

**Upprepade ljusstimuli orsakar interferens i
mörkeradapterade elektroretinogram hos hund –
en utvärdering av några av
European College of Veterinary Ophthalmology's
rekommendationer för elektroretinografi på hund**

Anna Bäckström

**Handledare:
Björn Ekesten, Inst. för Kliniska Vetenskaper
Eva Hertil, Inst. för Kirurgi och Medicin, smådjur**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Abstract	1
Sammanfattning	2
Introduktion	3
<i>Grunder till elektroretinografi</i>	3
<i>Människor</i>	4
<i>Djur</i>	4
Syfte	5
Material och metoder	5
<i>Hundar</i>	5
<i>Utrustning för stimulering</i>	6
<i>Utrustning för registrering</i>	6
<i>Vårt protokoll</i>	7
<i>Statistisk bearbetning och presentation av resultat</i>	7
Resultat	8
<i>Mörkeradaptation</i>	8
<i>Mörkeradapterat respons på svagt stimuli</i>	9
<i>Mörkeradapterat respons på starkt stimuli</i>	11
Diskussion	15
Litteraturförteckning	17

ABSTRACT

Electroretinography is an examination method where the function of the retina is objectively assessed. In 2002 the European College of Veterinary Ophthalmology (ECVO) published a proposition to a standard on how to perform ERG examinations, to facilitate comparison of results and to make it possible to repeat examinations.

The purpose of this study was to validate parts of the canine ERG protocol suggested by the ECVO. Our principal aim was to study if there is any interference at the recommended stimulus intervals for dark-adapted rod- and combined rod-/cone responses.

The results show that there is an effect on the a- and b-wave amplitudes when different stimulus intervals are employed. When all examined intervals are pooled, there is an increase in the median b-wave to each consecutive dim, white (rod) stimulus in a series of four. When bright stimuli were used, there is an initial increase and then a decrease in the median b-wave amplitude. In contrast, the a-wave amplitudes decreased for each consecutive stimulus. We believe that the decrease in a-wave amplitude and later b-wave amplitudes in response to bright stimuli is due to light adaptation of the rods. However, the increase in dark-adapted b-wave amplitude to dim stimuli has, to our knowledge, not been described previously. It may be caused by contribution from the cone system or other post-receptor circuits in the retina, but this requires further investigation. The clinical relevance is probably limited, but may certainly add to the variation between individuals and therefore limit the possibility for diagnosing more subtle abnormalities of the canine retina. Furthermore, we found that the maximum impedance recommended by the ECVO, 2 k Ω , can be exceeded without any obvious effect on the quality and reproducibility of the ERG. Thus we suggest that the maximum impedance has to be less than 7 k Ω and preferably less than 5 k Ω .

SAMMANFATTNING

Elektroretinografi är en undersökningsmetod där funktionen hos retina studeras objektivt. År 2002 publicerades ett förslag till en standard för hur ERG-undersökningar ska genomföras på hund av European College of Veterinary Ophthalmology (ECVO) med syfte att underlätta jämförelse av resultat och öka reproducerbarheten i undersökningarna.

Syftet med denna studie var att validera vissa av de rekommendationer som ECVO fastställt. Huvudmålet var att studera om interferens uppstår för stav- respektive kombinerade stav- och tappsvär i mörker, vid upprepad ljusstimulering med de stimulusintervaller som ECVO rekommenderar.

Resultaten visar att amplituden påverkas vid användandet av olika intervall mellan blixtar. Vid användning av svaga stimuli (motsvarande den ljusintensitet som rekommenderas för stimulering av stavarna) ses en stegring av medianamplituden för b-vågen för varje individuellt respons i en serie om fyra. Vid starka stimuli ses först en ökning och sedan en nedgång i medianamplituden för b-vågen. För a-vågen ses däremot en successiv minskning i amplitud för upprepade blixtar. Det är sannolikt att minskningen i a-vågsamplitud samt b-vågsamplitud för de senare responserna som svar på starka blixtar beror på en ljusadaptation av stavarna. Ökningen i b-vågsamplitud då svaga stimuli användes är, vad vi känner till, inte tidigare beskriven utan kan vara orsakad av ett bidrag från tappsystemet eller från retinala kretsar på post-receptornivå. Detta kräver dock ytterligare undersökningar. Den kliniska relevansen är troligen begränsad men kan öka variationen mellan individer och därför inskränka möjligheterna att diagnostisera mera subtila abnormaliteter i retina hos hund. Vi har vidare funnit att den maximala impedansen som anges i ECVOs rekommendationer, 2 k Ω , kan överskridas utan att kurvornas kvalité eller reproducerbarhet påverkas negativt. Vi föreslår därför att den maximala impedansen ska vara lägre än 7 k Ω , men bör understiga 5 k Ω .

INTRODUKTION

Grunder till elektroretinografi

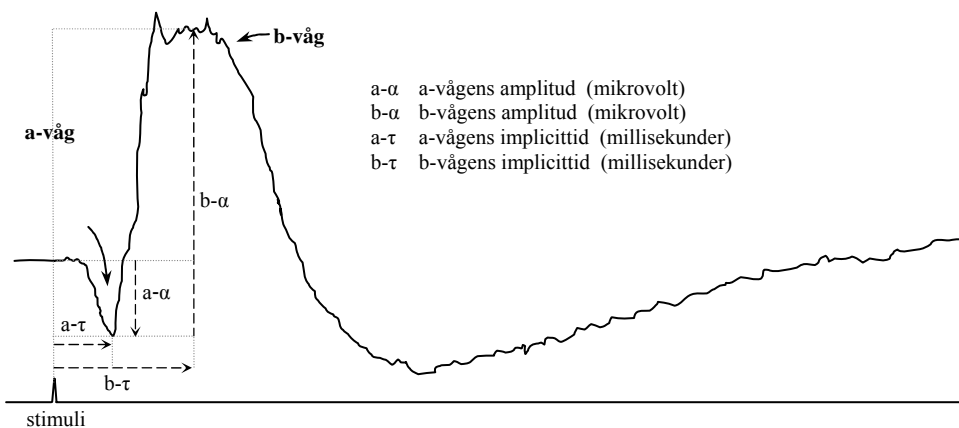
1865 kunde Frithiof Holmgren mäta en potential på utsidan av grodögon, spänningen genererades då han stimulerade ögat med ljus. (Holmgren 1865) Initialt var det oklart vilken del av ögat som genererade potentialen. Några år senare plockade han bort ögats främre segment och placerade mätelektroden direkt på näthinnan. Han kunde då visa att responsen hade retinalt ursprung.

Elektroretinografi (ERG) är en masspotential som har sitt ursprung i retina och potentialen kan mätas icke-invasivt med hjälp av en aktiv elektrod, som vanligtvis placeras i kontakt med hornhinnan. Det stimulus man använder för att aktivera retina är ljus. Företrädesvis ska ljuset spridas så jämnt som möjligt över retina och detta görs bäst med en helfältsstimulator (ty. Ganzfeld) (Figur 1).

Den potentialskillnad som genereras av fotoreceptorerna, syncellerna, är proportionell mot den ljusmängd de stimuleras med. Ljushänsynen som används för stimulering måste därför mätas. Under mörkeradaptation kan tester av stavfunktionen och förloppet av mörkeradaptation studeras genom att svaga ljusstimuli användes. Tappfunktionen kan t.ex. testas under dagsljusliknande betingelser (i bakgrundsljus) med starkare ljusstimuli. Som ljusstimulus vid ERG-undersökningar används ofta mycket korta ljusblixtar (blixt-ERG) som har en duration i storleksordningen $10^1 \mu\text{s}$.



Figur 1 Helfältsstimulatorn som använts för dessa försök.



Figur 2 Ett normalt svar från ett mörkeradapterat hundöga på ett starkt ljusstimulus.

Flera olika celltyper bidrar till olika delar av ERG kurvan. Ett elektroretinogram kan delas upp i bl.a. a-, b- och c-vågor (figur 2). A-vågen har sitt ursprung i fotoreceptorcellernas hyperpolarisation och är den första negativa delen av ERG-kurvan. (Penn och Hagins 1969) A-vågen avbryts av b-vågen som har en positiv potential. Källan till b-vågen har diskuterats under det föregående århundradet. Under lång tid trodde man att potentialen härstammade från K^+ -strömmar som genererades i Müller celler. Nu är det vedertaget att b-vågen har neuralt ursprung

och anses reflektera bipolarcellernas funktion. (Kofuij et al 2000). C-vågen är den sista delen av ERG-kurvan och den som används minst kliniskt, då den kräver särskild utrustning för att kunna registreras. Denna våg speglar pigmentepitelets funktion och kan inte heller registreras hos alla vuxna, normala hundar. (Dawson och Kommonen 1995)

Bara två olika parametrar kan mätas på en ERG kurva – amplituden (i mikrovolt) och implicittiden (i millisekunder), se figur 2. Implicittiden är tiden som passerar mellan ett stimulus och den maximala amplituden, antingen positiv eller negativ, på den vågdel man mäter. Amplituden för a-vågen mäts från baslinjen till maximala utslaget (botten) av a-vågen. Amplituden för b-vågen mäts av hävd från botten av a-vågen till det maximala utslaget (toppen) av b-vågen. (Gouras 1970)

Den aktiva elektroden placeras i regel i kontakt med hornhinnan med en ipsilateral referenselektrod som i regel är i kontakt med ögonlockskanten eller huden lateralt-aboralt om ögat. En jordelektrod placeras på en neutral position som t.ex. mitt på huvudet.

Olika näthinnesjukdomar kan drabba olika celltyper i retina eller olika områden och ger därigenom olika förändringar i elektoretinogrammet. Om man har en påverkan på yttre delarna av retina, såsom fotoreceptorerna eller bipolarcellerna, ser man karaktäristiska förändringar i elektoretinogrammet. Sjukdomar och skador i gangliecellerna anses inte ge någon påtaglig förändring i blixtelektoretinogrammet a-, b- och c-vågor. (Gouras 1970)

Människor

The International Society of Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) rekommenderade den första standarden för hur ERG-undersökningar skulle utföras på människa. Den första versionen skrevs 1989 och har sedan uppdaterats regelbundet (Marmor 1990, Marmor 1995, Marmor och Zrenner 1999, Marmor et al 2004). I standarden beskrivs fem olika typer av ERG-responser som man anser ska finnas med vid en fullständig undersökning.

1. ERG (härrörande från stavar) som svar på en svag blix i det mörkeradapterade ögat.
2. ERG (härrörande från stavar och tappar) som svar på en stark blix i det mörkeradapterade ögat.
3. Oscillatoriska potentialer (högfrekventa signaler från amakrin- och interplexiformceller).
4. ERG (härrörande från tappar) med en stark blix i det ljusadapterade ögat
5. Tapp-ERG som svar på ett snabbt blinkande stimulus (flicker).

Djur

2002 publicerades den första internationella standarden för ERG-undersökningar på hundar av European Collage of Veterinary Ophthalmology (ECVO). Enligt denna standard finns det två huvudsakliga andledningar till att utföra ERG-undersökningar och därför presenterades två protokoll. (Narfström et al 2002) Det första protokollet är kortfattat och visar om det finns en respons från retina eller inte. Detta protokoll föreslås för utvärdering av näthinnefunktionen inför

kataraktoperationer och för att undersöka om retina är involverad i akut blindhet. Det andra protokollet används för att diagnostisera generella retinala dystrofier som till exempel fotoreceptordegenerationer. Detta protokoll är mer detaljerat och påminner mycket om ISCEVs protokoll. Det finns utförliga beskrivningar av prestanda för utrustning för stimulering och registrering. Nedan återges en summering av standarden, som föreskriver mörkeradapterade stavresponser och blandad stav- och tappresponser, samt ljusadapterade tappresponser.

1. Mörkeradaptera hunden under 20 minuter medan stavfunktionen och den dynamiska mörkeradaptationen utvärderas var fjärde minut (vid 1, 4, 8, 12, 16 och 20 minuter).
2. Testa den blandade stav- och tappresponserna.
3. Testa tappresponserna efter tio minuters ljusadaptation.
4. Undersök tappresponserna på ett snabbt blinkande ljus (s.k. flicker test).

Djur, som oftast är mindre samarbetsvilliga än människor, brukar behöva sövas eftersom det är viktigt att patienten är stilla under undersökningen. Även om det är välkänt att generell narkos påverkar responsen på ljus har denna påverkan vanligen avsevärt mindre inflytande än de artefakter, från t.ex. muskelryckningar och kroppsrörelser, som fås på vakna hundar. (Granit R 1933, Kommonen 1988, Yanase och Ogawa 1997) Då ERG-undersökningen skulle vara i stort sätt omöjlig att genomföra på djur utan narkos är det ändå det rekommenderade tillvägagångssättet.

SYFTE

Syftet med denna studie var att verifiera vissa av ECVOs rekommendationer, som inte bygger på tidigare publicerade studier, för olika typer av ERG-undersökningar genom ERG-undersökningar av kliniskt friska hundar. Huvudmålet var att studera om interferens uppstår för stav- samt kombinerade stav-/tappsvaret i mörker vid de blixintervall som rekommenderas av ECVO.

MATERIAL OCH METODER

Hundar

ERG-undersökningarna genomfördes på sex försökshundar, beaglar, från Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Kirurgi och Medicin, smådjur. Etiskt tillstånd hade beviljats innan studien påbörjades och användningen av försökshundarna skedde i överensstämmelse med rekommendationerna från The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). För att hundarna skulle få delta i studien krävdes att de genomgick en klinisk undersökning, varvid hundarna bedömdes vara fria från symptom på sjukdomar och skador. Dessutom gjordes en oftalmologisk undersökning med indirekt oftalmoskop och spaltlampa för att kontrollera status på lins och retina. De förändringar som hittades i linsen hos några av hundarna bedömdes ha negligerbar effekt på ljusets möjlighet att nå fotoreceptorerna och inte heller på något annat vis påverka funktionen i retina.

Tabell 1. Resultat av den oftalmologiska undersökningen från alla hundar som deltog i studien

Kön	Ålder (år)	Oftalmologisk undersökning	
		Retina	Lins
hane	9	u.a.	liten, rund förtätning, främre Y-sömmen, höger öga
tik	7	u.a.	liten förtätning, bakre linskapseln, höger öga
tik	6	u.a.	liten, rund förtätning, främre Y-sömmen, höger öga
hane	5	u.a.	u.a.
hane	6	u.a.	liten förtätning, bakre linskapseln, höger öga
hane	8	u.a.	liten, rund förtätning, främre Y-sömmen, vänster öga
hane	7	u.a.	u.a.

Hundarna sövdes med Acepromacin (Plegicil vet, 10 mg/ml, SC, injektionslösning, Pharmaxim, Helsingborg, Sverige), Atropinsulfat (Atropin Merck NM, 0,5 mg/ml, SC, injektionslösning, Merck, Stockholm, Sverige) och Buprenorphin (Temgesic, 0,3 mg/ml, SC, injektionslösning, Schering-Plough, New Jersey, USA). Induktionen gjordes med Propofol (Rapinonet vet 10 mg/ml, IV, injektionslösning, Schering-Plough, New Jersey, USA) och anestesi underhölls med hjälp av Isofluran (Isoflo vet, inhalationsånga, vätska, Orion Pharma AB, Animal Health, Sollentuna, Sverige) och syre som tillfördes via en endotrakeal tub. Pupillerna utvidgades med Tropicamid (Mydriacyl, lösning 0,5 %, ögondroppar, Alcon, Fort Worth, Texas, USA) och Cyclopentolat (Cyclogyl, lösning 1 %, ögondroppar, Alcon, Fort Worth, Texas, USA) och pupillstorleken kontrollerades före och efter ERG-undersökningen. En ögonlockshållare höll isär övre och nedre ögonlocket, medan hållsuturer placerades i tredje ögonlocket för att hålla ögonen öppna och möjliggöra maximalt ljusinsläpp. Under narkosen fick alla hundar dropp (Rehydrex med glucos, 25 mg/ml, IV, injektionslösning, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Tyskland) intravenöst.

Utrustning för stimulering

Under försöken användes en Xenon blix (Model PS 22, Grass, Quincy, MA, USA), med vitt ljus, för att generera stimuli och ljuset spreds homogent med hjälp av en Ganzfeld stimulator. Maximal luminans per tidsenhet (sekund) uppmättes till 3.0 med en ljusmätare (IL 1700, International, Light Ltd, Newburyport, MA, USA) av forskningskvalité. Filter (Kodak Wratten filter no. 96 (vanligtvis 1.4 log enheter), Eastman Kodak, Co, Rochester NY) användes för att dämpa ljusintensiteten då svagt ljus skulle användas (stavsvär). Luminansen per tidsenhet för dessa stavstimuli var då $0,03 \text{ cd} \times \text{s/m}^2$ ($\text{cd/m}^2/\text{s}$).

Utrustning för registrering

Hundarna placerades på bröstet och ERG från båda ögonen registrerades samtidigt med kontaktlinselektroder (JET-lens electrodes, Universo, Switzerland). Referenselektrodena (Electrodes-Platinum subdermal needle electrodes, GRASS Astro-Med Inc, West Warwick RI, USA) placerades ca 2 cm kaudalt om laterala kantus och jordelektroden placerades mitt uppe på huvudet. Från elektroderna går registreringen till en förförstärkare (Iso-Dam, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA), vidare till en förstärkare (Powerlab/8SP (ADInstruments Ltd, Castle Hill, Australia)) och en A/D-omvandlare, där signalen omvandlas från analog till digital. Signalen förstärktes 10^4 gånger och ett bandpassfilter mellan 1-

1000 Hz användes. För att minimera störningar placerades en Faraday's bur över hunden. Impedansen mellan jord och referenselektroden mättes med en impedansmätare (Electrode impedance meter, GRASS Astro-Med Inc, West Warwick RI, USA) och var aldrig högre än 5 k Ω .



Figur 3. Fyra typiska stavsvår från en mörkeradapterad beagle. Intervallen mellan stimuli är 0,5 sekunder. Lagg märke till den stabila baslinjen.

Vårt protokoll

Vid våra ERG-undersökningar studerades de responser som starka och svaga ljusstimuli ger under den inledande mörkeradaptationen och därefter vid maximal mörkeradaptation. För det första undersöktes b-vågsamplituder som svar på svaga ljusstimuli under mörkeradaptation för att fastställa när en stabil adaptationsnivå uppnåtts. För det andra testades olika blixterintervall vid maximal mörkeradaptation. Detta gjordes för både rena stavsvår, samt för kombinerade stav-/tappsvår. Svaret på varje enskilt stimulus sparades och mättes individuellt för att undvika medelvärdesbildning, som skulle dölja eventuell interferens. Under förberedelserna, innan mörkeradaptationens start, vistas hundarna i normalt rumsljus (ca 30 cd/m²).

1. Mörkeradaptation av hunden följdes under 44 minuter medan stavfunktionen och därmed det dynamiska förloppet utvärderas var fjärde minut (vid 1,4, 8 och 12 fram till 44 minuter). Fyra blixter (0,03 cd/m²/s) med 10 sekunders intervall och de fyra individuella svaren från varje omgång lagrades och utvärderades. Ingen medelvärdesbildning gjordes.
2. Utvärdering vid olika stimuleringsintervall för stavresponser vid maximal mörkeradaptation. Svagt ljus (0,03 cd/m²/s), med olika intervall, användes som stimuli. Intervallen var 30, 20, 10, 6, 4, 2, 1, 0,5 och 0,3 sekunder. Fyra blixter och fyra individuella svar varje omgång som sparades och mättes individuellt. Ingen medelvärdesbildning gjordes.
3. Utvärdering av kombinerade stav-/tappresponser vid maximal mörkeradaptation. Starka ljusstimuli (3,0 cd/m²/s) med olika intervall, användes. Intervallen var 30, 20, 10, 6 och 4 sekunder. Fyra blixter och fyra individuella svar registrerades varje omgång. Alla svar sparades och mättes individuellt. Ingen medelvärdesbildning gjordes.

Statistisk bearbetning och presentation av resultat

Då det förekommer individuella skillnader mellan olika hundar normaliserades amplituderna för att möjliggöra jämförelse mellan olika individer. All bearbetning av data gjordes i ett statistikprogram (JMP version 5.1, SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA)

Mörkeradaptation

Den högsta amplituden i μ V för varje hund och öga som uppmättes under mörkeradaptionsperioden sattes till 100 %. Detta innebär att endast två responser per hund (en för höger och en för vänster öga) var 100 %. Vi valde att redovisa

resultaten för höger- respektive vänsterögon separat, eftersom resultaten från ögonen hos samma hund inte kan anses vara oberoende av varandra. I tabellen visas medianer samt den maximala och den minsta amplituden vid varje angiven tidpunkt under mörkeradaptationen.

Mörkeradapaterat respons på starkt och svagt stimuli

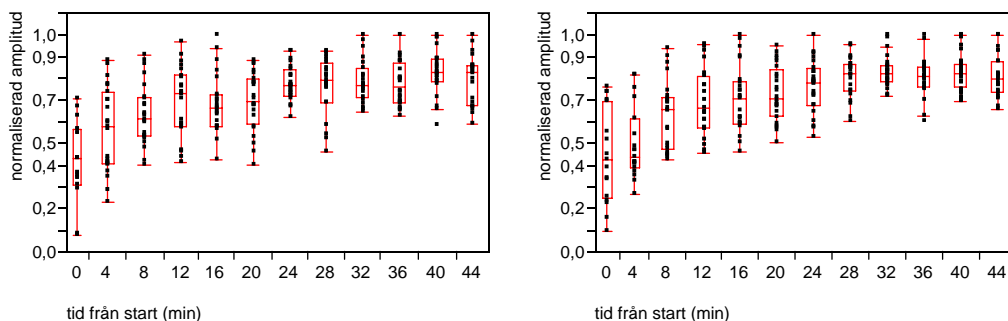
Vid undersökningarna med olika frekvenser sattes responsamplituden för den första blixten i varje serie om fyra till 100 %. Detta innebär att alla responser som är lägre än den första i sin serie kommer vara under 100 %, medan alla responser som har högre amplitud än den första i sin serie kommer vara mer än 100 %. Även vid frekvensundersökningen har vi tittat på höger och vänster öga var för sig. Alla figurer i resultatdelen som presenteras med boxplotdiagram visar normaliserad amplitud som en funktion av ordningsnummer (svar på blyxt 1, 2, 3 eller 4).

RESULTAT

Mörkeradaptation

Tabell 2 Normaliserade b-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) under mörkeradaptationen hos 6 normala beaglehundar. Tio sekunder före tidpunkten 0 släcktes rumsljuset. Ett svagt stimulus användes, varför responserna kan förutsättas drivas huvudsakligen av stavarna.

Vänster öga				Höger öga			
Minuter från start	Minimum	Median	Maximum	Minuter från start	Minimum	Median	Maximum
0	0,08	0,43	0,71	0	0,10	0,43	0,76
4	0,23	0,58	0,88	4	0,26	0,44	0,82
8	0,40	0,62	0,91	8	0,42	0,66	0,94
12	0,41	0,73	0,97	12	0,46	0,67	0,96
16	0,42	0,67	1,00	16	0,46	0,71	1,00
20	0,40	0,69	0,88	20	0,51	0,71	0,95
24	0,62	0,77	0,93	24	0,53	0,78	1,00
28	0,46	0,79	0,93	28	0,60	0,82	0,95
32	0,64	0,77	1,00	32	0,72	0,82	1,00
36	0,63	0,76	1,00	36	0,60	0,81	1,00
40	0,59	0,83	1,00	40	0,69	0,82	1,00
44	0,59	0,83	1,00	44	0,66	0,80	1,00



Figur 4 Normaliserade b-vågsamplituder som svar på svaga ljusstimuli under mörkeradaptationen, hos sex beaglar, som en funktion av tid i mörker. Varje boxplot visar median och kvantiler (uppifrån och ner: 90 %, 75 %, median, 25 % och 10 %).

Innan mörkeradaptationen påbörjades pågick förberedelserna i normalt rumsljus. Efter mörkläggnings testades stavfunktionen med svaga ljusblixtar var fjärde minut under de 44 minuter som mörkeradaptationen pågick. I figur 4 visas normaliserad b-vågsamplitud som en funktion av det antal minuter som passerat sedan mörkläggnings för vänster respektive höger öga hos sex beaglar. Resultaten visar att det sker en ökning av amplituden fram till 24-28 minuter har förflutit. I tabell 2 visas b-vågsamplituderna hos de sex hundarna vid varje mättpunkt. Efter 24-28 minuter ligger b-vågsamplituderna på en stabil nivå. Även här framgår att b-vågsamplituderna ligger på en stabil nivå efter cirka 24-28 minuter. Vi anser därför att alla hundar hade nått en fullständig mörkeradaptationsnivå efter 44 minuter i mörker när det egentliga försöket genomfördes.

Mörkeradpterat respons på svagt stimuli

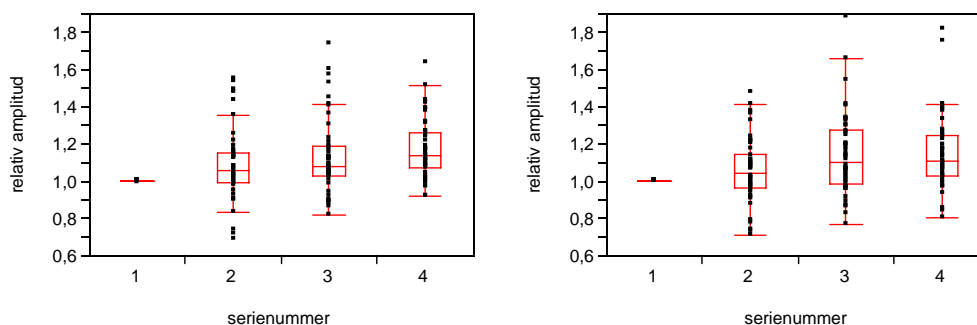
Efter 44 minuters mörkeradaptationen påbörjades test med olika blyxtintervall och svaga stimuli motsvarande de som rekommenderas för testning av stavfunktionen av ECVO. I figur 5 visas fyra efter varandra följande b-vågsamplituder i en serie hos en och samma hund. Den första responsen hade alltid en påtagligt lägre amplitud än de följande responserna. I regel var amplituden för det fjärde och sista svaret högst.



Figur 5 Fyra på varandra följande b-vågsresponser som svar på svagt stimuli presenterat med 0.5 sekunders intervall (2 Hz) hos en beagle. Amplituderna ökar successivt för de fyra responserna. Följaktligen har svaret på den första blixten lägst amplitud, medan svaret på den fjärde och sista blixten har högst amplitud.

Tabell 3 Fyra (serienummer 1-4) normaliserade b-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) efter mörkeradaptationen hos 6 normala beaglehundar. Ett svagt stimulus användes och därmed kommer responsen i första hand från stavarna

Vänster öga				Höger öga			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,69	1,06	1,55	2	0,71	1,05	1,48
3	0,82	1,08	1,74	3	0,77	1,10	1,88
4	0,92	1,14	1,64	4	0,81	1,11	1,81



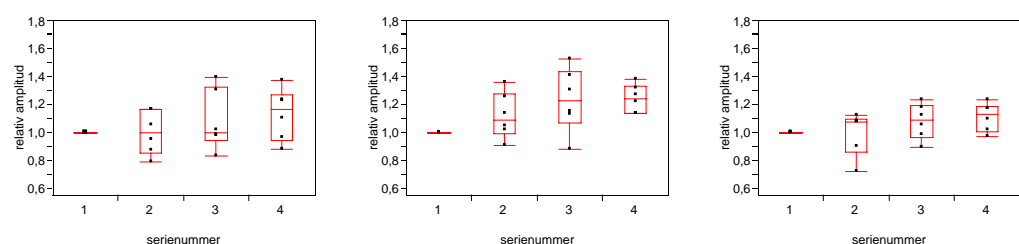
Figur 6 Normaliserade b-vågsamplituder som respons på svaga ljusstimuli hos sex hundar som funktion av serienummer. Resultaten för vänster och höger öga presenteras separat. Se texten till figur 4 för ytterligare förklaringar av diagrammen.

I figur 6 visas normaliserad b-vågsamplitud hos sex hundar som svar på svagt stimuli som en funktion av ordningsnummer. Alla undersökta blixintervaller är sammanslagna. Medianamplituden för respons nummer ett är alltid mindre än de följande medianamplituderna i alla serier. I tabellen (tabell 3) ser man att ökningen för medianen ligger mellan 5-14 % för respons nummer två till fyra jämfört med respons nummer ett.

Tabell 4 Normaliserade b-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) efter mörkeradaptationen hos 6 normala beaglehundar. Ett svagt stimulus användes och därmed kommer responsen i första hand från stavarna. Resultaten för vänster och höger öga presenteras separat uppdelat på tre olika intervall (30, 2 (ECVOs rekommendation) och 0,3 sekunder)

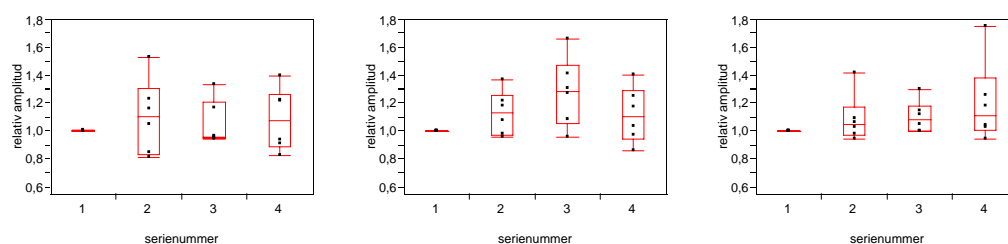
Vänster öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,79	1,00	1,17	2	0,91	1,09	1,36	2	0,72	1,08	1,12
3	0,83	1,00	1,40	3	0,88	1,23	1,52	3	0,90	1,09	1,23
4	0,88	1,16	1,37	4	1,14	1,24	1,38	4	0,97	1,13	1,24



Höger öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,01	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,81	1,10	1,53	2	0,96	1,13	1,36	2	0,94	1,04	1,41
3	0,95	0,96	1,33	3	0,96	1,28	1,66	3	0,99	1,08	1,30
4	0,83	1,07	1,39	4	0,86	1,10	1,40	4	0,94	1,11	1,75



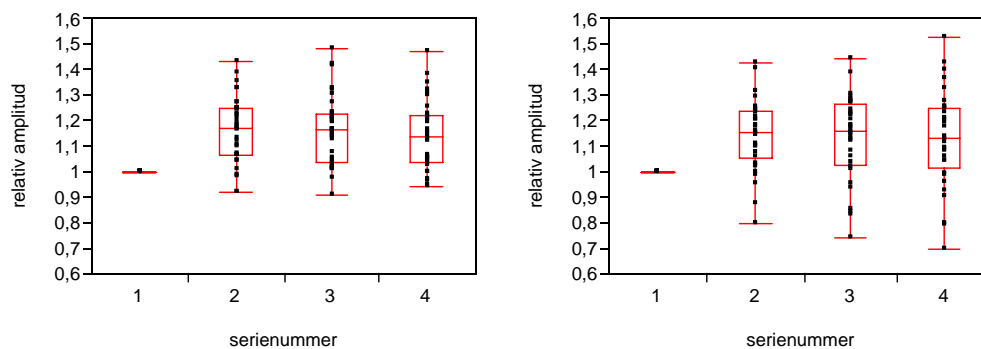
Figur 7 Normaliserade b-vågsamplituder som respons på svaga stimuli, hos sex beaglar, som en funktion av ordningsnummer (vänster respektive höger öga). Här visas tre olika intervall 30, 2 (ECVOs rekommendation) och 0,3 sekunder.

Figur 7 visar effekten av tre olika intervaller, 30 sekunder, 2 sekunder och 0,3 sekunder på b-vågsamplituder hos fyra på varandra följande singel-responser. Med 30 sekunders intervall ökar amplituden med 4-13 %. Vid 2 sekunders intervall, som motsvarar ECVOs rekommendation för lägsta tidsintervall för mörkeradapterade stavsvvar, ökar amplituden med 9-28 %. Vid 0,3 sekunders intervall ses såväl en ökning med 16 % som en minskning med 4 %. Det är troligt att även de svaga ljusblixtarna som ges med så kort intervall ger en viss ljusadaptation av stavarna, åtminstone hos vissa individer, vilket kan vara förklaringen till nedgången i amplitud som kunde ses hos flera stycken av hundarna.

Mörkeradapterat respons på starkt stimuli

Tabell 5 Fyra (serienummer 1-4) normaliserade b-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) från mörkeradapterade ögon hos 6 normala beaglehundar. Ett starkt stimulus användes och därmed ses ett kombinerat stav-/tapp respons.

Vänster öga				Höger öga			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,92	1,17	1,43	2	0,80	1,15	1,42
3	0,91	1,16	1,48	3	0,74	1,16	1,44
4	0,94	1,13	1,47	4	0,70	1,13	1,53



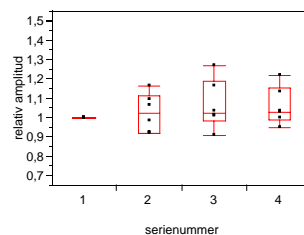
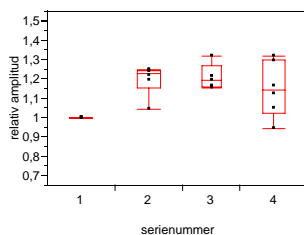
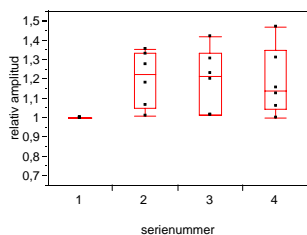
Figur 8 Normaliserade b-vågsamplituder, hos sex beaglar, som respons på starkt ljus relaterat till serienummer uppdelat på vänster och höger öga. Se texten till figur 4 för ytterligare förklaring av diagrammen.

I figur 8 visas normaliserad b-vågsamplitud hos sex hundar som svar på starkt stimuli kopplat till serienummer. Alla undersökta stimulusintervaller är sammanslagna. Medianamplituden för respons nummer ett är alltid mindre än de följande medianamplituderna i alla serier. Medianamplituden för sista responsen är lägre än de två mellersta. Av tabell 5 framgår att ökningen ligger mellan 13-16 % för andra till fjärde responsen jämfört med den första.

Tabell 6 Normaliserade b-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) från mörkeradapterade ögon hos 6 normala beaglehundar. Ett starkt stimulus användes och ger ett kombinerat respons från tappar och stavar. Resultaten för vänster och höger öga presenteras separat uppdelat på tre olika intervall (30, 10 (ECVOs rekommendation) och 4 sekunder)

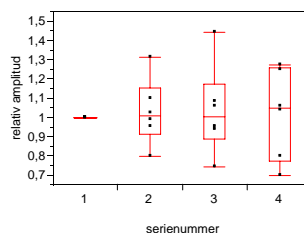
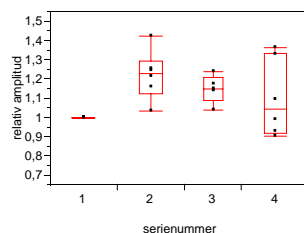
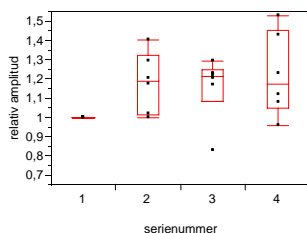
Vänster öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	1,01	1,22	1,35	2	1,04	1,23	1,25	2	0,92	1,02	1,16
3	1,01	1,21	1,42	3	1,15	1,19	1,32	3	0,91	1,02	1,27
4	1,00	1,14	1,47	4	0,94	1,14	1,32	4	0,95	1,03	1,22



Höger öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1	1	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,19	1,40	2	1,03	1,23	1,42	2	0,80	1,01	1,32
3	0,83	1,21	1,29	3	1,04	1,15	1,24	3	0,74	1,01	1,44
4	0,96	1,17	1,53	4	0,90	1,04	1,36	4	0,70	1,05	1,28



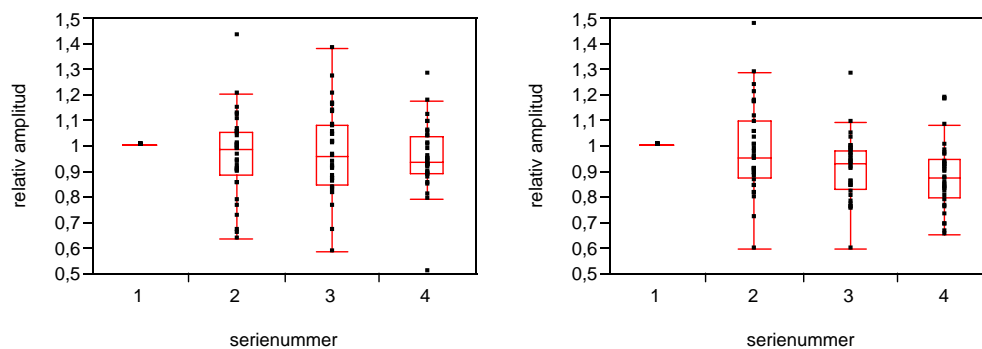
Figur 9 Normaliserade b-vågsamplituder som respons på starkt ljus, hos sex beaglar, relaterat till serienummer. Här visas de olika intervallerna 30, 10 (ECVOs rekommendation) och 4 sekunder.

I figur 9 visas effekten av tre olika intervaller, 30 sekunder, 10 sekunder och 4 sekunder på b-vågsamplituder hos fyra efter varandra följande single-responser. Med 30 sekunders intervall ökar amplituden för den andra till fjärde responser med 0-5 %. Vid 10 sekunders intervall, det kortaste av ECVO, rekommenderade intervallet ökar den andra till tredje responser med 15-23 % och den fjärde med bara 4-14 %. Vid 4 sekunders intervall ökar den andra till tredje responser med 19-22 % och den fjärde med 4-14 %.

Vid 4 sekunders intervall ses en kraftig ökning av amplituden för det andra och tredje responset jämfört med det första i serien. Det fjärde svaret genererar inte samma amplitud utan är tydligt lägre än nummer två och tre på båda ögonen. Responserna vid 10 sekunders intervallet har ett utseende som påminner om 4 sekunders intervallet. Även här ligger det fjärde svaret lägre än svaret för nummer två och tre, som om retina inte kan generera samma kraftiga respons om och om igen vid dessa intervaller. Vid 30 sekunders intervall, där retina har mer tid för återhämtning, ses en liten amplitudökning även för den fjärde responser.

Tabell 7 Fyra (serienummer 1-4) normaliserade a-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) efter mörkeradaptation hos 6 normala beaglehundar. Ett starkt stimulus användes och därmed kommer responserna både från stavarna och tapparna

Vänster öga				Höger öga			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,64	0,98	1,43	2	0,59	0,95	1,47
3	0,58	0,96	1,38	3	0,60	0,93	1,28
4	0,51	0,93	1,28	4	0,65	0,87	1,19



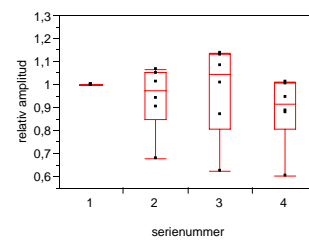
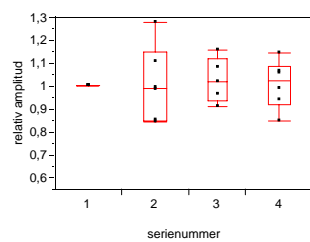
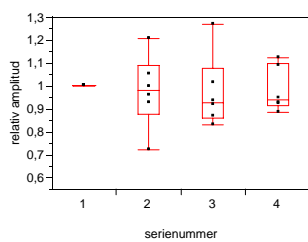
Figur 10 Normaliserade a-vågsamplituder, hos sex beaglar, som respons på starkt ljus relaterat till serienummer uppdelat på vänster till höger öga.

I figur 10 visas normaliserad a-vågsamplitud hos sex hundar som svar på starkt stimuli som en funktion av serienummer. Alla undersökta intervaller är sammanslagna. Medianamplituden för respons nummer ett är alltid störst av medianamplituderna i en serie, tvärtemot amplituden för b-vågorna. I tabellen ser man att minskningen ligger mellan 3-12 % för respons nummer två till fyra jämfört med nummer ett.

Tabell 8 Normaliserade a-vågsamplituder (minimum, medianen och maximum) från mörkeradapterade ögon hos 6 normala beaglehundar. Ett starkt stimulus användes och ger ett kombinerat svar från tappar och stavar. Resultaten för vänster och höger öga presenteras separat uppdelat på tre olika intervall (30, 10 (ECVOs rekommendation) och 4 sekunder)

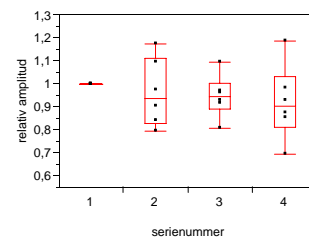
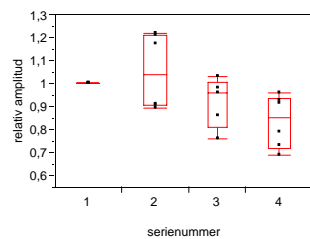
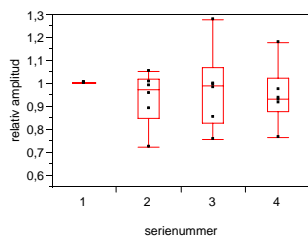
Vänster öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,72	0,98	1,20	2	0,84	0,99	1,28	2	0,68	0,97	1,06
3	0,83	0,93	1,27	3	0,91	1,02	1,16	3	0,62	1,05	1,14
4	0,89	0,94	1,12	4	0,85	1,02	1,15	4	0,60	0,91	1,01



Höger öga

0,3 sekunders intervall				2 sekunders intervall				30 sekunders intervall			
Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum	Serie-nummer	Minimum	Median	Maximum
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
2	0,72	0,97	1,05	2	0,89	1,04	1,22	2	0,80	0,94	1,17
3	0,75	0,99	1,28	3	0,76	0,96	1,03	3	0,80	0,94	1,09
4	0,77	0,93	1,18	4	0,69	0,85	0,96	4	0,69	0,90	1,19

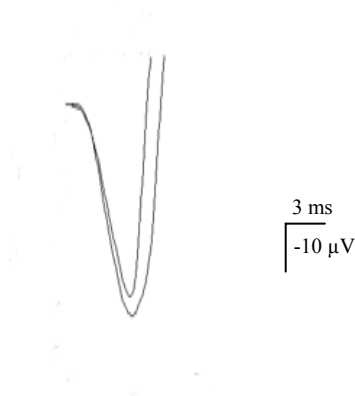


Figur 11 Normaliserade a-vågsamplituder som respons på starkt ljus, hos sex beaglar, relaterat till serienummer. Här uppdelat på de olika intervallerna 30, 10 (ECVOs rekommendation) och 4 sekunder. Se texten till figur 3 för ytterligare förklaring av diagrammen.

I figur 11 visas effekten av tre olika stimulusintervaller, 30 sekunder, 10 sekunder och 4 sekunder på a-vågsamplituderna för fyra efter varandra följande singelresponser.

Hos a-vågsamplituden ses inte samma tydliga förändring som hos b-vågsamplituden och det är svårare att se ett tydligt mönster, förutom att för det kortaste blixintervall, 4 sekunder, successivt minskar i amplitud.

Figur 12 visar två a-vågor, nummer ett och fyra, i en serie, som respons på starkt stimuli presenterat med 10 sekunders intervall. Den fjärde a-vågen har en flackare nedåtgående del och den uppåtgående delen startar tidigare. Den flackare lutningen av den descenderande delen talar för en minskad aktivering av fotoreceptorerna, sannolikt främst en ljusadaptation av stavarna från föregående blixtrar.



Figur 12 Den första och den fjärde a-vågen, som respons på starkt ljus, i en serie.

Placering av elektroder

Referenselektrodena placerades ca 2 cm kaudalt om laterala kantus på ögat. Hos flera hundar, framför allt efter starka stimuli, sågs muskelartefakter om elektroderna placerades närmare laterala kantus än 2 cm. Detta beror sannolikt på en ytlig anestesi kombinerat med närheten till musculus orbicularis oculi.

DISKUSSION

Efter 28 minuter har amplituderna stabiliserat sig och retina är totalt mörkeradapterad. Detta är längre tid än den rekommenderade tiden för att följa den dynamiska mörkeradaptationen i ECVOs rekommendation (Narfström et al 2002), men kortare än den tid för uppnående av maximal mörkeradaptation som anges för djur med stavdominerad retina t.ex. hund och katt (Dolt och Elenius 1960, Ripps et al 1981). Tiden som krävs för att nå hit kommer att bero på en rad olika parametrar. Bakgrundsljuset under förberedelserna är av stor betydelse. Känsligheten hos den utrustning man använder påverkar också tiden som fodras; en okänslig utrustning kan helt enkelt inte detektera små skillnader i amplitud.

ECVO rekommenderar som nämnts 20 minuters mörkeradaptation. Det faktum att vi ser en adaptation i ytterligare några minuter kan vara av mindre klinisk betydelse under förutsättning att samma tidsintervall alltid används för de olika testerna under mörkeradaptationen. Bara ett par minuters variation för det kombinerade stav- tappsvaret i ECVO-protokollet (stark blixtr efter 20 minuters mörkeradaptation) mellan olika undersökningar kan resultera i onödig spridning av amplituderna till följd av olika adaptationsnivåer.

Då man ofta använder medelvärdesbildning för amplituden vid ERG-undersökningar, kan det vara svårt eller omöjligt att säga något om hur intervallet man stimulerar under ger retina tillräckligt med tid för att återhämta sig mellan varje stimulus. Våra resultat indikerar att man har en påverkan, även vid det

högsta använda intervallet, 30 sekunder, mellan ljusblixtarna. Den kliniska betydelsen är troligtvis begränsad, i synnerhet om samma antal responser medelvärdesbildas vid varje tillfälle, men det kan försvåra detektion av mer subtila skillnader mellan olika individer. Det är också viktigt att försöka förstå de mekanismer som ger skillnaderna mellan responserna vid olika stimuleringsfrekvenser, eftersom de kan innebära aktivering av andra celltyper eller retinala kretsar än de som ger upphov till ERG vid en ända blixt. Det skulle åtminstone i teorin, vara möjligt att skillnaden mellan första och sista responsen i en serie skulle kunna ge information om funktionen i en specifik celltyp eller krets.

B-vågorna ökar om man jämför någon av de senare responserna med den första responsen i en serie. Detta har, vad vi känner till, inte beskrivits tidigare på något djurslag. Orsaken till detta är inte utredd men det skulle kunna bero på en eller flera av följande parametrar:

1. Aktivering av tapparna och därmed ett högre och snabbare svar. Detta kan bero på att tapparna reagerar när stimuliintervallet blir tillräckligt kort och tappsvarets snabbhet skulle tidigarelägga starten på den stigande b-vågen och därmed göra implicittiden kortare.
2. Interaktioner på en nivå som kommer efter receptornivå och som ger elektriska signaler vilka adderas till b-vågen. Ett annat exempel på elektriska signaler som läggs till b-vågen är de oscillatoriska potentialerna, de uppkommer i inhibitoriska kretsar drivna av amakrinceller. Dessa högfrekventa oscillationer ses främst vid stimulering med starka ljusstimuli och det är välkänt att de påverkas av adapterade blixtar som ges 15-30 sekunder före testblixt. Oscillatoriska potentialer har dock ett typiskt utseende (taggarna i framkant på b-vågen i figur 2), medan det tydligt kan ses i figur 5 att ökningen i b-vågsamplitud inte beror på att några distinkta oscillatoriska potentialer summerats till b-vågorna.

Hos a-vågorna ses ett omvänt samband, eftersom de successivt minskar i amplitud med stigande stimulusnummer. Av figur 12 framgår att den descenderande delen av a-vågen är något flackare, vilket talar för att stavarna har blivit ljusadapterade.

Under förberedelserna mättes alltid impedansen mellan kontaktlinselektrodena och referenselektrodena. Enligt ECVOs standard ska impedansen företrädesvis ligga under 2 k Ω . Denna rekommendation förefaller inte vara rimlig då vi endast vid enstaka tillfällen lyckades komma i närheten av så låg impedans för något elektrodpar. Impedansen låg dock alltid under 5 k Ω under registreringarna. Detta överensstämmer bättre med rekommendationerna från humansidan (Marmor et al 2004). Även vid impedanser mellan 5 och 7 k Ω erhöles reproducerbara ERG, som dock inte använts i studien.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Dawson, W. W. och B. Kommonen 1995. The late positive retinal potential in dogs. *Exp. Eye Res.* 60(2): 173-179
- Doldt, E. och V. Elenius 1960. Change of the threshold during dark adaptation measured with orange and blue light in cats and rabbits. *Experientia* 16: 313-314
- Gouras, P. 1970 Electroretinography: some basic principles. *Invest. Ophthalmol.*, 9(8): 557-569
- Granit, R. 1933. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J. Physiol. (Lond.)*23: 678-683
- Holmgren, F. 1865. En method att objektivera effecten av ljusintyck på retina, *Upsala Läkareförenings Förhandlingar* 1: 177-191
- Kofuji, P et al 2000, Genetic Inactivation of an Inwardly Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina, *J. Neurosci*, 20(15): 5733-5740
- Kommonen, B. 1998. The DC-recorded dog electroretinogram in ketamine-medetomidine anesthesia. *Acta Vet Scand* 29(1): 35-41
- Marmor, M. F. 1995. An Updated Standard for Clinical Electroretinography. *Arch Ophthalmol.*, 113: 1375-1376
- Marmor, M. F. 1990. An international standard for electroretinography. *Doc. Ophthalmol.* 73: 299-302
- Marmor, M. F, et al. 2004. Standard for Clinical Electroretinography (2004 update) *Doc. Ophthalmol.* 108: 107-114
- Marmor, M. F. och E. Zrenner 1999. Standard for Clinical Electroretinography (1999 update) *Doc. Ophthalmol.* 97: 143-156
- Narfström, K, et al. 2002, Guidelines for clinical electroretinography in the dog, *Doc. Ophthalmol.* 105: 83-92
- Penn, R, D. och W. A. Hagins 1969. Signal Transmission along Retinal Rods and the Origin of the a-Wave. *Nature*, 223: 201-205
- Ripps, H. et al, 1981. Rhodopsin kinetics in the cat retina. *J gen physiol*, 77: 317-334
- Yanase, J. och H. Ogawa 1997, Effects of halotane and sevoflurane on the electroretinogram of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 58(8): 904-909