Aus der Abteilung für klinische Neurophysiologie (Prof. Dr. med. W. Paulus) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Kalziumabhängige Effekte nikotinerger Modulation LTD-ähnlicher Neuroplastizität im Menschen mittels kathodaler tDCS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Niklas Jürgen Dieter Schade

aus

Eschwege

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. med. M. A. Nitsche
Ko-Referent/in:	PD Dr. Kirsten Jordan
Promotor:	Prof. Dr. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 10.01.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Kalziumabhängige Effekte nikotinerger Modulation LTDähnlicher Neuroplastizität im Menschen mittels kathodaler tDCS" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, den 10.05.2022

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbil	dungsverzeichnis	III
Tabe	llenverzeichnis	III
Abkü	rzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Nikotin	1
1.1.1	Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR)	1
1.2	Modulation neuronaler Kalziumkonzentrationen	2
1.2.1	Spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCC)	3
1.3	Neuroplastizität	4
1.4	Transkranielle Magnetstimulation (TMS)	5
1.5	Transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS)	6
1.6	Zielsetzung	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Probanden und Auswahlkriterien	9
2.1.2	Versuchsaufbau	10
2.1.3	Nikotin	11
2.1.4	Flunarizin	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS)	12
2.2.2	Transkranielle Magnetstimulation (TMS)	
2.2.3	Versuchsablauf	14
2.2.4	Datenanalyse und Statistik	16
3	Ergebnisse	
3.1	Probandenkollektiv	18
3.2	Allgemeine Anmerkungen	18
3.3	Einfluss von Flunarizin auf ctDCS-induzierte Neuroplastizität ohne Nikotin	19
3.3.1	Untersuchung mit Placebomedikation (Placebobedingung 1)	19
3.3.2	Untersuchung mit Flunarizin	19
3.4	Einfluss von Flunarizin auf ctDCS-induzierte Neuroplastizität mit Nikotin	23
3.4.1	Untersuchung mit Placebomedikation (Placebobedingung 2)	23
3.4.2	Untersuchung mit Flunarizin	23
4	Diskussion	
4.1	Allgemeine Anmerkungen	26
4.2	Untersuchungen ohne Nikotin	26

4.3	Untersuchungen mit Nikotin	30
4.4	Auswirkungen auf kognitive Leistungen	34
4.5	Limitationen	36
4.5.1	Methodisch	36
4.5.2	Pharmakologisch	37
4.6	Ausblick	38
5	Zusammenfassung	39
5 6	Zusammenfassung	39 40
5 6 6.1	Zusammenfassung Anhang Tabellen	39 40 40
5 6 6.1 6.2	Zusammenfassung Anhang Tabellen Abbildungen	39 40 40 41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Probandin mit vollständigem Versuchsaufbau	11
Abbildung 2: Durchführung einer MEP Messung	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	16
Abbildung 4: Verlauf der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) unter Applikation von Placebo-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen	21
Abbildung 5: Veränderung der gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation von Placebo-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen	22
Abbildung 6: Verlauf der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) unter Applikation von Nikotin-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen	24
Abbildung 7: Veränderung der gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation von Nikotin-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen	25
Abbildung 8: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Placebo und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und durch kathodale tDCS-induzierte LTD-ähnliche Plastizität	29
Abbildung 9: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Nikotin, Placebo und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und durch kathodale tDCS-induzierte LTD-ähnliche Plastizität	33
Abbildung 10: Durchführung der kathodalen tDCS	41
Abbildung 11: Versuchsaufbau inklusive verwendeter Materialien	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle	1: Ergebnisse der Messwiederholungs-ANOVA (rANOVA).	19
Tabelle	2: Ergebnisse des t-Tests für gepaarte Stichproben für die benötigte Stimulationsintensität (in % der maximalen Stimulatorleistung; % MSO) vor und nach Medikamentengabe	40
Tabelle	3: Ergebnisse des t-Tests für gepaarte Stichproben für die benötigte Stimulationsintensität (in % der maximalen Stimulatorleistung; % MSO) unter Placebo- bzw. Nikotin-Pflaster	40
Tabelle	4: Ergebnisse des t-Tests für gepaarte Stichproben für die gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Placebo-Pflaster oder Nikotin-Pflaster und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen	40

Abkürzungsverzeichnis

Acetylcholin
Acetylcholin-Rezeptor
Musculus abductor digit minimi
α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-4-Propionsäure
Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
Kathodale transkranielle Gleichstromstimulation (engl. cathodal transcranial direct current stimulation)
Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie A, Polypeptid 6
Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie A, Polypeptid 6
Dopamin 2-Rezeptor
Elektromyographie
γ-Aminobuttersäure
Langzeit-Depression (engl. Long-term depression)
Langzeit-Potenzierung (engl. Long-term Potentiation)
Motorisch evozierte Potentiale
Maximale Stimulatorleistung (engl. maximum stimulator output)
Nikotinerge/r Acetylcholin-Rezeptor/en
N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
Gepaarte assoziative Stimulation (engl.: paired associative stimulation)
Messwiederholungsvarianzanalyse (engl. repeated measures analysis of variance)
Transkranielle Gleichstromstimulation (engl. transcranial direct current stimulation)
Transkranielle Magnetstimulation
Spannungsabhängige Kalziumkanäle (engl. voltage-gated calcium channels)
Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Nikotin

Tabakabhängigkeit hat in der deutschen Erwachsenenbevölkerung eine hohe Prävalenz (28%) (Hoebel et al. 2012). Gleichzeitig stellt sie einen bedeutenden Risikofaktor für eine Vielzahl an schwerwiegenden Erkrankungen dar. Ein wichtiger psychotroper Bestandteil und verantwortlich für die schnelle Abhängigkeitsentwicklung ist das Nikotin (Heishman et al. 1994; Levin et al. 2006). Neben der Entwicklung von Abhängigkeiten spielt Nikotin auch in zahlreichen Gedächtnisprozessen eine wichtige Rolle und moduliert Neuroplastizität (Grundey et al. 2012a; Grundey et al. 2012b).

In Tier- und Humanstudien konnten unter Gabe von Nikotin deutliche Verbesserungen von Aufmerksamkeit, motorischen Funktionen, Arbeitsgedächtnis und episodischem Gedächtnis gezeigt werden (Rezvani und Levin 2001; Hahn und Stolerman 2002; Kumari et al. 2003; Jubelt et al. 2008; Froeliger et al. 2009; Heishman et al. 2010). Die molekularen Grundlagen der Wirkung von Nikotin auf die oben genannte Bereiche ist weiterhin nicht ausreichend geklärt, jedoch scheint ein starker Zusammenhang zwischen der Aktivierung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und deren Beeinflussung von neuronaler Plastizität zu bestehen (Grundey et al. 2012a; Grundey et al. 2012b). Zudem moduliert Nikotin auch über serotonerge, adrenerge, dopaminerge, glutamaterge und GABAerge (y-Aminobuttersäure) Systeme neuronale Plastizität (Summers et al. 1997; Alkondon et al. 1999; Albuquerque et al. 2009; Huang et al. 2010). Die Interaktionen von Nikotin mit all diesen Transmittersystemen nicht sind weiterhin ausreichend aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen.

1.1.1 Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR)

Die nAChR sind eine heterogene Gruppe ligandengesteuerter Ionenkanäle, welche in unterschiedlicher Ausprägung in vielen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems vorkommen und dort die Wirkung neuronaler Botenstoffe modulieren (Levin und Simon 1998; Gotti und Clementi 2004). Die heterogene Struktur und Funktion der nAChR ergibt sich aus ihrer pentameren Struktur. Jeder Rezeptor wird von fünf der aktuell bekannten neun $\alpha 2$ - $\alpha 10$ - und drei $\beta 2$ - $\beta 4$ -Untereinheiten gebildet (Gotti und Clementi 2004). Die im menschlichen zentralen Nervensystem (ZNS) am häufigsten vorkommenden Rezeptor-Subtypen sind die Hetero-Oligomeren $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren sowie der Homo-Oligomere $\alpha 7$ -Rezeptor. Die hieraus resultierende molekulare und funktionelle Vielfalt der Rezeptoren sowie die Verbreitung im gesamten Nervensystem deuten auf eine zentrale modulierende Rolle in viele neuronalen Prozessen hin (Dani und Bertrand 2007; Gotti et al. 2007; McKay et al. 2007). Der Einfluss des cholinergen Systems auf Neuroplastizität ist aktuell Gegenstand zahlreicher Forschungsbestreben. Vor einigen Jahren konnten Kuo et al. (2007) zeigen, dass durch transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS) vermittelte exzitatorische Neuroplastizität unter Gabe des Cholinesterase-Inhibitors Rivastigmin aufgehoben wurde. Ähnliche Effekte konnten bei Nicht-Rauchern unter Gabe von Nikotin beobachtet werden. Hier konnten die exzitatorischen nicht-fokalen Effekte der tDCS unter Nikotingabe in eine Inhibition umgewandelt werden (Thirugnanasambandam et al. 2011; Grundey et al. 2012b). Insbesondere nAChR mit Kalziumkanaleigenschaften scheinen hier von zentraler Bedeutung zu sein. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Vareniclin, ein $\alpha 4\beta 2$ -Partialagonist und $\alpha 7$ -Agonist, mit Nikotin vergleichbare modulierende Effekte bewirkt (Batsikadze et al. 2017). Sowohl $\alpha 4\beta 2$ - als auch $\alpha 7$ -Rezeptoren erhöhen als prä- und postsynaptische ligandengesteuerte Ionenkanäle die intrazellulären Kalziumkonzentrationen sowie die Freisetzung von Neurotransmittern (Radcliffe und Dani 1998; Fujii et al. 1999).

Diese Effekte von Nikotin und nikotinähnlichen Substanzen auf exzitatorische Plastizität legen einen kalziumvermittelten Mechanismus nahe, während die genaueren molekularen Zusammenhänge noch weitgehend ungeklärt sind.

1.2 Modulation neuronaler Kalziumkonzentrationen

Intrazelluläre Effekte von Kalziumionen wurden erstmalig durch Sydney Ringer im Jahre 1883 beschrieben (Ringer 1883). Seit seiner Beschreibung der Wirkung von Kalzium auf Herzmuskelkontraktionen wurden zahlreiche weitere Prozesse beschrieben, in welchen Kalzium als sekundärer Botenstoff fungiert. So konnte gezeigt werden, dass Kalziumionen beispielsweise eine wichtige Rolle bei Genexpression und Apoptose inne haben (Carafoli 2003; Lodish et al. 2008). Die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration spielt jedoch auch eine besondere Rolle bei der Induktion von Neuroplastizität (Bennett 2000). Eine diesbezügliche Hypothese besagt, dass die neuronale Plastizität von der Kalziumkonzentration der Nervenzellen abhängt. Für die exzitatorische Langzeit-Potenzierung (LTP) werden demnach höhere und für die inhibitorische Langzeit-Depression (LTD) niedrigere Kalziumkonzentrationen benötigt. Zwischen den hierfür benötigten Kalziumkonzentrationen befindet sich ein als "no man's land" bezeichneter Bereich, in welchem keinerlei Plastizität induziert wird (Lisman 2001). Neben dieser Übergangsphase zwischen den LTD- und LTP-Zonen kann jedoch auch eine zu hohe Kalziumkonzentration gegensätzliche Wirkungen zeigen. So kann bei zu hoher Kalziumkonzentration eine Aktivierung von Kalium-Kanälen erfolgen, welche in der Folge die LTP aufheben (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Dieser Bereich wird auch "no man's land 2" genannt.

Die zelluläre Kalziumhomöostase wird über verschiedene neurophysiologische Mechanismen reguliert. Im Rahmen dieser Studie ist die Modulation der Kalziumkonzentrationen durch Nikotin und Flunarizin von besonderem Interesse. Während Nikotin die Kalziumhomöostase primär über agonistische Effekte am nAChR beeinflusst, wirkt Flunarizin primär antagonistisch an spannungsabhängigen Kalziumkanälen (VGCC).

1.2.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCC)

Die VGCC sind Ionenkanäle, welche unter physiologischen Bedingungen eine selektive Permeabilität für Kalziumionen zeigen und sich nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften in mehrere Kategorien unterteilen (Bootman et al. 2001; Lasoń et al. 2011). Die beiden Hauptvertreter im ZNS bilden die L- und T-Typ-Kalziumkanäle, welche bei physiologischen Ruhemembranpotentialen inaktiv sind. Die häufig in Dendriten vorkommenden L-Typ-VGCC bewirken aufgrund ihrer langsamen Inaktivierung langanhaltende Veränderungen der Kalziumkonzentrationen und werden erst durch hohe Membranpotentiale aktiviert (Bertolino und Llinás 1992; Errington et al. 2005). Im Gegensatz hierzu werden die in kortikalen Neuronen vorkommenden T-Typ-VGCC bereits durch Membranpotentiale aktiviert und bewirken transiente geringe Konzentrationsveränderungen (Talley et al. 1999; Errington et al. 2005).

Flunarizin ist ein Arzneimittel, welches als Kalziumkanalantagonist zur Prophylaxe bei Migräne und Behandlung verschiedener Schwindelformen eingesetzt wird. Es wurde 1967 von der Firma Janssen Pharmaceutical entdeckt. Neben seiner Haupteigenschaft als Kalziumkanalantagonist hat Flunarizin auch Calmodulin-bindende, H₁-antihistaminerge, antiarrhythmische und antikonvulsive Eigenschaften (Louis und Spierings 1982; Holmes et al. 1984; Nitsche et al. 2012; Grundey et al. 2018). Die maximale Plasmakonzentration nach oraler Einnahme ist nach etwa zwei Stunden erreicht, die Eliminationshalbwertszeit beträgt bei einmaliger Gabe 5 bis 15 Stunden (Holmes et al. 1984). Flunarizin fungiert in vivo in erster Linie als Antagonist an L- und T-Typ-Kalziumkanälen (Kobayashi und Mori 1998; Nitsche et al. 2003d). Zudem sorgt Flunarizin in vitro über die Antagonisierung präsynaptischer VGCC für eine Reduktion der Glutamat- und in höherer Dosis auch der GABA-Ausschüttung (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017). Unter Dosierungen bis zu 10 mg konnten signifikante Effekte auf zentralnervöse Systeme und Neuroplastizität gezeigt werden (Louis und Spierings 1982; Nitsche et al. 2003d; Grundey et al. 2018).

1.3 Neuroplastizität

Unter neuronaler Plastizität versteht man die Fähigkeit von Nervenzellen sich an wechselnde interne und externe Einflussfaktoren anzupassen. Es können sowohl funktionelle als auch strukturelle Veränderungen beobachtet werden. Hierzu zählen neben Verstärkung und Abschwächung bestehender synaptischer Verbindungen auch die Neuschaffung oder Auslöschung bereits bestehender Verbindungen (Abraham und Williams 2003; Matsuzaki et al. 2004; Bosch und Hayashi 2012). Als zugrundeliegende Mechanismen stehen vor allem Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (LTD) im Zentrum der Forschungsbestrebungen und werden als wichtiger Teil zahlreicher Lernprozesse angesehen (Rioult-Pedotti et al. 2000). Erreicht ein Aktionspotenzial eine Nervenendigung, so sorgt die Spannungsdifferenz über entsprechende Ionenkanäle für den Einstrom von Kationen, insbesondere Kalzium, in die Zelle. Neurotransmitter werden nun kalziumvermittelt in den synaptischen Spalt freigesetzt. Im Falle der LTP und LTD werden Kalzium und Glutamat in unterschiedlichen Mengen ausgeschüttet. Glutamat bindet anschließend unter anderem an postsynaptischen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), welche ebenfalls Ionenkanaleigenschaften aufweisen und die postsynaptische Erregungsweiterleitung beeinflussen. Bei Ruhemembranpotentialen unter -30 mV sind die meisten NMDA-Rezeptoren durch Magnesiumionen geblockt und bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen wenig aktiv.

Im Falle der LTP kommt es zu einer starken Depolarisation der Prä- und Postsynapse mit präsynaptischer Transmitterausschüttung. Durch die gleichzeitige Depolarisation der Präund Postsynapse werden die NMDA-Rezeptoren entblockt, und das präsynaptisch ausgeschüttete Glutamat kann an die Rezeptoren binden. Da NMDA-Rezeptoren auch selbst als Kalziumkanäle fungieren, erhöht die Bindung von Glutamat die Permeabilität der postsynaptischen Membran für Kalzium. Es folgt ein starker postsynaptischer Kalziumeinstrom. Tritt dieser Fall häufig ein, folgt eine Stärkung der synaptischen Weiterleitung u.a. über Hochregulation von Glutamat-Rezeptoren (vor allem AMPA-Rezeptoren) (Malinow 2003; Malenka und Bear 2004). Hierbei wird die Kalzium-Kalmodulin-Kinase II phosphoryliert und vermittelt den vermehrten Einbau und die Aktivierung von membranständigen AMPA-Rezeptoren (D'Alcantara et al. 2003).

Im Falle der LTD kommt es zu einer asynchronen Depolarisation. Aufgrund einer niedrigeren präsynaptischen Spannungsänderung wird weniger Kalzium und in der Folge auch weniger Glutamat ausgeschüttet. Die NMDA-Rezeptoren sind zum Teil aufgrund mangelnder Depolarisation der Postsynapse weiterhin geblockt. Da diese Blockade jedoch nur unvollständig ist und das Konzentrationsgefälle einen starken Drang der Kalziumionen in die Postsynapse bewirkt, kommt es dennoch zu einer postsynaptischen Aktivierung, wenn auch in geringerem Ausmaß. Das häufige Auftreten dieser Übertragungen bewirkt dementsprechende Anpassungsprozesse zur Schwächung der synaptischen Verbindung. Ein Beispiel hierfür ist die Reduktion der Glutamat-Rezeptordichte (insbesondere der AMPA-

Rezeptoren) (Malinow 2003; Malenka und Bear 2004). Durch den wiederkehrenden geringen Anstieg der Kalziumkonzentration erfolgt eine Dephosphorylierung der Kalzium-Kalmodulin-Kinase II, welche die postsynaptischen AMPA-Rezeptoren inaktiviert (D'Alcantara et al. 2003). Sowohl LTD als auch LTP werden jedoch neben glutamatergen auch durch GABA-vermittelte Mechanismen moduliert (Caillard et al. 1999a; Caillard et al. 1999b).

GABA stellt einen der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des ZNS dar. Die entsprechenden GABA-Rezeptoren werden in zwei Subgruppen unterteilt. Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren und die metabotropen GABA_B-Rezeptoren. Insbesondere die postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Modulation neuronaler Inhibition (Sigel und Steinmann 2012). GABA_A-Rezeptoren ermöglichen in aktiviertem Zustand eine erhöhte Permeabilität für Anionen, insbesondere Chloridionen, durch die Zellmembran. Dies führt aufgrund des physiologischen Spannungsgefälles in vivo unter Normalbedingungen zu einem Einstrom von Anionen in die Zelle. Die genauen Wirkmechanismen insbesondere auf langanhaltende inhibitorische Prozesse wie die LTD sind aktueller Gegenstand der Forschung (Kullmann et al. 2012; Sigel und Steinmann 2012).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche nicht invasive Hirnstimulationsverfahren entwickelt, welche es ermöglichen, LTP- und LTD-ähnliche Effekte zu induzieren. Hierzu zählen unter anderem die transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS) und die transkranielle Magnetstimulation (TMS)

1.4 Transkranielle Magnetstimulation (TMS)

Die transkranielle Magnetstimulation (TMS) wurde 1985 von Anthony Barker entwickelt und stellt ein nicht invasives, schmerzfreies Verfahren zur Stimulation kortikaler Areale dar (Barker et al. 1985). In den folgenden Jahren etablierte sich die TMS als effektives Verfahren in Forschung und klinischer Diagnostik. Auf Grundlage der TMS entwickelten sich zudem Methoden zur Induktion verlängerter kortikaler Erregbarkeitsveränderungen. Durch repetitive Anwendung der TMS entstand die repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS), durch Kombination von peripherer Nervenstimulation mit TMS entstand die gepaarte assoziative Stimulation (PAS).

Einen besonderen Stellenwert gewannen TMS-gestützte Verfahren in der neurologischen Diagnostik von z.B. Multipler Sklerose (MS) und Amyotropher Lateralsklerose (ALS). In Kombination mit der Elektromyographie (EMG) ermöglicht die TMS durch Stimulation motorischer Kortexareale und sukzessive Ableitung der motorischen Antwort am betreffenden Muskel eine objektive Einschätzung der motorischen Reizweiterleitung. Bei TMS über dem primär motorischen Kortex werden die generierten Aktionspotentiale zunächst über die kortikospinalen Bahnen (auch Pyramidenbahnen) in das Vorderhorn des Rückenmarks weitergeleitet. Hier werden sie nach Verschaltung auf die efferenten Nervenfasern zur Muskulatur übertragen und lösen zuletzt die Muskelkontraktion aus. Die somit abgeleiteten motorisch evozierten Potentiale (MEP) geben durch ihre Amplitude und Latenz Hinweise auf die strukturelle und funktionelle Konnektivität zwischen Stimulationsund Messort. Kommt es unter stabilen anatomisch-strukturellen Bedingungen und gleicher Stimulationsintensität der TMS wiederholt zu einer Erhöhung der MEP-Amplituden, so ist von einer verbesserten Konnektivität bzw. vermehrten Exzitabilität von Neuronen auszugehen. Gleichzeitig deutet eine Verringerung der MEP-Amplituden auf eine verminderte neuronale Exzitabilität bzw. Konnektivität hin (Rothwell 1993).

1.5 Transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS)

Die transkranielle Gleichstromstimulation (engl. transcranial direct current stimulation; tDCS) stellt ein etabliertes, nicht invasives Verfahren zur Induktion kortikaler Plastizität dar, welches mittels tonischer Elektrostimulation des Gehirns Exzitabilitätsveränderungen hervorruft (Nitsche et al. 2008; Fritsch et al. 2010). Bereits Bindman et al. (1964) konnten im Tiermodell nachweisen, dass die Applikation von Gleichstrom auf den sensomotorischen Kortex Veränderungen der kortikalen Exzitabilität hervorruft, welche auch noch Stunden nach der Applikation persistierten. Während in diesen ersten Versuchen die Elektroden nach Eröffnung der Schädeldecke direkt auf dem Kortex der Versuchstiere platziert wurden, konnte in den folgenden Jahren gezeigt werden, dass bei ausreichender Intensität der Gleichstromstimulation diese Effekte auch bei Applikation durch die geschlossene Schädeldecke entstehen (Rush und Driscoll 1968; Dymond et al. 1975; Lolas 1977). Erst viele Jahre später wurden die Auswirkungen anodaler und kathodaler tDCS (ctDCS) insbesondere auf MEP systematisch untersucht (Priori et al. 1998; Nitsche und Paulus 2000).

Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der tDCS besteht in einer unterschwelligen Hyperoder Depolarisation des Ruhemembranpotentials (Purpura und McMurtry 1965). Je nach Ausrichtung der stimulierten Axone und Anordnung der Elektroden (anodale oder kathodale Stimulation) kann somit die Exzitabilität bestimmter Kortexareale gesteigert oder vermindert werden (Bindman et al. 1962; Bindman et al. 1964). Hierdurch wird eine nicht fokale Plastizität induziert, welche messbare Veränderungen der Erregbarkeit des motorischen Kortex hervorruft (Nitsche und Paulus 2000; Nitsche und Paulus 2001; Nitsche et al. 2003b). Während die anodale tDCS eine Erhöhung der kortikalen Erregbarkeit im Sinne einer LTP induziert, wird selbige durch kathodale tDCS im Sinne einer LTD verringert. Diese Effekte konnten bei Stimulation motorischer Kortexareale unter Ableitung von motorisch evozierten Potentialen (MEP) gezeigt werden (Nitsche und Paulus 2000; Monte-Silva et al. 2010; Batsikadze et al. 2013). Insbesondere für die ctDCS hängt die Induktion einer LTD jedoch eng mit den verwendeten Stimulationsparametern zusammen. So konnten LTDinduzierende Effekte für Stromstärken von 1 mA und 3 mA, nicht jedoch für 2 mA gezeigt werden (Batsikadze et al. 2013; Mosayebi Samani et al. 2019; Mosayebi Samani et al. 2020a).

Zudem ist eine Stimulationsdauer von einigen Minuten notwendig, um über die eigentliche Stimulation hinaus bestehende Veränderungen zu generieren (Nitsche und Paulus 2001; Nitsche et al. 2003c). Während bei einer kurzen Stimulationsdauer von 5 bis 7 Minuten die Erregbarkeitsveränderungen lediglich wenige Minuten anhalten, können diese bei einer Stimulationszeit von 9 bis 30 min für über 60 Minuten fortbestehen (Nitsche et al. 2003b; Monte-Silva et al. 2010; Batsikadze et al. 2013; Mosayebi Samani et al. 2019). Die molekularen Grundlagen dieser Prozesse werden unter Abschnitt 1.3 näher erläutert.

Die durch tDCS erwirkte Modulation der kortikalen Erregbarkeit ist NMDA- und kalziumkonzentrationsabhängig (Liebetanz et al. 2002; Nitsche et al. 2003d). Liebetanz et al. (2002) konnten zeigen, dass die zuvor beschriebenen langanhaltenden Effekte der tDCS unter Blockade von NMDA-Rezeptoren eliminiert wurden. Die Aktivität der NMDA-Rezeptoren wiederum ist neben dem Membranpotential auch entscheidend von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig (Bennett 2000). Somit nimmt die Modulation der synaptischen Kalziumkonzentration über direkte sowie indirekte transmittervermittelte Mechanismen eine zentrale Rolle in der Veränderung neuronaler Plastizität ein. Nikotin hat diesbezüglich die interessante Eigenschaft, über die Bindung an nAChR sowohl direkt als Ionenkanal als auch indirekt über die dosisabhängige Freisetzung von Glutamat und GABA die intra- und extrazellulären Kalziumkonzentrationen zu modulieren (Burnashev 1998; Dajas-Bailador und Wonnacott 2004). Somit nimmt die Aktivierung von nAChR durch Nikotin eine zentrale Rolle in der Modulation intrazellulären Kalziumkonzentrationen ein.

1.6 Zielsetzung

In dieser Studie sollen die physiologischen Grundlagen der Aktivierung von Nikotinrezeptoren und deren Auswirkungen auf neuroplastische Veränderungen der synaptischen Verbindungen weiter aufgeklärt werden. Insbesondere soll die Rolle von Kalzium in der nikotinergen Veränderung von Neuroplastizität untersucht werden.

Wir vermuten, dass bei Kombination von Nikotin und ctDCS die intrazelluläre Kalziumkonzentration in das "no man's land" zwischen dem LTP- und LTD-Bereich steigt und somit keine LTD-ähnliche Neuroplastizität induzierbar ist. Eine grundlegende, sekundär über NMDA-Rezeptoren vermittelte Kalziumabhängigkeit nikotinerger Effekte auf tDCSinduzierte Plastizitätsveränderungen konnte bereits gezeigt werden (Lugon et al. 2015). Es fehlen jedoch weiterhin Studien bezüglich der Dosisabhängigkeit dieser Veränderungen und deren Auswirkungen insbesondere auf die kathodale tDCS. Ziel dieser Studie ist es somit, eine grundlegende Kalziumabhängigkeit dieser Effekte zu zeigen und Erkenntnisse über die Dosisabhängigkeit selbiger zu gewinnen.

Zu diesem Zweck kombinierten wir ctDCS mit Nikotin und der Gabe von Flunarizin, einem Kalziumkanalblocker, in unterschiedlicher Dosierung. Während die alleinige Gabe von Nikotin die Plastizitätsveränderungen durch kathodale tDCS auslöscht (Thirugnanasambandam et al. 2011; Grundey et al. 2012b), ist unter zusätzlicher Gabe von Flunarizin von einer nicht linearen dosisabhängigen Modulation dieser Veränderungen auszugehen (Mosayebi Samani et al. 2020a).

Insbesondere unter Gabe einer mittleren und hohen Dosis von Flunarizin in Kombination mit Nikotin ist von einer Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit einer Wiederherstellung der ctDCS induzierten Plastizitätsveränderungen auszugehen. Zudem erwarten wir, dass unter einer niedrigen Flunarizin-Dosis eine mögliche Unterdosierung diese Effekte maskiert. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs dieser Veränderungen ist basierend auf bisherigen Studien mit einer Effektdauer der tDCS von bis zu 60 Minuten auszugehen, während die größten Effekte in den ersten 30 Minuten zu beobachten sind (Nitsche et al. 2003b; Monte-Silva et al. 2010; Batsikadze et al. 2013; Mosayebi Samani et al. 2020b).

Unsere primäre Hypothese besagt somit, dass die Blockade von Kalziumkanälen durch Flunarizin dosisabhängig und nicht linear die durch ctDCS und Nikotin induzierten Plastizitätsveränderungen moduliert. Wir erwarten experimentell - insbesondere unter einer mittleren und hohen Dosis von Flunarizin - eine Wiederherstellung der durch Nikotin aufgehobenen, ctDCS bedingten Reduktion der MEP-Amplituden, während wir von unveränderten MEP-Amplituden unter einer niedrigen Flunarizin-Dosis ausgehen. Unsere zeitlichen sekundäre Hypothese bezüglich des Verlaufs dass die besagt, plastizitätsverändernden Effekte sich insbesondere in den ersten 30 Minuten nach der tDCS signifikant von der jeweiligen Baseline bzw. Placebobedingung unterscheiden und sich anschließend bis zum Abend des nächsten Tages auf das Baseline-Niveau normalisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probanden und Auswahlkriterien

Es handelt sich um eine randomisierte, placebo-kontrollierte, bezüglich der Flunarizin-Medikation doppelt-verblindete und bezüglich der Nikotin-Gabe einfach-verblindete Interventionsstudie an Probanden. Die Experimente wurden an zwölf gesunden Probanden im Zeitraum von November 2014 bis April 2016 durchgeführt. Es wurden ausschließlich Probanden ohne aktuellen oder früheren Nikotinkonsum (Nichtraucher) eingeschlossen. Die Rekrutierung erfolgte über öffentliche Aushänge in den Gebäuden der Universitätsmedizin Göttingen. Bei Erfüllen eines der unten genannten Kriterien war eine Teilnahme an der Studie nicht möglich.

- 1. Herzschrittmacher, tiefe Hirnstimulation
- Intrazerebrale Metallimplantate (z.B. Clips nach Operation eines intrazerebralen Aneurysmas, Implantation einer künstlichen Cochlea)
- 3. Alter < 18 oder > 40 Jahre
- 4. Hinweise auf epileptische Anfälle in der Vorgeschichte
- 5. Schädelhirntrauma mit Bewusstseinsverlust in der Vorgeschichte
- 6. Vorliegen einer gravierenden internistischen Erkrankung oder Vorliegen einer psychiatrischen Erkrankung mit Einschränkung der Urteilsfähigkeit
- 7. Vorliegen einer gesetzlichen Betreuung
- 8. Schwangerschaft oder Stillperiode
- 9. Alkohol-, Medikamenten- und Drogenabhängigkeit
- 10. Rezeptive oder globale Aphasie (Störung des Sprachverständnisses bzw. zusätzlich des Sprechens)
- 11. Aktuelle oder chronische Einnahme zentralnervös wirksamer Medikamente
- 12. Teilnahme an einer klinischen Arzneimittel- oder Medizinprodukte-Prüfung innerhalb der letzten acht Wochen
- 13. Aktueller oder früherer Konsum von Nikotin (Raucher)

Alle Probanden gaben vor Beginn der Studie ihr informiertes Einverständnis und wurden durch ärztliches Personal eingehend internistisch-neurologisch untersucht. Akute oder chronische Erkrankungen führten ebenso wie regelmäßige Medikamenteneinnahme zum Ausschluss. Diesbezüglich sind im Besonderen auch Schwangerschaft, Epilepsien sowie Herzschrittmacher und Metallimplantate jeder Art als Ausschlusskriterien zu nennen.

Der Ethikantrag wurde durch das lokale Ethikkomitee genehmigt und befindet sich im Einklang mit der Deklaration von Helsinki (Antragsnummer DOK_203_2015). Der Aufwand der Teilnahme an den Experimenten wurde mit einer Aufwandsentschädigung von 37,50 Euro pro Versuchstag vergütet.

Die Größe der Stichprobe orientiert sich vor dem Hintergrund des explorativen Charakters der vorliegenden Studie und in Anbetracht der etwaigen pharmakologischen Risiken für die Probanden an bisherigen Veröffentlichungen auf dem Gebiet. So konnten in mehreren Studien mit Probandenzahlen von 11-14 signifikante Effekte unter pharmakologischer Beeinflussung von tDCS-induzierter Neuroplastizität erzielt werden (Nitsche et al. 2003d; Lugon et al. 2015; Grundey et al. 2018; Fresnoza et al. 2020; Mosayebi Samani et al. 2020a).

Es wurde zudem eine softwaregestützte Berechnung der Stichprobengröße durchgeführt (G*Power, Version 3.1.9.4; R, Version 4.2.0, r-project.org). Basierend auf bisherigen Studien wurde unter der Annahme einer mittleren Effektstärke ($\eta^2 > 0,06$), eines kritischen p-Werts von < 0,05 und einer statistischen Power von 0,8 eine Stichprobengröße von zwölf Probanden berechnet um signifikante Effekte der Interaktion Nikotin x Flunarizin x Messzeitpunkt in einer Messwiederholungsvarianzanalyse (engl. repeated measures analysis of variance; rANOVA) nachzuweisen (Lugon et al. 2015; Grundey et al. 2018).

2.1.2 Versuchsaufbau

Alle Versuche wurden in speziellen Laborräumen der Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung für klinische Neurophysiologie durchgeführt. Der Versuchsaufbau erfolgte für alle Probanden standardisiert nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema (siehe auch Abbildung 11 im Anhang).



Abbildung 1: Probandin mit vollständigem Versuchsaufbau. Oben: Durch Bänder befestigte tDCS Elektroden mit Kathode über dem ADM-repräsentierenden motorischen Kortexareal und Anode über der kontralateralen Orbita. Im Hintergrund: Acht-förmige TMS Spule. Unten: Angelegte EMG Elektroden über dem Muskelbauch des ADM und dem distalen Sehnenansatz EMG: mit blauer Erdungselektrode am Unterarm. ADM: tDCS: Transkranielle Elektromyographie; Abductor digiti minimi; Gleichstromstimulation; TMS: Transkranielle Magnetstimulation

2.1.3 Nikotin

Für diese Studie wurde den Probanden Nikotin in Form von transdermalen Pflastern der Firma Pfizer (Nicorette®) mit einer Dosierung von 15 mg und einer Größe von 13,5 cm² verabreicht. Die Abgabe erfolgt mit 15 mg über 16 Stunden. Die Applikation erfolgte einfach verblindet auf ein reizloses, trockenes Hautareal am proximalen bis medialen Oberarm. Das Pflaster verblieb bei jeder Messung bis zur letzten Messung des zweiten Tages auf dem Oberarm des Probanden. In den Placebo-Versuchen wurde an selber Stelle ein Pflaster der Firma BSN Medical (Leukomed®) mit einer Größe von 5 x 7,2 cm geklebt. Zusätzlich wurde unter Nikotin- und Placebo-Bedingungen das Areal mit einem weiteren Pflaster blickdicht beklebt, sodass dem Probanden keine optischen Rückschlüsse auf die Gruppenzuordnung möglich waren. Alle Probanden bekamen zum Zeitpunkt der Applikation und bei Auftreten von Symptomen ein weiteres Mal nach 2 Stunden jeweils 10 mg Domperidon (Motilium®) oral verabreicht, um bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und andere gastrointestinale Beschwerden zu kupieren. Domperidon ist ein Dopamin-D2-Antagonist, welcher auf Grund seiner antiemetischen und prokinetischen Eigenschaften breite klinische Anwendung findet. In der verwendeten Dosis wirkt Domperidon hauptsächlich peripher und überwindet nur zu geringen Anteilen die Blut-Hirn-Schranke (Barone 1999). Zusätzlich konnten in Vorstudien keine signifikanten Effekte von Domperidon-Medikation auf die kortikospinale Erregbarkeit festgestellt werden (Grundey et al. 2013).

2.1.4 Flunarizin

Die Flunarizin-Medikation (Acis Arzneimittel GmbH; Grünwald, Deutschland) wurde in Tablettenform in unterschiedlicher Dosierung verabreicht. Hierzu wurden Placebo- sowie Flunarizin-Tabletten der Dosis 2,5, 5 und 10 mg unter doppelverblindeten Bedingungen verwendet. Diese wurden durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter, welcher nicht in die Durchführung der Studie involviert war, gemeinsam mit den entsprechenden Pflastern (siehe 2.1.3.) in je acht blickdichte Umschläge verpackt. Anschließend wurde jede Gruppe aus acht Umschlägen in zufälliger Reihenfolge nummeriert und einer Probandennummer zugeordnet. Die Zuordnung eines Probanden zu einer Probandennummer erfolgte randomisiert per Losverfahren durch einen externen wissenschaftlichen Mitarbeiter. Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurden in der aufsteigenden Reihenfolge der Nummern durchgeführt. Die Entblindung der Versuchsbedingungen erfolgte erst nach Abschluss aller Versuchsreihen. Die Tabletten wurden den Probanden jeweils zum ersten Termin einer Messreihe ausgehändigt. Die Einnahme erfolgte nach telefonischer Aufforderung 4 Stunden nach Applikation des Nikotin-Pflasters. Die Probanden wurden instruiert die Medikation mit ausreichend Flüssigkeit einzunehmen.

2.2 Methoden

Zur Induktion von Neuroplastizität-repräsentierenden Exzitabilitätsveränderungen im Bereich des motorischen Kortex wurde kathodale transkranielle Gleichstromstimulation verwendet (ctDCS). Transkranielle Magnetstimulation (TMS) wurde zur Erfassung der kortikalen Exzitabilitätsveränderungen eingesetzt.

2.2.1 Transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS)

Die Stromerzeugung für die tDCS erfolgte über einen batteriebetriebenen Gleichstromstimulator (neuroConn GmbH, Ilmenau, Deutschland). Zur Applikation auf die intakte Kopfhaut wurden zwei leitfähige Gummielektroden verwendet, welche mit einem mit 0,9% Natriumchlorid-Lösung benässten Schwamm überzogen wurden.

Die Positionierung der kathodalen Elektrode erfolgte anschließend auf einem mittels TMS bestimmten Repräsentationsareal des rechten Musculus abductor digiti minimi (ADM), während die anodale Elektrode über der kontralateralen Orbita befestigt wurde. Um etwaige Bewegungen der Elektroden zu vermeiden, wurden diese mit Gummibändern fixiert (siehe Abbildung 10 im Anhang). Die Applikation der tDCS erfolgte ohne vorherige Verblindung. Gleichstromstimulation in oben genannter Anordnung erzeugt signifikante Veränderungen der kortikalen Exzitabilität, welche in Abhängigkeit von Stromstärke und -dauer bis zu einer Stunde nach Stimulation anhalten können (siehe Abschnitt 1.4) (Nitsche und Paulus 2001; Nitsche et al. 2003a; Nitsche et al. 2004a).

2.2.2 Transkranielle Magnetstimulation (TMS)

Als Methode zur Erfassung der kortikalen Exzitabilität wurden für diese Studie motorisch evozierte Potentiale mittel TMS generiert und dann zur weiteren Analyse aufgezeichnet. Die Magnetimpulse wurden durch einen Magstim 200 Magnetstimulator (The Magstim Company, Whitland, Dyfed, United Kingdom) in Verbindung mit einer acht-förmigen Spule erzeugt. Die Durchmesser der Windungen betrugen 70 mm, die maximale Magnetfeldstärke 2,2 Tesla. Anschließend wurden die MEP mittels einer Ag/AgCl-Oberflächenelektroden über dem rechten ADM abgeleitet. Hierbei befand sich eine Elektrode über dem Muskelbauch des ADM, eine weitere Elektrode über dem distalen Sehnenansatz. Beide Elektroden wurden mit Pflasterstreifen fixiert und zuvor mit Elektrodenleitgel benetzt, um eine bessere Leitfähigkeit zu gewährleisten. Die abgeleiteten Signale wurden verstärkt und mit einer Zeitkonstante von 10 ms und einem Tiefpassfilter von 2,5 kHz gefiltert. Daraufhin wurde das Signal mit einer analog-zu-digital Rate von 5 Hz digitalisiert und über eine Schnittstelle zur Datenerfassung (CED 1401, Cambridge Electric Devices, Cambridge) an einen Laborcomputer mit der "Signal"-Software (Cambridge Electric Devices, Cambridge) übermittelt. Vor Beginn der Messungen wurde die muskuläre Entspannung durch visuelle Kontrolle des Ruhe-EMG sichergestellt.

Zur Bestimmung des optimalen Stimulationsortes für TMS und tDCS wurde die Magnetspule linkshemisphärisch, tangential und im 45° Winkel (Griff nach postero-lateral ausgerichtet) am Kopf des Probanden positioniert.



Abbildung 2: Durchführung einer MEP Messung. Links: Angelegte EMG-Elektroden über dem Muskelbauch des ADM und dem distalen Sehnenansatz mit blauer Erdungselektrode am Unterarm. Rechts: Applikation eines Magnetpulses über dem ADMrepräsentierenden motorischen Kortexareal mittels acht-förmiger Magnetspule. EMG: Elektromyographie; ADM: Abductor digiti minimi

2.2.3 Versuchsablauf

Für den Versuchsablauf wurde ein placebo-kontrolliertes, randomisiertes und hinsichtlich der Flunarizin-Medikation doppelt-verblindetes Untersuchungsdesign verwendet (siehe 2.1.3 und 2.1.4). Während des Versuchs saßen die Probanden in einem bequemen Stuhl mit gepolsterter Armlehne und verstellbarer Kopfstütze und wurden gebeten sich zu entspannen. Die EMG-Elektroden wurden wie zuvor beschrieben platziert und fixiert. Anschließend wurde TMS über dem kortikalen Repräsentationsareal des rechten ADM appliziert. Um den Punkt mit den konsistent höchsten MEP zu finden, wurde die Magnetspule entlang der Schädeldecke des Probanden bewegt. Dieser Punkt wurde anschließend mit einem wasserfesten Stift markiert und die TMS-Stimulationsintensität (in % der maximalen Stimulatorleistung) solange angepasst, bis eine durchschnittliche Amplitude der MEP von 1 mV (0,8-1,2 mV) erreicht wurde.

Nun wurden 25 MEP mit der vorher festgelegten Stimulationsintensität aufgezeichnet, um die erste Baseline (Baseline 1) zu bestimmen. Abhängig von der Versuchskondition applizierten wir den Probanden nun oben genannte Nikotin- bzw. Placebo-Pflaster auf den linken Oberarm. Zusätzlich applizierten wir in beiden Gruppen ein weiteres Placebo-Pflaster über das erste Pflaster zur Verblindung des Probanden. Die Pflaster verblieben jeweils bis zur Messung am nächsten Abend. Ebenso erhielten alle Probanden 20 mg Domperidon (Motilium®) nach der oben genannten Applikation.

Nach 4 Stunden wurde den Probanden Flunarizin in einer der drei unter Abschnitt 2.1.4 genannten Dosierungen oder Placebo verabreicht. Bei bestehenden gastrointestinalen Beschwerden im Sinne von Übelkeit wurden zu diesem Zeitpunkt erneut 20 mg Domperidon

(Motilium®) gegeben. Bestanden diese Beschwerden nicht, wurde auf die erneute Gabe verzichtet. Nach weiteren 2 Stunden, also 6 Stunden nach Pflaster-Applikation, wurden erneut EMG-Elektroden über dem ADM platziert. Es erfolgte die Aufzeichnung von 25 MEP über dem zuvor markierten Punkt auf der Schädeldecke. Hierzu wurde die zuvor bestimmte Stimulationsintensität verwendet (Baseline 2). War es erneut möglich, eine durchschnittliche Amplitude der MEP von 1 mV (0,8-1,2 mV) zu erreichen, wurden mit dieser TMS-Stimulationsintensität alle weiteren Messungen bis zum Abend des nächsten Tages durchgeführt. War dies nicht möglich, wurde die TMS-Stimulationsintensität erneut angepasst, bis über 25 MEP eine durchschnittliche Amplitude von 1 mV (0,8-1,2 mV) erreicht wurde (Baseline 3).

Im Anschluss wurde die kathodale tDCS nach dem in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Aufbau für 9 Minuten mit einer Stromstärke von 1 mA appliziert. Sofort nach der ctDCS wurden erneut 25 MEP mit der festgelegten TMS-Stimulationsintensität aufgezeichnet. Die Aufzeichnung wiederholte sich jeweils nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten. Die Probanden verließen anschließend das Labor und wurden für den Morgen und Abend des Folgetages erneut einbestellt. Hier wurden jeweils erneut 25 MEP nach oben genanntem Procedere abgeleitet. Im Anschluss an die Abendmessung wurden die Pflaster für den Probanden nicht sichtbar entfernt und entsorgt. Aufgrund der prolongierten Wirkungen von Nikotin und Flunarizin sowie der Möglichkeit später einsetzender MEP-Veränderungen wurden bewusst Messpunkte bis zum Abend des nächsten Tages gewählt, um eine vollständige Normalisierung der MEP-Amplituden auf das Baseline-Niveau sicherzustellen (Mosayebi Samani et al. 2020a; Mosayebi Samani et al. 2020b). Die Anzahl und der Abstand der Messzeitpunkte orientierten sich hierbei im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit an vorangegangenen Studien zur pharmakologischen Beeinflussung von tDCS-induzierter Neuroplastizität (Nitsche et al. 2003d; Grundey et al. 2018; Fresnoza et al. 2020).

Zu allen Messzeitpunkten wurden etwaige unerwünschte Wirkungen deskriptiv erfasst. Jeder Proband durchlief jeweils achtmal den hier beschriebenen Versuchsablauf. Jeweils vier Messungen mit Nikotin-Pflaster in Kombination mit Placebo oder Flunarizin in jeder der drei verwendeten Dosierungen und vier Messungen mit Placebo-Pflaster erneut kombiniert mit Placebo oder Flunarizin in jeder der drei Dosierungen (siehe Abbildung 3). Die jeweiligen Versuchsabläufe fanden in randomisierter Reihenfolge statt. Um überlappende Effekte der jeweiligen Versuche zu vermeiden, betrug der minimale Abstand zwischen zwei Versuchsabläufen eine Woche.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Dargestellt ist zunächst die Bestimmung der TMS-Intensität, um MEP-Amplituden von 1 mV zu erreichen (Baseline 1). Anschließend wurden Nikotin- oder Placebo-Pflaster appliziert (NP/PP). 4 Stunden später erfolgte die Gabe von Placebomedikation (0) oder Flunarizin in einer Dosis von 2,5, 5, 10 mg (2,5/5/10). Weitere 2 Stunden später wurden erneut 25 MEP abgeleitet und die Stimulationsintensität gegebenenfalls angepasst (Baseline 2/3). Nun wurde kathodale tDCS appliziert und es wurden zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 240 Minuten nach tDCS, sowie am nächsten Morgen und Abend erneut 25 MEP abgeleitet. Modifiziert nach J. Grundey et al. (Grundey et al. 2018). MEP: Motorisch evoziertes Potential; nm: Nächster Morgen; ne: Nächster Abend; NP: Nikotinpflaster; PP: Placebopflaster; 0: Placebomedikation; 2,5/5/10: Flunarizin in einer Dosis von 2,5, 5 oder 10 mg; 0: Placebomedikation; BL1= Baseline 1; BL2/3 = Baseline 2/3

2.2.4 Datenanalyse und Statistik

Das Auslesen der MEP-Amplituden erfolgte mit der "NuCursor"-Software (Sobell-Lab, London). Für die weitere Auswertung wurden als Statistikprogramme SPSS (Version 20, IBM) und Excel (Version 1811, Microsoft) genutzt.

Um durch medikamentöse Intervention bedingte Veränderungen der Ruhemotorschwelle zu erfassen, wurde die Stimulationsintensität in Prozent (%) der maximalen Stimulatorleistung vor und nach der Medikamentengabe (Baseline 1 und Baseline 2/3) bestimmt. Zusätzlich wurden die Stimulationsintensitäten zwischen Nikotin- und Placebo-Pflaster verglichen. Hier wurden ebenso Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben (kritischer p-Wert: p < 0,05) durchgeführt.

Zunächst wurden die individuellen Mittelwerte der 25 MEP-Amplituden für alle Probanden und zu allen Messzeitpunkten berechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte der MEP-Amplituden im Bezug zum jeweiligen MEP-Mittelwert der Baseline normalisiert, es wurde also jeweils der Quotient der MEP-Mittelwerte nach Intervention zu den MEP-Mittelwerten der jeweiligen Baseline-Messung bestimmt. Mit diesen Werten wurde anschließend eine Messwiederholungsvarianzanalyse (engl. repeated measures analysis of variance; rANOVA) durchgeführt. Die normalisierten Mittelwerte der MEP-Amplituden waren die abhängige Variable. Nikotin (Placebo-/Nikotin-Pflaster), Flunarizin (Placebo/2,5 mg/5 mg/10 mg) sowie die verschiedenen Messzeitpunkte wurden als Messwiederholungsfaktoren einbezogen. Der Mauchly-Test auf Sphärizität wurde durchgeführt und wenn notwendig mit der Greenhouse-Geisser Methode korrigiert. Die jeweiligen Effektstärken wurden als partielles Eta-Quadrat (η^2) berechnet. Eine große Effektstärke wurde für Werte von $\eta^2 > 0,14$ angenommen. In Abhängigkeit von signifikanten Werten der rANOVA wurden post hoc Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben (kritischer p-Wert: p < 0,05) durchgeführt, um die normalisierten MEP-Amplituden vor der ctDCS mit den jeweiligen MEP-Amplituden zu den Messzeitpunkten nach ctDCS in jeder der Konditionen zu vergleichen. Zusätzlich wurden die normalisierten MEP-Amplituden der verschiedenen Flunarizin-Dosierungen (Placebo/2,5 mg/5 mg/10 mg) untereinander zu festen Zeitpunkten verglichen.

Zusätzlich erfolgte aufgrund der zum Teil hohen intra-individuellen Schwankungen (siehe 4.5.1) zwischen einzelnen Messzeitpunkten eine Auswertung der gepoolten Daten, also der Mittelwerte der normalisierten MEP Amplituden (MEP-Ratio) der ersten 30 Minuten nach der Stimulation. Hierdurch konnten bereits in vorangegangenen Studien die Effekte der pharmakologischen Interaktionen verdeutlicht werden (Grundey et al. 2018; Mosayebi Samani et al. 2020a). Zudem stellen die ersten 30 Minuten den Zeitraum dar, in welchem bisher unter ähnlichen Versuchsbedingungen die deutlichsten ctDCS-Effekte gezeigt werden konnten (Nitsche et al. 2003d; Grundey et al. 2018). Für die Auswertung der gepoolten Daten wurden jeweils die zur Baseline normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) zu allen Messzeitpunkten in den ersten 30 Minuten nach ctDCS zusammengefasst. Die jeweiligen Messwerte aller Probanden für die jeweilige Versuchsmedikation wurden einbezogen und ein Mittelwert gebildet. Es erfolgte ein Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben (kritischer p-Wert: p < 0,05) und es wurde das 95%-Konfidenzintervall bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Probandenkollektiv

Für die Studie wurden insgesamt 13 Probanden rekrutiert, von welchen 12 die Studie abschlossen. Ein Proband brach die Studie ohne weitere Angabe von Gründen nach der ersten Messung ab. Die Altersspanne der verbleibenden zwölf Probanden lag zwischen 19 und 33 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 24,53 Jahre (SD = 4,19). Alle Probanden waren Nichtraucher. Von den zwölf Probanden, welche die Studie abschlossen, waren fünf weiblich (~41,7%).

3.2 Allgemeine Anmerkungen

Die medikamentöse Intervention wurde ebenso wie die Stimulationen mittels ctDCS und TMS im Allgemeinen gut vertragen. Fünf Probanden berichteten unter Gabe von Nikotin über leichtes Unwohlsein und Übelkeit. Zwei Probanden beschrieben unter Verummedikation mit Flunarizin 5 und 10 mg vermehrte Müdigkeit. Ein Proband gab unter ctDCS starken Juckreiz unterhalb der Elektroden an und vier Probanden gaben einen leichten Schwindel unter Nikotingabe an. Es traten keine weiteren unerwünschten Arzneimittelwirkungen und insbesondere keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse auf. Alle genannten Nebenwirkungen sistierten bis zur Stimulation mittels kathodaler tDCS spontan oder unter Gabe von Domperidon.

Die Stimulationsintensitäten in Prozent (%) der maximalen Stimulatorleistung (MSO) zeigten im Vergleich vor und nach Medikamentengabe (Baseline 1 vs. Baseline 2/3), sowie zwischen Nikotin- und Placebo-Pflaster zum Zeitpunkt der Baseline 2/3 keine signifikanten Unterschiede (siehe Anhang, Tabellen 2 und 3).

Die rANOVA ergab signifikante Effekte für die Faktoren Nikotin (F(1) = 58,468, p < 0,001), Flunarizin (F(3) = 8,109, p < 0,001), sowie Nikotin x Messzeitpunkt (F(2,679) = 2,974, p < 0,05) und Flunarizin x Messzeitpunkt (F(5,127) = 2,164, p < 0,001). Der Faktor Messzeitpunkt sowie die Interaktionen Flunarizin x Nikotin und Flunarizin x Nikotin x Messzeitpunkt zeigten keine signifikanten Effekte. Die Ergebnisse der rANOVA sind zusammen mit den jeweiligen Effektstärken in Tabelle 1 dargestellt.

	df	F	Sig.	η2
Nikotin	1	58,468	< 0,001*	,842
Flunarizin	3	8,109	< 0,001*	,424
Messzeitpunkt	13	,703	,758	,060
Nikotin x Flunarizin	3	,038	,990	,003
Nikotin x Messzeitpunkt	13	2,974	< 0,001*	,213
Flunarizin x Messzeitpunkt	39	2,164	< 0,001*	,164
Nikotin x Flunarizin x Messzeitpunkt	39	,769	,842	,065

Tabelle 1: Ergebnisse der Messwiederholungs-ANOVA (rANOVA). df: Freiheitsgrade, F: F-Wert, Sig.: Signifikanzniveau; *: p < 0.05; η^2 : Partielles Eta-Quadrat

3.3 Einfluss von Flunarizin auf ctDCS-induzierte Neuroplastizität ohne Nikotin

Die Messungen beinhalten die Untersuchung der MEP-Amplituden durch operationalisierten kortikalen Erregbarkeitsveränderungen unter ctDCS ohne Nikotin. Pro Proband wurden hierzu vier Messungen mit jeweils unterschiedlicher Medikation (Placebo, Flunarizin in 2,5 mg, 5 mg und 10 mg Dosis) durchgeführt. Der Faktor Flunarizin und die Interaktion Flunarizin x Messzeitpunkt ergaben in der rANOVA jeweils signifikante Ergebnisse (p <0,05). Sowohl der Faktor Flunarizin ($\gamma^2 = 0,842$) als auch die Interaktion Flunarizin x Messzeitpunkt ($\eta^2 = 0,164$) zeigten zudem jeweils große Effektstärken $(\eta^2 > 0, 14;$ siehe Tabelle 1). Die Messung ohne Nikotin mit Placebomedikation wird im Folgenden als Placebobedingung 1 bezeichnet.

3.3.1 Untersuchung mit Placebomedikation (Placebobedingung 1)

Die post hoc Zweistichproben-t-Tests ergaben im Vergleich zu den Baseline-Werten eine signifikante (p < 0,05) Reduktion der MEP-Amplituden zu jedem Messzeitpunkt bis 60 min nach Stimulation. Es bestand auch für alle nicht-signifikanten Messungen des ersten Tages eine Tendenz zur Verringerung der MEP-Amplitude verglichen mit der Baseline-Messung (siehe Abbildung 4).

3.3.2 Untersuchung mit Flunarizin

Unter der Applikation von Flunarizin in einer Dosis von 2,5 mg ergaben die post hoc Zweistichproben-t-Tests keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Baseline-Werten. Im Vergleich zur Placebobedingung 1 zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 25 und 30 min. Insgesamt lagen die MEP-Amplituden nahe am Baselineniveau (siehe Abbildung 4). Untersuchungen mit einer Dosis von 5 mg Flunarizin ergaben im t-Test signifikante Unterschiede (p < 0,05) zur Baseline bei 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 60 min. Verglichen mit der Placebobedingung 1 waren die Effekte zu keinem der Messzeitpunkte signifikant unterschiedlich. Es besteht eine zur Placebobedingung 1 vergleichbare Reduktion der MEP-Amplitude (siehe Abbildung 4).

Unter einer Flunarizin Dosis von 10 mg zeigten sich verglichen mit der Baseline keine signifikanten Effekte. Verglichen mit der Placebobedingung 1 hingegen waren zu den Zeitpunkten 5, 20, 25 und 30 min signifikante Effekte ersichtlich (p < 0.05). Mit Ausnahme der Messungen zu den Zeitpunkten 20 und 25 Minuten befanden sich die Werte erneut nahe dem Baselineniveau (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Verlauf der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) unter Applikation von Placebo-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt in der obigen Grafik sind die mittleren MEP-Amplituden +/-Standardfehler (Fehlerbalken) zu den verschiedenen Messzeitpunkten (x-Achse) im Vergleich zur MEP-Baseline (MEP-Ratio; y-Achse) bei Anwendung der ctDCS ohne Nikotin und nach Gabe von Flunarizin in o. g. Dosierung. Ausgefüllte Symbole kennzeichnen signifikante Veränderungen der MEP-Amplituden nach kathodaler tDCS gegenüber Baselineniveau. Die mit einem Stern markierten Symbole stellen signifikante Veränderungen der MEP-Amplitude durch Flunarizingabe gegenüber der Placebobedingung 1 (Placebopflaster mit Placebomedikation) bei identischem Zeitfenster dar. Signifikanzniveau: p < 0,05. MEP: Motorisch evoziertes Potential; nm: Nächster Morgen; ne: Nächster Abend; MEP: Motorisch evoziertes Potential; PLC1: Placebobedingung 1; PP: Placebo-Pflaster; PP+2,5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; PP+5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 5 mg: PP+10: Placebo-Pflaster und Flunarizin 10 mg.

Für den gepoolten Datensatz der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Placebobedingung 1 und den Messungen mit Flunarizin in den Dosierungen 2,5 und 10 mg (p < 0,05). In beiden Fällen zeigt sich eine signifikante Zunahme der MEP-Amplituden im Vergleich zur Placebomedikation, die Erregbarkeitsverminderung nach ctDCS war somit nicht mehr nachweisbar. Unter der Gabe von Flunarizin in 5 mg Dosierung ergaben sich keine signifikanten Differenzen der MEP-Amplituden zur Placebomedikation (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Veränderung der gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation von Placebo-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt in der obigen Grafik sind die mittleren MEP-Amplituden zusammengefasst für die ersten 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation des Placebo-Pflasters mit Placebomedikation oder Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen (x-Achse) für alle Probanden. Jede Säule stellt den Mittelwert der MEP-Amplituden im Vergleich zur MEP-Baseline (MEP-Ratio; y-Achse) +/- 95%-Konfidenzintervall für die ersten 30 Minuten nach Stimulation dar. Die mit einem Stern markierten Säulen stellen signifikante Veränderungen der MEP-Amplitude durch Flunarizingabe gegenüber der Placebobedingung 2 (Placebopflaster mit Placebomedikation) bei identischem Zeitfenster dar. Signifikanzniveau: * p < 0,05; ** p < 0,01. MEP: Motorisch evoziertes Potential; PLC1: Placebobedingung 1; PP: Placebo-Pflaster; PP+2,5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; PP+5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 5 mg: PP+10: Placebo-Pflaster und Flunarizin 10 mg.

Insbesondere in einer Flunarizin-Dosis von 2,5 und 10 mg konnten signifikante Veränderungen der MEP-Amplituden im Vergleich zur Placebobedingung 1 nachgewiesen werden. Unter einer Dosierung von 5 mg Flunarizin kam es hingegen zu keinen signifikanten Effekten verglichen mit der Placebobedingung 1, was für eine nicht lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung spricht. Bezogen auf unsere sekundäre Hypothese konnten wir für die Versuchsbedingungen ohne Nikotin zeigen, dass ab einem Zeitpunkt von 30 Minuten nach der ctDCS keine signifikanten Unterschiede zur Placebobedingung 1 und nach 60 Minuten zur jeweiligen Baseline nachweisbar waren.

3.4 Einfluss von Flunarizin auf ctDCS-induzierte Neuroplastizität mit Nikotin

Die Messungen beinhalten die Untersuchung der durch MEP-Amplituden operationalisierten kortikalen Erregbarkeitsveränderungen unter ctDCS nach Gabe von Nikotin. Pro Proband wurden hierzu vier Messungen mit jeweils unterschiedlicher Medikation (Placebo, Flunarizin in 2,5 mg, 5 mg und 10 mg Dosis) durchgeführt. Die Faktoren Nikotin und Flunarizin sowie die Interaktionen Nikotin x Messzeitpunkt bzw. Flunarizin x Messzeitpunkt ergaben in der rANOVA jeweils signifikante Ergebnisse (p < 0,05). Beide Faktoren ($\eta^2 = 0,842$ bzw. 0,424) und beide Interaktionen ($\eta^2 = 0,213$ bzw. 0,164) zeigten zudem jeweils große Effektstärken ($\gamma^2 > 0,14$; siehe Tabelle 1). Für die Interaktionen Nikotin x Flunarizin und Nikotin x Flunarizin x Messzeitpunkt ergaben sich keine signifikanten Effekte in der rANOVA. Die Messung mit Nikotinpflaster und Placebomedikation wird im Folgenden als Placebobedingung 2 bezeichnet.

3.4.1 Untersuchung mit Placebomedikation (Placebobedingung 2)

Mittels post hoc Zweistichproben-t-Tests ergaben sich signifikante Effekte (p < 0,05) für die Messzeitpunkte 0 und 5 min im Vergleich zur Baseline-Messung. Zu beiden Messzeitpunkten zeigte sich eine Exzitabilitätssteigerung, welche sich ab dem Zeitpunkt 10 min nicht mehr nachweisen ließ. Im Gegensatz zur Placebobedingung 1 (Placebo + Placebo) kam es zu keinem Messzeitpunkt zu einer Verringerung der MEP-Amplituden (siehe Abbildung 6).

3.4.2 Untersuchung mit Flunarizin

Nach Gabe von 2,5 mg Flunarizin waren in den t-Tests signifikante Unterschiede (p < 0,05) zur Baseline zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 90 min ersichtlich. Die Werte waren zu den genannten Zeitpunkten verglichen mit der Baseline signifikant erhöht. In Bezug zur Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, es bestand jedoch über alle Messwerte eine Tendenz zu erhöhten MEP-Amplituden. Es besteht somit im Gegensatz zur Placebobedingung 1 (Placebo + Placebo) tendenziell eine Erregbarkeitssteigerung (siehe Abbildung 6).

Bei einer Dosis von 5 mg bestand ein signifikanter Effekt (p < 0,05) verglichen mit der Baseline lediglich bei 0 min. Im Vergleich zur Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte befanden sich mit Ausnahme der Messung nach 5 Minuten annährend auf Baselineniveau (siehe Abbildung 6).

Nach Applikation von 10 mg Flunarizin verglichen mit der Baseline waren die Ergebnisse des t-Tests bei 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 und 120 min sowie am nächsten Morgen und Abend signifikant unterschiedlich (p < 0,05). Verglichen mit der Baseline-Messung zeigte sich zu diesen Messzeitpunkten eine Erhöhung der MEP-Amplituden. Auch bezogen auf die Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo) ergaben sich bei 15 und 25 min signifikant erhöhte MEP-Amplituden (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Verlauf der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) unter Applikation von Nikotin-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt in der obigen Grafik sind die mittleren MEP-Amplituden +/-Standardfehler (Fehlerbalken) zu den verschiedenen Messzeitpunkten (y-Achse) im Vergleich zur MEP-Baseline (MEP-Ratio; y-Achse) bei Anwendung der ctDCS mit Nikotin und nach Gabe von Flunarizin in o. g. Dosierung. Ausgefüllte Symbole kennzeichnen signifikante Veränderungen der MEP-Amplituden nach kathodaler tDCS gegenüber Baselineniveau. Die mit einem Stern markierten Symbole stellen signifikante Veränderungen der MEP-Amplitude durch Flunarizingabe gegenüber der Placebobedingung 2 (Nikotinpflaster mit Placebomedikation) bei identischem Zeitfenster dar. Signifikanzniveau: p < 0,05. MEP: Motorisch evoziertes Potential; nm: Nächster Morgen; ne: Nächster Abend; PLC2: Placebobedingung 2; NP: Nikotin-Pflaster; NP+2,5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; NP+5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 5 mg: NP+10: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 10 mg.

Für den gepoolten Datensatz der normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) mit Nikotin-Pflaster zeigte sich nach Gabe von Flunarizin 10 mg eine signifikante Steigerung der MEP-Amplitude (p < 0,05) und bei Gabe von 2,5 mg ebenfalls ein Trend zu einer Erregbarkeitssteigerung, allerdings statistisch nicht signifikant. Nach Gabe von Flunarizin in einer Dosierung von 5 mg ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo), sodass die MEP-Amplituden auf Baselineniveau verblieben (siehe Abbildung 7). Die einzelnen Ergebnisse der t-Tests sind der Tabelle 4 im Anhang zu entnehmen.



Abbildung 7: Veränderung der gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation von Nikotin-Pflaster und Flunarizingabe in den unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt in der obigen Grafik sind die mittleren MEP-Amplituden zusammengefasst für die ersten 30 Minuten nach ctDCS unter Applikation des Nikotin-Pflasters mit Placebomedikation oder Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen gepoolt für alle Probanden. Jede Säule stellt den Mittelwert der MEP-Amplituden im Vergleich zur MEP-Baseline (MEP-Ratio) +/- 95%-Konfidenzintervall für die ersten 30 Minuten nach Stimulation dar. Die mit einem Stern markierten Säulen stellen signifikante Veränderungen der MEP-Amplitude durch Flunarizingabe gegenüber der Placebobedingung 2 (Nikotinpflaster mit Placebomedikation) bei identischem Zeitfenster dar. Signifikanzniveau: p < 0,05. MEP: Motorisch evoziertes Potential; PLC2: Placebobedingung 2; NP: Nikotin-Pflaster; NP+2,5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; NP+5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 5 mg: NP+10: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 10 mg.

Zusammenfassend konnte in der Versuchsbedingung mit Nikotin und 10 mg Flunarizin eine signifikante Erhöhung der MEP-Amplituden im Vergleich zur Placebobedingung 2 gezeigt werden. In einer Dosierung von 2,5 und 5 mg waren die entsprechenden Effekte nicht signifikant. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und bezogen auf die jeweilige Baseline-Messung ergaben sich für den Zeitraum über 30 Minuten unter einer Dosierung von 2,5 mg Flunarizin einmalig nach 90 Minuten signifikante Veränderungen der MEP-Amplituden. Gleiches gilt unter einer Dosierung von 10 mg jeweils nach 60, 90 und 120 Minuten sowie am nächsten Morgen und Abend.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Anmerkungen

In der Zusammenschau der Ergebnisse ist von einer kalziumabhängigen Modulation der Plastizitätsveränderungen unter ctDCS und Nikotin auszugehen. Entgegen unserer initialen Hypothese kam es nicht zur Wiederherstellung der unter Nikotin aufgehobenen LTD, sondern - insbesondere in einer hohen Flunarizin-Dosis - zur Induktion einer LTP. Auch konnte entgegen unserer Hypothese in der Versuchsbedingung ohne Nikotin bereits unter einer niedrigen Dosis Flunarizin eine Aufhebung der LTD nachgewiesen werden. Insgesamt legen diese Befunde einen komplexeren Zusammenhang zwischen der Beeinflussung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen und deren Auswirkungen auf Neuroplastizität nahe. Unter der Voraussetzung, dass Flunarizin in Abhängigkeit von der Dosis unterschiedliche Effekte erzielt, lässt sich somit ein Wirkmechanismus in Einklang mit dem gegenwärtigen Stand der Forschung postulieren (siehe Abbildung 9). Es ist insbesondere bezüglich der hier postulierten synaptischen Wirkmechanismen einschränkend anzumerken, dass diese im Rahmen der vorliegenden Studie nicht direkt gemessen wurden (siehe 4.5.1). Vielmehr wurden diese aus den Veränderungen der MEP-Amplituden und vor dem Hintergrund bisheriger Studien in Zellkulturen und am Menschen abgeleitet (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017).

4.2 Untersuchungen ohne Nikotin

In der Placebobedingung 1 (Placebo + Placebo) wird mittels ctDCS eine Langzeit-Depression (LTD) induziert (siehe Abbildung 8). Hierbei kommt es durch die ctDCS zu einer Hyperpolarisation der Zellmembranen (Purpura und McMurtry 1965). Anschließend erfolgt bei Eintreffen eines Aktionspotentiales eine prä- und postsynaptische Depolarisation. Durch die geringe Depolarisation der Präsynapse kommt es zu einem verminderten Kalziumeinstrom und in der Folge zu einer verminderten kalziumabhängigen Glutamatausschüttung in den synaptischen Spalt (Malarkey und Parpura 2008). Gleichzeitig sind Rezeptorbindungsstellen der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren aufgrund der Depolarisation zu großen Teilen weiterhin geringen postsynaptischen durch Magnesiumionen geblockt. Zusammen bewirken diese Mechanismen eine verminderte Bindung von Glutamat an NMDA-Rezeptoren, da zum einen die NMDA-Rezeptoren geblockt sind, zum anderen aber auch weniger Glutamat im synaptischen Spalt zur Verfügung steht. Da NMDA-Rezeptoren unter anderem als Kalziumkanäle fungieren, führt dies zu einem verminderten Einstrom von Kalziumionen in die Postsynapse. Tritt dieser Prozess gehäuft auf, so wird die synaptische Verbindung unter anderem durch Verringerung der Glutamat-Rezeptordichte geschwächt. Es entsteht eine LTD. Bei Applikation der ctDCS über dem primär motorischen Kortex kommt es, in Folge der induzierten LTD, zu einer

verringerten Weiterleitung der Aktionspotentiale zu den kortikospinalen Bahnen. Somit generieren die in diesem Versuchsaufbau durch TMS ausgelösten Aktionspotentiale eine geringere motorische Antwort am abgeleiteten Muskel (ADM). Experimentell zeigt sich dies durch signifikant verringerte MEP-Amplituden im Vergleich zur Baseline. Die vorliegenden Ergebnisse stehen somit im Einklang mit vorangegangen Studien zu dieser Thematik (Nitsche und Paulus 2000; Mosayebi Samani et al. 2020a).

Verabreicht man Flunarizin in einer Dosis von 2,5 mg, so zeigt sich dies experimentell durch MEP-Amplituden auf dem Niveau der Baseline-Messung jedoch mit signifikanter Differenz zur Placebobedingung 1 (Placebo + Placebo; siehe Abbildung 8). Es kann hier von einer weiteren Reduktion der Glutamatausschüttung in Folge der Medikation mit Flunarizin ausgegangen werden (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017). In neuronalen Zellkulturen von Säugetieren konnte eine dosisabhängige Reduktion der präsynaptischen Glutamatausschüttung durch Flunarizin bereits gezeigt werden (Cousin et al. 1993). Als möglicher Mechanismus wurde die Antagonisierung präsynaptischer VGCC mit konsekutiv verringertem Einstrom von Kalziumionen postuliert. Dies führt in der Folge zu einer verminderten Exozytose von Glutamat in den synaptischen Spalt (Cousin et al. 1993). Auch in vivo konnten verringerte Glutamatkonzentrationen im Serum von Probanden unter Gabe von Flunarizin beobachtet werden (Surbakti et al. 2017). Obwohl weitere Studien auf diesem Gebiet notwendig sind, legen die bisherigen Beobachtungen eine durch Flunarizin bedingte verringerte Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt nahe. Eine verminderte Glutamatausschüttung führt somit zu einer geringeren Aktivität der NMDA-Rezeptoren und es kommt nur zu einem sehr geringen Anstieg der postsynaptischen Kalziumkonzentration. Dieser reicht jedoch nicht aus, um LTD-ähnliche Effekte zu erzielen (Cummings et al. 1996). Diesbezüglich konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die tDCS-generierte LTP- und LTD-ähnliche Neuroplastizität von der NMDA-Rezeptoraktivität abhängig ist (Liebetanz et al. 2002). Dies erklärt zusammen mit der verminderten Glutamatausschüttung eine Aufhebung der ctDCS-induzierten LTD. In einer Studie von Mosayebi Samani et al. (2020a) konnte unter Gabe von 2,5 mg Flunarizin nach ctDCS keine Normalisierung der MEP-Amplituden auf das Baseline-Niveau erzielt werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie erfolgte die ctDCS jedoch mit abweichenden Stimulationsparametern, weswegen ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich ist (Mosayebi Samani et al. 2020a).

Bei einer Dosis von 5 mg könnte Flunarizin nach dem hier postulierten Wirkmechanismus nun eine Reduktion der GABA-Ausschüttung bewirken (Cousin et al. 1993). In vitro konnte Flunarizin, in höheren Dosierungen, durch Antagonisierung der VGCC nicht nur die Glutamat-, sondern auch die GABA-Ausschüttung aus der Präsynapse signifikant reduzieren (Cousin et al. 1993). Obgleich diesbezüglich weitere Studien in vivo fehlen, können unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Studie relevante Effekte von Flunarizin auf die GABA-Ausschüttung angenommen werden. Hierdurch wird das Gleichgewicht zwischen Glutamat als aktivierendem und GABA als inhibierendem Transmitter wiederhergestellt. Die verminderte GABAerge Aktivität führt zu einem geringeren Einstrom von Anionen (insbesondere Chloridionen) und somit zu einer stärkeren Depolarisation der Postsynapse bei Eintreffen eines Aktionspotentiales. In der Folge ergibt sich, nach dem hier postulierten Wirkmechanismus, ein erhöhter postsynaptischer Kalziumeinstrom. Somit kommt es erneut zu einer LTD. Diese zeigt sich in signifikant erniedrigten Werten der MEP zur Baseline (siehe Abbildung 8). Ähnliche Effekte auf ctDCS-induzierte Neuroplastizität konnten bereits von Nitsche et al. (2003) unter einer Flunarizin-Dosis von 10 mg gezeigt werden, während Mosayebi Samani et al. (2020a) unter 5 mg Flunarizin eine Aufhebung der LTD berichteten.

Flunarizin in einer hohen Dosis (10 mg) könnte eine direkte Antagonisierung der postsynaptischen Kalziumkanäle und somit eine Verminderung des Kalziumeinstroms bewirken (Nitsche et al. 2003d; Grundey et al. 2018). Die Kalziumkonzentration steigt hierdurch postsynaptisch erneut nur sehr gering an und reicht nicht aus, um eine LTD zu induzieren. Durch diesen Effekt wird die ctDCS-induzierte LTD aufgehoben. Die MEP-Amplituden zeigen hier ebenfalls signifikante Unterschiede zur Placebobedingung 1 (Placebo + Placebo) mit einer Tendenz zum Baselineniveau (siehe Abbildung 8). Eine Studie, in welcher die ctDCS mit 3 mA und 20 Minuten Stimulationsdauer erfolgte, konnte ebenfalls eine Aufhebung der LTD unter einer Dosis von 10 mg Flunarizin zeigen und unterstützt somit die hier genannten Beobachtungen (Mosayebi Samani et al. 2020a). Ähnliche Effekte konnten in anderen Studien ebenfalls für die anodale tDCS gezeigt werden (Nitsche et al. 2003d).

In allen Versuchsbedingungen ohne Nikotin konnten keine signifikanten Effekte über einen Zeitpunkt von 60 Minuten nach der Stimulation hinaus nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede der MEP-Amplituden zur Placebobedingung 1 traten nur innerhalb der ersten 30 Minuten nach ctDCS auf. Unsere sekundäre Hypothese konnten wir für die Versuchsbedingungen ohne Nikotin somit bestätigen. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien mit vergleichbaren Versuchsabläufen (Nitsche et al. 2003b; Monte-Silva et al. 2010; Batsikadze et al. 2013). Die bereits genannte Untersuchung von Mosayebi Samani et al. (2020a) kam jedoch zu einem anderen Ergebnis. Dort konnten unter Anwendung eines alternativen Stimulationsprotokolls signifikante Effekte der ctDCS in Kombination mit 10 mg Flunarizin für bis zu 120 Minuten nachgewiesen werden (Mosayebi Samani et al. 2020a).



Abbildung 8: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Placebo und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und durch kathodale tDCS-induzierte LTD-ähnliche Plastizität. Die Grafik stellt den hier postulierten Wirkmechanismus dar. Auf der y-Achse befinden sich die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und die hiermit verbundenen Plastizitätsänderungen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Versuchsbedingungen dargestellt. Die Veränderungen der Kalziumkonzentrationen können zu LTD- oder LTP-ähnlichen Plastizitätsveränderungen führen. Zwischen beiden Bereichen und bei sehr starken Kalziumeinströmen ergeben sich keine Plastizitätsveränderungen ("no man's land 1 und 2"). Die schwarzen Pfeile zeigen die Veränderungen durch kathodale tDCS an, die weißen Pfeile die zusätzlichen Effekte durch Flunarizin. Modifiziert nach J. Grundey et al. (Grundey et al. 2018). LTP: Langzeit-Depression; LTP: Langzeit-Potenzierung; PLC1: Placebobedingung 1; PP: Placebo-Pflaster; PP+2,5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; PP+5 Placebo-Pflaster und Flunarizin 5 mg; PP+10: Placebo-Pflaster und Flunarizin 10 mg.

4.3 Untersuchungen mit Nikotin

Fügt man Nikotin als zusätzlichen Faktor hinzu, gelten dieselben Grundannahmen wie bei den Placebobedingungen. In der Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo) findet keine Plastizitätsinduktion durch ctDCS statt (siehe Abbildung 9). Durch Gabe von Nikotin und den konsekutiven nAChR bedingten starken prä- und postsynaptischen Kalziumeinstrom wird der Konzentrationsbereich des Kalziums oberhalb des LTP-Bereichs erreicht ("no man's land 2"; siehe Abschnitt 1.5) (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Neben dieser direkten Wirkung als liganden-gesteuerte Ionenkanäle modulieren die aktivierten nAChR zudem die Ausschüttung von unter anderem Glutamat und GABA (Summers et al. 1997; Alkondon et al. 1999; Albuquerque et al. 2009; Huang et al. 2010). Dies legt einen weitreichenden Einfluss von nAChR auf die synaptische Plastizität nahe. Betrachtet man jedoch zunächst nur die starke Erhöhung der postsynaptischen Kalziumkonzentration, so vermutet man, dass intrazelluläre Regulationsmechanismen aktiviert werden, um das resultierende Konzentrations- und Spannungsgefälle auszugleichen. Hierbei kommt es beispielsweise zur Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in der postsynaptischen Zellmembran (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Durch den Ausstrom von Kaliumionen aus der Postsynapse wird ein Gegengewicht zum starken Kalziumeinstrom und die resultierende Depolarisation gebildet vermindert. Infolge dieser die Regulationsmechanismen werden tDCS-induzierten Plastizitätsveränderungen aufgehoben. Experimentell befinden sich die gemessenen MEP-Amplituden annähernd auf Baselineniveau.

Die weitere Literatur bezüglich der nikotinergen Modulation ctDCS-induzierter Neuroplastizität ist gegenwärtig uneinheitlich. Während einige Studien ebenfalls eine Aufhebung der LTD-ähnlichen Effekte unter Nikotin zeigen konnten (Thirugnanasambandam et al. 2011; Grundey et al. 2012b), ergaben andere unter Gabe von Cholinesterasehemmern eine Stärkung und Prolongation selbiger (Kuo et al. 2007; Batsikadze et al. 2017). Für die anodale tDCS hingegen konnte bereits in mehreren Studien eine Aufhebung der dort induzierten LTP-Effekte unter Nikotin gezeigt werden (Thirugnanasambandam et al. 2011; Grundey et al. 2012b; Grundey et al. 2018). Insgesamt ist für die Untersuchungen mit Nikotin und Flunarizin von einer komplexen Interaktion zwischen den pharmakologischen Effekten beider Substanzen auf den intrazellulären Kalziumspiegel sowie den stimulationsbedingten Veränderungen, insbesondere von GABA und Glutamat auszugehen (Cousin et al. 1993; Summers et al. 1997; Alkondon et al. 1999; Albuquerque et al. 2009).

Unter Gabe von Flunarizin in der Dosis 2,5 mg ergibt sich nun erneut eine Reduktion der Glutamatausschüttung und konsekutiv der NMDA-Rezeptoraktivität (siehe Abschnitt 4.2) (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017). Zunächst besteht, bedingt durch die Gabe von Nikotin, eine vermehrte Aktivität prä- und postsynaptischer nAChR, welche zu einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat und erhöhten Aktivität der NMDA-Rezeptoren

führt (siehe Abschnitt 1.5.1) (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Flunarizin wiederum vermindert nun in niedriger Dosis vor allem die Ausschüttung von Glutamat über die Antagonisierung präsynaptischer VGCC. Dieser Effekt scheint in vivo in niedrigen Dosierungen besonders ausgeprägt zu sein und mit steigender Dosis abzunehmen (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017). Somit bildet die verminderte Glutamatausschüttung durch Flunarizin ein Gegengewicht zur vermehrten NMDA-Rezeptoraktivität durch Nikotin. Zusammenfassend strömen weniger Kalziumionen in die Postsynapse ein und die Kalziumkonzentration an der postsynaptischen Membran sinkt in den Bereich, der eine LTP auslösen kann (Lisman 2001). Aufgrund der, relativ zur Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo) gesehen verminderten Kalziumkonzentration ergibt sich ein geringeres Spannungsgefälle. Somit treten die bereits erwähnten Regulationsmechanismen mit Aktivierung der postsynaptischen Kaliumkanäle weniger stark in Erscheinung und es entsteht eine LTP-ähnliche Neuroplastizität (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Die MEP-Amplituden sind gegenüber der Baseline signifikant erhöht.

Bei Gabe von 5 mg Flunarizin könnte nun erneut die GABAerge Wirkung reduziert werden (Cousin et al. 1993). Als zugrundeliegender Mechanismus kommt die bereits unter Abschnitt 4.2 beschriebene Antagonisierung der präsynaptischen VGCC in Frage, welche in höheren Dosierungen neben der Glutamat- auch die GABA-Ausschüttung hemmt. Hierbei kommt es zu einem verminderten Einstrom von Anionen und die Kalziumkonzentration steigt ins "no man's land 2." Die bereits zuvor für die Placebobedingung 2 (Nikotin + Nikotin) beschriebenen Regulationsmechanismen wie beispielsweise die Aktivierung postsynaptischer Kaliumkanäle greifen aufgrund des erhöhten Spannungsgefälles erneut und verhindern die Bildung einer LTP-ähnlichen Plastizität (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Es wird somit wie bei der Untersuchung ohne Nikotin, das Gleichgewicht zwischen glutamaterger und GABAerger Wirkung wiederhergestellt. Experimentell befinden sich die MEP-Amplituden auf Baselineniveau. Wie bereits unter Abschnitt 4.2. erläutert, bleiben die hier postulierten GABAergen Effekte von Flunarizin weiterhin spekulativ. Während in neuronalen Zellkulturen bereits eine gleichzeitige Reduktion der Glutamat- und GABA-Ausschüttung unter Flunarizin gezeigt werden konnte, fehlen weiterhin entsprechende in vivo-Studien zu den hier verwendeten Dosierungen (Cousin et al. 1993).

Unter 10 mg Flunarizin erfolgt vermutlich eine direkte Blockade postsynaptischer Kalziumkanäle und der LTP-Konzentrationsbereich wird erneut erreicht (Nitsche et al. 2003d; Grundey et al. 2018). Durch den verminderten Kalziumeinstrom verringert sich das Spannungsgefälle und die bereits mehrfach erwähnten Kompensationsmechanismen zur Reduktion desselbigen treten weniger stark in Erscheinung. Unter einer Dosis von 10 mg Flunarizin reicht dieser Effekt jedoch nicht aus, um die Kalziumkonzentration noch weiter in den Bereich des "no man's land" oder gar den LTD-Bereich zu senken (Lisman 2001; Misonou et al. 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die nikotinbedingte erhöhte Glutamatausschüttung und NMDA-Rezeptoraktivität an der Postsynapse weiterhin gegenläufige Effekte bewirken. Zusätzlich nimmt insbesondere in höheren Dosierungen von

Flunarizin die durch VGCC vermittelte Hemmung der präsynaptischen Glutamatausschüttung ab, wodurch ebenfalls mehr Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird (Surbakti et al. 2017). Es kann jedoch vermutet werden, dass in noch höherer Dosierung von Flunarizin durch weitere direkte Blockade der postsynaptischen Kalziumkanäle ein erneutes Erreichen des LTD-Bereiches möglich wäre. Die MEP-Amplituden sind durch Induktion einer LTP im Vergleich zur Baseline-Messung mit Nikotin und 10 mg Flunarizin signifikant erhöht. Zudem differieren sie signifikant von der Placebobedingung 2 (Nikotin + Placebo).

Abschließend bleiben insbesondere die hier postulierten Wirkmechanismen für die Dosisbereiche von 2,5 und 5 mg in Ermangelung weiterer In-vivo-Studien spekulativ. Insbesondere die Beeinflussung von Glutamat und GABA durch Flunarizin sollte weiter erforscht werden.

Bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Plastizitätsveränderungen konnten signifikante Unterschiede gegenüber der Baseline-Messung bis zum nächsten Abend in der Gruppe mit 10 mg Flunarizin nachgewiesen werden. Hierdurch wurde unsere sekundäre Hypothese für die Versuchsbedingungen mit Nikotin widerlegt. Prolongierte MEP-Veränderungen unter Flunarizin 10 mg wurden bereits in einer anderen Studie beschrieben, dort jedoch ohne die zusätzliche Gabe von Nikotin (Mosayebi Samani et al. 2020a). Einschränkend ist für die genannte Studie jedoch anzumerken, dass Mosayebi Samani et al. (2020a) die Messungen nur bis 120 Minuten nach der ctDCS weiterführten und ein anderes ctDCS-Protokoll verwendet wurde. Um etwaige lang-anhaltende Plastizitätseffekte der Kombination von Flunarizin 10 mg mit Nikotin nachzuweisen sind jedoch bisweilen weitere Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen und größeren Stichproben notwendig.



Abbildung 9: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Nikotin, Placebo und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und durch kathodale tDCS-induzierte LTD-ähnliche Plastizität. Die Grafik stellt den hier postulierten Wirkmechanismus dar. Auf der y-Achse befinden sich die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und die hiermit verbundenen Plastizitätsänderungen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Versuchsbedingungen dargestellt. Die Veränderungen der Kalziumkonzentrationen können zu LTD- oder LTP-ähnlichen Plastizitätsveränderungen führen. Zwischen beiden Bereichen und bei sehr starken Kalziumeinströmen ergeben sich keine Plastizitätsveränderungen ("no man's land 1 und 2"). Die schwarzen Pfeile zeigen die Veränderungen durch kathodale tDCS an, die weißen Pfeile die zusätzlichen Effekte durch Flunarizin. Unter zusätzlicher Applikation von Nikotin-Pflastern kommt es zu einem starken Kalziumeinstrom, welcher durch den grauen Pfeil dargestellt ist. Modifiziert nach J. Grundey et al. (Grundey et al. 2018). LTP: Langzeit-Depression; LTP: Langzeit-Potenzierung; PLC1: Placebobedingung 1; PP: Placebo-Pflaster; PP+2,5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; PP+5 Placebo-Pflaster und Flunarizin 5 mg: PP+10: Placebo-Pflaster und Flunarizin 10 mg; NP: Nikotin-Pflaster; NP+2,5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; NP+5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 5 mg: NP+10: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 10 mg

4.4 Auswirkungen auf kognitive Leistungen

Die Modulation von LTP und LTD stellt eine der neurophysiologischen Grundlagen für unterschiedliche kognitive Funktionen dar (Rioult-Pedotti et al. 2000). Während Nikotin im Allgemeinen für die Verbesserung dieser kognitiven Funktionen bekannt ist, so zeichnen zahlreiche Studien in der nicht-rauchenden Bevölkerung ein uneinheitliches Bild (Rezvani und Levin 2001; Hahn und Stolerman 2002; Kumari et al. 2003; Jubelt et al. 2008; Froeliger et al. 2009; Heishman et al. 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen zwei Erklärungen für die unterschiedlichen Effekte von Nikotin auf kognitive Prozesse nahe.

Zunächst lässt sich eine nicht lineare Beziehung zwischen der neuronalen Kalziumkonzentration und der Modulation von Neuroplastizität vermuten (Lisman 2001). Die Induktion einer LTD unter ctDCS konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden (Nitsche und Paulus 2000; Monte-Silva et al. 2010; Batsikadze et al. 2013; Mosayebi Samani et al. 2020a). Auch in der vorliegenden Studie konnte mittels ctDCS und ohne Medikation eine LTD für bis zu 60 Minuten ausgelöst werden. Dieser Effekt konnte ohne Nikotin in Dosierungen von 2,5 und 10 mg Flunarizin aufgehoben werden, während unter 5 mg weiterhin eine LTD induzierbar war (siehe Abbildung 4). Unter kombinierter Gabe von Nikotin und Flunarizin in einer Dosis von 2,5 und 10 mg konnte nicht nur die LTD aufgehoben, sondern zusätzlich eine LTP induziert werden (siehe Abbildung 6). Ähnliche nicht lineare Effekte von Flunarizin konnten bereits in anderen Studien für die anodale und kathodale tDCS gezeigt werden (Grundey et al. 2018; Mosayebi Samani et al. 2020a). Da die Induktion von LTP eine entscheidende Rolle in zahlreichen Lernprozessen spielt, stellt die nicht lineare Kalziumabhängigkeit der Induktion von LTP eine mögliche Erklärung für die bisher heterogenen Studienergebnisse auf diesem Gebiet dar und betont die Notwendigkeit einer individualisierten Dosisfindung (Rezvani und Levin 2001; Hahn und Stolerman 2002; Kumari et al. 2003; Jubelt et al. 2008; Froeliger et al. 2009; Heishman et al. 2010; Mosayebi Samani et al. 2020a).

Des Weiteren scheint der Ausgangszustand der synaptischen Kalziumkonzentration im Probanden von großer Bedeutung für die Modulation von Neuroplastizität zu sein (Lugon et al. 2015). So moduliert die Gabe von Flunarizin in den unterschiedlichen Dosierungen jeweils die gleichen synaptischen Prozesse, induziert jedoch in Abhängigkeit von der initialen Kalziumkonzentration unterschiedliche Effekte (siehe Abbildung 9). Während beispielsweise der Placebo-Gruppe eine hohe Flunarizin-Dosis durch Verminderung in der Kalziumkonzentration zur Aufhebung der LTD führte, konnte sie in der Nikotin-Gruppe einen übermäßigen Anstieg der Kalziumkonzentration in das "no man's land 2" verhindern und erneut eine LTP induzieren. Ähnliche Effekte für den Ausgangszustand konnten bereits für Raucher unter Nikotinentzug gezeigt werden (Grundey et al. 2012a). Da Raucher durch ihre chronische Nikotinexposition eine Desensibilisierung ihrer nikotinergen Kalziumkanäle entsteht in Abwesenheit von Nikotin bewirken, eine niedrigere neuronale Kalziumkonzentration. Während Raucher sich im Nikotinentzug befanden, war es

beispielsweise nicht möglich, durch anodale tDCS eine LTP-ähnliche Neuroplastizität zu erzeugen. Dieser Effekt war jedoch unter Gabe von Nikotin reversibel (Grundey et al. 2012a). Auch konnte eine reduzierte Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses im Nikotinentzug gezeigt werden. Diese ließ sich bei Rauchern erneut durch Nikotin-Gabe verbessern, jedoch nicht bei Nicht-Rauchern (Grundey et al. 2015). Diese Beobachtungen legen die These nahe, dass erst durch Aktivierung der nikotinergen Kalziumkanäle eine ausreichende Ausgangskonzentration von Kalzium erreicht werden konnte, um eine LTP-ähnliche Plastizität zu induzieren (Lisman 2001; Lugon et al. 2015).

Hieraus ergeben sich möglicherweise weitreichende Konsequenzen für die Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, welche ebenfalls mit einem cholinergen Defizit einhergehen. Ein Beispiel hierfür stellt die Alzheimer-Demenz dar (Bartus et al. 1982; Wilcock et al. 1982; Muir 1997). Aufgrund der niedrigeren Ausgangskonzentrationen für Kalzium und dessen nicht-linearem Effekt auf Neuroplastizität könnte hier bei erkrankten Patienten eine exakte und individualisierte Dosisfindung cholinerger Substanzen in Zukunft von größerer Bedeutung sein. Auch hier könnten zu hohe oder zu niedrige Kalziumkonzentrationen die gewünschten Effekte cholinerger Substanzen verhindern und eine mögliche Erklärung für das bisher sehr heterogene Therapieansprechen unter diesen Medikamenten liefern (Birks 2006). Dies bleibt jedoch in Anbetracht der aktuellen Studienlage bisweilen spekulativ (Rezvani und Levin 2001; Hahn und Stolerman 2002; Kumari et al. 2003; Jubelt et al. 2008; Froeliger et al. 2009; Heishman et al. 2010).

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse der bisher zu diesem Thema durchgeführten Studien sollte zukünftig überprüft werden, inwiefern die hier erhobenen Veränderungen von MEP-Amplituden auch mit höheren kognitiven Funktionen korrelieren. Denkbar wäre diesbezüglich eine Beurteilung der Leistung des Arbeitsgedächtnisses unter dem hier verwendeten Versuchsaufbau.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist anzunehmen, dass sich für die Versuche mit Nikotin und Flunarizin in einer Dosis von 2,5 und 10 mg eine verbesserte kognitive Leistungsfähigkeit infolge der induzierten LTP ergibt (Morris et al. 1986; Whitlock et al. 2006; Nabavi et al. 2014). Dies könnte in einer unspezifischen Verschiebung des kortikalen Gleichgewichts in Richtung einer Erregbarkeitssteigerung begründet sein (Thirugnanasambandam et al. 2011). Für die Probanden ohne Nikotin, sowohl unter Placebo als auch unter 2,5 mg Flunarizin ist eine LTD-bedingte schlechtere kognitive Leistungsfähigkeit erwartbar. Auch hier stellt die Verschiebung des Gleichgewichts, diesmal zugunsten einer Inhibition, einen der wichtigsten Faktoren dar (Thirugnanasambandam et al. 2011). In den letzten Jahren konnte zudem eine gewisse Wichtigkeit LTD-ähnlicher Neuroplastizität für Hippocampus-assoziierte Lern- und Gedächtnisvorgänge gezeigt werden, sodass für eine genauere Einschätzung weitere Studien notwendig sind (Collingridge et al. 2010; Dong et al. 2013).

4.5 Limitationen

4.5.1 Methodisch

Der hier postulierte Wirkmechanismus ist in Anbetracht der Komplexität der genannten Prozesse sicher spekulativ. Dies gilt insbesondere, da die Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene nicht direkt gemessen, sondern lediglich indirekt aus den Veränderungen der MEP-Amplituden und unter Heranziehung anderer Studien abgeleitet wurden. Weitere Studien, auch im tierexperimentellen Bereich, sind notwendig, um die hier genannten Ergebnisse zu erhärten (Euskirchen et al. 2021). Während die Durchführung einer solchen Studie im Menschenmodell deutliche Vorteile bezüglich der etwaigen klinischen Relevanz bringt, so entsteht jedoch auch eine höhere Variabilität. Es konnten in einigen Studien deutliche Inter-Subjekt-Unterschiede bezüglich der Veränderungen von MEP-Amplituden unter gleichen Stimulationsbedingungen gezeigt werden (Nitsche et al. 2004b; Nitsche et al. 2004a; Horvath et al. 2014). Eine altersbedingte Reduktion der tDCS-Wirkung konnte diesbezüglich für die anodale, nicht jedoch für die kathodale tDCS gezeigt werden (Ghasemian-Shirvan et al. 2020). Die Modulation neuroplastischer Prozesse durch circadiane, anatomische, metabolische oder hormonelle Faktoren muss jedoch weiterhin in Betracht gezogen werden (Inghilleri et al. 2004; Sale et al. 2008; Mosayebi Samani et al. 2021). Auch bleiben die Annahmen über kognitive Auswirkungen im Rahmen dieser Studie in Abwesenheit expliziter neuropsychologischer Testungen spekulativ. Zusammenfassend handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine explorative Studie. Somit sind grundsätzlich weitere Studien mit höheren Probandenzahlen wünschenswert, um die Ergebnisse zu replizieren und zu erweitern.

Ebenfalls sind trotz eines möglichst reizabschirmenden Settings und der Maßgabe an die Probanden sich zu entspannen, motorische und kognitive Störvariablen nicht sicher auszuschließen. Insbesondere willkürliche und unwillkürliche motorische Aktivitäten, sowie kognitive Anstrengung können signifikante Effekte auf tDCS-induzierte Plastizitätsveränderungen haben (Quartarone et al. 2004; Antal et al. 2007; Horvath et al. 2014). Auch eine Veränderung der Sitz- und Kopfposition zwischen den Messzeitpunkten kann möglicherweise die Messung der MEP-Amplituden beeinflussen (Mikkonen und Laakso 2019). Die Metabolisierung von Nikotin ist von zahlreichen inter- und intrapersonellen Faktoren wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, Ernährungsgewohnheiten und Leberenzymstatus abhängig (Benowitz et al. 2009). Veränderungen insbesondere des CYP2D6-Enzyms können sowohl die Blutplasmaspiegel von Flunarizin als auch - in geringem Maße - von Nikotin verändern (Narimatsu et al. 1993; Caporaso et al. 2001). Diesbezüglich sind auch die zum Teil unterschiedlichen Verabreichungsformen von Nikotin beispielsweise als Spray oder Pflaster zu erwähnen. Aufgrund der unterschiedlichen Pharmakokinetik und der raschen Hochregulation der nAChR-Rezeptoren unter Nikotingabe muss von einer hierdurch bedingten Veränderung der neuronalen Effekte ausgegangen werden (Flores et al. 1992; Alkondon und Albuquerque 2004; Mukhin et al. 2008). Zudem wirkt Nikotin nicht selektiv an nAChR, sondern moduliert zahlreiche weitere Neurotransmittersysteme. Dies erklärt möglicherweise, warum andere Studien unter Gabe von Rivastigmin (einem Cholinesterasehemmer) oder Vareniclin (ein a4\beta2-Partialagonist und a7-Agonist) prolongierte LTD-ähnliche Effekte zeigen konnten (Kuo et al. 2007; Batsikadze et al. 2017), während sich in dieser und anderen Studien unter Nikotingabe eine Aufhebung selbiger nachweisen ließ (Thirugnanasambandam et al. 2011; Grundey et al. 2012b). Des Weiteren bewirkt Nikotin eine Aktivierung dopaminerger Systeme, welche ebenfalls tDCS-induzierte Effekte modulieren (Fresnoza et al. 2014; Wei et al. 2018).

Für Kalziumkanalblocker, zu welchen auch Flunarizin gehört, konnte eine enzymbedingte und altersabhängige Veränderung der Wirkung gezeigt werden (Xu et al. 2017). Im Rahmen dieser Studie wurden keine Blutspiegel der hier genannten Medikamente bestimmt, sodass eine Aussage über die tatsächliche Resorption und Metabolisierung nicht möglich ist. Des Weiteren wirkt Flunarizin nicht ausschließlich als Kalziumantagonist und beeinflusst, ähnlich wie Nikotin, zahlreiche weitere Rezeptorsysteme. Die genaue Wirkweise ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausreichend geklärt, so dass konkurrierende Effekte auf Rezeptorebene wie die Inhibition von Natriumkanälen in Betracht gezogen werden müssen (Cousin et al. 1993). Zudem besitzt Flunarizin auch modulierende Effekte auf Calmodulin, dessen Auswirkung auf Kalziumkonzentration und etwaige Enzymaktivitäten hier nicht berücksichtigt wurde (Kubo et al. 1984). Während ein starker Einfluss der postsynaptischen Veränderungen der Kalziumkonzentrationen auf LTP- und LTD-ähnliche Neuroplastizität als gesichert gilt, ist weiterhin unklar, inwieweit auch direkte Effekte der NMDA-Rezeptoraktivität diese beeinflussen. Vermutlich sind für die durch tDCS induzierten Plastizitätsveränderungen, sowohl Kalziumkonzentrationsals auch NMDArezeptorabhängige Mechanismen von entscheidender Bedeutung (Liebetanz et al. 2002; Nitsche et al. 2003c). Weiterhin sind die dosisabhängigen Veränderungen von Glutamat und GABA in Ermangelung weiterer Studien zu diesem Thema noch nicht hinreichend ergründet (Cousin et al. 1993; Surbakti et al. 2017).

4.6 Ausblick

Im Rahmen zukünftiger Studien könnte unter dem hier genannten experimentellen Ablauf die Gabe von höheren Flunarizin-Dosierungen in Kombination mit Nikotin von Interesse sein. Der hier postulierte Wirkmechanismus legt in diesem Fall eine weitere Reduktion der Kalziumkonzentration durch direkte Blockade postsynaptischer Kalziumkanäle nahe. Durch starke Reduktion des Kalziumeinstroms ließe sich somit vermutlich erneut eine LTDähnliche Plastizität induzieren. Zudem könnte die Inter- und Intra-Subjektvariabilität durch die Rekrutierung größerer Probandenzahlen sowie Anwendung von Neuronavigation und Erfassung von hormonellen und metabolischen Faktoren vermindert werden (Ahdab et al. 2010). Insbesondere die computergestützte, individualisierte Simulation elektrischer Felder anhand von MRT-Daten konnte hier in ersten Studien bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen (Antonenko et al. 2019; Laakso et al. 2019; Mosayebi Samani et al. 2021).

In der klinischen Anwendung könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse zum weiteren Verständnis zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen beitragen. Bei der Alzheimer-Demenz stellt beispielsweise der Untergang cholinerger Neurone durch übermäßigen Einstrom von Kalziumionen mit konsekutiver Exzitotoxizität einen möglichen Pathomechanismus dar (Koch et al. 2004; Lipton 2006). Die gezielte Modulation intrazellulärer Kalziumkonzentration im ZNS könnte hier in Zukunft einen entscheidenden Beitrag zur Therapie dieser Erkrankung beitragen. Während schon heute Cholinesterase-Inhibitoren wie Rivastigmin regelhaft zur Verbesserung kognitiver Defizite eingesetzt werden, konnten für die klinische Anwendung von direkten nAChR-Agonisten bisher keine signifikanten Effekte gezeigt werden (Gee et al. 2017). Eine mögliche Erklärung stellt die Notwendigkeit einer exakten Dosisfindung zur Vermeidung eines Wirkverlustes bei zu starken oder zu schwachen Änderungen der Kalziumkonzentration dar. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Studie die zukünftige Wichtigkeit einer individualisierten Dosisfindung nikotinerger Substanzen unter Einbeziehung der nicht linearen Effekte von Kalzium auf Neuroplastizität.

5 Zusammenfassung

moduliert Neuroplastizität und kognitive Nikotin Prozesse über multiple Neurotransmittersysteme und Veränderung der neuronalen Kalziumkonzentrationen. Die Gabe von Nikotin schwächt die durch nicht invasive Hirnstimulationsverfahren wie die transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS) induzierten Plastizitätsveränderungen vermutlich durch einen übermäßigen intrazellulären Kalziumeinstrom. Um diese Hypothese zu testen, analysierten wir die Effekte des Kalziumkanalblockers Flunarizin auf die durch kathodale tDCS induzierten Plastizitätsveränderungen in gesunden Nichtrauchern unter zusätzlicher Nikotingabe. Wir applizierten hierfür jeweils kathodale tDCS und verabreichten Nikotin oder Placebo, sowie Flunarizin in drei verschiedenen Dosierungen (2,5, 5 und 10 mg) oder Placebo. Als Messparameter der Plastizitätsveränderungen wurden Amplituden motorisch evozierter Potentiale (MEP) über dem M. abductor digit minimi verwendet. Unter Nikotin wurden die durch kathodale tDCS bedingten LTD-ähnlichen Plastizitätsveränderungen aufgehoben. Unter kombinierter Gabe von Nikotin mit 2,5 mg und 10 mg Flunarizin, jedoch nicht bei Gabe von 5 mg, konnte neben dieser Aufhebung auch eine LTP-ähnliche Plastizität generiert werden. Unter alleiniger Gabe von Flunarizin (ohne Nikotin) konnten die LTD-ähnlichen Plastizitätsveränderungen unter 2,5 mg und 10 mg Gabe aufgehoben werden. Unter Gabe der mittleren Dosis von 5 mg ergab sich eine LTD-ähnliche Plastizität, auf dem Niveau der Placebogabe. Die Ergebnisse dieser Studie legen eine zentrale Rolle der Modulation intrazellulärer Kalziumkonzentrationen in der Beeinflussung LTD-ähnlicher Plastizität durch Nikotin im Menschen nahe. Diese Ergebnisse ergänzen das bestehende Wissen über neuronale Plastizität im Menschen und tragen möglicherweise in Zukunft zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung kognitiver Dysfunktionen bei.

6 Anhang

6.1 Tabellen

Tabelle 2: Ergebnisse des t-Tests für gepaarte Stichproben für die benötigte Stimulationsintensität (in % der maximalen Stimulatorleistung; % MSO) vor und nach Medikamentengabe. df: Freiheitsgrade, T: t-Wert, Sig.: Signifikanzniveau.



Tabelle 3: Ergebnisse des t-Tests für gepaarte Stichproben für die benötigte Stimulationsintensität (in % der maximalen Stimulatorleistung; % MSO) unter Placebo- bzw. Nikotin-Pflaster. df: Freiheitsgrade, T: t-Wert, Sig.: Signifikanzniveau.

	Т	df	Sig. (2-seitig)
%MSO (Placebo) - %MSO (Nikotin)	-1,103	47	,276

Tabelle 4: Ergebnisse der t-Tests für gepaarte Stichproben für die gepoolten, normalisierten MEP-Amplituden (MEP-Ratio) bis 30 Minuten nach ctDCS unter Placebo-Pflaster oder Nikotin-Pflaster und Flunarizin in unterschiedlichen Dosierungen. df: Freiheitsgrade, t: t-Wert, Sig.: Signifikanzniveau; PLC1: Placebobedingung 1; PP: Placebo-Pflaster; PP+2,5: Placebo-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; PP+5 Placebo-Pflaster und Flunarizin 5 mg: PP+10: Placebo-Pflaster und Flunarizin 10 mg; NP: Nikotin-Pflaster; NP+2,5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 2,5 mg; NP+5: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 5 mg: NP+10: Nikotin-Pflaster und Flunarizin 10 mg

		Differenz der Mittelwerte	Standard- abweichung	t	df	Sig.
Paaren 1	PP+2.5 - PLC1	,27351	,23080	4,105	11	,002
Paaren 2	PP+5 - PLC1	,04835	,24503	,684	11	,508
Paaren 3	PP+10 - PLC1	,31526	,36737	2,973	11	,013
Paaren 4	NP+2.5 - PLC2	,20706	,44759	1,603	11	,137
Paaren 5	NP+5 – PLC2	,00163	,27399	,021	11	,984
Paaren 6	NP+10 - PLC2	,24410	,36547	2,314	11	,041

6.2 Abbildungen



Abbildung 10: Durchführung der kathodalen tDCS. Links: Durch Bänder befestigte tDCS-Elektroden mit Kathode über dem ADM-repräsentierenden motorischen Kortexareal und Anode über der kontralateralen Orbita. Rechts: Batteriebetriebener Gleichstromstimulator (neuroConn GmbH, Ilmenau, Germany). ADM: Abductor digiti minimi; tDCS: Transkranielle Gleichstromstimulation



Abbildung 11: Versuchsaufbau inklusive verwendeter Materialien. Im Hintergrund: Schnittstelle zur Datenerfassung (CED 1401, Cambridge Electric Devices, Cambridge) mit angeschlossenem Laborcomputer. Rechts: Magstim 200 Magnetstimulator (The Magstim Company, Whitland, Dyfed, United Kingdom) mit acht-förmiger Magnetspule. Mitte: Probandin unter laufender kathodaler tDCS. Unten: batteriebetriebener Gleichstromstimulator (neuroConn GmbH, Ilmenau, Germany). ADM: Abductor digiti minimi; tDCS: Transkranielle Gleichstromstimulation

7 Literaturverzeichnis

- Abraham WC, Williams JM (2003): Properties and Mechanisms of LTP Maintenance. Neurosci <u>9</u>, 463–474
- Ahdab R, Ayache SS, Brugières P, Goujon C, Lefaucheur J-P (2010): Comparison of "standard" and "navigated" procedures of TMS coil positioning over motor, premotor and prefrontal targets in patients with chronic pain and depression. Neurophysiol Clin Neurophysiol <u>40</u>, 27–36
- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW (2009): Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. Physiol Rev <u>89</u>, 73–120
- Alkondon M, Albuquerque EX (2004): The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex; in: Progress in Brain Research, Band 145; 109–120
- Alkondon M, Pereira EFR, Eisenberg HM, Albuquerque EX (1999): Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. J Neurosci <u>19</u>, 2693– 2705
- Antal A, Terney D, Poreisz C, Paulus W (2007): Towards unravelling task-related modulations of neuroplastic changes induced in the human motor cortex. Eur J Neurosci <u>26</u>, 2687–2691
- Antonenko D, Thielscher A, Saturnino GB, Aydin S, Ittermann B, Grittner U, Flöel A (2019): Towards precise brain stimulation: Is electric field simulation related to neuromodulation? Brain Stimul <u>12</u>, 1159–1168
- Barker AT, Jalinous R, Freeston IL (1985): Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. Lancet <u>325</u>, 1106–1107
- Barone JA (1999): Domperidone: A peripherally acting dopamine2-receptor antagonist. Ann Pharmacother <u>33</u>, 429–440
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982): The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science (80-) <u>217</u>, 408–417
- Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo MF, Nitsche MA (2013): Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. J Physiol <u>591</u>, 1987–2000
- Batsikadze G, Paulus W, Hasan A, Grundey J, Kuo MF, Nitsche MA (2017): Compromised neuroplasticity in cigarette smokers under nicotine withdrawal is restituted by the nicotinic α4β2-receptor partial agonist varenicline. Sci Rep <u>7</u>, 1387
- Bennett MR (2000): The concept of long term potentiation of transmission at synapses. Prog Neurobiol <u>60</u>, 109–137
- Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P (2009): Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. Handb Exp Pharmacol <u>192</u>, 29–60
- Bertolino M, Llinás RR (1992): The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. Annu Rev Pharmacol Toxicol <u>32</u>, 399–421
- Bindman LJ, Lippold OCJ, Redfearn JWT (1962): Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents. Nature <u>196</u>,

584-585

- Bindman LJ, Lippold OCJ, Redfearn JWT (1964): The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of longlasting after-effects. J Physiol <u>172</u>, 369–382
- Birks J (2006): Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst Rev
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, et al. (2001): Calcium signalling - An overview. Semin Cell Dev Biol <u>12</u>, 3–10
- Bosch M, Hayashi Y (2012): Structural plasticity of dendritic spines. Curr Opin Neurobiol <u>22</u>, 383–388
- Burnashev N: Calcium permeability of ligand-gated channels. Band 24; Churchill Livingstone, Amsterdam 1998
- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1999a): Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. J Physiol <u>518</u>, 109–119
- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaïarsa JL (1999b): Mechanisms of induction and expression of longterm depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. J Neurosci <u>19</u>, 7568–7577
- Caporaso NE, Lerman C, Audrain J, Boyd NR, Main D, Issaq HJ, Utermahlan B, Falk RT, Shields P (2001): Nicotine metabolism and CYP2D6 phenotype in smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev <u>10</u>, 261–263
- Carafoli E (2003): The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. Nat Rev Mol Cell Biol <u>4</u>, 326–332
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010): Long-term depression in the CNS. Nat Rev Neurosci <u>11</u>, 459–473
- Cousin MA, Nicholls DG, Pocock JM (1993): Flunarizine inhibits both calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes and cultured neurones. Brain Res <u>606</u>, 227–236
- Cummings J, Mulkey R, Nicoll R, Malenka R (1996): Ca 2+ Signaling Requirements for Long-Term Depression in the Hippocampus. Neuron <u>16</u>, 825–833
- D'Alcantara P, Schiffmann SN, Swillens S (2003): Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent Ca2+-controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. Eur J Neurosci <u>17</u>, 2521–2528
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S: Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Band 25; Elsevier, Amsterdam 2004
- Dani JA, Bertrand D (2007): Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. Annu Rev Pharmacol Toxicol <u>47</u>, 699– 729
- Dong Z, Bai Y, Wu X, Li H, Gong B, Howland JG, Huang Y, He W, Li T, Wang YT (2013): Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. Neuropharmacology <u>64</u>, 65–73
- Dymond AM, Coger RW, Serafetinides EA (1975): Intracerebral current levels in man during electrosleep therapy. Biol Psychiatry <u>10</u>, 101–104
- Errington A, Stohr T, Lees G (2005): Voltage Gated ion Channels: Targets for

Anticonvulsant Drugs. Curr Top Med Chem 5, 15–30

- Euskirchen N, Nitsche MA, van Thriel C (2021): Direct current stimulation in cell culture systems and brain slices New approaches for mechanistic evaluation of neuronal plasticity and neuromodulation: State of the art. Cells <u>10</u>, 3583
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ (1992): A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. Mol Pharmacol <u>41</u>, 31–7
- Fresnoza S, Paulus W, Nitsche MA, Kuo M-F (2014): Nonlinear Dose-Dependent Impact of D1 Receptor Activation on Motor Cortex Plasticity in Humans. J Neurosci <u>34</u>, 2744– 2753
- Fresnoza SM, Batsikadze G, Müller LE, Rost C, Chamoun M, Paulus W, Kuo MF, Nitsche MA (2020): Inhibitory effect of apomorphine on focal and nonfocal plasticity in the human motor cortex. Pharmaceutics <u>13</u>, 718
- Fritsch B, Reis J, Martinowich K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, Lu B (2010): Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. Neuron <u>66</u>, 198–204
- Froeliger B, Gilbert DG, McClernon FJ (2009): Effects of nicotine on novelty detection and memory recognition performance: Double-blind, placebo-controlled studies of smokers and nonsmokers. Psychopharmacology (Berl) <u>205</u>, 625–633
- Fujii S, Ji Z, Morita N, Sumikawa K (1999): Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. Brain Res <u>846</u>, 137–143
- Gee KW, Olincy A, Kanner R, Johnson L, Hogenkamp D, Harris J, Tran M, Edmonds SA, Sauer W, Yoshimura R, et al. (2017): First in human trial of a type i positive allosteric modulator of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacokinetics, safety, and evidence for neurocognitive effect of AVL-3288. J Psychopharmacol <u>31</u>, 434–441
- Ghasemian-Shirvan E, Farnad L, Mosayebi Samani M, Verstraelen S, Meesen RLJ, Kuo MF, Nitsche MA (2020): Age-related differences of motor cortex plasticity in adults: A transcranial direct current stimulation study. Brain Stimul <u>13</u>, 1588–1599
- Gotti C, Clementi F (2004): Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. Prog Neurobiol <u>74</u>, 363–396
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M (2007): Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. Biochem Pharmacol <u>74</u>, 1102–1111
- Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA (2012a): Neuroplasticity in Cigarette Smokers Is Altered under Withdrawal and Partially Restituted by Nicotine Exposition. J Neurosci <u>32</u>, 4156–4162
- Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA (2012b): Rapid effect of nicotine intake on neuroplasticity in non-smoking humans. Front Pharmacol <u>3 OCT</u>, 186
- Grundey J, Freznosa S, Klinker F, Lang N, Paulus W, Nitsche MA (2013): Cortical excitability in smoking and not smoking individuals with and without nicotine. Psychopharmacology (Berl) 229, 653–664
- Grundey J, Amu R, Ambrus GG, Batsikadze G, Paulus W, Nitsche MA (2015): Double dissociation of working memory and attentional processes in smokers and non-smokers with and without nicotine. Psychopharmacology (Berl) <u>232</u>, 2491–2501
- Grundey J, Barlay J, Batsikadze G, Kuo M-FF, Paulus W, Nitsche MA (2018): Nicotine

modulates human brain plasticity via calcium dependent mechanisms. J Physiol <u>596</u>, 5429–5441

- Hahn B, Stolerman IP (2002): Nicotine-induced attentional enhancement in rats: Effects of chronic exposure to nicotine. Neuropsychopharmacology <u>27</u>, 712–722
- Heishman SJ, Taylor RC, Henningfield JE (1994): Nicotine and smoking: A review of effects on human performance. Exp Clin Psychopharmacol <u>2</u>, 345–395
- Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG (2010): Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. Psychopharmacology (Berl) <u>210</u>, 453– 469
- Hoebel J, Lange DC, Müters S (2012): Faktenblatt zu GEDA 2012 : Ergebnisse der Studie » Gesundheit in Deutschland aktuell 2012 «Chronisches Kranksein. Robert-Koch-Institut 1–4
- Holmes B, Brogden RNN, Heel RCC, Speight TMM, Avery GSS (1984): Flunarizine: A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. Drugs <u>27</u>, 6–44
- Horvath JC, Carter O, Forte JD (2014): Transcranial direct current stimulation: five important issues we aren't discussing (but probably should be). Front Syst Neurosci <u>8</u>, 2
- Huang LT, Sherwood JL, Sun YJ, Lodge D, Wang Y (2010): Activation of presynaptic α7 nicotinic receptors evokes an excitatory response in hippocampal CA3 neurones in anaesthetized rats: An in vivo iontophoretic study. Br J Pharmacol <u>159</u>, 554–565
- Inghilleri M, Conte A, Currà A, Frasca V, Lorenzano C, Berardelli A (2004): Ovarian hormones and cortical excitability. An rTMS study in humans. Clin Neurophysiol <u>115</u>, 1063–1068
- Jubelt LE, Barr RS, Goff DC, Logvinenko T, Weiss AP, Evins AE (2008): Effects of transdermal nicotine on episodic memory in non-smokers with and without schizophrenia. Psychopharmacology (Berl) <u>199</u>, 89–98
- Kobayashi T, Mori Y (1998): Ca2+channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. Eur J Pharmacol <u>363</u>, 1–15
- Koch HJ, Szecsey A, Haen E (2004): NMDA-antagonism (memantine): an alternative pharmacological therapeutic principle in Alzheimer's and vascular dementia. CurrPharmDes <u>10</u>, 253–259
- Kubo K, Matsuda Y, Kase H, Yamada K (1984): Inhibition of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by flunarizine, a calcium-entry blocker. Biochem Biophys Res Commun <u>124</u>, 315–321
- Kullmann DM, Moreau AW, Bakiri Y, Nicholson E (2012): Plasticity of Inhibition. Neuron <u>75</u>, 951–962
- Kumari V, Gray JA, Ffytche DH, Mitterschiffthaler MT, Das M, Zachariah E, Vythelingum GN, Williams SCR, Simmons A, Sharma T (2003): Cognitive effects of nicotine in humans: An fMRI study. Neuroimage <u>19</u>, 1002–1013
- Kuo M-F, Grosch J, Fregni F, Paulus W, Nitsche MA (2007): Focusing Effect of Acetylcholine on Neuroplasticity in the Human Motor Cortex. J Neurosci <u>27</u>, 14442– 14447
- Laakso I, Mikkonen M, Koyama S, Hirata A, Tanaka S (2019): Can electric fields explain inter-individual variability in transcranial direct current stimulation of the motor cortex?

Sci Rep <u>9</u>, 626

- Lasoń W, Dudra-Jastrzębska M, Rejdak K, Czuczwar SJ (2011): Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/ pharmacodynamic interactions: An update. Pharmacol Reports <u>63</u>, 271–292
- Levin ED, Simon BB (1998): Nicotinic acetylcholine involvement in cogitive function in animals. Psychopharmacology (Berl) <u>138</u>, 217–230
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006): Nicotinic effects on cognitive function: Behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization; in: Psychopharmacology (Berl) <u>184</u>, 523–539
- Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W (2002): Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. Brain <u>125</u>, 2238–47
- Lipton SA (2006): Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. Nat Rev Drug Discov <u>5</u>, 160–170
- Lisman JE (2001): Three Ca2+ levels affect plasticity differently: The LTP zone, the LTD zone and no man's land. J Physiol <u>532</u>, 285
- Lodish HF, Bhamrah HS, Juneja K: Molecular cell biology. 6. Auflage; W.H. Freeman, New York 2008
- Lolas F (1977): Brain polarization: behavioral and therapeutic effects. Biol Psychiatry <u>12</u>, 37– 47
- Louis P, Spierings ELH (1982): Comparison of Flunarizine (Sibelium®) and Pizotifen (Sandomigran®) in Migraine Treatment: A Double-Blind Study. Cephalalgia <u>2</u>, 197–203
- Lugon MDMV, Batsikadze G, Fresnoza S, Grundey J, Kuo M-FF, Paulus W, Nakamura-Palacios EM, Nitsche MA (2015): Mechanisms of Nicotinic Modulation of Glutamatergic Neuroplasticity in Humans. Cereb Cortex <u>27</u>, 544–553
- Malarkey EB, Parpura V (2008): Mechanisms of glutamate release from astrocytes. Neurochem Int <u>52</u>, 142–154
- Malenka RC, Bear MF (2004): LTP and LTD: An embarrassment of riches. Neuron <u>44</u>, 5–21
- Malinow R (2003): AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. Philos Trans R Soc B Biol Sci <u>358</u>, 707–714
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004): Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. Nature <u>429</u>, 761–766
- McKay DB, Chang C, Gonzalez-Cestari TF, McKay SB, El-Hajj RA, Bryant DL, Zhu MX, Swaan PW, Arason KM, Pulipaka AB, et al. (2007): Analogs of Methyllycaconitine as Novel Noncompetitive Inhibitors of Nicotinic Receptors: Pharmacological Characterization, Computational Modeling, and Pharmacophore Development. Mol Pharmacol <u>71</u>, 1288–1297
- Mikkonen M, Laakso I (2019): Effects of posture on electric fields of non-invasive brain stimulation. Phys Med Biol <u>64</u>, 065019
- Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS (2004): Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. Nat Neurosci <u>7</u>, 711–718

- Monte-Silva K, Kuo M-F, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA (2010): Shaping the optimal repetition interval for cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS). J Neurophysiol <u>103</u>, 1735–40
- Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986): Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature <u>319</u>, 774–776
- Mosayebi Samani M, Agboada D, Jamil A, Kuo MF, Nitsche MA (2019): Titrating the neuroplastic effects of cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS) over the primary motor cortex. Cortex <u>119</u>, 350–361
- Mosayebi Samani M, Melo L, Agboada D, Nitsche MA, Kuo MF (2020a): Ca2+ channel dynamics explain the nonlinear neuroplasticity induction by cathodal transcranial direct current stimulation over the primary motor cortex. Eur Neuropsychopharmacol <u>38</u>, 63–72
- Mosayebi Samani M, Agboada D, Kuo MF, Nitsche MA (2020b): Probing the relevance of repeated cathodal transcranial direct current stimulation over the primary motor cortex for prolongation of after-effects. J Physiol <u>598</u>, 805–816
- Mosayebi Samani M, Jamil A, Salvador R, Ruffini G, Haueisen J, Nitsche MA (2021): The impact of individual electrical fields and anatomical factors on the neurophysiological outcomes of tDCS: A TMS-MEP and MRI study. Brain Stimul <u>14</u>, 316–326
- Muir JL (1997): Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav <u>56</u>, 687–696
- Mukhin AG, Kimes AS, Chefer SI, Matochik JA, Contoreggi CS, Horti AG, Vaupel DB, Pavlova O, Stein EA (2008): Greater Nicotinic Acetylcholine Receptor Density in Smokers than in Nonsmokers: A PET Study with 2-18F-FA-85380. J Nucl Med <u>49</u>, 1628–1635
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014): Engineering a memory with LTD and LTP. Nature <u>511</u>, 348–352
- Narimatsu S, Kariya S, Isozaki S, Ohmori S, Kitada M, Hosokawa S, Masubuchi Y, Suzuki T (1993): Involvement of CYP2D6 in Oxidative Metabolism of Cinnarizine and Flunarizine in Human Liver Microsomes. Biochem Biophys Res Commun <u>193</u>, 1262– 1268
- Nitsche MA, Paulus W (2000): Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. J Physiol <u>527</u>, 633–639
- Nitsche MA, Paulus W (2001): Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. Neurology <u>57</u>, 1899–1901
- Nitsche MA, Schauenburg A, Lang N, Liebetanz D, Exner C, Paulus W, Tergau F (2003a): Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. J Cogn Neurosci <u>15</u>, 619–626
- Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W (2003b): Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. Clin Neurophysiol <u>114</u>, 600–604
- Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F, Paulus W (2003c): Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation--technical, safety and functional aspects. Suppl Clin Neurophysiol <u>56</u>, 255–276
- Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, Henning S, Tergau F, Paulus W (2003d): Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced

by transcranial direct current stimulation in humans. J Physiol 553, 293-301

- Nitsche MA, Grundey J, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W (2004a): Catecholaminergic consolidation of motor cortical neuroplasticity in humans. Cereb Cortex <u>14</u>, 1240–5
- Nitsche MA, Liebetanz D, Schlitterlau A, Henschke U, Fricke K, Frommann K, Lang N, Henning S, Paulus W, Tergau F (2004b): GABAergic modulation of DC stimulationinduced motor cortex excitability shifts in humans. Eur J Neurosci <u>19</u>, 2720–2726
- Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A (2008): Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. Brain Stimul <u>1</u>, 206–223
- Nitsche MA, Müller-Dahlhaus F, Paulus W, Ziemann U (2012): The pharmacology of neuroplasticity induced by non-invasive brain stimulation: Building models for the clinical use of CNS active drugs. J Physiol <u>590</u>, 4641–4662
- Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M (1998): Polarization of the human motor cortex through the scalp. Neuroreport <u>9</u>, 2257–2260
- Purpura DP, McMurtry JG (1965): Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. J Neurophysiol <u>28</u>, 166–185
- Quartarone A, Morgante F, Bagnato S, Rizzo V, Sant'Angelo A, Aiello E, Reggio E, Battaglia F, Messina C, Girlanda P (2004): Long lasting effects of transcranial direct current stimulation on motor imagery. Neuroreport <u>15</u>, 1287–1291
- Radcliffe KA, Dani JA (1998): Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. J Neurosci <u>18</u>, 7075–7083
- Rezvani AH, Levin ED (2001): Cognitive effects of nicotine. Biol Psychiatry 49, 258-267
- Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. J Physiol <u>4</u>, 29–42
- Rioult-Pedotti M-SS, Friedman D, Donoghue JP (2000): Learning-Induced LTP in Neocortex. Science 290, 533–536
- Rothwell JC (1993): Evoked potentials, magnetic stimulation studies, and event-related potentials. Curr Opin Neurol <u>6</u>, 715–723
- Rush S, Driscoll DA (1968): Current distribution in the brain from surface electrodes. Anesth Analg <u>47</u>, 717–723
- Sale M V., Ridding MC, Nordstrom MA (2008): Cortisol Inhibits Neuroplasticity Induction in Human Motor Cortex. J Neurosci <u>28</u>, 8285–8293
- Sigel E, Steinmann ME (2012): Structure, function, and modulation of GABAA receptors. J Biol Chem <u>287</u>, 40224–40231
- Summers KL, Kem WR, Giacobini E (1997): Nicotinic agonist modulation of neurotransmitter levels in the rat frontoparietal cortex. Jpn J Pharmacol <u>74</u>, 139–146
- Surbakti KP, Sjahrir H, Juwita-Sembiring R, Mutiara E (2017): Effect of flunarizine on serum glutamate levels and its correlation with headache intensity in chronic tension-type headache patients. Open access Maced J Med Sci <u>5</u>, 757–761
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (1999): Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. J Neurosci <u>19</u>, 1895–911
- Thirugnanasambandam N, Grundey J, Adam K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W,

Nitsche MA (2011): Nicotinergic Impact on Focal and Non-Focal Neuroplasticity Induced by Non-Invasive Brain Stimulation in Non-Smoking Humans. Neuropsychopharmacology <u>36</u>, 879–886

- Wei C, Han X, Weng D, Feng Q, Qi X, Li J, Luo M (2018): Response dynamics of midbrain dopamine neurons and serotonin neurons to heroin, nicotine, cocaine, and MDMA. Cell Discov <u>4</u>, 60
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006): Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science (80-) <u>313</u>, 1093–1097
- Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CCT (1982): Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. J Neurol Sci <u>57</u>, 407–417
- Xu J, Boström AE, Saeed M, Dubey RK, Waeber G, Vollenweider P, Marques-Vidal P, Mwinyi J, Schiöth HB (2017): A genetic variant in the catechol-O-methyl transferase (COMT) gene is related to age-dependent differences in the therapeutic effect of calcium-channel blockers. Med (United States) <u>96</u>, e7029

Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Nitsche für die gute Betreuung sowie die Anregungen und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben.

Zudem möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Jessica Grundey für ihre engagierte sowohl fachliche als auch persönliche Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Shane Fresnoza Ph. D. von der Abteilung Klinische Neurophysiologie Göttingen für die lehrreichen Ratschläge und seine unermüdliche Unterstützung herzlich danken.