

Die verschiedenen Komponenten des ERG spiegeln die Funktionen unterschiedlicher Anteile der Netzhaut wider. Das "frühe Rezeptorpotential" entsteht durch Photopigmentveränderungen in den Rezeptoren, die a-Welle wird durch die Hyperpolarisierung der Photorezeptoren, also der Stäbchen und Zapfen, als Folge eines Transduktionsprozesses generiert (Rüther 1996, Brown und Wiesel 1961, Miller und Dowling 1970, Berson 1975). Die Depolarisation der Müllerzellen und der Bipolarzellen der inneren Körnerschicht kommt in der b-Welle zur Darstellung und die c-Welle ist die Summe der Hyperpolarisation der Müllerzellen und der Pigmentepithel-Apikalmembran (Rüther 1996, Brown und Wiesel 1961, Miller und Dowling 1970, Berson 1975, Niemyer 1976). Die "oszillatorischen Potentiale" haben ihren Ursprung in der inneren plexiformen Schicht (Rüther 1996). Der für die Durchführung klinischer ERGs etablierte weltweite Standard von Jacobi et al. (1993), der die Vergleichbarkeit klinischer und grundlagenwissenschaftlicher Untersuchungen erleichtert, wurde von uns dem Versuchsaufbau zugrunde gelegt.

### **1.3 Fragestellung und Ziel der Untersuchungen**

Unter Verwendung von elektrophysiologischen Methoden wie der Elektroretinographie im Vergleich mit histologischen Untersuchungen sollen die eventuell durch Amiodaron verursachten Schädigungen der Retina sichtbar gemacht und lokalisiert werden.

Im einzelnen sollen durch die Versuchsreihe folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wird durch Amiodaron eine Lipidose in der Retina von Mäusen induziert?
2. Treten in Folge der Lipidose ERG-Veränderungen auf? Wenn ja, welche?
3. Sind die Resultate ähnlich den bisherigen Erkenntnissen auf diesem Gebiet oder gibt es Abweichungen?
4. Inwieweit sind diese Ergebnisse mit Wirkungen auf die menschliche Retina vergleichbar?
5. Können die histologischen Präparate Schädigungen der Retina bestätigen?
6. Falls lichtmikroskopisch eine Lipidose nachweisbar ist, in welchen Schichten der Netzhaut ist sie hauptsächlich lokalisiert?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden pigmentierte Mäuse vom Zuchtstamm Black CL 57 verwendet. Die anfängliche Versuchsgruppe bildeten 21 weibliche Tiere im Alter von 4

Wochen; die Kontrollgruppe bestand aus 20 ebenfalls 4 Wochen alten, weiblichen Tieren (siehe Abb. 4). Ihr Gewicht betrug durchschnittlich 20 Gramm.

Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn zwei Wochen zur Adaptation mit Normalfutter (Altromin-Lage) gefüttert. Danach wurde ein Normalfutter-Amiodaron-Gemisch bestehend aus 500 g Normalfutter und 400 mg Amiodaron hergestellt. Aus dem Futterverbrauch und dem alle drei Tage registrierten Gewicht konnte die durch die Tiere über die Nahrung aufgenommene Arzneimittelkonzentration berechnet werden. Es ergab sich für den Behandlungszeitraum von 22 Wochen für Amiodaron die Tagesdosis von 176,15 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Nach 22 Wochen wurde die Medikamentengabe beendet und die Mäuse erhielten weiter Normalfutter.

ERG-Untersuchungen sind zu Beginn der Versuchsreihe, sowie nach 4, 8, und 22 Wochen durchgeführt worden. Nach den genannten Zeitintervallen wurden einige Mäuse zur histologischen Untersuchung vorbereitet. Über die Zahl der während der Versuchsreihe verstorbenen, beziehungsweise zur Histologie verwendeten Tiere geben Abb. 5a und 5b Auskunft.

	0 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	22 Wo.
Versuchstiere	21	19	16	10
Kontrollen	20	13	17	16

*Abb. 4: Zahl der in den jeweiligen Wochen gemessenen Tiere.*

	0 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	22 Wo.
Histologie	0	0	3	2
Verstorben	2	3	0	0

*Abb. 5a: Abgänge zur Histologie bzw. verstorben aus der Gruppe der Versuchstiere.*

	0 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	22 Wo.
Histologie	0	0	1	1
Verstorben	0	1	0	0

*Abb. 5b: Abgänge zur Histologie bzw. verstorben aus der Gruppe der Kontrolltiere.*

## **2.2 Haltung**

Die Mäuse sind als Fünfergruppen in Gitterlaufkäfigen untergebracht und bei etwa 20°C Raumtemperatur ihrem natürlichen Tagesrhythmus entsprechend gehalten worden. Ihre Nahrung erhielten sie als gemahlenes Trockenfutter (Altromin-Lage), dem auch die erforderliche Tagesdosis Amiodaron beigemischt war. Trinkwasser war für die Tiere frei zugänglich entsprechend ihren Bedürfnissen.

### **2.2.1 Dunkeladaptation und Betäubung**

Vor dem Ableitungstag verbrachten die Tiere 14 Stunden in lichtundurchlässigen Kästen in einem verdunkelten Raum und wurden auf diese Weise dunkeladaptiert.

Unmittelbar vor den Ableitungen erhielten die Mäuse als Anästhetikum eine intraperitoneale Mischinjektion bestehend aus Ketavet® 100 mg/kg und Rompun® 1,5 mg/kg (Schaeppi et al. 1988). Ketavet® führt zu einer Analgesie bei bestehender freier Atmung und Erhaltung der Cornealreflexe. Rompun® hat analgetische, betäubende und muskelrelaxierende Wirkungen. Eine Pupillendilatation erfolgte mit Neosynephrin 5% und Tropicamid 5,0 mg.

## **2.3 Meßsystem**

Das Meßsystem bestand aus einem Ganzfeldstimulationsgerät, einem ERG-Verstärker, einer Vorrichtung zur sicheren Applikation der Elektroden auf der Hornhaut und einer Zustelleinrichtung zur Positionierung der Versuchstiere im Ganzfeldstimulator. Vervollständigt wurde das System durch einen Computer mit Kontrollbildschirm und der passenden Software.

Die Meßeinrichtung und die Versuchsdurchführung wurden in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) entsprechend angepaßt, so daß eine Stimulation der Retina mit verschiedenen Reizen wie Einzel- und Serienblitzen, Ganzfeldstimulation, variabler Lichtintensität und Reizdauer unabhängig von der Tierspezies (zum Beispiel Maus oder Ratte) möglich war.

### **2.3.1 Stimulationsgerät**

Der Ganzfeldstimulator emittierte durch eine Xenonlampe Einzelblitze von 10µsec. Dauer. Die Intensität der Einzelblitze konnte über mehrere Stufen eingestellt werden, wobei die maximal erreichbare Intensität 25 Lumen/cm<sup>2</sup> betrug. Die Triggerung und Steuerung der Beleuchtungsstärke erfolgte über den PC.

### 2.3.2 ERG-Verstärker

Der verwendete Verstärker verfügte über zwei Kanäle und hatte eine Bandbreite von 0,03-1000 Hz. Der Eingangswiderstand betrug 1 M $\Omega$ . Eine 100-, 1000- oder 10000fache Verstärkung konnte über den PC eingestellt werden.

### 2.3.3 Elektroden

Die Corneaelektrode hatte einen Durchmesser von 2 mm und bestand aus einer 0,25 mm dicken Platinschleife, die mit Methocel-Gel zur Verbesserung des Kontaktes mit der Hornhaut angelegt wurde. Die Referenzelektrode, eine Platinnadel, wurde subkutan medial über dem Nasenbein eingestochen. Die Erdung erfolgte über eine subkutan in das Schwanzfell eingestochene Edelstahl-nadel. Das Anbringen der Elektroden geschah unter Rotlicht. Danach erfolgte eine Impedanzmessung der Referenz- und Aktivelektroden, die unter 10 Kilo $\Omega$  liegen sollten.

### 2.3.4 Computerauswertung

Das Einlesen der Meßwerte erfolgte über einen Pentium-PC mit 200 MHz und 64 MByte RAM unter Windows NT 4,0 mit zwei Datenerfassungskarten: National Instruments DAQ 516 im PCI MIO 16 XE 50 Format und DIO 24 im PCMCIA Format. Die Software für den ERG-Meßplatz wurde mit der Grafischen Programmierung LabVIEW erstellt. Zur Datenerfassung mußten vom Programm folgende Anforderungen erfüllt werden: Bereitstellung einer im Dunkeln einfach zu bedienenden grafischen Benutzeroberfläche mit sofortiger Anzeige der ERG-Ableitung (siehe Abb. 6), Erfassung von ERG-Analogdaten über einen Zeitraum von 1-40 sec. und parallel dazu die Ausgabe zeitlich definierter Stimulationsimpulse mit einer Folgefrequenz von bis zu 30 Hz sowie die Speicherung der Meßdaten in Dateien mit vordefinierten Namen.

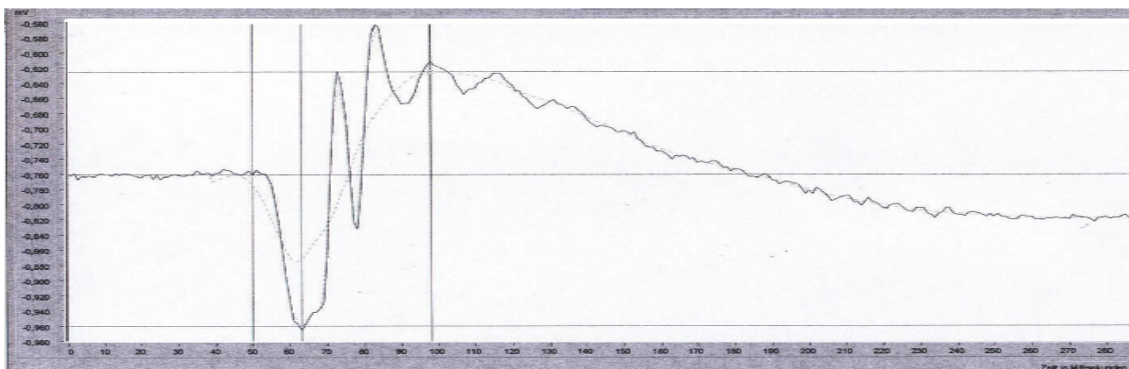


Abb. 6: Original Mäuse-ERG vor Beginn der Behandlung mit Amiodaron.  
Dunkeladaptation für 14 Stunden, Reizdauer 10  $\mu$ sec., Lichtintensität 3000 mcd.

Die Auswertung der Daten stellte an das Programm auch einige Bedingungen, unter anderem: Einlesen und Anzeigen der ERG-Dateien, interaktive oder manuelle Merkmalsextraktionen und komfortable Übergabe der ermittelten Parameter mittels DDE (Dynamic Data Exchange) nach EXCEL.

### 2.3.5 Reizprogramm

Das Reizprogramm bestand aus skotopischen Einzelblitzen von 3000 msec/m<sup>2</sup>. Die Messungen wurden nach dem Anlegen der Elektroden am rechten und dann am linken Auge durchgeführt.

Die Lichtstärke von 3000 mcd ist für die ERG-Auswertung im Sinne der Vergleichbarkeit gewählt worden, denn sie entspricht dem Standardblitz am menschlichen Auge.

### 2.3.6 Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm SPSS 10.0 für Windows angewandt.

Zu Beginn der statistischen Auswertung wurden die ermittelten Werte der Amplituden a und b sowie die der Gipfelzeiten a und b der rechten und der linken Augen mittels SPSS-Programm aggregiert .

Mit Hilfe der Varianzanalyse mit Meßwiederholung (SPSS Advanced Model 10.0 1999) und der graphischen Darstellung mittels Boxplots sollte der Einfluß des Amiodarons auf die erhobenen Daten geprüft und verdeutlicht werden. Dabei wurden die benutzten Variablen wie folgt definiert: als Innersubjektfaktor wurde die Variable Zeit (4 Stufen: 0, 4, 8, 22 Wochen) festgelegt und als Zwischensubjektfaktor die Variablen Medikament vs. Kontrolle (siehe Abb. 7a und 7b).

#### Innersubjektfaktoren

Zeit	Abhängige Variable
1	0 Wo.
2	4 Wo.
3	8 Wo.
4	22 Wo.

Abb. 7a: Definition des Innersubjektfaktors

#### Zwischensubjektfaktoren

		N
Medikament	Amiodaron	10
	Kontrolle	10

Abb. 7b: Definition des Zwischensubjektfaktors

Statistische Tests auf Haupteffekte ( $H_0$ : keine Änderung im Mittel über die Zeit;  $H_0$ : im Mittel über die Zeit keine Unterschiede zwischen Medikament und Kontrolle) und dem Wechselwirkungseffekt ( $H_0$ : die mittleren Zeitverläufe zwischen Medikamentengruppe und Kontrollgruppe verlaufen parallel) wurden durchgeführt.

## **2.4 Histologische Präparate**

### **2.4.1 Präparation des Gewebes**

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Mischinjektion von 10%-igem Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) 80-130 mg/kg Körpergewicht entsprechend 0,8-1,3 ml/100g Körpergewicht und 5%-igem Xylazine-Hydrochlorid (Rompun®) 4 ml/100kg Körpergewicht in tiefe Narkose versetzt. Der Thorax wurde von abdominal inzidiert und eröffnet, ebenso der linke Vorhof, durch den eine Kanüle bis zur Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer Gefäßklemme fixiert wurde. Danach wurde das Gefäßsystem mit einer Fixierlösung, bestehend aus 3%-igem Glutaraldehyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 7,4), perfundiert, wozu der rechte Vorhof eröffnet und das Kreislaufsystem dreimal mit 5 ml der Fixierlösung gespült werden mußte. Um eine Vasokonstriktion zu verhindern, wurde den ersten 5 ml der Perfusionslösung 1%-iges Procain-HCl® (Sigma-Werke München) zugesetzt. Nach Kennzeichnung des nasalen Anteils des rechten und linken Auges mit Hilfe eines an der Tenonschen Kapsel oder am periorbitalen Gewebe angenähten Fadens (farblich codiert für rechts und links) wurden die Bulbi vorsichtig enukleiert.

### **2.4.2 Herstellung der Präparate**

Die entnommenen Augen wurden durch einen sagittalen Schnitt mit der Rasierklinge in zwei Hälften geteilt, die eine Übersicht von Hornhaut, peripherer und zentraler Netzhaut boten. Danach wurden die Retinae mit 3%-igem Glutaraldehyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 7,4) fixiert. Das Gewebe ist dann in 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 7,4) gespült und in 2%-iger ungepufferter Osmium-Lösung für zwei Stunden nachfixiert worden. Danach wurde das Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 100%) entwässert und über das Intermedium Propylenoxid in Araldit eingebettet. Die Semidünnschnitte (1  $\mu$ m) für die Lichtmikroskopie sind mit Glasmessern am Reichert' Mikrotom angefertigt und mit 0,1%-iger Toluidinblaulösung gefärbt, sowie mit einem Photomikroskop (Zeiss, Typ 3) fotografiert worden.