

**Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Forschungsinstitut für Augenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. E. Zrenner**

**Die Nutzung elektroretinographischer Minimalsignale
zur quantitativen Erfassung der Restfunktion bei
fortgeschrittener erblicher Netzhautdegeneration**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Andreas Schatz
aus
Temirtau / Kasachstan**

2011

"Die Nutzung elektroretinographischer Minimalsignale zur quantitativen Erfassung der Restfunktion bei fortgeschrittener erblicher Netzhautdegeneration"

[25.01.2011]

Dekan: **Professor Dr. I. B. Autenrieth**

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Zrenner

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Gekeler

"Die Nutzung elektroretinographischer Minimalsignale zur quantitativen Erfassung der Restfunktion bei fortgeschrittener erblicher Netzhautdegeneration"

[25.01.2011]

Für Frau Limburger

Inhalt

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	6
2. EINLEITUNG	8
2.1. ERG.....	8
2.2. PROTOKOLLE.....	8
2.3. DIFFERENZIERUNG DER PHOTOREZEPTOREN IM ERG.....	9
2.3.1. <i>Skotopisches ERG</i>	9
2.3.2. <i>Kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort</i>	11
2.3.3. <i>Photopisches ERG</i>	11
2.3.4. <i>ERG der Blauzapfen</i>	12
2.4. SPEZIELLE POTENTIALE DES ERG.....	15
2.5. ZIELE DER AKTUELLEN ARBEIT.....	17
3. METHODEN	18
3.1. PROBANDEN- UND PATIENTENMESSUNG.....	18
3.2. APPARATUR.....	19
3.3. OPTIMIERUNG DER ERG METHODEN.....	22
3.4. STATISTIK UND AUSWERTUNG DES ERG.....	23
4. ERGEBNISSE	30
4.1. SKOTOPISCHES ERG.....	30
4.1.1. <i>Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)</i>	30
4.1.1.a. Exploration Frequenz.....	30
4.1.1.b. Exploration spektrale Sensitivität.....	32
4.1.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen.....	34
4.1.1.d. Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität.....	35
4.1.1.e. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:.....	36
4.1.1.f. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:.....	37
4.1.1.g. Vorstudie: Intensitätsserien und FFT-Analyse des Blauflickers.....	38
4.1.1.h. Vorstudie: Anwendung verschiedener Stimulationsfarben für den 9Hz-Flicker.....	44
4.1.1.i. Vorstudie: Festlegung der Intensitätsbreite für den 9Hz-Blauflicker.....	49
4.1.1.j. Vorstudie: Einfluss auf die Dunkeladaptation durch den 9Hz-Blauflicker.....	50
4.1.2. <i>Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie skotopisches ERG)</i>	53
4.1.2.a. Hauptstudie Pulszeit:.....	54
4.1.2.b. Hauptstudie Stimulationsintensität:.....	57
4.2. KOMBINIERTES STÄBCHEN- UND ZAPFEN-ERG.....	59
4.2.1. <i>Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)</i>	59
4.2.1.a. Exploration Frequenz.....	59
4.2.1.b. Exploration spektrale Sensitivität.....	59
4.2.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen.....	61
4.2.1.d. Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität:.....	62
4.2.1.e. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:.....	64
4.2.1.f. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:.....	65
4.2.1.g. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Stimulationsintensität:.....	67
4.2.2. <i>Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie kombiniertes Stäbchen- und Zapfen-ERG)</i> 73	
4.2.2.a. Hauptstudie Pulszeit:.....	73
4.2.2.b. Hauptstudie Stimulationsintensität:.....	75
4.3. PHOTOPISCHES ERG.....	78
4.3.1. <i>Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)</i>	78
4.3.1.a. Exploration Frequenz.....	78
4.3.1.b. Exploration spektrale Sensitivität.....	79
4.3.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen.....	79
4.3.1.d. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:.....	80
4.3.1.e. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:.....	82
4.3.1.f. Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität:.....	84
4.3.1.g. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Stimulationsintensität:.....	85

4.3.2.	Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie photopisches ERG).....	86
4.3.2.a.	Hauptstudie Pulszeit:	87
4.3.2.b.	Hauptstudie Stimulationsintensität:	88
4.4.	BLAUZAPFEN-ERG	90
4.4.1.	Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)	90
4.4.1.a.	Exploration Frequenz	90
4.4.1.b.	Exploration spektrale Sensitivität	90
4.4.1.c.	Exploration Stimulationseinstellungen	92
4.4.1.d.	Vorstudie des Blauzapfens ERG:.....	93
4.4.1.e.	Erkenntnisse aus der Vorstudie:	100
4.4.2.	Neues Paradigma für das Blauzapfen-ERG:.....	100
4.4.3.	Optimierung des neuen Blauzapfenparadigmas	103
4.4.3.a.	Untersuchungen zu den Adaptationsblitzen	103
4.4.3.b.	Untersuchungen zum Blauzapfenstimulus.....	104
4.4.4.	Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie des Blauzapfen-ERG).....	107
4.4.4.a.	Verifizierung der Blauzapfenstimulation	108
4.4.4.b.	Nachweis der tatsächlichen Blauzapfenantwort.....	109
4.4.5.	Auswertung:.....	112
5.	DISKUSSION:	116
5.1.	SKOTOPISCHES ERG:.....	116
5.1.1.	Auswahl der Stimulationsfarbe.....	117
5.1.2.	Auswahl der Stimulationsfrequenz.....	119
5.1.3.	Optimierung der skotopischen ERG Parameter	120
5.1.4.	Einfluss des 9Hz-Blauflickers auf die Dunkeladaptation	122
5.2.	KOMBINIERTES STÄBCHEN- UND ZAPFEN-ERG	123
5.2.1.	Bedingungen für die Optimierung des kombinierten ERG	123
5.2.2.	Einfluss hoher Intensitäten auf das kombinierte ERG	126
5.2.3.	Evaluation der oszillatorischen Potentiale	128
5.2.4.	Definition des optimierten Stäbchen- und Zapfen-ERG	128
5.3.	PHOTOPISCHES ERG:.....	130
5.3.1.	Grundlage der photopischen Optimierung	130
5.3.2.	Auswahl der Stimulationsfarbe.....	131
5.3.3.	Rolle der photopischen Stimulationsintensität.....	131
5.3.4.	Optimierung der photopischen Stimulationsparameter.....	132
5.4.	BLAUZAPFEN-ERG:.....	134
5.4.1.	Rahmenbedingung für die Blauzapfenstimulation	134
5.4.2.	Neues Stimulationsparadigma für die Blauzapfen.....	135
5.4.3.	Optimierung des Blauzapfenstimulus	137
5.4.4.	Nachweis der tatsächlichen Blauzapfenantwort.....	138
5.5.	RÉSUMÉ:	140
6.	ZUSAMMENFASSUNG:	142
7.	APPENDIX	143
7.1.	ROLLE DER MITTELUNGEN UND DER STIMULATIONSFREQENZ	143
7.2.	PROGRAMMIERUNG DER BLAUZAPFENSTIMULATION	144
7.3.	ERGEBNISSE DER HAUPTSTUDIEN	145
7.3.1.	Skotopische Hauptstudie	145
7.3.2.	Hauptstudie kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort	147
7.3.3.	Photopische Hauptstudie.....	151
7.3.4.	Blauzapfen ERG	155
7.4.	STIMULATIONS PROTOKOLLE	157
8.	LITERATURVERZEICHNIS:	159
9.	TEILE DER ARBEIT IN PRÄSENTATIONEN:	167
10.	DANKSAGUNG:	168
11.	LEBENS LAUF:	169

1. Abkürzungsverzeichnis:

µV	Mikrovolt
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
bzw.	beziehungsweise
cd	Candela (als Einheit der Lichtintensität)
CFF	critical fusion frequency
ECMDD	European Commission Medical Device Directive
ERG	Elektroretinogram
FFT	Fast Fourier Transformation
ISI	Inter-Stimulus-Interval
K	Kelvin
Kompo	Komponente
LA	linkes Auge
LED	Light Emitting Diode
m ²	Quadratmeter
max	maximal
min	Minute / mindestens
ms	Millisekunde
n-Welle	negatives Potential der Sättigungsblitze von dem Höhepunkt der b-Welle gemessen.
off	ERG-Antwort, die entsteht wenn ein Lichtreiz ausgeschaltet wird
OP	Oszillatorische Potentiale
PERG	Pattern ERG
phot	photopische Einheiten
PhNR	photopic negative response (negatives Potential photopischer Ableitungen von der Basislinie (0-Linie) gemessen
Prob.	Proband
RA	rechtes Auge

[25.01.2011]

s	Sekunde
SA	Standardabweichung
SAT	Selective Adaptation Technique
SNR	Signal-to-Noise-Ratio = Signal-Rausch-Verhältnis
skot	skotopische Einheiten
s.o.	siehe oben
SST	Silent Substitution Technique
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1. ERG

Durch die Präsentation eines Lichtreizes reagieren die Photorezeptoren und die damit in Kontakt stehenden Zellen in der Retina mit einer Spannungsänderung. Das ERG zeichnet durch eine Hornhautelektrode die Summe der Spannungsänderungen in der Retina auf [Granit 1947]. Durch die Veränderung der einzelnen Parameter des ERGs, wie zum Beispiel unterschiedliche Lichtstärken, verschiedenen Farben oder die Anwendung einer Hintergrundbeleuchtung, können die Photorezeptoren differenziert untersucht werden [Marmor and Zrenner 1999]. Durch eine Variation der Stimulationsparameter erfährt das ERG typische Veränderungen, nach denen die Aktivität der Photorezeptoren, die an der ERG Antwort beteiligt sind, gemessen werden kann. Die ersten elektrischen Reaktionen der menschlichen Retina auf einen Lichtreiz wurden bereits 1873 beschrieben [Dewar and McKendrick 1873]. Seither wurden die Elektroden, die Stimulations- und Aufzeichnungstechniken weiter entwickelt und finden in der klinischen Diagnostik weiten Einsatz. Vor allem in der Diagnostik der Retinitis Pigmentosa, der kongenitalen stationären Nachtblindheit und den Stäbchen- und Zapfendystrophien ist das ERG von großer Bedeutung [Heckenlively and Arden 2006].

2.2. Protokolle

Durch die ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) wurde der erste Standard für die klinische Anwendung des ERG beschrieben, um die Messungen weltweit vergleichbar zu machen [Marmor, Arden *et al.*

1989]. Eine Überarbeitung des Standards erfolgte im Jahre 1999 [Marmor and Zrenner 1999], 2004 [Marmor, Holder *et al.* 2004] und 2009 [Marmor, Fulton *et al.* 2009]. Das Standardprotokoll beinhaltet neben einigen Empfehlungen zur technischen Umsetzung der ERG Untersuchung, eine Definition des Standard-Blitzes (von 1,5 bis 3,0 phot cd*s/m² und einer Pulszeit von 4ms) und der klinischen Stimulationsprotokolle.

Es werden vor allem 5 Protokolle detailliert beschrieben [Abbildung 2.1]:

- 1.) Die Stäbchenstimulation (im dunkeladaptierten Zustand)
- 2.) Die Maximalstimulation des dunkeladaptierten Auges
- 3.) Oszillatorische Potentiale
- 4.) Die Zapfenstimulation (im lichtadaptierten Zustand)
- 5.) Die Antwort auf einen schnelle Flickerstimulation

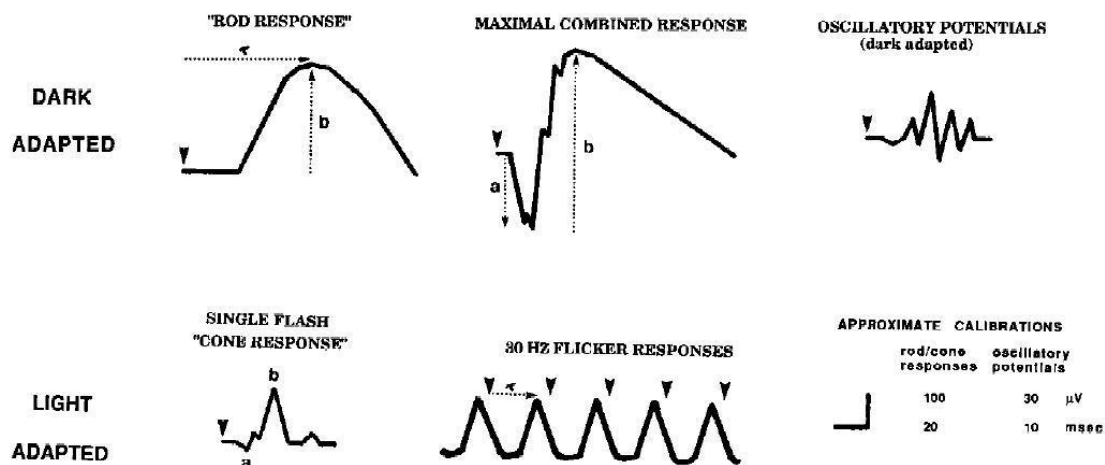


Abbildung 2.1: ERG-Kurven der Standard-Protokolle, Auszug aus [Marmor, Fulton *et al.* 2009]. „a“ und „b“ bezeichnet die Wellen im ERG. Das „t“ deutet auf die Zeit nach der Lichtstimulation (Gipfelzeit). Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Lichtstimulation an. „dark adapted“= dunkeladaptiert, „light adapted“=lichtadaptiert, „rod response“= Stäbchenantwort, „cone response“=Zapfenantwort, „oscillatory potentials“= OP, „30 Hz flicker“= Flickerantwort, „combined rod-cone response“= kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort.

2.3. Differenzierung der Photorezeptoren im ERG

2.3.1. Skotopisches ERG

[25.01.2011]

Bei einer Stimulation mit sehr schwachen Lichtintensitäten und einer vorhergehenden Dunkeladaptation von 20 bis 30 Minuten kann die Stäbchenfunktion im ERG gemessen werden. Durch eine lange Dunkeladaptationszeit und sehr schwachen Intensitäten kann zunächst die skotopische Schwellenantwort (STR) ausgelöst werden. Die STR (Skotopic Threshold Response) entsteht unter anderem durch eine post-Photorezeptor-Aktivität in der proximalen Retina [Wakabayashi, Gieser *et al.* 1988]. Die langsam ansteigende sehr hohe b-Welle, die unter dunkeladaptierten Bedingungen und das Stäbchensystem aktivierenden Intensitäten ausgelöst wird, findet ihren Ursprung in den Bipolarzellen und indirekt in den Müllerzellen [Newman and Frishman 1991]. Die a-Welle wird durch die Hyperpolarisation der Stäbchen-Außensegmente hervorgerufen [Frishman, Sieving *et al.* 1988] und wird bei ansteigenden Intensitäten separat von der b-Welle im ERG sichtbar [Abbildung 2.2].

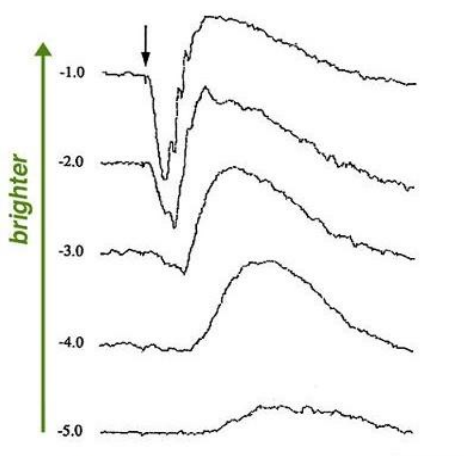


Abbildung 2.2: Skotopische ERG-Kurven ausgelöst durch ansteigende Intensitäten [Webvision]. Auswirkungen einer Intensitätserhöhung des Lichtstimulus im dunkeladaptierten Auge werden an der Kurvenform verdeutlicht. Zeitliche Auflösung der X-Achse ca. 50ms, der Y-Achse ca. 100µV. Von unten nach oben nimmt die Intensität stetig zu. Auf der linken Seite stehen unmittelbar neben den Kurven die Stimulationsintensitäten in Log Einheiten. Mit einem Pfeil ist der Beginn der Lichtstimulation markiert. „brighter“= heller werdender Lichtstimulus

Durch die Überlagerung der b-Welle ist die a-Welle unter Anwendung von sehr schwachen Lichtintensitäten im skotopischen ERG nicht sichtbar. Des Weiteren erreichen die Stäbchen ihre maximale Sensitivität im kurzwelligen Bereich im Vergleich zu den Zapfen [Adrian E.D. 1945]. Die Stäbchen sind nicht in der

Lage schnelle Flickerstimulationen aufzulösen. Die CFF, die maximale auflösbare Frequenz, liegt bei Stäbchen um 15Hz [Dodt 1951]. Spezielle Untersuchungsmethoden zeigten, dass Stäbchen in der Lage sind Frequenzen von bis zu 28Hz aufzulösen [Stockman, Sharpe *et al.* 1991]. Das liegt an den 2 Erregungswegen, durch die das Stäbchensystem auf Lichtstimulation antwortet. Der erste, langsame Weg kann Frequenzen bis 15Hz auflösen und unterliegt den Stäbchen Bipolarzellen. Der zweite, schnelle Weg, wird durch die Stäbchen-Zapfen Gap-Junction Verbindung realisiert. Dadurch wird das Stäbchensignal durch die Zapfen Bipolarzelle weitergeleitet und ermöglicht eine Frequenzauflösung bis 28Hz [Scholl, Langrova *et al.* 2001b].

2.3.2. Kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort

Die Maximalantwort ist eine kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort und wird durch eine Erhöhung der Lichtintensität im dunkeladaptierten Auge ausgelöst [Abbildung 2.2 Ableitung mit der Intensität von $\log(-1)$]. Charakteristisch für die Maximalantwort ist eine tiefe a-Welle, die sich separat von der b-Welle in der ERG-Kurve darstellt. Die Gipfelzeit der b-Welle wird durch die höhere Lichtintensität im Vergleich zur isolierten skotopischen Antwort verkürzt [Cone and Platt 1964]. Dies sind beides Hinweise auf die Zapfenbeteiligung an der Maximalantwort. Die oszillatorischen Potentiale (OPs) werden im aufsteigenden Schenkel der b-Welle in der Maximalantwort sichtbar. Der Ursprung der oszillatorischen Potentiale ist noch nicht eindeutig geklärt, dennoch existieren Vermutungen, dass es möglicherweise Interaktionen zwischen Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen sind [Wachtmeister 1998]. Durch eine Filterung der schnellen Frequenzen ab ca. 100Hz können oszillatorische Potentiale differenziert dargestellt werden. Durch bestimmte zusätzliche Filtereinstellungen lassen sich sowohl stäbchen- als auch zapfengenerierte OPs untersuchen [Lei, Yao *et al.* 2006].

2.3.3. Photopisches ERG

Durch eine Helladaptation der Retina mit Hilfe einer Hintergrundbeleuchtung und der Anwendung von sehr intensiven Lichtstimuli kann die Zapfenantwort im ERG aufgezeigt werden. Durch die Hintergrundbeleuchtung werden die Stäbchen gesättigt und somit aus dem ERG-Potential weitgehend entfernt. Es wird im photopischen ERG zwischen dem Einzelblitz-ERG und dem Flicker-ERG unterschieden, je nachdem ob ein einzelner Stimulus oder eine Stimulusfolge mit einer festen Frequenz präsentiert wird. Das photopische Einzelblitz-ERG wird durch eine schnelle a-Welle und eine sehr steil ansteigende und spitze b-Welle beschrieben. Die photopische a-Welle entsteht zum größten Teil durch Aktivitäten im post-Photorezeptoranteil der Retina, jedoch auch zum Teil durch die Hyperpolarisation der Photorezeptoren [Bush and Sieving 1993, Friedburg, Allen *et al.* 2004]. Durch hyperpolarisierende Zellen und depolarisierende [Nelson, Lynn *et al.* 1985] Bipolarzellen wird die b-Welle ausgelöst [Knapp and Schiller 1984, Sieving, Murayama *et al.* 1994]. Die isolierte photopische b-Welle ist in der Amplitude kleiner als die skotopische b-Welle. Das liegt am Zahlenverhältnis der Stäbchen (120 Millionen) zu den Zapfen (6 Millionen). Die photopische Flicker-Stimulation erfolgt zumeist mit einem 30Hz-Flicker und gleichzeitiger Präsentation einer Hintergrundbeleuchtung. Die Zapfen sind im Gegensatz zu den Stäbchen in der Lage Frequenzen von bis zu 60Hz aufzulösen [Dodt 1951]. Die Stäbchen sind bei einer Frequenz von 30Hz an der ERG-Antwort nicht beteiligt. Somit wird durch die Flickerfrequenz und die Hintergrundbeleuchtung ein isoliertes Zapfen-ERG erreicht.

2.3.4. ERG der Blauzapfen

Die Blauzapfenableitung ist eine zusätzliche Untersuchung, die zur Erweiterung des klinischen ERG Protokolls herangezogen wird. Es bestehen einige Unterschiede des Blauzapfens zu den mittel- und langwelligen Zapfen, die in der ERG Untersuchung ausgenutzt werden können. Zahlenmäßig ist der Blauzapfen nur zu ca. 9% aller Zapfen in der Retina vorhanden [Ahnelt, Kolb *et al.* 1987]. Das erklärt die niedrige Amplitude von ca. 20 μ V der Blauzapfen im

ERG. Die Blauzapfen sind im Zentrum der Stelle des schärfsten Sehens (Fovea centralis) nur gering vorhanden und haben die dichtesten Anteile in dem aufsteigenden Teil der Fovea centralis [Curcio, Allen *et al.* 1991, Williams, MacLeod *et al.* 1981]. Das Maximum der Blauzapfen b-Welle wird bei einer Gipfelzeit von ca. 50ms erreicht. Die b-Welle tritt damit im Vergleich zu den mittel- und langwelligen Zapfen um ca. 20ms verzögert auf. Bei der standardisierten Einzelblitz-Messung der Zapfenfunktion wird die Antwort der Blauzapfen durch die Antwort der mittel- und langwelligen Zapfen überlagert. Darüber hinaus zeigt die Blauzapfenableitung keine Off-Antwort im ERG im Vergleich zu den Rot- und Grünzapfen [Dacey 1996]. Die von mittel- und langwelligen Zapfen generierte Off-Antwort erscheint im photopischen ERG durch Anwendung von zeitlich sehr langen Lichtstimulationen. Unter Anwendung von lange andauernden Lichtstimuli (größer als 50ms) lässt sich somit die Blauzapfenantwort im ERG von den mittel- und langwelligen Zapfen differenzieren. Die spektrale Sensitivität erreicht beim Blauzapfen ihr Maximum bei 430nm. Dadurch besteht eine gewisse spektrale Distanz des Blauzapfens zu den Grün- und Rotzapfen, deren maximale spektralen Sensitivitäten sich beinahe überlagern (535nm und 570nm) [Calkins 2001]. Diese spektrale Distanz wird unter anderem in den Untersuchungsmethoden zur Blauzapfenstimulation ausgenutzt. Der Blauzapfen hat eine CFF von ca. 28Hz (adaptationsabhängig) [Stockman, MacLeod *et al.* 1991]. Da die Blauzapfenamplitude auf Grund der Zahlenmäßigen Unterlegenheit sehr gering ist und eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz über ein gewisses Maß mit einer Amplitudenreduktion einhergeht, wird im ERG versucht eine adäquate Antwort der Blauzapfen durch niedrige Stimulationsfrequenzen zu erhalten. Grundsätzlich lassen sich die Techniken der Blauzapfenstimulation auf zwei Ableitungsmethoden reduzieren. Eine reine Blauzapfenantwort kann durch die Anwendung der SST (Silent Substitution Technique) erreicht werden [Estévez and Spekrijse 1982, Sawusch, Pokorny *et al.* 1987, Swanson, Birch *et al.* 1993]. Hierbei werden zwei Schritte durchgeführt. Zunächst werden durch eine sehr helle Hintergrundbeleuchtung mit einer Wellenlänge im Rotbereich (z.B. 650nm) die Rotzapfen supprimiert. Zusätzlich werden im selben Schritt durch

die hohe Intensität der Hintergrundbeleuchtung die Stäbchen helladaptiert und sind somit an der ERG-Antwort nicht beteiligt. Nun wird durch eine 33Hz Stimulation mit zwei abwechselnden Stimuli im grünen und blauen Spektralbereich (z.B. 450 und 535nm) der Grünzapfen „ausbalanciert“. Während der 33Hz Stimulation enthält die ERG-Antwort wenige Blauzapfenanteile, da die CFF von Blauzapfen bei ca. 28Hz (adaptationsabhängig) liegt. Das heißt, beim ersten Schritt der SST werden die Stäbchen durch die Intensität der Hintergrundbeleuchtung helladaptiert, die Rotzapfen durch die spektrale Eigenschaft der Hintergrundbeleuchtung supprimiert, und durch eine 33Hz Stimulation nur der Grünzapfen stimuliert. Mit dieser Methode, der heterochromatischen Flicker Photometrie (HFP), lässt sich der Grünzapfen psychophysisch „ausbalancieren“. Im zweiten Schritt wird die Stimulationsfrequenz bei gleicher Hintergrundbeleuchtung nun herabgesetzt auf 2 bis 4Hz, um mit dem Blaustimulus eine Blauzapfenstimulation zu ermöglichen, die möglichst weitgehend frei von Grün- und Rotzapfenanteilen ist [Drasdo, Aldebari *et al.* 2001]. Wenn dennoch Grünzapfenanteile in der ERG Antwort enthalten sind, muss die HFP für den jeweiligen Patienten wiederholt werden. Die SST benötigt einen hohen technischen und zeitlichen Aufwand und ist in der Durchführung sehr kompliziert [Chiti, North *et al.* 2003]. In klinischen Untersuchungen ist die SST deshalb nicht zu realisieren. Die zweite Methode ist die SAT (Selective Adaptation Technique). Die SAT profitiert vor allem von den spektralen Eigenschaften der Blauzapfen. Durch eine helle Hintergrundbeleuchtung mit Intensitäten über 2000 td werden die Stäbchen weitgehend vollständig adaptiert [Aguilar and Stiles 1954]. Dabei ermöglicht ein Licht mit einem Spektrum im gelben oder orangen Bereich gleichzeitig die Adaptation der mittel- und langwelligen Zapfen [Miyake, Yagasaki *et al.* 1985]. Die Stimulation der Blauzapfen erfolgt durch einen schwachen blauen Lichtimpuls möglichst nahe am Maximum der spektralen Empfindlichkeit der Blauzapfen bei 430nm. Da die Blauzapfen sich nicht nur im ERG, sondern auch im Stoffwechsel und in der Morphologie von den Grün- und Rotzapfen stark unterscheiden, ist eine Differenzierung der Blauzapfen im ERG bei speziellen Fragestellungen sehr wichtig. Die Blauzapfen sind vor allem bei systemischen

Erkrankungen (z.B. Diabetes Mellitus) und bei toxischen Einflüssen im Krankheitsverlauf früher betroffen als die Grün- und Rotzapfen.

2.4. Spezielle Potentiale des ERG

Im Standardprotokoll werden vor allem die a-Welle, die b-Welle und die Gipfelzeit im ERG beschrieben. Für spezielle Untersuchungen im ERG kann unter anderem die d-Welle beschrieben werden. Die d-Welle erscheint im ERG wenn das Stimulationslicht ausgeschaltet wird als sogenannte „Off-Antwort“ (Off von Licht Aus) [Abbildung 2.3]. Bei kurzen Lichtstimuli erscheint die d-Welle zeitlich zusammen mit der b-Welle und kann deshalb im ERG nicht isoliert dargestellt werden. Welchen Einfluss die d-Welle auf die b-Welle nimmt, ist noch ungeklärt. Sicher ist jedoch, dass die d-Welle durch lange andauernde Lichtstimuli von der b-Welle getrennt im ERG dargestellt werden kann. Die d-Welle wird vor allem durch hyperpolarisierende Bipolarzellen generiert [Spekreijse, van der Tweel *et al.* 1973].

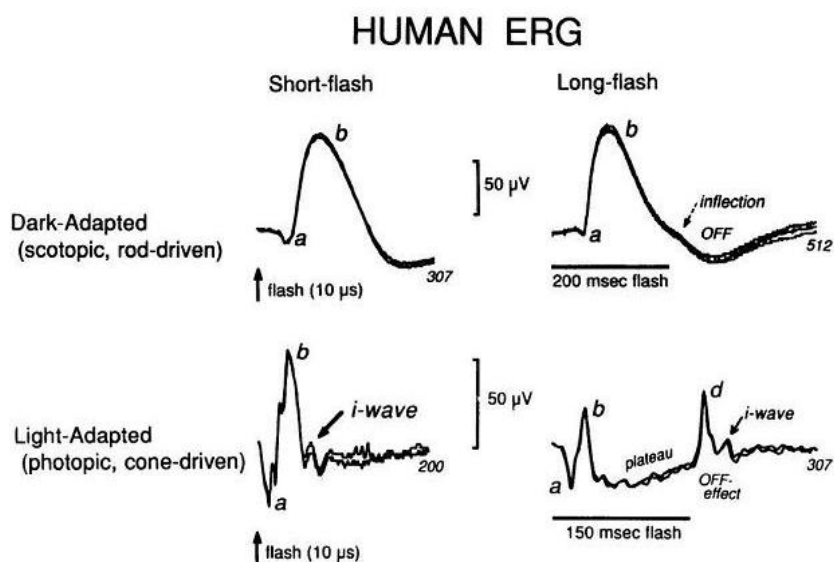


Abbildung 2.3: ERG-Kurven mit Andeutung der Off-Antworten des skotopischen („Dark-Adapted“) und photopischen („Light-Adapted“) ERGs [Sieving 1993]. Die Blitzdauer wird von 10µs bis 200ms im skotopischen ERG verändert (obere Kurven), und von 10µs bis 150ms im photopischen ERG (untere Kurven). Die Zahlen hinter den Kurven (200, 307, 512) kennzeichnen die Dauer der ERG Aufzeichnung. a, b, d, i und off stehen für die Wellen im ERG. „human erg“= menschliches ERG.

Einen weiteren Off-Effekt stellt die i-Welle dar. Die i-Welle kann sogar durch die Stimulation mit sehr kurzen Pulszeiten im photopischen ERG sichtbar gemacht werden [Nagata 1963, Peachey, Alexander *et al.* 1989]. Es ist eine kleine positive Welle, die unmittelbar auf die photopische b-Welle folgt. Unter Anwendung von längeren Stimuli, erscheint die i-Welle nach der d-Welle im ERG [Abbildung 2.3]. Die i-Welle ist wahrscheinlich abhängig von der On-Antwort und keine reine Off-Komponente [Murayama and Sieving 1992]. Eine Untersuchung der i-Welle ist in den klinischen ERG Protokollen noch nicht weit verbreitet. Das liegt an dem umstrittenen Ursprung der i-Welle und deren diagnostischen Stellenwert.

Zwischen der photopischen b-Welle und der i-Welle kann die „photopische negative Antwort“ (PhNR) gemessen werden. Genauer definiert ist die PhNR das Potential zwischen der Basislinie (0-Linie) und dem Tief, das auf die b-Welle folgt [Abbildung 2.4]. Am größten sind die Amplituden für die PhNR durch die Stimulation mit kurzen Pulszeiten und roten Lichtstimuli bei blauer Hintergrundbeleuchtung [Rangaswamy, Shirato *et al.* 2007]. Interessant bei der PhNR ist der Ursprung des Potentials. Es wird vermutet, dass es die Aktivität der Ganglienzellen im ERG widerspiegelt. Die sensitivste elektrophysiologische Untersuchung zu Optikus-Neuropathien stellt zum gegenwärtigen Zeitpunkt die N95 Welle des PERG dar [Graham, Drance *et al.* 1996, Holder 1987, Holder 2000]. Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die PhNR möglicherweise mit der N95 Welle des PERG korreliert [Viswanathan, Frishman *et al.* 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass die PhNR bei Glaukom im Tiermodell und am Patienten im Vergleich zum Gesunden reduziert war [Ueno, Kondo *et al.* 2006, Viswanathan, Frishman *et al.* 1999, Viswanathan, Frishman *et al.* 2001].

[25.01.2011]

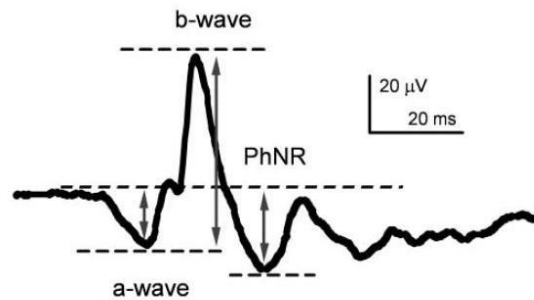


Abbildung 2.4: Photopisches Einzelblitz-ERG mit Kennzeichnung der Potentiale (Auszug aus [Ueno, Kondo *et al.* 2006]). Die zeitliche Abfolge der Potentiale wird verdeutlicht.

2.5. Ziele der aktuellen Arbeit

Das Standardprotokoll stellt ein „Minimalprogramm“ für die klinische ERG-Untersuchung dar. Um spezielle Fragestellungen zu untersuchen ist eine Ausweitung des Standardprotokolls unumgänglich. Es wurden bisher zahlreiche zusätzliche Stimulationsverfahren, vor allem zur Off-Antwort, zur Differenzierung der Zapfen und zur Beurteilung der Dunkeladaptation beschrieben [Simonsen and Rosenberg 1995, Walters, Smith *et al.* 1981].

Bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration zeigen die Standardprotokolle häufig keine messbare Antwort im ERG, obwohl Restpotentiale, die durch eine subjektive Untersuchung überprüft werden können, teilweise noch vorhanden sind (Lichtschein, Fingerzeig). Ziel der aktuellen Arbeit ist die Erstellung neuer ERG-Untersuchungsmethoden, und Optimierung dieser, um die ERG Ableitung von Restfunktionen bei Patienten mit degenerierten Netzhauterkrankungen zu realisieren und zu quantifizieren. Dabei werden die einzelnen Variablen der ERG Ableitungstechnik für eine optimale Amplitude und die bestmögliche klinische Messung abgestimmt. Da die Photorezeptoren bei degenerativen Netzhauterkrankungen unterschiedlicher Genese mit variablen Anteilen betroffen sein können (z.B. Stäbchen-Zapfendystrophie, kongenitale stationäre Nachtblindheit), sollen die spezifischen Einstellungen der ERG Protokolle eine Differenzierung der gestörten Photorezeptorensysteme zulassen. Im Einzelnen soll das isolierte Stäbchen- und Zapfensystem, die kombinierte Maximalantwort und eine

Differenzierung der Zapfen (zwischen Grün-/Rotzapfen und Blauzapfen) berücksichtigt werden. Letzteres vor allem aus Gründen der unterschiedlichen Vulnerabilität der Zapfenarten bei systemischen Erkrankungen oder toxischen Einflüssen. Die Beurteilung der Restfunktion hinsichtlich der Signifikanz und der Quantifizierung der ERG-Antworten erfolgt mittels spezieller statistischer Methoden auf die nur erwähnend eingegangen wird.

3. Methoden

3.1. Probanden- und Patientenmessung

Die Probanden- und Patientenmessung erfolgte nach einer Zustimmung der Ethik- Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, die nach den GCP-/ICH-Richtlinien der Deklaration von Helsinki verfährt.

Für die Entwicklung des optimierten ERG Protokolls wurden auf Grund der multiplen Variablen der ERG Technik 30 gesunde Probanden gemessen.

Jedem Probanden wurde je 1 Tropfen "Mydriatikum Stulln®" (Tropicamid 1%) in beide Augen getropft, um eine Dilatation der Pupille zu erreichen. Dieser Vorgang wurde nach 20 Minuten wiederholt. Die Dunkeladaptation erfolgte durch einen 30-minütigen Aufenthalt in einem lichtdichten Raum [Cameron, Mahroo *et al.* 2006, Cameron, Miao *et al.* 2008]. Das Anlegen der Elektroden wurde für die skotopischen Untersuchungen unter Rotlicht durchgeführt. Im Einzelnen wurden zwei Schläfenelektroden und eine Stirnelektrode mit Hilfe eines Kontaktgels zur Widerstandsverringering nach Entfettung der Hautstellen mit einer Peeling-Paste angelegt. Eine Entfernung der Haare war nicht notwendig. Die Bindehautelektroden (DTL-Elektroden [Dawson, Trick *et al.* 1979, Hebert, Vaegan *et al.* 1999]) wurden nach vorhergehender Gabe von je 1 Tropfen "Novesine® 0,4%" (Oxybuprocain-HCl 4%) zur oberflächlichen Anästhesie der Bindehaut angelegt. Bei den Bindehautelektroden handelt es

sich um feine, leitende, silberplattierte Nylon-Fäden, die in die Bindehautsäcke gelegt wurden [Abbildung 3.1].

Die Pupillenweite wurde vor der ERG Messung dokumentiert. Die Untersuchung wurde bei einer Pupillenweite von mindestens 7mm durchgeführt. Die Messung der Impedanzen erfolgte nach dem Anlegen der Elektroden und vor der ERG Untersuchung. Während der ERG Untersuchung wurden die Impedanzen mehrmals kontrolliert. Ein Grenzwert von 5 k Ω wurde eingehalten. Vor der photopischen ERG Untersuchung wurde eine Helladaptation für 10 Minuten durchgeführt [Gouras and MacKay 1989, Miyake, Horiguchi *et al.* 1988, Peachey, Alexander *et al.* 1991]. Eine Hintergrundbeleuchtung mit der Mischfarbe Weiß (6500K) und einer Intensität von 34 phot cd/m² wurde für eine optimale Helladaptation dargeboten [Marmor, Fulton *et al.* 2009]. Die Bindehaut wurde bei Bedarf während der Untersuchung mit Befeuchtungstropfen (Tränenersatzmittel) feucht gehalten.

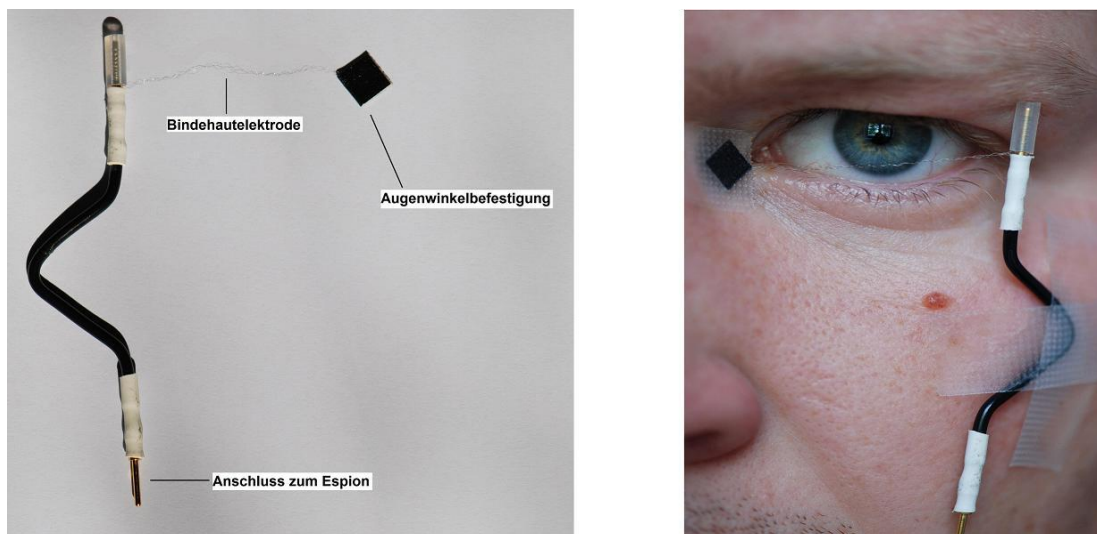


Abbildung 3.1: DTL Elektrode in der aktuellen Studie mit dem feinen Bindehautfaden (links). Rechts ist die Position der Elektrode am Probanden dargestellt. Der Bindehautfaden stellt den Kontakt zum Auge her.

3.2. Apparatur

Die ERG Untersuchung wurde mit Hilfe des Espion E²® Systems durchgeführt. Das Espion E²® wurde von der ECMDD als ein Klasse IIa medizinisches Gerät

klassifiziert. Der Verstärker des Espions bietet eine Auflösung bis 24 bit, das mit 100nV in der ERG Ableitung gleichzusetzen ist. Die Stimulation wurde durch den ColorDome® LED-Ganzfeld-Stimulator von Diagnosys UK durchgeführt. Der ColorDome® LED-Stimulator enthält neben einer herkömmlichen Xenon Blitzstimulation 4 LED's für die Generierung der Lichtstimulation. Die spektrale Wirksamkeit der LED's und des Xenonblitzes ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Durch Mischung der 4 LED's wird ein Mischlicht Weiß mit 6500K generiert. Als Hautelektroden wurden Goldkappenelektroden eingesetzt. Die Bindehaut-elektroden (DTL-Elektroden [Dawson, Trick *et al.* 1979, Hebert, Vaegan *et al.* 1999]) wurden im ERG-Labor der Augenklinik Tübingen hergestellt. Die Verschaltung der einzelnen Komponenten des Espion E² verdeutlicht ein vereinfachtes Schema in Abbildung 3.3.

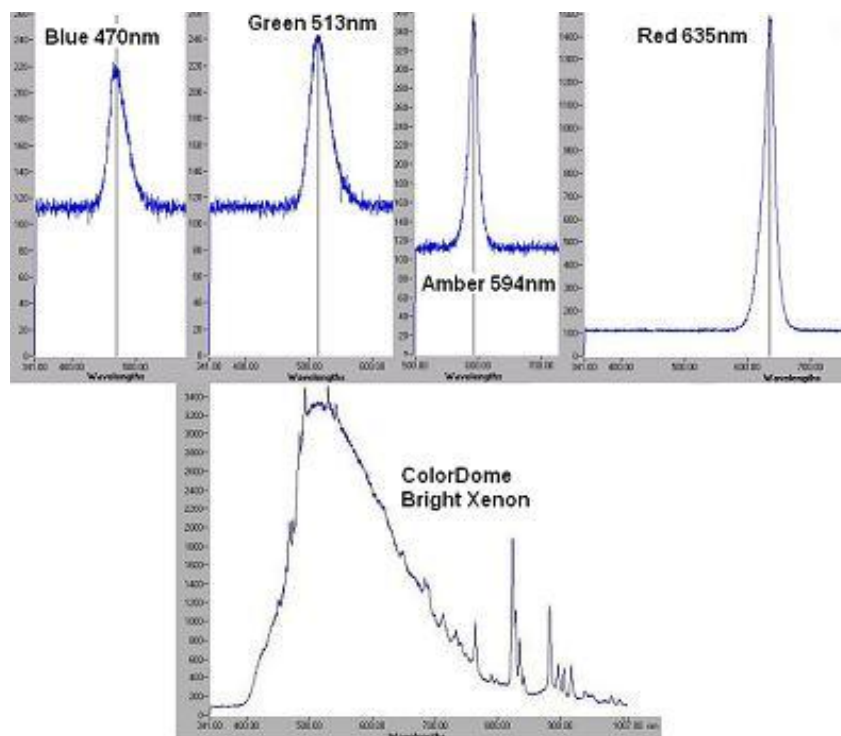
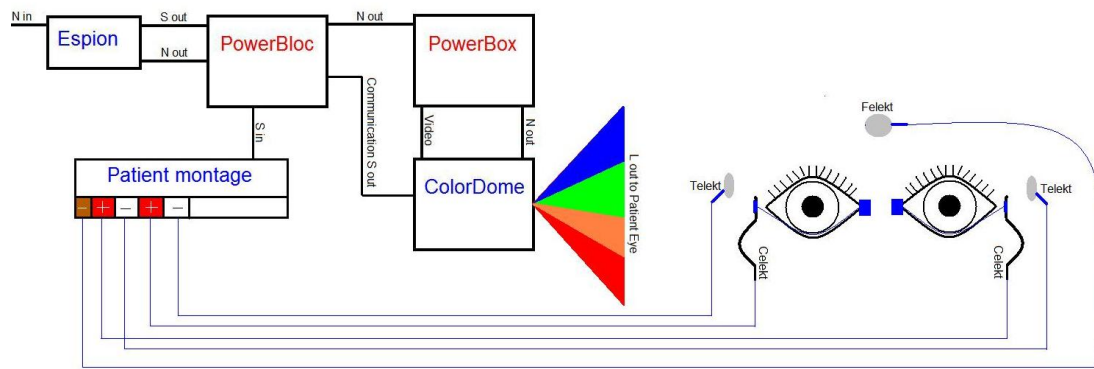


Abbildung 3.2: Spektrale Eigenschaften der LED's („Blue“= blau, „Green“= grün, „Amber“= orange, „Red“= rot) und des Xenonblitzes („Xenon“) [Diagnosys 2003]. Die Zahlen hinter den Farbbezeichnungen stehen für die Wellenlängen der jeweiligen LEDs.

„Die Nutzung elektroretinographischer Minimalsignale zur quantitativen Erfassung der Restfunktion bei fortgeschrittener erblicher Netzhautdegeneration“

[25.01.2011]



N in = Stromanschluss eingehend
 N out = Stromanschluss ausgehend
 S in = Signal eingehend
 S out = Signal ausgehend
 L out = Lichtstimulus ausgehend
 Felekt = Stirnelektrode (Referenz)
 Telekt = Schläfenelektrode (-)
 Ceblekt = Bindehautelektrode (+)

Abbildung 3.3: Schema über die Verschaltung der Espion Komponenten. „Espion“ = Espion Computer, „Power Bloc“ = Verstärker, „Power Box“ = Netzeinheit, „Patient montage“ = Vorverstärker, „ColorDome“ = Ganzfeld Lichtstimulator

Die technischen Einstellungen der ERG Aufzeichnung wurden nach dem jeweiligen Photorezeptorensystem, das abgeleitet werden sollte, variiert.

Für die Vor- und Hauptstudie wurden ERG Untersuchungen mit einem Bandpassfilter von 0Hz-1000Hz durchgeführt. Dies entspricht einer deaktivierten Filterfunktion des Bandpassfilters. Der 50Hz-Sperrfilter (Notch-Filter) wurde bei allen ERG Messungen deaktiviert. Durch das breite Frequenzfenster sollten möglichst alle beteiligten Frequenzen, das heißt außer der Stimulationsantwort der Netzhaut alle Artefakte im ERG aufgezeichnet werden. Eine Entfernung der Gleichstrom Störkomponente („DC-off-set removal“) wurde für die Aufzeichnung der ERG Messungen aktiviert. Durch die Espion Software wurde eine digitale Mittelung der Einzelantworten durchgeführt. Die Abtastfrequenz („sample frequency“), die Frequenz mit der Datenpunkte während der ERG Untersuchung aufgezeichnet wurden, betrug in der Vorstudie 1000Hz und 2000Hz. In der Hauptstudie wurde eine Aufzeichnungsfrequenz von 2000Hz festgesetzt. Der Gleichstrom Drift wurde nur bei den Aufzeichnungen der Blauzapfen digital entfernt.

3.3. Optimierung der ERG Methoden

Die Optimierung der ERG Methoden erfolgte in 3 Schritten:

1. Bei intakter Netzhaut, wie es bei einem gesunden Probanden der Fall ist, wird die Antwort der Netzhaut auf einen adäquaten Stimulus deutlich höher aufgezeichnet als die an der ERG Ableitung beteiligten Artefakte, solange keine Störungen durch Augen- und Lidschlussbewegungen involviert sind. Somit dominiert die retinale Stimulationsantwort im ERG des gesunden Probanden. Bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration kann die Antwort der Netzhaut auf einen Stimulus sehr gering sein und von Artefakten (z.B. Netzrauschen) verfälscht oder überlagert werden. Dabei kann die Netzhautantwort ihre Dominanz an der ERG Ableitung verlieren. Um den Effekt der Stimulationsantwort bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration an gesunden Probanden zu simulieren, wurden sehr schwache Lichtintensitäten verwendet. Diese lösen bei gesunden Probanden nur kleine Amplituden aus, die durch Artefakte verfälscht werden.

Im ersten Schritt der Optimierung wurden, durch die Stimulation mit sehr schwachen Lichtintensitäten, Minimalsignale von gesunden Probanden aufgezeichnet, die durch die beteiligten Artefakte verfälscht und überlagert wurden. Aus den Erkenntnissen der ERG Untersuchungen mit sehr schwachen Lichtintensitäten erfolgte die Exploration der Möglichkeiten für die Erstellung einer optimalen Stimulation für das jeweilige Photorezeptorensystem. Die technischen Möglichkeiten wurden an die physiologischen Eigenschaften der Photorezeptoren angepasst, um neue ERG Protokolle zu entwickeln.

2. In der Vorstudie, dem zweiten Schritt der Optimierung der ERG Methoden, wurden die Erkenntnisse aus der Exploration an einzelnen Probandenmessungen genauer untersucht. Hierbei wurden die explorierten Techniken in der ERG Messung eingesetzt. Darauf erfolgte die Auswahl von Einstellungen, die eine möglichst optimale elektrische Aktivität der Photorezeptoren auf eine Stimulation der Netzhaut boten.

Es wurden erste Erkenntnisse für die Auswertung der ERG Ergebnisse gewonnen und in dem Prozess der Optimierung umgesetzt. Die Vorstudie beinhaltet beispielhafte Untersuchungen, die Richtwerte für die Hauptstudie lieferten. Die Exploration und die Vorstudie wurden in der Protokollentwicklung zusammengefasst.

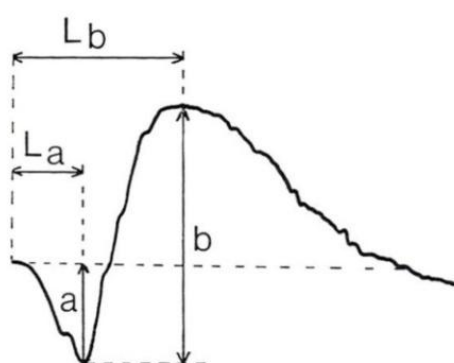
3. Die Verifizierung der entwickelten Protokolle erfolgte an Probandenmessungen in der Hauptstudie. An 16 Probanden wurden im 3. Schritt der Optimierung die Richtwerte aus der Vorstudie untersucht. Dabei wurden Kennlinien mit unterschiedlichen Intensitäten und Pulszeiten, zu denen aus der Vorstudie Hinweise gewonnen wurden, für die neuen Protokolle untersucht. Es erfolgte eine statistische Auswertung der Ergebnisse. Die Resultate der Hauptstudie wurden als Empfehlung für die ERG Messung von Minimalsignalen zu Stimulationsprotokollen zusammengefasst.

3.4. Statistik und Auswertung des ERG

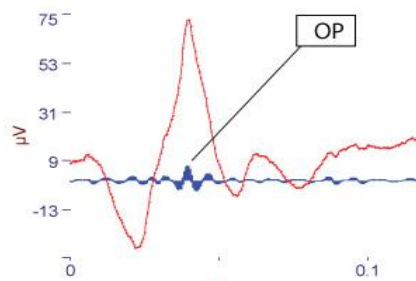
Die Auswertung des ERG beinhaltete vor allem die Messung der b-Wellenamplitude und die Gipfelzeit [Abbildung 3.4 links]. Zusätzlich wurden die Amplituden der Stimulationsfrequenz und deren Harmonische in den Ableitungen mit Flickerstimulation mit Hilfe der Fast Fourier Transformation (FFT) softwaregesteuert kalkuliert. Auf die Methodik der FFT wird hier nicht näher eingegangen. Die Anwendung der FFT ergibt sich aus den diskreten Daten, die bei der ERG Messung erhoben werden. Die FT (Fourier Transformation) ist für analoge Datensätze gedacht. Eine Abwandlung davon, die DFT (Discrete Fourier Transformation), lässt sich auf diskrete Datensätze, wie im Fall der ERG-Messung, anwenden. Das bedeutet, dass durch die DFT ein zeitabhängiges Signal untersucht werden kann. Die FFT stellt eine vereinfachte Kalkulation der DFT dar. Die Anwendung der FFT auf elektrophysiologisch erhobene Daten wurde bereits beschrieben [Bach and Meigen 1999]. Durch die vorgegebene Stimulationsfrequenz bietet sich die FFT für die Analyse der Signalantwort an [Bach and Meigen 1999]. Das ist vor allem

bei Untersuchungen von Restfunktionen sehr hilfreich. Dabei kann der Anteil der Antwort einer festgesetzten Stimulationsfrequenz aus der Gesamtantwort, das heißt aus der Gesamtheit aller Frequenzen, extrahiert werden. Viel wichtiger ist jedoch die Betrachtung des Anteils der Stimulationsfrequenz im Vergleich zu allen anderen Frequenzen, die an der ERG Antwort beteiligt sind. Bei sehr geringen b-Wellenamplituden und durch Artefakte verfälschte ERG Ableitungen können die an der Antwort dominierenden Frequenzen leicht abgelesen, und mit der Stimulationsfrequenz verglichen werden. Um die Signifikanz der Antwort bei sehr geringen b-Wellenamplituden zu bestimmen, kann mit Hilfe der FFT ein „Signal-to-Noise-Ratio“ (Signal-Rausch-Verhältnis) berechnet werden [Bach and Meigen 1999, Meigen and Bach 2000]. In der aktuellen Studie wurde die FFT jedoch nur zur relativen Beurteilung herangezogen. Es wurde kein „Signal-to-Noise-Ratio“ berechnet. Die Anteile der Frequenzen wurden nur vergleichend betrachtet, und die an der Antwort dominierenden Frequenzen ermittelt.

In der kombinierten Stäbchen- und Zapfenstimulation und in der Blauzapfenstimulation wurde außerdem die a-Welle mit der zugehörigen Gipfelzeit ausgewertet. Die Oszillatorischen Potentiale wurden im skotopischen ERG mit einer Filtereinstellung von 100-300Hz, Tief- und Hochpassfilter, aus der ERG-Antwort extrahiert. Die Filterung der OP's aus der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort erfolgte in einem Bereich von 75-300Hz [Abbildung 3.4 rechts].



9Hz/stim:white6500K/i:0,2 phot cd*s/m2/d:8ms



OP Filter: 100-300Hz low- and high cut off

Abbildung 3.4:

LINKS: Skotopisches Einzelblitz-ERG mit Kennzeichnung der Potentiale [Webvision]. „L“= Gipfelzeit. Die a-Welle wird von der Grundlinie zum ersten Minimum der Kurve gemessen. Vom ersten Minimum bis zum Maximum der Kurve wird die b-Welle gemessen. Die Gipfelzeiten der beiden Wellen werden vom Einsatzzeitpunkt des Blitzes bis zum Höhepunkt bzw. Tiefpunkt der

[25.01.2011]

Wellen angegeben.

RECHTS: Skotopisches Flicker-ERG mit Darstellung der oszillatorischen Potentiale. Die OPs (blaue Kurve) wurden durch die Filtereinstellung von 100-300Hz (Tief- und Hochpassfilter) dargestellt. Die ERG Aufzeichnung erfolgte während einer 9Hz Flickerstimulation mit dem Mischlicht Weiß6500K und einer Intensität von 0,2 photopischen $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$, Pulszeit von 8ms.

Die Blauzapfenableitung erforderte eine erweiterte Analyse der einzelnen ERG-Komponenten. Zunächst erfolgte in der Blauzapfenableitung der Vorstudie eine Beurteilung der b-Wellenamplitude. Nach der Entwicklung eines neuen Stimulationsparadigma für die Blauzapfen wurden weitere ERG-Wellen [Abbildung 3.5] in die Auswertung der Hauptstudie eingeschlossen. Es erfolgte eine Bestimmung der a- und b-Wellen der jeweiligen Sättigungsblitze. Die ERG Kurve der Blauzapfenstimulation unterlag Nachschwingungen der Stimulation und unterschiedlich großem Gleichstromdrift, so dass die Basislinie nicht einheitliche Werte annahm und die PhNR deshalb falsch angegeben wurde. Auch unter softwaregestützter Driftentfernung („Drift-Removal“ im Espion-System) konnte die PhNR nicht korrekt im Bezug zur Basislinie (0-Linie) bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde ein neues Potential, die n-Welle, definiert und bestimmt. Die n-Welle ist keine offizielle Bezeichnung eines Potentials, sondern eine Umwandlung des PhNR und dient nur als Platzhalter. Im Gegensatz zum PhNR wird die n-Welle nicht im Bezug zur Basislinie (0-Linie) gemessen [Abbildung 2.4], sondern zum höchsten Punkt der vorhergehenden b-Welle [Abbildung 3.5]. Dadurch wurde eine konstante Bestimmung des negativen Potentials, das zeitlich auf die b-Welle folgt, möglich. Da die Sättigungsblitze mit gleichen Stimulationseinstellungen und in einem bestimmten zeitlichen Zusammenhang (80ms) abgeleitet wurden, wurde eine Beurteilung der Abhängigkeit beider Komponenten und deren Wellen voneinander durchgeführt. Es wurden dazu Quotienten zwischen den a- und b-Wellen und der n-Wellen beider Sättigungsblitze berechnet.

[25.01.2011]

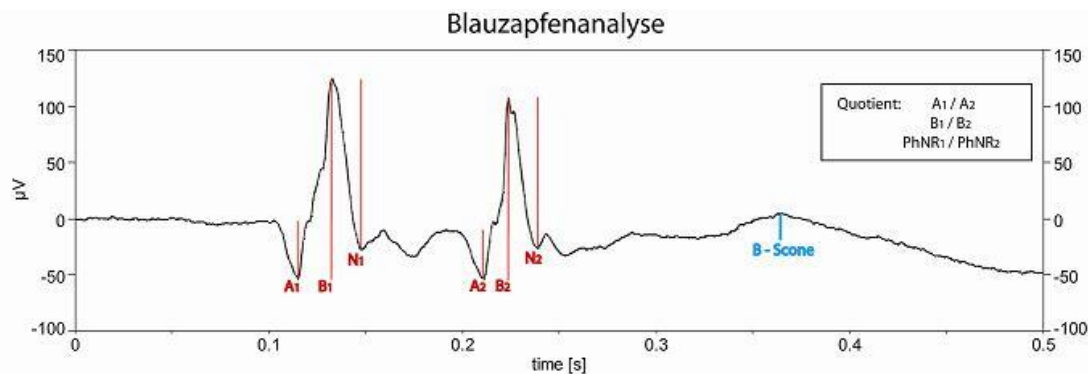


Abbildung 3.5: Blauzapfen-ERG des neuen Stimulationsparadigmas, Kennzeichnung der einzelnen Potentiale (A, B, N entsprechend a-, b-, n-Wellen). Die Bildung eines Quotienten zwischen den Wellen der beiden Sättigungsblitze ermöglicht die Beschreibung einer Abhängigkeit der beiden Potentiale.

Unter Berücksichtigung von spezifischen Eigenschaften des dominierenden Photorezeptorensystems im ERG erfolgte die Beurteilung der Kurvenform. Durch die FFT konnten die Frequenzen, die an der ERG Antwort beteiligt waren, berechnet und deren Anteile dargestellt werden. Die FFT wurde nur deskriptiv angewandt. Das bedeutet, dass mit der FFT eine Identifikation der an der ERG Antwort beteiligten Frequenzkomponenten erfolgte, und der relative Vergleich der Anteile der einzelnen Komponenten durchgeführt wurde. Die FFT wurde in der aktuellen Arbeit jedoch nicht zur Amplitudenbestimmung oder zur Berechnung eines „Signal-To-Noise-Ratios“ (SNR) angewandt. Vor allem aber die Veränderungen der einzelnen FFT-Komponenten und deren Anteile an der ERG Antwort während einer Intensitätsvariation wurde untersucht. Durch den Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit der Exploration der einzelnen Stimulationsmethoden und den daran beteiligten Photorezeptorensysteme erfolgte die Auswahl der Untersuchungsparameter für die Hauptstudie.

Die Amplituden der b-Wellen wurden in der Vorstudie durch ein Microsoft Excel-Programm halb automatisiert ausgewertet. Das Programm wurde für diese Studie entwickelt und erstmalig eingesetzt [Abbildung 3.6]. Es ermöglichte unter Festlegung bestimmter zeitlicher Abstände die Auslesung der b-Welle und den Export der Ergebnisse in einem Diagramm.

[25.01.2011]

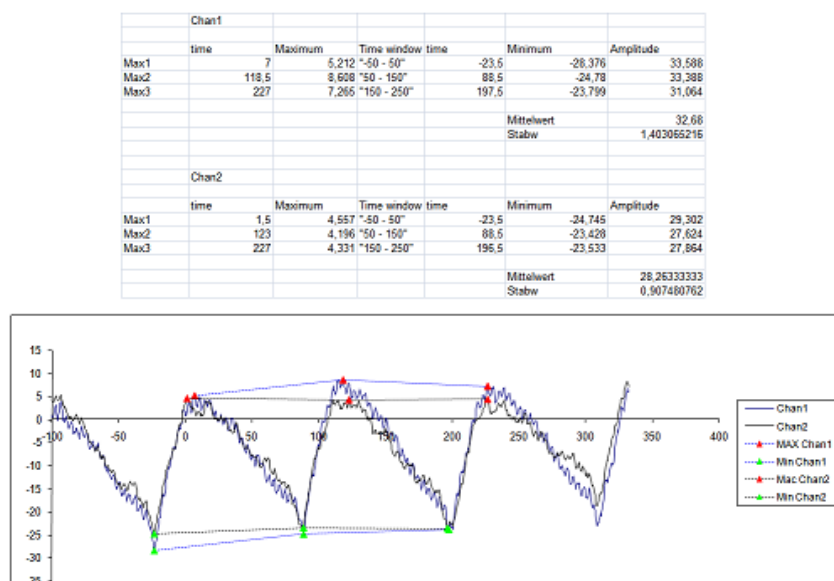


Abbildung 3.6: 9Hz-Flicker ERG und die Darstellung der a- und b-Wellen im programmierten Excel-Programm. In der oberen Tabelle ist der zeitliche Rahmen der a- und b-Wellen definiert („Time window“). Die zugehörigen Amplituden der Wellen werden ebenfalls aufgelistet („Maximum“ entspricht der b-Welle, „Minimum“ entspricht der a-Welle). „Chan1“ bezeichnet das linke Auge, „Chan2“ das rechte Auge. Die Darstellung der ERG-Kurve (unten) dient der Kontrolle. Hier lässt sich an den Minima und Maxima sofort ersehen, ob eine Amplitude falsch errechnet wurde.

In Abbildung 3.6 ist der Export der Analyseergebnisse einer Einzeluntersuchung dargestellt. Aus der Tabelle wird die Höhe und die Zeit der Minima und Maxima aus der ERG Untersuchung ersichtlich. Beide Augen (Chan1 und Chan2) konnten somit gleichzeitig analysiert werden. Mit Hilfe des Excel-Programms konnten die b-Wellenamplituden aus einer Einzelmessung ausgerechnet und in einer Graphik im Zusammenhang mit der Intensität dargestellt werden. Die Abbildung 3.7 zeigt Kennlinien aus einer Probandenuntersuchung.

Durch die exportierten Kennlinien wird selbst bei sehr großen Untersuchungen, wie in Abbildung 3.7 dargestellt mit 36 Einzelmessungen und 2 untersuchten Augen, die Auswertung der b-Wellenamplituden enorm erleichtert. Das Excel-Programm wurde vor allem bei Untersuchungen mit zahlreichen Einzelmessungen für die Berechnung der b-Wellenamplituden angewandt.

[25.01.2011]

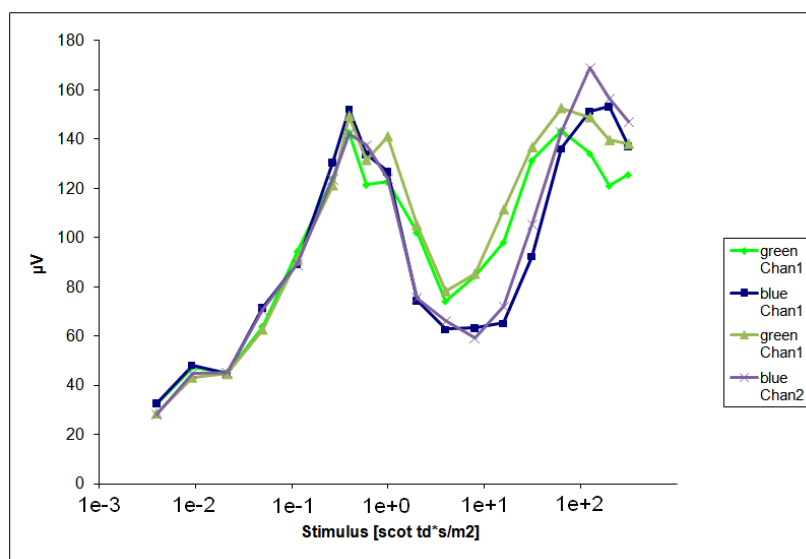


Abbildung 3.7: Kennlinie der b-Wellenamplituden gegen die Intensität aufgetragen. Export aus dem Excel Programm. Die Punkte der Kennlinie kennzeichnen die b-Wellenamplituden. Die verschiedenen Farben der Kennlinien verdeutlichen die Stimulationsfarbe (blaue LED, grüne LED) und die Augen (Channel1= linkes Auge, Channel2= rechtes Auge) der Probandenmessung. Die Intensität wird logarithmisch (hier im Bsp. Scot td*s bei 7mm Pupillendurchmesser) exportiert.

Für die Berechnung der a-Welle und der FFT wurde das Programm AutoSignal® (Ver. 1.71 Seasolve Software Inc.) verwendet. Die Filterung der OPs erfolgte ebenfalls durch AutoSignal®.

Die graphische Darstellung und Berechnung von Medianen, Mittelwerten, Standardabweichungen und Konfidenzintervallen der Vorstudie wurde mit Hilfe von SigmaPlot® (Ver. 8.02 SPSS Inc.) durchgeführt.

In der Hauptstudie wurden 16 Probandenmessungen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Statistik und Biometrie der Universität Tübingen analysiert. Die Auswertung der ERG Messungen erfolgte mit Hilfe von JMP® (SAS Institute).

Zur Kontrolle der errechneten Amplituden diente das Programm „Import“, das ebenfalls in der Augenklinik Tübingen entwickelt wurde [Messias, Jaegle *et al.* 2008]. „Import“ arbeitet ähnlich wie das zuvor erwähnte Microsoft Excel-Programm mit Zeitspannen, die jedoch graphisch kontrolliert, manuell verschoben werden können. Der Vorteil dabei ist eine Speicherfunktion, die die Auswertungseinstellungen für eine komplette Untersuchung eines Probanden oder Patienten speichert und diese auf alle darauf folgenden Probanden oder

[25.01.2011]

Patienten anwenden kann. Somit ist nur eine einmalige Einstellung der Zeitspannen notwendig, um Studien mit einer Mehrzahl von Probanden oder Patienten zu untersuchen. Das garantiert konstante Auswertungseinstellungen für die ERG-Potentiale des gesamten Probandenkollektivs. Weiterhin wird der Export der a- und b-Wellenamplitude in kurzer Zeit ermöglicht. Eine grafische Darstellung und Funktionsanalyse (Naka-Rushton-Funktion [Naka and Rushton 1966]) ist für besondere Fragestellungen in die Software integriert [Abbildung 3.8]. Dabei ist das Programm auf die Exporttabelle des verwendeten Espion Systems abgestimmt.

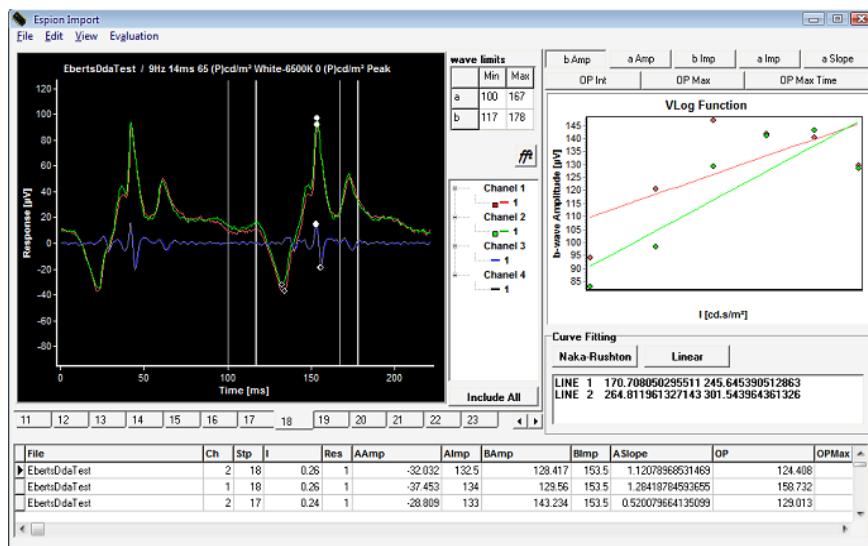


Abbildung 3.8: ERG-Kurve bei 9Hz-Flicker-Stimulation unter Anwendung einer hohen Intensität (65 phot cd/m²) in einer Programmfenster-Abbildung von „Import“. Im linken schwarz bedruckten Abbild sind die Kurven der ERG Messung zu sehen. Die weißen Balken zeigen visuell die Zeitspanne an, die analysiert wird. Auf der rechten Seite ist ein Teil der V log-I Funktion (Naka-Rushton-Funktion) zu erkennen. Ganz unten im Bild werden die Daten der einzelnen Wellen in einer exportierbaren Tabelle zusammengefasst.

4. Ergebnisse

4.1. Skotopisches ERG

4.1.1. Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)

4.1.1.a. Exploration Frequenz

Essentiell ist eine Berücksichtigung der Dunkeladaptation von 30 Minuten für eine Stimulation des Stäbchensystems, die möglichst isoliert vom Zapfensystem abgeleitet werden soll. Die Untersuchung von gesunden Probanden mit sehr niedrigen Lichtintensitäten ermöglichte die Auswahl von erweiterten Techniken zur Stimulation des skotopischen ERGs.

Unter Anwendung von sehr schwachen Lichtstimuli erscheint die Netzhautantwort durch die an der Antwort beteiligten Artefakte deformiert [Abbildung 4.1]. Aus diesem Grund ist eine genaue Trennung von Artefakten und realer Netzhautantwort nicht immer möglich. Die Stimulationen mit Einzelblitzen zeigten hierbei nur suboptimale Ergebnisse. Die Netzhautantwort auf einen Einzelblitz konnte bei niedrigen Amplituden in der ERG Antwort nicht eindeutig identifiziert werden, da die Amplitude durch Artefakte (z.B. Netzrauschen) überlagert wurde. Auch wenn eine deformierte b-Welle sichtbar wird, kann nicht mit eindeutiger Sicherheit belegt werden, dass die b-Welle kein Artefakt ist [Abbildung 4.1]. Zusätzlich machten die Mittelungen von zahlreichen Einzelmessungen einen Beweis dafür unmöglich, da ein Artefakt in nur einer Einzelmessung, zum Beispiel durch Zwinkern oder durch Augenbewegungen, durch Mittelung mit Netzrauschen oder einem erloschenen ERG eine deformierte b-Welle und damit eine Restantwort vortäuschen kann. Diese Tatsache erschwerte die Auswertung von Restfunktionen im ERG. Die Lösung für dieses Problem wurde in der repetitiven Stimulation gefunden [Abbildung 4.1].

Messung Proband 1 (15.12.2005 und 20.12.2005)

Single Flash VS 10Hz Flicker

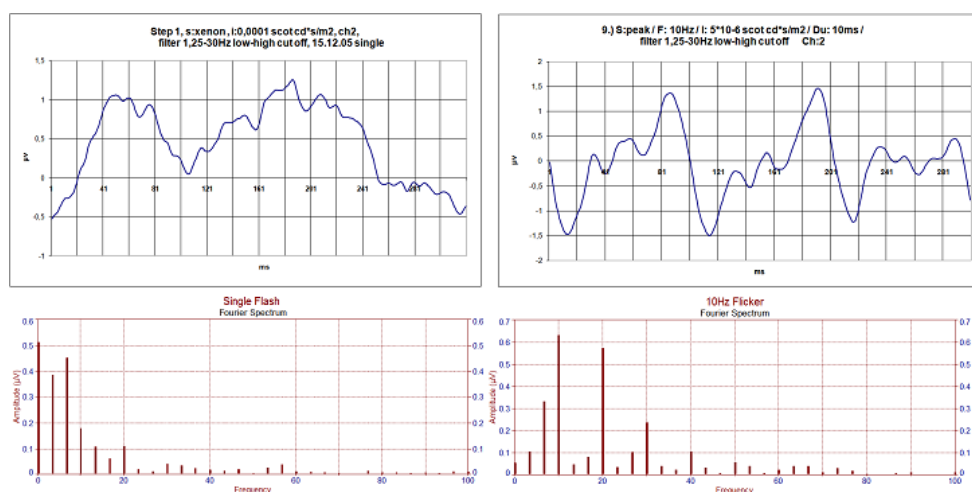


Abbildung 4.1: Einzelblitz-ERG (links) mit zugehöriger FFT Analyse (links unten) und die 10Hz-Flicker Methode (rechts) mit zugehöriger FFT (rechts unten) bei Stimulation mit sehr geringen Lichtintensitäten. In beiden Messungen wurde das RA untersucht. Die FFT verdeutlicht die erleichterte Beurteilung bei einer Flickerstimulation im rechten Bild. Bei 10Hz ist eine hohe, dominante Komponente in der FFT erkennbar.

Links: Stimulation mit Xenon-Blitz, Intensität von 0,0001 skot cd*s/m², Filter von 1,25-30Hz.

Rechts: 10Hz Flickerstimulation mit weissem Lichtblitz, Intensität von 0,000005 skot cd*s/m², Filter 1,25-30Hz.

Dabei wurde die Frequenz der repetitiven Stimulation so gewählt werden, dass pro Einzelmessung gleich mehrere b-Wellen in der ERG Ableitung sichtbar wurden. Die Ableitung erhielt dadurch ein charakteristisches Erscheinungsbild mit mehreren b-Wellen. Diese Strategie erleichterte die Auswertung von Restfunktionen im ERG. Die Vortäuschung von Reizantworten einer festgesetzten Stimulationsfrequenz durch Artefakte ist sehr unwahrscheinlich.

Für das isolierte Stäbchensystem besteht ein Frequenzlimit bis ca. 15Hz [Dodt 1951]. Der schnelle Erregungsweg der Stäbchen durch die „Gap-Junction“ Verbindung mit den Zapfen, der Frequenzen über 15Hz aufzulösen vermag, sollte bewusst aus der Untersuchung ausgeschlossen werden, da jede Zapfenbeteiligung minimiert werden sollte. Die skotopische Flickerantwort bei 15Hz wurde bereits beschrieben [Scholl, Langrova *et al.* 2001a, Scholl, Langrova *et al.* 2001b]. Die maximale b-Wellenamplitude betrug hierbei ca. 12-15µV. Je höher die Frequenz des Flickers, desto geringer ist die b-Wellenamplitude. Die ersten Untersuchungen wurden in der aktuellen Studie

mit einem 10Hz Flicker ERG durchgeführt. Der 10Hz Flicker gewährleistet zunächst eine gewisse elektrophysiologische „Distanz“ zu der CFF der Stäbchen bei ca. 15Hz. Durch die Stimulation mit 10Hz sind b-Wellenamplituden von bis zu 150 μ V möglich. Weiterhin können durch den 10Hz Flicker in einer kurzen Zeit von 300ms pro Einzelmessung insgesamt 3 b-Wellenamplituden gemessen werden. Durch die 3 b-Wellenamplituden erfährt die ERG-Messung eine charakteristische Kurvenform, die bei der Beurteilung von Restfunktionen sehr hilfreich ist. Die gesamte Untersuchungszeit kann bei einer 10Hz-Flickerstimulation sehr kurz gehalten werden. Bei einer Mittelung von 50 Einzelmessungen ist eine gesamte Untersuchungszeit von nur 15s aufzubringen. Theoretisch wäre daraus eine Mittelung von 150 b-Wellenamplituden der Netzhaut in nur 15s Untersuchungszeit zu realisieren. Die ersten Probandenuntersuchungen wurden mit einer 10Hz Flickerstimulation durchgeführt.

Nach Aufklärung der durch die Mittelung und entsprechenden Frequenzwahl entstehenden Vorteile in Kapitel 7.1 wurde eine 9Hz-Flickerfrequenz der 10Hz Flickerstimulation vorgezogen. Das bedeutet, dass die Stimulationsfrequenz des skotopischen Protokolls im Laufe der Vorstudie von 10Hz auf 9Hz wechselte. Die Verifizierung des entwickelten Protokolls erfolgte ausschließlich mit einer 9Hz Flickerstimulation.

4.1.1.b. Exploration spektrale Sensitivität

Die spektrale Sensitivität ist definiert als die Empfindlichkeit der Photorezeptoren auf Licht mit variabler Wellenlänge. Gemessen werden kann die spektrale Sensitivität der Photorezeptoren an der Absorption von Licht mit verschiedenen Wellenlängen durch die Sehpigmente der Stäbchen und Zapfen [Brown and Wald 1964]. Die Unterschiede zwischen den spektralen Empfindlichkeitskurven der Stäbchen bzw. Zapfen lässt sich durch den Unterschied zwischen ihren Absorptionsspektren erklären. Die Absorptionsspektren sind bestimmt durch die Lichtmenge, die durch das Sehpigment der jeweiligen Zapfenart oder der Stäbchen absorbiert wird,

[25.01.2011]

aufgetragen gegen die Wellenlänge. Das Stäbchensystem zeigt eine maximale spektrale Sensitivität bei einer Wellenlänge von ca. 500nm. Die blaue LED im ColorDome® bietet eine maximale spektrale Wirksamkeit bei 470nm. Eine Einstellung des Lichtstimulus auf 500nm wäre technisch durchaus möglich. Die Vermischung von LEDs mit verschiedenen Wellenlängen wäre dafür unumgänglich, was ein breiteres spektrales Wirksamkeitsfeld nach sich ziehen würde. Das wäre wiederum mit Nachteilen verbunden. Das breite spektrale Wirksamkeitsfeld wäre für eine isolierte Stimulation der Stäbchen nicht geeignet, da durch die breite spektrale Wirksamkeit eine hohe Zapfenbeteiligung nicht auszuschließen wäre. Bei einer Wellenlänge von 470nm ist die spektrale Sensitivität der mittel- und langwelligen Zapfen geringer als bei einer Wellenlänge von 500nm [Abbildung 4.2]. Somit resultiert bei 470nm das beste Verhältnis aus einer optimalen Stäbchenstimulation und einer kleinstmöglichen Zapfenbeteiligung in der ERG-Antwort. Aus diesen Gründen wurde für das isolierte skotopische ERG die blaue LED mit einer Wellenlänge von 470nm angewandt. Eine Hintergrundbeleuchtung wurde auf Grund der notwendigen Dunkeladaptation deaktiviert.

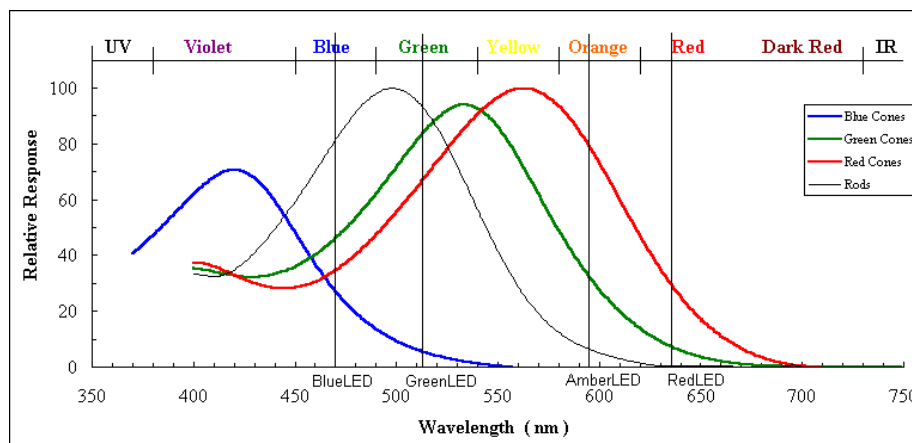


Abbildung 4.2: Antwortfunktion der Photorezeptoren auf verschiedene Wellenlängen. Modifizierter Auszug aus der Darstellung zur Antwort der Zapfen und Stäbchen auf unterschiedliche Wellenlängen der Universität von New Mexico [UniversityOfNewMexico Homepage]. Schwarze Linien im Diagramm stellen die Wellenlängen der verwendeten LEDs (z.B. „BlueLED“) dar. Farbige Kurven (Blau, Grün, Rot) kennzeichnen die Antwort der Photorezeptoren auf unterschiedliche Wellenlängen („Blue Cones, Green Cones, Red Cones“). Schwarze Kurve kennzeichnet die spektrale Wirksamkeit auf die Stäbchen („Rods“). Es wurde die spektrale Wirksamkeit der Wellenlängen (nm) gegen die relative Antwort (normiert auf 100% des jeweiligen Rezeptors) aufgetragen. Die Stäbchenkurve („Rods“) entspricht nicht der Skalierung und dient nur dem spektralen Vergleich zwischen Stäbchen und Zapfen.

4.1.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen

Für die Vorstudie erfolgte die Definition der Rahmenbedingungen einer Optimierung der Stimulationsparameter. Dabei kommt es bei den skotopischen Messungen zu Beginn einer Intensitätssteigerung zu einem stetigen Wachstum der b-Wellenamplitude. Nach einem Höhepunkt der b-Wellenamplitude wird eine Abnahme durch die Interaktion zwischen Stäbchen und Zapfen erwartet. Wenn die Schwellenintensität der Stäbchenantwort überschritten wird, steigen die b-Wellenamplituden sehr steil an. Das ist ein Zeichen für die steigende Zapfendominanz am ERG. Für die möglichst isolierte skotopische ERG Antwort ist der erste Höhepunkt der Kennlinien von Bedeutung [Abbildung 4.3]. Hieraus wird die optimale Einstellung für eine maximale b-Wellenamplitude extrahiert.

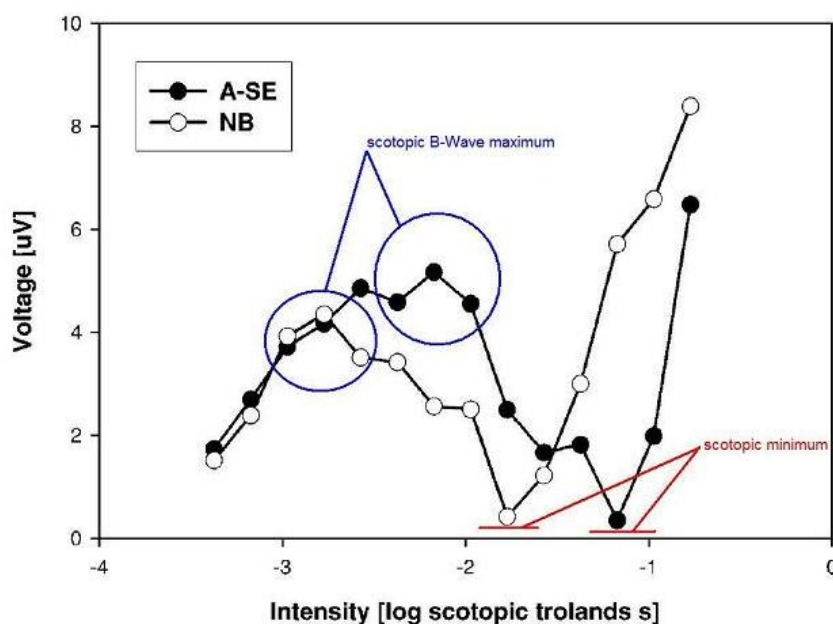


Abbildung 4.3: Kennlinie der b-Wellenamplituden einer 15Hz Flicker Messung mit steigender Intensität in Anlehnung an Scholl [Scholl, Langrova *et al.* 2001b]. Der erste Gipfel (blau umrandet) wird als maximale skotopische b-Wellenamplitude („skotopic b-Wave maximum“) angestrebt. Diesem Maximum folgt das skotopische Minimum („skotopic minimum“). Bei Anwendung von höheren Intensitäten erfährt die Kennlinie der b-Wellen nach dem skotopischen Minimum einen steilen Anstieg. Die Darstellung beinhaltet zwei Probandenmessungen (a-SE [•] und NB [○]).

Eine optimale Pulszeit wird ebenfalls durch Kennlinien, in denen die b-Wellenamplitude gegen die Pulszeit aufgetragen wird, untersucht.

Bei der Optimierung des isolierten skotopischen ERGs wurde besonderer Wert auf ein Flicker-ERG ohne a-Welle gelegt. Die a-Welle repräsentiert schnelle Potentiale im ERG, die bei der Einzelblitz Ableitung erst bei mesoptischen Intensitäten sichtbar werden, und ein Zeichen für eine Zapfenbeteiligung sind. Somit sollte das möglichst isolierte Stäbchen ERG keine a-Welle enthalten.

In der Vorstudie wurden Versuchsserien mit unterschiedlichen Intensitäten und Pulszeiten mit dem explorierten Protokoll durchgeführt, um ein Optimum für eine maximale b-Wellenamplitude im skotopischen ERG extrahieren zu können. Eine hohe Zapfenbeteiligung wurde durch verschiedene Techniken ausgeschlossen (z.B. FFT-Analyse). Die Hauptstudie untersucht die aus der Vorstudie resultierenden Intensitäts- und Pulszeit-Bereiche genauer.

4.1.1.d Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität

Die ersten Ergebnisse aus den Probandenmessungen zeigten eine optimale skotopische 10Hz Antwort im Intensitätsbereich zwischen 0,001 und 0,1 skot. $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$. Die folgenden Messungen zeigen jeweils kleine Intensitätsserien mit dem 10Hz Blauflicker unter gleichbleibender Pulszeit und konstanten Einstellungen für jede Einzelmessung.

Messung Proband 1 (08.12.2005 und 20.12.2005)

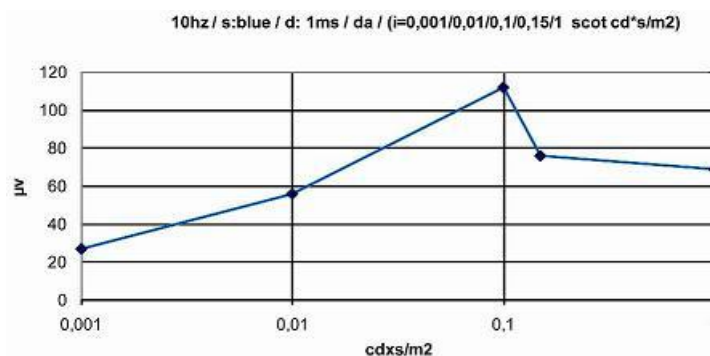


Abbildung 4.4: B-Wellenamplitude unter 10Hz Stimulation und Anwendung verschiedener Intensitäten im dunkeladaptierten Zustand. Intensität in skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$, blaue Stimulations-LED, feste Pulszeit von 1ms. {Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 44-106 Einzelantworten}

Die Messung mit einer Pulszeit von 1ms ergibt ein Maximum bei 0,1 skot

[25.01.2011]

cd*s/m² [Abbildung 4.4]. Da es zunächst keine Hinweise auf eine optimale Pulszeit unter einer 9Hz-Blauflicker Stimulation gab, wurden kleine Intensitätsserien mit unterschiedlichen Pulszeiten durchgeführt. Die Anwendung einer Pulszeit von 4ms erbrachte vergleichbare Ergebnisse (maximale b-Wellenamplitude bei 0,1 skot cd*s/m²) wie die Pulszeit von 1ms. Eine Verlängerung der Pulszeit auf 15ms und 30ms zeigte im ERG eine maximale Antwort bei 0,01 skot cd*s/m². Die maximale b-Wellenamplitude war hierbei jedoch um ca. 30µV geringer als unter Anwendung von kurzen Pulszeiten (1ms und 4ms).

4.1.1.e. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:

In der nächsten Versuchsreihe sollte die optimale Stimulationsdauer bei verschiedenen Intensitäten untersucht werden. Es wurde bei gleichbleibenden Intensitäten jeweils die Pulszeit variiert und das Maximum der b-Wellenamplitude ermittelt [Abbildung 4.5]. Die Lichtstimulation erfolgte mit einer Frequenz von 10Hz unter Anwendung einer blauen LED im dunkeladaptierten Zustand. Diese Untersuchungen zeigten eine maximale b-Wellenamplitude bei 10ms.

Messung Proband 1 (08.12.2005 und 10.01.2006)

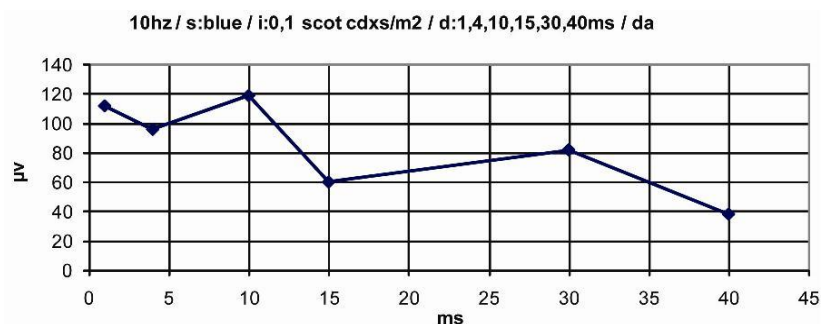


Abbildung 4.5: B-Wellenamplitude unter 10Hz Stimulation und Anwendung verschiedener Pulszeiten im dunkeladaptierten Zustand. Pulszeit in ms, blaue Stimulations-LED, konstante Intensität von 0,1 skot cd*s/m². {Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 29-96 Einzelantworten}

[25.01.2011]

4.1.1.f. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:

Die Pulszeit wurde anhand einer Serie von Messungen, bei denen die Reizdauer von 1ms bis 20ms variierte, untersucht. Die übrigen ERG-Einstellungen, vor allem die Intensität, blieben konstant. Die Intensität wurde auf Grund der Hinweise aus den Voruntersuchungen auf 0,01 skot cd*s/m² justiert. Die b-Wellenamplitude wurde aus den Einzelmessungen ausgewertet. Danach wurden die 9Hz- bzw. 18Hz-Anteile jeder Einzelmessung in der FFT kalkuliert. Bei dieser Untersuchung wurden die Abstände zwischen den einzelnen Pulszeiten klein gehalten und die Messung auf 10 Messwerte erweitert [Abbildung 4.6].

Messung Proband 5 (17.09.2006)

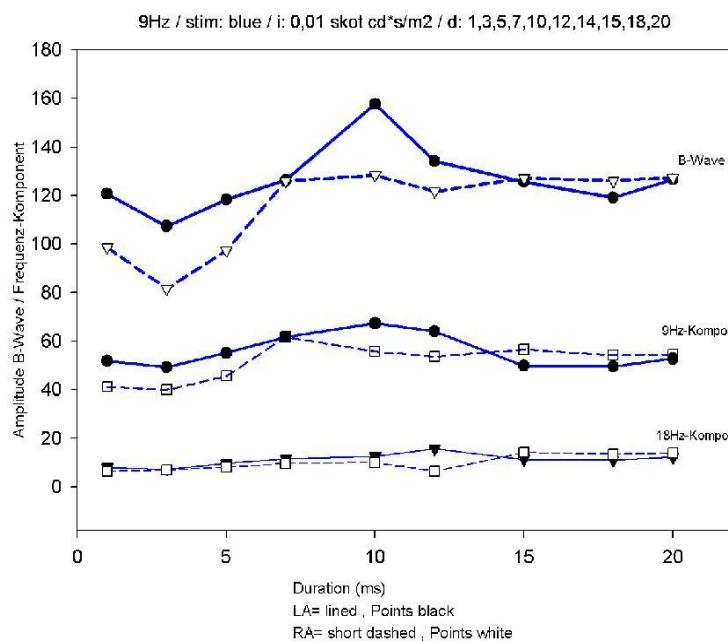


Abbildung 4.6: B-Wellenamplituden beider Augen (obere Kennlinien „B-Wave“) bei 9Hz-Flickerstimulation mit blauer LED und fester Intensität von 0,01 skot cd*s/m² (LA = schwarze Punkte, RA = weiße Punkte). Die Pulszeit (ms) wurde variiert (1-20ms). Frequenzanteile aus der ERG-Antwort gegen die angewandte Pulszeit aufgetragen (mittleren Kennlinien 9Hz-Komponente= „9Hz-Kompo“ und untere Kennlinien 18Hz-Komponenten = „18Hz-Kompo“). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 30 Einzelantworten}

Die Auswertung ergibt bei beiden Augen ein Maximum der b-Wellenamplitude in der ERG Antwort bei einer Pulszeit von 10ms. Die 18Hz-Anteile sind minimal im Vergleich zu den 9Hz-Anteilen. Die 9Hz-Anteile weisen unterschiedliche

Maxima auf [Abbildung 4.6]. Das linke Auge liefert eine maximale 9Hz-Komponente bei einer Pulszeit von 10ms und das rechte Auge bei 7ms. Ein Maximum lässt sich für die 18-Hz-Komponente in der FFT nicht eindeutig bestimmen. Der Verlauf der 18-Hz-Komponente ist eher gleichbleibend minimal im Vergleich zur 9Hz-Komponente. Eine a-Welle ließ sich in keiner Ableitung identifizieren, was für ein weitgehend isoliertes skotopisches ERG spricht.

Da die b-Wellenamplitude in beiden Augen ein Maximum bei 10ms zeigt, wurde für die folgenden Messungen zur Auswahl der Intensität eine Pulszeit von 10ms adjustiert. Es erfolgte jedoch in der Hauptstudie eine genaue Definition der Reizdarbietungsdauer durch ERG-Messungen an 16 Probanden mit konstanter Intensität und variierenden Pulszeiten.

4.1.1.g. Vorstudie: Intensitätsserien und FFT-Analyse des Blauflickers.

Die Auswahl einer geeigneten Intensitätsbreite für die Hauptstudie erfolgte an einer 10Hz-Flickerserie mit konstanter Pulszeit von 10ms und variierenden Intensitäten von $\log(-4,9 \text{ skot cd*s/m}^2)$ bis $\log(0,09 \text{ skot cd*s/m}^2)$ in $\log 0,2$ -Schritten. Außer der Intensitätsänderung blieben die Einstellungen für den 10Hz Blauflicker konstant. Die einzelnen ERG Ableitungen wurden für das rechte und linke Auge in einem Diagramm zusammenfassend abgebildet [Abbildung 4.7].

Da durch die ansteigenden Intensitäten das ERG eine charakteristische Veränderung erfuhr, erfolgte zunächst die Kurvenformdiskussion an der gesamten Stimulationsserie. Durch die Anwendung von sehr geringen Intensitäten ist nur eine geringe b-Wellenamplitude zu erkennen. Diese nimmt jedoch mit ansteigenden Intensitäten stetig bis zum Erreichen eines Schwellenwertes, ab dem eine a-Welle sichtbar wird, zu. Dieser Schwellenwert ist für die Beurteilung einer möglichst reinen Stäbchenantwort sehr wichtig, da die a-Wellenamplitude auf eine deutliche Zapfenbeteiligung hinweist.

Die a-Welle wurde in der Stimulationsserie ab Messung (Untersuchungsschritt) 19-20 ($0,0307-0,0486 \text{ skot cd*s/m}^2$) identifiziert [Abbildung 4.7].

[25.01.2011]

Messung Proband 1 (17.05.2006)

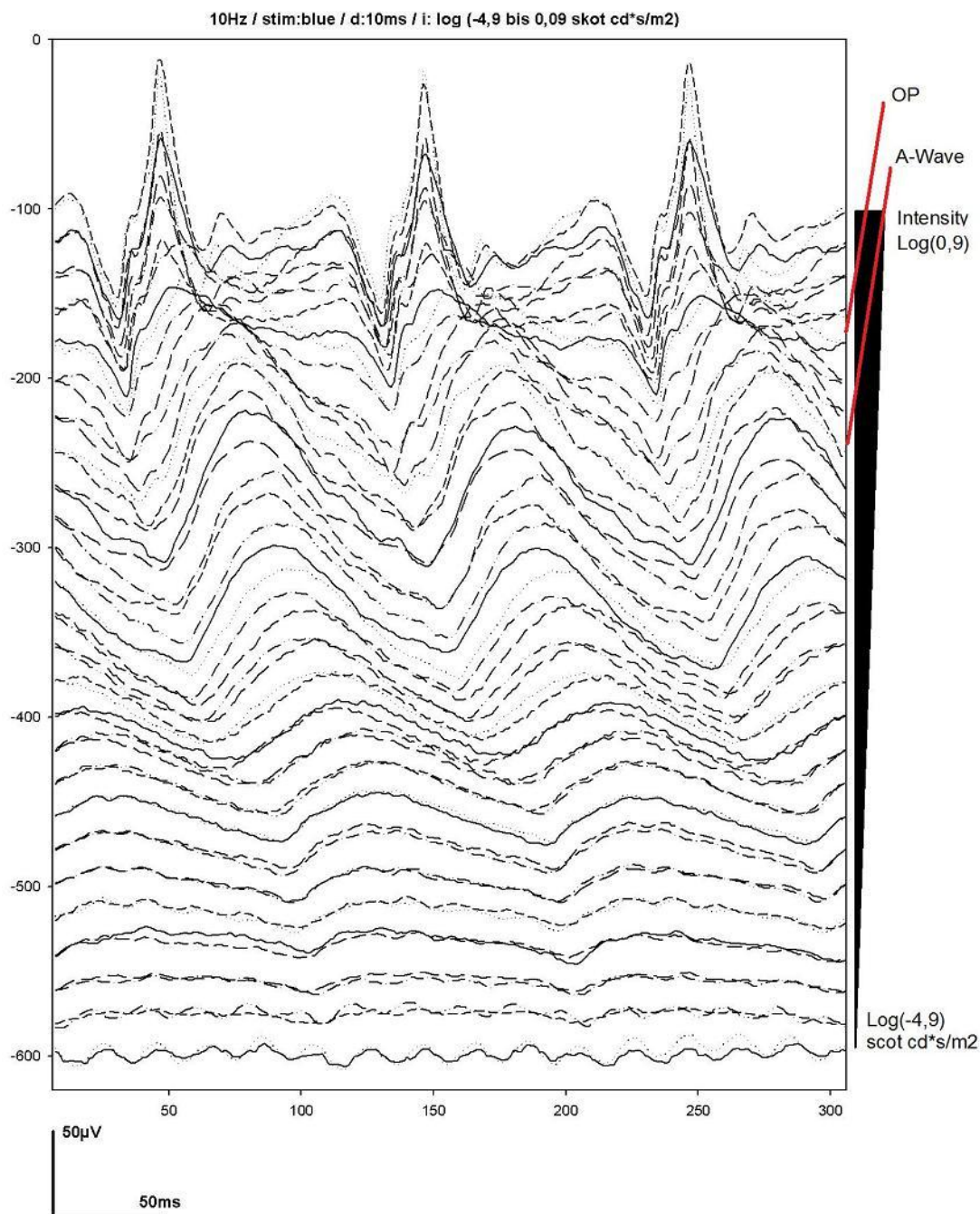


Abbildung 4.7: ERG Kurven beider Augen bei 10Hz-Flickerstimulation mit blauer LED und konstanter Pulszeit von 10ms. Intensität von unten nach oben zunehmend. Im Verlauf der Intensitätserhöhung werden eine a-Welle („a-Wave“) und OPs („OP“) identifiziert. {Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:aus; Mittelung von 50-83 Einzelantworten}

Anschließend wurden die Einzelschritte mittels FFT analysiert [Abbildung 4.8]. Messung 1 enthielt eine reine Rausch-Aufzeichnung und wird deshalb hier nicht aufgeführt. Bis Messung 3 (0,0000194 skot cd*s/m²) wurde der 50Hz-Anteil

[25.01.2011]

mittels digitaler Offlinefilterung entfernt. Ab Messung 3 (0,000194 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) war eine 50Hz-Filterung nicht mehr notwendig, da der Anteil der 50Hz-Komponente im Vergleich zum Signal minimal war. Die genauen Frequenzanteile der Ableitungen in der FFT wurden gesondert aufgetragen:

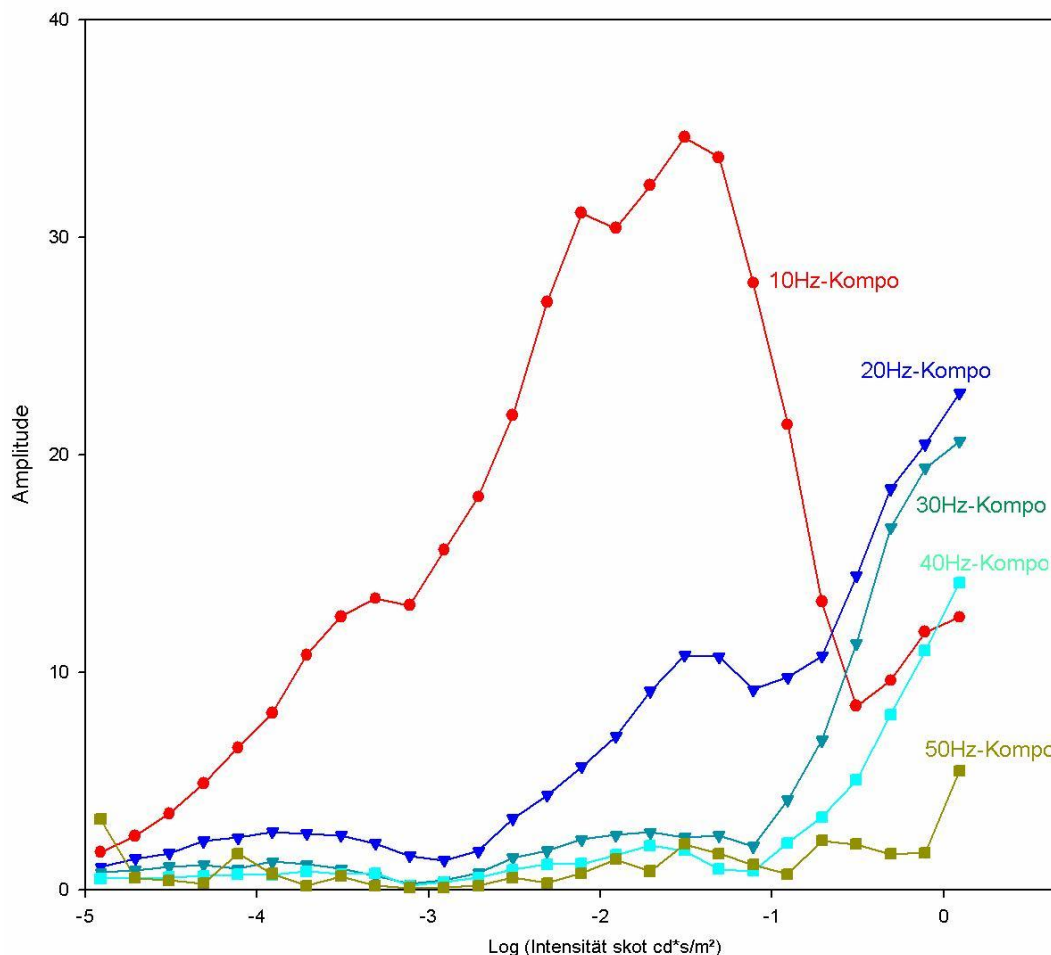


Abbildung 4.8: Die Anteile (Amplituden (μV)) einzelner Frequenzen, die an der ERG-Antwort beteiligt waren, wurden mit Hilfe der FFT zusammengefasst. Zur Stimulation s.o.. (x-Achse=Intensität in log skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$; y-Achse=Amplitude in μV ; 10Hz-Anteil=rot; 20Hz-Anteil=blau; 30Hz-Anteil=dunkeltürkis; 40Hz-Anteil=türkis; 50Hz-Anteil=dunkelgelb)

Daraus lässt sich der Anteil der Frequenzen an den einzelnen Messungen ersehen [Abbildung 4.8]. Den höchsten Anteil an der abgeleiteten ERG-Antwort hat die 10Hz-Komponente in Messung 19 (0,0307 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$). Dabei ist zu beachten, dass die 20Hz-Komponente (2. Harmonische) in Messung 19 ein „Zwischenhoch“ aufweist. Bei höheren Intensitäten verhalten sich die 10Hz- und 20Hz-Anteile annähernd reziprok zueinander. Das wird durch die stetig ansteigende a-Welle bedingt. Der 10Hz-Anteil fällt bis unter die 20Hz- und

30Hz-Anteile ab. Die 20Hz- und 30Hz-Anteile steigen dabei stetig an. Erst ab Messung 24 (0,307 skot cd*s/m²) erfährt die 10Hz-Komponente einen Anstieg.

Einzelauflistung der Messungen 18 bis 23 und der zugehörigen FFT:

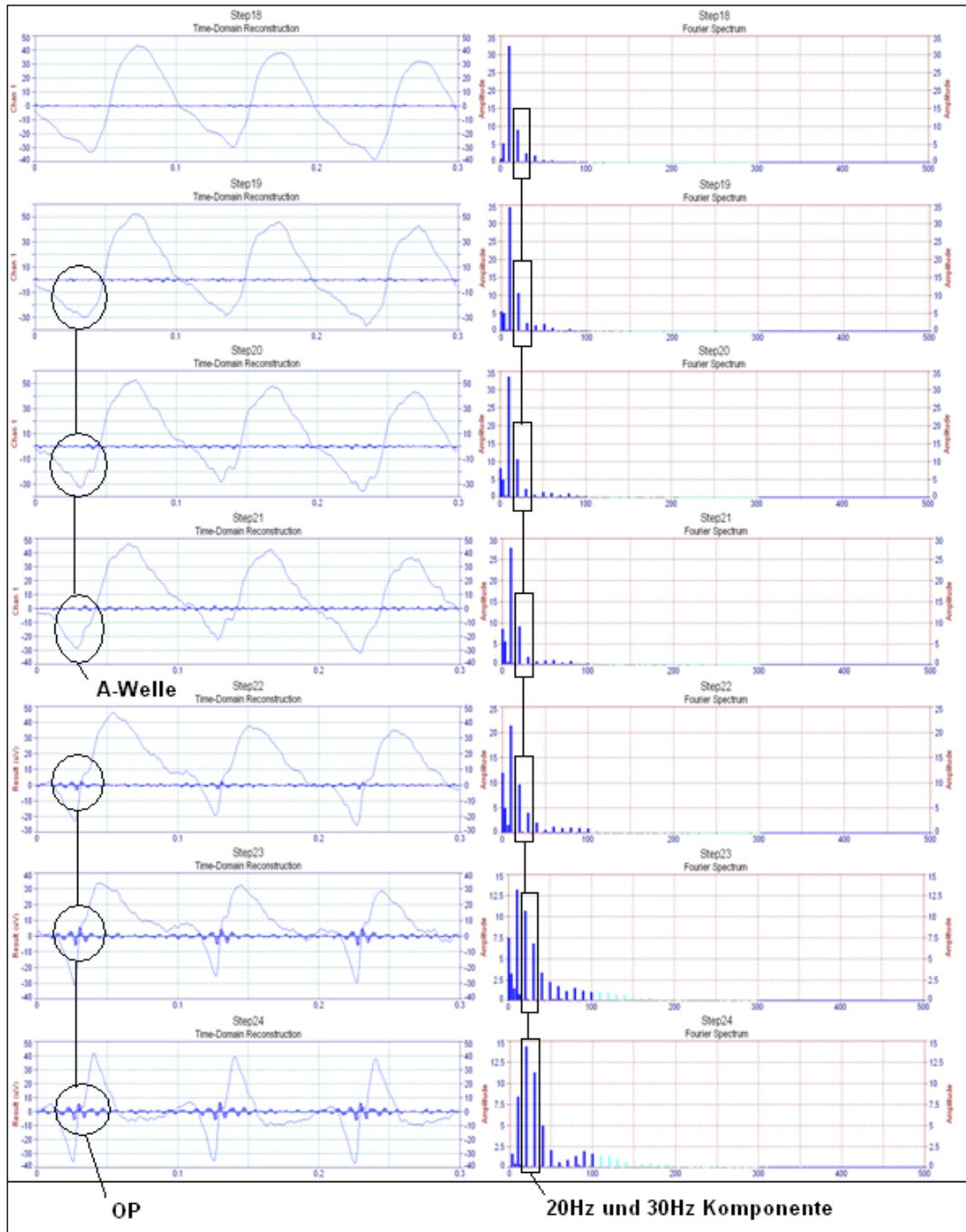


Abbildung 4.9: ERG Kurven der 10Hz-Flickerstimulation von Messung 18 bis 24 (0,0194 bis 0,307 skot cd*s/m²) (links). Die dunkelblaue Kurve stellt die gefilterten OPs aus der Kurve dar (AUC). Die a-Welle und das Auftreten der OPs wurde durch eine Markierung verdeutlicht. (x-Achse = s, y-Achse = µV). Analyse der FFT der jeweiligen ERG Kurven rechts (x-Achse = Frequenzen, y-Achse = Amplitude µV). Die 20Hz und 30Hz Komponente wurde markiert. Hellblau sind die ausgefilterten Frequenzen für die OP-Darstellung aufgeführt (100-300Hz).

Um den Effekt der ansteigenden a-Welle und den Veränderungen in der FFT zu visualisieren wurden einzelne Messungen (Messung 18-23) mit der ERG-Kurve und der zugehörigen FFT-Analyse dargestellt. Zusätzlich zur Kurvendarstellung der Messungen 18 bis 23 wurde eine OP-Filterung im Bereich von 100 bis 300Hz durchgeführt, um den Anteil der Zapfenbeteiligung an der abgeleiteten Antwort abzuschätzen [Abbildung 4.8]. Die Analyse der FFT ergab, dass erst ab Messung 22-23 (0,122-0,1945 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) OPs nachzuweisen sind [Abbildung 4.9]. Zusätzlich steigen die 20Hz- und 30Hz-Anteile in der FFT ab Messung 20 (0,04865 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) deutlich an. Zwischen Messung 23 und Messung 24 (zwischen 0,1945 und 0,307 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) besteht ein Umschlagpunkt, bei dem der 20Hz-Anteil in der FFT den 10Hz-Anteil übersteigt. Der 10Hz-Anteil sinkt in den folgenden Messungen, also mit steigender Intensität, und es entsteht eine 20Hz- und 30Hz-Dominante in der FFT. Aus dieser Analyse resultiert, dass bei Erscheinen oder Zunahme einer a-Welle in der ERG-Ableitung eine Zunahme der oszillatorischen Potentiale und eine Abnahme des Anteils der Stimulationsfrequenz (10Hz-Komponente in der FFT) bei gleichzeitiger Zunahme der höheren Harmonischen registriert werden kann. Das sind Hinweise auf eine zunehmende Zapfenbeteiligung an der ERG-Antwort bei ansteigender a-Welle.

Die Messung der b-Wellenamplitude und der zugehörigen Gipfelzeiten erlauben eine weitere Beurteilung. Es wurden die Amplituden und die Gipfelzeiten der b- und a-Wellen in einem Diagramm aufgetragen [Abbildung 4.10]. Diese Darstellung erlaubt eine Beurteilung der maximalen b-Wellenamplitude und das Einsetzen einer a-Welle in der ERG Ableitung. Dies erfolgt jedoch nur an der Amplitudenauswertungen der ERG Kurve, nicht in der FFT-Analyse.

Die b-Welle hat ein Zwischenmaximum in Messung 20 (0,04865 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$), fällt in der Amplitude bis Messung 23 (0,194 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) ab und steigt mit höheren Intensitäten erneut an. Der zweite Anstieg der b-Wellenamplitude ist viel schneller als der erste und geht mit höheren Amplituden einher. Die Gipfelzeit der b-Welle verkürzt sich erwartungsgemäß mit dem Anstieg der Stimulationsintensitäten. Auch hier ist eine rapidere Verkürzung der b-Wellen Gipfelzeit ab Messung 20 (0,04865 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) zu registrieren als bei

niedrigeren Intensitäten.

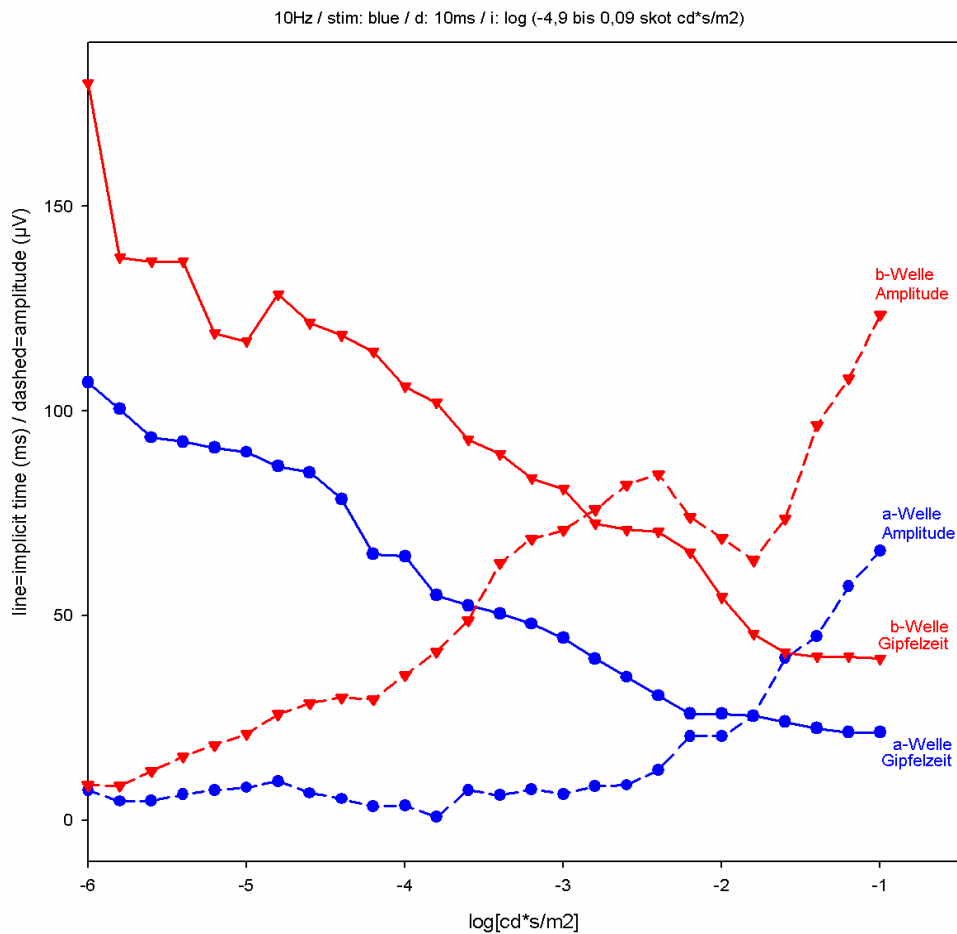


Abbildung 4.10: B- und a-Wellenamplituden mit den zugehörigen Gipfelzeiten aus den ERG-Kurven der 10Hz Blauflickerstimulation gegen die Intensität aufgetragen. Zur Stimulation s.o. (x-Achse= log skot cd*s/m², y-Achse= Amplitude in µV, Gipfelzeiten in ms)

Die Gipfelzeit der a-Welle nimmt ebenfalls mit steigenden Intensitäten ab. Die a-Wellen Amplitude erfährt ab Messung 20 (0,04865 skot cd*s/m²) einen plötzlichen Anstieg. Zusammenfassend lässt sich somit ab Messung 20 (0,04865 skot cd*s/m²) eine Interaktion zwischen Stäbchen und Zapfen erkennen, die ab Messung 23 (0,194 skot cd*s/m²) in eine Dominanz der Zapfenantwort oder zumindest in eine Stäbchen- und Zapfeninteraktion übergeht. Das skotopische Maximum kann in Messung 20 und einer Intensität von 0,04865 skot cd*s/m² identifiziert werden. Bei Stimulationen mit höheren Intensitäten (als 0,04865 skot cd*s/m²) steigt der Zapfenanteil stetig an und führt zunächst zu einer Abnahme der b-Wellenamplitude, was ein Hinweis auf die Stäbchen- und Zapfeninteraktion ist.

4.1.1.h. Vorstudie: Anwendung verschiedener Stimulationsfarben für den 9Hz-Flicker

Durch eine weitere Versuchskonstellation sollte der Übergang von ERG Antworten, die stäbchendominiert sind, auf zapfendominierte Ableitungen deutlicher gezeigt werden.

Der Beginn der Dominanz der Zapfen im ERG bei den bereits durchgeführten Intensitätsserien sollte durch eine weitere Stimulationsfarbe (Grün) deutlich gemacht werden. Es wurde eine Intensitätsserie von log (-5 bis -0,8 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) bei einer Pulszeit von 10ms aufgezeichnet [Abbildung 4.11], wobei jede Intensität mit der blauen und anschließend mit der grünen LED dargeboten wurde [Abbildung 4.11].

Die Vorstellung ist, dass bei einer rein stäbchengenerierten Antwort die Amplitude für blauen und grünen Stimulus identisch sein sollte, da eine skotopische Skalierung der Intensitäten verwendet wurde. Bei Beteiligungen der Zapfen an der ERG-Antwort sollte die Amplitude bei grünem Stimulus rasch ansteigen, da die entsprechende spektrale Empfindlichkeit nach der photopischen Kurve der Zapfen für grünes Licht wesentlich höher ist als für blaues Licht. Die Stimulationsfrequenz wurde auf 9Hz geändert. Weitere Einstellungen blieben für jede Einzelmessung konstant. Die Amplituden niedriger Intensitäten von log (-5 und -4,6 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) zeigten keine eindeutige retinale Antwort im ERG und sind deshalb im Diagramm nicht aufgelistet [Abbildung 4.11].

Die Gipfelzeiten der b-Wellen sowohl mit dem blauen 9Hz Flickerlicht, als auch mit dem grünen 9Hz Flickerlicht, wurde jeweils durch die Stimulation mit ansteigenden Intensitäten verkürzt [Abbildung 4.11]. Die Höhe der b-Wellenamplituden von blauem Flickerlicht und grünem Flickerlicht erreichen ein Maximum bei unterschiedlichen Intensitäten [Abbildung 4.11]. Das Maximum für blaues Flickerlicht unter 9Hz Stimulation wird im Messung 18 (0,0159 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$), für grünes Flickerlicht erst bei der nächst höheren Intensität (0,0398 skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) erreicht. Das Amplitudenmaximum unterscheidet sich hierbei um 18 μV zu Gunsten des grünen Stimulationslichts.

Messung Proband 1 (28.06.2006)

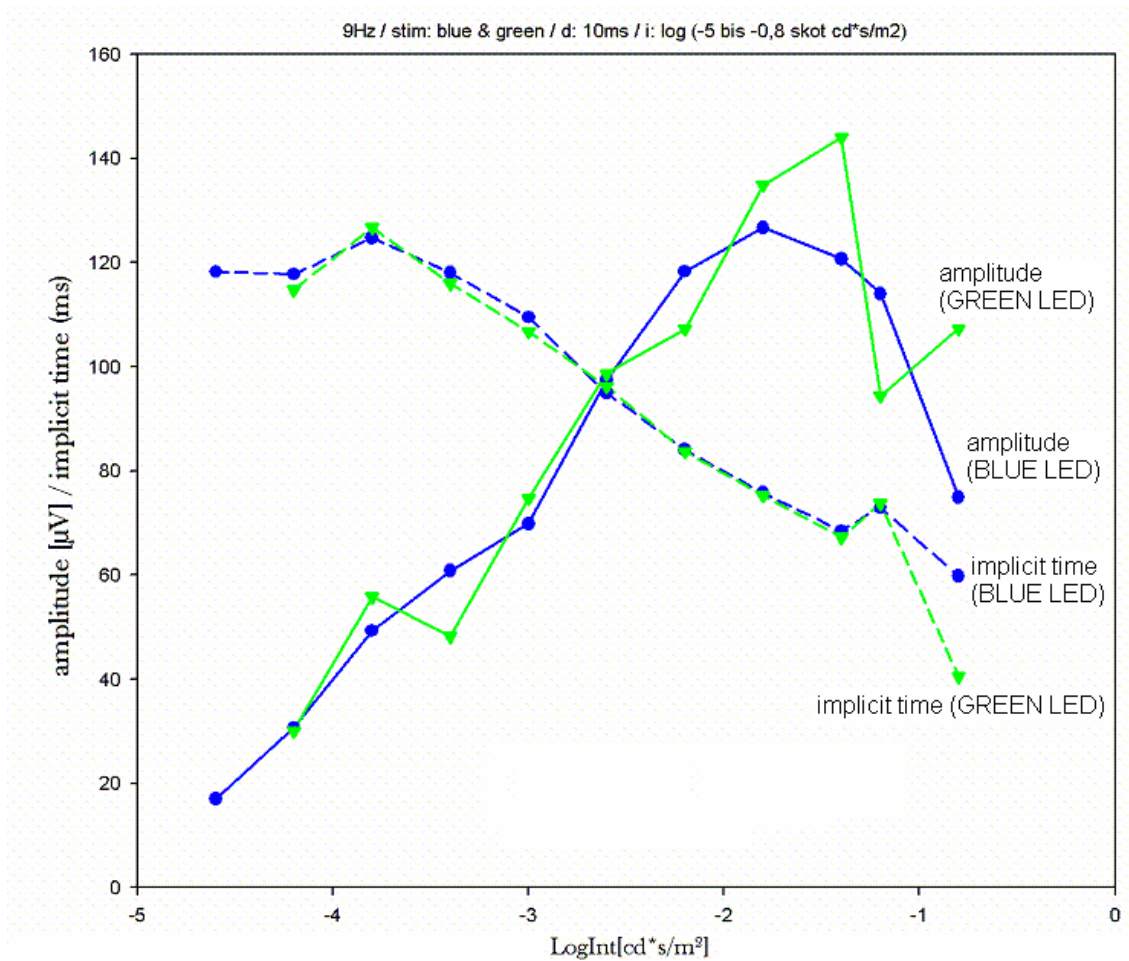


Abbildung 4.11: B-Wellenamplituden (durchgezogene Linie) der 9Hz-Stimulation mit den zugehörigen Gipfelzeiten (unterbrochene Linie). Die Stimulation erfolgte abwechselnd durch einen 9Hz Blauflicker (blaue Kurven) und Grünflicker (grüne Kurven) mit einer festen Pulszeit von 10ms und ansteigenden Intensitäten von Log(-5) bis Log(-0,8) skot cd*s/m². (x-Achse= log skot cd*s/m², y-Achse= Amplitude in µV, Gipfelzeiten in ms). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter: aus; Mittelung von 50 Einzelantworten}

Um die Frequenzanteile der ERG-Ableitungen mit blauer und grüner LED gegenüber zu stellen erfolgte eine Auswertung der Frequenzen mit Hilfe der FFT. Die Frequenzanalyse ergab, dass die 9Hz-Komponente in der FFT bei blauer Stimulation größer ist als die des grünen Lichts [Abbildung 4.12]. Weiterhin haben beide Stimulationsfarben das 9Hz-Frequenzmaximum in Messung 18 (0,0159 skot cd*s/m²).

[25.01.2011]

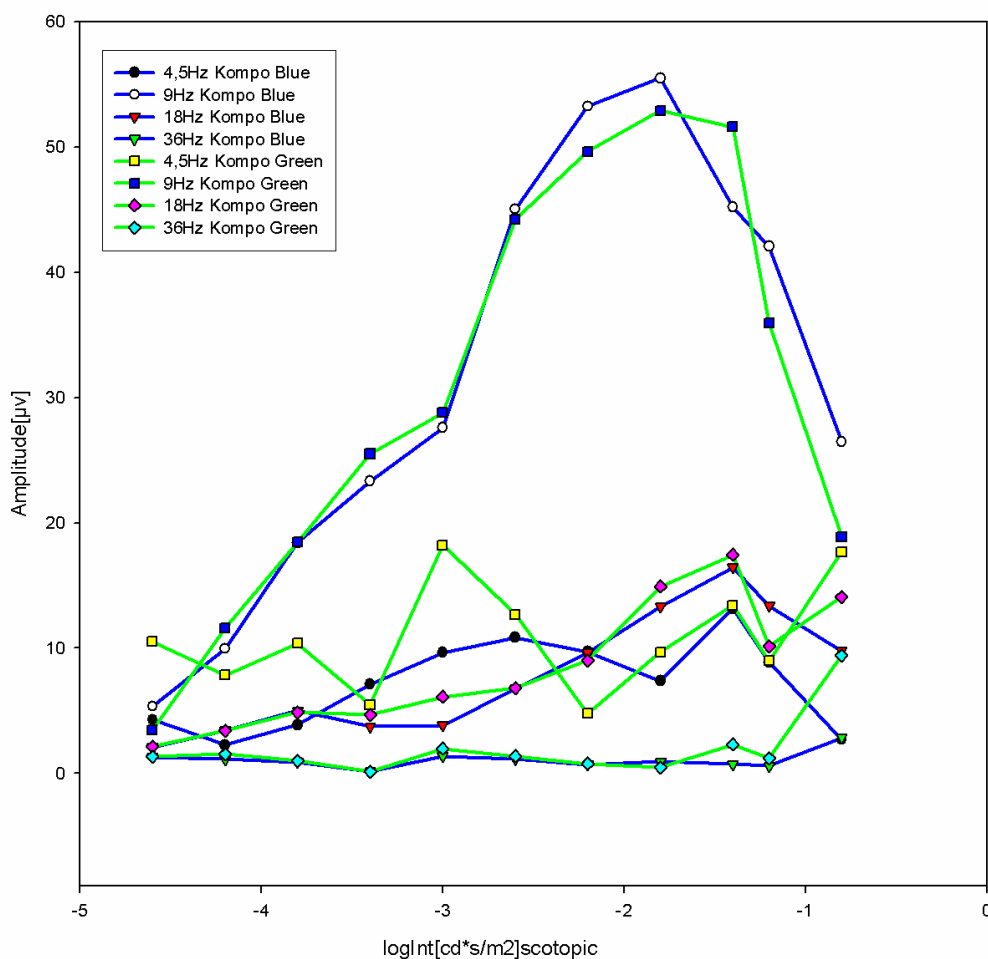


Abbildung 4.12: FFT Analyse der ERG Kurven durch 9Hz Stimulation und Anwendung von grüner LED (grüne Kurven) und blauer LED (blaue Kurve). Die Amplituden einzelner Frequenzen, die an der ERG-Antwort beteiligt waren, wurden mit Hilfe der FFT in einem Diagramm zusammengefasst. (x-Achse=Intensität in log skot cd*s/m²; y-Achse=Amplitude in µV aus der FFT)

Die Auswertung der 18Hz und 36Hz-Anteile im Verhältnis zu den jeweiligen 9Hz-Anteile an der ERG-Antwort lassen einige Rückschlüsse zu. Zunächst ist die Intensitätsserie der Messung zu kurz, das heißt die höheren Harmonischen von 18Hz und 36Hz weisen bei den höchsten Intensitäten der Messung keinen Anstieg auf wie in der vorhergehenden Messung von Proband 1 [Abbildung 4.8], außer bei der Stimulation mit dem grünen 9Hz-Flicker und der höchsten Intensität. Der Umschlagpunkt, an dem die 9Hz Komponente kleiner wird als die 18Hz und 36Hz Komponente ist in dieser Messung ebenfalls nicht erreicht worden.

Deshalb wurde eine Verschiebung der Intensitätsserie zu höheren Intensitäten notwendig. An 2 Probanden (eine Probandenmessung auf Grund ähnlicher

[25.01.2011]

Ergebnisse nicht aufgelistet) wurde eine Intensitätsreihe von $\log(-4,1$ bis $0,8$ skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) durchgeführt, um die Dominanz der 18Hz- und 36Hz-Komponente bei höheren Intensitäten zu zeigen, und um den Unterschied zwischen der blauen und grünen LED bei 9Hz Stimulation deutlicher darzustellen [Abbildung 4.13]. Die Stimulationsparameter waren bis auf die Intensität konstant. Die Intensität wurde unter Anwendung der blauen und grünen LED variiert.

Messung Proband 5 (06.10.2006)

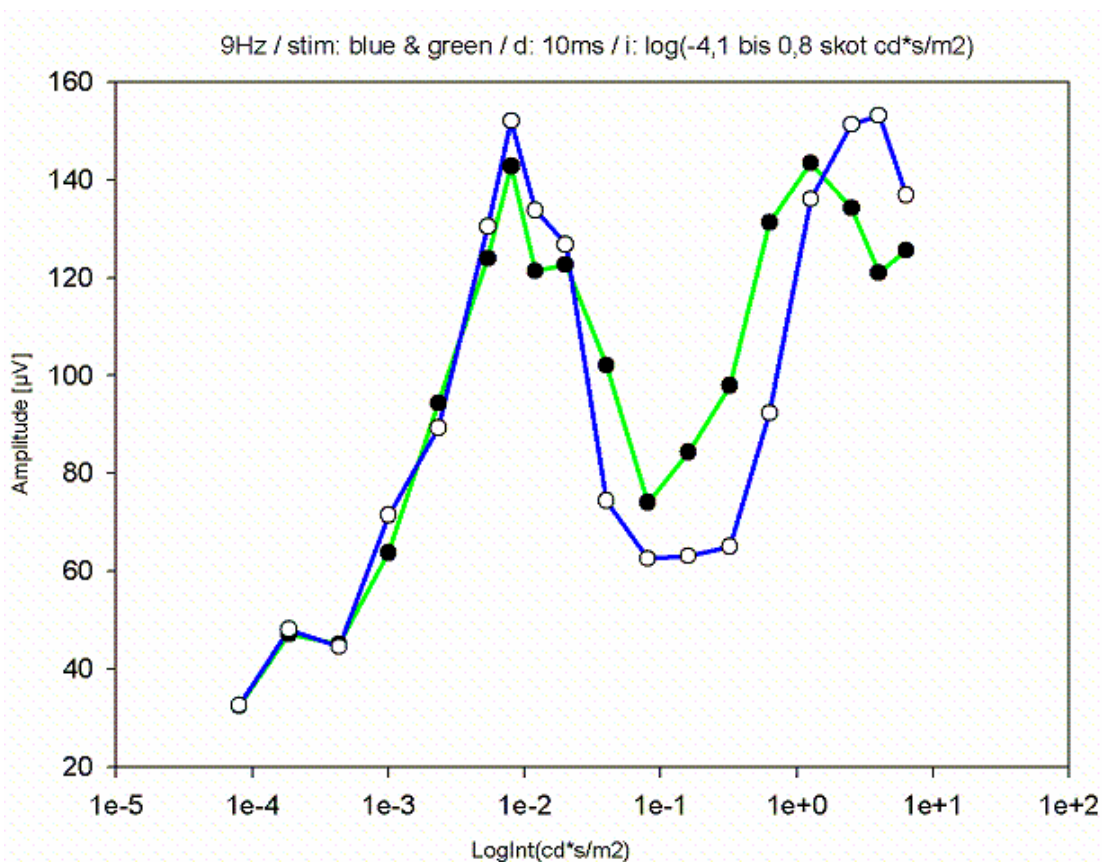


Abbildung 4.13: B-Wellenamplituden (μV) der 9Hz-Stimulation mit einem Blauflicker (blaue Kurven) und im Wechsel mit einem Grünflicker (grüne Kurven) mit einer festen Pulszeit von 10ms und ansteigenden Intensitäten von $\text{Log}(-4,1)$ bis $\text{Log}(0,8)$ skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelung von 20-50 Einzelantworten}

Die Analyse der Stimulationsserie erfolgte erneut durch Beurteilung der b-Wellenamplituden, und durch eine Kalkulation der an der ERG Antwort beteiligten Frequenzanteile. Die maximalen b-Wellenamplituden und die maximalen 9Hz-Komponenten wurden für beide Stimulationsfarben in Messung 13 und 14 erreicht ($0,008$ skot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$). Nach dem ersten Maximum erfährt die b-Wellenamplitude für den blauen und den grünen Stimulus ein Tief bis zur

[25.01.2011]

Messung 21 und 22 (0,08 skot cd*s/m²). Nach dem Minimum steigt die b-Welle rasch bis zum Erreichen eines zweiten Maximums an.

Es wurde zusätzlich eine Analyse der an der ERG-Antwort beteiligten Frequenzen durchgeführt [Abbildung 4.14].

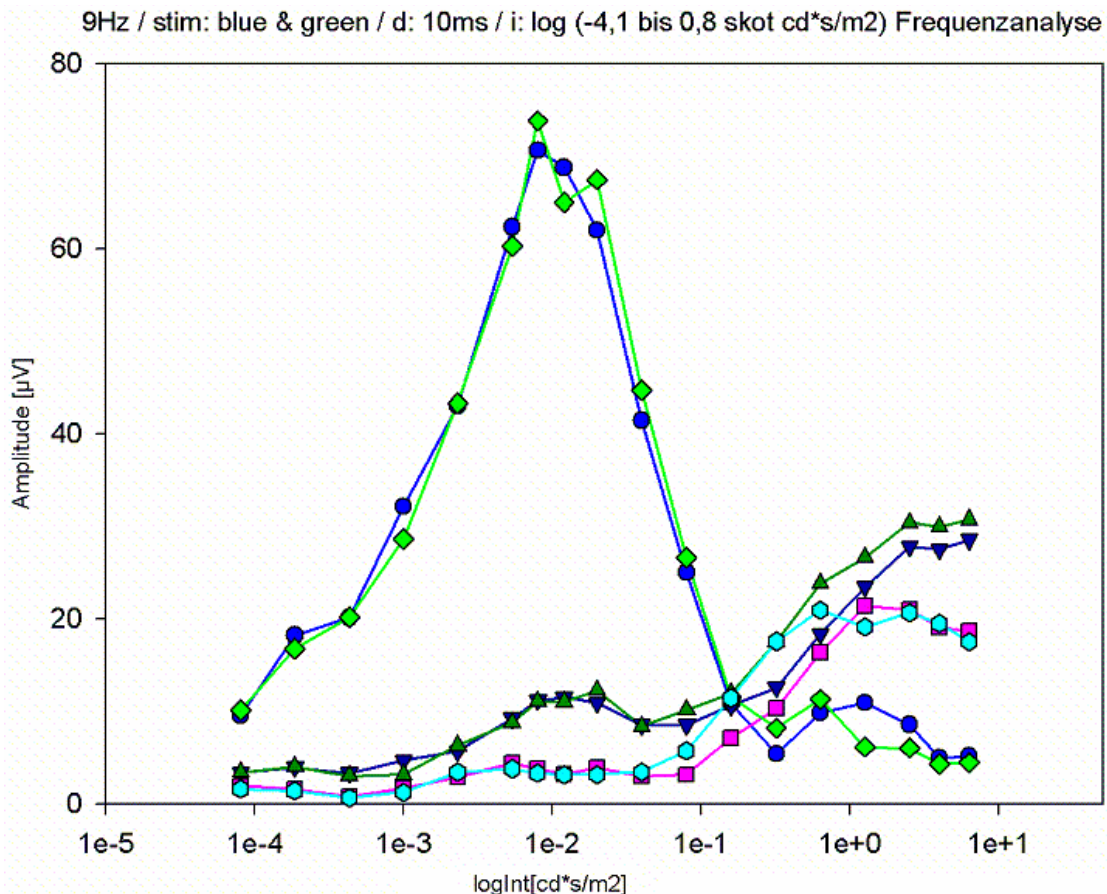


Abbildung 4.14: Ergebnisse der Amplituden aus der Frequenzanalyse bei 9Hz-Stimulation mit unterschiedlichen Intensitäten. Anteil einzelner Frequenzen (9Hz, 18Hz, 27Hz) am ERG durch die Stimulation mit der grünen und blauen LED. 9Hz-Komponente des grünen Stimulationslichts (grüne Vierecke) und des blauen Stimulationslichts (blaue Kreise) erreichen bei gleicher Intensität ein Maximum. Bei stärkeren Intensitäten sinkt die Amplitude und die 18Hz- (grüne und blaue Dreiecke) bzw. 27Hz-Anteile (türkise Hexagone für grüne LED und rosa Vierecke für blaue LED) dominieren die ERG-Antwort.

Die 9Hz-Komponente in der FFT sinkt nach dem ersten Maximum bis zur Messung 25 und 26 (0,32 skot cd*s/m²). Die Anteile der 18Hz und 27Hz-Komponenten steigen ab Messung 20 und 21 (0,04 und 0,08 skot cd*s/m²) an. Im Bereich der maximalen b-Wellenamplitude und der 9Hz-Komponente bleiben die 18Hz und 27Hz-Anteile der ERG Antwort für beide Farben minimal, jedoch sind sie für die grüne Stimulationsfarbe im Verhältnis zur 9Hz-Komponente

größer als für die blaue Stimulationsfarbe.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich zwei Amplitudenmaxima der b-Welle, die durch ein relatives Minimum klar getrennt sind. Das Erste der beiden Maxima ist dem Stäbchensystem zuzuordnen, das Zweite der Kombination der Interaktion zwischen Stäbchen und Zapfen. Es ist klar zu erkennen, dass erst nach dem ersten Maximum eine erhöhte spektrale Sensitivität für grünes Licht besteht. Dies wird an der Linksverschiebung der ansteigenden Flanke des zweiten Maximums, sowie des früheren Erreichens des zweiten Maximums der grünen Stimulation im Vergleich zum blauen Stimulus deutlich [Abbildung 4.13]. Da Stäbchen auf blaues Licht viel sensibler reagieren als Zapfen, und diese ihrerseits sensibler auf grünes Licht reagieren, ist dies ein klarer Hinweis, dass im Bereich des ersten Maximums eine überwiegende Stäbchenantwort gemessen wird, und erst bei höheren Intensitäten eine Zapfenantwort aufgezeichnet wird. Auch die FFT bestätigt diese Annahme: Das Maximum der 9Hz Komponente fällt mit dem ersten Maximum der b-Wellenamplitude zusammen. Bei ansteigender Intensität fällt die 9Hz Komponente in der FFT stetig zu Gunsten höherer Harmonischer (18Hz und 27Hz) ab. Dies deutet darauf hin, dass das erste Maximum durch das langsame Stäbchensystem generiert wurde, und bei höheren Intensitäten schnellere Komponenten des Zapfensystems zu Ungunsten des Stäbchensystems hinzukommen.

4.1.1.i. Vorstudie: Festlegung der Intensitätsbreite für den 9Hz-Blauflicker

Im nächsten Schritt konnte aus diesen Untersuchungen eine Intensitätsbreite für den stäbchengenerierten 9Hz-Blauflicker extrahiert werden, um die genaue Intensität für die optimale b-Wellenamplitude an weiteren Probandenmessungen in der Hauptstudie definieren zu können [Tabelle 4.1]. Das Maximum der b-Wellenamplitude der Intensitätsserien ($\log [-6,65$ bis $-0,5$ skot $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$] bei einer 9Hz-Blauflickerstimulation wurde an 3 weiteren gesunden Probanden untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen verglichen, um daraus einen Richtwert für die Hauptstudie zu gewinnen [Tabelle 4.1].

Proband:	Max. b-Welle bei Intensität (skot cd*s/m ²)	Max. 9Hz-Komponente aus der FFT bei Intensität (skot cd*s/m ²)
1 (28.06.06 LA)	0,0159	0,0159
3 (04.07.06 LA)	0,02	0,02
5 (06.10.06 LA)	0,008	0,008
+(15.07.06 LA)	0,008	0,008
15 (12.07.06 LA)	0,012	0,012
6 (06.10.06 LA)	0,00538	0,008
Median	0,012	0, 012
Konfidenzintervall 95%	±0,0052	±0,0046

Tabelle 4.1: Intensitäten eines 9Hz-Blauflickers (mittlere Spalte), die eine maximale b-Wellenamplitude auslösten. Zusätzlich wurden die Intensitäten mit der maximalsten 9Hz-Komponente aus der FFT aufgelistet (rechte Spalte). Das Ergebnis der zweiten Untersuchung von Proband 5 wurde in der Berechnung des Medians und des Konfidenzintervalls nicht berücksichtigt.

Außerdem konnte das b-Wellenmaximum bei zwei zu verschiedenen Zeiten gemessenen Untersuchungen von Proband 5 verglichen werden, um Abweichungen und die Validität der Untersuchungen festzustellen.

Die Intensität der maximalen b-Welle lag bei beiden Messungen (06.10.06 und 15.07.06) bei 0,008 skot cd*s/m². Der Median der 5 Probandenmessungen von 0,012 skot cd*s/m² für die Intensität, bei der die b-Wellenamplitude bei einer 9Hz-Blauflicker Messung maximal war, stellt den Richtwert für die Hauptstudie dar. Dieser Wert wurde nur orientierend bestimmt und wird Anhand von weiteren Probandenmessungen in der Hauptstudie validiert.

4.1.1.j. Vorstudie: Einfluss auf die Dunkeladaptation durch den 9Hz-Blauflicker

Die Dunkeladaptation sollte durch die Untersuchung mit den optimierten skotopischen ERG Einstellungen nicht beeinträchtigt werden. Eine spezielle Untersuchung mit den entwickelten Einstellungen ermöglichte die Beurteilung des Einflusses des 9Hz-Flickers auf die Dunkeladaptation. Das ERG wurde mit einem automatisierten Stimulationsprotokoll abgeleitet [Kramer, Messias *et al.* 2008]. Die 9Hz Einzelmessung wurde 20 Mal wiederholt und gemittelt. Durch das automatisierte Programm erfolgte die Umschaltung zwischen den einzelnen

[25.01.2011]

Messungen in einer festen Zeit, dadurch konnte das voreingestellten Inter-Stimulus-Intervall [Bui, Weisinger *et al.* 1998] konstant gehalten werden. Ein gesunder Proband wurde nach einer Dunkeladaptationszeit von 30min durch Stimulation mit einer Intensität von 0,012 skot cd*s/m² und einer Pulszeit von 10ms mit einem 9Hz-Blauflicker stimuliert. Diese Messung stellte den Ausgangswert für die b-Wellenamplitude der Stäbchenantwort dar [Abbildung 4.15 (rote Kurve)]. Danach erfolgte das Bleichen der Stäbchen durch einen sehr hellen Hintergrund von 500 phot cd/m² für 5 Minuten. Im Anschluss wurde der Proband im Dunkeln erneut durch Anwendung des 9Hz-Blauflickers mit 0,012 skot cd*s/m² und 10ms Pulszeit stimuliert. Diese Stimulation wurde im 1Minuten-Takt 30 Mal wiederholt, bis die Dunkeladaptation wieder hergestellt wurde [Abbildung 4.15 (blaue Kurven)].

Messung Proband 4 (16.06.2007):

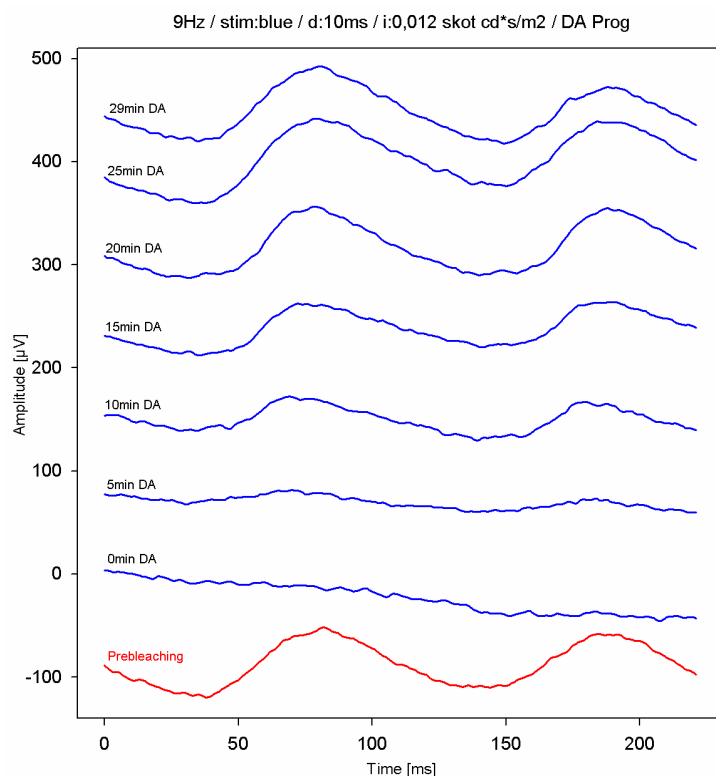


Abbildung 4.15: ERG Kurven der 9Hz-Blauflickerstimulation nach 30 Minuten Dunkeladaptation (rote Kurve „Prebleaching“ = vor der Bleichung) und nach einer Bleichung der Stäbchen mit 500 cd/m² (blaue Kurven). Sofort nach dem Bleichen wurde die Messung bei „0min DA“ abgeleitet und in einem 1minütigen Zyklus für 30 Minuten in Dunkeladaptation wiederholt. Ergebnisse wurden in 5 Minuten Schritten dargestellt. Konstante Einstellungen mit einer Pulszeit von 10ms und einer Intensität von 0,012 skot cd*s/m². { Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:0,15-300Hz; Mittelung von 20 Einzelantworten}

Der Vergleich des ERG vor dem Bleichen mit der ERG Ableitung bei 20 bis 30 Minuten nach dem Bleichen erlaubt eine Beurteilung des Einflusses der Stimulation auf die Dunkeladaptation. Die Kinetik der b-Wellenamplituden [Abbildung 4.16] ermöglicht den Rückschluss, dass vorwiegend das Stäbchensystem durch die 9Hz-Blauflicker Stimulation gereizt wurde [Schwarz 1943].

Die b-Wellenamplituden der ERG-Messungen wurden gegen die Zeit nach dem Bleichen der Stäbchen aufgetragen [Abbildung 4.16]. Es ist klar zu erkennen, dass die 9Hz Antwort nach dem Bleichen nahezu vollständig verschwindet (0-Minuten Wert in der Abbildung 4.16). Am Ende der Wiederherstellung der Dunkeladaptation (30min) wird wieder ein stabiles Plateau erreicht, mit Amplituden, die der Antwort vor dem Bleichen (großer Blauer Punkt in Abbildung 4.16) entsprechen. Die Kinetik der b-Wellenamplitude bei 9Hz lässt eine zeitabhängige Wiederherstellung der Dunkeladaptation erkennen. Daraus resultiert, dass der 9Hz-Blauflicker mit der verwendeten Intensität von 0,012 skot $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ selbst bei einer Mittelung von 20 Einzelmessungen pro Messung und einer 1minütigen Wiederholung keinen Einfluss auf die Dunkeladaptation hat.

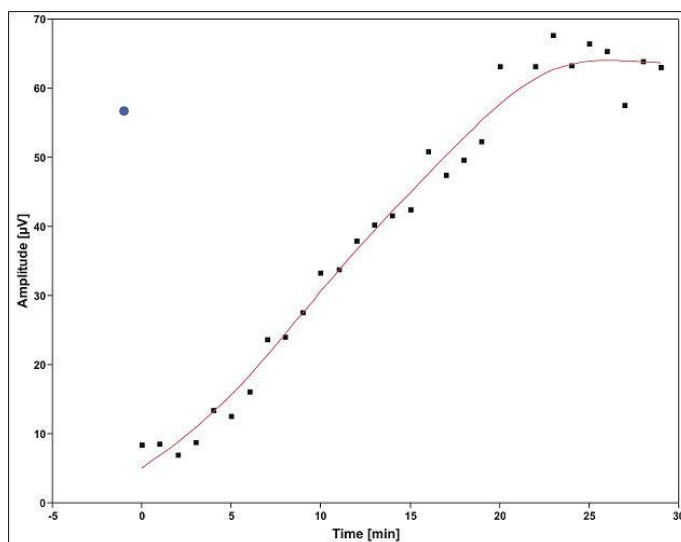


Abbildung 4.16: Die Punkte im Diagramm entsprechen den b-Wellenamplituden des 9Hz-Flickers. Der blaue Kreis stellt die Messung nach einer Dunkeladaptation von 30 Minuten dar, wobei die Messung vor der Bleichung erfolgte. Die schwarzen Rechtecke sind ERG Messungen nach dem Bleichen. Es wurden jeweils 20 Einzelantworten gemittelt. Zur Stimulation s.o.. Die rote Linie stellt einen Fit durch alle Messwerte nach dem Bleichen dar.

4.1.2. Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie skotopisches ERG)

In einer anfänglichen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das linke Auge in den Hauptstudien stets bei allen Messungen eine höhere Amplitude erzielte als das rechte Auge. Der Unterschied zwischen beiden Augen war je nach Stimulation unterschiedlich groß. Ein Modell wurde zum Zweck der Darstellung der Abhängigkeit des linken und des rechten Auges erstellt. Das folgende Diagramm der rein skotopischen Pulszeitserie soll beispielhaft die Abhängigkeiten aufzeigen [Abbildung 4.17].

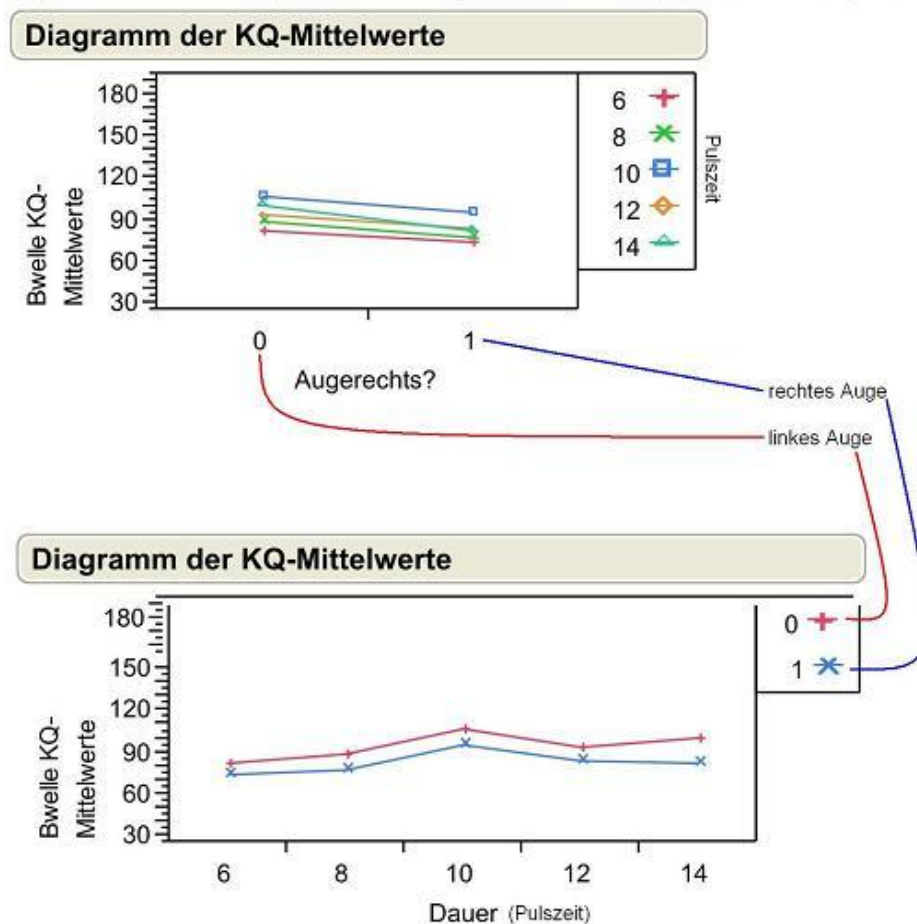


Abbildung 4.17: KQ-Mittelwerte (Mittelwerte der kleinsten Quadrate) des Vergleichs zwischen beiden Augen. Die untere Abbildung zeigt, dass die Amplituden für alle Pulszeiten („Dauer“) im rechten Auge (blau) niedriger sind als im linken Auge (rot). Der Unterschied zwischen dem rechten und dem linken Auge ist für die jeweilige Pulszeit unterschiedlich (Abbildung oben).

Um den Effekt der unterschiedlichen Augenergebnisse in der Auswertung der

Hauptstudie auszuschließen, wurden in der Auswertung der Daten die Mittelwerte aus beiden Augenergebnissen für alle ERG-Messungen gebildet. Dadurch wurde ein Einfluss auf die Analyse der optimalen ERG-Antwort durch unterschiedliche Augenergebnisse umgangen. Weiterhin ermöglicht die Bildung von Mittelwerten die Auswertung von einer Kennlinie für jeden Probanden.

Die Einstellungen der Stimulationsprotokolle in der Hauptstudie berücksichtigten wesentliche Erkenntnisse aus der Vorstudie. Dadurch konnten die Einstellungen der einzelnen vorhergehenden ERG Untersuchungen optimiert werden. Für die Optimierung des skotopischen ERGs wurde eine 9Hz-Blauflicker Stimulation angewendet. Die genaue Definition der Pulszeit und der Stimulationsintensität erfolgte an 16 Probandenmessungen (32 Augen), deren Ergebnisse statistisch aufgearbeitet wurden.

4.1.2.a. Hauptstudie Pulszeit:

Es wird zunächst das Vorgehen bei der Auswahl einer optimalen b-Wellenamplitude in der Hauptstudie am Beispiel der skotopischen Pulszeitenuntersuchung erläutert. Die Pulszeit wurde durch Serien mit gleichbleibender Intensität von $0,012 \text{ skot cd} \cdot \text{s/m}^2$ und variierenden Pulszeiten von 6 bis 14ms definiert. Die Einstellungen der ERG Ableitung blieben für alle Einzelableitungen (Messungen) konstant und werden im Appendix aufgeführt [Tabelle 7.6].

Es wurden beide Augen jedes Probanden gemessen. Bei 16 Probanden sind es dementsprechend 32 b-Wellenamplituden für jede Stimulationseinstellung [Abbildung 4.18]. In der Tabelle sind die jeweiligen Mittelwerte, Standardabweichungen und Quantilen dargestellt. Zu beachten ist, dass diese Zahlen für alle Probandenergebnisse gelten. Aus der Darstellung resultiert, dass der höchste Mittelwert der b-Wellenamplitude ($99,94 \mu\text{V}$) aus allen Probandenergebnissen bei 10ms liegt.

Daraus ist jedoch nicht ersichtlich, ob nur ein Proband eine ausgesprochen hohe b-Wellenamplitude bei dieser Pulszeit hatte, oder mehrere Probanden hier eine deutlich höhere b-Wellenamplitude im intraindividuellen Verlauf aufwiesen.

[25.01.2011]

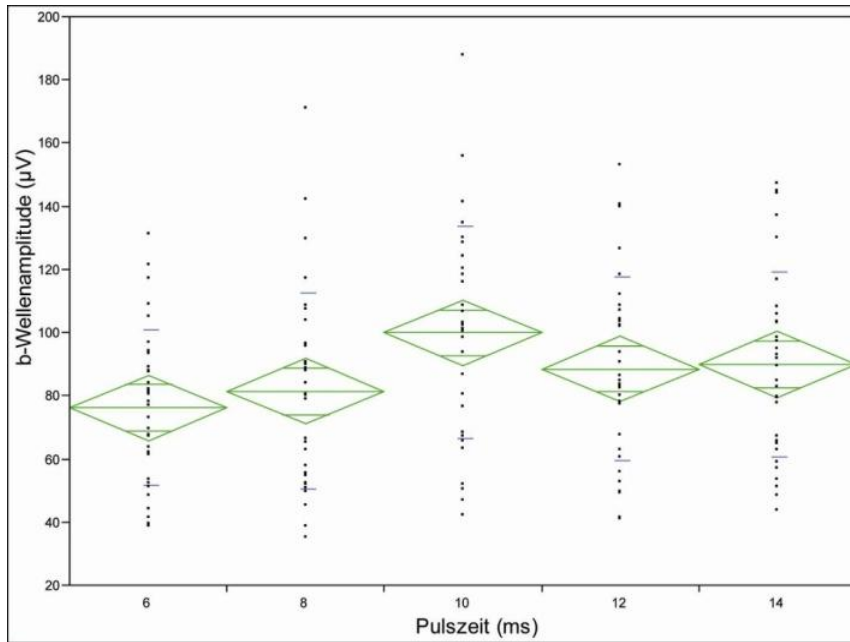


Abbildung 4.18: Im Schaubild sind die b-Wellenamplituden aller Probandenmessungen dargestellt. Die Pulszeit ist gegen die b-Wellenamplitude (μV) aufgetragen. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {y-Achse=b-Wellenamplitude in μV ; x-Achse=Pulszeit in ms; Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

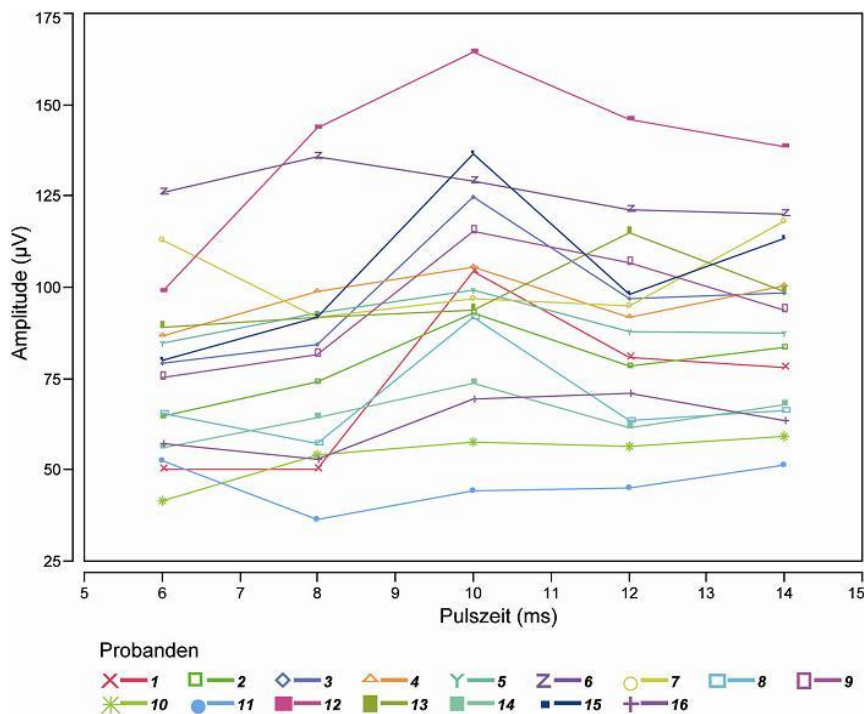


Abbildung 4.19: Kennlinien der gemittelten b-Wellenamplituden für jeden Probanden dargestellt. Gemittelt wurden die Ergebnisse beider Augenmessungen für die jeweilige Pulszeit (ms). Die Nummerierung der farbigen Kodierung in der Legende des Schaubilds entspricht den Probandennummern (1 bis 16). {y-Achse=Mittelwerte der b-Wellenamplitude beider Augen in μV ; x-Achse=Pulszeit in ms}

[25.01.2011]

Die Auswertung der optimalen Stimulationseinstellung sollte für jeden Probanden einzeln erfolgen, da jeder Proband seine individuelle Kennlinie aufweist. Aus diesem Grund wurden zunächst Mittelwerte beider Augenergebnisse eines Probanden gebildet, und deren Kennlinien dargestellt [Abbildung 4.19]. Die Kennlinien verdeutlichen den Verlauf der b-Wellenamplituden eines Probanden und ermöglichen dadurch eine bessere Beurteilung der optimalen Stimulationseinstellungen. Im nächsten Schritt wurde für den jeweiligen Probanden der maximale Mittelwert in der Kennlinie abgelesen und die zugehörige Pulszeit, bei der dieser maximale Mittelwert aus beiden Augen abgeleitet wurde, in einem Verteilungsdiagramm zusammengefasst dargestellt [Abbildung 4.20].

Nun ist deutlich zu identifizieren, wie oft eine bestimmte Pulszeit den maximalen Mittelwert bei der Messung von 16 Probanden erreichte. Die Prozentzahlen verdeutlichen die Wahrscheinlichkeit, dass die jeweilige Pulszeit bei einer weiteren Untersuchung den maximalen Mittelwert aufweist. Die Pulszeit von 10ms erreicht in 62,5 Prozent der Messungen, was 10 Probandenmessungen von insgesamt 16 Probanden entspricht, eine maximale b-Wellenamplitude und wird deshalb als optimal betrachtet.

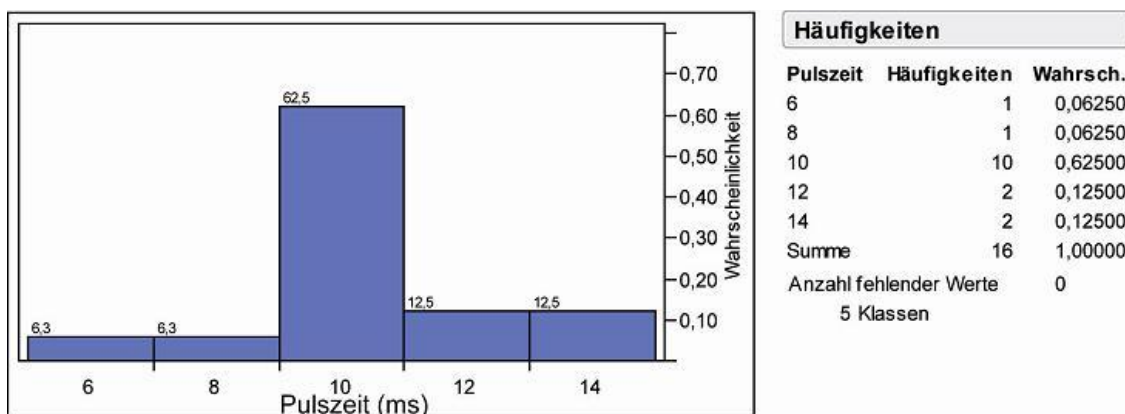


Abbildung 4.20: Aus den Kennlinien von Abbildung 38 wurde für jeden Probanden die maximalste mittlere b-Wellenamplitude abgelesen und der zugehörigen Pulszeit zugeordnet. Die Häufigkeitsverteilung der maximalen Amplituden bei verschiedenen Pulszeiten ist hier aufgezeigt. Das linke Diagramm dient als Veranschaulichung der Ergebnisse. Die Zahlen unter der Spalte „Pulszeit“ entsprechen den Pulszeiten in ms. {y-Achse=Wahrscheinlichkeiten der Verteilung; x-Achse=Pulszeiten in ms}

4.1.2.b. Hauptstudie Stimulationsintensität:

Durch variierende Intensitäten von 0,002512 (log -2,6) bis 0,0398 (log -1,4) skot cd*s/m² soll die optimale Intensität, die eine maximale b-Wellenamplitude auslöst, ausgewählt werden. Es wird eine Pulszeit von 10ms verwendet. Die Einstellungen der ERG Ableitungen blieben für alle Messungen konstant und werden in Tabelle 7.6 erläutert. Der maximale Mittelwert [Abbildung 7.1] von 97,56µV aus allen Probandenmessungen liegt bei 0,012 skot cd*s/m². Der zweithöchste Mittelwert von 85,92µV weist eine um ca. 12µV kleinere b-Wellenamplitude bei 0,02 skot cd*s/m² auf.

Die Kennlinien der Mittelwerte aus beiden Augen zeigen, dass bei vielen Probandenmessungen ein Höhepunkt bei 0,012 skot cd*s/m² erreicht wird [Abbildung 7.2]. Es werden jedoch auch Probandenmessungen registriert, die einen annähernd linearen Anstieg der Mittelwerte zeigen (Proband 7). Das heißt, dass für diese Probanden die aktuelle Intensitätsspanne nicht ausreichend war, um ein deutliches Maximum abgrenzen zu können. Als höchster Mittelwert wird deshalb bei diesen Probandenmessungen der maximalste Wert aus der Kennlinie bei der höchsten angewandten Intensität (0,04 skot cd*s/m²) für die Auswertung herangezogen.

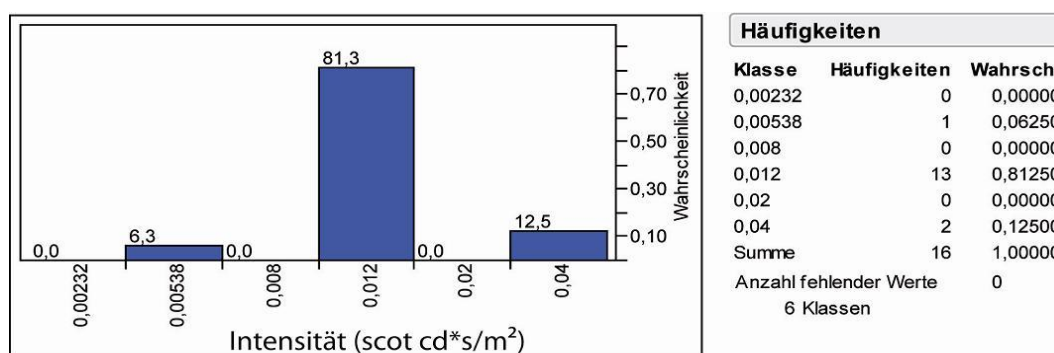


Abbildung 4.21: Häufigkeitsverteilung der maximalen Amplituden bei verschiedenen Intensitäten. Das linke Diagramm dient als Veranschaulichung der Ergebnisse. Rechts sind in der Tabelle die Ergebnisse mit der prozentualen Wahrscheinlichkeit abgebildet. Die Zahlen unter der Spalte „Klasse“ entsprechen den Intensitäten in skot cd*s/m². Die Häufigkeiten deuten auf die Anzahl der Probanden hin, bei denen die entsprechende Intensität eine maximale b-Wellenamplitude ergab. (y-Achse=Wahrscheinlichkeiten der Verteilung; x-Achse=Intensität in skot cd*s/m²)

Aus der Verteilung der maximalen Mittelwerte resultieren immerhin zwei Probandenmessungen, die bei der Intensität von 0,04 skot cd*s/m² die höchsten b-Wellenamplituden hatten [Abbildung 4.21]. Bei 81,3 Prozent der

[25.01.2011]

Probandenmessungen, entspricht 13 Probanden, wird jedoch eine maximale b-Wellenamplitude bei 0,012 skot cd*s/m² erreicht. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 81,3 Prozent wird jede weitere Probandenmessung ein Maximum der b-Wellenamplitude bei einer Intensität von 0,012 skot cd*s/m² haben. Aus diesem Grund wird die Intensität von 0,012 skot cd*s/m² als optimal betrachtet.

4.2. Kombiniertes Stäbchen- und Zapfen-ERG

4.2.1. Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)

4.2.1.a. Exploration Frequenz

Das kombinierte Stäbchen- und Zapfen-ERG soll ebenfalls unter Konditionen gemessen werden, die die Dunkeladaptation gewährleisten. Da hierbei der Einfluss der Zapfen erwünscht ist und die Messung am Ende der skotopischen Untersuchung erfolgt, ist eine vollständige Dunkeladaptation nach der ERG Untersuchung nicht erforderlich.

Die Vorteile der repetitiven Stimulation sollten in der ERG Messung der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort ebenfalls ausgenutzt werden. Die Frequenz sollte für eine optimale Stimulation der Stäbchen nicht größer als 15Hz sein [Dodt 1951]. Ein möglichst hoher Anteil an Zapfenantwort sollte dennoch ermöglicht werden. Zusätzlich sollte als dritte Bedingung eine möglichst hohe a- und b-Welle messbar sein. Die ersten Untersuchungen mit einem 9Hz Flicker zeigten sehr gute Ergebnisse. Die Eigenschaften des kombinierten ERG können durch die 9Hz Flickerstimulation realisiert werden. Durch eine schnellere Flickerfrequenz, wie 15Hz zum Beispiel, kann die a-Welle nicht mehr separat von der b-Welle dargestellt werden [Scholl, Langrova *et al.* 2001a, Scholl, Langrova *et al.* 2001b]. Die charakteristische a-Welle wird bei einer 9Hz Flickerstimulation separat von der b-Welle aufgezeichnet. Die Vorteile der repetitiven Stimulation und der Mittelungen werden durch den 9Hz Flicker in der kombinierten Stäbchen- und Zapfenmessung wie in der rein skotopischen ERG Untersuchung erfüllt.

4.2.1.b. Exploration spektrale Sensitivität

Die Stimulation der Stäbchen in Kombination mit den Zapfen erfordert eine besondere chromatische Einstellung des Stimulus. Eine einzelne LED besitzt einen spektralen Wirksamkeitsbereich in einem relativ eingeschränkten Farbbereich. Die blaue LED hat eine maximale spektrale Wirksamkeit von

470nm, die grüne LED von 511nm, die orange LED von 596nm und die rote LED von 635nm [Abbildung 4.22]. Zwar kann eine einzelne LED dazu verwendet werden die Stäbchen und die Zapfen zu stimulieren, jedoch ist der Anteil der beteiligten Photorezeptorensysteme nicht identisch. Bei Anwendung der blauen LED, zum Beispiel, werden die Stäbchen durch Ihre spektrale Sensitivität in einem viel größeren Maß stimuliert als die Zapfen. Die grüne LED mit 511nm liegt zwischen der maximalen spektralen Sensitivität der Stäbchen mit 500nm und der Zapfen mit 550nm [Abbildung 4.22].

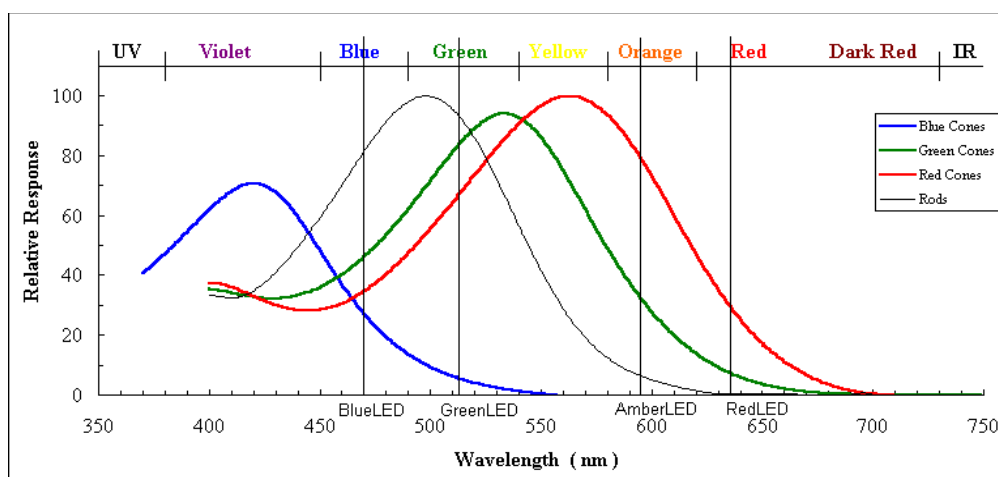


Abbildung 4.22: Modifizierter Auszug aus der Darstellung zur Antwort der Zapfen und Stäbchen auf unterschiedliche Wellenlängen der Universität von New Mexico [UniversityOfNewMexico Homepage]. Die schwarzen Linien im Diagramm stellen die Wellenlängen der verwendeten LEDs (z.B. „BlueLED“) dar. Die farbigen Kurven (Blau, Grün, Rot) kennzeichnen die Antwort der Photorezeptoren auf unterschiedliche Wellenlängen („Blue Cones, Green Cones, Red Cones“). Die schwarze Kurve kennzeichnet die spektrale Wirksamkeit auf die Stäbchen („Rods“). Es wurde die spektrale Wirksamkeit der Wellenlängen (nm) gegen die relative Antwort (normiert auf 100% des jeweiligen Rezeptors) aufgetragen. Die Stäbchenkurve („Rods“) entspricht nicht der Skalierung. Stäbchen reagieren mit einer sehr viel höheren Antwort auf Licht als Zapfen. Die Stäbchen-Kurve dient nur dem spektralen Vergleich zwischen Stäbchen und Zapfen.

Aus diesem Grund wurde die grüne LED für die Stimulationen in der Vorstudie verwendet. Es wurde ein Vergleich mit der Mischfarbe Weiss 6500K durchgeführt. Sie wird durch die Mischung aller LEDs (Grün, Blau, Rot) generiert und ist durch die Koordinaten $X=0,2633$ und $Y=0,2649$ in dem CIE Koordinatensystem definiert. Die Farbe Weiss 6500K hat somit einen breiten spektralen Wirksamkeitsbereich. Für die Messung der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort ist ein breites spektrales Wirksamkeitsfeld optimal, da hierbei die Stäbchen und Zapfen zu beinahe identischen Anteilen stimuliert werden können. Eine Hintergrundbeleuchtung würde bei der

Kombinationsantwort im ERG die Stäbchen sättigen, was für die Messung nicht sinnvoll wäre. Aus diesem Grund wird die Hintergrundbeleuchtung deaktiviert.

4.2.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen

Bei der Auswahl der optimalen kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort sollte nicht nur die Einstellung mit der maximalen b-Wellenamplitude ausgewählt werden, sondern auch ein ausgewogenes b/a-Wellenverhältnis sichergestellt werden. Das heißt ein b/a-Verhältnis von 2/1 wird als wünschenswert definiert. Gemäß der Definition wird die b-Welle durch den Abstand vom Tiefpunkt der a-Welle bis zum Höhepunkt der b-Welle beschrieben. Durch eine sehr tiefe a-Welle kann demnach eine große Amplitude erreicht werden, obwohl die b-Welle von der Nulllinie gemessen nur minimal ist [Abbildung 4.23].

In der aktuellen Studie wird die Ableitung der größeren b-Welle, gemessen von der 0-Linie, bevorzugt. In speziellen Fragestellungen bei der Untersuchung von Patienten mit degenerativ veränderter Netzhaut ist eine deutliche Identifizierung der b-Welle sehr wichtig (z.B. bei Patienten mit kongenitaler stationärer Nachtblindheit), da hierbei eine Reduktion der b-Welle bei normwertiger a-Welle vorliegt. Diese Identifizierung wird in der Ableitung mit der von der 0-Linie gemessenen, größeren b-Welle, einfacher.

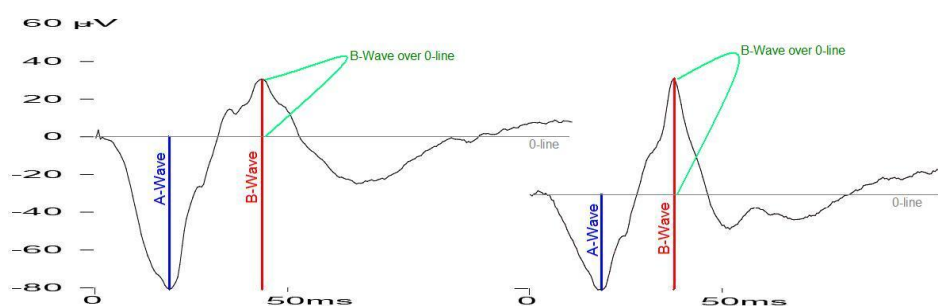


Abbildung 4.23: 9Hz Stimulation mit unterschiedlichen Intensitäten (links 10 x höher als rechts) und Darstellung der unterschiedlichen a/b-Verhältnisse bei gleicher b-Wellenamplitude. Vergleich der Wellen („a-Wave“ und „b-Wave“) der beiden Messungen. Die grüne Kennzeichnung („b-Wave over 0-line“) verdeutlicht den Unterschied zwischen beiden Messungen.

[25.01.2011]

Die Pulszeit und die Stimulationsintensität werden anhand von Messungen in der Vorstudie und der Hauptstudie genauer untersucht. Zunächst wird in der Vorstudie ein im Hinblick auf eine maximale b-Wellenamplitude geeigneter Intensitäts- und Pulszeit-Bereich ausgewählt, der in der Hauptstudie genauer definiert wird. Dabei werden die explorierten Rahmenbedingungen befolgt.

4.2.1.d. Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität:

Die Auswahl einer geeigneten Stimulationsintensität basierte auf den vorhergehenden Messungen der skotopischen 9Hz Flicker Intensitätsserien. Der Einfluss der Zapfen auf skotopische ERG-Messungen wurde in höheren Intensitätsbereichen während der Optimierung des Stäbchen-ERGs bereits nachgewiesen [Abbildung 4.24+Abbildung 4.25]. Aus den Ergebnissen der 9Hz Blau- und Grünflicker Messungen lässt sich eine Intensitätsspanne für die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort abschätzen.

Messung Proband 5 (06.10.2006)

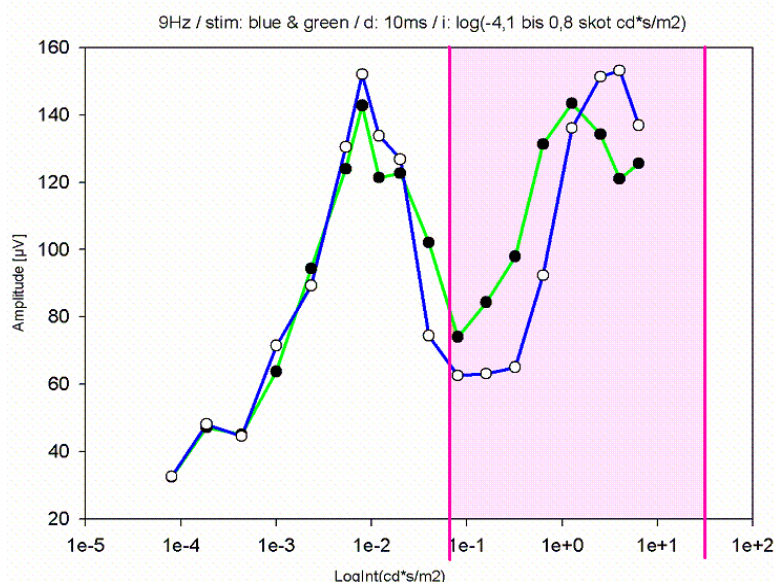


Abbildung 4.24: B-Wellenamplitude der 9Hz Blau- (blaue Kurve) und Grünflickerstimulation (grüne Kurve) gegen die Intensität aufgetragen. Stimulation mit fester Pulszeit von 10ms und ansteigenden Intensitäten von Log(-4,1) bis Log(0,8) skot cd*s/m². Die Intensitätsspanne der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort wurde rosa markiert. (x-Achse= log skot cd*s/m², y-Achse= Amplitude in µV). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelung von 20-50 Einzelantworten}

Messung Proband 6 (06.10.2006)

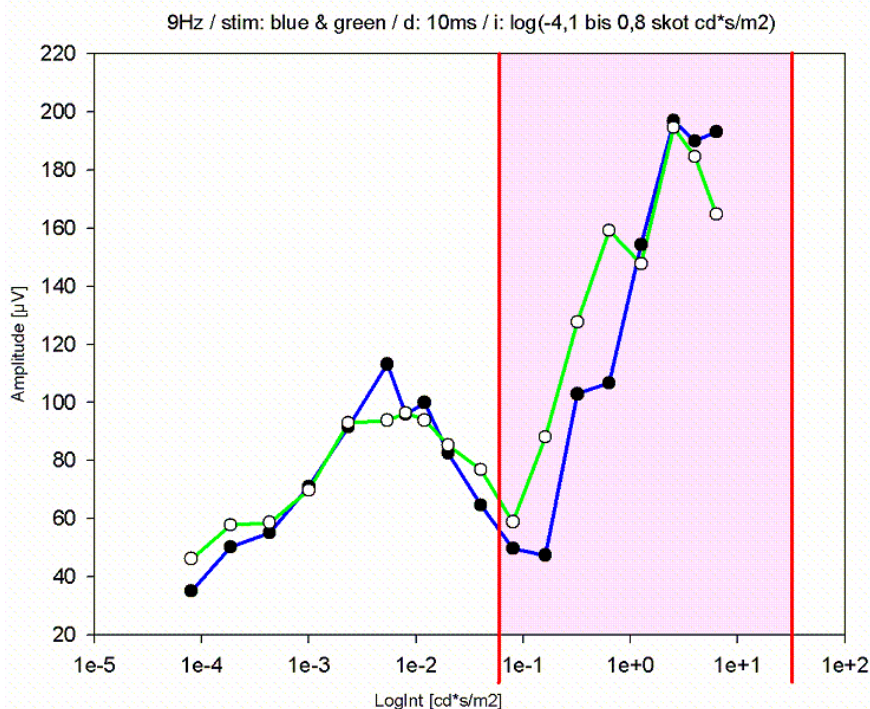


Abbildung 4.25: Stimulation und Definition s.o. (Abbildung). Messung eines weiteren Probanden. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelung von 25-50 Einzelantworten}

Die Intensitätsbereiche, die für die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort von Bedeutung sind, wurden durch die Markierungen in den Probandenmessungen hervorgehoben. Die Frequenzanalyse der beiden Probandenmessungen zeigt in dem ausgewählten Intensitätsbereich einen hohen Anteil an 18Hz- und 27Hz-Komponenten unter einer 9Hz-Stimulation, was für den vorhandenen Zapfenanteil an der ERG-Antwort spricht [Abbildung 4.26].

Zu beachten ist jedoch, dass bei den vorliegenden Messungen mit der blauen und grünen LED stimuliert wurde, und für eine kombinierte Maximalantwort eine Stimulation mit der Mischung aller LEDs (Grün, Blau, Rot) erfolgen soll. Zusätzlich wurden die Messungen mit skotopischen $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ durchgeführt. Für die kombinierte Stäbchen und Zapfenantwort wird die Anwendung von photopischen Einheiten bevorzugt, da die photopische Adjustierung der Intensitäten benötigt wird. Durch diese Tatsachen wird eine Verschiebung der Intensitätsspanne erwartet.

[25.01.2011]

Frequenzanalyse Proband 6 (06.10.2006)

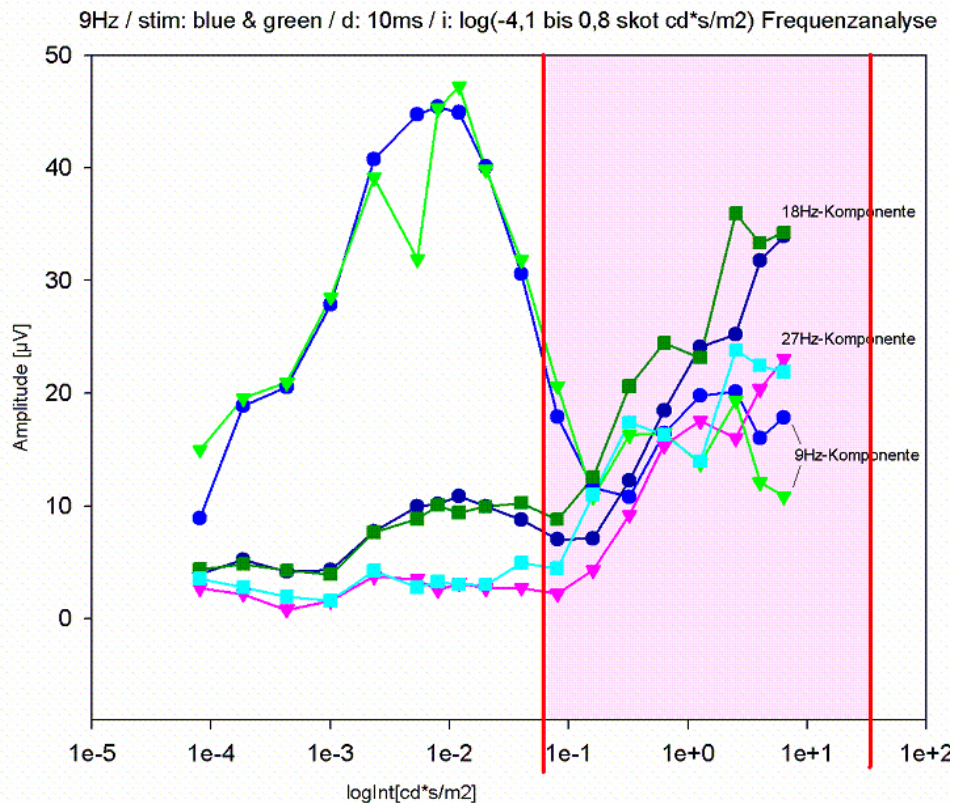


Abbildung 4.26: Ergebnisse der Amplituden aus der Frequenzanalyse bei 9Hz-Stimulation mit unterschiedlichen Intensitäten. Anteil einzelner Frequenzen (9Hz, 18Hz, 27Hz) am ERG durch die Stimulation mit der grünen und blauen LED. 9Hz-Komponente des grünen Stimulationslichts (grüne Dreiecke) und des blauen Stimulationslichts (blaue Kreise) werden ab dem ersten Maximum stetig kleiner. Bei stärkeren Intensitäten steigen die 18Hz- (grüne Quadrate und dunkelblaue Kreise) bzw. 27Hz-Anteile (türkise Quadrate für grüne LED und rosa Dreiecke für blaue LED) bis zur Dominanz, was ein deutlicher Hinweis auf eine Zapfenbeteiligung ist.

4.2.1.e. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:

Einen ersten Hinweis auf die optimale Pulszeit lieferten zwei Messungen an einem Probanden, die durch die Stimulation mit 0,16 skot cd*s/m² mit einem 9Hz-Grünflicker und in einer weiteren Messung mit 0,24 skot cd*s/m² mit einem 9Hz-Weißflicker mit verschiedenen Pulszeiten abgeleitet wurden [Abbildung 4.27].

Messung Proband 4 (03.02.2007)

[25.01.2011]

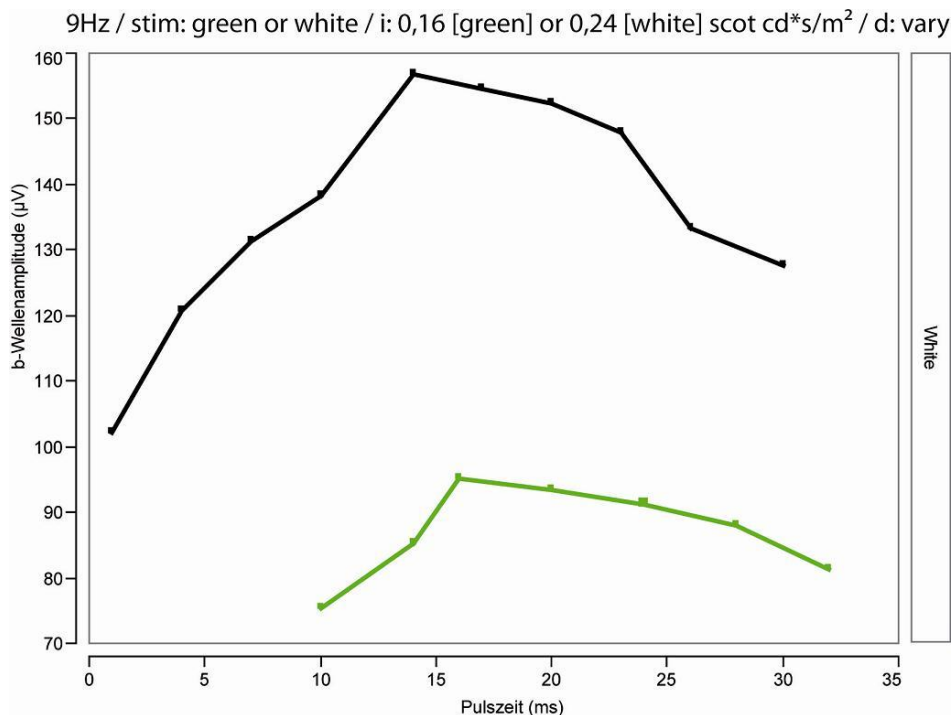


Abbildung 4.27: B-Wellenamplituden einer 9Hz-Flickerstimulation mit weißem (schwarze Kurve) und grünem (grüne Kurve) Stimulationslicht bei Anwendung von verschiedenen (x-Achse= Pulszeit in ms; y-Achse= Amplitude in µV). Zu beachten ist die unterschiedliche Intensität von 0,16 für den Grünflicker und 0,24 skotopischen cd*s/m² für den Weißflicker. {Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 20-30 Einzelantworten}

Es zeigte sich eine maximale b-Welle bei einer Pulszeit von 16ms bei Anwendung des grünen Flickerlichts. Die zweite Messung mit dem weißen Flickerlicht und einer höheren Intensität (0,24 skot cd*s/m²) ergab eine maximale b-Wellenamplitude bei einer Pulszeit von 14ms [Abbildung 4.27]. Durch beide Probandenmessungen wurde ein erster Hinweis auf eine optimale Pulszeit zwischen 14ms und 16ms gewonnen. Zu beachten ist jedoch, dass beide Messungen bei unterschiedlichen Intensitäten abgeleitet wurden und deshalb die Amplitudenhöhe stark variiert.

4.2.1.f. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:

Die optimale Pulszeit bei der Ableitung des kombinierten Stäbchen- und Zapfen-ERGs wurde anhand von Messungen mit konstanter Intensität von 0,2 phot cd*s/m² und variierenden Pulszeiten von 1ms bis 20ms durchgeführt. Weitere Einstellungen blieben für alle ERG Ableitungen konstant. Ein weißes

[25.01.2011]

Mischlicht (Weiss6500K) wurde als Lichtstimulation gewählt. Es wurde zu jeder Pulszeit die zugehörige b-Wellenamplitude aufgezeichnet [Abbildung 4.28]. Die b-Wellenamplituden aus den Ergebnissen beider Augen wurden registriert und verglichen.

Messung Proband 14 (11.05.2007)

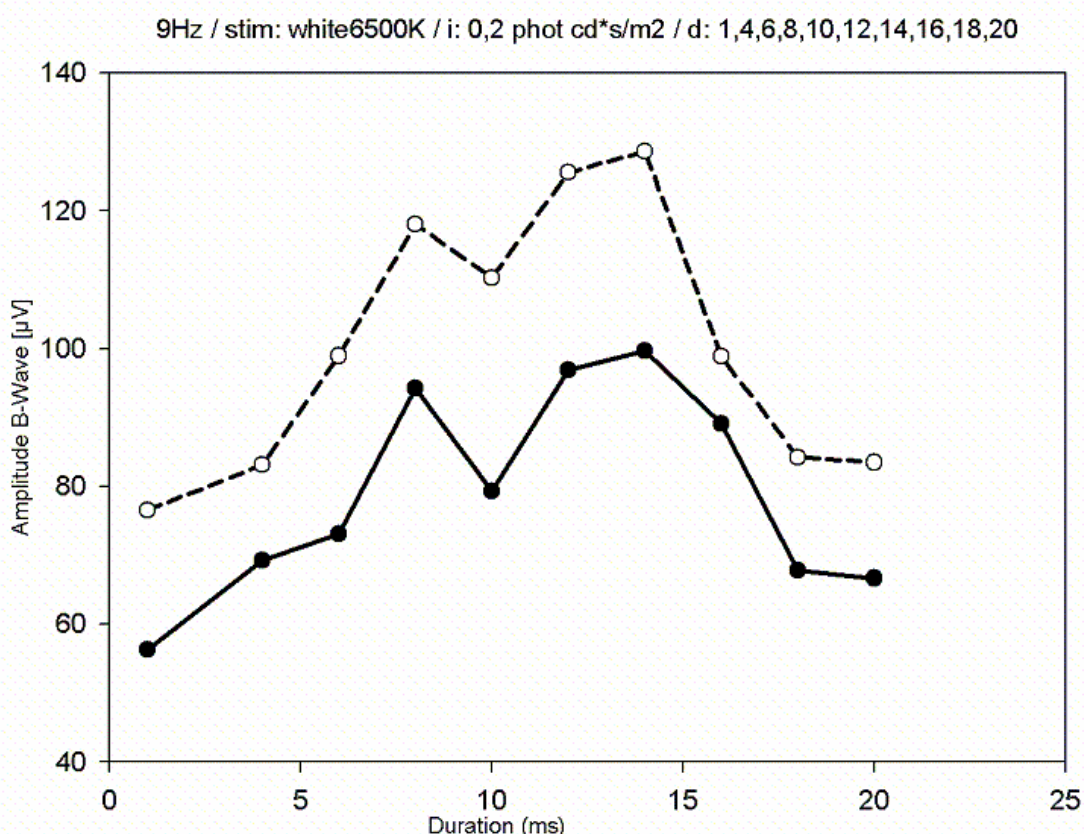


Abbildung 4.28: B-Wellenamplituden beider Augen (rechts Linie, links gestrichelt) unter 9Hz Weißstimulation bei Anwendung von verschiedenen Pulszeiten und fester Intensität von 0,2 skot cd*s/m² (x-Achse= Pulszeit in ms; y-Achse= Amplitude in µV). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 22-42 Einzelantworten}

Die maximalen b-Wellenamplituden von 128µV für das RA, 99µV für das LA, wurden bei der kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort bei einer Pulszeit von 14ms erreicht. Die Anwesenheit einer a-Welle von 42µV (RA), bzw. 34µV (LA), und der OPs zeigt die erwünschte Zapfenbeteiligung an der ERG Antwort. In der FFT wird die Zapfenbeteiligung durch das Ansteigen der Komponenten der höheren Harmonischen (18Hz, 27Hz und 36Hz) deutlich. Das Ergebnis einer

[25.01.2011]

optimalen Pulszeit von 14ms für die kombinierte Stäbchen und Zapfenantwort konnte an einem weiteren Probanden bei gleichen Einstellungen wie in der vorhergehenden Untersuchung gemessen werden [Abbildung 4.29].

Messung Proband 5 (05.09.2007)

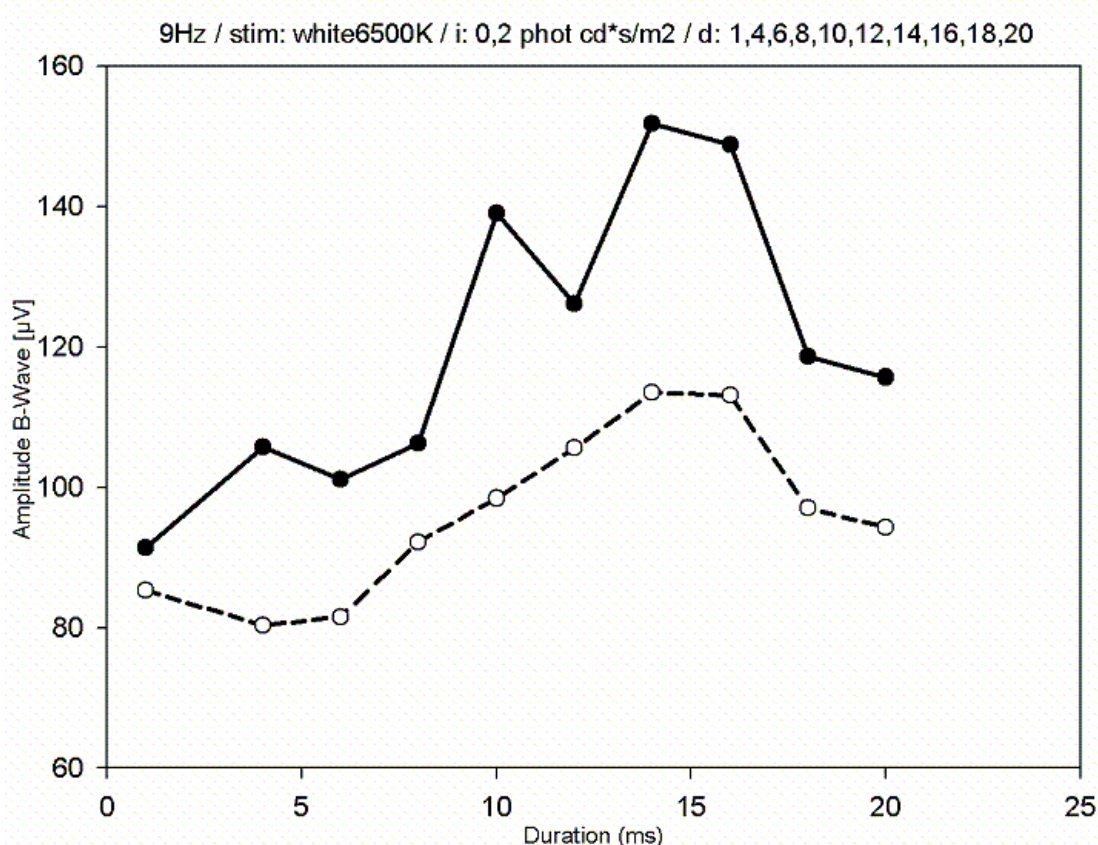


Abbildung 4.29: B-Wellenamplituden beider Augen (rechts Linie, links gestrichelt) unter 9Hz Weißstimulation bei Anwendung von verschiedenen Pulszeiten und fester Intensität von 0,2 skot cd*s/m² (x-Achse= Pulszeit in ms; y-Achse= Amplitude in µV). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter: aus; Mittelungen von 22-42 Einzelantworten}

4.2.1.g. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Stimulationsintensität:

Durch die Ergebnisse zur Auswahl der optimalen Pulszeit ließen sich nur minimale Unterschiede zwischen der grünen LED und dem weißen Mischlicht (6500K) in der Amplitude und der Kurvenform feststellen. Deshalb sollte in der Auswahl der optimalen Stimulationsintensität für die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort nochmals ein Vergleich zwischen den beiden Farben erfolgen. Es wurden Messungen mit Intensitäten von log -1,4 (0,04 phot cd*s/m²) bis log -

[25.01.2011]

0,42 (0,38 phot cd*s/m²) in log 0,02 Schritten bei konstanter Pulszeit von 10ms und sonst gleichbleibenden ERG Einstellungen abgeleitet. Jede Intensität wurde zunächst mit der grünen LED und in der nächsten Messung mit der Farbe Weiß (6500K) untersucht. Somit erlaubt die Messung zusätzlich zur Auswahl der optimalen Intensität auch einen direkten Vergleich zwischen den beiden Stimulationsfarben für die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort [Abbildung 4.30].

Messung Proband 5 (03.04.2007):

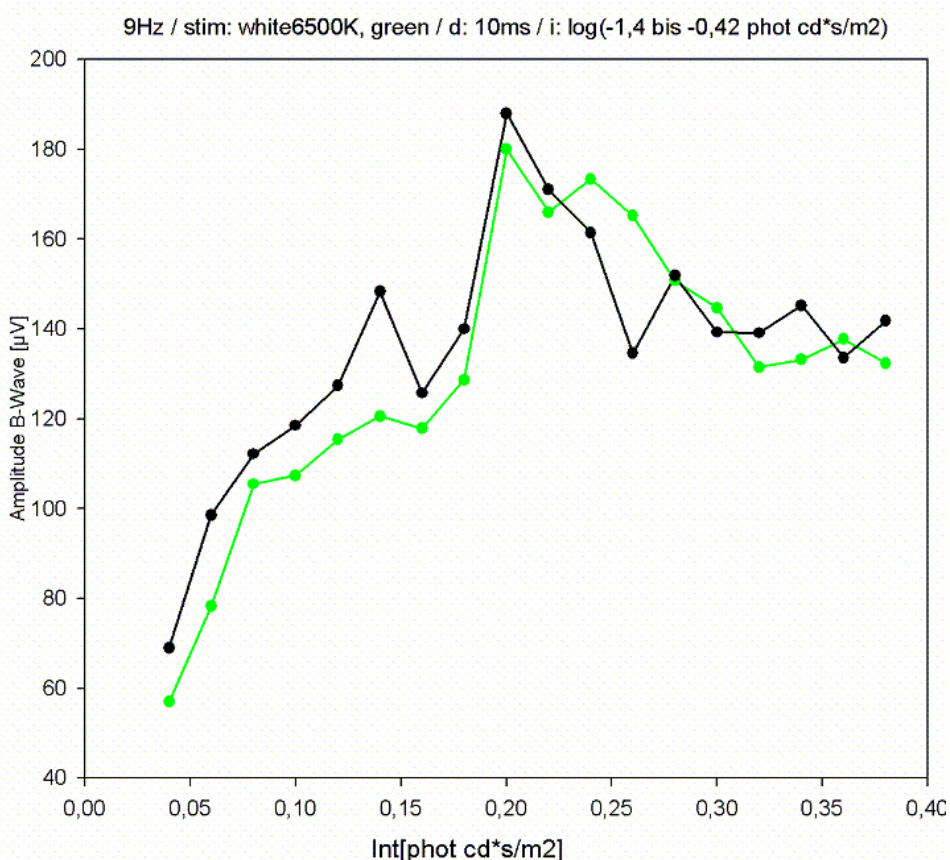


Abbildung 4.30: B-Wellenamplituden unter 9Hz Flickerstimulation mit konstanter Pulszeit von 10ms und variierenden Intensitäten von Log(-1,4) bis Log(-0,42) phot cd*s/m² im dunkeladaptierten Zustand und der Anwendung von grüner LED (grüne Linie) und weißem Mischlicht (schwarze Linie). {Abtastfrequenz: 1000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 30 Einzelantworten}

In der Darstellung der Amplitudenauswertung ist die maximale b-Welle bei 0,2 phot cd*s/m² sowohl bei der Anwendung von grünem Licht, als auch mit der Mischfarbe Weiß (6500K). Die Stimulation mit grünem Licht bei Intensitäten unterhalb des Maximums weist eine kleinere b-Wellenamplitude auf als die

[25.01.2011]

Stimulation mit Weiß 6500K. Im Bereich der maximalen b-Wellenamplitude kann jedoch mit dem weißen Mischlicht eine Amplitude von $188\mu\text{V}$ und mit der grünen LED von $180\mu\text{V}$ erlangt werden. Bei Intensitäten oberhalb dieses Maximums sind die Amplituden für beide Farben annähernd gleich. Die Auflistung der Einzelmessungen macht die Ähnlichkeit der Ableitungen deutlich [Abbildung 4.31].

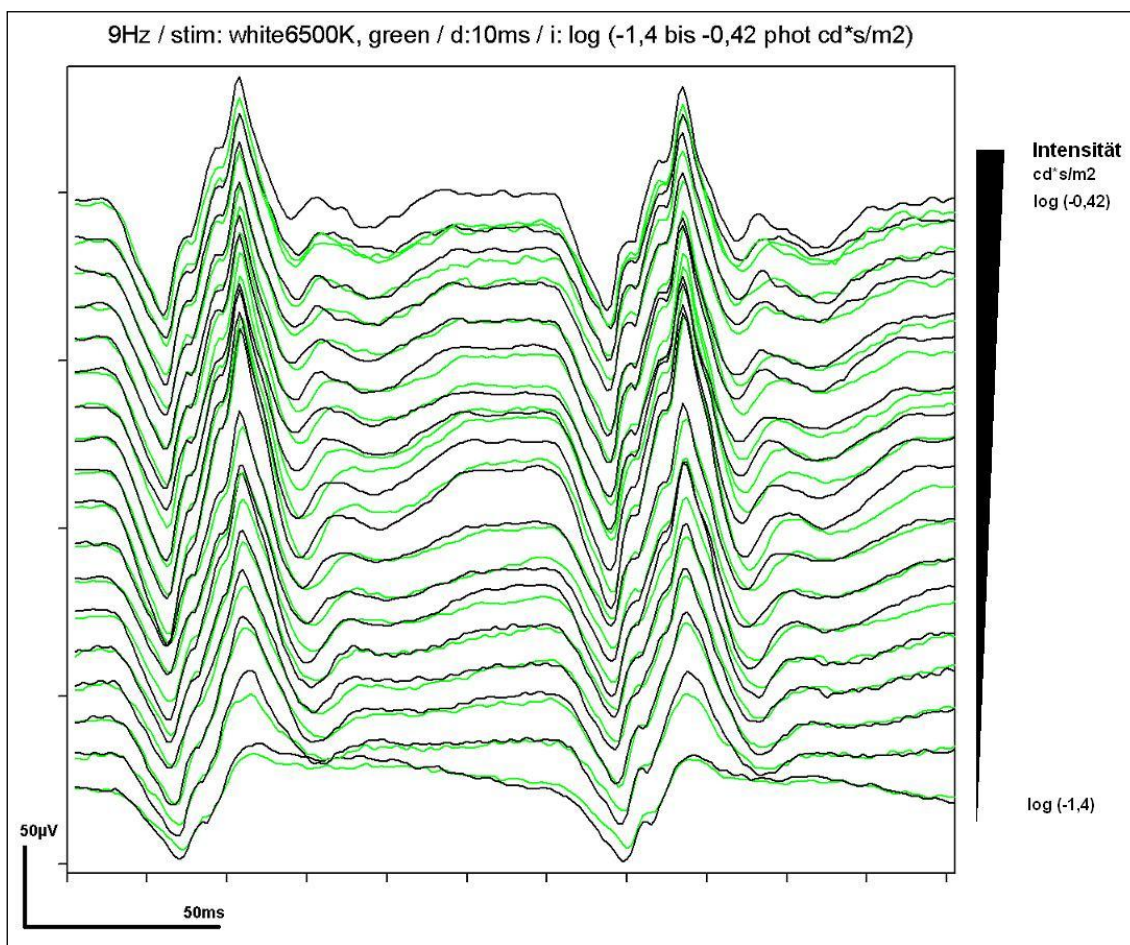


Abbildung 4.31: 9Hz-Stimulation mit grüner LED (grüne Linie) und weißem Mischlicht (schwarze Linie). Die Intensität steigt von unten nach oben schrittweise. {Definition s.o.}

Die Stimulation mit der grünen LED unterscheidet sich nur minimal in der Amplitude von den Ableitungen mit dem Mischlicht (6500K). In den Messungen mit geringer Intensität von $0,04 \text{ phot cd*s/m}^2$ zeigt sich nur eine sehr geringe und flache b-Welle. Die Auswertung dieser Kurve mit der FFT zeigt eine dominante 9Hz-Komponente, anders als die Auswertung der Kurve mit der

maximalen b-Wellenamplitude bei einer Intensität von 0,2 phot cd*s/m². Hierbei ist eine dominante 18Hz-Komponente in der FFT zu erkennen. Es wird eine größere 27Hz-Komponente unter Anwendung von 0,2 phot cd*s/m² im Vergleich zu 0,04 phot cd*s/m² aufgezeichnet [Abbildung 4.32+Abbildung 4.33].

Messung1 und 2 Messung Proband 5 (03.04.2007)

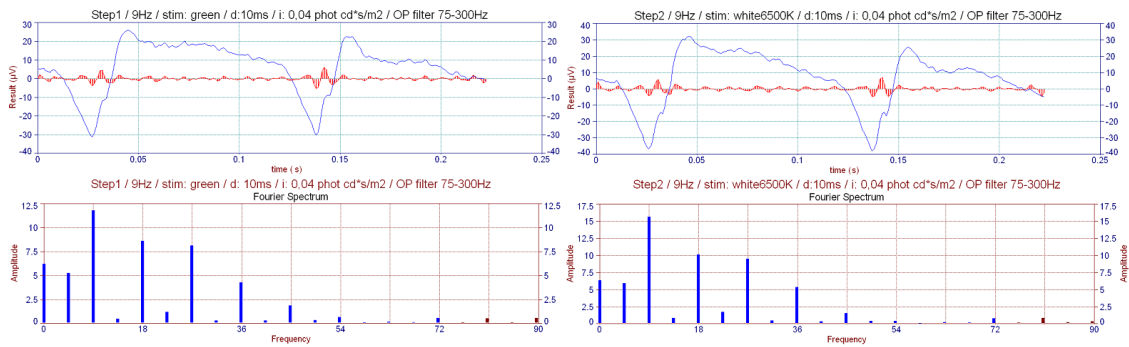


Abbildung 4.32: 9Hz Stimulation mit grüner LED (links) und weißem Mischlicht (rechts) unter Anwendung gleicher Pulszeit (10ms) und Intensität (0,04 phot cd*s/m²) mit offline Filterung der OPs (75-300Hz rote Kurve als AUC dargestellt). Unten sind die Auswertungen mit der FFT bis zu einer Frequenz von 90Hz dargestellt. (x-Achse oben= Zeit in s; y-Achse oben= Spannung in µV; x-Achse unten= Frequenzen; y-Achse unten= Amplitude in µV).

Messung17 und 18 Messung Proband 5 (03.04.2007)

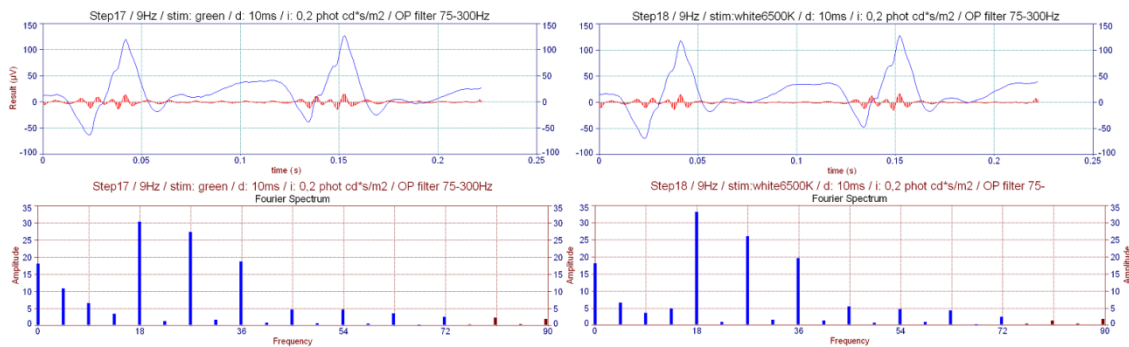


Abbildung 4.33: Zur Definition der Darstellung s.o.. Die Stimulationsintensität beträgt nun jedoch 0,2 phot cd*s/m².

In beiden Intensitätsstufen ist ein Unterschied zwischen dem grünen Stimulus und dem Stimulus mit dem Mischlicht zu ermitteln. In den Ableitungen mit einer Intensität von 0,04 phot cd*s/m² hat die Stimulation mit dem weißen Licht eine größere 9Hz-Komponente in der FFT (etwa 30% mehr) als die Stimulation mit der grünen LED zu verzeichnen. Die Ableitungen mit einer Intensität von 0,2 phot cd*s/m² zeigen ebenfalls in der 18Hz-Komponente mit weißem Stimulus

[25.01.2011]

einen geringfügig größeren Anteil an der Antwort (etwa 10% mehr) als mit dem grünen Stimulus. Aus diesen Gründen, und aus Gründen der größeren b-Wellenamplitude, wurde für die Hauptstudie das Mischlicht Weiß (6500K) verwendet.

Es wurde zusätzlich eine Serie mit höheren Intensitäten durchgeführt, um den Einfluss der dadurch steigenden Zapfenantwort auf die kombinierte ERG Ableitung zu verfolgen. Die Aufzeichnung der b-Wellen- und a-Wellenamplitude erfolgte für jede Stimulationsintensität. Die Pulszeit von 4ms blieb wie die übrigen Einstellungen der ERG Messung konstant. Die Intensität wurde schrittweise von 0,22 bis 2 phot cd*s/m² erhöht [Abbildung 4.34].

Messung Proband 5 (29.06.2007):

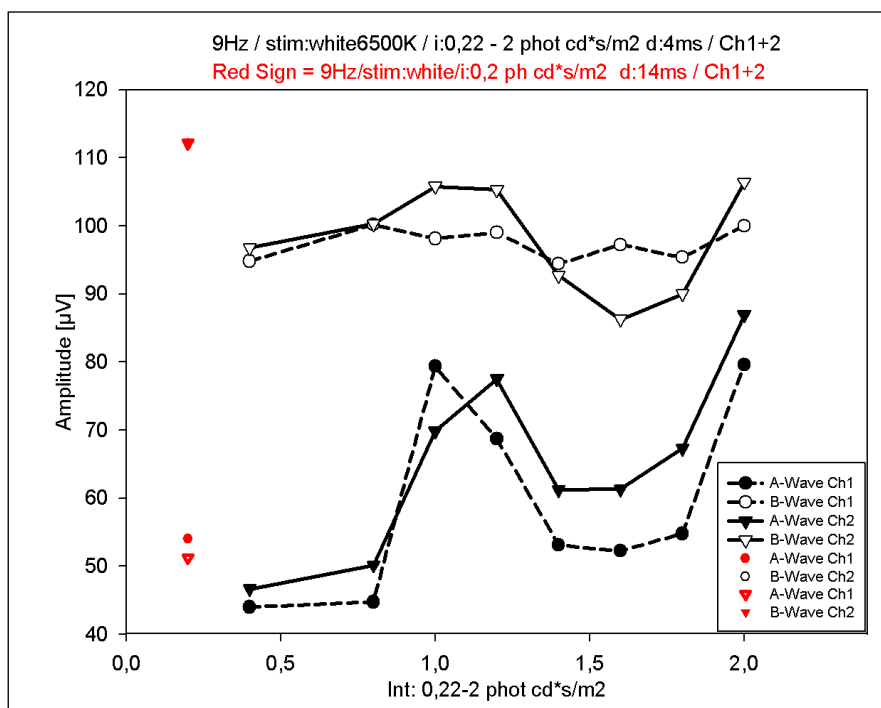


Abbildung 4.34: B-Wellen- und a-Wellenamplituden der 9Hz-Weißstimulation beider Augen (gestrichelt links, durchgezogen rechts) bei fester Pulszeit von 4ms und einer Intensitätsspanne von 0,22 bis 2 phot cd*s/m² (schwarze Linien). Die Messungen werden mit einer vorhergehenden Messung mit 0,2 phot cd*s/m² und einer Pulszeit von 14ms verglichen (rot). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 30 Einzelantworten}

Zum Vergleich wurde eine Einzelmessung mit den zuvor definierten Einstellungen für die maximale b-Wellenamplitude in der kombinierten

[25.01.2011]

Stäbchen- und Zapfenantwort angefügt. Die Intensität war hierbei $0,2 \text{ cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ mit einer Pulszeit von 14ms. Zur besseren Veranschaulichung ist das Ergebnis dieser Einzelmessung in dem Schaubild [Abbildung 4.34] rot gekennzeichnet.

Die maximale b-Welle ($106\mu\text{V}$) wurde in dieser Intensitätsserie bei $2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ festgestellt. Die a-Welle beträgt dabei $86\mu\text{V}$. Das entspricht einem Verhältnis (b/a) von 1,23. Bei der Vergleichsmessung mit $0,2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ [Abbildung 4.34 rote Punkte] konnte eine b-Welle mit $112\mu\text{V}$ und eine a-Welle von $54\mu\text{V}$ gemessen werden, was einem Verhältnis (b/a) von 2,07 entspricht. Im Vergleich zu der zuvor optimierten Intensität von $0,2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ erfährt die a-Welle in den höheren Intensitäten bei nahezu konstanter b-Wellenamplitude einen großen Anstieg.

Messung Proband 5 (29.06.2007)

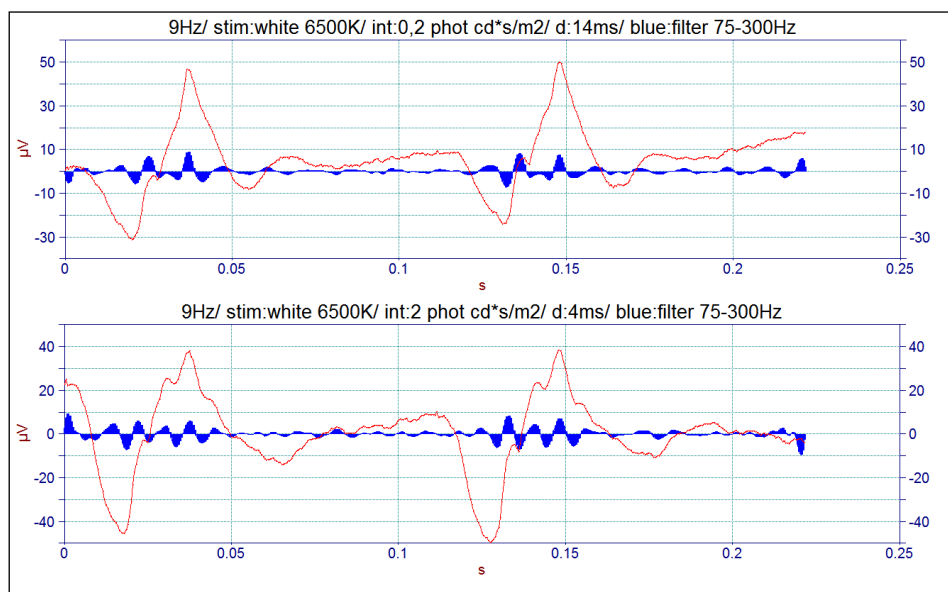


Abbildung 4.35: 9Hz Weißflicker mit einer Intensität von $0,2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ (oben) und einer 10-fach höheren Intensität von $2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$. Zu beachten sind die Unterschiede der ERG Kurvenform und der OPs (blau als AUC durch 75-300Hz Filterung).

Aus der Darstellung der ERG-Ableitung bei $0,2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ und der höchsten b-Wellenamplitude bei einer Intensität von $2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ [Abbildung 4.35] wird deutlich, dass die a-Welle bei der höheren Intensität zu Ungunsten des b/a-Verhältnisses ansteigt. Da aber die b-Welle über der „0-Linie“ bei der höheren Intensität von $2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ viel geringer ist (ca. $12\mu\text{V}$) als bei der

schwächeren Intensität von 0,2 phot cd*s/m² wird eine Differenzierung der a- und b-Welle in der Messung mit 2 phot cd*s/m² deutlich schwieriger. Die OPs ließen sich bei beiden Ableitungen zeigen. Bei der Stimulation mit einer Intensität von 2 phot cd*s/m² werden die Gipfelzeiten der OPs im Vergleich zu der Stimulation mit einer Intensität von 0,2 phot cd*s/m² kürzer.

Im Hinblick auf pathologisch veränderte ERGs, deren Identifizierung am deutlichsten durch die Beurteilung der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort möglich ist, wie zum Beispiel das „elektronegative“ ERG, wird ein höherer b/a-Quotient als günstig erachtet. Dies trifft auf den Intensitätsbereich um 0,2 phot cd*s/m² zu. Aus diesem Grund erfolgt in der Hauptstudie der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort eine Optimierung der Intensität im Bereich von 0,2 phot cd*s/m².

4.2.2. Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie kombiniertes Stäbchen- und Zapfen-ERG)

In der Hauptstudie der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort wurde mit einem 9Hz-Flicker und der Stimulationsfarbe Weiss 6500K die Optimierung der Pulszeit und der Stimulationsintensität durchgeführt. Die übrigen Reizbedingungen, wie Filtereinstellungen und Abtastfrequenzen blieben konstant und werden im Appendix [Tabelle 7.6] beschrieben. Die Ableitungen der 16 Probanden wurden gesondert nach a- und b-Wellen ausgewertet.

4.2.2.a. Hauptstudie Pulszeit:

Durch Serien mit gleichbleibender Intensität von 0,2 phot cd*s/m² und variierenden Pulszeiten von 8 bis 16ms wurden die optimalen ERG Parameter definiert. Die Einstellungen der ERG Ableitung blieben für alle Messungen konstant.

Die b-Wellenamplitude wurde separat zur a-Wellenamplitude ausgewertet. Die Mittelwerte aus allen 16 Probandenmessungen, bei denen die b-Wellenamplituden beider Augen untersucht wurden, zeigen keine großen

[25.01.2011]

Differenzen [Abbildung 7.3]. Der maximale Mittelwert mit $129,11\mu\text{V}$ wird bei 14ms erreicht. Im Vergleich zu den restlichen Pulszeiten besteht eine Differenz von ca. $15\mu\text{V}$. Im Schaubild ist zu erkennen, dass auch Amplituden von über $200\mu\text{V}$ erreicht wurden. Die Auswertung der a-Welle soll eine Auswahl der optimalen Pulszeit erleichtern [Abbildung 7.4].

Die a-Wellen Amplitude aller 16 Probandenmessungen erreicht im Mittelwert ein Maximum bei ebenfalls 14ms mit $47,74\mu\text{V}$. Das ist zusammen mit der b-Wellen Auswertung ein Hinweis auf eine optimale Pulszeit bei 14ms . Das Schaubild [Abbildung 7.4] soll aber auch die Streuung und den Mittelwert aus allen Probandenmessungen zeigen.

Die Mittelwerte beider Augen der jeweiligen Probandenmessungen wurden gegen die Pulszeit aufgetragen [Abbildung 7.5]. Somit kann die Auswertung an einer Kennlinie für jeden Probanden erfolgen.

Aus den Kennlinien wurden die maximalen Werte abgelesen und der zugehörigen Pulszeit zugeordnet. Die Verteilung der Maxima erlaubt eine Aussage über die optimale Pulszeit der Untersuchung.

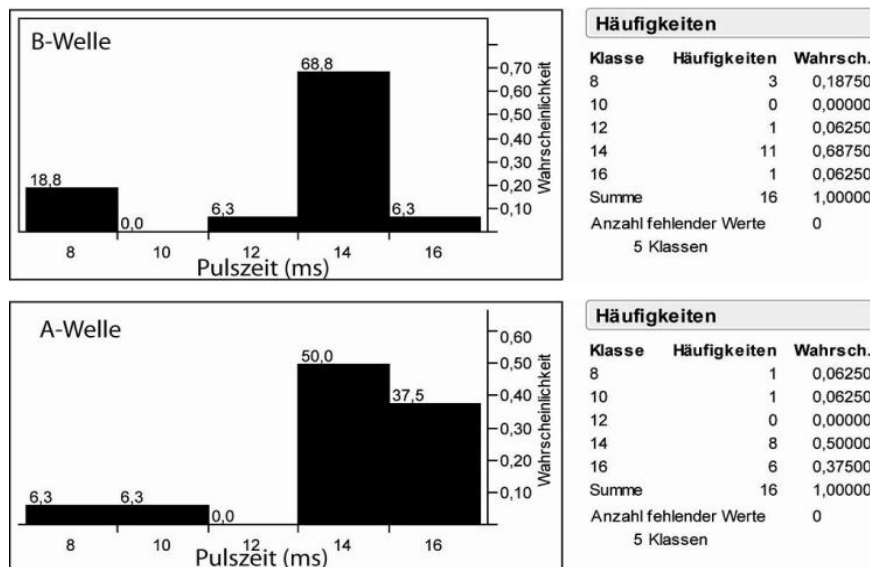


Abbildung 4.36: Häufigkeitsverteilung der maximalen b- und a-Wellenamplituden bei variierenden Pulszeiten. Aus den Kennlinien [Abbildung 7.5] wurden die Pulszeiten, die einen maximalen Mittelwert für jeden Probanden auslösten, in einer Verteilungsanalyse zusammengefasst. Das obere Schaubild bezieht sich auf die b-Wellenamplituden. Die a-Wellenamplituden wurden im unteren Schaubild ausgewertet. In der rechten Tabelle befinden sich die Häufigkeiten der Verteilung. Den Schaubildern ist zu entnehmen bei welcher Pulszeit die meisten Maxima der b-Wellenamplituden erreicht wurden.

Die Verteilung der maximalen Mittelwerte aus den b-Wellenamplituden beider Augen ergibt bei 11 Probanden ein Maximum bei 14ms [Abbildung 4.36 oben]. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 68,75 Prozent wird eine weitere Messung ein Maximum bei 14ms erreichen. Es ist jedoch zu beachten, dass sogar 3 Probanden ein Maximum bei 8ms aufwiesen. Die maximalen Mittelwerte aus den a-Wellenamplituden (unten) zeigen eine weniger eindeutige Verteilung. Zu 50 Prozent, was 8 Probanden entspricht, wird ein Maximum bei einer Pulszeit von 14ms erreicht. Bei immerhin 6 Probanden wurde aber ein Maximum bei 16ms festgestellt. Wenn nun beide Ergebnisse, die der b-Wellenamplituden und der a-Wellenamplitude, kombiniert betrachtet werden, lässt sich eine Pulszeit von 14ms als optimal festlegen. Das Ergebnis der Hauptstudie bestätigt somit die Hinweise aus der Vorstudie.

4.2.2.b. Hauptstudie Stimulationsintensität:

Die optimale Intensität des Stimulationsblitzes wurde anhand von Serien mit gleichbleibender Pulszeit von 14ms und Intensitäten von 0,16 (log -0,8) bis 0,26(log -0,6) phot cd*s/m² ermittelt. Außer der Intensität blieben die Einstellungen für die ERG Ableitung konstant [Abbildung 7.6].

Die Mittelwerte der b-Wellenamplituden schwanken bei allen verwendeten Intensitäten zwischen 110 und 128µV, was eine eindeutige Definition der optimalen Intensität erschwert. Der maximale Mittelwert (128,62µV) der b-Wellenamplitude wird bei einer Intensität von 0,2 phot cd*s/m² verzeichnet. Im Vergleich dazu erreicht der Mittelwert bei einer Intensität von 0,22 phot cd*s/m² 127,9µV. Die Differenz der beiden Mittelwerte beträgt somit weniger als 1µV! Eine ähnlich kleine Differenz verdeutlicht auch die Auswertung der a-Wellenamplituden. Hier beträgt die Differenz zwischen dem maximalen Mittelwert von 45,74µV und dem zweithöchsten Mittelwert von 45,22µV sogar nur 0,5V.

Bereits die Kennlinien deuten auf eine breite Streuung der Maxima [Abbildung 7.7]. Einzelne Probanden, wie Proband 7 oder Proband 10, weisen einen nahezu konstanten Verlauf der Amplituden auf. Die Darstellung enthält jedoch

[25.01.2011]

auch Messungen, die ein eindeutiges Maximum in der Kennlinie zeigen (z.B. Proband 15).

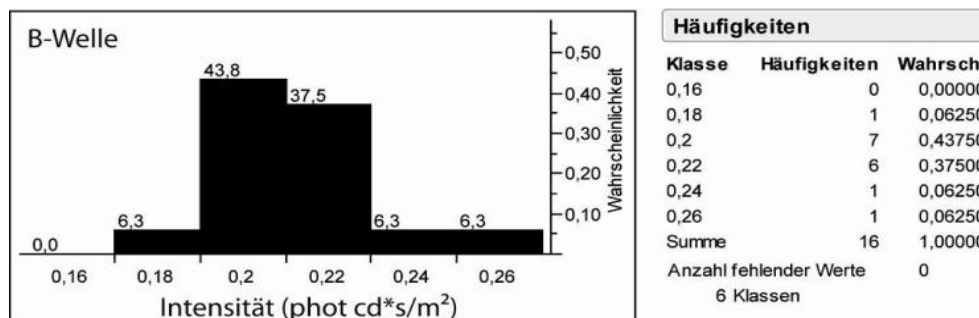


Abbildung 4.37: Häufigkeitsverteilung der maximalen b-Wellenamplituden bei variierenden Intensitäten. Die Häufigkeiten der jeweiligen Intensitäten sind in der Tabelle aufgelistet. Die Intensität von 0,2 phot cd*s/m² erreichte bei 7 Probanden einen maximalen Mittelwert. Die Intensität von 0,22 phot cd*s/m² bot jedoch bei 6 Probanden ebenfalls einen maximalen Mittelwert.

Aus der Untersuchung der Verteilung der einzelnen Maxima sind vor allem zwei dominante Intensitäten aufgefallen [Abbildung 4.37]. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 43,75 Prozent ist eine Intensität von 0,2 phot cd*s/m² als optimal zu betrachten. Die Intensität von 0,22 phot cd*s/m² wird jedoch ebenfalls bei 6 Probanden (37,5%) als optimale Intensität registriert.

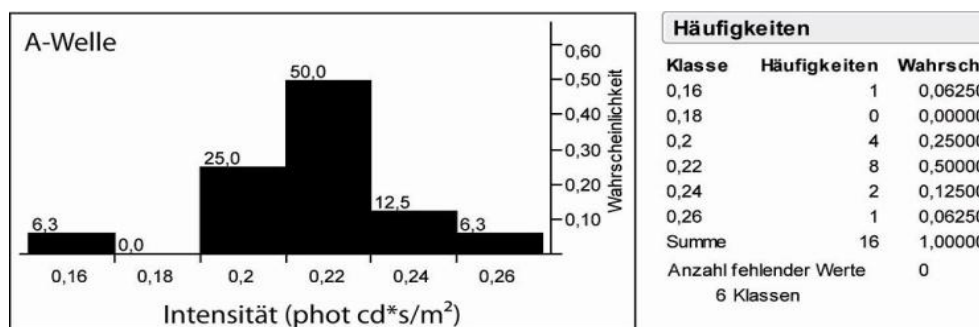


Abbildung 4.38: Häufigkeitsverteilung der maximalen a-Wellenamplituden bei verschiedenen Intensitäten. Hier erreicht die Intensität von 0,22 phot cd*s/m² mit 50%, also bei 8 Probandenmessungen, eine maximale a-Wellenamplitude. Die Intensität von 0,2 phot cd*s/m² jedoch nur bei 4 Probanden, was 25% entspricht.

Die Verteilung der maximalen Mittelwerte der a-Wellenamplituden bietet ein deutlicheres Ergebnis als die Analyse der b-Wellenamplituden [Abbildung 4.38]. Hier wurde durch die Intensität von 0,22 phot cd*s/m² bei 8 Probanden eine maximale a-Wellenamplitude ausgelöst. Nur bei 4 Probanden wurde ein Maximum bei 0,2 phot cd*s/m² verzeichnet.

[25.01.2011]

Beide Intensitäten, sowohl 0,2 als auch 0,22 phot cd*s/m², können als optimal betrachtet werden. Bei 0,22 phot cd*s/m² wird eine höhere a-Wellenamplitude erreicht, wobei bei 0,2 phot cd*s/m² eine höhere b-Wellenamplitude registriert wird. Der Quotient zwischen b-Welle und a-Welle (b-Welle/a-Welle) beträgt bei der Intensität von 0,2 phot cd*s/m² und einer Pulszeit von 14ms im Mittel 2,68 ($\pm 0,74$ Standardabweichung) aus 16 Probandenmessungen.

4.3. Photopisches ERG

4.3.1. Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)

4.3.1.a. Exploration Frequenz

Für die Messung des photopischen ERG wurde eine Helladaptation von 10 Minuten durch eine Hintergrundbeleuchtung mit mindestens 34 phot cd/m² durchgeführt. Die Stäbchen wurden zusätzlich während der photopischen Messungen durch eine Hintergrundbeleuchtung gebleicht.

In der isolierten photopischen Stimulation besteht bereits nach dem ISCEV Standard eine Flickerstimulation mit 30Hz [Marmor, Holder *et al.* 2004]. Die mit speziellen Methoden maximal messbare CFF für Stäbchen bei 28Hz [Stockman, Sharpe *et al.* 1991] liegt 2Hz unter der Stimulation mit 30Hz. Aus diesem Grund wird bereits durch die vom ISCEV Standard beschriebene 30Hz Flickerstimulation [Marmor, Holder *et al.* 2004] eine weitgehend isolierte Zapfenantwort ermöglicht. Dennoch zeigt die Anwendung der durch den ISCEV-Standard beschriebenen 30Hz Flickerstimulation vor allem bei Patienten mit Netzhautdegeneration (z.B. Retinitis Pigmentosa) eine artefaktreiche ERG-Ableitung, die auf Lidschlussartefakte, zurückgeführt werden kann. Dabei entstehen die Lidschlussartefakte durch die , subjektiv als störend empfundene, intensive Lichtstimulation mit einer hohen Frequenz von 30Hz. Patienten mit Netzhautdegenerationen zeigen eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit, die auch als Photoaversion bezeichnet wird [Gawande, Donovan *et al.* 1989]. Um Artefakte durch Muskelanspannung und Lidschluss, die durch helle Lichtstimuli bei Patienten ausgelöst werden, zu verhindern, wird in der aktuellen Studie ein neuer Stimulus für die weitgehend isolierte photopische ERG-Ableitung unter Anwendung von geringen Lichtintensitäten entwickelt.

Die Erhöhung der Flickerfrequenz führt zu geringeren b-Wellenamplituden in der ERG Untersuchung. Eine maximale b-Wellenamplitude bei der photopischen Stimulation wird jedoch unter der Erwartung von niedrigen Potentialen bei Patienten mit degenerierten Netzhauterkrankungen angestrebt. Deshalb erscheint eine Veränderung der Frequenz von 30Hz zunächst sinnlos.

Die Exploration der Mittelungen und der Artefaktreduktion [Kapitel 7.1], die bei Patientenmessungen mit sehr geringen ERG Potentialen eine entscheidende Rolle spielt, legte jedoch den Sinn und die Relevanz einer Frequenzänderung dar. Im Anbetracht der unter Kapitel 7.1 genannten Tatsachen wurde die Frequenz des photopischen ERG Protokolls auf 33Hz justiert.

4.3.1.b. Exploration spektrale Sensitivität

Das spektrale Wirksamkeitsfeld der Stimulationsfarbe des isolierten photopischen ERG sollte möglichst nahe an der maximalen spektralen Zapfensensitivität bei 550nm liegen. Zusätzlich ist eine Stäbchenbeteiligung in der Antwort zu vermeiden. Diese Anforderungen werden von der orangen (596nm) und von der roten (635nm) LED erfüllt. Die mittel- und langwelligen Zapfen werden bei einer Wellenlänge von 596nm zu einem größeren Maß stimuliert als bei 635nm. Jedoch ist die Stäbchenbeteiligung bei 635nm viel geringer als bei 596nm [Abbildung 4.2]. Aus diesem Grund wird in der photopischen Ableitung die rote LED mit einer Wellenlänge von 635nm als Stimulations-LED angewandt. Die Hintergrundbeleuchtung sollte die Stäbchen helladaptieren und die Zapfen nicht sättigen. Dazu ist eine Hintergrundbeleuchtung mit der blauen LED mit einer Wellenlänge von 470nm optimal. Die blaue LED besitzt den minimalsten Effekt auf die mittel- und langwelligen Zapfen, bei gleichzeitig hoher adaptiver Wirksamkeit auf die Stäbchen. Dadurch wird der Effekt einer geringen Stäbchenbeteiligung bei gleichzeitig optimierter Zapfenableitung verstärkt.

4.3.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen

Eine besondere Anpassung der Stimulationsintensität erfolgte in den isolierten photopischen ERG Ableitungen. Dabei musste die Blendungsempfindlichkeit von Patienten mit Netzhauterkrankungen (z.B. Stäbchendystrophien) berücksichtigt werden [Gawande, Donovan *et al.* 1989]. Die spektralen Einstellungen der isolierten photopischen Ableitung mit der blauen Hintergrundbeleuchtung und dem roten Stimulus schienen selbst bei gesunden

Probanden bei moderaten Intensitäten häufig zu Lidschlussartefakten zu führen. Diese Lidschlussartefakte wurden subjektiv durch die besonderen Blendungseigenschaften des blauen Hintergrundes in Kombination mit dem roten Stimulus ausgelöst. Eine Verringerung der Stimulationsintensität und eine gleichzeitige, verhältnisgetreue Reduktion der Hintergrundbeleuchtung führte zu einer Verbesserung der ERG Ableitung. Die isolierte Zapfenableitung wird trotz der geringen Intensitäten durch die Stimulationsfrequenz, der spektralen Eigenschaften des Stimulus und der Hintergrundbeleuchtung, sowie durch die vorhergehende Helladaptation garantiert. In der Vorstudie erfolgte die Auswahl einer maximalen b-Wellenamplitude unter Berücksichtigung der explorierten Bedingungen. Für diesen Zweck wurden Serien mit variierenden Intensitäten und Pulszeiten durchgeführt. Eine genaue Untersuchung der Intensitäten und der Pulszeiten erfolgte in der Hauptstudie.

4.3.1.d. Vorstudie: Hinweise auf die Pulszeit:

Messung Proband 5 (08.11.2006)

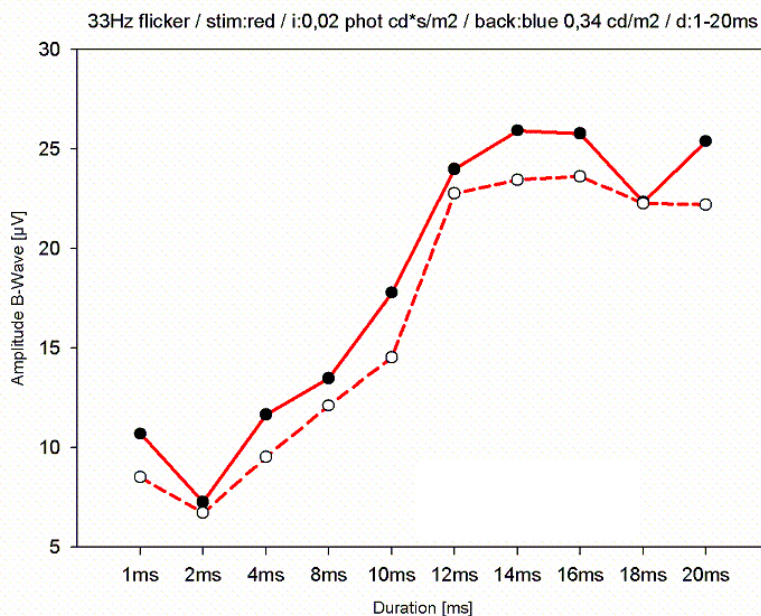


Abbildung 4.39: B-Wellenamplitude beider Augen (durchgezogene Linie = links, gestrichelt = rechts) der 33Hz-Rotflickerstimulation mit konstanter Intensität von 0,02 phot cd*s/m² und variierenden Pulszeiten von 1ms-20ms. Ableitung unter konstanter Hintergrundbeleuchtung von 0,34 cd/m² mit blauer LED. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 50 Einzelantworten}

[25.01.2011]

Die Stimulationsintensitäten von 0,02 phot cd*s/m² für den roten Blitz und 0,34 cd/m² für die blaue Hintergrundbeleuchtung (470nm) blieben konstant. Bei gleichbleibenden ERG Einstellungen wurden die ERG Messungen jeweils mit Pulszeiten von 1ms bis 20ms durchgeführt [Abbildung 4.39]. Eine maximale b-Wellenamplitude wurde bei Pulszeiten von 14ms (linkes Auge) und 16ms (rechtes Auge) erreicht.

Die darauf folgende Messung mit einer höheren Intensität von 0,16 phot cd*s/m² und einer intensiveren Hintergrundbeleuchtung von 1 phot cd/m² zeigte eine maximale b-Welle bei einer Pulszeit von 10ms (linkes und rechtes Auge) [Abbildung 4.40].

Messung Proband 4 (17.02.2007)

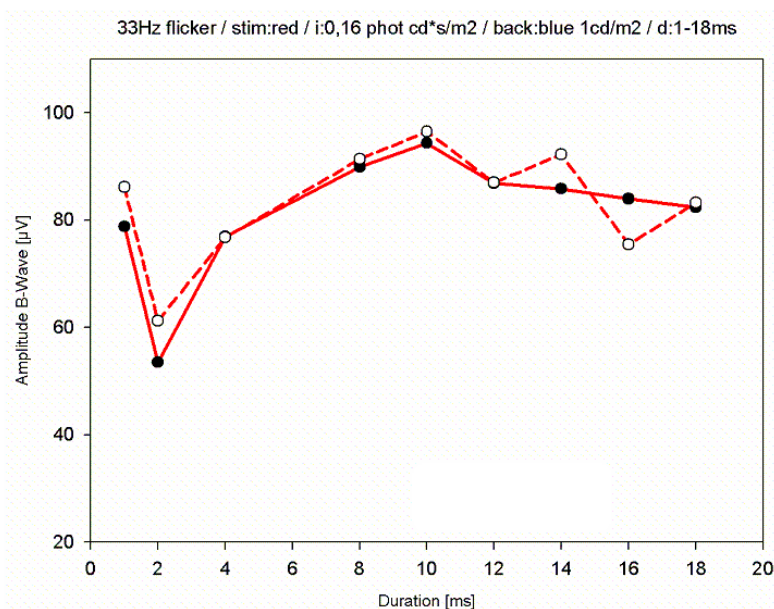


Abbildung 4.40: B-Wellenamplitude beider Augen (durchgezogene Linie = links, gestrichelt = rechts) der 33Hz-Rotflickerstimulation mit konstanter Intensität von 0,16 phot cd*s/m² und einer blauer Hintergrundbeleuchtung von 1 cd/m² unter Anwendung variierender Pulszeiten von 1-18ms. {Abtastfrequenz: 5000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 20 Einzelantworten}.

In der Einzelauflistung der Untersuchung ist die stabile Kurvenform der ERG-Ableitungen bei unterschiedlichen Pulszeiten zu erkennen [Abbildung 4.41]. Ab einer Pulszeit von 8ms kann eine annähernde Linearität der b-Wellenamplitude mit einer Amplitudenhöhe von 75-90µV festgestellt werden. Die Darstellung enthält ERG Kurven einer 33Hz Rotflickerstimulation mit ansteigenden

Pulszeiten (von unten nach oben) und konstanter Stimulationsintensität (1 phot cd*s/m²). Es sind die Ergebnisse beider Augenmessungen dargestellt.

Messung Proband 4 (17.02.2007)

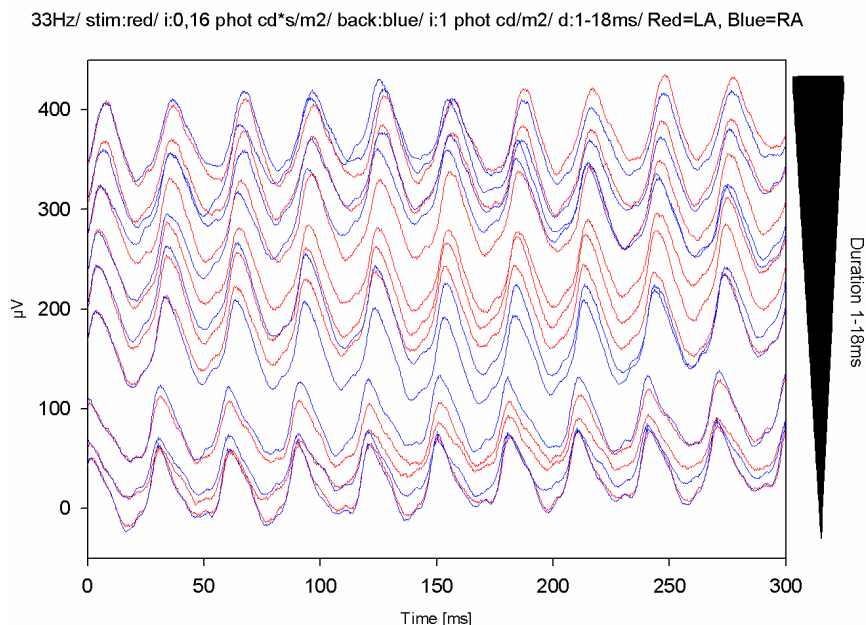


Abbildung 4.41: ERG Kurven der 33Hz Rotflickerstimulation mit konstanter Intensität von 0,16 phot cd*s/m² und einer blauen Hintergrundbeleuchtung von 1 phot cd/m² unter Anwendung von variierenden Pulszeiten von 1-18ms (von unten nach oben zunehmend). Das linke Auge ist rot, das rechte Auge blau dargestellt.

4.3.1.e. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Pulszeit:

Um weitere Hinweise auf die optimale Pulszeit für die photopische ERG Messung mit Hilfe des 33Hz Rotflickers zu erhalten, wurden 2 Messserien an 2 Probanden durchgeführt. Die Intensität wurde für beide Messungen auf 0,12 phot cd*s/m² für den Rotstimulus und auf 0,6 cd/m² für den blauen Hintergrund eingestellt. Die Spanne für die Pulszeit betrug 4 bis 20ms. Die übrigen ERG Einstellungen blieben für jede Einzelmessung konstant. Es wurde für jede Einzelmessung die b-Wellenamplitude und die Höhe der 33Hz Komponente aus der FFT Analyse aufgetragen [Abbildung 4.42]. Sowohl die b-Wellenamplitude als auch die 33Hz Komponente in der FFT sind bei einer Stimulation mit 14ms Pulszeit am größten.

[25.01.2011]

Messung Proband 10 (11.05.2007)

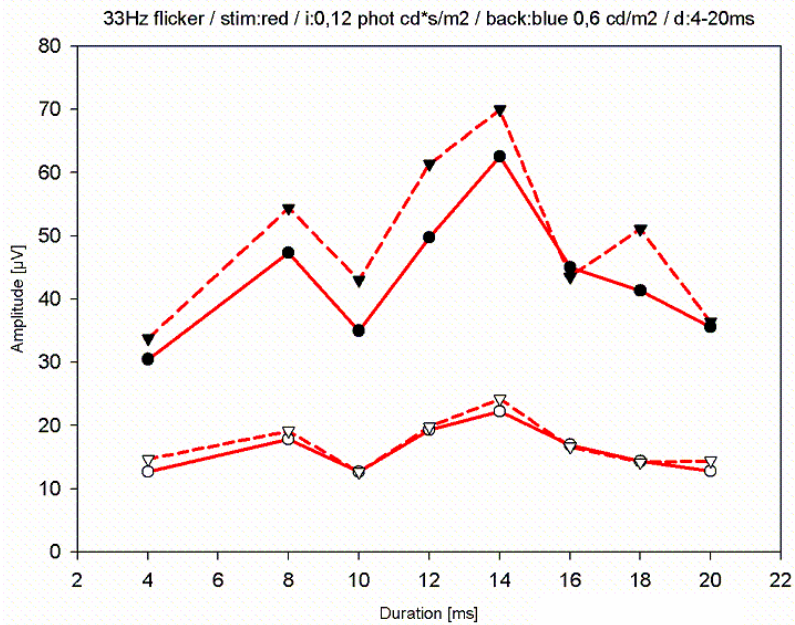


Abbildung 4.42: B-Wellenamplituden (schwarze Punkte) und 33Hz-Komponente aus der FFT-Analyse (weiße Punkte) unter Veränderung der Pulszeit (4 bis 20ms= „Duration“) bei einer 33Hz Flickerstimulation unter sonst konstanten Stimulationseinstellungen (Intensität des Rotflickers 0,12 phot cd*s/m² und 0,6 cd/m² der blauen Hintergrundbeleuchtung). Untersucht wurden beide Augen (durchgezogene Linie = rechtes Auge, gestrichelt = linkes Auge). {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 13-30 Einzelantworten}

Messung Proband 13 (25.05.2007):

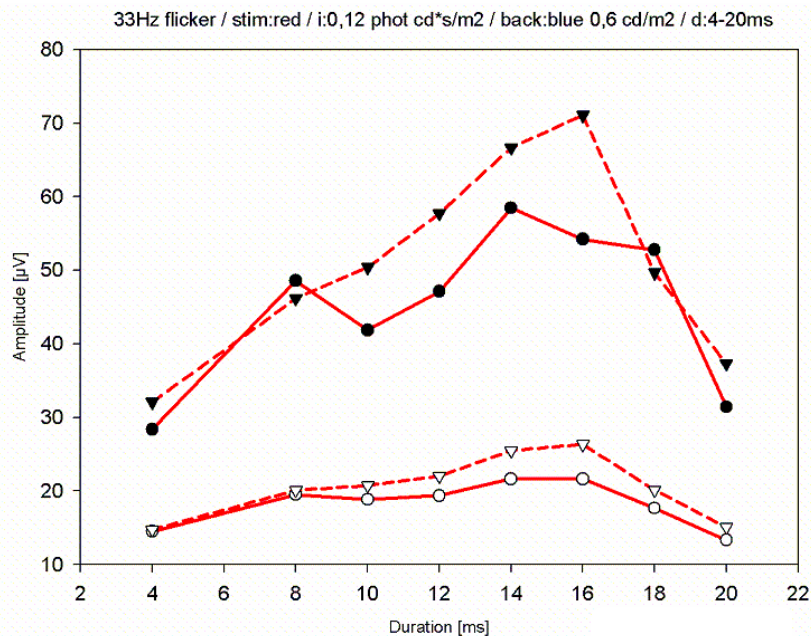


Abbildung 4.43: Gleiche Darstellungs- und Stimulations-Konstellation wie in Abbildung 4.42 bei einem weiteren Probanden. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 27-50 Einzelantworten}

[25.01.2011]

In der ERG Messung vom Proband 13 erscheint eine maximale b-Wellenamplitude für eine Pulsdauer von 14ms für das RA und 16ms für das LA [Abbildung 4.43]. Die entsprechenden Frequenzanalysen in der FFT zeigen das gleiche Ergebnis.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich eine optimale Pulsdauer von 14-16ms für den photopischen 33Hz-Rotflicker auf blauer Hintergrundbeleuchtung abschätzen. Eine genaue Auswahl der Pulsdauer für die isolierte Zapfenantwort erfolgt in der Hauptstudie.

4.3.1.f. Vorstudie: Hinweise auf die Stimulationsintensität:

Zunächst erfolgte die 33Hz-Flicker Stimulation am helladaptierten Auge mit sehr hohen Intensitäten. Die Intensitätsspanne betrug 1 bis 5 phot cd*s/m² für den Rotblitz auf einer blauen Hintergrundbeleuchtung von 17 cd/m². Die Pulszeit wurde auf 4ms justiert [Abbildung 4.44].

Messung Proband 8 und Proband 9 (01.09.2006):

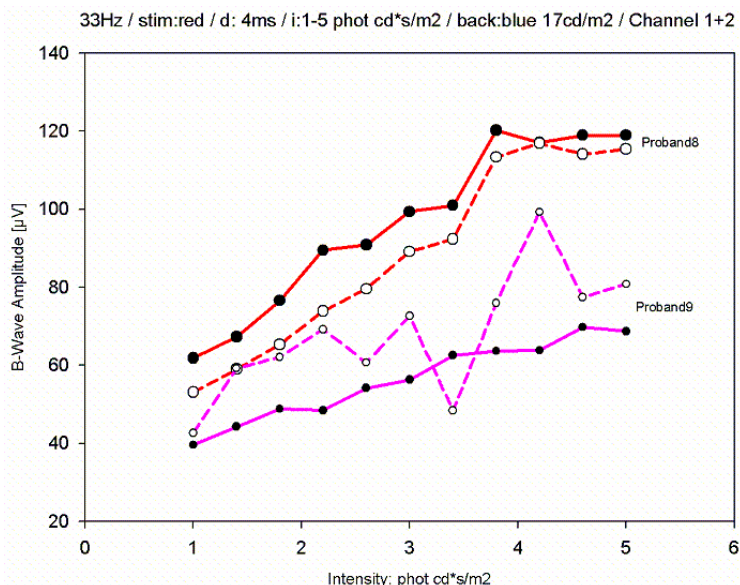


Abbildung 4.44: B-Wellenamplituden mit einer 33Hz-Flickerstimulation und Anwendung von ansteigenden Intensitäten (1-5 phot cd*s/m²) und einer konstanten Hintergrundbeleuchtung (17 phot cd/m²) bei einer Pulszeit von 4ms. Untersucht wurden beide Augen (durchgezogene Linie = rechts, gestrichelt = links) von 2 Probanden mit der gleichen Stimulationskonstellation. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 42-64 Einzelantworten bei Proband 8 und 50 Einzelantworten bei Proband 9}

Diese Messungen zeigten einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen der Stimulationsintensität und der zugehörigen b-Wellenamplitude [Abbildung 4.44]. Es konnte keine Stimulationsintensität als optimal betrachtet werden, da die Amplitude beinahe linear mit der Intensität zunahm und sich kein eindeutiges Maximum abzeichnete. Jedoch kam es bei der Stimulation im Bereich von 1 bis 5 phot cd*s/m² mit einem 33Hz Rotflicker auf einem blauen Hintergrund häufig zu Lidschlussartefakten. Bedingt durch die hohe Intensität, durch die Farbwahl von rotem Stimulus und blauer Hintergrundbeleuchtung und der Frequenz von 33Hz, war es bei gesunden Probanden nicht möglich eine adäquate Aufnahmezeit ohne Lidschlussartefakte zu gewährleisten, die für die Mittelungen von möglichst zahlreichen Einzelantworten notwendig waren. Aus diesem Grund war eine Verringerung der Stimulationsintensität unumgänglich.

4.3.1.g. Vorstudie: Erweiterte Auswahl der Stimulationsintensität:

Die Verwendung einer roten LED (635nm) als Stimulus, einer blauen Hintergrundbeleuchtung (470nm), einer Stimulationsfrequenz von 33Hz und eine vollständige Helladaptation machte die Auswahl von niedrigeren Intensitäten für die isolierte Zapfenantwort möglich. Durch die Anwendung von geringeren Intensitäten konnte die gesamte Aufnahmezeit des ERG verlängert werden, ohne dass das ERG durch Blick- oder Lidschlussbewegungen gestört wurde. Dies ermöglichte eine hohe Anzahl an Mittelungen, die für eine adäquate ERG-Antwort bei Patienten mit eingeschränkter Zapfenfunktion benötigt wird.

Durch die Berücksichtigung der Ergebnisse der zuvor abgeleiteten Probandenmessungen, wurde in der folgenden Untersuchung die Pulszeit auf 14ms festgesetzt. Die Intensitätsspanne betrug 0,08 bis 0,16 phot cd*s/m² bei einer blauen Hintergrundbeleuchtung von 0,6 cd/m² [Abbildung 4.45].

Aus dieser Messung ging hervor, dass die b-Wellenamplitude bei 0,11 phot cd*s/m² die maximalen Werte bei beiden Augen verzeichnete. Die Frequenzanalyse mit Hilfe der FFT ergab eine maximale 33Hz-Komponente bei einer Intensität von 0,12 phot cd*s/m².

[25.01.2011]

Messung Proband 14 (11.05.2007)

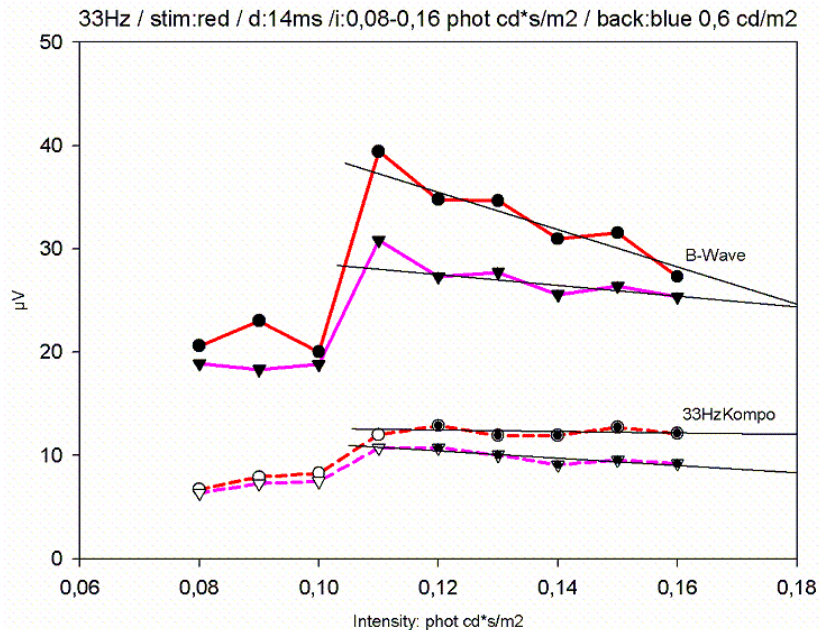


Abbildung 4.45: B-Wellenamplituden (durchgezogene Linien) und zugehörige Frequenzanalyse der 33Hz-Komponente (gestrichelt) in der FFT bei ansteigenden Intensitäten (0,08 bis 0,16 phot cd*s/m²) und konstanter Hintergrundbeleuchtung (0,6 phot cd/m²). Die rote Kurve entspricht dem linken Auge, die rosa Kurve dem rechten Auge. (Pulszeit=14ms; Stimulation durch die rote LED bei blauer Hintergrundbeleuchtung). Die schwarze Linie kennzeichnet die Regression, die die b-Welle ab einer Intensität von 0,11 phot cd*s/m² erfährt. {Abtastfrequenz: 2000Hz; Filter:aus; Mittelungen von 25-50 Einzelantworten}

Die Aufzeichnung der b-Wellenamplituden bei Intensitäten über 0,11 phot cd*s/m² lassen eine abfallende Linearität erkennen. Bei gleichzeitiger Beachtung der Frequenzanalyse ergibt sich jedoch eine weniger deutliche Abnahme der 33Hz-Komponente in der FFT, wobei sich ein beinahe konstanter Wert für die 33Hz-Komponente mit Zunahme der Stimulationsintensität einstellt. Da in dieser Messung ein deutliches Maximum (bei 0,11 phot cd*s/m²) identifiziert werden konnte, soll in der Hauptstudie die gleiche Intensitätsspanne (0,08-0,16 phot cd*s/m²) für die Optimierung der Stimulationsintensität dienen.

4.3.2. Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie photopisches ERG)

Die Hauptstudie des photopischen ERG erfolgte durch eine 33Hz-Flickerstimulation mit der roten LED (635nm) unter einer blauen (470nm) Hintergrundbeleuchtung. Die Intensität der Hintergrundbeleuchtung war mit 2 phot cd/m² bei jeder Einzelmessung konstant. Weitere Reizbedingungen

werden im Appendix erläutert [Tabelle 7.6] Durch die Erkenntnisse aus der Vorstudie wurden einzelne Einstellungen in der Hauptstudie angepasst. Die genaue Definition der Parameter für die Pulszeit und die Stimulationsintensität erfolgte an 16 Probandenmessungen.

4.3.2.a. Hauptstudie Pulszeit:

Durch die Stimulation mit einer konstanten Intensität von $0,12 \text{ phot cd}^* \text{ s/m}^2$ und variierenden Pulszeiten konnte die Einstellung für die maximale b-Wellenamplitude ermittelt werden. Zunächst wurden die Pulszeiten von 10-18ms untersucht [Abbildung 7.8]. Beobachtet wurde bei den ersten 8 Probandenmessungen, dass die Pulszeit von 10ms häufig die größte b-Wellenamplitude lieferte. Mit $73,88 \mu\text{V}$ stellt der Mittelwert aller b-Wellenamplituden der 8 gemessenen Probanden bei 10ms Pulszeit den höchsten Mittelwert dar.

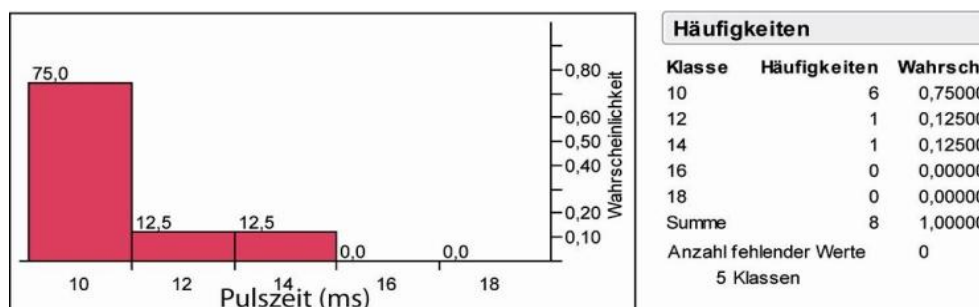


Abbildung 4.46: Häufigkeitsverteilung der maximalen b-Wellenamplitude bei variierender Pulszeit. In der Tabelle befinden sich die jeweiligen prozentualen Angaben über die Häufigkeit der maximalen b-Wellenamplituden in Abhängigkeit von der angewandten Pulszeit. Unter „Klasse“ stehen die untersuchten Pulszeiten. Unter „Häufigkeiten“ wird angegeben wie häufig die jeweilige Pulszeit eine maximale b-Wellenamplitude auslöste.

Die Kennlinien der Mittelwerte der beiden Augen bestätigen die Annahme [Abbildung 7.9]. Ein Großteil der Probandenmessungen weist bei 10ms die höchsten Mittelwerte der b-Wellenamplituden beider Augen auf. Die Verteilung der maximalen Mittelwerte zeigt bei 5 von 8 Probanden ein Höhepunkt der Kennlinien bei 10ms [Abbildung 4.46]. Nur bei 2 Probanden besteht ein Maximum bei 14ms. Aus diesem Grund wurde die Stimulation im nächsten

Schritt bei weiteren 8 Probanden auf 4 – 16ms erweitert.

An der Darstellung der b-Wellenamplituden der 8 Probandenmessungen [Abbildung 7.10] lässt sich die Vermutung, dass 10ms eine optimale Pulszeit darstellen, bestätigen. Der Mittelwert aus allen b-Wellenamplituden der 8 Probanden ist bei 10ms mit 75,6µV am höchsten. Die Distanz zum nächsthöchsten Mittelwert beträgt ca. 20µV.

Auch an den Kennlinien der einzelnen Probanden wird bei den meisten Messungen ein Maximum bei 10ms deutlich [Abbildung 7.11]. Die Verteilung der Mittelwerte bestätigt die Ergebnisse der Kennlinien [Abbildung 4.47].

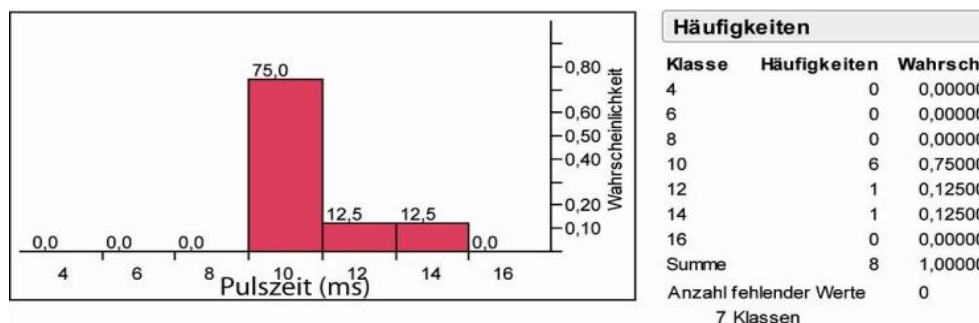


Abbildung 4.47: Häufigkeitsverteilung der maximalen b-Wellenamplituden bei variierenden Pulszeiten der zweiten Untersuchungsreihe. Die Pulszeiten (10,12 und 14ms), die ein Maximum in den Kennlinien der Probanden auslösten wurden hier nach der Häufigkeit dargestellt. Die Pulszeit von 10ms konnte mit einer Häufigkeit von 75% eine maximale b-Wellenamplitude auslösen. Die restlichen Pulszeiten (4,6,8 und 16ms) lösten in keiner Probandenmessung eine maximale b-Wellenamplitude aus.

Mit einer Häufigkeit von 75% wurde bei 10ms ein Höhepunkt in der Kennlinie der Probandenmessungen erreicht. Das entspricht 6 von 8 Probandenmessungen. Andere Pulszeiten, wie 12 oder 14ms, erreichten nur in 12,5% der Messungen einen maximalen Wert in den Kennlinien. Somit resultiert aus der Optimierung des photopischen ERG eine Pulszeit von 10ms.

4.3.2.b. Hauptstudie Stimulationsintensität:

Die optimale Stimulationsintensität wurde bei einer konstanten Pulszeit von 14ms aus einer Intensitätsbreite von 0,08-0,16 phot cd*s/m² definiert. Dabei wurde die b-Wellenamplitude bei 16 Probandenmessungen aufgezeichnet [Abbildung 7.12]. Bei 0,12 phot cd*s/m² wird in der Darstellung der b-

[25.01.2011]

Wellenamplituden aller Probandenmessungen ein deutliches Maximum suggeriert. Der Mittelwert der b-Wellenamplituden betrug bei 0,12 phot cd*s/m² 70,57µV [Abbildung 7.12]. Die Kennlinien jedes Probanden zeigen jedoch schon, dass die Ergebnisse der Probandenmessungen nicht immer ein deutliches Maximum aufweisen. Bei einigen Probandenmessungen werden auch annähernd lineare Verläufe registriert [Abbildung 7.13].

Die Auswertung der Verteilung der maximalen Werte in den Kennlinien bestätigt die Annahme aus der Darstellung der Kennlinien [Abbildung 4.48]. Bei 50% der Probandenmessungen, was 8 Probanden entspricht, wird eine maximale b-Wellenamplitude bei 0,12 phot cd*s/m² ausgelöst.

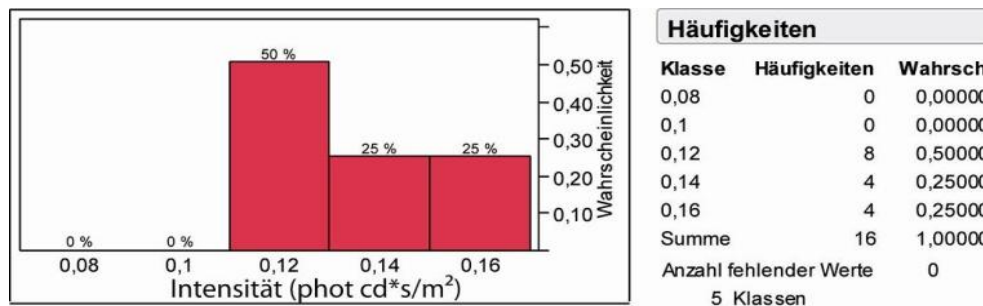


Abbildung 4.48: Häufigkeitsverteilung der maximalen b-Wellenamplitude bei verschiedenen Intensitäten. In der Tabelle werden unter „Klasse“ die untersuchten Intensitäten und die zugehörigen „Häufigkeiten“ angegeben, die beschreibt wie oft die Intensität eine maximale b-Wellenamplitude auslöste.

Die Intensitäten von 0,14 phot cd*s/m² und 0,16 phot cd*s/m² lösen jedoch jeweils bei 4 Probanden (25%) eine maximale b-Wellenamplitude aus. Beide Intensitäten bilden somit 50% der maximal ausgelösten b-Wellenamplituden. Eine optimale Intensität ist daher mit Vorbehalt bei 0,12 phot cd*s/m² zu sehen.

4.4. Blauzapfen-ERG

4.4.1. Protokollentwicklung (Exploration und Vorstudie)

4.4.1.a. Exploration Frequenz

Bei der Blauzapfenuntersuchung besteht die Schwierigkeit darin nicht nur das Stäbchensystem durch eine helle Hintergrundbeleuchtung zu bleichen, sondern zusätzlich die lang- und mittelwelligen Zapfen zu sättigen. Das kann durch eine intensive Hintergrundbeleuchtung mit einer bestimmten spektralen Eigenschaft, die vor allem die Rot- und Grünzapfen sättigt, erreicht werden.

Die b-Welle der Blauzapfen erreicht nur geringe Höhen von ca. 20 μ V beim gesunden Probanden und die CFF liegt adaptationsabhängig bei 28Hz [Stockman, Langendörfer *et al.* 2007]. Ab einer Frequenz von 5-8Hz sinkt die Netzhautantwort der Blauzapfen rapide [Green 1969, Wisowaty and Boynton 1980, Zrenner 1982]. Aus diesem Grund werden in der aktuellen Studie Frequenzen über 4Hz in der Blauzapfenableitung nicht angewandt. Es wird dadurch versucht die maximale Amplitudenhöhe der Blauzapfen von ca. 20 μ V durch eine repetitive Stimulation zu gewährleisten. Der Blauzapfen reagiert von allen Photorezeptoren häufig am sensibelsten auf Noxen, Ischämien, stoffwechselbedingte Schädigungen und Krankheiten der Retina [Greenstein, Hood *et al.* 1989, Mortlock, Chiti *et al.* 2005, Yamamoto, Kamiyama *et al.* 1996, Zrenner 1982]. Erbliche Netzhauterkrankungen haben ebenfalls Einfluss auf die Blauzapfenantwort im ERG [Kamiyama, Yamamoto *et al.* 1996, Zrenner, Nowicki *et al.* 1986]. Auf Grund der geringen Höhe muss eine hohe Stimulationsfrequenz speziell beim Blauzapfen der maximal auslösbaren b-Wellenamplitude weichen.

4.4.1.b. Exploration spektrale Sensitivität

Das Blauzapfen ERG wird in der aktuellen Studie mit Hilfe der SAT abgeleitet. Der Blauzapfenstimulus wird durch die Blaue LED mit einer Wellenlänge von 470nm generiert. Eine Einstellung der LEDs auf die maximale spektrale

[25.01.2011]

Sensitivität der Blauzapfen bei 430nm [Stockman, Sharpe *et al.* 1999] bringt durch die Mischung unterschiedlicher LEDs erhebliche Nachteile mit sich. Für die isolierte skotopische Ableitung wurden diese Nachteile bereits dargestellt und gelten auch für die Blauzapfenstimulation. Die Blauzapfen besitzen electrophysiologische Ähnlichkeiten zu den Stäbchen [Zrenner and Gouras 1979]. Die Gipfelzeit und die spektralen Eigenschaften beider Photorezeptoren unterscheiden sich nur gering. Die Form der b-Wellen der Stäbchen und der Blauzapfen weisen bei gesunden Probanden deutliche Unterschiede auf. Die Messung von pathologischen Stäbchenantworten kann der Blauzapfenableitung jedoch sehr ähnlich sein. Deshalb sollte die Stäbchenaktivität im Blauzapfen-ERG streng unterdrückt werden. Dieses Ziel wird durch die Helladaptation der Stäbchen mit Intensitäten über 2000 Td erreicht [Aguilar and Stiles 1954]. Unter Anwendung der blauen LED mit einer Wellenlänge von 470nm für die Stimulation der Blauzapfen unter photopischen Bedingungen zeigt sich jedoch auch eine hohe Empfindlichkeit der mittel- und langwelligen Zapfen [Abbildung 4.49].

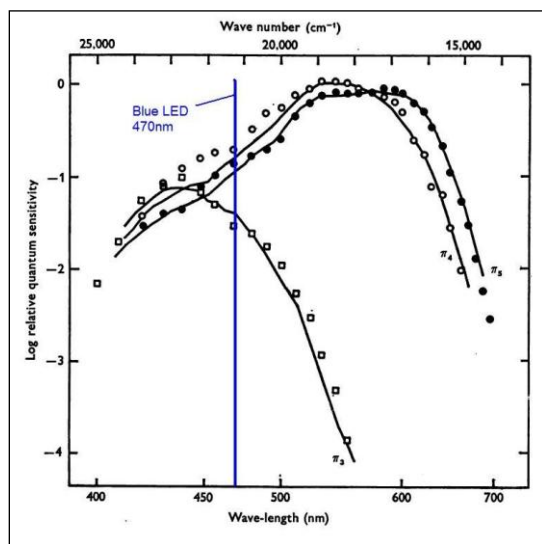


Abbildung 4.49: Darstellung der spektralen Sensitivitäten der Zapfensysteme [Cavonius and Estévez 1975]. Die isolierten Blauzapfen (□), Grünzapfen (○) und Rotzapfen (●) wurden einzeln untersucht und mit Stiles π -Mechanismen [Wysecki and Stiles 1980] (Linien) verglichen. Die Wellenlänge der blauen LED des ColorDome® wurde mit der blauen Linie eingezeichnet. Die Wellenlängen wurden gegen die logarithmische Sensitivität der Zapfen aufgetragen. Das Verhältnis der spektralen Eigenschaften der Grün- und Rot-Zapfen zu den Blauzapfen ist zu beachten.

Zu beachten ist zusätzlich, dass die Empfindlichkeit der Grün- und Rotzapfen

etwa 9 fach höher ist als die der Blauzapfen. Damit erhält die Hintergrundbeleuchtung neben der Helladaptation der Stäbchen eine weitere Aufgabe, und zwar die Sättigung der mittel- und langwelligen Zapfen. Durch die Wahl der orangen LED mit einer Wellenlänge von 594nm als Hintergrundbeleuchtung werden die mittel- und langwelligen Zapfen gesättigt und die Stäbchen helladaptiert. Gleichzeitig hat die orange LED nur einen minimalen Einfluss auf die spektrale Empfindlichkeit der Blauzapfen [Abbildung 12].

4.4.1.c. Exploration Stimulationseinstellungen

Zunächst wurden die notwendigen Einstellungen und Rahmenbedingungen für eine Blauzapfenantwort in der Vorstudie untersucht. Hierzu wurden einzelne Messungen mit unterschiedlichen Techniken unter Variation der Protokolleinstellungen durchgeführt.

Eine Adaptationszeit von 10 Minuten sollte vor der Blauzapfenmessung durch eine helle (200 phot cd/m²) orange oder gelbe Hintergrundbeleuchtung durchgeführt werden, um die mittel- und langwelligen Zapfen zu sättigen [Kuniyoshi, Uno *et al.* 2003]. Diese Helladaptation führte zu einer Verlängerung der klinischen ERG-Untersuchung und zu einer subjektiven Belastung des Probanden. Durch die Entwicklung eines neuen Paradigmas zur Stimulation der Blauzapfen sollte eine Erleichterung bei der klinischen Messung erreicht werden. Hierzu wurde ein neues Stimulationsprogramm für das Espion System programmiert [Tabelle 7.1]. Das neue Stimulationsparadigma für die Blauzapfenableitung [Kapitel 7.2] wurde schließlich untersucht und in der Hauptstudie verifiziert. Für die Blauzapfenstimulation sollte zunächst eine geeignete Hintergrundbeleuchtung gewählt werden. Dazu wurden einzelne Untersuchungen mit unterschiedlicher Hintergrundbeleuchtung orientierend durchgeführt. Die Pulszeit der Blauzapfenstimulation wurde danach variiert und die Effekte auf das ERG untersucht. Es wurden die allgemeinen Eigenschaften der Blauzapfen-Antwort anschaulich zusammengefasst. Verschiedene Intensitäten wurden für die Blauzapfenstimulation angewandt. Die Ergebnisse

der Vorstudie wurden als Erkenntnisse zur Blauzapfenstimulation kumuliert. In der Hauptstudie erfolgte die genaue Untersuchung eines neuen Stimulationsparadigmas.

4.4.1.d. Vorstudie des Blauzapfens ERG:

1. Für die Stimulation der Blauzapfen wurde die blaue LED (470nm) ausgewählt. Die ERG Messungen zur Vorstudie der Blauzapfenantwort liefern nur Hinweise. Dementsprechend finden sich in einigen Messungen der Vorstudie gleich mehrere Parameter, die verändert wurden. Zum Einen wird dadurch die Reproduktion der Ergebnisse eingeschränkt, zum Anderen jedoch eine nur richtungsweisende Aussage ermöglicht. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der Vorstudie nur als Hinweise für die daraus entstandenen Erkenntnisse zu sehen.

Es wurde nach der Definition der Stimulationsfarbe versucht eine optimale Hintergrundbeleuchtung zu deklarieren. Zu den vorgegebenen Kriterien, die mittel- und langwelligen Zapfen möglichst gut zu sättigen, standen zwei Farben als Hintergrundbeleuchtung zur Wahl. Es wurden einzelne Versuche mit der Farbe Gelb und Orange durchgeführt. Gelb wurde als eine Mischfarbe durch die rote (635nm) und grüne (513nm) LED produziert. Für die Farbe Orange stand eine separate orange LED mit der Wellenlänge 594nm zur Verfügung.

Die Hintergrundbeleuchtung musste zunächst eine gewisse Intensität aufweisen, um die mittel- und langwelligen Zapfen adaptieren zu können [Abbildung 4.50+Abbildung 4.51].

[25.01.2011]

Messung Proband 1 (10.01.06) und Proband 2 (17.01.06):

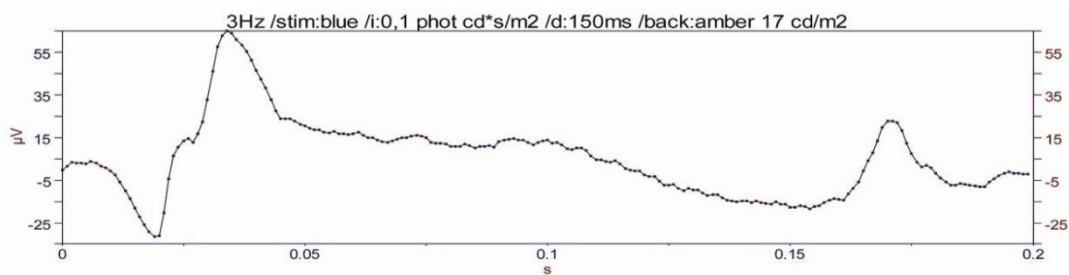


Abbildung 4.50: Eine ERG-Kurve der 3Hz Stimulation mit blauer LED bei 0,1 phot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ und einer Pulszeit von 150ms auf einer permanenten Hintergrundbeleuchtung von 17 phot cd/m^2 , generiert von der orangen LED. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:aus; Mittelung von 40 Einzelantworten}

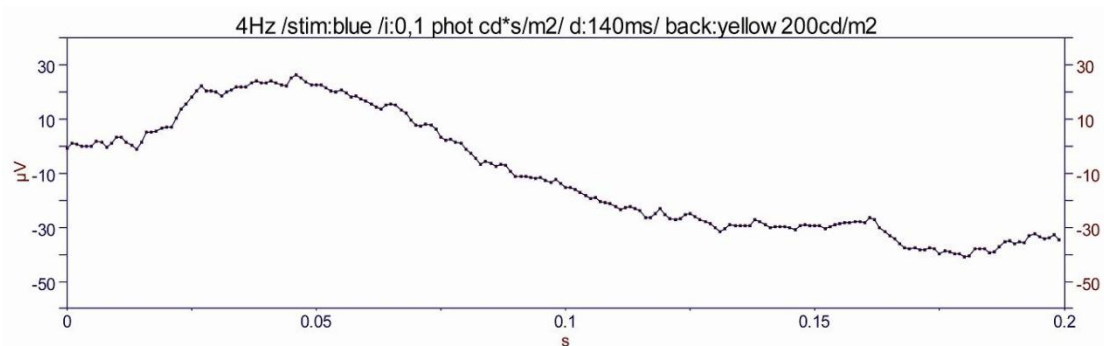


Abbildung 4.51: 4Hz Stimulation mit blauer LED bei 0,1 phot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ auf einer gelben Hintergrundbeleuchtung mit 200 phot cd/m^2 . Die Pulszeit betrug 140ms. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:aus; Mittelung von 67 Einzelantworten}

Im Vergleich zur Messung von Proband 1 erreicht die b-Welle von Proband 2 einen späteren und kleineren Höhepunkt (46ms) mit ca. $26\mu\text{V}$ als die b-Welle von Proband 1 (34ms) mit ca. $65\mu\text{V}$. Das Auftreten einer a-Welle bei der Anwendung von niedrigen Intensitäten für die Hintergrundbeleuchtung (Proband 1) ist ein Indiz für ein schnelles Potential, das von den mittel- und langwelligen Zapfen generiert wird. Diese a-Welle verschwindet bei der Messung mit einer helleren Hintergrundbeleuchtung (Proband 2). Als weiteres Merkmal fällt die deutliche Off-Antwort nach der Pulszeit von 150ms bei der Messung mit weniger intensiver Hintergrundbeleuchtung auf [Abbildung 4.50]. Eine Off-Antwort ist dagegen bei der Messung von Proband 2 nicht zu sehen. Es tritt jedoch ein spätes negatives Potential nach der Pulszeit von 140ms bei Proband 2 auf [Abbildung 4.51]. Diese Auffälligkeiten bei

[25.01.2011]

Proband 2 sind wichtige Charakteristika für die Blauzapfen ERG Antwort und werden in der folgenden Abbildung zusammengefasst [Abbildung 4.52]. Da bei dieser Gegenüberstellung mehrere Parameter verändert wurden, können Rückschlüsse nur mit Vorbehalt gezogen werden. Die Versuchskonstellation diente der Veranschaulichung der charakteristischen Eigenschaften der Blauzapfenantwort im Vergleich zu einer Antwort, die hauptsächlich von den Grün- und Rotzapfen dominiert wird. Die Zusammenfassung beider Ableitungen verdeutlicht die Unterschiede zwischen beiden Messungen.

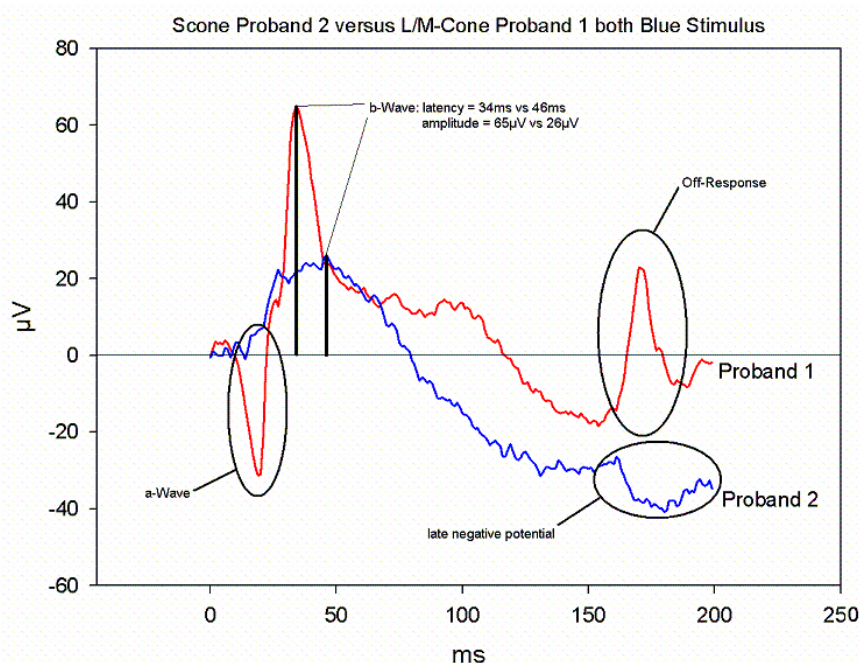


Abbildung 4.52: Zusammenfassung der Kurven aus Abbildung 4.50 (rot) und Abbildung 4.51(blau). Kennzeichnung der a- und b-Wellenamplitude und Gipfelzeit. Die Off-Antwort (Off-Response) und das späte negative Potential (late negative potential) wurden in beiden Kurven gekennzeichnet. Die blaue Kurve stellt eine typische Blauzapfenableitung dar, und soll der Grün- und Rotzapfen-dominierten Antwort (rot) gegenüber gestellt werden.

2. Durch die Anwendung der orangen Hintergrundbeleuchtung waren geringere Intensität notwendig, um einen höheren Grad an Adaptation der mittel- und kurzwelligen Zapfen zu ermöglichen [Abbildung 4.53]. Die Hintergrundbeleuchtung mit der orangen LED zeigte bei einer Intensität von 50 phot. cd/m² einen späteren Höhepunkt der b-Wellenamplitude als die Messung mit der gelben Hintergrundbeleuchtung bei einer Intensität von 100 phot. cd/m². Weiterhin ist das geringe Potential unter

[25.01.2011]

Anwendung der gelben Hintergrundbeleuchtung im Gegensatz zur orangen Hintergrundbeleuchtung zu beachten. Dennoch zeigt dieses geringe aber auch sehr viel schnelleres Potential eine deutliche Off-Antwort. Wichtig ist hierbei, dass bei konstanter Intensität des blauen Stimulus die Pulszeit bei der Messung mit dem orangen Hintergrund 150ms betrug, wobei der Stimulus bei der gelben Hintergrundbeleuchtung nur 100ms dauerte. Das heißt, dass bei der Messung mit der orangen Hintergrundbeleuchtung sogar eine größere Lichtenergie auf die Zapfen während der Stimulation wirkte, als bei der Messung mit der gelben Hintergrundbeleuchtung.

Messung Proband 2 (22.03.06):

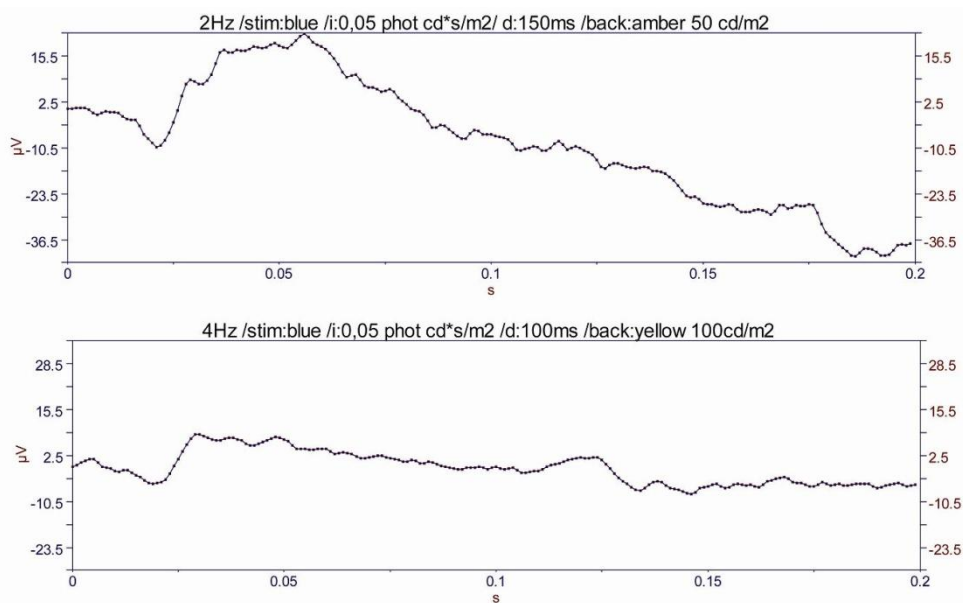


Abbildung 4.53: Blauzapfenstimulation mit unterschiedlichen Hintergrundbeleuchtungen, oben generiert durch die orange LED (50 phot cd/m²) und unten von der gelben LED (100 phot cd/m²). Die Stimulationsintensität war bei beiden Messungen gleich (0,05 phot cd*s/m²) und die Pulszeit variierte von 100ms (unten) auf 150ms (oben).

Bei höherer Lichtenergie wären demnach auch mehr mittel- und langwellige Zapfenanteile in der ERG Antwort zu erwarten. Jedoch scheint die orange Hintergrundbeleuchtung durch die Sättigung der Grün- und Rotzapfen der suppressierende Faktor für die unerwünschten mittel- und langwelligigen Zapfenanteile zu sein. Zusätzlich lässt sich aus

[25.01.2011]

den Messungen ableiten, dass eine 2Hz Stimulation für die ERG Ableitung des Blauzapfens möglicherweise besser geeignet ist, als eine 4Hz Stimulation.

3. Die Pulszeit wurde nur exemplarisch untersucht. Es ließ sich zeigen, dass eine Verlängerung der Pulszeit von 100ms auf 130ms keine wesentlichen Änderungen am Blauzapfen ERG bewirkte [Abbildung 4.54].

Messung Proband 1 (15.03.06)

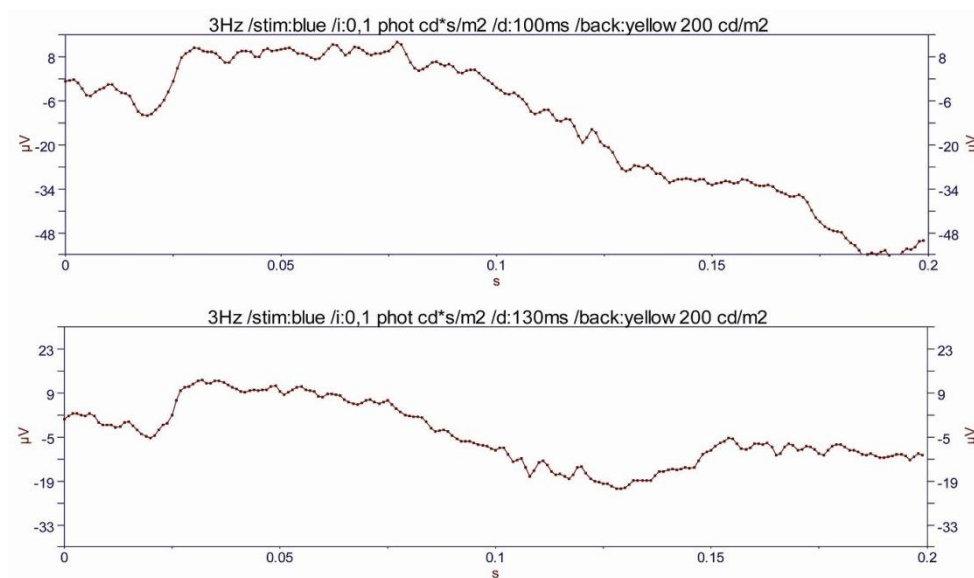


Abbildung 4.54: Blauzapfenstimulation mit konstanter Einstellungen (Stimulationsintensität 0,1 phot cd*s/m², gelbe Hintergrundbeleuchtung 200 cd/m², 3Hz Blaustimulation) und variierenden Pulszeiten von 100ms auf 130ms. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:aus; Mittelung von oben 56 und unten 65 Einzelantworten}

Die Ableitung mit einer Pulszeit von 130ms löst ein etwas schnelleres Potential aus, das zuvor eine kleine negative Welle aufweist. Dieses negative Potential kann als a-Welle interpretiert werden [Abbildung 4.54 unten]. Die Höhe der b-Welle ist jedoch bei beiden Ableitungen annähernd gleich. Die ERG-Messung mit 100ms zeigt eine längere Gipfelzeit der b-Welle und ebenfalls eine kleine a-Welle. Die Anwendung kurzer Pulszeiten von wenigen Millisekunden macht eine Unterscheidung zwischen Grün- und Rotzapfenantworten und den ERG Antworten der

[25.01.2011]

Blauzapfen schwierig. Eine Off-Antwort kann unter Anwendung von kurzen Pulszeiten bei den Grün- und Rotzapfen im ERG nicht identifiziert werden. Die Anwendung von lang andauernden Pulszeiten (z.B. 100ms) ermöglicht eine einfache Identifizierung von Off-Antworten im ERG. Aus diesem Grund wird die Stimulation mit langen Pulszeiten von ca. 100ms bevorzugt. Ein Unterschied zwischen einer Pulszeit von 100ms und 130ms kann nicht identifiziert werden.

4. Durch die folgenden Messungen wurde die Intensität variiert, um exemplarisch die Effekte der Intensitätserhöhung auf das Blauzapfen ERG zu untersuchen [Abbildung 4.55+Abbildung 4.56].

Messung Proband 1 (15.03.06)

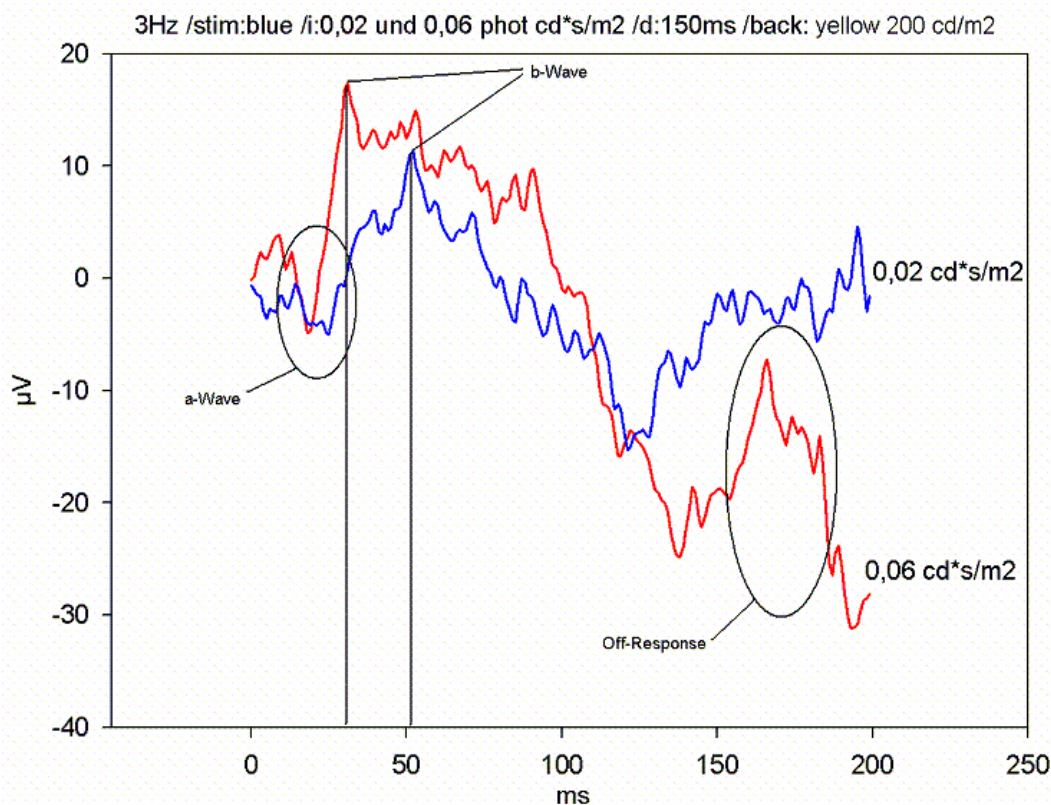


Abbildung 4.55: Blauzapfenstimulation bei 3Hz mit einer Intensität von 0,02 (blau) und 0,06 (rot) phot cd*s/m², konstanten Pulszeiten von 150ms und einer gelben Hintergrundbeleuchtung mit 200 phot cd/m². Gekennzeichnet sind die a-Wellen (a-Wave) und die b-Wellen (b-Wave), sowie die Off-Antwort (Off-Response). Wahrscheinlich löst eine Intensität von 0,06 cd*s/m² bereits eine Grün- und Rotzapfen dominierte ERG-Antwort aus (rot) im Vergleich zur Intensität von 0,02 cd*s/m² (wahrscheinlich Blauzapfenantwort). {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:1,25-300Hz; Mittelung von 68 (blau) und 44 (rot) Einzelantworten}

[25.01.2011]

Messung Proband 2 (22.03.06)

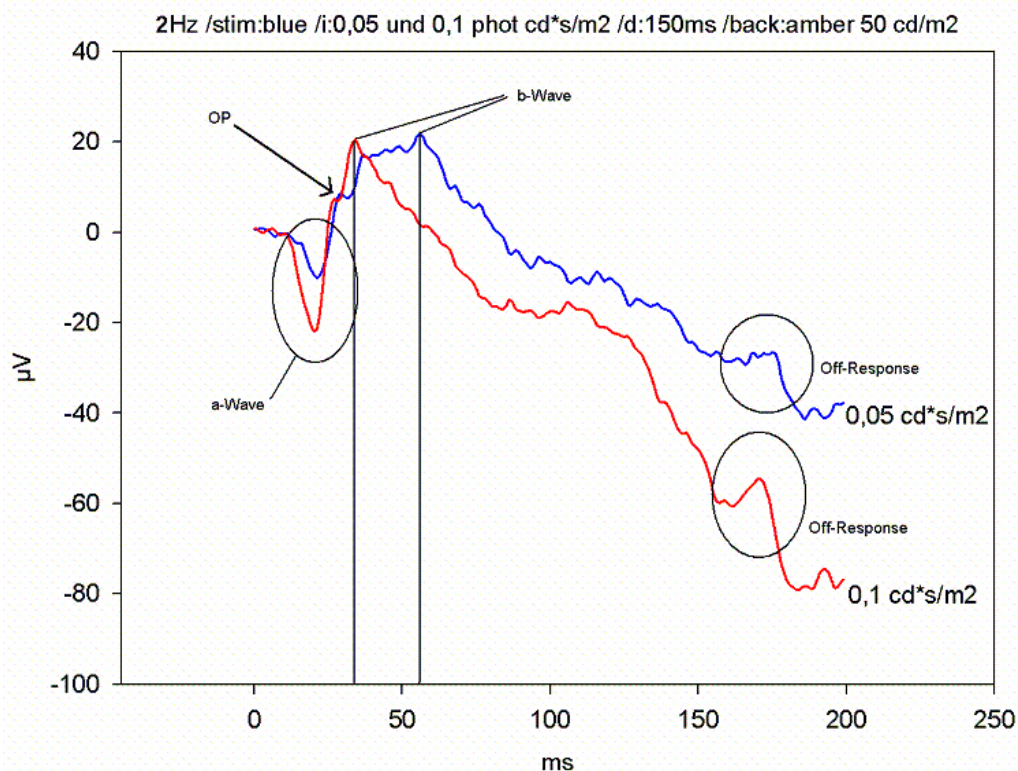


Abbildung 4.56: Blauzapfenstimulation bei 2Hz mit Intensitäten von 0,05 (blau) und 0,1 (rot) phot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$, Pulszeit 150ms und einer orangen Hintergrundbeleuchtung mit 50 phot cd/m^2 . Die blaue Kurve zeigt zwar eine späte b-Welle, so wie es für die Blauzapfenantwort definiert ist, jedoch weist die ERG-Antwort auch eine a-Welle und eine kleine Off-Antwort aus. Die OPs beider Kurven treten zeitlich identisch. Zusammengefasst lässt sich in beiden Kurven eine Beteiligung der Grün- und Rotzapfen zeigen. In der blauen Kurve ist jedoch durch die langsame b-Welle eine Blauzapfenkomponente erkennbar. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:1,25-300Hz; Mittelung von 44 (blau) und 38 (rot) Einzelantworten}

Zusammenfassend lässt sich für eine Erhöhung der Stimulationsintensität von 0,04 oder 0,05 phot $\text{cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ eine klare Veränderung im Blauzapfen ERG erkennen. Bei den höheren Intensitäten zeigen sich bei beiden Probandenmessungen eine kürzere b-Wellen Gipfelzeit in Kombination mit einer tieferen a-Welle und größeren Off-Antworten als bei Anwendung von geringen Intensitäten. Durch einen Vergleich der beiden Probandenmessungen wird der interindividuelle Unterschied der zwei Blauzapfenableitungen deutlich. Proband 2 erreicht eine Amplitude von 27 μV bei 55ms Gipfelzeit und Proband 1 von 16 μV bei 52ms Gipfelzeit.

4.4.1.e. Erkenntnisse aus der Vorstudie:

Aus der Vorstudie resultierten Erkenntnisse, die für die optimale Stimulation der kurzwelligen Zapfen in der Hauptstudie beachtet werden müssen.

- 1.) Vor einer Stimulation der Blauzapfen sollte eine intensive orange Hintergrundbeleuchtung (mindestens 40 phot cd/m² [entspricht ca. 2000 phot td bei 8mm Pupillendurchmesser]) für mindestens 10 Minuten dargeboten werden, um eine Sättigung der Stäbchen und der mittel- und langwelligen Zapfen zu gewährleisten.
- 2.) Die Frequenz der Stimulation sollte so niedrig wie möglich sein, um den Einfluss der mittel- und langwelligen Zapfen zu minimieren und ein möglichst hohes Blauzapfenpotential auszulösen.
- 3.) Um die Anteile von Grün- und Rotzapfenantworten in der ERG Antwort möglichst einfach zu identifizieren, werden für die Pulszeit in der Hauptstudie mindestens 100ms festgelegt. Unter Anwendung einer lang andauernden Pulszeit (100ms) kann eine Off-Antwort, als ERG-Anteil der mittel- und langwelligen Zapfen, einfach erkannt werden. Somit wird eine Differenzierung zwischen einer weitgehend von den Blauzapfen generierten Antwort und Einflüssen der mittel- und langwelligen Zapfen auf einfachem Wege möglich.
- 4.) Während der Stimulation des Blauzapfens wird die Hintergrundbeleuchtung durch die orange LED mit der Wellenlänge 594nm permanent dargeboten um den Adaptationszustand der Stäbchen und der Zapfen zu gewährleisten.
- 5.) Die Intensität und der Vergleich verschiedener Stimulationsfarben soll in der Hauptstudie näher untersucht werden.

4.4.2. Neues Paradigma für das Blauzapfen-ERG:

Unter Beachtung der aus der Vorstudie resultierenden Faktoren wurde ein neues Stimulationsparadigma für den Blauzapfen erstellt [Tabelle 7.1]. Dieses Paradigma beinhaltet zunächst eine Umgehung der 10 minütigen

Adaptationszeiten vor der Stimulation der Blauzapfen. Durch ein Stimulationsprogramm, das zwei intensive Sättigungsblitze vor dem Blauzapfenblitz generiert, wurde eine Sättigung der Grün- und Rotzapfen und damit eine Umgehung der 10 minütigen spektralen Adaptationsphase erreicht. Die zwei Sättigungsblitze wurden auf einer orangen Hintergrundbeleuchtung von 90-100 phot cd/m² dargeboten. Während des gesamten Stimulationsprogramms wurde die Hintergrundbeleuchtung permanent generiert. Die Intensität der Sättigungsblitze wurde auf 1000 phot cd/m², die maximale Intensität der roten LED, adjustiert. Die Pulszeit der Sättigungsblitze wurde variiert. Bei einer Intensität von 1000 phot cd/m² und einer Hintergrundbeleuchtung von 90-100 cd/m², konnte eine Beteiligung der Stäbchen ausgeschlossen werden. Die folgende Probandenmessung verdeutlicht das neu entwickelte Paradigma [Abbildung 4.57].

Messung Proband 5 (03.04.2007)

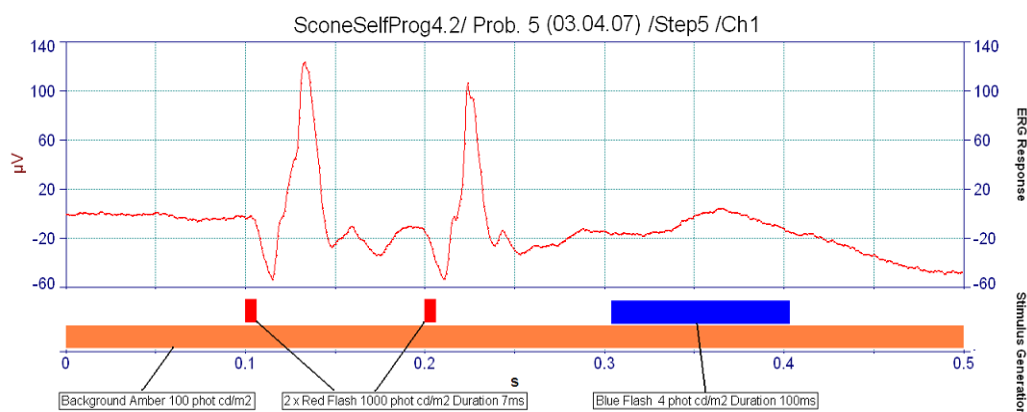


Abbildung 4.57: Neues Blauzapfenparadigma mit der zeitlichen Abfolge der einzelnen Blitze (unten rote und blaue Balken) und der Hintergrundbeleuchtung (oranjer Balken) mit der resultierenden ERG-Kurve (oben rote Kurve). Die Stimulation erfolgte auf einer orangen Hintergrundbeleuchtung mit 100 phot cd/m². Zunächst wurden 2 rote Sättigungsblitze (rote Balken) mit 1000 phot cd/m² mit einer Pulszeit von 7ms generiert, um die Grün- und Rotzapfen zusätzlich zum Hintergrund zu sättigen. Daraufhin wurde eine Blaustimulation mit 4 phot cd/m² und einer Pulszeit von 100ms generiert. Die resultierende ERG Kurve zeigt zwei schnelle, hochamplitudige Potentiale, die durch die roten Blitze hervorgerufen wurden, und ein langsames, für die Blauzapfenableitung typisches Potential. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:off; Mittelung von 20 Einzelantworten; x-Achse=Zeitliche Auflösung in s; y-Achse= μV }

Durch die Wahl der roten LED für die Sättigungsblitze wurde die spektrale Empfindlichkeit der kurzwelligen Zapfen nur minimal betroffen. Gleichzeitig

[25.01.2011]

konnte bei 635nm eine selektive Sättigung der mittel- und langwelligen Zapfen ermöglicht werden. Die beiden Sättigungsblitze wurden in einem festen zeitlichen Abstand dargeboten. Nach den Adaptationsblitzen folgte in einem zeitlichen Abstand von 80-120ms der Blaublitz für die Stimulation der Blauzapfen. Diese zeitliche Distanz musste eingehalten werden, um die i-Welle und die PhNR des zweiten Sättigungsblitzes aufzuzeichnen. Weiterhin sollten Nachschwingungen durch die intensive Sättigungsstimulation in der Blauzapfenantwort dadurch vermieden werden. Die kurzwelligen Zapfen wurden durch einen Blaublitz gereizt. Die Einstellungen der Intensität und der Pulszeit wurden untersucht.

Die zwei Adaptationsblitze lösen jeweils eine hohe (ca. 177 und 159 μ V) und schnelle (33 und 24ms) b-Welle aus. Eine tiefe a-Welle von ca. 51 und 38 μ V geht der b-Welle voraus. Das kennzeichnet eine eindeutige mittel- und langwellige Antwort im ERG aus. Der nachfolgende Blaublitz löst dagegen eine langsame (60ms) und niedrige (22,5 μ V) b-Welle aus. Ein Fehlen der Off-Antwort und die Wellenkonstellation des langsamen Potentials lässt eine Blauzapfenantwort vermuten [Abbildung 4.57].

Durch die zeitliche Extraktion der Blauzapfen-Stimulation und –Antwort (304 bis 500ms) wird die Beurteilung der Blauzapfenantwort einfacher [Abbildung 4.58].

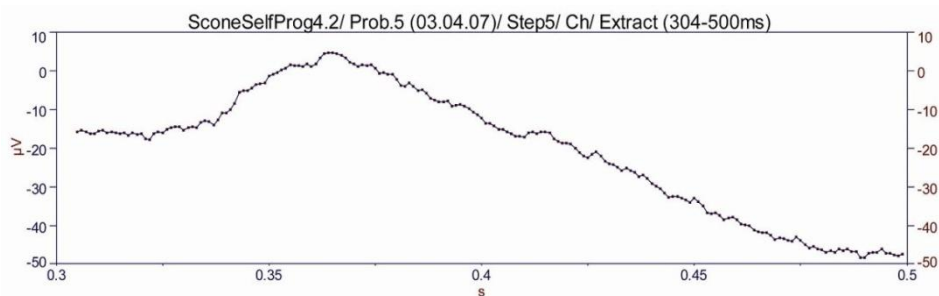


Abbildung 4.58: Extraktion der Blauzapfenstimulation (304-500ms) aus der ERG-Kurve des neu entwickelten Blauzapfenparadigmas aus Abbildung 4.57. In dieser Zeit erfolgte die Blauzapfenstimulation mit der blauen LED bei 4 phot cd/m² und einer Pulszeit von 100ms auf einem orangen Hintergrund mit 100 phot cd/m². Der Stimulus setzte bei 304ms ein und dauerte bis 404ms an. Es ist eine langsame b-Welle mit einem Höhepunkt bei 364ms (entspricht 60ms nach Stimulationsbeginn) zu erkennen. Die Höhe der b-Wellenamplitude entspricht 22,5 μ V. Es ist keine a-Welle und keine Off-Antwort zu erkennen. Zusammengefasst lässt sich eine Blauzapfenantwort identifizieren.

Die b-Welle erreicht ein Maximum mit ca. 22,5 μ V bei 364ms. Eine a-Welle oder eine Off-Antwort können nicht identifiziert werden. Nach den Kriterien der

Blauzapfenantwort handelt es sich bei dieser Ableitung wahrscheinlich um ein Blauzapfenpotential.

4.4.3. Optimierung des neuen Blauzapfenparadigmas

4.4.3.a. Untersuchungen zu den Adaptationsblitzen

Das entwickelte Paradigma wurde genauer untersucht. Die Einstellungen der Adaptationsblitze, die Intensität und die Pulszeit der Blauzapfenstimulation standen dabei im Vordergrund. Die Stimulationsintensität der Adaptationsblitze wurde nicht verändert. Für die Stimulation des Blauzapfens sollen möglichst wenig mittel- und langwellige Zapfenanteile in der ERG Antwort enthalten sein. Um die mittel- und langwelligen Zapfen weitgehend zu adaptieren wird die maximale Intensität für den Rotblitz mit 1000 phot cd/m² verwendet.

Messung Proband 4(19.08.07), Proband 5(19.05.07) und Proband 13(25.05.07):

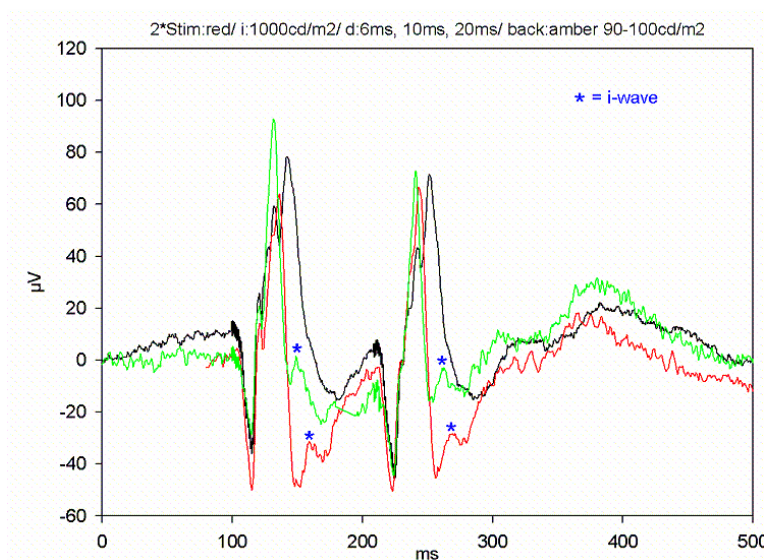


Abbildung 4.59: Blauzapfenparadigma an 3 Probanden bei konstanter Intensität der Adaptationsblitze (1000 phot cd/m²) und variierender Pulszeit von 6ms (Proband 13 = grüne Kurve), 10ms (Proband 4 = rote Kurve) und 20ms (Proband 5 = schwarze Kurve) und einer orangenen Hintergrundbeleuchtung mit 90-100 phot cd/m². i-Wellen der jeweiligen Ableitungen gekennzeichnet. Die i-Welle kann bei 20ms nicht identifiziert werden. {Abtastfrequenz:1000Hz Proband 4, 2000Hz Proband 5 und 13; Filter:aus; Mittelung von 10 (Proband 4), 14 (Proband 5) und 19 (Proband 13) Einzelantworten}

Die optimale Pulszeit der Adaptationsblitze wurde nur orientierend anhand von

3 Probandenmessungen untersucht. Es wurden die Pulszeiten 6ms, 10ms und 20ms bei 3 verschiedenen Probanden untersucht [Abbildung 4.59]. Die Intensität der Rotblitze war bei allen Untersuchungen mit 1000 phot cd/m² konstant. Es ist zu erkennen, dass bei der Anwendung einer Pulszeit von 20ms die Rotstimuli keine i-Welle aufweisen [Abbildung 4.59 „*“]. In der Probandenmessung mit 10ms Pulszeit ist zwar eine deutliche i-Welle zu verzeichnen, jedoch befindet sich diese in einem relativ großen Tief der b-Welle. Zusätzlich wird die i-Welle durch den darauf folgenden aufsteigenden Schenkel deformiert. Im Vergleich dazu ist die i-Welle unter Verwendung einer kurzen Pulszeit von 6ms deutlicher zu differenzieren. Aus diesen Gründen wird in der Hauptstudie eine kurze Pulszeit von 4ms für die Stimulation der mittel- und langwelligen Zapfen verwendet.

4.4.3.b. Untersuchungen zum Blauzapfenstimulus

Durch Serien von ERG-Messungen wurde versucht eine optimale Intensität für die Blauzapfenstimulation zu extrahieren.

Die Untersuchung beinhaltete insgesamt 14 Einzelmessungen, in denen die Intensität des blauen Blitzes von 0,5 bis 14 phot. cd/m² variiert wurde. Die Pulszeit des blauen Blitzes betrug 100ms. Die Intensität der beiden Adaptationsblitze wurde auf 1000 phot. cd/m² bei einer Pulszeit von 20ms adjustiert. Zu beachten ist, dass der Blaublitz nach 330ms einsetzte. In der Messung mit der niedrigsten Intensität (0,5 phot cd/m²) des Blaublitzes ist die Einsatzzeit der b-Welle [Abbildung 4.60 „b“] mit 80ms am langsamsten und am kleinsten (ca. 12,4µV) im Vergleich zu den anderen Stimuli der Serie. Die Einsatzzeiten der restlichen Stimuli betragen zwischen 64,5ms (2 phot cd/m²) und 46,5ms (10 phot cd/m²). Bei einer Stimulationsintensität von 10 phot cd/m² wurde die höchste b-Wellenamplitude mit ca. 28,6µV erreicht. Eine deutliche Off-Antwort im Blauzapfen ERG wurde ab einer Intensität von 11 phot cd/m² registriert [Abbildung 4.60 „off“]. Ab einer Intensität von 11 bis 12 phot cd/m² wird eine flache a-Welle sichtbar [Abbildung 4.60 „a“].

Messung Proband 5 (19.05.2007)

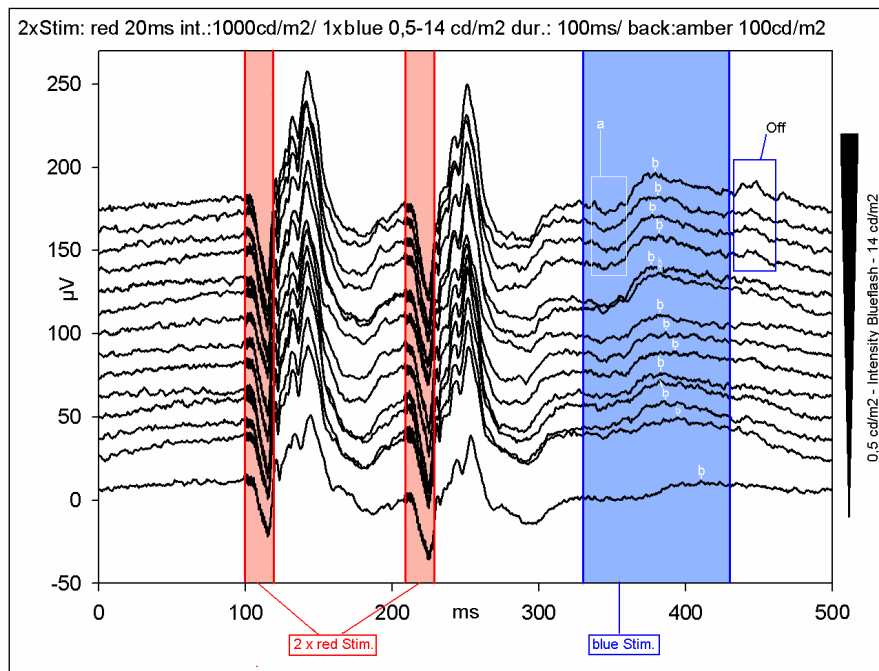


Abbildung 4.60: Intensitätsserie („blue Stim“ von unten nach oben Intensität 0,5-14 phot cd/m²zunehmend) des neuen Blauzapfenparadigmas. Stimulation umfasste zwei rote Sättigungsblitze mit einer Intensität von 1000 phot cd/m², einer Pulszeit von 20ms (rote Balken stellen den zeitlichen Zusammenhang im ERG dar = „2xred Stim“) und einem blauen Stimulus (blauer Balken) mit 100ms Pulszeit. Hintergrundbeleuchtung mit 100 phot cd/m². Mit „b“ sind die b-Wellen des Blauzapfenstimulus eingezeichnet. Das weiße Rechteck zu dem „a“ kennzeichnet das Auftreten einer minimalen a-Welle ab einer Intensität von 12 phot cd/m². Off-Antworten sind mit einem blauen Rechteck ab einer Intensität von 11 phot cd/m² dargestellt. {Abtastfrequenz:2000Hz; Filter:off; Mittelung von 11 bis 20 Einzelantworten; rechtes Auge}

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass eine Stimulation der Blauzapfen mit Intensitäten über 11 phot cd/m² und unter 2 phot cd/m² nicht sinnvoll ist. Über 11 phot cd/m² erscheint eine deutliche Off-Antwort. In Kombination mit einer flachen a-Welle bei 11 phot cd/m² ist dies ein Zeichen für eine hohe Beteiligung der mittel- und langwelligen Zapfen an der ERG Antwort. Unter 2 phot cd/m² wird nur eine minimale b-Welle erwartet, womit eine Messung unter dieser Intensität für die Hauptstudie nicht geeignet ist.

Die Pulszeit der Blauzapfenstimulation wurde im nächsten Schritt auf 150ms verlängert und mit den bisherigen Probandenmessungen (100ms Blaustimulus) verglichen. Es wurden Intensitäten von 3 und 4 phot cd/m² für den Blaustimulus untersucht [Abbildung 4.61]. Die Einsatzzeiten der Blaublitze waren unterschiedlich. Durch die verlängerte Pulszeit des Blaublitzes mussten die zeitlichen Abstände zwischen allen Stimuli verändert werden, um eine

Verlängerung der Gesamtmessung zu vermeiden. Die Intensität und Pulszeit der Sättigungsblitze war bei beiden Messungen identisch. Die Hintergrundbeleuchtung wurde bei der Messung von Proband 5 auf 100 cd/m² und bei Proband 4 auf 90 cd/m² justiert. Es kann jedoch angenommen werden, dass die Intensitätsänderung der Hintergrundbeleuchtung in diesem Rahmen keine Einflüsse auf das ERG hatte.

Messung Proband 4 (19.08.2007) und Proband 5 (19.05.2007):

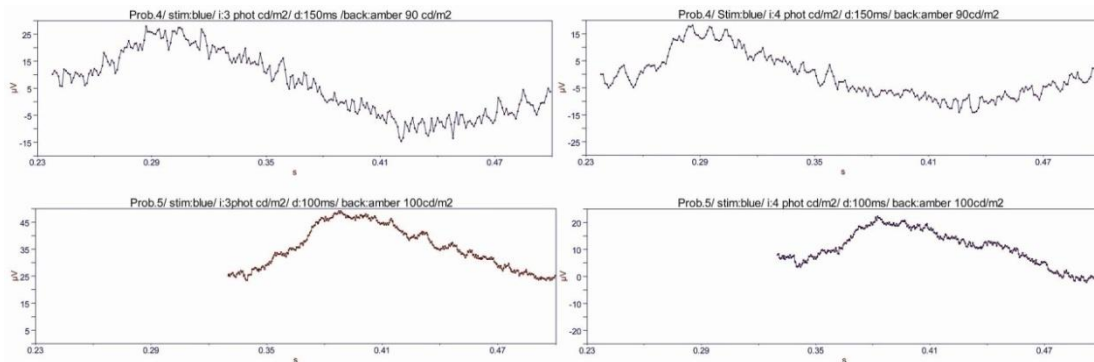


Abbildung 4.61: Blauzapfenstimulation mit dem neuen Paradigma bei 2 Probanden (oben Proband 4, unten Proband 5) mit verlängerter Pulszeit (150ms) bei 2 Intensitäten (links 3, rechts 4 phot cd*s/m²). ERG Kurve von Proband 4 (oben) zeigt bei beiden Messungen deutlich größere Rauschartefakte als die Messung von Proband 5 (unten). {Abtastfrequenz:1000Hz (oben) und 2000Hz (unten); Filter: aus; Mittelung von 10 (oben) und 19 (unten) Einzelantworten}

Da vor allem die Untersuchung von Proband 4 eine sehr verrauschte ERG Antwort erbrachte und die Wahl eines geeigneten Höhepunkts der b-Welle schwierig war, wurden bei beiden Probanden nur die gefilterten Ableitungen untersucht. Die Filterung erfolgte mit einer Einstellung von 0-30Hz (Bandpassfilter). Die Ergebnisse der Auswertung wurden in der Tabelle zusammengefasst [Tabelle 4.2].

Messung	Intensität 3 phot cd/m ²		Intensität 4 phot cd/m ²	
100ms (Prob.5)	23,57µV	60ms	17,23µV	54ms
150ms (Prob.4)	20,34µV	57ms	17,42µV	52ms
	Amplitude	Gipfelzeit	Amplitude	Gipfelzeit

Tabelle 4.2: Ergebnisse aus der obigen Blauzapfenmessung. Untersucht wurde die b-Wellenamplitude und Gipfelzeit der Blauzapfenstimulation bei beiden Probandenmessungen. Die Messwerte gingen aus der gefilterten Antwort (0-30Hz) hervor. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Probandenmessungen lässt sich nicht ausfindig machen.

Es lässt sich zwischen den einzelnen Stimulationsverfahren kein auffälliger Unterschied ermitteln [Tabelle 4.2]. Bei beiden Messungen liegen die Gipfelzeiten über 50ms. Die b-Wellenamplituden bleiben beinahe identisch, wobei zu beachten ist, dass beide Messungen bei unterschiedlichen Probanden durchgeführt wurden. Bei der Messung mit 150ms (Proband 4) ist jedoch aufgefallen, dass diese Messung viele Artefakte aufwies, die durch Augenbewegungen oder Lidschlussbewegungen entstanden sind. Die Messung mit 150ms wurde subjektiv von den Probanden als anstrengender empfunden als die Messung mit 100ms Pulszeit. Daher kann zusammenfassend eine Stimulation mit 150ms im Hinblick auf eine möglichst artefaktarme ERG Aufzeichnung nicht befürwortet werden. Zusätzlich bleibt ein Effekt in der b-Welle des Blauzapfen ERGs durch die Verlängerung der Pulszeit um den Faktor 1,5 aus. Somit wird in der Hauptstudie für die Blauzapfenstimulation eine Pulszeit von 100ms gewählt.

4.4.4. Verifizierung der Protokolleinstellungen (Hauptstudie des Blauzapfen-ERG)

In der Hauptstudie wurde das neue Paradigma mit definierten Einstellungen, die aus der Vorstudie resultierten, untersucht. Die Sättigungsblitze wurden für 4ms mit einer Intensität von 1000 phot cd/m² generiert. Vor dem ersten Sättigungsblitz wurde für 80ms die Hintergrundbeleuchtung ohne Stimulus dargeboten. Zwischen den beiden Sättigungsblitzen wurde ein zeitlicher Abstand von 92ms festgesetzt. Der Blaublitz folgte 120ms nach dem zweiten Sättigungsblitz mit einer Pulszeit von 100ms. Die detaillierte Definition der ERG Einstellungen für die Hauptstudie des Blauzapfen-ERG werden im Appendix erläutert [Tabelle 7.6]. Die Intensität des Blaublitzes wurde an einer Serie von Messungen mit variierenden Intensitäten untersucht. Während der gesamten Stimulation war die Hintergrundbeleuchtung mit 90 phot cd/m² konstant aktiv.

4.4.4.a. Verifizierung der Blauzapfenstimulation

An acht Probandenmessungen erfolgte die Messung einer Intensitätsserie für die Blauzapfenstimulation. Die Intensitäten wurden für den blauen Stimulus zwischen 0,01 und 20 phot cd/m² variiert. Das Stimulationsparadigma blieb, wie beschrieben, bei allen Einzelmessungen konstant [Abbildung 4.62].

Messung Proband 16 (15.09.2007)

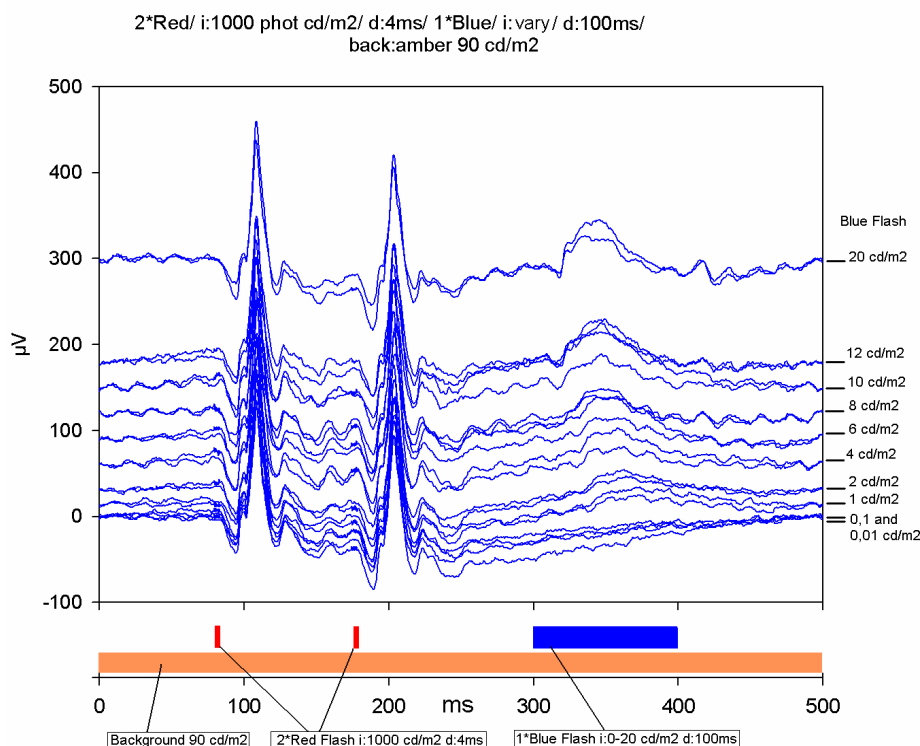


Abbildung 4.62: Intensitätsserie der Blauzapfenstimulation beider Augen mit variierenden Intensitäten der Blaustimulation (0,01-20 phot cd/m²). Außer der Intensitätsänderung waren alle ERG Parameter konstant. Sättigungsblitze jeweils mit 1000 phot cd/m² und 4ms Pulszeit (zwei rote Blaken unten). Hintergrundbeleuchtung von 90 phot cd/m² (oranger Balken unten). Aus dieser Untersuchung erfolgte der Ausschluss von Intensitäten mit deutlichen a-Wellen oder Off-Antworten aus der Statistik, da diese auf keine reine Blauzapfenantworten deuten. Die übrigen ERG Ableitungen wurden auf die maximale b-Welle untersucht. {Abtastfrequenz:1000Hz; Filter:aus; Mittelung von 10 Einzelantworten}

Aus der gezeigten Probandenmessung lässt sich zunächst der Unterschied zwischen der a- und b-Welle des ersten und des zweiten Rotblitzes erkennen. Deshalb wurde in der Hauptstudie nicht nur die Größe der a- und b-Wellen angegeben, sondern auch das Verhältnis der Wellen des ersten und des zweiten Rotblitzes kalkuliert. Die Entwicklung der b-Welle der Blauzapfen mit

steigenden Stimulationsintensitäten wurde beobachtet. In der gefilterten (Filter = 0-30Hz Nieder- und Hochpassfilter) Antwort lassen sich die einzelnen Komponenten der Blauzapfenantwort, zum Beispiel die Off-Anteile, besser beurteilen [Abbildung 4.63]. Das Auftreten einer a-Welle und die Größe der Off-Antwort wurde in der Extraktion der Blauzapfenantwort (Zeitraum 300-500ms) aus der gesamten ERG Antwort beurteilt.

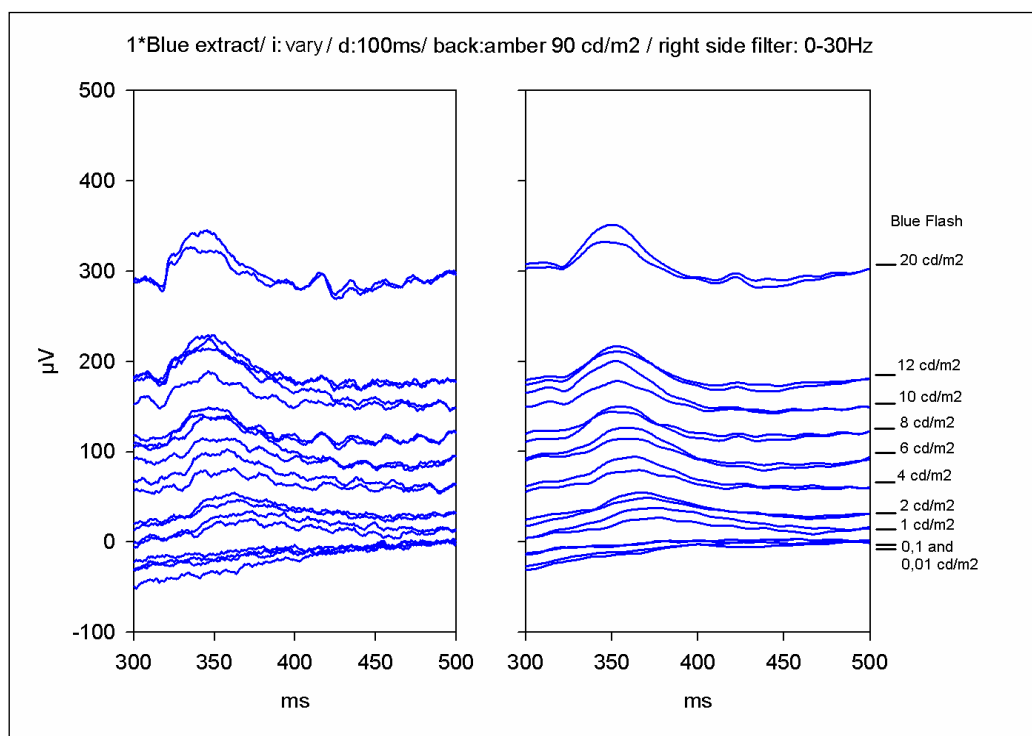


Abbildung 4.63: Extraktion der Blauzapfenantwort aus Abbildung 4.62 (300 bis 500ms). Die ungefilterte ERG Antwort (links) wurde der gefilterten Antwort (rechts 0-30Hz) gegenüber gestellt. Die Off-Antworten und die a-Wellen sind aus der gefilterten Antwort einfacher zu identifizieren, da die Rauschartefakte aus der ungefilterten Antwort exkludiert werden.

In der Probandenmessung ist bei den ERG-Ableitungen mit den Intensitäten von 20, 12 und 8 phot cd/m² eine deutliche Off-Antwort zu erkennen [Abbildung 4.63]. Eine dezente a-Welle tritt erst ab einer Stimulationsintensität von 10 phot cd/m² auf. Das bedeutet, dass eine deutliche Grün- und Rotzapfen Antwort ab einer Intensität von 10 phot cd/m² erkennbar ist.

4.4.4.b. Nachweis der tatsächlichen Blauzapfenantwort

In einer zusätzlichen Untersuchung sollte das Potential, das durch die

[25.01.2011]

Blaustimulation hervorgerufen wird, als tatsächliches Blauzapfenpotential nachgewiesen werden. Hierzu wurden verschiedene Stimulationsfarben anstatt der blauen LED eingesetzt, um die Effekte einer spektralen Differenz am ERG zu untersuchen [Abbildung 4.64].

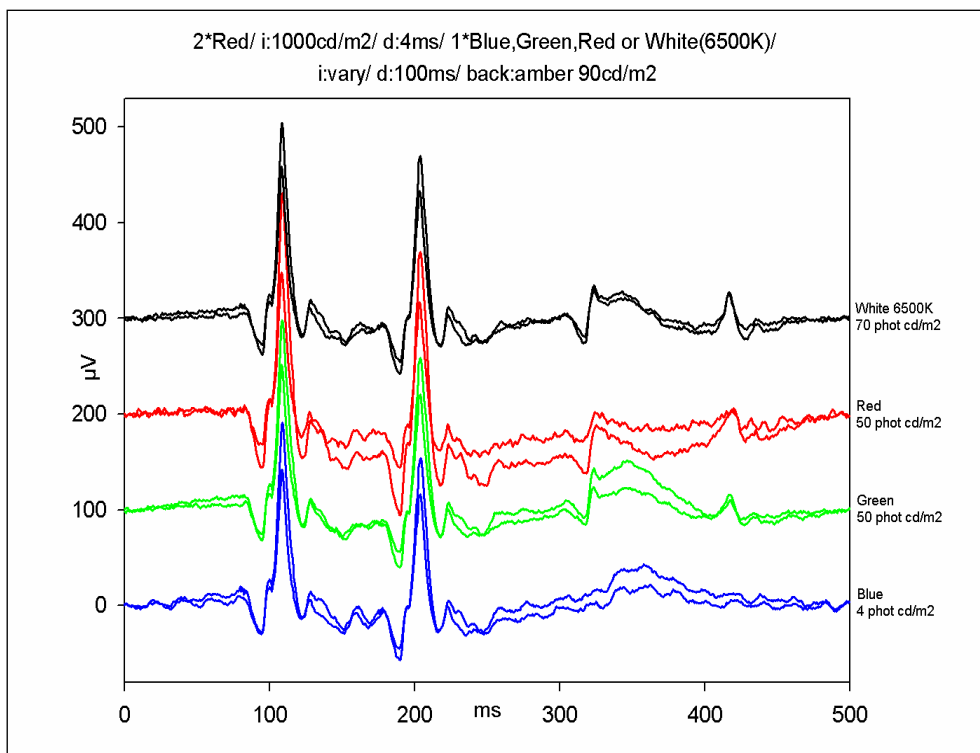


Abbildung 4.64: Auswirkungen spektral unterschiedlicher Stimulationen auf das Blauzapfen-ERG. Untersucht wurde die Anwendung verschiedener Stimulationsfarben (weißes Mischlicht = schwarze Kurve, rote LED = rote Kurve, grüne LED = grüne Kurve) im Vergleich zur blauen LED (blaue Kurve) als Blauzapfenstimulation. Die Sättigungsblitze aller hier dargestellten ERG Kurven wurden mit konstanten Einstellungen generiert. Eine typische Blauzapfenantwort mit langsamer b-Welle, ohne a-Welle und ohne Off-Antwort wird in der blauen ERG-Kurve unter Anwendung der blauen LED mit einer Intensität von 4 phot cd/m² deutlich. Im Gegensatz dazu ist bei allen anderen Ableitungen eine deutliche Off-Antwort und eine a-Welle zu erkennen, was für eine hohe Grün- und Rotzapfenaktivität spricht. Zu beachten ist, dass durch das Mischlicht und die grüne LED neben der schnellen aufsteigenden b-Welle (vermutlich Grün- und Rotzapfenpotential) eine langsame b-Wellenkomponente generiert wird, die zeitlich beinahe identisch zur langsamen b-Welle der Blauzapfenstimulation ist. Solch eine Komponente fehlt der ERG-Kurve, die durch die rote LED ausgelöst wurde. Diese weist nur eine schnelle b-Welle mit einer deutlichen a-Welle und einer Off-Antwort auf.

Dabei kamen das weiße Mischlicht (6500K), die grüne LED (513nm) und die rote LED (635nm) anstatt der blauen LED (470nm) während der Blauzapfenstimulation zum Einsatz. Die Ergebnisse wurden der ERG Antwort mit der blauen LED gegenüber gestellt [Abbildung 4.64]. Im Vergleich zu der Stimulation mit der blauen LED entsteht bei der Anwendung der grünen, der

roten und weißen Stimulationsfarbe eine deutliche Off-Antwort, die durch den positiven Ausschlag nach dem Ende der gesamten Stimulationsdauer (ab 400ms) zu sehen ist. Weiterhin wird bei allen verwendeten Stimulationsfarben, außer der blauen, eine a-Welle verzeichnet. Aus dieser Untersuchung kann der Ursprung der langsamen und allmählich ansteigenden b-Wellen unter Anwendung eines schwachen blauen Lichtstimulus am wahrscheinlichsten auf den Blauzapfen zurückgeführt werden. Im Vergleich dazu weisen die Lichtstimuli der Farbe Grün, Rot und dem Mischlicht Weiß 6500K eine schnell ansteigende und spitze b-Welle auf, was auf die mittel- und langwelligigen Zapfen zurückzuführen ist. Die Stimulation mit der grünen LED und dem weißen Mischlicht zeigen jedoch neben der a-Welle und dem schnellen, steil ansteigenden, initialen Potential eine langsame darauf folgende Komponente [Abbildung 4.65]. Diese Komponente hat, wie die Blauzapfen b-Welle, eine langsame Gipfelzeit und stellt wahrscheinlich eine Blauzapfenbeteiligung dar, da die spektralen Bereiche der grünen LED und des weißen Mischlichtes sich mit der spektralen Empfindlichkeit der Blauzapfen überschneiden. Die rote LED löst im Gegensatz dazu keine Blauzapfenantworten aus, da die spektrale Empfindlichkeit der Blauzapfen bei 635nm (rote LED) sehr minimal ist und von Rot- und Grünzapfen überlagert wird. Eine bessere Beurteilung wird durch die Extraktion des Bereiches von 300-500ms aus der ERG Antwort möglich [Abbildung 4.65]. Die gefilterten (0-30Hz) ERG Antworten des weißen und des grünen Stimulus weisen keine schnelle und steile b-Welle auf. Die a-Welle und die Off-Antwort sind jedoch enthalten. Das zeigt, dass bei der Filterung der ERG Antworten von 0-30Hz Anteile der mittel- und langwelligigen Zapfen teilweise ausgefiltert wurden. Der wahrscheinliche Blauzapfenanteil ist jedoch durch die Filterung nicht beeinflusst worden, was ein weiteres Indiz für die tatsächliche Blauzapfenantwort ist.

Die Gipfelzeit der b-Welle beträgt für die blaue LED 65,5ms für das LA und 63ms für das RA. Unter einer Stimulation mit der grünen LED beträgt die Gipfelzeit 53,5ms für das LA und 52,5 für das RA. Mit 49ms für das LA und 47ms für das RA ist die Stimulation mit der weißen Mischfarbe ähnlich zur grünen LED.

[25.01.2011]

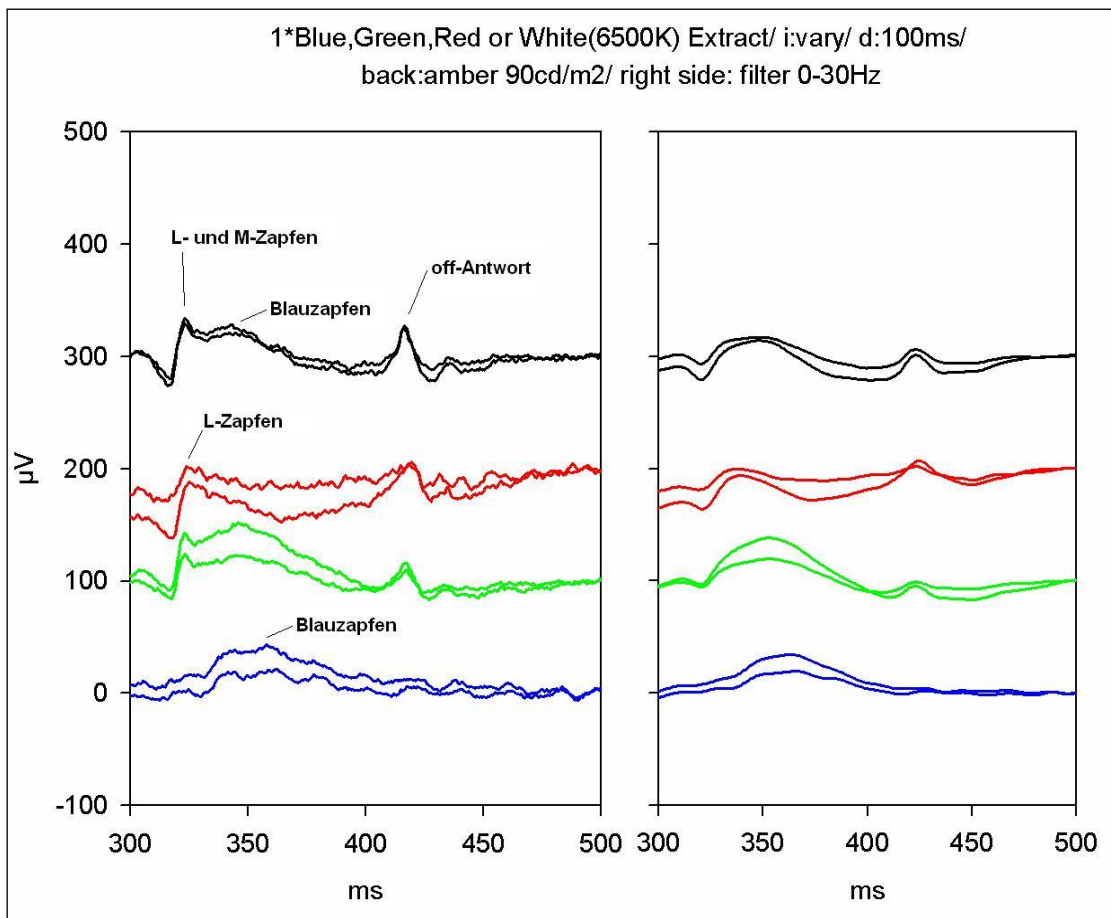


Abbildung 4.65: Extraktion der Blauzapfenstimulation mit unterschiedlichen Stimulationsfarben im Bereich von 300ms bis 500ms aus den ERG-Kurven der Abbildung 4.64. Die ungefilterten Kurven (links) wurden den gefilterten gegenübergestellt (rechts). Zur genauen Definition der Stimulationsparameter siehe Abbildung 4.64. Deutlich ist, dass die steile b-Wellenkomponente der ERG-Kurven, die mit der grünen LED und dem Mischlicht ausgelöst wurden, ausgefiltert werden konnte. Die a-Wellen und die Off-Antwort sind noch vorhanden. Die langsame b-Wellenkomponente der beiden Ableitungen ist jedoch in der gefilterten Kurve noch enthalten und mit der ERG-Kurve, die durch die blaue LED ausgelöst wurde, vergleichbar. Die rote LED weist keine langsame b-Wellenkomponente auf, da sie spektral beinahe keinen Einfluss auf den Blauzapfen hat. Dagegen zeigt die ERG-Kurve der blauen LED nur eine langsame b-Wellenkomponente ohne schnelle Potentiale. Somit ist die langsame b-Wellenkomponente wahrscheinlich eine Blauzapfenantwort und die schnelle, rapide ansteigende Komponente eine Grün- und Rotzapfenantwort.

Die Stimulation mit der roten LED unterscheidet sich wiederum mit einer Gipfelzeit von 38ms für das LA und 39ms für das RA im Vergleich zu den anderen Stimuli. Das ist ein weiterer Hinweis auf den großen Anteil an mittel- und langwelligen Zapfen in der Ableitung mit der roten LED.

4.4.5. Auswertung:

Zunächst erfolgt eine Beschreibung der a- und b-Wellen der Sättigungsblitze. Zusätzlich wurden die n-Wellen der Sättigungsblitze analysiert. Wichtig ist

hierbei, dass die n-Welle von dem Höhepunkt der b-Welle bis zum nachfolgenden negativen Potential gemessen wurde. Ausgewertet wurden die Amplituden der jeweiligen Wellen. Da die Sättigungsblitze in der gesamten Intensitätsserie, also bei insgesamt 10 Messungen pro Proband, mit konstanten Einstellungen generiert wurden, erfolgte die Mittelung der beiden Augen und der 10 Messungen für jeden Probanden. Die Mittelwerte für jeden Probanden wurden getrennt aufgelistet [Tabelle 7.2 und Tabelle 7.3]. Es wurden für jeden Probanden die zugehörigen Standardabweichungen berechnet. An den Tabellen ist die Spannweite der Mittelwerte ersichtlich. Bei der b-Wellenamplitude erstrecken sich diese zum Beispiel [Tabelle 7.2] von im Mittel $109,294\mu\text{V}$ (Proband 9) bis $253,322\mu\text{V}$ (Proband 12), was einer Spannweite von ca. $144\mu\text{V}$ entspricht. Bei den n-Wellen wird eine ähnlich große Spannweite von ca. $131\mu\text{V}$ verzeichnet. In der Tabelle [Tabelle 7.2] sind die Ergebnisse des ersten Sättigungsblitzes dargestellt. Nachfolgend erfolgte die tabellarische Auflistung der Ergebnisse des zweiten Sättigungsblitzes [Tabelle 7.3] für jeden Probanden. Aus den Daten der beiden Tabellen lässt sich bereits ersehen, dass die Amplituden des ersten Sättigungsblitzes höher sind, als die Amplituden des zweiten Sättigungsblitzes. Aus diesem Grund wurde ein Quotient für jeden Probanden errechnet, in dem das Verhältnis zwischen dem ersten und dem zweiten Sättigungsblitz zum Ausdruck gebracht wird. Für die korrekte Berechnung des Quotienten wurden die Augen zunächst getrennt ausgewertet. Es wurden jeweils die Amplituden des ersten Sättigungsblitzes durch die Amplituden des zweiten Sättigungsblitzes dividiert [Tabelle 7.4]. Dann erfolgte die Mittelung aller Quotienten. Die Verteilung der Quotienten über alle 8 Probanden soll einen Überblick über die Spannweite der Quotienten geben [Tabelle 7.5]. Die Mittelung aller Quotienten zeigt einen a-Wellen-Quotient ($A1/A2$) von im Mittel 0,973. Das bedeutet, dass die a-Welle des ersten Sättigungsblitzes im Mittel eine geringere Amplitude aufweist als die a-Wellenamplitude des zweiten Sättigungsblitzes. Die b-Wellen und n-Wellen des zweiten Sättigungsblitzes sind im Mittel kleiner als die Wellen des ersten Sättigungsblitzes. Bei den n-Wellen wird im Mittel in keiner Probandenmessung ein Wert von <1 erreicht. Dementsprechend wird der Effekt der kleineren

[25.01.2011]

Amplituden im zweiten Sättigungsblitz am besten bei den n-Wellen sichtbar.

Im zweiten Schritt der Auswertung des Blauzapfens erfolgte die Beschreibung der b-Wellenamplitude der Blauzapfenstimulation. Diese Auswertung betrifft den Bereich von 300 bis 500ms im abgeleiteten ERG. Bevor eine reine Amplitudenauswertung erfolgte, wurden ERG-Ergebnisse mit Anzeichen von Rot- oder Grünzapfenantworten (a-Welle und Off-Antwort) von der Auswertung ausgeschlossen. Aus diesem Grund fehlen einigen Kennlinien (z.B. Proband 12) die Werte ab einer bestimmten Intensität [Abbildung 7.14]. Ausgewertet wurde die b-Wellenamplitude der Blauzapfen nach der Amplitudenhöhe. Die Kennlinien der Mittelwerte aus beiden Augen verdeutlichen den Verlauf der b-Wellenamplituden der Blauzapfenantwort. Die maximale Amplitudenhöhe aus der individuellen Kennlinie wurde identifiziert und der jeweiligen Intensität zugeordnet. Danach erfolgte die Darstellung der Verteilung aller Intensitäten, bei denen eine maximale b-Wellenamplitude des Blauzapfens ausgelöst wurde [Abbildung 4.66].

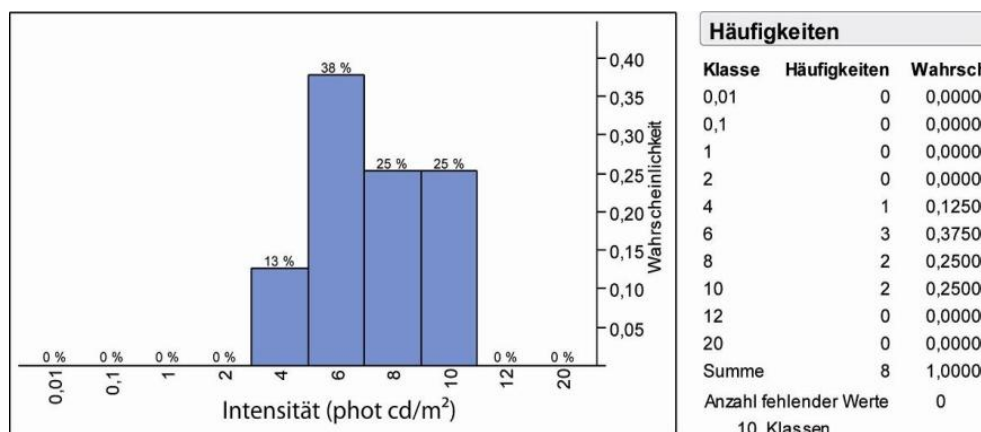


Abbildung 4.66: Häufigkeitsverteilung der maximalen b-Wellenamplitude bei variierenden Intensitäten in phot cd/m². Die Angaben unter „Klasse“ entsprechen den Intensitäten. Das Blockdiagramm links dient der Veranschaulichung. Die „Häufigkeiten“ wie oft eine Intensität die maximale b-Wellenamplitude auslöste ist in der mittleren Spalte der Tabelle angegeben.

Aus der Verteilung der maximalen Amplituden ist ersichtlich, dass eine Intensität von 6 phot cd/m² für den Blaublitz am häufigsten (37,5%) eine maximale Blauzapfenantwort auslöst. Jedoch erreichen die Intensitäten von 8 und 10 phot cd/m² jeweils zu 25 Prozent aller Probandenmessungen ebenfalls

eine maximale Blauzapfenantwort. Das Schaubild der Kennlinien [Abbildung 7.14] verdeutlicht jedoch, dass Probandenmessungen bestehen, bei denen eine Intensität von größer als 6 phot cd/m² bereits eine a-Welle oder eine Off-Antwort auslösen. Dies sind jeweils Zeichen für eine Rot- und Grünzapfenbeteiligung. Deshalb wird eine Intensität von 6 phot cd/m² als optimale Stimulationsintensität für die Blauzapfenstimulation definiert.

5. Diskussion:

Durch die Präsentation eines Lichtreizes reagieren die Photorezeptoren und die damit in Kontakt stehenden Zellen in der Retina mit einer Spannungsänderung. Das ERG zeichnet durch eine Hornhautelektrode die Summe der Spannungsänderungen in der Retina auf. Durch die charakteristischen Wellen im ERG lassen sich die Photorezeptorensysteme differenziert darstellen. Damit stellt die ERG Untersuchung eine wichtige objektive Beurteilungsmöglichkeit der Netzhautfunktion in der klinischen Diagnostik dar. Der ISCEV-Standard definiert einzelne Stimulationsprotokolle, mit deren Hilfe ein ERG der Photorezeptoren abgeleitet werden kann [Marmor, Holder *et al.* 2004]. Bei gesunden Menschen ist die Identifizierung der ERG-Potentiale nach dem Standardprotokoll relativ einfach, und kann durch eine quantitative Angabe der Amplitudenhöhen (z.B. a- und b-Welle) angegeben werden. Die Amplituden erfahren jedoch eine rasche Reduktion, wenn Prozesse degenerativer Art an der Netzhaut vorhanden sind (z.B. Stäbchen- und Zapfendystrophien) [Granse, Ponjavic *et al.* 2004, Marmor 1979]. Dabei kann der Patient mit einer Netzhautdegeneration noch einen Restvisus (Fingerzeig oder Lichtschein) haben, wenn gleichzeitig die ERG-Antwort bereits unter ein Niveau abgefallen ist, das nicht mehr registriert werden kann, und somit nicht mehr als retinales Potential erkennbar wird. In der aktuellen Studie wurden Stimulationsprotokolle definiert, die eine quantitative Erfassung von Restfunktionen erlauben. Die Stimulationsprotokolle wurden für die jeweiligen Photorezeptorensysteme optimiert. Die Exploration stellte eine Grundlage für die Studie an Probanden dar. Es wurden in der Exploration die Auswahlkriterien und Rahmenbedingungen für die ERG-Parameter deklariert. In der Vor- und Hauptstudie erfolgte der Einsatz der explorierten Techniken an Probanden und die Optimierung der ERG-Parameter.

5.1. Skotopisches ERG:

Die skotopische ERG Antwort ist elementar für eine elektrophysiologische

Funktionsdiagnostik. Das skotopische ERG erfasst die retinalen Potentiale des Stäbchensystems. Neben der Funktion der Photorezeptoren werden die Potentiale der nachgeschalteten Zellen, wie zum Beispiel der Bipolarzellen, aufgezeichnet. Da die Stäbchen mit einer Anzahl von 120 Millionen den Großteil der retinalen Zellen darstellen, ist eine Funktionsprüfung der Stäbchen essentiell für das ERG. Bei vielen retinalen Degenerationen (kongenitale stationäre Nachtblindheit, Retinitis Pigmentosa etc.) sind die Stäbchen am stärksten betroffen. Aus diesem Grund ist ein skotopisches Protokoll zur Untersuchung von Patienten mit Netzhautdegenerationen unerlässlich.

Für die skotopische ERG Untersuchung ist eine vorhergehende, mindestens 30 Minuten andauernde, Dunkeladaptation unumgänglich. Da bei vollständiger Dunkeladaptation die Stäbchen um ein 1000-faches sensitiver sind für Licht als die Zapfen [Fu and Yau 2007]. Somit ist die Dunkeladaptation der erste Schritt zur Isolierung einer reinen skotopischen ERG Antwort.

Die Definition der Stimulationsparameter erfolgte auf mehreren Ebenen. Zunächst wurde in der Exploration eine optimale Stimulationsfarbe definiert [Abbildung 5.1]. Die blaue LED mit 470nm Wellenlänge weist eine hohe spektrale Wirksamkeit für das Stäbchensystem auf. Im Gegensatz dazu werden die Zapfen bei einer Wellenlänge von 470nm nur in einem geringen Ausmaß stimuliert. Es wurden in der Vorstudie der skotopischen Antwort einige Versuche mit der grünen LED (511nm) als Vergleich zur blauen LED durchgeführt. Diese dienten der besseren Abschätzung einer Zapfenbeteiligung in der Untersuchung eines geeigneten Intensitätsbereichs für das skotopische ERG.

5.1.1. Auswahl der Stimulationsfarbe

Als Stimulus wurde für die rein skotopische ERG-Antwort die blaue LED gewählt, da die grüne LED die Zapfen zu einem höheren Anteil stimuliert als die blaue LED. Die maximale spektrale Wirksamkeit auf die Stäbchen bei 500nm wurde nicht gewählt. Zu Einem wird aus technischen Gründen eine Mischung von mehreren LEDs notwendig, um ein Licht mit einer Wellenlänge von 500nm

[25.01.2011]

zu generieren. Das bedingt jedoch ein breites spektrales Wirksamkeitsspektrum. Ein breites spektrales Wirksamkeitsspektrum stimuliert wiederum eine Vielzahl verschiedener Photorezeptoren, was vermieden werden sollte. Es sollen im skotopischen ERG nur die Stäbchen möglichst isoliert stimuliert werden. Wenn durch das breite spektrale Wirksamkeitsfeld Wellenlängen von $> 540\text{nm}$ erreicht werden, kann eine überwiegende Stäbchenantwort schon bei sehr geringen Intensitäten nicht mehr garantiert werden. Zum Anderen wird bei der maximalen spektralen Wirksamkeit der Stäbchen auch ein großer Anteil an Zapfen stimuliert [Abbildung 5.1].

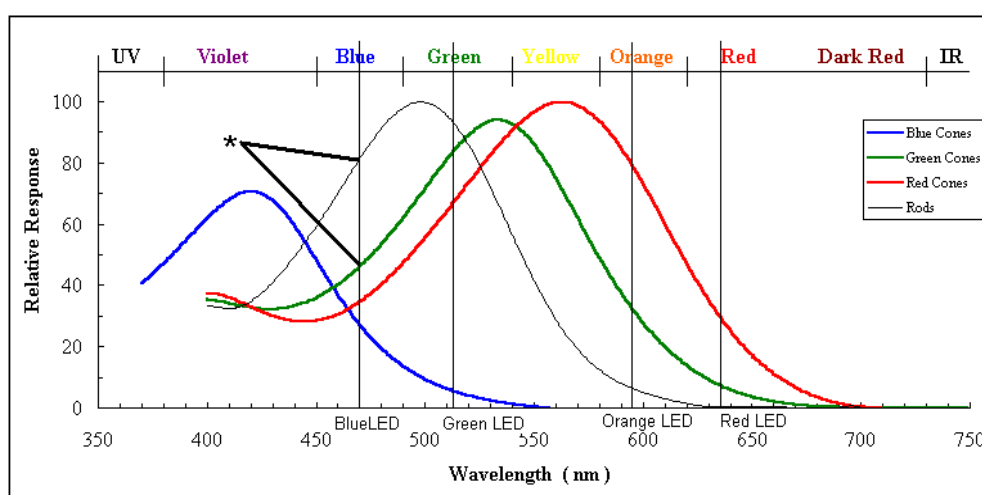


Abbildung 5.1: Antwortfunktion der Photorezeptoren auf verschiedene Wellenlängen. Modifizierter Auszug aus der Darstellung zur Antwort der Zapfen und Stäbchen auf unterschiedliche Wellenlängen der Universität von New Mexico [UniversityOfNewMexico Homepage]. Schwarze Linien im Diagramm stellen die Wellenlängen der verwendeten LEDs (z.B. „BlueLED“) dar. Farbige Kurven (Blau, Grün, Rot) kennzeichnen die Antwort der Photorezeptoren auf unterschiedliche Wellenlängen („Blue Cones, Green Cones, Red Cones“). Schwarze Kurve kennzeichnet die spektrale Wirksamkeit auf die Stäbchen („Rods“). Es wurde die spektrale Wirksamkeit der Wellenlängen (nm) gegen die relative Antwort (normiert auf 100% des jeweiligen Rezeptors) aufgetragen. Die Stäbchenkurve („Rods“) entspricht nicht der Skalierung und dient nur dem spektralen Vergleich zwischen Stäbchen und Zapfen. Mit dem Stern (*) wurde die Sensitivitätsdistanz bei einer Wellenlänge von 470nm (entspricht der blauen LED) zwischen Stäbchen und Zapfen angedeutet.

Bei einer Wellenlänge von 470nm besteht ein großer Unterschied zwischen der skotopischen und der photopischen spektralen Sensitivitätskurve. Dieser Unterschied soll für das skotopische Protokoll genutzt werden [Abbildung 5.1 „*“]. Zu beachten ist jedoch, dass die Skalierung der skotopischen Sensitivitätskurve in der Abbildung 5.1 nicht mit den Zapfenkurven übereinstimmt, da die Stäbchen eine höhere Antwort auf Licht aufweisen. Die Abbildung 5.1 soll jedoch eine bestehende Distanz zwischen der Stäbchen-Sensitivität und der Zapfen-Sensitivität andeuten.

5.1.2. Auswahl der Stimulationsfrequenz

Um eine einfache Identifizierung der Restantworten zu ermöglichen, wurde eine repetitive Stimulation gewählt. Bei festgesetzter Stimulationsfrequenz lässt sich anhand der FFT eine quantitative Angabe über die Restfunktion machen. Weiterhin kann ein Signal-Rausch-Verhältnis kalkuliert werden und das ERG Potential einfacher gegen das Rauschen abgegrenzt werden [Bach and Meigen 1999, Meigen and Bach 2000]. Die Festlegung von 9Hz als Stimulationsfrequenz bietet eine optimale Ausschöpfung aller explorierten Faktoren für das Stäbchensystem. Zunächst werden die 50Hz Netzrauschen durch die höheren Harmonischen der 9Hz Stimulationsfrequenz nicht beeinflusst. Weiterhin bietet die 9Hz Stimulation in einer kurzen Untersuchungszeit von 333ms insgesamt 3 Amplituden! Das ist ein entscheidender Vorteil gegenüber einer kleineren Stimulationsfrequenz von beispielsweise 6Hz, die auf Grund der höheren Amplituden in Betracht gezogen werden muss. Denn je höher die Stimulationsfrequenz, desto geringer wird die ERG Amplitude [Burns, Elsner *et al.* 1992, Odom, Reits *et al.* 1992]. Das Zahlenbeispiel [Tabelle 5.1] erläutert die Zunahme der gesamten Untersuchungszeit bei einem 6Hz Flicker und 50 Mittelungen auf 25s im Vergleich zum 9Hz Flicker mit 16,6s.

Zahlenbeispiel zum 9Hz und 6Hz Flicker:		
Attribute:	6Hz Flicker	9Hz Flicker
Eine Amplitude	166,6ms	111,1ms
Einzelmessung mit 3 Amplituden	3*166,6ms = ca. 500ms	3*111,1ms = ca. 333ms
Mittelung von 50 Einzelmessungen	50*500ms = 25s	50*333ms = 16,6s
Mittelung von 100 Einzelantworten	100*500ms = 50s	100*333ms = 32,2s

Tabelle 5.1: Zahlenbeispiel für die Dauer einer Untersuchung mit Anwendung von 50 bzw. 100 Mittelungen. Die 9Hz Stimulation wird der 6Hz Stimulation gegenüber gestellt. Zu beachten ist die zeitliche Differenz der beiden Stimulationsfrequenzen.

Die gesamte Untersuchungszeit wird durch die Lidschlussartefakte limitiert. Um

diese zu vermeiden, sollte die Untersuchungszeit so gering wie möglich gehalten werden.

Die Frequenz von 9Hz bietet eine gewisse Distanz zu der maximalen Frequenz von 15Hz für das isolierte Stäbchensystem. Im Anbetracht aller genannten Bedingungen bildet eine Stimulationsfrequenz von 9Hz einen Kompromiss zwischen Amplitudenhöhe, kurzer Aufnahmezeit, möglichst vielen Mittelungen und isolierter Stäbchenantwort.

5.1.3. Optimierung der skotopischen ERG Parameter

Durch die Anwendung von schwachen Lichtblitzen lässt sich das Stäbchensystem, zusätzlich zu den genannten Techniken, vom Zapfensystem differenziert ableiten. Es wurde an zahlreichen Probandenmessungen zunächst die Intensitätsspanne einer maximalen b-Wellenamplitude der rein skotopischen Antwort in der Vorstudie eingegrenzt. Als Auswahlkriterium dienten die Kennlinien der b-Wellen. Die b-Wellenamplituden wurden gegen die Stimulationsintensität aufgetragen. Aus den Kennlinien ließ sich eine Intensitätsspanne abschätzen. Die skotopische b-Wellenamplitude steigt zunächst bei stetiger Erhöhung der Intensität an. Nach einem Höhepunkt des b-Wellenpotentials folgt eine Reduktion der Amplitude [Abbildung 5.2 „Zwischentief“]. Worauf ein erneuter Anstieg der Amplituden bei weiterer Intensitätssteigerung zu verzeichnen ist. Das beruht auf zwei verschiedenen Signalwegen des Stäbchensystems. Der erste Signalweg hat einen Ursprung in der ON-Bipolarzelle und den All-Amakrinzellen. Der zweite und schnelle Signalweg erfolgt über die Gap-Junction Verbindung zwischen den Stäbchen und Zapfen. Die Signalwege konnten bereits elektrophysiologisch und physiologisch nachgewiesen werden [Stockman, Sharpe *et al.* 1995, Stockman, Sharpe *et al.* 1991]. Da im zweiten schnellen Signalweg die Zapfenverbindung mit den Stäbchen (Gap-Junction) verwendet wird, kann hier keine reine skotopische Antwort mehr garantiert werden. Aus diesem Grund erfolgte die Auswahl der Amplituden für die möglichst isolierte skotopische ERG-Antwort im Bereich des ersten Höhepunktes der Kennlinien [Abbildung 5.2].

[25.01.2011]

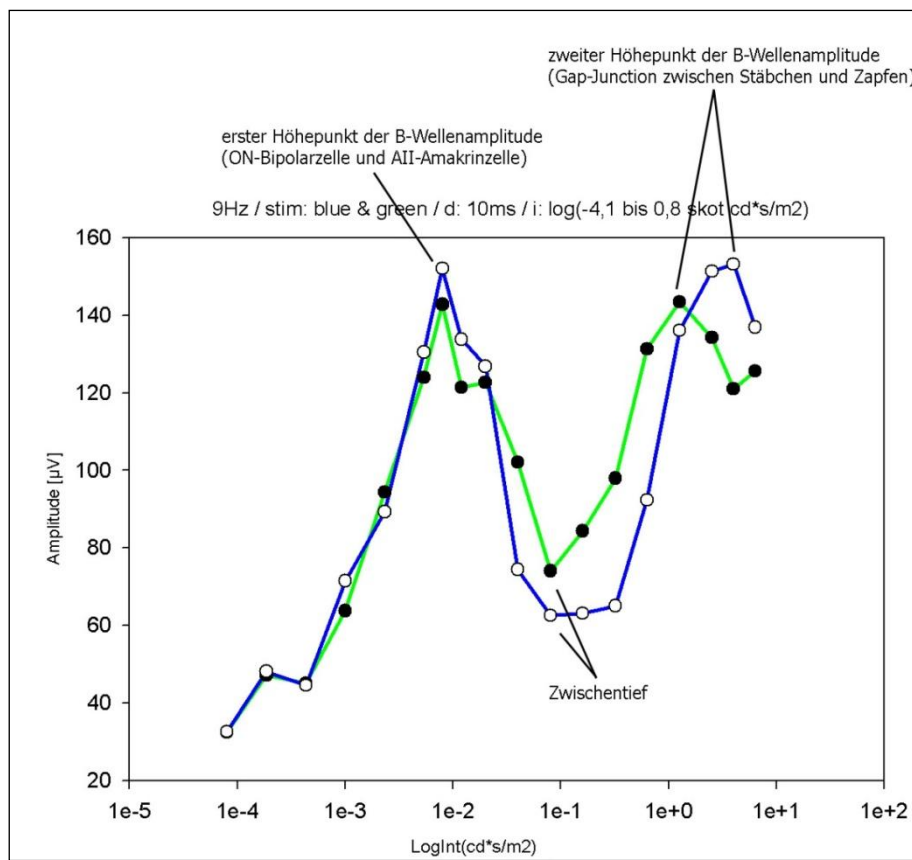


Abbildung 5.2: b-Wellenamplitude der 9Hz-Flickerstimulation mit Anwendung der blauen (blaue Kurve) und der grünen LED (grüne Kurve). Gekennzeichnet ist der erste Höhepunkt der Kennlinie, der auf die Stäbchen zurückzuführen ist. Unter einer weiteren Intensitätssteigerung erfährt die Kennlinie ein Zwischentief, das die Stäbchen- und Zapfeninteraktion widerspiegelt. Nach dem Zwischentief steigt die b-Wellenamplitude steil an und erreicht ein zweites Maximum als Ausdruck der maximalen Antwort der Stäbchen- und Zapfeninteraktion. Unter Anwendung der grünen LED werden nach dem Zwischentief höhere Amplituden verzeichnet. Da die Zapfen sensibler auf grünes Licht als auf blaues Licht reagieren, ist dies ein weiterer Hinweis auf die Zapfenbeteiligung.

Ein Nachweis der Zapfenbeteiligung erfolgte neben der Auswertung der Kennlinien mittels verschiedener Techniken. Zum einen wurde ERG-Welle auf das Erscheinen einer a-Welle und OPs als Zeichen der Zapfenbeteiligung analysiert. Zum anderen erfolgte eine Analyse der ERG-Antwort mittels FFT. Als Zeichen einer Zapfenbeteiligung wurde hierbei eine Erhöhung der höheren Harmonischen der Stimulationsfrequenz festgestellt. Aus diesen Ergebnissen wurden Bereiche für die Intensität und die Pulszeit eingegrenzt. Die Intensität und die Pulszeit der Stimulation wurden darauf in der Hauptstudie an 16 Probandenmessungen untersucht und definiert. Aus der Hauptstudie resultierte eine optimale Intensität von 0,012 skot cd*s/m² und eine Pulszeit von 10ms [Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21].

Die Variablen wurden durch die Verteilung der maximalen b-Wellenamplituden in 16 Probandenmessungen definiert. In 62,5% der Probandenmessungen wird eine maximale b-Wellenamplitude bei 10ms erreicht. Für die Intensität von 0,012 skot cd*s/m², die eine maximale b-Wellenamplitude auslöst, gab es bereits Hinweise in der Vorstudie. Die Hauptstudie bestätigte den Hinweis. Bei 81,3% der Probanden wird eine maximale b-Welle bei 0,012 skot cd*s/m² identifiziert.

5.1.4. Einfluss des 9Hz-Blauflickers auf die Dunkeladaptation

Die Dunkeladaptation wird unter einer 9Hz Stimulation mit den definierten Parametern nicht beeinflusst. Durch ein automatisiertes Stimulationsprotokoll konnte die Dunkeladaptation nach dem Bleichen der Stäbchen durch eine helle Hintergrundbeleuchtung (500 phot cd/m² für 5min) nach 30min wiederhergestellt werden. In diesen 30min wurde in einem festen Abstand von 1min mit dem 9Hz Flickerprotokoll stimuliert. Das Wachstum der b-Welle während der gesamten Stimulationszeit in Dunkelheit, direkt nach dem Bleichen, ist mit der Kinetik der Dunkeladaptation zu vergleichen [Cameron, Miao *et al.* 2008]. Die Endamplitude nach 30min ist identisch zur Amplitude vor dem Bleichen der Stäbchen [Abbildung 4.16]. Damit konnte gezeigt werden, dass das neu entwickelte 9Hz-Blauflickerprotokoll keine Einflüsse auf die Dunkeladaptation hat.

Die 9Hz Stimulation ist für eine schnelle klinische Anwendung mit möglichst vielen Mittelungen optimal. Durch die Auswertung mittels FFT wird eine genaue quantitative Angabe der retinalen Antwort ermöglicht. Das ist vor allem bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration sehr wichtig, da eine Verlaufsbeobachtung von kleinen Potentialen sehr schwierig ist. Durch die Anwendung der FFT kann somit, vor allem im Hinblick auf neue Therapiemethoden (z.B. Stammzellen, Elektrostimulation), eine präzise Verlaufsbeobachtung realisiert werden. Ein Nachteil der skotopischen 9Hz Flickerstimulation ist die niedrige Amplitude im Vergleich zur Einzelblitzableitung. Für die Identifizierung von Restantworten bzw. von

krankhaft veränderten ERG-Potentialen ist die Amplitude der 9Hz Stimulation jedoch ausreichend, da durch die FFT eine genaue quantitative Angabe der Antwort ermöglicht wird.

5.2. Kombiniertes Stäbchen- und Zapfen-ERG

5.2.1. Bedingungen für die Optimierung des kombinierten ERG

Das kombinierte Stäbchen- und Zapfenprotokoll wird unter Dunkeladaptation mittels sehr hoher Intensitäten abgeleitet. Das Resultat ist eine sehr tiefe a-Welle und eine b-Welle, die durch die Kombination der Stäbchen und der Zapfen entsteht und sich deshalb von der rein skotopischen Antwort unterscheidet. Die oszillatorischen Potentiale sind in der kombinierten ERG-Antwort am besten zu evaluieren [Rousseau and Lachapelle 1999]. Neben der tiefen a-Welle ist diese Tatsache für eine vollständige ERG-Untersuchung sehr wichtig. Aus diesem Grund wird die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort in der aktuellen Studie auf die Anwendung bei Patienten mit Restpotentialen optimiert.

Die Stimulation der Stäbchen und der Zapfen erfordert höhere Intensitäten als das rein skotopische ERG. Bei bestimmten retinalen Erkrankungen (Stäbchendystrophie, Retinitis Pigmentosa, CSNB, Zentralarterienverschluss) ist die a-Welle oder die b-Welle nur sehr reduziert ableitbar [Heckenlively and Arden 2006]. Je nach Erkrankung fehlt dem ERG die a-Welle oder die b-Welle und das ERG verliert seine charakteristische Kurvenform (z.B. das „elektronegative“ ERG). Bei fortgeschrittenen Erkrankungen werden die ERG-Potentiale zusätzlich so gering, dass eine Identifikation der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort unmöglich wird. Aus diesem Grund wurde ein neues Stimulationsprotokoll für die kombinierte Stäbchen und Zapfenableitung entwickelt. Es ermöglicht durch Zuhilfenahme einer Flicker-Stimulation die Anwendung der FFT und den Vorteil des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses durch eine hohe Anzahl an Mittelungen. Dadurch können in einer ERG Antwort alle an der Ableitung beteiligten Frequenzen quantitativ

angegeben werden. Um die FFT-Auswertung jedoch auch auf die Physiologie reproduzieren zu können, muss eine Beurteilung der ERG-Kurve erfolgen. Bei einer festen Stimulationsfrequenz und einer annähernd sinusoidalen Kurvenform wird in der FFT eine dominante Frequenz erwartet, die der Stimulationsfrequenz entspricht [Formel 5.1].

$$f_{(FFT-Dominante)} = f_{(Stimulus)}$$

Formel 5.1: Formel für die dominierende Frequenz der FFT ($f_{(FFT-Dominante)}$) bei einfacher und rauscharmer sinusoidaler Kurvenform (nur b-Welle, keine a-Welle vorhanden). Die Stimulationsfrequenz ($f_{(Stimulus)}$) entspricht in diesem Fall der dominierenden Frequenz aus der FFT.

Das ist bei einer Flickerableitung mit einer festen Frequenz und einer b-Welle, wie in der rein skotopischen Antwort, der Fall. Wenn nun zusätzlich zur b-Welle eine a-Welle hinzukommt, die eine Abweichung der ERG-Kurve von der sinusoidalen Form bewirkt, erfolgt ein Wechsel der dominanten Frequenz in der FFT zur doppelten Stimulationsfrequenz [Formel 5.2].

$$f_{(FFT-Dominante)} = 2xf_{(Stimulus)}$$

Formel 5.2: Formel für die dominierende Frequenz der FFT ($f_{(FFT-Dominante)}$) wenn nun neben einer Stimulationsfrequenz (b-Welle) eine weitere Frequenz (a-Welle) an der Kurvenform beteiligt ist. Die dominierende Frequenz in der FFT stimmt in diesem Fall mit der doppelten Stimulationsfrequenz überein.

Diese Konstellation wird bei der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort verzeichnet. Bei einer 9Hz-Dominante in der FFT ist die Beurteilung der ERG Kurve der kombinierten Antwort unabdingbar. Es besteht die Möglichkeit, dass die Dominante 9Hz-Frequenz in der FFT von der b-Welle oder von der a-Welle generiert wird. Diese Beurteilung hat für die Diagnostik eine entscheidende Relevanz, da die Wellen einen unterschiedlichen Ursprung in der Netzhaut aufweisen.

In der aktuellen Studie wurde als Stimulationsfrequenz der 9Hz-Flicker gewählt. Die Frequenz von 9Hz erlaubt bei der kombinierten ERG Antwort eine ausreichende Stimulation der Stäbchen, da die Fusionsfrequenz für eine isolierte Stäbchenantwort bei 15Hz [Dodt 1951] weit unterschritten wird. Zusätzlich erlaubt die Stimulationsfrequenz eine Ableitung der a- und b-Welle. Bei Anwendung von höheren Frequenzen, wie 15Hz, können die a-Welle und die b-Welle nicht getrennt voneinander abgeleitet werden [Scholl, Langrova *et al.* 2001a, Scholl, Langrova *et al.* 2001b]. Die Frequenz ist dabei bereits zu hoch, um eine separate a-Welle von der b-Welle im ERG darzustellen. Das

[25.01.2011]

Resultat ist ein Summenpotential in das die a- und die b-Welle eingeht. Bei einer Frequenz von 9Hz ist eine getrennte Darstellung beider Wellen realisierbar. Die Vorteile der repetitiven Stimulation werden durch die 9Hz Flickerstimulation auch für die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort verwirklicht.

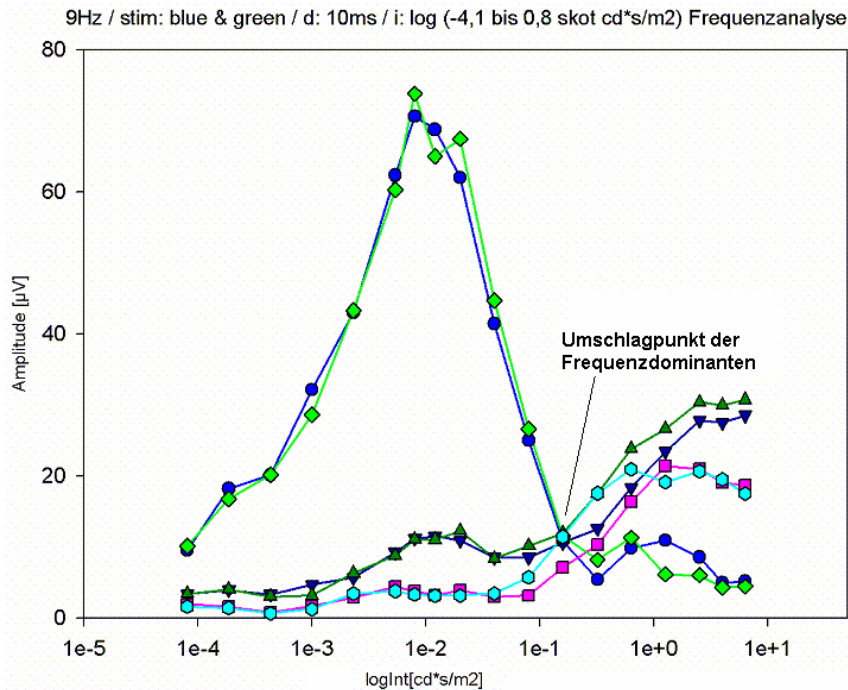


Abbildung 5.3: Ergebnisse der Amplituden aus der Frequenzanalyse bei 9Hz-Stimulation mit unterschiedlichen Intensitäten. Die Analyse bezieht sich auf die oben dargestellten [Abbildung 5.2] Intensitätskennlinie. Dargestellt ist der Anteil einzelner Frequenzen (9Hz, 18Hz, 27Hz) am ERG durch die Stimulation mit der grünen und blauen LED. Der Umschlagpunkt der dominanten Frequenz in der FFT wurde gekennzeichnet. Ab einer Intensität von 0,08 skotopischen cd*s/m² sinkt die 9Hz-Komponente des grünen Stimulationslichts (grüne Vierecke) und des blauen Stimulationslichts (blaue Kreise) auf ein Minimum ab und die 18Hz- (grüne und blaue Dreiecke) bzw. 27Hz-Anteile (türkise Hexagone für grüne LED und rosa Vierecke für blaue LED) dominieren die ERG-Antwort. Eine detaillierte Beschreibung ist in Kapitel 4.1.1. zu finden.

Aus der Vorstudie der rein skotopischen Messungen wurden bereits Erkenntnisse zu einer möglichen Intensitätsspanne gewonnen. Es wurde das Verhalten der Wellenform des ERGs unter Erhöhung der Intensität beobachtet. Die Auswahl einer optimalen Intensitätsspanne wurde durch die Erkenntnisse aus der Vorstudie des isolierten skotopischen ERG gestützt. Die b-Wellenamplitude und die Beurteilung der Wellenform wurden für die Auswahl als Beurteilungskriterien genutzt. Die b-Welle erfuhr im skotopischen ERG zunächst eine Amplitudenerhöhung bei ansteigenden Intensitäten. Nach einem

Höhepunkt sank die b-Wellenamplitude in den Kennlinien auf ein Zwischentief. Bei weiteren Intensitätssteigerungen stieg die b-Wellenamplitude erneut bis zu einem zweiten Maximum an [Abbildung 5.2]. Die Intensitätssteigerung bewirkt jedoch nicht nur eine Änderung der b-Wellenamplitude, sondern auch eine Änderung der dominanten FFT-Frequenz. Von der 9Hz Komponente, die zunächst die FFT als einzige Frequenz dominiert, wird ein Wechsel zur 18Hz Komponente in der FFT verzeichnet [Abbildung 5.3].

Das lässt sich wie bereits oben beschrieben auf die a-Welle zurückführen, die bei steigenden Intensitäten mit einer Verkürzung der Gipfelzeit einhergeht, und somit separat von der b-Welle aufgezeichnet werden kann. Es wurden in der Hauptstudie die Intensitäten um den Bereich des zweiten Höhepunkts der Kennlinien aus der Analyse der rein skotopischen Ableitung untersucht [Abbildung 5.2]. Der zweite Höhepunkt wird durch eine Interaktion der Stäbchen mit den Zapfen (Gap-Junction Verbindung) generiert [Scholl, Langrova *et al.* 2001b].

5.2.2. Einfluss hoher Intensitäten auf das kombinierte ERG

Eine Steigerung der Intensitäten über die Intensitätsspanne aus den skotopischen Ergebnissen wurde in der Vorstudie untersucht [Abbildung 4.34]. Dabei wurde deutlich, dass die b-Wellenamplitude beinahe konstant blieb und die a-Wellenamplitude stetig zunahm. Da die a-Wellenamplitude jedoch definitionsgemäß die Höhe der b-Wellenamplitude bewirkt, erfolgte eine genaue Wellenanalyse der ERG-Kurven. Das Resultat [Abbildung 5.4] beschreibt die tiefe a-Wellenamplitude, die bei Anwendung von hohen Stimulationsintensitäten (2 phot cd*s/m^2) auf Kosten der b-Welle (von der „0-Linie“ gemessen), verzeichnet werden konnte. Dagegen waren die b-Wellenamplituden bei geringeren Intensitäten (wie $0,2 \text{ phot cd*s/m}^2$) deutlich über der „0-Linie“ zu erkennen. Die Differenzierung zwischen a-Welle und b-Welle wurde dadurch erleichtert. Weiterhin wird im Anbetracht von verschiedenen degenerativen Erkrankungen (wie CSNB) die Beurteilung der kombinierten Antwort durch ein „elektronegatives“ ERG erschwert. Hierbei kommt es zu einem Verlust der b-

[25.01.2011]

Welle bei unbeeinträchtigt a-Wellenamplitude. Die ERG-Kurve der Ableitung mit einer Intensität von $2 \text{ cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ [Abbildung 5.4] kann ein „elektronegatives“ ERG vortäuschen und erschwert somit die Diagnose einer degenerativen Erkrankung.

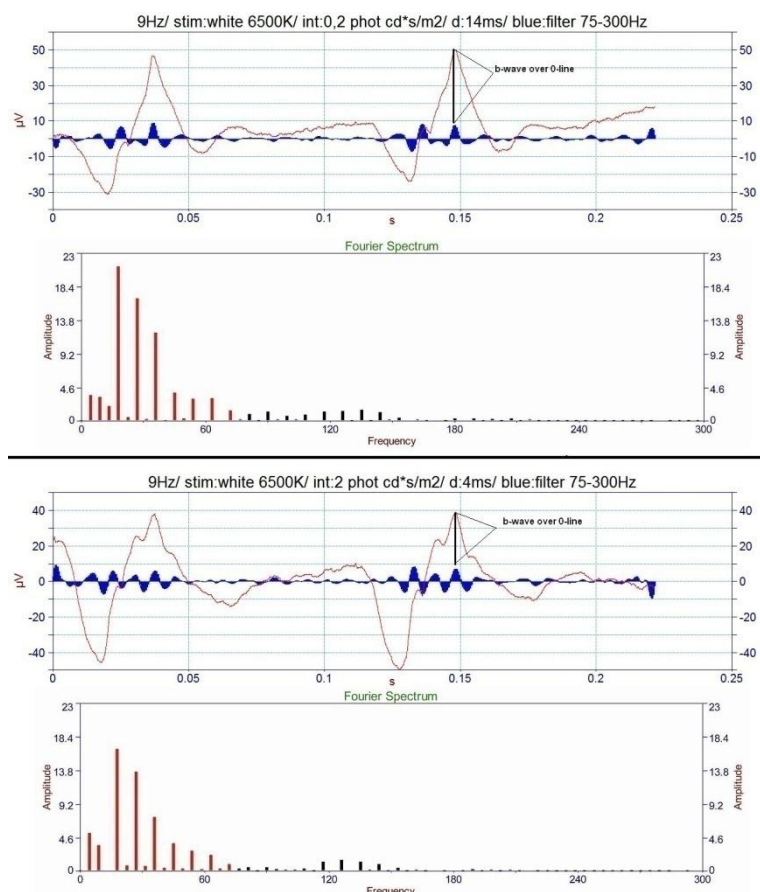


Abbildung 5.4: 9Hz-Stimulation mit weißem Mischlicht mit unterschiedlichen Intensitäten (oben $0,2$ unten $2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$) und Extraktion der OPs durch offline Filterung ($75\text{-}300\text{Hz}$). Die OPs werden als Fläche unter der Kurve (AUC) blau dargestellt. Die b-Welle über der 0-Linie wurde in beiden Ableitungen zum Vergleich markiert. Zu erkennen ist eine deutlich größere Amplitude über der 0-Linie unter Anwendung einer niedrigeren Intensität („b-wave over 0-line“). Auffällig ist jedoch auch, dass die AUC bei der höheren Intensität zunimmt. Das Fourier Spektrum wurde jeweils unter den ERG-Kurven dargestellt (schwarze Balken entsprechen gefilterten OPs und rote Balken den ausgefilterten Frequenzen).

Daher ist besonders in diesen Fällen eine eindeutige Differenzierung zwischen a- und b-Welle notwendig. Die Intensitäten um $0,2 \text{ phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ lösen eine deutlich differenzierbare a- und b-Welle (gemessen von der 0-Linie) aus. Damit wird der Rückschluss auf die betroffenen Photorezeptoren bei einer degenerativen Erkrankung in der ERG Untersuchung erleichtert. Zur Beschreibung des Verhältnisses zwischen a- und b-Welle wurde der Quotient

der beiden Wellen in der Hauptstudie berechnet. Für die resultierenden Stimulationsparameter mit der Intensität von 0,2 phot cd*s/m² und der Pulszeit von 14ms ergibt sich ein Quotient (b-Welle/a-Welle) von im Mittel 2,68 (\pm 0,74 Standardabweichung) aus 16 Probandenmessungen.

5.2.3. Evaluation der oszillatorischen Potentiale

Die Rolle der oszillatorischen Potentiale (OPs) ist für die frühe Diagnose vieler Netzhauterkrankungen bereits beschrieben worden [Wachtmeister 1998]. In der aktuellen Arbeit wurde die eigentliche Messung der OPs nicht optimiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Registrierung der OPs durch Filterung eines Frequenzbereiches von 75-300Hz in der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort mittels 9Hz-Flickerstimulation möglich ist [Abbildung 5.4]. Die beteiligten Frequenzen wurden ebenfalls dargestellt Abbildung 5.4 „Fourier Spectrum“. Es kann ein Maximum für die beteiligten Frequenzen der OPs bei ca. 115-130Hz identifiziert werden. Wie die OPs durch die Anwendung von einer Vielzahl an Mittelungen und durch die repetitive Stimulation beeinflusst werden, könnte weiter untersucht werden. Zusätzlich könnte die Thematik der Optimierung einer objektiven Untersuchungsmethode für die oszillatorischen Potentiale den Grundstein von weiteren Arbeiten bilden.

5.2.4. Definition des optimierten Stäbchen- und Zapfen-ERG

Die Stimulationsfarbe wurde in der Exploration im Hinblick auf eine optimale Ableitung der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort eruiert. Die maximale spektrale Sensitivität beträgt für Stäbchen 500nm und für Zapfen 550nm. Die grüne LED liegt mit 511nm genau zwischen der maximalen spektralen Sensitivität der Stäbchen und der Zapfen [Abbildung 5.1]. Aus diesem Grund wurde die grüne LED in der Vorstudie untersucht. Ein möglichst breites Wirkspektrum, das nicht nur Stäbchen sondern auch Zapfen zu stimulieren vermag, konnte durch das Mischlicht (Weiß 6500K) ermöglicht werden. Es wurde in der Vorstudie der kombinierten Antwort ein Vergleich zwischen beiden

Stimulationsfarben durchgeführt. In der Kurvenform werden keine Unterschiede zwischen beiden Stimulationsfarben erkennbar. Die FFT Auswertung ergibt einen höheren Anteil der 9Hz Komponente unter Anwendung des Mischlichts im Vergleich zur grünen LED [Abbildung 4.32 und Abbildung 4.33]. Auch die 18Hz Komponente konnte durch das Mischlicht einen größeren Anteil in der FFT Analyse verzeichnen. Dabei konnte eine geringfügig größere b-Wellenamplitude mit dem Mischlicht abgeleitet werden. Zusammenfassend wurde das Mischlicht (Weiß 6500K) als optimale Stimulationsfarbe für die kombinierte Antwort deklariert.

Die optimale Intensität und Pulszeit wurde in der Hauptstudie unter den beschriebenen Bedingungen definiert. Die Pulszeit von 14ms löste bei 68,75% der Probanden eine maximale b-Wellenamplitude aus. Bei 50% der Probanden konnte bei 14ms die höchste a-Welle identifiziert werden. Daher kann die Pulszeit von 14ms für die kombinierte ERG-Ableitung als optimal betrachtet werden. Im Vergleich dazu konnte die optimale Intensität nicht eindeutig bestimmt werden. 43,75% der Probanden erreichten eine maximale b-Wellenamplitude bei 0,2 phot cd*s/m². Jedoch konnte bei 37,5% aller Probanden bei einer Intensität von 0,22 phot cd*s/m² ebenfalls eine maximale b-Welle hervorgerufen werden. Die a-Welle war bei 50% der Probanden bei 0,22 phot cd*s/m² maximal. Nur bei 25% der Probandenmessungen war die a-Welle bei einer Intensität von 0,2 phot cd*s/m² optimal. Daher wird die Intensität für die Stimulation der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort auf 0,22 phot cd*s/m² festgelegt [Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38]. Eine eindeutige Intensität resultierte jedoch nicht. Es konnte nur eine Intensität durch die kombinierte Betrachtung der b- und a-Wellenamplitude definiert werden. Dies liegt möglicherweise an den kleinen Intensitätsschritten in der Optimierung der Protokolleinstellungen. Zwischen einer Intensität von 0,2 und 0,22 phot cd*s/m² ist eine sehr geringe Differenz, die unter Einzelblitzableitungen höchst wahrscheinlich, sowohl subjektiv als auch objektiv, nicht auffallen würde. Durch die Anwendung der 9Hz-Flickerstimulation sind jedoch auch geringe Intensitätssprünge, wie in unserem Beispiel 0,02 phot cd*s/m², sichtbar. Außerdem erfolgte eine „grobe“ und orientierende Eingrenzung der Parameter

für die Hauptstudie bereits in der Vorstudie. Aus diesem Grund wurden kleine Intensitätsänderungen in dem eingegrenzten Bereich untersucht. Diese Intensitätsschritte liefern jedoch keine signifikanten Amplitudenunterschiede und müssen deshalb deskriptiv ausgewertet werden.

5.3. Photopisches ERG:

5.3.1. Grundlage der photopischen Optimierung

Das photopische ERG erfasst die Zapfenfunktion. Die Zapfen sind vor allem in der Fovea centralis, dem Fleck des schärfsten Sehens, verteilt. Die Fovea centralis ist sehr wichtig zur Erfassung der Sehkraft und des maximalen räumlichen Auflösungsvermögens der Netzhaut. Da hierfür vor allem die Zapfen ganz eng an einander gegliedert vorliegen [Williams 1988], ist die photopische ERG-Untersuchung eine objektive Methode für die Messung der zentralen Netzhautfunktion.

Die isolierte photopische ERG Untersuchung erfordert ein Protokoll, das auf die Eigenschaften der Zapfen abgestimmt ist. Vor der photopischen Untersuchung muss eine Helladaptationsgipfelzeiten von 10 Minuten unter einer Hintergrundbeleuchtung (30 phot cd/m²) erfolgen, um die Stäbchen dadurch zu bleichen und somit aus der ERG-Antwort zu extrahieren [Gouras and MacKay 1989, Miyake, Horiguchi *et al.* 1988, Peachey, Alexander *et al.* 1991]. Die Zapfen vermögen über eine Frequenzauflösung von mehr als 50Hz [Dodt 1951]. Die maximale CFF der Stäbchen in Kombination mit den Zapfen beträgt 28Hz [Stockman, Sharpe *et al.* 1991]. Nach dem ISCEV-Standard wird bereits eine photopische Untersuchung mit einem 30Hz Flicker für die Zapfen beschrieben [Marmor, Holder *et al.* 2004]. Eine Verringerung der Frequenz wäre im Anbetracht der CFF der Stäbchen nicht sinnvoll. Die Erhöhung der Frequenz geht stets mit einer Reduktion der Amplitude einher [Burns, Elsner *et al.* 1992, Odom, Reits *et al.* 1992]. Die Anwendung eines 33Hz Flickers weist jedoch gegenüber dem 30Hz Flicker entscheidende Vorteile bei der Analyse mittels FFT auf. Die höheren Harmonischen des 33Hz Flickers haben keinen

Einfluss auf die 50Hz-Netzrauschen. Somit ist die 33Hz Stimulation für die quantitative Bestimmung einer möglichst rauscharmen Ableitung von Restantworten besser geeignet als die 30Hz Flickerstimulation.

5.3.2. Auswahl der Stimulationsfarbe

Die spektrale Sensitivität ist für Zapfen bei 550nm am höchsten [Abbildung 5.1]. Da jedoch bei 550nm auch die Stäbchen zu einem großen Anteil stimuliert werden, wurde eine längere Wellenlänge im roten Farbbereich als Stimulus gewählt. Die rote LED mit 635nm garantiert durch die spektralen Eigenschaften eine weitgehend rein photopische Ableitung. Wenn die Frequenz und die chromatische Einstellungen außer Betracht gezogen werden, ist eine minimale Stäbchenstimulation durchaus möglich. Wobei die Zapfen (v.a. die langwelligen Zapfen) bei 635nm eine viel höhere spektrale Sensitivität aufweisen. Die weiteren Protokolleinstellungen (z.B. Frequenz und Farbe) verhindern jedoch eine Stäbchenbeteiligung an der ERG Antwort. Durch eine Darbietung einer permanenten Hintergrundbeleuchtung werden die Stäbchen zusätzlich zu den spektralen Faktoren supprimiert. Die blaue LED mit einer Wellenlänge von 470nm stellt das Optimum für die spektrale Adaptation des Stäbchensystems dar. Die photopischen Rezeptoren werden bei 470nm nur minimal Beeinflusst. Die Stäbchen werden bei einer Hintergrundbeleuchtung mit einer Wellenlänge von 470nm permanent gebleicht.

5.3.3. Rolle der photopischen Stimulationsintensität

In der Vorstudie ist durch wenige Untersuchungen mit den deklarierten Stimulationsparametern und durch Anwendung von hohen Intensitäten das Blendungspotential der roten Stimulation auf einer blauen Hintergrundbeleuchtung aufgefallen. Die Probanden empfanden die Messung als sehr unangenehm, sobald die Intensität gesteigert wurde. Das rote Stimulationslicht besitzt gegenüber der blauen Hintergrundbeleuchtung einen als sehr unangenehm empfundenen Kontrast. Deshalb gingen die photopischen

ERG Messungen mit Lidschlussartefakten einher. Die Anwendung von höheren Intensitäten (1-5 phot cd*s/m²) erbrachten außerdem keine eindeutigen Ergebnisse. Es konnte ein beinahe linearer Verlauf der b-Wellenamplituden mit ansteigender Intensität gezeigt werden [Abbildung 4.44].

Im Hinblick auf künftige Patientenmessungen konnten keine hohen Intensitäten, die sogar bei gesunden Probanden zu Lidschlussartefakten führen, angewandt werden. Die gesteigerte Photosensibilität von Patienten mit degenerativen Netzhauterkrankungen (z.B. Retinitis Pigmentosa) gegenüber gesunden Probanden wurde bereits ausführlich beschrieben [Gawande, Donovan *et al.* 1989]. Um eine Beeinträchtigung der ERG Untersuchung durch Lidschlussartefakte zu vermeiden, werden daher in der Hauptstudie Intensitäten aus der Vorstudie (0,08-0,16 phot cd*s/m²), die keine Blendung und Lidschlussartefakte auslösten, untersucht.

5.3.4. Optimierung der photopischen Stimulationsparameter

Eine a-Wellenamplitude kann unter einer 30Hz Flickerstimulation nicht abgeleitet werden. Daher wird in der Hauptstudie des isolierten photopischen ERG nur die b-Wellenamplitude als Richtwert herangezogen. Die Hauptstudie bot bei 50% der Probanden-Kennlinien ein Maximum der b-Wellenamplitude bei 0,12 phot cd*s/m² [Abbildung 4.48]

Die Intensitäten von 0,14 und 0,16 phot cd*s/m² lösten bei 25% der Probanden eine maximale b-Wellenamplitude aus. Die Definition einer optimalen Pulszeit ging mit der Schwierigkeit einher, dass nach der Messung von 8 Probanden eine optimale Pulszeit resultierte (10ms), die durch eine breitere Pulszeit-Spanne bestätigt werden musste. Die Pulszeit von 10ms war bei den ersten 8 Probandenmessungen der kleinste untersuchte Wert für die Pulszeit. Es konnte daher in dem untersuchten Bereich von 10-18ms nicht ausgeschlossen werden, dass eine Pulszeit von kleiner als 10ms häufiger eine maximale b-Wellenamplitude auslösen könnte. Aus diesem Grund wurde der Bereich der zu untersuchenden Pulszeit bei den restlichen 8 Probandenmessungen auf 4-16ms erweitert. Es zeigte sich jedoch auch bei der erweiterten Untersuchung

der Pulzeit eine maximale b-Wellenamplitude in 75% der Probanden bei 10ms. Aus diesem Grund wird die optimale Pulszeit von 10ms für die photopische 33Hz-Flickeruntersuchung bestimmt.

Die Hintergrundbeleuchtung wurde an die Stimulationsintensität angeglichen. Durch die geringen Stimulationsintensitäten von 0,08 bis 0,16 phot cd*s/m² erfolgte eine Darbietung der Hintergrundbeleuchtung mit 2 phot cd/m².

Es wurden sehr geringe Intensitäten ausgewählt, jedoch garantiert die vorhergehende 10 minütige Helladaptation und die Protokolleinstellungen eine photopische ERG Ableitung. Neben der Intensität werden die chromatischen Eigenschaften der Zapfen ausgeschöpft, die Frequenz an das photopische System angeglichen und eine Hintergrundbeleuchtung eingesetzt. Die Gesamtheit der Stimulationsparameter erlaubt eine weitgehend isolierte photopische ERG-Ableitung. Die geringen Intensitäten, die in der aktuellen Studie beschrieben wurde bieten jedoch viele Vorteile. Für die Untersuchung des photopischen Systems werden meist hohe Intensitäten eingesetzt, da die Gefahr der Stäbchenbeteiligung an der ERG Antwort dadurch limitiert werden soll. Gleichzeitig besteht jedoch die Gefahr, dass die ERG Ableitungen unter hohen Intensitäten durch Muskel- und Lidschlussartefakte beeinflusst werden. Weiterhin wird durch die Blendungseigenschaften intensiver Lichtreize und die dadurch resultierenden Lidschlussartefakte die gesamte Untersuchungszeit eingeschränkt. Die Untersuchungszeit garantiert wiederum eine hohe Mittelungszahl, die für die Beurteilung von Restantworten elementar ist. Bei Patienten mit degenerativen Netzhauterkrankungen (z.B. Retinitis Pigmentosa) ist die Blendungsneigung größer als bei gesunden Probanden. Deshalb ist die Anwendung von niedrigen Intensitäten vor allem bei diesen Patienten für die ERG-Untersuchung essentiell. In der aktuellen Studie wird die isolierte photopische ERG-Messung mit geringen Intensitäten durch Anwendung anderer Techniken, wie Frequenz und spektrale Adjustierung des Stimulus und die spektrale Adaptation realisiert. Grundlegend für die photopische ERG-Untersuchung ist jedoch eine vorhergehende 10 minütige Helladaptation bei mindestens 30 phot cd/m².

5.4. Blauzapfen-ERG:

5.4.1. Rahmenbedingung für die Blauzapfenstimulation

Der Blauzapfenanteil der menschlichen Retina ist im Vergleich zu den Grün- und Rotzapfen geringer vorhanden. Die meisten Blauzapfen sind parafoveal lokalisiert [Curcio, Allen *et al.* 1991, Williams, MacLeod *et al.* 1981]. Sie unterscheiden sich auch morphologisch von den anderen Zapfen. Die Blauzapfen besitzen ein längeres inneres Segment. Die Fortsätze reichen tiefer in die äußere plexiforme Schicht [Ahnelt, Keri *et al.* 1990]. Das Blauzapfen-ERG reagiert sehr sensibel auf Beeinträchtigungen der Netzhaut, wie bei Glaukom, Diabetes mellitus, toxischen Einflüssen und hereditären Netzhautdegenerationen [Greenstein, Hood *et al.* 1989, Mortlock, Chiti *et al.* 2005, Yamamoto, Kamiyama *et al.* 1996]. Häufig ist das Blauzapfen-ERG vor dem ERG der mittel- und langwelligen Zapfen betroffen. Somit ist die Blauzapfenfunktion als Frühparameter von Netzhauterkrankungen zu sehen. Die quantitative Unterlegenheit der Blauzapfen im Vergleich zu den mittel- und langwelligen Zapfen erfordert eine spezielle elektroretinographische Untersuchungsmethode. In der aktuellen Studie wurde die SAT (Selective Adaptation Technique) angewandt. In der klinischen Anwendung ist die SAT besser zu realisieren als die SST (Silent Substitution Technique) [Marmor, Cabel *et al.* 2004]. Der Blauzapfen hat eine maximale spektrale Sensitivität bei 430nm [Nagata 1963]. Im Gegensatz dazu ist der Grünzapfen bei 534nm und der Rotzapfen bei 564nm am sensibelsten [Abbildung 5.1]. Diese Tatsache wird bei der SAT zu Nutze gemacht, um eine möglichst isolierte Blauzapfenableitung zu erhalten. In der Vorstudie der aktuellen Arbeit wurde der Aufwand für eine Blauzapfenableitung in der klinischen Anwendung schnell deutlich. Die elektroretinographische Blauzapfenableitung benötigt zunächst eine vorhergehende spektrale Adaptation der mittel- und langwelligen Zapfen. Diese sollte mindestens für 10 Minuten dargeboten werden. Das ist in der klinischen Routineuntersuchung mit einer enormen Belastung der Patienten verbunden. Die gesamte ERG Untersuchung verlängert sich dadurch um weitere 15 Minuten. Weiterhin wurde beobachtet, dass selbst unter Einhaltung der

vorgesehenen Adaptationszeit von 10 Minuten sehr große interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden bestehen. Dabei kann der Anteil an den Rot- und Grünzapfen bei jedem Probanden sehr unterschiedlich sein, obwohl eine identische Hintergrundbeleuchtung eingesetzt wurde. So konnte nach der Darbietung der Hintergrundbeleuchtung für 10 Minuten dennoch eine a-Welle und eine Off-Antwort beobachtet werden, obwohl die Stimulationsintensität sehr gering war. Aus diesem Anlass und unter Beachtung der Erkenntnisse aus der Vorstudie wurde ein neues Stimulationsparadigma für die Blauzapfenableitung programmiert [Kapitel 7.2].

5.4.2. Neues Stimulationsparadigma für die Blauzapfen

Das neue Paradigma soll die spektrale Adaptation in Form einer 10 minütigen Hintergrundbeleuchtung durch zwei helle Sättigungsblitze ersetzen. Die zwei Sättigungsblitze werden vor den Blauzapfenstimulus vorgeschaltet [Abbildung 5.5 (2*Red Flash)]. Durch die zeitlich schnelle Abfolge von Sättigungsblitzen und Blauzapfenstimulus (120ms) soll der Anteil der Grün- und Rotzapfen in der ERG-Antwort minimiert werden. Dadurch kann die 10 minütige spektrale Adaptation der mittel- und langwelligen Zapfen umgangen werden. Die Sättigungsblitze sind jedoch nicht nur als spektrale Adaptation vorgesehen, sondern auch als maximale Antwort der Grün- und Rotzapfen. Durch die rote Stimulations-LED (635nm) können die mittel- und vor allem langwelligen Zapfen optimal stimuliert werden. Die hohe Intensität der Sättigungsblitze (1000 phot cd/m²) und die schnelle zeitliche Abfolge ermöglichen eine Sättigung der Grün- und Rotzapfen. Die Blauzapfen werden bei einer Wellenlänge von 635nm nicht beeinflusst. Der zweite Sättigungsblitz folgt in einem festen zeitlichen Abstand (92ms) auf den ersten. Die Sättigungsblitze sind von kurzer Dauer, damit eine deutliche Registrierung der PhNR und der i-Welle möglich wird. Durch die zeitliche Abfolge der beiden Sättigungsblitze kann eine Abhängigkeit der Potentiale beschrieben werden. Die Quotienten der Wellen (statt PhNR, n-Welle) des ersten und des zweiten Blitzes (Potential erster Blitz / Potential zweiter Blitz) helfen eine Funktionsstörung des Zapfensystems aufzudecken.

[25.01.2011]

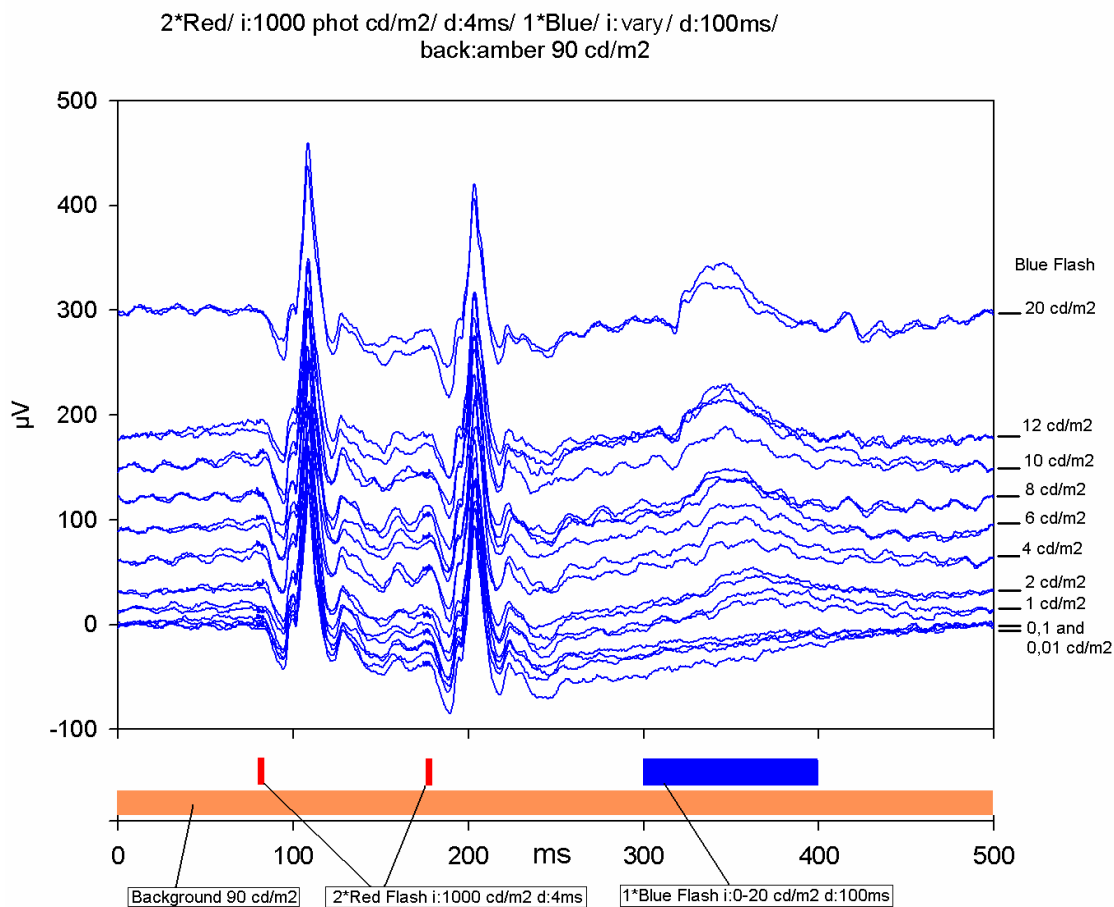


Abbildung 5.5: Intensitätsserie in der Hauptstudie des Blauzapfen-ERG mit dem neuen Paradigma. Die beiden Rotblitze (2*Red Flash) werden vor dem Blauzapfenstimulus (1*Blue Flash) generiert. Die orange Hintergrundbeleuchtung wird permanent dargeboten (Background 90 cd/m²). Die Intensität wurde für den Blaustimulus variiert (0,01-20 cd/m²).

Für Normalprobanden wurden die Quotienten samt Standardabweichung kalkuliert [Tabelle 7.4]. Quotienten von 0,6 und kleiner sollten auf die Korrektheit überprüft werden. Unter Umständen sollte eine Messung mit Quotienten von kleiner als 0,6 wiederholt werden. Quotienten von größer als 1,3 lassen auf eine Funktionsstörung der Zapfen schließen (bei Vitamin A Mangel zum Beispiel). Die permanente Hintergrundbeleuchtung mit 90 phot cd/m² bietet eine Verstärkung der Helladaptation. 90 phot cd/m² entsprechen 4500 phot td/m² bei einem Pupillendurchmesser von 8mm. Damit wird eine Stäbchenbeteiligung, die unter 2000 td/m² noch vorhanden sein könnte, ausgeschlossen [Aguilar and Stiles 1954]. Die Hintergrundbeleuchtung wird mit der orangen LED mit einer Wellenlänge von 596nm generiert. Diese

Wellenlänge ist für die Sättigung der Grün- und der Rotzapfen geeignet, da sie die beiden Zapfenarten am besten zu sättigen vermag ohne einen Einfluss auf die Blauzapfen auszuüben [Abbildung 5.1]. Das neue Paradigma erlaubt eine bessere Analyse von Restantworten, die nur eine minimale b-Wellenamplitude aufweisen. Durch die Darbietung von drei Blitzen werden 3 charakteristische b-Wellenamplituden im ERG erkennbar [Abbildung 5.5]. Bei einer minimalen b-Wellenamplitude ist diese von Artefakten besser zu unterscheiden als bei einer Einzelblitzableitung. Die Einzelblitzableitung kann durch ein einziges Artefakt in den zahlreichen Mittelungen verfälscht werden, so dass eine geringe aber unechte b-Wellenamplitude entsteht. Bei einer Ableitung von 3 b-Wellenamplituden wird ein Artefakt an allen Amplituden erkennbar. Auch wenn die Blauzapfenfunktion nur minimal ist, kann anhand der Begutachtung der beiden Sättigungsblitze abgeschätzt werden, ob ein Artefakt ursächlich für die deformierte b-Wellenamplitude ist. Das bietet enorme Vorteile bei der Ableitung und Beurteilung von Restfunktionen in der Zapfenantwort.

5.4.3. Optimierung des Blauzapfenstimulus

Die blaue LED mit 470nm wurde für die Blauzapfenableitung benützt, da dies die niedrigste Wellenlänge aller verbauten LEDs im Espion® System ist. Die Anwendung von niedrigeren Wellenlängen, die der maximalen spektralen Sensitivität der Blauzapfen bei 420nm entsprechen würden, wäre auf jeden Fall sinnvoll. In der aktuellen Studie wäre dies jedoch unter Garantie eines engen spektralen Wirksamkeitsfeldes nicht zu erreichen. Aus diesem Grund wurde die blaue LED mit einem engen spektralen Wirksamkeitsfeld bei 470nm angewandt. Die Stimulationseinstellungen des Blaublitzes resultierten zum Teil aus der Exploration und der Vorstudie und zum Teil aus der Hauptstudie. Eine Festlegung der Pulszeit auf 100ms wurde bereits in der Vorstudie deklariert, da hierdurch eine Beurteilung der Off-Antwort ermöglicht wird, die ein Indiz für eine hohe Grün- und Rotzapfenantwort darstellt. Die genaue Untersuchung der Stimulationsintensität wurde in der Hauptstudie an 8 Probandenmessungen durchgeführt. Dabei erfolgte vor der Auswertung der b-Wellenamplitude

zunächst die Kurvenanalyse. Die Intensitäten, die eine a-Welle oder eine Off-Antwort auslösten wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Hierbei werden bereits die mittel- und langwelligen Zapfen stimuliert. Aus diesem Grund erfolgte die Auswahl der maximalen b-Wellenamplitude nur an Intensitäten, die keine a-Welle oder Off-Antwort auslösten. Als optimale Stimulationsintensität resultierten 6 phot cd/m² für den Blaustimulus. Es muss angemerkt werden, dass die Blauzapfenantwort nur bei 8 von 16 Probanden untersucht wurde. Bei 8 Probanden waren die ERG Messungen zum Blauzapfen nicht auswertbar, da viele Artefakte (Blinzel-, Muskel- und Augenbewegungen) die ERG-Messungen verfälschten. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Stimulationseinstellungen sehr hohe Lichtintensitäten enthielten und die Probanden deshalb einer hohen Blendung ausgesetzt wurden und somit durch Lidschluss auf diese Blendung reagierten. Zum anderen kann es jedoch daran liegen, dass die Blauzapfenableitung in der Studie am Ende einer sehr langen Untersuchungsserie durchgeführt wurde und die Probanden durch die vorhergehenden Messungen bereits ausgelastet waren. Vorteilhaft erwies sich bei den Probandenuntersuchungen eine Eingewöhnungsphase, bei der den Probanden vor der ERG-Messung der Blauzapfen die Stimulation aus der Distanz präsentiert wurde. Damit einhergehend konnte eine Erklärung des folgenden Stimulationsprotokolls erfolgen. Weiterhin wird auch aus diesem Grund eine Durchführung von nur 10 Mittelungen pro Einzelmessung mit einem Interstimulusintervall [Bui, Weisinger *et al.*] von 1000-1500ms empfohlen. Das neu entwickelte Programm benötigt eine lange Aufzeichnungszeit von 500ms je Einzelmessung. Durch das Interstimulusintervall verringert sich die Wahrscheinlichkeit von Lidschlussartefakten. Die Blendungseigenschaft der beiden Sättigungsblitze ist zu hoch um ein Interstimulusintervall zu umgehen. Dadurch kann das Potential an Lidschluss- oder Muskelartefakten vermindert werden.

5.4.4. Nachweis der tatsächlichen Blauzapfenantwort

Der Beweis der tatsächlichen Blauzapfenstimulation durch das entwickelte Stimulationsparadigma erfolgte durch einen Vergleich verschiedener

Stimulationsfarben für den Blauzapfenstimulus. Anstatt der blauen LED mit 470nm wurde die grüne LED (511nm), die rote LED (635nm) und das weiße Mischlicht (6500K) generiert. Aus den resultierten ERG-Ableitungen wird eine deutliche a-Welle, eine Off-Antwort und eine schnelle Komponente in der b-Welle ersichtlich [Abbildung 4.65]. Weiterhin wird bei der roten LED die langsame b-Wellenkomponente, die unter Anwendung der grünen LED und des weißen Mischlichts zu identifizieren war, nicht registriert. Die rote LED mit 635nm hat auf Grund der spektralen Eigenschaften keinen Einfluss auf die Blauzapfen. Die grüne LED und das weiße Mischlicht können die Blauzapfen jedoch stimulieren. Deshalb wird bei diesen beiden Stimulationsfarben nach einem schnellen Potential (wahrscheinlich Grün- und Rotzapfenantwort) eine langsam ansteigende b-Welle (wahrscheinlich Blauzapfenantwort) verzeichnet. Die langsame Komponente der b-Welle der grünen LED und des weißen Mischlichts weist dabei eine ähnliche Gipfelzeit (grüne LED im LA 53,5ms und RA 52,5ms, weißes Mischlicht im LA 49ms und RA 47ms) wie die Blauzapfenableitung mit der blauen LED (65,5ms im LA und 63ms im RA) auf. An der Verkürzung der Gipfelzeit von der blauen LED zur grünen LED und zum weißen Mischlicht, wird der Nachweis der von den Blauzapfen generierten b-Welle erbracht. Die blaue LED stimuliert die Blauzapfen am besten, weshalb die b-Welle die längste Gipfelzeit aufweist. Die grüne LED besitzt spektral das nächst Höchste Stimulationspotential auf die Blauzapfen, das jedoch kleiner ist als das der blauen LED. Das weiße Mischlicht weist ein breites spektrales Wirksamkeitsfeld auf, weshalb die b-Wellengipfelzeit noch kürzer als bei der grünen LED verzeichnet wird. Die rote LED hat kein Stimulationspotential auf die Blauzapfen, was an der fehlenden langsamen b-Wellenkomponente gezeigt werden kann [Abbildung 4.65]. Mit der blauen LED wird kein schnelles Potential in der b-Welle registriert, wie mit der grünen LED und mit dem weißen Mischlicht, da sie die Grün- und Rotzapfen nur minimal stimuliert. Durch die Sättigungsblitze wird das minimale Potential der blauen LED die Rotbeziehungsweise die Grünzapfen zu stimulieren, aus der ERG Antwort extrahiert. Das sind eindeutige Hinweise auf die wahrscheinliche Blauzapfenantwort unter Benützung der blauen LED mit 470nm.

5.5. Résumé:

In der aktuellen Studie wurden vier ERG-Protokolle definiert [Tabelle 7.6]. Diese beinhalten eine Stimulation der isolierten Stäbchenantwort, der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort, der photopischen Antwort und des Blauzapfen-ERG. Die Definition der Protokolle erfolgte in theoretischen und praktischen Schritten. Nach der Exploration der optimalen Einstellungen für das jeweilige Photorezeptorensystem erfolgte die Optimierung der ERG Einstellungen. Aus der Vorstudie wurden erste Erkenntnisse zu den Stimulationsprotokollen gewonnen. In der Hauptstudie erfolgte eine genaue Untersuchung der Stimulationsparameter unter Beachtung der Erkenntnisse aus der Vorstudie. Die Protokolle dienen der Untersuchung von Restpotentialen bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration. Aus diesem Grund wurden die Protokolle auf die Anwendung am Patienten abgestimmt. Obwohl die Optimierung der ERG-Protokolle in der aktuellen Arbeit an gesunden Probanden erfolgte, wurde durch die Exploration die Situation bei Patienten mit Netzhauterkrankungen bei der Optimierung der Protokolle in Betracht gezogen. Das erfolgte vor allem durch die Beobachtung der klinischen ERG Untersuchung an Patienten mit dem standardisierten Protokoll (ISCEV Standard) aber auch an Einzelmessungen mit sehr schwachen Lichtintensitäten, um die Amplitudenhöhe bei Patienten mit Netzhauterkrankungen zu simulieren. Die Resultate der Hauptstudie können jedoch nicht nur bei Netzhauterkrankungen, sondern auch anderen, von den Normen abweichenden Faktoren, in der Amplitude und Gipfelzeit von gesunden Probanden abweichen. Es wird erwartet, dass zum Beispiel Faktoren, die die optischen Medien beeinträchtigen, einen Einfluss auf das ERG haben werden (z.B. Linsentrübung, Katarakt oder Myopie). Selbst die unterschiedlichen Altersgruppen weisen variable ERG-Antworten auf. Wobei bei einer Linsentrübung durch die Zunahme der Lichtstreuung der Linse eine Amplitudenzunahme möglich ist. Eine weit fortgeschrittene Katarakt, hohe Myopie oder auch das zunehmende Alter haben hingegen eine supprimierende

Wirkung auf die ERG-Amplitude. Die ERG-Messung am gesunden Probanden konnte diese Einflüsse nicht simulieren. Dennoch ist eine Optimierung der ERG-Protokolle am erkrankten Auge oder an Augen mit den zuvor beschriebenen Einflussfaktoren schwierig, da die ERG-Messung multiplen und gleichzeitig variablen Einflüssen ausgesetzt wäre und eine Optimierung dahingehend unmöglich erscheint. Aus diesem Grund wurde eine Optimierung der Stimulationsprotokolle an gesunden Probanden durchgeführt.

Das Resultat sind vier Stimulationsprotokolle, die als Ergänzung zum ISCEV-Standard angewandt werden können. Die Mediane und Mittelwerte der Probandenmessungen werden als Referenzwerte tabellarisch zusammengefasst. Für die Auswertung der Flickerprotokolle ist die Anwendung der FFT, vor allem im Verlauf, zur quantitativen Analyse der Restantworten empfehlenswert. Die Stimulationsparameter wurden unter Berücksichtigung der Auswertung mittels FFT justiert. Bei sehr geringen Restantworten bei Patienten mit fortgeschrittener Netzhautdegeneration wird durch die FFT eine exakte Angabe der Stimulationsantwort ermöglicht. Dadurch kann eine genaue klinische Verlaufsbeobachtung realisiert werden und die Progredienz einer Netzhauterkrankung eng beobachtet werden.

Condition	Dark-adapted		Light-adapted	
	Skotopic	Combined	Photopic	Scone
Description	9Hz Blueflicker	9Hz Whiteflicker	33Hz Redflicker	Tripple-Flash Paradigma
Mean ± Standard Deviation (µV)	97,56 ± 25,54	127,9 ± 34,9	70,57 ± 32,7	30,07 ± 9,11
Median (µV)	101,51	131,12	64,1	27,88

Tabelle 5.2: Übersicht der Mittelwerte, Standardabweichungen und der Mediane aus den Probandenmessungen zu den differenzierten Protokollen, die als Normwerte herangezogen werden können. Das skotopische, kombinierte und photopische ERG-Protokoll wurde an 16 Probandenmessungen untersucht. Daraus ergeben sich die aufgelisteten Werte. Das Blauzapfenprotokoll wurde nur an 8 Probanden untersucht.

6. Zusammenfassung:

Der internationale Standard für klinische Elektrophysiologie (ISCEV-Standard) bildet eine wichtige Grundlage für die klinische Anwendung des ERG. Bei Patienten mit degenerativen Netzhauterkrankungen (z.B. Retinitis Pigmentosa, Stäbchen- und Zapfendystrophien) sind die ERG-Amplituden im Großteil der Fälle bereits erloschen, obwohl ein Restvisus (Fingerzeig, Handbewegung) noch zu evaluieren ist. Ziel der aktuellen Studie war eine Optimierung der ERG-Einstellungen, damit eine Ableitung von Restpotentialen und deren quantitative Erfassung ermöglicht werden. Die verschiedenen Photorezeptorensysteme sollten hierbei in der ERG-Untersuchung differenziert werden, um eine möglichst vollständige klinisch-diagnostische Beurteilung realisieren zu können. Durch eine Exploration der zur Verfügung stehenden Techniken und der physiologischen Eigenschaften der Photorezeptoren wurde eine Auswahl der chromatischen Einstellungen, der Frequenzen und weiterer Stimulationseinstellungen durchgeführt. In der Vorstudie konnten an Einzelmessungen die ersten Erkenntnisse über eine optimale Intensität und Pulszeit gewonnen werden. Die Hauptstudie diente der genauen Definition der Intensität und der Pulszeit.

Das resultierende Protokoll [Tabelle 7.6] präsentiert die Stimulationsparameter und fasst die Ergebnisse der aktuellen Studie zusammen. Die Anwendung der neuen Stimulationsprotokolle wird als Erweiterung des ISCEV-Standards für ERG Untersuchungen empfohlen. Die Analyse von Restantworten mittels FFT ermöglicht eine genaue quantitative Aussage zu den Untersuchungsergebnissen. Die Stimulationsprotokolle wurden auf die Anwendung der FFT optimiert. Im Hinblick auf neue Therapiestrategien, wie Stammzellentherapie und die Neuroprotektion durch verschiedene Behandlungen, wird durch die entwickelten ERG-Protokolle eine optimale Verlaufsbeobachtung der Patienten gewährleistet.

7. Appendix

7.1. Rolle der Mittelungen und der Stimulationsfrequenz

In der ERG Untersuchung entstehen neben den retinalen Signalantworten auf einen Reiz auch Artefakte, die durch das Zwinkern des Patienten oder das Netz-Rausch-Signal generiert werden. Bei sehr geringen retinalen Signalantworten auf einen Lichtreiz ist eine möglichst große Artefaktreduktion notwendig, um Verfälschungen oder Überlagerungen der retinalen Antwort zu vermeiden. Durch das Mitteln von periodischen Signalen ist eine Reduktion der Artefakte möglich. Die Artefaktreduktion (R) ist hierbei von der Anzahl der Mittelungen (N) abhängig. Die Beziehung zwischen der Artefaktreduktion (R) und der Anzahl der Mittelungen (N) setzt sich wie folgt zusammen:

$$R = \sqrt{N}$$

Formel 7.1: Berechnung der Artefaktreduktion (R) in Abhängigkeit von der Anzahl der Mittelungen (N).

Dies gilt, wenn die Phase der Artefakte in zufälliger Beziehung zum dargebotenen Stimulus ist. Die Stimulation wird in unserer Studie so schnell wiederholt, dass ein synchrones Zwinkern nicht möglich ist. Das 50Hz Netzrauschen hat eine fixe Phase. Die Harmonische der Flickerfrequenz darf dem 50Hz Netzrauschen nicht entsprechen. Das ist aber in den ersten Untersuchungen der aktuellen Studie mit 10Hz- und 30Hz-Flickerstimulation der Fall gewesen. Auf Grund dieser Tatsache wurde in den weiteren Untersuchungen die Flickerstimulation auf 9Hz, beziehungsweise 33Hz, geändert.

Die Anwendung einer kontinuierlichen Flickerstimulation als sogenanntes „Steady State Signal“ erleichtert die Mittelung von vielen Einzelmessungen. Dabei erfolgt für einen bestimmten Zeitabschnitt, im Beispiel des 9Hz Flickers für 16,6s, eine kontinuierliche Flickerdarbietung. Aus dieser Gesamtuntersuchung werden kurze Einzelmessungen, im Beispiel 333ms, während der Untersuchung „herausgeschnitten“ und mehrere dieser Einzelmessungen miteinander gemittelt. In 16,6s Untersuchungszeit erhalten

wir dadurch bei einer Messung von 333ms, das beim 9Hz-Flicker 3 b-Wellenamplituden entspricht, 50 Mittelungen. Die limitierenden Faktoren der Anzahl von Mittelungen sind die Lidschlussartefakte der Patienten und speziell für die skotopische ERG Untersuchung die Auflösung der Dunkeladaptation nach einer gewissen Messzeit.

7.2. Programmierung der Blauzapfenstimulation

Das neue Paradigma wird durch ein programmiertes Stimulationsprotokoll generiert [Tabelle 7.1]. Dabei werden die Parameter für das Stimulationsprotokoll extern (nicht mit der Espion® Software) durch ein ASCII-Editor programmiert. Das programmierte Protokoll kann in die Espion® Software integriert werden. Einzelne Parameter, wie die Intensität der Sättigungsblitze und des Blauzapfenstimulus, sowie die Pulzeiten, lassen sich bequem durch die Espion® Software steuern.

Die Hintergrundbeleuchtung wird in der Espion® Software eingestellt und kann übernommen werden. Die Hintergrundbeleuchtung wird permanent dargeboten. Es wird zunächst nach einer 80ms andauernden Stimulationspause (nur Hintergrundbeleuchtung) der erste Sättigungsblitz generiert. Dieser hat im aktuellen Beispiel eine Intensität von 1000 cd/m² und eine Pulszeit von 4ms. Danach erfolgt in einem festen Abstand von 92ms der zweite Sättigungsblitz mit der roten LED und den gleichen Einstellungen. Nach weiteren 120ms wird die Blauzapfenstimulation für 100ms dargeboten. Am Schluss der Stimulation setzt erneut eine Stimulationspause (nur Hintergrundbeleuchtung) von 100ms Dauer ein. Somit hat das Protokoll eine Gesamtdauer von 500ms. Die zeitliche Abfolge des Protokolls kann nur durch Änderung der programmierten Stimulation erfolgen. Das bedeutet, dass die einzelnen Parameter für die zeitlichen Abstände und Stimulationsdarbietungen in der Tabelle 7.1 geändert werden müssen. Das betrifft auch die Intensitätsänderung.

GLOBAL	title\$	SconeSelfProg first 2 Red on Red Back then Blue Stim		
GLOBAL	V1name\$	Color 1 Int.	V1Default\$	1000
GLOBAL	V2name\$	Color 2 Int.	V2Default\$	6
GLOBAL	V3name\$	Duration ms	V3Default\$	4
GLOBAL	V4name\$	Space ms	V4Default\$	100

BLOCK	1	ms\$	&4-21	FLAGS\$	16384				
BLOCK	2	color\$	RED	lum\$	&1	ms\$	&3	FLAGS\$	16384
BLOCK	3	ms\$	&4-9	FLAGS\$	16384				
BLOCK	4	color\$	RED	lum\$	&1	ms\$	&3	FLAGS\$	16384
BLOCK	5	ms\$	&4+19	FLAGS\$	16384				
BLOCK	6	color\$	BLUE	lum\$	&2	ms\$	&4	FLAGS\$	16384
BLOCK	7	ms\$	&4-1	FLAGS\$	16384				

Tabelle 7.1: Programm für den Blauzapfenstimulus. Je Block benötigt das Programm eine Verarbeitungszeit von 1ms. Um diese zeitliche Abstände zu berücksichtigen, wurde jeweils 1ms von den eingestellten zeitlichen Perioden abgezogen (ms\$ &4-1). Dadurch wird eine korrekte zeitliche Verarbeitung möglich.

7.3. Ergebnisse der Hauptstudien

Die Ergebnisse der Hauptstudien werden in diesem Kapitel detailliert beschrieben. Es erfolgt eine Auflistung der Auswertungen und die Darstellung der Kennlinien der Probandenmessungen.

7.3.1. Skotopische Hauptstudie

An der Untersuchung der Pulszeit für das neu entwickelte skotopische ERG-Protokoll wurde die Vorgehensweise bei der Auswahl der optimalen Parameter in der Hauptstudie beispielhaft erläutert. Folgend werden die Ergebnisse der Auswahl einer optimalen Intensität für das 9Hz Blauflicker Protokoll dargestellt. Die Ergebnisse der b-Wellenamplituden aus 16 Probandenmessungen (jeweils 2 Augen) wurden gegen die angewandte Intensität aufgetragen [Abbildung 7.1]

[25.01.2011]

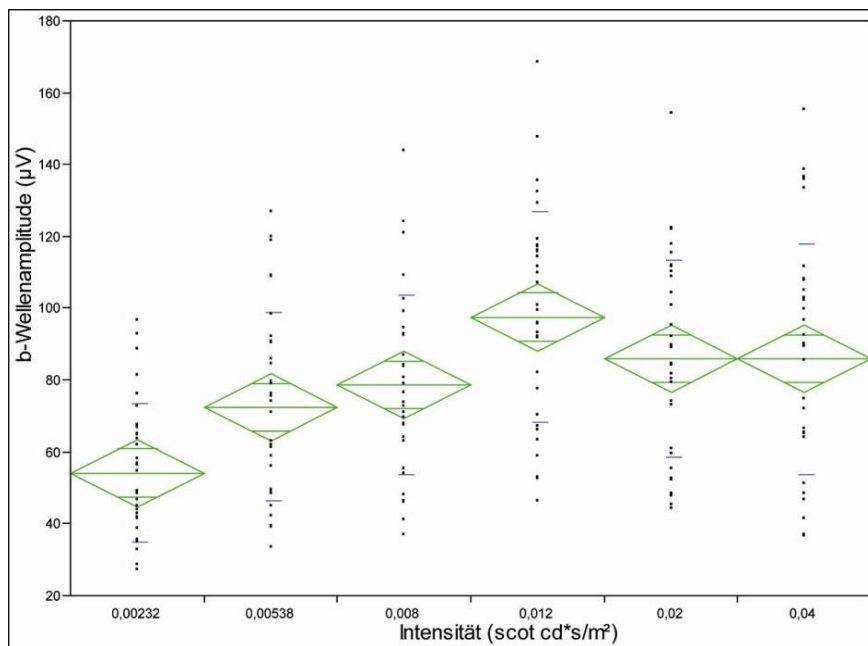


Abbildung 7.1: Die b-Wellenamplituden aller Probandenmessungen. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {y-Achse=b-Wellenamplitude in μV ; x-Achse=Intensität in $\text{scot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$; Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

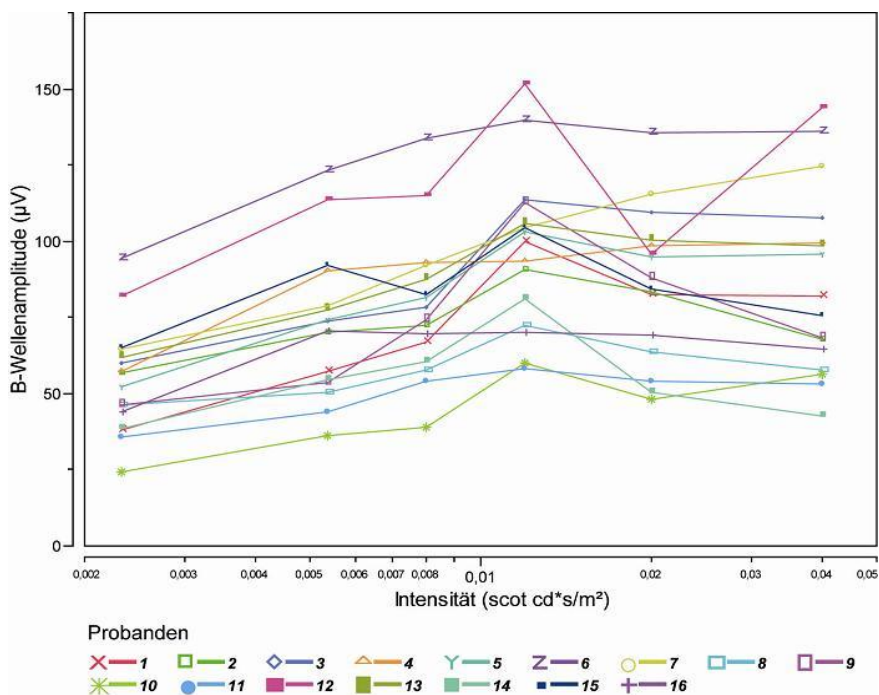


Abbildung 7.2: Kennlinien der gemittelten b-Wellenamplituden für jeden Probanden. Gemittelt wurden die Ergebnisse beider Augenmessungen für die jeweilige Stimulationsintensität. Die Nummerierung der farbigen Kodierung in der Legende des Schaubilds entspricht den Probandennummern. {y-Achse=Mittelwerte der b-Wellenamplitude beider Augen in μV ; x-Achse=Intensität in $\text{scot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ }

Eine Mittelung der Ergebnisse beider Augen ermöglicht die Erstellung einer Kennlinie für jeden Probanden, die gegen die Intensität aufgetragen werden

kann [Abbildung 7.2]. Daraus wurden die maximalen b-Wellenamplituden für jeden Probanden in der Hauptstudie zusammenfassend analysiert.

7.3.2. Hauptstudie kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort

Die Untersuchung der optimalen kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort erfolgte anhand der b- und a-Wellen. Zunächst wurde eine optimale Pulszeit untersucht. Die Intensität blieb für alle Messungen konstant. Eine Variation der Pulszeit wurde an 16 Probanden untersucht. Die b-Wellenamplituden aus den Probandenmessungen werden gegen die Pulszeit aufgetragen [Abbildung 7.3].

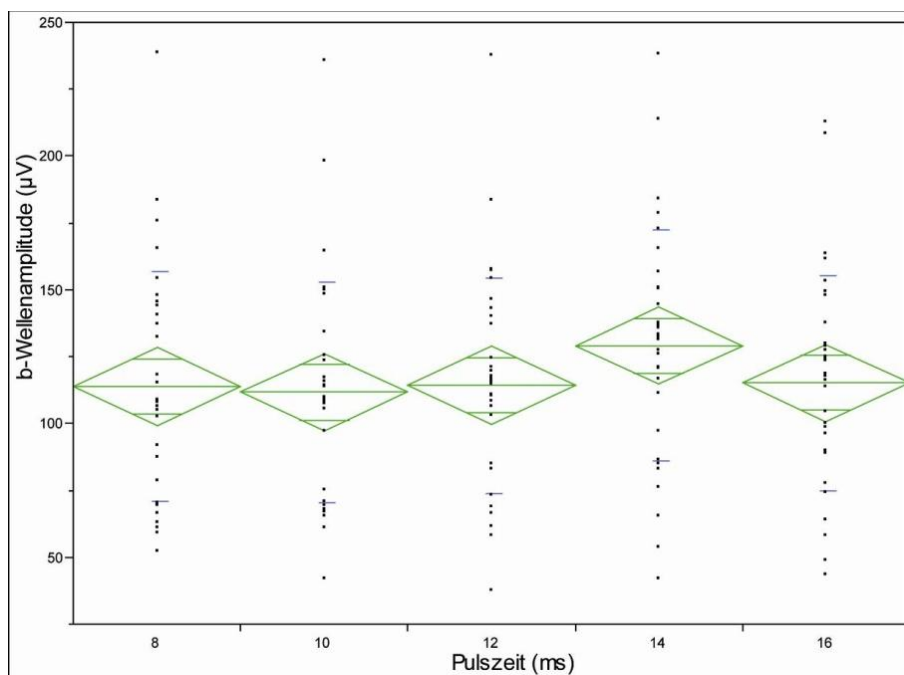


Abbildung 7.3: B-Wellenamplituden (y-Achse in µV) aller Probandenergebnisse, das heißt von 16 Probanden und jeweils 2 gemessenen Augen, für die jeweilige Pulszeit (x-Achse in ms). Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

Eine Auswertung der a-Wellenamplitude wurde im kombinierten Stäbchen- und Zapfen-ERG angeschlossen [Abbildung 7.4]

[25.01.2011]

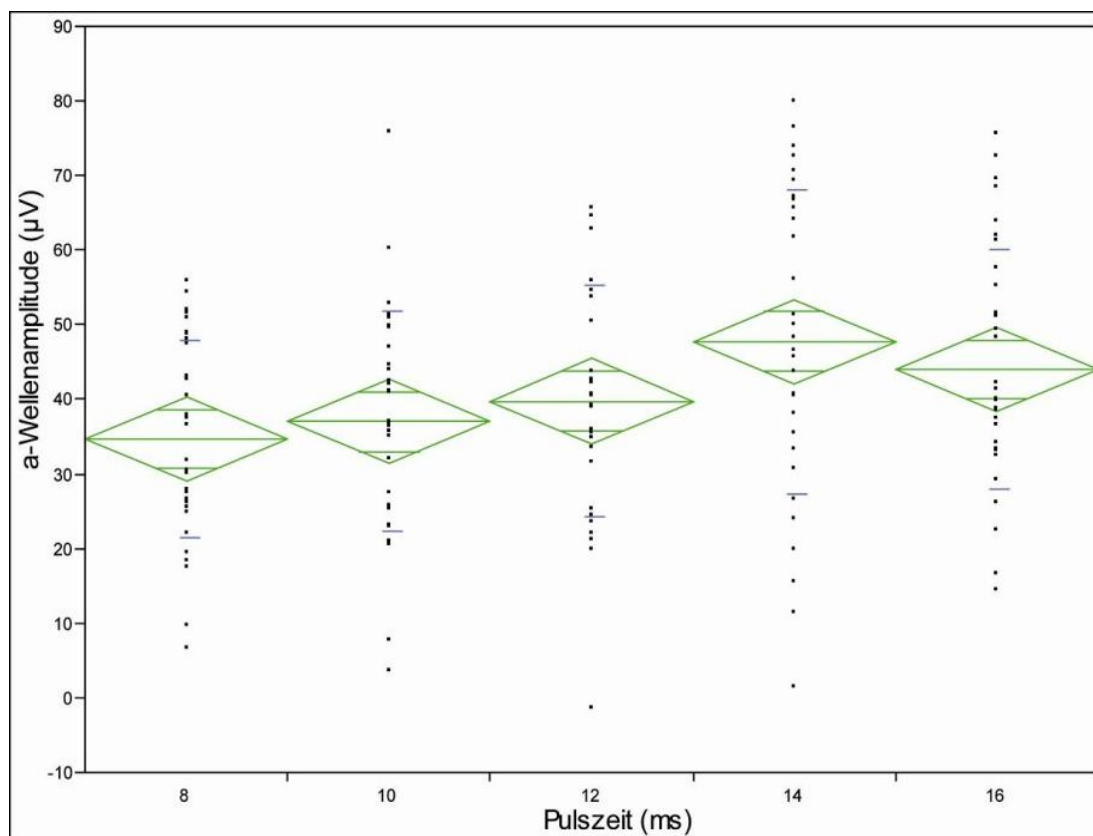


Abbildung 7.4: Die a-Wellenamplituden aller 16 Probandenmessungen (y-Achse in μV) wurden gegen die Pulszeit (x-Achse in ms) aufgetragen. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

Durch die Bildung der Mittelwerte beider Augenergebnisse eines Probanden können Kennlinien für jeden Probanden erstellt werden [Abbildung 7.5].

Hierbei wurden die b-Wellenamplituden und die a-Wellenamplituden ausgewertet. Aus den Verläufen wurde die maximale b- bzw. a-Wellenamplitude für jeden Probanden extrahiert und in einem Verteilungsdiagramm in der Hauptstudie erörtert.

[25.01.2011]

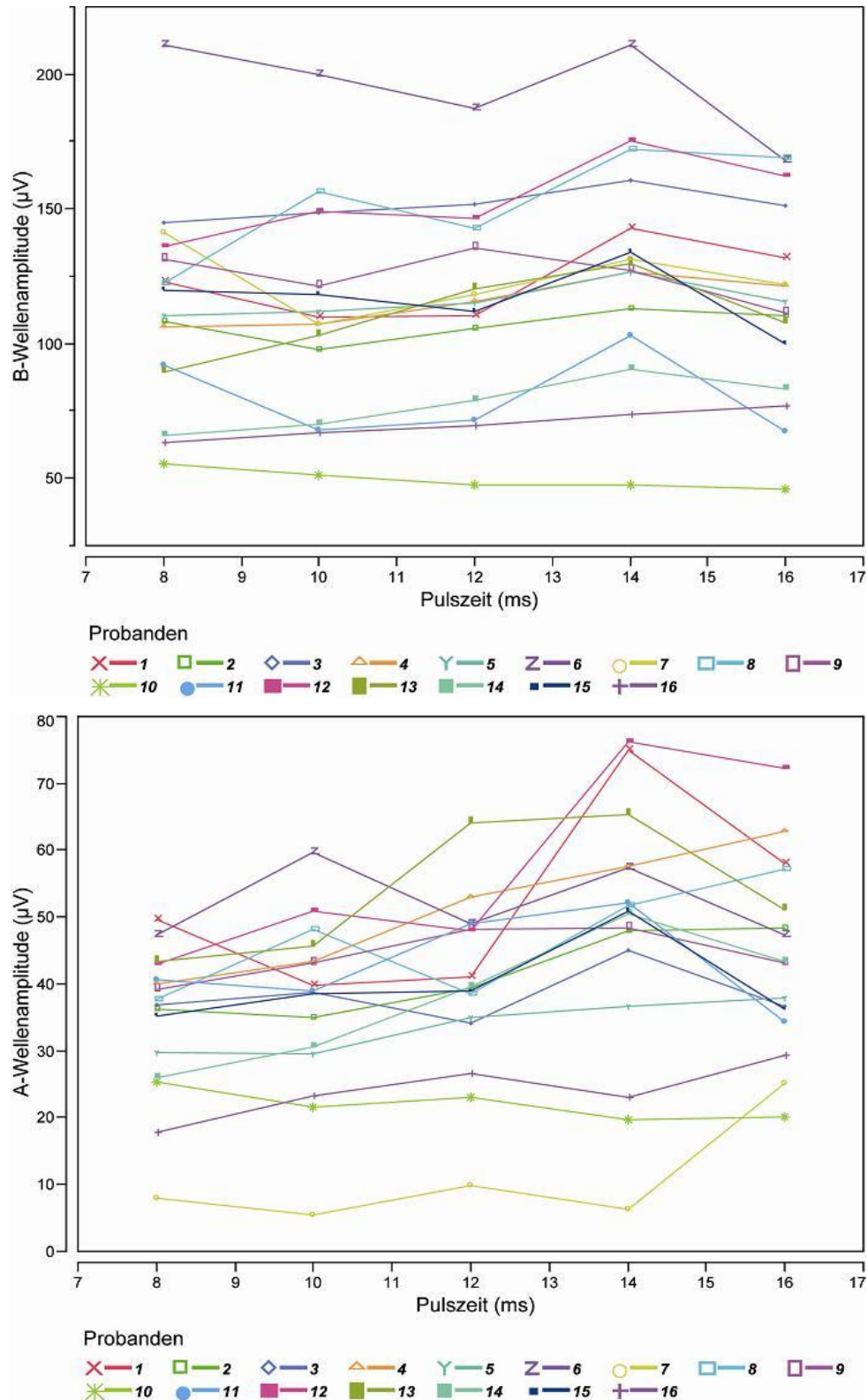


Abbildung 7.5: Die Kennlinien der Mittelwerte (y-Achse in µV) aus beiden Augen wurden für jeden Probanden mit der zugehörigen Pulszeit (x-Achse in ms) dargestellt. Oben wurden die b-Wellenamplituden und im unteren Schaubild die a-Wellenamplituden eingezeichnet.

Die Intensität der kombinierten Stäbchen- und Zapfenantwort wurde anhand

[25.01.2011]

von ERG Messungen unter Anwendung einer konstanten Pulszeit und variierenden Intensitäten untersucht [Abbildung 7.6].

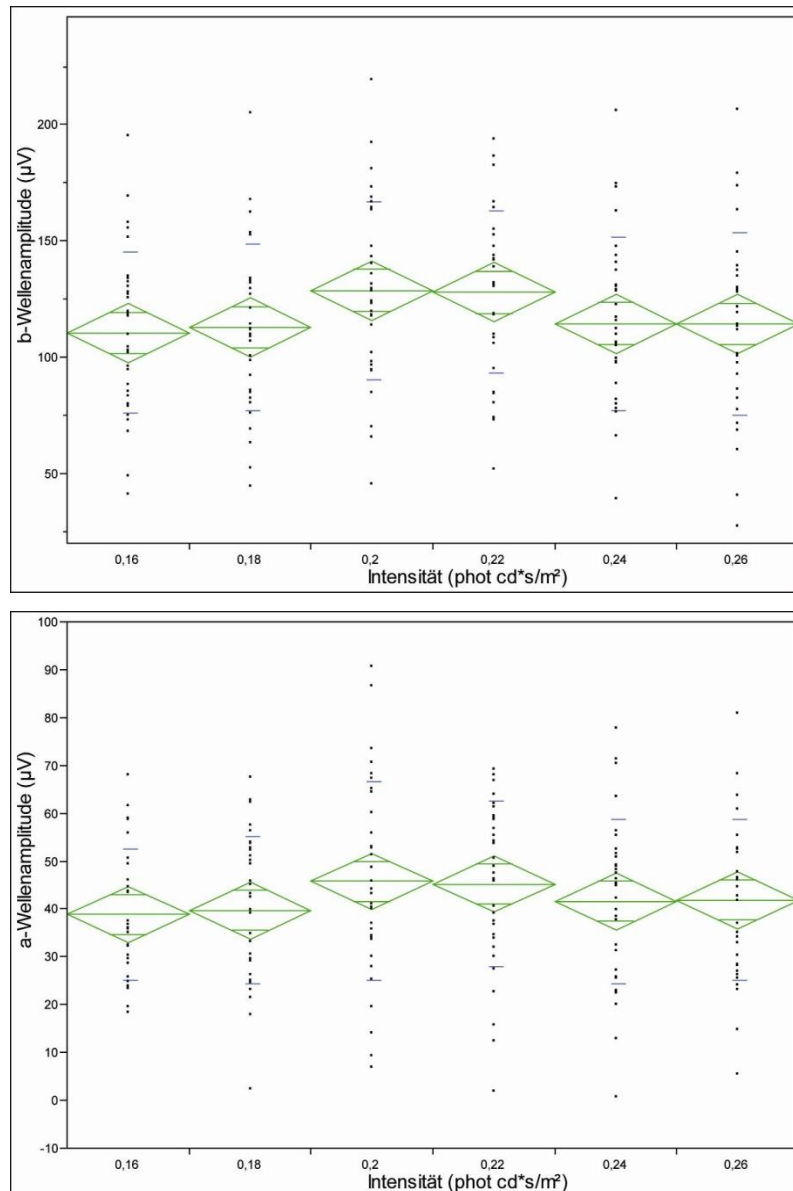


Abbildung 7.6: B-Wellenamplituden (oben) und a-Wellenamplituden (unten) aller 16 Probandenmessungen und beider Augen. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {y-Achse=Amplitude in µV; x-Achse=Intensität in phot cd*s/m²; Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

Aus diesen Ergebnissen wurden Mittelwerte zwischen beiden Augen jedes Probanden kalkuliert und als Kennlinien aufgetragen [Abbildung 7.7].

[25.01.2011]

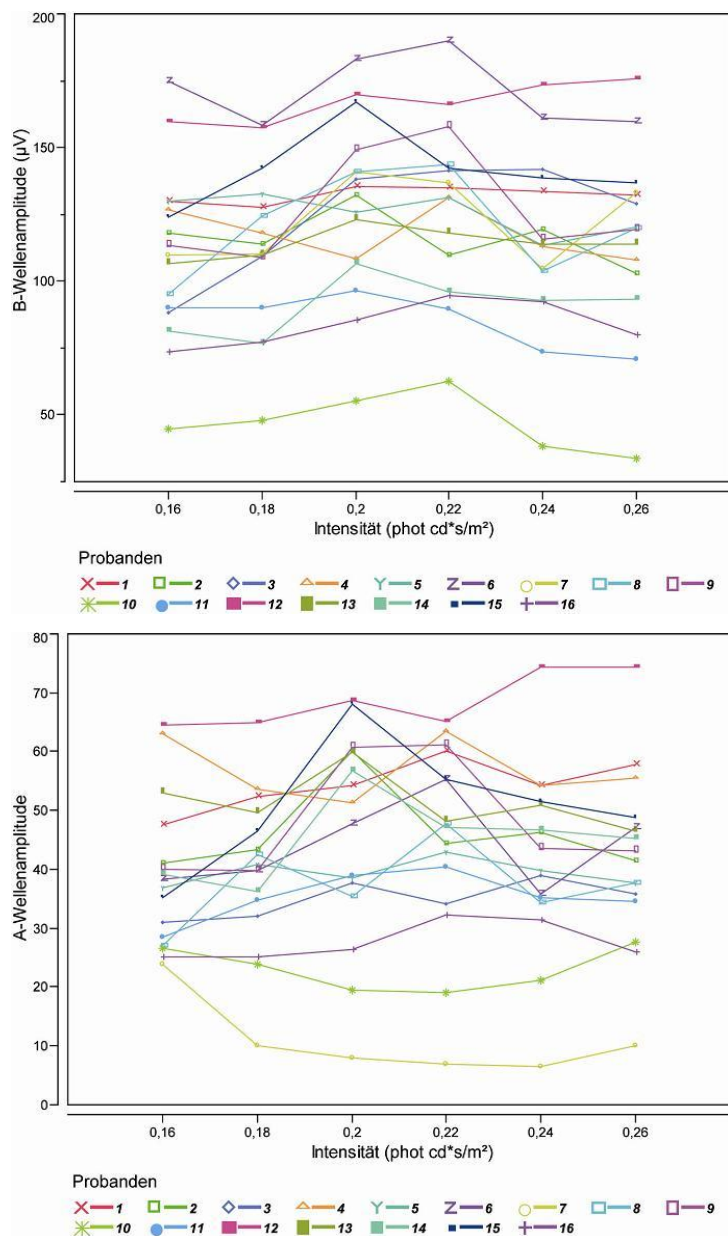


Abbildung 7.7: Kennlinien der Mittelwerte aus den beiden Augenergebnissen der Probanden. Die untere Legende (1-16) jedes Bildes beschreibt die Probandennummerierung. Oben wurden die Mittelwerte der b-Wellenamplituden (y-Achse), unten der a-Wellenamplituden (y-Achse) mit den jeweiligen Intensitäten (x-Achse) in phot cd*s/m² dargestellt.

Daraus wurde in der Hauptstudie eine Verteilung der maximalen b- bzw. a-Wellenamplitude kalkuliert [Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38].

7.3.3. Photopische Hauptstudie

Für die Untersuchung einer optimalen Pulszeit des photopischen ERG wurde zunächst eine Spanne von 10-18ms an 8 Probanden untersucht [Abbildung 7.8].

[25.01.2011]

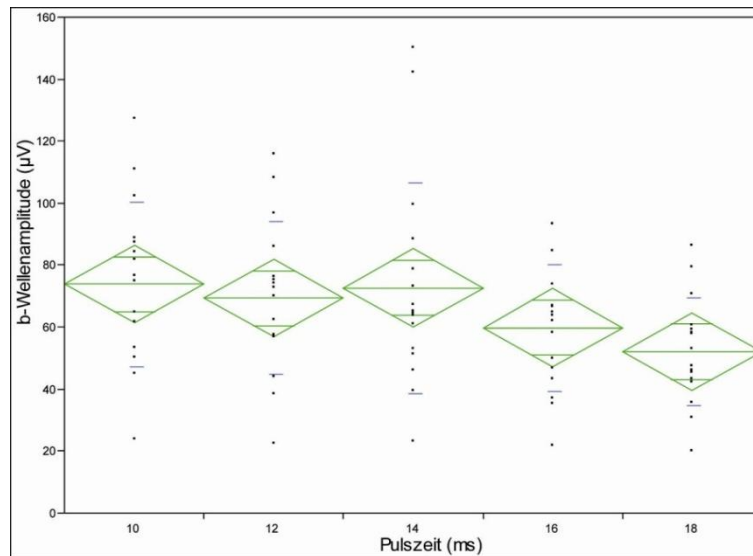


Abbildung 7.8: Im Diagramm wurden die b-Wellenamplituden (y-Achse in μV) der ersten 8 Probandenergebnisse für die jeweilige Pulszeit (x-Achse in ms) dargestellt. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

Daraus erfolgte die Mittelung der Ergebnisse beider Augen für jeden Probanden und die Erstellung von Kennlinien [Abbildung 7.9].

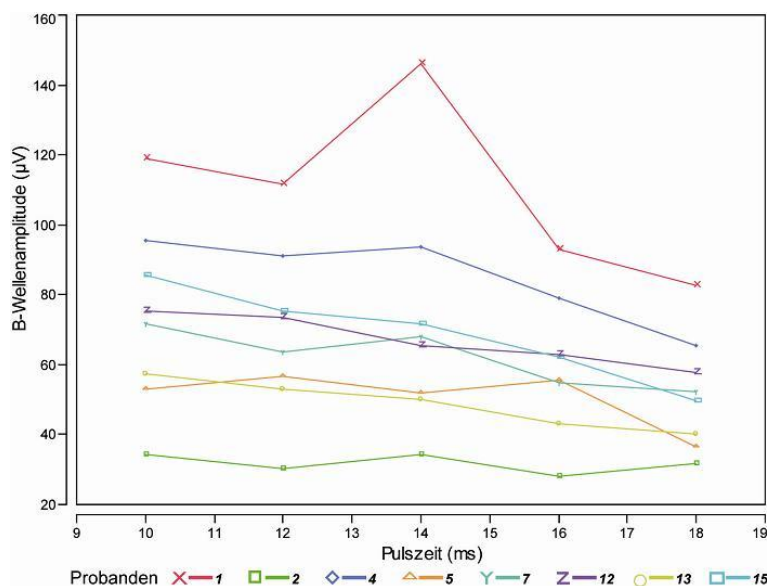


Abbildung 7.9: Kennlinien nach Proband geordnet. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten aus den b-Wellenamplituden beider Augen. Die angewandte Pulszeit ist in der x-Achse in ms angegeben. Die Mittelwerte in μV . Probandennummer wird in der unteren Legende angegeben.

Nach der Auswertung der Verteilung der maximalen Mittelwerte [Kapitel 4.3.2] wurde deutlich, dass eine Erweiterung der Zeitspanne für die Untersuchung der optimalen Pulszeit notwendig ist. Es wurden Untersuchungen mit Pulszeiten

[25.01.2011]

von 4-16ms an weiteren 8 Probanden durchgeführt [Abbildung 7.10].

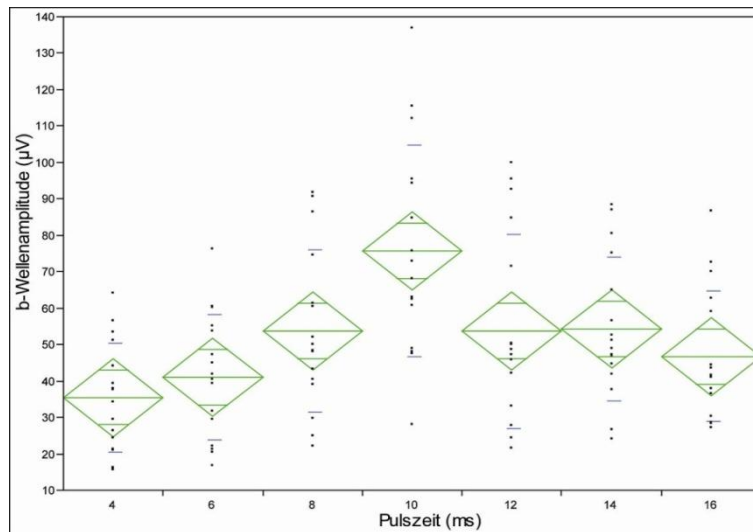


Abbildung 7.10: Die b-Wellenamplituden beider Augen von weiteren 8 Probanden. Nun mit der Spannweite für die Pulszeit von 4 bis 16ms. Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {y-Achse=Amplitude in μV ; x-Achse=Pulszeit in ms; Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}

Die Kennlinien der Mittelwerte aus beiden Augen zeigen bereits, dass die maximale b-Wellenamplitude am häufigsten unter Anwendung von 10ms Pulszeit zu finden ist [Abbildung 7.11].

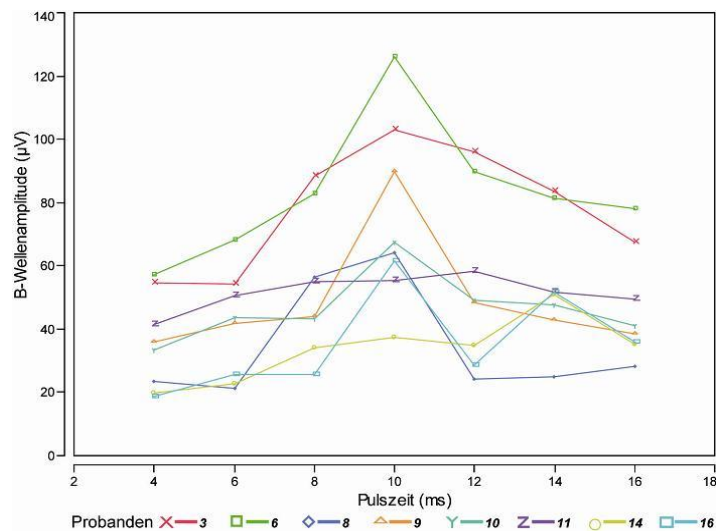


Abbildung 7.11: Die Mittelwerte (y-Achse in μV) aus beiden Augen wurden für jeden Probanden mit der zugehörigen Pulszeit (x-Achse in ms) dargestellt. Untenstehend werden die Probandennummern nach der zugehörigen Farbe erläutert.

Die Definition einer optimalen Pulszeit erfolgte durch die Analyse der Verteilung der maximalen Mittelwerte der b-Wellenamplitude aus den Probandenkennlinien [Kapitel 4.3.2].

[25.01.2011]

Eine optimale Intensität wurde durch gleichbleibende Pulszeiten und variierende Intensitäten an 16 Probanden untersucht [Abbildung 7.12].

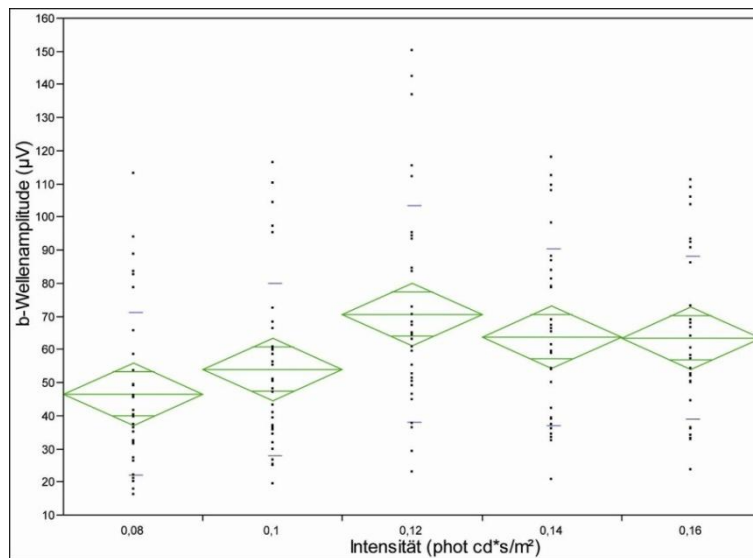


Abbildung 7.12: Die b-Wellenamplituden (y-Achse in μV) des 33Hz-Flickers aller Probanden. Die zugehörigen Intensitäten wurden in $\text{phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ angegeben (x-Achse). Die grünen Diamanten dienen der Darstellung der Mittelwerte. Die blauen Balken kennzeichnen die Standardabweichung. {Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 30 Einzelantworten}.

Für jeden Probanden wurden Mittelwerte zwischen beiden Augen gebildet und als Kennlinien gegen die Intensität aufgetragen [Abbildung 7.13].

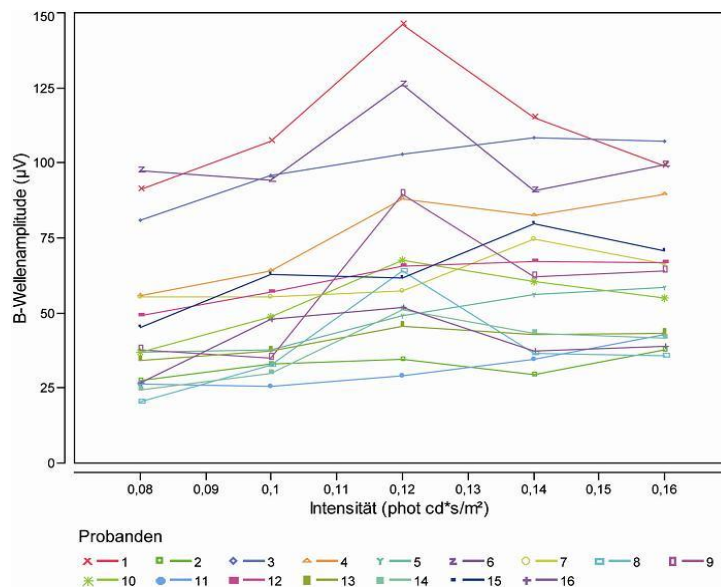


Abbildung 7.13: Kennlinien der 16 Probandenergebnisse. Dargestellt wurden die Mittelwerte aus beiden Augen. Die Probandenkennzeichnung findet sich unter dem Schaubild der Kennlinien. Die Intensitäten wurden $\text{phot cd}^*\text{s}/\text{m}^2$ angegeben (x-Achse).

Die optimale Stimulationsintensität wurde in der Hauptstudie anhand der Verteilung der maximal erzielten b-Wellenamplituden definiert [Kapitel 4.3.2].

7.3.4. Blauzapfen ERG

Eine detaillierte Auswertung der durch die Sättigungsblitze ausgelösten Potentiale erfolgte zunächst in der Hauptstudie des Blauzapfen-ERG. Die Potentiale des ersten und des zweiten Sättigungsblitzes wurden gesondert, tabellarisch dargestellt [Tabelle 7.2 und Tabelle 7.3].

Prob.	Mittelwert (A1)	Std.- Abw.(A1)	Mittelwert (B1)	Std.- Abw.(B1)	Mittelwert (N1)	Std.-Abw. (N1)
1	38,058	3,807	187,156	10,649	177,469	10,982
3	36,263	4,440	228,861	25,156	233,252	29,223
5	24,86	2,3	119,322	16,132	111,75	13,569
6	39,37	8,088	195,539	6,2957	185,265	7,317
8	27,894	3,212	135,050	7,8133	116,708	6,804
9	27,333	5,711	109,294	15,295	102,087	13,56
12	65,028	8,296	253,322	40,75	214,486	43,316
15	40,723	3,794	172,139	17,953	155,188	16,223

Tabelle 7.2: Auswertung der Amplituden des ersten Sättigungsblitzes. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (in μV) für jeden Probanden. Gemittelt wurden 10 Messungen und beide Augen. In die Auswertung wurde die a-Welle (A1), die b-Welle (B1) und die n-Welle (N1) einbezogen.

Prob and	Mittelwert (A2)	Std.- Abw.(A2)	Mittelwert (B2)	Std.- Abw.(B2)	Mittelwert (N2)	Std.-Abw. (N2)
1	41,623	3,766	174,616	11,12	154,23	9,668
3	40,931	4,927	211,887	23,816	204,089	24,03
5	32,862	2,398	119,579	13,752	97,539	7,143
6	43,12	5,798	181,162	9,212	164,45	5,873
8	27,567	3,313	122,734	7,191	103,101	4,763
9	23,644	3,043	99,382	14,753	89,967	14,25
12	62,942	7,804	235,402	36,677	192,846	40,428
15	42,037	5,422	160,816	13,082	130,688	15,877

Tabelle 7.3: Auflistung der Ergebnisse des zweiten Sättigungsblitzes, ebenfalls in μV . Die Auswertung entspricht der des ersten Sättigungsblitzes.

Daraus wurden die Quotienten aller Potentiale der beiden Sättigungsblitze

kalkuliert [Tabelle 7.4].

Probanden	Mittelwert (A1/A2)	Mittelwert (B1/B2)	Mittelwert (N1/N2)
1	0,924	1,073	1,15
3	0,901	1,081	1,142
5	0,76	0,997	1,146
6	0,918	1,08	1,129
8	1,102	1,1	1,134
9	1,161	1,103	1,139
12	1,035	1,075	1,114
15	0,987	1,069	1,189

Tabelle 7.4: Bildung der Quotienten für jeden Probanden. Die Ergebnisse aus Tabelle 7.2 wurden durch die zugehörigen Ergebnisse der Tabelle 7.3 dividiert.

Die Verteilung der Quotienten mit Mittelwert und Standardabweichung sind in Tabelle 7.5 dargestellt.

	Verteilung Quotienten aus (A1/A2)	Verteilung Quotienten aus (B1/B2)	Verteilung Quotienten aus (N1/N2)
Mittelwert	0,973	1,072	1,143
Std.-Abw.	0,127	0,033	0,022

Tabelle 7.5: Zusammenfassung der Verteilungen der Quotienten aus der Tabelle 7.4. Die Mittelwerte sollen darstellen wie sich die Potentiale des ersten Sättigungsblitzes im Vergleich zum zweiten Blitz verhalten. Der Quotient wurde durch Division der Potentiale errechnet. Es wurde jeweils das Potential des ersten Sättigungsblitzes durch das Potential des zweiten dividiert.

Als nächstes erfolgte die Analyse der b-Wellenamplitude des Blauzapfenstimulus. Die Definition einer optimalen Stimulationsintensität erfolgte durch Kennlinien in 8 Probandenmessungen. Die Verläufe wurden bis zum Erscheinen einer Off-Antwort oder einer a-Welle registriert, daher sind einige Probandenkennlinien nach bestimmten Intensitäten unterbrochen [Abbildung 7.14].

[25.01.2011]

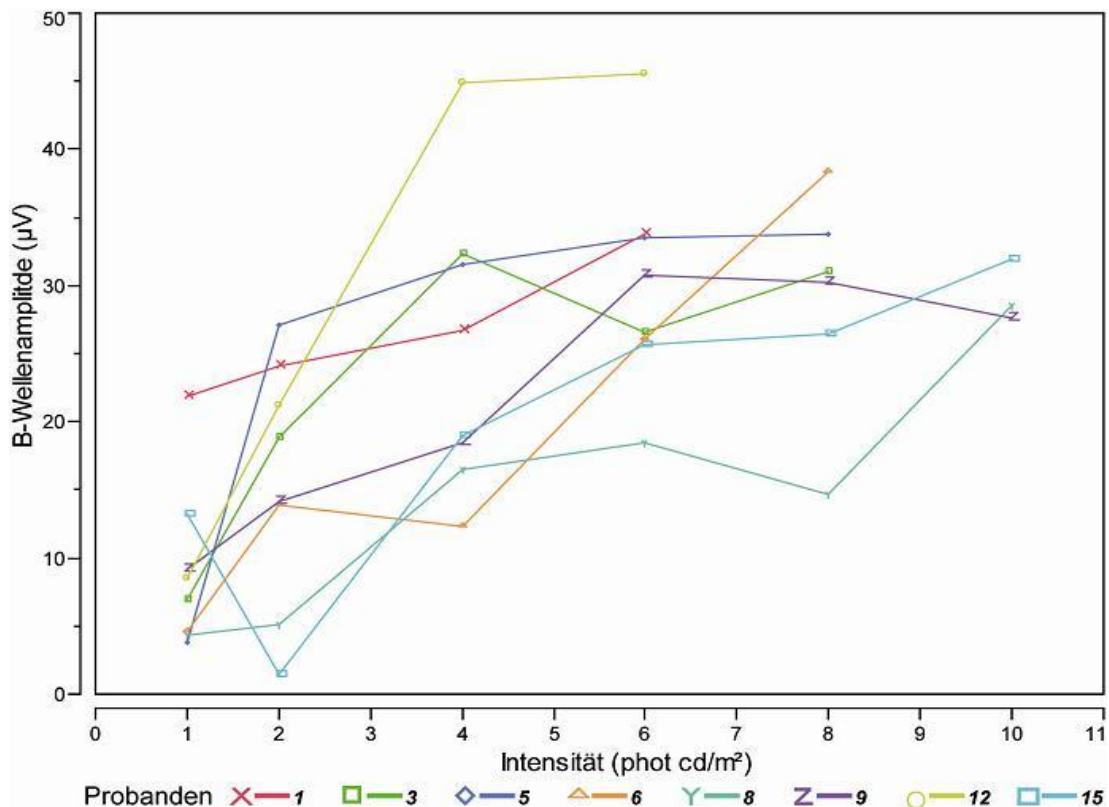


Abbildung 7.14: Kennlinien der Mittelwerte aus beiden Augen der 8 Probanden. Die Intensitäten wurden in phot cd/m² angegeben (x-Achse). Die Amplituden sind in µV (y-Achse) angegeben. Die Probandenkennzeichnung ist in der Diagrammlegende unten zu finden. {Abtastfrequenz=2000Hz; Filter=Aus; Mittelung von jeweils 20 Einzelantworten}.

Aus den Kennlinien der Mittelwerte erfolgte eine Bestimmung der maximalen Blauzapfen-b-Wellen und damit eine Definition der optimalen Intensität, bei der am häufigsten eine maximale b-Wellenamplitude erreicht wurde [Kapitel 4.4.5].

7.4. Stimulationsprotokolle

Die in der aktuellen Studie entwickelten Stimulationsprotokolle werden in der Tabelle 7.6 zusammen gefasst. Enthalten sind alle Protokolle, die als Resultat aus der Studie hervorgingen. Getrennt werden die Protokolle nach skotopischen Ableitungen („Dark-adapted“) und photopischen Ableitungen („Light-adapted“). Es werden die wichtigsten Parameter für die Generierung der entwickelten Protokolle definiert [Tabelle 7.6].

„Die Nutzung elektroretinographischer Minimalsignale zur quantitativen Erfassung der Restfunktion bei fortgeschrittener erblicher Netzhautdegeneration“

[25.01.2011]

Condition	Dark-adapted		Light-adapted		
	Global	Skotopic	Combined	Photopic	Scone
Description	9Hz Blueflicker	9Hz Whiteflicker	33Hz Redflicker	Tripple-Flash Paradigma	
Averages per Messung	4	4	3	3	
Acquisition					
Sample Frequency	2000 (Hz)	2000 (Hz)	2000 (Hz)	1000 (Hz)	
Sweep pre-trigger time	0 (ms)	0 (ms)	0 (ms)	0 (ms)	
Sweep post-trigger time	333 (ms)	333 (ms)	242(ms)	600 (ms)	
Sweeps per average	30	30	50	10	
Interstimulus interval	0 (ms)	0 (ms)	0 (ms)	1500 (ms)	
Drift removal	Off	Off	Off	ON	
Manual rejection of Sweeps	Off	Off	Off	ON	
DC off-set removal	On: 0 (ms)	On: 0 (ms)	On: 0 (ms)	On: 20 (ms)	
Stimulus					
Pulse frequency	9 Hz	9Hz	33Hz		
Pulse duration (d)	10 (ms)	14 (ms)	10 (ms)	User defined	
Stimulus luminance	0.012 skot cd.s/m ²	0.22 phot cd.s/m ²	0.12 phot cd.s/m ²	80 ms delay 1 st flash 1000 ph cd/m ² Red LED (d=4ms) 92 ms delay 2 nd flash 1000 phot cd/m ² Red LED (d=4 ms) 120 ms delay 3 rd flash 6 ph cd.s/m ² Blue (100 ms) 100ms delay	
Stimulus color	Blue	White 6500K	Red	Red and Blue	
Background luminance	0 cd/m ²	0 cd/m ²	2 phot cd/m ²	90 phot cd/m ²	
Background color			Blue	Amber	
Channels (1 and 2)					
Filter low frequency cutoff	1.5 (Hz)	1.5 (Hz)	1.5 (Hz)	1.5 (Hz)	
Filter high frequency cutoff	300 (Hz)	300 (Hz)	300 (Hz)	300 (Hz)	
Y-axis scaling	20 µV	50 µV	50 µV	20 µV	

Tabelle 7.6: Protokolleinstellungen der entwickelten ERG Stimulationen. Das Stäbchenprotokoll („skotopic“), die kombinierte Stäbchen- und Zapfenantwort („combined“), das photopische Protokoll („photopic“) und das neue Blauzapfenparadigma („trippel-flash-paradigma“) wurden im Detail beschrieben. Neben der Aufzeichnungseinstellung („acquisition“) werden die Stimulationseinstellungen („stimulus“) und die Filtereinstellungen („channels 1 und 2“) für die ERG Protokolle definiert. Das neue Blauzapfenparadigma benötigt eine zusätzliche Programmsequenz, die eingespielt werden kann und in Kapitel 7.2 beschrieben wird.

8. Literaturverzeichnis:

1. Adrian E.D., *The electric response of the human eye*. Journal of Physiology, 1945. **104**(1): p. 84-104.
2. Aguilar M. and Stiles W.S., *Saturation of the rod mechanism of the retina at high levels of stimulation*. Optica Acta, 1954. **1**: p. 59-64.
3. Ahnelt P.K., Keri C., and Kolb H., *Identification of pedicles of putative blue sensitive cones in human and primate retina*. Journal of Comparative Neurology, 1990. **293**: p. 39-53.
4. Ahnelt P.K., Kolb H., and Pflug R., *Identification of a subtype of cone photoreceptor, likely to be blue sensitive, in the human retina*. Journal of Comparative Neurology, 1987. **255**(1): p. 18-34.
5. Bach M. and Meigen T., *Do's and don'ts in Fourier analysis of steady-state potentials*. Documenta Ophthalmologica, 1999. **99**: p. 69-82.
6. Brown P.K. and Wald G., *VISUAL PIGMENTS IN SINGLE RODS AND CONES OF THE HUMAN RETINA. DIRECT MEASUREMENTS REVEAL MECHANISMS OF HUMAN NIGHT AND COLOR VISION*. Science, 1964. **144**: p. 45-52.
7. Bui B.V., Weisinger H.S., Sinclair A.J., and Vingrys A.J., *Comparison of guinea pig electroretinograms measured with bipolar corneal and unipolar intravitreal electrodes*. Doc Ophthalmol, 1998. **95**(1): p. 15-34.
8. Burns S.A., Elsner A.E., and Kreitz M.R., *Analysis of nonlinearities in the flicker ERG*. Optom Vis Sci, 1992. **69**(2): p. 95-105.
9. Bush R.A. and Sieving P.A., *A Proximal Retinal Component in the Primate Photopic ERG a-Wave*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1993. **35**(2): p. 635-645.
10. Calkins D.J., *Seeing with S cones*. Progress in Retinal and Eye Research, 2001. **20**(3): p. 255-287.
11. Cameron A.M., Mahroo O.A.R., and Lamb T.D., *Dark adaptation of human rod bipolar cells measured from the b-wave of the scotopic electroretinogram*. Journal of Physiology, 2006. **575**(2): p. 507-526.
12. Cameron A.M., Miao L., Ruseckaite R., Pianta M.J., and Lamb T.D., *Dark adaptation recovery of human rod bipolar cell response kinetics estimated from scotopic b-wave measurements*. J Physiol, 2008. **586**(Pt 22): p. 5419-36.
13. Cavonius C.R. and Estévez O., *Contrast sensitivity of individual colour*

- mechanisms of human vision*. Journal of Physiology, 1975. **248**: p. 649-662.
14. Chiti Z. ,North R.V. ,Mortlock K.E., and Drasdo N., *The S-cone electroretinogram: a comparison of techniques, normative data and age-related variation* Ophthal. Physiol. Opt. , 2003. **23**: p. 370-376.
 15. Cone R.A. and Platt J.R., *RAT ELECTRORETINOGRAM: EVIDENCE FOR SEPARATE PROCESSES GOVERNING B-WAVE LATENCY AND AMPLITUDE*. Science, 1964. **144**: p. 1016-8.
 16. Curcio C.A. ,Allen K.A. ,Sloan K.R. ,Lerea C.L. ,Hurley J.B. ,Klock I.B., and Milam A.H., *Distribution and morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin*. Journal of Comparative Neurology, 1991. **312**: p. 610-624.
 17. Dacey D.M., *Circuitry for colour coding in the primate retina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. **93**: p. 582-588.
 18. Dawson W.W. ,Trick G.L., and Litzkow C.A., *Improved electrode for electroretinography*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1979. **18**(9): p. 988-991.
 19. Dewar J. and McKendrick J.G., *On the Physiological Action of Light*. Journal of Anatomy Physiology, 1873. **2**: p. 275-282.
 20. Diagnosys L. *ColorDome Desktop Ganzfeld*. www.diagnosysllc.com 2003.
 21. Dodt E., *Cone electroretinography by flicker*. Nature 1951. **168**: p. 738.
 22. Drasdo N. ,Aldebasi Y.H. ,Chiti Z. ,Mortlock K.E. ,Morgan J.E., and North R.V., *The S-Cone PhNR and Pattern ERG in Primary Open Angle Glaucoma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**(6): p. 1266-1272.
 23. Estévez O. and Spekreijse H., *THE "SILENT SUBSTITUTION" METHOD IN VISUAL RESEARCH*. Vision Research, 1982. **22**: p. 681-691.
 24. Friedburg C. ,Allen C.P. ,Mason P.J., and Lamb T.D., *Contribution of cone photoreceptors and post-receptoral mechanisms to the human photopic electroretinogram*. Journal of Physiology, 2004. **556**(3): p. 819-834.
 25. Frishman L.J. ,Sieving P.A., and Steinberg P.A., *Contributions to the electroretinogram of currents originating in proximal retina*. Visual Neuroscience, 1988. **1**: p. 307-315.

26. Fu Y. and Yau K.W., *Phototransduction in mouse rods and cones*. Pflugers Arch, 2007. **454**(5): p. 805-19.
27. Gawande A.A., Donovan W.J., Ginsburg A.P., and Marmor M.F., *Photoaversion in retinitis pigmentosa*. Br J Ophthalmol, 1989. **73**(2): p. 115-20.
28. Gouras P. and MacKay C.J., *Growth in Amplitude of the Human Cone Electroretinogram with Light Adaptation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1989. **30**(4): p. 625-630.
29. Graham S.L., Drance S.M., Chauhan B.C., and al. e., *Comparison of psychophysical and electrophysiological testing in early glaucoma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1996. **37**: p. 2651-2662.
30. Granit R., *Sensory Mechanisms of the Retina*. 1947, London: Oxford University Press.
31. Granse L., Ponjavic V., and Andreasson S., *Full-field ERG, multifocal ERG and multifocal VEP in patients with retinitis pigmentosa and residual central visual fields*. Acta Ophthalmol Scand, 2004. **82**(6): p. 701-6.
32. Green D.G., *Sinusoidal flicker characteristics of the colour-sensitive mechanisms of the eye*. Vision Research, 1969. **9**: p. 591-601.
33. Greenstein V.C., Hood D.C., Ritch R., Steinberger D., and Carr R.E., *S (blue) cone pathway vulnerability in retinitis pigmentosa, diabetes and glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(8): p. 1732-7.
34. Hebert M., Vaegan, and Lachapelle P., *Reproducibility of ERG responses obtained with the DTL electrode*. Vision Research, 1999. **39**: p. 1069-1070.
35. Heckenlively J.R. and Arden G.B., *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*. Vol. second edition. 2006: The Mit Press.
36. Holder G.E., *Significance of abnormal pattern electroretinography in anterior visual pathway dysfunction*. British Journal of Ophthalmology, 1987. **71**: p. 166-171.
37. Holder G.E., *Pattern electroretinography (PERG) and an integrated approach to visual pathway diagnosis*. Progress in Retinal and Eye Research, 2000. **20**: p. 531-561.
38. Kamiyama M., Yamamoto S., Nitta K., and Hayasaka S., *Undetectable S cone electroretinogram b-wave in complete congenital stationary night blindness*. British Journal of Ophthalmology, 1996. **80**: p. 637-639.

39. Knapp A.G. and Schiller P.H., *THE CONTRIBUTION OF ON-BIPOLAR CELLS TO THE ELECTRORETINOGRAM OF RABBITS AND MONKEYS*. Vision Research, 1984. **24**(12): p. 1841-1846.
40. Kramer S. ,Messias A. ,Zrenner E., and Jaegle H., *Assessment of Human Dark Adaptation Kinetic Using the Electroretinogram B-Wave Amplitude and Dark Adaptometry.*, in *ISCEV-Meeting 2008*: Morgantown.
41. Kuniyoshi K. ,Uno N. ,Irifune M., and Shimomura Y., *Electroretinography of short-wavelength-sensitive cones with a LED built-in electrode and its normal values*. Doc Ophthalmol, 2003. **106**(3): p. 311-8.
42. Lei B. ,Yao G. ,Zhang K. ,Hofeldt K.J., and Chang B., *Study of Rod- and Cone-Driven Oscillatory Potentials in Mice*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2006. **47**(6): p. 2732-2738.
43. Marmor M.F., *The electroretinogram in retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol, 1979. **97**(7): p. 1300-4.
44. Marmor M.F. ,Arden G.B. ,Nilsson S.E.G., and Zrenner E., *Standard for clinical electroretinography*. Archives of Ophthalmology, 1989. **107**: p. 816-819.
45. Marmor M.F. ,Cabael L. ,Shukla S. ,Hwang J.C., and Marcus M., *Clinical S-cone ERG recording with a commercial hand-held full-field stimulator*. Documenta Ophthalmologica, 2004. **109**: p. 101-107.
46. Marmor M.F. ,Fulton A.B. ,Holder G.E. ,Miyake Y. ,Brigell M., and Bach M., *ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update)*. Doc Ophthalmol, 2009. **118**(1): p. 69-77.
47. Marmor M.F. ,Holder G.E. ,Seeliger M.W., and Yamamoto S., *Standard for clinical electroretinography (2004 update)*. Documenta Ophthalmologica, 2004. **108**: p. 107-114.
48. Marmor M.F. and Zrenner E., *Standard for clinical electroretinography*. Documenta Ophthalmologica, 1999. **97**: p. 143-156.
49. Meigen T. and Bach M., *On the statistical significance of electrophysiological steady-state response*. Documenta Ophthalmologica, 2000. **98**: p. 207-232.
50. Messias A. ,Jaegle H. ,Gekeler F., and Zrenner E., *Software for the Evaluation of Electroretinograms*, in *ISCEV-Meeting*. 2008: Morgantown.
51. Miyake Y. ,Horiguchi M. ,Ota I., and Takabayashi A., *Adaptational change in cone-mediated electroretinogram in human and carp*. Neuroscience Research, Suppl., 1988. **8**: p. S1-S13.

52. Miyake Y. ,Yagasaki K., and Ichikawa H., *Differential diagnosis of congenital tritanopia and dominantly inherited juvenile optic atrophy*. Archives of Ophthalmology, 1985. **103**(10): p. 1496-1501.
53. Mortlock K.E. ,Chiti Z. ,Drasdo N. ,Owens D.R., and North R.V., *Silent substitution S-cone electroretinogram in subjects with diabetes mellitus*. Ophthal. Physiol. Opt., 2005. **25**: p. 392-399.
54. Murayama K. and Sieving P.A., *Different rates of growth of human and monkey photopic ERG suggests two sites of light adaptation*. Clin Vis Sci, 1992. **7**: p. 385-392.
55. Nagata M., *Studies on the photopic ERG of the human retina*. Japanese Journal of Ophthalmology, 1963. **7**: p. 96-124.
56. Naka K.I. and Rushton W.A.H., *S-potentials from colour units in the retina of fish Cyprinidae*. Journal of Physiology, 1966. **185**: p. 536-555.
57. Nelson R. ,Lynn T. ,Dickinson-Nelson A., and Kolb H., *Spectral Mechanisms in Cat Horizontal Cells*, in *Neurocircuitry of the Retina: a Cajal Memorial*, Gallego A. and P. Gouras, Editors. 1985, Elsevier Science: New York. p. 109-121.
58. Newman E.A. and Frishman L.J., *The b-wave*. In: *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision.*, in *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*, Heckenlively J.R. A.G.B.e., Mosby Year Book, Editor. 1991, The Mit Press. p. 101-111.
59. Odom J.V. ,Reits D. ,Burgers N., and Riemslag F.C., *Flicker electroretinograms: a systems analytic approach*. Optom Vis Sci, 1992. **69**(2): p. 106-16.
60. Peachey N.S. ,Alexander K.R., and Fishman G.R., *Visual Adaptation and the Cone Flicker Electroretinogram*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1991. **32**(5): p. 1517-1522.
61. Peachey N.S. ,Alexander K.R. ,Fishman G.R., and Derlacki D.J., *Properties of the human cone system electroretinogram during light adaptation*. Applied Optics, 1989. **28**: p. 1145-1450.
62. Rangaswamy N.V. ,Shirato S. ,Kaneko M. ,Digby B.I. ,Robson J.G., and Frishman L.J., *Effects of Spectral Characteristics of Ganzfeld Stimuli on the Photopic Negative Response (PhNR) of the ERG*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(10): p. 4818-4828.
63. Rousseau S. and Lachapelle P., *The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic*

- oscillatory potentials*. Doc Ophthalmol, 1999. **99**(2): p. 135-50.
64. Sawusch M. ,Pokorny J., and Smith V.C., *Clinical Electroretinography For Short Wavelength Sensitive Cones*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1987. **28**: p. 966-974.
65. Scholl H.P.N. ,Langrova H. ,Weber B.H.F. ,Pusch C.M. ,Wissinger B. ,Zrenner E., and Apflestedt-Sylla E., *Slow and Fast Rod ERG Pathways in Patients with X-Linked Complete Stationary Night Blindness Carrying Mutations in the NYX Gene*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001a. **42**(11): p. 2728-2736.
66. Scholl H.P.N. ,Langrova H. ,Weber B.H.F. ,Zrenner E., and Apflestedt-Sylla E., *Clinical electrophysiology of two rod pathways: normative values and clinical application*. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001b. **239**: p. 71-80.
67. Schwarz F., *Ueber die binokulare Summation von Flimmerlicht*. Zeitschrift fuer Sinnesphysiologie, 1943. **70**: p. 22-29.
68. Sieving P.A., *Photopic ON- and OFF-pathway abnormalities in retinal dystrophies*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1993. **91**: p. 703-773.
69. Sieving P.A. ,Murayama K., and Naarendorp F., *Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave*. Visual Neuroscience, 1994. **11**(3): p. 519-532.
70. Simonsen S.E. and Rosenberg T., *Reappraisal of a short-wavelength-sensitive (S-cone) recording technique in routine clinical electroretinography*. Doc Ophthalmol, 1995. **91**(4): p. 323-32.
71. Spekrijse H. ,van der Tweel L.H., and Zuidema T., *Contrast evoked responses in man*. Vision Research, 1973. **13**: p. 1577-1601.
72. Stockman A. ,Langendörfer M., and Sharpe L.T., *Human short-wavelength-sensitive cone light adaptation*. Journal of Vision, 2007. **7**(3): p. 1-17.
73. Stockman A. ,MacLeod D.I.A., and DePriest D.D., *The temporal properties of the human short-wave photoreceptors and their associated pathways*. Vision Research, 1991. **31**: p. 189-208.
74. Stockman A. ,Sharpe L.T., and Fach C.C., *The spectral sensitivity of the human short-wavelength cones*. Vision Research, 1999. **39**: p. 2901-2927.
75. Stockman A. ,Sharpe L.T. ,Ruether K., and Nordby K., *Two signals in the human rod visual system: a model based on electrophysiological data*.

- Visual Neuroscience, 1995. **12**: p. 951-970.
76. Stockman A., Sharpe L.T., Zrenner E., and Nordby K., *Slow and fast pathways in the human rod visual system: ERG and psychophysics*. Journal of the Optical Society of America A, 1991. **8**: p. 1657-1665.
77. Swanson W.H., Birch D.G., and Anderson J.L., *S-cone Function in Patients With Retinitis Pigmentosa*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1993. **34**(11): p. 3045-3055.
78. Ueno S., Kondo M., Piao C.H., Ikenoya K., Miyake Y., and Terasaki H., *Selective Amplitude Reduction of the PhNR after Macular Hole Surgery: Ganglion Cell Damage Related to ICG-Assisted ILM Peeling and Gas Tamponade*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(8): p. 3545-3549.
79. UniversityOfNewMexico. http://www.unm.edu/~toolson/human_cone_response.htm. Homepage.
80. Viswanathan S., Frishman L.J., Robson J.G., Harwerth R.S., and Smith E.L., *The photopic negative response of the macaque electroretinogram is reduced by experimental glaucoma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1999. **40**: p. 1124-1136.
81. Viswanathan S., Frishman L.J., Robson J.G., and Walters J.W., *The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**: p. 514-522.
82. Wachtmeister L., *Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal*. Progress in Retinal and Eye Research, 1998. **17**(4): p. 485-521.
83. Wakabayashi K., Gieser J., and Sieving P.A., *Aspartat Separation of the Scotopic Treshold Response (STR) From the Photoreceptor a-wave of the Cat and Monkey ERG*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1988. **29**(1): p. 1615-1622.
84. Walters J.W., Smith E.L., 3rd, and Manny R.E., *ERG off-effects produced by short duration stimuli*. Am J Optom Physiol Opt, 1981. **58**(10): p. 792-6.
85. Webvision. <http://webvision.med.utah.edu/>.
86. Williams D.R., *Topography of the foveal cone mosaic in the living human eye*. Vision Res, 1988. **28**(3): p. 433-54.
87. Williams D.R., MacLeod D.I.A., and Hayhoe M.M., *Punctate sensitivity of the blue-sensitive mechanism*. Vision Research, 1981. **19**: p. 1357-1375.

88. Wisowaty J.J. and Boynton R.M., *Temporal modulation sensitivity of the blue mechanism: measurements made without chromatic adaptation*. Vision Research, 1980. **20**: p. 895-909.
89. Wyszecki G. and Stiles W.S., *High-level trichromatic color matching and the pigment-bleaching hypothesis*. Vision Research, 1980. **20**: p. 23-37.
90. Yamamoto S. ,Kamiyama M. ,Nitta K. ,Yamada T., and Hayasaka S., *Selective reduction of the S cone electroretinogram in diabetes*. Br J Ophthalmol, 1996. **80**(11): p. 973-5.
91. Zrenner E., *Electrophysiological characteristics of the blue sensitive mechanism: test of a model of cone interaction under physiological and pathological conditions*. Documenta Ophthalmologica Proceedings Series, 1982. **33**: p. 103-125.
92. Zrenner E. and Gouras P., *Blue-sensitive cones of the cat produce a rodlike electroretinogram*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1979. **18**(10): p. 1076-1081.
93. Zrenner E. ,Nowicki J., and Adamczyk R., *Cone function and cone interaction in hereditary degenerations of the central retina*. Doc Ophthalmol, 1986. **62**(1): p. 5-12.

9. Teile der Arbeit in Präsentationen:

A. Schatz, R. Wilke, H. Jägle, E. Zrenner. „*Optimierung von LED-Ganzfeld ERG-Techniken zur Aufzeichnung von kleinen Signalen*“. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft. DOG2006.

R. Wilke, A. Schatz, H. Jägle, T. Strasser, H. Benav, A. Messias, T. Peters, E. Zrenner. "*Objective Assessment of Retinal Functions of Persons with Advanced Retinal Degeneration in Clinical Trials*". The Association for Research in Vision and Ophthalmology. ARVO2008.

R. Wilke, M. Bach, A. Schatz, T. Strasser, H. Benav, A. Messias. "*Objective Assessment of Retinal Functions of Persons with Advanced Retinal Degeneration in Clinical Trials*". International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Meeting 2008.

10. Danksagung:

Für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Eberhart Zrenner. Durch seinen ausdauernden Einsatz und die unermüdliche Unterstützung konnte die Dissertation fertig gestellt werden. Ich denke vor allem an die großzügige Förderung und das mir entgegengebrachte Vertrauen, für das ich mich besonders bedanken möchte.

Mein tiefster Dank geht an alle Probanden, Freunden und meinen Eltern, die alle Strapazen aus Freundschaft, Liebe und Ehrgeiz über sich ergehen ließen. Nur durch Ihre aufopfernde Mitarbeit konnte die vorliegende Arbeit entstehen. Besondere Erwähnung möchte ich meiner Frau, Anja widmen. Durch ihre liebevolle Ermutigung, ihre Hilfe und ihren Einsatz erfuhr ich eine unvergleichliche Motivation.

Ganz besonderer Dank gebührt Dr. med. Robert Wilke für seine ausgezeichnete Begleitung und Betreuung während der Dissertationserstellung. Er inspirierte mich allgegenwärtig mit neuen Ideen und trieb die Arbeit voran. Er baute mich immer wieder auf und spendete viel Zeit und Arbeit in die Betreuung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Herrn Prof. Dr. med. Herbert Jäggle aussprechen. Er stand immer mit Rat und Tat zur Seite und begleitete die Studien mit sehr viel Engagement.

Prof. Dr. Klaus Dietz danke ich für seine aufopfernde Zeit und Geduld bei der Hilfestellung zur Auswertung der Studiendaten. Seinem Wissen sowohl bei statistischen Fragen als auch bei Bewältigung der Datenformatierung gebührt meinerseits sehr viel Respekt.

Mit viel Hochachtung und Anerkennung möchte ich einem guten Freund und Mentor, Herrn Prof. Dr. André Messias, für seine Hilfe und seine grenzenlose Bereitschaft danken. Sein Wissen und Können verhalf der Arbeit zu Ihrer Form. Ich möchte ihm für seine Freundschaft und seine Kompetenz, die er stets bemüht war an mich weiter zu geben, aus tiefstem Herzen danken.

[25.01.2011]

11. Lebenslauf:

Name: Andreas Schatz

Geburtsdatum: 03.09.1981

Geburtsort: Temirtau/ Kasachstan

Hochschulreife: 30.06.2001 in Trossingen

Wehrdienst: 01.07.2001-31.03.2002 als Sanitätssoldat an der Luftwaffensanitätsstaffel Roth und Memmingen

Studium: 26.03.1999-28.11.2000 Fernstudium zum
Netzwerkbetreuer mit Telekommunikationstechnik
mit Diplomabschluss

20.04.2003-03.06.2009 Studium der Humanmedizin
in Marburg und in Tübingen

Hochschulprüfungen: 1. Staatsexamen am 23.05.2005 in Marburg
2. Staatsexamen am 03.06.2009 in Tübingen

Weiterbildung: seit 01.07.2009 Assistenzarzt der Universitäts-
Augenklinik Tübingen