

Aus dem
Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik
(Schwerpunkt: Erkrankungen des vorderen und
hinteren Augenabschnittes)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-U. Bartz-Schmidt
Sektion für Motilitätsstörungen
Leiterin: Dr. D. Besch

Beitrag der Rot- und Grünzapfen zum
Elektroretinogramm der inneren Netzhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Judith Barbara Heine
aus
Karlsruhe
2009

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. H. Jägle

2. Berichterstatter:

Professor Dr. K.-U. Bartz-Schmidt

**Gewidmet allen, die die Hoffnung auf Fertigstellung
dieser Arbeit bewahrt haben,
als ich schon aufgeben wollte.**

Und: Unserem ungeborenen Kind, das mir die nötige Gelassenheit dazu gab.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktionsweise des Farbensehens.....	1
1.2 Anatomie der Netzhaut.....	4
1.3 Signalverarbeitung als Grundlage des Farbensehens	5
1.4 Die Technik des multifokalen Elektroretinogramms (mfERG)	6
1.5 Zapfenisolierendes multifokales Elektroretinogramm	10
1.6 Multifokale oszillatorische Potentiale (mfOPs)	11
1.7 Ziele der Studie.....	13
2. Methoden	15
2.1 Probanden	15
2.2 Durchführung der Untersuchung.....	16
2.3 Stimulationsbedingungen.....	19
2.4 Berechnung des L- zu M-Zapfenverhältnisses	20
2.5 Statistische Analyse.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Findet bereits auf retinaler Ebene eine Aufwertung des M-Zapfen-Signals statt?	22
3.1.1 Messergebnisse beim mfERG.....	22
3.1.2 Messergebnisse bei den OPs.....	26
3.2 Was sind die Ursachen für das höhere L/M-Verhältnis bei männlichen Individuen?	29
3.2.1 Änderungen der Wellenform durch die Reizbedingungen	30
3.2.2 Berechnungen des L- zu M- Zapfenverhältnisses.....	31
3.2.3 Geschlechtsabhängige Unterschiede im L/M-Verhältnis.....	33
4. Diskussion	37
4.1 Verändert sich die Gewichtung der L- und M- Zapfen bereits auf retinaler Ebene? Findet bereits auf retinaler Ebene eine Aufwertung des M-Zapfen-Signals statt? ..	37
4.2 Ist das L/M-Verhältnis bei Männern höher als bei Frauen? Was sind die Ursachen für ein höheres L/M-Verhältnis bei männlichen Individuen?	40
5. Zusammenfassung	46
6. Abbildungsverzeichnis	47
7. Literaturverzeichnis	50
8. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Funktionsweise des Farbsehens

Verschiedene Arten von Sinneszellen versetzen den Menschen in die Lage, auf die Netzhaut treffendes Licht in elektrische Impulse umzuwandeln und damit seine Umwelt optisch wahrzunehmen.

Dieser Vorgang, also das Umwandeln von Lichtquanten in elektrische Impulse, wird durch die Photorezeptoren gewährleistet. Der Mensch besitzt zwei Grundtypen von Rezeptoren: nämlich Stäbchen und Zapfen, wobei Stäbchen ca. 20 mal so häufig vorkommen wie Zapfen, etwa 120 Millionen Stäbchen zu 6 Millionen Zapfen.

Die Namensgebung bezieht sich auf ihre lichtmikroskopische Gestalt: Stäbchen sind im Außensegment schlank, Zapfen dagegen eher kompakt (Abb. 1).

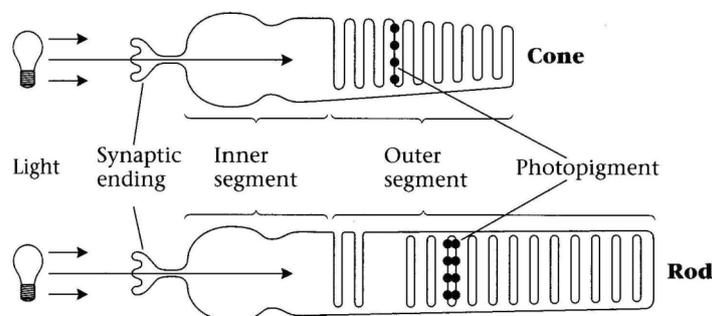


Abb. 1 Schematische Darstellung der Stäbchen (Rod) and Zapfen (Cone).

Das einfallende Licht bewirkt in den äußeren Segmenten der Sehzellen eine Transformation der Sehfärbstoffe (Photopigment). Bemerkenswerter Weise liegen die Sehfärbstoffe im von der Pupille abgewandten Teil der Netzhaut, weshalb das Licht zuvor durch alle Schichten der Netzhaut hindurch muss. (Aus: Wandell 1995)

Stäbchen (engl. rods) können Helligkeitsunterschiede auch noch bei sehr geringen Lichtmengen (z.B. in der Dämmerung) wahrnehmen. Sie sind für das sogenannte skotopische oder Dunkelsehen verantwortlich.

Zapfen (engl. cones) hingegen ermöglichen bei größeren Lichtmengen eine Wahrnehmung von Farben. Sie sind für das sogenannte photopische Sehen verantwortlich. Die Verteilung der verschiedenen Rezeptoren über die Netzhaut ist ungleichmäßig. Stäbchen und Zapfen verteilen sich in einer Art Mosaikstruktur über die Retina. Es gibt jedoch Bereiche in der die eine oder andere Klasse deutlich überwiegt.

An der Stelle des schärfsten Sehens, der Fovea centralis, finden sich ausschließlich Zapfen, wohingegen in der Peripherie deutlich mehr Stäbchen angesiedelt sind. Die meisten Stäbchen finden sich in einem Ring bei 20° Exzentrizität zur Fovea. Im sogenannten „blinden Fleck“, dem Austritt des Sehnerven aus dem Auge, sind weder Stäbchen noch Zapfen angesiedelt (Abb. 2).

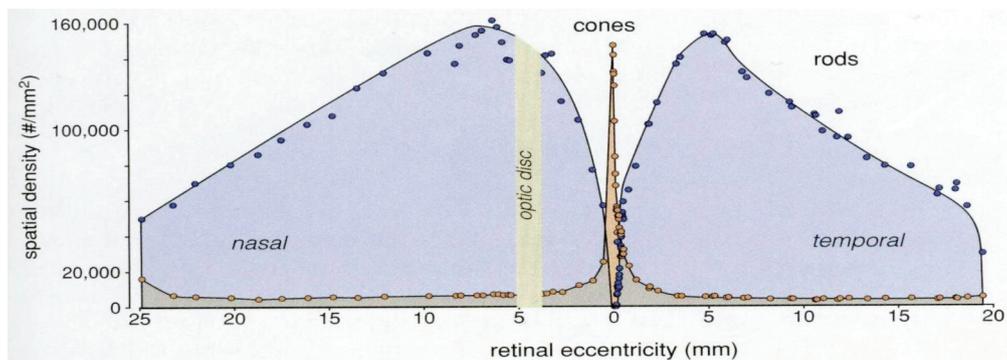


Abb. 2 Verteilung von Zapfen und Stäbchen in der Netzhaut

Auf der x-Achse ist die Entfernung von der Stelle des schärfsten Sehens, der Makula (bei 0 Grad), in Grad abgetragen. Auf der y-Achse ist die Dichte der Sehzellen in Stück pro Quadratmillimeter aufgetragen. Bei etwa 5 mm Exzentrizität in Richtung nasal findet sich der Austritt des Sehnerven (optic disc), ein Bereich in dem keine Sehzellen angesiedelt sind. Weiterhin zeigt sich, dass die Zapfen (cones) ihre höchste Dichte im Bereich der Makula haben und ihre Zahl in die Peripherie rasch abnimmt. Die Stäbchen (rods) hingegen haben ihre höchste Dichte im Bereich zwischen 5-10 mm Exzentrizität und nehmen zahlenmäßig in der Peripherie nicht so stark ab. (Aus: Rodieck, 1998)

„Bunt“ wird die menschliche Welt durch drei verschiedene Arten von Zapfen, deren Sehpigmente dank verschiedener Proteinstrukturen unterschiedliche Spektralabsorptionsmaxima haben. Die L- (oder long wavelength sensitive) Zapfen, wegen ihres Maximums der Empfindlichkeit im langwelligeren Bereich so genannt (max. Empfindlichkeit von 558 nm), die M- (oder middle wavelength sensitive) Zapfen mit einer max. Empfindlichkeit bei 531 nm und die selteneren

S- (short wavelength sensitive) Zapfen mit einer maximalen Empfindlichkeit bei 420 nm (Stockman & Sharpe 1998).

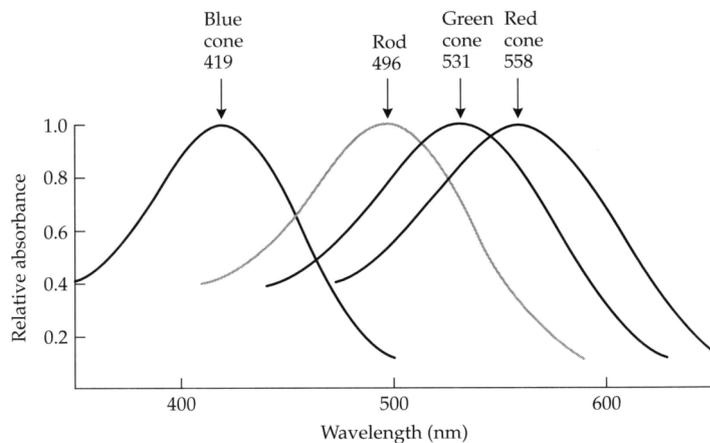


Abb. 3 Lichtspektrum mit Absorptionsmaxima der verschiedenen Zapfentypen

Auf der x-Achse ist die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, auf der y-Achse die Absorption durch die verschiedenen Zapfen- und das Stäbchenpigment abgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass die Blauzapfen (blue oder S-cones genannt) in einem kurzwelligeren Bereich ihre größte Absorption besitzen, die Grün- und Rotzapfen (green oder M-cones und red bzw. L-cones) im langwelligeren Bereich. (Aus: Rodieck 1998, modifizierte Abb. nach Osterberg 1935)

Auch die Verteilung der einzelnen Zapfentypen folgt einem Muster.

In der Fovea centralis haben L- und M-Zapfen die größte Dichte, wobei sie am ehesten einer zufälligen Verteilung unterworfen sind (Curcio et al. 1991).

Das Verhältnis von L- zu M- Zapfen wurde bei verschiedenen psychophysischen (De Vries, 1946; Jacobs & Neitz, 1991; Kremer et al. 2000; Pokorny & Smith, 1987) und elektroretinographischen (Jacobs & Neitz, 1991; Kremers et al., 2000; Carrol et al. 2000) Untersuchungen auf Werte zwischen 0.6 und 9 geschätzt. Jüngere Untersuchungen mittels mRNA-Analyse von menschlicher Spendernetzhaute (Hagstrom et al. 1998) oder der Netzhaut von Affen (Deeb et al. 2000) zeigten ein L- zu M- Zapfenverhältnis zwischen 0,6 und 7, das in der Peripherie ansteigt und Werte zwischen 3 und 12 erreicht.

S-Zapfen finden sich im Bereich der Fovea praktisch nicht.

Bei einem Grad Exzentrizität finden sich die meisten S-Zapfen (Dartnall et al. 1983; Curcio et al. 1991), sie sind wahrscheinlich regelmäßig über die zentrale

Netzhaut verteilt und bilden etwa acht Prozent der Gesamtzapfenzahl (Curcio et al 1991).

1.2 Anatomie der Netzhaut

In der Netzhaut befinden sich die primären Sinneszellen (Stäbchen und Zapfen) mit ihren Außensegmenten in Richtung der Bulbuswand (nach außen), also in größter Entfernung vom durch die Pupille einfallenden Licht (Abb.4). Vor diesen Rezeptoren liegen erregungsleitende Zellen mit verschiedener Morphologie. Die Bipolarzellen leiten den Impuls von den Photorezeptoren zu Ganglienzellen, während Horizontal- und Amakrinzellen für die Signale zahlreiche Querverbindungen über die Netzhaut herstellen. Auf ca. 126 Millionen Photorezeptoren kommen nur etwa eine Million Ganglienzellen. Die inneren Netzhautschichten nehmen daher eine erste Verarbeitung und Bündelung des Signals vor, welches anschließend über das Corpus geniculatum laterale (CGL) zum Cortex weitergeleitet wird.

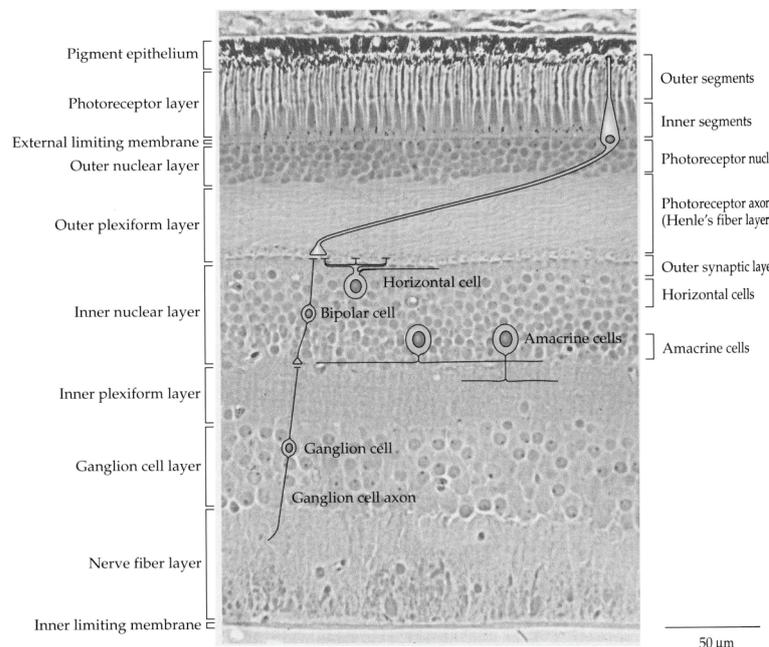


Abb. 4 Histologischer Schnitt durch die Netzhaut mit den unterschiedlichen Schichten

Die Orientierung derart, dass das einfallende Licht von unten die direkt unterhalb des retinalen Pigmentepithels gelegenen Außensegmente der Photorezeptoren nur durch die signalverarbeitenden Schichten der inneren Netzhaut erreicht. (Aus: Oyster 1999)

1.3 Signalverarbeitung als Grundlage des Farbsehens

Nachdem die durch die Pupille einfallenden Lichtstrahlen die Rezeptoren erreicht haben, generieren die verschiedenen Zapfentypen ein elektrisches Erregungsmuster, das im neuronalen Netzwerk der Retina weiterverarbeitet wird. Je nach Wellenlänge des einfallenden Lichts werden die verschiedenen Zapfentypen in unterschiedlichem Maße erregt. Die Proteine des Sehfärbstoffes ändern hierbei durch Absorption von Lichtquanten ihre räumliche Struktur. Dieses Isoomer bewirkt die Aktivierung von Transducin, das seinerseits eine cGMP-Phosphodiesterase aktiviert.

Die abnehmende Konzentration von cGMP bewirkt eine Schließung der cGMP-abhängigen Ionenkanäle. Hierdurch kommt es zum Erliegen des sogenannten Dunkelstroms (eng. dark current), einer cGMP-abhängigen Ionenpumpe, die bei fehlender Belichtung einen stetigen Einstrom von Natriumionen in die Photorezeptorzelle und eine beständige Depolarisation an der Zellmembran ermöglicht. Erlischt nun der Natriumeinstrom kommt es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials. Diesen Vorgang nennt man Transduktionsprozess.

Bipolar-, Ganglien-, Amakrin- und Horizontalzellen kombinieren dann die elektrischen Impulse der einzelnen Zapfen räumlich, zeitlich und spektral (Hurvich & Jameson, 1957; Gouras, 1968; Zrenner, 1983).

Die Signale, die in der Netzhaut entstehen, werden, vereinfacht dargestellt, hauptsächlich in drei verschiedenen Bahnen zum Cortex weitergeleitet. In den parvozellulären Bahnen (PC-Bahnen), auch Farbkanal genannt, werden die Signale verschiedener Zapfentypen antagonistisch kombiniert. Sie dienen der Auflösung hoher Ortsfrequenzen. Die magnozellanen Bahnen (MC-Bahnen) dienen der Kontrastempfindlichkeit. Hier werden die Signale der unterschiedlichen Zapfentypen additiv verknüpft. Die MC-Bahnen können dadurch zeitliche Veränderungen im Bild registrieren. Die Signale des kurzwelligen S-Zapfensystems werden getrennt durch sogenannte koniozelluläre Bahnen zum Cortex geleitet. An der Stelle des schärfsten Sehens, der Fovea centralis, finden sich hauptsächlich PC-Bahnen (Merigan et al. 1991; Schiller, 1991; Zrenner, 1991),

in der Peripherie dagegen ist die Zahl der MC-Bahnen größer (Dacey & Peterson, 1992).

1.4 Die Technik des multifokalen Elektretinogramms (mfERG)

Alle Photorezeptoren reagieren auf Reizung mit demselben Vorgang: Einer Änderung in ihrer Oberflächenspannung. Diese Potentialveränderung der Netzhaut kann man an der Augenoberfläche, der Hornhaut, mit geeigneten Elektroden ableiten. Seit über 60 Jahren wird diese Tatsache als Diagnosemethode in der Klinik eingesetzt.

Durch Veränderung der Lichtreiz- und der Ableitparameter lassen sich die Potentialveränderungen bestimmten Netzhautschichten oder Zelltypen zuordnen.

Die Vorläufer-Methode des multifokalen Elektretinogramms ist das sogenannte Ganzfeld-Elektretinogramm. Der Einsatz dieser Technik in der Augenheilkunde wurde 1945 durch Karpe beschrieben.

Bei dieser Methode wird die durch einen definierten Lichtblitz erzeugte Spannungsänderung der Photorezeptoren an der Horn- oder Bindehaut mittels Verstärker gemessen. Die abgeleiteten Signale stellen also ein Summensignal der gesamten Netzhaut dar (Karpe 1945).

Aus dieser Methode wurde das multifokale Elektretinogramm (mfERG) entwickelt, welches es erlaubt, eine Landkarte der elektrischen Erregbarkeit zu erstellen (Sutter, 1991; Sutter & Tran, 1992).

Hierzu wird eine Elektrode an der Augenoberfläche des Probanden angelegt. In unserem Fall eine Fadenelektrode, die in den Bindehautsack des Betreffenden eingelegt wurde.

Stimuliert wird beim multifokalen ERG mit einem Monitor, auf welchem meistens 61 oder 103 Hexagone dargeboten werden (Abb. 5).

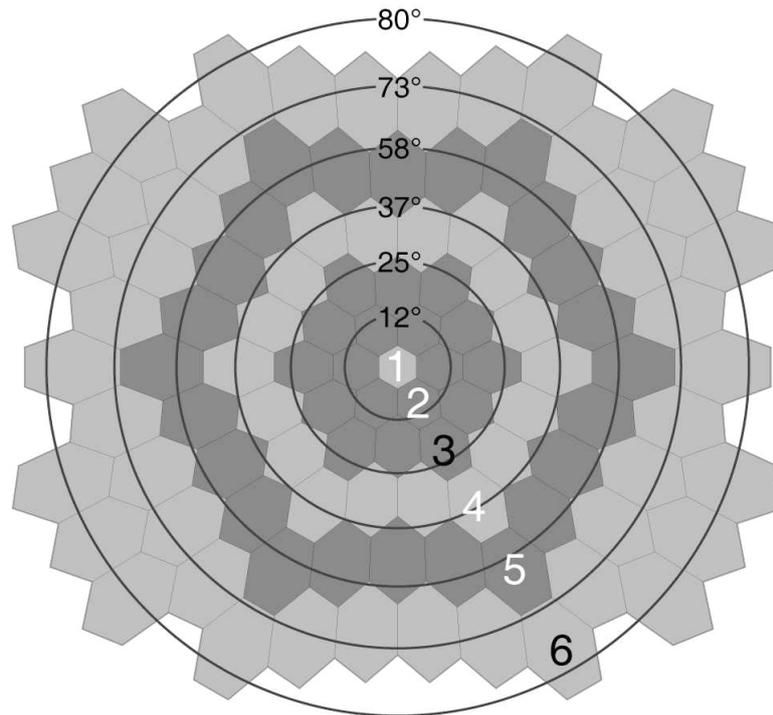


Abb. 5 Auf dem Monitor dargestelltes Muster bestehend aus Hexagonen unterschiedlicher Größe

Die Ringe fassen Bereiche ähnlicher Exzentrizität zusammen. In diesen Bereichen werden die Antwortamplituden aus den einzelnen Hexagonen gemittelt (beispielsweise alle Hexagone die sich in Ring 2, also bei 12° Exzentrizität, befinden u.s.w). Die Größe der Hexagone ist in etwa umgekehrt proportional zur Dichte der Zapfen.

Die hexagonalen Elemente werden nach einer pseudorandomisierten m-Sequenz abwechselnd zwischen zwei verschiedenen Emissionszuständen des Bildschirmes hin- und hergeschaltet (Sutter, 1991; Sutter & Tran, 1992), die Photorezeptoren also in zwei unterschiedliche Erregungszustände versetzt.

Die auch bei diesem Verfahren auf der Oberfläche des Auges gemessene Summenantwort lässt sich jedoch durch ein mathematisches Verfahren in die durch einzelne Hexagone erzeugten Teilantworten aufspalten, da die m-Sequenzen der einzelnen Hexagone ein Orthonormal-System bilden. Dadurch ist es möglich, die Topographie der in der Retina hervorgerufenen Spannungsänderungen simultan, das heißt an mehreren Orten zugleich, zu bestimmen (Sutter 1991).

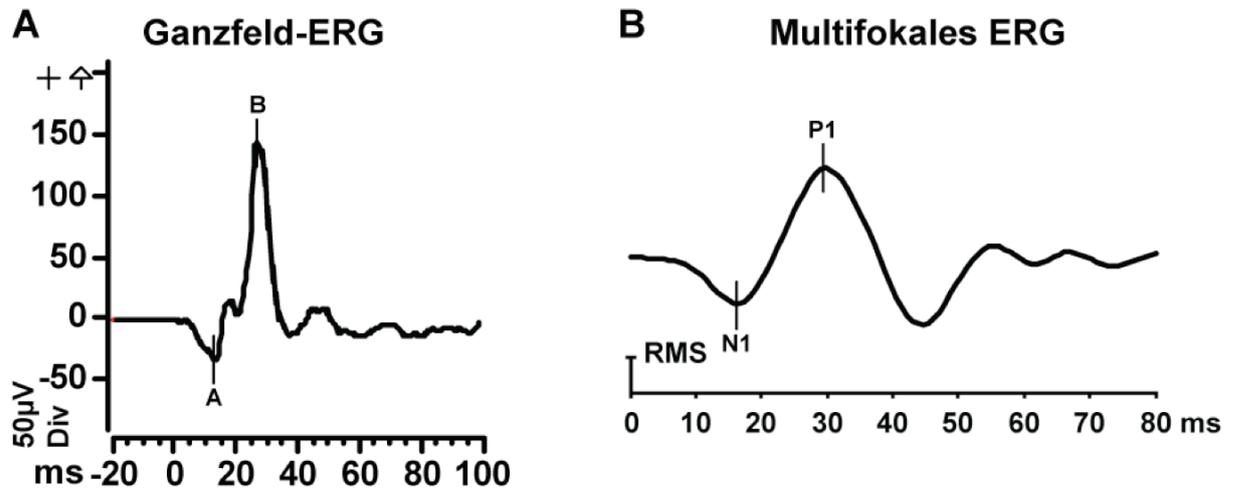


Abb. 6 Wellenform einer ERG-Ableitung bei Ganzfeldstimulation (A) und bei Stimulation mit dem Muster eines multifokalen ERGs (B).

Ausgewertet werden die Amplituden und Gipfelzeiten an den markierten Stellen der jeweiligen Wellenform.

Das Messergebnis, das heißt die den Spannungsverlauf darstellenden Kurven, unterscheiden sich zwischen dem herkömmlichen Ganzfeld-ERG und dem mfERG nicht grundsätzlich (Hood, Seiple, Holopigian & Greenstein, 1997)(siehe Abb. 6). Vergleicht man die Spannungskurve einer Ganzfeld-Messung mit der eines einzelnen Hexagons, lassen sich die gleichen Komponenten feststellen: einem initialen negativen Ausschlag (welcher im mfERG als N1, im Ganzfeld-ERG als a-Welle bezeichnet wird) folgt ein positiver Gipfel (im mfERG als P1, im Ganzfeld-ERG als b-Welle bezeichnet). Nach den Studien von Hood, Seiple, Holopigian & Greenstein 1997 lassen sich diese Komponenten in analoger Weise interpretieren.

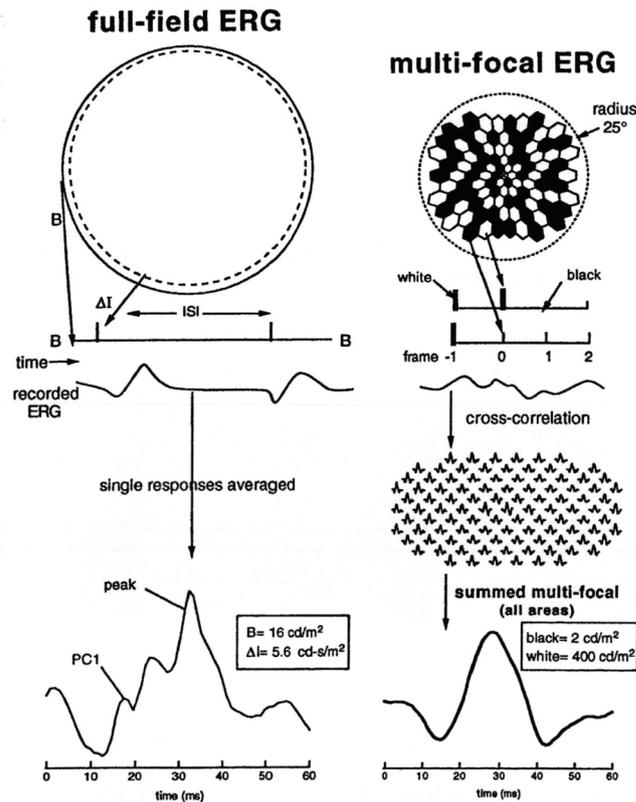


Abb. 7 Darstellung einer Ganzfeld- und einer multifokalen ERG Antwort

Zur Verdeutlichung der technischen Unterschiede: Beim Ganzfeld-ERG wird die Netzhaut mit einem Lichtblitz mehrmals gereizt, der Mittelwert der daraus erhaltenen Einzelantworten ergibt die Messkurve. Beim mfERG wird mittels eines Musters gereizt, das die Zuordnung der Antwortamplituden zu bestimmten Bereichen der Netzhaut erlaubt. Auch hier wird jeder Netzhautort mehrfach gereizt und die Einzelantworten im Sinne eines Mittelwertes berechnet.

Die verschiedenen Komponenten der mfERG-Signale haben unterschiedliche Ursprünge. Die positive Wellenform P1 wird von den Bipolarzellen generiert. Sie kann daher nur beobachtet werden, sofern die Rezeptorzellen in ihrer Funktion intakt sind, da sonst kein Signal an die Bipolarzellen weitergeleitet würde. Die initial negative Wellenform N1 kommt nur bei ausreichender Helligkeit des Stimulus zustande und ist ein negatives Summenpotential, das im Außensegment der Rezeptorzellen entsteht. Eigentlich ist N1 ein viel länger andauerndes negatives Signal, das sich aus unterschiedlich gepolten Ladungen zusammensetzt. Man sieht in N1 quasi einen Netto-Effekt dieser unterschiedlichen Ladungen. Bei geringer Helligkeit kommt die Wellenform N1 erst später zustande, so dass sie von der positiven Wellenform P1 überdeckt wird.

Die Gipfelzeit für N1 wird von Beginn des Reizes bis zum tiefsten Punkt der Wellenform gemessen. Die Amplitude ist die Differenz der Spannung von Reiz-

beginn bis zum tiefsten Punkt. Mit der Gipfelzeit von P1 verhält es sich analog, die Amplitude wird als Differenz des Minimums der initialen negativen Wellenform N1 und dem Maximum der ersten positiven Wellenform P1 berechnet (auch N1P1 genannt). Beide Werte, Gipfelzeit und Amplitude können bei Erkrankungen der Netzhaut verändert sein. Zusätzlich erlaubt das mfERG eine Aussage über die Lokalisation der erkrankten Bereiche in der betroffenen Netzhaut.

1.5 Zapfenisolierendes multifokales Elektroretinogramm

Zunächst wurde die Technik des mfERG für Messungen mit schwarz/weißem Reizmuster, d.h. bei Erregung aller Zapfentypen (wenn die Helligkeit im photosischen Bereich liegt) verwendet.

Um eine Aussage über die Funktion einzelner Zapfentypen machen zu können, wurden die Emissionszustände der Hexagone so eingestellt, dass der Wechsel zwischen den verwendeten Farben jeweils nur für einen Zapfentyp einen Wechsel des Erregungszustandes verursacht, während der Erregungszustand der anderen konstant blieb. Diese „silent substitution“ genannte Methode wurde 1982 von Estévez und Spekreijse vorgestellt.

Durch diese Selektierung fand man heraus, dass die Messkurven der verschiedenen Zapfentypen sich in ihrem Aussehen unterscheiden (Albrecht et al., 2002).

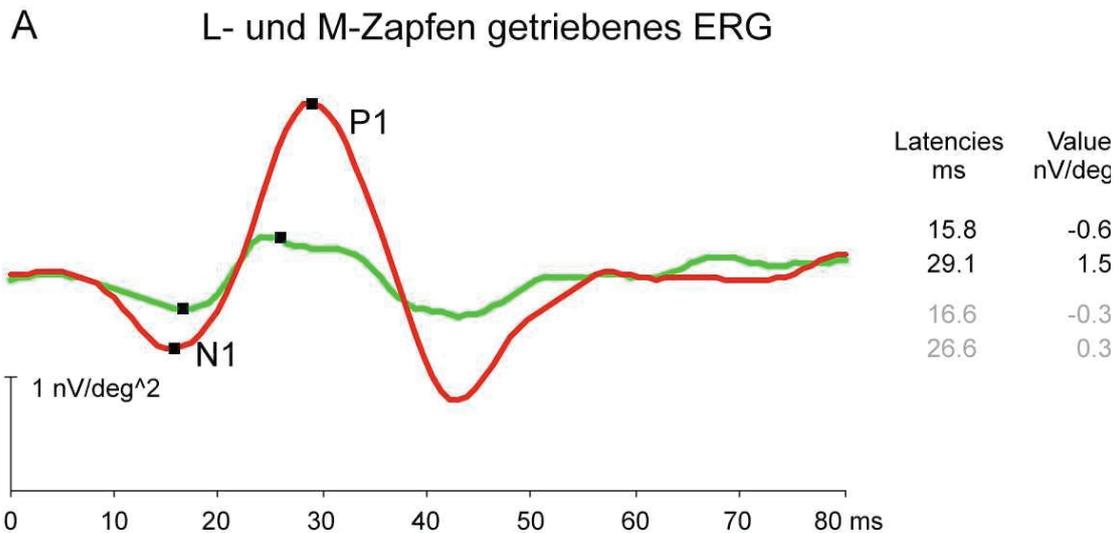


Abb. 8 L- und M-Zapfen getriebenes ERG

Zu sehen sind die ERG-Antwortkurven unter L-Zapfenisolierenden Bedingungen (rote Kurve) und unter M-Zapfen isolierenden Bedingungen (grüne Kurve). Gipfelzeit und Amplitudenhöhe sind rechterhand angegeben, oben für die L-Zapfen und unten für die M-Zapfen.

Die Zahl der L- und M-Zapfen ist individuell unterschiedlich. Eine Abschätzung der relativen Anzahl ist mittels der Relation der Stärke der ERG-Signale möglich (Albrecht et al., 2004).

1.6 Multifokale oszillatorische Potentiale (mfOPs)

Zusätzlich zu den Potentialen der Photorezeptoren ist es möglich, durch eine Änderung in der Verstärkung und Reizdarbietung aus dem Antwortsignal noch andere Komponenten herauszufiltern.

Im Anstieg von N1 zu P1 befinden sich hochfrequenter Elemente mit kleiner Amplitude, welche als oszillatorische Potentiale oder kurz OPs bezeichnet werden.

Bei den Untersuchungen von Heynen et al., die Ganzfeld-ERGs bei Primaten untersuchten, wurden oszillatorische Potentiale mit einer anderen Stromvertei-

lung als die der Komponenten der b-Welle gefunden. Diese Potentiale stammen aus einem mehr proximal gelegenen Teil der Netzhaut als die a- und b-Wellen. Pharmakologische Studien lassen vermuten, dass der ON-pathway für die Entstehung aller Potentiale in der OP-Antwort benötigt wird, die Aktivität des Off-pathway hingegen hauptsächlich einen Beitrag zur Entstehung späterer Spitzen der OP-Antwort leistet (Hare & Ton).

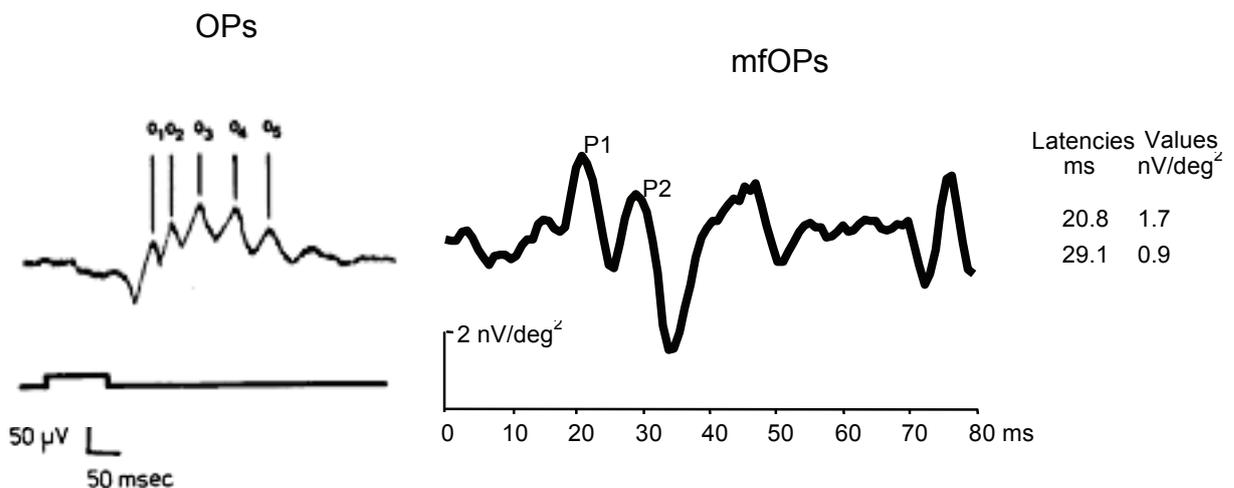


Abb. 9 Oszillatorische Potentiale im Ganzfeld-ERG (A) und multifokale oszillatorische Potentiale (B)

Während beim Ganzfeld-ERG mit 5-6 Potentiale identifiziert werden können, sind bei mfOPs meist nur die Potentiale P1 und P2 eindeutig identifizierbar.

Abb. 9 zeigt typische Wellenformen bei Ableitungen der OPs mit dem Ganzfeld-ERG und der multifokalen Technik. Bei Ganzfeld Ableitungen werden fünf, manchmal sechs Potentiale festgehalten (links) mfOPs zeigen zwei Gipfel mit einer signifikanten Amplitude.

Es wird angenommen, dass der Ursprung der aus dem Kern erster Ordnung extrahierten Signale der mfOPs (die lineare Antwort) hauptsächlich auf Zapfen-Interaktion auf der Ebene der Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen zu finden ist und somit etwas über die Verarbeitung der Signale in der inneren Netzhaut aussagen kann.

Betrachtet man die Amplitudenhöhen der mfOPs in unterschiedlichen Bereichen der Netzhaut fällt auf, dass die höchsten Amplituden nicht etwa im Bereich der Makula zu finden sind, sondern in einem Bereich zwischen 2° und 13° Exzentrizität von ihr liegen. Das lässt darauf schließen, dass für die Entstehung der Signale sowohl Zapfen als auch Stäbchen nötig sind, da in der Makula ja ausschließlich Zapfen angesiedelt sind.

Wu und Sutter (1995) zeichneten mfOPs bei steigender Intensität des Stimulus auf und schlossen aus den Ergebnissen, dass die Antwortsignale des Kerns 1. Ordnung vor allem von Zapfenbahnen oder Interaktionen zwischen den Zapfen bestimmt werden. Außerdem zeigte sich bei ihren Versuchen, dass die Amplituden der mfOPs stark von der verwendeten Helligkeit des Stimulus abhängig waren. Wurde die Helligkeit (und somit die Aktivität der Zapfen) reduziert, nahm die Größe der Amplitude ab. Andererseits bewirkte ein extrem heller Stimulus (der die Aktivität der Stäbchen verhinderte) eine längere Gipfelzeit der Antworten des 1. Kerns, sowie eine vollständige Auslöschung der Antworten des 2. Kerns (nicht-lineare Antwort). Demzufolge ist von einem deutlichen Beitrag durch Stäbchen-Zapfen-Interaktionen für die Entstehung der Antworten des 2. Kerns auszugehen.

1.7 Ziele der Studie

Aus den Untersuchungen von Albrecht (2005) ist bekannt, dass sich aus der Höhe der Amplituden im mfERG Rückschlüsse auf das mengenmäßige Verhältnis der L- und M-Zapfen ziehen lassen. Wie bereits erwähnt zeigt sich im L/M Verhältnis ein Überwiegen der L-Zapfen (im Durchschnitt etwa 2:1) obwohl es von Mensch zu Mensch unterschiedlich ist. Aus den Versuchen mit visuell evozierten Potentialen (Hood et al. 2002), die im Cortex entstehen, ist bekannt, dass die Information im Gehirn (Areal 17) mit einer etwa 1:1 Gewichtung von L- und M-Zapfen ankommt.

Das erste Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die Veränderung in der Gewichtung bereits in den inneren Netzhautschichten erfolgt, d.h. ob die Signa-

le der zahlenmässig unterlegenen M-Zapfen bereits auf retinaler Ebene eine Aufwertung erfahren. Dazu haben wir bei den gleichen Versuchspersonen sowohl mfERGs (welcher in der äußeren Netzhaut entstehen), als auch mfOPs (welche in der inneren Netzhaut entstehen) abgeleitet. Beide, L- und M-Zapfenaktivität, wurden getrennt abgeleitet und die Amplitude der Wellenform ausgewertet um Informationen über das L/M Verhältnis in den inneren und äußeren Netzhautschichten zu schätzen. Die Messungen wurden sowohl an farbtüchtigen (trichromatischen) Personen als auch an dichromatischen Probanden mit fehlenden L- oder M-Zapfen durchgeführt.

Die zweite Fragestellung bezog sich das L/M Verhältnis der Signale bei Männern und Frauen. Es ist berichtet worden, dass Männer im Durchschnitt ein höheres L/M-Verhältnis haben als Frauen. Eine Erklärung dafür wäre, dass Männer mehr L-Zapfen (in absoluten Zahlen) haben als Frauen. Es ist aber auch möglich, dass die Anzahl der L- und M-Zapfen durch Sexualhormone beeinflusst wird (Gupta et al. 2005). Es war daher das zweite Ziel, diesen Befund zu überprüfen und ggf. Hinweise auf die Ursachen zu bekommen. Dazu wurde das L/M-Verhältnis bei Männern und Frauen vergleichend untersucht und die relative Anzahl der L- beziehungsweise M-Zapfen mittels zwei Methoden, der Amplitudenhöhe der Signale sowie die Berechnung der Fläche unter der Kurve (area under curve = AUC), bestimmt.

2. Material und Methoden

Nach der Zustimmung der Ethik-Kommission der Universität Tübingen wurden bei insgesamt 18 Probanden (14 Farbsehtüchtige, 2 Protanope, 2 Deutanope) Messungen in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Probanden erhielten für die Teilnahme an unserer Studie eine Aufwandsentschädigung.

2.1 Probanden

An der Studie nahmen für die erste Fragestellung zehn farbsehtüchtige (trichromatische) Probanden im Alter zwischen 19 und 41 Jahren teil, davon fünf Frauen und fünf Männer. Für die zweite Fragestellung wurden zusätzlich vier weitere trichromatische Probanden rekrutiert: zwei Männer und zwei Frauen. Alle Probanden waren normalsichtig (z.T. mit Korrektur) und wurden mittels eines Rayleigh-Abgleiches am Oculus-Anomaloskop als farbsehtüchtig geprüft.

Zusätzlich wurden zwei protanope (keine Funktion der L-Zapfen) Probanden im Alter von 28 und 29 Jahren sowie zwei deutanope (keine Funktion der M-Zapfen) Probanden im Alter von 26 und 39 Jahren untersucht. Die Einstufung als Rot- oder Grünblind, erfolgte ebenfalls mittels der Rayleigh-Gleichung an einem Oculus-Anomaloskop. Da diese Probanden auch im Rahmen einer anderen Studie untersucht wurden, lagen zusätzlich Informationen über die genetische Ursache der Rot-Grün-Störung vor.

Die protanopen Probanden hatten einen nur ein einzelnes Gen im Rot-Grün-Opsingencluster. Beide besaßen ein einziges L-M-Hybridgen (L4M5 (Ala180)) bzw. ein L2M3 (Ala180) Pigmentgen) mit geschätzten Wellenlängen der maximalen Empfindlichkeit des Pigmentes von 533,5 nm und 530,0 nm.

Einer der beiden deutanopen Probanden hatte ein einziges L-Zapfen Pigmentgen (L(Ala 180)) mit einer geschätzten Wellenlänge des Maximums von 556,1 nm (die Schätzung der Wellenlängen ist ein Mittelwert aus in vivo Messungen (Neitz et al.1995, Sharpe et al. 1998) und in vitro (Merbs & Nathans, 1992, Asenjo et al., 1994)).

Der andere Grünblinde besaß drei Gene im Rot-Grün-Pigmentgen-Array. Auf das erste Gen L[M2](Ala180) folgt ein M3L4(Ala180)-Hybridgen und ein M(Ala180)-Pigmentgen mit geschätzten maximalen Wellenlängen von 556,9 nm, 551,9 nm, und 529,9 nm. Da es bislang keinen Hinweis darauf gibt, dass mehr als die ersten zwei Gene exprimiert werden, handelt es sich funktionell ebenfalls um einen deuteranopen Probanden. Das Pigment mit einer Wellenlänge bei maximaler Empfindlichkeit von 529,9 nm (ein M-Zapfenpigment) wird nicht exprimiert.

2.2 Durchführung der Untersuchung

Zunächst wurden die Pupillen des Probanden mit 0,5%iger Tropicamidlösung weitgetropft. Zusätzlich bekamen die Probanden ein Lokalanästhetikum in den Bindehautsack eingetroppt, um die Irritation durch die Fadenelektrode und das damit verbundene häufigere Blinzeln zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Anlage der Elektroden.

Die elektrischen Potentiale wurden an der Cornea durch eine DTL-Fadenelektrode abgegriffen, Speicherung und weitere Verarbeitung der Daten wurde mittels des VERIS-Programms durchgeführt (Versionen 3.0.1 und 4.9.1).

Die Referenzelektroden für das rechte und linke Auge wurden in Form von Napfelektroden an beiden Schläfen, die Grundelektrode an der Stirn angebracht.

Die Hautstellen wurden hierzu zunächst mit einer speziellen körnigen Paste mechanisch gereinigt und anschließend mit Alkohol abgewischt, um den Hautwiderstand weitestgehend herabzusetzen. Anschließend wurden die Elektroden mit einer Kontaktpaste aufgeklebt und mittels Klebestreifen fixiert.

Die Reizung der Netzhäute wurde über einen SONY Trinitron Monitor (mit einer Auflösung von 1024 x 768 Punkten) vermittelt. Die spektralen Emissionswerte des Monitors wurden mit einem Compact Array Spectrometer (CAS 140, Instrument Systems, München) gemessen. Die Helligkeit des zapfenisolierenden

Reizes wurde mit Hilfe der spektralen Sensitivität der Zapfen bestimmt. Die Lichtquantenabsorption der Stimuli lagen im Mittel bei $4,46 \log$ Quanten/s/Zapfen für den L-Zapfen isolierenden Reiz und $4,43 \log$ Quanten/s/Zapfen für den M-Zapfen isolierenden Reiz, bei einem Michelson Kontrast von ca. 47%. Für eine detaillierte Berechnung der Zapfenisolationsbedingungen siehe Albrecht, 2005 und Abb. 10.

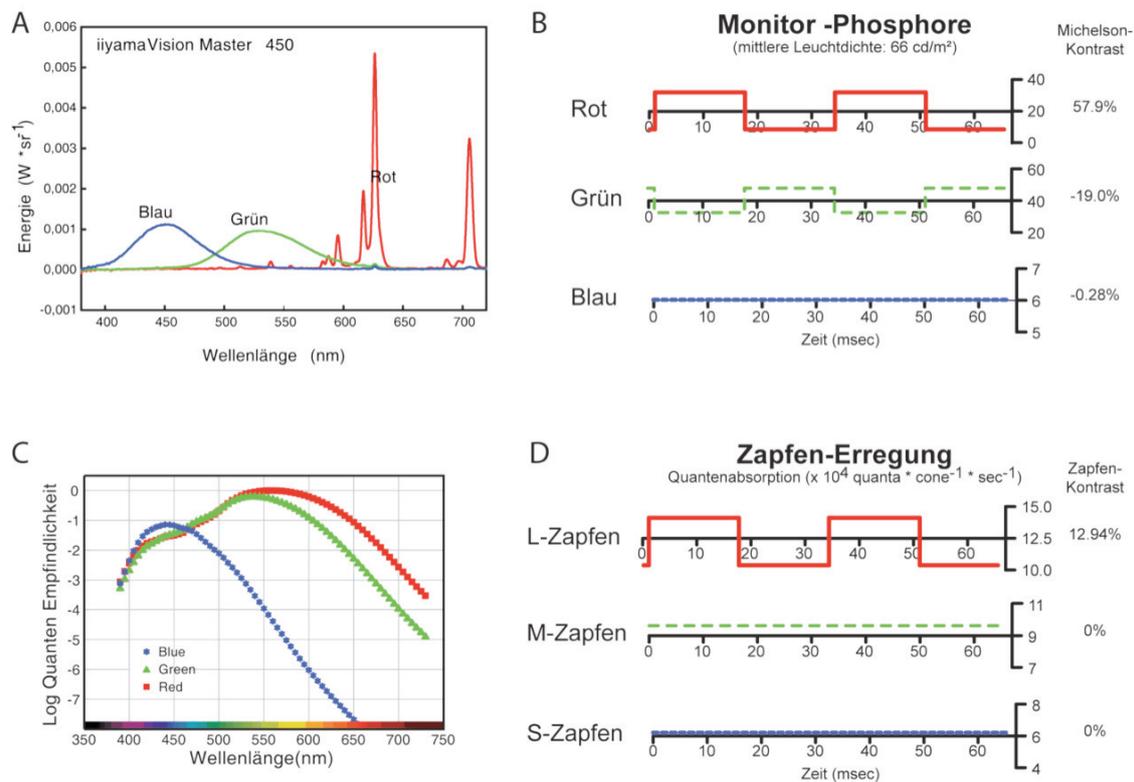


Abb. 10 Prinzip der stillen Substitution (silent substitution)

Für den zur Stimulation verwendeten Monitor wurden die Emissionsspektren der roten, grünen und gelben Phosphore gemessen (A). Diese werden entsprechend zwei definierten Zuständen (B) in einem vorgegebenen Rhythmus der m-Sequenz in ihrer Emission hin- und hergeschaltet. Aufgrund der sich über das gesamte Spektrum erstreckenden spektralen Empfindlichkeit der Photorezeptoren (C) wird von jedem Zapfentyp (Rot-, Grün- und Blauzapfen) in beiden Zuständen eine Erregung erzeugt. Die Erregung ist im gezeigten Beispiel jedoch für die M-Zapfen und L-Zapfen konstant und ändert sich nur für den L-apfen (D). Diese Änderung des Zapfenkontrastes erzeugt ein elektrisches Signal, welches gemessen wird.

Die Stimuli bestanden aus 63 oder 103 sechseckigen Elementen und wurden im Bereich der zentralen 84×75 Grad der Retina projiziert. Um fokale Antworten vergleichbarer Amplitude pro Stimuluselement zu erreichen, wurden die He-

xagone mit steigender Exzentrizität größer, da die Zahl der Zapfen in den peripheren Bereichen der Retina abnimmt. Als Fixationspunkt wurde ein schwachrotes Kreuz in der Mitte der Hexagonanordnung präsentiert. Die Speicherung und weitere Verarbeitung der Daten wurde mittels des VERIS-Systems durchgeführt (Versionen 3.0.1 und 4.9.1).

Aus den mit vorgegebener m-Sequenz abgeleiteten Signalen kann mit einem einfachen Prinzip der Kern erster Ordnung, oder die lineare Antwort, extrahiert werden (Abb. 11). Dabei werden alle von schwarzen Hexagonen hervorgerufenen Signalanteile von den zeitlich korrelierenden Signalanteilen abgezogen, die durch weißen Hexagone verursacht werden, addiert.

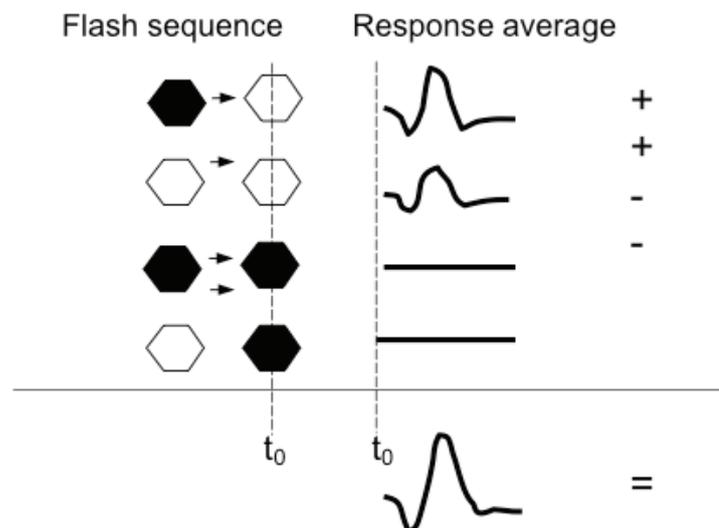


Abb. 11 Veranschaulichung der Extraktion der linearen Antwort aus der multifokalen ERG-Antwort

In der linken Hälfte sind die stimulierten Hexagone in ihrer zeitlich aufeinanderfolgenden Reihe dargestellt. Rechter Hand werden die durch die Sequenz ausgelösten Antwortkurven dargestellt. Ein Signal welches bei weißem Hexagon aufgezeichnet wird, wird addiert, jenes eines schwarzen Hexagons subtrahiert. Ganz unten rechts befindet sich das aus den verschiedenen Antwortkurven errechnete Signal, welches dem ERG des Netzhautortes entspricht.

Um sicherzustellen, dass der Proband während des Versuches nicht den Abstand oder den Blickwinkel zum Bildschirm änderte, musste die jeweilige Person den Kopf auf eine Kinnstütze auflegen und die Stirn ebenfalls an einem

stützenden Halbring anlehnen. Der Abstand zwischen den Augen des Probanden und dem Monitor betrug 18 cm.

2.3 Stimulationsbedingungen

Um die Messungen bei schwarz/weiß-Stimulation durchzuführen, wurde den Probanden ein Gebilde aus 61 Hexagonen präsentiert.

Während der Ableitung des multifokalen ERGs wurden die Sechsecke abwechselnd mit 100 cd/m^2 und $0,2 \text{ cd/m}^2$ gezeigt. Hierbei betrug die umgebende Helligkeit des Raumes etwa 150 cd/m^2 um eine Stäbchenantwort zu unterdrücken. Die Laufzeit für eine multifokale ERG Messung betrug 3,7 min in 16 Abschnitten von jeweils etwa 20 Sekunden. Nach jedem Abschnitt wurden die Rohdaten durch den Untersucher kurz überprüft. Wenn die Aufnahmen zu stark veräuscht waren, wurde der betreffende Abschnitt wiederholt.

Die Ableitung der multifokalen OPs bei schwarz/weiß-Stimulation wurde nach der von Wu & Sutter entwickelten Methode durchgeführt (Wu & Sutter, 1995). Zwischen zwei aufeinander folgenden Stimuli wurden drei schwarze Hexagone gezeigt, um ein Basisintervall für die pseudozufällige Stimulation von 53,33 ms zu schaffen. Die Helligkeit der Sechsecke war hierbei entweder 81 cd/m^2 oder $1,5 \text{ cd/m}^2$, die umgebende Helligkeit des Raumes betrug etwa 20 cd/m^2 .

Sowohl mfERG als auch mfOPs wurden auch unter zapfenisolierenden Bedingungen abgeleitet. Das heißt, die Stimuli waren so gewählt, dass entweder nur die Reaktion der L-Zapfen (Rot-Zapfen) oder die Reaktion der M-Zapfen (Grün-Zapfen) gemessen werden konnte. Hierzu wurde die oben beschriebene Technik der „Silent substitution“ verwendet (Estevez & Spekreijse, 1982; Kremers et al, 1999), die von Albrecht, Jägle, Hood & Sharpe 2002 ausführlich beschrieben wurde.

Zapfenisolierende mfERGs wurden mit 103 Stimuluselementen, sprich einem Gebilde von 103 Hexagonen, mfOPs wurden mit 61 Stimuluselementen gemes-

sen. Die zapfenisolierenden Reize wurden aus der spektralen Emission des Bildschirms und der spektralen Empfindlichkeit der L und M Zapfen berechnet (Stockman & Sharpe, 2000).

Der Stimulus für die L-Zapfen hatte hierbei eine durchschnittliche Leuchtdichte von $19,2 \text{ cd/m}^2$, derjenige der M-Zapfen $33,8 \text{ cd/m}^2$. Dem entspricht eine durchschnittliche Lichtquantenabsorption von ca. $4,46 \log \text{ Quanten/s/Zapfen}$ für die L-Zapfen Stimulation und $4,43 \log \text{ Quanten/s/Zapfen}$ für die M-Zapfen-Stimulation, bei einem Michelson Kontrast von etwa 47% bei beiden Bedingungen.

Die Ergebnisse von mindestens zwei Messungen (abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis) bei einem Probanden wurden für das rechte und das linke Auge getrennt gemittelt. Zur weiteren Analyse wurden die Daten in zwei Bereiche aufgeteilt: Ein zentrales Areal mit etwa 25° Radius, sowie eine periphere Zone im Radius von $25^\circ - 80^\circ$. Hierbei wurden die Signale des Kerns 1. Ordnung berechnet. Die Messergebnisse der farbtüchtigen Probanden (im Folgenden: Trichromaten) wurden für die zentralen und peripheren Areale sowie für das gesamte Feld gemittelt. Um die Signifikanz einer Abweichung der Messungen bei den Dichromaten zu schätzen, wurden die Ergebnisse mit dem Bereich von plus/minus zwei Standardabweichungen ($\pm 2 \text{ Standardabweichungen} = \text{SD}$) der Gruppe der trichromatischen Probanden verglichen. Ergebnisse die außerhalb dieses Bereiches lagen, galten hierbei als signifikant.

2.4 Berechnung des L- zu M-Zapfenverhältnisses

Um das Verhältnis von L- und M-Zapfen abschätzen zu können, wandten wir zwei Methoden an:

Zum einen wurde für die Abschätzung der Verhältnisse die Höhe der Antwortamplituden (N1P1 Amplitude beim mfERG sowie P1 Amplitude bei den mfOPs) auf entsprechende Stimulation herangezogen, wobei sich das Verhältnis von L- zu M-Zapfen als Quotient der Amplitudenhöhen darstellt.

Zum anderen wurde das Verhältnis als Quotient der AUC (area under curve) berechnet, wobei für die Berechnung der AUC das Zeitintervall von 12ms bis 35ms beim mfERG sowie von 20ms - 25ms für die mfOPs unter L-zapfenisolierenden Bedingungen und 23ms - 28ms unter M-zapfenisolierenden Bedingungen herangezogen wurde. Die unterschiedlichen Zeitintervalle bei den mfOPs sind den längeren Gipfelzeiten bis zum Auftreten der Spitze P1 in der Wellenform unter M-zapfenisolierenden Bedingungen geschuldet.

2.5 Statistische Analyse

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit einem nicht-parametrischen Test (van der Waarden Test) unter der Annahme einer Normalverteilung der Fehler und die Unterschiede zwischen äußeren (mfERG) und inneren (mfOPs) Netzhautantworten mit dem Wilcoxon Test berechnet. Sämtliche statistischen Berechnungen wurden mit JMP Version 5.0.1.2 (SAS Institute Inc.) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Findet bereits auf retinaler Ebene eine Aufwertung des M-Zapfen-Signals statt?

3.1.1 Messergebnisse beim mfERG

3.1.1.1 mfERG-Messungen bei schwarz/weißem Stimulus

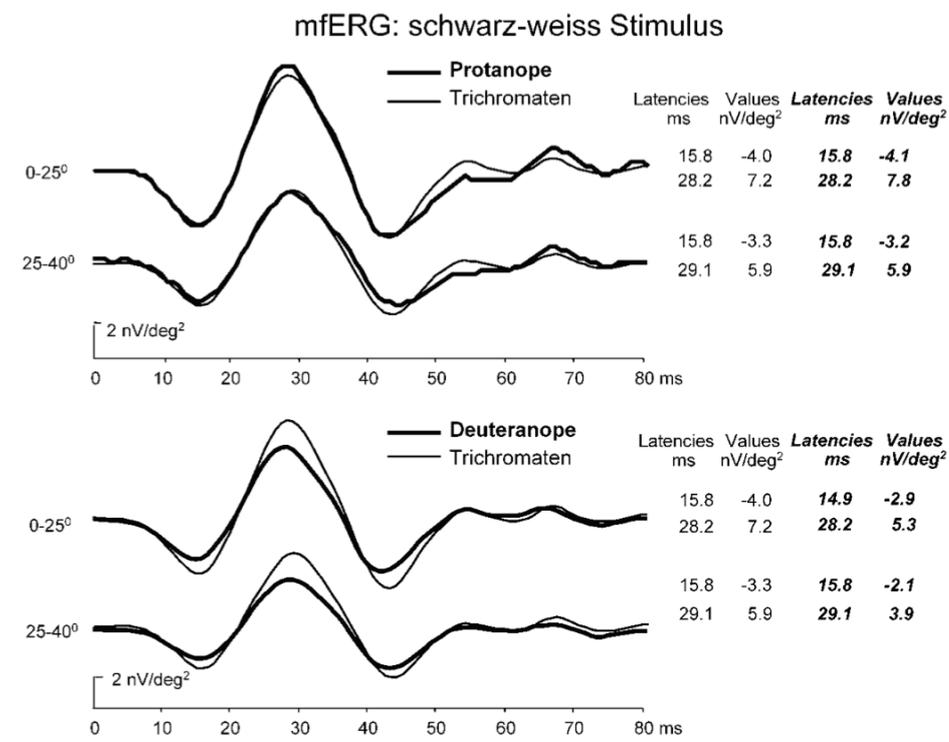


Abb. 12 Gemittelte mfERG Wellenformen, die durch einen schwarz/weißen Stimulus hervorgerufen werden.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deuteranopen und Trichromaten. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen aufgetragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Gezeigt werden hier und in Abbildung 14 die gemittelten Ergebnisse eines zentralen Feldes bis zu einer Ausdehnung von etwa 25° (obere Kurve), sowie die gemittelten Ergebnisse eines Rings von 25-40° Ausdehnung (untere Kurve).

Rechts neben den Kurven sind die Gipfelzeiten und die Amplituden für N1 und P1 aufgeführt.

In der oberen Hälfte der Abbildung 12 werden die Ergebnisse protanoper Probanden (dickere Linien) mit denen der Normalprobanden verglichen, die untere Hälfte zeigt die deuteranopen Probanden (dickere Linien) im Vergleich zu den Normalprobanden.

Beim Vergleich der Gipfelzeiten für N1 und P1 zeigten sich (bei gleichen Stimulationsbedingungen) nur geringfügige Unterschiede ohne signifikante Abweichungen zwischen Tri- und Dichromaten.

Die Unterschiede bei den Amplituden sind hingegen deutlich größer. Zur Berechnung wurde hier die größte Antwortamplitude (P1 minus N1) herangezogen und für jeden Probanden einzeln ermittelt. Die gemittelten Antwortamplituden aus den einzeln errechneten Amplituden jedes Probanden zeigte eine leicht unterschiedliche Größe als die über alle Probanden gemittelten Amplituden.

Im zentralen Feld war die mittlere Differenz zwischen N1 und P1 $11,5 \text{ nV/deg}^2$ (Standardabweichung $2,1 \text{ nV/deg}^2$), für die Umgebung $9,1 \text{ nV/deg}^2$ (SD $2,0 \text{ nV/deg}^2$).

Die Antwortkurven der beiden Protanopen zeigen Differenzen von $12,3 \text{ nV/deg}^2$ und $11,7 \text{ nV/deg}^2$ im Zentrum sowie $11,6 \text{ nV/deg}^2$ und $8,9 \text{ nV/deg}^2$ in der Umgebung.

Beide liegen damit im Bereich ± 2 Standardabweichungen im Vergleich zu den Ergebnissen der Trichromaten, bewegen sich damit also im Rahmen der interindividuellen Variabilität.

Die durchschnittlichen Antworten der deuteranopen Individuen zeigten jedoch reduzierte Antwortamplituden.

Die Ergebnisse des multigenen Deuteranopen zeigten sich 2 SD unterhalb der Amplitudengröße der Trichromaten und sind somit signifikant verändert gegenüber der Kontrollgruppe. Dies ließ sich sowohl für den zentralen Bereich mit $6,8 \text{ nV/deg}^2$, als auch in der Peripherie mit $5,0 \text{ nV/deg}^2$ nachweisen.

Der Einzel-Gen Proband zeigte nur für die Peripherie signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($7,0 \text{ nV/deg}^2$) im Zentrum lag er mit $9,7 \text{ nV/deg}^2$ innerhalb von 2 SD.

3.1.1.2 mfERG Messungen unter zapfenisolierenden Bedingungen

3.1.1.2.1 Überprüfung der Zapfenisoliationsbedingungen

Um die verwendeten Isolationsbedingungen zu überprüfen wurde bei den protanopen und deuteranopen Probanden unter M- und L-Zapfenisolation gemessen. Bei den protanopen Probanden war unter L-Zapfenisoliationsbedingungen keine reproduzierbare Antwort ableitbar (Abb. 13). Entsprechend verhielt es sich bei den deuteranopen Probanden unter M-Zapfenisoliationsbedingungen.

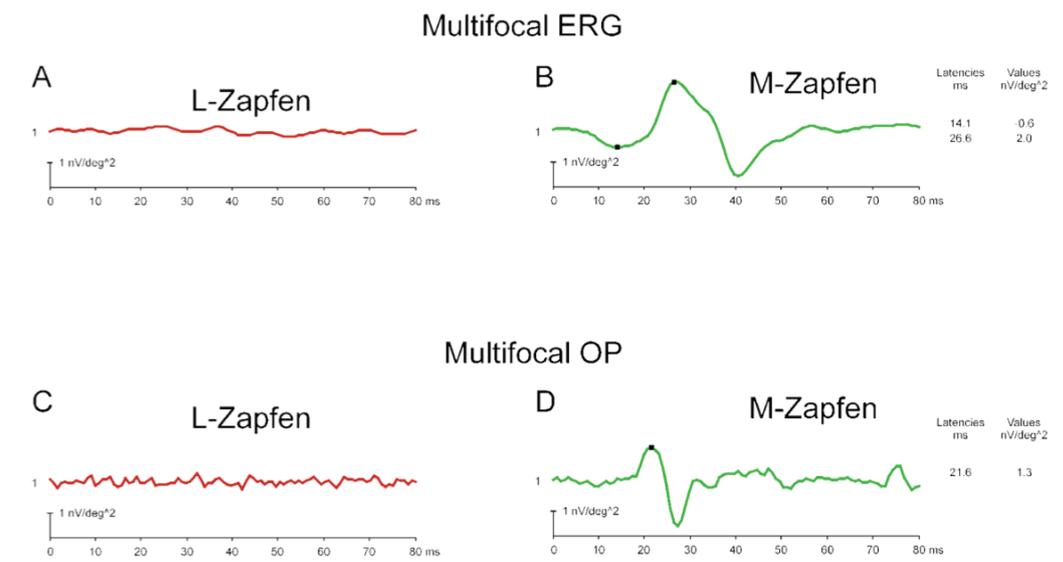


Abb. 13 Zapfenisolierendes mfERG eines protanopen Probanden

Dargestellt sind die Antwortkurven eines protanopen Probanden unter L- und M-Zapfen isolierenden Bedingungen. Es zeigt sich wie erwartet, dass bei diesen Probanden unter L-Zapfen isolierenden Bedingungen keine vom Rauschen unterscheidbaren Signale auftreten.

3.1.1.2.2 Isolation der M- und L-Zapfen

Wird das mfERG unter Bedingungen zur Isolation der M-Zapfen abgeleitet, so unterscheiden sich die Antwortkurven der Protanopen deutlich von denen der

Normalprobanden (Abb. 14). Der Vergleich der Gipfelzeiten bei den einzelnen Individuen zeigt auch hier keine signifikanten Unterschiede, doch schon auf den ersten Blick sind die Amplituden bei den protanopen Probanden deutlich größer. Die durchschnittliche Amplitudenhöhe bei den Trichromaten ist nur 1,1 nV/deg² im Zentrum (SD 0,2) und 0,6 nV/deg² (SD 0,2) in der Peripherie. Bei den Protanopen hingegen 3,3 nV/deg² und 3,8 nV/deg² im zentralen Bereich und 2,5 nV/deg² bzw. 2,6 nV/deg² in der Umgebung.

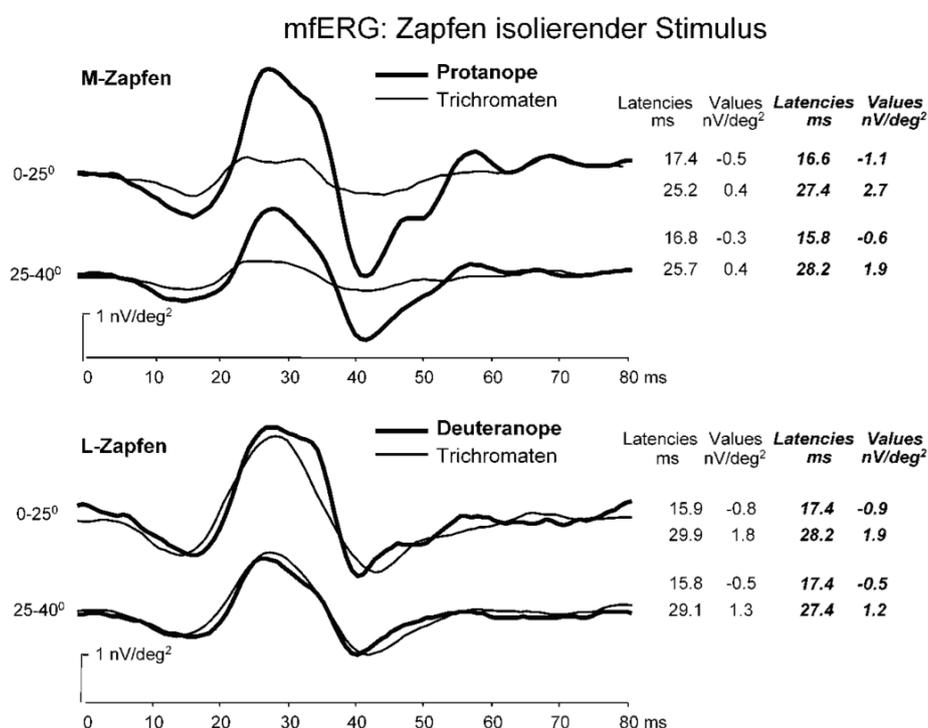


Abb. 14 Gemittelte mfERG Kurven unter zapfenisolierenden Bedingungen

Im oberen Teil der Abbildung ist die Antwortkurve unter M-Zapfen isolierenden Bedingungen für Protanope und Trichromaten aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Antwortkurve von Deuteranopen und Trichromaten unter L-Zapfen isolierenden Bedingungen. Die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen für N1 und P1 sind rechter Hand aufgeführt, wobei sich die kursiv gedruckten Zahlen auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden beziehen.

Abb. 14 zeigt auch einen Vergleich der Kurven von Deuteranopen und Trichromaten unter L-Zapfen-Isolationsbedingungen. Die Amplitude ist sehr ähnlich, d.h. ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Probandengruppen. Betrachtet man hingegen die individuellen Antwortamplituden der Dichromaten,

sieht man deutliche Unterschiede sowohl für den zentralen Bereich: bei Trichromaten mit $2,8 \text{ nV/deg}^2$ (SD 0.7), Einzel-Gen Dichromaten mit $3,6 \text{ nV/deg}^2$ und bei dem multigenen Dichromaten $2,4 \text{ nV/deg}^2$, als auch für die Peripherie: Trichromaten $1,9 \text{ nV/deg}^2$ (SD 0,5) Einzel-Gen Deuteranopen $2,3 \text{ nV/deg}^2$ und bei dem multigenen Deuteranopen $1,1 \text{ nV/deg}^2$.

Die Messergebnisse mit L-Zapfen isolierendem Stimulus bei den Protanopen sowie die Messergebnisse mit M-Zapfen isolierendem Stimulus bei den Deuteranopen waren nicht von Rauschen zu unterscheiden.

3.1.2 Messergebnisse bei den OPs

3.1.2.1 mfOP-Messungen bei s/w Stimulus

Die Mittelung der bei schwarz/weiß-Stimulation abgeleiteten multifokalen oszillatorischen Potentiale (mfOPs) zeigen eine sehr ähnliche Wellenform: In allen Messungen tauchen zwei Potentiale auf (Abb. 15). Auch bei diesen Ableitungen ergaben sich keine signifikanten Abweichungen in der Gipfelzeit, weder bei den Deuteranopen noch bei den Protanopen im Verhältnis zu Normalprobanden.

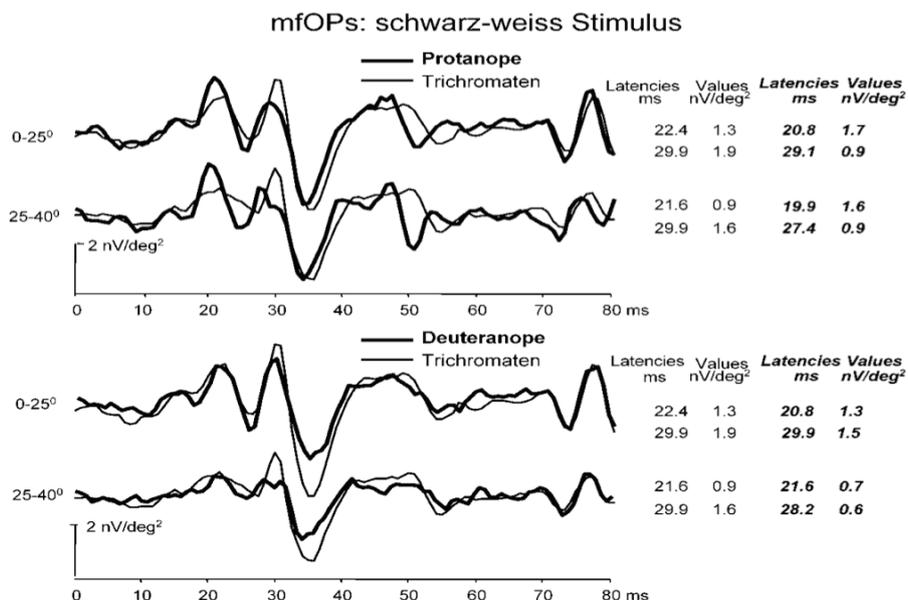


Abb. 15 Gemittelte mfOP-Antwortkurven bei schwarz/weißem Stimulus

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deuteranopen und Trichromaten. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen aufgetragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Die mittlere Amplitude der zwei Potentiale bei den Trichromaten beträgt 1,4 nV/deg² (SD 0,4 nV/deg²) und 2,6 nV/deg² (SD 0,9 nV/deg²) im Zentrum, sowie 1,0 nV/deg² (SD 0,2 nV/deg²) und 2,1 nV/deg² (SD 1,0 nV/deg²) in der Umgebung.

Die Amplituden beider Potentiale waren bei den zwei protanopen Probanden sowohl für den zentralen als auch für den peripheren Bereich innerhalb von +/- 2 SD im Vergleich zu den gemittelten Amplitudenhöhen der Trichromaten (d.h. die Abweichungen lagen wiederum im Rahmen der interindividuellen Variabilität) s. Tabelle 1.

Proband	Genotyp	P1 (zentral)	P2 (zentral)	P1 (peripher)	P2 (peripher)
Protanop 1	single-gene	2,2 nV/deg ²	1,3 nV/deg ²	2,0 nV/deg ²	1,7 nV/deg ²
Protanop 2	single-gene	1,3 nV/deg ²	1,3 nV/deg ²	1,3 nV/deg ²	1,4 nV/deg ²
Trichromaten		1,4 nV/deg ²	2,6 nV/deg ²	1,0 nV/deg ²	2,1 nV/deg ²

Tabelle 1 Vergleich der mfOP Amplitudenhöhen bei Protanopen und Trichromaten

Ebenso verhält es sich bei den deuteranopen Probanden. Auch bei Ihnen gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den trichromatischen Probanden (s. Tabelle 2).

Proband	Genotyp	P1 (zentral)	P2 (zentral)	P1 (peripher)	P2 (peripher)
Deuteranop 1	single-gene	1,6 nV/deg ²	2,4 nV/deg ²	0,7 nV/deg ²	1,7 nV/deg ²
Deuteranop 2	multigen	1,1 nV/deg ²	1,3 nV/deg ²	0,9 nV/deg ²	1,1 nV/deg ²
Trichromaten		1,4 nV/deg ²	2,6 nV/deg ²	1,0 nV/deg ²	2,1 nV/deg ²

Tabelle 2 Vergleich der mfOP Amplitudenhöhen bei Deuteranopen und Trichromaten

3.1.2.2 Ergebnisse der Messungen bei zapfenisolierendem Stimulus

Betrachtet man die OP-Kurven unter zapfenisolierenden Bedingungen, zeigen sich plötzlich Wellenformen mit nur einem Potential (Abb. 15).

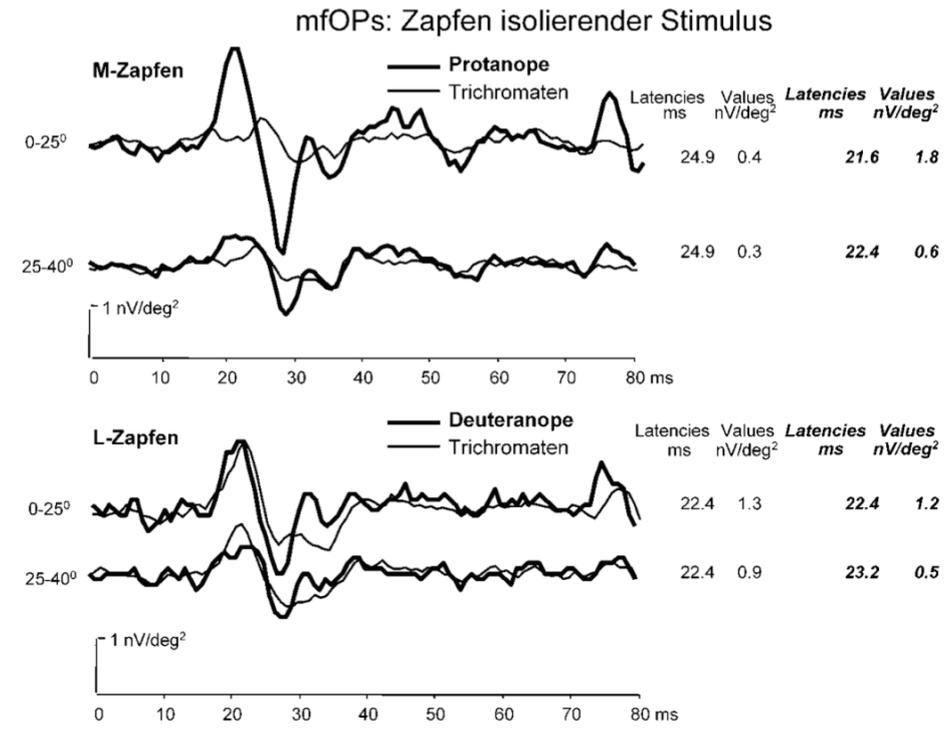


Abb. 16 Gemittelte mfOP-Antwortkurven unter zapfenisolierenden Bedingungen

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten unter M-Zapfenisolation aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deuteranopen und Trichromaten unter L-Zapfenisolation. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen aufgetragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Die individuellen Wellenformen unter M-Zapfenisolation weichen teils deutlich von der gemittelten Wellenform ab. Vier der Probanden hatten einen Gipfel bei 22.5 ms (SD 0,2) mit einer durchschnittlichen Amplitudenhöhe von 0,7 nV/deg² (SD 0,2 nV/deg²) im Zentrum. Die sechs anderen Trichromaten hatten hingegen ein Potential bei 25,5 ms (SD 0,3 nV/deg²) mit einer Amplitudenhöhe von durchschnittlich 0,8 nV/deg².

Bei der Messung der durch L-Zapfen Aktivität hervorgerufenen mfOPs verhält es sich analog zu den Messungen bei den M-Zapfen. Auch hier zeigt sich bei den Ergebnissen der Trichromaten nur ein Potential mit einer Amplitudenhöhe von $1,3 \text{ nV/deg}^2$ (SD $0,3 \text{ nV/deg}^2$) zentral und einer Amplitudenhöhe von $0,9 \text{ nV/deg}^2$ (SD $0,2 \text{ nV/deg}^2$) peripher.

Bei den dichromatischen Probanden war eine herausragende Wellenform zu beobachten, welche in den meisten Fällen jedoch eine deutlich höhere Amplitude als bei den Normalpersonen besaß. Bei den protanopen Individuen zeigten sich unter M-Zapfen isolierenden Bedingungen Amplitudenhöhen von $1,9 \text{ nV/deg}^2$ und $1,7 \text{ nV/deg}^2$ im Zentrum, sowie $0,9 \text{ nV/deg}^2$ und $1,2 \text{ nV/deg}^2$ in der Peripherie.

Wie zuvor unterschieden sich die Amplitudenhöhen der deuteranopen Probanden je nach Genotyp deutlich mehr voneinander als bei den Protanopen. Der Proband mit dem Einzel-Gen Defekt zeigte deutlich höhere Amplituden mit $1,9 \text{ nV/deg}^2$ zentral und $0,8 \text{ nV/deg}^2$ peripher gegenüber dem Probanden mit dem multigenen Defekt $0,8 \text{ nV/deg}^2$ zentral und $0,3 \text{ nV/deg}^2$ peripher.

Bemerkenswert hierbei ist, dass die Amplituden des multigenen Individuums denen der Trichromaten glichen, wohingegen die Amplituden des Einzel-Gen Individuums denen der (ebenfalls Einzel-Gen) protanopen Probanden ähnelten.

Erwartungsgemäß waren wie bei den mfERG-Messungen die Antworten der Dichromaten bei isolierender Messung ihrer fehlenden Zapfen nicht vom Grundrauschen zu unterscheiden.

3.2 Was sind die Ursachen für das höhere L/M-Verhältnis bei männlichen Individuen?

Für diese Fragestellung wurde zunächst das Summensignal für die gesamte Netzhaut berechnet. Dann wurden die Ergebnisse aller Trichromaten gruppenweise gemittelt.

3.2.1 Änderungen der Wellenform durch die Reizbedingungen

In Abbildung 16 sind der Durchschnitt der Wellenform der Messergebnisse aller 14 trichromatischen Probanden unter L- und M-Zapfenisolation zu sehen. Auf der linken Seite sind die Kurven des mfERG unter L- und M-Zapfenkonditionen abgebildet. Die rechte Seite zeigt die gemittelten Kurven der mfOPs unter L- und M-Zapfen isolierenden Bedingungen.

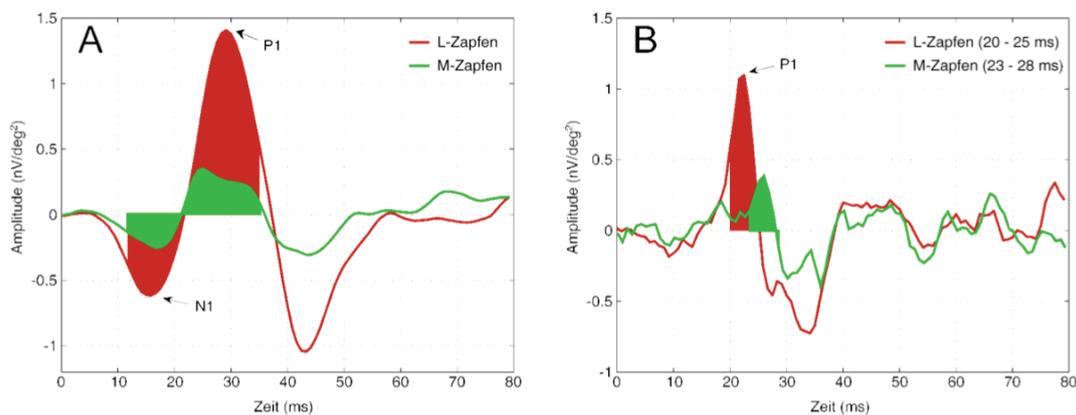


Abb. 17 Gemittelte Antwortkurven von mfERG (links) und mfOPs (rechts) unter zapfenisolierenden Bedingungen mit eingezeichneter AUC

Die Antwortkurven wurden über alle Hexagone und sämtliche Trichromaten gemittelt. Die AUC wurde für ein Intervall zwischen 12 und 35 ms bei den mfERG Antwortkurven und für 20-25 ms (L-Zapfenisolation) bzw. 23-28 ms (M-Zapfenisolation) bei den Antwortkurven der mfOPs berechnet.

Unterschiede zeigen sich zunächst vor allem in der Gipfelzeit. Während beim mfERG bei L- und M-Zapfenisolation zum gleichen Zeitpunkt ein Gipfel entsteht, sieht man bei den mfOPs einen früheren Gipfel bei L-Zapfenisolation.

Weiterhin ist die Stärke des Signals auf einen Reiz unterschiedlich. Die mittlere N1P1 Antwortamplitude des mfERG war bei den M-Zapfen deutlich kleiner als bei den L-Zapfen (M Zapfen: $0,69 \pm 0,24$ nV/deg² zu $2,11 \pm 0,55$ nV/deg² bei den L-Zapfen, $p < 0,0001$). Ebenso verhält es sich mit den Antwortamplituden von N1 bei den mfOPs (M-Zapfen: $0,44 \pm 0,16$ nV/deg² und $0,91 \pm 0,28$ nV/deg² bei den L-Zapfen, $p < 0,0001$).

Zur weiteren Analyse untersuchten wir auch die individuellen N1P1 bzw. N1 Amplituden.

Wie erwartet war der Durchschnitt der einzeln gemessenen Werte dem der Werte aus der kombinierten Kurve aller Werte sehr ähnlich. Beim mfERG war sie bei L-Zapfenisolation 2,15 nV/deg², bei M-Zapfenisolation 0,65 nV/deg². Bei allen Personen war die L-Zapfenantwort deutlich größer als die der M-Zapfen.

Gleichermaßen verhielt es sich mit den Antwortamplituden der mfOPs. Bei L-Zapfenisolation betrug die Amplitude 1,10 nV/deg²; bei M-Zapfenisolation 0,35 nV/deg²; auch hier war die L-Zapfenantwort bei allen Individuen die größere.

3.2.2 Berechnungen des L- zu M- Zapfenverhältnisses

Um das relative Verhältnis der L- und M-Zapfen (L/M-Verhältnis) zu berechnen wurden zwei Verfahren zur Analyse durchgeführt und verglichen. Zuerst wurde, wie im ersten Teil dieser Arbeit, die Amplitudenhöhe der bei L- bzw. M-Zapfenisolation durchgeführten mfERG zur Berechnung der Verhältnisse herangezogen. (Kurtenbach, Heine, Jägle 2004; Kremers, School, Knau, Berendschot, Usui & Sharpe, 2002; Jacobs & Neitz, 1991).

Für den gesamten stimulierten Bereich war das mittlere L/M – Verhältnis (berechnet aus den individuellen Antwortamplituden) 3,36 nV/deg² +/- 1,2 nV/deg². Das L/M- Verhältnis aus der kombinierten Antwortkurve war 3,31 nV/deg² und somit nahezu identisch.

Die zweite Möglichkeit, die Stärke des Antwortsignals zu messen, besteht in der Berechnung der AUC (Fläche unter der Kurve = area under curve). Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringeren Anfälligkeit für durch Signalrauschen bedingte Fehler.

Die AUC wurde für die Ableitungen bei L-Zapfenisolation sowie für die Ableitung bei M-Zapfenisolation als deren Quotient (AUC-L-Zapfenisolation / AUC-M-Zapfenisolation) berechnet.

Auch hierbei wurde das AUC basierte L/M-Zapfenverhältnis aus den Einzelwerten des mfERG (3,75 nV/deg² +/- 1,66 nV/deg²), sowie aus der kombinierten

Kurve berechnet ($3,47 \text{ nV/deg}^2$). Wieder lagen die Ergebnisse der Berechnungen sehr nahe beieinander.

3.2.2.1 Vergleich der unterschiedlichen Berechnungsarten

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der aus den mfERG-Messungen berechneten L/M-Verhältnisse ($R^2 = 0,83$, $p < 0,0001$; siehe Abb. 17A). Daraus lässt sich schließen, dass die Berechnung mittels der Amplitudenhöhe in unserer Studie nicht signifikant durch Rauschen gestört wurde.

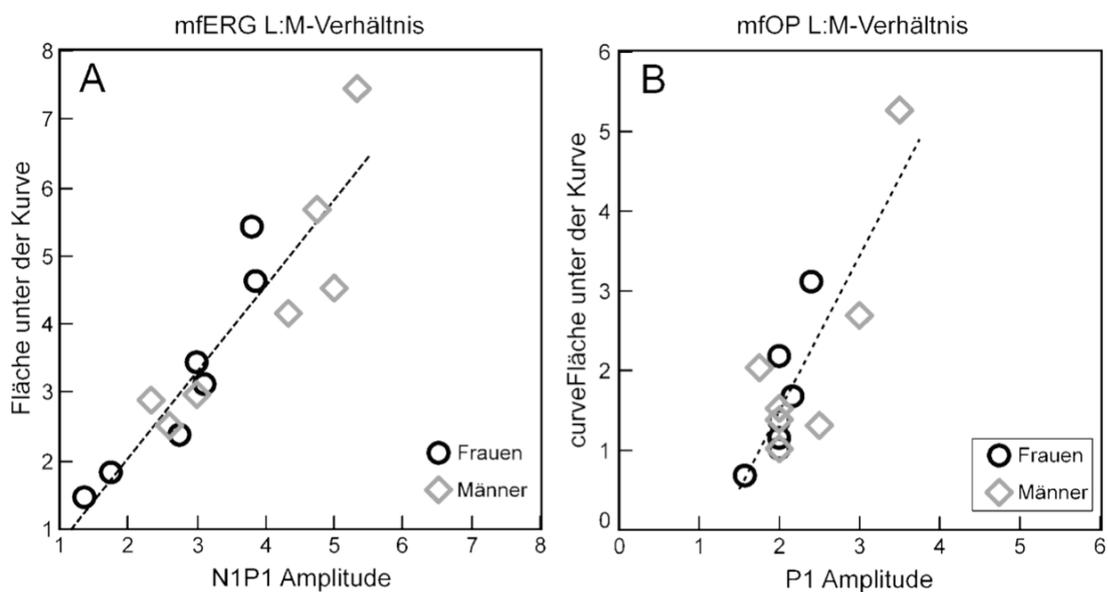


Abb. 18 Korrelation der beiden Verfahren zur Bestimmung der L/M-Verhältnisse

Die Korrelation zwischen den Amplituden basierten und den AUC basierten L/M-Verhältnisse zeigt eine signifikante Korrelation für die mfERGs. Die Männer und Frauen sind durch unterschiedliche Symbole identifiziert. Die gestrichelte Linie zeigt die Gerade, die sich am besten durch die Ergebnisse aller 14 Probanden legen lässt.

Nimmt man eine in etwa lineare Abhängigkeit zwischen der Antwortamplitude P1 der mfOPs und der Aktivität der inneren Netzhautschichten an, lässt sich auch eine Schätzung des durch L- und M-Zapfen generierten Signals anhand der Amplitudenhöhe von P1 vornehmen (Kurtenbach, Heine, Jägle 2004).

Der Mittelwert der individuellen Schätzung der L/M-Signalverhältnisse aus den mfOP-Messungen war $2,21 \pm 0,51$.

Auch hier wurde das L/M-Verhältnis zusätzlich aus den AUCs der L- und M-Kurven berechnet. Der Mittelwert der berechneten L/M-Verhältnisse der individuellen Ableitungen war hierbei $1,89 \pm 1,18$, bei der Berechnung aus der kombinierten Antwort war das Verhältnis $2,12$.

Die Korrelation der beiden Schätzungen zeigt ebenfalls eine lineare Beziehung mit hoher Signifikanz zwischen den auf AUC-Basis und den auf der Basis der Amplitudenhöhe berechneten Werten: $R^2 = 0,70$, $p = 0,0002$ (siehe Abb. 17B).

Einige Probanden zeigen jedoch AUC basierte L/M-Verhältnisse in einem Bereich von 1 bis 2,2, wohingegen ihr L/M-Verhältnis bei amplitudenbasierter Berechnung bei etwa 2,0 liegt. Dieses Phänomen erklärt sich am ehesten durch die sehr kleinen Antwortamplituden und die geringe Auflösung der Amplituden ($0,1 \text{ nV/deg}^2$) bei der Berechnung des Verhältnisses auf Basis der Amplitudenhöhe.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim mfERG sind die Antwortamplituden hier noch wesentlich kleiner, so dass die Messung störanfälliger für Artefakte bzw. Rauschen ist.

Obwohl das L/M-Verhältnis bei den mfOPs signifikant niedriger ausfiel als das beim mfERG bestimmte Verhältnis ($p = 0,003$ und $0,01$ für die Amplitudenhöhe bzw. die AUC Berechnung), konnte weder für die Berechnung des L/M-Verhältnisses aus der Amplitudenhöhe noch für die Berechnung mittels der AUC eine signifikante Korrelation zwischen den Antworten aus den äußeren (mfERG) und den inneren Retinaschichten (mfOPs), nachgewiesen werden.

3.2.3 Geschlechtsabhängige Unterschiede im L/M-Verhältnis

Sowohl bei Männern als auch bei Frauen sind die L/M-Verhältnisse aus den mfOP-Messungen kleiner als bei den mfERG-Messungen und die paarweise Korrelation zwischen mfERG und mfOP ist bei der AUC-Analyse signifikant für beide Geschlechter (Männer $p = 0,05$; Frauen $p = 0,03$). Bei den Männern besteht zusätzlich eine signifikante Korrelation zwischen den L/M-Verhältnissen

aus mfERG und mfOP die mittels der Amplitudenhöhe errechnet wurden ($p = 0,02$).

	Isolation der L-Zapfen Amplitudenhöhe (nV/deg ²)		Isolation der M-Zapfen Amplitudenhöhe (nV/deg ²)	
	gemittelt	kombiniert	gemittelt	kombiniert
Multifokales ERG (mfERG)				
Weiblich	2.09 ± 0.54	2.1	0.79 ± 0.19	0.7
Männlich	2.14 ± 0.60	2.2	0.60 ± 0.26	0.6
Multifokales OP (mfOP)				
Weiblich	1.00 ± 0.26	1.1	0.50 ± 0.14	0.4
Männlich	0.83 ± 0.29	1.1	0.37 ± 0.17	0.3

Tabelle 3: Amplituden der mfERG und mfOP Antworten auf L- und M-Zapfen isolierende Reize. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der individuellen Amplituden oder die aus den Wellenformen aller zugehörigen Probanden gemittelte Amplitude und beruhen auf der Antwortamplituden von N1P1 (beim mfERG) oder der Antwortamplitude von P1 (bei den mfOPs)

	Amplitudenhöhe		AUC	
	gemittelt	kombiniert	gemittelt	kombiniert
Multifokales ERG (mfERG)				
Weiblich	2.80 ± 0.95	3.00	3.19 ± 1.45	3.31
Männlich	3.91 ± 1.23	3.67	4.31 ± 1.77	4.00
Multifokales OP (mfOP)				
Weiblich	2.02 ± 0.25	2.75	1.60 ± 0.82	1.89
Männlich	2.39 ± 0.64	3.67	2.18 ± 1.47	3.00

Tabelle 4: Geschätzte L/M-Zapfen-Verhältnisse aus mfERG bzw. mfOP Antwortkurven unter zapfenisolierenden Bedingungen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der individuellen Amplituden oder die aus den Wellenformen aller zugehörigen Probanden gemittelte Amplitude und beruhen auf den Antwortamplituden von N1P1 (beim mfERG) oder den Antwortamplituden von P1 (bei den mfOPs)

Die aus mfERG und mfOPs geschätzten L/M-Verhältnisse sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Die individuellen und die gemittelten Werte unterscheiden sich beim mfERG kaum. Darüber hinaus sind die durch die verschiedenen Berechnungen (AUC und Amplitudenhöhe) ermittelten L/M-Verhältnisse ebenfalls sehr ähnlich. Obwohl die L/M-Verhältnisse für die mfERGs bei den Frauen generell niedriger als beim männlichen Geschlecht liegen, ließ sich hier keine Signifikanz nachweisen ($p = 0,08$) (siehe auch Abb. 19B). Weiter zeigen sich nicht signifikant kleinere L/M Verhältnisse bei Frauen für mfOPs.

Im Vergleich zu den mfERG basierten Berechnungen unterscheiden sich die Werte der aus AUC und Amplitudenhöhe gewonnenen Verhältnisse bei den mfOPs deutlicher. Bei der Berechnung mittels Amplitudenhöhe zeigt sich der Durchschnittswert der kombinierten Kurve deutlich höher als der aus den Einzelergebnissen gemittelte Wert. Diese höhere Variabilität kommt durch die kleineren Amplituden bei der mfOP-Messung zustande und zeigt sich in den Antworten aller Probanden.

3.2.3.2 Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Amplitude

Bei beiden Geschlechtern sind die aus den individuellen Werten des mfERG gewonnenen Ergebnisse den gemittelten Ergebnissen sehr ähnlich.

Auffällig ist, dass die mfERG Antwort auf L-Zapfen isolierende Reize bei den Frauen niedriger war ($2,09 \pm 0,54 \text{ nV/deg}^2$) als bei den Männern ($2,14 \pm 0,60 \text{ nV/deg}^2$). Umgekehrt lagen jedoch die Werte bei der M-Zapfen isolierenden mfERG-Messung bei den Männern niedriger ($0,60 \pm 0,26 \text{ nV/deg}^2$) als bei den Frauen ($0,79 \pm 0,09 \text{ nV/deg}^2$).

Rechnet man die Summe aus L- und M-Zapfen-Stimulation als Maß für die elektrische Antwort der gesamten Netzhaut, zeigt sich, dass die Frauen etwas höhere Antwortamplituden haben (Abb. 19A). Der durchschnittliche Amplitudenhöhen-Unterschied zwischen Männern und Frauen war jedoch mit $0,13 \text{ nV/deg}^2$ nicht signifikant.

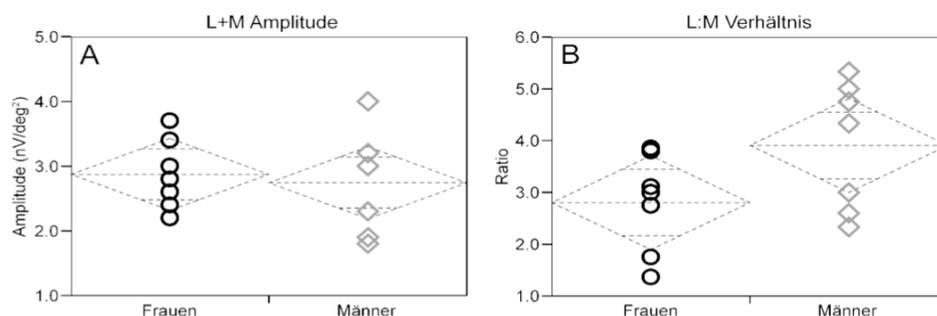


Abb. 19 Geschlechtsabhängige Unterschiede in der L+M-Amplitude und dem L/M-Verhältnis bei mfERG-Ableitungen

Vergleich der durch Addition der L-Zapfen- und der M-Zapfen-Amplituden berechneten Gesamtantwortamplitude (A) und der L/M-Verhältnisse (B). Bei gleicher Gesamtamplitude zeigt sich ein deutlich unterschiedliches L/M-Verhältnis.

Interessanterweise sind bei mfOPs die Antworten auf L-Zapfen isolierende Reize bei den Frauen nur in der individuellen Berechnung höher als bei den Männern, die Berechnung aus der kombinierten Wellenform ergibt für Männer und Frauen denselben Wert.

Die Antwortamplituden der weiblichen Probanden waren bei den mfOP-Messungen für beide Zapfentypen größer als bei den männlichen Probanden (L-Zapfenisolation: $1,00 \pm 0,26 \text{ nV/deg}^2$ zu $0,83 \pm 0,29 \text{ nV/deg}^2$; M-Zapfenisolation: $0,5 \pm 0,14 \text{ nV/deg}^2$ zu $0,37 \pm 0,17 \text{ nV/deg}^2$). Auch hier war der Unterschied in der L+M-Antwortamplitude mit $0,30 \text{ nV/deg}^2$ nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1 Verändert sich die Gewichtung der L- und M- Zapfen bereits auf retinaler Ebene? Findet bereits auf retinaler Ebene eine Aufwertung des M-Zapfen-Signals statt?

Wählt man einen schwarz/weißen Stimulationsmodus, so zeigt die initiale negative Welle N1 des mfERGs hauptsächlich die Aktivität der Photorezeptoren und die Signale der Off-Bipolar-Zellen an. Die positive Welle P1 hingegen zeigt die Antwort von On- und Off-Bipolarzellen.

Dagegen nimmt man an, dass die beiden oszillatorischen Potentiale durch Interaktionen zwischen den Zapfen sowie durch Interaktionen zwischen Stäbchen und Zapfen hervorgerufen werden (Wu & Sutter, 1995).

Dabei zeigt sich, dass sich die mfOP Amplituden bei Tri- und Dichromaten stark ähneln, so dass eine Interaktion zwischen L- und M-Zapfen keine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Amplituden zu spielen scheint.

Da jedoch der schwarz/weiße Stimulationsmodus die L- und M-Zapfen in unterschiedlichem Masse aktiviert, wurden zusätzlich Messungen unter zapfenisolierenden Bedingungen vorgenommen, um Hinweise auf ihr Verhältnis zu bekommen. Der Stimulus war dabei so berechnet, dass beide Rezeptortypen einer gleichen Menge an Lichtquanten ausgesetzt waren.

Eine lineare Beziehung zwischen der Antwortamplitude und der Stärke des gewählten Stimulus wurde von Albrecht et al. 2002 beschrieben. Die von uns verwendete Methode erlaubt daher bei gleichbleibenden Stimulationsbedingungen eine Aussage über die relative Anzahl der Rezeptoren, die zu einer Antwort beitragen.

Die bestimmten L/M-Verhältnisse als Mass für die relative Anzahl der L- und M-Zapfen liegen innerhalb der großen Variationsbreite des L- zu M- Verhältnisses, welche in anderen Studien gefunden wurde, in denen Ergebnisse von 0,6 bis 12 berichtet wurden (Vries, 1946; Jacobs & Neitz, 1991; Kremer et al. 2000; Pokorny & Smith 1987; Jacobs & Neitz, 1991; Kremers et al. 2000; Carrol et al.

2000; Hagstrom et al. 1998; Deeb et al. 2000). Darüber hinaus passen sie auch zu den von Albrecht et al. 2002 geschätzten Werten, die mit derselben Methode wie hier verwendet ein mittleres Verhältnis von 2,19 (SD 1,43) der N1P1 Amplituden herausfanden.

Für die Ableitung der oszillatorischen multifokalen Potentiale (mfOPs) liegen bislang keine Werte in der Literatur vor. Weiter liegen bislang keine Schätzungen der relativen Signalbeiträge der durch die L- und M-Zapfen generierten Signale vor. In unserer Studie fanden wir heraus, dass die Wellenformen bei Dichromaten sich bei L- bzw. M-Zapfen-generierten mfOP Signalen des Kerns 1. Ordnung, d.h. des linearen Anteils stark ähnelten. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass die Antwortsignale des 1. Kerns mit den hauptsächlich durch Zapfen generierten Signalen der inneren Netzhaut korrelieren.

Daher könnte das durch die mfOP Amplituden von L- und M-Zapfen errechnete Verhältnis der Antwortsignale des Kerns 1. Ordnung ein Hinweis auf die Signalstärke der Weiterverarbeitung der Zapfensignale in den inneren Netzhautschichten sein.

Wu und Sutter (1995) zeichneten mfOPs bei steigender Intensität des Stimulus auf und schlossen aus den Ergebnissen, dass die Antwortsignale des Kerns 1. Ordnung vor allem von Zapfenbahnen oder Interaktionen zwischen den Zapfen bestimmt werden.

In dieser Studie sind die mfOP Amplituden bei einem schwarz/weiß Stimulus bei Tri- und Dichromaten sehr ähnlich, so dass eine Interaktion zwischen L- und M-Zapfen keine wesentliche Rolle bei Entstehung der Amplituden zu spielen scheint.

Des Weiteren erlaubt die verwendete Methode auch eine Aussage über die relative Anzahl der Rezeptoren, die zu einer Antwort beitragen: Die Signale beziehen sich auf das Summenpotential aller Rezeptoren, die Steigung der Amplitude mit zunehmender Intensität ist für L- und M-Zapfen gleich und das berechnete Verhältnis der L- und M-Zapfen bleibt bei verschiedenen Kontrasten konstant (Albrecht et al. 2002). Die Kurvenformen der zapfenisolierenden Messungen bei den Trichromaten sind für L- und M- Zapfen zwar ähnlich, aber nicht

gleich, so dass möglicherweise noch andere Effekte die Ergebnisse zu einem kleinen Teil beeinflussen.

Für jeden Probanden wurde der Durchschnitt der verschiedenen Messungen unter L- und M-Zapfenkonditionen getrennt ermittelt. Der Mittelwert (aus L+M Antworten) aller trichromatischen Probanden ergab eine Amplitude von $3,8 \text{ nV/deg}^2$ (SD $0,8 \text{ nV/deg}^2$) innerhalb der zentralen 25 Grad und $2,5 \text{ nV/deg}^2$ für die Peripherie. Die Ergebnisse der beiden protanopen Probanden lagen innerhalb des Bereichs der Ergebnisse der Trichromaten mit $3,3 \text{ nV/deg}^2$ und $3,8 \text{ nV/deg}^2$ im Zentrum und $1,9 \text{ nV/deg}^2$ beziehungsweise $2,0 \text{ nV/deg}^2$ in der Peripherie.

Dies lässt vermuten, dass die L- und M- Zapfenantworten sich bei den Trichromaten summieren, wohingegen bei den Protanopen die fehlenden L- durch M-Zapfen Pigmente ersetzt werden.

Die Amplituden der L-Zapfenantwort bei den deuteranopen Probanden betragen $2,4 \text{ nV/deg}^2$ und $1,8 \text{ nV/deg}^2$ im Zentrum und $2,3 \text{ nV/deg}^2$ beziehungsweise $1,1 \text{ nV/deg}^2$ in der Peripherie. In diesem Fall zeigt nur der Einzel-Gen Deuteranope eine Wellenform mit Amplituden, die denen der protanopen und dem gemittelten Ergebnis aus L+M Antworten der trichromatischen Probanden ähnelt. Die Ergebnisse des multigenen Deuteranopen zeigen hingegen deutlich reduzierte Amplituden. Diese Befunde wären mit einer erniedrigten Gesamtzahl an Zapfen, bzw. mit der fehlenden Ersetzung des Pigmentes in einem Teil der Zapfen vereinbar.

Wie bei den mfERG Messungen wurden die Amplituden der unter zapfenisolierenden Bedingungen durchgeführten mfOPs bei den Trichromaten addiert. Der Durchschnitt von L+M-Zapfen Aktivität beträgt $2,0 \text{ nV/deg}^2$ (SD $0,5 \text{ nV/deg}^2$) im zentralen Bereich der Netzhaut und $1,4 \text{ nV/deg}^2$ (SD $0,3 \text{ nV/deg}^2$) in der Peripherie. Die Messungen der beiden Protanopen zeigen Amplitudenwerte von $1,9 \text{ nV/deg}^2$ und $1,7 \text{ nV/deg}^2$ zentral und $0,9 \text{ nV/deg}^2$ beziehungsweise $1,2 \text{ nV/deg}^2$ in der Umgebung. Wie bei den mfERG Messungen sind diese Amplituden vergleichbar mit den Amplitudenantworten von L+M-Zapfen der Trichromaten.

Ebenso liegen nur die Messergebnisse des Einzel-Gen Deuteranopen innerhalb des Messbereichs der Trichromaten (1,9 nV/deg² im Zentrum und 0,8 nV/deg² in der Peripherie).

Die Messungen des deuteranopen Probanden mit drei Genen im Pigmentgen-Array wiesen auch bei den mfOPs niedrigere Amplitudenwerte auf (0,8 nV/deg² zentral und 0,3 nV/deg² peripher). Jedoch zeigte sich, dass die Antwortamplituden des multigenen Deuteranopen den Antwortamplituden der Trichromaten (gemessen unter L-Zapfen isolierenden Bedingungen) ähnlicher waren als die der übrigen Dichromaten. Möglicherweise ist dies auf die zwei Gene zurückzuführen, die Pigmente mit einem gering unterschiedlichen λ_{\max} exprimieren oder auf Zapfen, die eine unterschiedliche Pigmentdichte aufweisen.

Das Verhältnis von L- zu M-Zapfen das aus den Antwortamplituden der mfOPs errechnet wurde, war niedriger als das Verhältnis, das aus den Amplituden der mfERG-Untersuchungen berechnet wurde.

Unsere Ergebnisse unterstützen daher die Theorie, dass L-Zapfen und M-Zapfen generierte Signale sowohl in inneren wie in äußeren Netzhautschichten miteinander verrechnet werden und dass die Dichromaten mit dem Einzel-Gen-Array eine ähnliche Anzahl funktionierender Zapfen wie trichromatische Individuen besitzen.

Es lässt sich also vermuten, dass es noch weitere gravierende Veränderungen in der Verstärkung der Signale geben muss, nachdem sie die innere plexiforme Schicht durchlaufen haben aber bevor das Signal im Kortex generiert wird.

4.2 Ist das L/M-Verhältnis bei Männern höher als bei Frauen? Was sind die Ursachen für ein höheres L/M-Verhältnis bei männlichen Individuen?

Bei unserer Studie kam es darauf an, etwas über die Funktionsweise der inneren sowie der äußeren Netzhaut zu erfahren, unter Berücksichtigung von geschlechtsspezifischen Unterschieden.

Zusätzlich untersuchten wir zwei verschiedene Methoden zur Datenanalyse. Hierbei zeigte sich, dass die Berechnung mittels der AUC besonders dann von Vorteil ist, wenn die Antwortamplituden sehr klein sind (wie bei den mfOPs). Aus unseren Ergebnissen lässt sich eine Aussage zum Verhältnis von L- zu M-Zapfen in der Netzhaut trichromatischer Individuen machen.

Die Unterschiede zwischen den Geschlechtern könnten beispielsweise durch einen geschlechtsabhängigen Faktor entstehen, der die Expression der Pigmentgene beeinflusst, oder durch die Expression von zusätzlichen Pigmentgenen, die auf dem zweiten X-Chromosom bei Frauen liegen, hervorgerufen werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, eine vierte Dimension des Farbsehens zu erreichen, also tetrachromatisch zu sehen (Nagy et al. 1981; Jordan & Mollon, 1993).

Um tetrachromatisch sehen zu können, muss sich entweder das Absorptionsmaximum des Sehfärbstoffes, der als erstes im Genbereich liegt (normalerweise der L-Zapfen Farbstoff), oder das Absorptionsmaximum des an zweiter Stelle codierten Sehfärbstoffes (normalerweise der M-Zapfen Farbstoff) hinreichend von den auf dem zweiten X-Chromosom codierten Sehfärbstoffen unterscheiden.

Zum Beispiel könnte die Kombination zweier gleichartiger, aber mit verschiedenen Absorptionsmaxima ausgestatteten L-Zapfen-Pigmente die Expressionsrate zugunsten der M-Zapfen-Pigmente verschieben. Der Kontrollmechanismus der Pigmentgen-Expression ist jedoch bislang weitgehend unbekannt.

Individuelle Unterschiede in der spektralen Sensitivität der Zapfen könnten einen Einfluss auf die „silent-substitution“ Technik, die in dieser Studie angewandt wurde, haben. Andererseits wurde in vorangehenden Studien, die mit derselben Methode arbeiteten, um das Verhältnis von L- zu M-Zapfen zu schätzen, zusätzlich die heterochromatische Flicker-Photometrie herangezogen, um die Verhältnisse der Zapfen zu bestimmen. Dadurch konnte die individuelle spektrale Sensitivität (die zudem auf der Dichte der Sehfärbstoffe beruht) sowie die individuelle Pigmentdichte in der Makula miteinbezogen werden. Diese Unter-

suchungen zeigten mit den unseren weitgehend übereinstimmende Ergebnisse (Kremers et al. 2000; Albrecht et al. 2002).

Demzufolge waren für unsere Zwecke die Unterschiede, die durch unterschiedliche spektrale Sensitivität sowie verschiedene Pigmentdichte in der Makula hervorgerufen wurden, für die Abschätzung des L- zu M-Zapfenverhältnisses zu vernachlässigen.

In diesem Teil der Arbeit wurde der Mittelwert der Amplituden aller Hexagone berechnet, um das Verhalten der gesamten Netzhaut bei Männern und Frauen zu untersuchen. Im Durchschnitt wurde bei den Trichromaten in dieser Studie ein Verhältnis von 3,36 gemessen.

Bei den weiblichen Probanden ergab sich durchschnittlich ein Verhältnis von 2,80, bei den männlichen eines von 3,91.

Interessanterweise zeigten alle aus mfERG-Messungen gewonnenen Verhältnisse von L- zu M-Zapfen einen tendenziell niedrigen Wert bei den weiblichen Probanden, ohne jedoch tatsächlich signifikant zu sein.

Bei den mfOPs schätzten wir das durchschnittliche Verhältnis von L- zu M- Zapfen (abgebildet in den inneren Netzhautschichten) auf einen Wert von 2,21, wobei sich bei den Frauen mit 2,02 etwas niedrigere Werte als bei den Männern mit 2,39 zeigten.

Die paarweise Korrelation zwischen den aus mfERG Untersuchungen und mfOP Untersuchungen gewonnenen L- zu M Verhältnissen zeigte sich sowohl für die weiblichen als auch für die männlichen Probanden signifikant. Also scheint es so zu sein, dass eine kleine Veränderung der Verstärkung in den Signalen der Netzhaut stattfindet, bevor die mfOPs in der inneren plexiformen Schicht entstehen.

Wir können zudem nicht ausschließen, dass auch noch andere Faktoren unsere Schätzung des L- zu M-Zapfenverhältnisses beeinflussen. Interaktionen zwischen den Zapfen oder zapfenunabhängige Verstärkungsmechanismen könnten den relativen Beitrag von L- beziehungsweise M-Zapfen zu den gemessenen Amplituden verändern. Derartige Veränderungen wären erwartungsgemäß

eher in den OP-Messungen zu finden, da diese im Rahmen der Informationsverarbeitung erst später generiert werden. Die starke Ähnlichkeit der Wellenformen bei Dichromaten im Vergleich zu Trichromaten lässt jedoch vermuten, dass diese Faktoren nur eine untergeordnete Rolle in unseren Untersuchungen spielen (Kurtenbach et al. 2004).

Obwohl es bislang keine Beweise für einen Unterschied in der Gesamtzahl der L- bzw. M-Zapfen bei Männern und Frauen gibt, zeigten sich bei unseren Untersuchungen niedrigere L- zu M-Verhältnisse sowie etwas höhere Summern (L+M) Antwortamplituden bei den Frauen. Dies galt sowohl für die Signale aus den äußeren Netzhautschichten (mfERGs) als auch für die Signale aus den inneren Netzhautschichten (mfOPs). Die Antwortamplituden gemittelt aus allen Hexagonen waren im ERG bei Frauen um etwa 5%, in den OP-Messungen sogar um 25% höher als bei den Männern.

Das niedrigere Verhältnis von L- zu M-Zapfen stimmt mit höheren Amplituden beim Xenon Flash ERG bei Frauen überein. Allerdings sind die Antwortamplituden bei diesem Verfahren höher als bei der in dieser Studie verwendeten Methode und der Bereich in dem die Amplituden differieren ist zu hoch, als dass er allein durch verschiedene L- zu M-Zapfen Verhältnisse erklärt werden könnte (Birch & Anderson 1992; Martin & Heckenlively 1982).

Basierend auf unseren durchschnittlichen L- zu M-Verhältnissen von 3,9 bei Männern und 2,8 bei Frauen und unter Einbeziehung der größeren Einwirkung eines Xenon Flash Spektrums auf die M- Zapfen im Vergleich zu den L-Zapfen, lässt sich der relative Anstieg der Amplituden bei Frauen auf etwa 1% schätzen.

Zusätzlich widerspricht eine größere Anzahl an M-Zapfen, deren ERG-Antwortamplituden tendenziell eher längere Gipfelzeiten als die der L-Zapfen aufweisen (Albrecht et al. 2002), der niedrigeren Gipfelzeit, die bei der Ableitung von ERGs bei Frauen gewonnen wurden (Martin & Heckenlively 1982).

Während Unterschiede im L- zu M-Verhältnis zu unterschiedlichen Antwortamplituden beim photopischen ERG beitragen können, lassen sich durch sie höhere ERG Antwortamplituden unter skotopischen Bedingung nicht erklären (Zeidler 1959; Birch & Anderson 1992; Martin & Heckenlively 1982).

Peterson schrieb 1968 die Unterschiede der ERG Antworten, die zwischen Männern und Frauen in Ganzfeld-ERG-Untersuchungen beobachtet wurden, geschlechtsbedingten Unterschieden in der axialen Länge des Augapfels zu.

Tatsächlich ließ sich nachweisen, dass die ERG Antwortamplituden mit der Brechung und der axialen Länge des Auges korrelieren. Dies gilt sowohl für Ganzfeld- als auch für multifokale ERG-Ableitungen (Peterson 1968; Kawabata & Adachi-Usami 1997; Chan & Mohidin, 2003).

Die prozentuale Erniedrigung der Amplitude bei steigender axialer Länge wurde für die Untersuchung mittels multifokalem ERG von Chan und Mohidin (2003) auf etwa 6 bis 8 % pro Millimeter geschätzt. Kawabata und Adachi-Usami berechneten sie 1997 auf etwa 15 bis 18% pro Millimeter und für Ganzfeld-ERG-Untersuchungen fand Peterson (1968) einen Wert von ca. 1,7% pro mm heraus.

Legt man die Differenz von 0,15 mm in der axialen Länge des Bulbus zwischen den Geschlechtern zugrunde (Stenström 1946), beträgt die Differenz in der Amplitudenhöhe weniger als 2,7% beim multifokalen ERG und 0,3% beim Ganzfeld-ERG (basierend auf den Daten von Peterson 1968). Dies ist deutlich weniger als die Amplitudendifferenz von 7,8 % über die Peterson in derselben Studie berichtete, ebenso wie 2,3 bis 16% die Zeidler (1959), bzw. 18% für Stäbchen- und 12 % für Zapfen-Antworten die Birch & Anderson (1992) berichteten.

Interessanterweise zeigte sich in diesen Studien, dass die Gipfelzeit der ERG Antworten bei Frauen signifikant niedriger war im Vergleich zu denen bei Männern.

Wir gehen deshalb davon aus, dass die Unterschiede in der axialen Augenlänge nicht ausreichen, um die Unterschiede in den ERG-Antwortamplituden zu erklären.

Ein zusätzlicher Faktor, der zu Unterschieden zwischen den Geschlechtern bei elektrophysiologischen Untersuchungen beitragen könnte, ist die Existenz von Geschlechtshormon-Rezeptoren im Auge (Gupta et al. 2005). Es wurde berichtet, dass diese Rezeptoren in verschiedenen Geweben des Auges vorkommen,

inklusive dem Pigmentepithel der Netzhaut. Zudem gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Östrogen, Progesteron und Androgen einen direkten Einfluss auf die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase sowie auf die Funktion der Kalium- und Calciumkanäle haben (Ogueta et al. 1999).

Bei dieser Studie zeigte sich, dass die Abschätzung der L/M-Verhältnisse bei der Messung der mfERGs unabhängig von der zur Berechnung verwandten Methode gelang. Bei der Messung der mfOPs jedoch zeigten sich Unterschiede, die von der begrenzten Auflösung der Amplituden (wenn diese sehr klein sind) herrühren.

Obwohl die Summenantwort (L+M) der Amplituden sowohl für mfERG als auch für mfOPs bei Frauen etwas höher war und auch die L/M-Verhältnisse der weiblichen Probanden niedriger waren als die der männlichen, ergab sich bei der statistischen Auswertung keine signifikante Differenz.

Weil der Bereich in dem die ERG Amplituden differieren größer ist als es durch das L/M-Verhältnis oder auch die axiale Länge des Augapfels erklärbar ist, nehmen wir an, dass er möglicherweise auf einen direkten Effekt der Sexualhormone auf die Ionenkanäle zurückzuführen ist.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der äußeren Netzhautschichten mittels des multifokalen Elektretinogramms (mfERG) und jene der Aktivität der inneren Netzhautschichten mittels multifokaler oszillatorischer Potentiale (mfOPs) unter Bedingungen zur Isolation der verschiedenen Zapfentypen untersucht. Zusätzlich wurden vergleichende Untersuchungen mit einem schwarz / weißen Stimulus durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden bei 14 farbtüchtigen Personen, 2 Personen mit fehlender Funktion des langwellig empfindlichen (L-) Zapfens (Protanope) und 2 Personen mit fehlender Funktion des mittelwellig empfindlichen (M-) Zapfens (Deutanope) durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Trichromaten unter zapfenisolierenden Bedingungen sowohl in den äußeren wie in den inneren Netzhautschichten Antwortamplituden aufwiesen, die das aufgrund anderer Untersuchungen erwartete Verhältnis der L- und M-Zapfen widerspiegeln und dass Dichromaten mit einem einzelnen Gen im L-M-Genarray eine ähnliche Anzahl von funktionstüchtigen Zapfen haben wie Farbsehtüchtige.

Das Verhältnis von L- zu M-Zapfen bei Normalen wurde zusätzlich zur Analyse der Amplituden durch die Fläche unter der Kurve (AUC) abgeschätzt. Dabei zeigte sich eine Unabhängigkeit von der Methode bei den mfERG-Messungen. Bei den mfOP-Messungen hingegen zeigten sich Unterschiede, die wahrscheinlich durch die bei kleinen Antwortamplituden größere Anfälligkeit für Artefakte zustande kommen.

Da die Verhältnisse der Antwortamplituden von L- und M-Zapfen bei den Messungen der mfOPs etwas niedriger waren als bei der Messung der mfERGs, ist anzunehmen, dass sich bereits auf der Ebene der inneren plexiformen Schicht der Netzhaut eine deutliche Angleichung der Signalstärke vollzieht.

Interessanterweise waren die L/M-Verhältnisse der mfERGs und mfOPs bei Frauen tendenziell niedriger, die L+M-Amplituden hingegen größer als bei Männern. Ursache hierfür könnten direkte Effekte von Sexualhormonen auf die Ionenkanäle im Auge sein.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Stäbchen (Rod) and Zapfen (Cone).

Das einfallende Licht bewirkt in den äußeren Segmenten der Sehzellen eine Transformation der Sehfärbstoffe (Photopigment). Bemerkenswerter Weise liegen die Sehfärbstoffe im von der Pupille abgewandten Teil der Netzhaut, weshalb das Licht zuvor durch alle Schichten der Netzhaut hindurch muss (Aus: Wandell 1995)

Abb. 2 Verteilung von Zapfen und Stäbchen in der Netzhaut

Auf der x-Achse ist die Entfernung von der Stelle des schärfsten Sehens, der Makula (bei 0 Grad), in Grad abgetragen. Auf der y-Achse ist die Dichte der Sehzellen in Stück pro Quadratmillimeter aufgetragen. Bei etwa 5 mm Exzentrizität in Richtung nasal findet sich der Austritt des Sehnerven (optic disc), ein Bereich in dem keine Sehzellen angesiedelt sind. Weiterhin zeigt sich, dass die Zapfen (cones) ihre höchste Dichte im Bereich der Makula haben und ihre Zahl in die Peripherie rasch abnimmt. Die Stäbchen (rods) hingegen haben ihre höchste Dichte im Bereich zwischen 5-10 mm Exzentrizität und nehmen zahlenmäßig in der Peripherie nicht so stark ab. (Aus: Rodieck 1998)

Abb. 3 Lichtspektrum mit Absorptionsmaxima der verschiedenen Zapfentypen

Auf der x-Achse ist die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, auf der y-Achse die Absorption durch die verschiedenen Zapfen- und das Stäbchenpigment abgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass die Blauzapfen (blue oder S-cones genannt) in einem kurzwelligerem Bereich ihre größte Absorption besitzen, die Grün- und Rotzapfen (green oder M-cones und red bzw. L-cones) im langwelligen Bereich. (Aus: Rodieck 1998)

Abb. 4 Histologischer Schnitt durch die Netzhaut mit den unterschiedlichen Schichten

Die Orientierung derart, dass das einfallende Licht von unten die direkt unterhalb des retinalen Pigmentepithels gelegenen Außensegmente der Photorezeptoren nur durch die signalverarbeitenden Schichten der inneren Netzhaut erreicht. (Aus: Oyster 1999)

Abb. 5 Auf dem Monitor dargestelltes Muster bestehend aus Hexagonen unterschiedlicher Größe

Die Ringe fassen Bereiche ähnlicher Exzentrizität zusammen. In diesen Bereichen werden die Antwortamplituden aus den einzelnen Hexagonen gemittelt (beispielsweise alle Hexagone die sich in Ring 2, also bei 12° Exzentrizität, befinden u.s.w). Die Größe der Hexagone ist in etwa umgekehrt proportional zur Dichte der Zapfen.

Abb. 6 Wellenform einer ERG-Ableitung bei Ganzfeldstimulation (A) und bei Stimulation mit dem Muster eines multifokalen ERGs (B).

Ausgewertet werden die Amplituden und Gipfelzeiten an den markierten Stellen der jeweiligen Wellenform.

Abb. 7 Darstellung einer Ganzfeld- und einer multifokalen ERG Antwort

Zur Verdeutlichung der technischen Unterschiede: Beim Ganzfeld-ERG wird die Netzhaut mit einem Lichtblitz mehrmals gereizt, der Mittelwert der daraus erhaltenen Einzelantworten ergibt die Messkurve. Beim mfERG wird mittels eines Musters gereizt, das die Zuordnung der Antwortamplituden zu bestimmten Bereichen der Netzhaut erlaubt. Auch hier wird jeder Netzhautort mehrfach gereizt und die Einzelantworten im Sinne eines Mittelwertes berechnet.

Abb. 8 L- und M-Zapfen getriebenes ERG

Zu sehen sind die ERG-Antwortkurven unter L-Zapfenisolierenden Bedingungen (rote Kurve) und unter M-Zapfen isolierenden Bedingungen (grüne Kurve). Gipfelzeit und Amplitudenhöhe sind rechterhand angegeben, oben für die L-Zapfen und unten für die M-Zapfen.

Abb. 9 M- und L-Zapfen getriebene multifokale OPs

Während beim Ganzfeld-ERG meist 5-6 Potentiale identifiziert werden können, sind bei mfOPs meist nur die Potentiale P1 und P2 eindeutig identifizierbar.

Abb. 10 Prinzip der stillen Substitution (silent substitution)

Für den zur Stimulation verwendeten Monitor wurden die Emissionsspektren der roten, grünen und gelben Phosphore gemessen (A). Diese werden entsprechend zwei definierten Zuständen (B) in einem vorgegebenen Rhythmus der m-Sequenz in ihrer Emission hin- und hergeschaltet. Aufgrund der sich über das gesamte Spektrum erstreckenden spektralen Empfindlichkeit der Photorezeptoren (C) wird von jedem Zapfentyp (Rot-, Grün- und Blauzapfen) in beiden Zuständen eine Erregung erzeugt. Die Erregung ist im gezeigten Beispiel jedoch für die M-Zapfen und L-Zapfen konstant und ändert sich nur für den L-apfen (D). Diese Änderung des Zapfenkontrastes erzeugt ein elektrisches Signal, welches gemessen wird.

Abb. 11 Veranschaulichung der Extraktion der linearen Antwort aus der multifokalen ERG-Antwort

In der linken Hälfte sind die stimulierten Hexagone in ihrer zeitlich aufeinanderfolgenden Reihe dargestellt. Rechter Hand werden die durch die Sequenz ausgelösten Antwortkurven dargestellt. Ein Signal welches bei weißem Hexagon aufgezeichnet wird, wird addiert, jenes eines schwarzen Hexagons subtrahiert. Ganz unten rechts befindet sich das aus den verschiedenen Antwortkurven errechnete Signal, welches dem ERG des Netzhautortes entspricht.

Abb. 12 Gemittelte mfERG Wellenformen, die durch einen schwarz/weißen Stimulus hervorgerufen werden.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deuteranopen und Trichromaten. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen aufgetragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Abb. 13 Zapfenisolierendes mfERG eines protanopen Probanden

Dargestellt sind die Antwortkurven eines protanopen Probanden unter L- und M-Zapfen isolierenden Bedingungen. Es zeigt sich wie erwartet, dass bei diesen Probanden unter L-Zapfen isolierenden Bedingungen keine vom Rauschen unterscheidbaren Signale auftreten.

Abb. 14 Gemittelte mfERG Kurven unter zapfenisolierenden Bedingungen

Im oberen Teil der Abbildung ist die Antwortkurve unter M-Zapfen isolierenden Bedingungen für Protanope und Trichromaten aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Antwortkurve von Deuteranopen und Trichromaten unter L-Zapfen isolierenden Bedingungen. Die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen für N1 und P1 sind rechter Hand aufgeführt, wobei sich die kursiv gedruckten Zahlen auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden beziehen.

Abb. 15 Gemittelte mfOP-Antwortkurven bei schwarz/weißem Stimulus

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deuteranopen und Trichromaten. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen auf-

tragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Abb. 16 Gemittelte mfOP-Antwortkurven unter zapfenisolierenden Bedingungen

Im oberen Teil der Abbildung sind die Antwortkurven von Protanopen und Trichromaten unter M-Zapfenisolation aufgetragen, im unteren Teil die Antwortkurven von Deutanopen und Trichromaten unter L-Zapfenisolation. Rechter Hand sind die Gipfelzeiten und Amplitudenhöhen aufgetragen, wobei sich der erste Wert auf N1 und der jeweils darunter stehende Wert auf P1 bezieht. Die in kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Antwortkurven der dichromatischen Probanden.

Abb. 17 Gemittelte Antwortkurven von mfERG (links) und mfOPs (rechts) unter zapfenisolierenden Bedingungen mit eingezeichneter AUC

Die Antwortkurven wurden über alle Hexagone und sämtliche Trichromaten gemittelt. Die AUC wurde für ein Intervall zwischen 12 und 35 ms bei den mfERG Antwortkurven und für 20-25 ms (L-Zapfenisolation) bzw. 23-28 ms (M-Zapfenisolation) bei den Antwortkurven der mfOPs berechnet.

Abb. 18 Korrelation der beiden Verfahren zur Bestimmung der L/M-Verhältnisse

Die Korrelation zwischen den Amplituden basierten und den AUC basierten L/M-Verhältnisse zeigte eine signifikante Korrelation für die mfERGs. Die Männer und Frauen sind durch unterschiedliche Symbole identifiziert. Die gestrichelte Linie zeigt die Gerade, die sich am besten durch die Ergebnisse aller 14 Probanden legen lässt.

Abb. 19 Geschlechtsabhängige Unterschiede in der L+M-Amplitude und dem L/M-Verhältnis bei mfERG-Ableitungen

Vergleich der durch Addition der L-Zapfen- und der M-Zapfen-Amplituden berechneten Gesamtantwortamplitude (A) und der L/M-Verhältnisse (B). Bei gleicher Gesamtamplitude zeigt sich ein deutlich unterschiedliches L/M-Verhältnis..

7. Literaturverzeichnis

Albrecht J., Jägle H., Hood D.C., Sharpe L.T. (2002). The multifocal electroretinogram (mfERG) and cone isolating stimuli: Variation in L- and M-cone driven signals across the retina. *Journal of Vision*, 2(8), 543-558.

Albrecht J.F. (2005). Das Rot- und Grün-Zapfen isolierende multifokale Elektroretinogramm. Unterschiede in den Rot- und Grün-Zapfen generierten Signalen. Diss., Tübingen.

Asenjo A.B., Rim J., Oprian D.D. (1994). Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* 12, 1131-1138.

Birch D. G., Anderson J. L. (1992). Standardized full-field electroretinography. Normal values and their variation with age. *Arch Ophthalmol*, 110(11), 1571-1576.

Carroll J., McMahon C., Neitz M., Neitz J. (2000). Flicker-photometric electroretinogram estimates of L:M cone photoreceptor ratio in men with photopigment spectra derived from genetics. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 17, 499-509.

Chan H., Mohidin N. (2003). Variation of multifocal electroretinogram with axial length. *Ophthalmol Physiol Opt*, 23, 133-140.

Curcio C.A., Allen K.A., Sloan K.R., Lerea C.L., Hurley J.B., Klock I.B., Milam A.H. (1991). Distribution and morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin. *J Comp Neurol*. 312, 610-624.

Curcio C. A., Allen K. A. (1990). Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol*, 300(1), 5-25.

-
- Curcio C.A., Hendrickson A.E. (1991). Organization and development of the primate photoreceptor mosaic. N. Osborn & J. Chader (Ed.), *Progress in retinal research*, 89-120. Oxford: Pergamon.
- Curcio, C. A., Sloan K. R., Kalina R. E., Hendrickson A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*, 292(4):497-523.
- Dacey D.M., Peterson M.R. (1992). Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(20), 9666-9670.
- Dartnall H.J., Bowmaker J.K., Mollon J.D. (1983). Human visual pigments: Microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 220(1218), 115-130.
- Deeb S. S., Diller L. C., Williams D. R., Dacey D. M. (2000). Interindividual and topographical variation of L:M cone ratios in monkey retinas. *J Opt Soc Am.* 17, 538-544.
- De Vries H. (1946). The heredity of the relative numbers of red and green receptors in the human eye. *Genetica.* 24, 199-212.
- Estévez O., Spekrijse H. (1982). The "Silent Substitution" Method in Visual Research. *Vision Res.* 22, 681-691.
- Ettelt H., Brandl E., Zrenner E., Lund O. E. (1991). Vision test device: possibilities and limits of LCD technique. *Fortschr. Ophthalmol*, 88(1) 59-63.
- Gouras (1968). Identification of cone mechanisms in monkey ganglion cells.. *J Physiol*, 199(3) 533-4.

- Gouras P., Zrenner E. (1981). Color coding in primate retina. *Vision Res*, 21(11) 1591-8.
- Gupta P.D., Johar K., Nagpai K., Vasavada A.R. (2005). Sex hormone receptors in the human eye. *Surv Ophthalmol*, 50, 274-284.
- Hagstrom S.A., Neitz J., Neitz M.(1998). Variations in cone populations for red-green color vision examined by analysis of mRNA, *Neuroreport*. 9, 1963-1967.
- Hagstrom S.A., Neitz M., Neitz J.(2000). Cone pigment gene expression in individual photo receptors and the chromatic topography of the retina. *J Opt Soc Am A*, 17, 527-537.
- Hood D.C., Frishman L.J., Saszik S., Viswanathan S. (2002). Retinal origins of the primate multifocal ERG: Implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1673-1685.
- Hood D.C., Seible W., Holopigian K., Greenstein V. (1997). A comparison of the components of the multifocal and full-field ERGs. *Visual Neuroscience* 14(3), 533-544.
- Hurvich, L. M. and Jameson D.(1957). An opponent-process theory of color vision. *Psychol Rev*, 64, Part 1(6):384-404, 1957.
- Jacobs G.H., Neitz J. (1991). Electrophysiological estimates of individual variation in the L/M cone ratio. *Color Vision Deficiencies XI*, 107-112.
- Jägle H., Heine J., Kurtenbach A. (2006). L:M-cone ratio estimates of the outer and inner retina and its impact on sex differences in ERG amplitudes. *Doc Ophthalmol* 113, 105-113.

-
- Jordan G., Mollon J. D. (1993). A study of women heterozygous for colour deficiencies. *Vision Res* 33, 1495-1508.
- Karpe G. (1945). Basis of clinical electroretinography. *Acta ophthal* 24 (Suppl), 1-118.
- Kawabata H., Adachi-Usami E. (1997) Multifocal electroretinogram in myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2844-2851.
- Kremers J., School H.P., Knau H., Berendschot T.T.J.M., Usui T., Sharpe L.T. (2002). L/M cone ratios in human trichromats assessed by psychophysics electroretinography and retinal densitometry. *J Opt Soc Am. A* 17, 517-526.
- Kremers J., Usui T., Scholl H.P., Sharpe L.T. (1999) Cone signal contributions to electroretinograms in dichromats and trichromats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40, 920-930.
- Kurtenbach A., Heine J., Jägle H. (2004). The multifocal electroretinogram in trichromat and dichromat observers under cone isolating conditions. *Visual Neuroscience* 21(3), 249-255.
- Hare W. A., Ton H. (2002). Effects of APB, PDA and TTX on ERG responses recorded using both multifocal and conventional methods in monkey. Effects of APB, PDA and TTX on monkey ERG responses. *Doc Ophthalmol.* 105, 189-222.
- Heynen H., Wachtmeister L., Van Norren D. (1985). Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res.* 25, 1365-1373
- Hendrickson, P. (1992). Sources of error in planimetry of the optic nerve. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 200(5):489-93.

Martin D.A, Heckenlively J.R. (1982). The normal electroretinogram. *Doc Ophthalmol Proc Ser.* 31, 135-144.

Merbs S.L., Nathans J. (1992). Absorption spectra of the hybrid pigments responsible for anomalous color vision. *Science* 258, 464-466.

Merigan, W. H., L. M. Katz and J. H. Maunsell (1991). The effects of parvocellular lateral geniculate lesions on the acuity and contrast sensitivity of macaque monkeys. *J Neurosci.* 11(4):994-1001.

Nagy A.L., MacLeod D.I., Heyneman N.E., Eisner A. (1981). Four cone pigments in women heterozygous for color deficiency. *J Opt Soc Am* 71, 719-722.

Neitz M., Neitz J., Jacobs G.H. (1995) Genetic bases of photopigment variations in human dichromats. *Vision Research* 35, 2095-2103.

Ogueta S.B., Schwartz S.D., Yamashita C.K., Farber D.B. (1999). Estrogen receptors in the human eye: Influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1906-1911.

Oyster, C.W. (1999) *The Human Eye – Structure and Function*, Sinauer Associates

Peterson, H. (1965). The normal b-potential in the single-flash clinical electroretinogram. *Acta Ophthalmol.* 99, 5-77.

Pokorny J., Smith V.C. (1987). L/M cone ratios an the null point of the perceptual red/green opponent system. *Die Farbe.* 34, 53-57.

Rangaswamy N.V., Hood D.C., Frishman L.J. (2003). Regional variations in local contributions to the primate photopic flash ERG: Revealed using the slow-sequence mfERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 3233-3247.

Robert W. Rodieck (1998) *First Steps in Seeing*, Sinauer Associates

Schiller (1991). The color-opponent and broad-band channel of the primate visual system. A. Valberg & B.B. Lee (Editoren): *From pigments to perception* (Seite 127-132). New York: Plenum Press.

Sharpe L.T., Stockman A., Jägle H., Knau H., Klausen G., Reitner A., Nathans J. (1988). Red, green and red-green hybrid pigment in the human retina correlations between deduced protein sequences and psychophysically measured spectral sensitivities. *Journal of Neuroscience* 18, 10053-10069.

Stenström S. (1946). Untersuchungen über die Variation und Covariation der optischen Elemente des menschlichen Auges. *Acta Ophthalmol. suppl.* 26.

Stockman A., Sharpe L.T. (1998). Human cone spectral sensitivities: A progress report. *Vision Res.* 38, 3193-3206.

Stockman A., Sharpe L.T. (2000). The spectral sensitivities of the middle- and long- wavelength-sensitive cones derived from measurements in observers of known genotype. *Vision Res.* 40, 1711-1737.

Sutter E.E. (1991). The fast m-transform: A fast computation of cross-correlations with binary m-sequences. *Society for industrial and applied mathematics*, 2, 668-694.

Sutter E.E. & Tran D. (1992). The field photography of ERG components in man-I. The photopic luminance response. *Vision Res.* 32, 433-446.

Vimal R. L., Pokorny J., Smith V.C., Shevell S. K. (1989). Foveal cone thresholds. *Vision Res.* 29, 61-78.

Brian A. Wandell (1995) *Foundations Of Vision*, Sinauer Associates

Wu S. & Sutter E.E. (1995). A topographic study of oscillatory potentials in man. *Visual Neuroscience*, 1013-1025.

Zeidler I. (1959). The clinical electroretinogram, IX: The normal electroretinogram: value of the b-potential in different age groups and its difference in men and women. *Arch Ophthalmol*, 37, 294-301.

Zrenner E. (1983). Neurophysiological aspects of color vision mechanisms in the primate retina. Mollon & Sharpe (Ed.), *Color Vision*, 195-210. London: Academic Press.

Zrenner E. (1991). Discussion: P-M-Pathways. Valberg & Lee (Ed.) *From pigments to perception*, 133-138. New York: Plenum Press.

8. Danksagung

Ohne die folgenden Personen hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können.

Mein Dank gilt deshalb

Herrn PD Dr. Herbert Jägle, der vom Betreuer zum Doktorvater wurde und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke insbesondere für das rasche Korrekturlesen und die Hilfe beim Editieren der Bilder.

Frau PD Dr. Anne Kurtenbach, die diese Arbeit gleichfalls betreute und nicht müde wurde, immer wieder nach Fortschritten zu fragen. Auch ihr heißen Dank für die schnelle Korrekturarbeit.

Meinem Vater, Dr. Felix Heine, der sich mit Elan und Kenntnis den Tücken der Textformatierung entgegenstellte und hundertfach verschiedene Versionen der Arbeit Korrektur las.

Meinem Liebsten, Daniel van Gerpen, fürs Mutmachen und das Ertragen meiner Launen in der heißen Phase sowie die Hilfe beim Kampf gegen Software-Tücken und beim Erstellen von Tabellen.

Meiner Mutter, Sonja Heine und meiner Freundin, Mareike Schansker für ihr Verständnis meiner Zweifel und Bedenken, sowie für ihre Bereitschaft, sich diese immer wieder anzuhören und mir Mut zu machen.

UND

meinen zahlreichen Probanden, die die Messungen so geduldig ertragen haben, auch wenn wir sie zum Teil unzählige Male vornehmen mussten, bis das Verhältnis von Signal zu Rauschen erträglich war.

Besonderer Dank gebührt hier meinem Bruder Daniel Heine, der tapfer die Augen offen gehalten hat.

Den MitarbeiterInnen der Augenklinik, die stets kooperativ und hilfsbereit waren.