

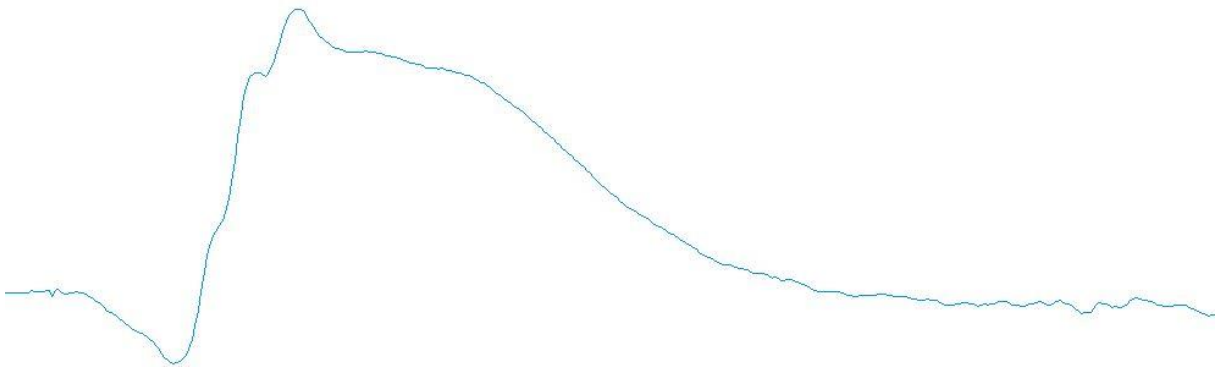


Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

# Metodvariation vid elektroretinografi av friska Beaglehundar

Methodological variation of electroretinography in healthy Beagle dogs



*Johan Sjöstedt*

*Uppsala*

*2020*



# Metodvariation vid elektroretinografi av friska Beaglehundar

## Methodological variation of electroretinography in healthy Beagle dogs

*Johan Sjöstedt*

*Handledare: Björn Ekesten, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Henrik Rönnberg, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** Illustration gjord av Johan Sjöstedt

**Nyckelord:** elektroretinografi, ERG, beagle, hund, metodvariation

**Key words:** electroretinography, ERG, Beagle dog, method variation

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

Syftet med arbetet var att studera metodvariationen för elektroretinografi (ERG) av friska beaglehundar.

Undersökningarna gjordes på sex tikar av rasen beagle från kliniska vetenskaper hos SLU. Hundarna bedömdes som friska innan undersökningarna gjordes. Undersökningarna gjordes under narkos och med ett ERG-protokoll som grundar sig på European College of Veterinary Ophthalmologists standardprotokoll.

Stor variation sågs för amplituder och lägre variation sågs för implicit-tider mellan individer, mellan ögon och mellan mättillfällen. Ingen statistiskt signifikant skillnad kunde visas mellan ögonen på samma individ. Ingen statistiskt signifikant skillnad kunde ses mellan mättillfällen förutom för den mörkeradapterade b-vågen.

Den här studien har tagit fram normalvärden samt variations- och repeterbarhetskoefficienter som skulle användas för att hjälpa differentiera mellan sjukliga förändringar och normalvariation. Det finns ett antal faktorer som kan förklara den observerade variationen och som särskilt visar vikten av noggrann preparation av patienten, samt träning och erfarenhet hos undersökaren. För mer generella resultat eller normalvärden för andra raser behövs ytterligare studier.

## **SUMMARY**

The purpose of this study was to study the method variations of electroretinography (ERG) in healthy beagle dogs.

The examinations were performed on six female Beagles from the Clinical Sciences department of SLU. The dogs were evaluated as healthy before the examinations. The examinations were performed under general anaesthesia and with an ERG protocol based on the European College of Veterinary Ophthalmologists standard protocol.

A large variation in amplitudes was seen and lower variations was seen in implicit times between individual dogs, between eyes and between different examinations of the same dog. No statistically significant difference was seen between the eyes of the same dog. No statistically significant differences were seen between the repeated examinations for the same individual except for the dark-adapted b-wave.

This study has produced normal values, coefficients of variation and repeatability that can be aid in differentiating disease and normal variation. There are several factors that contribute to the observed variation and that emphasize the importance of meticulous preparation of the patient, as well as training and experience of the examiner. For a more general result or normal values for other breeds additional studies are required.



## INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Retina .....	1
RPE.....	1
Fotoreceptorlager .....	2
Yttre gränsmembran.....	3
Yttre nukleärt lager.....	3
Yttre plexiformt lager.....	3
Inre nukleärt lager .....	4
Inre plexiformt lager.....	5
Gangliecellslager.....	5
Nervfiberlager .....	6
Inre gränsmembran.....	6
Synuppfattning .....	7
Ljus- och mörkeradaptation .....	7
Fusionsfrekvens.....	7
Elektroretinografi .....	8
ERG kurvan.....	8
Metodvariation .....	11
Statistik.....	11
Material och metoder .....	11
Hundar .....	11
Elektroretinografi .....	11
Statistisk analys.....	13
Resultat.....	14
Diskussion .....	17
Populärvetenskaplig sammanfattning .....	20
Referenser.....	22





## INLEDNING

Elektroretinografi (ERG) är en objektiv och icke-invasiv metod där elektriska potentialer mäts över retina vid olika ljusstimuli (Ropstad & Narfström, 2007; Ekesten, 2013). Registreringen ger en kurva som ger information om retinas funktion på cellnivå. ERG används för att ställa diagnos på sjukdomar i retina och för att kontrollera retinas funktion inför kataraktoperationer.

För att kunna bedöma om ett djur är friskt eller sjukt behövs normalvärden som referens. Kunskap om hur normalvärden varierar mellan olika undersökningstillfällen är också viktig för att bedöma om förändringar över tid beror på förbättring/försämring eller på normala variationer mellan olika mättillfällen.

Det finns ett antal faktorer som påverkar resultatet vid en ERG-registrering (Ekesten, 2013). Vissa kan elimineras genom att följa exakta protokoll men vissa beror på typ av utrustning, miljöfaktorer och liknande vid de kliniker som utför ERG och på djurspecifika orsaker, men även på undersökarens erfarenhet. Det är därför viktigt att ha normalvärden som representerar det arbetssättet och den population man har på sin klinik.

Syftet med det här arbetet är att studera metodvariationen för ERG inom och mellan friska beaglar samt mellan undersökningstillfällen.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Retina

Retina hos däggdjur delas in i 10 lager histologiskt. Dessa är (Parry, 1953):

1. Retinalt pigmentepitel (RPE)
2. Fotoreceptorlager
3. Yttre gränsmembran
4. Yttre nukleärt lager
5. Yttre plexiformt lager
6. Inre nukleärt lager
7. Inre plexiformt lager
8. Gangliecellslager
9. Nervfiberlager
10. Inre gränsmembran

### RPE

RPE är ett lager av epitelceller som ligger mellan kapillärerna i koroidea och fotoreceptorerna (Steinberg, 1985; Bok, 1993; Rizzolo, 1997). Där bildar det en del av blod-näthinnebarriären med sina tight junctions (zonula occludens eller täta fogar). RPE har många olika funktioner i retina som har betydelse för synen (Strauss, 2011; Ofri, 2013). RPE-cellerna i icke-tapetala fundus innehåller melanin som absorberar ljus som inte har absorberats av fotoreceptorerna

och skyddar mot skador som det fokuserade ljuset från linsen kan orsaka (Strauss, 2005). I tapetala fundus innehåller RPE-cellerna inte melanin så att ljuset kan passera till och reflekteras från tapetum lucidum (Samuelsson, 2013). RPE transporterar även näringsämnen och retinal från blodet till fotoreceptorer och skickar vatten, joner och metaboliter från fotoreceptorer till blodet (Strauss, 2011). RPE är också viktig i syncykeln då all-trans-retinal återförs till 11-cis-retinal, vilket är nödvändigt för fototransduktionen (se nedan) (Kiser *et al.*, 2012; Sahu & Maeda, 2016). RPE har även som funktion att fagocytera de yttre segmenten av fotoreceptorerna när de förbrukats (Mazzoni *et al.*, 2014).

### **Fotoreceptorlager**

Fotoreceptorer delas in i två typer; stavar och tappar (Kolb, 2013; Samuelsson, 2013). Stavar och tappar består av fyra delar; yttersegment, innersegment, cellkroppen och den synaptiska terminalen. I det här lagret av retina finns ytter- och innersegmenten. Yttersegmenten är hos tappar formade som koner och hos stavar som cylindrar. Det yttre segmentet innehåller membran som är travade på varandra som en myntrulle. I stavarna sitter dessa diskmembran inte ihop med den yttre cellväggen medan hos tappar så gör de det (Steinberg *et al.*, 1980). Membranen innehåller synpigment som består av ett protein som kallas opsin och en kromofor som kallas 11-cis-retinal (Kolb, 2013; Samuelsson, 2013). 11-cis-retinal är ett a-vitaminderivat. Innersegmentet förbinds med yttersegmentet av ett tunt cilium (Kolb, 2013). Membranen med synpigmenten börjar bildas från ciliet och mognar till färdiga diskar i den inre delen av yttersegmentet (Steinberg *et al.*, 1980; Ding *et al.*, 2015). Innersegmentet innehåller cellens organeller förutom cellkärnan (Samuelsson, 2013). Ytterst finns mitokondrierna, denna del av fotoreceptorerna kallas ellipsoiden. Längre in finns endoplasmatiskt retikulum, ribosomer och golgiapparaten, denna del kallas myoiden.

Stavsystemet är känsligt för små förändringar i ljusstyrka och för rörelser men har en dålig förmåga att urskilja detaljer (Mustafi *et al.*, 2009). Stavarna används vid mörkerseende (skotopiskt seende). Tappsystemet är istället avgörande för förmågan att se detaljer, men är mera okänsligt för små förändringar i ljusstyrka (stavar behöver endast en foton för att ge en respons, medan tappar behöver i storleksordningen 100 fotoner). Tappsystemet används för seende i dagsljus. Tappsystemet används dessutom för att se färg vilket inte stavsystemet kan hos däggdjur. Hund har två typer av tappar, vilket ger dem ett dikromatiskt färgseende. De har en typ av tapp som är känsligast för ljus runt 429 nm (blått ljus) och en tapp som har maximal känslighet runt 555 nm (gul-grönt ljus) (Neitz *et al.*, 1989). Detta är som hos en mänsklig deuteranop (grön-röd färgblindhet) (Siniscalchi *et al.*, 2017).

Den process som omvandlar ljusstimuli till en nervsignal i fotoreceptorerna kallas fototransduktion (Marc *et al.*, 1998; Ofri, 2013). Stavar och tappar är depolariserade (relativt sett elektropositiva) i mörker och avger neurotransmittorn glutamat. Detta är den enda neurotransmittorn som frisätts av fotoreceptorerna. Depolarisationen upprätthålls av ett inflöde av  $\text{Na}^+$  och  $\text{Ca}^{++}$  i cellerna och ett visst utflöde av  $\text{K}^+$  som gör att cellerna är positiva (Ofri, 2013). Inflödet av positiva joner kallas ”dark current” och sker via cGMP kopplade katjonkanaler. När fotoreceptorerna absorberar ljus stängs dessa kanaler genom en serie biokemiska reaktioner i cellen,

fototransduktionskaskaden, och stavarna och tapparna blir hyperpolariserade (elektronegativa) och utsöndringen av glutamat minskar.

Processen börjar med att fotoner träffar kromoforen 11-cis-retinal i membranen i det yttre segmentet på stavar och tappar (Ridge *et al.*, 2003; Yau & Hardie, 2009). 11-cis-retinal omvandlas till all-trans-retinal och synpigmentet blir aktiverat och kan binda till transducin som är ett G-protein. Transducin i sin tur aktiverar fosfodiesteras PDE6 som hydrolyserar cGMP till GMP. När cGMP sänks intracellulärt stängs katjonkanalerna.

Fototransduktionen avslutas med att synpigmentet fosfolyseras av G-kopplad-receptor-kinas (GRK1) och binder till arrestin, ett protein som helt avslutar aktiveringen av synpigmentet (Ars-havsky & Burns, 2012). Transducin och PDE deaktiveras och det cGMP som syntetiserats av guanylatcyklas bryts inte längre ner, nivån av cGMP ökar i cellen och katjonkanalerna öppnas igen.

### **Yttre gränsmembran**

Det yttre gränsmembranet är en avskiljare mellan det extracellulära rummet runt ytter- och innersegmenten av fotoreceptorerna och resten av retina (Bunt-Milam *et al.*, 1985; Samuelsson, 2013). Det består av cellkontakter mellan fotoreceptorer och Müllerceller samt mellan olika Müllerceller. Det finns senare studier som visar att det yttre gränsmembranet består av både zonula adherens (adherenspunkter) och zonula occludens (täta fogar) (Daniele *et al.*, 2007; Omri *et al.*, 2010). Funktionen för det yttre gränsmembranet är dels strukturell stabilitet, dels vara en del i transporten av makromolekyler och dels bibehålla ett extracellulärt matrix runt fotoreceptorerna (Bunt-Milam *et al.*, 1985; Omri *et al.*, 2010).

### **Yttre nukleärt lager**

Det yttre nukleära lagret innehåller cellkropparna från fotoreceptorerna (Samuelsson, 2013). Hos hund är lagret 10–15 cellkärnor tjockt i centrala retina och blir tunnare i periferin av retina. Tapparnas cellkroppar sitter dikt an mot det yttre gränsmembranet medan stavarnas cellkroppar utgör resten av det yttre nukleära lagret. Tapparnas cellkroppar är större och mer ovala än stavarnas cellkroppar som är små och runda.

### **Yttre plexiformt lager**

I det yttre plexiforma lagret sker överföringen av visuell information från fotoreceptorer till horisontalceller och bipolarceller (Kolb, 2011a; Ofri, 2013). Det yttre plexiforma lagret innehåller fotoreceptorernas synaptiska terminal (Kolb, 2013; Samuelsson, 2013). Hos tappar kallas pedikler och hos stavar spherulae. Det yttre plexiforma lagret innehåller också axoner och dendritter från horisontalceller och dendritter från bipolarceller (Samuelsson 2013). Horisontalceller och bipolarceller är andra ordningens neuron som modulerar signalerna från fotoreceptorerna samt direkt eller indirekt för signaler vidare till gangliocellerna (Kolb, 2011a; Ofri, 2013).

Bipolärceller delas fysiologiskt in i ON- och OFF-bipolärceller beroende på om de blir depolariserade och aktiverade (ON) eller hyperpolariserade och avaktiverade (OFF) vid ljusstimuli (Brandstätter & Hack, 2001; Nelson & Connaughton, 2012). Stavbipolärceller och ca hälften av tappbipolärcellerna är ON-bipolärceller och den andra halvan av tappbipolärcellerna är OFF-bipolärceller (Dumitrescu *et al.*, 2009).

Synapsen mellan stavarnas spherulae och deras postsynaptiska celler består av en bandsynaps med två invaginerande centrala dendritter från ON-bipolärceller och två laterala dendritter från horisontalceller (Brandstätter & Hack, 2001). Signalöverföringen från tapparnas pedikler är i jämförelse mer komplex. Det finns tre olika typer synapser vid en pedikel. Dels finns det som hos stavarna en invaginerande synaps som består av en bandsynaps med en central invaginerande dendrit från en ON-bipolärcell och två laterala dendritter från horisontalceller. Pedikler har även en icke invaginerande basal synaps där dendritter från OFF-bipolärceller tar emot information. Tapparna är även kopplade till andra tappar och stavar med kanalförbindelser mellan olika pedikler och mellan pedikler och spherulae.

Orsaken till att fotoreceptorernas glutamat kan ge två olika svar hos bipolärceller är för att de har två olika glutamatreceptorer (Brandstätter & Hack, 2001; Nelson & Connaughton, 2012). ON-bipolärceller har metabotropiska glutamatreceptorer medan OFF-bipolärceller har ionotropiska glutamatreceptorer. Metabotropiska glutamatreceptorer består av ett enkelt protein som är kopplat till G-protein som i sin tur öppnar en katjonkanal genom intracellulära kaskadsystem (Brandstätter & Hack, 2001). Det är visat att katjonkanalen som är kopplad till metabotropiska glutamatreceptorer är av typen transient receptor potential channels (Morgans *et al.*, 2009; Kojima *et al.*, 2010). Ionotropiska glutamatreceptorer däremot består av flera proteiner och fungerar själva som jonkanalen (Brandstätter & Hack, 2001).

Horisontalceller hos däggdjur delas in i två typer, typ A och B (Perlman *et al.*, 2012; Ofri, 2013). Typ A har endast dendritter, saknar axon och bildar bara synapser med tappar. Typ B har både dendritter och axon och bildar synapser med både stavar och tappar. Dendriterna har kontakt med omkringliggande tappar, medan axonet har kontakt med stavar en bit bort. Detta gör att signalerna från stavarna och tapparna isoleras från varandra i typ B-horisontalceller. Horisontalceller har även kanalförbindelser mellan horisontalceller av samma typ (Perlman *et al.*, 2012).

Horisontalceller fungerar som interneuron mellan fotoreceptorer och integrerar deras signaler. På det sättet ökar känsligheten för förändringar i kontrast och färg (Ofri, 2013). Horisontalceller har också en roll i att reglera signalen från fotoreceptorerna genom en negativ, men också positiv, återkoppling (Jackman *et al.*, 2011; Perlman *et al.*, 2012).

### ***Inre nukleärt lager***

Det inre nukleära lagret innehåller cellkropparna av bipolärceller, amakrinceller, horisontalceller (Kolb, 2011b; Samuelsson, 2013). Horisontalceller och bipolärceller är lokaliserade till den yttersta regionen av det inre nukleära lagret (Samuelsson, 2013; Huh *et al.*, 2015).

Amakrina celler är lokaliserade till den inre regionen (Samuelsson, 2013; Park *et al.*, 2018). Hos råtta har det visats att ett temporärt plexiformt lager bildas i det inre nukleära lagret under den tidiga delen av retinas utveckling (Park *et al.*, 2018). Författarna av studien föreslår att detta leder till stratifieringen i det inre nukleära lagret. I det inre nukleära lagret finns även Müllercellernas kärnor (Ofri, 2013; Samuelsson, 2013). Müllercellerna är vanligt förekommande gliaceller i retina och har strukturell och metabolisk funktion.

### ***Inre plexiformt lager***

I det inre plexiforma lagret sker informationsöverföringen från bipolarceller till amakrinceller och ganglieceller. Det innehåller bipolarcellernas axoner, samt dendriterna från amakrinceller och ganglieceller (Kolb, 2012; Ofri, 2013; Samuelsson, 2013). Det inre plexiforma lagret är indelat i fem strata (Kolb, 2012). Dessa strata är indelade i två funktionella sublamina, kallade a och b, där de två yttre utgör sublamina a och de tre inre utgör sublamina b. ON-bipolarceller kopplar till ON-ganglieceller i sublamina b och OFF-bipolarceller kopplar till OFF-ganglieceller i sublamina a. Det har dock visats att den uppdelningen inte är så strikt som man tidigare trott då det finns vissa ON-bipolarceller som bildar synapser i sublamina a hos mus och kanin (Dumitrescu *et al.*, 2009; Lauritzen *et al.*, 2013).

Bipolarcellerna har en bandsynaps som kopplar till två typer av postsynaptiska celler (Dacheux *et al.*, 2003; Bordt *et al.*, 2019). Bipolarceller från tappar är direktkopplade till en gangliecell och en amakrincell medan bipolarceller från stavar är kopplade till två amakrinceller och är genom dem indirekt kopplad till ganglieceller.

Amakrinceller delas dels in efter diametern på deras dendritiska fält, alltså den ytan som dendriterna utgör (narrow field 30–150  $\mu\text{m}$ , small field 150–300  $\mu\text{m}$ , medium field 300–500  $\mu\text{m}$  och wide field >500  $\mu\text{m}$ ), och dels efter hur deras dendriterna sträcker sig i de olika strata av det inre plexiforma lagret (Kolb, 2015). Monostatifierade finns bara i ett stratum medan bi- och tristatifierade sträcker sig in i två respektive tre strata. Det finns amakrinceller som sträcker sig igenom alla strata och dessa kallas diffusa celler.

Det finns ett trettiotal olika typer av amakrinceller och orsaken till att det finns så många är att de alla har en specifik funktion (MacNeil & Masland, 1998). Funktionen hos alla amakrinceller är inte kartlagd men de funktioner som har hittats är inhibition i det inre plexiforma lagret, vidarebefordran av signaler från stavbipolarceller till ganglieceller och vissa förstärker signaler. Den inhibitoriska funktionen sker med neurotransmittorerna GABA och glycin medan vidarebefordringen av signalerna från bipolarceller sker via kanalförbindelser till gangliecellerna (Ofri, 2013). Amakrinceller använder även dopamin, acetylcolin och serotonin som neurotransmittorer.

### ***Gangliecellslager***

Gangliecellslagret innehåller cellkropparna av de retinala gangliecellerna (Samuelsson, 2013). Ganglieceller kan delas in efter morfologi, vilken cell de får information ifrån och vilken information de processar (Ofri, 2013). Alfa-, Y- eller magnoceller är stora celler som får sin

information från stavar via amakrinceller och behandlar information om ljusnivå och rörelse. Alfaceller utgör ca 1-4% av gangliecellerna i retina på däggdjur (Peichl *et al.*, 1987). Beta-, X- eller parvoceller är små celler som är kopplade till tapparnas ON- och OFF- bipolarceller och behandlar information om detaljer och färg (Ofri, 2013). Betaceller utgör ca 45-50% av gangliecellerna i retina. Resterande ganglieceller har fått samlingsnamnet gamma- eller W-celler (Troy & Shou, 2002). Trots att de delar namn har de många olika fysiologiska egenskaper och morfologiskt utseende.

Hos hund finns det ett horisontellt stråk (visual streak) med högre densitet av ganglieceller som sträcker sig temporonasalt dorsalt om synnervspapillen (Mowat *et al.*, 2008; Beltran *et al.*, 2014). Dorsotemporalt i detta stråk finns ett cirkulär område med ännu högre densitet kallat area centralis. I area centralis finns det en fovea plana som liknar fovea centralis hos människa (Beltran *et al.*, 2014). En studie har visat på samband mellan noslängd och hur tydlig area centralis är (McGreevy *et al.*, 2004). Brakycéfala hundar har en väl utpräglad area centralis och nästan inget horisontellt stråk medan dolicocefala hundar har en mindre utpräglad area centralis men ett mer utpräglat horisontellt stråk.

### **Nervfiberlager**

Nervfiberlagret består av axonerna från gangliecellerna (Samuelsson, 2013). De går radiellt mot synnervshuvudet där de bildar synnerven. Nervfiberlagrets tjocklek hos beagle är som tjockast i den dorsala delen (Ofri & Ekesten, 2020). Medelvärdet för den dorsala delen hos vuxna beaglar var  $64 \pm 21$  centralt i retina och tunnades ut till  $31 \pm 9$  i perifera retina. I den ventrala delen av retina är nervfiberlagret som tunnast med en tjocklek på  $36 \pm 7$  i centrala retina och en tjocklek på  $20 \pm 3$  i perifera retina. Mediala och laterala nervfiberlagret hade en tjocklek på  $53 \pm 27$  respektive  $46 \pm 11$  i centrala retina som tunnades ut till  $31 \pm 5$  respektive  $25 \pm 5$  i perifera retina. Det fanns ingen statistiskt signifikant skillnad mellan mediala och laterala retina. Studien visade även att valpar hade ett tjockare nervfiberlager än vuxna och seniora beaglar.

Den intraretinala konduktionshastigheten i axonerna hos alfaceller har ett medelvärde på 4,9 m/s (Stone & Fukuda, 1974). Betacellerna har en intraretinal konduktionshastighet på 2,9 m/s i perifera retina. Betacellerna från area centralis har en snabbare intraretinal konduktionshastighet. Gammacellerna har den snabbaste intraretinala konduktionshastigheten med ett medelvärde på 8,74 m/s, gammaceller har också den största individuella spridningen av intraretinal konduktionshastighet.

### **Inre gränsmembran**

Det inre gränsmembranet består både av delar från retina och från vitreus (Rhodes, 1982; Heegaard *et al.*, 1986; Samuelsson, 2013). Från retina är det plasmamembranen och basalmembran från Müllerceller och andra gliaceller. Vitreus bidrar med ett nätverk av vitreala fibrer som infogar sig i basmembranen. De vitreala fibrerna består av kollagen.

## Synuppfattning

### **Ljus- och mörkeradaptation**

Adaptation till olika ljusnivåer låter retina arbeta med optimal prestanda i ett brett spann (Ofri, 2013). I ljusnivåer under  $0,03 \text{ cd/m}^2$ , skotopiska nivåer, används stavarna vilka har hög ljuskänslighet. I ljusnivåer mellan  $0,03 \text{ cd/m}^2$  och  $3 \text{ cd/m}^2$ , mesopiska nivåer, är både tapp- och stavsystemen igång. Ljusnivåer över  $3 \text{ cd/m}^2$ , fotopiska nivåer, gör att stavarna satureras och bara tappar (som har lägre ljuskänslighet än stavar) används.

Vid ljusadaptation ställer retina om till högre ljusnivåer (Fain *et al.* 2001; Arshavsky & Burns 2012). Den bakomliggande mekanismen i retina är driven av koncentrationen av  $\text{Ca}^{++}$  i yttersegmenten i fotoreceptorerna och av translokation av transducin, recoverin och arrestin. Vid höga ljusnivåer sjunker koncentrationen  $\text{Ca}^{++}$  vilket leder till aktivering av guanylatcyklas och en ökad syntes av cGMP. Aktiveringen av guanylatcyklas beror på  $\text{Ca}^{++}$ -bindande proteiner som inhiberar guanylatcyklas när de är bundna till  $\text{Ca}^{++}$  och aktiverar guanylatcyklas när de inte är bundna till  $\text{Ca}^{++}$ . Vid sänkningen av  $\text{Ca}^{++}$  vid höga ljusnivåer binder inte  $\text{Ca}^{++}$  längre till proteinerna och guanylatcyklas aktiveras vilket i sin tur ökar syntesen av cGMP. Låg koncentration av  $\text{Ca}^{++}$  leder också till att de cGMP-kopplade katjonkanalerna får en ökad affinitet för cGMP vilket ökar inflödet av positiva joner och förhindrar saturation. Andra  $\text{Ca}^{++}$ -bundna proteiner kallade recoveriner förhindrar fosfolysering av den aktiverade formen av synpigmentet i fotoreceptorerna vid höga  $\text{Ca}^{++}$ -nivåer (Arshavsky & Burns, 2012). Vid låga  $\text{Ca}^{++}$ -nivåer sker fosfolyseringen snabbare och synpigmentet är då mottaglig för en ny foton snabbare. Translokationen av transducin och recoverin sker från yttersegmentet till andra delar av stavarna vid höga ljusnivåer. Translokationen av arrestin sker åt andra hållet. Translokationen av proteinerna behöver längre tid och sker bara när ljusnivåerna ökar under en längre period (minuter). Denna process finns bara hos stavar och inte hos tapparna.

Vid mörkeradaptation återgår retina till hög känslighet från desensibiliseringen av stavarna vid starka ljusstimulus (Leibrock *et al.*, 1998). Processen simulerar en sakta minskning av ljus. Mörkeradaptation sker i ett snabbt steg och ett långsamt steg. Det snabba steget beror på de nedbrytningsprodukter som bildas efter att synpigmentet i fotoreceptorerna har fosfolyserats och bundit till arrestin. Dessa nedbrytningsprodukter kan på olika sätt aktivera transducin och på så sätt aktivera fototransduktionen. När nedbrytningsprodukterna blir färre blir färre transducinmolekyler aktiverade och det blir som när ljuset minskar. Det långsamma steget beror på syncykeln och att all-trans-retinal återförs till 11-cis-retinal i RPE (Fain *et al.*, 2001). Retina är inte helt återställd förrän allt synpigment har gått igenom syncykeln och återfått sin 11-cis-retinal form.

### **Fusionsfrekvens**

Ögat kan urskilja individuella blixtrar så länge det finns tillräckligt med tid mellan dem (Pangeni *et al.*, 2010; Hohberger *et al.*, 2011; Lisney *et al.*, 2011). Om frekvensen ökar kommer ögat till slut endast se ett ihållande ljussken. Frekvensen där detta händer kallas

Clicker Flicker Frequency, CFF CFF är olika för stavar och tappar (Coile *et al.*, 1989). Hos hund har stavar en CFF på 10–20 Hz och tapparna har en CFF på 60 Hz.

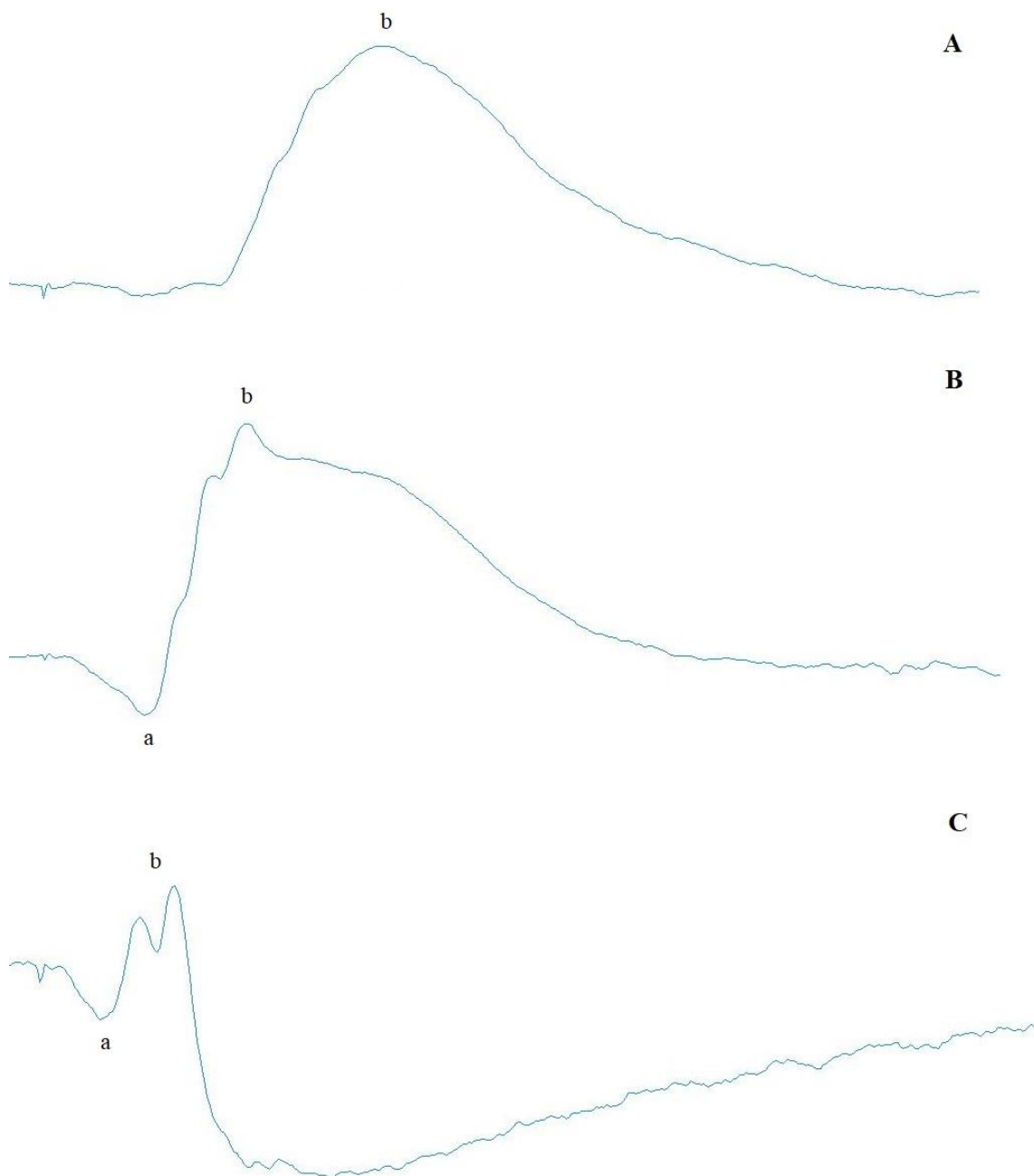
## **Elektroretinografi**

Elektroretinografi (ERG) är ett sätt att mäta elektriska potentialer över retina. Detta sker genom registrering med elektroder vid ljusstimuli. Elektroden fästs vid vardera tinningen och på hjässan samt på cornea med linselektroder. För att få ett så jämt ljusstimuli som möjligt placeras huvudet ofta i en fullfältstimulator. I fullfältstimulatorn genereras både blixtar och jämnt bakgrundsljus.

### **ERG kurvan**

ERG-kurvan delas in i flera komponenter. Huvudkomponenterna är a-vågen, b-vågen och c-vågen (Einthoven & Jolly, 1908). A-vågen är den initiala negativa delen av ERG, vars första del helt representerar hyperpolariseringen av fotoreceptorerna (Ekesten, 2013). B-vågen är den positiva delen som kommer efteråt och drivs av ON-bipolärceller (Kofuji *et al.*, 2000) (se figur 1). Vid starka ljusstimuli när retina är mörkeradapterad kan oscillatoriska potentialer ses som taggar på den uppåtgående delen av b-vågen. Dessa skapas av amakrinceller. A-vågen och b-vågen används mest för utvärdering av patienter. C-vågen är en sen, långsam, positiv komponent som beror på hyperpolarisation av det apikala membranet hos RPE och müllerceller (Dawson & Kommonen, 1995). C-vågen används sällan i kliniska undersökningar då den kräver specialutrustning (DC-ERG) för att registrera och bara finns hos en liten del av friska vuxna hundar.





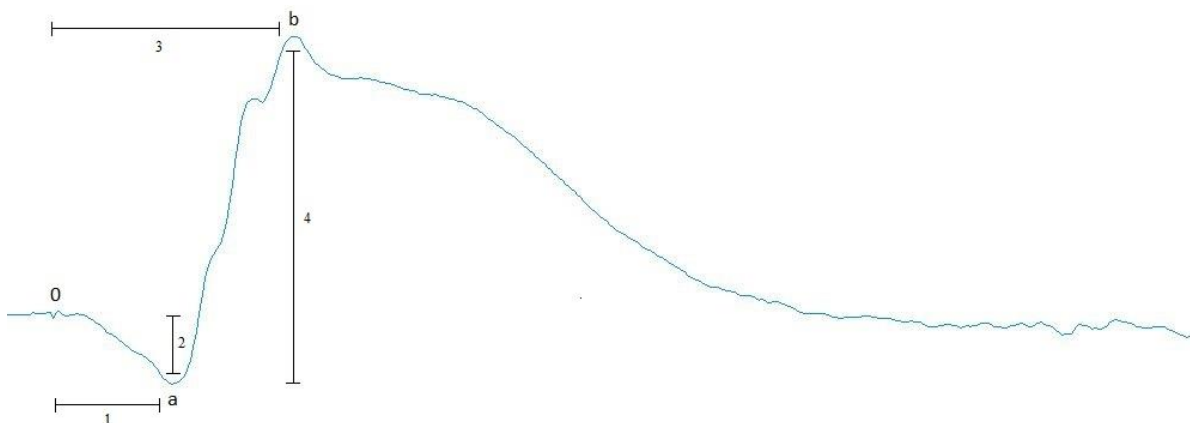
Figur 1. ERG-kurvor med a- och b-vågor markerade. A) stavsvär från mörkeradapterat ERG B) Blandat stav- och tappsvär från mörkeradapterat ERG C) Tappsvär från ljusadapterat ERG.

Det finns också andra komponenter som kan ses under speciella omständigheter. D-vågen kan ses som en positiv topp efter att ett långt ljusstimulus släcks och är OFF-bipolärcellernas respons (Perlman, 2007). Vid korta blixtrar smälter d-vågen ihop med b-vågen. I-vågen, som har en positiv topp, kommer efter b-vågen när retina är ljusadapterad. I-vågen har föreslagits vara en del av d-vågen (Kondo *et al.*, 2000) men tros också vara en respons från gangliocellerna (Rosolen *et al.*, 2004). Scotopic threshold response (STR) är en negativ respons på svaga ljusstimuli när retina är mörkeradapterad där a- och b-våg inte kan ses (Robson & Frishman, 1999).

STR når sin maximala amplitud ca 100 ms efter ljusstimulus. Amakrinceller, Müllerceller och retinala ganglieceller i den stavdrivna signalvägen har visats bidra till STR. Det har visats att STR kan ge upphov till så kallade pseudo a-vågor vid låga ljusstimulus (Sieving *et al.*, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1988). Dessa ser ut som a-vågor men beror inte på hyperpolariseringen av fotoreceptorerna utan på att b-vågen ännu inte fyller ut hela STR. Photopic negative response (PNR) är en negativ respons från den tappdrivna signalvägen vid starka ljusstimuli och full ljusadaptation från ganglieceller och deras axoner (Niemeyer, 2005; Frishman *et al.*, 2018). PNR kan ses efter b-vågen.

Genom att använda olika intensitet på bakgrundsljus och blixtrar kan man separera stav- och tappsvar. För att utvärdera tapparna används 10 minuter av ett regelbundet bakgrundsljus på 30 cd/m<sup>2</sup>, under den tiden hinner tapparna ljusadaptera och stavarna satureras vilket leder till ett rent tappsvar (figur 1C). För att utvärdera stavarna följs deras svar under en mörkeradaptation på (minst) 20 minuter (figur 1A). Med regelbundna intervall under dessa 20 minuter stimuleras ögat av en svag ljusblixt för att inte retina ska ljusadapteras. Stavsvarens b-vågor hos en frisk individ får då högre amplitud efter varje blixt. Man kan även få ett blandat stav- och tappsvar genom att stimulera retina med en stark ljusblixt efter mörkeradaptationen (figur 1B). CFF är viktigt att ha med i en ERG-undersökning då en sänkning i CFF kan vara en av de första indikationerna på degeneration av fotoreceptorerna (Ofri, 2013). I ERG på hund används en frekvens på 30 Hz för att testa funktionen hos tappar då denna frekvens är för hög för stavarna (Ekesten *et al.*, 2013).

ERG-kurvan mäts på två sätt (se figur 2). Dels mäts amplituden, högsta/lägsta punkten, av topparna och dalarna och dels mäts tiden det tar för toppen eller dalen att nå högsta/lägsta punkten, vilket kallas peak-time eller implicit-tid.



Figur 2. ERG-kurva från blandat stav- och tappsvar med mätpunkter för implicit-tid och amplitud för a- och b-våg utmarkerat. 1 = implicit-tid för a-vågen 2 = amplituden för a-vågen 3 = implicit-tiden för b-vågen 4 = amplituden för b-vågen. 0 = tidpunkt för ljusstimulus.

### **Metodvariation**

ERG-resultat beror på många olika faktorer (Ekesten *et al.*, 2013).. De påverkas av typ av utrustning, miljöfaktorer och liknande vid de kliniker som utför ERG samt undersökarens erfarenhet. Det har visats att olika elektroder som används kan ge så olika resultat att de inte kan jämföras (Mentzer *et al.*, 2005). Vidare påverkar faktorer som ras, ålder och vilken tid på dygnet undersökningen görs (Ekesten *et al.*, 2013). Alla dessa faktorer gör det viktigt att varje klinik som utför ERG tar fram egna normalvärden för just det arbetssätt och för den population som används.

Denna metodvariation kan ses vid jämförelse av flertalet artiklar som har tagit fram normalvärden för ERG på hund (Lee *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2013; Sussadee *et al.*, 2015; Nedev & Simonova, 2017, 2018). Dessa studier är gjorda på olika raser samt med olika anestasier och ERG-utrustningar.

### **Statistik**

Repetierbarhetskoefficienten (CR) är ett mått på om två mätningar gjorda vid olika tillfällen på samma individer och under samma förhållanden är reproducerbara (Vaz *et al.*, 2013). CR anger det värde under vilken den absoluta skillnaden mellan mätvärdena från de olika undersökningstillfällena förväntas hamna med 95 % säkerhet. Detta gör det lätt att använda kliniskt då man har en siffra som man snabbt kan referera till. CR ger absoluta mått i samma enhet som parametern som mäts.

Variationskoefficienten (CV) är ett mått på standardavvikelsen i procent av medelvärdet (Reed *et al.*, 2002). Det är därför ett mått på variation där man kan bortse från parametrarnas enheter. Detta gör det möjligt att jämföra parametrar med olika enheter.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Hundar**

Vid undersökningarna användes sex tikar i åldrarna 2–10 av rasen beagle från kliniska vetenskaper, SLU. Innan ERG-undersökningarna gick hundarna igenom en allmänklinisk undersökning och en enkel ögonundersökning omfattande yttre inspektion, pupillreflex, palpebralreflex, optisk blinkreflex och hotrespons. Alla hundarna bedömdes vara friska vid undersökningstillfällena.

### **Elektroretinografi**

ERG protokollet som används i studien grundar sig på European College of Veterinary Ophthalmologists standardprotokoll (Ekesten *et al.*, 2013). Protokollet kan ses i tabell 1.

Tabell 1. Protokoll för ERG mätning. Stav=stavsvar under mörkeradaptation, DA i/r=intensitet/respons serie under mörkeradaptation, Tapp=tappsvar vid en ljusblxt under ljusadaptation, Flicker=flickersvar under ljusadaptation

Mätning	Tid efter föregående mätning (minuter)	Styrka ljusblxt (cd s m <sup>-2</sup> )	Styrka bakgrundsljus (cd/m <sup>2</sup> )	Repetitioner (n)	Frekvens (Hz)
<b>Stav 1</b>	0,25 efter ljuset släckts	0,2	0	≤6	0,2
<b>Stav 2</b>	4	0,2	0	≤6	0,2
<b>Stav 3</b>	4	0,2	0	≤6	0,2
<b>Stav 4</b>	4	0,2	0	≤6	0,2
<b>Stav 5</b>	4	0,2	0	≤6	0,2
<b>Stav 6</b>	4	0,2	0	≤6	0,2
<b>DA i/r 1</b>	2	0,003	0	≤6	0,2
<b>DA i/r 2</b>	2	0,012	0	≤6	0,2
<b>DA i/r 3</b>	2	0,05	0	≤6	0,2
<b>DA i/r 4</b>	2	0,19	0	≤6	0,1
<b>DA i/r 5</b>	3	0,75	0	≤3	0,05
<b>DA i/r 6</b>	4	3	0	≤3	0,05
<b>Tapp 1</b>	10	3	20	≤6	0,3
<b>Tapp 2</b>	0	3	20	≤6	0,3
<b>Flicker</b>	-	3	20	150	30

Innan ERG-undersökningen dilaterades pupillerna med tropikamid (Mydriacyl ögondroppar 0,5 %, Alcon Nordic, Köpenhamn, Danmark) och pupilldilateringen kontrollerades på vissa individer, om den inte ansågs tillräcklig itererades tropikamiden. Vissa av hundarnas pupilldilatering kontrollerade även efter undersökningen. Hållsutur (silke, 4–0, Ethicon, Sommerville, NJ, USA) sattes i konjunktiva för att kontrollera ögats position. Ögonlockshållare placerades för att hålla ögonen öppna under ERG-undersökningarna. Subkutana nålelektroder (12 x 0,4 mm, Cephalon A/S, Nørresundby, Danmark) fästes på hjässan och på vardera tinningen. Elektroderna på vardera tinningen placerades i höjd med laterala ögonvinkeln mellan laterala cantus och öronbasen. Någon exakt mätning gjordes inte. En kontaktlinselektrod (ERG-jet®, Universo Plastique, Grenchen, Schweiz) placerades på hornhinnorna med en hyaluronsyra-haltig saltlösning som kontaktmedium (Comfort Shield SD, i.com medical GmbH, München, Tyskland). Impedansen mellan jord (elektroden på hjässan) och referenselektroderna på vardera tinningen mättes med en elektrodimpedansmätare (F-EZM5, Astro-Med inc., Grass instrument Division, West Warwick, IR, USA). Impedansen var under 5 kΩ och ungefär lika bilateralt.

ERG-undersökningarna utfördes med specialtillverkad fullfältstimulator (Ganzfeld) med ett xenonblxtaggregat (PS33 Plus, Astro-Med Inc., Grass instrument Division, West Warwick, IR, USA). Bakgrundsljuset genererades av en halogenlampa med en ljusstyrka på 20 cd/m<sup>2</sup>.

Signalen förstärktes med PowerLab (ADInstrument Ltd, Oxford, Storbritannien) och registrerades med LabChart (ADInstruments Ltd, Oxford, Storbritannien).

ERG-undersökningarna utfördes under narkos för att hundarna skulle vara tillräckligt stilla. Hundarna premedicerades med 0,05 mg/kg acepromazin (Plegicil 10 mg/ml, Pharmaxim, Helsingborg) i.m. Narkosen inducerades med ca 4 mg/kg propofol (Propofol-®Lipuro 10mg/ml, Braun, Melsungen, Tyskland) och hundarna lades sedan över på inhalationsnarkos med isofluran (IsoFlo vet, Orion Pharma AB Animal Health, Danderyd) och syrgas. Hundarna fick underhållsdropp på 2–3 ml/h Ringer-acetat (Baxter Viaflo, Baxter Medical AB, Kista). Övervakningen av narkosen gjordes med batteridriven övervakningsenhet (Cardell 9402, Midmark, Tampa, FL, USA) och manuellt. Hundarna placerades på en formbar vakuumpudde och täcktes med fleecepläd under undersökningen. Under förberedelsen inför ERG-undersökningen låg hundarna på en värmedyna (Mano Medical, Taden, Frankrike) som sedan kopplades ur för att inte ge sekundära störningar på ERG:t. Temperaturen kontrollerades även innan induktion samt i samband med uppvak. Temperaturen var jämn under narkosen.

Författaren av studien gjorde alla mätningar som låg till grund för de statistiska analyserna. Amplituden för a-vågen mättes från baslinjen till dalens djupaste punkt. Amplituden för b-vågen mättes från a-vågens djupaste punkt till b-vågens högsta topp. Implicit-tiderna för a- och b-vågorna mättes från tidpunkten för ljusstimulit till tidpunkten för högsta /lägsta amplitud för respektive våg.

### **Statistisk analys**

De statistiska analyserna gjordes med JMP Pro 12 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

De deskriptiva måtten (medelvärde, standardavvikelse och percentiler) kom från undersökningar på 24 ögon från sex hundar och två olika undersökningstillfällen.

Övriga statistiska analyser som gjordes var CV och CR på interindividuell variation, mellan ögon hos samma individ och mellan mättillfällen hos samma individ samt jämförelse av resultat mellan ögon och mellan undersökningstillfällen med parat t-test. Jämförelse mellan hundar gjordes på ett slumpmässigt utvalt öga från första mättillfället hos varje hund. Även jämförelser mellan mättillfällen gjordes på ett slumpmässigt utvalt öga.

CV räknades ut med formeln  $CV = \frac{\text{Standardavvikelse}}{\text{Medelvärde}}$ . CR räknades ut med formeln  $CR = 2,77 * \text{Standardavvikelse}$ . Standardavvikelse och medelvärde räknades ut med en ANOVA (variansanalys). Dessa statistiska analyser gjordes endast på mörkeradapterat ERG efter 20 minuter (Stav 6), ljusadapterat ERG (Tapp) samt på flicker ERG.

Jämförelse mellan ögon och mättillfällen mellan samma individ gjordes med parat t-test. En skillnad bedömdes vara statistiskt signifikant om  $p \leq 0,05$ .

## RESULTAT

Narkosen och uppvaken var jämna och skedde utan anmärkning. Inga ögonrörelser kunde uppmärksammas under narkoserna men vid enstaka av undersökningarna var pupillerna inte maximalt dilaterade. Vid enstaka tillfällen åkte kontaktlinselektrodena ur ögat eller tappade kontakten. De tre värdena som saknas var på tre olika ögon under en registrering, Stav 5. Endast 21 ögon användes därför för den univariabla analysen för den registreringen.

Amplituderna för både a- och b-vågorna ökade under mörkeradaptationen och med stigande stimulusintensitet (tabell 2). Implicit-tiden för a- och b-vågen minskade däremot när stimulusintensiteten ökades. Implicit-tiden för b-vågen för stavsvaret under mörkeradaptation blev längre desto mer tid av undersökningen som har gått. Det fanns en lägre standardavvikelse för implicit-tiden än för amplituderna.

Implicit-tiden för b-vågorna under mörkeradaptation var nere på värden runt 20 ms hos vissa individer. De negativa vågor som föregick b-vågorna ibland när stimulusintensiteten var låg var höga, i vissa ögon kunde de nå nivåer runt 30  $\mu$ V. Då ljusintensiteten för ljusstimulus var låg bedöms de vara pseudo a-vågor, snarare än a-vågor. DA i/r 4 hade en ca tre gånger så hög amplitud på b-vågorna än Stav 6 fast de hade mycket lika stimulusintensitet. DA i/r 4 hade dessutom en lägre implicit-tid än Stav 6.

Tabell 2. Presentation av medelvärde  $\pm$  standardavvikelse med 2,5:e och 97,5:e percentilen inom parentes av amplitud ( $\mu V$ ) och implicit-tid (ms) för a- och b-vågor. Stav=stavsvar under mörkeradaptation, DA i/r=intensitet/respons serie under mörkeradaptation, Tapp=tappsvar vid en ljusblxt under ljusadaptation, Flicker=flickersvar under ljusadaptation, \* innehåller mätdata från pseudo-a-vågor

	a-våg amplitud	a-våg implicit-tid	b-våg amplitud	b-våg implicit-tid
<b>Stav 1</b>	0		10,7 $\pm$ 10,3 (0–42,6)	48,5 $\pm$ 6,1 (33–60,5)
<b>Stav 2</b>	0		19,4 $\pm$ 19,5 (1,7–75,3)	47,9 $\pm$ 10,8 (22–61)
<b>Stav 3</b>	0		23,6 $\pm$ 20,5 (1,4–73)	48,6 $\pm$ 10,9 (21,5–61)
<b>Stav 4</b>	0		31,7 $\pm$ 30,2 (3,4–101,2)	52,9 $\pm$ 11 (26,5–66)
<b>Stav 5</b>	0		35,5 $\pm$ 34 (3,3–105,2)	55,1 $\pm$ 11,7 (29–67)
<b>Stav 6</b>	0		44,9 $\pm$ 36,6 (2,4–118,2)	57 $\pm$ 8,9 (31,5–67)
<b>DA i/r 1</b>	0		3,9 $\pm$ 4,6 (0–19,6)	47,6 $\pm$ 14 (18,5–67)
<b>DA i/r 2</b>	1,1 $\pm$ 2,7 (0–10,3)*	36,4 $\pm$ 0,8 (36–37,5)*	25,1 $\pm$ 22,7 (0–90,9)	54,3 $\pm$ 11,5 (32,5–69,5)
<b>DA i/r 3</b>	2,4 $\pm$ 6,9 (0–33,2)*	23,4 $\pm$ 6,1 (14,5–30)*	90,8 $\pm$ 52,6 (23,7–188,2)	61 $\pm$ 3,9 (52–67)
<b>DA i/r 4</b>	8,4 $\pm$ 6,4 (0–23,8)*	18,1 $\pm$ 3,7 (12–23,5)*	150,6 $\pm$ 59,5 (67,1–248)	50,2 $\pm$ 6,5 (38,5–60)
<b>DA i/r 5</b>	38,2 $\pm$ 18,7 (10,2–72,5)	17,6 $\pm$ 1,5 (14–19,5)	172,8 $\pm$ 59,5 (92,2–267)	36 $\pm$ 2,9 (28,5–40,5)
<b>DA i/r 6</b>	97,5 $\pm$ 22,7 (55,6–142,5)	15,1 $\pm$ 0,9 (13,5–17)	208,1 $\pm$ 57,1 (118,8–303,4)	32,2 $\pm$ 3,7 (26,5–37,5)
<b>Tapp 1</b>	8,3 $\pm$ 3 (3,9–15,2)	10,8 $\pm$ 1,2 (8,5–13,5)	33 $\pm$ 14 (8,6–65,9)	24,2 $\pm$ 1,1 (22,5–26,5)
<b>Tapp 2</b>	8,1 $\pm$ 2,8 (3,4–13,7)	10,6 $\pm$ 1 (8,5–12)	33,3 $\pm$ 13,2 (12,6–61)	24,4 $\pm$ 1,1 (22,5–26)
<b>Flicker</b>			29,5 $\pm$ 12,7 (7,5–62,6)	21,9 $\pm$ 1,1 (20–45,9)

Jämförelse mellan ögon visade på låg variation för implicittiderna och hög variation för amplituderna (se tabell 3). Det fanns ingen statistiskt signifikant skillnad mellan ögonen.

Tabell 3. Jämförelse av värden mellan ögon inom hund. CV= variationskoefficient, CR = repeterbarhetskoefficient. CR rapporteras i respektive enhet, ms och  $\mu V$

ERG	Parameter	OS		OD		p-värde	Medel	CV	CR
		medel	SD	medel	SD				
<b>Mörkeradapterat (20 min)</b>	b-våg (ms)	60	4,0	51	10,6	0,12	56	8%	12
	b-våg ( $\mu V$ )	33	19,8	16	15,6	0,14	24	35%	23
<b>Ljusadapterat</b>	a-våg (ms)	10	1,2	11	0,6	0,77	11	6%	2
	a-våg ( $\mu V$ )	8	2,3	8	2,4	0,45	8	27%	6
	b-våg (ms)	24	1,2	24	1,1	0,59	24	3%	2
	b-våg ( $\mu V$ )	38	13,8	31	19,1	0,38	34	53%	51
<b>Flicker</b>	b-våg (ms)	22	0,9	22	1,3	0,08	22	4%	2
	b-våg ( $\mu V$ )	36	13,9	26	19,1	0,23	31	47%	40

Interindividuell variation kan ses i tabell 4. För implicit-tiderna sågs en låg variation. Variation hos implicittiden för mörkeradapterat ERG var något högre än de andra implicittiderna. Variationen för amplituderna var mycket hög.

Tabell 4. Interindividuell variation. CV= variationskoefficient, CR = repeterbarhetskoefficient. CR rapporteras i respektive enhet, ms och  $\mu V$

ERG	Parameter	Medel	SD	Range	CV	CR
<b>Mörkeradapterat (20 min)</b>	b-våg (ms)	56	8,8	32–65	16%	24
	b-våg ( $\mu V$ )	24	19,2	3–62	80%	53
<b>Ljusadapterat</b>	a-våg (ms)	10	0,8	9–12	8%	2
	a-våg ( $\mu V$ )	8	2,5	3–11	31%	7
	b-våg (ms)	24	1,1	23–26	5%	3
	b-våg ( $\mu V$ )	34	15,4	12–66	45%	43
<b>Flicker</b>	b-våg (ms)	22	1,0	21–24	5%	3
	b-våg ( $\mu V$ )	31	16,8	8–63	54%	47

Resultatet mellan undersökningstillfällena visar låg variation för implicittider och hög eller mycket hög variation för amplituderna (tabell 5). Ingen statistiskt signifikant skillnad kunde ses mellan mätillfällena förutom för b-vågen i det mörkeradapterade ERG:t ( $p = 0,02$ ).



Tabell 5. Jämförelse mellan undersökningstillfällena hos varje hund. CV= variationskoefficient, CR = repeterbarhetskoefficient. CR rapporteras i respektive enhet, ms och  $\mu V$

ERG	Parameter	Medel 1	Medel 2	p-värde	Medel	CV	CR
<b>Mörkeradapterat (20 min)</b>	b-våg (ms)	58	61	0,51	60	7%	11
	b-våg ( $\mu V$ )	20	70	0,02	45	93%	115
<b>Ljusadapterat</b>	a-våg (ms)	10	11	0,41	11	8%	2
	a-våg ( $\mu V$ )	7	9	0,47	8	47%	10
	b-våg (ms)	24	24	0,71	24	3%	2
	b-våg ( $\mu V$ )	35	34	0,89	34	33%	31
<b>Flicker</b>	b-våg (ms)	22	22	0,84	22	2%	1
	b-våg ( $\mu V$ )	31	29	0,70	30	26%	21

## DISKUSSION

Den här studien har studerat metodvariationen för ERG hos beaglehundar. Resultaten i den här studien visar på låg variation för implicit-tid och hög variation för amplituder. Detta indikerar att ett brett intervall av amplituder faller inom normalvariation medan implicit-tiden har ett snävare intervall. Baserat på de här resultaten kan avvikelser i implicit-tid vara en mer robust indikator på sjukdom än amplitud. Skillnaden i variation mellan dessa två parametrar skulle kunna bero på fysiologiska skillnader hos olika individer. Amplituderna beror på elektroniska potentialer som blir olika stor ju fler eller färre celler som genererar dem, vilket gör amplituden känslig för individuella skillnader i celluppsättning. Implicit-tiden däremot beror på biokemiska signaler intracellulärt eller på nervhastigheten i en cell, dessa faktorer borde vara mer lika oavsett individ då cellerna är gjorda för att fungera på samma sätt. Å andra sidan kan den uttalade variationen i amplituder också bero på att preparationen av patienten och undersökningsförhållandena inte var identiska mellan olika tillfällen.

Som tidigare nämnts är registreringen av amplituden känslig för placeringen av nålelektroden och bara någon eller några centimeters skillnad kan ge signifikant skillnad i amplitud (Mentzer *et al.*, 2005). Att samma elektroder användes under studiens gång kan ha gett sämre kontakt efter varje undersökning. Detta är troligt då impedansen mellan jordelektrod och de andra ökade för varje undersökning, dock var den under 5 k $\Omega$  under hela studien. Placeringen av elektroderna kan också ha skiljts sig mellan mätillfällen då det inte mättes ut exakt varje gång. Detta kan även vara en förklaring till den högre variationen för amplituder. Författaren till denna studie har inte hittat några studier som visat detta på implicit-tiden men det kan tänkas att registreringen av implicit-tiden inte är lika känslig för yttre faktorer som amplituden är.

Även flera andra faktorer kan bidra till variationen i resultat. Huvudet och ögonens position i ljusstimatoren vid undersökningarna och pupillstorleken vid undersökningarna påverkar hur mycket av ljuset som når retina och om ljuset är jämnt fördelat över hela retina eller om delar stimuleras kraftigare än andra (Gouras, 1970). Positionen av huvudet spelar förmodligen större

roll vid låga ljusstimuli då ett snett huvud kan leda till att ena ögat får mindre ljus än det andra då nosen absorberar ljuset. Pupillen var inte maximalt dilaterad under vissa undersökningar, vilket gör att iris blockerade delar av ljuset på väg till retina (Perlman, 2007). Vissa hundar fick även ytterligare pupilldilaterande droppar precis innan undersökningen då det konstaterades att pupillstorleken inte var maximal, vilket förmodligen resulterade i att pupillen blev mer och mer dilaterad under undersökningens gång. Rekommendationen är att pupillerna är maximalt dilaterade under hela undersökningen och att detta kontrolleras minst en gång innan undersökningen och helst även efter undersökningen (Ekestén *et al.*, 2013).

Luftfuktigheten i rummet kan ha påverkat ögats fuktighet. Om det var torrt i rummet där undersökningarna gjordes kan det ha gjort ögonen torra, vilket i sin tur gör att kontaktlinselektroden inte fäster lika bra. Detta kan ha gjort att kontakten blev sämre och sämre under undersökningens gång. Hundarna undersöktes inte alltid vid samma tid på dygnet vid den efterföljande mätningen (Hawlina *et al.*, 1992). Detta kan ha gjort att normala dagliga förändringar ha påverkat resultatet.

Att det blev en statistiskt signifikant skillnad mellan mättillfällena för b-vågen i det mörkeradapterade ERG:t är något som inte var förväntat. Man kan se att mätning 2 ger betydligt högre amplitud än mätning 1. Erfarenheten hos undersökaren är sannolikt också en viktig faktor då undersökaren var helt oerfaren med ERG i början av studien och sedan gradvis lärde sig och därmed kunde både bättre förstod vad som påverkade resultaten och även tränade upp det rent praktiska genomförandet. Detta betyder att studien gjordes under en inlärningskurva, vilket kan ha gett bättre undersökningar under studiens gång. Att vi inte såg signifikanta skillnader i ljusadapterat ERG skulle kunna bero på att ljusstimulit är så svagt under det mörkeradapterade ERG att preparationen av patienten har större betydelse för om det relativt sett låga antalet fotoner verkligen når och distribueras jämnt över retina jämfört med när ögat stimuleras med ett överflöd av ljus.

Problem med dålig kontakt mellan kontaktlinselektrod och öga gjorde att några resultat saknas, vilket minskade underlaget i vissa av de statistiska analyserna något. I de senare analyserna där resultat mellan ögon, individer och undersökningstillfälle jämfördes blev dock det inget som behöver vägas in då kontaktproblemen bara påverkade registreringar som inte användes för de analyserna.

En djupare ögonundersökning med spaltlampa, tonometri och oftalmologi genomfördes inte på hundarna. Det är därför svårt att säga om hundarna var helt friska, men den enklare undersökningen visade inga uppenbara problem.

Något som inte heller var förväntat att se var a-vågorna vid låga ljusstimulus under mörkeradaptationen. Dessa är förmodligen pseudo a-vågor (Sieving *et al.*, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1988) snarare än a-vågor, d v s en rest av STR som vid stimulering med svagt ljus inte fyllts ut fullständigt av b-vågen.

Sussadee *et al.* (2015) använde liknande anestesi som i denna studie med induktion med propofol för att sedan gå över på isofluran. De använde även nålelektroder. En stor skillnad mellan studierna var att Sussadee *et al.* (2015) använde en handhållen ERG-enhet med en mini-ganzfeld för stimulering av ett öga. De såg också ökande amplitud för b-vågen under mörkeradaptationen, men hade en generellt högre amplitud på b-vågen än i denna studie. Detta skulle kunna förklaras av placeringen av nålelektroder. Sussadee *et al.* (2015) placerade sina 3 cm från laterala canthus. I denna studie var det inte preciserat exakt vilket avstånd elektroder skulle ha från laterala canthus, utan approximerades från anatomiska strukturer (laterala canthus och öronbasen). Vid användandet av en fullfältstimulator som hela huvudet placerades i krävs, som nämnts, att huvudet var placerat så rakt som möjligt. Om huvudet var placerat snett kan ett öga få mindre ljus vid de låga ljusstimuli som används vid mörkeradapterat ERG. Detta skulle ha kunnat sänkt amplituderna vilket förklara skillnaden då Sussadee *et al.* (2015) inte hade den faktorn att räkna med. Detta kan även styrkas av att amplituden för b-vågen vid ljusadaptation var liknande mellan studierna. Om det var placeringen av nålelektroder skulle troligen även denna ha skiljt sig, även om Mentzer *et al.* (2005) inte studerade skillnader vid ljusadapterade ERG. Vid starkare ljusstimulus, som används vid ljusadapterat ERG, blir placeringen av huvudet en faktor som påverkar mindre då det finns ett överflöd av fotoner, vilket då ger mer liknande resultat.

Implicit-tiden för b-vågen i mörkeradapterat ERG är generellt högre än implicit-tiderna som Sussadee *et al.* (2015) såg, förutom hos en ras som hade mycket lägre implicit-tider. Sussadee *et al.* (2015) har diskuterat skallform som en faktor som skulle kunna förklara detta. Implicit-tiderna för ljusadapterat ERG är liknande, för alla raser Sussadee *et al.* (2015) har med i sin studie.

Amplituden och implicit-tiden för a-vågen i ljusadapterat ERG var liknande mellan denna studie och Sussadee *et al.* (2015).

Lee *et al.* (2009) använde ketamin och medetomidin som anestesi i sin studie. De använde också samma handhållna ERG-enhet som Sussadee *et al.* (2015) använde. Även Lee *et al.* (2009) lät hundarna mörkeradaptera i 20 minuter. Lee *et al.* (2009) kunde inte påvisa samma ökning av b-vågen under mörkeradaptationen. Generellt var amplituderna för b-vågorna under mörkeradaptation något högre i Lee *et al.* (2009) än i denna studie. Detta kan bero på att hundarna var relativt sett mer mörkeradapterade redan innan ljuset släcktes i deras studie och därför förändrades inte amplituderna lika mycket, samtidigt som mer mörkeradapterade stavar ger svar med högre amplitud. Amplituden för b-vågen i ljusadapterat ERG var liknande som i denna studie.

CV mellan ögonen för b-vågornas amplitud och implicit-tid efter 10 minuter ljusadaptation är lägre på människa. CV för amplituden var 4,5 % och för implicit-tiden var den 1,25 % (Hochstein *et al.*, 2007). Hochstein *et al.* (2007) konstaterade dock att detta var lägre CV än vad man tidigare har sett för b-vågens amplitud hos människa, 25 %-110 %. Dessa tidigare CV är mer i linje med resultaten från denna studie med en CV på 53 % för b-vågens amplitud efter 10 minuter ljusadaptation mellan ögonen. Något att beakta är att människa och hund är olika arter med mycket olika huvudform, vilket kan påverka variationen.

Då denna studie endast är gjord på hundar av rasen beagle och endast på tikar kan man inte dra för stora slutsatser till andra raser och kön. För att få fram siffror att använda kliniskt behövs mer studier på fler raser av intresse samt båda könen. För att kunna dra ännu säkrare slutsatser kan en större grupp individer användas. Det skulle vara intressant att se sådana studier i framtiden.

Sammanfattningsvis var ambitionen med den här studien att ta fram normalvärden samt CV och CR som kan användas för att hjälpa differentiera mellan sjukliga förändringar och normalvariation och har lyft fram vikten av att mått på variation och repeterbarhet tas fram för kliniska undersökningsmetoder. Studien har visat att det finns det en hög variation för amplitud och en låg variation för implicit-tid. Det finns ett antal faktorer som kan förklara den observerade variationen och som särskilt visar vikten av noggrann preparation av patienten, samt träning och erfarenhet hos undersökaren. Studien är dock endast gjord på ett litet material. För mer generella siffror eller siffror för andra raser behövs mer omfattande studier inom området.

## **POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING**

Stavar och tappar kallas tillsammans synceller eller fotoreceptorer. De omvandlar ljus till elektriska potentialer som går genom näthinnan. De olika elektriska potentialerna går olika vägar genom näthinnan beroende på om de börjar hos stavarna eller tapparna.

Elektroretinografi (ERG) är en icke-invasiv metod för att mäta de elektriska strömmarna i näthinnan och därmed få ett mått på näthinnans funktion. För att kunna göra registreringarna måste elektroder sättas på hornhinnan samt på vardera tinningen och hjässan. Med hjälp av ERG får man fram kurvor som kan ge två typer av information. Dels höjden på topparna och dalarna på kurvorna kallad amplitud och dels tiden det tar för topparna och dalarna att nå sin maximala höjd kallad implicit-tid.

Många olika faktorer kan påverka resultatet vid en ERG-registrering. Vissa av faktorerna beror på hur man jobbar på kliniken och vissa beror på individen man undersöker. Det är därför viktigt att ta fram normalvärden för det sätt man arbetar på och för den population man har där man arbetar. För att kunna avgöra om en individ är friskt eller sjukt behövs normalvärden som referens. Det är också viktigt att ha kunskap om hur normalvärdena varierar mellan olika undersökningstillfällen för att bedöma om en förändring beror på förbättring/försämring eller om det beror på normala variationer mellan mätningar.

Syftet med arbetet var att ta fram normalvärden för ERG av beaglehundar och göra statistiska jämförelser mellan individer, mellan höger och vänster öga samt mellan undersökningstillfällen av samma individ.

De hundar som ingick i undersökningarna var sex tikar av rasen beagle. Undersökningarna utfördes på sövda hundar och innehöll en serie registreringar av näthinnans svar på ljusblixtar som grundar sig på European College of Veterinary Ophthalmologists standardprotokoll för ERG på hund. Det innebar att registreringar gjordes i mörker var fjärde minut med samma

ljusblixtstyrka under 20 minuter, för att utvärdera stavsvaret; var andra-fjärde minut med gradvis starkare ljusblixtar, för att gradvis gå från stavsvaret till ett blandat stav/tapp-svar; med stark ljusblixt efter 10 minuter i bakgrundsljus motsvarande dagsljusförhållanden, för att utvärdera tappsvaret och till sist flera blixtar i följd med en frekvens på 30 blixtar/sekund, vilket är ytterligare ett sätt att utvärdera tapparna.

En del av resultatet som togs fram i studien var beskrivande mått som medelvärde, standardavvikelse och percentiler för amplituder och implicit-tider. För att upptäcka om resultat från en patient är normalt eller onormalt tittar man ofta på om det faller mellan 2,5:e och 97,5:e percentilen för ett normalmaterial.

En annan del av resultatet var statistisk analys på utvalda delar av protokollet som visade variation mellan individer, mellan ögon på samma individ och mellan undersökningstillfällena. De utvalda delarna som dessa analyser gjordes på var stavsvaret efter 20 minuter mörkeradaptation, samt tappsvaren vid enstaka blixtar eller 30 Hz flicker (snabbt blinkande ljusblixtar) efter ljusadaptation.

Dessa analyser visade att det finns en stor variation för amplituderna från dessa ERG men en låg variation för implicit-tiden. Detta betyder att det intervall där friska djur kan befinna sig, normalvariationen, är mycket bredare för amplituderna än för implicit-tiden. Detta gör implicit-tiden till en mer användbar parameter för det här materialet för att skilja på förändringar i näthinnan på grund av sjukdom och förändringar som är normala individskillnader.

Det finns förmodligen flera orsaker till den stora variationen för amplituderna och den lägre variationen för implicit-tiderna. Dels finns flera yttre faktorer som kan ha stor påverkan på amplituderna. Mängden ljus som når näthinnan påverkas av pupillernas storlek vid undersökningen och huvudets position i ljusstimatoren. Det är också visat att placeringen av elektroderna på tinningarna kan ändra hur hög amplituden blir vid ett ERG, medan motsvarande skillnad för implicit-tiderna inte har rapporterats. Vi noterade också att återanvändning av elektroderna ökade motståndet under studiens gång, vilket kan påverka amplitudernas storlek. Betydligt högre stavsvaret uppmättes vid andra undersökningen av hundarna, vilket kan bero på en ökad erfarenhet hos undersökaren/författaren då ERG är en metod som kräver mycket träning. Andra faktorer som kan ha haft viss, men sannolikt mindre betydelse, var skillnader i luftfuktigheten i rummet och tid på dygnet som hundarna undersöktes.

Det skulle även kunna finnas fysiologiska orsaker som haft påverkan på variationen mellan individer då amplituderna beror på hur många celler av vissa sorter som finns då dessa celler står för den elektriska potential som ERG:t mäter. Implicit-tiderna däremot beror mer på processer i cellerna och hastigheten på som den elektriska potentialen har i cellen. Dessa faktorer borde vara lika mellan olika individer då cellerna i sig fungerar lika oavsett vilken individ de finns hos.

## REFERENSER

- Arshavsky, V.Y. & Burns, M.E. (2012). Photoreceptor signaling: Supporting vision across a wide range of light intensities. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287 (3), ss. 1620–1626
- Beltran, W.A., Cideciyan, A.V., Guziewicz, K.E., Iwabe, S., Swider, M., Scott, E.M., Savina, S.V., Ruthel, G., Stefano, F., Zhang, L., Zorger, R., Sumaroka, A., Jacobson, S.G. & Aguirre, G.D. (2014). Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations. *PLoS ONE*, vol. 9 (3). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090390>
- Bok, D. (1993). The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. *Journal of Cell Science*, vol. 1993 (Supplement 17), ss. 189–195
- Bordt, A.S., Perez, D., Tseng, L., Liu, W.S., Neitz, J., Patterson, S.S., Famiglietti, E.V. & Marshak, D.W. (2019). Synaptic inputs from identified bipolar and amacrine cells to a sparsely branched ganglion cell in rabbit retina. *Visual Neuroscience*, vol. 36. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0952523819000014>
- Brandstätter, J.H. & Hack, I. (2001). Localization of glutamate receptors at a complex synapse. *Cell and Tissue Research*, vol. 303 (1), ss. 1–14
- Bunt-Milam, A.H., Saari, J.C., Klock, I.B. & Garwin, G.G. (1985). Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 26 (10), ss. 1377–1380
- Coile, D.C., Pollitz, C.H. & Smith, J.C. (1989). Behavioral determination of critical flicker fusion in dogs. *Physiology & Behavior*, vol. 45 (6), ss. 1087–1092
- Dacheux, R.F., Chimento, M.F. & Amthor, F.R. (2003). Synaptic input to the on-off directionally selective ganglion cell in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 456 (3), ss. 267–278
- Daniele, L.L., Adams, R.H., Durante, D.E., Pugh, E.N. & Philp, N.J. (2007). Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 505 (2), ss. 166–176
- Dawson, W.W. & Kommonen, B. (1995). The late positive retinal potential in dogs. *Experimental Eye Research*, vol. 60 (2), ss. 173–179
- Ding, J.-D., Salinas, R.Y. & Arshavsky, V.Y. (2015). Discs of mammalian rod photoreceptors form through the membrane evagination mechanism. *Journal of Cell Biology*, vol. 211 (3), ss. 495–502 The Rockefeller University Press.
- Dumitrescu, O.N., Pucci, F.G., Wong, K.Y. & Berson, D.M. (2009). Ectopic retinal ON bipolar cell synapses in the OFF inner plexiform layer: Contacts with dopaminergic amacrine cells and melanopsin ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 517 (2), ss. 226–244
- Einthoven, W. & Jolly, W.A. (1908). The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, vol. 1 (4), ss. 373–416
- Ekesten, B. (2013). Ophthalmic examination and diagnostics part 4: Electrodiagnostic evaluation of vision. I: Gelatt, K.N., Gilger, B.C., & Kern, T.J. (red.) *Veterinary Ophthalmology*. Chichester: John Wiley & Sons, 5. uppl., ss. 684–702.
- Ekesten, B., Komáromy, A.M., Ofri, R., Petersen-Jones, S.M. & Narfström, K. (2013). Guidelines for clinical electroretinography in the dog: 2012 update. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 127 (2), ss. 79–87

- Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C. & Koutalos, Y. (2001). Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiological Reviews*, vol. 81 (1), ss. 117–151
- Frishman, L., Sustar, M., Kremers, J., McAnany, J.J., Sarossy, M., Tzekov, R. & Viswanathan, S. (2018). ISCEV extended protocol for the photopic negative response (PhNR) of the full-field electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 136 (3), ss. 207–211
- Gouras, P. (1970). Symposium on electrophysiology: Electroretinography: Some basic principles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 9 (8), ss. 557–569 The Association for Research in Vision and Ophthalmology.
- Hawlina, M., Jenkins, H.G. & Ikeda, H. (1992). Diurnal variations in the electroretinographic c-wave and retinal melatonin content in rats with inherited retinal dystrophy. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 79 (2), ss. 141–150
- Heegaard, S., Jensen, O.A. & Prause, J.U. (1986). Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 224 (4), ss. 355–360
- Hochstein, G.D., Molnar, F.E. & Marmor, M.F. (2007). Intrasession variability of the full-field ERG. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 115 (2), ss. 77–83
- Hohberger, B., Rössler, C.W., Jünemann, A.G.M., Horn, F.K. & Kremers, J. (2011). Frequency dependency of temporal contrast adaptation in normal subjects. *Vision Research*, vol. 51 (12), ss. 1312–1317
- Huh, Y.-J., Choi, J.-S. & Jeon, C.-J. (2015). Localization of rod bipolar cells in the mammalian retina using an antibody against the alpha(1)c L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Acta Histochemica Et Cytochemica*, vol. 48 (2), ss. 47–52
- Itoh, Y., Maehara, S., Itoh, N., Yamashita, K. & Izumisawa, Y. (2013). Electroretinography recordings using a light emitting diode active corneal electrode in healthy Beagle dogs. *Journal of Veterinary Science*, vol. 14 (1), ss. 77–84
- Jackman, S.L., Babai, N., Chambers, J.J., Thoreson, W.B. & Kramer, R.H. (2011). A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. *PLoS Biology*, vol. 9 (5), s. e1001057
- Kiser, P.D., Golczak, M., Maeda, A. & Palczewski, K. (2012). Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1821 (1), ss. 137–151 (Retinoid and Lipid Metabolism)
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A. & Newman, E.A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: Phenotypic impact in retina. *The Journal of Neuroscience*, vol. 20 (15), ss. 5733–5740
- Koike, C., Obara, T., Uriu, Y., Numata, T., Sanuki, R., Miyata, K., Koyasu, T., Ueno, S., Funabiki, K., Tani, A., Ueda, H., Kondo, M., Mori, Y., Tachibana, M. & Furukawa, T. (2010). TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107 (1), ss. 332–337
- Kolb, H. (2011a-10-08). *Outer plexiform layer by Helga Kolb. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/outer-plexiform/> [2019-10-27]
- Kolb, H. (2011b-10-08). *Simple anatomy of the retina by Helga Kolb. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina/> [2019-10-25]

- Kolb, H. (2012-03-25). *Inner plexiform layer by Helga Kolb. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/inner-plexiform-layer/> [2019-10-30]
- Kolb, H. (2013-07). *Photoreceptors by Helga Kolb. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/photoreceptors/> [2019-10-08]
- Kolb, H. (2015-10-15). *Roles of amacrine cells by Helga Kolb. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-iii-retinal-circuits/roles-of-amacrine-cells/> [2019-11-01]
- Kondo, M., Piao, C.-H., Tanikawa, A., Horiguchi, M., Terasaki, H. & Miyake, Y. (2000). Amplitude decrease of photopic ERG b-wave at higher stimulus intensities in humans. *Japanese Journal of Ophthalmology*, vol. 44 (1), ss. 20–28
- Lauritzen, J.S., Anderson, J.R., Jones, B.W., Watt, C.B., Mohammed, S., Hoang, J.V. & Marc, R.E. (2013). ON cone bipolar cell axonal synapses in the OFF inner plexiform layer of the rabbit retina. *The Journal of comparative neurology*, vol. 521 (5), ss. 977–1000
- Lee, J., Kim, K., Jang, H., Lee, B., Kim, J.Y. & Jeong, S. (2009). The normal electroretinogram in adult healthy Shih Tzu dogs using the HMsERG. *Journal of Veterinary Science*, vol. 10 (3), ss. 233–238
- Leibrock, C.S., Reuter, T. & Lamb, T.D. (1998). Molecular basis of dark adaptation in rod photoreceptors. *Eye*, vol. 12 (3), ss. 511–520
- Lisney, T.J., Rubene, D., Rózsa, J., Løvlie, H., Håstad, O. & Ödeen, A. (2011). Behavioural assessment of flicker fusion frequency in chicken *Gallus gallus domesticus*. *Vision Research*, vol. 51 (12), ss. 1324–1332
- MacNeil, M.A. & Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*, vol. 20 (5), ss. 971–982
- Marc, R.E., Murry, R.F., Fisher, S.K., Linberg, K.A., Lewis, G.P. & Kalloniatis, M. (1998). Amino acid signatures in the normal cat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 39 (9), ss. 1685–1693
- Mazzoni, F., Safa, H. & Finnemann, S.C. (2014). Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: Use and utility of RPE cells in culture. *Experimental Eye Research*, vol. 0, ss. 51–60
- McGreevy, P., Grassi, T.D. & Harman, A.M. (2004). A strong correlation exists between the distribution of retinal ganglion cells and nose length in the dog. *Brain, Behavior and Evolution*, vol. 63 (1), ss. 13–22
- Mentzer, A., Eifler, D., Montiani-Ferreira, F., Tuntivanich, N., Forcier, J. & Petersen-Jones, S. (2005). Influence of recording electrode type and reference electrode position on the canine electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 111, ss. 95–106
- Morgans, C.W., Zhang, J., Jeffrey, B.G., Nelson, S.M., Burke, N.S., Duvoisin, R.M. & Brown, R.L. (2009). TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106 (45), ss. 19174–19178
- Mowat, F.M., Petersen-Jones, S.M., Williamson, H., Williams, D.L., Luthert, P.J., Ali, R.R. & Bainbridge, J.W. (2008). Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. *Molecular Vision*, vol. 14, ss. 2518–2527
- Mustafi, D., Engel, A.H. & Palczewski, K. (2009). Structure of cone photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 28 (4), ss. 289–302
- Nedev, V. & Simeonova, G. (2017). The normal electroretinogram in adult healthy Bulgarian hound dogs. *Revue Méd. Vét.*, s. 6



- Nedev, V. & Simeonova, G. (2018). Normal clinical electroretinography parameters of healthy Pharaoh hound dogs. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, vol. 6
- Neitz, J., Geist, T. & Jacobs, G.H. (1989). Color vision in the dog. *Visual Neuroscience*, vol. 3 (2), ss. 119–125
- Nelson, R. & Connaughton, V. (2012-02-29). *Bipolar cell pathways in the vertebrate retina by Ralph Nelson and Victoria Connaughton. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-v-phototransduction-in-rods-and-cones/bipolar-cell-pathways-in-the-vertebrate-retina/> [2019-10-28]
- Niemeyer, G. (2005). ERG components of negative polarity from the inner retina and the optic nerve response. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 111 (3), ss. 179–189
- Ofri, R. (2013). Optics and physiology of vision. I: Gelatt, K.N., Gilger, B.C., & Kern, T.J. (red.) *Veterinary Ophthalmology*. Chichester: John Wiley & Sons, 5. uppl., ss. 208–270.
- Ofri, R. & Ekesten, B. (2020). Baseline retinal OCT measurements in normal female Beagles: The effects of eccentricity, meridian, and age on retinal layer thickness. *Veterinary Ophthalmology*, vol. 23 (1), ss. 52–60
- Omri, S., Omri, B., Savoldelli, M., Jonet, L., Thillaye-Goldenberg, B., Thuret, G., Gain, P., Jeanny, J.C., Crisanti, P. & Behar-Cohen, F. (2010). The outer limiting membrane (OLM) revisited: Clinical implications. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, vol. 4, ss. 183–195
- Pangeni, G., Horn, F.K. & Kremers, J. (2010). A new interpretation of components in the ERG signals to sine wave luminance stimuli at different temporal frequencies and contrasts. *Visual Neuroscience*, vol. 27 (3–4), ss. 79–90 Cambridge University Press.
- Park, H.W., Kim, H.-L., Park, Y.S. & Kim, I.-B. (2018). The transient intermediate plexiform layer, a plexiform layer-like structure temporarily existing in the inner nuclear layer in developing rat retina. *Experimental Neurobiology*, vol. 27 (1), ss. 28–33
- Parry, H.B. (1953). Degenerations of the dog retina. *The British Journal of Ophthalmology*, vol. 37 (7), ss. 385–404
- Peichl, L., Ott, H. & Boycott, B.B. (1987). Alpha ganglion cells in mammalian retinae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 231 (1263), ss. 169–197
- Perlman, I. (2007). *The electroretinogram: ERG by Ido Perlman. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/electrophysiology/the-electroretinogram-erg/> [2019-11-11]
- Perlman, I., Kolb, H. & Nelson, R. (2012-01). *S-potentials and horizontal cells by Ido Perlman, Helga Kolb and Ralph Nelson. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-v-phototransduction-in-rods-and-cones/horizontal-cells/> [2019-10-27]
- Reed, G.F., Lynn, F. & Meade, B.D. (2002). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 9 (6), ss. 1235–1239
- Rhodes, R.H. (1982). An ultrastructural study of the complex carbohydrates of the mouse posterior vitreoretinal juncture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 22 (4), ss. 460–477
- Ridge, K.D., Abdulaev, N.G., Sousa, M. & Palczewski, K. (2003). Phototransduction: crystal clear. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 28 (9), ss. 479–487
- Rizzolo, L.J. (1997). Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histology and Histopathology*, vol. 12 (4), ss. 1057–1067
- Robson, J.G. & Frishman, L.J. (1999). Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 95 (3–4), ss. 187–215
- Ropstad, E.O. & Narfström, K. (2007). The obvious and the more hidden components of the electroretinogram. *EJCAP*, vol. 17 (3), ss. 290–296

- Rosolen, S.G., Rigaudière, F., LeGargasson, J.-F., Chalier, C., Rufiange, M., Racine, J., Joly, S. & Lachapelle, P. (2004). Comparing the photopic ERG i-wave in different species. *Veterinary Ophthalmology*, vol. 7 (3), ss. 189–192
- Sahu, B. & Maeda, A. (2016). Retinol dehydrogenases regulate vitamin A metabolism for visual function. *Nutrients*, vol. 8 (11), s. 746
- Samuelsson, D.A. (2013). Ophthalmic anatomy. I: Gelatt, K.N., Kern, T.J., & Gilger, B.C. (red.) *Veterinary Ophthalmology*. Chichester: John Wiley & Sons, 5. uppl., ss. 39–170.
- Sieving, P.A., Frishman, L.J. & Steinberg, R.H. (1986). Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *Journal of Neurophysiology*, vol. 56 (4), ss. 1049–1061
- Siniscalchi, M., d’Ingeo, S., Fornelli, S. & Quaranta, A. (2017). Are dogs red-green colour blind? *Royal Society Open Science*, vol. 4 (11), s. 170869
- Steinberg, R.H. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*, vol. 60 (4), ss. 327–346
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K. & Anderson, D.H. (1980). Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 190 (3), ss. 501–518
- Stone, J. & Fukuda, Y. (1974). Properties of cat retinal ganglion cells: a comparison of W-cells with X- and Y-cells. *Journal of Neurophysiology*, vol. 37 (4), ss. 722–748
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, vol. 85 (3), ss. 845–881
- Strauss, O. (2011). *The retinal pigment epithelium by Olaf Strauss. Webvision*. Tillgänglig: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/the-retinal-pigment-epithelium/> [2019-10-23]
- Sussadee, M., Phavaphutanon, J., Kornkaewrat, K. & Thayanunphat, A. (2015). Normal clinical electroretinography parameters for poodle, Labrador retriever, Thai ridgeback, and Thai Bangkaew. *Journal of Veterinary Science*, vol. 16 (1), ss. 67–74
- Troy, J.B. & Shou, T. (2002). The receptive fields of cat retinal ganglion cells in physiological and pathological states: where we are after half a century of research. *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 21 (3), ss. 263–302
- Vaz, S., Falkmer, T., Passmore, A.E., Parsons, R. & Andreou, P. (2013). The case for using the repeatability coefficient when calculating test–retest reliability. *PLoS ONE*, vol. 8 (9), s. e73990
- Wakabayashi, K., Gieser, J. & Sieving, P.A. (1988). Aspartate separation of the scotopic threshold response (STR) from the photoreceptor a-wave of the cat and monkey ERG. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 29 (11), ss. 1615–1622 The Association for Research in Vision and Ophthalmology.
- Yau, K.-W. & Hardie, R.C. (2009). Phototransduction motifs and variations. *Cell*, vol. 139 (2), ss. 246–264