. Doch bleibt fraglich, ob es in einer Konzentration von 5 μM die Potenz hätte, allein über diese Mechanismen b-Wellen hervorzurufen, deren Amplitude teils sogar die derer in b-Wellen-Experimenten übersteigt, obwohl die betreffenden a-Wellen-Versuche nicht unter Sauerstoffzufuhr durchgeführt wurden. Die Mitwirkung von ON-Bipolar-Zellen an den „b-Wellen“-Phänomenen bei a-Wellen-Experimenten scheint also trotz Sauerstoffmangel nicht ausgeschlossen. Jedoch bleibt unwahrscheinlich, dass bei den a-Wellen-Versuchen ihre Aktivität allein zu solch großen positiven Ausschlägen führen kann.
- Andererseits bleibt eine grundsätzliche Voraussetzung für die Mitwirkung von Bipolarzellen an den positiven Ausschlägen, dass Nikotin mit der Aspartat-

wirkung auf die Netzhaut interferiert, da Aspartat langfristig ja zur Dissoziation zwischen Photorezeptoren und proximaler Retina führt. Wie bereits in Kapitel 5.2.2 erwähnt, entfaltet Aspartat seine Wirkung auf retinale Zellen durch agonistische Aktivierung von NMDA Glutamatrezeptoren. Dies führt zur dauerhaften Depolarisation des Ruhemembranpotentials NMDA-Rezeptor-exprimierender Zellen, sodass diese ihre Reaktion auf Lichtstimulation einbüßen [Cervetto L, MacNichol EF Jr, 1972], [Shimazaki et al, 1984]. SHIMAZAKI et al. beschrieben allerdings erstmalig detaillierter, wie sich Aspartat auf retinale Zellen und ERG-Wellen auswirkt. Sie unterschieden dabei drei verschiedene Phasen der Aspartatwirkung, von denen die erste und dritte zur Depression der Lichtreaktionen proximaler Zellen führten. Die Lichtreaktionen von Horizontal-, Bipolar-, Amakrin- und Müllerzellen kehrten jedoch während der zweiten Phase vorübergehend wieder, die b-Welle wurde dabei durch Aspartat sogar verstärkt. Zudem stieg in dieser Phase auch die extrazelluläre K^+ -Konzentration in der distalen Retina an [Shimazaki et al, 1984]. Durch seine Interaktion mit NMDA-Rezeptoren und den genannten neuroprotektiven Mechanismen, vor GluR-bedingter Exzitotoxizität zu schützen, könnte Nikotin auf komplexen Wegen also mit den Wirkungen des Aspartats interferieren. Sollte es über diese Wechselwirkung eine Möglichkeit geben, dass eine Nikotinexposition der Retina die Aspartatwirkungen der zweiten Phase dauerhaft begünstigt, wäre ein positiver Ausschlag trotz Aspartat in der Nährlösung denkbar.

Wieso findet sich bei a-Wellen-Versuchen mit 5 μ M Nikotin und einer Reizintensität von 10 lx kein „b-Wellen“-Phänomen?

- Theoretisch besteht aufgrund der hohen Reizintensität die Möglichkeit, dass ein hier vorkommender positiver Ausschlag, der durch oben genannte Nikotininterferenzen mit den Konditionen der a-Wellen-Experimente entsteht, von einer negativer a-Welle überlagert wird und damit nicht sichtbar ist. Diese Theorie ist allerdings bisher - soweit es die konsultierte Literatur zeigt - nicht belegbar.
- Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Nikotinwirkungen auf das ERG der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut zeigten generell eine stark von der Reizintensität abhängende Vielfalt. Es ist nicht auszuschließen, dass sich eine identische Nikotinkonzentration (5 μ M) bei verschiedenen Reizintensitäten jeweils anders auf die komplexen Vorgänge der retinalen Signaltransduktion auswirkt. So könnte eine Exposition der Retina gegenüber 5 μ M Nikotin andere Effekte auf retinale Neuronen bei Lichtreizen von 100 mlx und 1 lx haben, als bei einer Reizintensität von 10 lx. Worin die Abhängigkeit der Nikotinwirkung von der Reizintensität genau begründet ist, bleibt weitergehend zu klären.

Wieso zeigen sich keine „b-Wellen“ bei a-Wellen-Versuchen mit höheren Nikotinkon-

zentrationen?

- Hierfür könnten die neurotoxischen Wirkungen des Nikotins ursächlich sein, welche stark dosisabhängig sind (siehe Kapitel 5.2.4). Höhere Nikotinkonzentrationen könnten zu toxisch für die Neuronen und Signaltransduktionsvorgänge sein, welche die positiven Ausschläge auf Lichtstimulation hin produzieren. Die Tatsache, dass bei Nikotinkonzentrationen von 20µM noch Augmentationen der a-Wellen-Amplituden auftreten, legt die Vermutung nahe, die für die einzelnen Wellen hauptverantwortlichen Zelltypen könnten in unterschiedlichem Maße empfindlich gegenüber den protektiven sowie toxischen Eigenschaften des Nikotins reagieren. Wiederum spielen hierbei auch die Intensitäten des Lichtreizes eine Rolle.

5.2.4 Depression oder Auslöschung des ERG-Signals

Die Depression bzw. Auslöschung des ERG-Signals zeigt sich bei allen b-Wellen-Experimenten mit einer Nikotinkonzentration von 20µM, sowie bei den a-Wellen-Experimenten aller Konzentrationsgruppen - bei 5µM Nikotin nur bei einer Reizintensität von 10 lx, bei 20µM Nikotin bei den Reizintensitäten von 1 lx und 10 lx und bei 50µM Nikotin bei allen gewählten Reizintensitäten. Bei a-Wellen-Versuchen mit geringerer Nikotinkonzentration (5µM, teilweise 20µM) zeigt sich bei einigen Versuchen eine teilweise Erholung der a-Welle innerhalb der Auswaschphase. Diese ist im Verlauf steigender Nikotinkonzentrationen (teilweise 20µM, 50µM) immer weniger erkennbar. Die tabellarischen Zusammenfassungen der Versuchsergebnisse in den Kapiteln 4.1.1 und 4.2.4 zeigen noch einmal deutlich die Abhängigkeit der Nikotinwirkung von der applizierten Nikotinkonzentration und der Reizintensität auf.

Sowohl Depression als auch Auslöschung der ERG-Wellen könnten durch neurotoxische Eigenschaften des Nikotins auf retinale Nervenzellen zurückzuführen sein. Dass diese Substanz im Bezug auf retinale Zellen ebenso neuroprotektive [Wehrwein et al, 2004], [Thompson et al, 2006], [Akaike et al, 2010], [Sieber M, 2012], [Iwamoto et al, 2013] wie auch neurotoxische Eigenschaften besitzt [Toledano et al, 2010], ist belegt und wurde bereits aufgegriffen. Die Balance zwischen diesen gegensätzlichen Mechanismen und Wirkungen ist - neben anderen Kriterien - vor allem dosisabhängig [Toledano et al, 2010], [Gahring et al, 2003], [Hurley et al., 2012], was das vermehrte Auftreten von Versuchen mit ERG-Auslöschung unter hohen Nikotinkonzentrationen erklären kann.

Da es bei b-Wellen-Versuchen unter 20µM zur Auslöschung des ERG-Signals kommt, sich bei a-Wellen-Versuchen unter dieser Nikotinkonzentration bei einer Reizintensität von 100 mlx allerdings noch eine deutliche a-Wellen-Verstärkung zeigt, kann die

Vermutung aufgestellt werden, dass Bipolarzellen und Photorezeptoren in unterschiedlichem Maße anfällig für die toxische Wirkung von Nikotin sind.

Erneut sei auch die Abhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von der Intensität des Lichtreizes erwähnt, mit dem die Retina stimuliert wird. So zeigt sich zumindest bei a-Wellen-Versuchen mit 5 μ M Nikotin und 20 μ M Nikotin eine Depression bzw. Auslöschung des ERG-Signals nur bei höherer Reizintensität, während die gleiche Nikotinkonzentration bei geringerer Intensität noch stimulierend wirkt.

Bei 20 μ M Nikotin und den Reizintensitäten 1 lx und 10 lx sowie bei allen a-Wellen-Experimenten unter 50 μ M Nikotin zeigt sich vor der Depression der a-Welle oder dem Erlöschen des ERG-Signals eine ein- bis maximal zweimalige Verstärkung der a-Welle. Dieses Phänomen erscheint einleuchtend, bedenkt man die genannten Mechanismen der a-Wellen-Verstärkung durch Nikotin und seine vermutlich dosisabhängige „Grenze“ zwischen Neuroprotektion und Stimulation und Neurotoxizität. Man könnte aus diesen Versuchsreihen den Schluss ziehen, dass Nikotin zwar zur ein- bis zweimaligen Stimulation der Zellen führt, diese jedoch den neurotoxischen Effekten des Nikotins nicht standhalten können und daher zugrunde gehen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elektroretinographische Untersuchungen *in vitro* an isolierten Rindernetzhäuten durchgeführt. Nach einer Equilibriumsphase sollte der Effekt von Nikotin unterschiedlicher Konzentrationen auf a- und b-Welle des ERG-Signals untersucht werden. Zudem sollten beobachtete Effekte in der sich anschließenden Auswaschphase auf ihre Reversibilität hin überprüft werden. Eine Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur sollte einen theoretischen Erklärungsansatz für die beobachteten Nikotineffekte ermöglichen.

Alle Versuche wurden an vollständig vom restlichen okkulären Gewebe isolierten Netzhautpräparaten durchgeführt, die in der geschlossenen Versuchskammer kontinuierlich mit Nährlösung sowie während der Experimentphase mit Nikotin verschiedener Konzentrationen umspült wurden.

Es zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der Amplituden sowohl der a-Welle als auch der b-Welle des ERGs durch Nikotin. Qualität und Quantität dieses Einflusses waren abhängig von der applizierten Nikotinkonzentration sowie von der Intensität des auf die zu testende Netzhaut applizierten Lichtreizes. Tendenziell war zu beobachten, dass geringere Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten in den jeweiligen Versuchsreihen einen stimulierenden Effekt auf die Amplituden von a- bzw. b-Wellen ausübten, während höhere Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten eher eine Depression oder gar Auslöschung des ERG-Signals hervorriefen. a- und b-Welle zeigten sich unterschiedlich empfindlich gegenüber depressiven Nikotineffekten, sodass eine Depression bzw. ein Verlust von b-Wellen bereits bei geringeren Nikotinkonzentrationen einsetzte, als dies bei a-Wellen der Fall war. Sowohl Depression als auch Verstärkung der ERG-Wellen stellten sich nach Nikotinapplikation stets rasch ein, ihre Amplitudenwerte zeigten signifikante Veränderungen. Waren die nikotinvermittelten Alterationen des ERG-Signals reversibel, so zeigte sich dies ebenfalls rasch nach Beginn der Auswaschphase. Insbesondere bei höheren Nikotinkonzentrationen erholte sich die Netzhaut jedoch nicht mehr oder kaum von der Nikotinexposition. Neben den beobachteten Verstärkungen oder Depressionen der a- und b-Wellen zeigte sich bei a-Wellen-Versuchen unter 5 μ M Nikotin und den Reizintensitäten von 100 mlx und 1 lx ein Umschwung der negativen a-Welle zu einem positiven Ausschlag, der morphologisch einer b-Welle glich.

Die Erklärung der beobachteten Phänomene blieb aufgrund der bis heute nicht vollständig verstandenen retinalen Signaltransduktionswege und der im Vergleich zu bisherigen ERG-Studien mit nikotinischen Agonisten teils inkongruenten Ergebnisse von theoretischer Natur. Die Verstärkung der b-Welle könnte auf direkter Beeinflussung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren der ON-Bipolarzellen durch Nikotin basieren. Die Depression bzw. Auslöschung sowohl der a-Welle als auch der b-Welle bei hohen Nikotinkonzentrationen könnten durch neurotoxische Effekte des Nikotins auf die entsprechenden retinalen Zellen hervorgerufen werden. Dazu passt auch ihre überwiegende Irreversibilität sowie eine gegebenenfalls höhere Suszeptibilität der Bipolarzellen im Vergleich zu Photorezeptoren, welche die b-Welle empfindlicher gegenüber nikotinbedingter Auslöschung machen könnte als die a-Welle. Im Gegensatz zu diesen direkten Nikotineinflüssen scheinen die Erhöhung der a-Wellen-Amplitude sowie der Umschlag der a-Welle zu positiven Ausschlägen über indirekte Signalwege vermittelt zu werden. Durch ihre Empfindlichkeit gegenüber nikotinischen Agonisten und ihrer synaptischen Verbindung zu Photorezeptoren und Bipolarzellen stehen hier insbesondere die Horizontalzellen im Fokus, sie könnten die entscheidende Zielzelle zur Vermittlung des Nikotineffekts auf Photorezeptorsignale und damit auf die a-Welle sein.

Um die Erklärungsansätze der Nikotinwirkung auf die a-Welle zu prüfen, bedarf es weiterer Erforschung der Horizontalzellfunktion und ihrer Rolle in der retinalen Signaltransduktion unter Nikotin. Weiterführende ERG-Untersuchungen sollten die beobachteten a-Wellen-Phänomene mit größeren Versuchsreihen und weiteren Nikotinkonzentrationen und Reizintensitäten bestätigen. Beispielsweise durch pharmakologische Inaktivierung der Horizontalzellen könnte zudem der Einfluss dieser Zellen auf die a-Welle unter Nikotinbelastung näher untersucht werden. Weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen nikotinvermittelter Entkopplung der Horizontalzellen auf die a-Welle des ERGs könnten dabei zum Verständnis der Vorgänge beitragen.

Zudem bedarf es weiterer Ergründung der Mechanismen der Nikotintoxizität und der Empfindlichkeit anderer retinaler Neuronen gegenüber dieser Substanz. So könnten Depression und Auslöschung des ERG-Signals durch hohe Nikotinkonzentrationen besser verstanden und die Zunahme von a- und b-Welle durch niedrigere Nikotinkonzentrationen sicherer den dafür verantwortlichen Neuronen und Transduktionswegen zugeordnet werden.

Literaturverzeichnis

- [Aizenman et al, 1991] Aizenman et al (1991). Effects of nicotinic agonists on the nmda receptor. *Brain Research*, 551(1-2):355–357.
- [Akaike et al, 2010] Akaike et al (2010). Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors. role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(1-2):211–216.
- [Ames A, Pollen DA, 1969] Ames A, Pollen DA (1969). Neurotransmission in central nervous tissue: A study of isolated rabbit retina. *Journal of Neurophysiology*, 32(3):424–442.
- [Ascioglu et al, 2004] Ascioglu et al (2004). Effects of cigarette smoking on cognitive processing. *The international journal of neuroscience*, 114(3):381–390.
- [Baldrige WH, 1996] Baldrige WH (1996). Optical recordings of the effects of cholinergic ligands on neurons in the ganglion cell layer of mammalian retina. *The Journal of Neuroscience*, 16(16):5060–5072.
- [Benowitz et al, 2009] Benowitz et al (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of experimental pharmacology*, 129:29–60.
- [Benowitz NL, 2010] Benowitz NL (2010). Nicotine addiction. *The New England journal of medicine*, 362(24):2295–2303.
- [Blanco R, de la Villa P, 1999] Blanco R, de la Villa P (1999). Ionotropic glutamate receptors in isolated horizontal cells of the rabbit retina. *The European Journal of Neuroscience*, 11(3):867–873.
- [Block F, Schwarz M, 1998] Block F, Schwarz M (1998). The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *General Pharmacology*, 30(2):281–287.
- [Bloomfield SA, Dowling JE, 1985] Bloomfield SA, Dowling JE (1985). Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. i. outer plexiform layer. *Journal of Neurophysiology*, 53(3):699–713.
- [Bolz et al, 1985] Bolz et al (1985). Action and localization of gamma-aminobutyric acid in the cat retina. *The Journal of Physiology*, 362:369–393.
- [Bringmann et al, 2006] Bringmann et al (2006). Mueller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retina*, 25(4):397–424.

- [Brown KT, 1968] Brown KT (1968). The electroretinogram: its components and their origins. *Vision Research*, 8(6):633–677.
- [Bui BV, Fortune B, 2004] Bui BV, Fortune B (2004). Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *The Journal of Physiology*, 555:153–173.
- [Cervetto L, MacNichol EF Jr, 1972] Cervetto L, MacNichol EF Jr (1972). Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate. *Science*, 178(4062):767–768.
- [Chang et al, 2011] Chang et al (2011). Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal raphe to the nucleus accumbens. *Journal of Neurophysiology*, 106(2):801–808.
- [Cheon et al, 2001] Cheon et al (2001). Muscarinic acetylcholine receptors in the normal, developing and regenerating newt retinas. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 127(1):9–21.
- [Cisternino et al, 2013] Cisternino et al (2013). Coexistence of passive and proton antiporter-mediated processes in nicotine transport at the mouse blood-brain barrier. *The AAPS Journal*, 15(2):299–307.
- [Cohen ED, Miller RF, 1994] Cohen ED, Miller RF (1994). The role of nmda and non-nmda excitatory amino acid receptors in the function organization of primate retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience*, 11(2):317–332.
- [Contini et al, 2010] Contini et al (2010). Synaptic input of on-bipolar cells onto the dopaminergic neurons of the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(11):2035–2050.
- [Dahlstroem et al, 2004] Dahlstroem et al (2004). Nicotine exposure in breastfed infants. *Acta paediatrica*, 93(6):810–816.
- [Dani JA, 2001] Dani JA (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biological Psychiatry*, 49(3):166–174.
- [Daw et al, 1990] Daw et al (1990). Rod pathways in mammalian retinæ. *Trends in Neurosciences*, 13(3):110–115.
- [Deplano S, 1988] Deplano S (1988). Binding pattern of alpha-bungarotoxin on horizontal cells of a marine teleost retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 277(4):541–548.
- [Dhingra A, Vardi N, 2012] Dhingra A, Vardi N (2012). mglu receptors in the retina - wires membrane transport and signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Membrane Transport and Signaling.*, 1(5):641–653.
- [Dmitrieva et al, 2001] Dmitrieva et al (2001). The relationship between gaba-containing cells and the cholinergic circuitry in the rabbit retina. *Visual Neuroscience*, 18(1):93–100.

- [Dmitrieva et al, 2003] Dmitrieva et al (2003). Identification of cholinceptive glycinergic neurons in the mammalian retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 456:167–175.
- [Dmitrieva et al, 2007] Dmitrieva et al (2007). Expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors by bipolar, amacrine, and ganglion cells of the rabbit retina. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(5):461–476.
- [Dong CJ, Hare WA, 2003] Dong CJ, Hare WA (2003). Temporal modulation of scotopic visual signals by a17 amacrine cells in mammalian retina in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 89(4):2159–2166.
- [Dowling JE, Boycott BB, 1966] Dowling JE, Boycott BB (1966). Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 166(1002):80–111.
- [Dursun SM, Kutcher S, 1999] Dursun SM, Kutcher S (1999). Smoking, nicotine and psychiatric disorders: evidence for therapeutic role, controversies and implications for future research. *Medical hypotheses*, 52(2):101–109.
- [Endeman et al, 2012] Endeman et al (2012). Chloride currents in cones modify feedback from horizontal cells to cones in goldfish retina. *The Journal of Physiology*, 590(22):5581–5595.
- [Famiglietti EV, 1991] Famiglietti EV (1991). Synaptic organization of starburst amacrine cells in rabbit retina: analysis of serial thin sections by electron microscopy and graphic reconstruction. *The Journal of Comparative Neurology*, 309(1):40–70.
- [Fenster et al, 1997] Fenster et al (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *The Journal of Neuroscience*, 17(15):5747–5759.
- [Field GD, Chichilnisky EJ, 2007] Field GD, Chichilnisky EJ (2007). Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annual Review of Neuroscience*, 30:1–30.
- [Firth et al, 2003] Firth et al (2003). Ampa receptors mediate acetylcholine release from starburst amacrine cells in the rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(1):80–90.
- [Flores-Hernandez et al, 2009] Flores-Hernandez et al (2009). Cholinergic direct inhibition of n-methyl-d-aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4):308–318.
- [Florescu et al, 2009] Florescu et al (2009). Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 31(1):14–30.
- [Ford KJ, Feller MB, 2012] Ford KJ, Feller MB (2012). Assembly and disassembly of retinal cholinergic network. *Visual Neuroscience*, 29:61–71.

- [Foulds et al, 1996] Foulds et al (1996). Cognitive performance effects of subcutaneous nicotine in smokers and never-smokers. *Psychopharmacology*, 127(1):31–38.
- [Gaemperli et al, 2010] Gaemperli et al (2010). Nicotine addiction and coronary artery disease: impact of cessation interventions. *Current Pharmaceutical Design*, 16(23):2586–2597.
- [Gahring et al, 2003] Gahring et al (2003). Nicotine-induced neuroprotection against n-methyl-d-aspartic acid or beta-amyloid peptide occur through independent mechanisms distinguished by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Neurochemistry*, 87(5):1125–1136.
- [Galzi JL, Changeux JP, 1995] Galzi JL, Changeux JP (1995). Neuronal nicotinic receptors: Molecular organization and regulations. *Neuropharmacology*, 34(6):536–582.
- [Gábel et al, 2000] Gábel et al (2000). Synaptology of the inner plexiform layer in the anuran retina. *Microscopy Research and Technique*, 50(5):394–402.
- [Goebel et al, 2001] Goebel et al (2001). Bestimmung der netzhautdicke in abhängigkeit von alter und achsenlaenge mit hilfe der optischen kohaerenztomographie. *Der Ophthalmologe*, 98:157–162.
- [Gotti et al, 1997] Gotti et al (1997). Alpha7 and alpha8 nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *The European journal of neuroscience*, 9(6):1201–1211.
- [Granit R, 1933] Granit R (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *The Journal of Physiology*, 77(3):207–239.
- [Hamassaki-Britto et al, 1994] Hamassaki-Britto et al (1994). Bipolar cells of the chick retina containing alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Visual Neuroscience*, 11(1):63–70.
- [Haro R, Drucker-Col n R, 2004] Haro R, Drucker-Col n R (2004). A two-year study on the effects of nicotine and its withdrawal on mood and sleep. *Pharmacopsychiatry*, 37(5):221–227.
- [Hayden et al, 1980] Hayden et al (1980). Acetylcholine synthesis by displaced amacrine cells. *Science*, 210:435–437.
- [Henningfield JE, Keenan RM, 1993] Henningfield JE, Keenan RM (1993). Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 61(5):743–750.
- [Holle et al, 2014] Holle et al (2014). Influence of smoking and caffeine consumption on trigeminal pain processing. *The Journal of Headache and Pain*, 15:39.

- [Hurley et al., 2012] Hurley et al. (2012). Positive and negative effects of alcohol and nicotine and their interactions: a mechanistic review. *Neurotoxicity Research*, 21(1):57–69.
- [Ikeda H, Sheardown MJ, 1982] Ikeda H, Sheardown MJ (1982). 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(5):1299–1308.
- [Ishida AT, Fain GL, 1981] Ishida AT, Fain GL (1981). D-aspartate potentiates the effects of l-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9):5890–5894.
- [Iwamoto et al, 2013] Iwamoto et al (2013). Neuroprotection of rat retinal ganglion cells mediated through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*, 237:184–198.
- [Jaehne et al, 2009] Jaehne et al (2009). Effects of nicotine on sleep during consumption, withdrawal and replacement therapy. *Sleep medicine reviews*, 13(5):363–377.
- [Jurklies et al, 1996] Jurklies et al (1996). Cholinergic effects on cat retina in vitro: changes in rod- and cone-driven b-wave and optic nerve response. *Vision Research*, 36(6):797–816.
- [Kamermans M, Fahrenfort I, 2004] Kamermans M, Fahrenfort I (2004). Epretina interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(5):531–541.
- [Kamermans M, Werblin F, 1992] Kamermans M, Werblin F (1992). Gaba-mediated positive autofeedback loop controls horizontal cell kinetics in tiger salamander retina. *The Journal of Neuroscience*, 12(7):2451–2463.
- [Kang Derwent J, Linsenmeier RA, 2000] Kang Derwent J, Linsenmeier RA (2000). Effects of hypoxemia on the a- and b-waves of the electroretinogram in the cat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(11):3634–3642.
- [Kao et al, 2004] Kao et al (2004). Evidence that certain retinal bipolar cells use both glutamate and gaba. *The Journal of Comparative Neurology*, 478(3):207–218.
- [Kenny PJ, Markou A, 2001] Kenny PJ, Markou A (2001). Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 70:531–549.
- [Keyser et al, 1988] Keyser et al (1988). Cholinoceptive neurons in the retina of the chick: an immunohistochemical study of the nicotinic acetylcholine receptors. *Visual Neuroscience*, 1(4):349–366.
- [Keyser et al, 2000] Keyser et al (2000). Amacrine, ganglion, and displaced amacrine cells in the rabbit retina express nicotinic acetylcholine receptors. *Visual Neuroscience*, 17(5):743–752.

- [Khan et al, 2006] Khan et al (2006). Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology*, 90(1):75–80.
- [Kihara et al, 2001] Kihara et al (2001). alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block a beta-amyloid-induced neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(17):13541–13546.
- [Kim HJ, Jeon CJ, 2014] Kim HJ, Jeon CJ (2014). Synaptic pattern of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on the direction-selective retinal ganglion cells in the postnatal mouse retina. *Experimental Eye Research*, 122:54–64.
- [Kolb H, 1977] Kolb H (1977). The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *Journal of Neurocytology*, 6(2):131–153.
- [Koob GF, 2000] Koob GF (2000). Neurobiology of addiction. toward the development of new therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 909:170–185.
- [Koulen et al, 1999] Koulen et al (1999). Modulation of intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17):9909–9914.
- [Kreitzer et al, 2009] Kreitzer et al (2009). Pharmacological characterization, localization, and regulation of ionotropic glutamate receptors in skate horizontal cells. *Visual Neuroscience*, 26(4):375–387.
- [Lamb TD, Pugh EN Jr, 1992] Lamb TD, Pugh EN Jr (1992). A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. *The Journal of Physiology*, 449:719–758.
- [Le Houezec et al, 1994] Le Houezec et al (1994). A low dose of subcutaneous nicotine improves information processing in non-smokers. *Psychopharmacology*, 114:628–634.
- [Le Houezec J, Benowitz NL, 1991] Le Houezec J, Benowitz NL (1991). Basic and clinical psychopharmacology of nicotine. *Clinics in Chest Medicine*, 12(4):681–699.
- [Lei B, Perlman I, 1999] Lei B, Perlman I (1999). The contributions of voltage- and time-dependent potassium conductances to the electroretinogram in rabbits. *Visual Neuroscience*, 16(4):743–754.
- [Li et al., 2012] Li et al. (2012). Gap-junctional coupling of mammalian rod photoreceptors and its effect on visual detection. *The Journal of Neuroscience*, 32(10):3552–3562.

- [Lim R, Sobey CG, 2011] Lim R, Sobey CG (2011). Maternal nicotine exposure and fetal programming of vascular oxidative stress in adult offspring. *British journal of pharmacology*, 164(5):1397–1399.
- [Linn et al, 1991] Linn et al (1991). Acetylcholine release from the rabbit retina mediated by kainate receptors. *The Journal of Neuroscience*, 11(1):111–122.
- [Liu et al, 2013] Liu et al (2013). Calcium channels in rat horizontal cells regulate feedback inhibition of photoreceptors through an unconventional gaba- and ph-sensitive mechanism. *The Journal of Physiology*, 591(13):3309–3324.
- [Lüllmann-Rauch, 2009] Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*, volume 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [Lueke et al, 2005] Lueke et al (2005). The isolated perfused bovine retina - a sensitive tool for pharmacological research on retinal function. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 16(1-3):27–36.
- [MacNeil et al., 2004] MacNeil et al. (2004). The population of bipolar cells in the rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 472(1):73–86.
- [Marc RE, 1988] Marc RE (1988). The role of glycine in the mammalian retina. *Progress in Retinal Research*, 8:67–107.
- [Marriott et al, 2005] Marriott et al (2005). Nicotinic cholinergic receptors in the rat retina: Simple and mixed heteromeric subtypes. *Molecular Pharmacology*, 68:1656–1668.
- [Masland RH, 2001] Masland RH (2001). The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience*, 4(9):877–886.
- [Masland RH, 2005] Masland RH (2005). The many roles of starburst amacrine cells. *Trends in Neurosciences*, 28(8):395–396.
- [Masland RH, 2012a] Masland RH (2012a). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2):266–280.
- [Masland RH, 2012b] Masland RH (2012b). The tasks of amacrine cells. *Visual Neuroscience*, 29(1):3–9.
- [Millar TJ, Morgan IG, 1987] Millar TJ, Morgan IG (1987). Cholinergic amacrine cells in the rabbit retina synapse onto other cholinergic amacrine cells. *Neuroscience Letters*, 74(3):281–285.
- [Moretti et al, 2004] Moretti et al (2004). Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. *Molecular Pharmacology*, 66:85–96.
- [Moyano et al, 2013] Moyano et al (2013). The effects of nicotine on cone and rod b-wave responses in larval zebrafish. *Visual Neuroscience*, 30(4):141–145.
- [Myers et al, 2008] Myers et al (2008). Dose-related enhancement of mood and

- cognition in smokers administered nicotine nasal spray. *Neuropsychopharmacology*, 33(3):588–598.
- [Myhr KL, McReynolds JS, 1996] Myhr KL, McReynolds JS (1996). Cholinergic modulation of dopamine release and horizontal cell coupling in mudpuppy retina. *Vision Research*, 36(24):3933–3938.
- [Neal et al, 2001] Neal et al (2001). Activation of nicotinic receptors on gabaergic amacrine cells in the rabbit retina indirectly stimulates dopamine release. *Visual Neuroscience*, 18(1):55–64.
- [Newman E, Reichenbach A, 1996] Newman E, Reichenbach A (1996). The mueller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8):307–312.
- [Newman EA, 1987] Newman EA (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian müller (glial) cells. a comparative study. *The Journal of Neuroscience*, 7(8):2423–2432.
- [Newman EA, Zahs KR, 1998] Newman EA, Zahs KR (1998). Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *The Journal of Neuroscience*, 18(11):4022–4028.
- [Oakley et al, 1992] Oakley et al (1992). Spatial buffering of extracellular potassium by müller (glial) cells in the toad retina. *Experimental Eye Research*, 55(4):539–550.
- [Ochoa et al, 1989] Ochoa et al (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. molecular mechanisms and effect of modulators. *Cellular and Molecular Biology*, 9(2):141–178.
- [O'Malley et al, 1992] O'Malley et al (1992). Co-release of acetylcholine and gaba by the starburst amacrine cell. *The Journal of Neuroscience*, 12(4):1394–1408.
- [Penn RD, Hagins WA, 1969] Penn RD, Hagins WA (1969). Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature*, 223(5202):201–204.
- [Quick W, Lester RAJ, 2002] Quick W, Lester RAJ (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 53(4):457–478.
- [Rao-Mirotznik et al., 1995] Rao-Mirotznik et al. (1995). Mammalian rod terminal: Architecture of a binary synapse. *Neuron*, 14(3):561–569.
- [Reed et al, 2002] Reed et al (2002). Rabbit retinal ganglion cell responses mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Visual Neuroscience*, 19(4):427–438.
- [Ren et al, 2005] Ren et al (2005). Multiple calcium channels and kinases mediate alpha7 nicotinic receptor neuroprotection in pc12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 94(4):926–933.

- [Robson et al, 2003] Robson et al (2003). Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *The Journal of Physiology*, 547:509–530.
- [Robson JG, Frishman LJ, 1999] Robson JG, Frishman LJ (1998-1999). Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 95(3-4):187–215.
- [Rockhill et al, 2002] Rockhill et al (2002). The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *The Journal of Neuroscience*, 22(9):3831–3843.
- [Russell MAH, Feyerabend C, 1978] Russell MAH, Feyerabend C (1978). Cigarette smoking: A dependence on high-nicotine boli. *Drug Metabolism Reviews*, 8(1):29–57.
- [Sakuranaga M, Naka K, 1985] Sakuranaga M, Naka K (1985). Signal transmission in the catfish retina. i. transmission in the outer retina. *Journal of Neurophysiology*, 53(2):373–389.
- [Salin-Pascual RJ, 2002] Salin-Pascual RJ (2002). Relationship between mood improvement and sleep changes with acute nicotine administration in non-smoking major depressed patients. *Revista de investigación clínica*, 54(1):36–40.
- [Schmidt et al, 1987] Schmidt et al (1987). Action and localization of acetylcholine in the cat retina. *Journal of Neurophysiology*, 58(5):997–1015.
- [Schulze, 2011] Schulze, S. (2011). *Basics Embryologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- [Sharples GV, Wonnacott S, 2001] Sharples GV, Wonnacott S (2001). Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews*, No. 19.
- [Sheardown MJ, 1997] Sheardown MJ (1997). The triggering of spreading depression in the chick retina by nicotinic receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 337(2-3):209–212.
- [Shimazaki et al, 1984] Shimazaki et al (1984). Aspartate-induced dissociation of proximal from distal retinal activity in the mudpuppy. *Vision Research*, 24(6):587–595.
- [Siapich S, 2010] Siapich S (2010). *Die Rolle der pharmakoresistenten und Ni^{2+} -sensitiven spannungsgesteuerten E-/R-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die Funktion ihrer Interaktionspartner in der isolierten umströmten Vertebratennetzhaut [Dissertation]*. PhD thesis, Universität zu Köln.
- [Sieber M, 2012] Sieber M (2012). Neuroprotective properties of nicotine. *Current Medical Chemistry*, 19(2):292–297.
- [Sillman et al, 1969] Sillman et al (1969). Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina. I. general properties of the response. *Vision Research*, 9(12):1435–1442.

- [Slaughter MM, Miller RF, 1981] Slaughter MM, Miller RF (1981). 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science*, 211(4478):182–185.
- [Sobkowiak R, Lesicki A, 2013] Sobkowiak R, Lesicki A (2013). Absorption, metabolism and excretion of nicotine in humans. *Postepy Biochemii*, 59(1):33–44.
- [Stockton RA, Slaughter MM, 1989] Stockton RA, Slaughter MM (1989). B-wave of the electroretinogram. a reflection of on bipolar cell activity. *The Journal of general physiology*, 93(1):101–122.
- [Strang et al, 2010] Strang et al (2010). Muscarinic acetylcholine receptor localization and activation effects on ganglion response properties. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(5):2778–2789.
- [Straub W, 1961] Straub W (1961). Das elektroretinogramm: experimentelle und klinische beobachtungen. *Enke Verlag*.
- [Taylor WR, Smith RG, 2011] Taylor WR, Smith RG (2011). Trigger features and excitation in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(5):672–678.
- [Taylor WR, Smith RG, 2012] Taylor WR, Smith RG (2012). The role of starburst amacrine cells in visual signal processing. *Visual Neuroscience*, 29(1):73–81.
- [Thompson et al, 2006] Thompson et al (2006). Acetylcholine neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in adult pig retinal ganglion cells is partially mediated through $\alpha 4$ nachrs. *Experimental Eye Research*, 83(5):1135–1145.
- [Thoreson WB, Mangel SC, 2012] Thoreson WB, Mangel SC (2012). Lateral interactions in the outer retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(5):407–441.
- [Toledano et al, 2010] Toledano et al (2010). Diversity and variability of the effects of nicotine on different cortical regions of the brain - therapeutic and toxicological implications. *Central Nervous System Agents in Medical Chemistry*, 10(3):180–206.
- [Tutka et al, 2005] Tutka et al (2005). Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*, 57(2):143–153.
- [Van Essen et al, 1992] Van Essen et al (1992). Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*, 255(5043):419–423.
- [Varghese et al., 2011] Varghese et al. (2011). The effects of nicotine on the human electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(13):9445–9451.
- [Vizi ES, Lendvai B, 1999] Vizi ES, Lendvai B (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 30(3):219–235.

- [Voelgyi et al., 2013] Voelgyi et al. (2013). Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme? *Progress in Retinal and Eye Research*, 34:1–18.
- [Voigt T, 1986] Voigt T (1986). Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 284(1):19–35.
- [Waessle et al, 2009] Waessle et al (2009). Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *The Journal of Neuroscience*, 29(1):106–117.
- [Waessle H, Boycott BB, 1991] Waessle H, Boycott BB (1991). Functional architecture of mammalian retina. *Physiological Reviews*, 71(2):447–480.
- [Wehrwein et al, 2004] Wehrwein et al (2004). Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(5):1531–1543.
- [Wen R, Oakley B, 1990] Wen R, Oakley B (1990). K(+)-evoked mueller cell depolarization generates b-wave of electroretinogram in toad retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6):2117–2121.
- [Wonnacott et al, 1990] Wonnacott et al (1990). Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release. *Ciba Foundation Symposium*, 152:87–101.
- [Woodell A, Rohrer B, 2014] Woodell A, Rohrer B (2014). A mechanistic review of cigarette smoke and age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 801:301–307.
- [Wu et al, 2004] Wu et al (2004). Light-evoked responses of the mouse retinal pigment epithelium. *Journal of Neurophysiology*, 91(3):1134–1142.
- [Yamada et al, 2003] Yamada et al (2003). Synaptic connections of starburst amacrine cells and localization of acetylcholine receptors in primate retinas. *The Journal of Comparative Neurology*, 461:76–90.
- [Yang XL, 2004] Yang XL (2004). Characterization of receptors for glutamate and gaba in retinal neurons. *Progress in Neurobiology*, 73(2):127–150.
- [Yasuhara et al, 2003] Yasuhara et al (2003). Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: Expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *The Journal of Neuroscience*, 23(7):2872–2881.
- [Yoshida et al, 2001] Yoshida et al (2001). A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron*, 30(3):771–780.
- [Zevin et al, 1998] Zevin et al (1998). Clinical pharmacology of nicotine. *Clinics in Dermatology*, 16(5):557–564.
- [Zheng et al, 2004] Zheng et al (2004). A developmental switch in excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron*, 44(5):851–864.

Anhang

Danksagung

Ich danke herzlichst allen Personen, welche die Erstellung der vorliegenden Dissertation ermöglicht und unterstützt haben:

- Univ.-Prof. Dr. med. Peter Walter für die Betreuung meiner Dissertation als Doktorvater
- Dr. med. Serge Sjapic für die praktische Betreuung meiner Arbeit
- Frau Andrea Goebel, die mich in die Bedienung der Versuchsanordnung eingewiesen hat
- Metzgerei und Partyservice Nießen GbR für die Entnahme und Überlassung der für die Experimente verwendeten Rinderaugen

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden
Originaldaten

bei mir, Janina Mauer, Hansenstraße 15 in 53859 Niederkassel

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Frau Janina Mauer, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Effekte von Nikotin auf a- und b-Welle des Elektoretinogramms der isolierten, umströmten Vertebratennetzhaut“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, statistische Auswertung in Kooperation mit dem praktischen Betreuer, Analyse im Kontext der Literaturrecherche und Niederschrift der Dissertation.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich (Doktorandin) folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

	Doktor- andin J.Mauer	Prakt. Betreuer Dr. S. Sjapic	Studentische Mitarbeiterin A. Goebel	Tiermaterialquelle Metzgerei Nießen GbR	Doktorvater Prof. Dr. P Walter	Summe (%)
Studien- überwachung	30	60			10	100
Studiendesign/Kon- zeption	30	70				100
Einarbeitung in Präparation und Versuchsapparatur		30	70			100
Bereitstellung von Materialien	30	30		40		100
Präparation der Materialien, Versuchsaufbau	100					100
Durchführung der a- Wellen-Experimente	100					100
Durchführung der b- Wellen-Experimente	100					100
Datenauswertung	70	30				100
Statistische Auswertung	30	70				100
Interpretation der Datenauswertung	80	20				100

Unterschrift der Doktorandin Janina Mauer

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau Janina Mauer

Unterschrift des Doktorvaters Univ.-Prof. Dr. med. Peter Walter