

**Aus dem Department für Augenheilkunde**

**Ärztliche Direktoren:**

**Professor Dr. K.-U. Bartz-Schmidt, Professor Dr. E. Zrenner**

**Universitäts-Augenklinik Tübingen**

**Forschungsinstitut für Augenheilkunde**

**Direktor: Professor Dr. E. Zrenner**

**Elektroretinographische Untersuchung zur Erholung  
der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung bei der  
Ratte**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

vorgelegt von

Katharina Vieira Messias, geb. Stecher

aus

Guatemala-Stadt/Guatemala

2010

**Aus dem Department für Augenheilkunde**

**Ärztliche Direktoren:**

**Professor Dr. K.-U. Bartz-Schmidt, Professor Dr. E. Zrenner**

**Universitäts-Augenklinik Tübingen**

**Forschungsinstitut für Augenheilkunde**

**Direktor: Professor Dr. E. Zrenner**

**Elektroretinographische Untersuchung zur Erholung  
der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung bei der  
Ratte**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

vorgelegt von

Katharina Vieira Messias, geb. Stecher

aus

Guatemala-Stadt/Guatemala

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Zrenner

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. M. Knipper-Breer

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Aufbau der Retina	1
1.1.1.	Die Photorezeptoren	2
1.2.	Die Phototransduktion	5
1.3.	Signalverarbeitung in der Retina	7
1.4.	Der Rhodopsinzyklus	9
1.4.1.	Pathologische Veränderungen des Rhodopsinzyklus	10
1.4.2.	Untersuchung des Rhodopsinzyklus	12
1.5.	Die Elektroretinographie	12
1.5.1.	Die a-Welle	14
1.5.2.	Die b-Welle	14
1.5.3.	Die oszillatorischen Potentiale	14
1.5.4.	Weitere Komponenten des ERGs	15
1.5.5.	Das helladaptierte Flicker-ERG	16
1.6.	Motivation für diese Arbeit	17
1.7.	Ziel der Arbeit	18
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Die Versuchstiere	19
2.2.	Messung des kornealen ERGs	19
2.2.1.	Dunkeladaptation und Narkose	19
2.2.2.	Der Messaufbau	20
2.2.3.	Der Espion <sup>®</sup> und ColorDome <sup>®</sup>	20
2.3.	Das Mess-Protokoll	21
2.3.1.	Dunkeladaptiertes ERG	23
2.3.2.	Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung	23

2.3.3.	Photopigmentbleichung	23
2.3.4.	Erholung der a- und b-Wellenamplitude nach der Photopigmentbleichung	24
2.3.5.	Helladaptation	25
2.3.6.	Helladaptiertes ERG	26
2.4.	Auswertung	27
2.4.1.	Die dunkeladaptierten Sensitivitätsparameter	27
2.4.2.	Die oszillatorischen Potentiale	29
2.4.3.	Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung	29
2.4.4.	Regeneration der a- und b-Wellenamplitude nach der Photopigmentbleichung	30
2.4.5.	Helladaptiertes ERG	30
2.5.	Statistische Analyse der Normwerte	31
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Dunkeladaptiertes ERG	33
3.1.1.	Die b-Wellenamplitude und deren Gipfelzeiten	33
3.1.1.1.	Parameter $V_{\max}$ der Anpassung nach Hill	35
3.1.1.2.	Parameter k der Anpassung nach Hill	38
3.1.1.3.	Parameter n der Anpassung nach Hill	38
3.1.2.	Die dunkeladaptierte Maximalantwort	39
3.2.	Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung	40
3.3.	Regeneration der a- und b-Wellenamplitude nach der Photopigmentbleichung	41
3.3.1.	Regeneration der b-Wellenamplitude	41
3.3.2.	Regeneration der a-Wellenamplitude	43
3.4.	Zapfenantwort unter helladaptierten Bedingungen	45
3.4.1.	Einzelblitzantwort	45

3.4.2.	20-Hz-Flicker	46
4.	Diskussion	48
4.1.	Entwicklung des ERG-Protokolls und Diskussion der Ergebnisse	49
4.1.1	Dunkeladaptiertes ERG	50
4.1.2.	Die oszillatorischen Potentiale	53
4.1.3.	Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung	53
4.1.4.	Regeneration der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung	54
4.1.5.	Helladaptiertes ERG	58
4.1.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	58
5.	Zusammenfassung	60
6.	Abbildungsverzeichnis	62
7.	Tabellenverzeichnis	64
8.	Literaturverzeichnis	65
9.	Anhang	76
10.	Danksagung	78
11.	Lebenslauf	79

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA4	Gen, welches das ABCR kodiert
ABCR	ATP-bindender-Transporter (engl.: ATP-binding cassette transporter)
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve)
A2-E	N-retinyliden-N-retinylethanolamin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
ca.	circa
cd	Candela
cGMP	Guanosin-3', 5'- zyklisches Monophosphat (engl.: guanosine 3',5'- cyclic monophosphate)
CSNB	kongenitale stationäre Nachtblindheit
d. h.	das heißt
ERG	Elektroretinogramm
et al.	et alii, und Andere
evtl.	eventuell
FFT	Fast Fourier Transformation
g	Gramm
GCL	Ganglienzellschicht (engl: ganglion cell layer)
GDP	Guanosin-Diphosphat
GRK1	Gen, welches die Rhodopsinkinase kodiert
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
5'-GMP	Guanosin-5'-Monophosphat (engl.: guanosine 5'-monophosphate)
h	Stunde
Hz	Hertz

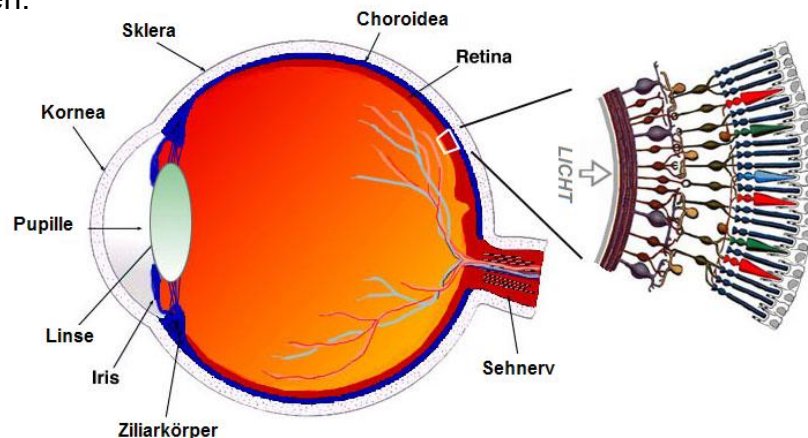
I	Lichtintensität
$I_{100}$	benötigte Luminanz zum Erreichen einer Gipfelzeit von 100 ms
INL	Innere nukleäre Schicht (engl.: inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht (engl.: inner plexiform layer)
IRBP	Interphotorezeptor-Matrix-Retinoid bindendes Protein (engl.: interstitial retinol-binding protein)
ISCEV	Internationale Gesellschaft für klinischen Elektrophysiologie des Sehens (engl.: International Society for Clinical Electrophysiology of Vision)
ISI	Interstimulusintervall
k	benötigte Lichtintensität zum Erreichen der Hälfte von $V_{\max}$ des Hill-Modells
$K^+$	Kalium
K	Kelvin
KG	Körpergewicht
log	logarithmiert
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
MII	Metarhodospin
min	Minute
n	Parameter der linearen Steigung des Hill-Modells
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
$Na^+$	Natrium
NrPE	N-retinyliden-PE
OFF-Zellen	Zellen, die bei Belichtung hyperpolarisieren
$\Omega$	Ohm
ONL	Äußere nukleäre Schicht (engl.: outer nuclear layer)
ON-Zellen	Zellen, die bei Belichtung depolarisieren
OPL	Äußere plexiforme Schicht (engl.: outer plexiform layer)
OS	Außensegmente der Photorezeptoren (engl.: outer segment)
OP	oszillatorische Potentiale



PDE	Phosphodiesterase
PE	Phosphatidylethanolamin
RBP	Serumretinol-bindendes Protein (engl.: retinol binding protein)
11-RDH	11-cis-Retinol-Dehydrogenase
RDH5	Gen, welches die 11-cis-Retinol-Dehydrogenase kodiert
RHOK	Gen, welches die Rhodopsinkinase kodiert
RPE	retinales Pigmentepithel
SAG	Gen, welches für Arrestin kodiert
SD	Standardabweichung (engl.: standard derivation)
STR	skotopische Schwellenantwort (engl.: scotopic threshold response)
$T_{0.02}$	erwartete Gipfelzeit bei einer Luminanz von $0,02 \text{ cd.s/m}^2$
Tab.	Tabelle
td	Troland
$V_{\max}$	saturierte b-Wellenamplitude des Hill-Modells

## 1. Einleitung

Zum Verständnis der Elektrophysiologie des Auges bedarf es einiger grundlegender Informationen über den Aufbau der Retina und der dort stattfindenden biochemischen Vorgänge. In der Einleitung zu dieser Arbeit wird zunächst ausführlich auf das menschliche Sehsystem eingegangen, obgleich der Gegenstand dieser Arbeit die Untersuchung der Vorgänge am Rattenauge ist. Die grundlegenden Mechanismen in den beiden Säugerretinae sind jedoch aufeinander übertragbar. Das Tiermodell der Ratte weist jedoch neben der einfachen Verfügbarkeit den großen Vorteil auf, dass in ihm bereits viele Krankheitsmodelle etabliert sind. Dennoch wird hier auf den Sehapparat des Menschen verwiesen als Vertreter der Säugetiere. Die elektrophysiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit am Modell der Ratte sollen die Grundlage für eine mögliche Verwendung beim Menschen bilden. Auf Unterschiede im Aufbau des Auges zwischen Ratte und Mensch wird gegebenenfalls explizit hingewiesen.



**Abb. 1: Horizontaler Schnitt durch ein menschliches Auge, schematisch.**

Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Lage und Anordnung der Photorezeptoren und der ihnen nachfolgenden retinalen Nervenzellen. Es wird deutlich, dass das Licht erst alle Schichten der Netzhaut durchdringen muss, bevor es auf die Photorezeptoren trifft (modifiziert nach Kolb, H 2003, [www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu)).

### 1.1. Aufbau der Retina

Die Retina stellt ein ca. 0,2 mm dickes Nervengewebe dar, welches sich embryonalgeschichtlich aus einem Teil des Zwischenhirns entwickelt. Die Netzhaut kleidet mit dem ihr anliegenden Pigmentepithel den Augenhintergrund

aus. Die Abbildung 1 (Kolb, 2003) zeigt ein Schema des menschlichen Auges und die Lage der Retina.

Histologisch kann man die Retina grob in sechs Schichten gliedern, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell unterscheiden (Abb. 2). Die äußerste Schicht besteht aus dem retinalen Pigmentepithel (1), welche die Retina von der Aderhaut abgrenzt. Daraufhin folgt die Schicht der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), die mit ihren lichtempfindlichen Außensegmenten (2) eine eigene Schicht bilden. Nach innen schließt sich die Innensegmentenschicht an (3). In der äußeren nukleären Schicht (4) liegen die Somata der Photorezeptoren, in der inneren nukleären Schicht (5) die der bipolaren, horizontalen und amakrinen Zellen. Die Zellkörper der Ganglienzellen und der „versetzten“ amakrinen Zellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (6). Das Licht muss somit erst durch alle Retinaschichten hindurch, bevor es die Photorezeptoren erreicht, daher auch der Terminus „inverse“ Retina.

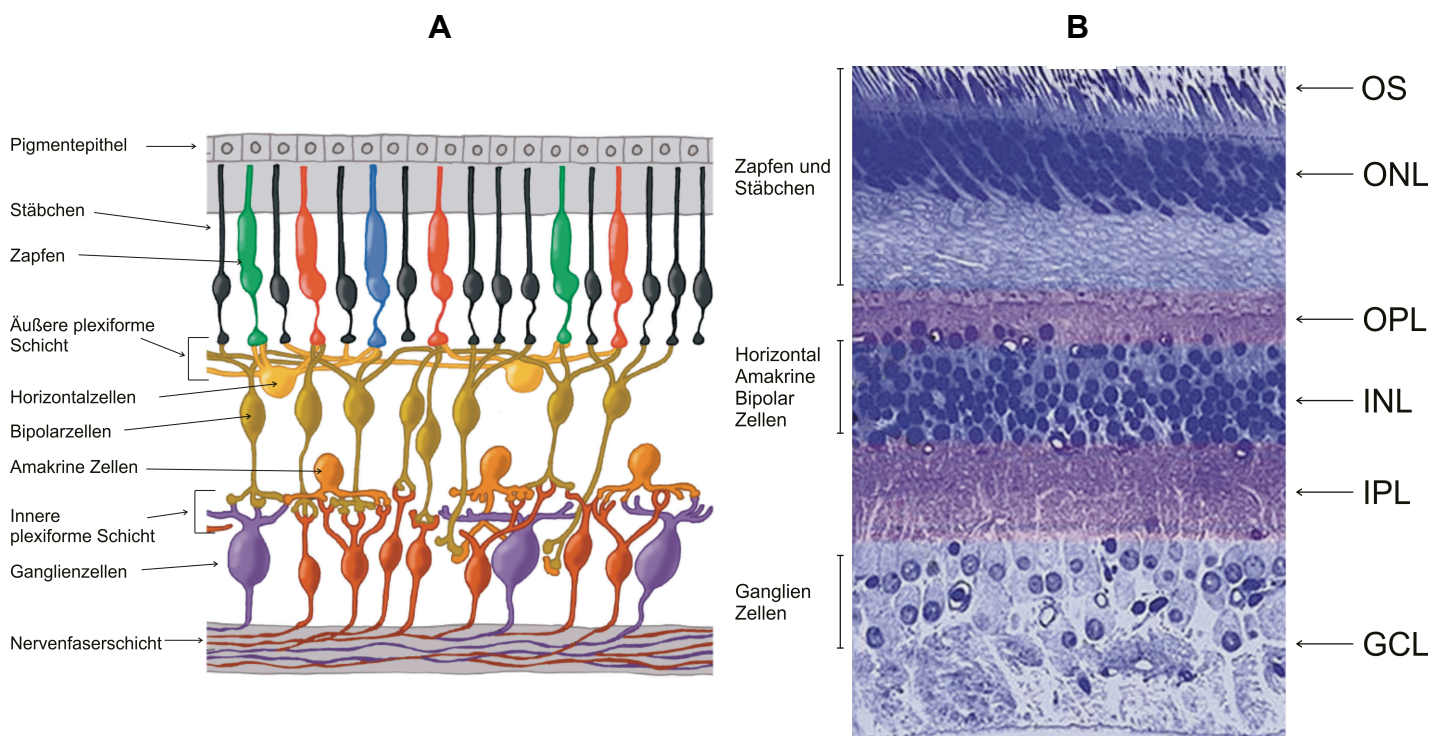
Die Synapsen zwischen Stäbchen, Zapfen, vertikal verlaufenden Bipolarzellen und Horizontalzellen finden sich in der äußeren plexiformen Schicht. In der inneren plexiformen Schicht bilden die Ganglienzellen, amakrinen Zellen und Bipolarzellen Synapsen untereinander aus.

Neben den Nervenzellklassen kommen 3 Arten von Gliazellen in der Retina vor. Müllerzellen durchspannen die Retina in vertikaler Richtung entlang der Endglieder bis zu den Ganglienzellen. Sie gelten als Stützelement der Retina und gehören zur Zellklasse der Neuroglia. Den Müllerzellen wird auch eine Aufgabe im Metabolismus von extrazellulärem Kalium zugeschrieben. Ähnlich wie im restlichen zentralen Nervensystem sind Astroglia mit Blutgefäßen assoziiert und bilden einen Teil der Blut-Retina-Schranke. Bewegliche Mikrogliazellen haben die Aufgabe, totes Gewebe zu beseitigen.

### 1.1.1. Die Photorezeptoren

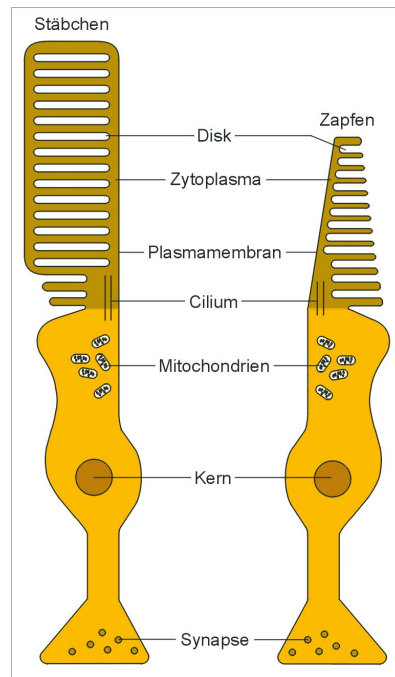
Die Photorezeptoren der Säugetiere besitzen einen gemeinsamen charakteristischen Aufbau. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung von Stäbchen und Zapfen. Das lichtempfindliche Außensegment der Stäbchen enthält ein dicht gepacktes Membransystem, bestehend aus Disci, das der

Vergrößerung der sensorischen Oberfläche dient. In den Diskmembranen befindet sich das lichtempfindliche Sehpigment. Das Innensegment (mit Kern und Mitochondrien) ist der Ort der Proteinsynthese und des Energiestoffwechsels. In der Synapse befinden sich glutamathaltige Vesikel, die den Neurotransmitter bei Depolarisation ausschütten und damit das Signal auf die nachgeschalteten Zellen übertragen.



**Abb. 2: Vertikalschnitt und schematischer Aufbau der Retina.**

**A:** schematische Darstellung des Vertikalschnitts durch die Retina (modifiziert nach Kolb, H 2003, [www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu)); **B:** histologische Darstellung der Retina: OS: Außensegmente der Photorezeptoren (engl.: outer segment), ONL: Äußere nukleäre Schicht (engl.: outer nuclear layer), OPL: Äußere plexiforme Schicht (engl.: outer plexiform layer), INL: Innere nukleäre Schicht (engl.: inner nuclear layer), IPL: Innere plexiforme Schicht (engl.: inner plexiform layer), GCL: Ganglienzellschicht (engl.: ganglion cell layer). Die Retina aller Vertebraten besteht aus 3 Schichten von Nervenzellkörpern und 2 Schichten von Synapsen. Die ONL enthält die Somata der Photorezeptoren, die INL enthält die der Bipolar-, Horizontal- und amakrinen Zellen und in der GCL liegen die Zellkörper der Ganglienzellen und der „versetzten“ amakrinen Zellen. Zwischen diesen Schichten liegen 2 Reihen, in denen die synaptischen Kontakte stattfinden. Die erste ist die OPL, in der die Synapsen zwischen den Photorezeptoren, den Bipolar- und Horizontalzellen liegen, die zweite ist die IPL, in der die Synapsen der Bipolar- und der Ganglienzellen liegen, die vor allem für den vertikalen Informationsfluss verantwortlich sind (modifiziert nach [www.webvision.med.utah.edu](http://www.webvision.med.utah.edu)).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Photorezeptoren.**

Die Photorezeptoren bestehen aus einem Außensegment, welches Membranstapel mit dem Sehfärbstoff enthält, einem Innensegment, welches reich an Mitochondrien zur Energiegewinnung und an Ribosomen zur Biosynthese des Sehfärbstoffs ist, einem Zellkörper mit Kern, und dem synaptischen Ende an dem die Neurotransmission an die nachgeschalteten Zellen stattfindet (übernommen aus <http://www.kfa-juelich.de/ibi/ibi-1/stefring/photor/pho01bl.jpg>).

Der natürliche Reiz für Photorezeptoren ist Licht, d. h. elektromagnetische Schwingungen im Wellenbereich von 400 bis 760 nm beim Menschen.

Die Zapfen, beim Menschen insgesamt 6 - 7 Millionen, kommen in besonders hoher Konzentration in der Fovea centralis vor, in der jedem Zapfen eine eigene Ganglienzelle zugeordnet ist (1:1-Verbindung). Diese Region stellt den Ort des schärfsten Sehens dar. In anderen Netzhautbezirken konvergieren dagegen durchschnittlich 250 Zapfen auf eine Ganglienzelle. Zapfen sind etwa 100-mal weniger lichtempfindlich als Stäbchen (Osterberg, 1935), reagieren aber schneller auf Lichtveränderungen und adaptieren auf die neuen Lichtverhältnisse rasch, innerhalb von Sekunden bis Minuten. Drei Zapfenpigmente, die aus 11-cis-Retinal und einer jeweils unterschiedlichen Proteinkomponente (Zapfen-Opsin) bestehen, sind bekannt. Jeder Zapfen enthält nur eines dieser drei Pigmente. Die Absorptionsmaxima der drei Zapfenpigmente liegen bei 440 nm (blau), 540 nm (grün) und 570nm (rot). Dies

ist die Grundlage der Theorie des trichromatischen Farbensehens auf Sensorebene (Jacobs, 2008).

Die Anzahl der Stäbchen beträgt beim Menschen 120 - 130 Millionen. Sie finden sich vorwiegend in der Peripherie und nicht in der Fovea centralis. Das Sehpigment der Stäbchen ist das Rhodopsin, bestehend aus 11-cis-Retinal und dem Protein Opsin. Das Empfindlichkeitsmaximum liegt bei 510 nm. Stäbchen zeigen eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit. Sie ermöglichen das Sehen bei geringer Lichtintensität.

Als nachtaktives Tier enthält die Retina der Ratte hauptsächlich Stäbchen, mit einem Stäbchen-Zapfen-Verhältnis von ca. 100:1 (Szel & Rohlich, 1992). Die Ratte besitzt zwei Zapfenpigmente, deren Absorptionsmaxima bei 450 nm und bei 560 nm liegen (Cicerone, 1976). Im Gegensatz zum Primatenaugen besitzt die Netzhaut der Ratten keine Fovea.

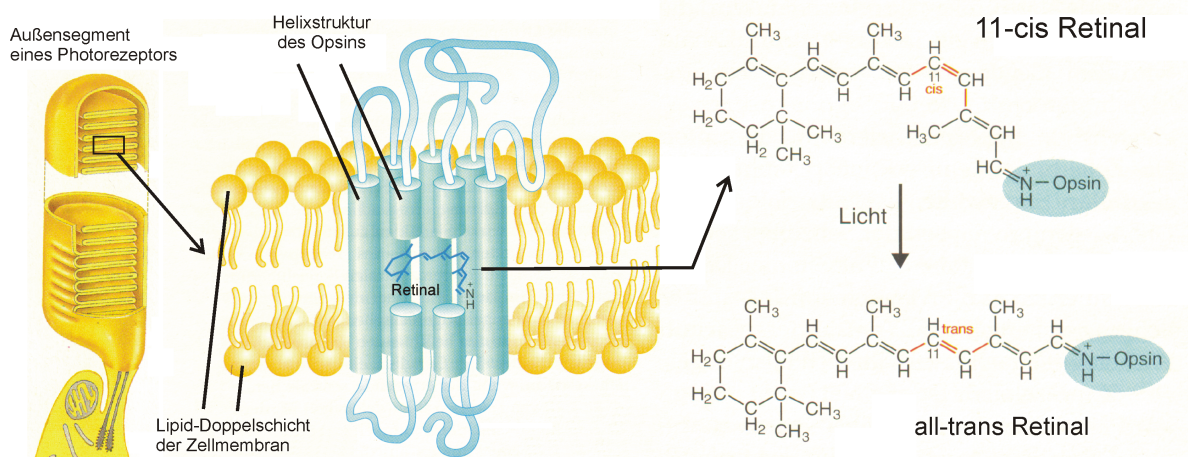
### 1.2. Die Phototransduktion

Die visuelle Wahrnehmung beginnt mit der Absorption eines Photons durch das lichtempfindliche Chromophor 11-cis-Retinal, einem Aldehyd des Vitamin A (Palczewski & Saari, 1997; Rao & Oprian, 1996). 11-cis-Retinal ist in Dunkelheit kovalent an das Protein Opsin gebunden; zusammen bilden beide den Sehsfarbstoff Rhodopsin (Abb. 4). Das Opsin gehört zur Gruppe der integralen Membranproteine und befindet sich in den Disci der Außensegmente der Photorezeptoren. Über 7 transmembrane Domänen ist es in der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran verankert (Schertler & Hargrave, 1995; Sheikh *et al.*, 1996; Unger *et al.*, 1997).

Lichteinfall bewirkt die Isomerisation des 11-cis-Retinals zu all-trans-Retinal und führt zu einer Konformationsänderung des Opsins (Farahbakhsh *et al.*, 1993; Farrens *et al.*, 1996). Das so entstandene aktivierte Rhodopsin, auch Rh\* oder Metarhodopsin II genannt, triggert nun über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus die weitere Phototransduktionskaskade.

Durch die Strukturänderung des Rhodopsins werden bestimmte zytoplasmatisch gelegene Regionen des Proteins frei, an die sich das G-Protein Transducin anlagert. Transducin, ein GTP-bindendes Protein, besteht aus 3

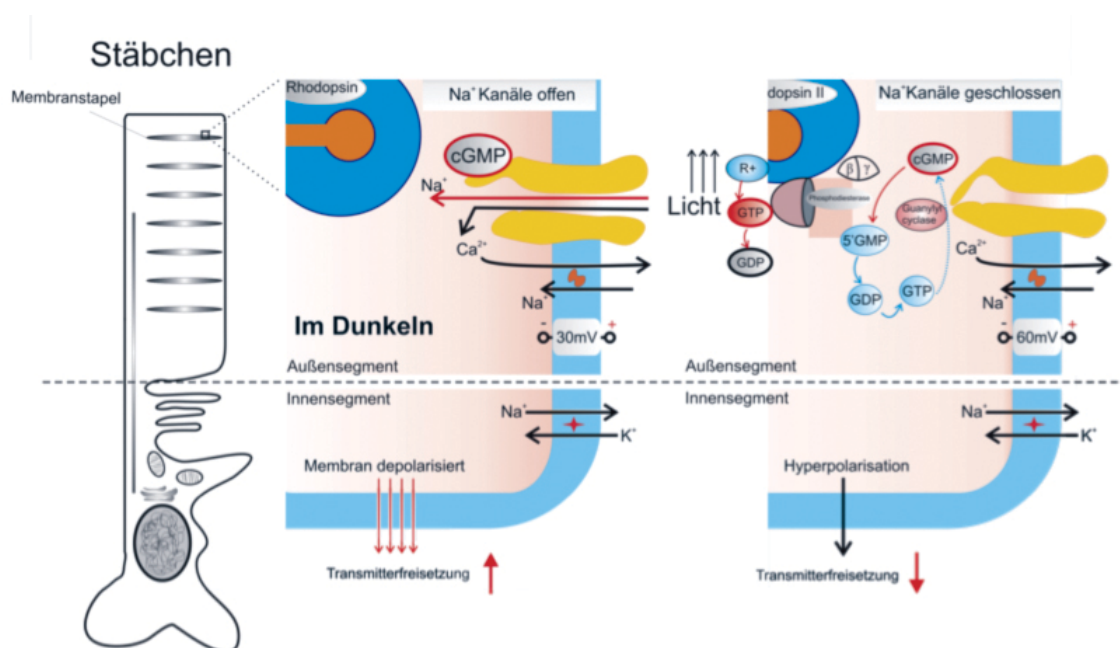
Untereinheiten ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), die im Dunkeln an die Zellmembran gebunden sind. Nachdem sich Transducin an das  $Rh^*$  angelagert hat, kommt es zur Abspaltung der  $\alpha$ -Untereinheit, welche ein GTP-Molekül bindet. Die mit GTP-beladene Untereinheit  $\alpha$  diffundiert zu der membrangebundenen Phosphodiesterase (PDE) und aktiviert diese. Die durch Transducin aktivierte PDE hydrolysiert cGMP zu 5'-GMP. Dadurch kommt es zu einem Abfall der cGMP-Konzentration innerhalb der Zelle. Da die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle in der Zellmembran cGMP-abhängig ist, führt der cGMP-Abfall zum Schließen der Kanäle.



**Abb. 4:** Links: schematische Darstellung des Außensegments eines Stäbchens. Außenglied räumlich geöffnet. Die Zellmembran der Außenglieder ist eingefaltet und enthält das Sehpigment; Mittig: Struktur des Opsins mit Darstellung der 7 transmembranen Domänen und der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran. Lage des Retinals; Rechts: Formel von 11-cis- und all-trans-Retinal. Durch Lichtabsorption kommt es zu einer photoinduzierten Stereoisomerisierung der 11-cis- in die all-trans-Form. (modifiziert nach Lindner Biologie, Metzler Verlag, 21. Auflage, 1998, S. 195).

Im Dunkeln sind die  $Na^+$ -Kanäle geöffnet, was zu einem Einstrom von  $Na^+$  in die Zelle führt, dem so genannten Dunkelstrom, und die Zellmembran depolarisiert. Es besteht eine  $Na^+$ -Konzentrations- und eine Spannungsdifferenz zwischen dem Inneren der Zelle und ihrer Umgebung. Der depolarisierte Photorezeptor schüttet an seinem synaptischen Ende mit den Bipolarzellen Glutamat als inhibitorischen Transmitter aus. Durch das Schließen der Kanäle bei Lichteinfall gleicht sich die  $Na^+$ -Konzentration durch passiven Transport aus und die Spannungsdifferenz nimmt ab. Es kommt zu einem

hyperpolarisierenden Rezeptorpotenzial und die Transmitterausschüttung kommt zum Erliegen (Abb. 5).



**Abb. 5: Phototransduktion.**

**Links:** Im Dunkeln sind die cGMP abhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle offen, was zu einer Membrandepolarisation der Zelle mit kontinuierlicher Transmitterausschüttung führt. Phosphodiesterase und Transducin sind an die Zellmembran gebunden und die 3 Untereinheiten des Transducins sind zusammen gelagert. Rhodopsin liegt im inaktiven Zustand in den Disci der Außensegmente. Das Retinal befindet sich in der 11-cis Form.

**Rechts:** Bei Belichtung reagiert das im Rhodopsin gebundene 11-cis-Retinal mit einer Konformationsänderung und lagert sich über all-trans-Retinal zu Metarhodopsin II um. Metarhodopsin II aktiviert nun Transducin, ein G-Protein. Das G-Protein stimuliert eine Phosphodiesterase, die cGMP zu GMP hydrolysiert. Dieser Abfall des cGMP-Spiegels führt zum Schließen der  $\text{Na}^+$ -Kanäle, was eine Hyperpolarisation des Photorezeptors zur Folge hat. Diese Signalkaskade beinhaltet eine ca. 10-fache Verstärkung. Über einen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter werden anschließend wieder  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle aufgenommen, während  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entfernt werden. Da  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die cGMP-Synthese hemmen, kann durch deren Abtransport wieder vermehrt cGMP durch die Guanylylcyclase gebildet werden, wodurch sich die  $\text{Na}^+$ -Kanäle erneut öffnen. Der depolarisierende  $\text{Na}^+$ -Strom beginnt wieder zu fließen und der Photorezeptor kehrt zum Ruhezustand zurück.

(modifiziert nach Lehrbuch der Physiologie; Klinker und Silbernagel, Thieme Verlag, 3. Auflage, 2001, S. 614).

### 1.3. Signalverarbeitung in der Retina

Die Hyperpolarisation an den Photorezeptoren nach Belichtung wird an die retinalen Folgeneurone im Netzwerk durch Glutamat weitergeleitet. Bei den Zapfen gibt es hierfür zwei verschiedene Wege: Die erste Möglichkeit besteht in der Verschaltung auf Zapfenbipolarzellen, bei denen man zwei Klassen



unterscheiden kann: ON-Bipolarzellen, die bei Erregung depolarisieren und OFF-Bipolarzellen, die bei Erregung hyperpolarisieren. Die unterschiedliche Antwort der Bipolarzellen wird durch ihren Glutamatrezeptor bestimmt. Diese ON-OFF-Aufteilung wird in den darauf folgenden Zellen beibehalten, d. h. ON-Bipolarzellen erregen ON-Ganglienzellen und OFF-Bipolarzellen erregen OFF-Ganglienzellen. Die Bipolarzellen übertragen somit die Information vertikal von den Photorezeptoren auf die Ganglienzellen. Die zweite Möglichkeit ist ein lateraler Informationsweg. Hierbei sind Horizontalzellen, welche die Bipolarzellen untereinander verbinden, und amakrine Zellen, welche die Ganglienzellen quervernetzen, involviert. Sowohl Horizontal- als auch amakrine Zellen sind inhibitorische Interneurone und besitzen durch diese lateralen Hemmmechanismen eine kontrastverstärkende Wirkung. Diese Vorgänge treffen im Wesentlichen auch auf die Ratte zu.

Bei den Stäbchen ist die Situation anders. Hier verschalten die Stäbchen auf nur einen Typ von Bipolarzellen, welcher bei Erregung depolarisiert (Dowling & Boycott, 1966; Dacheux & Raviola, 1986; Wässle *et al.*, 1991). Da die Stäbchenbipolarzellen mit Ganglienzellen keine Synapsen bilden (Strettoi *et al.*, 1990) gibt es offenbar drei verschiedene Wege, um den Informationsfluss zu bewerkstelligen. Bei der ersten Möglichkeit erregen die Stäbchenbipolarzellen All amakrine Zellen (Dacheux & Raviola, 1986; Famiglietti, Jr. & Kolb, 1975; Strettoi *et al.*, 1992). Die All amakrinen Zellen leiten das Signal daraufhin zu ON- und OFF-Zapfenbipolarzellen weiter. Dieser Weg wird besonders im dunkeladaptierten Zustand eingeschlagen (Smith *et al.*, 1986).

Eine zweite Möglichkeit stellt die direkte Signalübertragung zwischen Zapfen und Stäbchen via gap junctions dar und wird vornehmlich beim Dämmerungssehen verwendet (DeVries & Baylor, 1995; Raviola & Gilula, 1973; Schneeweis & Schnapf, 1999; Smith *et al.*, 1986). Die dritte Option beinhaltet die direkte Glutamatfreisetzung von Stäbchen an OFF-Zapfenbipolarzellen (Hack *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

#### 1.4. Der Rhodopsinzyklus

Der Rhodopsinzyklus, auch visueller Zyklus genannt, besteht aus einer Kette biochemischer Reaktionen, die das Sehpigment nach Lichtexposition regenerieren. Im Folgenden wird der Ablauf der biochemischen Vorgänge zur Regeneration des Rhodopsins, dem Sehpigment der Stäbchen, beschrieben.

Das durch Photonanlagerung aus dem 11-cis-Retinal entstandene all-trans-Retinal wird, nach der Inaktivierung des Metarhodopsins durch Phosphorylierung und Arrestin, mittels des ATP-bindenden-Transporters (ABCR) von der Innenseite der Disci auf deren zytosolische Seite gebracht (Sun *et al.*, 1999). Dort wird es durch die Retinol-Dehydrogenase zu all-trans-Retinol reduziert. Dieser Vorgang verbraucht NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) (Palczewski *et al.*, 1994; Futterman *et al.*, 1970). Daraufhin verlässt all-trans-Retinol den Photorezeptor und durchquert die Interphotorezeptormatrix mittels lipophiler Transportproteine, wie Serumalbumin, Serumretinol-bindendes Protein (RBP) oder dem Interphotorezeptor-Matrix-Retinoid bindenden Protein, welches hierbei die bedeutendste Rolle spielt (IRBP) (Adler & Edwards, 2000; Okajima *et al.*, 1990). Im RPE wird all-trans-Retinol durch die Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) zu einem Retinylester konvertiert (Saari *et al.*, 1993). Es kann als all-trans-Retinylester gespeichert werden oder durch eine Isomerohydrolase zu 11-cis-Retinol und freien Fettsäuren gespalten werden (Rando, 1992). Die Aufbewahrung des 11-cis Retinols in Form eines Esters ist notwendig, da freies Retinol toxische Eigenschaften besitzt (Blomhoff *et al.*, 1990). 11-cis-Retinol wird nun durch die 11-cis-Retinol-Dehydrogenase (11-RDH) zu 11-cis-Retinal oxidiert, welches in die Photorezeptoren diffundiert, sich dort mit Opsin verbindet und somit das Sehpigment regeneriert. Einen schematischen Überblick des Rhodopsinzyklus bietet die Abbildung 6.

Zapfen regenerieren das Sehpigment schneller als Stäbchen, vermutlich durch den Gebrauch weiterer Mechanismen, bei denen zusätzliche Enzyme involviert sind (Mata *et al.*, 2002).



Dehydrogenase kodiert, ebenfalls zu einer stationären Nachtblindheit. Die Rhodopsinregeneration ist hierbei stark verlangsamt (Marmor, 1977; Cideciyan *et al.*, 2000). Bei der kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB), einer klinisch und molekulargenetisch heterogenen Erkrankung, kommt es unter anderem zu einer von Geburt an bestehenden, nichtprogressiven Nachtblindheit. Ursächlich hierfür sind Mutationen, die u. a. die Rhodopsinstruktur betreffen (Zeitze *et al.*, 2008).

Andere Erkrankungen sind auf Mutationen von Transporterproteinen zurückzuführen. Beim Morbus Stargardt, am häufigsten auftretend in der autosomal rezessiven Ausprägung, kommt es zu einer Atrophie des RPE. Der zu Grunde liegende Defekt wurde auf dem Gen ABCA4, welches für ein Transporterprotein namens ABCR kodiert, gefunden (Allikmets *et al.*, 1997a). Das Protein wird sowohl in Stäbchen als auch in Zapfen exprimiert (Molday *et al.*, 2000). Durch die Dysfunktion dieses Transporterproteins kommt es zu einer Akkumulation von Lipofuszin im RPE, welches die Zellen schädigt. Weiterhin wird vermutet, dass eine heterozygote ABCA4 Mutation eine Prädisposition für das Auftreten der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) darstellt (Allikmets *et al.*, 1997b).

Bisher gibt es noch keine befriedigende Therapie dieser Erkrankungen. Ein neuerer Therapieansatz besteht darin, durch Modulation des visuellen Zyklus die Retina vor Degeneration zu bewahren, z. B. durch Accutane (Sieving *et al.*, 2001; Radu *et al.*, 2003), einem Inhibitor der 11-cis-RDH oder durch Hemmung der Isomerase (Golczak *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006a; Messias *et al.*, 2008). Der dahinter liegende Gedanke ist, eine Verlangsamung des visuellen Zyklus zu bewirken und somit auch eine verminderte Produktion des Lipofuszins.

Es kann aber auch zu erworbenen Störungen des Rhodopsinzyklus kommen. So können toxische Substanzen, wie z. B. Blei (Fox & Katz, 1992), Ethanol (Katz & Fox, 1991) oder Vincristin (Ripps *et al.*, 1984) einen inhibierenden Einfluss auf den Rhodopsinzyklus haben. Mangel an Vitamin A führt ebenfalls zu einer verlangsamt Dunkeladaptation (Hecht & Mandelbaum, 1938). Bei einem leichten Mangel an Vitamin A können der absolute Rhodopsingehalt und die Empfindlichkeit der Stäbchen auf schwache Lichtreize noch völlig normal

sein (Kemp *et al.*, 1988). Bei weiter bestehendem Mangel kommt es zu einem Abfall der Rhodopsinregeneration nach Lichteinfall und somit zu einer verlangsamten Dunkeladaptation.

### 1.4.2. Untersuchung des Rhodopsinzyklus

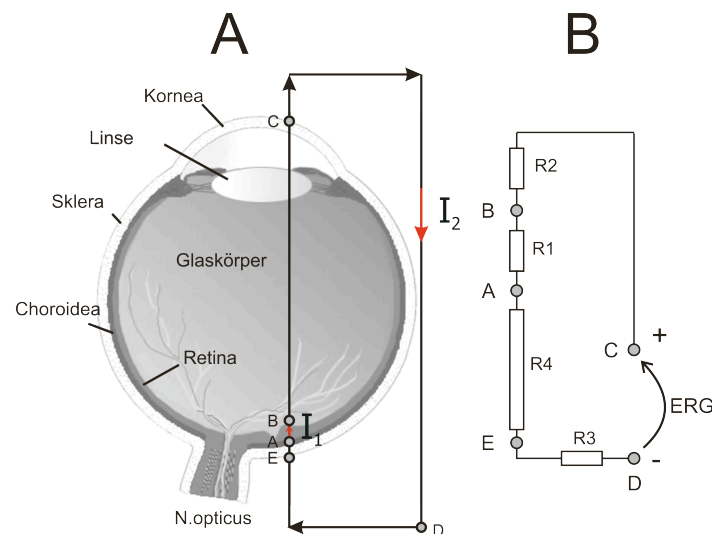
Zur funktionellen Untersuchung des Rhodopsinzyklus am lebenden Organismus bieten sich die Adaptometrie, eine psychophysische (subjektive) Methode und die Elektroretinographie, eine elektrophysiologische (objektive) Methode an.

Die Exposition des Auges mit hellem Licht, sog. Photopigmentbleichung (bleaching), führt zu einer ausgeprägten Desensibilisierung auf nachfolgende Lichtstimulation. Dieser desensibilisierte Zustand und die sich anschließend regenerierende Empfindlichkeit des Auges im Dunkeln können durch die beiden oben genannten Methoden untersucht werden. Bei der Adaptometrie wird nach einer Photopigmentbleichung die Zeit bis zur Erholung der Wahrnehmungsschwelle im Dunkeln ermittelt. Psychophysische Methoden besitzen einen großen Stellenwert in der Diagnostik und Verlaufskontrolle retinaler Erkrankungen, haben aber den prinzipiellen Nachteil, dass sie im Tiermodell nicht anwendbar sind. Des Weiteren spielen kognitive Faktoren eine Rolle bei der Durchführung. Das ERG hat wiederum den großen Vorteil, dass es eine objektive Methode ist und an Mensch und Tier gleichermaßen durchgeführt werden kann.

### 1.5. Die Elektroretinographie

Im Jahre 1865 entdeckte der schwedische Wissenschaftler Holmgren, dass ein Lichtstimulus im Amphibienauge zu einer elektrischen Potentialänderung führte. Diese lichtinduzierte elektrische Aktivität des Auges wurde als Elektroretinogramm bezeichnet. Ursächlich hierfür sind Ionenströme zwischen den unterschiedlichen Schichten der Retina. Durch die parallele Anordnung gleichartiger Zelltypen summieren sich diese. Dadurch kommt es zur Entstehung elektrischer Felder zwischen der Augentrückseite und der Kornea. Bei Belichtung der Retina ändern sich die Membranströme bestimmter Zellklassen und es kommt zu einer Spannungsänderung, die einen stereotypen

Verlauf zeigt und teilweise einzelnen Zellpopulationen zugeordnet werden kann. Ein vereinfachtes Schema dieses elektrischen Stromkreises zeigt Abbildung 7.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des elektrischen Stromkreises am Auge.**

**A:** Die Abbildung zeigt die extrazellulären Ströme, welche durch Lichtstimulation der Retina hervorgerufen werden:  $I_1$  zeigt den intraretinal fließenden Strom, der zwischen den Punkten A und B entsteht.  $I_2$  durchquert den Glaskörper, tritt an der Kornea aus, und kehrt in die Retina zurück nach Passage der Choroidea und des retinalen Pigmentepithels. **B:** Der elektrische Stromkreis und die elektrischen Widerstände im Bereich des Auges: R1 entspricht dem Widerstand der Retina, R2 dem des Glaskörpers, der Linse und der Kornea, R3 dem der extraokularen Strukturen und R4 dem des retinalen Pigmentepithels, welches den größten Widerstand verursacht.

Das ERG wird zur objektiven Beurteilung der retinalen Funktion angewendet. Im Falle des Ganzfeld-ERG wird die Retina einheitlich beleuchtet, woraufhin ein externes elektrisches Summenpotential am Auge abgeleitet werden kann, indem eine Elektrode auf der Kornea und eine weitere auf der Haut der ipsilateralen Schläfe bzw. zwischen den Augen positioniert werden. Dadurch lassen sich generalisierte Störungen leichter als lokal begrenzte nachweisen. Um gezielt die Funktion einzelner Zellklassen der Retina zu untersuchen, werden die Reizbedingungen modifiziert. Beispielhaft erwähnt sei an dieser Stelle die Dunkeladaptation zur Untersuchung des Stäbchensystems oder die Helladaptation zur Untersuchung des Zapfensystems. Elektoretinographische Untersuchungen werden unter anderem bei der Diagnostik degenerativer retinaler Erkrankungen, bei toxischen Reaktionen und zur funktionellen Beurteilung der Netzhaut im Tiermodell durchgeführt (Heckenlively & Arden, 2006).

### 1.5.1. Die a-Welle

Die negative a-Welle wird durch die Hyperpolarisation der Photorezeptoren bei Einfall von Licht hervorgerufen (Penn & Hagins, 1969). Die Gipfelzeit beträgt 8 - 20 ms und ist abhängig, wie die anderen Komponenten des ERG auch, von der Spezies, dem Adaptationszustand der Retina und von der Stärke des Lichtstimulus. Die a-Welle kann nur mit relativ hellen Blitzen aufgezeichnet werden, die genügend viele Photorezeptoren stimulieren, da sonst kein adäquates Signal hervorgerufen wird. Bei Untersuchungen an Primaten konnte gezeigt werden, dass zumindest im helladaptierten ERG auch Zellen, die den Photorezeptoren nachgeschaltet sind, eine Rolle bei der Generierung der a-Welle spielen (Bush & Sieving, 1994).

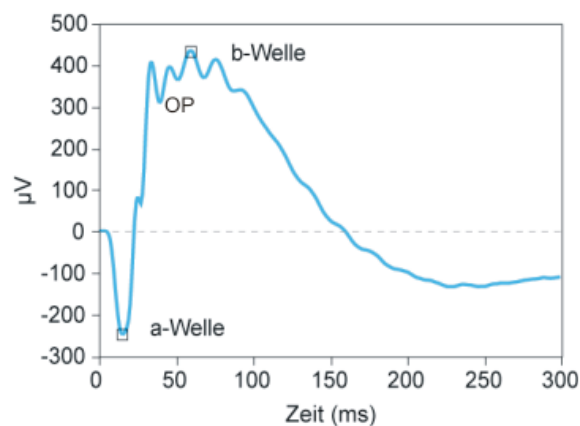
### 1.5.2 Die b-Welle

Die Komponente des ERGs mit der größten Amplitude ist die korneapositive b-Welle und wird vornehmlich von den hyperpolarisierenden ON-Bipolarzellen generiert (Gurevich & Slaughter, 1993; Knapp & Schiller, 1984; Stockton & Slaughter, 1989). Eine Beteiligung der Horizontalzellen (Hanitzsch *et al.*, 2004), der Müllerzellen (Newman & Odette, 1984) und der amakrinen Zellen (Dong & Hare, 2002) wird diskutiert. Die maximale Amplitude der b-Welle liegt zwischen 60 und 120ms.

### 1.5.3 Die oszillatorischen Potentiale

Bei Einfall von relativ starkem Licht kommt es zum Auftreten von hochfrequenten Oszillationen im aufsteigenden Schenkel der b-Welle. Diese werden als oszillatorische Potentiale (OP) bezeichnet und sind im dunkel- und helladaptierten Zustand nachzuweisen. Sowohl das Zapfen- als auch das Stäbchensystem scheinen an der Generierung der OP beteiligt zu sein (Peachey *et al.*, 1987, Rousseau *et al.*, 1999). Die Frequenz und die Anzahl, in der Regel treten zwischen 4 und 10 OP auf, können variieren. Der Ursprung der OP liegt postsynaptisch der Photorezeptoren (Yonemura *et al.*, 1974) in der inneren Retina. Welche Zellen allerdings die OP hervorrufen und ob alle OP

von denselben Zellen generiert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Voraussichtlich werden sie durch Interaktionen zwischen amakrinen, Bipolaren- und Ganglienzellen hervorgerufen (Wachtmeister & Dowling, 1978; Heynen *et al.*, 1985). Neuere Ergebnisse deuten auch auf einen Einfluss der Photorezeptoren bei der Entstehung der OP hin (Dong *et al.*, 2004). Die OP scheinen sehr sensitiv auf retinale Ischämie zu reagieren und sind die ERG-Komponenten, die am frühesten bei Diabetes mellitus pathologisch verändert sein können (Sakai *et al.*, 1995). Zahlreiche Studien belegen, dass die OP ein Indikator der neuronalen Adaptation im Rahmen der retinalen Entwicklung darstellen und möglicherweise eine Reifung des Neurotransmittersystems anzeigen (Wachtmeister, 1998).



**Abb. 8: Beispiel eines dunkeladaptierten ERGs der Ratte.**

Man erkennt die a-Welle als negative Amplitude und die darauf folgende b-Welle mit den OP am aufsteigenden Schenkel der b-Welle.

#### 1.5.4. Weitere Komponenten des ERGs

Die im Folgenden genannten ERG-Komponenten nehmen in der Diagnostik einen geringeren Stellenwert ein. Da sie meist schwierig zu registrieren sind, haben sie eher wissenschaftliche Bedeutung.

- **Die skotopische Schwellenantwort (scotopic threshold response: STR)**

Bei Lichteinfall von geringer Intensität kommt es im dunkeladaptierten Zustand der Retina zu einer negativen Potentialänderung (Sieving *et al.*, 1986; Sieving & Nino, 1988; Saszik *et al.*, 2002). Diese Potentialänderung, welche sensitiver als die b-Welle ist und bei



niedrigeren Lichtintensitäten gesättigt ist, wird die skotopische Schwellenantwort genannt. Das STR scheint von proximalen Anteilen der Retina gebildet zu werden (Sieving *et al.*, 1986).

- **Die c-Welle**

Die c-Welle ist ein korneapositives Potential, welches ca. 1 Sekunde nach Beendigung des Lichteinfalls auftritt. Sie resultiert aus einem Anstieg des transepithelialen Potentials im RPE. Dadurch kann die c-Welle Information über die Funktion des RPE zu liefern (Wu *et al.*, 2004).

- **Die d-Welle**

Die korneapositive d-Welle tritt nach Beendigung einer länger andauernden Lichtstimulation (mindestens 100 ms) im hell adaptierten Zustand der Retina auf. Es wird vermutet, dass der Ursprung der d-Welle in den OFF-Zentrum-Bipolarzellen liegt (Xu & Karwoski, 1995; Sieving *et al.*, 1994; Bush & Sieving, 1994).

- **Die m-Welle**

Die m-Welle tritt bei Beginn und am Ende der Lichtstimulation eines helladaptierten Auges auf und kann als negatives Potential abgeleitet werden. Vermutlich repräsentiert die m-Welle Änderungen des Membranpotentials der Müllerzellen, hervorgerufen durch Kalium-Konzentrationsänderungen im retinalen Extrazellulärraum (Karwoski & Proenza, 1980; Newman & Karwoski, 1989).

### 1.5.5. Das helladaptierte Flicker-ERG

Eine Möglichkeit, die Funktion der Zapfen getrennt von der Funktion der Stäbchen zu untersuchen, bietet das helladaptierte Flicker-ERG. Hierbei bedient man sich der Helladaptation und dem bei Stäbchen im Vergleich zu den Zapfen niedrigeren temporalen Reizaufklärungsvermögen. So können Stäbchen lediglich Frequenzen bis ca. 15 Hz getrennt wahrnehmen, wohingegen Zapfen Reize bis zu einer Frequenz von 50 Hz oder mehr einzeln unterscheiden können (Dodt, 1951). Bei Ratten eignet sich eine Stimulusfrequenz von 20 Hz zur Separation der Zapfen von den Stäbchen (Goto *et al.*, 1998).

### 1.6. Motivation für diese Arbeit

In den letzten Jahren ist ein wachsendes wissenschaftliches Interesse an der Erforschung des visuellen Zyklus zu verzeichnen (Cideciyan *et al.*, 1997; Golczak *et al.*, 2005; Cideciyan *et al.*, 2004; Cideciyan *et al.*, 2000; Cideciyan *et al.*, 1998; Grimm *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2001; Grimm *et al.*, 2004; Grimm *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005; Lamb & Pugh, Jr., 2004; Lamb & Pugh, Jr., 2006; Nilsson *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2006a; Suter *et al.*, 2000; Saari *et al.*, 1994). Ein wichtiger Grund hierfür ist die Erkenntnis, dass Zwischenprodukte dieses Zyklus, allen voran das Lipofuszin (Delori *et al.*, 2000; Dorey *et al.*, 1989; Sparrow *et al.*, 2003; Seeliger *et al.*, 2001; Suter *et al.*, 2000), eine Rolle bei der Entstehung retinaler Degenerationserkrankungen zu spielen scheinen.

Hervorzuheben sind die Krankheiten, bei denen Mutationen des ABCA4 Gens beteiligt sind. ABCA4 wird spezifisch in den Außensegmenten der Photorezeptoren exprimiert (Molday *et al.*, 2000) und kodiert ein transmembranes Transporterprotein, welches all-trans-Retinal von der luminalen Seite der Disci zu deren zytosolischen Seite befördert (Sun *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass sich all-trans-Retinal spontan mit Phosphatidylethanolamin (PE) zu N-retinyliden-PE (NrPE) via einer Schiffchen-Base verbindet (Anderson & Maude, 1970). Daraufhin kann sich ein zweites all-trans-Retinal an das PE anlagern und führt zur Bildung von A2-PE (Ben-Shabat *et al.*, 2002). Durch weitere chemische Veränderungen von A2-PE kommt es zur Produktion von N-retinyliden-N-retinylethanolamin (A2-E), welches den Hauptbestandteil von Lipofuszin bildet.

Es sind keine Enzyme bekannt, die in der Lage sind A2-PE oder A2-E abzubauen, und somit kommt es zur Akkumulation dieser Stoffe im RPE und Photorezeptoren mit einer konsekutiven Schädigung dieser Strukturen. ABCA4 Mutationen wurden bei Patienten mit autosomal rezessiver Stargardt-erkrankung (Allikmets *et al.*, 1997b), Zapfen-Stäbchen Dystrophie (Papaioannou *et al.*, 2000) und Retinitis pigmentosa (Cremers *et al.*, 1998) gefunden. Weiterhin wird vermutet, dass auch eine heterozygote ABCA4 Mutation eine Prädisposition für

das Auftreten der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) darstellt (Allikmets *et al.*, 1997a).

Bisher gibt es noch keine befriedigende Therapie dieser Erkrankungen. Ein neuerer Therapieansatz besteht darin, durch Modulation des visuellen Zyklus die Retina vor Degeneration zu bewahren, z. B. durch Accutane (Sieving *et al.*, 2001; Radu *et al.*, 2003), einem Inhibitor der 11-cis-RDH oder durch Hemmung der Isomerase (Golczak *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006a). Die grundlegende Idee dahinter ist, eine Verlangsamung des visuellen Zyklus zu bewirken und somit auch eine verminderte Produktion des Lipofuszins (Messias *et al.*, 2008). Zur Untersuchung auftretender funktioneller Effekte dieser Stoffe auf den visuellen Zyklus stellt das ERG eine geeignete Methode dar.

### 1.7. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein auf klinischen Standardgeräten verwendbares ERG-Protokoll zu erstellen, mit dem an gesunden Ratten Normwerte der Erholung des visuellen Zyklus nach Photopigmentbleichung erhoben werden können. Dazu war es zunächst nötig, optimale Reizparameter wie Stimulusintensität und -dauer, Interstimulusintervall (ISI; Zeitintervall zwischen zwei Lichtstimuli), und die Dauer und Intensität der Photopigmentbleichung zu definieren. Diese Normwerte können dann in zukünftigen Studien, bei denen die Funktion des visuellen Zyklus untersucht werden soll, als Vergleich dienen; beispielsweise bei Studien zur Testung der Toxizität neuer Substanzen oder auch zum Wirksamkeitsnachweis für Medikamente, bei denen ein Eingreifen in den Rhodopsinzyklus postuliert wird. Weiterhin ist es möglich, die Integrität des Zyklus bei bestimmten Erkrankungen im Tiermodell zu erforschen. Die Übertragung der Versuchsparameter und die Erstellung von Normwerten im Menschen muss das Ziel weiterer Arbeiten sein.

## 2. Material und Methoden

Alle Versuche unterlagen den Bestimmungen des Tierschutzes und waren vom Regierungspräsidium Baden-Württemberg genehmigt (Tierversuch Nr. AK 1/06).

### 2.1. Die Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 38 weibliche Wildtyp Brown Norway Ratten (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Zu Beginn der Experimente befanden sich die Tiere in einem Alter von 6 bis 8 Wochen. Ihr Gewicht betrug im Durchschnitt  $153,8 \text{ g} \pm 11,1 \text{ g}$ . Im Tierstall wurden die Ratten in einem zirkadianen Rhythmus gehalten (12 Stunden dunkel, 12 Stunden hell).

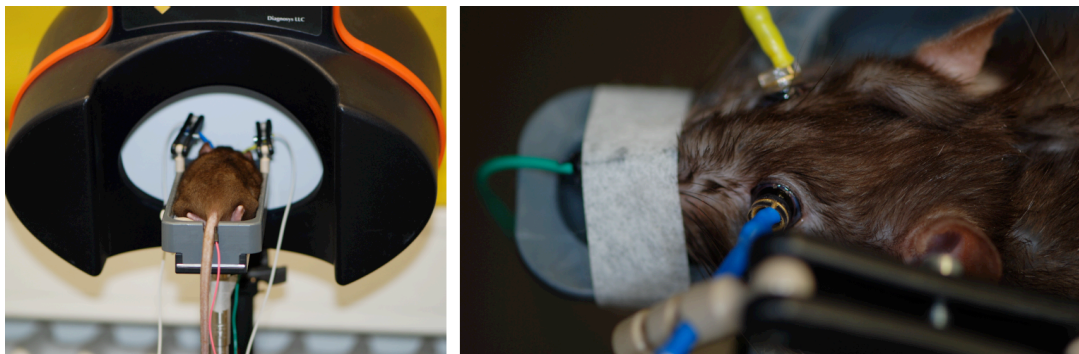
### 2.2. Messung des kornealen ERGs

#### 2.2.1. Dunkeladaptation und Narkose

Die Versuchstiere wurden vor den Messungen 12 Stunden dunkel adaptiert. Unter schwacher Rotlichtbeleuchtung (Glühbirne „dark red“ Philips, 230 V) wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion bestehend aus Ketaminhydrochlorid (Ketavet<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht und Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach einer Stunde erfolgte abermals eine anästhetische Injektion subkutan, dieses Mal aber nur ein Drittel des initialen Volumens. Die Pupillen wurden mittels eines Tropfens Tropicamid (Mydriaticum Stulln<sup>®</sup>, Pharma Stulln, Stulln, Deutschland) dilatiert und die Kornea mittels 0,4% Oxybuprocainhydrochlorid (Novesine<sup>®</sup>, Novartis, Nürnberg, Deutschland) lokal betäubt. Um das Austrocknen der kornealen Oberfläche zu vermeiden, wurde ein Methylcellulose-Gel (Methocel<sup>®</sup> 2%, Novartis, Nürnberg, Deutschland) auf diese aufgetragen.

### 2.2.2. Der Messaufbau

Die narkotisierten Tiere wurden auf einem beweglichen Schlitten positioniert. Um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden sie auf ein Heizkissen gelegt und die Raumtemperatur konstant bei 25 Grad Celsius gehalten. Die Körpertemperatur der Ratten wurde mit einem rektalen Thermometer (Digitalthermometer GTH 1170, NiCr-Ni (Typ k), Greisinger electronic, Regenstauf, Deutschland) überwacht und lag zwischen 35 und 37 Grad Celsius. Als Messelektrode wurde eine Kontaktlinse verwendet, welche einen feinen Golddraht umfasste (hergestellt von der Werkstatt der Universitätsaugenklinik Tübingen), der in direkten Kontakt zur Kornea gebracht wurde. Eine Referenzelektrode aus Stahl wurde vorsichtig unter die Kopfhaut der Tiere geschoben und befand sich zwischen den Augen. Die stählerne Erdungselektrode wurde subkutan in die Schwanzwurzel eingebracht. Die auf dem beweglichen Schlitten fixierte Ratte wurde nun in die Messvorrichtung, dem ColorDome® (ColorDome®; Diagnosys LLC, Littleton, USA), eingeschoben (Abb. 9).



**Abb. 9: Versuchsaufbau.**

Eine Ratte befindet sich auf dem beweglichen Schlitten im ColorDome® (links). Auf dem Bild rechts erkennt man die Lage der kornealen (gelb und blau) und der Referenzelektrode (grün).

### 2.2.3. Der Espion® und ColorDome®

Die Espion® Software (Hersteller: Espion intelligence, Manchester, Großbritannien) erlaubt, neben der Durchführung der standardisierten ISCEV Tests, auch die Programmierung eigener Protokolle. Ein entscheidender Vorteil hierbei ist die Programmierung von Protokollen mit der Abfolge automatischer

Sequenzen, d. h. der Abfolge eines definierten Reizes zu einem definierten Zeitpunkt. Der Verstärker hat ein Auflösungsvermögen von 12 bits. Des Weiteren ist es möglich durch die Anwendung verschiedener Filter, gezielt eine gewünschte Antwortfrequenz zu untersuchen.

Der ColorDome® ist ein Ganzfeld Stimulator, der für ERG-Messungen entwickelt wurde. Durch ein LED (light-emitting diode) System (Luminanzumfang von 0,0002 cd.s/m<sup>2</sup> bis 30 cd.s/m<sup>2</sup>), welches aus roten, grünen, blauen und gelben LEDs besteht, und ein ebenfalls integriertes Xenon System (Luminanzumfang von 0,009 cd.s/m<sup>2</sup> bis 3000 cd.s/m<sup>2</sup> ) ist es möglich, Lichtblitze in beinahe beliebigen Farben, Intensitäten und Dauern zu produzieren.

### 2.3. Das Mess-Protokoll

Das entwickelte ERG-Protokoll orientiert sich am internationalen Standard der Elektroretinographie - ISCEV (Marmor *et al.*, 2004), welcher für standardisierte ERG-Messungen am Menschen etabliert wurde. Er wurde entsprechend ergänzt, um weitere Informationen über die retinale Funktion zu erhalten, und die Besonderheiten des Rattenauges, wie z. B. die höhere Empfindlichkeit im Dunkeln im Vergleich zum Menschen, berücksichtigt. Vor Beginn und am Ende der Messungen wurde die Elektrodenimpedanz geprüft und betrug weniger als 10 k $\Omega$  bei 25 Hz, entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Alle ERG-Protokolle folgten demselben Algorithmus und unterschieden sich lediglich in der Intensität und Dauer der vorangegangenen Photopigmentbleichung (Tab. 1). Die Lichtstimuli sollten eine maximale Reizdauer von 5 ms nicht überschreiten, um nicht mit der Reizintegrationszeit der Photorezeptoren zu interferieren. Zur Ermittlung der optimalen Photopigmentbleichungsdauer und –stärke wurde das Protokoll an 13 Tieren getestet. Im zweiten Schritt erfolgte die Anwendung des Protokolls mit den Parametern der Photopigmentbleichungsgruppe E an 38 weiteren Tieren, um genauere Daten zu erheben. Zur Ermittlung der intraindividuellen Variabilität erfolgte eine zweite Messung (Messreihe 2) aller Tiere im Abstand von 7 Tagen zur ersten Messung (Messreihe 1).

**Tabelle 1:** Übersicht über das verwendete ERG-Messprotokoll. ISI: Interstimulusintervall

Schritt	Beschreibung	Dauer
Dunkeladaptation		12 Stunden
Narkose	Unter schwacher Rotlichtbeleuchtung intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/ kg KG Xylazin	2 min
Anästhesie der Kornea	1 Tropfen Novesine®	
Pupillendilatation	1 Tropfen Tropicamid	15 min
Erneute Dunkeladaptation nach der Vorbereitung	Nach dem Plazieren der Elektroden wurde das Rotlicht ausgeschaltet	10 min
ERG-Protokoll		
1	dunkeladaptiertes ERG Lichtstimulus von 0,000003 bis zu 0,03 cd.s/m <sup>2</sup> (4 ms Stimulusdauer) in 9 Schritten – ISI 10-40 sec je nach Stimulusstärke Einzelblitz mit 10 cd.s/m <sup>2</sup> zum Erhalt der Maximalantwort	18 min
2	Untersuchung der Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung Testblitz mit 3 cd.s/m <sup>2</sup> (Xenon) gefolgt von einem Untersuchungsblitz mit 30 cd.s/m <sup>2</sup> ISI: 200, 400, 600, 1000, 1200, 1400 oder 4000 ms Zeitdauer zwischen den einzelnen Schritten = 120 sec	16 min
3.1	Pre-Photopigmentbleichung Dreimalige Wiederholung zweier Lichtblitze alle 2,5 min: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blitz <math>\beta</math>: 0,003 cd.s/m<sup>2</sup> - semi-saturierte Stäbchen b-Welle</li> <li>• Blitz <math>\alpha</math>: 10 cd.s/m<sup>2</sup> - saturierte gemischte a-Welle</li> </ul> ISI: 1 sec	8 min
3.2	Photopigmentbleichung Einteilung der Tiere in 6 verschiedene Gruppen entsprechend der Photopigmentbleichungs-Intensität und Dauer: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A: 2.5 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec</li> <li>• B: 10 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec</li> <li>• C: 100 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec</li> <li>• D: 250 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec</li> <li>• E: 400 cd/m<sup>2</sup> - 30 sec</li> <li>• F: 500 cd/m<sup>2</sup> - 60 sec</li> </ul>	
4	Doppelblitz zur Evaluation der Rhodopsinregeneration Zwei Lichtblitze alle 2,5 min: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blitz <math>\beta</math>: 0,003 cd.s/m<sup>2</sup> - semi-saturierte Stäbchen b-Welle</li> <li>• Blitz <math>\alpha</math>: 10 cd.s/m<sup>2</sup> - saturierte gemischte a-Welle</li> </ul> Inter-flash-Intervall: 1 sec	16 bis 70 min
5	Helladaptation Ganzfeldhintergrundsbeleuchtung: 25 cd/m <sup>2</sup>	10 min
6	helladaptiertes ERG 10 cd.s/m <sup>2</sup> (4 ms) - Einzelblitz + 20 Hz Flicker	1 min

### 2.3.1. Dunkeladaptiertes ERG

Zur Bestimmung der Dunkeladaptation der Tiere wurde ein Protokoll angewendet, welches aus Lichtblitzen mit einem Lichtumfang von 0,000003 bis 0,03 cd.s/m<sup>2</sup> bestand und beginnend mit dem schwächsten Reiz in aufsteigender Lichtintensität dargeboten wurde. Die Stimulusdauer betrug jeweils 4 ms. Ziel war es, Antworten von der Grundlinie (d. h. b-Welle nicht detektierbar) bis hin zur saturierten b-Welle zu erhalten. Durch Korrelation der dunkeladaptierten b-Wellenamplitude und der Intensität des jeweiligen Lichtblitzes wurde eine individuelle Hill-Funktion (Naka & Rushton, 1966) (siehe Kapitel 2.4.1.) berechnet. Für die ersten 4 Schritte (0,00003 bis 0,00001 cd.s/m<sup>2</sup>) wurde ein Mittelwert aus 15 Antworten gebildet mit einem ISI von 10 Sekunden; für die nächsten 4 Schritte (0,0003 bis 0,03 cd.s/m<sup>2</sup>) wurde der Mittelwert aus 5 Antworten gebildet mit einem ISI von 25 Sekunden. Anschließend erfolgte ein Einzelblitz mit einer Helligkeit von 10 cd.s/m<sup>2</sup>, um die gemischte maximale ERG-Antwort von Zapfen und Stäbchen im dunkeladaptierten Zustand zu erhalten.

### 2.3.2. Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung

Dieser Schritt wurde durchgeführt, um die Kinetik der Erholungszeit der Stäbchen im dunkeladaptierten Zustand nach kurzer Desensibilisierung (verbrauchtes Rhodopsin weniger als 0,5 % des gesamten Rhodopsingehalts (Phipps *et al.*, 2006)) zu ermitteln. Hierzu wurde ein Testblitz (Xenon; 3 cd.s/m<sup>2</sup>) zum Zeitpunkt  $T_t = 0$  emittiert, gefolgt von einem Untersuchungsblitz (Xenon; 30 cd.s/m<sup>2</sup>) zu den Zeitpunkten  $T_p = 200, 400, 600, 1200, 1400$  oder 4000 ms. Zwischen einem Intervall (Test- und Untersuchungsblitz) erfolgte eine Pause von 120 Sekunden, um etwaige Einflüsse des Untersuchungsblitzes auf den folgenden Testblitz zu vermeiden.

### 2.3.3. Photopigmentbleichung

Vor der Photopigmentbleichung wurden 3 Messungen im dunkeladaptierten Zustand durchgeführt, um die Amplituden der a- und b-Wellen direkt vor der Photopigmentbleichung zu ermitteln (Pre-Photopigmentbleichung). Die



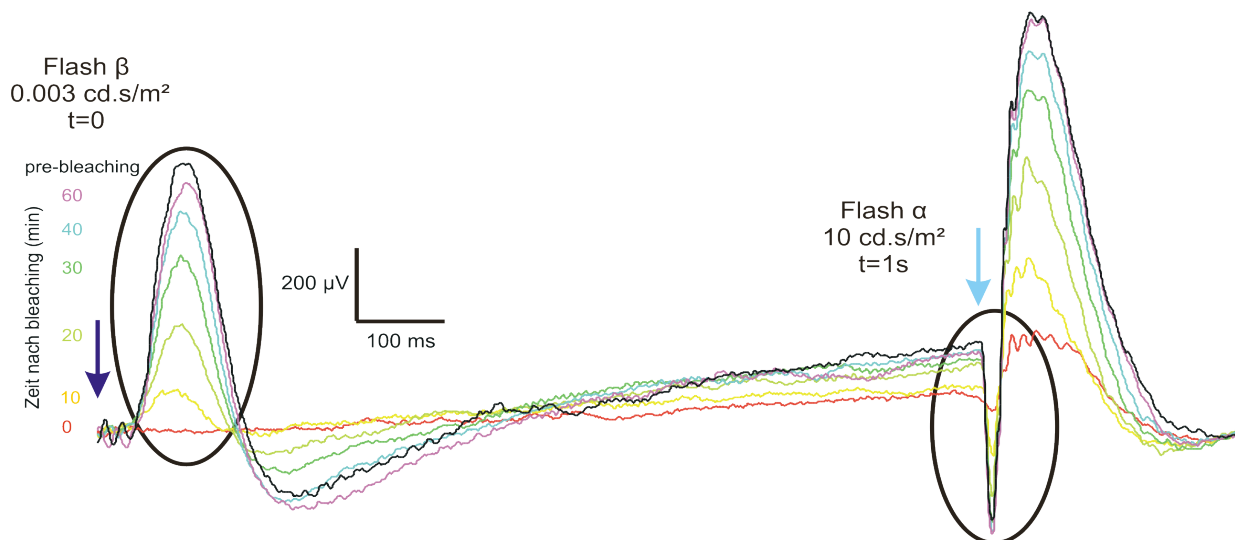
Stimulusstärke und -dauer entsprechen denen der Blitze  $\alpha$  und  $\beta$  (siehe 2.3.4.). Daraufhin erfolgte die Exposition mit intensivem weißem Licht, der so genannten Photopigmentbleichung. Die Tiere wurden in 6 verschiedene Gruppen (A bis F) eingeteilt, entsprechend der Lichtintensität und Dauer der Photopigmentbleichung:

- A: 2.5 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec
- B: 10 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec
- C: 100 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec
- D: 250 cd/m<sup>2</sup> - 25 sec
- E: 400 cd/m<sup>2</sup> - 30 sec
- F: 500 cd/m<sup>2</sup> - 60 sec

### 2.3.4. Erholung der a- und b-Wellenamplitude nach der Photopigmentbleichung

Die Erholung der a- und b-Welle nach der Photopigmentbleichung wurde über 70 Minuten hinweg beobachtet. Alle 2,5 Minuten erfolgte eine Messung. Ein Doppelblitz-Protokoll wurde durchgeführt, um eine semi-saturierte b-Welle (Blitz  $\beta$ ) und eine gemischte a-Welle (Blitz  $\alpha$ ) zu erhalten. Die Stimulusstärke von Blitz  $\beta$  betrug 0,003 cd.s/m<sup>2</sup> (weißes Licht) mit einer Stimulusdauer von 4 ms. Um eine Photopigmentbleichung durch den relativ starken Blitz  $\alpha$  (10 cd.s/m<sup>2</sup>) zu vermeiden, wurde für Blitz  $\alpha$  Xenon als Lichtquelle verwendet. Hierbei kann eine extrem kurze Stimulusdauer von 50  $\mu$ s erreicht werden.

Vorausgehende eigene Untersuchungen hatten gezeigt, dass ein ISI von 2,5 Minuten zwischen Blitz  $\alpha$  und Blitz  $\beta$  ausreichend ist, um eine Helladaptation und damit eine Einflussnahme durch den Blitz  $\alpha$  auf den nächsten Blitz  $\beta$  zu vermeiden.



**Abb. 10: Messung der Erholung der a- und b-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung ( $400 \text{ cd/m}^2 - 30 \text{ sec}$ ) mittels Doppelblitz-Technik.**

Durch Anwendung der Doppelblitz-Technik ist es möglich, zeitgleich die Regeneration der b- und a-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung zu erfassen. Durch einen schwachen, nur die Stäbchen erregenden Flash  $\beta$  ( $0,003 \text{ cd.s/m}^2$ ) zum Zeitpunkt 0 und einem darauffolgenden stärkeren Flash  $\alpha$  ( $10 \text{ cd.s/m}^2$ ), der sowohl die Stäbchen als auch die Zapfen erregt, wird alle 2,5 Minuten eine Messung durchgeführt. Als Ausgangswert dient eine direkte Messung der a- und b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung (schwarze Linie). Ein Anstieg der a- und b-Wellenamplitude im Laufe der Zeit ist zu verzeichnen.

Zur Bestimmung des ISI zwischen Blitz  $\beta$  und Blitz  $\alpha$  wurde eine separate Versuchsreihe (2 Tiere; Standardabweichung  $< 10\%$ ) durchgeführt mit den oben definierten Blitzintensitäten und ansteigenden ISI. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein ISI von 600 ms ausreichend ist, um eine Einflussnahme des Blitzes  $\beta$  auf den Blitz  $\alpha$  zu vermeiden (Abb. 11). Um jedoch keinerlei Risiko einzugehen, wurde ein ISI von 1000 ms bei der Durchführung des hier vorgestellten Protokolls gewählt.

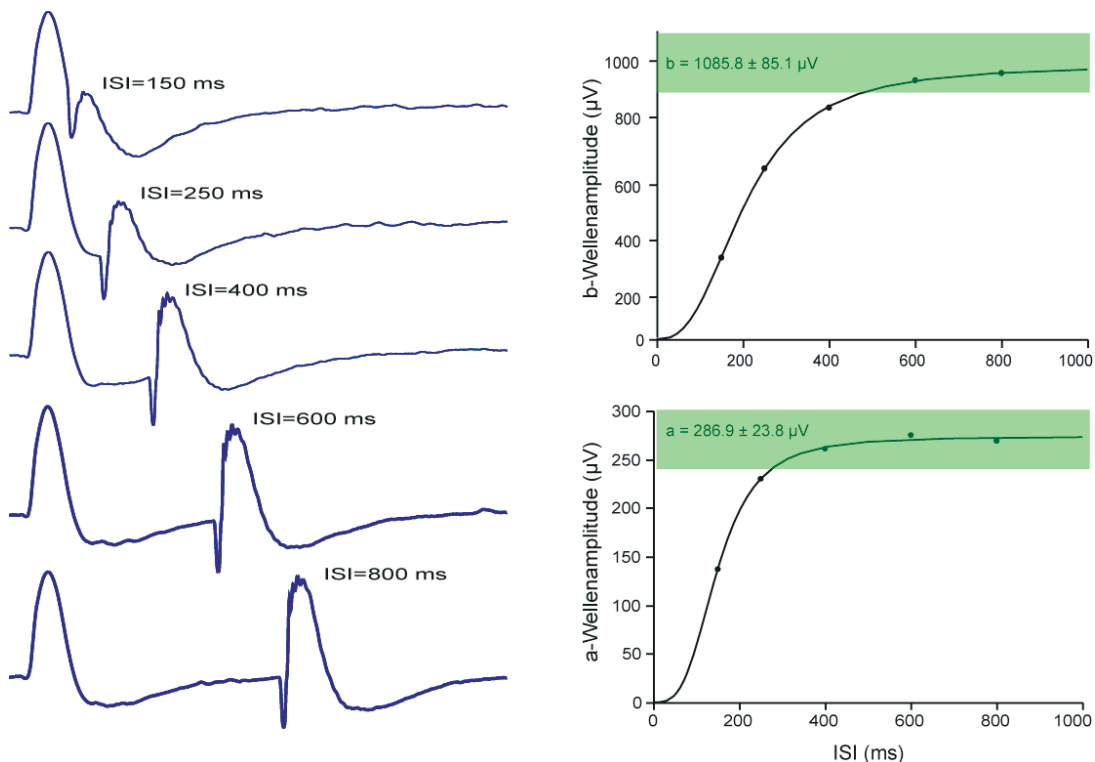
### 2.3.5. Helladaptation

Die Tiere wurden über 10 Minuten durch eine Ganzfeldbeleuchtung von  $25 \text{ cd.s/m}^2$  (weißes Licht - 6500 K) helladaptiert. Durch die Helladaptation und der damit erfolgenden Sättigung der Stäbchen ist es möglich, im ERG eine isolierte Antwort der Zapfen zu registrieren.

### 2.3.6. Helladaptiertes ERG

Die lichtadaptierten ERG-Messungen erfolgten in 2 Schritten:

- Einzelblitz-Zapfen-ERG mit einer Stimulusstärke von  $10 \text{ cd.s/m}^2$  (weißes Licht - 6500 K) und einer Stimulusdauer von 4 ms. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus jeweils 10 Messungen mit einem ISI von 10 Sekunden dar.
- Durchführung eines Flicker-ERGs mit einer Lichtintensität von  $10 \text{ cd.s/m}^2$  (weißes Licht - 6500 K) bei 20 Hz. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus jeweils 50 Messungen dar.



**Abb. 11: Ergebnisse der Versuchsreihe zur Bestimmung des benötigten ISI beim Doppelblitz-Protokoll.**

Um das benötigte ISI zwischen Blitz  $\beta$  und Blitz  $\alpha$  zu ermitteln, wurde das ISI bestimmt, bei dem keine Einflussnahme des Blitzes  $\beta$  auf den Blitz  $\alpha$  mehr zu ermitteln war. Beginnend bei einem ISI von 150 ms, welches sich bis maximal 800 ms steigerte, konnte gezeigt werden, dass 600 ms ausreichen, um dieses zu verhindern. Auf der rechten Seite sind die Amplituden der a- und b-Welle im Verhältnis zu den verschiedenen ISI gesetzt worden und man kann erkennen, dass bei einem ISI von 600 ms, die Amplituden dieselben Werte erreichen, wie die Amplituden der dunkeladaptierten Antworten (grün unterlegt), die vorab schon bestimmt worden waren.

## 2.4. Auswertung

Eine Auswertungssoftware (Delphi 7.0 Enterprise – Borland 2002), welche automatisch die a- und b-Wellenamplituden und deren Gipfelzeiten ermittelt, wurde von einem Labormitarbeiter eigens entwickelt (André Messias).

Unter dunkeladaptierten Bedingungen wurde festgelegt, dass der a-Welle das minimale Potential zwischen 0 und 50 ms entspricht und der b-Welle das maximale Potential zwischen 35 und 120 ms minus der a-Wellenamplitude. Unter helladaptierten Bedingungen wurde die a-Welle als das Minimum zwischen 0 und 30 ms und die b-Welle als das Maximum zwischen 20 und 60 ms minus der a-Wellenamplitude definiert. Die vom Computer ausgewerteten Daten wurden manuell gesichtet, um sicherzustellen, dass die richtigen Amplitudengipfel ermittelt wurden. Gegebenenfalls wurden die Zeitintervalle angepasst, um die tatsächlichen Gipfelzeiten zu erhalten. Im Folgenden wird die Auswertung der separaten Protokollschritte beschrieben.

### 2.4.1. Die dunkeladaptierten Sensitivitätsparameter

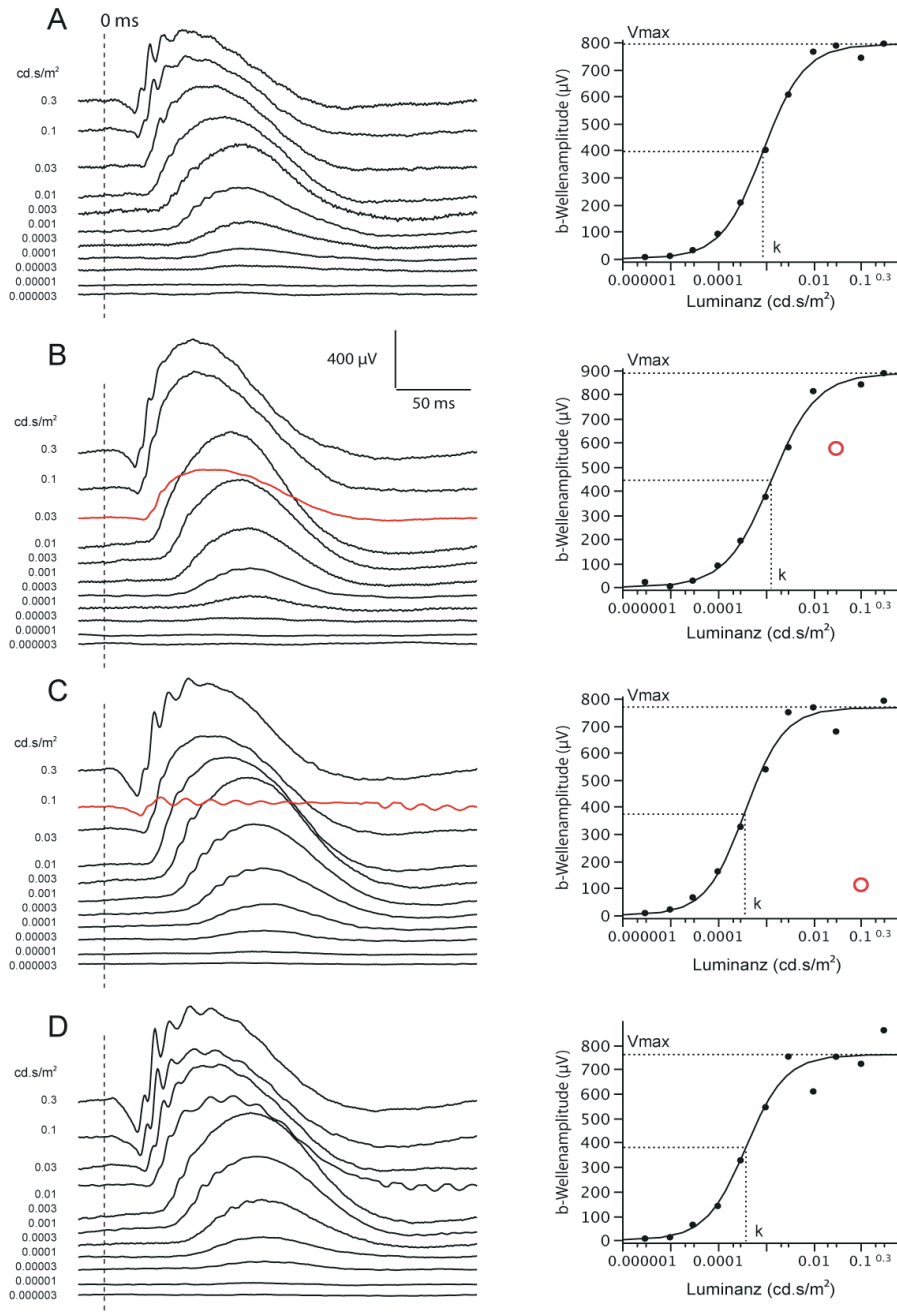
Ein hyperbolisches Sättigungsmodell nach Hill (Naka & Rushton, 1966) wurde angewandt, um den Zusammenhang der b-Wellenamplitude und der Lichtintensität ( $I$ ) zu ermitteln. Hieraus erfolgte die Bestimmung von 3 Parametern:  $V_{\max}$  – saturierte b-Wellenamplitude;  $k$  – benötigte Lichtintensität zum Erreichen der Hälfte von  $V_{\max}$  (Halbsättigungspunkt);  $n$  – Parameter, welcher mit der linearen Steigung zusammenhängt (Gleichung 1).

$$(Gleichung 1) \quad V(I) = \frac{V_{\max} \times I^n}{I^n + k^n}$$

**Gleichung 1:**  $V$  ist die erwartete b-Wellenamplitude in Abhängigkeit von  $I$ .  $I$  entspricht der Lichtintensität,  $V_{\max}$  der saturierten b-Wellenamplitude,  $k$  der Lichtintensität, welche zum Erreichen der Hälfte von  $V_{\max}$  benötigt wird, und  $n$  ein Parameter, der ein Maß der Steigung darstellt.

Die Abbildung 12 zeigt vier konkrete Beispiele verschiedener Tiere der Anpassung der Hill-Funktion. Links sieht man die Originalmesskurven und rechts die daraus errechnete b-Wellenamplitude in Abhängigkeit der

Lichtintensität. Man kann hierbei deutlich erkennen, wie wichtig es ist, die vom Computer ausgewerteten Daten manuell zu sichten, „Ausreißer“ zu erkennen, zu interpretieren und ggf. auszuschließen.

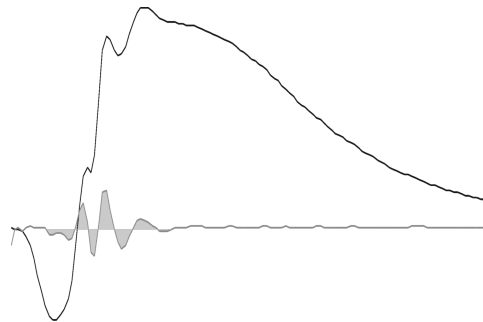


**Abb. 12. Vier konkrete Beispiele verschiedener Tiere bei der Anpassung der Hill-Funktion.**

**A:** Beispiel ohne Artefakt. Keine Intervention nötig; **B und C:** unerwartet niedrige Amplitude bei 0,03 bzw. 0,1 cd/m<sup>2</sup>, möglicherweise hervorgerufen durch eine interferierende Atembewegung, welche die Elektrodenplatzierung kurzzeitig verändert, oder einem Ausfall des Verstärkers. **D:** moderate Variabilität der Antworten bei höheren Lichtintensitäten, allerdings dennoch gute Anpassung durch das Modell möglich.

### 2.4.2. Die oszillatorischen Potenziale (OP)

Die OP wurden aus der dunkeladaptierten Maximalantwort berechnet, indem mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation (FFT) ein Frequenzfilter angewendet wurde. Das Frequenzintervall erstreckt sich von 75 Hz bis 300 Hz. Als Programm wurde Delphi (Version 7.0 – Borland 2002, Programmierer: André Messias) verwendet. Der Absolutwert der Fläche ( $\mu\text{V}\cdot\text{ms}$ ) zwischen a- und b-Welle wurde berechnet (Abb. 13).



**Abb. 13: Beispiel für OP**, die mittels der FFT (Fast Fourier Transformation) aus dem aufsteigenden Ast der b-Welle gefiltert werden (75 – 300 Hz). Die graue Fläche wird berechnet (AUC: area under the curve).

### 2.4.3. Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung

Die a-Wellenamplitude des Untersuchungsblitzes, der auf den Testblitz folgte, wurde durch die Wellenamplitude des Untersuchungsblitzes ohne vorhergehenden Testblitz dividiert und ergab die sog. normalisierten Werte (Gleichung 2). Durch Anwendung einer hyperbolischen Funktion war es möglich, das Interstimulusintervall zu errechnen, bei dem die a-Wellenamplitude des Untersuchungsblitzes, der auf den Testblitz folgte, 75 % der a-Wellen-Amplitude des Untersuchungsblitzes alleine ergab. Durch die Messung der Stäbchenerholungszeit nach kurzer Desensibilisierung lässt sich eine Aussage über die Photorezeptorenreaktivierungskinetik treffen (siehe Kapitel 4.1.3.).

$$(Gleichung 2) \quad \frac{a_{probe}}{a_{probe \text{ alleine}}} = \frac{ISI}{ISI + t_{75}}$$

**Gleichung 2:**  $a_{probe}$  entspricht der a-Wellenamplitude des Untersuchungsblitzes nach einem Testblitz, und  $a_{probe \text{ alleine}}$  der a-Wellenamplitude bei voll dunkeladaptierten Augen;  $t_{75}$  ist das Interstimulusintervall, welches notwendig ist, damit  $a_{probe}$  75% von  $a_{probe \text{ alleine}}$  erreicht.

#### 2.4.4. Regeneration der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung

Die b-Welle des Lichtblitzes  $\beta$  und die a-Welle des Lichtblitzes  $\alpha$  wurden jeweils durch die b- und a-Wellenamplituden vor der Photopigmentbleichung dividiert und ergaben die sog. normalisierten Werte.

Die Amplituden der a- und b-Welle nach der Photopigmentbleichung wurden durch die individuelle Amplitude vor der Photopigmentbleichung dividiert und ergab die normierte Amplitude ( $A_N$ ). Ein exponentielles Modell wurde angepasst, um  $T_{50\%}$  (Zeit zum Erreichen von 50% der Amplitude vor der Bleichung) zu bestimmen (Gleichung 3).

$$(Gleichung 3) \quad A_N = \frac{A}{A_p} = \frac{T^{bt}}{T_{50\%} + T^{bt}}$$

**Gleichung 3:**  $A_N$ : normierte Amplitude,  $bt$ : Parameter, welcher mit der linearen Steigung zusammenhängt,  $T$ : Zeit im Dunkeln nach der Bleichung,  $T_{50\%}$ : benötigte Zeit zum Erreichen von 50% der Amplitude vor der Bleichung.

#### 2.4.5. Helladaptiertes ERG

Nach 10-minütiger Helladaptation mit einem flächigen Lichthintergrund von 25 cd/m<sup>2</sup> in dem ColorDome® Ganzfeld Stimulator, wurden die Amplituden (b-Welle) und Gipfelzeiten der Einzelblitz-Zapfen-ERG und die Amplitude und Latenz der 20-Hz-Flicker ausgewertet. Da die Messung von Einzelblitzantworten durchgeführt wurde und für diese Arbeit die helladaptierte Zapfenantwort nicht im Vordergrund stand, erfolgte keine Anpassung an ein Modell.

## 2.5. Statistische Analyse der Normwerte

Zu jedem der ERG-Parameter wurden für die einzelnen Protokollschritte folgende Daten ausgewertet (die Auswertung aller Daten erfolgte mittels JMP 7):

### a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe

Hierbei wurden die Daten aller Tiere (n=38) verarbeitet und deren Gesamtverteilung ermittelt. Die Daten entsprechen absoluten Werten und stammen aus der ersten Messreihe.

### b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe

Hierbei wurden die erhobenen ERG-Parameter des linken und rechten Auges innerhalb eines Individuums verglichen. Die Daten stammen aus der ersten Messung und stellen absolute und prozentuale Werte dar.

### c) Intraindividueller Vergleich zweier Messreihen

Hierbei erfolgte ein intraindividueller Vergleich der ERG-Parameter anhand zweier Messungen mit einem Messintervall von 7 Tagen. Für die Daten der ersten und zweiten Messreihe diente der Mittelwert beider Augen. Die Daten sind in absoluten und prozentualen Werten angegeben.

### d) Prospektive Poweranalyse

Studien können in vielen verschiedenen Formen geplant werden, z. B. anhand einer einzigen Beobachtungsgruppe (hierbei z. B. Vergleich vor und nach Medikamentengabe) oder auch anhand dem Vergleich zweier Gruppen (Kontrollgruppe versus behandelter Gruppe).

Dieser Abschnitt soll verdeutlichen, wie man mittels der in dieser Arbeit erhobenen Daten weitere Studien planen kann. Hierfür kann man eine Poweranalyse durchführen, um z. B. die benötigte Versuchstieranzahl zu ermitteln. Um die benötigte Versuchstieranzahl mittels einer Poweranalyse herauszufinden, werden vier Parameter benötigt:

- 1.) Parameter  $\alpha$ : entspricht der Signifikanzgrenze (üblicherweise = 0.95)
- 2.) Standardabweichung der Zielvariablen (beispielhaft wurde in dieser Arbeit eine Poweranalyse mit  $V_{max}$  als Zielvariablen durchgeführt)
- 3.) Power: entspricht der Wahrscheinlichkeit zum Erreichen des Signifikanzniveaus (generelle Empfehlung = 0.8)



4.) erwartete Effektgröße: entspricht dem erwarteten Effekt einer Substanzgabe oder einer experimentellen Situation (z. B. Lichtschädigung) auf eine Zielvariable (z. B. b-Wellenamplitudenreduktion nach Gabe einer toxischen Substanz) und sollte anhand Ergebnissen von Pilotstudien oder entsprechenden Literaturangaben festgestellt werden.

Die prospektive Poweranalyse wurde mittels JMP 7.0.2 nach einem standardisierten Verfahren berechnet (Welch, 2008).

### 3. Ergebnisse

Dargestellt sind die Ergebnisse von 38 Tieren, an welchen das hier vorgestellte Protokoll mit der Photopigmentbleichungsintensität von Gruppe E ( $400 \text{ cd.s/m}^2 - 30 \text{ sec}$ ) angewandt wurde. Drei der 38 Tiere sind auf Grund von Narkosezwischenfällen verstorben. Die Ergebnisse der zuvor gemessenen 13 Ratten zur Ermittlung der geeigneten Photopigmentbleichungsparameter erscheinen lediglich im Kapitel 3.3.

#### 3.1. Dunkeladaptiertes ERG

Im dunkeladaptierten Zustand wurden Antworten auf Reize, die unterhalb der Reizschwelle liegen aufgezeichnet, um eine Grundlinie zu erhalten, und die Antwort auf Reize bei zunehmender Lichtintensität der Lichtblitze bis hin zur Sättigung der b-Wellenamplitude.

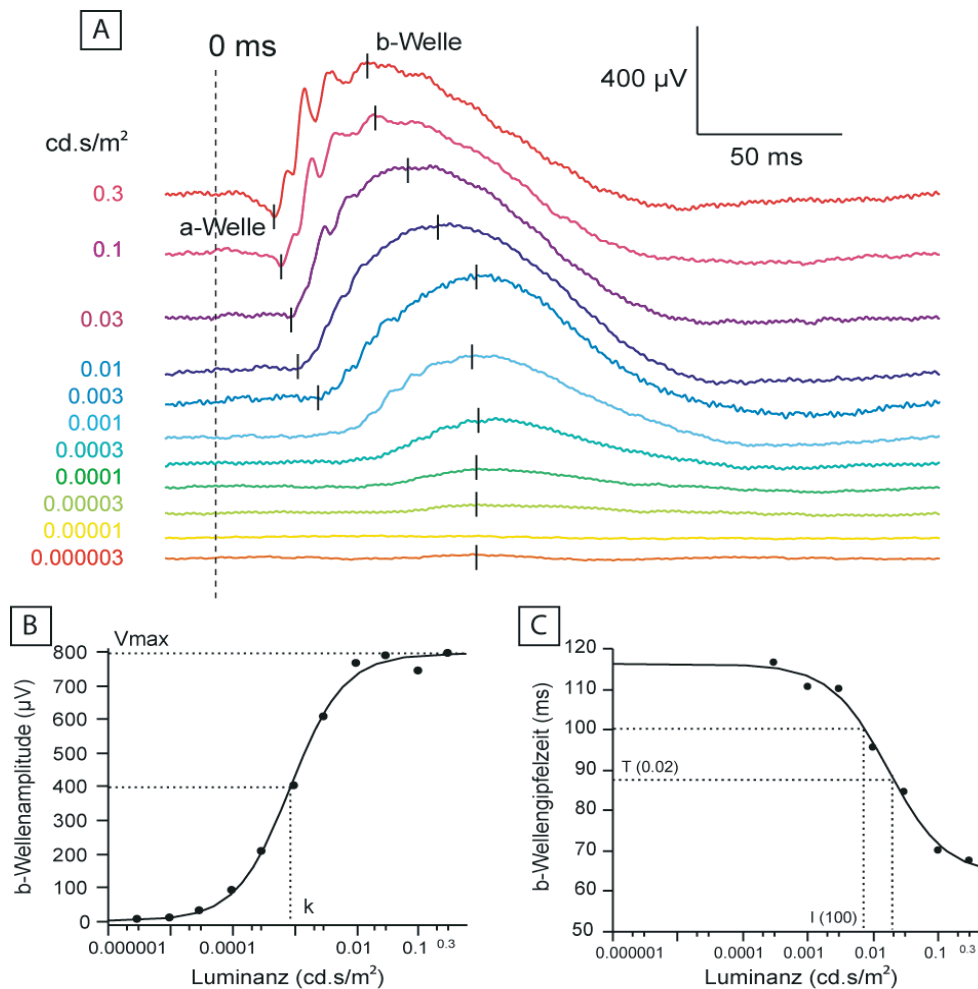
Die Daten des dunkeladaptierten ERGs wurden durch einmalige Messungen an 38 Ratten ermittelt.

##### 3.1.1. Die b-Wellenamplitude und deren Gipfelzeit

Der Anstieg der b-Wellenamplitude mit zunehmender Lichtintensität kann durch eine hyperbolische Funktion, dem sogenannten Hill-Modell, dargestellt werden, um die Parameter  $V_{\max}$ ,  $k$  und  $n$  zu berechnen (siehe oben).

Ebenso erfasst wird die Abhängigkeit der Gipfelzeiten der b-Welle von der Lichtintensität, um die Parameter  $I_{100}$  (benötigte Luminanz zum Erreichen einer Gipfelzeit von 100 ms) und  $T_{0.02}$  (rechnerische Gipfelzeit bei Luminanz =  $0,02 \text{ cd.s/m}^2$ ) zu kalkulieren (Abb. 14).

Um die Eignung des gewählten Modells zur Anpassung der Interrelation zwischen b-Wellenamplitude und Lichtintensität zu verdeutlichen, wird die Verteilung des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) aus allen Anpassungen ( $n=38$ ) in der folgenden Abbildung dargestellt. Erwähnenswert ist, dass das minimale  $R^2$  bei 0,7 und etwa 85 % der Anpassungen bei einem  $R^2$  größer als 0,9 lagen. Dies bedeutet bei einem  $R^2 > 0,9$ , dass 90 % der Standardabweichung (SD) der b-Wellenamplitude durch die Lichtintensität erklärt werden kann.



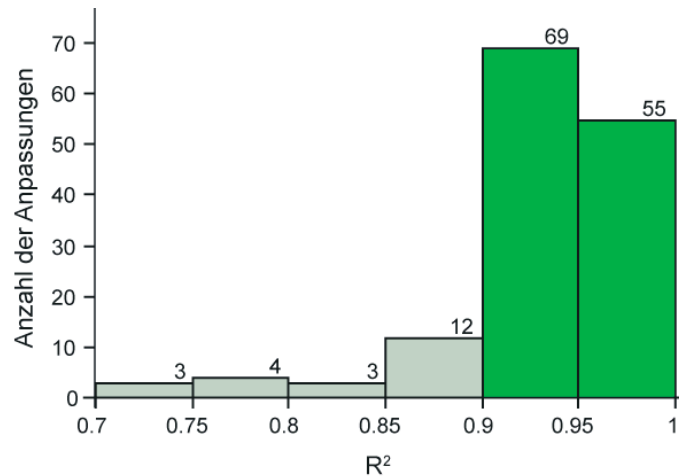
**Abb. 14: A: Beispiel einer dunkeladaptierten ERG-Messung an einem Rattenauge.**

Die dunkeladaptierte b-Wellenamplitude wächst stetig mit ansteigender Lichtintensität (vgl. auch B) und ihre Gipfelzeit verkürzt sich (vgl. auch C). Die schwarzen Markierungen zeigen die Stelle, an welcher die Amplituden und die Gipfelzeiten der b- und a-Welle gemessen werden.

**B: Beispiel der Interrelation zwischen b-Wellenamplitude ( $\mu\text{V}$ ) und der Lichtintensität ( $\text{cd.s/m}^2$ ) anhand der Messergebnisse an einem Rattenauge, dargestellt als hyperbolische Funktion.**

Dadurch lassen sich folgende Parameter bestimmen:  $V_{\text{max}}$ , welches der saturierten b-Wellenamplitude entspricht und  $k$ , welches der benötigten Lichtintensität zum Erreichen der Hälfte von  $V_{\text{max}}$  (Halbsättigungspunkt) entspricht.

**C: Beispielhafte Darstellung der Interrelation zwischen den b-Wellengipfelzeit (ms) und der Lichtintensität ( $\text{cd.s/m}^2$ ) am Messergebnis eines Rattenauges und die daraus sich ermöglichende Berechnung von  $I_{100}$  (benötigte Luminanz zum Erreichen einer Gipfelzeit von 100 ms) und  $T_{0.02}$  (erwartete Gipfelzeit bei Luminanz = 0,02  $\text{cd.s/m}^2$ ).**



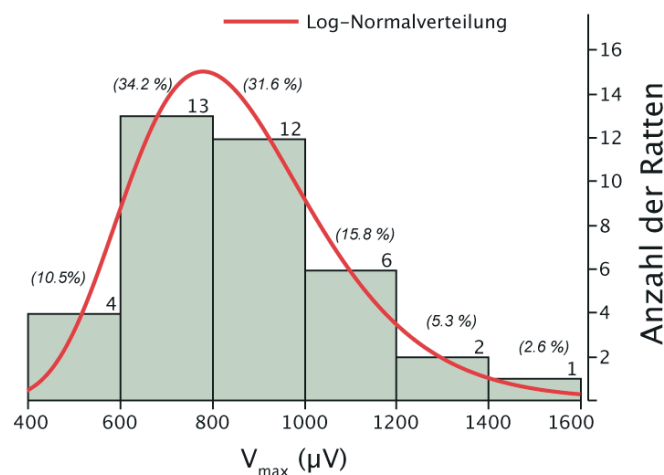
**Abb. 15: Verteilung von  $R^2$  für die Anpassung des Modells der Interrelation der b-Wellenamplitude und der Lichtintensität.**

Das minimale  $R^2$  lag bei 0,7 und etwa 85 % der Anpassungen bei einem  $R^2$  größer als 0,9.

### 3.1.1.1. Parameter $V_{\max}$ der Anpassung nach Hill

#### a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=38)

Die Verteilung von  $V_{\max}$  ist in Abb. 16 zu sehen. Es wurden 38 Tiere einmalig gemessen. Der maximale Wert von  $V_{\max}$  liegt bei 1508,8  $\mu\text{V}$ , das Minimum bei 468,6  $\mu\text{V}$ . Im Durchschnitt  $\pm$  SD werden 858,53  $\pm$  223,49  $\mu\text{V}$  erreicht. Die Daten können als logarithmische Normalverteilung beschrieben werden (Kolmogorov Test:  $D = 0,0775$ ;  $p = 0,150$ ).



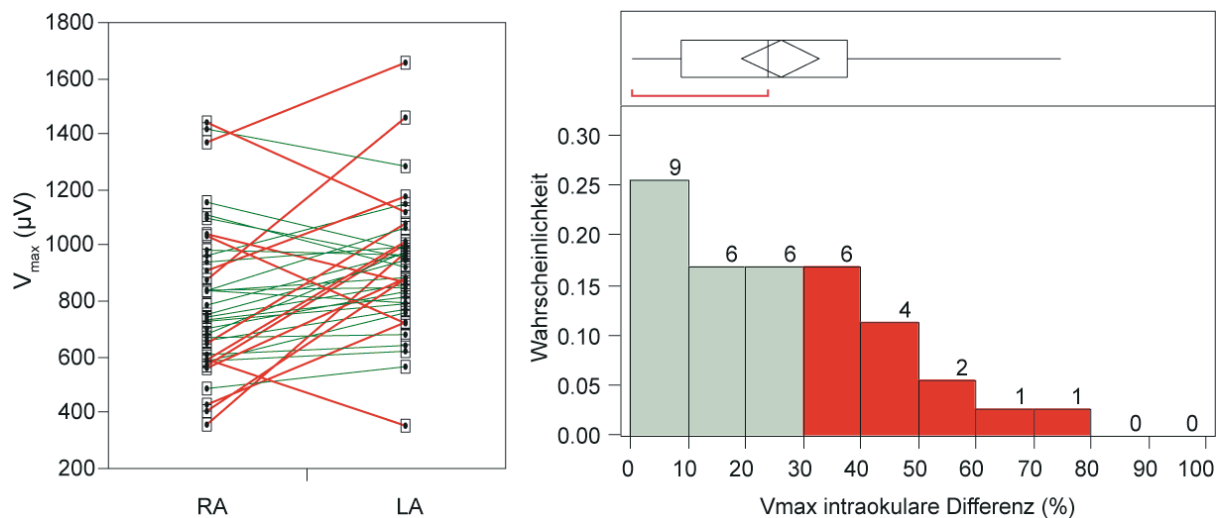
**Abb. 16: Die Gesamtverteilung von  $V_{\max}$ .**

Der maximal erreichte Wert lag bei 1508,8  $\mu\text{V}$  und das Minimum bei 468,6  $\mu\text{V}$ . Im Durchschnitt  $\pm$  SD werden 858,53  $\pm$  223,49  $\mu\text{V}$  erreicht. Numerisch erwähnt werden die Anzahl der Ratten und in Klammern deren prozentualer Anteil an der gesamten Tieranzahl. Die Verteilung von  $V_{\max}$  entspricht einer logarithmischen Normalverteilung (rote Linie).

## b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=38)

Für das rechte Auge werden durchschnittlich Werte  $\pm$  SD von  $800,25 \pm 267,97$   $\mu$ V, und für das linke Auge Werte  $\pm$  SD von  $916,82 \pm 236,57$   $\mu$ V erreicht.

Das entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von  $208,14 \pm 158,79$   $\mu$ V. Prozentual gesehen ergibt dies einen Unterschied  $\pm$  SD von  $21,15 \pm 15,53$  %.

**Abb. 17: Intraokularer Unterschied von  $V_{max}$ .**

**Links:** Man sieht die absoluten Werte des rechten (RA) und des linken Auges (LA). Bei einem Großteil der Messungen liegt der intraokulare Unterschied bei weniger als 30 % (grüne Linien). Die rot markierten Linien heben die Messungen hervor, bei denen die intraokulare Differenz größer ausfiel. **Rechts:** In dieser Abbildung ist die Wahrscheinlichkeit der intraokularen Differenz prozentual dargestellt. Man sieht, dass bei 21 von 35 Tieren der intraokulare Unterschied maximal 30 % beträgt.

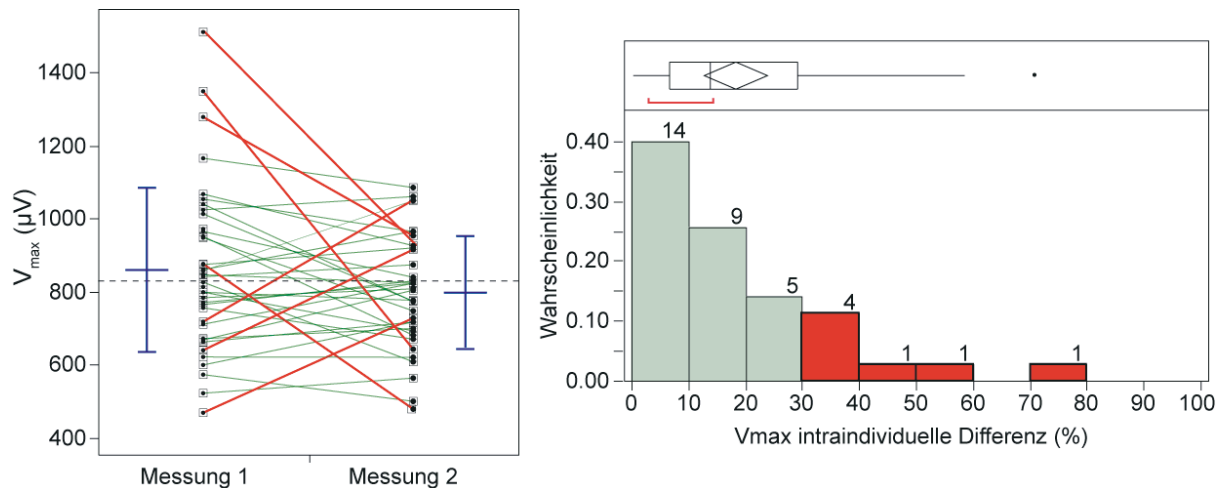
## c) Intraindividuelle Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD beträgt  $150,47 \pm 142,61$   $\mu$ V, prozentual entspricht dies  $15,82 \pm 12,63$  %.

## d) Poweranalyse

Als Beispiel wird die Anzahl Versuchstiere für eine hypothetische Studie kalkuliert, in welcher die Toxizität einer Substanz „A“ anhand Veränderungen der b-Wellenamplitude festgestellt werden soll. Wir gehen davon aus, dass eine 35 % Reduktion der b-Wellenamplitude als klinisch relevante Veränderung bezeichnet werden kann und wollen, dass unser geplanter Versuch eine Power

von 0,8 hat, d. h. die Ergebnisse des Versuches sollen mit einer 80 % Wahrscheinlichkeit das Signifikanzniveau erreichen. Der Parameter  $\alpha$  wird wie üblich mit 0.95 angegeben. Die Studie wird mittels zweier Versuchstiergruppen (Kontrollgruppe vs. behandelter Gruppe) und zweier Messungen (vor und nach Medikamentengabe – baseline und 2. Messung) durchgeführt.



**Abb. 18: Intraindividuelle Unterschiede von  $V_{max}$ .**

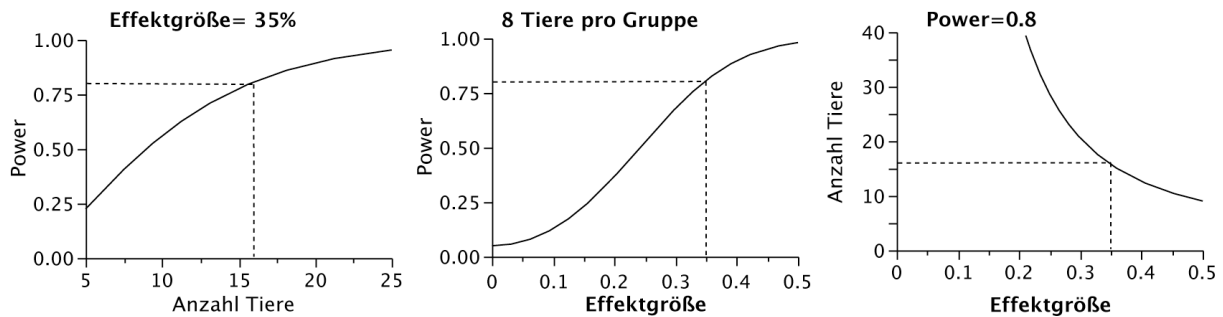
**Links:** In dieser Abbildung ist der intraindividuelle Unterschied zweier Messungen, Messung 1 und Messung 2, von  $V_{max}$  in absoluten Werten dargestellt. Bei dem Großteil der Messungen liegt der intraindividuelle Unterschied bei weniger als 30 % (grüne Linien). Die rot markierten Linien heben die Messungen hervor, bei denen die intraindividuelle Differenz größer ausfiel. **Rechts:** In dieser Abbildung ist die Wahrscheinlichkeit der intraindividuellen Differenz prozentual dargestellt. Man sieht, dass bei 28 von 35 Tieren der intraindividuelle Unterschied maximal 30 % beträgt.

Das Ergebnis der Poweranalyse zeigt, dass die fiktive Studie mit 8 Tieren pro Gruppe geplant werden kann ( $\alpha = 0.95$ , Power = 80 %), bei einer Standardabweichung der b-Wellenamplitudenratio von 0.35 (2. Messung/baseline). Die Absolutwerte und -ratios aller ERG-Parameter sind im Anhang dieser Arbeit in Form einer Tabelle zusammengefasst. Auf Grund des Narkoserisikos sollte ein zusätzliches Tier in diesem Beispiel eingeplant werden. Generell ist zu empfehlen, zusätzlich ca. 15 % mehr Tiere als die benötigte Tieranzahl bei Ratten mit einem Körpergewicht von mehr als 150 g auf Grund möglicher Narkosekomplikationen einzuplanen.

### 3.1.1.2. Parameter k der Anpassung nach Hill

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=38)

Der Maximalwert von k liegt bei  $-2,7 \log \text{cd.s/m}^2$  und das Minimum bei  $-3,5 \log \text{cd.s/m}^2$ . Das arithmetische Mittel  $\pm$  SD beträgt  $-3,18 \pm 0,26 \log \text{cd.s/m}^2$ . Die Daten wurden durch eine einmalige Messung an 38 Ratten erhoben.



#### Abb. 19: Poweranalyse.

**Links:** Dargestellt ist die Abhängigkeit von Power und Tieranzahl bei einer geforderten Effektgröße von 35 % (b-Wellenamplitudendifferenz). Zu beachten ist, dass die Power dieser Studie in logarithmischer Weise abnimmt durch eine Reduktion der Tieranzahl. Die gestrichelte Linie zeigt, dass bei einer Power von 0,8 insgesamt 16 Tiere (pro Gruppe 8 Tiere) benötigt werden. **Mittig:** Dargestellt wird die Abhängigkeit der Power und der zu erwarteten b-Wellenamplitudendifferenz (Effektgröße), wenn 8 Tiere pro Gruppe festgelegt werden. Diese Abhängigkeit zeigt einem asymptotischen Verlauf, der eine Power von 1,0 erreicht bei einer Effektgröße von ca. 50 %. **Rechts:** Dargestellt ist die Abhängigkeit der Tieranzahl (für beide Gruppen) und der Effektgröße. Zu beachten ist, dass man bei einer gewünschten Power von 0,8 und einer geringen Effektgröße, eine große Anzahl Versuchstiere benötigt (Effektgröße < 0,2  $\rightarrow$  >>> 20 Tiere pro Gruppe).

b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=38)

Der intraokulare absolute Unterschied für k liegt im Durchschnitt  $\pm$  SD bei  $0,13 \pm 0,13 \log \text{cd.s/m}^2$ . Prozentual entspricht dies  $4,62 \pm 4,95 \%$ .

c) Intraindividueller Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Der absolute Unterschied  $\pm$  SD für k beträgt  $0,13 \pm 0,11 \log \text{cd.s/m}^2$ . Prozentual entspricht dies  $4,54 \pm 4,14 \%$ .

### 3.1.1.3. Parameter n der Anpassung nach Hill

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=38)

Im Durchschnitt  $\pm$  SD werden  $0,94 \pm 0,1$  erreicht.

b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=38)

Der intraokulare absolute Unterschied für n liegt im Durchschnitt  $\pm$  SD bei  $0,06 \pm 0,06$ . Prozentual entspricht dies  $6,11 \pm 6,41$  %.

c) Intraindividuellem Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Der absolute Unterschied  $\pm$  SD für n beträgt  $0,08 \pm 0,07$ , prozentual entspricht dies  $8,23 \pm 6,8$  %.

### 3.1.2. Die dunkeladaptierte Maximalantwort

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=38)

Bei der Maximalantwort im dunkeladaptierten Zustand wurden die Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Welle und die OPs am aufsteigenden Schenkel der b-Welle ausgewertet. Die Amplitude der a-Welle beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $243,09 \pm 87,54$   $\mu$ V mit einer Gipfelzeit von  $23,16 \pm 1,44$  ms. Bei der b-Welle beträgt die Amplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD  $977,64 \pm 261,36$   $\mu$ V mit einer Gipfelzeit von  $76,33 \pm 7,24$  ms. Die OPs (area under the curve) ergeben Werte von  $2403,86 \pm 955,64$   $\mu$ V.ms.

b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=38)

Für das rechte Auge ergibt die a-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD  $209,85 \pm 80,84$   $\mu$ V mit einer durchschnittlichen Gipfelzeit von  $22,74 \pm 1,80$  ms, die b-Wellenamplitude beträgt durchschnittlich  $844,93 \pm 247,87$   $\mu$ V mit einer Gipfelzeit von  $76,02 \pm 7,17$  ms. Die OPs zeigen Werte von  $2065,43 \pm 865,01$   $\mu$ V.ms.

Für das linke Auge ergab die a-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD  $268,63 \pm 95,32$   $\mu$ V mit einer durchschnittlichen Gipfelzeit von  $23,24 \pm 1,47$  ms, die b-Wellenamplitude betrug durchschnittlich  $1063,97 \pm 325,11$   $\mu$ V, mit einer Gipfelzeit von  $75,93 \pm 8,83$  ms. Die OPs zeigten Werte von  $2619,53 \pm 1013,96$   $\mu$ V.ms.

Das ergibt einen absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD für die a-Wellenamplitude von  $68,67 \pm 58,24$   $\mu$ V entsprechend  $23,71 \pm 16,67$  %, für deren Gipfelzeit von  $1,23 \pm 1,43$  ms, entsprechend  $5,15 \pm 5,89$  %.



Das ergibt einen absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD für die b-Wellenamplitude von  $302,36 \pm 253,77 \mu\text{V}$  entsprechend  $25,84 \pm 18,97 \%$ , für deren Gipfelzeit von  $4,91 \pm 6,11 \text{ ms}$ , entsprechend  $6,38 \pm 8,25 \%$ .

Das ergibt einen absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD für die OPs von  $781,58 \pm 674,54 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$ , entsprechend  $28,61 \pm 20,93 \%$ .

#### c) Intraindividuelle Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD für die a-Wellenamplitude beträgt  $53,56 \pm 45,32 \mu\text{V}$ , prozentual entspricht dies  $21,27 \pm 16,46 \%$ . Für die Gipfelzeit der a-Welle können absolute Werte  $\pm$  SD von  $1,74 \pm 1,37 \text{ ms}$ , entsprechend  $6,92 \pm 5,01 \%$ , ermittelt werden.

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD für die b-Wellenamplitude beträgt  $190,79 \pm 174,17 \mu\text{V}$ , prozentual entspricht dies  $18,06 \pm 14,29 \%$ . Für die Gipfelzeit der b-Welle können absolute Werte  $\pm$  SD von  $9,31 \pm 5,53 \text{ ms}$ , entsprechend  $11,36 \pm 6,37 \%$ , ermittelt werden.

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD für die OPs beträgt  $722,43 \pm 507,89 \mu\text{V}\cdot\text{ms}$ , prozentual entspricht dies  $29,51 \pm 18,94 \%$ .

### 3.2. Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung

#### a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=13)

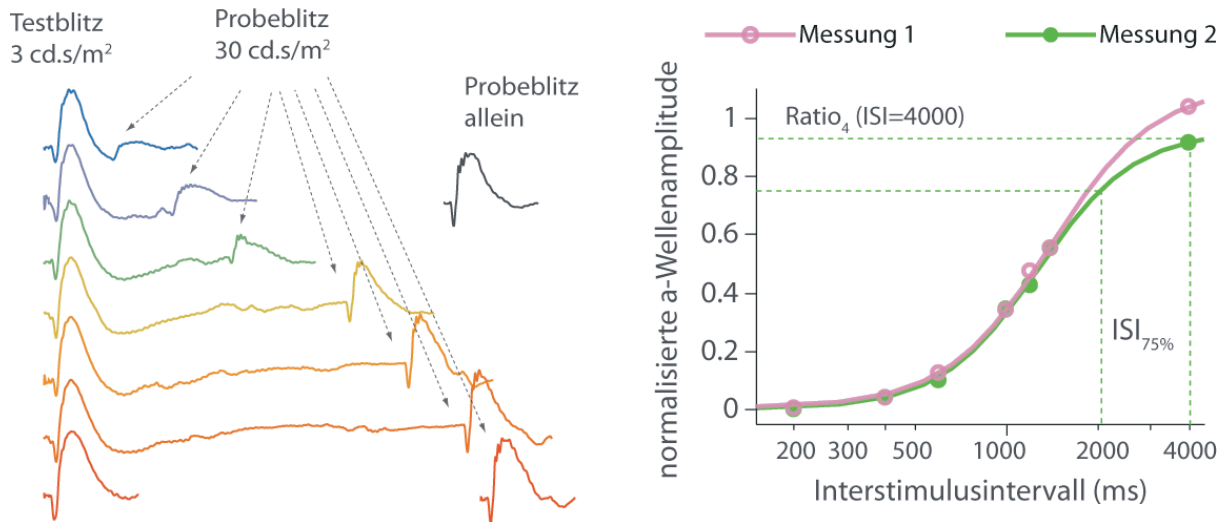
Es konnte gezeigt werden, dass der Testblitz die a-Welle des folgenden Probeflitzes bei einem ISI von 200 ms vollständig unterdrückt und sich die a-Welle nach einem ISI von 4000 ms vollständig erholt. Die Erholungszeit, die bis zum Erreichen von 75 % der normalisierten a-Wellenamplitude benötigt wird ( $\text{ISI}_{75\%}$ ), beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $1783,51 \pm 436,26 \text{ ms}$  (Abb. 20).

#### b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=13)

Für das rechte Auge wird zum Erreichen eines  $\text{ISI}_{75\%}$  im Durchschnitt  $\pm$  SD  $1770,94 \pm 456,56 \text{ ms}$  benötigt. Entsprechende Werte für das linke Auge betragen  $1758,36 \pm 527,88 \text{ ms}$ . Das ergibt einen durchschnittlichen intraokularen Unterschied von  $123,88 \pm 102,08 \text{ ms}$ , welcher prozentual  $6,95 \pm 6 \%$  entspricht.

c) Intraindividuelle Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Der intraindividuelle Unterschied für  $ISI_{75\%}$  beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD 366,53  $\pm$  271,7 ms. Das entspricht einem prozentualen Unterschied von  $17,76 \pm 12,56$  %.



**Abb. 20: Darstellung der Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung am Beispiel zweier Ratten.**

**Links:** Hierbei soll die Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung im dunkeladaptierten Zustand ermittelt werden. Ein Testblitz (Xenon; 3 cd.s/m<sup>2</sup>) wird zum Zeitpunkt  $T_t = 0$  emittiert, gefolgt von einem stärkeren Probeblitz (Xenon; 30 cd.s/m<sup>2</sup>) zu den Zeitpunkten  $T_p = 200, 400, 600, 1200, 1400$  oder 4000 ms. Man kann hier erkennen, dass bei einem ISI von 200 ms die a-Welle des Probeblitzes durch den vorausgegangenen Testblitz nahezu vollständig unterdrückt wird. Mit wachsendem ISI erholt sich auch die a-Wellenamplitude des Probeblitzes und erreicht nach 4000 ms die Höhe des Testblitzes. **Rechts:** Die a-Wellenamplitude des Probeblitzes, der auf den Testblitz folgte, wurde durch die a-Wellenamplitude des Probeblitzes ohne vorhergehenden Testblitz dividiert und ergab die normalisierten Werte. Man kann hier erkennen, dass bei einem ISI von 200 ms die a-Welle des Probeblitzes durch den vorausgegangenen Testblitz nahezu vollständig unterdrückt wird. Mit wachsendem ISI erholt sich auch die a-Wellenamplitude des Probeblitzes. Die Erholungszeit, die bis zum Erreichen von 75% der normalisierten a-Wellenamplitude benötigt wird, beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD 1783,51  $\pm$  436,26 ms (ISI: Interstimulusintervall).

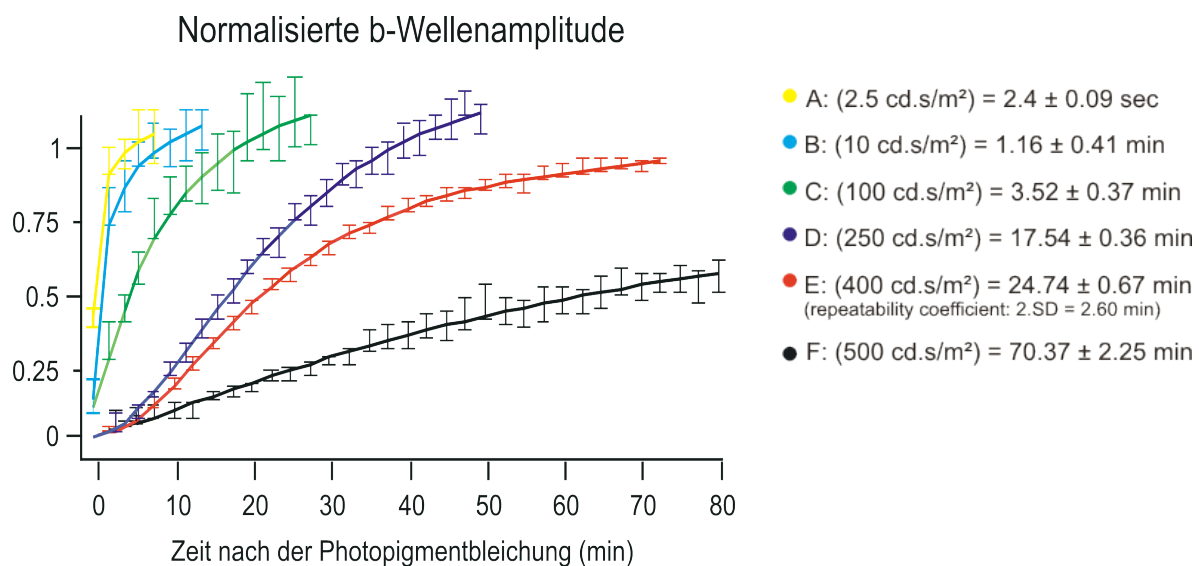
### 3.3. Regeneration der a- und b-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung

#### 3.3.1. Regeneration der b-Wellenamplitude

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=51)

Zum Erreichen von 50% der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung war für die unterschiedlich starken Photopigmentbleichungen folgende Zeit nötig (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (Abb. 21):

- A: 2,5 cd.s/m<sup>2</sup> - 25 sec: 2,4  $\pm$  0,09 sec (n=13)
- B: 10 cd.s/m<sup>2</sup> - 25 sec: 1,16  $\pm$  0,41 min (n=13)
- C: 100 cd.s/m<sup>2</sup> - 25 sec: 3,52  $\pm$  0,37 min (n=13)
- D: 250 cd.s/m<sup>2</sup> - 25 sec: 17,54  $\pm$  0,36 min (n=13)
- E: 400 cd.s/m<sup>2</sup> - 30 sec: 24,74  $\pm$  0,67 min (n=13)
- F: 500 cd.s/m<sup>2</sup> - 60 sec: 70,37  $\pm$  2,25 min (n=13);



**Abb. 21: Die Regeneration der b-Wellenamplituden nach der Photopigmentbleichung** wurde durch ERG-Messungen, die alle 2,5 Minuten über einen Zeitraum von 80 Minuten erfolgten, beobachtet. Die Stimulusstärke von Lichtblitz  $\beta$  betrug 0,0003 cd.s/m<sup>2</sup> (weißes Licht) mit einer Stimulusdauer von 4 ms. Die b-Wellenamplitude des Blitzes  $\beta$  wurde durch die entsprechenden b-Wellenamplituden vor der Photopigmentbleichung dividiert und ergab die normalisierten Werte.

Weitere Daten wurden aus der Gruppe E erhoben (siehe Kapitel 4.1.4.). Bestimmt wurde die Zeit in Minuten zum Erreichen von 50 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Diese beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD 31,27  $\pm$  7,23 Minuten. Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreichte die b-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD 94,25  $\pm$  8,79 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung.

#### b) Intraokularer Vergleich innerhalb der Messreihe E (n= 13)

Zum Erreichen von 50 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung werden am rechten Auge im Durchschnitt  $\pm$  SD 27,85  $\pm$  8,79 Minuten, am linken Auge 34,69  $\pm$  8,09 Minuten gebraucht. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von 8,3  $\pm$  7,23 Minuten, prozentual gesehen ist dies durchschnittlich  $\pm$  SD 21,99  $\pm$  18,22 %.

Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreicht die b-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD am rechten Auge 94,86  $\pm$  10,53 % und am linken Auge 93,65  $\pm$  8,67 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von 6,51  $\pm$  4,34 %.

#### c) Intraindividueller Vergleich innerhalb der Messreihe E (n= 13)

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD zum Erreichen von 50 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung beträgt 8,78  $\pm$  4,71 Minuten, prozentual entspricht dies 26,66  $\pm$  10,63 %.

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD nach einer Messdauer von 60 Minuten ergibt im Durchschnitt  $\pm$  SD 10,24  $\pm$  5,46 % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung.

### 3.3.2. Regeneration der a-Wellenamplitude

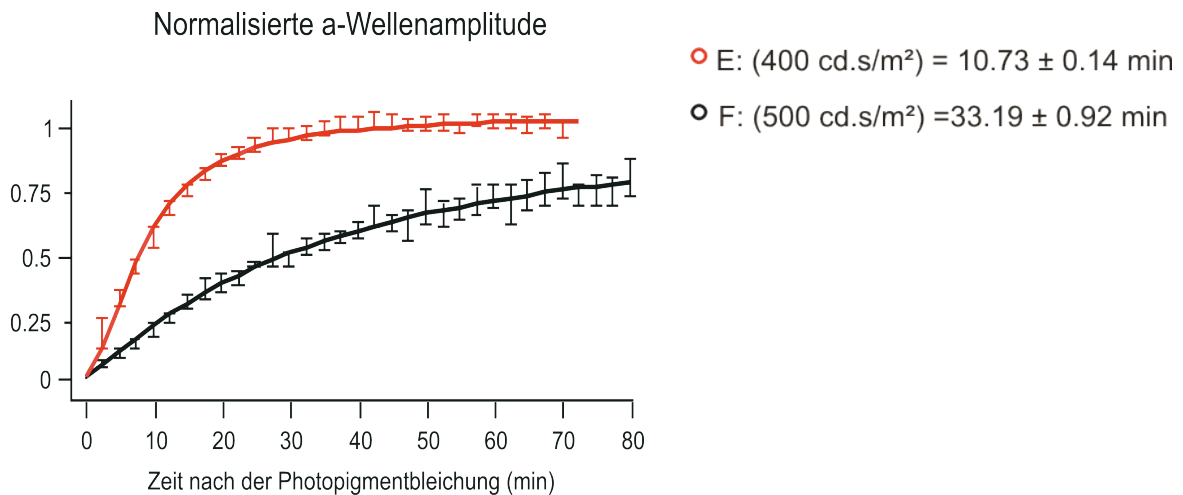
#### a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=13)

Zum Erreichen von 50 % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung war für die unterschiedlichen Gruppen folgende Zeit nötig: E: 400 cd.s/m<sup>2</sup> - 30 sec: 10,73  $\pm$  0,14 min; F: 500 cd.s/m<sup>2</sup> - 60 sec: 33,19  $\pm$  0,92 min.

Aufgrund der raschen Regeneration der a-Welle für die schwächeren Photopigmentbleichungsgruppen (Gruppe A bis D) wurden die Werte der a-Wellenregeneration nicht ausgewertet.

Weitere Daten wurden aus der Gruppe E erhoben.

Bestimmt wurde die Zeit in Minuten zum Erreichen von 50 % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Diese beträgt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $15,33 \pm 6,29$  Minuten. Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreichte die a-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD  $101,55 \pm 6,82$  % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung.



**Abb. 22:** Die Regeneration der a-Wellenamplituden nach der Photopigmentbleichung wurde mittels ERG-Messungen, die alle 2,5 Minuten über einen Zeitraum von 80 Minuten erfolgten, beobachtet. Die Stimulusstärke von Lichtblitz  $\alpha$  betrug  $10 \text{ cd.s/m}^2$  (Xenon) mit einer Stimulusdauer von 4 ms. Die a-Wellenamplitude des Blitzes  $\alpha$  wurde mittels der entsprechenden a-Wellenamplituden vor der Photopigmentbleichung normalisiert.

b) Intraokularer Vergleich innerhalb der Messreihe E (n=13)

Zum Erreichen von 50 % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung werden am rechten Auge im Durchschnitt  $\pm$  SD  $12,7 \pm 6,28$  Minuten, am linken Auge  $17,53 \pm 6,99$  Minuten gebraucht. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von  $4,45 \pm 4,4$  Minuten, prozentual gesehen ist dies durchschnittlich  $\pm$  SD  $24,82 \pm 20,72$  %.

Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreichte die a-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD am rechten Auge  $102,86 \pm 9,22$  % und am linken Auge  $100,9 \pm 8,68$  % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von  $8,34 \pm 7,98$  %.

c) Intraindividueller Vergleich innerhalb der Messreihe E (n=13)

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD zum Erreichen von 50 % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung beträgt  $6,03 \pm 4,79$  Minuten, prozentual entspricht dies  $34,49 \pm 14,63$  %.

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD nach einer Messdauer von 60 Minuten ergibt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $8,52 \pm 8,89$  % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung

Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Abbildung 23 dargestellt.

### 3.4. Zapfenantwort unter helladaptierten Bedingungen

#### 3.4.1. Einzelblitzantwort

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n=38)

Durchschnittlich wurden beim Zapfen-Einzelblitz-ERG b-Wellenamplituden  $\pm$  SD von  $100,79 \pm 26,91$   $\mu$ V erreicht. Die durchschnittliche b-Wellengipfelzeit beträgt  $\pm$  SD  $46,12 \pm 3,35$  ms.

b) Intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=38)

Für das rechte Auge beträgt die durchschnittliche b-Wellenamplitude  $\pm$  SD  $98,67 \pm 27,14$   $\mu$ V mit einer Gipfelzeit von  $45,66 \pm 3,75$  ms. Entsprechende Werte für das linke Auge betragen  $102,59 \pm 30,89$   $\mu$ V und  $46,53 \pm 3,48$  ms. Das ergibt einen durchschnittlichen intraokularen Unterschied von  $19,03 \pm 18,31$   $\mu$ V für die b-Wellenamplitude, entsprechend  $16,79 \pm 14,96$  %, und  $2,13 \pm 2,73$  ms, entsprechend  $4,4 \pm 5,5$  %, für die b-Wellengipfelzeit.

c) Intraindividueller Vergleich zweier Messreihen (n=38)

Für die b-Wellenamplitude liegt der intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD bei  $27,99 \pm 19,32$   $\mu$ V, welches einem prozentualen Unterschied von  $23,86 \pm 13,42$  % entspricht. Für die b-Wellengipfelzeit liegt der intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD bei  $3,42 \pm 2,04$  ms, welches einem prozentualen Unterschied von  $7,1 \pm 4,1$  % entspricht.

### 3.4.2. 20-Hz-Flicker

a) Gesamtverteilung innerhalb einer Messreihe (n= 37)

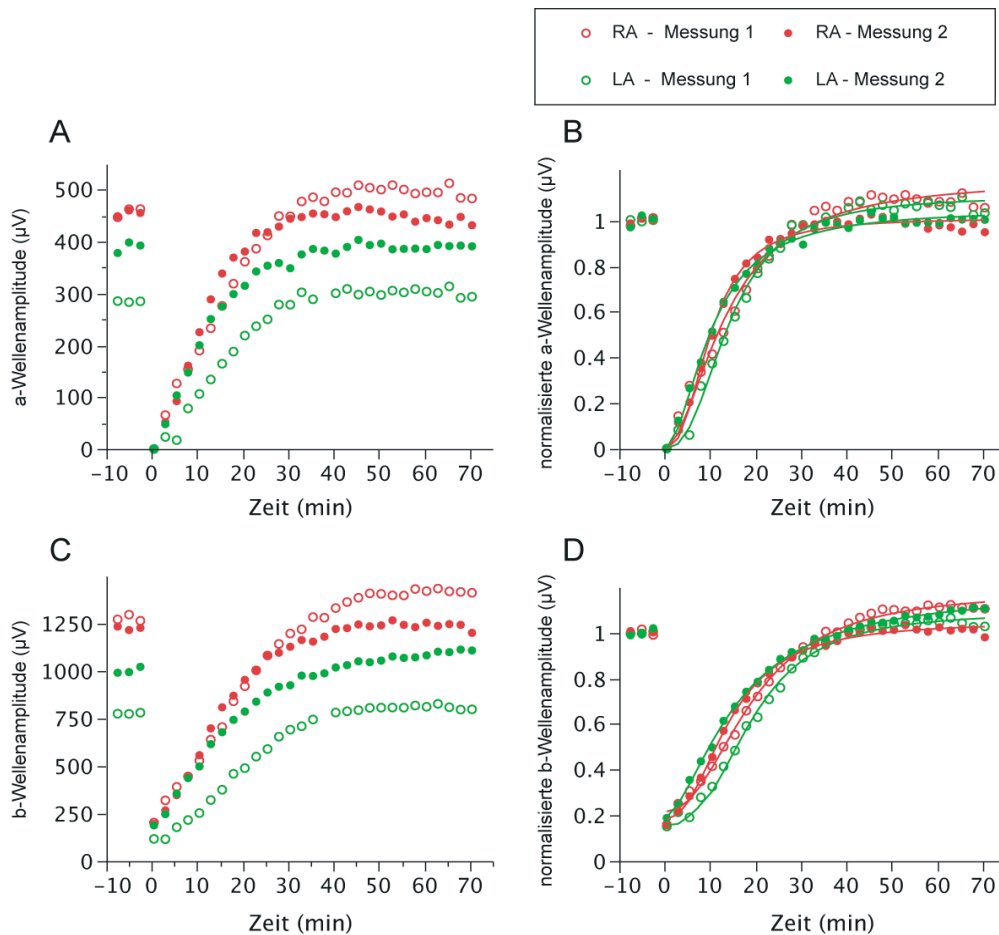
Die 20-Hz-Flicker Amplitude liegt im Durchschnitt  $\pm$  SD bei  $17.81 \pm 5.8 \mu\text{V}$  mit einer Gipfelzeit von  $48,45 \pm 2,51 \text{ ms}$ .

b) intraokularer Vergleich innerhalb einer Messreihe (n=37)

Für das rechte Auge ergibt die 20-Hz-Flicker Amplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD  $17,59 \pm 5,73 \mu\text{V}$  mit einer Gipfelzeit von  $47,71 \pm 2,17 \text{ ms}$ . Entsprechende Werte für das linke Auge betragen  $17,72 \pm 6,26 \mu\text{V}$  und  $48,86 \pm 2,67 \text{ ms}$ . Das entspricht einer absoluten intraokularen Differenz  $\pm$  SD für die 20-Hz-Flicker Amplitude von  $2,65 \pm 1,97 \mu\text{V}$ , entsprechend  $13,87 \pm 9,56 \%$ , und  $1,4 \pm 1,21 \text{ ms}$ , entsprechend  $2,81 \pm 2,34 \%$ , für die Gipfelzeit.

c) intraindividuellem Vergleich zweier Messreihen (n=37)

Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD für die 20-Hz-Flicker Amplitude beträgt  $4,64 \pm 3,8 \mu\text{V}$ , entsprechend  $24,09 \pm 19,57 \%$ , und  $1,73 \pm 1,7 \text{ ms}$ , entsprechend  $3,47 \pm 3,38 \%$ , für die 20-Hz-Flicker Gipfelzeit.



**Abb. 23: Intraokularer und intraindividueller Unterschiede der a- und b-Wellenamplituderegeneration nach der Photopigmentbleichung.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Regeneration der a- und b-Wellenamplitude in Abhängigkeit der Zeit. Die roten Markierungen entsprechen den Ergebnissen des rechten Auges und die grünen denen des linken. Jedes Auge wurde jeweils zwei Mal gemessen. Es wurden drei Messungen vor der Photopigmentbleichung durchgeführt, mittels derer die später gemessenen Amplituden dividiert wurden (normierte Werte) und welche hundert Prozent darstellen. Man kann erkennen, dass trotz erheblicher intraokularer und intraindividuellen Unterschiede, die 100 Prozentmarke bei jeder Messung erreicht wurde. **A:** Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreichte die a-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD am rechten Auge  $102,86 \pm 9,22$  % und am linken Auge  $100,9 \pm 8,68$  % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von  $8,34 \pm 7,98$  %. Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD nach einer Messdauer von 60 Minuten ergibt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $8,52 \pm 8,89$  % der a-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. **B:** Dargestellt sind die normalisierten a-Wellenamplituden. Man erkennt den nahezu gleichförmigen Kurvenverlauf. **C:** Nach einer Messdauer von 60 Minuten erreicht die b-Wellenamplitude im Durchschnitt  $\pm$  SD am rechten Auge  $94,86 \pm 10,53$  % und am linken Auge  $93,65 \pm 8,67$  % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. Dies entspricht einem absoluten intraokularen Unterschied  $\pm$  SD von  $6,51 \pm 4,34$  %. Der absolute intraindividuelle Unterschied  $\pm$  SD nach einer Messdauer von 60 Minuten ergibt im Durchschnitt  $\pm$  SD  $10,24 \pm 5,46$  % der b-Wellenamplitude vor der Photopigmentbleichung. **D:** Dargestellt sind die normalisierten b-Wellenamplituden. Man erkennt den nahezu gleichförmigen Kurvenverlauf.



## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines ERG-Protokolls, mit dem die Erholung der Netzhautfunktion nach vorausgegangener Photopigmentbleichung durch starkes Licht untersucht werden kann. Es wurden in der vorgelegten Arbeit die zur Entwicklung des Protokolls notwendigen Schritte beschrieben und die Ergebnisse von Messungen an 38 gesunden Tieren präsentiert. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Parameter ist es möglich, Studien zur Funktion der Netzhaut und des Pigmentepithels (von der Funktion dieser beiden Strukturen und deren intakter Interaktion hängt die Erholung nach der Photopigmentbleichung ab) durchzuführen.

Über den Rhodopsinzyklus ist in den letzten Jahren viel geforscht worden. Die Bestimmung der Qualität und der Geschwindigkeit dieses Zyklus erlaubt Aussagen über die Intaktheit der beteiligten Strukturen, also der äußeren Netzhaut und des RPE (Lamb & Pugh, Jr., 2004). Eine Möglichkeit, Erkenntnisse über funktionelle Prozesse innerhalb der Retina am lebenden Organismus zu erhalten, stellt die Elektroretinographie dar. Wählt man die Parameter des Lichtreizes entsprechend und berücksichtigt man den Adaptationszustand des Auges lassen sich viele Sehprozesse bis auf zelluläre Ebene hinunter gezielt untersuchen (Weymouth & Vingrys, 2008).

Im Gegensatz zum Menschen gibt es für Tiere noch keine standardisierten Vorgehensweisen bei der ERG-Messung. Infolge dessen wird der ISCEV-Standard für Menschen häufig als Grundlage für elektroretinographische Untersuchungen bei Tieren verwendet (Messias *et al.*, 2007). Der internationale Standard der ERG Untersuchung beinhaltet ein Protokoll, welches aus fünf Schritten besteht und die grundlegenden Funktionen der Netzhautzellen erfasst: die Stäbchenantwort, die dunkeladaptierte Maximalantwort, die OPs, die Zapfenantwort auf Einzelblitze und auf 30-Hz-Flicker (Marmor *et al.*, 2004). Des Weiteren werden Richtlinien für die praktische Durchführung einer ERG-Messung dargestellt, wie z. B. die Dauer der vorausgehenden Dunkeladaptationszeit, die verwendeten Elektroden, die Impedanz, den Verstärker, die eingesetzten Filter und die

Auswertungsalgorithmen. Das von der ISCEV vorgeschlagene Protokoll ist in der Lage, grundlegende Aussagen über die Stäbchen- und die Zapfenfunktion beim Menschen zu machen. Aus verschiedenen Gründen, wie etwa der unterschiedlichen Netzhautanatomie von Ratte und Mensch, welche unter anderem eine längere Dunkeladaptationszeit der Rattenretina bedingt, ist der ISCEV-Standard zur Durchführung elektroretinographischer Untersuchungen bei der Ratte nicht optimal geeignet. Des Weiteren ist das ISCEV-Protokoll nur bedingt in der Lage, die Funktion des Rhodopsinzyklus und die Interaktion des RPE mit den Photorezeptoren oder den Einfluss von Substanzen, die toxisch auf das RPE und den Rhodopsinzyklus wirken, zu beurteilen. Um hierüber Aussagen zu treffen, ist die Untersuchung der Dunkeladaptationskinetik notwendig.

Viele der bereits durchgeführten elektroretinographischen Experimente sind in der Praktikabilität und für die Anwendung im eigenen Labor ungeeignet. Ursächlich hierfür sind die Verwendung nicht kommerzieller ERG-Systeme, eine fehlende exakte Angabe der Lichtquelle mit Stimulusdauer und –intensität, teilweise eine ungenaue Beschreibung des Versuchsablaufes inklusive des Protokolls und das Fehlen von Normwerten an einer gesunden Kohorte. Mittels der hier vorgestellten Arbeit soll es möglich sein, dass beschriebene Protokoll nachzuvollziehen und selbst anzuwenden.

### 4.1. Entwicklung des ERG-Protokolls und Diskussion der Ergebnisse

Um ein Protokoll für die Untersuchung der Rhodopsinzykluserholung nach Photopigmentbleichung bei der Ratte zu entwickeln, ist es primär notwendig grundlegende Informationen über die retinale Funktion des Tieres zu erfassen.

Das hier entwickelte ERG-Protokoll beinhaltet die vom ISCEV- Standard geforderten Schritte, mit Veränderungen entsprechend der Anatomie der Ratte und fügt ergänzend die zur Beurteilung des Rhodopsinzyklus notwendigen weiteren Untersuchungen hinzu.

Zu beobachten war, dass sowohl bei intraokularem als auch

intraindividuellem Vergleich die Differenz der Amplituden signifikant höher war als die entsprechenden Werte der Gipfelzeiten; dies obwohl die Messungen stets unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurden: Es wurde durchgehend dasselbe Gerät verwendet, dieselbe Narkoseart mit gewichtsadaptierter Dosierung der Medikamente durchgeführt, auf eine gleichlange Dunkeladaptationszeit geachtet; die Elektrodenplatzierung erfolgte möglichst identisch und nur dieselbe Person führte die Messungen durch. Dennoch lässt sich die bei allen Messungen beobachtete Amplitudenvariabilität durch ebendiese Faktoren erklären. So spielt sicherlich die Elektrodenplatzierung die bedeutendste Rolle, welche sich in Anbetracht der Bedingungen - kleine Augen der Versuchstiere, lediglich eine schwache Rotlichtbeleuchtung, schlechter Kontrast zwischen Auge und braunem Fell - nicht einfach darstellt. Zur Verbesserung des Kontakts der Kontaktlinse zum Hornhautepithel (und außerdem zu dessen Schutz) musste Methocel<sup>®</sup> vor der Messung auf die Hornhaut aufgetragen werden. Trotz des möglicherweise schlechteren Kontaktes der Kontaktlinse schien sie geeigneter zu sein als ein „nackter“ Golddraht. Frühere Messungen mit Golddrahtelektroden, welche durch direktes Auflegen direkten Kontakt zur Hornhaut und Konjunktiva hatten, zeigten deutlich mehr Lokalreaktionen am Auge und führten häufiger zu Verletzungen der Kornea. Verständlicherweise ist eine Platzierung der Elektrode im Bereich der Pupille zu vermeiden, da es dadurch zu einer geringeren Lichtexposition der Retina kommt. Im nächsten Abschnitt werden zunächst die Bedeutung und die Variabilität der einzelnen, relevanten ERG-Parameter erörtert.

### 4.1.1. Dunkeladaptiertes ERG

Unter dunkeladaptierten Bedingungen stellt die b-Welle des ERGs hauptsächlich die Aktivität der Stäbchen-Bipolarzellen dar (Robson & Frishman, 1998). Durch ihre Messung ist es möglich, gezielt die Funktion der Stäbchen-Bipolarzellen und somit auch die Funktion der Stäbchen im dunkeladaptierten Zustand zu beurteilen. Dazu ist es hilfreich, nicht nur die Amplitude und deren Gipfelzeiten von Einzelblitzen zu beschreiben, sondern

diese Parameter aus einer Abfolge von ansteigenden Blitzintensitäten mit einem Luminanzumfang von 6 oder mehr logarithmischen Einheiten zu untersuchen. Dadurch ist die Anpassung eines hyperbolischen Modells (nach Hill) möglich, aus welchem sich drei Parameter bestimmen lassen:  $V_{\max}$ ,  $k$  und  $n$ . Als Marker für die Empfindlichkeit der Stäbchen im dunkeladaptierten Zustand dient der Sensitivitätsparameter  $k$ , der sich aus der hyperbolischen Funktion nach Hill bestimmen lässt (Naka & Rushton, 1966). Weiterhin lassen sich aus der ermittelten Funktion die ERG-Grundlinie, die monoton ansteigende b-Wellenamplitude und deren Sättigung bestimmen. Die Sättigung ( $V_{\max}$ ), per definitionem, entspricht der saturierten b-Wellenamplitude und ist aus den oben erwähnten Gründen von denselben Faktoren beeinflusst wie auch die Einzelblitze. Die hierbei beobachtete recht hohe Standardabweichung der  $V_{\max}$  Werte und der große intra- und interindividuelle Unterschied wurde bereits bei elektroretinographischen Untersuchungen an anderen nachtaktiven Tierarten beschrieben, wie z. B. an Katzen (Messias *et al.*, 2007) und an Mäusen (Dalke *et al.*, 2004). Interessanter scheint somit bei der Interpretation des dunkeladaptierten ERGs die Verwendung des Parameters  $k$  als Bezugswert für die dunkeladaptierte Sensitivität. Dass  $k$  nicht von der absoluten b-Wellenamplitude abhängt, die individuell stark variieren kann, sondern von der Lichtintensität, welche zum Erreichen von 50 % der normalisierten Amplitudensättigung benötigt wird, lässt den Parameter  $k$  von den absoluten Amplitudenwerten unabhängig werden.

Je niedriger  $k$  ist, desto weniger Lichtintensität wird zum Erreichen der halbmaximalen Sättigung benötigt. Ferner fällt der niedrige  $k$  Wert bei der Ratte ( $-3,18 \pm 0,26 \log \text{cd.s/m}^2$ ) im Vergleich z. B. mit dem der Katze ( $-2,47 \pm 0,05 \log \text{cd.s/m}^2$ ) (Messias *et al.*, 2007) auf. Dies spricht für die hohe Sensitivität des Rattenauges im Dunkeln. Da das dunkeladaptierte Rattenaug auf niedrige Lichtintensitäten schon sehr empfindlich reagiert, ist es somit zu empfehlen, im Bereich von  $0,000003 \text{ cd.s/m}^2$  mit der dunkeladaptierten Messung zu beginnen und einen ausreichend großen Umfang (mindestens 6 logarithmische Einheiten) der Lichtintensitäten zu

verwenden, um das Hill-Modell sauber anpassen zu können.

Die Variabilität der b-Wellengipfelzeiten hängt zudem auch von der verwendeten Filterung des ERG-Signals ab (z. B. dem Herausfiltern der OPs oder von Artefakten). Zum Herausfiltern der b-Welle eignet sich ein Filterfrequenz  $< 50$  Hz, um durch eine Elimination der OPs eine „saubere“ b-Welle zu erhalten und somit auch eine geringere Variabilität der Amplituden zu erreichen.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Parameter  $I_{100}$  (benötigte Luminanz zum Erreichen einer Gipfelzeit von 100 ms) und  $T_{0,02}$  (erwartete Gipfelzeit bei Luminanz =  $0,02 \text{ cd.s/m}^2$ ) ausgewertet. Diese Parameter können als ERG-Marker in Studien dienen, bei denen eine hohe Sensitivität von Nöten ist.

Obwohl eine Sättigung der dunkeladaptierten b-Welle bei der Ratte bereits bei einer geringeren Lichtintensität als beim Menschen eintritt, sollte man die Lichtintensität der maximalen Blitzstärke vergleichbar mit der Stimulusintensität zum Hervorrufen der Maximalantwort wie sie im ISCEV-Standard empfohlen wird, wählen. So ist es möglich, bei bereits fortgeschrittener Degeneration und pathologischen Antworten noch eine eventuell vorhandene Restfunktion zu detektieren, die sonst unentdeckt bliebe. In diesem Fall ist es wichtig auf Grund der Stärke des Lichtblitzes auf ein ISI von mindestens 60 Sekunden bis zum darauffolgenden Stimulus zu achten. Der ISCEV-Standard erfuhr zuletzt im Jahr 2008 eine Ergänzung der dunkeladaptierten Maximalantwort. Zusätzlich zu dem Standardblitz ( $3 \text{ cd.s/m}^2$ ) erfolgt ein weiterer, intensiverer Stimulus ( $10 - 30 \text{ cd.s/m}^2$ ) zum Erhalt der gemischten Photorezeptorenantwort im dunkeladaptierten Zustand. Die Antwort auf diesen stärkeren Blitz bietet einige Vorteile: die a-Welle lässt sich sauberer abgrenzen, die OPs zeigen größere Amplituden und lassen sich somit auch leichter identifizieren, und eventuell auftretende pathologische Amplitudenminderungen der b-Welle lassen sich besser erkennen. In dem hier verwendeten Protokoll wird die skotopische Maximalantwort mit einer Stimulusintensität von  $10 \text{ cd.s/m}^2$  hervorgerufen. Bei der Wahl dieser Stimulusstärke ist von einer ausreichender Sättigung

der Photorezeptoren auszugehen.

#### 4.1.2. Die oszillatorischen Potentiale

Die OP haben ihren Stellenwert im Tiermodell der Ratte und wurden daher in der vorgelegten Arbeit bei jedem Tier ermittelt und evaluiert. Die OP sind in der Lage frühzeitig funktionelle Beeinträchtigungen der inneren retinalen Schichten aufzuzeigen (Wachtmeister, 1998). So sind pathologisch ausfallende OP als Indikator einer neuronalen Dysfunktion anzusehen, z. B. durch eine gestörte Mikrozirkulation. Es ist empfehlenswert, die OP aus der dunkeladaptierten Maximalantwort zu bestimmen, da diese dann eine maximale Amplitude aufweisen. Die Auswertung der OP anhand der AUC scheint geeignet, da in diesem Fall nicht nur die Amplitude berücksichtigt wird, welche eine hohe Variabilität aufweist, sondern eine Fläche berechnet wird. Die OP standen nicht im Vordergrund dieser Arbeit. Mit den im Anhang angegebenen Messdaten mit der dazugehörenden Standardabweichung ist es dennoch möglich, eine Studie zur gezielten Untersuchung der OP zu planen.

#### 4.1.3. Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung

Die Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung kann man durch Kombination zweier Blitze, sog. *paired flashes*, untersuchen (Pepperberg *et al.*, 1997; Birch *et al.*, 1995). Bei dieser Technik wird der sogenannte Testblitz zum Zeitpunkt null emittiert. Auf diesen folgt ein starker Untersuchungsblitz zum Zeitpunkt  $t$ , welcher die Stäbchenantwort saturiert. Hierbei kommt es zu keiner Photopigmentbleichung der Photorezeptoren. Dies ist wichtig, um beim folgenden Schritt, der Photopigmentbleichung von einer nahezu vollständigen Dunkeladaptation ausgehen zu können und eine Aktivierung des Rhodopsinzyklus zu vermeiden. Vorausgehende ERG-Experimente in Mäusen haben gezeigt, dass unter dunkeladaptierten Umständen hierbei hauptsächlich Stäbchen erregt werden (Hetling & Pepperberg, 1999; Lyubarsky *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2001).

Durch Kombination zweier Lichtblitze fixer Intensität bei ansteigendem ISI

lässt sich das Zeitintervall bestimmen, welches zur vollständigen Regeneration der a-Welle notwendig ist.

Da beide Lichtblitze, also Test- und Untersuchungsblitz, kaum Photopigment bleichen, lässt sich die Erholung der Stäbchenantwort hauptsächlich durch die Erholung der Photorezeptoren erklären. Durch die Messung der Stäbchenerholungszeit nach kurzer Desensibilisierung kann man somit eine Aussage über die Photorezeptorenreaktivierungskinetik – und damit natürlich der Photorezeptorintegrität – treffen.

Die Durchführung dieses Schrittes in dem verwendeten Protokoll ist wichtig, um später bei der Regeneration der a- und b-Welle nach der Photopigmentbleichung sichergehen zu können, dass die Erholung der Amplituden nach der Photopigmentbleichung vom Rhodospiningehalt abhängig ist und nicht von einem möglicherweise vorliegendem Defizit in der Photorezeptorenreaktivierungskinetik.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass bei gesunden Ratten die Zeit bis zur kompletten Erholung der a-Wellenamplitude nach einem Testblitz (Xenon; 3 cd.s/m<sup>2</sup>) ca. 4 s beträgt, wenn ein Untersuchungsblitz (Xenon) mit einer Intensität von 30 cd.s/m<sup>2</sup> verwendet wird.

#### 4.1.4. Regeneration der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung

Die Erholung der ERG-Antworten nach Photopigmentbleichung sind bereits sowohl für die a-Welle beim Menschen mittels eines saturierten Blitzes als auch für die b-Welle (Radu *et al.*, 2003) bei der Maus mittels eines unsaturierten Blitzes untersucht worden. Um Aussagen über beide Sachverhalte in einem einzigen Protokoll simultan erhalten zu können, wurden die am besten geeigneten Lichtintensitäten und ein ISI definiert. Bei der hierzu verwendeten Doppelblitz-Technik erfolgte zum Zeitpunkt null ein schwacher Blitz  $\beta$  (0,003 cd.s/m<sup>2</sup>) gefolgt von einem stärkeren Blitz  $\alpha$  (10 cd.s/m<sup>2</sup>) nach einem Intervall zwischen 0,1 und 1 Sekunde. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem ISI von 600 ms keine Wirkung des ersten auf den zweiten Blitz mehr zu sehen war. Auffällig ist, dass die

Lichtintensitäten der beiden Blitze für die Ratten, welche sich in diesem Protokoll als die aussagekräftigsten herauskristallisiert hatten, mit denen des ISCEV Protokolls für die Stäbchenantwort und für den Standardblitz beim Menschen vergleichbar waren. Die etwas niedrigere Lichtintensität des Blitzes  $\beta$  ( $0.003 \text{ cd.s/m}^2$ ) im Vergleich zur Blitzintensität der Stäbchenantwort beim Menschen ( $0.1 \text{ cd.s/m}^2$ ) beruht auf der oben bereits erwähnten höheren Lichtempfindlichkeit des Rattenauges.

Schon früh wurde festgestellt, dass sich die b-Wellenamplitude des Menschen nach Photopigmentbleichung verringert und in Abhängigkeit der Zeit danach wieder ansteigt (Adrian, 1945). Diese Beobachtung zeigt klare Parallelen mit der Erholung der anhand psychophysischer Methoden ermittelten visuellen Sensitivität (Fulton & Rushton, 1978; Karpe & Tansley, 1948). Der Zusammenhang zwischen verbrauchtem Rhodopsin und dem Empfindlichkeitsverlust des Auges auf Lichtreize wurde fassbarer, sobald es möglich wurde den Rhodopsingehalt im lebenden Organismus zu messen. Es wurde eine lineare Beziehung zwischen dem logarithmierten Schwellenwert und dem Rhodopsingehalt während der Erholung des Auges nach intensiver Photopigmentbleichung beim Menschen (Rushton, 1961) und bei der Ratte (Dowling, 1960) gezeigt. Diese Erkenntnis brachte Dowling zu der Hypothese, dass die Dunkeladaptation aus zwei Phasen bestehe: einer langsamen „photochemischen“ und einer schnellen „neuronalen“ Phase. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der photochemischen Phase wurde die Regeneration des Sehpigments postuliert (Barlow, 1964). Spätere Experimente konnten zeigen, dass die Empfindlichkeit der Stäbchen auch von der Entfernung und Inaktivierung von Verbindungen, die während der Photopigmentbleichung entstehen, abhängig ist (Pepperberg, 1984). So entwickelten Donner und Reuter die Hypothese, dass das Ausmaß der Desensibilisierung nach der Photopigmentbleichung sich proportional zur Konzentration von Metarhodopsin II verhalte (Donner & Reuter, 1967). Besonders bei schwacher Photopigmentbleichung scheint Metarhodopsin II eine führende Rolle in der Reizschwellenanhebung zu spielen (Leibrock *et al.*, 1998).



Stärkere Photopigmentbleichung führt wohl zu einer gesteigerten Produktion von langlebigeren Verbindungen, das Opsin mit eingeschlossen.

Durch Verwendung der Doppelblitz-Methode während der Dunkeladaptation nach der Photopigmentbleichung, ist es möglich sowohl die maximale Photorezeptorenantwort als auch eine isolierte, semi-saturierte (d. h. keine Maximalantwort) Stäbchenantwort zu erhalten.

Ein weiterer Aspekt für die Verwendung zweier unterschiedlich intensiver Blitze ist in der Arbeit von Radu dargelegt (Radu *et al.*, 2003), in welcher der Einfluss von Isotretinoin (Acutane<sup>®</sup> – Roche, Basel, Schweiz) auf die dunkeladaptierten ERG-Antworten nach einer Photopigmentbleichung von ca. 60 % des Rhodopsingehalts (1000 Lux für 25 Sekunden) bei *abcr* -/- knockout Mäusen untersucht wurde. Bei dem in dieser Arbeit angewandten ERG-Protokoll wurden 2 unterschiedliche Blitzintensitäten während der Rhodopsinregeneration verwendet (-0,91 log scotopic td-s und 3,11 log scotopic td-s). Hierbei wurde vermutet, dass die ERG-Antwort auf schwache Blitze, die keine Sättigung der Stäbchenantwort hervorrufen, abhängig vom Rhodopsingehalt sei. Der nachfolgende stärkere Blitz scheint keine so große Sensitivität betreffend des Rhodopsingehalts zu besitzen. Es stellte sich dann im Zusammenhang mit der vorgestellten Arbeit die Frage, zwei entsprechende Blitze in einem Protokoll zu vereinen und dadurch eine Möglichkeit zu erschließen, den Effekt auf den Rhodopsinzyklus, z. B. eines Medikamentes, quantifizieren zu können.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, welche das in dieser Arbeit beschriebene ERG-Protokoll zur Testung eines Medikamentes (ACU-3223, Isomerohydrolaseinhibitor) anwendete, zeigt die Fähigkeit dieses Protokolls den Einfluss eines Stoffes auf den visuellen Zyklus zu untersuchen (Messias *et al.*, 2008). Hierbei wurde nach Gabe des Medikamentes eine Reduktion der b-Wellenamplitude um ca. 50% und eine minimale Reduktion der a-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung bei sonst unveränderten ERG-Parametern beobachtet.

Bei den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit fällt auf, dass auch nach intensiver Photopigmentbleichung die durch den Blitz  $\alpha$  hervorgerufene a-

Wellenamplitude nicht eliminiert wird. Das lässt sich zum Einen durch die schnelle Erholung der Zapfen erklären, zum Anderen aber auch durch die Intensität des Blitzes, welcher eine maximale Antwort hervorruft und dadurch in der Lage ist eine größere Anzahl an Zellen zu rekrutieren. Diese Annahmen sind wahrscheinlich auch für die mehr als doppelt so schnelle Regeneration der a-Welle im Vergleich zur b-Welle verantwortlich.

Die Ergebnisse der Erholungszeit der a- und b-Wellenamplitude zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Intensität und Dauer der Photopigmentbleichung. Auf eine Exaktheit der Protokollmesszeiten ist zu achten. Schon eine geringe Abweichung der Photopigmentbleichungsdauer und -intensität führt zu einer deutlich veränderten Regeneration der a- und b-Wellenamplitude (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 22). Somit ist eine manuelle Steuerung des ERG-Protokolls ungeeignet.

Ebenfalls ersichtlich wird, dass eine zu geringe Photopigmentbleichung ( $2,5 \text{ cd/m}^2$  für 25 Sekunden,  $10 \text{ cd/m}^2$  für 25 Sekunden) eine geringe Aussage liefert, da vermutlich der Rhodopsinzyklus zu wenig „gefordert“ wird, und durch die schnelle Regeneration der Amplituden die Gefahr der Ungenauigkeit birgt. Eine zu starke Photopigmentbleichung ( $500 \text{ cd/m}^2$  für 60 Sekunden) wiederum wird durch die lange Protokolldauer unpraktikabel. Somit erscheint eine Photopigmentintensität von etwa  $400 \text{ cd/m}^2$  für 30 Sekunden geeignet. Eine Protokolldauer von 2 Stunden sollte nicht überschritten werden, da es sich zum einen als schwierig erweist, die Temperatur über einen längeren Zeitraum sicher zu kontrollieren, zum anderen wiederholtes Nachspritzen von Narkosemedikamenten eine höhere Letalität der Tiere und einen stärkeren Einfluss der Medikamente auf die elektroretinographischen Messungen bedingt.

Es ist an dieser Stelle wichtig darauf hinzuweisen, dass die Narkose einen erheblichen Einfluss auf die ERG-Ergebnisse haben kann. Keller zeigte eine verlangsamte Rhodopsinregeneration bei Ratten und Mäusen unter einer Ketamin/Xylazin Anästhesie (Keller *et al.*, 2001). Aus diesem Grund sollte die Art der Narkose auf die Rhodopsinregeneration beim Vergleich von verschiedenen Studien berücksichtigt werden. Des Weiteren ist auf eine

konstante Körpertemperatur der Ratten zu achten und sollte bei einem Vergleich verschiedener Studien ebenfalls zur Kenntnis genommen werden, da die Körpertemperatur einen Einfluss auf die Amplitudenhöhe hat (Kong & Gouras, 2003).

### 4.1.5. Helladaptiertes ERG

Als letzter Schritt wurde ein helladaptiertes ERG durchgeführt, welches die Standarduntersuchung zur Beurteilung der Zapfenfunktion darstellt. Durch die vorausgegangene Helladaptation erfolgt eine Sättigung der Stäbchen, so dass lediglich die Antworten der Zapfen im ERG aufgezeichnet werden. Die standardisierte 10-minütige Helladaptation ist nötig, da die Amplitude der ERG-Antwort von der Dauer der Lichtadaptation abhängig ist (Rüther & Zrenner, 1996). Besonders nach vorausgegangener Dunkeladaptation zeigen die a- und b-Wellenamplitude beim Menschen einen Anstieg über mehrere Minuten (Armington & Biersdorf, 1958; Burian, 1954; Gouras & Mackay, 1989). Um eine Amplitudenschwankung zu vermeiden, sollte darum mindestens 10 Minuten helladaptiert werden (Marmor *et al.*, 2004).

Durch die Aufzeichnung der Zapfenantwort auf Einzelblitze und auf Flickerblitze konnte gezeigt werden, dass auch noch nach längeren Messzeiten eine geringe Variabilität der Daten erreichbar ist und dass die verschiedenen Intensitäten des Photopigmentbleichens auf die Zapfenfunktion keinen gravierenden Einfluss haben.

Die geringen Amplituden der ERG-Antworten lassen sich mit der kleinen Anzahl von Zapfen in der Rattenretina gut vereinbaren. Da die Amplituden sehr gering ausfallen, ist die Verwendung eines hochauflösenden Gerätes zur Erhebung des helladaptierten Ratten-ERGs notwendig.

### 4.1.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem hier präsentierten ERG-Protokoll ist es möglich die Regeneration der a- und b-Wellenamplituden während der Dunkeladaptation nach Photopigmentbleichung zu verfolgen. Die Interpretation dieser Ergebnisse lässt Aussagen über die Funktionalität des Rhodopsinzyklus zu. Offen bleibt

dennoch die Korrelation zwischen der Rhodopsinkonzentration und der ERG-Amplitude während der Dunkeladaptation. Interessant wäre es dieses Protokoll zur Klärung ebendieser Frage anzuwenden. In diesem Fall wäre eine chromatographische Untersuchung zur Bestimmung der Rhodopsinkonzentration zu korrelieren mit elektroretinographischen Untersuchungen zur Bestimmung der a- und b-Wellenamplitude im Rahmen der Dunkeladaptation. Weiterhin wäre ein direkter Vergleich zwischen dem hier vorgestellten Protokoll und dem ISCEV-Standard zur Untersuchung der Dunkeladaptationskinetik empfehlenswert, um eine klare Aussage über die Sensitivität dieses Protokolls zu erhalten.

Das Protokoll und die präsentierten Ergebnisse können für zukünftige Studien zur Erfassung der Rhodopsinzykluserholung als Vorlage nützlich sein und somit ist das Ziel der Arbeit erreicht. Da ein Großteil der getesteten Medikamente teuer ist, ist ein verlässliches Protokoll mit der Erfassung möglichst vieler Information über den elektroretinographischen Einfluss der angewandten Stoffe von Interesse.

Die oben erwähnte Arbeit von Messias *et al.* (Messias *et al.*, 2008) zeigt die Praktikabilität dieses Protokolls zur Untersuchung der visuellen Zyklusfunktion. Somit bietet sich durch die Anwendung dieses Protokolls ein Mittel zur gezielten Untersuchung toxischer Einflüsse, beispielsweise von Medikamenten auf die Dunkeladaptation als Funktion der retinalen Integrität.

## 5. Zusammenfassung

Durch Anwendung eines ERG-Protokolls, welches die vom ISCEV- Standard geforderten Schritte (die dunkeladaptierte Stäbchen- und Maximalantwort, die OP, die helladaptierte Zapfenantwort auf Einzelblitze und auf 30-Hz-Flicker) enthält und um zwei weitere Schritte, der Ermittlung der Erholungszeit nach kurzer Stäbchendesensibilisierung mittels paired-flash Technik und der Doppelblitz-Technik zur Erfassung der Regeneration der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung, ergänzt wurde, ist ein ERG-Protokoll in der Lage gezielt die Funktion des visuellen Zyklus zu beurteilen.

Das Ziel dieser Arbeit war es ein solches Protokoll zu entwickeln, welches auch in der Praxis einsetzbar wäre und die dazugehörigen Normwerte für die funktionelle Erholung am lebenden Tier zu ermitteln. Im Folgenden soll das Protokoll zusammengefasst und die für die Praxis relevanten Beobachtungen erwähnt werden. Das Protokoll besteht aus 5 Schritten:

- 1. Dunkeladaptiertes ERG:** Hierbei wurde die absolute Dunkeladaptation der Tiere ermittelt und die erhaltenen Werte mittels dem Modell von Hill interpretiert. Ein Abweichen von den Parametern  $V_{\max}$  und  $k$  lässt Aussagen über die Sensitivität des Auges im Dunkeln und damit auch über eventuell veränderte Zellfunktionen zu. Der Parameter  $k$  ist zur Beurteilung der dunkeladaptierten Sensitivität geeignet, da die Streuung der Werte gering und der Parameter  $k$  von den absoluten Amplitudenwerten unabhängig ist. Anschließend erfolgte die Bestimmung der dunkeladaptierten Maximalantwort, aus der die a- und b-Wellenamplitude mit deren Gipfelzeiten und die OP ermittelt wurden.
- 2. Ermittlung der Erholungszeit nach kurzer Stäbchendesensibilisierung mittels paired-flash Technik:** Die Anwendung der paired-flash Technik lässt gezielt Aussagen über die Rhodopsindeaktivierungskinetik der dunkeladaptierten Stäbchen zu. Bei den gewählten Blitzintensitäten, Testblitz mit  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  gefolgt von einem Untersuchungsblitz mit  $30 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , beträgt bei gesunden Ratten die Zeit bis zur kompletten Erholung der a- und b-Wellenamplitude 4 s.

3. **Photopigmentbleichung:** Um einen ausreichend hohen Verbrauch an Sehpigment zu bewirken, aber dennoch praktikable Messzeiten zu erhalten, empfehlen wir eine Dauer der Photopigmentbleichung von 30 Sekunden bei einer Lichtintensität von 400 cd/m<sup>2</sup>.
4. **Regeneration der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung:** Durch den Gebrauch eines Doppelblitz-Protokolls, ist es möglich sowohl die Regeneration der semi-saturierten b-Welle und als auch die der gemischten Maximalantwort gleichzeitig zu verfolgen. Als Blitzintensitäten eignen sich für Blitz  $\beta$  0,003 cd.s/m<sup>2</sup> und 10 cd.s/m<sup>2</sup> für den Blitz  $\alpha$ .
5. **Helladaptiertes ERG:** Um gezielt die Zapfenfunktion beurteilen zu können, ist es nötig unter helladaptierten Umständen ein Einzelblitz und ein Flicker-ERG durchzuführen. Hierbei ist eine Flickerfrequenz von 20 Hz bei Ratten ausreichend. Man sollte allerdings wegen der geringen Amplituden ein hochauflösendes Gerät verwenden und auf einen guten Elektrodenkontakt achten.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, welche das hier beschriebene ERG-Protokoll zur Testung eines Medikamentes (ACU-3223, Isomerohydrolaseinhibitor) anwendete, zeigt die Fähigkeit des Protokolls die Spezifität dieses Medikamentes auf den visuellen Zyklus zu testen (Messias *et al.*, 2008). Hierbei wurde nach Gabe des Medikamentes eine Reduktion der b-Wellenamplitude um ca. 50 % und eine minimale Reduktion der a-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung bei sonst unveränderten ERG-Parametern beobachtet.

Das Protokoll ist somit in der Lage gezielt die visuelle Zyklusfunktion zu untersuchen und ist geeignet zur Anwendung bei retinalen Erkrankungen oder der Untersuchung von Medikamenten bzw. toxischen Substanzen, die einen Einfluss auf den visuellen Zyklus haben könnten.

Durch eine Poweranalyse anhand der in dieser Arbeit erhobenen Normwerte ist es möglich weitere Studien zu planen, welche dieses Protokoll anwenden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Horizontaler Schnitt durch ein menschliches Auge, schematisch (modifiziert nach Kolb, H 2003, <a href="http://www.webvision.med.utah.edu">www.webvision.med.utah.edu</a> ).	1
Abb. 2	Vertikalschnitt und schematischer Aufbau der Retina; A: schematische Darstellung des Vertikalschnitts durch die Retina (modifiziert nach Kolb, H 2003, <a href="http://www.webvision.med.utah.edu">www.webvision.med.utah.edu</a> ); B: histologische Darstellung der Retina (modifiziert nach <a href="http://www.webvision.med.utah.edu">www.webvision.med.utah.edu</a> ).	3
Abb. 3	Schematische Darstellung der Photorezeptoren (übernommen aus <a href="http://www.kfa-juelich.de/ibi/ibi-1/stefring/photor/pho01bl.jpg">www.kfa-juelich.de/ibi/ibi-1/stefring/photor/pho01bl.jpg</a> ).	4
Abb. 4	Links: schematische Darstellung des Außensegments eines Stäbchens; Mittig: Struktur des Opsins; Rechts: Formel von 11-cis- und all-trans-Retinal (modifiziert nach Lindner Biologie, Metzler Verlag, 21. Auflage, 1998, S. 195).	6
Abb. 5	Phototransduktion (modifiziert nach Lehrbuch der Physiologie, Klinke und Silbernagel, Thieme Verlag, 3. Auflage, 2001, S. 614).	7
Abb. 6	Schematische Darstellung des Rhodopsinzyklus (modifiziert nach Saari, 1993).	10
Abb. 7	Schematische Darstellung des elektrischen Stromkreises am Auge.	13
Abb. 8	Beispiel eines dunkeladaptierten ERGs der Ratte.	15
Abb. 9	Versuchsaufbau. Ratte im ColorDome©.	20
Abb. 10	Messung der Erholung der a- und b-Wellenamplitude nach Photopigmentbleichung ( $400 \text{ cd/m}^2 - 30 \text{ sec}$ ) mittels Doppelblitz-Technik.	25
Abb. 11	Ergebnisse der Versuchsreihe zur Bestimmung des benötigten Interstimulusintervall beim Doppelblitz-Protokoll.	26
Abb. 12	Vier konkrete Beispiele verschiedener Tiere bei der Anpassung der Hill-Funktion.	28

Abb. 13	Beispiel für OP, die mittels der FFT (Fast Fourier Transformation) aus dem aufsteigenden Ast der b-Welle gefiltert werden.	29
Abb. 14	A: Beispiel einer dunkeladaptierten ERG-Messung an einem Rattenauge. B: Beispiel der Interrelation zwischen b-Wellenamplitude und der Lichtintensität anhand der Messergebnisse an einem Rattenauge. C: Beispielhafte Darstellung der Interrelation zwischen den b-Wellengipfelzeit und der Lichtintensität am Messergebnis eines Rattenauges und die daraus sich ermöglichende Berechnung von $I_{100}$ und $T_{0.02}$ .	34
Abb. 15	Verteilung von $R^2$ für die Anpassung des Modells der Interrelation der b-Wellenamplitude und der Lichtintensität.	35
Abb. 16	Die Gesamtverteilung von $V_{max}$ .	35
Abb. 17	Intraokularer Unterschied von $V_{max}$ .	36
Abb. 18	Intraindividueller Unterschied von $V_{max}$ .	37
Abb. 19	Poweranalyse.	38
Abb. 20	Darstellung der Erholungszeit der Stäbchen nach kurzer Desensibilisierung am Beispiel zweier Ratten.	41
Abb. 21	Die Regeneration der b-Wellenamplituden nach der Photopigmentbleichung.	42
Abb. 22	Die Regeneration der a-Wellenamplituden nach der Photopigmentbleichung.	44
Abb. 23	Intraokularer und intraindividueller Unterschiede der a- und b-Wellenamplituderegeneration nach der Photopigmentbleichung.	47



## 7. Tabellenverzeichnis

---

Tab.1	Übersicht über das verwendete ERG-Messprotokoll.	22
-------	--	----

---

## 8. Literaturverzeichnis

Adler AJ & Edwards RB (2000). Human interphotoreceptor matrix contains serum albumin and retinol-binding protein. *Exp Eye Res* 70, 227-234.

Adrian ED (1945). The electric response of the human eye. *J Physiol* 104, 84-104.

Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, & Leppert M (1997a). Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 277, 1805-1807.

Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, & Lupski JR (1997b). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15, 236-246.

Anderson RE & Maude MB (1970). Phospholipids of bovine outer segments. *Biochemistry* 9, 3624-3628.

Armington JC & Biersdorf WR (1958). Long-term light adaptation of the human electroretinogram. *J Comp Physiol Psychol* 51, 1-5.

Barlow HB (1964). Dark-adaptation: a new hypothesis. *Vision Res* 4, 47-58.

Ben-Shabat S, Parish CA, Vollmer HR, Itagaki Y, Fishkin N, Nakanishi K, & Sparrow JR (2002). Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin. *J Biol Chem* 277, 7183-7190.

Birch DG, Hood DC, Nusinowitz S, & Pepperberg DR (1995). Abnormal activation and inactivation mechanisms of rod transduction in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and the pro-23-his mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1603-1614.

Blomhoff R, Green MH, Berg T, & Norum KR (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science* 250, 399-404.

Burian HM (1954). Electric responses of the human visual system. *AMA Arch Ophthalmol* 51, 509-524.

Bush RA & Sieving PA (1994). A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 635-645.

Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, & Simon MI (1995). Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* 267, 374-377.

Cicerone CM (1976). Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. *Science* 194, 1183-1185.

Cideciyan AV, Aleman TS, Swider M, Schwartz SB, Steinberg JD, Brucker AJ, Maguire AM, Bennett J, Stone EM, & Jacobson SG (2004). Mutations in ABCA4 result in accumulation of lipofuscin before slowing of the retinoid cycle: a reappraisal of the human disease sequence. *Hum Mol Genet* 13, 525-534.

Cideciyan AV, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CL, Marmor MF, Jacobson SG, & Palczewski K (2000). Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis Neurosci* 17, 667-678.

Cideciyan AV, Pugh EN, Jr., Lamb TD, Huang Y, & Jacobson SG (1997). Rod plateaux during dark adaptation in Sorsby's fundus dystrophy and vitamin A deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1786-1794.

Cideciyan AV, Zhao X, Nielsen L, Khani SC, Jacobson SG, & Palczewski K (1998). Null mutation in the rhodopsin kinase gene slows recovery kinetics of rod and cone phototransduction in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 328-333.

Cremers FP, van de Pol DJ, van DM, den Hollander AI, van Haren FJ, Knoers NV, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Deutman AF, & Hoyng CB (1998). Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 7, 355-362.

Dacheux RF & Raviola E (1986). The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci* 6, 331-345.

Dalke C, Loster J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Soewarto D, Favor J, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Gekeler F, Shinoda K, Zrenner E, Meitinger T, Hrabe de AM, & Graw J (2004). Electroretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 601-609.

Delori FC, Fleckner MR, Goger DG, Weiter JJ, & Dorey CK (2000). Autofluorescence distribution associated with drusen in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 496-504.

DeVries SH & Baylor DA (1995). An alternative pathway for signal flow from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10658-10662.

Doty E (1951). Cone electroretinography by flicker. *Nature* 168, 738.

Dong CJ, Agey P, & Hare WA (2004). Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 21, 533-543.

Dong CJ & Hare WA (2002). GABA<sub>C</sub> feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b-wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res* 42, 1081-1087.

Donner KO & Reuter T (1967). Dark-adaptation processes in the rhodopsin rods of the frog's retina. *Vision Res* 7, 17-41.

Dorey CK, Wu G, Ebenstein D, Garsd A, & Weiter JJ (1989). Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1691-1699.

Dowling JE (1960). Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature* 188, 114-118.

Dowling JE & Boycott BB (1966). Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 166, 80-111.

Famiglietti EV, Jr. & Kolb H (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res* 84, 293-300.

Farahbakhsh ZT, Hideg K, & Hubbell WL (1993). Photoactivated conformational changes in rhodopsin: a time-resolved spin label study. *Science* 262, 1416-1419.

Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, & Khorana HG (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770.

Fox DA & Katz LM (1992). Developmental lead exposure selectively alters the scotopic ERG component of dark and light adaptation and increases rod calcium content. *Vision Res* 32, 249-255.

Fulton AB & Rushton WA (1978). The human rod ERG: correlation with psychophysical responses in light and dark adaptation. *Vision Res* 18, 793-800.

Futterman S, Hendrickson A, Bishop PE, Rollins MH, & Vacano E (1970). Metabolism of glucose and reduction of retinaldehyde in retinal photoreceptors. *J Neurochem* 17, 149-156.

Golczak M, Kuksa V, Maeda T, Moise AR, & Palczewski K (2005). Positively charged retinoids are potent and selective inhibitors of the trans-cis isomerization in the retinoid (visual) cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8162-8167.

Goto Y, Yasuda T, Tobimatsu S, & Kato M (1998). 20-Hz flicker stimulus can isolate the cone function in rat retina. *Ophthalmic Res* 30, 368-373.

Gouras P & Mackay CJ (1989). Growth in amplitude of the human cone electroretinogram with light adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 625-630.

Grimm C, Hermann DM, Bogdanova A, Hotop S, Kilic U, Wenzel A, Kilic E, & Gassmann M (2005). Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration. *Semin Cell Dev Biol* 16, 531-538.

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, & Reme CE (2002). HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 8, 718-724.

Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, & Reme CE (2000). Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 25, 63-66.

Grimm C, Wenzel A, Stanescu D, Samardzija M, Hotop S, Groszer M, Naash M, Gassmann M, & Reme C (2004). Constitutive overexpression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration. *J Neurosci* 24, 5651-5658.

Grimm C, Wenzel A, Williams T, Rol P, Hafezi F, & Reme C (2001). Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 497-505.

Gurevich L & Slaughter MM (1993). Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 33, 2431-2435.

Hack I, Peichl L, & Brandstatter JH (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14130-14135.

Hamer RD, Nicholas SC, Tranchina D, Liebman PA, & Lamb TD (2003). Multiple steps of phosphorylation of activated rhodopsin can account for the reproducibility of vertebrate rod single-photon responses. *J Gen Physiol* 122, 419-444.

Hanitzsch R, Kuppers L, & Flade A (2004). The effect of GABA and the GABA-uptake-blocker NO-711 on the b-wave of the ERG and the responses of horizontal cells to light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 42, 784-791.

Hecht S & Mandelbaum J (1938). Rod-cone dark adaptation and vitamin A. *Science* 88, 219-221.

Heckenlively JR & Arden GB (2006). *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*, Second ed. The MIT press, Massachusetts.

Hetling JR & Pepperberg DR (1999). Sensitivity and kinetics of mouse rod flash responses determined in vivo from paired-flash electroretinograms. *J Physiol* 516 ( Pt 2), 593-609.

Heynen H, Wachtmeister L, & van ND (1985). Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* 25, 1365-1373.

Jacobs GH (2008). Primate color vision: a comparative perspective. *Vis Neurosci* 25, 619-633.

Jin M, Li S, Moghrabi WN, Sun H, & Travis GH (2005). Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122, 449-459.

Karpe G & Tansley K (1948). The relationship between the change in the electroretinogram and the subjective dark-adaptation curve. *J Physiol* 107, 272-279.

Karwoski CJ & Proenza LM (1980). Neurons, potassium, and glia in proximal retina of *Necturus*. *J Gen Physiol* 75, 141-162.

Katz LM & Fox DA (1991). Prenatal ethanol exposure alters scotopic and photopic components of adult rat electroretinograms. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 2861-2872.

Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, & Reme C (2001). Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 476-480.

Kemp CM, Jacobson SG, Faulkner DJ, & Walt RW (1988). Visual function and rhodopsin levels in humans with vitamin A deficiency. *Exp Eye Res* 46, 185-197.

Knapp AG & Schiller PH (1984). The contribution of on-bipolar cells to the electroretinogram of rabbits and monkeys. A study using 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB). *Vision Res* 24, 1841-1846.

Kolb H. How the retina works. (2003) Electronic Citation: <http://www.webvision.med.utah.edu/index.html>.

Kong J & Gouras P (2003). The effect of body temperature on the murine electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 106, 239-242.

Kuhn H & Wilden U (1987). Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin. *J Recept Res* 7, 283-298.

Laitko U & Hofmann KP (1998). A model for the recovery kinetics of rod phototransduction, based on the enzymatic deactivation of rhodopsin. *Biophys J* 74, 803-815.

Lamb TD & Pugh EN, Jr. (2004). Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 23, 307-380.

Lamb TD & Pugh EN, Jr. (2006). Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5137-5152.

Leibrock CS, Reuter T, & Lamb TD (1998). Molecular basis of dark adaptation in rod photoreceptors. *Eye* 12 ( Pt 3b), 511-520.

Li W, Keung JW, & Massey SC (2004). Direct synaptic connections between rods and OFF cone bipolar cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 474, 1-12.

Lyubarsky AL, Falsini B, Pennesi ME, Valentini P, & Pugh EN, Jr. (1999). UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. *J Neurosci* 19, 442-455.

Maeda A, Maeda T, Golczak M, Imanishi Y, Leahy P, Kubota R, & Palczewski K (2006a). Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol Pharmacol* 70, 1220-1229.

Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Golczak M, Moise AR, & Palczewski K (2006b). Aberrant metabolites in mouse models of congenital blinding diseases: formation and storage of retinyl esters. *Biochemistry* 45, 4210-4219.

Marmor MF (1977). Fundus albipunctatus: a clinical study of the fundus lesions, the physiologic deficit, and the vitamin A metabolism. *Doc Ophthalmol* 43, 277-302.

Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, & Yamamoto S (2004). Standard for clinical electroretinography (2004 update). *Doc Ophthalmol* 108, 107-114.

Mata NL, Radu RA, Clemmons RC, & Travis GH (2002). Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* 36, 69-80.

Maw MA, John S, Jablonka S, Muller B, Kumaramanickavel G, Oehlmann R, Denton MJ, & Gal A (1995). Oguchi disease: suggestion of linkage to markers on chromosome 2q. *J Med Genet* 32, 396-398.

Messias A, Gekeler F, Wegener A, Dietz K, Kohler K, & Zrenner E (2007). Retinal safety of a new fluoroquinolone, pradofloxacin, in cats: assessment with electroretinography. *Doc Ophthalmol*.

Messias A, Tzekov RT, McGee D, Peters T, Wilhelm B, Baryluk A, Gekeler F, Kubota R, & Zrenner E. Single Doses of a New Vitamin A Derivative (AG-787-14-1) Selectively Slow Down Rod Visual Cycle in Rats. *ARVO D669[3516/]*. 2008.

Molday LL, Rabin AR, & Molday RS (2000). ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 25, 257-258.

Naka KI & Rushton WA (1966). S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). *J Physiol* 185, 587-599.

Newman EA & Karwoski CJ (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal glial (Muller) cells. *Acta Physiol Scand Suppl* 582, 51.

Newman EA & Odette LL (1984). Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K<sup>+</sup> hypothesis. *J Neurophysiol* 51, 164-182.

Nilsson SE, Sundelin SP, Wihlmark U, & Brunk UT (2003). Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Doc Ophthalmol* 106, 13-16.

Okajima TI, Pepperberg DR, Ripps H, Wiggert B, & Chader GJ (1990). Interphotoreceptor retinoid-binding protein promotes rhodopsin regeneration in toad photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6907-6911.

Osterberg G (1935). Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol* 6, 1-103.

Palczewski K, Jager S, Buczylo J, Crouch RK, Bredberg DL, Hofmann KP, Sson-Batres MA, & Saari JC (1994). Rod outer segment retinol dehydrogenase: substrate specificity and role in phototransduction. *Biochemistry* 33, 13741-13750.

Palczewski K & Saari JC (1997). Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol* 7, 500-504.



Papayannou M, Ocaka L, Bessant D, Lois N, Bird A, Payne A, & Bhattacharya S (2000). An analysis of ABCR mutations in British patients with recessive retinal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 16-19.

Peachey NS, Alexander KR, & Fishman GA (1987). Rod and cone system contributions to oscillatory potentials: an explanation for the conditioning flash effect. *Vision Res* 27, 859-866.

Penn RD & Hagins WA (1969). Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature* 223, 201-204.

Pepperberg DR (1984). Rhodopsin and visual adaptation: analysis of photoreceptor thresholds in the isolated skate retina. *Vision Res* 24, 357-366.

Pepperberg DR, Birch DG, & Hood DC (1997). Photoresponses of human rods in vivo derived from paired-flash electroretinograms. *Vis Neurosci* 14, 73-82.

Phipps JA, Yee P, Fletcher EL, & Vingrys AJ (2006). Rod photoreceptor dysfunction in diabetes: activation, deactivation, and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 3187-3194.

Radu RA, Mata NL, Nusinowitz S, Liu X, Sieving PA, & Travis GH (2003). Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4742-4747.

Rando RR (1992). Molecular mechanisms in visual pigment regeneration. *Photochem Photobiol* 56, 1145-1156.

Rao VR & Oprian DD (1996). Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25, 287-314.

Raviola E & Gilula NB (1973). Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 1677-1681.

Ripps H, Carr RE, Siegel IM, & Greenstein VC (1984). Functional abnormalities in vincristine-induced night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 787-794.

Robson JG & Frishman LJ (1998). Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 95, 187-215.

Rousseau S & Lachapelle P (1999). The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic oscillatory potentials. *Doc Ophthalmol* 99, 135-150.

Rüther K & Zrenner E (1996). Factors that influence the increase in the electroretinogram 30-Hz flicker amplitude during light adaptation. *Ger J Ophthalmol* 5, 285-288.

Rushton WA (1961). Rhodopsin measurement and dark-adaptation in a subject deficient in cone vision. *J Physiol* 156, 193-205.

Saari JC, Bredberg DL, & Farrell DF (1993). Retinol esterification in bovine retinal pigment epithelium: reversibility of lecithin:retinol acyltransferase. *Biochem J* 291 ( Pt 3), 697-700.

Saari JC, Bredberg DL, & Noy N (1994). Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* 33, 3106-3112.

Sakai H, Tani Y, Shirasawa E, Shirao Y, & Kawasaki K (1995). Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Ophthalmic Res* 27, 57-63.

Saszik SM, Robson JG, & Frishman LJ (2002). The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J Physiol* 543, 899-916.

Schertler GF & Hargrave PA (1995). Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11578-11582.

Schneeweis DM & Schnapf JL (1999). The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation, noise, and kinetics. *J Neurosci* 19, 1203-1216.

Seeliger MW, Grimm C, Stahlberg F, Friedburg C, Jaissle G, Zrenner E, Guo H, Reme CE, Humphries P, Hofmann F, Biel M, Fariss RN, Redmond TM, & Wenzel A (2001). New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 29, 70-74.

Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, & Bourne HR (1996). Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* 383, 347-350.

Sieving PA, Chaudhry P, Kondo M, Provenzano M, Wu D, Carlson TJ, Bush RA, & Thompson DA (2001). Inhibition of the visual cycle in vivo by 13-cis retinoic acid protects from light damage and provides a mechanism for night blindness in isotretinoin therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1835-1840.

Sieving PA, Frishman LJ, & Steinberg RH (1986). Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *J Neurophysiol* 56, 1049-1061.

Sieving PA, Murayama K, & Naarendorp F (1994). Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis Neurosci* 11, 519-532.

Sieving PA & Nino C (1988). Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1608-1614.

Silva GA, Hetling JR, & Pepperberg DR (2001). Dynamic and steady-state light adaptation of mouse rod photoreceptors in vivo. *J Physiol* 534, 203-216.

Smith RG, Freed MA, & Sterling P (1986). Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. *J Neurosci* 6, 3505-3517.

Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, Itagaki Y, & Nakanishi K (2003). A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res* 43, 2983-2990.

Stockton RA & Slaughter MM (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93, 101-122.

Strettoi E, Dacheux RF, & Raviola E (1990). Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina. *J Comp Neurol* 295, 449-466.

Strettoi E, Raviola E, & Dacheux RF (1992). Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (All) in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 325, 152-168.

Sun H, Molday RS, & Nathans J (1999). Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem* 274, 8269-8281.

Suter M, Reme C, Grimm C, Wenzel A, Jaattela M, Esser P, Kociok N, Leist M, & Richter C (2000). Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 39625-39630.

Szel A & Rohlich P (1992). Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res* 55, 47-52.

Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, & Schertler GF (1997). Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.

Wachtmeister L (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17, 485-521.

Wachtmeister L & Dowling JE (1978). The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 1176-1188.

Wässle H, Yamashita M, Greferath U, Grunert U, & Müller F (1991). The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Vis Neurosci* 7, 99-112.

Welch WJ (2008). Computer-Aided Design of Experiments for Response Estimation, pp. 217-224. *Technometrics*.

Weymouth AE & Vingrys AJ (2008). Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Prog Retin Eye Res* 27, 1-44.

Wu J, Peachey NS, & Marmorstein AD (2004). Light-evoked responses of the mouse retinal pigment epithelium. *J Neurophysiol* 91, 1134-1142.

Yonemura D, Kawasaki K, Shibata N, Tanabe J (1974). The electroretinographic PIII component of the human excised retina. *Jpn J Ophthalmol* 18, 322-333.

Xu X & Karwoski C (1995). Current source density analysis of the electroretinographic d wave of frog retina. *J Neurophysiol* 73, 2459-2469.

Zeit C, Gross AK, Leifert D, Kloeckener-Gruissem B, McAlear SD, Lemke J, Neidhardt J, & Berger W (2008). Identification and functional characterization of a novel rhodopsin mutation associated with autosomal dominant CSNB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4105-4114.

## 9.1. Mittelwerte und Standardabweichungen aller Messungen

	N	OD	OS	1. Messreihe	2. Messreihe
b-Wellengipfelzeit 100 ms Log (cd.s/m <sup>2</sup> )	38	-1.96 ± 0.31	-2.15 ± 0.24	-2.05 ± 0.25	-2.01 ± 0.3
b-Wellengipfelzeit I=0.02 (ms)	38	92.43 ± 9.06	87.64 ± 6.91	90.04 ± 7.47	91.09 ± 8.84
Flicker 20Hz – Amplitude (µV)	27	17.59 ± 5.73	17.72 ± 6.26	17.81 ± 5.8	17.53 ± 5.58
Flicker 20Hz – Phase (ms)	38	47.71 ± 2.17	48.86 ± 2.67	48.45 ± 2.51	48.28 ± 1.59
Maxantwort - a- Wellengipfelzeit (ms)	38	22.74 ± 1.8	23.24 ± 1.47	23.16 ± 1.44	23.78 ± 2.23
Maxantwort - a- Wellenamplitude (µV)	38	209.85 ± 80.84	268.63 ± 95.32	243.09 ± 87.54	224.02 ± 56.77
Maxantwort - b- Wellengipfelzeit (ms)	38	76.02 ± 7.17	75.93 ± 8.83	76.33 ± 7.24	75.23 ± 8.92
Maxantwort - b- Wellenamplitude (µV)	38	844.93 ± 247.87	1063.97 ± 325.11	977.64 ± 261.36	917.2 ± 173.07
Maxantwort – OP (µV.ms)	38	2065.43 ± 865.01	2619.53 ± 1013.96	2403.86 ± 955.64	2118.75 ± 909.7
Maxantwort – a- Wellensteigung (µV/ms)	38	20.44 ± 9.25	25.6 ± 9.44	23.28 ± 8.7	18.34 ± 6.94
VLogI – k (Log cd.s/m <sup>2</sup> )	38	-3.13 ± 0.3	-3.23 ± 0.23	-3.18 ± 0.26	-3.2 ± 0.22
VLogI – Vmax (µV)	38	800.25 ± 267.97	916.82 ± 236.57	858.53 ± 223.49	796.51 ± 155.39
VLogI - n	38	0.93 ± 0.12	0.95 ± 0.09	0.94 ± 0.1	0.98 ± 0.08
Paired - a-Welle ISI (75% Erholung) (ms)	36	1770.94 ± 456.56	1758.36 ± 527.88	1783.51 ± 436.26	1956.35 ± 346.4
Paired - b-Welle ISI (75% Erholung) (ms)	37	1134.88 ± 313.71	1252.93 ± 443.14	1073.96 ± 217.99	1212.71 ± 292.36
Photopisch – b- Wellenamplitude (µV)	38	98.67 ± 27.14	102.59 ± 30.89	100.79 ± 26.91	99.93 ± 24.66
Photopisch - b- Wellengipfelzeit (µV)	38	45.66 ± 3.75	46.53 ± 3.48	46.12 ± 3.35	45.47 ± 3
Erholung der a- Wellenamplitude bei T = 60 min (%)	13	102.86 ± 9.22	100.9 ± 8.68	101.55 ± 6.82	99.03 ± 9.33
Erholung der b- Wellenamplitude bei T = 60 min (%)	13	99.36 ± 10.76	100.22 ± 11.46	99.65 ± 8.56	98.08 ± 10.56

## 9.2. Mittelwerte und Standardabweichungen der intra-individuellen und intraokularen Differenzen

	Intraindividuelle Differenz (%)	Intraindividuelle Differenz (abs)	Intraokulare Differenz (%)	Intraokulare Differenz (abs)
b-Wellengipfelzeit 100 ms Log (cd.s/m <sup>2</sup> )	14.87 ± 16.08	0.25 ± 0.22	12.55 ± 13.73	0.22 ± 0.2
b-Wellengipfelzeit I=0.02 (ms)	7.48 ± 5.38	7.31 ± 5.76	5.6 ± 5.17	5.46 ± 5.4
Flicker 20Hz – Amplitude (µV)	24.09 ± 19.57	4.64 ± 3.8	13.87 ± 9.56	2.65 ± 1.97
Flicker 20Hz – Phase (ms)	3.47 ± 3.38	1.73 ± 1.7	2.81 ± 2.34	1.4 ± 1.21
Maxantwort - a-Wellengipfelzeit (ms)	6.92 ± 5.01	1.74 ± 1.37	5.15 ± 5.89	1.23 ± 1.43
Maxantwort - a-Wellenamplitude (µV)	21.27 ± 16.46	53.56 ± 45.32	23.71 ± 16.67	68.67 ± 58.24
Maxantwort - b-Wellengipfelzeit (ms)	11.36 ± 6.37	9.31 ± 5.53	6.38 ± 8.25	4.91 ± 6.11
Maxantwort - b-Wellenamplitude (µV)	18.06 ± 14.29	190.79 ± 174.17	25.84 ± 18.97	302.36 ± 253.77
Maxantwort – OP (µV.ms)	29.51 ± 18.94	722.43 ± 507.89	28.61 ± 20.93	781.58 ± 674.54
Maxantwort – a-Wellensteigung (µV/ms)	30.68 ± 18.9	7.64 ± 5.72	26.71 ± 18.14	7.41 ± 5.63
VLogI – k (Log cd.s/m <sup>2</sup> )	4.54 ± 4.14	0.13 ± 0.11	4.62 ± 4.95	0.13 ± 0.13
VLogI – Vmax (µV)	15.82 ± 12.63	150.47 ± 142.61	21.15 ± 15.53	208.14 ± 158.79
VLogI – n	8.23 ± 6.8	0.08 ± 0.07	6.11 ± 6.41	0.06 ± 0.06
Paired - a-Welle ISI (75% Erholung) (ms)	17.76 ± 12.56	366.53 ± 271.7	6.95 ± 6	123.88 ± 102.08
Paired - b-Welle ISI (75% Erholung) (ms)	17.08 ± 13.23	236.24 ± 239.32	12.77 ± 11.3	163.86 ± 183.96
Photopisch – b-Wellenamplitude (µV)	23.86 ± 13.42	27.99 ± 19.32	16.79 ± 14.96	19.03 ± 18.31
Photopisch - b-Wellengipfelzeit (µV)	7.1 ± 4.1	3.42 ± 2.04	4.4 ± 5.5	2.13 ± 2.73
Erholung der a-Wellenamplitude bei T = 60 min (%)	7.77 ± 7.7	8.52 ± 8.89	7.73 ± 6.95	8.34 ± 7.98
Erholung der b-Wellenamplitude bei T = 60 min (%)	6.89 ± 6.37	7.12 ± 6.71	7.68 ± 9.77	8.55 ± 11.88

N: Anzahl der untersuchten Tiere; OD: rechtes Auge, OS: linkes Auge; Maxantwort: dunkeladaptierte Maximalantwort; OP: oszillatorische Potentiale; ISI: Interstimulusintervall; abs: absolute Werte.

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Eberhart Zrenner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotion anfertigen zu dürfen.

Der größte Dank im Hinblick auf die Vollendung dieser Arbeit gilt meinem Mann, André Messias, welcher mich in all der Zeit unermüdlich unterstützte und mir tatkräftig zur Seite stand.

Bei meinen Eltern, Gabriele und Walter Stecher, möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Mit ihrer großzügigen und selbstlosen Art haben sie mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht und mich in allen Lebenslagen unterstützend begleitet.

## Lebenslauf

Name: Katharina Vieira Messias, geb. Stecher

Geburtsdatum: 24.11.1981

Geburtsort: Guatemala-Stadt, Guatemala

### Schulbildung:

---

1988-1992: Melanchthonschule Tübingen

---

1992-2001: Uhlandgymnasium Tübingen

---

2001: Abitur

---

### Studium:

---

2001-2003: Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

---

09/2003: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)

---

2003: Fortsetzung des Studiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen

---

2005: Auslandssemester an der Universität Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brasilien

---

2006: Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Prof. Zrenner mit dem Thema: „Elektroretinographische Untersuchung zur Erholung der a- und b-Welle nach Photopigmentbleichung bei der Ratte“

---

30.11.2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

---

Seit 03/2008 Assistenzärztin im Klinikverbund Südwest, Klinikum Sindelfingen-Böblingen, Neurologische Abteilung

---