

3-dimensionale penetrierende Multielektrodenarrays zur Stimulation und Ableitung in der Retina

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Janis Sebastian Brusius
aus Marburg a. d. Lahn

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. A. Offenhäusser
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Januar 2015

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	6
2.1 Anatomie des menschlichen Auges	6
2.2 Die anatomische Feinstruktur der Retina	7
2.3 Die Photorezeptorzellen	9
2.4 Die Sehkaskade	9
2.5 Physiologie der Retina	11
2.5.1 Bipolarzellen und Horizontalzellen.....	11
2.5.2 Besonderheiten im Signalweg der Stäbchen.....	12
2.5.3 Ganglienzellen und amakrine Zellen	13
2.6 Degenerationskrankheiten der Retina	15
2.6.1 Retinitis Pigmentosa (RP)	16
2.6.2 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD).....	16
2.7 Sehprothesen.....	17
2.7.1 Nicht-retinale Implantate	17
2.7.2 Retinale Implantate	18
2.7.2.1 Subretinale Implantate	19
2.7.2.2 Suprachoroidale Implantate.....	20
2.7.2.3 Epiretinale Implantate:	20
2.8 Ableitungen elektrischer Aktivität in neuronalem Gewebe	21
2.9 Elektrostimulation in neuronalem Gewebe.....	23
2.10 Physikalische Eigenschaften von Mess- und Stimulationselektroden	25
2.10.1 Reaktionen an Phasengrenzschichten.....	26
2.10.2 Spezifische Materialeigenschaften von Stimulationselektroden	27
2.11 Nagetiere als Versuchstiere für die Grundlagenforschung.....	29
2.11.1 Die Wistar-Ratte als Versuchstier.....	29
2.11.2 Tiermodelle retinaler Degenerationen (rd-Mäuse).....	29

3	Methoden und Entwicklung des Versuchsaufbaus	31
3.1	Versuchstiere und Medium	31
3.2	Präparation der Retina.....	32
3.3	Versuchsaufbau	33
3.3.1	Zentraler Messaufbau	33
3.3.2	Badkammer	34
3.3.3	Perfusionssystem.....	36
3.4	Pharmakologie	37
3.4.1	Hochkaliumhaltiges Ames-Medium	37
3.4.2	Synaptische Blockade durch 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)	38
3.5	Extrazelluläre Ableitungen mit Glaselektroden.....	38
3.5.1	Herstellung von Glaselektroden	38
3.5.2	Datenerfassung der Einzelelektrodenableitungen.....	39
3.6	Extrazelluläre Ableitungen mit penetrierenden Multielektrodenarrays.....	39
3.7	Optische Stimulation.....	42
3.8	Elektrische Stimulation	43
3.8.1	Tucker-Davis Technologies MS 16 Stimulus Isolator	43
3.8.2	Eigenentwickelter strombasierter Neurostimulator	44
3.8.3	Funktionsgenerator Keithley 3390	46
3.8.4	Stimulationsparameter.....	46
3.9	Datenanalyse	46
3.9.1	Auswertung auftretender Aktionspotentiale	47
3.9.2	Mittlere Frequenz der Aktionspotentiale.....	47
3.9.3	Interevent-Intervall-Histogramm	48
3.9.4	Die empirische kumulative Verteilungsfunktion	49
3.9.5	Der Kolmogorov-Smirnov-Test als Signifikanztest	49
4	Penetrierende MEAs zur Stimulation und Ableitung in der Retina.....	51
4.1	Penetrationsversuche mit MEAs.....	54
4.2	Charakterisierung der Mess- und Stimulationselektroden	56
4.2.1	Impedanzspektroskopie	56
4.2.2	Nicht-aktivierte Iridiumelektroden.....	57
4.2.3	Elektrochemische Aktivierung von Iridiumelektroden.....	58
4.2.4	Kommerzielle PEDOT-beschichtete Messelektroden.....	59

4.2.5	Elektrodeposition von Poly-3,4-ethylendioxythiophen	61
4.2.6	Zusammenfassung der Elektrodenimpedanzen	63
4.2.7	Abnutzungserscheinungen der Elektrodenoberflächen	64
5	Elektrophysiologische Messungen in der Retina	67
5.1	Extrazelluläre Ableitungen von Ganglienzellen mit Glaselektroden	67
5.2	Perfusion mit hochkaliumhaltigem Ames-Medium	67
5.3	Positionierung der MEAs im Gewebe	69
5.4	Extrazelluläre Ableitungen von Ganglienzellen mit penetrierenden MEAs	71
5.5	Optische Stimulation	71
5.5.1	Phasisch-tonische ON-Antwort	72
5.5.2	Hemmung der elektrischen Aktivität durch Lichtstimulation	73
5.6	Elektrische Stimulation	75
5.6.1	Amplitudenvergrößerung nach elektrischer Stimulation	75
5.6.2	Stimulation mit Rechteckpulsen ansteigender Amplitude	77
5.6.3	Sinusförmige Stimulationspulsfolgen mit ansteigender Amplitude	79
5.6.4	Frequenzabhängigkeit sinusförmiger Stimulation	82
5.6.5	Sinusförmige und rechteckige Stimulationspulsfolgen gleicher Frequenz	84
5.6.6	Stimulation durch akkumulierte Stimulationspulse	85
5.6.7	Summierungseffekt durch schnelle Pulsfolgen	87
5.6.8	Variation der Länge einzelner Stimulationspulse	89
5.6.9	Variation der Gesamtdauer einer sinusförmigen Stimulationsfolge	91
5.6.10	Zusammenfassung der Stimulationsergebnisse	93
5.7	Nachweis der indirekten elektrischen Stimulation durch CNQX-Blockade	95
5.8	Einsatz der MEAs in der degenerierten Retina der rd10 Maus	97
5.9	Grenzen der elektrischen Stimulation	99
6	Diskussion	101
6.1	Entwicklung der Messmethode für extrazelluläre Ableitungen	101
6.2	Architektur und Penetrationseigenschaften penetrierender MEAs	103
6.2.1	Positionierung und Lage der MEAs im Gewebe	105
6.2.2	Architektur der penetrierenden MEAs	106
6.3	Elektrodeneigenschaften	107
6.3.1	Oberflächenbeschichtungen der Elektroden	107
6.3.2	Abnutzungserscheinungen der Elektroden	109

6.4	Ableitungen und Stimulationen im retinalen Netzwerk.....	111
6.4.1	Extrazelluläre Ableitungen mit penetrierenden MEAs in der Retina.....	111
6.4.2	Optische Stimulation	111
6.4.3	Stimulationsparameter.....	112
6.4.3.1	Vergrößerung der Amplitude von Aktionspotentialen	112
6.4.3.2	Erhöhung der Stimulationsamplitude	113
6.4.3.3	Sinusförmige Stimulationspulse unterschiedlicher Frequenz und Länge ..	114
6.4.3.4	Akkumulation der Stimulationsladung.....	115
6.4.3.5	Länge von rechteckigen Einzelpulsen	116
6.4.4	Nachweis der indirekten elektrischen Stimulation durch CNQX.....	117
6.4.5	Einsatz der MEAs in der degenerierten Retina	117
6.5	Technische und physiologische Grenzen der elektrischen Stimulation	118
6.6	Ausblick	119
	Zusammenfassung.....	121
	Summary.....	122
	Anhang A: Prüfgrößen Kolmogorov-Smirnov-Test	123
	Anhang B: Ames-Medium Zusammensetzung	124
	Anhang C: MATLAB-Skripte.....	125
	Literaturverzeichnis.....	131
	Bildnachweis	145
	Danksagung.....	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Querschnitt durch das Wirbeltierauge	7
Abbildung 2	Neuronales Verschaltungsschema der Retina	8
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Sehkaskade	10
Abbildung 4	Lichtreaktion von retinalen Ganglienzellen (schematisch)	14
Abbildung 5	Stern-Doppelschicht	26
Abbildung 6	Nylonschlinge zur Ablösung der Retina	32
Abbildung 7	Zentraler Messaufbau	34
Abbildung 8	Anpassung der Haltegitter	35
Abbildung 9	Badkammer im Versuchsaufbau während eines Versuches	36
Abbildung 10	Badkammer mit Aufsatz auf der Hauptkammer	36
Abbildung 11	Perfusionsheizung	37
Abbildung 12	Gebogene Glaselektrode zur extrazellulären Ableitung	39
Abbildung 13	Datenerfassungssystem Tucker Davis Technologies	40
Abbildung 14	Blockdiagramm der Verschaltungen des Versuchsaufbaus	41
Abbildung 15	Grafische Benutzeroberfläche der Ableitsoftware	42
Abbildung 16	Warmweiße LED zur optischen Stimulation	43
Abbildung 17	Grafische Benutzeroberfläche der Stimationssoftware	44
Abbildung 18	Prototyp des 2-Kanal Neurostimulators	45
Abbildung 19	Schematischer Schaltplan des Neurostimulators	45
Abbildung 20	Berechnung eines Interevent-Intervall-Histogramms (IEIH)	48
Abbildung 21	Vergleich der kumulativen Verteilungsfunktionen	50
Abbildung 22	Schematische Darstellung der Ableitung mit penetrierenden MEAs	52
Abbildung 23	Abmessungen der entwickelten MEAs	53
Abbildung 24	Standard-MEAs penetrieren die Retina nicht	55
Abbildung 25	Impedanzen von Iridiumelektroden mit 15 μm und 20 μm Durchmesser	58
Abbildung 26	Aktivierung von Iridiumelektroden	59
Abbildung 27	Impedanzspektren von Iridium- und PEDOT-Elektroden	60
Abbildung 28	Einfluss der Durchmesser auf die Impedanz von PEDOT-Elektroden	61
Abbildung 29	Elektrode nach übermäßiger PEDOT-Deposition	62
Abbildung 30	Oberflächen- und Impedanzveränderung durch PEDOT-Deposition	63
Abbildung 31	PEDOT-Elektroden vor und nach dem Einsatz im Gewebe	65
Abbildung 32	PEDOT-Elektrode nach Stimulation im Gewebe	66
Abbildung 33	PEDOT-beschichtete Elektrode nach Messeinsatz im Gewebe	66
Abbildung 34	Extrazelluläre Ableitung einer retinalen Ganglienzelle mit Glaselektrode	67
Abbildung 35	Perfusion mit Ames-Medium erhöhter Kaliumkonzentration (80mmol/l)	68
Abbildung 36	Positionierung der MEAs anhand neuronaler Aktivität	70
Abbildung 37	Extrazelluläre Ableitung mit penetrierendem MEA	71
Abbildung 38	Phasisch-tonische Lichtantwort einer retinalen Ganglienzelle	72
Abbildung 39	Ableitung einer Ganglienzelle mit tonischer OFF-Komponente	74
Abbildung 40	Reduzierung der Aktionspotentialfrequenz im Licht	75

Abbildung 41	Amplitudenvergrößerung nach stromgesteuerter Stimulation	77
Abbildung 42	Erhöhung der Stimulationsspannung einzelner Pulse	79
Abbildung 43	Erfolgreiche Stimulation durch Erhöhung der Stromstärke	81
Abbildung 44	Frequenzabhängigkeit sinusförmiger Stromstimulation	83
Abbildung 45	Rechteckpulse und sinusförmige Stimulationspulse gleicher Frequenz	85
Abbildung 46	Steigerung der Feuerfrequenz durch aufeinanderfolgende Einzelpulse	86
Abbildung 47	Erfolgreiche Stimulation durch schnelle Pulsfolgen	88
Abbildung 48	Erhöhung der Pulsdauer einzelner Stimulationspulse	90
Abbildung 49	Effekt durch längere sinusförmige Stimulationsfolgen	92
Abbildung 50	Blockierung der synaptischen Übertragung durch CNQX	96
Abbildung 51	CNQX blockiert niederfrequente Oszillationen (rd10 Maus)	98
Abbildung 52	Gasbildung an den Elektroden nach elektrischer Stimulation	99
Abbildung 53	Geweberückstände an den Stimulationselektroden	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einfluss der Dimensionen der MEAs auf das Penetrationsverhalten.....	55
Tabelle 2	Elektrodenimpedanz von Iridium bei 1 kHz vor und nach der Aktivierung	59
Tabelle 3	Vergleich der mittleren Impedanz für 15 µm Elektroden (für 1 kHz)	63
Tabelle 4	Reaktionszeiten einer phasisch-tonischen Ganglienzelle	73
Tabelle 5	Reaktionszeiten einer OFF-Ganglienzelle auf Belichtung.....	74
Tabelle 6	Getestete minimale und maximale Stimulationsparameter	94
Tabelle 7	Gasbildung an der Stimulationselektrode	100

1 Einleitung

Der Mensch und die meisten anderen Säugetiere sind primär visuelle Lebewesen. Aus den reflektierten elektromagnetischen Wellen, die vom Auge detektiert werden, konstruiert unser Gehirn einen Großteil unserer Wirklichkeit. Die Netzhaut, das neuronale Netzwerk im Inneren des Auges, leistet die entsprechende Vorarbeit, analysiert die komplexen visuellen Parameter und leitet die Information in parallelen Kanälen ins Gehirn weiter. Von der Detektion eines Photons durch die Photorezeptorzellen bis zur bewussten Wahrnehmung eines Seheindrucks durchläuft die Information eine Vielzahl von Verrechnungsstationen und wird in vielfältiger Weise aufbereitet. In vertikaler Richtung wird die Information durch die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet, die als Ausgangsregion der Retina die Verbindung zum Gehirn herstellen.

Eine Reihe von Erkrankungen der Netzhaut, zum Beispiel die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) oder die Retinitis pigmentosa (RP), führen zum Absterben der Photorezeptoren und zur allmählichen Erblindung der Patienten. In der Folge kommt es zu einer neuronalen Reorganisation des retinalen Netzwerkes und einem Verlust der Sehfähigkeit.

Medikamentöse Therapien können das Fortschreiten der Erblindung zwar verlangsamen, ein bereits erfolgter Verlust der Photorezeptorzellen kann allerdings nicht kompensiert werden. Mit dem Verlust der Photorezeptorzellen, der Eingangsregion des visuellen Systems, verliert die Retina ihre Fähigkeit, auf optische Reize zu reagieren.

Ziel der Neuroprothetik ist es, Implantate zu entwickeln, die in der Lage sind durch elektrische Stimulation mit dem Nervensystem zu kommunizieren und verlorene Nervenfunktionen zu ersetzen. Grundlegendes Prinzip hierbei ist die elektrische Stimulation von Neuronen durch Spannungs- oder Strompulse, die über geeignete Stimulationselektroden in das Gewebe appliziert werden. Diese Mikroelektroden sind meist zu sogenannten Multielektrodenarrays (MEAs) auf Trägern aus Silizium zusammengefasst.

Die Neuroprothetik hat in den letzten Jahren deutlichen Auftrieb bekommen, nicht zuletzt durch erfolgreiche Implantationen von Cochlear- oder Tiefenhirnstimulatoren. Seit mehreren Jahrzehnten wird ebenfalls versucht, die Funktion der Netzhaut durch geeignete Implantate wiederherzustellen. Es gab wiederholt vielversprechende experimentelle Versuche mit retinalen Implantaten. Einige von diesen einstmaligen Prototypen befinden sich mittlerweile in der klinischen Erprobungsphase. Heutige retinale Implantate ermöglichen es den Patienten bereits, Buchstaben und einfache Gegenstände zu identifizieren. Die Gesichtserkennung zu ermöglichen gilt als das übergeordnete Ziel bei der Entwicklung retinaler Prothesen. Bisher ist allerdings kein Implantat leistungsfähig genug, diese Fähigkeit bei erblindeten Patienten wiederherzustellen.

Retinale Prothesen versuchen die komplexe Eingangsinformation der Photorezeptorzellen durch geeignete Stimulationsmuster zu imitieren. Meist bestehen diese Systeme aus

mehreren funktionellen Einheiten. Eine, meist extern angebrachte, Kamera nimmt ein Bild der Umwelt auf, aus dem ein Mikroprozessor ein vereinfachtes Stimulationsmuster berechnet, welches auf die Elektroden des implantierten MEAs übertragen wird. Die maximal erreichbare Qualität des Seheindrucks wird hauptsächlich durch die Anzahl der verwendeten Stimulationspunkte pro Flächeneinheit limitiert.

Bestehende retinale Prothesen nutzen planare MEAs, die als epiretinale Implantate der Ganglienzellschicht aufliegen, oder subretinal in der Nähe der Bipolarzellen implantiert werden. Hierbei entstehen, je nach Lage der Implantate, unterschiedliche Voraussetzungen bei der Stimulation im Nervengewebe.

Während sich epiretinale Implantate näher an den Ausgangsneuronen der Retina befinden, werden durch subretinale Implantate tieferliegende Schichten des neuronalen Netzwerkes stimuliert und auf einer niedrigen Abstraktionsstufe in der neuronalen Verrechnung angesetzt. Epiretinale Implantate befinden sich näher an den Zielzellen, wodurch niedrigere Stimulationsschwellen erwartet werden.

Generell ist es wünschenswert möglichst viele der verbleibenden Strukturen der degenerierten Retina durch eine gezielte Stimulation anzusprechen. Penetrierende MEAs können in vertikaler Richtung in tiefere Schichten gelangen und in unmittelbarer Nähe zu den Bipolarzellen positioniert werden. Da sie, ähnlich wie epiretinale Implantate, aus Richtung der Ganglienzellschicht ins Auge eingebracht werden, vereinfacht sich der chirurgische Eingriff. Bisherige retinale Implantate ermöglichen keine simultane Verwendung als Stimulations- und Messsystem. Das bedeutet, dass nach einer erfolgten Stimulation die neuronale Antwort nicht über dasselbe MEA gemessen werden kann. Über ein penetrierendes MEA können durch die übereinander angeordneten Elektroden mehrere Zellschichten der Retina gleichzeitig erreicht werden.

Das Ziel des DFG-Projekts BiMEA ist die Erforschung der Grundlagen, die für ein bidirektionales retinales Implantat von Bedeutung sind. Bidirektional meint, dass sowohl Stimulationen als auch elektrische Ableitungen mit dem Implantat durchgeführt werden und Stimulationsparameter durch konstante Rückkopplung kontinuierlich verbessert werden können. Das Kernstück eines solchen Implantates ist ein penetrierendes Multielektrodenarray, welches in vertikaler Richtung in tiefere Bereiche der Retina vordringt und mehrere Zellschichten gleichzeitig erreicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein solches penetrierendes Multielektrodenarray mit 16 Elektroden geplant und entwickelt. Grundlage dieses penetrierenden MEAs ist ein Siliziumträger mit vier schwertähnlichen Strukturen, auf deren Oberseite je vier Iridiumelektroden linear angeordnet sind. An der Spitze jedes Schwertes befinden sich Stimulationselektroden, mit denen in der Nähe der Bipolarzellen elektrisch stimuliert wurde, während die Reaktion der Ganglienzellen mit kleineren Messelektroden aufgezeichnet wurde.

Da penetrierende Elektroden dieses Typs bisher noch nicht für elektrophysiologische Messungen und Stimulationen in der Retina eingesetzt wurden, war die Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaus für die Fixierung und Ernährung der extrahierten Retina

erforderlich. Die speziellen Eigenschaften der entwickelten MEAs erforderten darüber hinaus die Entwicklung eines einfachen stromgesteuerten Neurostimulators. Dieser wird detailliert in Kapitel 3.8.2 beschrieben.

Nach Entwicklung und Aufbau der Messapparatur wurden die Ganglienzellen der isolierten Rattenretina elektrophysiologisch untersucht. In Vorversuchen wurde die elektrische Aktivität der Ganglienzellen mit Glaselektroden extrazellulär abgeleitet. In weiteren Experimenten wurde erstmalig die neuronale Aktivität von Ganglienzellen mit penetrierenden Multielektrodenarrays in der isolierten Retina gemessen. Einfache optische Reize wurden präsentiert, um die Funktionsfähigkeit der entwickelten Ableitmethode durch physiologische Reaktionen der retinalen Ganglienzellen zu verifizieren.

In den Stimulationsversuchen wurde über Stimulationselektroden in Höhe der Bipolarzellen stimuliert und simultan die Aktivität der Ganglienzellen mit kleineren Messelektroden aufgezeichnet. Durch die Variation von Amplitude, Dauer, Frequenz und Form der Stimulationspulse wurde der Einfluss dieser Stimulationsparameter auf die Erregbarkeit der retinalen Neurone untersucht. Es kann gezeigt werden, dass die elektrische Stimulation mit penetrierenden MEAs zu signifikanten Änderungen der Aktivitätsrate der abgeleiteten Ganglienzellen führt.

Um zu überprüfen, welche retinalen Zellen durch die elektrische Stimulation erregt werden, wurde die synaptische Übertragung zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen mit dem ionotropen AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonisten 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) blockiert. Es zeigte sich, dass neuronale Antworten während der synaptischen Blockade ausbleiben. Die Stimulation wirkte folglich auf tiefere Schichten der Retina, möglicherweise auf die Bipolarzellen.

Neben elektrophysiologischen Untersuchungen an gesunden Retinae der Ratte wurden Experimente an degenerierten Retinae von Mäusen (rd10) durchgeführt. Diese sollten klären, ob sich die entwickelten MEAs auch für den Einsatz in diesem Modellorganismus eignen und Hinweise für einen zukünftigen Einsatz bei Degenerationskrankheiten der menschlichen Retina liefern. Es gelang die Ableitung niederfrequenter Schwingungen des Membranpotentials, über die schon in früheren Untersuchungen berichtet wurden.

Der Elektrodenoberfläche als Schnittstelle zwischen dem Implantat und dem neuronalen Gewebe galt ein besonderes Augenmerk, da über sie die Ladung übertragen wird, die Reaktionen an den Zielzellen bewirkt. Die elektrochemischen Grundlagen, die zum Verständnis notwendig sind, werden in Kapitel 2.10. beschrieben. Die Oberflächeneigenschaften der verwendeten Mess- bzw. Stimulationselektroden wurden mittels Impedanzspektroskopie und Elektronenmikroskopie laufend dokumentiert. Diese Messungen zeigen auf, wie es durch den Einsatz im Gewebe und hohe Ladungen zu Abnutzungserscheinungen kommt.

Zu Beginn von Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit werden die anatomischen und physiologischen Grundlagen des Auges und der Retina im Speziellen erläutert. Danach werden die physiologischen Veränderungen, die bei retinalen Degenerationskrankheiten auftreten, beschrieben. Die Funktionsprinzipien unterschiedlicher retinaler Prothesen und

der aktuelle Stand bisheriger Forschung werden erläutert. Die technischen Details und die physikalischen Eigenschaften von Mess- und Stimulationselektroden werden im Kontext retinaler Implantate hervorgehoben. Zum Ende des Kapitels wird auf die verwendeten Versuchstiere eingegangen.

Kapitel 3 beginnt mit der Beschreibung der verwendeten Standardmethoden, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind. Im zweiten Abschnitt werden die speziellen Entwicklungsschritte der Methode und der entwickelte Versuchsaufbau beschrieben. Hierbei wird auch auf die Entwicklung des Neurostimulators eingegangen. Die Entwicklung des Versuchsaufbaus stellt ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit dar. Zum Abschluss von Kapitel 3 werden die Prinzipien der verwendeten Datenanalyse und die statistischen Verfahren erläutert.

Zu Beginn von Kapitel 4 wird beschrieben, welche Überlegungen zu Anatomie und technischen Details, zur Entwicklung des penetrierenden MEAs und dem letztendlichen Design geführt haben. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse, die durch Impedanzspektroskopie und elektronenmikroskopische Aufnahmen die Charakterisierung der Mess- und Stimulationselektroden ermöglichte. Hierbei werden auch die verwendeten Oberflächenbeschichtungen beschrieben und deren unterschiedliche elektrische Eigenschaften durch die Impedanzmessungen aufgezeigt. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ebenfalls dokumentieren, welchen Abnutzungserscheinungen die Elektrodenoberflächen während der Einsätze im Gewebe unterliegen.

Kapitel 5 enthält alle physiologischen Ergebnisse, die bei der Ableitung und der Stimulation der extrahierten Retinae beobachtet werden konnten. Nach den klassischen, extrazellulären Ableitungen mit Glaselektroden und der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus wurde damit begonnen, die entwickelten MEAs im Experiment einzusetzen. Einen zentralen Punkt der entwickelten Methodik stellte die Positionierung der MEAs im extrahierten Gewebe dar. Diese wurde durch parallele extrazelluläre Ableitungen während des Einstechens in Echtzeit kontrolliert.

Erstmalig wurden penetrierende MEAs in der Retina eingesetzt und die Aktivität von Ganglienzellen extrazellulär mit dieser Technik abgeleitet. Die anschließenden Stimulationsversuche zeigen die physiologischen Reaktionen, die durch Stimulationspulse mit unterschiedlichen Parametern erzielt werden konnten. Die letzten beiden Abschnitte dieses Kapitels beschreiben die Stimulationsversuche während der Applikation von CNQX und den Einsatz der MEAs an extrahierten Retinae von rd10 Mäusen.

In Kapitel 6 werden die Ergebnisse aus den vorangegangenen Kapiteln miteinander verglichen, diskutiert und mit dem aktuellen Stand wissenschaftlicher Literatur über retinale Implantate in Verbindung gebracht. Im ersten Abschnitt werden der Versuchsaufbau und die verwendete Methode bewertet; dabei wird ebenfalls auf die entwickelten MEAs eingegangen. Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse werden Vorschläge zur weiteren Verbesserung der MEAs und der Ableittechnik gegeben.

Im Anschluss werden die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen miteinander verglichen und in Verbindung mit den Impedanzspektren der Stimulationselektroden gebracht.

Der Einsatz der MEAs in der degenerierten Retina von rd10 Mäusen lässt erste Schlüsse über einen zukünftigen Einsatz der entwickelten MEAs in einem retinalen Implantat zu. Zuletzt werden die physiologischen und technischen Grenzen der elektrischen Stimulation von retinalen Zellen mit dem hier vorgestellten MEA aufgezeigt und im Ausblick Anregungen zur Planung zukünftiger Experimente gegeben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Anatomie des menschlichen Auges

Das menschliche Auge hat die Form einer leicht abgeplatteten Kugel mit einem Durchmesser von ca. 25 mm (Kolb, 1995b). Die äußere Hülle des Auges wird von der Lederhaut (*Sklera*) und der Hornhaut (*Cornea*) gebildet, die ineinander übergehen (Abbildung 1). Die Sklera besteht aus einem derben kollagenen Bindegewebe und bildet die Rückseite und die Seitenwände des Augapfels. Die Cornea bildet den vorderen Teil der äußeren Augenhaut, durch die das Licht ins Augeninnere gelangt. Sie besteht ebenfalls aus Kollagen, welches durch die parallele Anordnung seiner Fasern lichtdurchlässig ist (Weiland *et al.*, 2005). Im Inneren des Augapfels befindet sich der Glaskörper (*Corpus vitreum*). Dieser besteht zu 99% aus Wasser, zu 1% aus Hyaluronsäure, die dem Glaskörper zu seiner gallertartigen Konsistenz verhilft, sowie einem weitmaschigen Netz aus Kollagenfasern (Weiland *et al.*, 2005). Der Glaskörper füllt das Augeninnere bis zur hinteren Augenkammer aus und erzeugt einen Druck, der dem Augapfel die Form verleiht. Fällt Licht durch die Cornea und die Linse wird dieses gebrochen. Durch den ringförmigen Ziliarmuskel, an dem die Linse aufgehängt ist, kann diese in ihrer Form verändert und einfallendes Licht fokussiert werden. Die pigmentierte Regenbogenhaut (*Iris*) liegt zwischen Linse und Cornea. Ihr Öffnen und Schließen durch das Wechselspiel zweier unwillkürlich gesteuerter Muskeln (*Musculus sphincter pupillae* und *Musculus dilatator pupillae*) reguliert den Lichteinfall ins Auge (Heldmaier & Neuweiler, 2003).

Die Netzhaut (*Retina*) kleidet das Innere des Augapfels an den Seiten und der Rückseite aus und reicht im apikalen Bereich bis zur Iris heran. Sie wird durch die innere Grenzmembran (englisch: *inner limiting membrane* = ILM) vom Glaskörper abgegrenzt. Die ILM wird gebildet aus einer Reihe von Gliazellen innerhalb der Retina. Die Versorgung der Retina mit Nährstoffen und Sauerstoff wird über ein dichtes Gefäßnetz, die Aderhaut (*Choroidea*), gewährleistet (Weiland *et al.*, 2005).

Die Retina ist ein mehrschichtiges Gewebe, welches neben den lichtempfindlichen Photorezeptorzellen, ein dichtes Netzwerk aus unterschiedlichen Neuronen enthält. Dieses Netzwerk ist die erste Instanz des visuellen Nervensystems, welche visuelle Informationen perzipiert und vorverarbeitet, bevor diese ins Gehirn weitergeleitet werden. Die Feinstruktur und die Funktionsweise der Retina werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

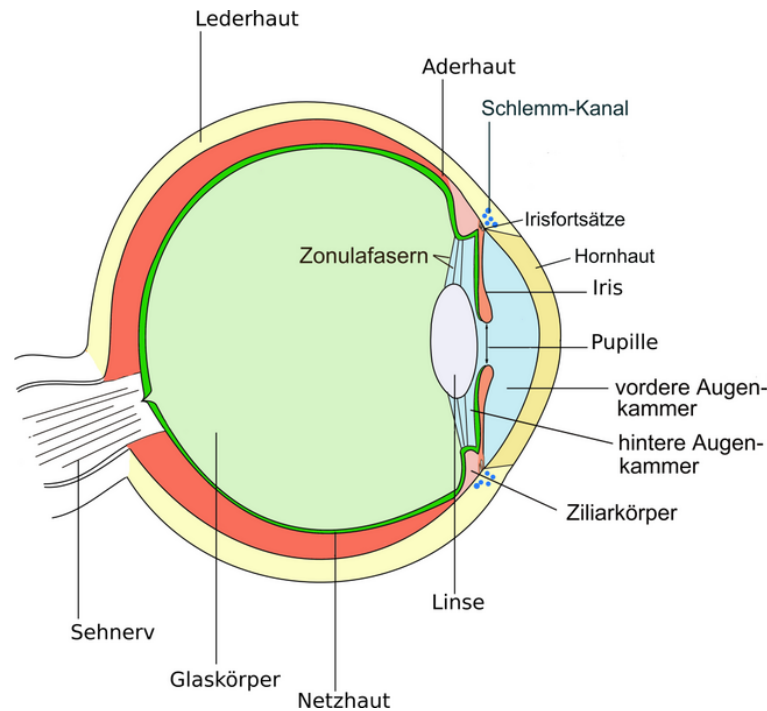


Abbildung 1 Querschnitt durch das Wirbeltierauge

Die Lederhaut bildet die Außenhülle des Auges. Die Aderhaut versorgt die Netzhaut mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Axone der Ganglienzellen verlassen durch den Sehnerv das Auge. Im Inneren des Auges befindet sich der durchsichtige Glaskörper. Durch den Schlemm-Kanal kann Kammerwasser abfließen und der Augeninnendruck reguliert werden. Das Licht fällt durch die Hornhaut und die vordere Augenkammer und wird erstmals gebrochen. Die Iris reguliert die Menge des einfallenden Lichts durch die Öffnung der Pupille. An der hinteren Augenkammer ist die Linse über die Zonulafasern am Ziliarkörper aufgehängt. Über dessen Kontraktion wird die Linse verformt und das einfallende Licht auf die Netzhaut fokussiert.

(Talos, 2008)

2.2 Die anatomische Feinstruktur der Retina

Das dichte neuronale Netzwerk der Retina ist in mehreren Schichten organisiert (Abbildung 2). Das retinale Pigmentepithel (RPE) bildet die unterste Schicht der Retina und ist zugleich Grenzschicht zur Choroidea (nach: Bear, 2006). In die Zellen des RPEs ist der Farbstoff Melanin eingelagert. Melanin verhindert die Reflektion von Photonen, die nicht von einer Photorezeptorzelle absorbiert wurden und verstärkt die Fähigkeit zum Sehen bei schwachem Licht. Die Epithelzellen bilden apikal mikrovilläre Fortsätze, die die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen umschließen und für deren Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie für den Abtransport von Stoffwechselprodukten sorgen. Der basale Teil der Membran der RPE-Zellen ist tief gefurcht und über die Bruch'sche Membran mit der Choroidea verbunden, über die der Stoffaustausch gewährleistet wird (Guymer *et al.*, 1999).

Die Zellkörper der Photorezeptorzellen bilden die sogenannte äußere nukleäre Schicht (englisch: *outer nuclear layer* = ONL). In der äußeren plexiformen Schicht (englisch: *outer*

plexiform layer = OPL) verbinden sich die synaptischen Fortsätze der Photorezeptoren mit denen der Horizontal- und Bipolarzellen. Die Horizontalzellen verbinden über horizontale Fortsätze die synaptischen Endigungen mehrerer Photorezeptorzellen miteinander. Die Bipolarzellen vermitteln den vertikalen Informationsfluss hin zu den Ganglienzellen. Die Zellkörper der Bipolar- und Horizontalzellen bilden zusammen mit den Zellkörpern der amakrinen Zellen die innere nukleäre Schicht (englisch: *inner nuclear layer* = INL). In der inneren plexiformen Schicht (englisch: *inner plexiform layer* = IPL) treten die Afferenzen der amakrinen und Bipolarzellen mit den dendritischen Endigungen der Ganglienzellen in Kontakt. Ebenso wie die Horizontalzellen verfügen die amakrinen Zellen über Fortsätze in vertikaler Richtung. Sie integrieren und modulieren die Informationen von mehreren Ganglien- und Bipolarzellen. Die Ganglienzellen bilden die innerste Schicht der Retina. Ihre Axone verlassen das Auge gebündelt durch den Sehnerv und ziehen weiter in die höheren Verrechnungszentren im Thalamus und im Cortex. Parallel zu den fünf Neuronentypen innerhalb der Retina wachsen Gliazellen. Ein für die Retina spezifischer Typ von Gliazellen sind die sogenannten Müllerzellen. Sie geben dem Netzwerk mechanische Stabilität, regulieren den Stoffaustausch innerhalb der Retina und sind teilweise an der Lichtweiterleitung beteiligt (Franze *et al.*, 2007). Ein weiterer Zelltyp innerhalb der Retina ist die Mikrogliazelle, die die Immunantwort in der Netzhaut initiiert, sowie phagozytotische Funktionen übernimmt (Langmann, 2007).

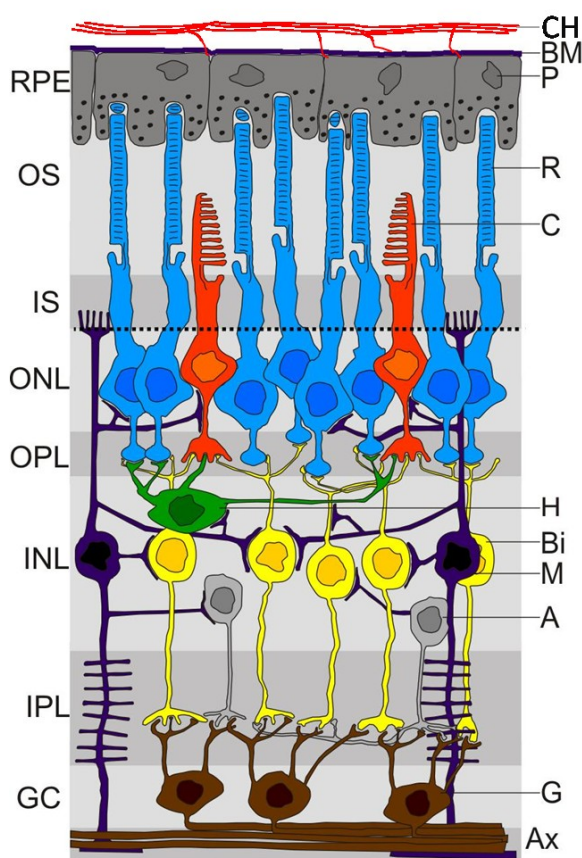


Abbildung 2 Neuronales Verschaltungsschema der Retina

RPE: retinales Pigmentepithel
 OS: Außensegmente der Photorezeptorzellen
 IS: Innensegmente der Photorezeptorzellen
 ONL: äußere nukleäre Schicht
 OPL: äußere plexiforme Schicht
 INL: innere nukleäre Schicht
 IPL: innere plexiforme Schicht
 GC: Ganglienzellschicht
 P: Pigmentepithelzelle
 CH: Choroidea
 BM: Bruchsche Membran
 R: Stäbchen
 C: Zapfen
 H: Horizontalzelle
 Bi: Bipolarzelle
 M: Müllerzelle
 A: Amakrine Zelle
 G: Ganglienzelle
 AX: Axone der Ganglienzellen

(verändert nach Hartmann, 2007)

2.3 Die Photorezeptorzellen

Die Retina wandelt eintreffende optische Stimuli in chemische und elektrische Signale um und verarbeitet die Information auf vielfältige Weise. Der erste funktionelle Schritt dieser Verarbeitung, die Wandlung der Energie eines eintreffenden Photons, geschieht in den Photorezeptorzellen. In der Säugetierretina kommen zwei unterschiedliche Arten von Photorezeptorzellen vor, die aufgrund ihrer Morphologie als Stäbchen- bzw. Zapfenphotorezeptorzellen bezeichnet werden. Sie übernehmen funktionell unterschiedliche Aufgaben. Das System der Stäbchenrezeptorzellen ist für das Sehen bei niedriger Helligkeit zuständig und wird als skotopisches Sehsystem bezeichnet. Bei hoher Beleuchtungsstärke wird das Sehen von dem photopischen Sehsystem der Zapfenrezeptorzellen übernommen, das auf die Perzeption von farbigem Licht zugeschnitten ist. Bei Säugetieren gibt es einen Typ von Stäbchenrezeptorzellen und zwei bis drei Typen von Zapfenrezeptorzellen je nach Art (Kolb, 1995a,c). Die Zapfenrezeptoren unterscheiden sich aufgrund ihrer spektralen Empfindlichkeit für Licht. Der Mensch verfügt über drei Typen von Photorezeptorzellen mit einer maximalen spektralen Empfindlichkeit für Wellenlängen von 419 nm (blau), 531 nm (grün) und 559 nm (rot). Den Arten mit dichromatischem Sehsystem, zu denen die meisten Nager gehören, fehlt ein spezifischer Rezeptor für grünes Licht. Ratten und Mäuse verfügen über Rezeptoren für kurzwelliges Licht im UV-Bereich (360 nm) und einen Rezeptor für langwelliges Licht (510 nm) (Heldmaier & Neuweiler, 2003). Das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen in der menschlichen Retina beträgt ca. 20:1 bei insgesamt 125 Mio. Photorezeptorzellen. Bei nachtaktiven Säugetieren, zu denen die Laborratte gehört, beträgt das Verhältnis 99:1 (Heldmaier & Neuweiler, 2003). Die Verteilung der Stäbchen und Zapfen über die gesamte Retina ist heterogen. Die höchste Dichte aller Sehzellen und insbesondere der Zapfen findet sich im Gelben Fleck (*Makula*). In dessen Zentrum befindet sich die Sehgrube (*Fovea*). Auf diesen Punkt wird beim photopischen Sehen das Licht fokussiert und die höchste räumliche Auflösung erreicht. In der Peripherie der Retina befinden sich vornehmlich die monochromatischen Stäbchenrezeptorzellen (Østerberg, 1935; Curcio *et al.*, 1987, Kolb, 1995a,c).

2.4 Die Sehkaskade

Das durch den optischen Apparat des Auges fokussierte Licht wandert durch die Schichten des neuronalen Netzwerks der Retina und fällt auf die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen. Hier liegt die Photorezeptormembran in Form abgeplatteter, übereinanderliegender Membranscheiben vor. In die Zellmembran der Photorezeptorzellen ist der Sehfärbstoff Rhodopsin eingelagert. Die Rhodopsinmoleküle bestehen aus einer chromophoren Gruppe, dem Retinal, und einem daran kovalent gebundenen Protein, dem Opsin. Unterschiedliche Absorptionsspektren der an das Retinal gebundenen Opsine bestimmen die Farbempfindlichkeit der drei Zapfentypen.

Bei der Absorption eines Photons durch Rhodopsin kommt es zur Konformationsänderung der retinalen Gruppe (siehe Abbildung 3). Diese wechselt von einer *all-trans*-Form in das 11-*cis*-Retinal, wodurch eine G-proteingekoppelte Enzymkaskade im Photorezeptor angestoßen

wird. In der Folge aktiviert das membrangebundene G-Protein Transducin das Effektorenzym Phosphodiesterase (PDE). Die PDE hydrolisiert das second messenger Molekül zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Das darauffolgende Absinken des intrazellulären cGMP-Spiegels bewirkt das Schließen ligandengesteuerter Natriumkanäle. Es kommt zur Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle. Der Neurotransmitter aller Photorezeptorzellen ist Glutamat (Massey, 1990). Es wird in der Dunkelheit dauerhaft an der synaptischen Endigung der Zelle ausgeschüttet. Wird die Zelle belichtet, führt die Hyperpolarisation zu einer verminderten Ausschüttung von Glutamat.

Innerhalb der Sehkaskade wird der Effekt jedes eintreffenden Photons verstärkt. Jeder Zwischenschritt innerhalb der oben beschriebenen intrazellulären Signalkaskade führt zu einer Potenzierung der beteiligten Moleküle (nach: Heldmaier & Neuweiler, 2003).

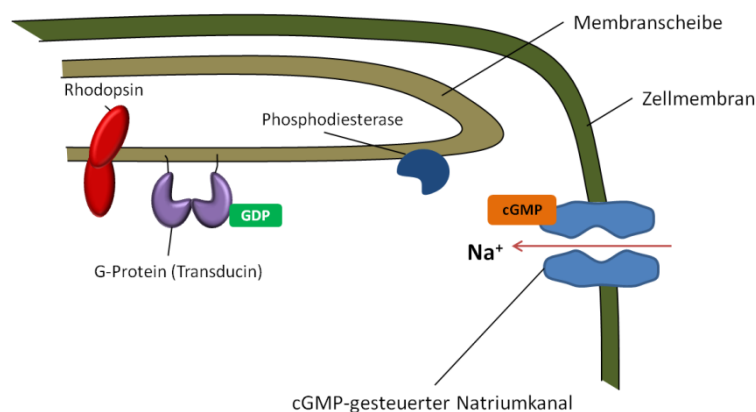
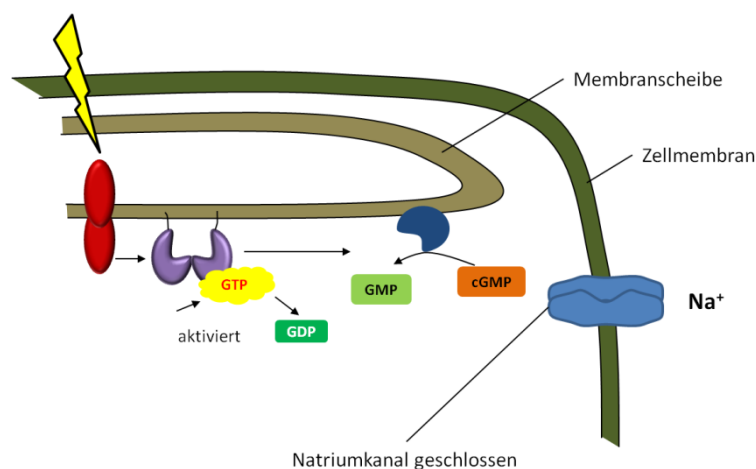


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Sehkaskade

Oben: In der Dunkelheit sind die cGMP-gesteuerten Natriumkanäle geöffnet. Natrium gelangt in die Zelle. Es kommt zur Depolarisation. Der Sehfärbstoff Rhodopsin liegt in der inaktiven *11-cis* Form vor. Rhodopsin, Transducin sowie die Phosphodiesterase sind in die Membran der Membranscheiben eingelagert. GDP= Guanosindiphosphat; cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat



Unten: Trifft Licht auf Rhodopsin kommt es zu einer Konformationsänderung. Es wechselt in die aktive *all-trans* Form und aktiviert das G-Protein Transducin. Unter Energieverbrauch (GTP) aktiviert Transducin die membranständige Phosphodiesterase. Die Phosphodiesterase degradiert cGMP zu GMP. Durch das Fehlen von cGMP schließen die ligandenabhängigen Natriumkanäle in der Zellmembran. Die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert. (eigene Abb. nach: Bear, 2006)

2.5 Physiologie der Retina

In der Dunkelheit depolarisieren die Photorezeptorzellen und schütten den Neurotransmitter Glutamat aus. Während der Belichtung hyperpolarisieren die Photorezeptorzellen und die Ausschüttung von Glutamat wird verringert. Die Funktion des retinalen Netzwerkes besteht darin, die Informationen aus den Photorezeptorzellen zu verarbeiten und zu einem Gesamtbild zusammenzusetzen. Die unterschiedlichen Aufgaben der Zelltypen innerhalb der Retina werden im Folgenden erläutert.

2.5.1 Bipolarzellen und Horizontalzellen

Die Photorezeptorzellen treten in der OPL mit den Bipolarzellen und den Horizontalzellen in Kontakt. Bei Säugetieren wurden insgesamt elf Typen von Bipolarzellen identifiziert, die sich aufgrund der Größe ihrer Dendriten und ihrer synaptischen Kontakte klassifizieren lassen (Nelson, 1995).

Physiologisch betrachtet kommen Bipolarzellen in zwei Klassen vor. Die ON-Bipolarzellen reagieren auf die Belichtung des Zentrums ihres rezeptiven Feldes (s.u.) mit einer Depolarisation. Die OFF-Bipolarzellen reagieren im Licht mit einer Hyperpolarisation und depolarisieren im Dunkeln. In beiden Fällen ist der ausgeschüttete Neurotransmitter der Photorezeptorzellen gleich (Massey, 1990). ON und OFF-Bipolarzellen reagieren gegensätzlich auf das Vorhandensein von Glutamat. Möglich wird dies durch die unterschiedliche Ausstattung mit Glutamatrezeptoren und entsprechenden Ionenkanälen. Die OFF-Bipolarzellen tragen ionotrope AMPA- (englisch: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole propionic acid*) oder Kainat-Glutamatrezeptoren, die im aktivierten Zustand Kationenkanäle öffnen. OFF-Bipolarzellen mit AMPA-Rezeptoren antworten phasisch auf Licht, wohingegen die Ausstattung mit Kainat-Rezeptoren zu einer anhaltenden (tonischen) Lichtantwort führt (DeVries, 2000, Wässle, 2004). Die ON-Bipolaren tragen den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR6, der bei Anwesenheit von Glutamat über ein gekoppeltes G-Protein Kationenkanäle schließt (Slaughter & Miller, 1983; Nomura *et al.*, 1994; Vardi *et al.*, 2000; Wässle, 2004). Die Bipolarzellen reagieren auf exzitatorischen Eingang typischerweise nicht mit einem schnellen Aktionspotential, sondern mit einem langsamen, gradierten Potential. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass einige Bipolarzellen auch schnelle Alles-oder-Nichts-Antworten generieren (Baden *et al.*, 2013).

Das System der Zapfenrezeptorzellen ist für das Sehen bei Tageslicht verantwortlich und erlaubt die Differenzierung von Licht unterschiedlicher Wellenlängen. In der Primatenretina lassen sich zwei grundsätzliche Verzweigungsmuster unterscheiden. Bipolarzellen mit einem kleinen dendritischen Feld werden als *midget*-Zellen (englisch: *midget* = Zwerg) bezeichnet. Ein zweiter Typ mit einem weitläufigen Verzweigungsmuster wird als *parasol*-Zelle bezeichnet (englisch: *parasol* = Sonnenschirm). Abhängig von der Größe ihrer Verzweigungen erhalten sie Eingang von einer (bei den *midget*-Bipolaren) oder vielen Zapfenrezeptorzellen (Nelson & Connaughton, 1995).

Das sogenannte rezeptive Feld einer Bipolarzelle umfasst alle Photorezeptorzellen, die die Aktivität dieser Bipolarzelle beeinflussen. Es ist kreisförmig und besteht aus einem Zentrum,

das gekennzeichnet ist durch die o.g. direkten Verbindungen zu den Photorezeptorzellen und einem ringförmigen, antagonistischen Umfeld. Die Beleuchtung des zentralen rezeptiven Feldes einer ON-Bipolaren führt zu deren Depolarisation, das Ausleuchten des umgebenden rezeptiven Feldes zu einer Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation wird durch ein Netz aus Horizontalzellen vermittelt. OFF-Bipolarzellen besitzen ein ringförmiges, exzitatorisches rezeptives Umfeld. Die Horizontalzellen integrieren Informationen über den Beleuchtungszustand aus den umliegenden Photorezeptorzellen und senden inhibitorisches Feedback an diese zurück (Nelson, 1995).

Bei der Mehrheit der Tiere kommen zwei Typen von Horizontalzellen vor, die sich aufgrund ihrer Verzweigungsmuster unterscheiden. Die A-Typ Horizontalzellen besitzen kein Axon und verzweigen lokal. Die B-Typ Horizontalzellen bilden ein Axon aus und erfassen entferntere Bereiche der Retina. Horizontalzellen sind über *gap junctions* mit anderen Horizontalzellen gleichen Typs verbunden (Yamada & Ishikawa, 1965; Kolb & West, 1977). Sie geben inhibitorisches Feedback in die synaptischen Endigungen der Photorezeptorzellen und in benachbarte Horizontalzellen (Mariani, 1985). Einige treten in Kontakt mit den Dendriten von Bipolarzellen (Herrmann *et al.*, 2011). Das flächige Netzwerk aus Horizontalzellen misst den mittleren Beleuchtungszustand des Hintergrundes und sendet hemmendes Feedback zurück zu den Synapsen der Photorezeptorzellen. Auf diese Weise regulieren die Horizontalzellen einen Adaptationsprozess, der es ermöglicht über einen weiten Helligkeitsbereich kontrastreich zu sehen (Masland, 2012).

In der IPL nehmen die Bipolarzellen der Zapfen direkten Kontakt zu den Ganglienzellen auf. Hier kommt es zu einer deutlichen anatomischen Trennung der Dendriten von ON- und OFF-Bipolarzellen. Die OFF-Bipolarzellen verbinden sich in der äußeren IPL, in der Nähe der Zellkörper der amakrinen Zellen, mit den Fortsätzen von OFF-Ganglienzellen. Die ON-Bipolaren verschalten in der inneren IPL auf ON-Ganglienzellen (Wässle, 2004).

2.5.2 Besonderheiten im Signalweg der Stäbchen

Wie oben beschrieben sind die Stäbchen-Photorezeptorzellen und deren Signalweg für das Sehen bei eingeschränkten Lichtverhältnissen zuständig. Die höchste Dichte von Stäbchen-Photorezeptorzellen findet sich in der Peripherie der Retina. In der Fovea kommen wenige Stäbchen vor. Im Gegensatz zu den Zapfenrezeptorzellen verschalten Stäbchenzellen ausschließlich auf einen Typ von ON-Bipolarzellen. Diese Stäbchen-Bipolarzellen reagieren auf Beleuchtung mit einer Depolarisation, da sie den mGluR6-Glutamatrezeptor tragen (Dacheux & Raviola, 1986, Nomura 1994). Eine Stäbchen-Bipolarzelle sammelt die Information aus 15-30 Stäbchenrezeptorzellen. Der Kontakt zu den Bipolarzellen geschieht über eine Invagination der Stäbchenbasis, in der ebenfalls Kontakt zu den Dendriten der Horizontalzellen aufgenommen wird (Kolb, 1970).

In der IPL nehmen die Stäbchen-Bipolarzellen Kontakt zu den amakrinen Zellen auf (Kolb & Famiglietti, 1974; Kolb, 1979). Die zwei häufigsten Zelltypen von amakrinen Zellen im Stäbchensignalweg sind die AII- und die A17-Zellen, die sich aufgrund der Größe ihrer rezeptiven Felder unterscheiden (Kolb, 2001). Die AII-Zellen verfügen über ein kleines rezeptives Feld, die A17 Zellen verzweigen diffus über ein weites Feld. Die A17-Zellen

integrieren die Informationen aus mehreren Bipolarzellen und erhalten die Information aus bis zu 1000 Stäbchenrezeptoren (Nelson & Kolb, 1985). Durch diese konvergente Verschaltung wird die Sensitivität für eintreffende Photonen enorm erhöht.

Die Stäbchen-Bipolarzellen bilden keine direkten Kontakte zu Ganglienzellen, sondern verschalten ausschließlich auf amakrine Zellen. Die All-Zellen reagieren bei Belichtung mit einer Depolarisation. Sie bilden *gap junctions* mit Zapfen-ON-Bipolarzellen, die mit chemischen Synapsen auf ON-Ganglienzellen verschaltet sind (Famiglietti & Kolb, 1975; Nelson, 1982; Vaney, 1994). Auf diese Weise nutzen sie den Zapfen-ON-Signalweg. Sie bilden glycinerge Synapsen mit OFF-Ganglienzellen und vermitteln eine OFF-Reaktion aus dem Signalweg der Stäbchen (Pourcho, 1996; Menger *et al.*, 1998).

2.5.3 Ganglienzellen und amakrine Zellen

Die Ganglienzellschicht ist die Ausgangsregion der Retina, in der die finale Integration der Informationen stattfindet. Die Ganglienzellen integrieren die eingehenden Informationen aus den Bipolarzellen (Rockhill *et al.*, 2002). Hierbei werden unterschiedliche Parameter, die parallel verrechnet wurden, zusammengeführt. Entsprechend komplex können die Stimuli sein, auf die Ganglienzellen reagieren. Einzelne Zellen kodieren für eine bestimmte Bewegungsrichtung, Farbe, Größe oder Bewegungsgeschwindigkeit eines visuellen Stimulus oder auf eine bestimmte Kombination aus diesen Parametern (Nelson, 1995). Die Ganglienzellen übermitteln ihre Informationen nicht über graduierte Potentiale, sondern über zeit-kodierte Abfolgen von Aktionspotentialen. Erst an dieser Stelle kommt es in der Retina zu einer „Digitalisierung“ der Informationsübermittlung. Klassischerweise werden drei Arten von Ganglienzellen unterschieden. ON-Zellen, die beim Einsetzen eines Stimulus mit einer transienten Abfolge von Aktionspotentialen feuern und eine anhaltende Antwortkomponente zeigen, bis der Stimulus beendet ist. OFF-Ganglienzellen, die während des Stimulus nicht feuern, aber beim Ausschalten des Stimulus mit einem kurzen transienten Anstieg ihrer Aktivität antworten. Und die ON-OFF-Ganglienzellen, die beim Ein- und Aussetzen des Stimulus eine transiente Antwort generieren, sonst aber nicht aktiv sind (vgl. Abbildung 4) (Hartline, 1938).

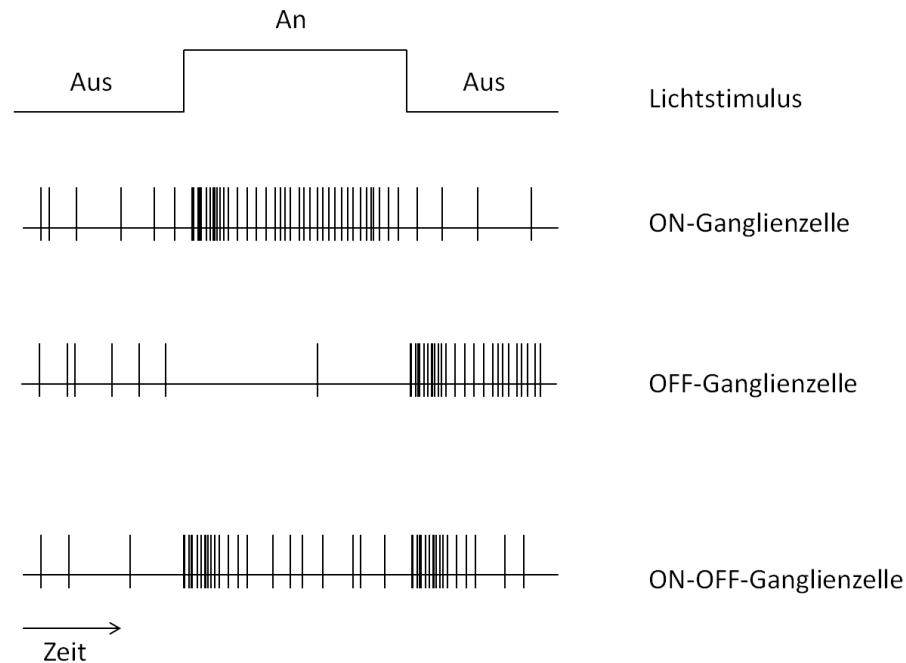


Abbildung 4 Lichtreaktion von retinalen Ganglienzellen (schematisch)

Es können grob drei physiologische Typen von Ganglienzellen unterschieden werden. ON-Ganglienzellen reagieren auf die Beleuchtung ihres rezeptiven Zentrums mit einer Steigerung ihrer Aktivität. Die Antwort setzt sich aus einer transienten und einer tonischen Komponente für die Dauer des Lichtstimulus zusammen. OFF-Ganglienzellen sind in der Dunkelheit aktiv und setzen ihre Aktivität bei Beleuchtung aus. Beim Ausschalten des Stimulus reagieren sie mit einem kurzen Anstieg der Feuerrate. ON-OFF-Ganglienzellen steigern ihre Aktivitätsrate kurzzeitig beim Ein- und Ausschalten der Beleuchtung. Sie weisen keine phasische Antwortkomponente auf (eigene Abb. nach: Hartline, 1938).

Dieser physiologische Unterschied hat eine morphologische Entsprechung. Die OFF-Zellen stratifizieren in der IPL in der Nähe der Zellkörper der amakrinen Zellen und kontaktieren die Dendriten der OFF-Bipolaren (Amtho *et al.*, 1984). ON-Zellen stratifizieren nahe an den Zellkörpern der Ganglienzellen, wo sie in Kontakt mit den Endigungen der ON-Bipolaren stehen (Nelson *et al.*, 1978). Die ON-OFF-Ganglienzellen stratifizieren an der Grenze zwischen beiden Schichten (Amthor *et al.*, 1989).

Das Organisationsprinzip der konzentrischen rezeptiven Felder, das bei den Bipolarzellen zu beobachten ist, findet sich ebenfalls auf Ebene der Ganglienzellen. Das Zentrum des rezeptiven Feldes von ON-Ganglienzellen wird umgeben von einer ringförmigen antagonistischen OFF-Peripherie, bei deren Beleuchtung es zu einer Hemmung der betreffenden Ganglienzelle kommt. OFF-Zentrum-Ganglienzellen sind von einer ON-Peripherie umgeben (Kuffler, 1953).

ON-Zentrum-Ganglienzellen feuern maximal beim Ausleuchten des Zentrums ihres rezeptiven Feldes. Wird die Größe des Lichtpunktes schrittweise vergrößert, nimmt die Aktivität der Ganglienzelle schrittweise ab. Wird ausschließlich die rezeptive OFF-Peripherie

beleuchtet, kommt es zur Hemmung der Aktivität (Wiesel, 1959). Auf diese Weise erreichen Ganglienzellen eine ausgeprägte Größenselektivität. Sie reagieren maximal auf den Stimulus, der das Zentrum ihres rezeptiven Feldes optimal abdeckt.

Bewegungssensitive Ganglienzellen kodieren für eine bestimmte Bewegungsrichtung eines Objektes. Sie feuern maximal, wenn sich das Objekt in die präferierte Bewegung bewegt und feuern nicht, wenn es sich in die Gegenrichtung bewegt (Barlow & Hill, 1963). Diese richtungssensitiven Zellen können darüber hinaus selektiv für die Geschwindigkeit des sich bewegenden Objektes sein (Barlow *et al.*, 1964).

Die Richtungssensitivität dieser Ganglienzellen lässt sich durch gezielte pharmakologische Blockade bestimmter Transmitter eingrenzen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der GABA-Antagonist Picrotoxin die Richtungssensitivität aufhebt (Wyatt & Daw, 1976).

Durch die Blockade von Acetylcholinrezeptoren oder das Ausschalten von cholinergen amakrinen Zellen wird die Richtungssensitivität vermindert, aber nicht komplett ausgeschaltet (Cohen & Miller, 1995; Grzywacz *et al.*, 1998, He & Masland, 1997). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Richtungssensitivität der Ganglienzellen durch modulatorischen Einfluss der amakrinen Zellen in der IPL vermittelt wird. Die meisten der ca. 30 morphologisch unterscheidbaren Typen von amakrinen Zellen enthalten die inhibitorischen Neurotransmitter GABA oder Glycin (Ehinger, 1983a). Einige amakrine Zellen sind cholinerg oder verwenden den Neuromodulator Dopamin (Kolb *et al.*, 1990; Mariani, 1990.). Dopaminerge amakrine Zellen spielen eine Rolle bei Lichtadaptationsprozessen, entsprechend der Horizontalzellen in der OPL (Ehinger, 1983b; Dowling, 1986; Datum *et al.*, 1993; Newkirk *et al.*, 2013).

Die amakrinen Zellen verfeinern die Selektivität der Ganglienzellen, indem sie Feedback zu den Bipolarzellen, anderen amakrinen Zellen und den Ganglienzellen senden. Mit den Ganglienzellen sind sie über *gap junctions* verbunden (Vaney, 1994). Da in der IPL die Eingänge von Bipolaren und amakrinen Zellen neu kombiniert werden, gibt es insgesamt mehr Typen von Ganglienzellen als funktionelle Typen von Bipolarzellen (Taylor & Smith, 2011). Die Ganglienzellen senden ihre Fortsätze über den Sehnerv in das Gehirn, wo die unterschiedlichen Informationen aus dem visuellen Umfeld zu einem Seheindruck kombiniert werden.

2.6 Degenerationskrankheiten der Retina

Eine Vielzahl von retinalen Erkrankungen führt in ihrem Verlauf zu einer Degeneration des retinalen Netzwerkes und zur teilweisen oder vollständigen Erblindung des Patienten. Nach dem Absterben der Photorezeptorzellen durchläuft die Retina in vielen Fällen eine neuronale Neumodellierung. Neben einem Überblick über den zeitlichen Verlauf einer Degeneration des retinalen Gewebes sollen im Speziellen zwei wichtige Krankheitsbilder ausführlich beschrieben werden, da sie zu den meisten Neuerblindungen in den Industriestaaten führen: Die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD), die für 32% der Neuerblindungen bei Menschen über 50 Jahre in den Industriestaaten verantwortlich ist (Jager *et al.*, 2008) und

die Retinitis Pigmentosa (RP) mit drei Millionen Betroffenen weltweit (Weiland *et al.*, 2005; Hartong *et al.*, 2006).

2.6.1 Retinitis Pigmentosa (RP)

Bei RP kommt es, bedingt durch einen genetischen Defekt, zu einer Degeneration der Photorezeptorzellen. Die Degeneration beginnt an den peripheren Stäbchenrezeptoren und verläuft in Richtung der Makula. Die Symptome äußern sich schrittweise in Nachtblindheit und fortschreitender Einschränkung des Gesichtsfeldes und können in völliger Blindheit enden (Berson, 1993; Weiland *et al.*, 2005; Hartong *et al.*, 2006). Aktuell konnten 45 an der Entstehung von RP beteiligte Gene identifiziert werden (Ferrari *et al.*, 2011; Parmeggiani, 2011). Trotz einiger Therapieansätze gilt die Krankheit bisher als nicht heilbar (Weiland *et al.*, 2005; Hartong *et al.*, 2006). Eine Studie von Varela und Mitarbeitern zeigte, dass Stäbchen-Bipolarzellen zunehmend ihre Sensitivität für den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat verlieren und stattdessen auf den von den Horizontalzellen ausgeschütteten, inhibitorischen Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) reagieren (Varela *et al.*, 2003). Dies ist ein Indiz für eine mit der Krankheit einhergehende chemische Neumodellierung des Netzwerkes.

2.6.2 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die AMD hat ihre primäre Ursache nicht in der Degeneration des retinalen Nervengewebes, sondern in einer beschleunigten Alterung des RPEs. Über die Zeit kommt es zur Bildung charakteristischer Proteinablagerungen in der Netzhaut, die als Drusen bezeichnet werden. Darüber hinaus kann eine beschleunigte Alterung der Gefäße beobachtet werden, die mit ihren Fortsätzen in den subretinalen Raum eindringen (Roig-Melo *et al.*, 2000). Durch die beschädigten Gefäßwände gelangt Flüssigkeit in den subretinalen Raum und lagert sich dort an (Ferris *et al.*, 1984). Das amerikanische *National Institute of Health* schlägt eine Klassifizierung der Krankheit aufgrund der Schwere der auftretenden Degenerationserscheinungen vor (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000).

Generell verläuft eine retinale Degeneration in drei aufeinanderfolgenden Phasen (nach: Marc *et al.*, 2003). Nach dem Absterben der äußeren Segmente (Phase 1) kommt es zum Absterben der Zellkörper betroffener Stäbchen. Nicht betroffene Stäbchen verlängern ihre Neurite in die inneren retinalen Schichten oder zu den Ganglienzellen und bilden neue Verknüpfungen. In der zweiten Phase kommt es zum Absterben der Zapfen und zum Verlust der verbliebenen Stäbchen. Die dritte Phase ist Startpunkt einer Neumodellierung des retinalen Netzwerkes, in dessen Folge Bipolar- und Horizontalzellen ihre Dendriten aus der OPL zurückziehen. Horizontalzellen bilden neue axonale und dendritische Verbindungen in die IPL. Gleichzeitig kommt es zum exzessiven Wachstum von Müllerzellen. Diese bilden ein dichtes Geflecht, welches den subretinalen Raum zunehmend versiegelt. Zu diesem Zeitpunkt sind die letzten Photorezeptorzellen abgestorben. Die Endigungen der verbleibenden Zellen der Retina (inklusive Ganglienzellen und amakrinen Zellen) verbinden sich zu knotenförmigen Gebilden, sogenannten Mikroneuromen. In der Folge sterben mehr

und mehr Ganglienzellen ab und werden durch Mikroglia ersetzt, die IPL wird dünner. Im Endstadium der retinalen Degeneration wachsen zunehmend Blutgefäße in die innere Retina. Ebenso durchdringen apikale Fortsätze von RPE-Zellen das verbleibende Netzwerk. Die neuronale Funktionalität der Retina wird in weiten Teilen aufgehoben. Eine externe Stimulation durch neuronale Prothesen kann ausschließlich an den wenigen verbliebenen Ganglienzellen ansetzen und wird durch die zunehmende elektrische Isolation erschwert (Fernandes *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit RP und AMD dennoch in gewissem Maße möglich ist, durch elektrische Simulation einen Seheindruck zu erzeugen (Potts & Inoue, 1969; Humayun *et al.*, 1999; Rizzo *et al.*, 2003a,b; Weiland *et al.*, 2005). Wahrscheinlich kommt es weder bei den Patienten mit RP, noch bei denen mit AMD zu einer vollständigen Degeneration des retinalen Netzwerkes. Daraus ergibt sich die Hoffnung, mittels elektrischer Stimulation mit den sekundären Neuronen der Retina kommunizieren zu können und durch geeignete retinale Implantate beim Patienten einen Seheindruck zu erzeugen. Die physiologischen Veränderungen in der degenerierten Retina müssen bei der Entwicklung einer geeigneten Sehprothese berücksichtigt werden.

2.7 Sehprothesen

Die Geschichte funktioneller Implantate, die Erblindeten zum Sehen verhelfen sollen, reicht bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts. Im Jahr 1956 reichte Tassicker ein Patent für ein einfaches retinales Implantat ein. Eine einzelne lichtsensitive Selenzelle sollte bei eintreffendem Licht eine Spannung erzeugen, um Neurone der Retina elektrisch zu stimulieren (Tassicker, 1956). Das Patent wurde niemals praktisch umgesetzt. Es folgten viele weitere Ansätze, die an unterschiedlichen Stellen der Sehbahn ansetzten.

Prinzipiell gibt es mehrere Stellen im visuellen System, an denen Sehprothesen zum Einsatz kommen können. Nicht-retinale Implantate stimulieren in den höheren Ebenen des visuellen Systems, z.B. am Sehnerv oder im visuellen Cortex. Retinale Implantate stimulieren unterschiedliche Ebenen des retinalen Netzwerkes direkt im Auge.

Im Folgenden soll eine Klassifizierung der unterschiedlichen Ansätze und ein Überblick über die aktuellen Forschungsschwerpunkte gegeben werden. Die Zusammenfassung orientiert sich an drei Übersichtsartikeln über Sehprothesen (Weiland *et al.*, 2005; Chader *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012). Weitere Quellen sind an entsprechender Stelle im Text genannt.

2.7.1 Nicht-retinale Implantate

Die ersten Versuche eine Sehprothese im menschlichen Cortex einzusetzen unternahmen Brindley und Lewin. Es gelang erstmals Seheindrücke (Phosphene) beim Patienten durch elektrische Stimulation mit Radiowellen auszulösen (Brindley & Lewin, 1968). Der Ansatz litt an der geringen räumlichen Auflösung und an dem schnellen Verblässen der Phosphene.

In den folgenden Jahren gab es weitere Versuche kortikale Prothesen zu etablieren (Dobelle & Mladejovsky, 1974; Dobelle, 2000; Schmidt *et al.*, 1996; Steven *et al.*, 2006; Woolley *et al.*, 2013). Die mangelnde Auflösung, trotz 100 Elektroden umfassender Implantate, stellt ein noch zu überwindendes Hindernis dar (Normann *et al.*, 2001). Kortikale Implantate setzen an einer hohen Verarbeitungsstelle in der Sehbahn an. Das durch viele

Ebenen vorverarbeitete Signal im visuellen Cortex ist schwer durch eine Stimulation zu imitieren (Fernandes *et al.*, 2012). In welchem Umfang detaillierte Abbilder der Umwelt im Cortex künstlich erzeugt werden können, bleibt die Frage zukünftiger Forschung.

Der zweite Ansatz einer nicht-retinalen Prothese setzt direkt im unteren Bereich des Sehnervs an. Ein ringförmiges Implantat mit mehreren aufgelagerten Stimulationselektroden umschließt den Nerv und stimuliert die Fortsätze der Ganglienzellen auf ihrem Weg ins Gehirn. Vielversprechende Ergebnisse stammen von Veraart und Mitarbeitern, die die Prothese bereits am Patienten getestet haben. Die Interaktion mit der Umwelt, Mustererkennung und ein zeitabhängiger Lerneffekt konnten gezeigt werden (Veraart *et al.*, 1998, 2003). Bei dieser Methode sind ebenfalls Nachteile zu erwarten. Der Sehnerv bündelt ca. 1,2 Mio. Axone in einem ca. 2 mm dicken Faserstrang. Die Neurone aus der Makula verlaufen im Inneren. Eine gezielte Stimulation des Zentrums wird schwierig und mit erhöhter Wahrscheinlichkeit werden die Fasern aus der peripheren Retina stimuliert. Dadurch kommt es zu einer Limitierung der maximal erreichbaren Auflösung. Diese Prothese setzt ebenfalls an einem späten Punkt der Verrechnung an. Da ausschließlich Ganglienzellen stimuliert werden, verliert man den verrechnenden Einfluss der Bipolar-, Horizontal- und amakrinen Zellen (Fernandes *et al.*, 2012).

2.7.2 Retinale Implantate

Eine retinale Sehprothese versucht die Funktion der Photorezeptorzellen zu ersetzen, indem die verbliebenen sekundären Neurone durch eine geeignete elektrische Stimulation angeregt werden. Die Prothese besteht in der Regel aus mehreren funktionellen Einheiten. Zuerst muss ein Bild der Umgebung aufgenommen werden. Dies geschieht durch eine Videokamera, die in das Brillengestell des Patienten integriert ist oder in neueren Ansätzen durch Photodioden, die in dem Implantat integriert sind (Zrenner *et al.*, 2011). Ein Mikroprozessor errechnet aus dem komplexen Bild der Umgebung ein geeignetes Stimulationsmuster. Hierbei muss das Bild stark vereinfacht und an die Anzahl der verfügbaren Stimulationselektroden angepasst werden. Eine Stromquelle liefert die entsprechenden Stimulationsströme bzw. Spannungen und stimuliert über die implantierten Elektroden die Neurone der Retina. In Abhängigkeit von der Platzierung des Implantats und der Stärke der Stimulation kann das Netzwerk an unterschiedlichen Stellen stimuliert werden. Beim Patienten wird durch die Ganglienzellen die Information ins Gehirn weitergeleitet und ein Seheindruck erzeugt (Chader *et al.*, 2009).

Retinale Implantate werden anhand ihrer Lage im Auge grob in epiretinale und subretinale Implantate unterteilt. Epiretinale Implantate werden zwischen Glaskörper und Ganglienzellschicht positioniert, während subretinale Implantate hinter der Retina in den Bereich der Photorezeptorzellen oder der Choroidea eingesetzt werden. Bisher sind die meisten epiretinalen Prothesen aus internen und externen Teilen aufgebaut, d.h. Kamera, Stromquelle und Mikroprozessor befinden sich außerhalb des Körpers. Das eigentliche Implantat besteht aus den Elektroden im Inneren des Auges. Das Ziel neuerer subretinaler Implantate ist eine komplett im Auge integrierte Prothese (Zrenner *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2012).

2.7.2.1 Subretinale Implantate

Subretinale Implantate werden in den Bereich zwischen dem RPE und den geschädigten Photorezeptorzellen platziert. Sie befinden sich somit in unmittelbarer Nähe zu den verbliebenen Bipolar- und amakrinen Zellen. Da an einer niedrigeren Verrechnungsstufe angesetzt wird, sollte mit subretinalen Implantaten ein differenzierterer Seheindruck entstehen als mit epiretinalen Implantaten (Fernandes *et al.*, 2012). Wie oben erwähnt, versuchen subretinale Implantate viele technische Komponenten zu integrieren. Auf dem Träger der Elektroden befinden sich, neben den Stimulationselektroden, Mikrophotodioden, die durch einfallendes Licht eine Spannung erzeugen. Durch die Verwendung dieser Photodioden kann theoretisch auf die externe Kamera verzichtet werden, da die Energie der Photonen direkt von dem Implantat in einen elektrischen Strom gewandelt wird. Das Ziel dieser Entwicklung ist es, die Spannung der Photodioden direkt zur Stimulation der Retina zu nutzen. Bisher sind die verwendeten Photodioden nicht leistungsstark genug, um ohne externe Stromversorgung auszukommen (Fernandes *et al.*, 2012).

Das erste klinische Projekt mit subretinalen Implantaten war das Optobionics Projekt. Die Implantate umfassten bis zu 3500 Stimulationselektroden bei einer Gesamtgröße von 3 mm. In der ersten klinischen Studie nahmen Patienten Licht und eine leichte Vergrößerung des Sehfeldes durch die Stimulation wahr (Chow *et al.*, 2004). In einer späteren Veröffentlichung wurde von einer Verbesserung der Wahrnehmung in peripheren Bereichen der Retina berichtet, auf die die Stimulation keinen direkten Einfluss haben konnte. Die Autoren führten dies auf einen indirekten Effekt z.B. durch die Freisetzung eines Wachstumsfaktors als Antwort auf die Implantation zurück (Ciavatta *et al.*, 2009). Der Nachweis, dass die elektrische Stimulation für die Verbesserung der visuellen Wahrnehmung verantwortlich war, konnte nicht erbracht werden. Das Projekt wurde mittlerweile eingestellt.

Die Retina Implant AG entwickelt aktuell ein subretinales Implantat mit insgesamt 1500 Stimulationselektroden (Elektrodendurchmesser= 100 µm) und integrierten Photodioden. Ein Bild der Umgebung wird durch den natürlichen optischen Apparat des Patienten direkt auf die Photodioden projiziert und die Retina über einen mikroprozessorgestützten Neurostimulator stimuliert. In der aktuellen Studie wird berichtet, dass die drei Patienten, die das Implantat erhielten, in der Lage waren Buchstaben und geometrische Figuren auf schwarzem Hintergrund zu erkennen. Einer der Patienten war darüber hinaus in der Lage, einfache Objekte wie Gabeln oder Messer voneinander zu unterscheiden (Zrenner *et al.*, 2011).

Einer der größten Nachteile der subretinalen Implantate ist die aufwendige Implantation, die die Gefahr von Verletzungen im Inneren des Auges birgt. Ein weiterer Nachteil ergibt sich durch die eingeschränkten Platzverhältnisse im subretinalen Raum, die die Möglichkeiten der Unterbringung einer Stromquelle oder eines Mikrochips limitieren. Bei hohen Leistungen der Stimulation können Probleme beim Abtransport von Wärme entstehen, die im schlimmsten Fall zur Schädigung der Neurone führen können (Fernandes *et al.*, 2012).

2.7.2.2 Suprachoroidale Implantate

Ein Spezialfall eines subretinalen Implantats ist das suprachoroidale Implantat, das in eine sklerale Tasche nahe der Choroidea eingesetzt wird (Ohta *et al.*, 2007). Ein Vorteil dieses Implantats liegt im schonenden chirurgischen Eingriff. Die Positionierung im Auge des Patienten ist minimal invasiv, da kein direkter Zugang zur Retina hergestellt werden muss (Morimoto *et al.*, 2002; Fujikado *et al.*, 2011, Fernandes *et al.*, 2012;). Die Implantate können viel stabiler befestigt werden und sind bei einem Defekt trotzdem leicht auszutauschen. Der größte Nachteil dieses Implantats liegt in der Tatsache, dass sich der Abstand der Stimulationselektroden zu den Zielzellen vergrößert und höhere Stimulationsströme benötigt werden. Trotz großer Elektrodendurchmesser (0,5 mm) wurden Ströme von bis zu 1mA benötigt, um beim Patienten Seheindrücke auszulösen (Fujikado *et al.*, 2011). Mit zunehmender Distanz vergrößert sich die Ausbreitung der Stimulationsströme im Gewebe. Dies verringert die Genauigkeit der Stimulation, sowie die maximale Auflösung, die mit einem solchen Implantat zu erreichen ist (Morimoto *et al.*, 2002; Shivdasani *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2012). Die Entwicklung transchoroidaler Implantate wird von mehreren Gruppen fortgeführt, die sich momentan mit der Langzeitbiokompatibilität beschäftigen (Morimoto *et al.*, 2011; Villalobos *et al.*, 2013).

2.7.2.3 Epiretinale Implantate:

Pionierarbeit auf dem Gebiet der epiretinalen Implantate leistete die Arbeitsgruppe um Humayun, die erste Implantate dieses Typs klinische erprobte (Humayun *et al.*, 1996; 1999; 2003). Das verwendete Mikroelektrodenarray (Argus™ I) trug 16 Elektroden mit einem Durchmesser von 500 µm. Während der ersten klinischen Studie im Jahr 2003, berichteten Patienten die Wahrnehmung von lokalen Seheindrücken, die mit der relativen Lage der Elektroden in Verbindung gebracht werden konnten. Desweiteren konnten mit der Stimulationsstärke korrelierte Helligkeitsunterschiede, sowie die Bewegungsrichtung von Objekten wahrgenommen werden (Humayun *et al.*, 2003). Das aus den Ergebnissen dieser Vorversuche entwickelte Implantat (Argus II™ System) wurde mittlerweile auf 60-Stimulationselektroden erweitert. Es ist das erste kommerzielle epiretinale Implantat mit CE-Zulassung für Medizinprodukte. Derzeit tragen 32 Patienten aus fünf Nationen das Argus II™ System (Humayun *et al.*, 2012).

Das epiretinale Implantat wird auf einem Träger aus Silizium oder flexiblen Polyimid aufgebracht und über einen Zugang durch den Augapfel auf der Ganglienzellschicht platziert. Dies vereinfacht die Implantation im direkten Vergleich zu den subretinalen Prothesen. Das Zellnetzwerk der Retina wird nur oberflächlich tangiert und es erfolgt keine Beeinträchtigung der RPE oder der Choroidea. Die Stimulationsschwellen sinken aufgrund der Nähe zu den Ganglienzellen. Die thermischen Eigenschaften der epiretinalen Implantate sind ebenfalls besser, da entstehende Wärme über den wasserhaltigen Glaskörper gut abgeführt werden kann (Opie *et al.*, 2010).

Die elektrische Stimulation der epiretinalen Implantate setzt an den Ganglienzellen an. Deren Fortsätze sammeln sich und verlassen über den Sehnerv das Auge und projizieren in das Gehirn. Tiefere Schichten des neuronalen Netzwerkes werden durch diesen Ansatz

selten stimuliert. Da das retinale Netzwerk aus Bipolarzellen, amakrinen Zellen und Horizontalzellen eine enorme Vorverarbeitung des visuellen Signals vollführt, ist der Abstraktionsgrad der visuellen Information auf Ebene der Ganglienzelle hoch. Durch direkte Stimulation auf dieser Ebene müssten theoretisch räumlich-zeitliche Stimulationsmuster gefunden werden, die von den Zentren des visuellen Cortexes verstanden werden (Zrenner *et al.*, 2002).

Der experimentelle Teil dieser Arbeit versucht die Nachteile der subretinalen, sowie der epiretinalen Implantate zu minimieren und den Stimulationserfolg objektiv messbar zu machen. Die Hintergründe und die Motivation dieser Arbeit wurden in Kapitel 1 detailliert dargestellt. Zum Verständnis der Funktionsweise retinaler Implantate sind physikalische und messtechnische Grundlagen vonnöten, die im Folgenden näher erläutert werden.

2.8 Ableitungen elektrischer Aktivität in neuronalem Gewebe

Die Neurone der Retina leiten die visuellen Informationen zum Gehirn. Im Ruhezustand kann über der Zellmembran eines Neurons ein Potential zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Medium gemessen werden. Wird die Zellmembran eines Neurons über einen bestimmten Schwellenwert depolarisiert, öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle in der Zellmembran und es kommt zum Einstrom von Natriumionen. Es entsteht ein Aktionspotential, das sich entlang des Axons fortbewegt. Um die elektrische Aktivität von Nervenzellen zu untersuchen, wurde eine Vielzahl elektrophysiologischer Methoden entwickelt. Der Strom von Ionen durch die entsprechenden Ionenkanäle führt zu zeitlichen Spannungsänderungen über der Zellmembran. Die elektrische Aktivität kann durch das direkte Messen des Stromes, durch die Veränderung der elektrischen Spannung über der Zellmembran oder die Spannung zwischen dem Zelläußeren und einem entfernten festen Bezugspotential abgeleitet werden. Die durch Ionen getragenen Ströme der Zelle, müssen in einen elektronengetragenen Strom gewandelt werden, um mit einer Messelektronik aufgezeichnet werden zu können. Die Wandlung geschieht an der Phasengrenze zwischen Elektrolyt und der Oberfläche der Messelektrode. Bei der Verwendung von elektrolytgefüllten Glaselektroden wird ein Silber-/Silberchlorid-Draht verwendet, an dessen Oberfläche die Wandlung stattfindet.

Bei der intrazellulären Ableitung werden feine, scharfe Elektroden ($<1\ \mu\text{m}$) benutzt, mit denen die Zellmembran durchstochen wird. Diese intrazellulären Elektroden können beispielsweise aus geätzten Metallelektroden (z.B. Stahl) oder aus scharfen Glaselektroden gefertigt werden. Als Referenzelektrode dient eine zweite, in der Regel weit entfernte Silber-/Silberchlorid-Elektrode. Die Glaselektrode wird mit intrazellulärem Medium befüllt. Innerhalb der Glaselektrode befindet sich ein Silberdraht, der die Ionenbewegungen in der Zelle in einen faradayschen Strom in der Messelektronik wandelt. Bei den intrazellulären Messungen wird das Membranpotential der Zelle gemessen. Da dieses ca. -60 bis -80 mV beträgt, ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei intrazellulären Ableitungen besonders gut. Spannungsänderungen, die durch das Auftreten von schnellen Aktionspotentialen auftreten,

können durch wechselstromgekoppelte Verstärker dargestellt werden (Hodgkin & Huxley, 1952; Hodgkin *et al.*, 1952).

Bei der Patch-Clamp-Technik, die von Neher und Sakmann entwickelt wurde, werden feine, abgerundete Glaselektroden verwendet, um den Ionenstrom durch die Kanäle in der Zellmembran direkt zu messen. Die Glaselektroden werden auf der Zellmembran der zu untersuchenden Zelle positioniert. Durch das Anlegen eines leichten Unterdrucks an der Messelektrode wird die Zellmembran angesaugt und eine hohe Abdichtung zwischen Zelle und Elektrode erreicht. Da in dieser Konfiguration die Leckströme klein sind, können auch sehr kleine Ströme detektiert werden. Im Idealfall deckt die verwendete Elektrode wenige Ionenkanäle ab. Durch pharmakologische Blockversuche konnten einzelne Kanäle und deren Eigenschaften identifiziert werden (Neher & Sakmann, 1976).

Die Patch-Clamp-Technik und die intrazelluläre Ableitung erlauben ausschließlich die Messung der Aktivität einer einzelnen Zelle. Generell ist es zwar möglich, mehrere Messelektroden in einem Versuch parallel zu verwenden, jedoch beschränken die räumlichen Begebenheiten im Versuchsaufbau die maximale Elektrodenzahl.

In extrazellulären Ableitungen werden klassischerweise Metallelektroden (Stahl, Wolfram, Iridium, Platin) oder Glaselektroden verwendet (Wolbarsht *et al.*, 1960). Extrazelluläre Elektroden penetrieren, anders als intrazelluläre Elektroden, die Zellmembran nicht, sondern kommen im extrazellulären Raum zum Liegen. Extrazelluläre Ableitungen sind stabiler und schonender für die einzelne Zelle als intrazelluläre Ableitungen. In Abhängigkeit der Größe und der Materialeigenschaften der extrazellulären Elektrode sowie der Beschaffenheit des Ableitortes, kann mit ihr die Aktivität eines einzelnen Neurons oder die Summenaktivität mehrerer angrenzender Neurone gemessen werden. Extrazelluläre Summenableitungen von mehreren Neuronen mit einzelnen Elektroden können durch statistische Verfahren postanalytisch aufgeschlüsselt werden.

Bei der extrazellulären Ableitung wird die Spannung zwischen dem unmittelbaren Umfeld der Zelle und einem weit entfernten Bezugspotential gemessen. Die aufgezeichneten Spannungsänderungen durch Aktionspotentiale sind klein. Sie liegen in Abhängigkeit zur Entfernung vom Zielgewebe und den elektrischen Eigenschaften der Elektrode zwischen 20 μ V bis zu maximal 2 mV. Neben schnellen Spannungsschwankungen, wie sie durch Aktionspotentiale im extrazellulärem Raum hervorgerufen werden, können mit extrazellulären Elektroden auch langsame lokale Feldpotentiale abgeleitet werden, wie sie durch die Aktivität von vielen gekoppelten Neuronen entstehen.

Um die Funktionsweise von komplexen neuronalen Netzwerken verstehen zu können, ist es hilfreich, die elektrische Aktivität von einer größeren Anzahl von Zellen simultan abzuleiten. Sogenannte Multielektroden-Arrays (MEAs) kombinieren auf einem Träger mehrere unabhängige Messelektroden. Die ersten dieser Arrays bestanden aus Bündeln von feinen isolierten Drähten, deren Spitzen als Messelektroden verwendet wurden (Strumwasser, 1958). In in-vivo Versuchen im Neocortex wurden diese Draht-Multielektroden besonders häufig genutzt (Buzsáki, 2004). Durch die Entwicklung der Fotolithographie und der Mikroprozestechnologie in den 1970er Jahren entstanden die

ersten MEAs auf Siliziumträgern (Wise *et al.*, 1970). Die eigentlichen Messelektroden, mitsamt deren Zuleitungen, sind bei diesen MEAs auf dünnen Siliziumplatten aufgebracht. Sie sind, je nach Anwendung, z.B. aus Gold, Iridium, Platin oder Titan gefertigt. Die Elektroden sind häufig linear oder in Vierergruppen (Tetroden) angeordnet und auf einzelnen Schwertern positioniert, die den Zinken einer Gabel ähneln. Diese, unter dem Namen *Michigan Arrays* bekannten, penetrierenden MEAs ermöglichen das extrazelluläre Ableiten in unterschiedlichen Schichten eines neuronalen Gewebes (Cheung, 2007). Durch die flexible Fertigung dieser MEAs lassen sich Elektrodendurchmesser und -abstände sowie Breite, Abstand und Anzahl der Schwerter im Rahmen gewisser physikalischen Grenzen frei gestalten.

Die Qualität der extrazellulären Ableitungen mit MEAs ist, wie bei den Ableitungen mit einzelnen Elektroden, primär von der Lage der Elektroden zu den Zielzellen abhängig. Der Durchmesser der Elektroden sollte so gewählt werden, dass er der Größe der abzuleitenden Struktur entspricht. Durch entsprechende Oberflächenbeschichtungen kann die Impedanz der Elektroden, bei gleichbleibendem Durchmesser, verringert werden. Soll die Elektrode gleichzeitig als Stimulationselektrode benutzt werden, müssen bestimmte physikalische Parameter beachtet werden. Die Grundlagen der Elektrostimulation in neuronalem Gewebe und die Materialeigenschaften der Mess- bzw. Stimulationselektroden werden in Kapitel 2.9 und 2.10 beschrieben.

2.9 Elektrostimulation in neuronalem Gewebe

Das Ziel elektrischer Stimulationen ist es, durch eine Ladungsverschiebung im extrazellulären Medium die Zellmembran zu depolarisieren und die Zelle zur Ausbildung von Aktionspotentialen zu bewegen.

Für eine elektrische Stimulation benötigt man mindestens zwei Elektroden. Eine aktive Elektrode, die in der Nähe der Zielzelle liegt, sowie eine indifferente Elektrode, die als Gegenelektrode den Stromkreis schließt. Die externe Auslösung eines Aktionspotentials kann durch eine Ladungsverschiebung an der Zellmembran erreicht werden. An der Oberfläche der aktiven Elektrode wird der Elektronenstrom in einen Ionenstrom im Gewebe umgewandelt. Die positiv geladene Stimulationselektrode (Anode) zieht negative Ladung von der Zelloberfläche ab. Es verbleibt eine positive Partialladung an der Außenhülle des Neurons. Die negativ geladene Stimulationselektrode (Kathode) zieht dementsprechend positive Ladung aus der Umgebung der Zelle ab und depolarisiert die Zellmembran. Die Ladungsdifferenz zwischen Zellinnerem und Zelläußeren wird geringer. Wird der Schwellenwert der spannungsabhängigen Ionenkanäle in der Zellmembran erreicht, wird ein Aktionspotential ausgelöst (Benton *et al.*, 1983).

Je näher sich die aktive Elektrode am Zielgewebe befindet, desto geringere Amplituden müssen für den Stimulationspuls gewählt werden. Neben dem Abstand zum Zielgewebe gibt es noch weitere Parameter, die den Effekt einer elektrischen Stimulation beeinflussen. Der relative Abstand und das Größenverhältnis von Stimulations- und Referenzelektrode bestimmen an welcher Stelle im Gewebe eine maximale Potentialverschiebung stattfindet.

Liegen beide Elektroden dicht beieinander, ist die Ausbreitung des elektrischen Feldes kleiner als bei weit voneinander entfernten Elektroden. Im idealisierten Fall, in dem sich die Zelle exakt zwischen beiden Elektroden befindet, verlaufen die Feldlinien eines elektrischen Feldes parallel und homogen zwischen dem Elektrodenpaar. Im ungünstigsten Fall relativieren sich die Potentiale an Kathode und Anode und es kommt nicht zur gewünschten Stimulation. Stimulationen über eng beieinanderliegende Referenz- und Stimulationselektroden werden als bipolare Stimulationen bezeichnet (Benton *et al.*, 1983; Grumet, 1999). Wählt man eine großflächige und weit vom Zielgewebe entfernte Elektrode als Referenz, spricht man von monopolarer Stimulation.

Einen großen Einfluss auf die Effektivität der Stimulation hat neben dem absoluten Strom, der zwischen Referenz- und Stimulationselektrode fließt, auch die Stromdichte (A/m^2). Durch eine Elektrode mit geringem Durchmesser fließt ein konstanter Strom mit einer hohen Dichte. Wählt man eine große Referenzelektrode, nimmt die Stromdichte in deren Richtung stetig ab. Neben der Gesamtladung, die während einer Stimulation transferiert wird, muss die Ladung in einer bestimmten Dichte fließen, um die Zielzelle zu stimulieren. Nur wenn die Zielzelle ausreichend polarisiert wird, kommt es zur Ausbildung von Aktionspotentialen.

In mehreren Untersuchungen wurde der Schwellenwert der benötigten Flächenladungsdichte für unterschiedliche Implantate und Netzhäute bestimmt. Die experimentell erhobenen Daten unterliegen großen Schwankungen zwischen und innerhalb der Studien.

Für epiretinale Prothesen wurden unterschiedliche Schwellenwerte bestimmt: $5\text{--}570 \mu C/cm^2$ (Mahadevappa *et al.*, 2005) und $80\text{--}306 \mu C/cm^2$ (Rizzo *et al.*, 2003a,b). Bei den genannten Studien handelt es sich um Patientenstudien. Es wurde kein physiologischer Stimulationserfolg gemessen, sondern der subjektive Seheindruck des Patienten herangezogen, um die Schwellen zu bestimmen. In elektrophysiologischen Messungen im Tierversuch wurde der Stimulationserfolg durch externe Elektroden direkt an den Ganglienzellen gemessen. Es wurden Schwellenwerte für die Flächenladungsdichte von $140\text{--}250 \mu C/cm^2$ mit Elektrodendurchmessern von $30 \mu m$ bestimmt (Fried *et al.*, 2006), in der Rattenretina $20\text{--}200 \mu C/cm^2$ mit $8\text{--}12 \mu m$ Elektroden (Sekirnjak *et al.*, 2006) und in einem in-vivo Versuch im Primatenaugen mit einem epiretinalen Implantat Schwellen von $18\text{--}99 \mu C/cm^2$ (Sekirnjak *et al.*, 2008).

Werden durch subretinale Stimulationselektroden tiefere Schichten der Retina stimuliert, werden größere Teile des Netzwerkes angesprochen. Aufgrund der größeren Entfernung zu den Zielzellen, in diesem Fall den Bipolarzellen, sollten die Schwellen der Stimulation erwartungsgemäß steigen. Jedoch bestätigen Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien diese Vermutung nicht. Die Schwellenwerte für die Flächenladungsdichte decken einen weiten Bereich ab. Subretinale Stimulationsversuche in unterschiedlichen Tiermodellen zeigten Schwellenwerte von $10 \mu C/cm^2$ für $100 \mu m$ Elektroden, gemessen als kortikale Antwort im Hasen (Gekeler *et al.*, 2004) oder $625 \mu C/cm^2$ in der isolierten Hühnerretina, gemessen an den retinalen Ganglienzellen (Stett *et al.*, 2007). Die Schwelle der Flächenladungsdichte in einer klinischen Studie am Patienten betrug $80 \mu C/cm^2$ (Zrenner *et al.*, 2011).

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Schwellenwerte für die Stimulation mit subretinalen oder epiretinalen Stimulationselektroden innerhalb ihrer Gruppen großen Schwankungen unterliegen.

Methodisch lassen sich zwei Möglichkeiten unterscheiden, eine Zelle elektrisch zu stimulieren: Durch spannungsdefinierte Stimulationspulse, bei denen sich der effektiv fließende Strom automatisch aus der Impedanz der Stimulationselektrode ergibt oder durch stromdefinierte Stimulation, bei der der gewünschte Strom festgelegt wird und das Stimulationsgerät die Spannung erhöht, bis der gewünschte Strom fließt. Nachteil ist die Abhängigkeit von der Impedanz der Elektrode. Ist diese hoch, werden Spannungen erreicht, bei denen es zu irreversiblen Reaktionen an der Elektrodenoberfläche und zur Gasbildung durch Hydrolyse kommt. Des Weiteren kann es bei hohen Strömen und Spannungen zu irreversiblen Schädigungen des umliegenden Gewebes kommen. Bei der Elektrostimulation im sensomotorischen Cortex konnte gezeigt werden, dass Neurone in einem Radius von bis zu 150 μm geschädigt werden können (McCreery *et al.*, 2010).

Am häufigsten werden biphasische Stimulationspulse eingesetzt. Biphasisch bedeutet, dass Rechteckpulse genutzt werden, die eine negative (kathodische) und eine positive (anodische) Phase besitzen. Durch den ersten Puls wird eine bestimmte Ladung ins Gewebe transferiert und in der entgegengesetzten Phase abgezogen. Die biphasische Stimulation kann symmetrische oder asymmetrische Pulsphasen aufweisen. Bei asymmetrischer Stimulation ist die zweite Stimulationsphase durch eine kleine Amplitude bei gleichzeitig größerer Dauer gekennzeichnet. Die Ladung verbleibt länger im Gewebe (Cogan, 2008).

Es hat sich herausgestellt, dass Ladung, die nicht vollständig aus dem Gewebe abgezogen wird, auf Dauer Schäden am Gewebe verursacht (Sooksood *et al.*, 2009). Ziel ist es, die Stimulation ladungsneutral durchzuführen, d.h. die in das Gewebe transferierte Ladung sollte der abgezogenen Ladung entsprechen.

2.10 Physikalische Eigenschaften von Mess- und Stimulationselektroden

Den Elektrodenoberflächen retinaler Prothesen gilt ein besonderes Augenmerk. Sie stellen die direkte Schnittstelle zwischen den Komponenten der Ableitelektronik und dem biologischen Gewebe dar. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberflächen beeinflussen das Verhalten der Elektrode im Gewebe. Eine bidirektionale Elektrode hat abwechselnd die Funktion, Spannungsänderungen der Zellen zu messen, und während einer Stimulation Ladung über die Metall-Flüssigkeitsgrenzschicht ins Gewebe zu transferieren.

In diesem Abschnitt sollen die grundlegenden Eigenschaften von Mess- bzw. Stimulationselektroden im Gewebe erörtert werden. Neben einer kurzen Erläuterung der elektrochemischen Prozesse an einer Grenzschicht sollen unterschiedliche Materialien für Elektroden vorgestellt werden. Das Verständnis der Reaktionen, die während einer Stimulation an der Elektrode stattfinden, ist essentiell für die Interpretation der biologischen Antwort und für die Weiterentwicklung der Stimulationstechnik.

2.10.1 Reaktionen an Phasengrenzschichten

Ist eine Elektrode von einer Elektrolytlösung umgeben, bildet sich an dem Übergang zwischen Elektrodenmaterial und Elektrolyt eine Phasengrenzschicht (Abbildung 5). Die erste Beschreibung dieser Schicht wurde von v. Helmholtz vorgeschlagen (v. Helmholtz, 1879). Ist die Elektrode gegenüber dem Medium schwach negativ geladen, lagern sich positiv geladene Teilchen in der flüssigen Phase direkt an der Oberfläche an und kompensieren die Oberflächenladung der Elektrode. Nach v. Helmholtz ist diese Schicht in Abhängigkeit der Ionenkonzentration und Art der Ionen ca. 0,1 nm-10 nm dick und starr an die Oberfläche gebunden. Sie hat die kapazitiven Eigenschaften eines Kondensators, das heißt sie kann in gewissem Maße Ladung akkumulieren. Diese Schicht wird als Helmholtz-Doppelschicht bezeichnet.

Später erfuhr diese These durch Gouy und Chapman eine Erweiterung (Gouy, 1910; Chapman, 1913). Sie berücksichtigen die freie, temperaturabhängige Beweglichkeit von Ionen in der Elektrolytlösung und folgerten, dass die Grenzschicht aus diffus verteilten freien Ionen besteht und insgesamt einen größeren Bereich umfasst. Beide Theorien wurden von Otto Stern vereint. Er beschrieb den Phasenübergang an einer Elektrode im Elektrolyt als Kombination der starren Molekülschicht (Helmholtz-Schicht), die sich direkt an der Elektrodenoberfläche befindet und der diffusen, beweglichen Schicht (Gouy-Chapman-Schicht) im Medium (Stern, 1924). Die Kapazität dieser Stern-Doppelschicht beträgt ca. $20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cogan, 2008).

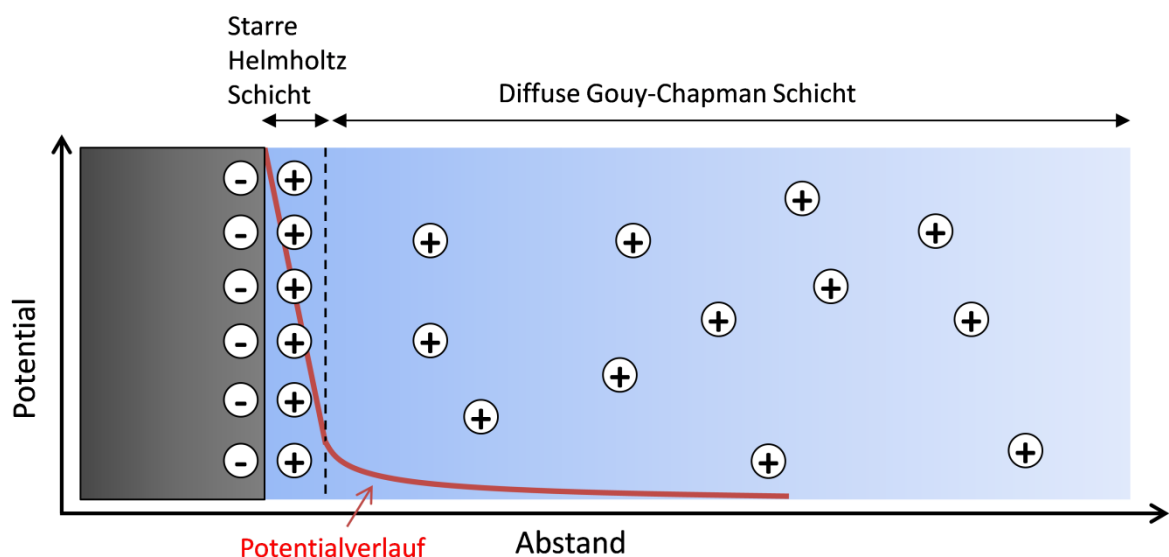


Abbildung 5 Stern-Doppelschicht

An der Oberfläche einer Elektrode bildet sich im Elektrolyt eine Stern-Doppelschicht aus. Sie setzt sich aus einer starren Schicht geladener Ionen unmittelbar an der Phasengrenze (Helmholtz-Schicht) und einer diffusen Schicht von frei beweglichen Ionen im Elektrolyt zusammen (Gouy-Chapman-Schicht). Die Spannung, die zwischen der Elektrode und dem Elektrolyt abfällt nimmt mit zunehmendem Abstand von der Elektrodenoberfläche ab. (eigene Abb. nach: Both, 2011)

Diese Zusammenhänge spielen eine besondere Rolle, wenn Elektroden als Stimulationselektroden genutzt werden. Durch das Anlegen einer Stimulationsspannung können an der oben beschriebenen Doppelschicht kapazitive und faradaysche Ladungsverschiebungen stattfinden (Cogan, 2008).

Bei rein kapazitiven Ladungsverschiebungen werden keine Ladungen über die Grenzschicht transferiert; es handelt sich ausschließlich um induzierte Ströme. Die Ladung in der Stimulationselektrode bewirkt eine Verschiebung von gegensätzlich geladenen Ionen im Elektrolyt. Kapazitive Effekte entstehen bei kleinen Spannungen und Ladungen.

Wird die Spannung über einer Elektrode weiter erhöht, kommt es zum Übertritt von Elektronen durch die Grenzschicht. Positiv geladene Ionen innerhalb des Elektrolyten werden reduziert. Man spricht von faradayschen Strömen. In einem gewissen Rahmen sind diese Reaktionen reversibel. Haben sich die reduzierten Ladungsträger noch nicht zu weit von der aktiven Oberfläche entfernt, können diese bei einer Polaritätsumkehr an der Grenzschicht erneut oxidiert werden.

In Abhängigkeit von Amplitude und Dauer des angelegten Spannungspulses treten unterschiedliche Reaktionen an der Grenzoberfläche auf. Die Art der möglichen Reaktionen wird durch das Elektrodenmaterial und durch die Bestandteile des Elektrolyten bestimmt. Nicht alle der auftretenden Reaktionen sind reversibel. Es können beispielsweise Korrosionen der Elektrodenoberfläche entstehen, indem Metallionen aus der Oberfläche gelöst werden. Oder es kommt zur Elektrolyse von Wasser, bei der Sauerstoff und Wasserstoff gebildet wird. Besondere Gefahr für ein biologisches System besteht durch chemische Reaktionen zwischen dem Gewebe und der Elektrode oder Stoffen im Elektrolyt (z.B. Proteinen). Diese können durch pH-Änderungen, Veränderungen von Biomembranen oder im Nährmedium enthaltener Proteine ungewollte Effekte verursachen (Cogan, 2008).

2.10.2 Spezifische Materialeigenschaften von Stimulationselektroden

Um ein Neuron zu stimulieren, muss dessen Zellmembran bis zu einem gewissen Punkt depolarisiert werden. Dies erreicht man durch kapazitive Verschiebungen von Ionen oder das Einbringen, bzw. Abziehen von Ladungen über die Elektroden in das extrazelluläre Medium (faradaysche Ströme). Ein rein kapazitiver Ladungstransfer bei elektrischer Stimulation ist wünschenswert, da auf diese Weise irreversible Schädigungen an der Elektrode oder dem Gewebe verhindert werden.

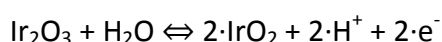
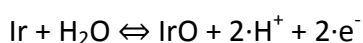
Um ausreichend Ladung durch kapazitive Effekte zu transferieren und an der Zielzelle eine Reaktion hervorzurufen, muss die Kapazität der Stimulationselektrode hoch sein. Um die Kapazität von Stimulationselektroden zu erhöhen, muss die effektive Oberfläche vergrößert werden. Da die Kapazität der Elektrode maßgeblich durch die Gesamtfläche der Doppelschicht limitiert wird, gelingt die Oberflächenvergrößerung durch das Aufbringen poröser Strukturen. Die maximale Ladungstransferrate gibt an, wie viel Ladung pro Fläche über die Elektrode transferiert werden kann, bevor es zu irreversiblen Reaktionen kommt. Für die Ladungstransferrate wird die geometrische Fläche einer Elektrode herangezogen, die sich aus dem Radius der Elektrode ergibt.

Die elektrochemische Fläche bezieht sich auf die gesamte elektrochemisch aktive Oberfläche einer porösen Struktur. Diese ist für die meisten Oberflächenbeschichtungen schwer zu bestimmen (Cogan, 2008). Die gängigsten Materialien und ihre maximalen Ladungstransferraten werden im Folgenden vorgestellt.

Platin, Iridium oder Legierungen aus beiden Edelmetallen stellen die klassische Beschichtung von Messelektroden dar. Für Mikroelektroden, die zur Stimulation eingesetzt werden, sind diese Metalle aufgrund ihrer niedrigen Ladungstransferraten von 0,05-0,35 mC/cm (Brunner & Turner, 1977; Rose & Robblee, 1990; Weiland *et al.*, 2002; Cogan, 2008, Venkatraman *et al.*, 2011) nur bedingt geeignet.

Höhere Ladungstransferraten von bis zu 0,9 mC/cm² lassen sich beispielsweise mit porösen Beschichtungen aus Titannitrit erreichen (Weiland *et al.*, 2002). Titannitrit zeichnet sich durch eine hohe chemische Stabilität und eine gute Biokompatibilität aus (Lee *et al.*, 2003). Mit Titannitrit können Spannungen zwischen -0,9 V und 0,9 V zur Stimulation genutzt werden, ohne dass es zur Elektrolyse von Wasser und damit einhergehender Gasbildung kommt (Cogan, 2008). Darüber hinaus gibt es noch weitere Edelmetallverbindungen, die zur Oberflächenvergrößerung von Mikroelektroden eingesetzt werden.

Eine Besonderheit unter den Edelmetallbeschichtungen ist die Aktivierung von Iridium. Durch wiederholte Reduktions- und Oxidationsprotokolle werden hoch poröse, hydratisierte Schichten aus Iridiumoxid aufgebaut (Robblee *et al.*, 1983). Dies erniedrigt die Impedanz, erhöht die Kapazität der Messpunkte und führt zu einer Verbesserung der Ableit- und Stimulationseigenschaften. Je nach Oxidationsstufe des Iridiums auf der Oberfläche, können durch schnelle reversible Redoxreaktionen Ladungen auf folgende Weisen ausgetauscht werden:



Die sicheren Ladungstransferraten liegen bei 0.35-3.8 mC/cm² (Cogan *et al.*, 2005). Die sicheren Spannungsamplituden zwischen -0,6 V und 0,8V (Cogan, 2008). Iridiumoxid zeichnet sich durch eine gute Biokompatibilität aus und eignet sich für den Langzeiteinsatz in Neuroimplantaten (Robblee *et al.*, 1983).

Neben den Edelmetallen wurden in den letzten Jahren leitfähige Polymere untersucht, die sich für die Beschichtung von Mikroelektroden eignen. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT). Es weist eine hohe Leitfähigkeit für Elektronen und Ionen auf und kann u.a. durch elektrochemische Deposition auf Mikroelektroden aufgebracht werden, auf denen es kissenartige Strukturen mit großer elektrochemischer Oberfläche bildet. Mit PEDOT konnten im Versuch Ladungstransferraten von 2 bis 15 mC/cm² erreicht werden (Nyberg *et al.*, 2007; Cogan, 2008).

Die größte Gefahr für das Gewebe geht von der Überschreitung der sicheren Spannungsgrenzen aus, da das bei der Hydrolyse gebildete Gas das Gewebe verdrängt und

schädigt. Der sichere Spannungsbereich für PEDOT-beschichtete Elektroden umfasst -0,9 V bis 0,6 V (Cogan, 2008). Die Möglichkeit Biomoleküle in die Polymerstruktur einzubinden führt zu einer überdurchschnittlichen Biokompatibilität, welche bei Implantaten von besonderem Interesse ist (Xiao *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2008, Harris *et al.*, 2013).

2.11 Nagetiere als Versuchstiere für die Grundlagenforschung

Für grundlegende Experimente an der Säugetierretina wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Tiermodelle etabliert. Ein besonderer Fokus lag von Beginn an auf der Untersuchung der Retina von Nagetieren. Der Laborhase wird seit Beginn der physiologischen Untersuchungen an der Retina häufig verwendet (Ames & Nesbett, 1981; Peichl, 1987; Jensen *et al.*, 2003). Die Farbratte (*Rattus norvegicus forma domestica*) ist ebenfalls ein weit verbreitetes und lang etabliertes Versuchstier in der Erforschung retinaler Krankheiten (Jensen & Rizzo, 2011; Jensen, 2012; Sekirnjak, 2009, 2011).

2.11.1 Die Wistar-Ratte als Versuchstier

Für die elektrophysiologischen Versuche dieser Arbeit, die die Etablierung der penetrierenden MEAs zum Ziel hatte, sollten gesunde Retinae verwendet werden, um die Vergleichbarkeit physiologischer Antworten zu ermöglichen. Die Wistar-Ratte wird seit 1909 als Versuchstier eingesetzt (Clause, 1998).

Für die physiologischen Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist die Retina eines Kleinnagers als Modell ausreichend. Die grundlegenden anatomischen Parameter des menschlichen Auges gleichen denen des Rattenauges. Die Größenverhältnisse des Rattenauges müssen für die Entwicklung eines MEA-Prototyps berücksichtigt werden. Die flexiblen Fertigungsprozesse fotolithografisch hergestellter MEAs ermöglichen Größenanpassungen für zukünftige klinische Studien am Patienten.

2.11.2 Tiermodelle retinaler Degenerationen (rd-Mäuse)

Die Entwicklung geeigneter Behandlungsmethoden für Degenerationskrankheiten der Retina setzt geeignete Tiermodelle voraus. Eine Reihe von Labormausstämmen weist retinale Degenerationen auf. Die retinale Degeneration 10 (rd10) führt zur Ausbildung sklerotischer Gefäße und dem Absterben der Photorezeptorzellen bis zur vierten Lebenswoche (Chang *et al.*, 2002; Gargini *et al.*, 2007). Die Symptome ähneln denen der RP, die beim Menschen beobachtet werden kann (siehe Kapitel 2.6). Diese Mausstämmen haben sich aus diesem Grund zu einem beliebten Modellorganismus für die Erforschung retinaler Prothesen entwickelt. Neben den anatomischen Veränderungen, die durch die Umstrukturierung des retinalen Netzwerkes beobachtet werden können, zeigen elektrophysiologische Untersuchungen an den degenerierten Retinae physiologische Veränderungen. Auffälligstes Merkmal ist das Auftreten niederfrequenter Oszillationen (~5 Hz), die als lokale Feldpotentiale extrazellulär gemessen werden können (Goo *et al.*, 2011; Menzler & Zeck, 2011). Durch das Blockieren ionotroper Glutamatrezeptoren konnten diese Oszillationen ausgeschaltet werden (Menzler & Zeck, 2011). Vermutlich werden diese Oszillationen in den

ON-Bipolarzellen ausgelöst, wenn die Eingänge der Photorezeptorzellen fehlen (Borowska *et al.*, 2011).

Die elektrophysiologischen Besonderheiten in der degenerierten Retina werden in einem zukünftigen retinalen Implantat von Bedeutung sein; im Besonderen in der Etablierung geeigneter Stimulationsparameter, die eine Neumodellierung (vgl. Kapitel 2.6) des neuronalen Netzwerkes verhindern sollen.

3 Methoden und Entwicklung des Versuchsaufbaus

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines penetrierenden MEA-Systems, das das Ableiten elektrischer Aktivität und die Stimulation der tieferen Schichten der Retina ermöglicht. Desweiteren sollte ein Versuchsaufbau etabliert werden, mit dem die Stimulationsversuche an der extrahierten Rattenretina durchgeführt werden können.

Die grundlegenden Teile des Versuchsaufbaus entsprechen den klassischen Materialien, die für elektrophysiologische Experimente benötigt werden. Die Anforderungen an die Messtechnik orientieren sich an den Anforderungen von planaren MEAs. Der Einsatz von planaren MEAs für die Untersuchung von neuronalem Gewebe gehört seit einigen Jahren zu den Standardverfahren der Elektrophysiologie. Planare MEAs ähneln Zellkulturschalen, auf deren Boden elektrische Kontakte aufgebracht sind, über die die elektrische Aktivität von Neuronen gemessen werden kann. Hierbei können dissoziierte Neurone in Kultur oder akute Präparationen von Gewebeschnitten verwendet werden (Pine, 1980; Egert *et al.*, 1998; Oka *et al.*, 1999;). Auch von der extrahierten Retina wurde bereits elektrische Aktivität mit MEAs abgeleitet (Jin *et al.*, 2005; Ye & Goo, 2007).

Aus der Verwendung von penetrierenden MEAs für die Experimente der vorliegenden Arbeit ergaben sich besondere Anforderungen an den Versuchsaufbau. So bestand die Schwierigkeit in der Tatsache, dass die extrahierte Retina in exakt vertikaler Richtung penetriert werden sollte. Somit konnte die optische Kontrolle der Penetration nicht direkt von oben geschehen, da sich das MEA im Lichtweg befand. Die spezielle Aufhängung des Mikroskops in Verbindung mit der Erweiterung der Badkammer ermöglichte die optische Kontrolle. Im Laufe der Entwicklung wurden mehrmals technische Anpassungen vorgenommen, bis der endgültige Aufbau für die Experimente verwendet werden konnte. Der in diesem Abschnitt beschriebene Versuchsaufbau stellt die finale Version einer längeren Entwicklungshistorie dar. Teile des Aufbaus mussten zuvor in experimenteller Weise erprobt werden.

3.1 Versuchstiere und Medium

Alle Experimente wurden an weiblichen adulten Wistar-Ratten (Charles River Deutschland GmbH) im Alter zwischen 90 und 120 Tagen durchgeführt. Die Ausnahme bildeten drei Experimente an männlichen rd10 Mäusen (Alter: 60 Tage). Die Tiere wurden im Tierhaus des Forschungszentrums Jülich gehalten und kurz vor der Durchführung der Experimente in das eigene Labor überführt. Die Tiere wurden in einer Kohlenstoffdioxid gefüllten Kammer oder mit Isofluran (Isofluran Deltaselect, Actavis Dtl. GmbH & Co. KG) betäubt. Die Tiefe der Anästhesie wurde mit Überprüfung des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Nach dem Töten durch Dekapitation wurden die Augen mit einer gebogenen Schere (FST 14091-09, Fine Science Tools) aus der Augenhöhle entfernt und in eine Petrischale mit oxygeniertem und vorgewärmtem (32°C) Ames-Medium (Sigma-Aldrich) überführt. Ames-Medium ähnelt in der Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit des Auges und eignet sich zur Aufbewahrung retinalen Gewebes (Ames & Nesbett, 1981). Das Medium wurde aus

Fertigpulver in 1 l *aqua bidest* vor den Versuchen angesetzt. Nach Anleitung wurden 1,9 g Natriumhydrogencarbonat zugesetzt und die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (Rezeptur siehe Anhang B).

3.2 Präparation der Retina

Die Präparation des Gewebes wurde in schwachem Rotlicht unter einem Auflichtmikroskop (Stemi SV-6, Carl Zeiss GmbH) bei 50-facher Vergrößerung durchgeführt. Der Augapfel wurde an den verbleibenden Resten der Augenmuskeln mit einer feinen Pinzette (Dumont #5, Fine Science Tools) gefasst und durch leichten Druck auf dem Boden einer Petrischale fixiert. In der Mitte der Seitenlinie des Augapfels wurde mittels einer Kanüle (Sterican Gr.18, B.Braun Melsungen) ein Loch gestochen. Mit einer 3 mm Federschere (No. 15000-00, Fine Science Tools) wurde der Augenbecher entlang der koronaren Ebene geteilt. Der vordere Augenteil wurde zusammen mit dem Glaskörper entfernt und verworfen. Die Entfernung der inneren Grenzmembran gelang mit Hilfe einer kleinen gezähnten Pinzette (Iris Forceps – 0,6 mm, Fine Science Tools). Diese wurde an der Schnittkante im Inneren des Augenbechers angesetzt und die innere Grenzmembran zur Mitte hin mit leichtem Zug abgelöst. Der Augenbecher wurde in Richtung des Sehnervs vom Außenrand her mit drei Schnitten fächerförmig aufgeschnitten. Eines dieser Dreiecke wurde direkt verwendet. Die übrigen Stücke wurden in oxygeniertem Ames-Medium zur späteren Verwendung am selben Versuchstag aufbewahrt. Mit feinen Pinseln (322 Kolinsky Größe 4, ELCO Pinsel GmbH) und einer selbstentwickelten Nylonschlinge (siehe Abbildung 6) wurde die Retina vorsichtig vom Augenbecher abgelöst. Mithilfe eines weiteren Pinsels wurde das Präparat in eine spezielle Badkammer (siehe unten) überführt, dort ausgebreitet und mit einem Gitter aus Draht und dünnen Nylonfäden am Boden fixiert.



Abbildung 6 Nylonschlinge zur Ablösung der Retina

Der Nylonfaden (Pfeil) wird während der Präparation zwischen Sklera und Retina geschoben. Durch leichten Zug kann die Retina schonend abgelöst werden.

Die Gitter wurden aus einem u-förmig gebogenen zahnmedizinischen Edelstahldraht (Menzanum hart, 0,9 mm, Scheu-Dental GmbH) gefertigt. Über dessen Länge wurden im Abstand von 0,7 mm dünne Nylonfäden gespannt. Die Nylonfäden wurden aus handelsüblicher ungewachster Zahnseide (Oral B Essential Floss, Procter & Gamble) gewonnen. Hierzu wurde ein Stück Zahnseide unter dem Binokular in seine einzelnen Fasern zerlegt. Die Fasern wurden auf einer Unterlage gleichmäßig nebeneinander aufgereiht und

provisorisch mit Klebeband fixiert. Die Kantenlänge der gebogenen Drahtstücke beträgt ca. 8mm. Die Drähte wurden an der Unterseite mit Sandpapier (Körnung 240) plan geschliffen, von oben auf die Nylonfäden gesetzt und mit 2-Komponenten-Klebstoff fixiert (siehe Abbildung 8). Die grundlegende Präparationsmethode und die Herstellung der Gitter wurden von der AG Müller (ICS-4, Forschungszentrum Jülich) übernommen und an die eigenen Anforderungen angepasst.

3.3 Versuchsaufbau

Die Versuchsaufbauten wurden auf einem hydraulisch gedämpften Tisch (VH3648W-OPT, Newport Corporation) montiert, um schwingungs- und erschütterungsfreies Arbeiten zu ermöglichen. Der komplette Aufbau wurde mit einer faradayschen Abschirmung umgeben. Die Vorderseite des faradayschen Käfigs konnte mit einem selbstentwickelten Kettenvorhang geschildert werden. Durch die Lamellen des Vorhangs konnte während laufender Messungen in den Käfig gefasst werden, ohne den Käfig komplett zu öffnen. Die abschirmenden Eigenschaften des Käfigs, vor allem im Bereich um 50 Hz, blieben weitestgehend erhalten. Durch einen zweiten Vorhang aus lichtundurchlässigem Stoff (Trevira CS Black Out, Trevira GmbH) konnte der Käfig bei Bedarf komplett verdunkelt werden.

3.3.1 Zentraler Messaufbau

Auf der Grundplatte des Tisches wurden ein vertikaler Positionierungstisch und darauf ein turmförmiger Aluminiumaufbau angebracht, der die Badkammer, in der das Gewebe positioniert wurde, auf eine ergonomische Arbeitshöhe bringt (Abbildung 7). Der obere Teil des Turms trägt eine Aussparung zur Aufnahme der Badkammer. Der Turm ist an der Vorderseite geöffnet und mit mehreren Einschüben ausgestattet, in die nachträglich verschiedene Module eingeschoben werden können, um den Aufbau zu erweitern (z.B. LED für optische Stimulation). Ein Inspektionsmikroskop (FS-70, Mitutoyo Europe GmbH) wurde über eine Galgenkonstruktion über dem Aufbau angebracht. Das Objektiv ließ sich frei über der Badkammer positionieren. Das Objektiv des Mikroskops wurde im 45° Winkel zur Oberfläche gekippt, um in vertikaler Achse oberhalb der Badkammer ausreichend Raum für das MEA freizuhalten.

Hinter dem Turm wurde ein zweiter Aufbau montiert, welcher einen Satz elektronisch steuerbarer Mikromanipulatoren (SM-6, Luigs & Neumann) trägt. Die Mikromanipulatoren können in 3-Achsen bewegt werden. Der oberste Mikromanipulator trägt einen Schlitten mit einem Winkeladapter, an dessen Vorderseite das MEA in vertikaler Position angeschlossen wurde. Auf der Rückseite des Adapters wurde der Vorverstärker des Messsystems angeschlossen. Alle Aufbauten innerhalb des Käfigs wurden mit Kupferkabeln an einem zentralen Punkt geerdet, um Erdschleifen zu verhindern.

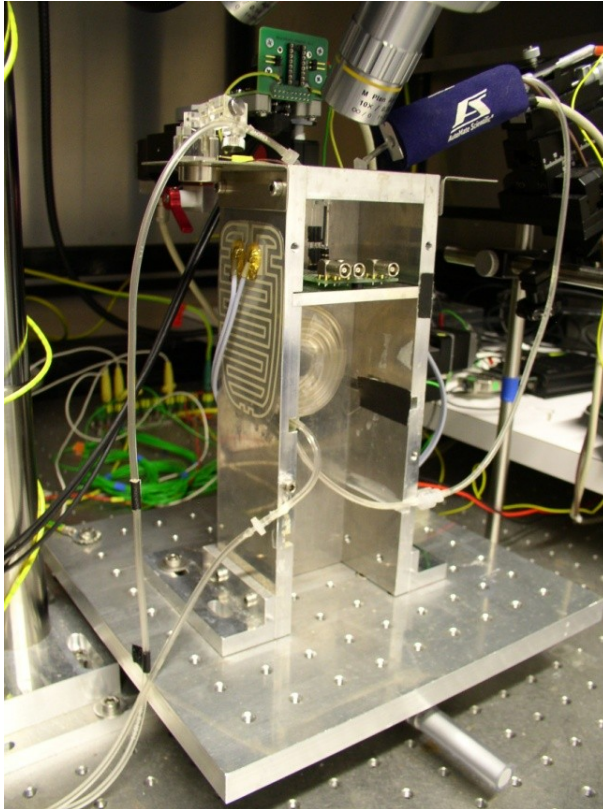


Abbildung 7 Zentraler Messaufbau

Die Abbildung zeigt den turmförmigen Aluminiumaufbau, der über einen X-Y Positionierungstisch mit der Grundplatte des Schwingungstischs verbunden ist. In die Oberseite des Turms wird die Badkammer eingesetzt. Von rechts fließt extrazelluläres Nährmedium zuerst durch die Perfusionsheizung (blau), dann durch die Badkammer und wird am linken Rand über einen Schlauch abgesaugt. Das Objektiv des Mikroskops reicht vom oberen mittleren Rand in das Bild hinein. Links daneben befindet sich der winkelförmige Adapter (grün), auf dem das MEA befestigt wird. Auf dem Einschub unterhalb der Badkammer ist die LED für die optische Stimulation angebracht. Der gesamte Turm kann durch seitlich angebrachte Heizfolien erwärmt werden.

3.3.2 Badkammer

Die Badkammer besteht aus einer 6 mm hohen Polycarbonatplatte, in die mehrere Vertiefungen gefräst wurden. Als Überlaufschutz dient ein 3 mm hoher Rand. Im Zentrum befindet sich die kreisrunde Hauptkammer ($d=13\text{ mm}$), in die das Gewebe überführt wurde. Abzweigend von der Hauptkammer befindet sich eine Aussparung für den Temperatursensor der Badheizung. Über einen Ein- und einen Auslaufkanal wurde während der Versuche Ames-Medium zu- und abgeführt. Im Auslaufkanal befindet sich eine weitere Aussparung, in welche die Referenzelektrode aus gesintertem Silber-/Silberchlorid (E201ML, In Vivo Metric) eingelassen ist. Der hintere Teil des Ablaufkanals ist leicht erhöht und gewährleistet, dass im laufenden Betrieb zu keinem Zeitpunkt der komplette Inhalt der Badkammer abgesaugt wird. Die Badkammer wurde an der Unterseite mit einem Deckglas und Vakuumfett verschlossen. Die Deckgläschen konnten bei Verschmutzung oder einem Defekt leicht ausgetauscht werden. Für die extrazellulären Ableitungen mit Glaselektroden wurde die Retina direkt auf dem Deckglas positioniert. Für die MEA-Versuche wurde auf dem Deckglas ein ca. 3 mm hohes rechteckiges Kissen aus dem flexiblen Polymer Polydimethylsiloxan (PDMS) aufgeklebt. Auf ihm wurde die Retina mittels der oben beschriebenen Gitter leicht fixiert. Diese flexible Unterlage verhindert zum einen die mechanische Beschädigung der MEAs beim Auftreffen auf die Glasunterlage, zum anderen erleichtert die Polymerunterlage die Penetration der Retina, da sie im Gegensatz zur glatten Glasunterlage durch die erhöhte Reibung das seitliche Ausweichen des Gewebes verhindert. PDMS wird aus zwei Komponenten, einem Harz und einem Binder, angesetzt (Sylgard® 182/184, Dow Corning,

Germany). Die Steifigkeit von PDMS kann durch das Mischungsverhältnis beider Komponenten leicht variiert werden. Nachdem unterschiedliche Kombinationen getestet wurden, stellte sich ein Mischungsverhältnis von acht Teilen Harz zu einem Teil Binder als optimal heraus.

Um die Haftung zwischen PDMS-Unterlage und dem oben beschriebenen Gitter zu erhöhen, wurde auf dem Gitter ein zusätzlicher Metalldraht parallel zu den Fäden des Netzes angebracht (Abbildung 8). Der Draht überragt die Unterlage seitlich und ist nach unten abgebogen. Er konnte nach Aufbringen des Gewebes auf der PDMS-Unterlage festgeklemmt werden.

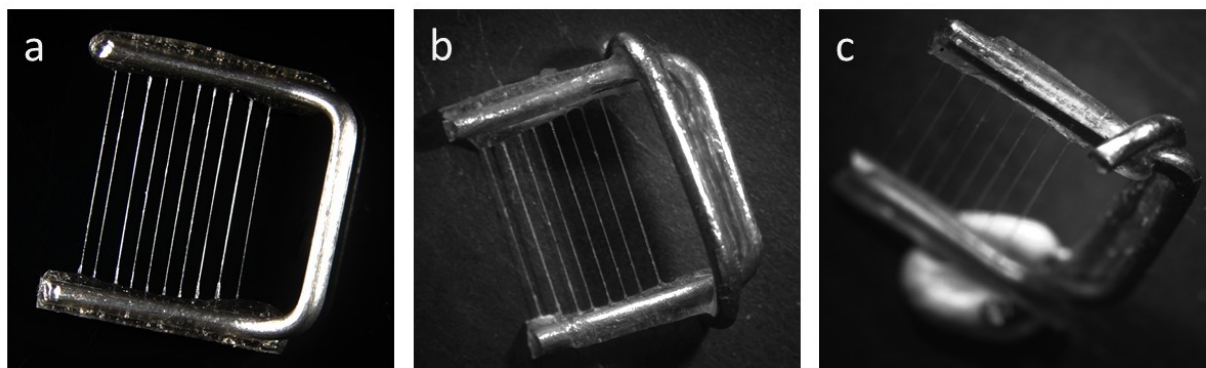


Abbildung 8 Anpassung der Haltegitter

- a) Die ursprüngliche Form des Gitters aus medizinischem Edelstahldraht und Nylonfäden liegt flach auf der Glasunterlage.
- b) Der zusätzlich angebrachte Bügel ermöglicht das Festklemmen auf einer PDMS-Unterlage.
- c) Die Enden des Drahtes sind auf der Unterseite umgebogen und umfassen im Versuch die PDMS-Unterlage.

Rund um die zentrale Hauptkammer wurde ein ca. 2 cm hoher röhrenförmiger Kunststoffaufsatz mit Vakuumpfett befestigt. Der Aufsatz wurde auf der Vorderseite in einem Winkel vom 45° abgeschrägt und mit einem halbierten Deckglas mit passendem Durchmesser über die halbe Länge verschlossen. Dieser Aufsatz erhöht das Volumen der Hauptkammer. Durch den oberen, unverschlossenen Bereich konnte mit dem MEA das Gewebe erreicht werden (Abbildung 9). Diese Anpassung wurde nötig, nachdem sich herausstellte, dass die Neigung des Mikroskops zur Verschlechterung der optischen Eigenschaften führte. An der Phasengrenze zwischen Luft und Flüssigkeitsoberfläche traten in Folge starke Verzerrungen und Spiegelungen auf. Durch das Anbringen des Deckglases und die daran adhärierende Flüssigkeitssäule innerhalb der Hauptkammer wurde der Winkel kompensiert und die optischen Eigenschaften deutlich verbessert (siehe Abbildung 10).

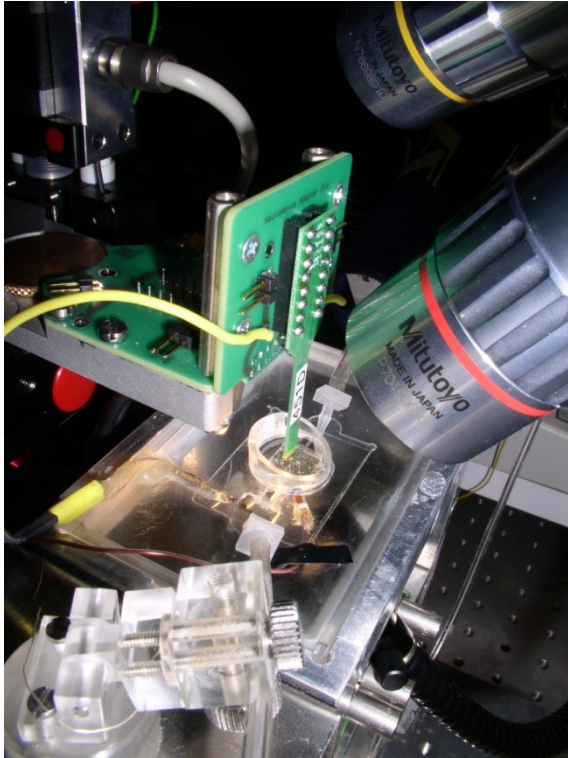


Abbildung 9 Badkammer im Versuchsaufbau während eines Versuches

Die Gewebeprobe befindet sich in der Hauptkammer der Badkammer. Der winkelförmige Elektrodenhalter (grün) ist auf einen Schlitten montiert, der durch die automatischen Mikromanipulatoren bewegt werden konnte. An der Vorderseite wird das MEA aufgesteckt. Durch die Öffnung in der Badkammer kann das Gewebe erreicht werden. An der rechten Seite ragt das Objektiv des Mikroskops, durch das die optische Kontrolle erfolgt, in das Bild. Zwischen Objektiv und MEA ist der Eingang des Perfusionssystems zu erkennen. Am unteren linken Bildrand befindet sich die Halterung des Perfusionssablaufes.

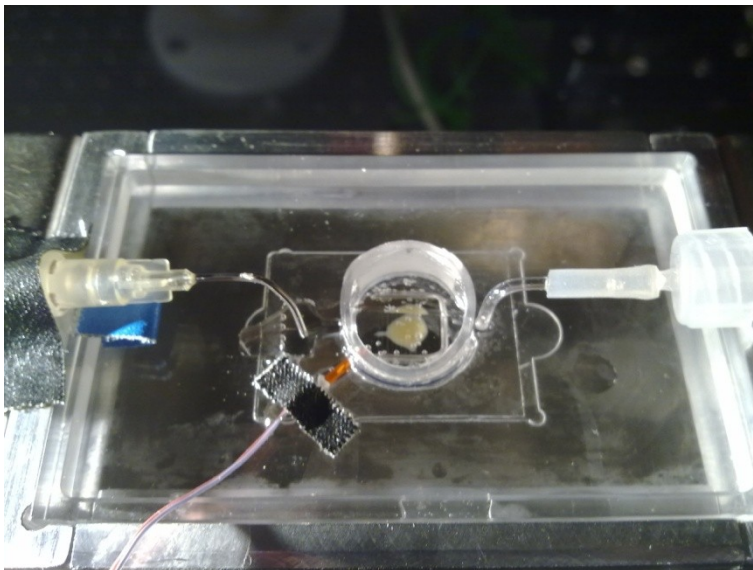


Abbildung 10 Badkammer mit Aufsatz auf der Hauptkammer

Der röhrenförmige Aufsatz um die Hauptkammer erhöht das Volumen. Der vordere Bereich des Aufsatzes ist im 45° Winkel abgeschrägt und mit einem Deckglas verschlossen. Die optischen Eigenschaften werden dadurch deutlich verbessert. Rechts und links der Badkammer befinden sich der Zu- und Ablauf der Perfusion.

3.3.3 Perfusionssystem

Das Gewebe innerhalb der Badkammer wurde während der laufenden Versuche kontinuierlich mit temperiertem (32°C) und oxygeniertem Ames-Medium perfundiert (Durchflussrate= 3ml/min). In einem Vorratsbehälter wurde das Ames-Medium durch eine Keramikfritte mit einer Mischung aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid angereichert (Carbogen Lab, Linde AG Gases Division). Mittels einer Schlauchpumpe (REGLO Digital, Ismatec) wurde die Nährlösung durch ein Schlauchsystem in die Badkammer befördert und

am Auslass der Badkammer abgesaugt. Die Lösung innerhalb der Schläuche wurde durch feine Silberdrähte geerdet, um den Eintrag von externen Störsignalen zu verhindern. Vor dem Erreichen der Badkammer, wurde die Lösung in einem Perfusionsheizgerät (ThermoClamp 1, AutoMate Scientific Incorporated) auf 32°C erwärmt. Die Temperatur der Badlösung wurde permanent mit einem Temperatursensor kontrolliert und durch die Steuereinheit automatisch angepasst (siehe Abbildung 11).

Zur Unterstützung der Perfusionsheizung wurden Heizfolien auf den Seitenteilen des zentralen Messturms aufgeklebt und mittels einer Konstantstromquelle (ES 015-10, Delta Elektronika) angesteuert. Die Erwärmung der Metallteile im Umfeld der Badkammer stabilisierte die Temperatur des Gewebes, da Schwankungen in der Außentemperatur abgefangen werden konnten. Der Schlauch der Perfusion wurde in einer Wendel an den Heizfolien vorbeigeführt und die Nährlösung im Vorbeiströmen vorgewärmt. Dadurch wurde einer übermäßigen Erhitzung der Lösung durch die Perfusionsheizung vorgebeugt.

Die Temperaturen im Umfeld der Badkammer wurden mehrmals, vor allem nach Umbauten des Versuchsaufbaus, kontrolliert.

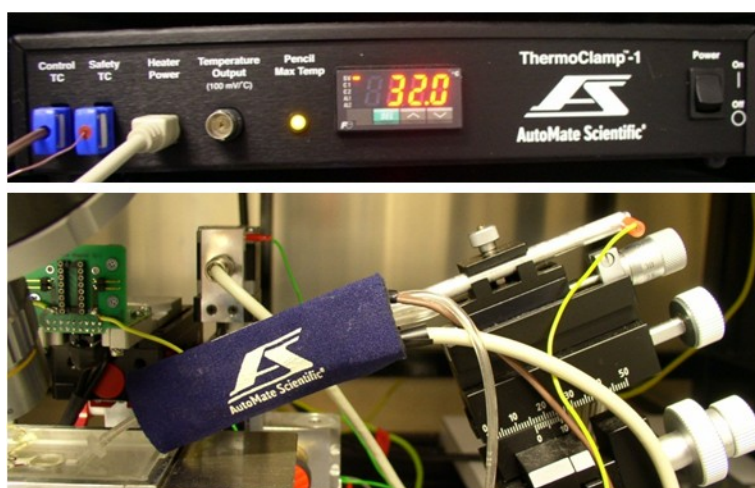


Abbildung 11 Perfusionsheizung

Oben: Über die Steuereinheit der ThermoClamp™-1 Perfusionsheizung kann die Temperatur des Mediums in der Badkammer kontrolliert und verändert werden.

Unten: Der Heizstift der Perfusionsheizung erwärmt das Medium unmittelbar vor Eintritt in die Badkammer auf die vorgewählte Temperatur.

3.4 Pharmakologie

In einigen Versuchen wurde das extrazelluläre Medium durch den Zusatz von Pharmaka verändert, um die physiologische Reaktion der Retina zu untersuchen. Neben der Veränderung der Kaliumkonzentration wurde in einigen Experimenten der AMPA/Kainat-Rezeptorantagonist CNQX verwendet.

3.4.1 Hochkaliumhaltiges Ames-Medium

Um die Reaktion der retinalen Ganglienzellen auf die Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu untersuchen, wurde die Ames-Lösung in einigen Versuchen durch Ames mit erhöhtem Kaliumgehalt ersetzt. Für diese Versuche wurde der standardisierten Ames-Lösung eine entsprechende Menge Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) zugesetzt. Es

wurden Kaliumkonzentrationen von 1-100 mmol/l verwendet. Die Konzentrationen sind bei der Darstellung der Ergebnisse angegeben. Die Lösungen wurden über die Perfusionspumpe in die Badkammer appliziert.

3.4.2 Synaptische Blockade durch 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)

Nach der erfolgreichen Stimulation in der Retina sollte experimentell untersucht werden, ob die beobachteten Antworten durch eine direkte Stimulation der Ganglienzellen oder durch Stimulation tieferer Strukturen hervorgerufen wurden. Hierzu sollte die synaptische Übertragung zwischen den Bipolar- und den Ganglienzellen blockiert werden. Dies geschah experimentell über den Einsatz des kompetitiven AMPA/Kainat Rezeptor-Antagonisten 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). Die Aliquots für die CNQX-Experimente wurden unmittelbar vor dem Einsatz aus einer Stammlösung (20 mmol/l) angesetzt. Diese wurde bei -20°C gelagert. Die Applikation erfolgte entweder über die Perfusionspumpe (Fließrate: 3 ml/min oder 5 ml/min) oder durch den raschen Austausch der Badlösung mittels einer Pipette. Es wurden CNQX-Konzentrationen zwischen 5 µmol/l und 1 mmol/l eingesetzt.

3.5 Extrazelluläre Ableitungen mit Glaselektroden

Vor dem geplanten Einsatz der Multielektrodenarrays sollte die Funktionalität des Versuchsaufbaus überprüft werden. Der physiologische Zustand des präparierten Gewebes wurde durch extrazelluläre Ableitungen der Ganglienzellen mit einfachen Glaselektroden überprüft.

3.5.1 Herstellung von Glaselektroden

Die Glaselektroden wurden aus Glaskapillaren (Borosilicate glass #BF150-86-10, Sutter Instruments) mit einem laserbasierten Pipetten-Zieh-Gerät (P-2000, Sutter Instruments) gezogen. Der Spitzendurchmesser der Glaselektroden betrug 1-10 µm. Anschließend wurde die Kapillare über der Flamme eines Bunsenbrenners im 90° Winkel abgebogen. Diese Modifikation war vonnöten, um den Abstand zwischen Mikroskop und Gewebe ausreichend verkleinern zu können. Die Kapillare wurde mit Hilfe einer flexiblen Kunststoffspritze mit Medium gefüllt. Der Kontakt zum Vorverstärker wurde mit einem Silber-/Silberchloriddraht über einen Elektrodenhalter hergestellt. Die angewinkelte Messelektrode wurde mit dem Vorverstärker verbunden (siehe Abbildung 12).

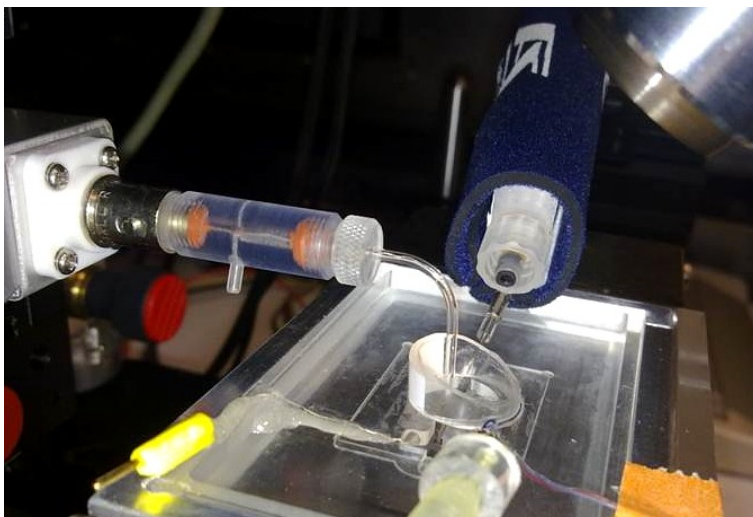


Abbildung 12 Gebogene Glaselektrode zur extrazellulären Ableitung.

Die Glaselektrode mit dem Elektrodenhalter steckt in der Headstage des Verstärkersystems (linker Bildrand). Die im rechten Winkel abgebogene Messelektrode ermöglicht die Positionierung des Objektivs (oberer rechter Bildrand) in ausreichender Nähe zur Ableitkammer.

3.5.2 Datenerfassung der Einzelelektrodenableitungen

Die extrazellulär abgeleiteten Signale wurden mit einem Verstärkersystem (EXT-01F/2, npi electronic GmbH) zehnfach vorverstärkt und im Hauptverstärker 1000-fach endverstärkt. Das Signal wurde hardwareseitig gefiltert (100 Hz-20 kHz). Die Digitalisierung erfolgte über einen analogen Eingang des Datenerfassungssystems (Bioamp RZ-5, Tucker Davis Technologies) mit einer Abtastrate von 3 kHz. Die digitalisierten Daten wurden auf einer Festplatte gespeichert. Bei Bedarf wurde das Rohsignal mit Softwarefiltern erneut gefiltert.

3.6 Extrazelluläre Ableitungen mit penetrierenden Multielektrodenarrays

Für die extrazellulären Ableitungen und Stimulationen in der Retina kamen zwei unterschiedliche MEA-Typen zum Einsatz. Für die Vorversuche wurden Standard-MEAs der Firma Neuronexus (A2x2-tet-3mm-150-150-121) verwendet. Aufgrund ihrer Architektur eigneten sie sich nur bedingt für die geplanten Versuche. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem zweiten Schritt individuelle penetrierende MEAs geplant und von der Firma Neuronexus gefertigt. Insgesamt kamen 16 dieser MEAs wiederholt zum Einsatz. Im Anschluss an die Versuche wurden die MEAs über Nacht in handelsüblichem Kontaktlinsenreiniger (imed enzyme, Speedy GmbH) gereinigt und anschließend mit 70% Isopropanol und destilliertem Wasser gespült. Die detaillierte Beschreibung dieser MEAs findet sich im Ergebnisteil (siehe Kapitel 4).

Die extrazellulären Signale wurden mit einem Datenerfassungssystem der Firma Tucker Davis Technologies (RZ-5 Bioamp Processor & RX-8 Multi I/O Processor, Tucker Davis Technologies) aufgezeichnet (Abbildung 13). Die MEAs wurden mit einem eigens entwickelten Adapter mit der Headstage (SH-16, Tucker Davis Technologies) verbunden. Die analogen Signale wurden hardwareseitig gefiltert (Bandpass: 2,2 Hz – 7,5 kHz), zehnfach vorverstärkt, in einem Analog/Digital-Konverter (Medusa RA16PA, Tucker Davis Technologies) digitalisiert (Abtastrate: 12 kHz) und zum Datenerfassungssystem gesendet.

Die Kommunikation zwischen dem Datenerfassungssystem und dem PC wurde mittels einer speziellen PCI Karte (PO5 PCI Interface Card w/optics, Tucker Davis Technologies) realisiert. In der Regel wurden die Daten ohne erneute Softwarefilterung digital gespeichert. Bei Bedarf wurden die Signale zusätzlich gefiltert (300 Hz – 5 KHz) und dann gespeichert. Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der Verschaltungen des Versuchsaufbaus



Abbildung 13 Datenerfassungssystem Tucker Davis Technologies

Das Datenerfassungssystem besteht aus dem DSP-gesteuerten RZ-5 von TDT, mit dem die 16-Kanäle des MEAs aufgezeichnet werden. Die Ansteuerung der elektrischen und optischen Stimulation wird über die analogen Ausgänge der RX-8 Multi-I/O Prozessor-Einheit gesteuert.

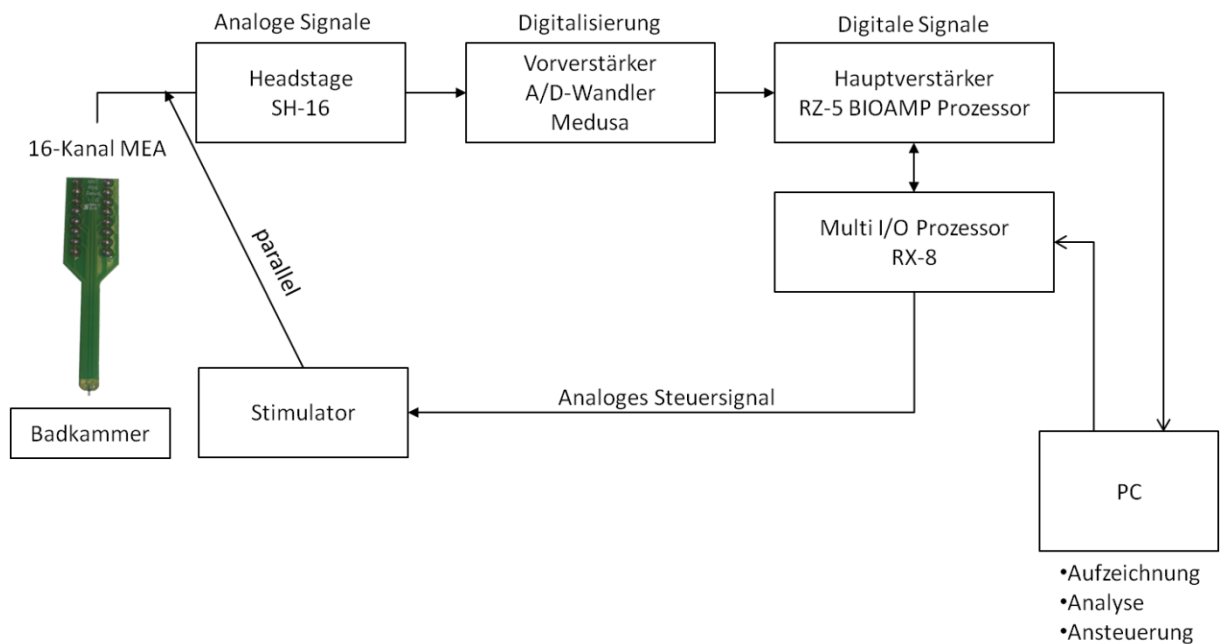


Abbildung 14 Blockdiagramm der Verschaltungen des Versuchsaufbaus

Das Blockdiagramm zeigt die Verschaltungen der elektronischen Komponenten des Versuchsaufbaus. Die elektrische Aktivität der Ganglienzellen wird mit dem MEA innerhalb der Badkammer aufgezeichnet. Das MEA ist direkt mit der Headstage des Verstärkersystems verbunden. Das analoge Signal wird im Vorverstärker 10-fach verstärkt und digitalisiert. Die digitalen Signale werden über den RZ-5 Bioamp Prozessor endverstärkt und an den PC gesendet. Über die analogen Ausgänge des RX-8 Multi I/O Prozessors werden die Stimulationspulse zum Stimulator gesendet. Der Stimulator ist parallel zur Headstage auf das MEA verschaltet. Über den PC werden die extrazellulären Signale aufgezeichnet und analysiert. Die Ansteuerung der Stimulation erfolgt ebenfalls über die grafische Benutzeroberfläche in der Software.

In einem zweiten Datenstrom wurden gesondert Aktionspotentiale aufgezeichnet, deren Amplitude eine definierte Schwelle überschreiten. Der Wellenverlauf der Aktionspotentiale wurde 2,5 ms nach und 2,5 ms vor dem Schwellendurchtritt mit hoher Abtastrate (24,4 kHz) aufgezeichnet. Die Ableitungen konnten während der laufenden Versuche über eine programmierte Benutzeroberfläche visualisiert und gesteuert werden (siehe Abbildung 15).

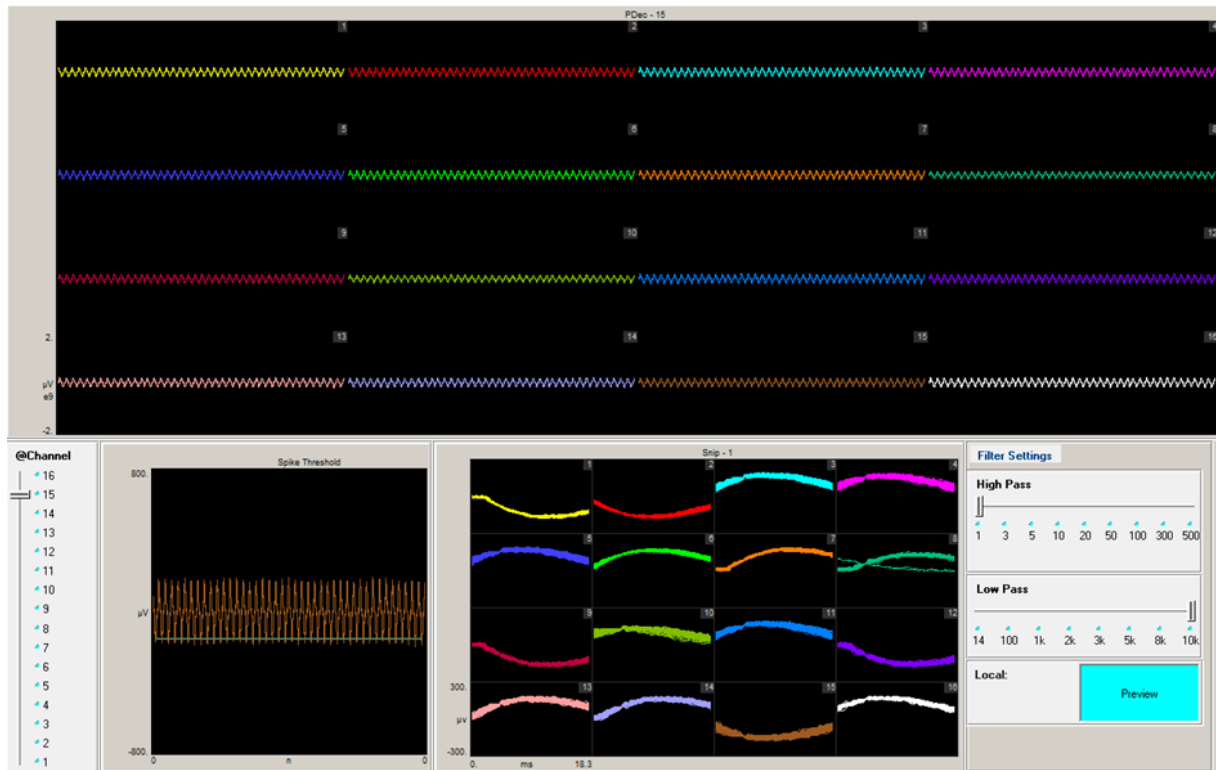


Abbildung 15 Grafische Benutzeroberfläche der Ableitsoftware

Oben: Die grafische Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware stellt alle 16 Verstärkerkanäle während der Ableitung grafisch dar.

Unten: Von links nach rechts finden sich der Reihe nach folgende Steuerungselemente: Wahlschalter zum Anwählen eines Kanals, der in dem benachbarten Fenster detailliert betrachtet werden kann. In dem Fenster wird ebenfalls die Schwelle für die Detektion einzelner Aktionspotentiale festgelegt. Die gesammelten Ausschnitte von Aktionspotentialen werden in die 16 Felder rechts daneben geschrieben. Über die Regler unten links können die Grenzen für den Hochpass- und den Tiefpassfilter gewählt werden.

3.7 Optische Stimulation

Um die Photorezeptorzellen in der Retina optisch zu stimulieren, wurde eine warmweiße 5mm LED (YI-WS5 Golden White, YOLDAL Co., LTD.) unterhalb der Badkammer in den Messaufbau integriert (Abbildung 16). Der Lichtkegel der LED wurde so ausgerichtet, dass über die gesamte Fläche der Retina eine gleichmäßige Ausleuchtung gewährleistet war. Angesteuert wurde die LED durch einen analogen Ausgang des Datenerfassungssystems RZ-5. Die Ausgänge lieferten eine maximale Spannung von 10 V und einen maximalen Strom von 20 mA. Dies war ausreichend, um die LED in ihrem gesamten Arbeitsbereich anzusteuern. In die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware wurde ein Pulsgenerator integriert, mit dem unterschiedliche Stimulationsparameter realisiert werden konnten. Die Integration der LED-Ansteuerung in die bestehende Software bot den Vorteil, dass alle Parameter der durchgeführten optischen Stimulationen zusammen mit den extrazellulären Daten gespeichert werden konnten. Die Stärke der einzelnen Lichtpulse betrug ca. 2000 lux.

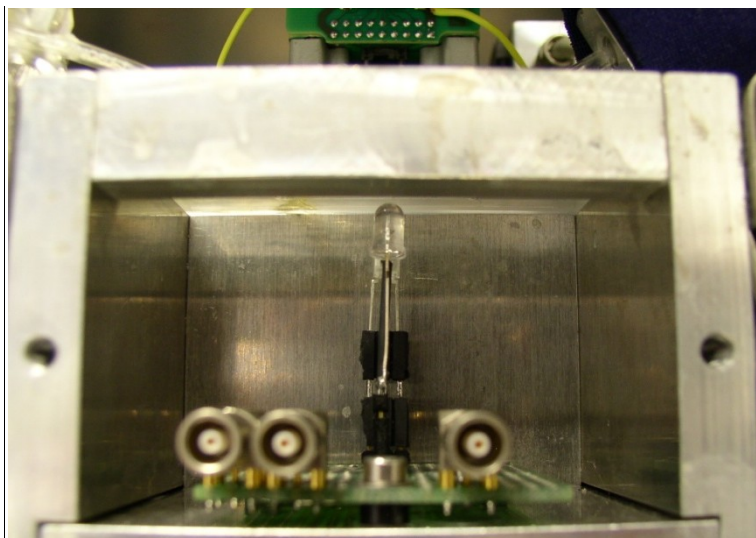


Abbildung 16 Warmweiße LED zur optischen Stimulation

Die LED zur optischen Stimulation befindet sich direkt unterhalb des Gewebes in der Badkammer. Der Lichtkegel leuchtet das Gewebe über die gesamte Auflagefläche aus. Die Ansteuerung erfolgt über die analogen Ausgänge des Tucker-Davis Verstärkersystems.

3.8 Elektrische Stimulation

Um die tieferen Zellschichten der Retina zu stimulieren und gleichzeitig extrazelluläre Signale an den Ganglienzellen abzuleiten, war es nötig, ein System aufzubauen, mit dem Beides mit minimalen Einschränkungen durchzuführen ist. Da zu Beginn dieser Arbeit nicht abzusehen war, welcher Neurostimulator die besten Ergebnisse liefern würde, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Ansätze verfolgt. Insgesamt kamen drei verschiedene Geräte zum Einsatz.

3.8.1 Tucker-Davis Technologies MS 16 Stimulus Isolator

Zu Beginn der Arbeit wurde ein 16-Kanal Stimulator der Firma Neuronexus verwendet, der sich direkt in das bestehende Messsystem integrieren ließ (MS16 16-Channel Stimulus Isolator, Tucker Davis Technologies). Der Vorteil dieses Systems war die Kompatibilität mit einer frei schaltbaren Headstage (SH16 16-Channel Switchable Headstage, Tucker Davis Technologies), die es ermöglichte Messkanäle und Stimulationskanäle frei auf die vorhandenen Messelektroden zu verschalten. Der Stimulationsstrom wurde durch eine aufladbare Batterie geliefert (NC48 Battery Pack, Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Dieser kommerzielle Stimulator ist in der Lage, abhängig von der Impedanz der Elektroden, eine maximale Stromstärke von 10 μA zu liefern.

Die Steuerung der Stimulationsparameter sowie die Auswahl der Stimulationskanäle erfolgte direkt über eine selbstprogrammierte Benutzeroberfläche in der mitgelieferten Entwicklungssoftware (TDTSys 3 OpenEx RpvdsEx & OpenEx Controller, Tucker Davis Technologies). Über diese lassen sich Parameter wie Form, Stromstärke, Länge, Abstand und Wiederholrate für einen Stimulationspuls definieren (siehe Abbildung 17). Es stellte sich im Laufe der ersten Versuche heraus, dass das Gerät aufgrund der Entstehung großer Artefakte und langer Latenzzeiten in Kombination mit den verwendeten MEAs nur eingeschränkt genutzt werden konnte. Das Einschalten des Stimulators verursachte niederfrequente

Artefakte, die vermutlich über die dicht beieinanderliegenden Zuleitungen auf dem MEA durch Induktion in das System eingetragen wurden. Mit diesem Stimulatorsystem wurden keine verwertbaren Ergebnisse erzielt.

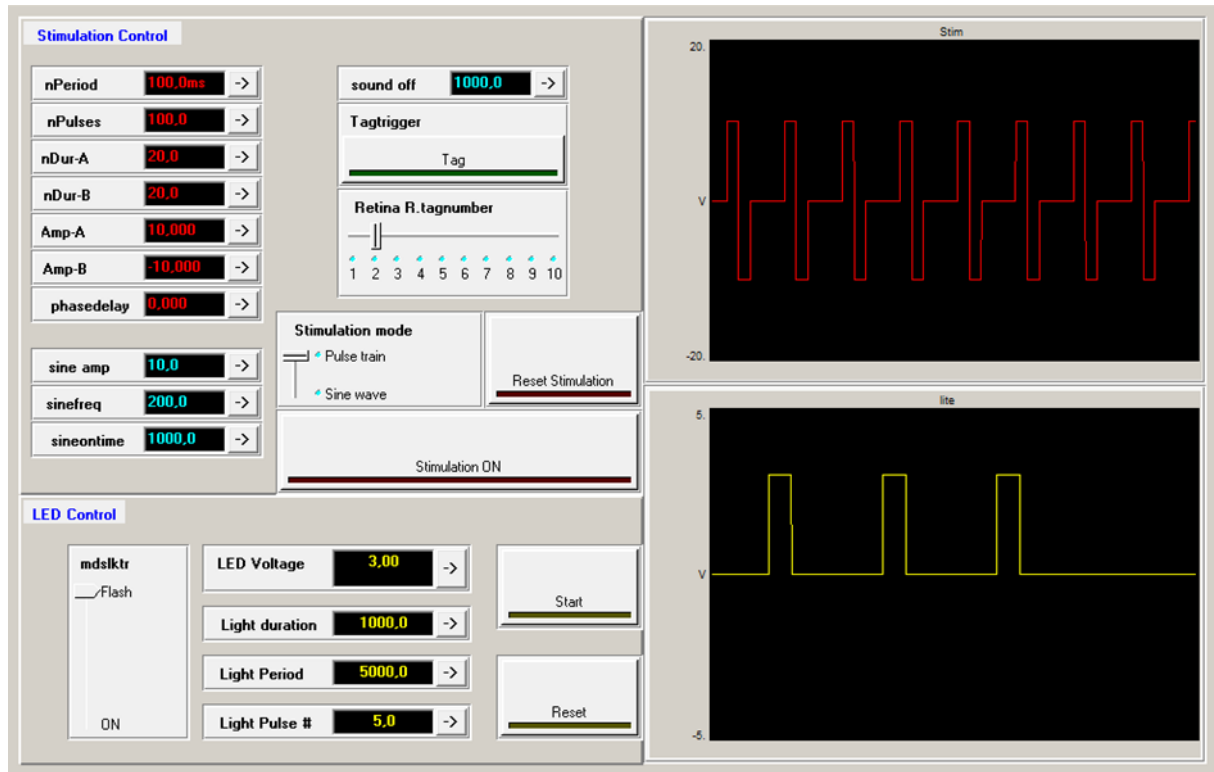


Abbildung 17 Grafische Benutzeroberfläche der Stimulationssoftware

Die grafische Benutzeroberfläche wurde in der TDT-Sys 3 Controller Entwicklungssoftware programmiert. Sie erlaubt die Anpassung der Parameter der elektrischen Stimulation für rechteckige und sinusförmige Stimulationspulse. Ebenfalls können Stimulationsmuster für die optische Stimulation programmiert werden. Die Stimulationsmuster für die elektrische (rot) und optische (gelb) Stimulation werden während der Versuche in den Kontrollfenstern auf der rechten Bildseite in Echtzeit visualisiert.

3.8.2 Eigenentwickelter strombasierter Neurostimulator

Aufgrund der großen Artefakte des oben beschriebenen Stimulationsgerätes wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentralinstitut für Elektronik im Forschungszentrum Jülich (ZEA-2) ein Prototyp eines Neurostimulators (Schloesser *et al.*, 2013) entwickelt (Abbildung 18).

Der Stimulator funktioniert nach dem Prinzip eines Spannungs-Strom-Wandlers (Abbildung 19). Der Stimulator wurde durch ein analoges Signal über die Ausgänge des TDT-Verstärkersystems angesteuert. Die Ausgänge des TDT RZ-5-Verstärkers wurden direkt über die Softwareoberfläche angesteuert. Der Stimulator wandelt eine Eingangsspannung von 1 V in einen Ausgangstrom von 1 μ A. In Abhängigkeit der verwendeten Elektrode erhöht der Stimulator die Ausgangsspannung solange, bis zwischen Stimulationselektrode und Referenzelektrode ein Strom von exakt 1 μ A fließt. Der maximale Strom ist durch die

maximale Ausgangsspannung der analogen Ausgänge des Steuerungssystems limitiert. Im vorliegenden Fall waren dies $\pm 10\text{ V}$, was einer maximalen Stromstärke von $10\text{ }\mu\text{A}$ entspricht. Die Betriebsspannung des Stimulators wurde durch handelsübliche 9 V Blockbatterien gespeist. Der Stimulationstrom wurde von einer separaten Batterie geliefert. Die eingehenden Spannungssignale wurden durch optische Koppler am Geräteeingang gewandelt. Somit konnte das Gerät, galvanisch getrennt von externen Komponenten, betrieben werden. Die Ausgänge des Stimulators wurden parallel zu den Stimulationselektroden geschaltet. Die Experimente, bei denen der strombasierte Neurostimulator zum Einsatz kam finden sich in den Kapiteln 5.6.1, 5.6.2, 5.6.3, 5.6.4, 5.6.5, 5.6.6 & 5.6.9.

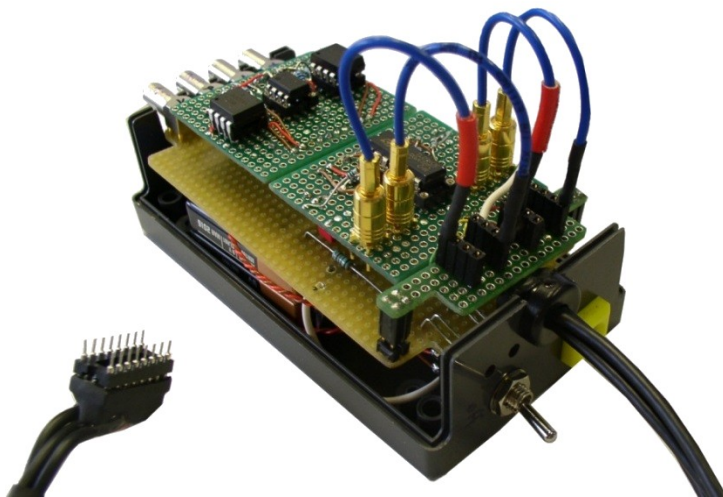


Abbildung 18 Prototyp des 2-Kanal Neurostimulators

Über die vier analogen Eingänge (links oben) wird der Stimulator angesteuert. Die eingespeiste Spannung wird in einen konstanten Strom gewandelt, der über die Stimulations-elektrode fließt. Die freie Verkabelung ermöglicht es, die Stimulationselektroden einfach per Hand umzustecken.

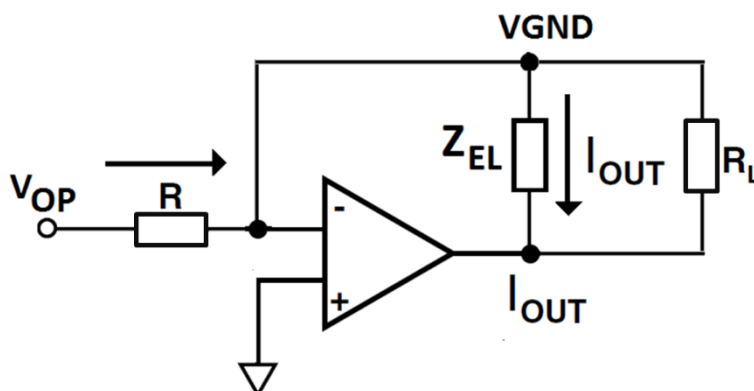


Abbildung 19 Schematischer Schaltplan des Neurostimulators

Das Eingangssignal wird über optische Koppler gewandelt und gelangt als V_{OP} in den invertierenden (-) Eingang des Operationsverstärkers. Dieser reguliert den Strom I_{OUT} , der über die Elektrode Z_{EL} fließt. Über den Widerstand R_L können akkumulierte Ladungen der Stimulationselektroden nach der Stimulation abfließen.

3.8.3 Funktionsgenerator Keithley 3390

Neben den zwei obengenannten strombasierten Stimulationsansätzen wurde alternativ eine einfache spannungsbasierte Stimulation durchgeführt. Dieser Stimulationsansatz ermöglichte es, bewusst Spannungen zu erzeugen, die den sicheren Spannungsbereich verlassen. Hierzu wurde der Ausgang eines Funktionsgenerators (Keithley 3390 Function Generator, Keithley Instruments) direkt an die Stimulationselektrode angeschlossen. Mit dem Funktionsgenerator konnten Spannungen bis zu ± 10 V erzeugt werden. Die Ansteuerung erfolgte manuell oder über ein synchronisiertes Signal des TDT-Verstärkersystems. Auf diese Weise konnte die Stimulation über die Softwareoberfläche gesteuert und die Parameter der Stimulationspulse automatisiert gespeichert werden. Mit dem Funktionsgenerator wurden Rechteckpulse und sinusförmige Spannungsfolgen erzeugt. Die Experimente, bei denen der Funktionsgenerator zum Einsatz kam, finden sich in den Kapiteln 5.6.2, 5.6.6, 5.6.7, 5.6.8 & 5.7.

3.8.4 Stimulationsparameter

Wie oben beschrieben, wurden im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Stimulationssysteme verwendet. Neben stromdefinierten Spannungspulsen wurden Pulsformen mit definierten Spannungen getestet. Die Stimulationspulse sollten aus einem symmetrischen bipolaren Puls mit kathodischer und anodischer Phase bestehen.

Insgesamt wurden folgende Parameter variiert: Amplitude der Phasen, Länge der Phasen, Latenzzeit zwischen erster und zweiter Phase. Die Abfolge der kathodischen und anodischen Phasen konnte variiert werden. Neben rechteckigen Pulsformen wurden auch sinusförmige Stimulationspulse unterschiedlicher Frequenz getestet. Die Stimulationsparameter konnten mit der eigens programmierten Benutzeroberfläche angepasst werden. Theoretische Überlegungen zu den verwendeten Stimulationsformen wurden in Kapitel 2.9 angestellt.

3.9 Datenanalyse

Das Ziel der verwendeten Datenanalyse war es, die Stimulationseffekte auf die extrazellulär abgeleiteten Ganglienzellen statistisch zu überprüfen. Die auftretenden Aktionspotentiale wurden mit einem Schwellenwertdetektor (siehe unten) als Ereignisinformation extrahiert. Im Weiteren dienten die zeitlichen Abstände zwischen den auftretenden Aktionspotentialen zur Erstellung von Verteilungshistogrammen. Die Verteilungen für einen definierten Zeitraum vor und nach der Stimulation wurden mit einem geeigneten statistischen Test auf Veränderungen überprüft. Ein etwaiges erhöhtes Auftreten von Aktionspotentialen nach einer Stimulation konnte so detektiert und entsprechend als Effekt gewertet werden. Die extrazellulären Signale wurden zeitgleich mit der Aufnahme in einem separaten Kanal der TDT-Software analysiert und während des Versuches visualisiert. Die Rohdaten aller Kanäle konnten zeitgleich dargestellt und überwacht werden. Vom aktiven Kanal wurden darüber hinaus die mittlere Feuerrate und eine Detailansicht auftretender Aktionspotentiale zeitgleich dargestellt. Die Aktionspotentiale wurden über einen Schwellendetektor direkt in

einem separaten Kanal (25 kHz Abtastrate) dargestellt. Diese Daten wurden ausschließlich für die vorläufige Analyse während laufender Versuche genutzt.

Alle weiterführenden Auswertungen wurden mithilfe eigens programmierter Skripte in Matlab (Version R2012b, MathWorks) durchgeführt. Hierzu wurden zuerst die vom TDT-System aufgezeichneten Rohdaten importiert. Die verwendeten Skripte finden sich im Anhang dieser Arbeit. Ausgehend von diesen Rohdaten der 16 simultan aufgezeichneten Kanäle wurden weitere Analysen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

3.9.1 Auswertung auftretender Aktionspotentiale

Für die Auswertung von Ereignisinformationen (englisch: *events*) wurden die Rohdaten mit einem Bandstopppfilter (33-74 Hz) gefiltert, um Störungen durch die Netzspannung zu entfernen. Ein zusätzliches Tiefpassfilter (3000 Hz) wurde eingesetzt, um hochfrequente Störungen aus dem Signal zu entfernen. Das so gefilterte Signal enthielt alle relevanten Frequenzen, die für die zeitliche Analyse von Aktionspotentialen benötigt werden. Anschließend wurden mit einem selbstprogrammierten Schwellenwertdetektor alle Potentiale, die die zuvor gewählte Spannungsschwelle (in positiver oder negativer Richtung) überschreiten, ermittelt. Die Schwellenwerte variierten in Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses der einzelnen Ableitungen. Die Schwelle wurde optisch so gelegt, dass möglichst alle Aktionspotentiale die Schwelle erreichen, ohne dass diese im Grundrauschen liegt. Im Vorfeld wurde bestimmt, ob es sich um negative oder positive Ausschläge handelt. Beim Durchlauf des Potentials durch die Schwelle wurde der relative Zeitpunkt innerhalb der Ableitung gespeichert. Die Zeitmarken (englisch: *timestamps*) auftretender Potentiale wurden der Reihe nach in einem Vektor gespeichert. Die für diese Arbeit programmierte Routine nimmt eine Refraktärzeit von mindestens 1 ms nach einem aufgetretenen Ereignis an. Das bedeutet, dass zwei aufeinanderfolgende Ereignisse in einem zeitlichen Abstand von mindestens 1 ms auftreten müssen, um als getrennte Ereignisse gezählt zu werden. Dies trägt der minimalen Refraktärzeit eines Neurons Rechnung, in der es ohnehin nicht zur Ausbildung eines neuen Aktionspotentials kommen kann. Von allen kürzeren Abständen zwischen detektierten Ereignissen, kann angenommen werden, dass sie nicht biologischen Ursprungs sind.

3.9.2 Mittlere Frequenz der Aktionspotentiale

Die mittlere Frequenz gibt die gemittelte Häufigkeit auftretender Aktionspotentiale über den Verlauf einer Ableitung in Ereignissen pro Sekunde an (Hz). Der zu untersuchende Teil der Ableitung wird in definierte kleinere Abschnitte unterteilt (englisch: *bins*). Nacheinander werden alle Ereignisse innerhalb dieser Abschnitte gezählt und anschließend auf eine Länge von einer Sekunde normiert. Beispielsweise ergeben 100 auftretende Potentiale in fünf Sekunden für jede der einzelnen Sekundenabschnitte des beobachteten Abschnitts eine mittlere Frequenz von 20 Hz. Aus der Beobachtung der mittleren Frequenz können spontane sowie langfristige Veränderungen der neuronalen Aktivität abgelesen werden.

3.9.3 Interevent-Intervall-Histogramm

Das Interevent-Intervall-Histogramm (IEIH) ist eine grafische Darstellung der Intervalle zwischen aufeinanderfolgenden Ereignissen (englisch: *inter-event intervals*= IEIs) innerhalb einer Ableitung (siehe Abbildung 20). Die X-Achse wird unterteilt in eine zuvor ausgewählte Anzahl von Zeitfenstern zwischen 0 und einem festgelegten Maximalwert (englisch: *bins*). Die IEIs werden aufgrund ihrer Länge auf diese bins verteilt und deren Anzahl auf der Y-Achse aufgetragen. Die Größe der bins legt fest, mit welcher Schärfe die unterschiedlichen IEIs voneinander getrennt werden. Kommt ein bestimmtes IEI in besonderer Häufung vor, ist dies im Histogramm durch eine spitze Verteilung gekennzeichnet. Feuert ein Neuron mit niedriger Frequenz, werden wenige Ereignisse im Histogramm eingezeichnet und die Verteilung bleibt flach. Nimmt die Feuerrate eines Neurons zu, treten vermehrt kurze IEIs und weniger lange IEIs auf. Die Verteilung wird dementsprechend in der Nähe der Y-Achse ihr Maximum annehmen. Die IEIHs, die im Ergebnisteil der elektrischen Stimulation gezeigt werden, sammeln auftretende Ereignisse in einem Bereich von zwei Sekunden vor sowie zwei Sekunden nach der Stimulation. Der Vergleich beider Histogramme macht die Veränderung der Aktivität der abgeleiteten Neurone sichtbar.

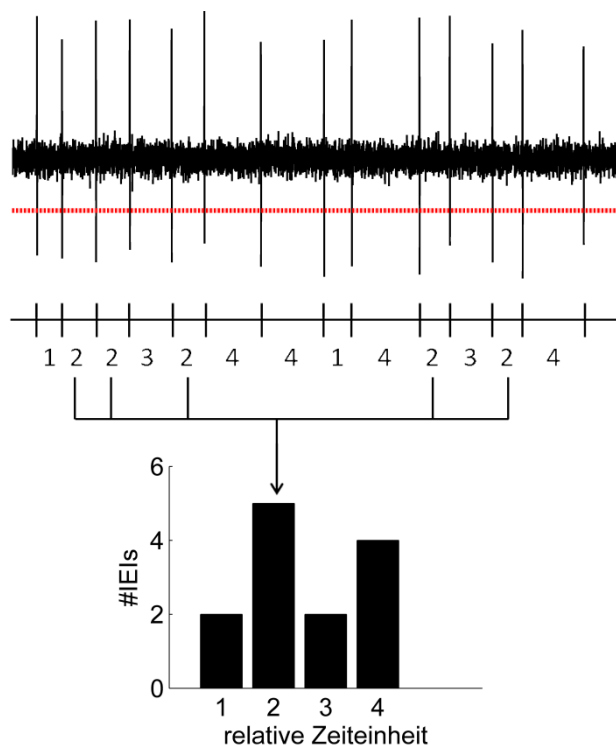


Abbildung 20 Berechnung eines Interevent-Intervall-Histogramms (IEIH)

Der obere Teil der Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Ableitungs-Spur. Alle Signale, die die definierte Schwelle (rot) erreichen, werden detektiert. Die Intervalle zwischen den Ereignissen werden bestimmt und in definierte Kategorien eingeteilt. In einem Histogramm werden die Intervalle gleicher Länge aufsummiert. Das gehäufte Auftreten eines spezifischen Intervalls führt zu einem entsprechenden Gipfel in der Verteilung.

3.9.4 Die empirische kumulative Verteilungsfunktion

Die empirische Verteilungsfunktion oder kumulative Verteilungsfunktion ist eine normierte Darstellung aller auftretenden Werte einer Stichprobe. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine empirische Größe X einen Wert kleiner oder gleich x annimmt:

$$F(x) = P(X \leq x)$$

Im konkreten Fall der Darstellung der Verteilungsfunktionen auftretender IEIs werden alle Werte der Größe nach sortiert und grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 21). Die Gesamtzahl aller Werte der Verteilung wird normiert und entspricht einem Wert von 1 auf der Y-Achse. Beginnend mit dem kleinsten Wert werden alle IEIs nacheinander auf der X-Achse aufgetragen. Der dazugehörige Y-Wert ist der Anteil eines Wertes an der Gesamtanzahl aller Werte. Aus dem Anstieg der Verteilungsfunktion kann z.B. abgelesen werden, wie viel Prozent aller IEIs größer oder kleiner als ein definiertes Intervall sind. Erhöht sich die Feuerrate eines Neurons, treten mehr kurze Intervalle auf. Die Verteilung ist steil und der Wert von 1 wird schnell erreicht. Treten neben kurzen Intervallen auch lange Intervalle auf, ist die Verteilung flacher. Vergleicht man beide Verteilungsfunktionen der IEIs eines Neurons vor und nach einer Stimulation, können Aussagen über den Erfolg der Stimulation gemacht werden. Eine statistische Überprüfung von Verteilungsfunktionen erfolgt durch den Kolmogorov-Smirnov-Test.

3.9.5 Der Kolmogorov-Smirnov-Test als Signifikanztest

Um den potentiellen Effekt einer Stimulation auszuwerten, wurden die vor und nach der Stimulation auftretenden IEIs auf statistische Abhängigkeit geprüft. Hierzu wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) verwendet (Massey, 1951). Dieser nichtparametrische Test überprüft die Wahrscheinlichkeit, dass die zu testenden Ereignisse aus derselben Verteilung stammen. Dieser Test bietet zwei entscheidende Vorteile: Er ist für kleine Stichprobengrößen geeignet und die untersuchten Zufallsvariablen müssen nicht normalverteilt sein.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass die Verteilungen auftretender Aktionspotentiale vor und nach erfolgreicher Stimulation voneinander abweichen. Bei erfolgreicher Stimulation wird die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese abgelehnt, wenn beide Stichproben aus unterschiedlichen Verteilungen stammen. Der KS-Test bestimmt hierzu die relativen Summenfunktionen beider Verteilungen und vergleicht die absoluten Differenzen. Die Prüfgröße d_{max} berechnet sich nach folgender Formel:

$$d_{max} = \max(|F_1(x) - F_2(x)|)$$

Die Nullhypothese wird bei einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ abgelehnt, wenn die Prüfgröße d_{max} den kritischen Wert d_{krit} überschreitet. Die kritischen Werte für den KS-Test finden sich im Anhang. Ergebnisse erhält man bereits für eine minimale Stichprobengröße $N_{min} \geq 4$. Die Berechnungen des KS-Tests in dieser Arbeit wurden mithilfe von Matlab (Funktion: `kstest2`) automatisiert vorgenommen.

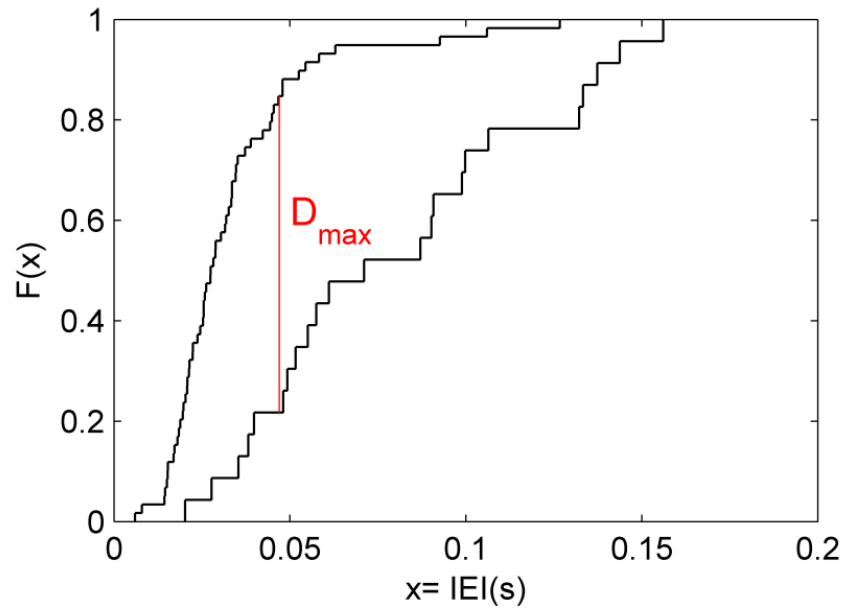


Abbildung 21 Vergleich der kumulativen Verteilungsfunktionen

Für die Darstellung der kumulativen Verteilungsfunktionen werden alle auftretenden IEIs ihrer Länge nach sortiert. Die Gesamtzahl der IEIs wird normiert und auf der Y-Achse aufgetragen. Die X-Achse gibt die Länge der IEIs an. Werden die Verteilungsfunktionen zweier Stichproben gemeinsam in einer Grafik dargestellt, können diese anhand ihrer Abweichungen verglichen werden. Der KS-Test bewertet die Unterschiedlichkeit beider Stichproben anhand der maximalen Differenz ($D_{\max}$) beider Verteilungen.

4 Penetrierende MEAs zur Stimulation und Ableitung in der Retina

Die Besonderheit des für diese Arbeit entwickelten penetrierenden MEAs ist die gleichzeitige Verwendbarkeit der Elektroden als Mess- und Stimulationselektroden. Dies stellt besondere Anforderungen an die technischen Eigenschaften der entwickelten Arrays.

Penetrierende MEAs wurden zuvor noch nicht in der Retina eingesetzt, so dass für diese Arbeit MEAs mit den folgenden Eigenschaften entwickelt werden sollten:

- Vereinfachte Penetration des Gewebes
- der Anatomie der Retina angepasste Elektrodengröße und -abstände
- Verwendbarkeit der Elektroden als Stimulations- und Messelektroden

Das Ziel war es, die Abstände der Elektroden so festzulegen, dass die Elektroden an der Spitze in der Nähe der Zellkörper der Bipolarzellen zum Liegen kommen. Die Elektroden, die am weitesten von der Spitze entfernt liegen, sollten als Messelektroden für extrazelluläre Ableitungen an den retinalen Ganglienzellen dienen. Abbildung 22 zeigt schematisch die gewünschte Position der penetrierenden MEAs in der extrahierten Retina. Details der geplanten MEAs wurden im Vorfeld mit Prof. Frank Müller (ICS-4, Forschungszentrum Jülich) diskutiert. In Absprache mit der Entwicklungsabteilung der Firma Neuronexus wurde ein MEA mit insgesamt 16 Mess- bzw. Stimulationselektroden aus Iridium auf einem 15 µm dicken Träger aus Silizium entwickelt und nach unseren Vorgaben gefertigt.

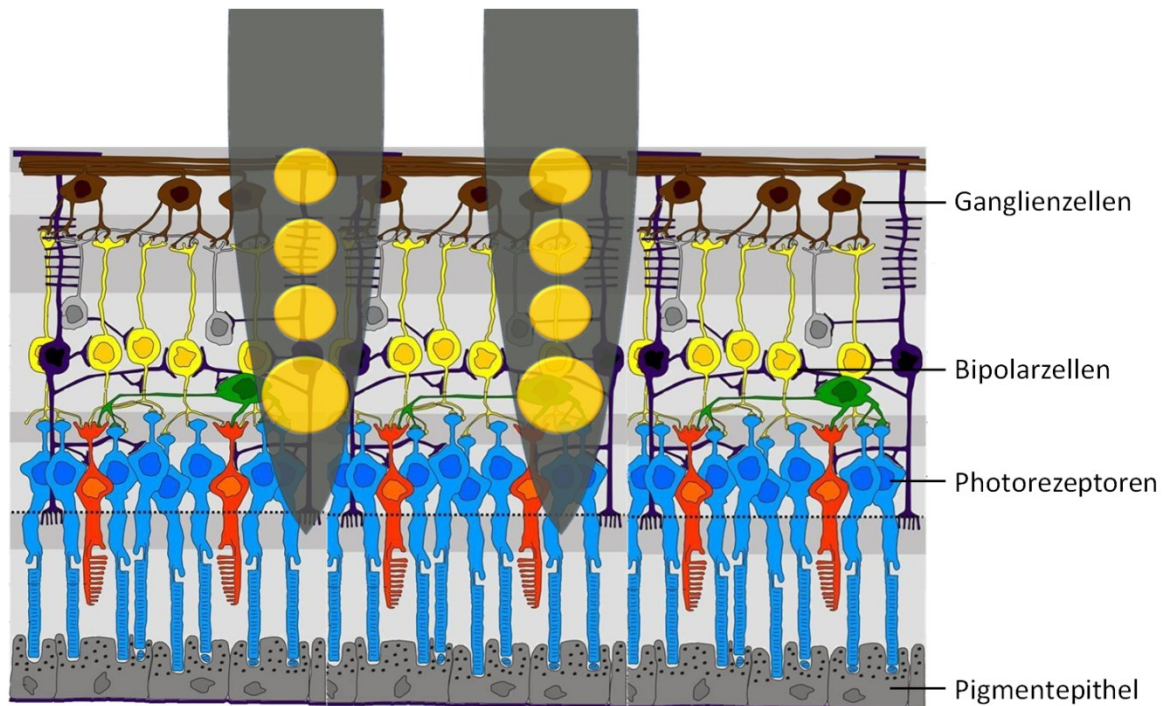


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Ableitung mit penetrierenden MEAs

Die Darstellung zeigt schematisch das penetrierende MEA in der endgültigen Position im Gewebe. Die MEAs werden so in der Retina positioniert, dass die vordersten Elektroden in der Nähe der Bipolarzellen zum Liegen kommen. Die obersten Elektroden werden in die Nähe der Zellkörper der Ganglienzellen positioniert. Über sie können die Aktionspotentiale der Ganglienzellen gemessen werden. Die große Elektrode wird als aktive Stimulationselektrode verwendet. Bei erfolgreicher Stimulation kann der Erfolg als Steigerung der Aktivitätsrate der Ganglienzellen über die oberen Elektroden gemessen werden. (Veränderte Abbildung nach: Hartmann, 2007)

Die äußere Form der entwickelten MEAs erinnert an vier parallel verlaufende Schwerter. Die Schwerter verfügen über eine Breite von 42 μm , verjüngen sich im vorderen Bereich auf ca. 1 μm und bilden eine scharfe Spitze, die die Penetration erleichtert. Der Innenwinkel der Spitze beträgt ca. 35°. Jedes Schwert hat eine Länge von 1000 μm von der Spitze bis zur Basis des Siliziumträgers. Der Abstand der Schwertspitzen zueinander beträgt 125 μm .

Jedes dieser Schwerter trägt vier Elektroden, die an der Spitze linear angeordnet sind (siehe Abbildung 23). Die Elektroden werden über Goldzuleitungen kontaktiert. Die jeweils vorderste Elektrode verfügt über einen Durchmesser von 20 μm , während die folgenden Elektroden einen Durchmesser von 15 μm aufweisen. Der Abstand der Elektrodenmittelpunkte beträgt je 25 μm bzw. 29 μm zwischen der vordersten und zweiten Elektrode. Der Abstand zwischen den Elektrodenrändern beträgt so jeweils 10 μm .

Der Siliziumträger ist an der Basis verbreitert. Mit dieser Basis ist das Silizium auf einen Kunststoffträger geklebt. Der Kunststoffträger ist weitere 30 mm lang und im unteren Bereich 5 mm breit. Die Zuleitungen zu den Elektroden werden auf diesem Kunststoffträger weitergeführt und enden in einem männlichen, standardisierten DIL-Stecker (englisch: *dual in-line*). Mit diesem Stecker wurde das MEA während laufender Versuche, über einen

Winkeladapter, mit dem Verstärkersystem verbunden (siehe Kapitel 3.6). Die Ausrichtung des MEAs ermöglichte die Penetration des Gewebes in vertikaler Richtung. Die Positionierung im Gewebe erfolgte unter optischer Kontrolle mittels elektronisch gesteuerter Mikromanipulatoren. Die Feinpositionierung der Ableitelektroden wurde über die Messung der Aktivität von Ganglienzellen auf unterschiedlichen Messpunkten vorgenommen. Das Verfahren wird detailliert in 5.3 beschrieben.

Den Planungen der penetrierenden MEAs lagen einige theoretische Überlegungen zugrunde: Es sollte ein MEA entwickelt werden, dessen vorderste Elektroden in der Nähe der Bipolarzellen zum Liegen kommen. Die Abstände der Elektroden auf einem Schwert wurden so gewählt, dass die letzte Elektrode bei vollständiger Penetration in der Nähe der Ganglienzellen liegt. Da das Ziel der Stimulation die Bipolarzellen waren, wurde der Elektrodendurchmesser der vordersten Elektrode erhöht, um die Impedanz zu senken. Die äußere Form der MEAs hatte Einfluss auf die Penetrationseigenschaften. Verschiedene Parameter wurden in Vorversuchen getestet und flossen in die Planungen mit ein. Diese werden in Kapitel 4.1 beschrieben.

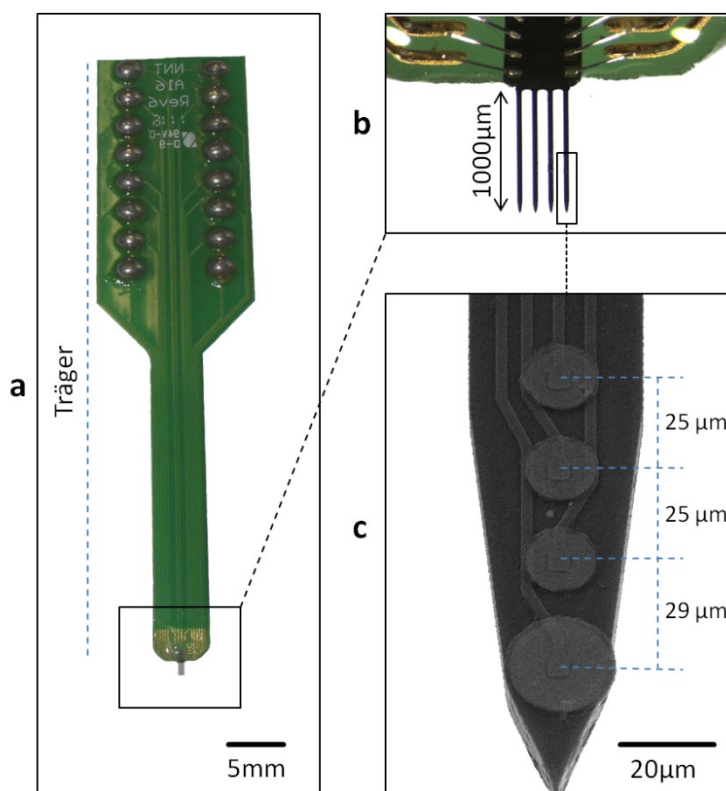


Abbildung 23 Abmessungen der entwickelten MEAs

a) An der Spitze des Kunststoffträgers ist das MEA befestigt. Der Träger verbindet die Elektroden an der Spitze über Goldzuleitungen mit einem DIL-Adapter, mit dem der Kontakt zum Vorverstärker hergestellt wird.

b) Das eigentliche MEA besteht aus einem gabelförmigen Siliziumträger mit vier Schwertern. An den Spitzen der Schwerter sind die Messelektroden aufgebracht. An der Basis des Siliziumträgers werden die Elektroden über Goldleitungen kontaktiert.

c) REM-Aufnahme einer einzelnen Schwertspitze. Die vier Elektroden und deren Zuleitungen sind zu erkennen.

4.1 Penetrationsversuche mit MEAs

Die Stabilität des retinalen Gewebes im intakten Auge wird maßgeblich durch die Lederhaut und den Glaskörper gewährleistet. Bei der Präparation der Retina wurden die externen Stützstrukturen entfernt, sodass das Gewebe insgesamt empfindlicher auf mechanische Einwirkungen reagierte. Die Penetration der extrahierten Retina mit den MEAs musste mit großer Vorsicht vorgenommen werden. Während das Ableiten der Ganglienzellen mit Glaselektroden an der Oberfläche des Gewebes vorgenommen werden konnte, musste das Gewebe mit den Schwertern der MEAs durchstoßen werden, um die Stimulationselektroden in tieferen Schichten zu positionieren.

Vor der Planung der finalen MEAs wurden erste Vorversuche mit kommerziell erhältlichen Standard-MEAs der Firma Neuronexus durchgeführt (A2x2-tet-3mm-150-150-121). Es handelte sich hierbei um MEAs mit zwei Schwertern, einer Trägerdicke von 25 µm und einer Schwertbreite von 95 µm. Die Spitze der Schwerter lief mit einem Winkel von 45° zusammen. Obwohl die innere Grenzmembran vor der Penetration entfernt wurde, war ein hoher mechanischer Widerstand an der Oberfläche der extrahierten Retina festzustellen. Unter dem Lichtmikroskop konnte beobachtet werden, dass es an den Kontaktstellen zwischen den Elektrodenschwertern und der Retina zu Stauchungen des Gewebes kam. Die Siliziumspitzen des MEAs penetrierten die oberste Schicht nicht, sondern komprimierten das Gewebe als Ganzes (Abbildung 24). Verantwortlich hierfür waren vermutlich die Breite der Schwerter sowie der flache Winkel der Spitzen. Der Versuch durch schnelles, schrittweises Vorantreiben der Spitzen die Penetration zu vereinfachen, konnte die Komprimierung des Gewebes nicht verhindern. Vorversuche, in denen versucht wurde die oberen bindegewebsartigen Strukturen enzymatisch zu verdauen, führten zur Instabilität des gesamten retinalen Gewebes. Es wurde im weiteren Verlauf darauf verzichtet.

Die erschwerte Penetration der oberen Schichten der Retina stellte besondere Anforderungen an die Architektur eines neuen MEAs. Um einen Prototyp schnell zum Einsatz bringen zu können, wurde eng mit der Entwicklungsabteilung der Firma Neuronexus zusammengearbeitet. Um limitierende architektonische Details vorab zu klären, wurden Penetrationsversuche mit nicht-funktionellen „Dummy“-Arrays durchgeführt, die vom Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik (IWE-1) der RWTH Aachen hergestellt wurden. Getestet wurde der Einfluss verschiedener Winkelspitzen (30°, 60°, halbrund) sowie die Anzahl, der Abstand und die Länge der Schwerter eines Arrays. Die Breite der einzelnen Schwerter wurde vorab von 95 µm auf 50 µm reduziert.

Bei einer erfolgreichen Penetration konnte beobachtet werden, wie die einzelnen Schwerter der Elektrode langsam in das Gewebe eindringen. Die Eindringtiefe der MEAs konnte anhand der Lage der oberen Messelektroden in Relation zur Gewebeoberfläche abgeschätzt werden. Bei nicht erfolgreicher Penetration wurde das Gewebe bis zu einem gewissen Maß komprimiert und wich bei vertikaler Druckausübung zu den Seiten aus.

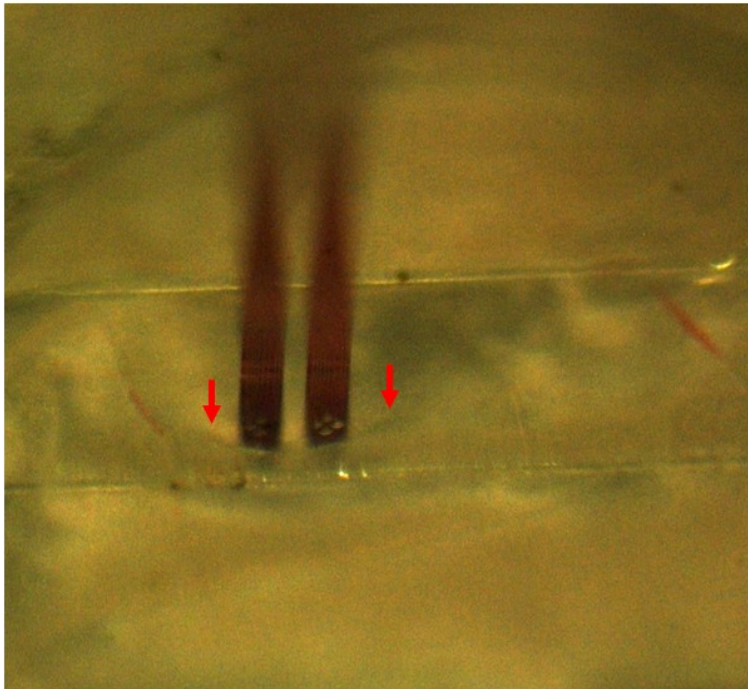


Abbildung 24 Standard-MEAs penetrieren die Retina nicht

Die Ausübung von Druck in vertikaler Richtung auf die extrahierte Retina mit einem Standard-MEA komprimiert das Gewebe. Es kommt nicht zur Penetration. Rechts und links der beiden Schwerter (Pfeile) ist zu erkennen, wie sich eine Delle in der Oberfläche bildet.

Den größten Einfluss auf das Penetrationsverhalten hatte der Winkel der Schwertschärfe. Schwerter mit einem Spitzenwinkel von 30° penetrierten das Gewebe deutlich leichter als Schwerter mit einem Winkel von 60°. Alle Penetrationsversuche mit abgerundeter Spitze blieben ohne Erfolg. Für den zukünftigen Prototyp sollte ein möglichst spitzer Winkel verwendet werden.

Die Länge der Schwerter (200 µm vs. 1000 µm) hatte keinen Einfluss auf das Penetrationsverhalten, jedoch auf die optischen Eigenschaften während der Versuche. Der Kunststoffträger des MEAs reichte bei kurzer Schwertlänge dicht an das Gewebe, was die Kontrolle unter dem Mikroskop erschwerte. Für die Entwicklung des Prototyps wurden 1000 µm lange Schwerter eingeplant, um in den folgenden Versuchen ausreichend Abstand zum Gewebe einhalten zu können.

Die Anzahl nebeneinander angeordneter Schwerter nahm nur leichten Einfluss auf die Penetrationseigenschaften. Bei den Teststrukturen mit vier Schwertern konnte beobachtet werden, dass aufgrund der absoluten Breite nicht alle Schwerter gleichmäßig in das Gewebe vordrangen. Die Vergrößerung des Abstandes zwischen den Schwertern von 125 µm auf 250 µm verbesserte die Penetration in geringem Maße, aber nicht ausschlaggebend. Die subjektiven Beobachtungen aus den Penetrationsversuchen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Einfluss der Dimensionen der MEAs auf das Penetrationsverhalten

Spitze d. Schwerter		Abstand d. Schwerter		Anzahl d. Schwerter		Länge d. Schwerter	
30°	++	125 µm	+	1	++	200 µm	++
60°	-	250 µm	++	2	++	1000 µm	++
rund	--			4	+		

++=sehr leichte Penetration; += leichte Penetration; -= Penetration schwierig; ---=Penetration nicht erfolgreich

Ausgehend von den zusammengefassten Ergebnissen aus Tabelle 1 hätten die optimalen MEAs eine Schwertspitze mit einem Winkel von 30° und eine Länge zwischen 200 und $1000\ \mu\text{m}$ haben müssen. Die Anzahl der Schwerter sollte minimiert werden und der Abstand zwischen den einzelnen Schwertern zwischen 125 und $250\ \mu\text{m}$ liegen. Ein größerer Abstand muss mit geringerer räumlicher Auflösung abgewogen werden.

Letztlich wurden MEAs mit einem Spitzenwinkel von 35° , einer Länge von $1000\ \mu\text{m}$, einer Schwertanzahl von vier und einem Abstand von $125\ \mu\text{m}$ gewählt. Die Schwertspitzen der entwickelten MEAs wurden zudem mit einem zweistufigen Design (Neuronexus, „skijump tip“) ausgeliefert, was die Penetration nochmals erleichterte. Zur Verbesserung der optischen Eigenschaften wurde die Länge der Schwerter auf $1000\ \mu\text{m}$ festgelegt. Der Abstand der Schwerter zueinander wurde geringer gehalten und die Anzahl der Schwerter erhöht, um die absolute Anzahl der Messpunkte zu vergrößern.

4.2 Charakterisierung der Mess- und Stimulationselektroden

Die Effektivität einer elektrischen Stimulation hängt von den Eigenschaften der verwendeten Elektroden ab (Vgl. 2.9 und 2.10). Die Elektrodeneigenschaften der MEAs wurden zwischen den einzelnen Einsätzen im Gewebe regelmäßig charakterisiert und die Veränderungen dokumentiert. Neben der Bestimmung der Impedanz wurden die Elektroden regelmäßig unter dem Rasterelektronenmikroskop kontrolliert, um Veränderungen der Oberflächen und Abnutzungs- bzw. Alterungserscheinungen der Elektroden zu überprüfen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erforderten kein Bedampfen der MEAs, somit konnten diese im Anschluss weiter verwendet werden.

4.2.1 Impedanzspektroskopie

Die Qualität einer Ableit- bzw. Stimulationselektrode kann durch ihren Wechselstromwiderstand (Impedanz) beschrieben werden. Da sich der Widerstand einer Elektrode aus kapazitiven und faradayschen Komponenten zusammensetzt, verändert sich der spezifische Widerstand mit der Frequenz des anliegenden Signals. Der Widerstand einer Elektrode wird sinnvollerweise über einen bestimmten Frequenzbereich angegeben.

Die Impedanzmessungen wurden mit einem Potentiostaten (PGST302, Metrohm Autolab B.V.) automatisiert durchgeführt. Das MEA wurde hierzu mit der Spitze in einem mit phosphatgepufferter Salzlösung (1-fach PBS) gefüllten Becherglas positioniert. Als Gegen- und Referenzelektrode diente eine Elektrode aus gesintertem Silber- /Silberchlorid (E201ML, In Vivo Metric). Zur Bestimmung der Impedanz wurde eine sinusförmige effektive Wechselspannung von $U_{\text{eff}}=17\ \text{mV}$ zwischen den Elektroden angelegt. Durch die angelegte Wechselspannung fließt ein Strom zwischen der Arbeitselektrode und der Gegenelektrode. Aus der Stromstärke wird durch den Potentiostaten die Impedanz bestimmt. Die Frequenz der Sinusspannung wurde automatisch in 51 Frequenzen zwischen 10 Hz und 10 kHz variiert und die Impedanz für jede Elektrode bestimmt. Die Darstellung der Messwerte erfolgt üblicherweise in einer doppelt-logarithmischen Auftragung der Impedanz gegen die Frequenz. Um Messelektroden schnell miteinander vergleichen zu können, hat es sich

bewährt die Impedanzen für eine Referenzfrequenz von 1 kHz miteinander zu vergleichen. Dieser Wert spiegelt den Hauptfrequenzbereich von Aktionspotentialen wider.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten MEAs wurden vor der ersten Benutzung charakterisiert, um die Veränderungen, die über die Zeit auftreten, verfolgen zu können.

Um den Einfluss von Durchmesser, Beschichtung und Abnutzung auf die Elektrodenimpedanz zu untersuchen, wurden die Impedanzen folgender Elektroden exemplarisch miteinander verglichen:

- Die Standardelektrode aus Iridium mit einem Durchmesser von 20 μm mit einer Standardelektrode aus Iridium mit einem Durchmesser von 15 μm (Kap. 4.2.2)
- Die Standardelektrode aus Iridium mit einer aktivierten Iridiumoxidelektrode und einer PEDOT-beschichteten Elektrode (Kap. 4.2.3; 4.2.4; 4.2.5)
- Die Veränderung der Impedanz durch Abnutzung der Elektrodenbeschichtung (Kap. 4.2.7)

4.2.2 Nicht-aktivierte Iridiumelektroden

Die von der Firma Neuronexus gefertigten MEAs tragen Messelektroden mit zwei unterschiedlichen Durchmessern von 15 μm bzw. 20 μm . Abbildung 25 zeigt die Impedanzspektren von allen 16 Elektroden eines MEAs, davon vier Elektroden mit 20 μm Durchmesser und zwölf mit 15 μm Durchmesser. Ein Vergleich der Impedanzspektren zeigt, dass der Einfluss der Elektrodendurchmesser auf die Impedanz hinter der Variabilität der Elektroden gleichen Durchmessers zurücksteht. Die Größe der Durchmesser skaliert nicht mit einer verringerten Impedanz. Im Mittel wiesen die Elektroden mit einem Durchmesser von 20 μm für 1 kHz eine Impedanz von $0,88 \text{ M}\Omega \pm 0,34$ auf, die kleineren Elektroden (15 μm) einen Wert von $0,73 \text{ M}\Omega \pm 0,25$.

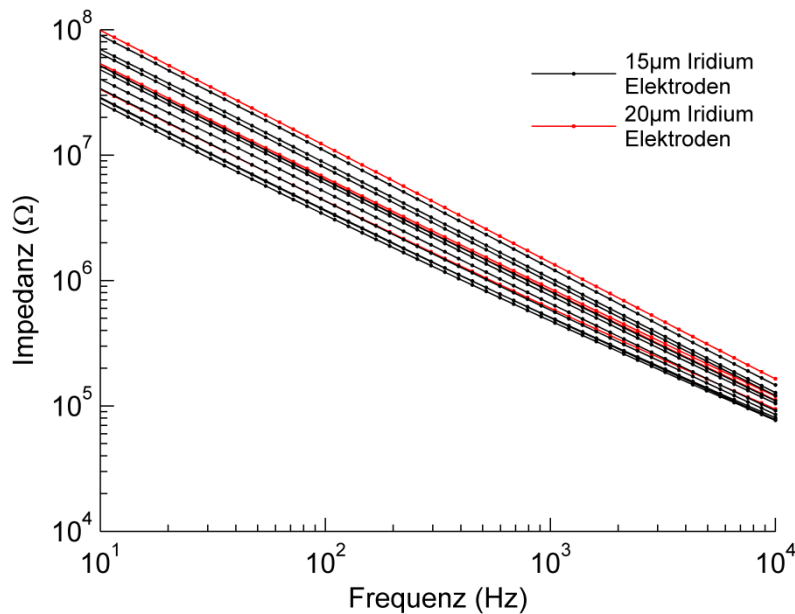


Abbildung 25 Impedanzen von Iridiumelektroden mit 15 µm und 20 µm Durchmesser

Die Impedanzen der 20 µm Messelektroden (rot) weichen nicht von denen der 15 µm Messelektroden (schwarz) ab.

4.2.3 Elektrochemische Aktivierung von Iridiumelektroden

Die elektrochemische Aktivierung von Iridium bezeichnet die Oberflächenvergrößerung durch Bildung poröser Schichten aus Iridiumoxid. Für die Aktivierung wurden die Messelektroden des MEAs in ein Becherglas mit phosphatgepufferter Salzlösung getaucht. Die Elektroden wurden nacheinander an die Arbeitselektrode des Potentiostaten (AUTOLAB, PGST302, Metrohm Autolab B.V.) angeschlossen. Als Gegen- und Referenzelektrode diente eine gesinterte Silber-/Silberchloridelektrode (E201ML, In Vivo Metric). Für die Aktivierung der Oberflächen mit Iridiumoxid wurden Protokolle aus der Literatur (Robblee *et al.* 1983) verwendet und angepasst. Die Aktivierung der Oberflächen wurde durch das Anlegen einer langsamen Wechsellspannung erreicht. Hierbei wurde das Potential mit einer Rate von 100 mV/s zwischen -0,85 V und 0,7 V hoch und heruntergefahren. Es zeigte sich, dass es nach 100 Zyklen zu keiner weiteren Verringerung der Impedanz kam.

Die Aktivierung der Oberflächen führte in allen Fällen zu einer Reduzierung der Impedanz und einer Verbesserung der Ableiteigenschaften. Die Stärke des Effekts schwankte zwischen den unterschiedlichen Messelektroden eines MEAs.

Tabelle 2 zeigt exemplarisch die Impedanzreduzierung für 12 Elektroden mit 15 µm Durchmesser vor und nach der Aktivierung. Im Mittel kann die Impedanz für Frequenzen von 1 kHz um 58,7% $\pm$ 14,5 reduziert werden. Die maximal erreichte Verringerung beträgt 89,8%. Die minimale Verringerung liegt bei 33,7%. Abbildung 26 verdeutlicht die Variabilität der Impedanzänderung nach der Aktivierung mit identischem Protokoll für zwei Elektroden gleichen Durchmessers.

Tabelle 2 Elektrodenimpedanz von Iridium bei 1 kHz vor und nach der Aktivierung

Impedanz (1 kHz) vor Aktivierung [MΩ]	Impedanz (1 kHz) nach Aktivierung [MΩ]	Veränderung in %
0,34	0,16	53,2
0,21	0,14	33,7
0,12	0,04	66,3
0,33	0,08	73,0
0,28	0,14	47,9
0,48	0,28	47,3
0,42	0,16	62,7
0,41	0,19	53,4
0,54	0,17	67,8
0,78	0,37	52,4
0,60	0,26	56,9
0,79	0,08	89,8
0,44 ±0,21	0,17 ±0,09	58,7% ±14,5

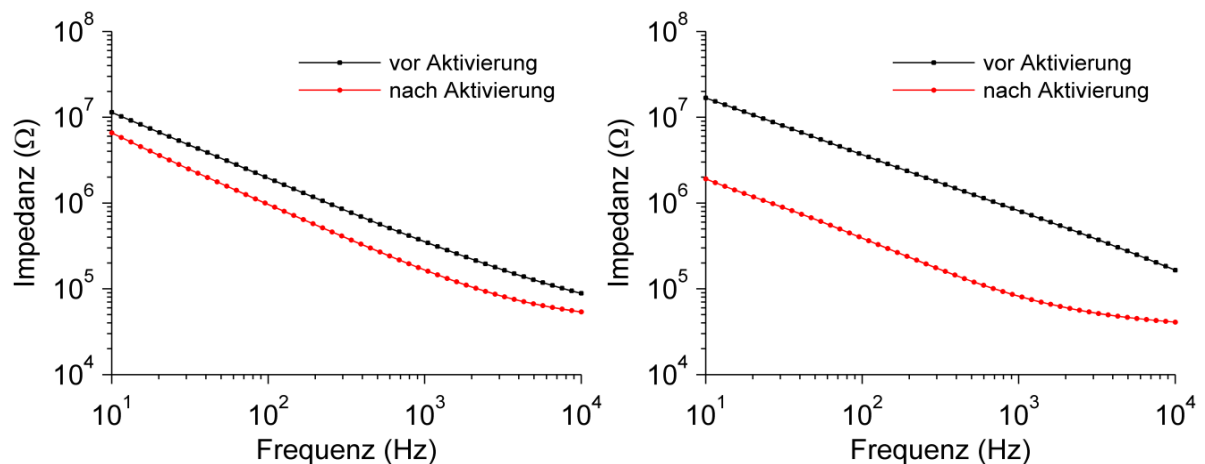


Abbildung 26 Aktivierung von Iridiumelektroden

Die relative Reduzierung der Impedanz schwankt von Elektrode zu Elektrode trotz identischer Durchmesser und Aktivierungsprotokolle. *Links:* Die Impedanz für 1 kHz wird durch die Aktivierung von 0,343 MΩ auf 0,161 MΩ reduziert. Dies entspricht einer Verringerung um 53,2%. *Rechts:* Die Elektrodenimpedanz bei 1 kHz beträgt 0,789 MΩ vor der Aktivierung und wird durch die Aktivierung um 89,8 % auf 0,08 MΩ reduziert.

4.2.4 Kommerzielle PEDOT-beschichtete Messelektroden

Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT) ist ein leitfähiges Polymer, das zur Beschichtung von Messelektroden eingesetzt wird. Die Beschichtung führt zu einer massiven Oberflächenvergrößerung, erhöht die Kapazität und reduziert so die Impedanz der Elektrode (vgl. Abbildung 30). Acht kommerzielle MEAs wurden zu Testzwecken mit PEDOT-

beschichteten Elektroden bestellt. Im direkten Vergleich der mittleren Impedanzen der kommerziellen MEAs zeigte sich eine deutliche Impedanzreduzierung bei den PEDOT-beschichteten Elektroden. Für den Referenzwert von 1 kHz lag die gemittelte Impedanz für Iridiumelektroden mit 15 μm Durchmesser bei $0,73 \text{ M}\Omega \pm 0,25$, während die von PEDOT-Elektroden bei $0,053 \text{ M}\Omega$ lag. Dies entspricht einer Reduktion um 93%. Die Variabilität der Impedanz von Iridiumelektroden war generell größer als die von PEDOT-Elektroden (siehe Abbildung 27).

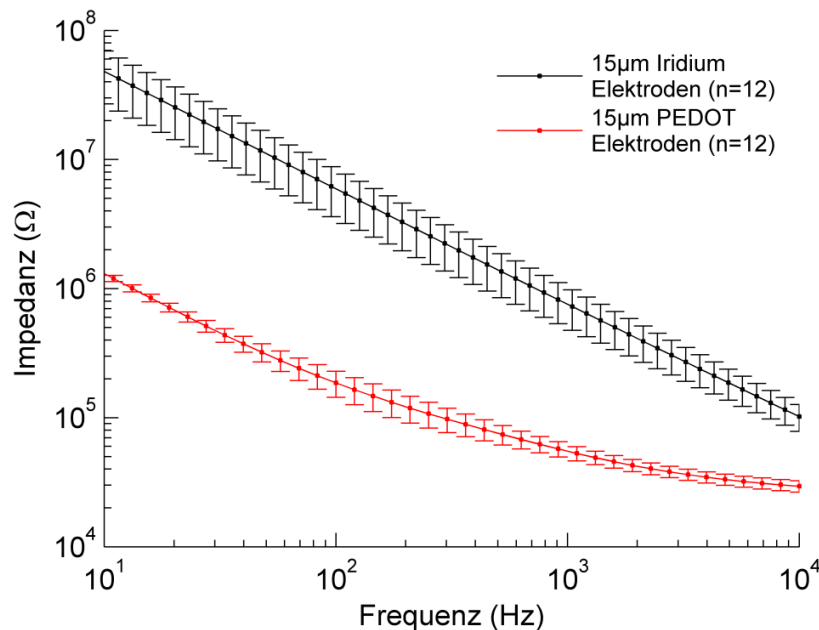


Abbildung 27 Impedanzspektren von Iridium- und PEDOT-Elektroden

Kommerzielle PEDOT-beschichtete Messelektroden weisen im Vergleich zu Iridiumelektroden eine deutlich reduzierte Impedanz auf. Für den Vergleichswert von 1 kHz ist die Impedanz im Mittel um 93% reduziert. Die Variabilität der PEDOT-Elektroden ist kleiner als die der Iridiumelektroden.

Während die Impedanz der Elektroden mit Iridiumoberflächen nicht mit dem Elektrodendurchmesser skalierte (vgl. Abbildung 25), gab es bei den PEDOT-Elektroden eine Reduzierung der Impedanz bei zunehmender Größe. Für Frequenzen von 1 kHz lag die Impedanz für Elektrodendurchmesser von 20 μm im Mittel bei $0,039 \text{ M}\Omega \pm 0,005$ und für 15 μm Elektroden bei $0,053 \text{ M}\Omega \pm 0,007$ (siehe Abbildung 28).

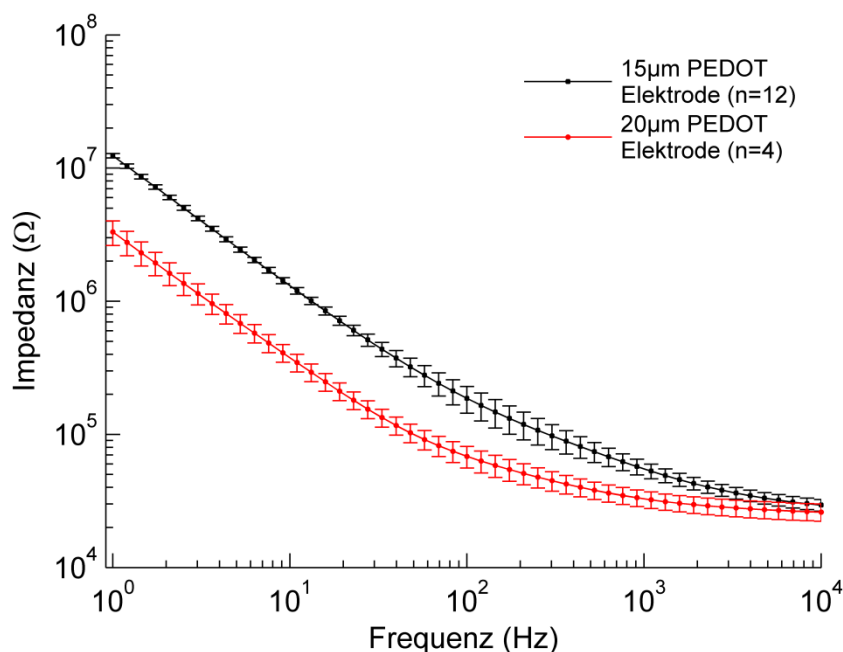


Abbildung 28 Einfluss der Durchmesser auf die Impedanz von PEDOT-Elektroden

Die Impedanz von kommerziellen PEDOT-Elektroden skaliert mit dem Elektrodendurchmesser. Für 1 kHz liegt die Impedanz der 20 μm Elektroden um 42% unter der von 15 μm Elektroden. Für niedrige Frequenzen zeigt sich der Effekt noch deutlicher. Für hohe Frequenzen ab ca. 3 kHz ist der Unterschied nicht mehr eindeutig.

4.2.5 Elektrodeposition von Poly-3,4-ethylenedioxythiophen

Während der laufenden Versuche stellte sich heraus, dass die Polymerbeschichtungen der Stimulationselektroden durch den wiederholten Einsatz im Gewebe beschädigt werden. Um unbeschichtete Iridiumelektroden nachträglich mit PEDOT zu beschichten und defekte Elektroden zu reaktivieren, wurde ein eigenes Protokoll zur elektrochemischen Deposition von PEDOT etabliert. Hierzu wurden auf Grundlage eines vorhandenen Protokolls (Abidian & Martin, 2008) die Parameter den speziellen Anforderungen angepasst. Für Tests wurden Standard-MEAs mit 16 rechteckigen Elektroden (15 μm Kantenlänge) verwendet, um die vorhandenen entwickelten MEAs für spätere Versuche aufzusparen.

Die Arbeitselektrode wurde in eine wässrige Lösung aus 0,01 mol/l 3,4-ethylenedioxythiophen (PEDOT) und 0,1 mol/l Lithiumchlorid platziert. Die zu beschichtenden Elektroden wurden nacheinander mit der Arbeitselektrode des Potentiostaten (AUTOLAB, PGST302, Metrohm Autolab B.V.) verbunden. Als Referenz- und Gegenelektrode diente ein Platindraht. Während der Deposition fließt ein konstanter Strom zwischen der Arbeitselektrode und der Gegenelektrode für die gewählte Depositionszeit. Die Stromstärke wurde zwischen 2,5 nA und 35 nA variiert. Die Depositionszeiten betrugen zwischen 60 s und 320 s. Die Stromstärken und die Depositionsdauer wurden auf mehreren Messelektroden eines MEAs variiert, um die ideale Kombination für eine gleichmäßige Beschichtung zu finden. Der Erfolg der Deposition wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Beschichtete Elektroden konnten durch deren Schwarzfärbung leicht von den metallisch glänzenden Iridiumoberflächen unterschieden werden. Die ausführliche Charakterisierung der Deposition wurde mithilfe des Rasterelektronenmikroskops sowie einer vergleichenden Impedanzspektroskopie vorgenommen. Stromdichte und Depositionszeiten wurden variiert, bis sie zu verwertbaren Ergebnissen führten.

Hohe Gesamtladungen ($11,1 \mu\text{C}$) führten zu einer großflächigen Deposition des Polymers auf den Elektroden. Hierbei bildeten sich charakteristische Ablagerungen, die die Elektroden unbrauchbar machten (Abbildung 29).

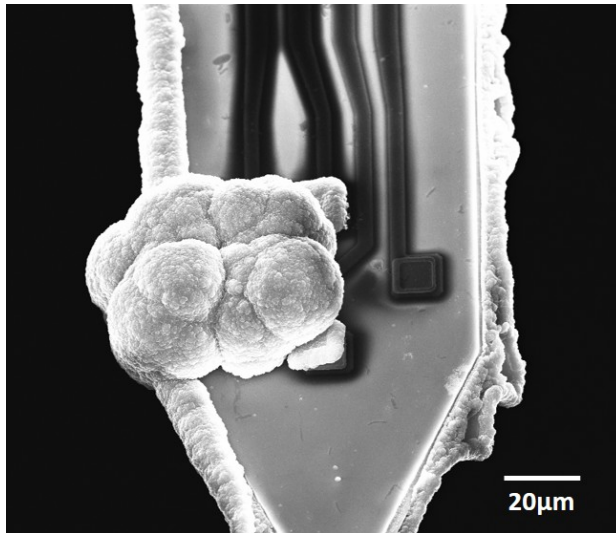


Abbildung 29 Elektrode nach übermäßiger PEDOT-Deposition

Gezeigt ist ein Schwert des MEAs nach der Deposition von PEDOT. Die Elektrode ist mit großen Mengen des ausgefallten Polymers überschichtet. Die kugelförmigen Ablagerungen erreichen benachbarte Elektroden und interferieren mit deren Oberflächenbeschichtungen, was zu Kurzschlüssen der Messelektroden führen kann. Reste des vernetzten Polymers zeigen sich auch an den Rändern und an der Unterseite des Siliziumträgers.

In folgenden Versuchen wurden weitere Kombination aus Stromdichte und Applikationsdauer getestet, bis stabile Beschichtungen auf der Elektrodenoberfläche erreicht wurden. Wie erwartet wiesen die mit PEDOT beschichteten Elektroden eine deutlich geringere Impedanz gegenüber den unbeschichteten Elektroden auf.

Abbildung 30 zeigt die Impedanzspektren von zwei Messelektroden nach erfolgter Deposition von PEDOT im Vergleich zum gemittelten Impedanzspektrum unbeschichteter Elektroden. Obwohl für beide Elektroden unterschiedliche Gesamtladungen während der Deposition transferiert wurden, zeigen die Impedanzspektren nur geringe Abweichungen. Zum Vergleich ist in der Grafik das Impedanzspektrum einer Kontrollelektrode aufgetragen, die lediglich in die Depositionslösung eingetaucht wurde. Die Impedanz dieser Elektrode ist zwar höher als die der aktiv beschichteten Elektroden, verringert sich jedoch durch das Eintauchen in die Lösung. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass das leitfähige PEDOT erfolgreich auf die Oberfläche aufgebracht wurde. Darüber hinaus zeigt der Vergleich, dass eine Gesamtladung von $6,4 \mu\text{C}$ zu einer stärkeren Ablagerung von PEDOT auf der Iridiumoberfläche führte als der Transfer von $5,4 \mu\text{C}$ (Abbildung 30). Die Impedanz der intensiver beschichteten Elektrode ist nicht weiter gesunken. Sie beträgt für beide Elektroden $0,027 \text{ M}\Omega$ bei 1 kHz .

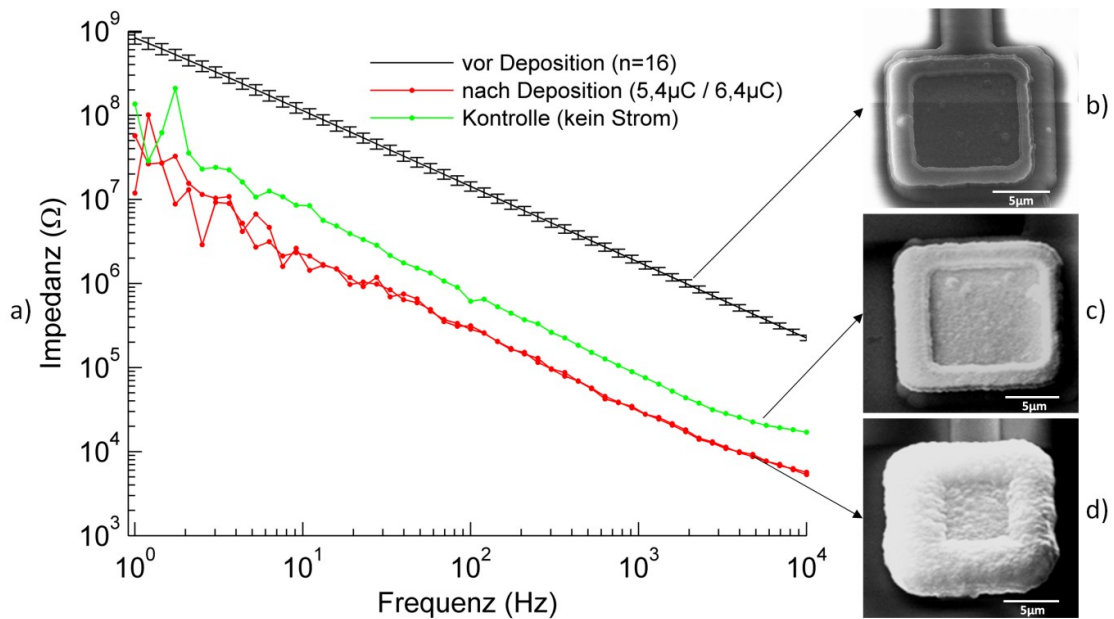


Abbildung 30 Oberflächen- und Impedanzveränderung durch PEDOT-Deposition

a) Impedanzmessungen von Messelektroden eines MEAs vor (schwarz) und nach (rot) der Deposition von PEDOT. Für die Impedanz der unbeschichteten Elektroden wurden die Messungen für alle 16 Elektroden des MEAs gemittelt. Die Impedanzen der beiden elektrochemisch beschichteten Elektroden (rot) verhalten sich annähernd gleich und liegen deutlich unter dem Mittel der unbehandelten Elektroden. Die grüne Kurve zeigt die Impedanz einer Kontrollelektrode. Diese wurde in die PEDOT-Lösung getaucht aber keine Ladung aktiv transferiert. Die Impedanz liegt ebenfalls deutlich unter der der unbehandelten Elektroden, ist aber höher als die Impedanz der elektrochemisch beschichteten Elektroden.

Die drei elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Oberflächenbeschaffenheit von Iridium-Elektroden vor der Deposition von PEDOT (b), nach dem Eintauchen in die PEDOT-Lösung, ohne aktive Deposition (c) und nach der Deposition durch eine applizierte Gesamtladung von 5,4 μC (d).

4.2.6 Zusammenfassung der Elektrodenimpedanzen

Die Impedanzspektroskopie der unterschiedlichen Elektrodenoberflächen ergab die niedrigsten Impedanzen für die PEDOT-beschichteten Elektroden. Der Durchmesser der Elektroden skalierte bei nicht-aktivierten Iridiumelektroden nicht mit der Impedanz. Für Elektroden mit einem Durchmesser von 15 μm lag die Impedanz im Mittel bei 0,88 M Ω . Die Aktivierung von Iridium führte zu einer mittleren Reduzierung der Impedanz um 58,7% auf Impedanzen zwischen 0,04 und 0,37 M Ω . Die Elektroden mit kommerziellen PEDOT-Beschichtungen wiesen im Mittel eine Impedanz von 0,053 M Ω auf. Die eigens durchgeführte Deposition von PEDOT auf Iridiumoberflächen führte zu einer Impedanz von 0,027 M Ω . Die mittleren Impedanzen sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3 Vergleich der mittleren Impedanz für 15 μm Elektroden (für 1 kHz)

Iridium (nicht aktiviert)	Iridiumoxid (aktiviert)	PEDOT (Neuronexus)	PEDOT (ICS-8)
0,88 M Ω $\pm$ 0,32	0,173 M Ω $\pm$ 0,09	0,053 M Ω $\pm$ 0,007	0,027 M Ω $\pm$ 0,0

4.2.7 Abnutzungserscheinungen der Elektrodenoberflächen

Wie oben erwähnt, wurden die elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Typen von Messelektroden durchgeführt. Die Oberflächenbeschichtungen verhielten sich unterschiedlich stabil im Gewebe. Die aktivierten und nicht aktivierten Iridiumelektroden zeigten kaum Alterungserscheinungen, auch nach wiederholtem Einsatz im Gewebe und über die gesamte Nutzungsdauer von bis zu 4 Wochen, sofern die MEAs nach den Versuchen gereinigt wurden (vgl. Kap. 3.6).

Die mit PEDOT beschichteten Elektroden verhielten sich nach längerer Nutzung im Gewebe instabil. Die Alterung konnte an allen acht verwendeten MEAs mit PEDOT beschichteten Elektroden beobachtet werden.

Abbildung 31 zeigt das Schwert eines MEAs vor dem ersten Einsatz und nach der Benutzung im Gewebe. Bei den intakten PEDOT-Beschichtungen sitzt das Polymer kissenförmig auf den Elektroden und umschließt diese gleichmäßig. Die Feinstruktur der Oberflächen ist ebenfalls gleichmäßig und zeigt keine Risse oder Löcher.

Nach mehrmaligem Einsatz der MEAs können Veränderungen an den Oberflächen ohne optische Hilfsmittel festgestellt werden. Die einzelnen Schwerter sind mit einer weißlichen Schicht aus Geweberesten und Rückständen überzogen. In gewissem Maße war es möglich, diese Proteinablagerungen durch das Reinigungsprotokoll zu entfernen (siehe Kapitel 3.6). Nach mehr als fünf Einsätzen im Gewebe verblieben jedoch zunehmend Reste, die sich nicht mehr auf diese Weise entfernen ließen. Unter dem Rasterelektronenmikroskop lässt sich die Ablösung des Polymerkissens von der darunterliegenden Iridiumelektrode erkennen (siehe Abbildung 31). Die PEDOT-Beschichtungen wurden vom Rand her angehoben und von der Unterlage abgerissen. Der Versuch die MEAs im Ultraschallgerät zu reinigen war nicht erfolgreich, da die Schwerter durch die hochfrequente Schwingung von der Basis des Siliziumträgers abbrechen.

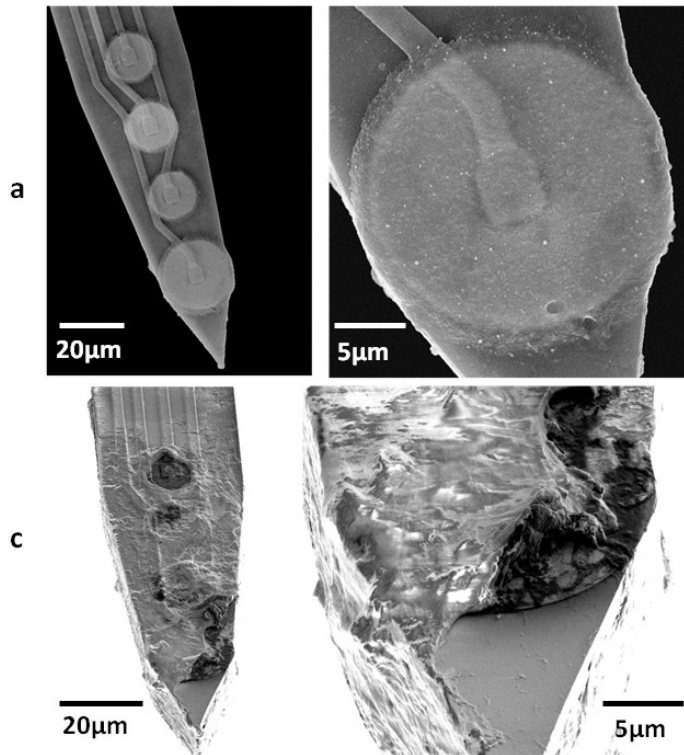


Abbildung 31 PEDOT-Elektroden vor und nach dem Einsatz im Gewebe

a) REM-Aufnahme eines Schwertes mit vier PEDOT-beschichteten Elektroden vor der Benutzung im Gewebe. b) Detailansicht der vordersten Messelektrode (d=20 µm). Die intakte, gleichmäßige Beschichtung überragt die Iridiumelektrode.

c) Nach dem einmaligen Einsatz des MEAs im Gewebe ist das Schwert mit einer Schicht von Rückständen überzogen. d) Die Detailansicht zeigt eine Ablösung der Beschichtung am Rand. Die Oberfläche ist von Rückständen bedeckt, die auch die Ränder des Schwertes überdecken.

Auf einigen Messelektroden bildeten sich Risse vom Rand in Richtung Mittelpunkt der PEDOT-Beschichtung (siehe Abbildung 32). Dies führte zur Freilegung der Iridiumoberflächen und während der Stimulation zur verstärkten Bildung von Gasbläschen in den Rissen. Die Gasbläschen beschleunigten die Alterung der Beschichtungen, indem sie die defekte Beschichtung weiter aufsprenkten. Die Beschädigung der Oberflächen führte zu einem starken Anstieg der Elektrodenimpedanz (im Beispiel von $0,025^{\circ}M\Omega$ (1kHz) auf $0,34 M\Omega$) bereits nach einmaligem Einsatz als Stimulationselektrode (siehe Abbildung 32). Die Zunahme der Impedanz bei benutzten Elektroden korrelierte mit dem Grad der Beschädigung der Oberflächen. Die Impedanz einer stark beanspruchten Elektrode nahm stark zu, während sich bei den elektronenmikroskopisch einwandfreien Beschichtungen nur minimale Veränderungen der Impedanz feststellen ließen (siehe Abbildung 33).

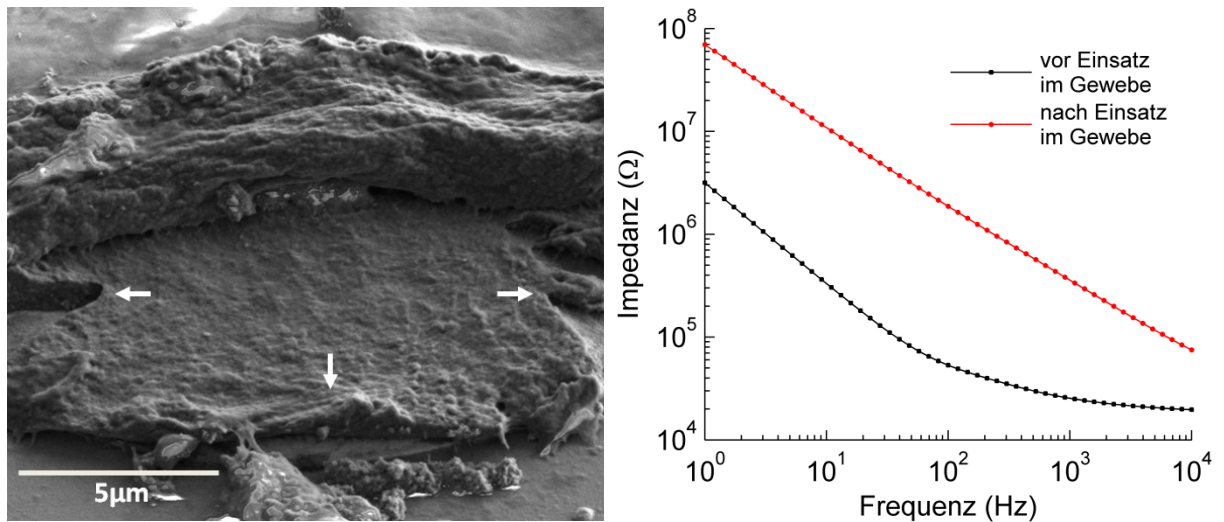


Abbildung 32 PEDOT-Elektrode nach Stimulation im Gewebe

Links: Die Pfeile markieren Risse in der Polymerbeschichtung der Elektrodenoberfläche. Am oberen Bildrand ist die Ablagerung von Proteinrückständen zu erkennen, die als geschlossene Schicht die freie Elektrodenfläche verkleinert.

Rechts: Die Beschädigung der PEDOT-Beschichtung führt zu einer starken Erhöhung der Impedanz über den gesamten Frequenzbereich der Messung (für den Referenzwert (1 kHz) von 0,025 MΩ auf 0,34 MΩ).

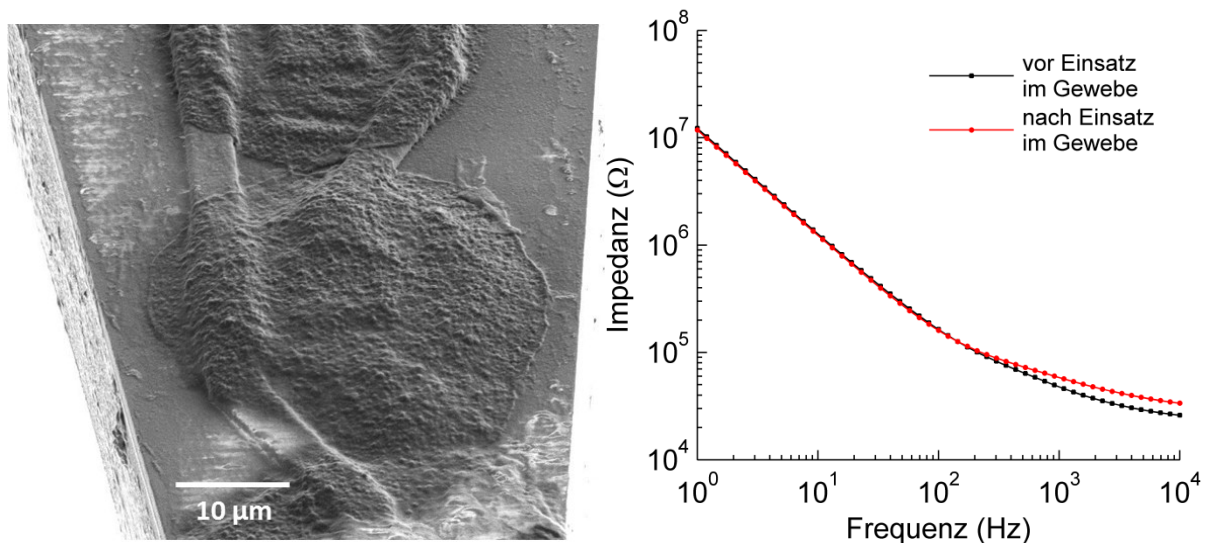


Abbildung 33 PEDOT-beschichtete Elektrode nach Messeinsatz im Gewebe

In einigen Fällen blieben die PEDOT-Beschichtungen nach dem Einsatz im Gewebe intakt.

Links: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Elektroden auf einem Schwert. Im unteren Bereich sind einige Rückstände auf der Elektrodenoberfläche zu erkennen. Die Oberfläche der mittleren Elektrode zeigt sich weitestgehend frei von Rückständen. Die Polymerbeschichtung ist gleichmäßig und zeigt keine Beschädigungen.

Rechts: Die Impedanz einer unbeschädigten Elektrode zeigt nach dem Einsatz im Gewebe nur minimale Abweichungen von der ursprünglich gemessenen Impedanz.

5 Elektrophysiologische Messungen in der Retina

Die neu entwickelten penetrierenden MEAs, deren Eigenschaften in Kapitel 4 beschrieben sind, wurden erstmalig in extrahierten Retinae von Ratten eingesetzt. Bevor erste Ableitungen mit den Messelektroden durchgeführt werden konnten, wurde eine Methode zur Positionierung der MEAs im Gewebe entwickelt. Im Anschluss wurden erste Messungen von Aktionspotentialen der Ganglienzellen durchgeführt. Es wurde zunächst optisch stimuliert und später über die Stimulationselektroden in der Nähe der Bipolarzellen mit unterschiedlichen Stimulationsparametern elektrisch stimuliert.

5.1 Extrazelluläre Ableitungen von Ganglienzellen mit Glaselektroden

Vor dem Einsatz der penetrierenden MEAs im Gewebe sollte die elektrische Aktivität der retinalen Ganglienzellen mit extrazellulären Glaselektroden gemessen werden. Diese Vorversuche dienten der Überprüfung des physiologischen Zustandes des Gewebes nach der Präparation und der Funktion des Versuchsaufbaus. Die Aktionspotentiale der Ganglienzellen wurden als positive oder negative Ausschläge von der Grundlinie gemessen. Die Amplituden lagen zwischen 0,2- 1,5 mV (Spitze-Tal-Wert= U_{ss}) in Abhängigkeit vom Elektrodendurchmesser und der Entfernung zur gemessenen Zelle.

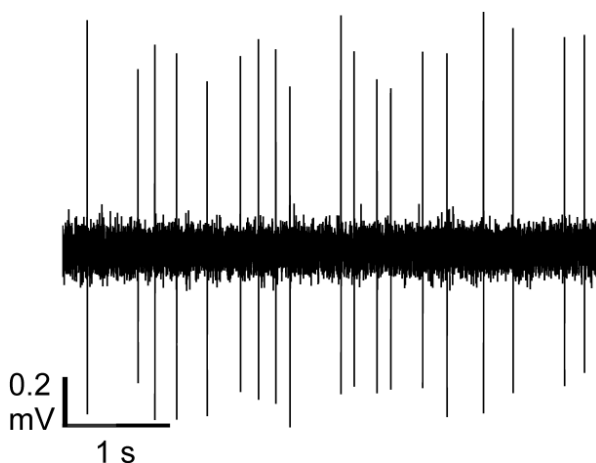


Abbildung 34 Extrazelluläre Ableitung einer retinalen Ganglienzelle mit Glaselektrode

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt von 5 s Gesamtlänge aus einer extrazellulären Ableitung an einer retinalen Ganglienzelle. Die Zelle ist spontan und unregelmäßig aktiv. Die Amplitude der Aktionspotentiale liegt bei ca. 1,5 mV U_{ss} . Das Grundrauschen beträgt ca. 0,2 mV.

5.2 Perfusion mit hochkaliumhaltigem Ames-Medium

Um zu bestätigen, dass es sich bei den abgeleiteten Signalen tatsächlich um Aktionspotentiale handelt, wurde Ames-Medium mit erhöhter Kaliumkonzentration (10 mmol/l – 100 mmol/l Kalium) in insgesamt acht Ableitungen in die Badkammer eingeleitet. Die Erhöhung des extrazellulären Kaliumspiegels depolarisierte die Zellmembran, da durch die im Ruhezustand geöffneten Kaliumkanäle Kaliumionen vermehrt in das Zellinnere gelangen. Eine geringfügige Erhöhung führte erwartungsgemäß zu einer leichteren Erregbarkeit der Zelle, die sich in erhöhter elektrischer Aktivität äußerte. Wurde die Konzentration weiter erhöht, so wurde die natürliche extrazelluläre Ionenkonzentration

aus dem Gleichgewicht gebracht und es konnten keine weiteren Aktionspotentiale ausgebildet werden. Die Zelle stellte dann bis zum Auswaschen des veränderten extrazellulären Mediums ihre Aktivität ein. Die Anwendung von Ames-Medium mit erhöhter Kaliumkonzentration diente der Überprüfung des physiologischen Zustandes des Präparats. Die Stimulation mit erhöhten Kaliumkonzentrationen wird standardmäßig in neurophysiologischen Experimenten angewandt (Jeftinija *et al.*, 1993; Sutton *et al.*, 2013). In insgesamt fünf von acht Ableitungen (63%) konnte eine Reduzierung der Feuerrate der Neurone bis zum kompletten Aussetzen der Aktivität beobachtet werden (siehe Abbildung 35). Bei einer Kaliumkonzentration von 10 mmol/l wurde unmittelbar vor der kompletten Hemmung der Aktivität ein kurzzeitiger Anstieg der Feuerrate beobachtet.

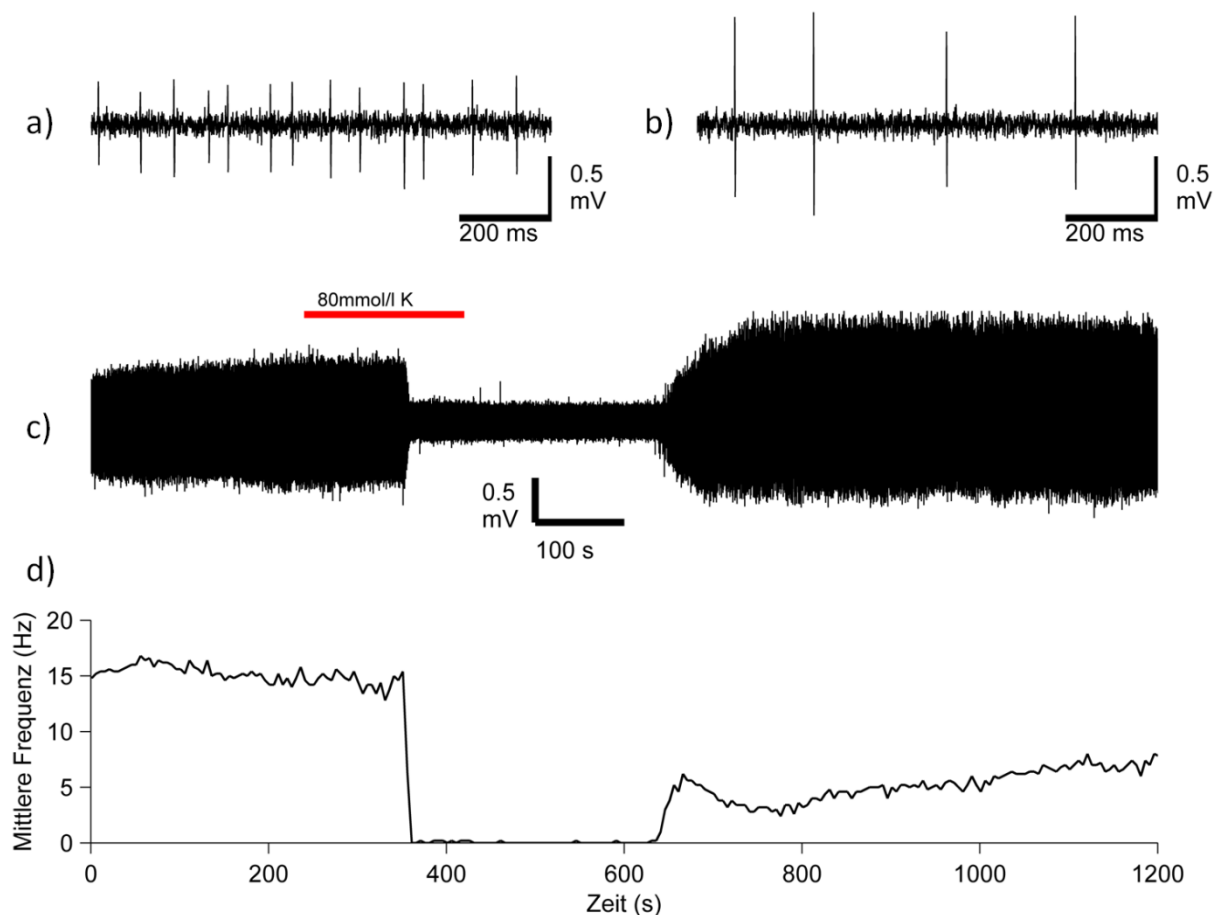


Abbildung 35 Perfusion mit Ames-Medium erhöhter Kaliumkonzentration (80mmol/l)

Die beiden oberen Graphen zeigen Ausschnitte aus der Ableitspur vor der Perfusion mit hochkaliumhaltigem Ames-Medium (a) und nach dem Auswaschen (b). Der mittlere Graph (c) zeigt die extrazelluläre Ableitspur über die gesamte Länge der Ableitung von 1200 s. Der rote Balken oberhalb des Graphen markiert das Einleiten von hochkaliumhaltigem Ames-Medium (80 mmol/l) in die Badkammer. Der untere Graph (d) gibt die mittlere Feuerrate des Neurons in Hz an. Unter Ruhebedingungen feuert das Neuron zunächst mit einer Frequenz von 15 Hz und stellt seine Aktivität 17 s nach Beginn des Einleitens von hochkaliumhaltigem Ames-Medium abrupt ein. Die mittlere Frequenz verdeutlicht das Aussetzen der Spontanaktivität. 130 s nach dem Ende der Kaliumperfusion nimmt die Zelle ihre Aktivität mit verminderter Frequenz (~4 Hz) wieder auf. Die Amplitude der Aktionspotentiale vergrößert sich von 0,8 mV U_{ss} auf 1,5 mV U_{ss} .

5.3 Positionierung der MEAs im Gewebe

Die Stimulation und das Ableiten aus unterschiedlichen neuronalen Schichten innerhalb der Retina setzt die gezielte Positionierung der MEAs voraus. Die Abstände der Messelektroden zueinander auf den einzelnen Schwertern wurden bei der Planung berücksichtigt. In der endgültigen Position im Gewebe sollten die Stimulationselektroden in der Nähe der Zellkörper der Bipolarzellen zum Liegen kommen, während die oberen Messelektroden imstande sein sollten die Aktivität der Ganglienzellen zu messen. Die grobe Positionierung gelang unter optischer Kontrolle. Das verwendete Mikroskop erlaubte es, die Eindringtiefe des MEAs anhand der Lage der Elektroden zu verfolgen. Die exakte Lage der Messpunkte zu einzelnen Zellen konnte auf diese Weise jedoch nicht bestimmt werden.

Die Feinpositionierung der MEAs wurde anhand der elektrischen Aktivität vorgenommen, die simultan über die Elektroden gemessen wurde. Der bidirektionale Aufbau des Verstärkersystems ermöglichte es, die Spontanaktivität der Ganglienzellen über alle 16 Elektroden des MEAs zu messen. Bei der Annäherung an die Ganglienzellschicht des extrahierten Gewebes konnte die elektrische Aktivität zuerst an den vorderen Elektroden gemessen werden. Das MEA wurde nun schrittweise mithilfe der Mikromanipulatoren vorangetrieben. Mit zunehmender Eindringtiefe konnte die Aktivität der Ganglienzellen nacheinander auf den linear angeordneten Elektroden gemessen werden. Aus dieser Information wurde auf die Lage der Messpunkte in Relation zu den Ganglienzellen geschlossen. Die MEAs wurden so positioniert, dass die Aktivität der Ganglienzellen auf den obersten Messelektroden mit maximaler Amplitude gemessen wurde (siehe Abbildung 36).

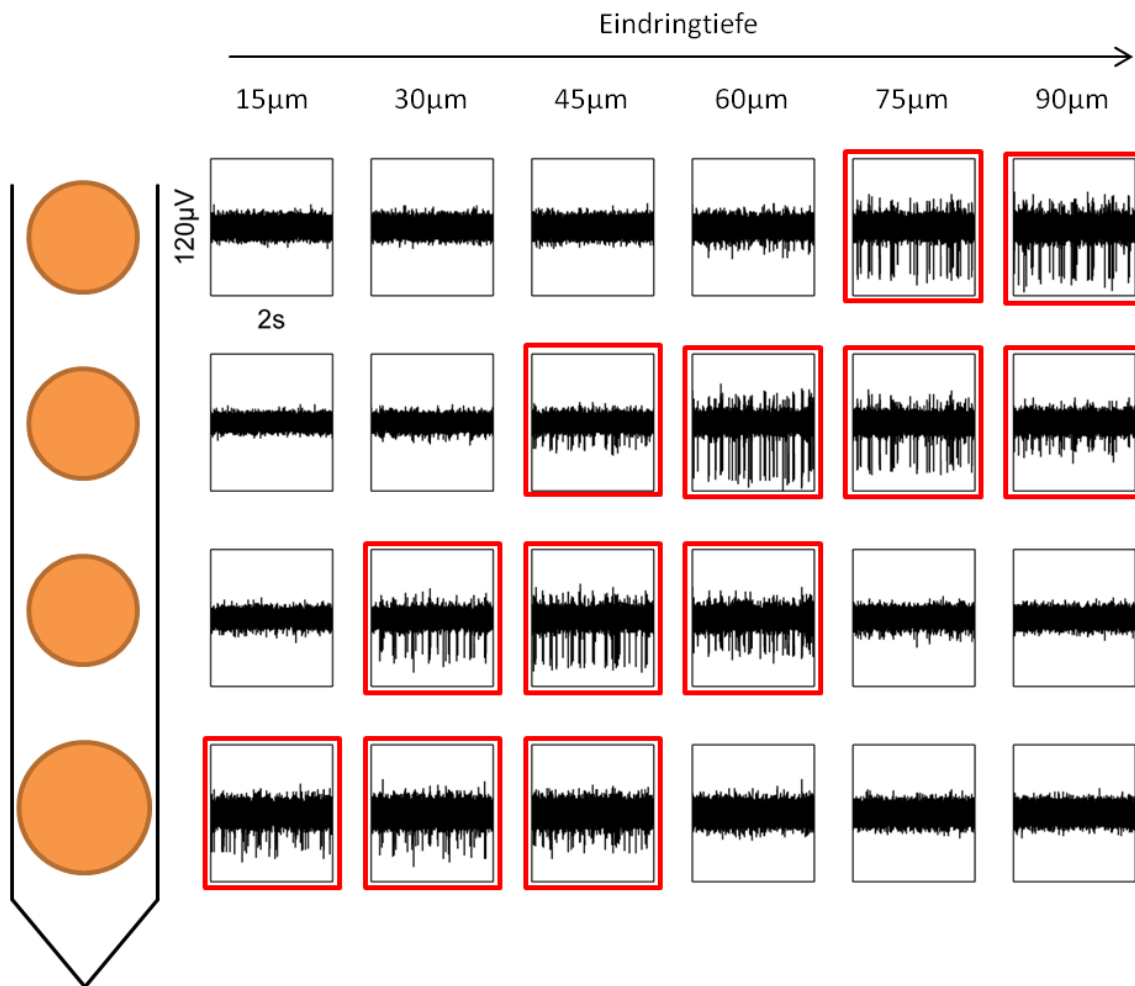


Abbildung 36 Positionierung der MEAs anhand neuronaler Aktivität

Die Abbildung zeigt die extrazelluläre Ableitung einer retinalen Ganglienzelle während der Positionierung des MEAs im Gewebe. Links im Bild befindet sich eine schematische Darstellung eines Schwertes der verwendeten MEAs mit den vier linear angeordneten Messelektroden. Rechts davon 24 Ausschnitte von Ableitspuren einer extrazellulären Ableitung in unterschiedlichen Eindringtiefen. Die rot umrandeten Ausschnitte zeigen die Ableitspuren mit neuronaler Aktivität. Die sechs Spalten zeigen jeweils die zeitlich simultanen Ableitspuren der vier Messelektroden für einen Ausschnitt von 2000 ms Länge in unterschiedlichen Eindringtiefen.

In einer Eindringtiefe von 15 µm wird die elektrische Aktivität nur von der vordersten Messelektrode aufgezeichnet. Das MEA wird in 15 µm Schritten in vertikaler Richtung in die Retina vorgefahren. Mit fortschreitender Eindringtiefe kann die elektrische Aktivität nacheinander auf den Messelektroden aufgezeichnet werden. In einer Tiefe von ca. 90 µm liegt die abgeleitete Zelle in der Nähe der obersten Elektrode. Liegt die Ganglienzelle zwischen zwei Messelektroden (z.B. zwischen den oberen Elektroden in 75 µm Eindringtiefe), ist die gemessene Amplitude auf beiden annähernd gleich groß.

5.4 Extrazelluläre Ableitungen von Ganglienzellen mit penetrierenden MEAs

Während der extrazellulären Ableitungen mit penetrierenden MEAs wurden maximale Amplituden von $250\ \mu\text{V}$ (U_{ss}) gemessen. Das Grundrauschen der Ableitungen lag zwischen $20\ \mu\text{V}$ und $40\ \mu\text{V}$ (U_{ss}). Die maximal erreichte Amplitude war abhängig von der Entfernung der Messelektrode zur Zielzelle und dem Elektrodenmaterial. Die besten Ergebnisse wurden mit frischen PEDOT-beschichteten Elektroden erzielt. Im Idealfall konnte parallel an vier Stellen in der Ganglienzellschicht abgeleitet werden, wenn alle Schwerter des MEAs gleichmäßig in das Gewebe eingeführt wurden. Im Regelfall wurde auf einer oder zwei Elektroden gleichzeitig gemessen.

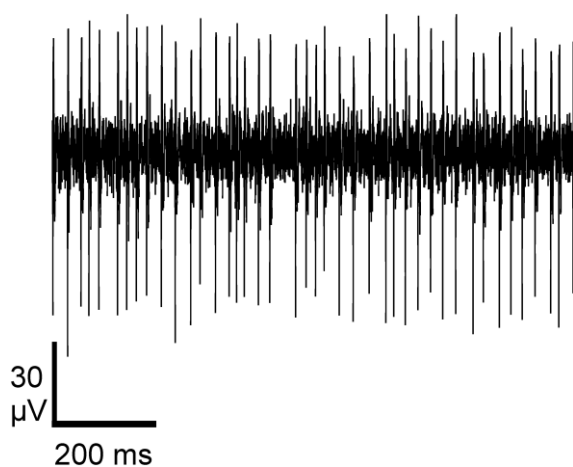


Abbildung 37 Extrazelluläre Ableitung mit penetrierendem MEA

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer typischen extrazellulären Ableitung mit penetrierendem MEA. Die Amplitude der Aktionspotentiale beträgt $90\text{--}120\ \mu\text{V}$ (U_{ss}). Wie die Mehrzahl der untersuchten Zellen ist diese spontan und unregelmäßig aktiv.

5.5 Optische Stimulation

Die optische Stimulation des Retinapräparates diente der Überprüfung des physiologischen Zustands der Retina nach erfolgter Präparation. Die spezifische Reaktion auf Lichtreize eignete sich als Kontrollversuch, da bei Ausleuchtung des gesamten Präparates und physiologischer Unversehrtheit mit einer neuronalen Antwort zu rechnen war. Optische Stimulationen wurden an insgesamt 62 unterschiedlichen Zellen durchgeführt. In 39 dieser Präparationen (63%) kam es zu einer neuronalen Antwort der untersuchten Ganglienzellen. Es konnten verschiedene Antworten beobachtet werden und somit bestimmte Typen von Ganglienzellen identifiziert werden. In 28 Experimenten (72% der erfolgreichen Stimulationen) führte die optische Stimulation zu einem Anstieg der Feuerfrequenz der abgeleiteten Ganglienzellen. In 11 Experimenten (28%) führte die Beleuchtung zu einer Reduzierung der Feuerrate. Im Folgenden wird das Antwortverhalten von drei einzelnen Zellen exemplarisch beschrieben.

5.5.1 Phasisch-tonische ON-Antwort

Phasisch-tonische Ganglienzellen antworten auf Beleuchtung mit einer zweiphasigen Erhöhung ihrer Feuerrate. Die Ganglienzelle aus Abbildung 38 feuert vor der Stimulation unregelmäßig mit einer Frequenz unter 1 Hz. Zu Beginn der Lichtstimulation kommt es zu einer starken Erhöhung der Feuerrate auf ca. 50 Hz, die nach $163 \text{ ms} \pm 21$ ($n=10$) einsetzt. Gefolgt wird diese Aktivitätsphase von einem kurzfristigen Aussetzen der elektrischen Aktivität. Die mittlere Feuerrate des Neurons stellt sich anschließend auf 10 - 15 Hz ein und fällt dann wieder auf den Anfangswert unter 1 Hz. Die optische Stimulation führt zu Aktivitätsphasen mit einer Gesamtlänge von $10,6 \text{ s} \pm 1,8$. In der Abbildung ist die Antwort auf drei aufeinanderfolgende Lichtpulse grafisch dargestellt. Die Ergebnisse der Reaktionen auf einzelne Lichtpulse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

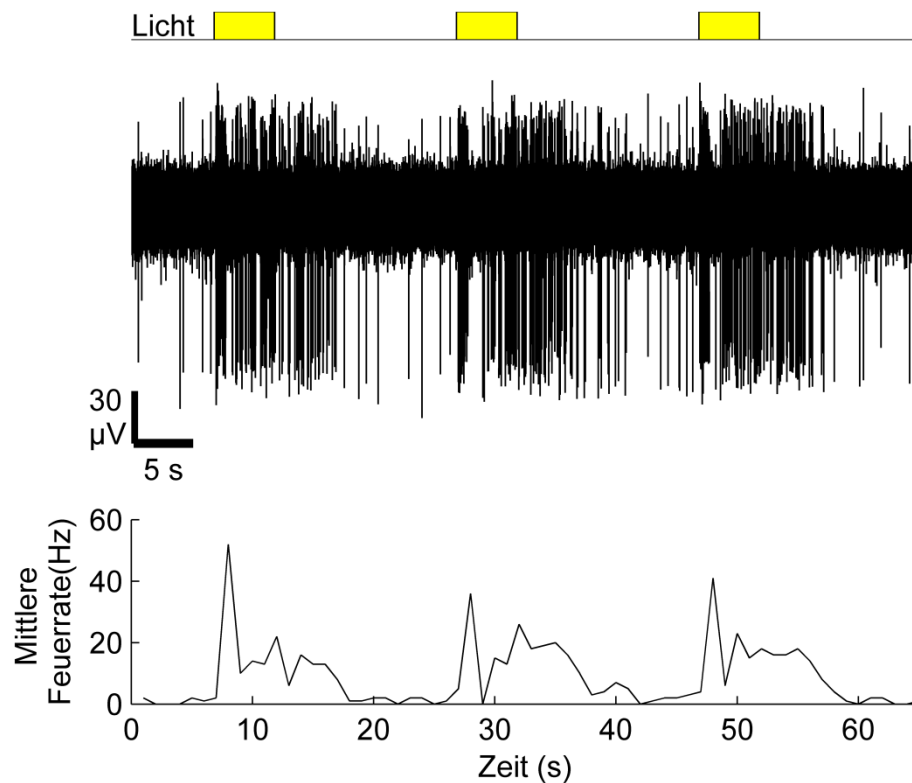


Abbildung 38 Phasisch-tonische Lichtantwort einer retinalen Ganglienzelle

Dargestellt ist die Reaktion einer Ganglienzelle auf drei aufeinanderfolgende Lichtpulse (Länge: 5 s). Es kommt zu Steigerungen der Feuerrate nach den optischen Stimulationen. Vor Beginn des ersten Lichtpulses feuert die Zelle nur unregelmäßig und mit geringer Frequenz. Nach jeder der drei Lichtpulse reagiert die Zelle mit einer phasisch-tonischen Antwort. Die phasische Komponente der Antwort hält auch nach Beendigung des Lichtpulses an. Nach weiteren 10 s verringert sich die Zahl der Aktionspotentiale spontan.

Tabelle 4 Reaktionszeiten einer phasisch-tonischen Ganglienzelle

Latenz der neuronalen Antwort [ms]	Dauer der phasischen Komponente [ms]	Dauer der gesamten Antwort [s]
187,7	1627	14,57
111,4	1181	12,37
166,3	795	9,77
148,6	695	10,45
165,9	831	9,21
162,4	781	11,51
160,5	819	10,09
179,6	761	8,57
176,9	756	10,49
173,3	797	9,01
$\bar{\phi}=163 \pm 21$	$\bar{\phi}=904 \pm 286$	$\bar{\phi}=10,6 \pm 1,8$

5.5.2 Hemmung der elektrischen Aktivität durch Lichtstimulation

Bei 11 von 39 Zellen (28%) konnte eine Hemmung der elektrischen Aktivität durch optische Stimulation beobachtet werden. Innerhalb dieser Gruppe konnten zwei unterschiedliche Antwortmuster differenziert werden.

Der erste Zelltyp reagiert unmittelbar nach dem Anschalten des Lichts mit einer Hemmung der elektrischen Aktivität, welche etwa für die halbe Dauer der Lichtpulse anhält (vgl. Abbildung 39). Im gezeigten Beispiel halten diese Hemmungen bei einer Stimuluslänge von 500 ms im Mittel $250,5\text{ms} \pm 31,3$ an. Nach dem Ende der Lichtstimulation steigt die Feuerfrequenz nach einer Latenzzeit von $173,7 \pm 36,4$ sprunghaft auf ca. 55 Hz an. Die Aktivität nimmt dann innerhalb einer Sekunde wieder ab und pendelt sich auf die Anfangsrate ein. Die Ergebnisse der Reaktionen auf einzelne Lichtpulse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Der zweite Typ von Ganglienzellen mit OFF-Reaktion reagiert auf die Beleuchtung mit einem kurzzeitigen Aussetzen der elektrischen Aktivität, welches nicht über die gesamte Zeit der Beleuchtung anhält. Noch während der Beleuchtung beginnen die Zellen erneut zu feuern. Eine Wiederholung des Lichtpulses führt reproduzierbar zu vergleichbaren Reaktionen. Das Ausschalten der Beleuchtung führt jedoch nicht zu einer tonischen OFF-Reaktion (vgl. Abbildung 40).

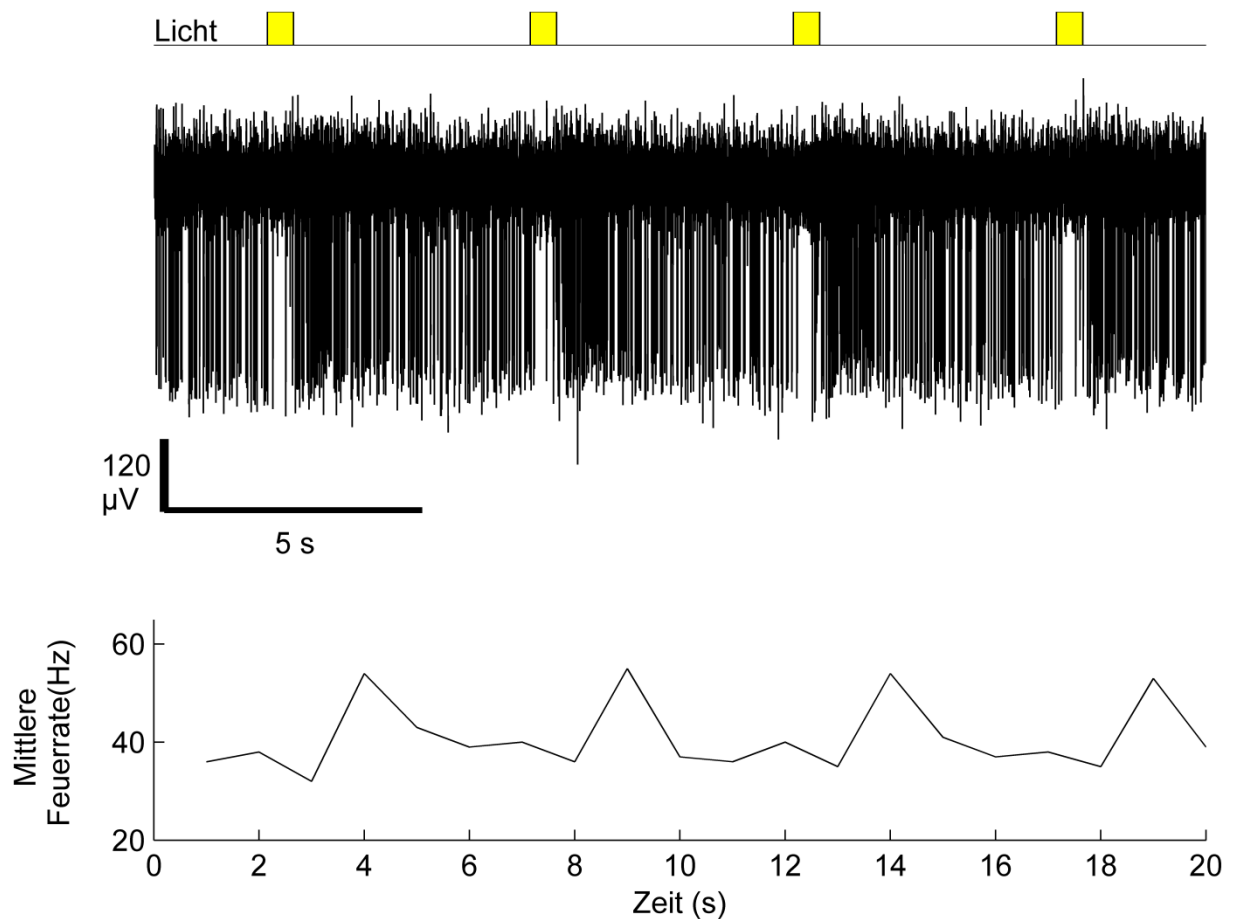


Abbildung 39 Ableitung einer Ganglienzelle mit tonischer OFF-Komponente

Die Abbildung zeigt die extrazellulär gemessene Aktivität einer Ganglienzelle während der Beleuchtung mit vier aufeinanderfolgenden Lichtpulsen von 500 ms Länge. Die mittlere Feuerrate bei Dunkelheit beträgt ca. 40 Hz. Zu Beginn der Belichtungsphasen verringert die Zelle ihre Aktivität kurzfristig bis zum abrupten Aussetzen der Aktivität. Unmittelbar nach dem Ausschalten der Beleuchtung kommt es zu einer kurzfristigen Steigerung der Aktivität auf ca. 55 Hz.

Tabelle 5 Reaktionszeiten einer OFF-Ganglienzelle auf Belichtung

Latenzzeit bis zur Hemmung [ms]	Hemmungsdauer [ms]	Latenzzeit bis zur tonischen Antwort nach [ms]
58,3	194,3	-*
68,3	288,9	191
74,4	287,3	-*
106,5	241,7	145,4
76,7	229,2	167,4
75,2	283,7	202,7
99,1	264,4	126,2
79,6	254,0	141
102,1	221,0	179,4
31,9	240,5	236,4
$\bar{\phi}=77,2 \pm 22,3$	$\bar{\phi}=250,5 \pm 31,3$	$\bar{\phi}=173,7 \pm 36,4$

*keine tonische Antwortkomponente feststellbar

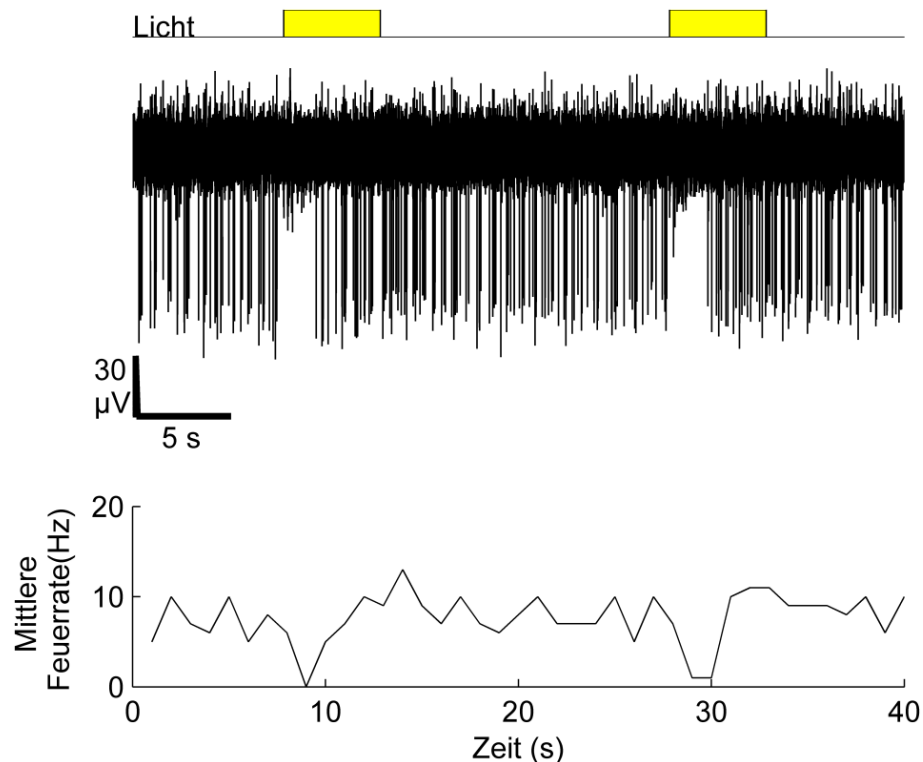


Abbildung 40 Reduzierung der Aktionspotentialfrequenz im Licht

Die Beleuchtung einer spontan aktiven Ganglienzelle für jeweils 5000 ms führt zum Aussetzen der elektrischen Aktivität für ca. 2100 ms. Die Aktivität setzt noch während des andauernden Lichtpulses wieder ein. Die Stimulation durch einen zweiten Lichtpuls nach 15 s führt zum erneuten Aussetzen der elektrischen Aktivität.

5.6 Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation des retinalen Netzwerkes durch die eigens entwickelten penetrierenden MEAs war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Die Stimulation war für unterschiedliche Stimulationsparameter erfolgreich. Grundsätzlich wurde mit zwei unterschiedlichen Stimulationsansätzen gearbeitet.

Zum einen wurde die Ladung durch einen stromgesteuerten Stimulator an das Gewebe geliefert. Alternativ wurde die Spannung definiert, so dass sich der resultierende Strom durch die Impedanz der Stimulationselektrode ergibt. Als eine erfolgreiche Stimulation wurde gewertet, wenn die Stimulation im Bereich der Bipolarzellen zur Erhöhung der Feuerrate der simultan abgeleiteten Ganglienzelle führte und dies statistisch nachgewiesen werden konnte.

5.6.1 Amplitudenvergrößerung nach elektrischer Stimulation

In zwei Ableitungen von 80 Ableitungen (2,5%) vergrößerte sich die Amplitude der Aktionspotentiale durch die elektrische Stimulation. Nach den meisten erfolgreichen Stimulationen (n=78) konnte kein Effekt auf die Amplitude der Aktionspotentiale beobachtet

werden. Im ausgewählten Beispiel (Abbildung 41) beträgt die Spitze-Tal-Amplitude der Aktionspotentiale vor der Stimulation ca. 90 μV . Nach der Stimulation mit zehn biphasischen Rechteckpulsen mit einer Stromstärke von 1 μA und einer Länge von 1 ms pro Phase kommt es durch die Sättigung des Verstärkers zu einer Blindzeit von ca. 1 s. Beim Wiedererscheinen der Aktionspotentiale erhöht sich deren Spitze-Tal-Amplitude auf ca. 130 μV . Die IEI-Histogramme lassen erkennen, dass sich die Aktivität der Neurone nicht grundlegend ändert. Zwar kommt es nach der Stimulation zu einer leichten Zunahme der IEIs zwischen 30-40 ms; die Verteilungsfunktionen weichen allerdings nicht signifikant voneinander ab.

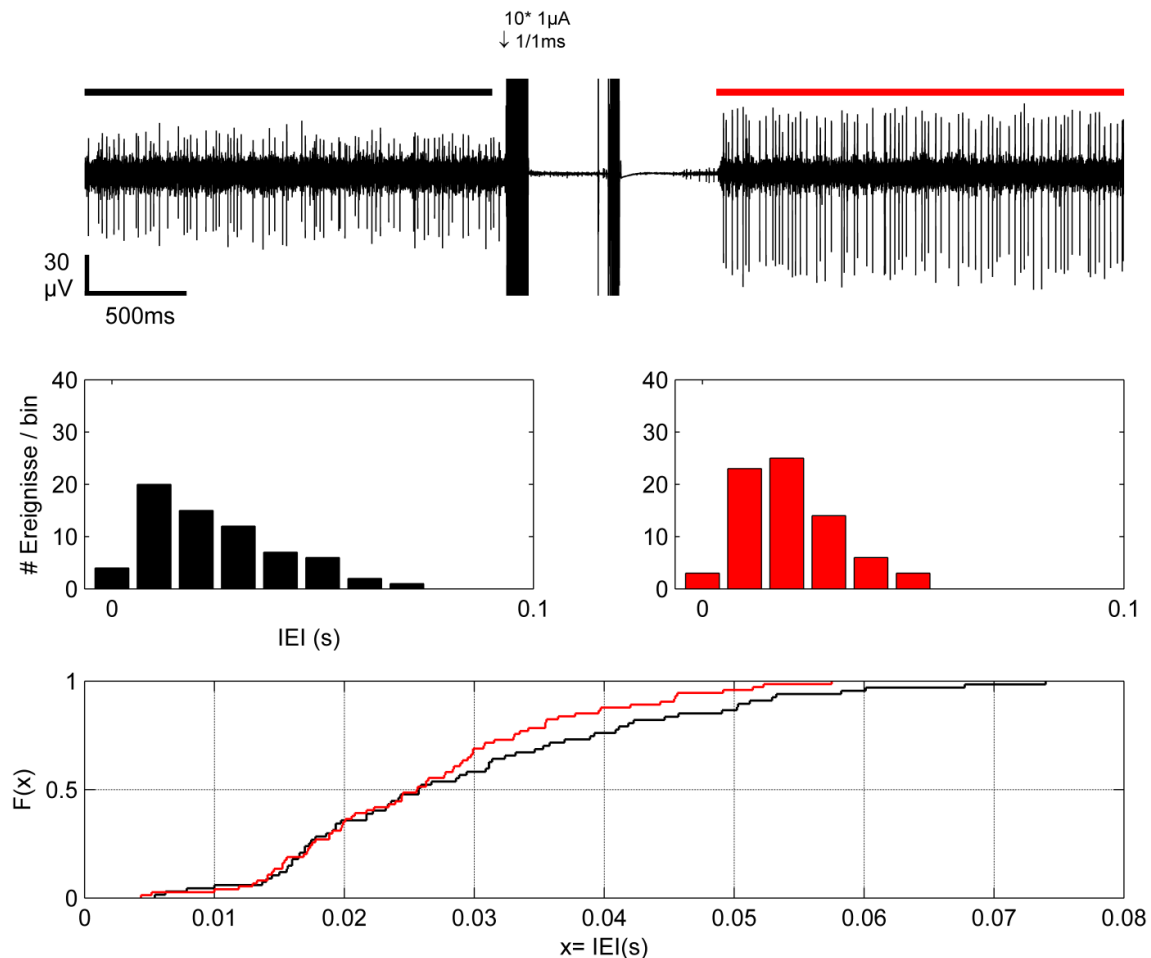


Abbildung 41 Amplitudenvergrößerung nach stromgesteuerter Stimulation

Oben: Extrazelluläre Ableitspur während der stromgesteuerten Stimulation mit zehn biphasischen Pulsen mit $1\ \mu\text{A}$ Amplitude und von $1\ \text{ms}$ Länge pro Phase. Der Pfeil oberhalb der Ableitspur markiert den Beginn der Stimulation. Die Stimulationsartefakte sind deutlich als schwarze vertikale Balken in der Ableitspur zu erkennen. Die horizontalen Balken über der Ableitspur markieren den analysierten Bereich. Die Farben werden in den Histogrammen und in der Darstellung der kumulativen Verteilungsfunktionen weitergeführt. Nach der Blindzeit, die auf die Stimulation folgt, ist ein deutlicher Anstieg der Amplitude der Aktionspotentiale zu erkennen.

Mitte: Die Histogramme zeigen die Verteilung der IEIs vor (links) und nach (rechts) der Stimulation. Das Histogramm nach der Stimulation zeigt einen leichten Anstieg kürzerer IEIs. Die Frequenz der Aktionspotentiale nimmt leicht zu.

Unten: Die kumulative Verteilungsfunktion nach der Stimulation (rot) zeigt einen geringfügig steileren Anstieg für Intervalle ab einer Länge von $25\ \text{ms}$. Der KS-Test erkennt keinen signifikanten Unterschied in den Verteilungen.

5.6.2 Stimulation mit Rechteckpulsen ansteigender Amplitude

Die Stimulationen mit spannungsdefinierten Stimulationspulsen zeigten einen Zusammenhang zwischen Stimulationsamplitude und Erregbarkeit der Zielzelle. Die Schwellenwerte für erfolgreiche Stimulationen schwankten zwischen aufeinanderfolgenden Experimenten innerhalb einer Präparation. Darüber hinaus führten Strom- oder Spannungsamplituden, die in einem Experiment zu Antworten der Zielzellen führten, in folgenden unabhängigen Präparationen nicht zwangsläufig zu messbaren Reaktionen.

Abbildung 42 zeigt das Verhalten einer retinalen Ganglienzelle auf die Erhöhung der Stimulationsamplitude für die spannungsdefinierte Stimulation. Eine allgemeingültige Aussage über die Schwellenwerte der Stimulationsamplitude kann nicht getroffen werden.

Für die spannungsgesteuerte Stimulation wurden Amplituden von 0,5 V bis 10 V getestet. Die effektive Spannung, die letztlich an den Stimulationselektroden anlag, war abhängig von den Impedanzen der Elektroden für die Frequenz der verwendeten Stimulationspulse sowie von den Widerständen der Zuleitungen auf den MEAs. Sie konnte demnach von der gewählten Spannung abweichen. Die niedrigste Amplitude, die zu einem Stimulationserfolg führte, betrug 0,9 V bei einer Pulslänge von 800 ms. In weiteren Ableitungen waren Stimulationen mit 1,1 V (Pulslänge 400 ms) und 2 V (Pulslänge 100 ms) erfolgreich. In drei unterschiedlichen Präparationen wurde erfolgreich mit einer Spannung von 10 V stimuliert. Bei dieser Spannung genügte eine Pulslänge von 1-2 ms. In weiteren Ableitungen lagen die Schwellen bei 6°V, 7°V oder 8 V bei einer Pulslänge von 1-3 ms. Im Spannungsbereich zwischen 2 V und 10 V bestand die Gefahr der Elektrolyse des Mediums und der Gewebeschädigung (vgl. Kap. 2.10.1). In insgesamt 18 unterschiedlichen Ableitungen wurde mit rechteckigen Spannungspulsen stimuliert. In 14 Ableitungen (78 %) gelang es durch die Stimulation einen messbaren Effekt zu erzielen.

Die stromgesteuerte Stimulation mit einzelnen Rechteckpulsen führte insgesamt seltener zu neuronalen Antworten an den Zielzellen. Von 27 Ableitungen wurde in drei Ableitungen (11%) ein leichter Anstieg der Feuerrate nach der Stimulation beobachtet. Allerdings konnte bei der anschließenden statistischen Analyse keine signifikante Änderung gezeigt werden. Es wurden Stromstärken zwischen 0,1 μ A und 10 μ A getestet. Leichte Effekte zeigten sich ausschließlich ab einer Amplitude von 5 μ A bei Stimulationspulsen von mindestens 10 ms Länge.

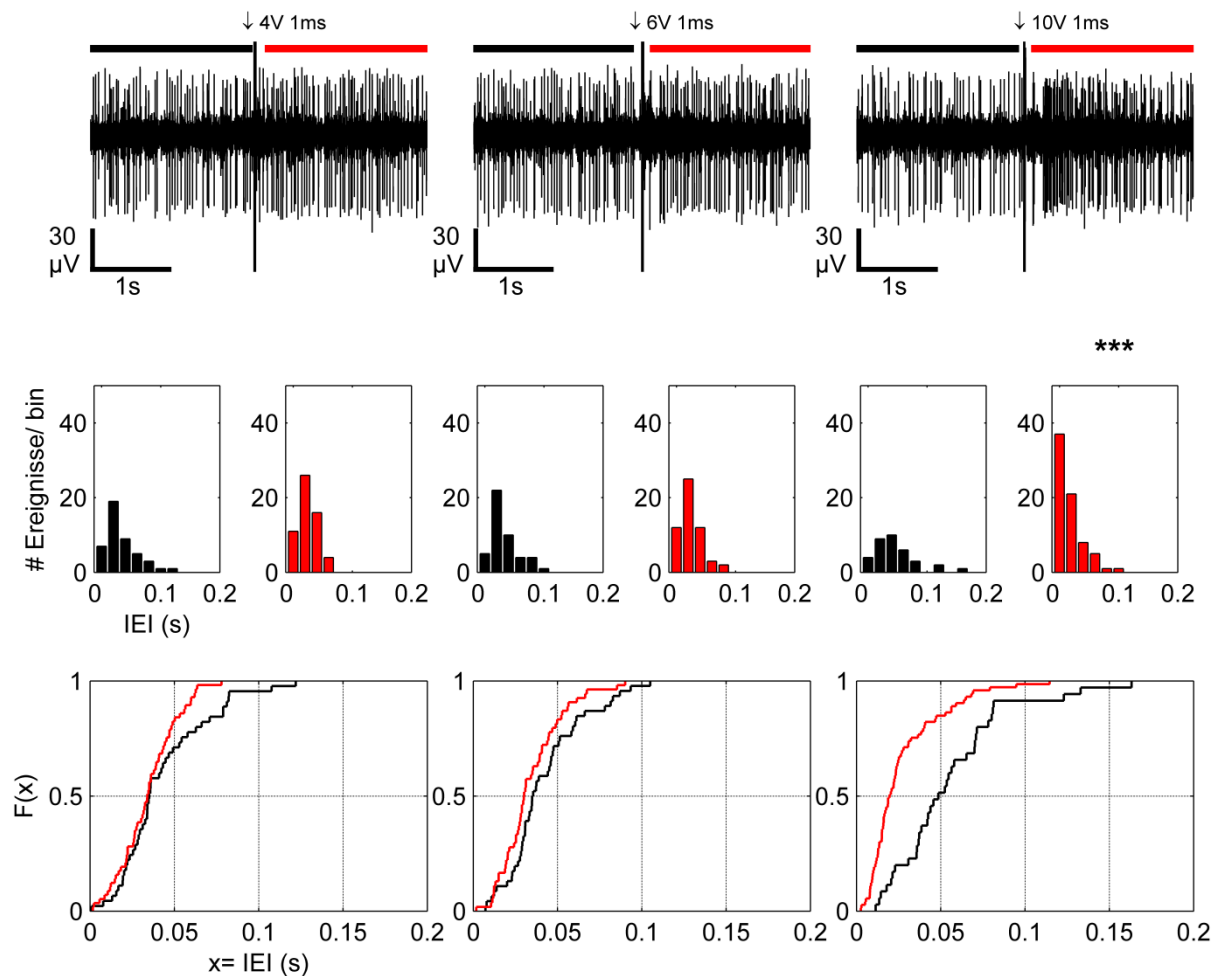


Abbildung 42 Erhöhung der Stimulationsspannung einzelner Pulse

Ganglienzellen reagieren auch auf die Stimulation mit kurzen Spannungspulsen von 1 ms. Die Pfeile oberhalb der Ableitspuren (*obere Reihe*) markieren den Zeitpunkt der Stimulation. Die Balken oberhalb der Ableitspur markieren den analysierten Bereich vor (*schwarz*) bzw. nach der Stimulation (*rot*). Die benötigte minimale Spannung beträgt im Beispiel 10 V. Zwei getrennte Stimulationen mit 4 V (*linke Spalte*) und 6 V (*mittlere Spalte*) zeigen keinen Effekt auf das Feuerverhalten des Neurons. Die IEIHs sowie die kumulativen Verteilungsfunktionen zeigen keine signifikanten Veränderungen. Die dritte Stimulation erfolgt mit einer Spannung von 10 V (rechte Spalte). In der Ableitspur ist, 50 ms nach dem Stimulationspuls, ein Anstieg der Feuerrate des Neurons für ca. 500 ms zu erkennen. Die Verteilung der IEIs nach der Stimulation (*rotes Histogramm*) verschiebt sich deutlich in Richtung der Y-Achse. Der direkte Vergleich der kumulativen Verteilungsfunktionen verdeutlicht die beschleunigte Feuerrate des Neurons nach der Stimulation (*rote Linie*) durch einen von Beginn an steileren Anstieg. Der KS-Test bestätigt den signifikanten Unterschied der Verteilungen ($***=\alpha<0,001$).

5.6.3 Sinusförmige Stimulationspulsfolgen mit ansteigender Amplitude

Neben rechteckigen Stimulationspulsen wurde die Effektivität von sinusförmigen Stimulationspulsfolgen getestet. Insgesamt wurden 15 unterschiedliche Zellen getestet. Davon reagierten sieben Zellen (47%) auf die Stimulation. Die verwendeten Stromstärken variierten zwischen $0,1 \mu\text{A}$ und $10 \mu\text{A}$. Leichte Zellantworten zeigten sich ab einer

Stromstärke von 1 μA , traten statistisch nachweisbar allerdings erst ab einer Stromstärke von 5 μA auf. Die Dauer der getesteten Stimulationsfolgen lag zwischen 100 ms und 1000 ms. Erfolgreiche Stimulationen traten ab einer Länge von 125 ms auf. Die Frequenzen des Sinuspulses wurden zwischen 10 Hz und 1000 Hz variiert.

In Abbildung 43 ist die Reaktion einer Ganglienzelle auf drei 50 Hz Sinusstimulationen von 500 ms Länge gezeigt. Während eine Stromstärke von 1 μA und 2 μA nicht zu einem Anstieg der Feuerrate führt, ist nach der Stimulation mit 5 μA eine neuronale Antwort zu erkennen. Die Frequenz auftretender Potentiale nimmt zu. In der Verteilung nach der Stimulation häufen sich kurze IEIs. Die Verteilungsfunktionen vor und nach der Stimulation weichen entsprechend signifikant (***) ($\alpha < 0,001$) voneinander ab.

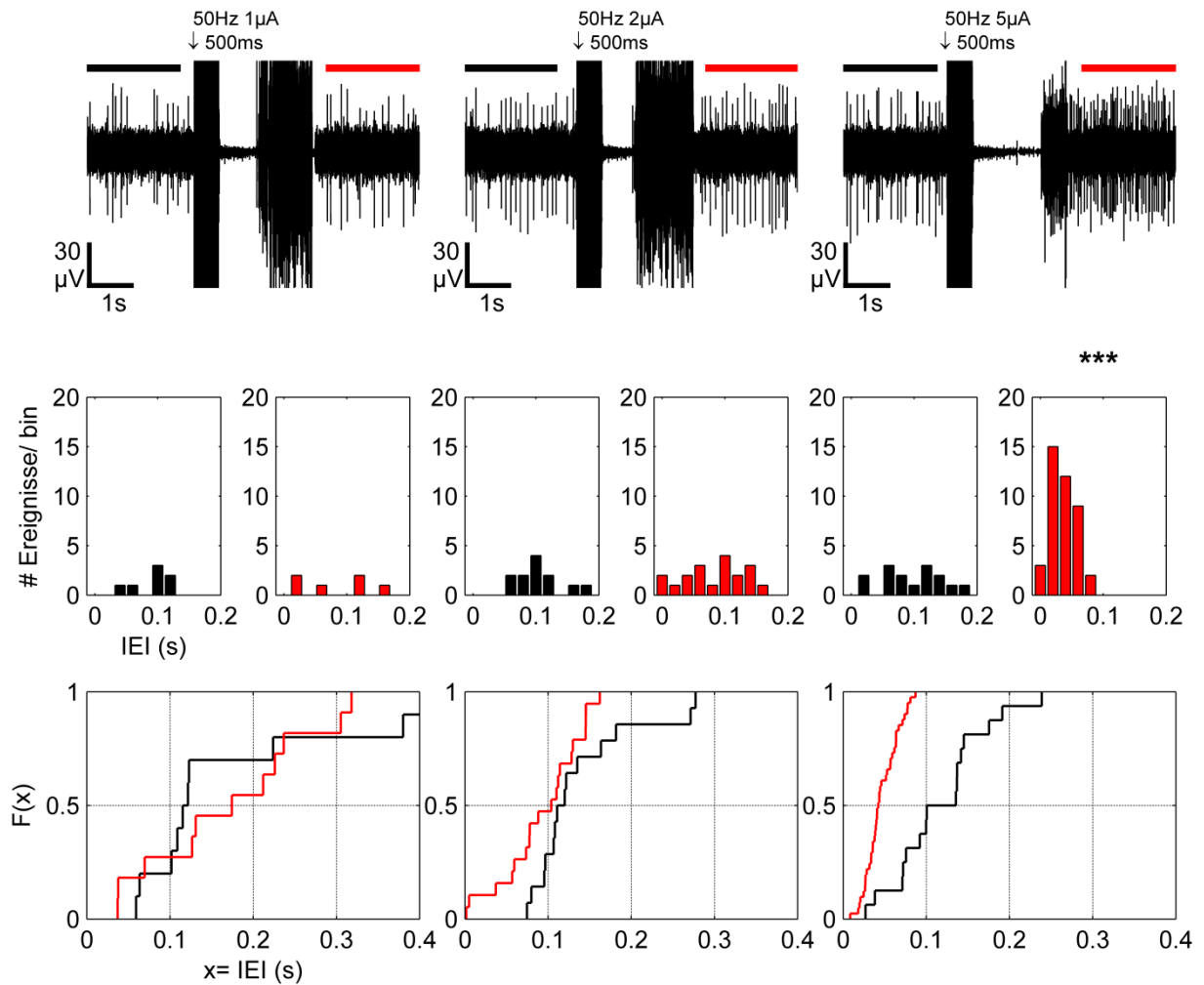


Abbildung 43 Erfolgreiche Stimulation durch Erhöhung der Stromstärke

Die Abbildung zeigt die Aktivität einer Ganglienzelle vor und nach der Stimulation mit sinusförmigen Stimulationspulsen unterschiedlicher Stromstärke (1 μA , 2 μA , 5 μA) bei konstanter Stimulationsfrequenz (50 Hz) und Stimulationsdauer (500 ms). Die Zeitpunkte der Stimulation sind durch Pfeile oberhalb der Ableitspuren (*obere Reihe*) gekennzeichnet. Die Balken oberhalb der Ableitspuren markieren den berechneten Bereich. Nach den Stimulationspulsen kommt es zu starken Artefakten für eine Dauer von ca. 3500 ms. Vor Beginn des ersten Stimulationspulses feuert die Zelle mit einer Grundfrequenz von ca. 5 Hz. Die erste elektrische Stimulation (1 μA) führt nicht zur Änderung der Aktivität. Die zweite Stimulation (2 μA) führt zu einer leichten Beschleunigung der elektrischen Aktivität. Die Verteilungsfunktion der IEIs nach der Stimulation (*unten Mitte rote Linie*) zeigt das Auftreten kürzerer IEIs. Diese Änderung ist statistisch nicht signifikant. Erst nach der Stimulation mit einer Stromstärke von 5 μA (*rechte Spalte*) kommt es zu einem deutlichen Anstieg der elektrischen Aktivität. Das Histogramm (*rechts Mitte, rot*) zeigt einen deutlichen Gipfel. Die Verteilungsfunktion (*rot*) steigt früh an und weicht signifikant von der Verteilung vor der Stimulation ab (**= $\alpha < 0,001$).

5.6.4 Frequenzabhängigkeit sinusförmiger Stimulation

In insgesamt drei Ableitungen wurde die Frequenzabhängigkeit der Sinusstimulation getestet. Hierbei zeigte sich in allen drei Fällen ein Zusammenhang zwischen Frequenz und Stärke der Antwort. Bei Stimulationsfrequenzen zwischen 50- 200 Hz konnten die stärksten Antworten beobachtet werden (Stromstärke 10 μ A). In zwei von drei Ableitungen führte die Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 800 Hz zu schwächeren, statistisch nicht mehr nachweisbaren Reaktionen der Zelle. Statistisch nachweisbar waren Sinusstimulationsfolgen bis zu einer Frequenz von 400 Hz. Frequenzen von 1000 Hz führten in keiner der Ableitungen zu zellulären Antworten.

Abbildung 44 zeigt das veränderte Antwortverhalten einer retinalen Ganglienzelle auf die Variation der Frequenz einer stromgesteuerten, sinusförmigen Stimulationsfolge. Die Stimulationen erfolgen für 1000 ms mit einer Amplitude von 10 μ A. Die erste und die dritte Stimulationspulsfolge weisen eine Frequenz von 200 Hz auf, dazwischen ein Puls mit einer Frequenz von 800 Hz. Auf beide 200 Hz-Pulse folgt eine deutliche Antwort der Zielzelle. Die mittlere Feuerrate steigt von 14-17 Hz vor der Stimulation auf Werte von ca. 40 Hz an. Die Verteilungsfunktionen nach der Stimulation zeigen in beiden Fällen einen deutlich steileren Anstieg als die entsprechenden Verteilungen vor der Stimulation. Der Unterschied der Verteilungen ist statistisch signifikant. Im direkten Vergleich zeigt die Stimulation mit 800 Hz einen undeutlichen Effekt, der durch die Verschiebung des Histogramms und einen steileren Anstieg der Verteilungsfunktion sichtbar, aber nicht signifikant ist. Die Feuerrate steigt von 15 Hz vor der Stimulation auf 25 Hz nach der Stimulation. Die betreffende Zelle reagierte schwach auf Frequenzen über 800 Hz.

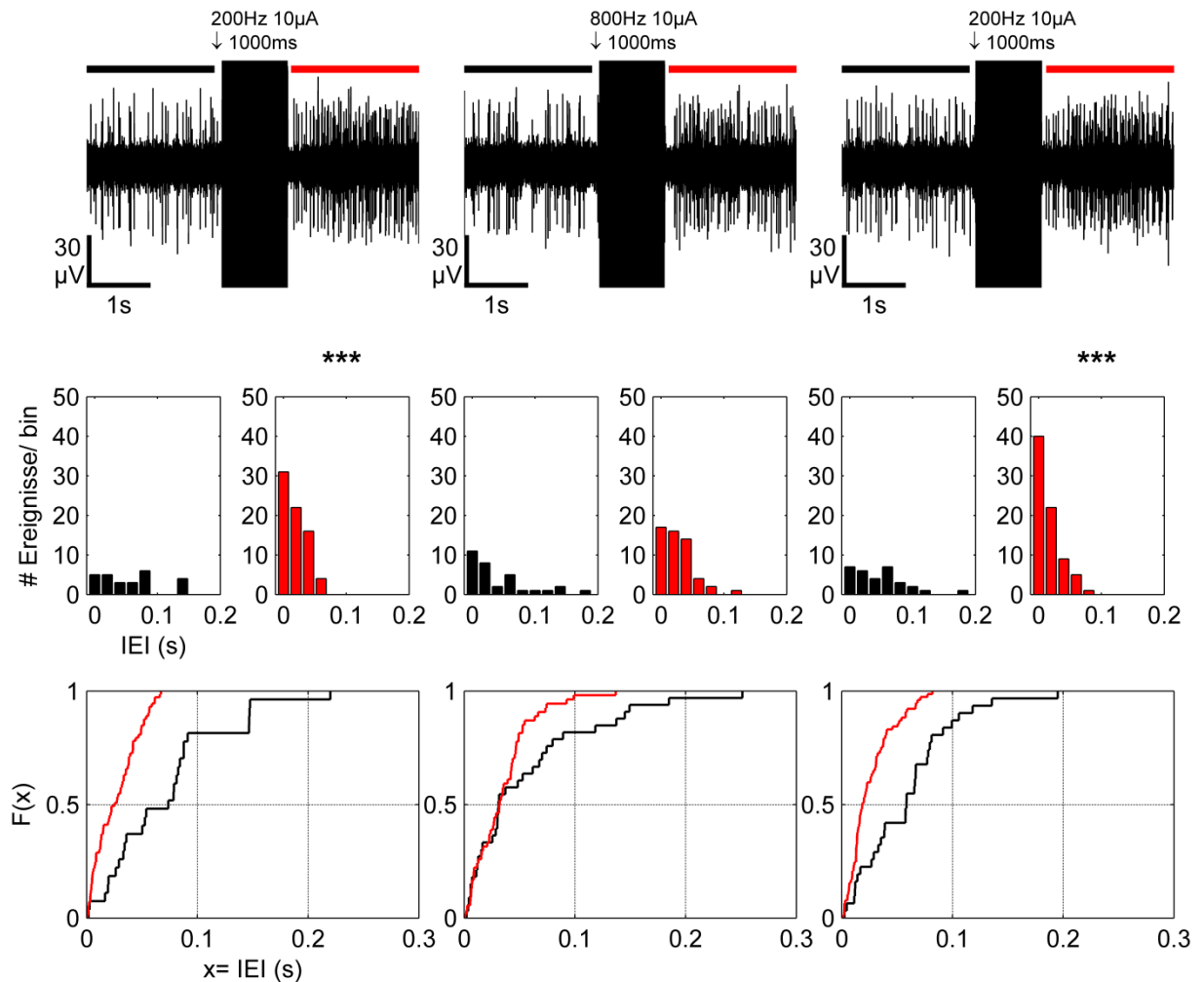


Abbildung 44 Frequenzabhängigkeit sinusförmiger Stromstimulation

Die im Beispiel gezeigte Zelle wird abwechselnd mit einem sinusförmigen Stimulationspuls niedriger Frequenz (200 Hz) und hoher Frequenz (800 Hz) stimuliert. Stimulationsdauer (1000 ms) und Stromstärke (10 μA) bleiben konstant. Die Pfeile oberhalb der Ableitspuren markieren den Zeitpunkt der Stimulationspulse. Die Stimulationsartefakte sind als breite vertikale Balken in der Ableitspur zu erkennen. Die Balken oberhalb markieren den analysierten Bereich vor (schwarz) und nach (rot) der Stimulation. Vor der ersten elektrischen Stimulation (linke Spalte) ist die Zelle mit einer Frequenz von ca. 10 Hz spontan aktiv. Das zugehörige Histogramm (schwarz) zeigt eine flache Verteilung. Die Stimulation führt zu einer signifikanten Steigerung der Feuerrate des Neurons. Das IEIH zeigt eine Zunahme kurzer IEIs. Im direkten Vergleich der kumulativen Verteilungsfunktionen wird der Anstieg ebenfalls deutlich. Nach der Stimulation sind alle auftretenden Intervalle kürzer als 80 ms, wohingegen vor der Stimulation auch Intervalle bis zu 210 ms auftreten. Der KS-Test bestätigt eine signifikante Abweichung ($***=\alpha<0,001$). Der zweite Stimulationspuls von 800 Hz (mittlere Spalte) führt zu einem leichten Anstieg der Feuerrate, der statistisch nicht nachweisbar ist. Eine abschließende Stimulation von 200 Hz führt erneut zum Anstieg der elektrischen Aktivität der Zelle.

5.6.5 Sinusförmige und rechteckige Stimulationspulsfolgen gleicher Frequenz

Der direkte Vergleich von Stimulationsfolgen aus rechteckigen Einzelpulsen gegenüber sinusförmigen Pulsen mit gleicher Frequenz und Länge führt im Beispiel (Abbildung 45) zu einem ähnlichen Antwortverhalten der Zelle. Eine Folge von 50 biphasischen Einzelpulsen mit einer Einzelpulslänge von 20 ms und einer Stromstärke von 10 μ A wird mit einer Sinusstimulation von einer Sekunde Länge und einer Frequenz von 200 Hz bei gleichbleibender Stromstärke verglichen. Die Ableitungen zeigen ein ähnliches Aktivitätsmuster vor den jeweiligen Stimulationspulsen. Die Feuerrate liegt in beiden Fällen bei ca. 15 Hz. Nach den Stimulationsartefakten nimmt die Frequenz der auftretenden Aktionspotentiale in beiden Fällen zu (biphasisch= 31 Hz; sinusförmig= 39 Hz). Es kommt nicht zu einer Erhöhung der Amplituden. Ein näherer Blick auf die IEIHs zeigt eine deutliche Zunahme kurzer Intervalle zwischen den Aktionspotentialen nach erfolgter Stimulation. Die Verteilungsfunktionen zeigen für den Zeitraum nach der Stimulation einen deutlich steileren Anstieg im Vergleich zu der Verteilung vor der jeweiligen Stimulation an. Nach beiden Stimulationen zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Verteilungen vor und nach der Stimulation. Das sinusförmige Stimulationsmuster führt folglich zu einer ähnlichen Antwort der Zielzelle, wie rechteckige Pulse mit gleicher Frequenz (200 Hz). Dieser Effekt konnte innerhalb dieser Ableitung mehrfach hintereinander gemessen werden.

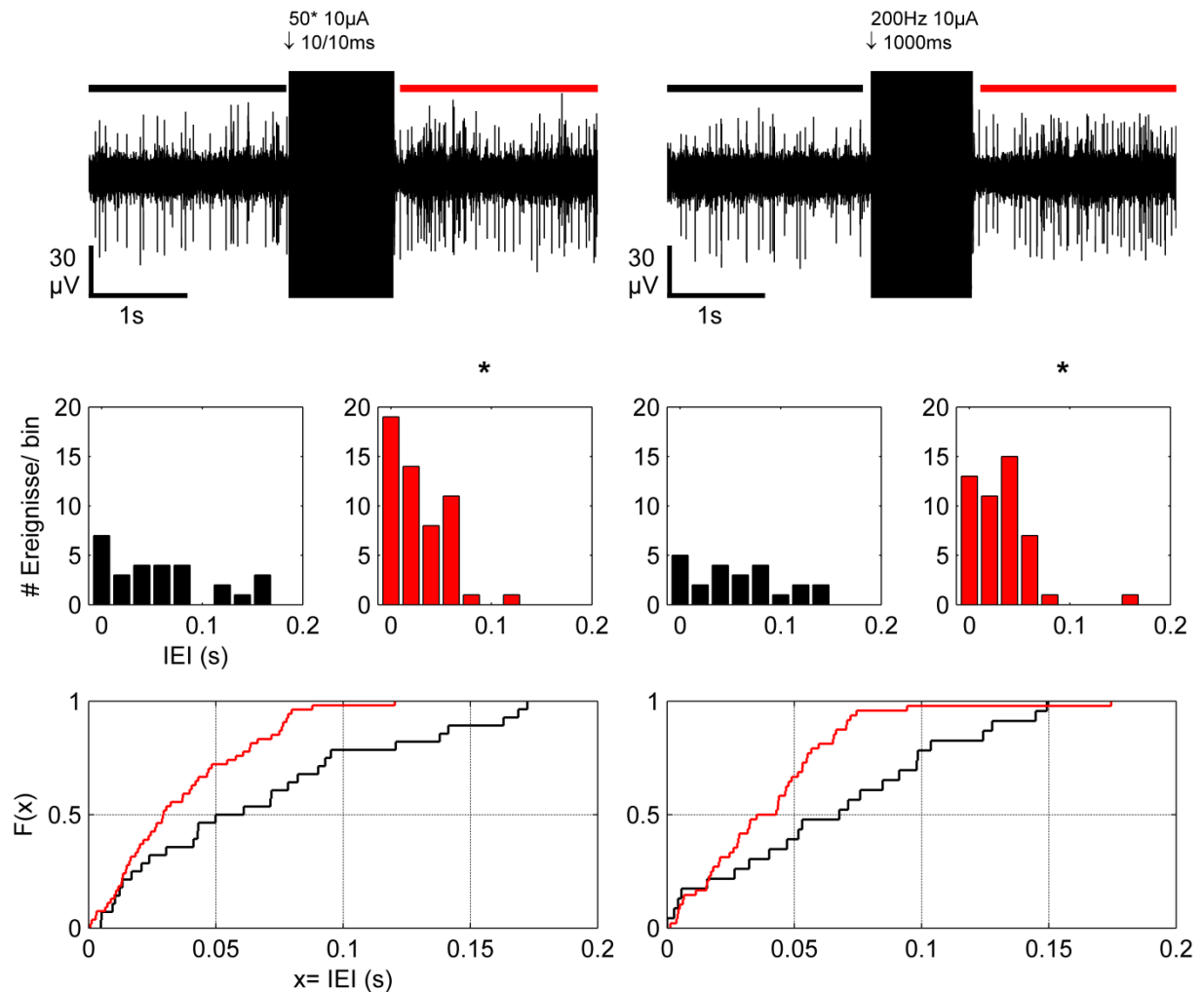


Abbildung 45 Rechteckpulse und sinusförmige Stimulationspulse gleicher Frequenz

Die Stimulation mit rechteckigen Pulsen (*linke Spalte*) führt zu einem ähnlichen Antwortverhalten wie die Stimulation mit einer sinusförmigen Pulsfolge (*rechte Spalte*). Die Ableiturspuren zeigen für beide Fälle ein erhöhtes Auftreten von Aktionspotentialen nach der Stimulation. Die für die Berechnung verwendeten Ausschnitte von 2 s vor bzw. nach der Stimulation sind durch die roten bzw. schwarzen Balken oberhalb der Ableiturspur markiert. Der Vergleich der Histogramme verdeutlicht die Zunahme kurzer IEIs nach beiden Stimulationen. Die kumulierten Verteilungsfunktionen (*unten*) zeigen für beide Stimulationen eine signifikante Abweichung (*= $\alpha < 0,05$) nach erfolgter Stimulation (*rote Linien*).

5.6.6 Stimulation durch akkumulierte Stimulationspulse

In insgesamt fünf Ableitungen reagierten die untersuchten Neurone nicht auf einzelne Stimulationspulse, jedoch auf mehrere aufeinanderfolgende Stimulationspulse in größerem zeitlichem Abstand (Intervall: 10 s).

Im gezeigten Beispiel (Abbildung 46) kommt es nach zwei Stimulationspulsen (5 V; 30 ms) nicht zu einer Erhöhung der Feuerrate des betreffenden Neurons. Erst nach dem dritten Stimulationspuls kann eine signifikante Erhöhung der Frequenz festgestellt werden. Die einzelnen Pulse wurden mit einem Abstand von 10 s appliziert. Der Effekt konnte innerhalb derselben Ableitung nach einer Pause von 100 s reproduziert werden.

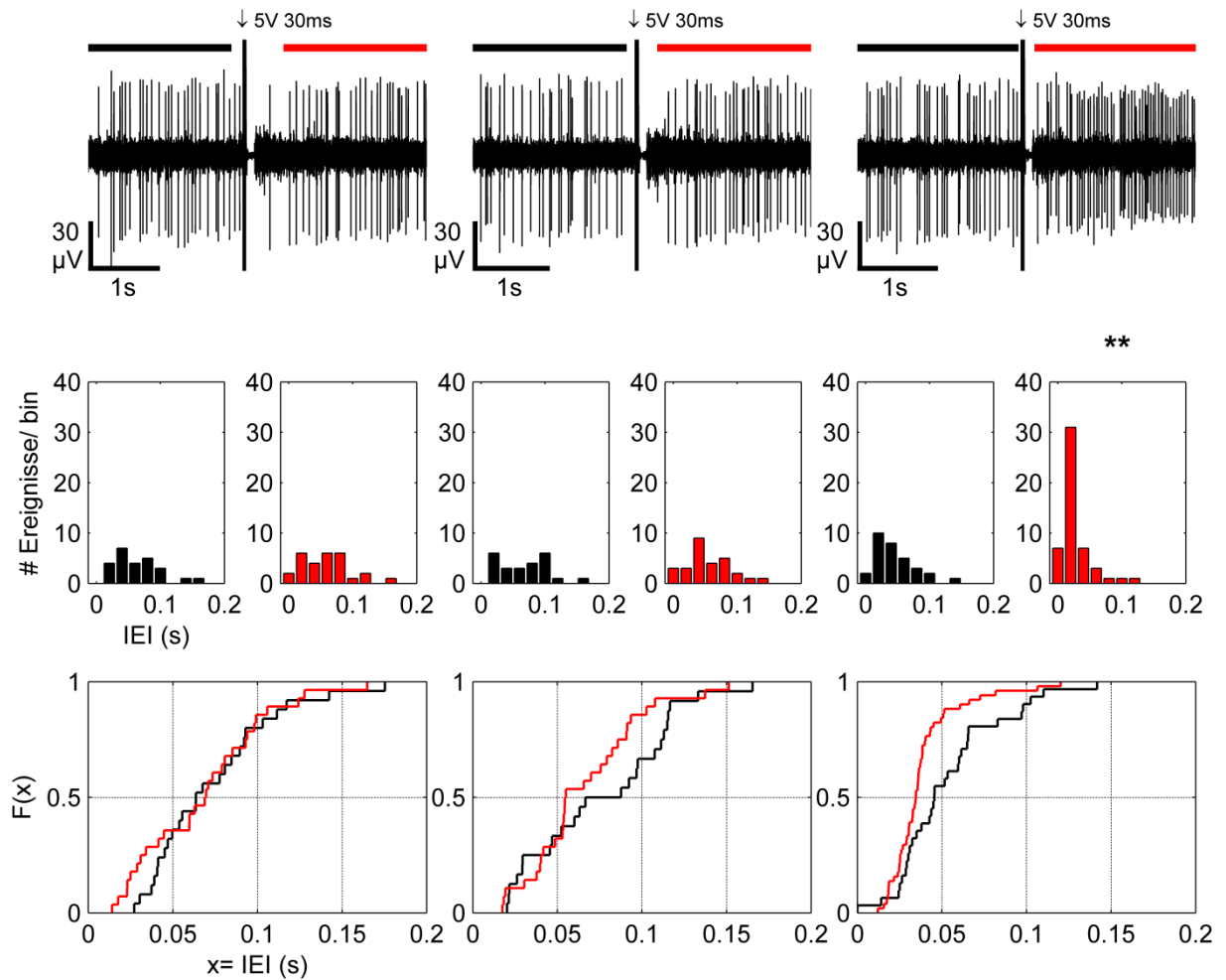


Abbildung 46 Steigerung der Feuerfrequenz durch aufeinanderfolgende Einzelpulse

Die Abbildung zeigt die Reaktion eines Neurons auf drei im Abstand von 10 s aufeinanderfolgende Stimulationspulse (5 V; 30 ms). *Linke Spalte:* Die Feuerrate des Neurons bleibt nach dem Stimulationspuls nahezu unverändert, die Histogramme sowie die kumulative Verteilungsfunktion zeigen keine signifikanten Veränderungen. *Mittlere Spalte:* Auch nach dem zweiten Stimulationspuls kommt es nicht zu einer Erhöhung der Feuerrate. *Rechte Spalte:* Nach dem dritten Stimulationspuls kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Feuerrate. Dies ist sowohl durch eine Verdichtung der Aktionspotentiale nach der Stimulation in der Ableitspur, als auch in einem distinkten Gipfel im Histogramm im Bereich zwischen 20-40 ms zu erkennen. Die Verteilungsfunktion der IEIs nach der Stimulation steigt deutlich steiler an. Die Verteilungen weichen statistisch signifikant voneinander ab (**= $\alpha < 0,01$).

5.6.7 Summierungseffekt durch schnelle Pulsfolgen

In insgesamt zwei Ableitungen kam es durch einzelne kurze Spannungspulse nicht zu einer Reaktion, hingegen jedoch bei einer Pulsfolge aus mehreren dieser Einzelpulse in kurzen Abständen.

Abbildung 47 zeigt wie zwei einzelne Spannungspulse von 8 V Amplitude und einer Länge von 1 ms keinen Einfluss auf die Feuerrate des betreffenden Neurons haben. Zuvor wurde mehrfach mit Einzelpulsen stimuliert, ohne dass es zu einer wirksamen Akkumulation der Ladungen kam. Eine Stimulation aus vier unmittelbar aufeinanderfolgenden Einzelpulsen führt jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Aktionspotentialfrequenz für mehrere Sekunden. Anschließende Stimulationen mit weiteren gleichen Einzelpulsen bleiben ohne Stimulationserfolg.

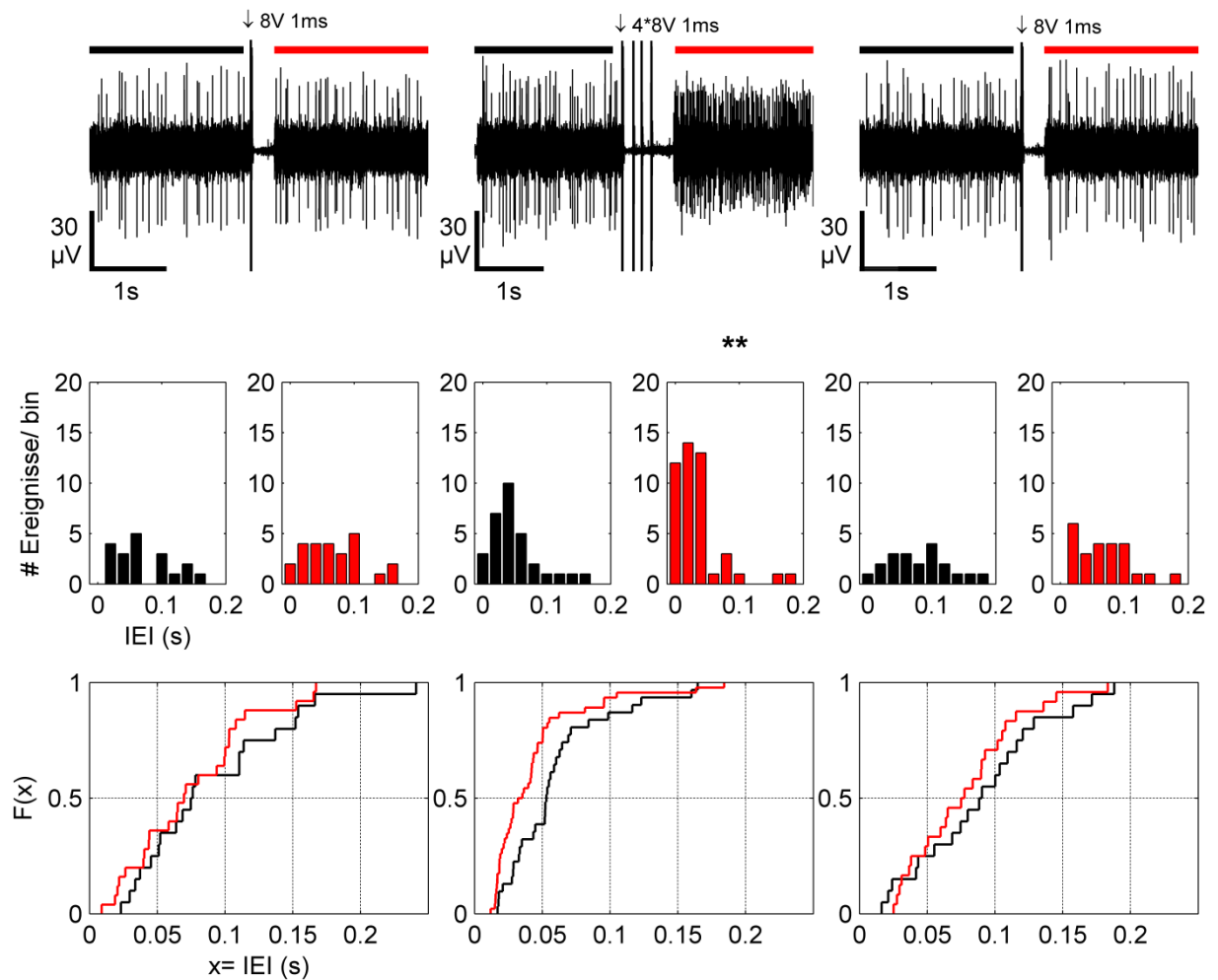


Abbildung 47 Erfolgreiche Stimulation durch schnelle Pulsfolgen

Die Anzahl der applizierten Spannungspulse bestimmt den Stimulationserfolg. Die Pfeile oberhalb der Ableitursuren markieren den Zeitpunkt der Stimulationspulse. Die Stimulationsartefakte sind als breite vertikale Balken in der Ableiturspur zu erkennen. Die Balken oberhalb der Ableiturspur markieren den analysierten Bereich vor (schwarz) und nach (rot) der Stimulation. Nach dem ersten Stimulationspuls zeigt die Ganglienzelle keine Reaktion (*linke Spalte*). Die Histogramme und Verteilungsfunktionen sind unverändert. Die zweite Stimulation aus vier schnell aufeinanderfolgenden Pulsen mit unveränderten Parametern führt zu einer Reaktion (*mittlere Spalte*). Die Frequenz der Aktionspotentiale nimmt deutlich zu. Nach der Stimulation ist im Histogramm eine deutliche Zunahme der IEIs unterhalb von 30 ms zu erkennen. Die Verteilungsfunktion der IEIs (rot) zeigt einen deutlichen Anstieg der kurzen Intervalle (>50 ms). Der KS-Test bestätigt die signifikante Veränderung (**= $\alpha < 0,01$). Nach der dritten Einzelpuls-Stimulation nach weiteren 10 s ist kein Effekt auf die Feuerrate des Neurons zu erkennen (*rechte Spalte*).

5.6.8 Variation der Länge einzelner Stimulationspulse

Die Gesamtdauer einer elektrischen Stimulation kann entweder durch die Summation einzelner Pulse oder durch die Dauer eines Einzelpulses variiert werden. Prinzipiell konnte beobachtet werden, dass längere Stimulationspulse wahrscheinlicher zu einer zellulären Antwort führen. Getestet wurden einzelne Stimulationspulse mit Längen zwischen 0,01 - 1000 ms. Der kürzeste erfolgreiche Einzelpuls hatte eine Länge von 1 ms bei Amplituden zwischen 6 V und 10 V. Bei niedrigeren Spannungen musste die Pulslänge entsprechend vergrößert werden um eine Zellantwort zu erreichen. Eine Spannung von 5 V verlangte eine Pulslänge von mindestens 30 ms. In weiteren Ableitungen führten Spannungspulse mit einer Amplitude von 2 V ab einer Länge von 100 ms zu neuronalen Antworten. Der längste Einzelpuls, der zu einem beobachtbaren Effekt führte, hatte eine Länge von 800 ms bei einer Amplitude von 0,9 V.

Im hier gezeigten Beispiel (Abbildung 48) werden drei einzelne spannungsgesteuerte Stimulationspulse gleicher Amplitude (1,1 V) in der Länge variiert. Exemplarisch sind die Ergebnisse für 100 ms, 200 ms und 400 ms gezeigt. Der Stimulationspuls von 100 ms führt nicht zu einer Veränderung des Antwortverhaltens der abgeleiteten Zelle. Die Verteilungsfunktionen weichen geringfügig voneinander ab. Nach dem zweiten dargestellten Stimulationspuls von 200 ms erhöht sich die Frequenz der Aktionspotentiale leicht, wie in der Verschiebung der Intervalle im zugehörigen Histogramm zu erkennen ist. Die Verteilungsfunktion zeigt einen leicht steileren Anstieg für die Intervalle ab einer Länge von 50 ms. Diese Abweichung ist statistisch nicht signifikant. Eine weitere Erhöhung der Länge des Stimulationspulses auf 400 ms führt schließlich zu einem deutlichen Anstieg der Feuerrate der untersuchten Ganglienzelle. Das IEIH zeigt nun einen deutlichen Gipfel für Intervalle zwischen 20-60 ms. Die Verteilungsfunktion zeigt, dass ca. 80% der Intervalle kleiner als 50 ms sind. Alle Intervalle nach der Stimulation sind kleiner als 70 ms, wohingegen vor der Stimulation auch solche mit einer Länge von maximal 110 ms zu erkennen sind. Die statistische Überprüfung der Verteilungen bestätigt die signifikante Veränderung der neuronalen Aktivität nach der Stimulation. Der Einfluss der Länge einzelner Stimulationspulse wurde in insgesamt drei Experimenten bestätigt.

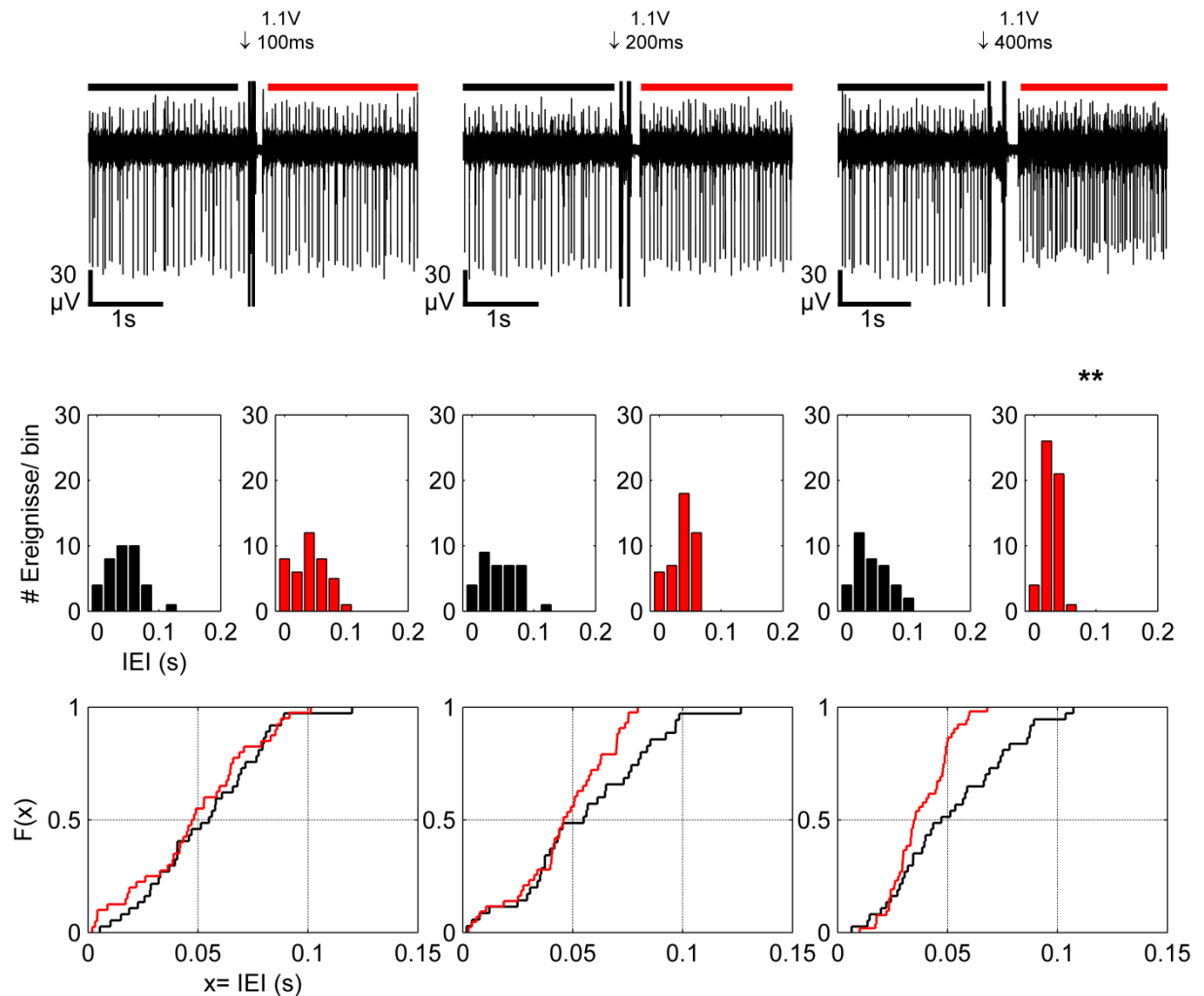


Abbildung 48 Erhöhung der Pulsdauer einzelner Stimulationspulse

Eine Ganglienzelle antwortet auf die Stimulation des Netzwerkes nach einer kritischen Länge der Einzelpulse. Die Stimulation erfolgt mit biphasischen Spannungspulsen mit einer Amplitude von 1,1 V. Gezeigt sind drei Stimulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in denen ausschließlich die Länge der Einzelpulse variiert. Nach der ersten Stimulation mit einer Pulslänge von 100 ms (*linke Spalte*) kommt es nicht zur Veränderung der elektrischen Aktivität. Die IEIHs (*links Mitte*) vor und nach der Stimulation zeigen eine ähnliche Verteilung. Die Verteilungsfunktionen (*links unten*) bestätigen, dass die Stimulation nicht zu einem Effekt führt. Der zweite Stimulationspuls hatte mit 200 ms die doppelte Länge des ersten Pulses (*mittlere Spalte*). Das zugehörige Histogramm und die Verteilungsfunktion (rot) zeigen einen leichten Anstieg der IEIs ab 50 ms. Die Verteilungen weichen nicht signifikant voneinander ab. Schließlich führt eine weitere Verdopplung der Pulslänge auf 400 ms zu einer deutlichen Reaktion der Zielzelle. In der Ableiturspur (*oben rechts*) ist nach der Stimulation (*roter Balken*) ein deutlich verdichtetes Auftreten von Aktionspotentialen zu erkennen. Der direkte Vergleich der IEIHs vor (schwarz) und nach (rot) der Stimulation macht den Frequenzanstieg als Folge der Stimulation deutlich. Die Verteilungsfunktion der IEIs nach der Stimulation (unten rechts; rot) steigt für Intervalle ab 30 ms deutlich steiler an als vor der Stimulation (schwarz). Der KS-Test bestätigt die signifikante Abweichung (**= $\alpha < 0,01$).

5.6.9 Variation der Gesamtdauer einer sinusförmigen Stimulationsfolge

Die Gesamtlänge der sinusförmigen Stimulation entscheidet, ebenso wie die Länge eines einzelnen Rechteckpulses, ob es zu einer Reaktion der Zielzelle kommt. In den Versuchen schwankte der Schwellenwert der Stimulationsdauer von Ableitung zu Ableitung. Generell konnten bei sinusförmigen Stimulationsfolgen nur Effekte mit einer Amplitude von mindestens 5 μA beobachtet werden. Die maximale Amplitude stromgesteuerter Pulse lag, technisch bedingt, bei 10 μA . Die Länge der Stimulationen wurde zwischen 10 ms und 2000 ms variiert. Die kürzeste Sinusstimulationsfolge, die zu einer Zellantwort führte, hatte eine Länge von 125 ms (Frequenz: 120 Hz).

Abbildung 49 zeigt, wie zwei sinusförmige Stimulationen von 50 Hz, einer Amplitude von 10 μA und einer Länge von 1000 ms zu einer neuronalen Antwort führen. Eine kürzere Stimulation von lediglich 100 ms führt zu keinem statistisch nachweisbaren Effekt. Über einen Zeitraum von 70 s wird die abgeleitete Ganglienzelle dreimal elektrisch stimuliert. Die Zellantwort auf die Stimulation besteht aus zwei Phasen. Unmittelbar nach der Stimulation treten Potentiale von 70 μV auf, deren Amplitude sich nach ca. 200 ms auf 170 μV vergrößert. Nach den Stimulationen mit 1000 ms Länge sind deutliche Anstiege in den Verteilungen der IELs zu erkennen. Die Stimulationslänge von 100 ms führt ebenfalls zu einem leichten Anstieg der IELs, der jedoch nicht statistisch nachweisbar ist.

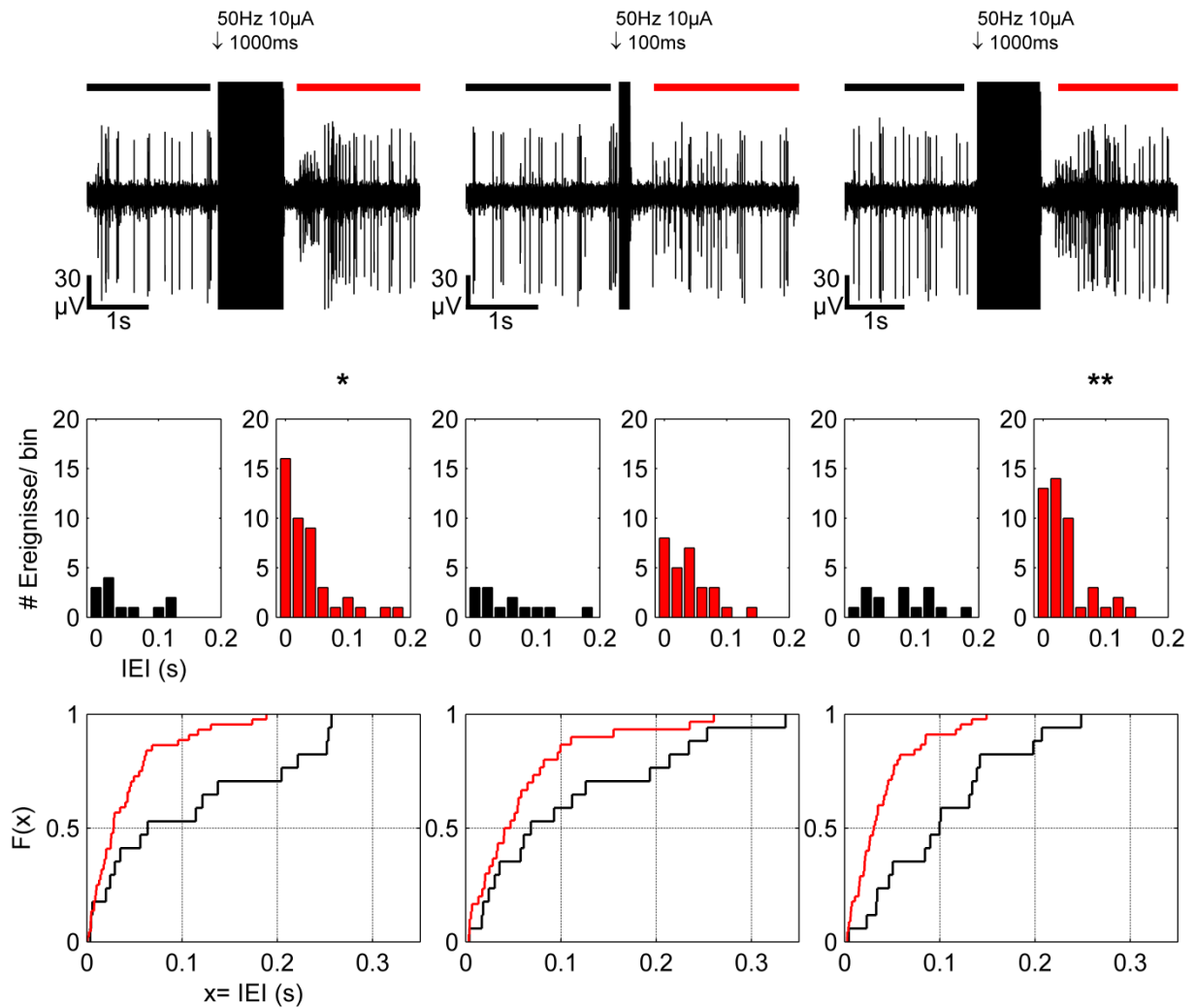


Abbildung 49 Effekt durch längere sinusförmige Stimulationsfolgen

Die erste Stimulation mit einem sinusförmigen Stimulationspuls (50 Hz) führt zu einer Steigerung der neuronalen Aktivität (*linke Spalte*). Der Anstieg der Feuerrate nach der Stimulation ist in der Ableitungs- (oben) zu erkennen. Die Balken oberhalb der Ableitungs- markieren den analysierten Bereich vor (*schwarz*) bzw. nach der Stimulation (*rot*). Die Pfeile oberhalb der Ableitungs- markieren die Stimulationspulse. Die Reaktion auf die Stimulation teilt sich in zwei Phasen ein. In den ersten 200 ms sind kleine Potentiale (ca. 70 μV) zu erkennen, die mit einer Frequenz von 40 Hz auftreten. Dieser initialen Antwort folgen größere Potentiale (170 μV), die zuerst mit gleicher Frequenz auftreten und dann langsamer werden. Die IEIHs zeigen eine deutliche Zunahme kurzer IEIs für den untersuchten Bereich nach der Stimulation. Der statistische Vergleich der Verteilungen durch den KS-Test ergibt einen signifikanten Unterschied (*= $\alpha<0,05$). Eine verkürzte Stimulationsdauer von 100 ms führt nicht zur Aktivierung des Zellnetzwerkes (*mittlere Spalte*). Die IEIHs und die Verteilungsfunktionen weichen nicht signifikant voneinander ab (**= $\alpha<0,01$). Eine Wiederholung der Stimulation mit einer Sinusschwingung von 1000 ms Länge (*rechte Spalte*) führt erneut zu einer signifikanten Reaktion der Zielzelle. Die Gesamtlänge der Stimulationsfolge bestimmt in diesem Fall, ob die Zielzelle erfolgreich stimuliert wird.

5.6.10 Zusammenfassung der Stimulationsergebnisse

Die Parameter der Stimulationspulse, die zu neuronalen Antworten führten, schwankten innerhalb der unterschiedlichen Präparationen. Zusammenfassend können die Intervalle angegeben werden, innerhalb derer Stimulationspulse erfolgreich waren. Ein absoluter, allgemeingültiger Schwellenwert kann daraus nicht ermittelt werden. Dieser unterliegt den variablen Parametern der Stimulationselektroden und Versuchsbedingungen. Es soll jedoch versucht werden aus den vorhandenen Ergebnissen der Einzelpulsstimulationen den Bereich der Schwellenwerte abzuschätzen.

Für die Bestimmung der Flächenladungsdichte bei spannungsbasierter Stimulation muss die Impedanz der Stimulationselektroden zum Stimulationszeitpunkt und für die entsprechenden Frequenzen geschätzt werden. Da die Impedanzen für PEDOT-beschichtete Stimulationselektroden nur vor und nach der Verwendung im Gewebe bestimmt werden konnten, sind die minimale und die maximale geschätzte Ladungsdichte als Wertebereich angegeben. Die absoluten Schwellen können aufgrund der nicht verfügbaren Impedanzen während der Stimulation nicht berechnet werden. Diese Werte geben somit keine empirisch ermittelten Flächenladungsdichten an. Die Berechnung der Flächenladungsdichte (σ) erfolgt nach:

$$\sigma = A \times s \times m^{-2}$$

Die Stromstärke A wird berechnet durch die angelegte Spannung des Pulses und den Widerstand für die Frequenzen der Stimulationspulse. Für die Impedanz der Elektrode werden exemplarisch die Werte aus Kap. 4.2.7 für eine unbenutzte bzw. einmalig benutzte PEDOT-Elektrode ($d = 20 \mu\text{m}$; Fläche = $314 \mu\text{m}^2$) angenommen. Für die Spannungen und Längen der erfolgreichen spannungsgesteuerten Stimulationspulse ergeben sich somit theoretische Stromstärken zwischen $0,015 - 2,3 \mu\text{A}$ (benutzte Elektroden) bzw. $0,34 - 400 \mu\text{A}$ (unbenutzte Elektroden) sowie entsprechende Flächenladungsdichten zwischen $4,5 - 111,5 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ für bereits beschädigte, hochohmige PEDOT-Elektroden und $746 - 4321 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ für unbenutzte PEDOT-Elektroden mit niedriger Impedanz.

Die Erhöhung der Amplitude ermöglichte es, die Länge der Stimulationspulse zu reduzieren und dennoch erfolgreich zu stimulieren. So waren Stimulationspulse ab einer minimalen Spannung von $0,9 \text{ V}$ und einer Länge von 800 ms erfolgreich. Bei Erhöhung der Spannung auf 6 V genügten 1 ms lange Einzelpulse um eine Antwort an der Zielzelle auszulösen. Die maximale Spannung, die erfolgreich verwendet wurde, betrug 10 V bei ebenfalls 1 ms Länge. Bei hohen Spannungen kam es jedoch zu schädlichen elektrochemischen Reaktionen an den Elektrodenoberflächen (siehe Kapitel 5.9). Stromgesteuerte Einzelstimulationspulse führten ab einer minimalen Amplitude von $5 \mu\text{A}$ und einer Länge von 10 ms zu subjektiven Antworten der Neurone, die allerdings nicht statistisch nachweisbar waren. Kürzere Stimulationspulse führten auch bei der Erhöhung auf $10 \mu\text{A}$ zu keinerlei erkennbaren Antworten der untersuchten Neurone. Stromgesteuerte Pulsfolgen führten ab einer Gesamtlänge von 125 ms bei einer Amplitude von $5 \mu\text{A}$ zu Zellantworten.

Die Stimulation mit sinusförmigen, stromgesteuerten Stimulationspulsfolgen zeigte Frequenzabhängigkeit, dabei waren Frequenzen zwischen 20 Hz und 400 Hz erfolgreich (10 μA ; 1000 ms). Folgen von sinusförmigen Stimulationspulsen mit Frequenzen zwischen 800 Hz und 1000 Hz (bei konstanter Länge und Amplitude) führten nicht zu neuronalen Antworten. Der direkte Vergleich zwischen rechteckigen und sinusförmigen Stimulationspulsfolgen, gleicher Frequenz, Amplitude und Länge zeigte ähnliche Antworten. Pulsfolgen mehrerer, zuvor nicht erfolgreicher Einzelpulse, konnten Zellantworten auslösen wenn diese in kurzen Abständen aufeinander folgten. In zwei Ableitungen führten auch zwei aufeinanderfolgende Pulse zu einer Antwort der Zielzelle, wenn diese im Abstand von 10 s zueinander präsentiert wurden.

Tabelle 6 fasst die getesteten Stimulationsparameter zusammen. Es sind die getesteten Intervalle, einige erfolgreiche einzelne Spannungspulse und die geschätzten Flächenladungsdichten angegeben.

Tabelle 6 **Getestete minimale und maximale Stimulationsparameter**

Spannungsgesteuerte einzelne Rechteckpulse				
	Amplitude	Länge	Stromstärke geschätzt (alt- neu)*	Flächenladungsdichte geschätzt (alt- neu)*
Getestete Pulse	0,5- 10 V	0,01 ms-800 ms		
Erfolgreiche Einzelpulse (exemplarisch)	0,9 V	800 ms	0,015 - 0,34 µA	37,9 - 867 µC/cm ²
	1,1 V	400 ms	0,033 - 0,86 µA	42,1 - 1099 µC/cm ²
	2,0 V	100 ms	0,19 - 6,58 µA	62,9 - 2094 µC/cm ²
	5,0 V	30 ms	1,17 - 45 µA	111,5 - 4321 µC/cm ²
	6,0 V	1 ms	1,4 - 240 µA	4,5 - 764 µC/cm ²
	10,0 V	1 ms	2,34- 400 µA	7,4 - 1273 µC/cm ²
Stromgesteuerte einzelne Rechteckpulse				
	Amplitude	Länge		
Getestete Pulse	0,1 µA- 10 µA	1 ms- 800 ms		
Erfolgreiche Einzelpulse (nicht signifikant)	(5 µA- 10 µA)	(10 ms-100 ms)		
Stromgesteuerte Sinuspulsfolgen				
	Amplitude	Länge	Frequenz	
Getestete Pulsfolgen	1- 10 µA	10- 2000 ms	10- 1000 Hz	
Erfolgreiche Pulsfolgen (min- max)	5 µA-10 µA	125 ms- 2000 ms	20- 400 Hz	

*Die Flächenladungsdichten und Stromstärken für die Spannungseinzelpulse sind aufgrund der nicht bekannten Impedanzen zum Stimulationszeitpunkt für unbenutzte (neu) und benutzte (alt) PEDOT-Elektroden abgeschätzt.

5.7 Nachweis der indirekten elektrischen Stimulation durch CNQX-Blockade

Der Erfolg der elektrischen Stimulation wurde an der gesteigerten Aktivitätsrate der abgeleiteten Ganglienzellen gemessen. Im Experiment wurden die Stimulationselektroden in der Nähe der Bipolarzellen positioniert, während die Ableitelektroden im Bereich der Ganglienzellen lagen. Durch die Entfernung zwischen Stimulations- und Ableitelektrode bzw. zwischen Bipolar- und Ganglienzellen war die direkte Stimulation der Ganglienzellen unwahrscheinlich, konnte jedoch anhand der abgeleiteten Ganglienzellantworten nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob eine Antwort der Ganglienzellen direkt über die Stimulationselektroden ausgelöst wurde, oder ob sie das Ergebnis synaptischer Übertragung über die Bipolarzellen war, wurde der kompetitive AMPA/Kainat-Rezeptorantagonist CNQX in Konzentrationen von 20 – 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

CNQX blockiert die vertikale, glutamatvermittelte Informationsweiterleitung der Retina und somit auch die Verbindung zwischen Bipolar- und Ganglienzellen. Die Stimulation der Ganglienzellen während der synaptischen Blockade kann dann nur auf direktem Wege geschehen, da die exzitatorischen Eingänge aus dem Netzwerk wegfallen (Abbildung 50).

Im laufenden Versuch wurde nach erfolgreicher Stimulation die synaptische Übertragung blockiert und die Stimulation mit gleichen Parametern wiederholt. Nach dem Auswaschen von CNQX und einer anschließenden Pause wurde erneut eine Kontrollstimulation durchgeführt.

In Abbildung 50 ist exemplarisch die Reaktion einer Ganglienzelle auf die elektrische Stimulation vor, während und nach der Applikation von 20 $\mu\text{mol/l}$ CNQX gezeigt.

Vor Beginn der ersten Stimulation ist die Ganglienzelle spontan aktiv. Ein einzelner spannungsgesteuerter Stimulationspuls mit einer Amplitude von 6 V und einer Länge von 2 ms führt zu einem deutlichen Anstieg der neuronalen Aktivität, wie die Verteilungshistogramme zeigen. Die Überprüfung der Verteilungsfunktionen, vor und nach der Stimulation ergibt eine signifikante Abweichung ($\alpha < 0,001$). Nach erfolgter Stimulation kehrt die abgeleitete Zelle zu ihrer ursprünglichen Aktivitätsrate zurück (nicht gezeigt).

Das Einleiten von Ames-Medium mit 20 $\mu\text{mol/l}$ CNQX führt zu einem kompletten Aussetzen der elektrischen Aktivität. Ein weiterer, während der Anwesenheit von CNQX, applizierter Stimulationspuls (6 V, 2 ms), führt nicht zur Reaktion der Zelle.

Das vollständige Auswaschen von CNQX aus der Badkammer führt auch nach 15 Minuten nicht zur Rückkehr der ursprünglichen spontanen Aktivität des abgeleiteten Neurons. Die erneute Applikation eines dritten Stimulationspulses führt jedoch wieder zum deutlichen Auftreten von Aktionspotentialen.

In insgesamt drei unabhängigen Ableitungen konnten erfolgreiche Stimulationen durch CNQX blockiert werden. Nach dem Auswaschen des Blockers führten Stimulationspulse mit unveränderten Parametern erneut zum Aktivitätsanstieg der abgeleiteten Ganglienzellen.

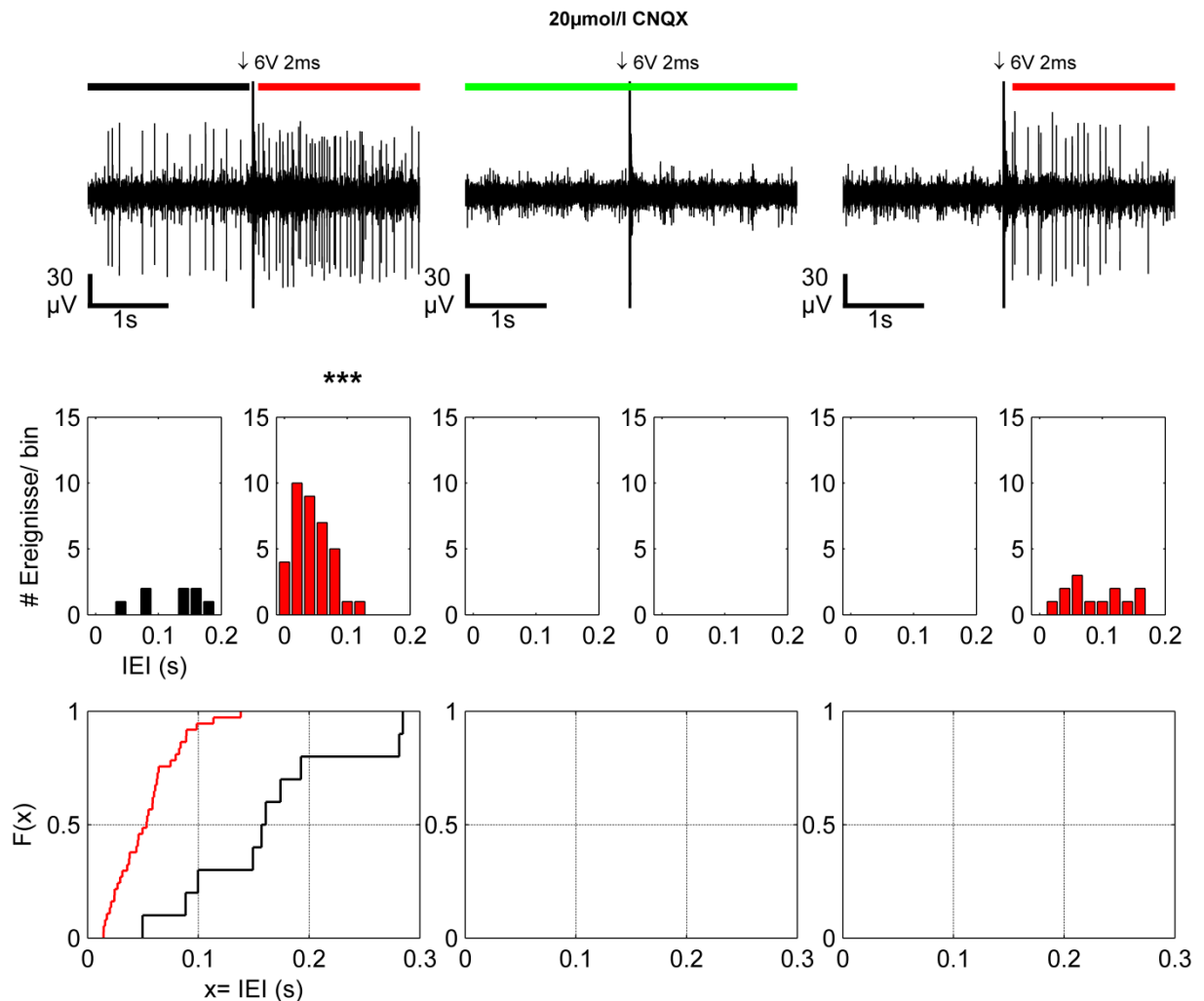


Abbildung 50 Blockierung der synaptischen Übertragung durch CNQX

Vor der Applikation von CNQX (linke Spalte) führt die spannungsgesteuerte Stimulation von 6 V und 2 ms zu einem deutlichen Anstieg der Feuerrate der abgeleiteten Ganglienzelle. In der Ableitspur (*links oben*) ist das Auftreten der Aktionspotentiale zu erkennen. Die Verteilungsfunktionen weichen stark voneinander ab. Die Verteilungsfunktion nach der Stimulation (rot) zeigt einen deutlich steileren Anstieg als die Verteilungsfunktion vor der Stimulation (schwarz). Der KS-Test bestätigt die signifikante Abweichung ($***=\alpha<0,001$). Während der zweiten Stimulation (*mittlere Spalte*) wurde 20 $\mu\text{mol/l}$ CNQX über die Perfusion in die Badkammer geleitet (grüner Balken). Die Perfusion mit CNQX führt zu einem kompletten Aussetzen der elektrischen Aktivität. Während der Blockade führt die Stimulation mit gleichen Parametern nicht zum Erfolg. Die dritte Stimulation (rechte Spalte) erfolgt nach dem kompletten Auswaschen von CNQX aus der Badlösung und einer Wartezeit von 15 min. Die spontane Aktivität der Neurone setzt nach dem Auswaschen vorerst nicht wieder ein. Eine erneute Stimulation führt zu einem Wiedereinsetzen der Aktionspotentiale für ca. 1,8 s (rechts oben). Die Verteilungsfunktionen und der KS-Test können nicht dargestellt werden, da die Verteilung vor der Stimulation keine Werte enthält. Das Wiederauftreten der elektrischen Aktivität in der Ableitspur ist deutlich zu erkennen.

5.8 Einsatz der MEAs in der degenerierten Retina der rd10 Maus

Die Messung an der extrahierten Retina von drei männlichen rd10 Mäusen zeigte, neben Aktionspotentialen der Ganglienzellen, das Auftreten charakteristischer niederfrequenter Schwingungen mit einer Frequenz von ca. 4,5 Hz. Die burstartigen Aktionspotentiale folgten den niederfrequenten Schwingungen und traten mit gleicher Frequenz auf. Die niederfrequenten Potentiale konnten bei vollständiger Penetration der Retina auf mehreren Kanälen gemessen werden. Die Perfusion mit 100 $\mu\text{mol/l}$ CNQX in Ames-Medium blockierte diese Schwingungen. Die schnellen Aktionspotentiale wurden durch den Blocker nicht beeinflusst. Auf die Daten wurde eine schnelle Fourier-Transformation (englisch: Fast Fourier Transformation = FFT) angewandt, durch die die relative Stärke der auftretenden Frequenzen sichtbar wurde. Im ausgewählten Beispiel ist die Messung an einer Stelle der Retina vor, während und nach der Perfusion mit CNQX gezeigt (Abbildung 51).

Abbildung 51 zeigt das Auftreten der niederfrequenten Schwingungen von 4,5 Hz und der assoziierten Aktionspotentiale vor der Applikation von CNQX. Die FFT-Analyse zeigt das Auftreten von zwei Gipfeln in der Frequenzverteilung bei 4,5 Hz und der harmonischen Frequenz von 9 Hz. Während der Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ CNQX in die Badlösung, reduziert sich die Amplitude der Schwingungen bei 4,5 Hz um die Hälfte, der Gipfel bei 9 Hz verschwindet fast vollständig. Nach dem vollständigen Auswaschen von CNQX aus der Badlösung nimmt die Amplitude der Schwingungen von 4,5 Hz deutlich zu und erreicht höhere Werte als vor der Blockade. Die harmonische Frequenz von 9 Hz nimmt ebenfalls wieder etwas zu, erreicht aber nicht ihre Ausgangsstärke. Die Aktionspotentiale werden durch CNQX nicht sichtlich beeinflusst.

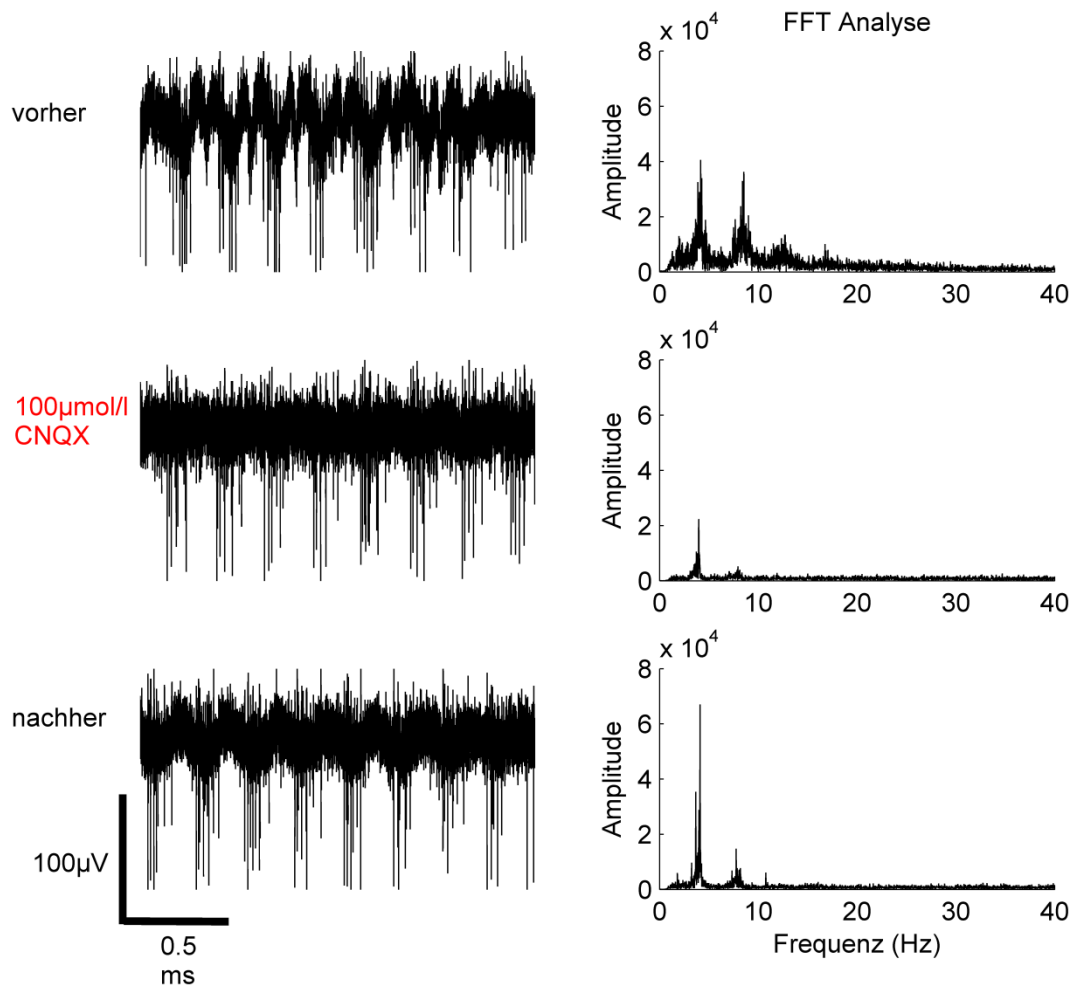


Abbildung 51 CNQX blockiert niederfrequente Oszillationen (rd10 Maus)

Die Ableitungen in der Retina von rd10 Mäusen zeigten neben den schnellen Aktionspotentialen auch regelmäßige, langsame Feldpotentiale mit einer Frequenz von 4-5 Hz. Die FFT zeigt neben dem Gipfel bei ca. 4.5 Hz einen zweiten Gipfel bei der harmonischen Frequenz von 9 Hz. Diese Feldpotentiale können durch CNQX reversibel geblockt werden (mittlere Reihe). Das burst-ähnliche Auftreten von Aktionspotentialen wird durch die CNQX-Blockade nicht ausgeschaltet. Die FFT-Analyse (rechte Spalte) zeigt das Aussetzen der niederfrequenten Potentiale während der pharmakologischen Blockade. Nach dem vollständigen Auswaschen des Blockers zeigt die FFT-Analyse eine Verstärkung der niederfrequenten Potentiale. Der zweite Gipfel bei der harmonischen Frequenz ist reduziert. Die auftretenden Aktionspotentiale bleiben unverändert.

5.9 Grenzen der elektrischen Stimulation

Stimulationsspannungen, die das sichere elektrochemische Fenster verlassen, sind schädlich für die Beschichtungen der Elektroden und können sich negativ auf das neuronale Gewebe auswirken. Beim Anlegen hoher Spannungen an der Stimulationselektrode kommt es zur Elektrolyse von Wasser und damit zur Bildung von Sauerstoff und Wasserstoff. Das sichere Spannungsfenster ist abhängig vom Material der verwendeten Elektroden.

In den meisten Stimulationsversuchen erfolgte eine Reaktion der indirekt stimulierten Zellen erst nach dem Anlegen vergleichsweise hoher Spannungen ($>1,5$ V). Je nach Länge und Amplitude der angelegten Pulse wurde die Bildung von Gasblasen unterschiedlicher Größe an der Elektrodenoberfläche beobachtet. Die Gasblasen wirkten isolierend, so dass im Anschluss an die Stimulation keine elektrische Aktivität gemessen werden konnte. Bildeten sich kleinere Gasmengen, diffundierte das Gas im Anschluss an die Stimulation zurück in den Elektrolyten. Bei der Bildung von Gasblasen einer kritischen Größe erfolgte keine schnelle Diffusion. Die Gasblasen verdrängten das Gewebe von den Elektroden und es konnte dauerhaft keine elektrische Aktivität mehr gemessen werden.

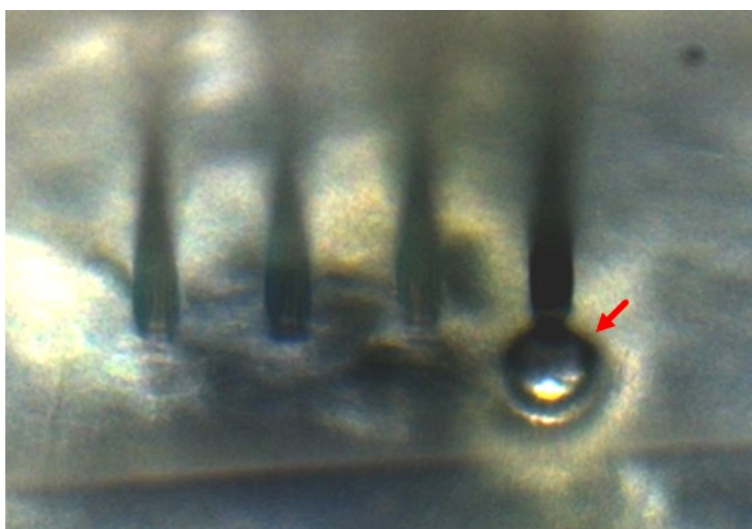


Abbildung 52 Gasbildung an den Elektroden nach elektrischer Stimulation

Die Schwerter des MEAs penetrieren das retinale Gewebe. Nach der Stimulation mit einem Spannungspuls kommt es zur Bildung einer deutlich sichtbaren Gasblase (roter Pfeil) an der Stimulationselektrode. Umliegendes Gewebe wird dadurch zurückgedrängt und geschädigt.

Um den Spannungsbereich einzugrenzen, in dem es nicht zur Bildung von Gasblasen kommt, wurde eine Versuchsreihe gestartet. Ein MEA wurde in Ames-Medium getaucht und unter dem Mikroskop unter 50-facher Vergrößerung beobachtet, während rechteckige Spannungspulse unterschiedlicher Länge und Amplitude angelegt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von Spannungen zwischen 6 V und 8 V ausschließlich kurze Pulse ($<0,1$ ms) nicht zur Bildung sichtbarer Gasblasen führen. Bei einer Amplitude von 10 V konnte selbst bei einer Pulslänge von 0,01 ms die Gasbildung unter dem Mikroskop beobachtet werden. Bei einer Spannung von 1 V kam es, unabhängig von der Pulslänge, nicht zur Bildung von Gasblasen.

Tabelle 7 Gasbildung an der Stimulationselektrode

		Pulslänge in ms					
		0,01	0,1	0,2	0,5	1	10
Pulsamplitude in Volt	1	O	O	O	O	O	O
	2	O	O	O	O	X	X
	3	O	O	O	X	X	X
	4	O	O	O	X	X	X
	5	O	O	X	X	X	X
	6	O	X	X	X	X	X
	8	O	X	X	X	X	X
	10	X	X	X	X	X	X

O= keine sichtbaren Gasblasen durch Stimulation

X= Entstehung von Gasblasen durch Stimulation

Neben den elektrochemischen Effekten, die beim Verlassen des sicheren Spannungsfensters zur Gasbildung durch Elektrolyse führten, kam es ebenfalls zu biochemischen Reaktionen zwischen der Elektrodenoberfläche und dem neuronalen Gewebe. Nach entsprechenden Stimulationen haftete das neuronale Gewebe den Elektroden an und in den meisten Fällen konnte keine elektrische Aktivität mehr gemessen werden. Beim Entfernen des MEAs wurde eine größere Menge Gewebe aus dem Verband herausgerissen, welches die Elektroden überdeckte (siehe Abbildung 53). Die PEDOT-beschichteten Elektroden reagierten besonders empfindlich auf mechanische Kräfte, wenn Gewebereste an ihnen anhafteten (vgl. Kapitel 4.2.7). Die Rückstände auf den MEAs ließen sich nicht mehr vollständig entfernen.

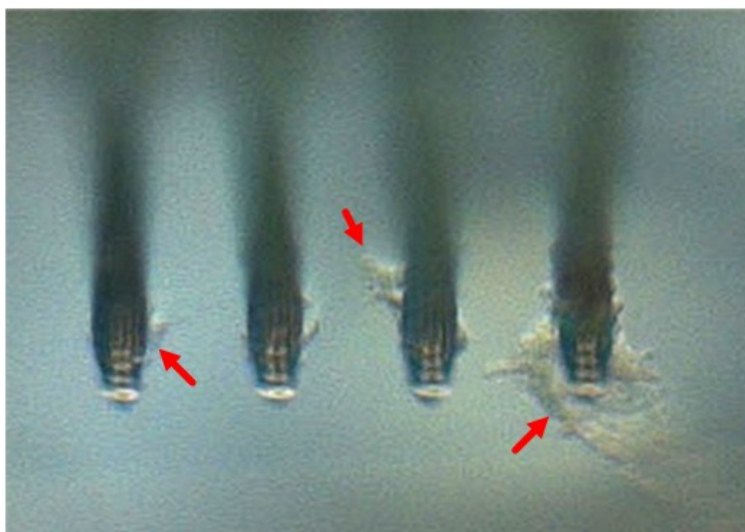


Abbildung 53 Geweberückstände an den Stimulationselektroden

Nach dem Entfernen der MEAs aus der Retina sind an den Spitzen aller vier Schwerter Gewebereste erkennbar (rote Pfeile), die an Stimulationselektroden anhaften.

6 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch betrachtet und im wissenschaftlichen Kontext bewertet. Zu Beginn werden Überlegungen zum bestehenden Versuchsaufbau und zu dem entwickelten MEA angestellt (Kap. 6.1, 6.2). Anhand der Charakterisierungen der Elektrodenoberflächen und Beschichtungen werden Vorschläge für zukünftige Verbesserungen von retinalen Implantaten gegeben (Kap. 6.3). Anschließend werden die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen in der Rattenretina bewertet. Zum Schluss wird auf die Ableitungen in der Retina der rd10 Maus eingegangen.

6.1 Entwicklung der Messmethode für extrazelluläre Ableitungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang die Entwicklung eines MEAs und eines Versuchsaufbaus, mit denen bidirektionale Ableitungen in der extrahierten Retina von Ratten und Mäusen durchführbar sind. Die Größenverhältnisse der MEAs und die Anordnung der Elektroden wurden den anatomischen Gegebenheiten in der extrahierten Retina angepasst. Die Präparations- und Ableitmethodik wurde derart verbessert, dass die Ableitung von elektrischer Aktivität über mehrere Stunden möglich ist. Die Lichtempfindlichkeit der Retina blieb nach der Präparation erhalten, wie durch optische Stimulationsversuche bestätigt wurde.

Der hier beschriebene Versuchsaufbau mit zentralem Messturm und der geeigneten Anbringung des Inspektionsmikroskops ermöglicht die optische Kontrolle der elektrophysiologischen Versuche. In den Einschüben des Messturms fand die LED für die optischen Stimulationen Platz, die für weitere Versuche durch einen kompakten TFT-Monitor ersetzt werden könnte, um komplexere optische Stimuli präsentieren zu können.

Die verwendete Badkammer ermöglichte die sichere Lagerung der extrahierten Retina während der laufenden Versuche. Die Perfusionspumpe erlaubte eine gleichmäßige Perfusion des extrahierten Gewebes und eine konstante Versorgung mit frischem Ames-Medium. Durch die erhöhte Ablaufkammer wurden Pegelschwankungen innerhalb der Hauptkammer minimiert und ein Trockenlaufen verhindert.

Die regelmäßige Kontrolle der Temperatur innerhalb der Badkammer zeigte, dass diese dauerhaft stabil auf 32°C gehalten werden konnte und keine thermisch bedingten Reaktionen der Neurone vorkamen. Mögliche Temperaturschwankungen durch äußere Einflüsse wurden durch die Installation von Heizfolien um den Messturm verhindert. Das zusätzliche Vorwärmen des Ames-Mediums an den Heizfolien führte zu einer langsamen Erwärmung und verhinderte das Überhitzen in der Perfusionsheizung. Das Medium wurde an keinem Punkt der Zuleitungen über 40°C erwärmt. Auf diese Weise wurde eine Schädigung der Proteine im Nährmedium ausgeschlossen.

Neuronale Aktivität der Ganglienzellen konnte über mehrere Stunden abgeleitet werden. Der Versuchsaufbau ermöglichte die Aufrechterhaltung der physiologisch relevanten Parameter innerhalb der extrahierten Retina über Zeiträume von bis zu acht Stunden.

Die Penetration der Retina in exakt vertikaler Richtung, gelang durch die Anbringung des Inspektionsmikroskops im 45°-Winkel und der Positionierung der Elektrodenhalterung direkt oberhalb der Badkammer. Die abgewinkelte Anbringung führte allerdings zur Verschlechterung der optischen Eigenschaften und zur Erschwerung der visuellen Kontrolle während der Penetration des Gewebes. Nach Anpassung der vorläufig flachen Badkammer mit dem röhrenförmigen Aufbau, verbesserte sich die Optik durch die zusätzliche Verwendung der im Winkel angebrachten Glasscheibe und der daran adhärierenden Flüssigkeit. Mit dieser Konstruktion konnte die Positionierung der MEAs innerhalb der Retina mit guter optischer Auflösung durch das Mikroskop verfolgt werden.

Die Präparation der Retina gelang gewebeschonend. Besonders der Einsatz der beschriebenen Nylonschlinge minimierte die Gefahr von Beschädigungen beim Ablösen der Retina von der Sklera und verkürzte die Präparationszeit.

Die Positionierung des extrahierten Gewebes auf einer einfachen Glasunterlage in der Badkammer, so wie es zu Beginn der Versuche durchgeführt wurde, erschwerte die Penetration. Es konnte beobachtet werden wie das Gewebe auf der glatten Oberfläche seitlich auswich, sobald vertikaler Druck auf die Retina ausgeübt wurde. Beim unbeabsichtigten Auftreffen der Schwertspitzen auf die Glasunterlage kam es zudem leicht zu Beschädigungen an den MEAs. Durch die Verwendung der flexiblen PDMS-Unterlage konnten diese Schäden verhindert werden. Die Penetrationseigenschaften der MEAs verbesserten sich, da die erhöhte Reibung das oben beschriebene seitliche Ausweichen verhinderte. Die Verwendung der PDMS-Unterlagen machte die Anpassung der Haltenetze erforderlich, um die extrahierte Retina sicher auf der Unterlage zu fixieren. Die Anbringung des Querbügels an den Gittern ermöglichte es, das Netz auf der Unterlage festzuklemmen. Dies führte zu einer besseren Fixierung der Retina, die sich flacher auf der Unterlage ausbreitete und eine gleichmäßigere Penetration ermöglichte. Bei den ursprünglichen, bündellosen Netzen konnte es zudem vorkommen, dass diese bei der Entfernung der MEAs mitsamt dem Gewebe angehoben wurden und Schäden verursachten. Der erhöhte Anpressdruck der neuen Netze verhinderte dies ohne übermäßige Komprimierung des Gewebes.

Extrazelluläre Ableitungen der Ganglienzellen mit Glaselektroden lieferten ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis (ca. 3:1) und bestätigten die Funktionalität des Versuchsaufbaus sowie die physiologische Unversehrtheit des retinalen Gewebes.

Das Membranpotential der retinalen Ganglienzellen ließ sich durch Perfusion mit hochkaliumhaltigem Ames-Medium reversibel verschieben. Nach kurzzeitigem Anstieg der neuronalen Aktivitätsraten stellten die abgeleiteten Zellen ihre Aktivität wie erwartet ein. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beobachteten Signalen um neuronale Aktivität handelte. Die Stimulation von Neuronen durch hochkaliumhaltiges Extrazellulärmedium stellt ein gängiges pharmakologisches Verfahren dar (Jeftinija *et al.*, 1993; Maher *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 2013).

6.2 Architektur und Penetrationseigenschaften penetrierender MEAs

Die Vorversuche mit nicht funktionellen MEAs ergaben, dass die wichtigsten Parameter für eine erfolgreiche Penetration des Gewebes der Spitzenwinkel und die Breite der Schwerter sind. Ein Spitzenwinkel von 60° erschwerte die Penetration, abgerundete Schwerter waren generell nicht in der Lage die Retina zu penetrieren. Für ein zukünftiges Implantat eignen sich abgerundete Schwerter folglich nicht. Schwerter mit Spitzenwinkeln von 30° erleichterten die Penetration. Am einfachsten gelang die Penetration mit den scharfen Schwertspitzen der letztlich umgesetzten Prototypen. Sie durchdrangen die Retina durch ihre zweistufige Spitze deutlich schonender.

Im Bezug auf die optischen Eigenschaften im Versuchsaufbau spielte die Schwertlänge eine entscheidende Rolle. Schwerter mit einer Länge von $1000\ \mu\text{m}$ wurden daher kürzeren Versionen vorgezogen. Ein Einfluss der Schwertlänge auf die Penetrationseigenschaften wurde nicht festgestellt. Dennoch könnte die Schwertlänge für das endgültige Implantat auf die minimal nötige Größe reduziert werden, um die Stabilität durch unnötig große Hebelkräfte nicht zu reduzieren. Andererseits könnten die Schwerter, zur späteren Verankerung der Implantate im Auge, verlängert werden, um diese durch die Choroidea in der Sklera zu befestigen. Allerdings birgt dies auch die Gefahr wichtige Blutgefäße im Auge zu verletzen. Eventuelle Vorteile der Befestigung müssen gegen die Reduzierung der Stabilität abgewogen werden. Die Verbreitung der Schwertbasis oder die Verwendung geeigneter Stützstrukturen könnte dem entgegenwirken. Die Positionen der Elektroden entlang der Schwerter müssten dann entsprechend angepasst werden und in Richtung der Basis verschoben werden. Bei der Übertragung der entwickelten Modelle von der Rattenretina auf die menschliche Retina muss geklärt werden inwiefern diese fest integrierten Implantate bei einem auftretenden Defekt oder einer Entzündung zu entfernen sind, ohne schwere Schäden im Auge zu hinterlassen.

Generell waren in den durchgeführten Versuchen zwei kritische Größen ausschlaggebend für den Erfolg der Penetration. Die initiale Penetration der oberen Zellschichten der Retina stellte den limitierenden Faktor bei der Positionierung der MEAs im Gewebe dar. Die endgültige Positionierung der Schwerter nach dem Durchdringen der obersten Schicht gelang sehr leicht. Von einer enzymatischen Behandlung der Retinaoberfläche zur Vereinfachung der Penetration wurde abgesehen, um die Stabilität der gesamten Retina nicht zu reduzieren. Zudem sollte zu Beginn die äußere Architektur der Schwerter für einen späteren Einsatz im menschlichen Auge optimiert werden, ohne anderweitige Hilfsmittel bei der Penetration zu verwenden.

Möglicherweise wurde während der Präparation des Gewebes die bindegewebshaltige ILM nicht immer komplett entfernt, was zumindest in einigen Fällen die Penetration erschwert haben könnte. Auf das Entfernen der ILM konnte nicht verzichtet werden, da diese die Penetration in allen Fällen verhinderte. Für eine zukünftige Implantation eines penetrierenden MEAs im menschlichen Auge müsste die ILM über dem Implantationsort ebenfalls lokal entfernt werden oder die Spitzen der Schwerter weiter verkleinert werden, um das Durchstechen der ILM zu ermöglichen.

Der zweite Faktor, der die Penetration maßgeblich beeinflusst, ist das durch die Schwerter verdrängte Gesamtvolumen im Gewebe. Dieses hatte unmittelbaren Einfluss auf die Schädigungen, die nach dem Entfernen des MEAs im Gewebe zurückblieben. Nach dem Entfernen von MEAs mit 95 µm Breite waren unter dem Lichtmikroskop große Löcher im Gewebe auszumachen. Die Penetration mit schmalen Schwertern (42 µm) hinterließ, wie zu erwarten, kleinere Löcher im Gewebe, die sich nach dem Entfernen in vielen Fällen selbstständig schlossen. Die feinstrukturelle Schädigung durch die Penetration kann nur durch histologische Untersuchungen in zukünftigen Studien sichtbar gemacht werden. Die Prototypen, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, waren unverzichtbar und durften durch immunhistochemische Färbungen nicht beschädigt werden. Den kommerziellen MEAs nachempfundene Teststrukturen, die für diesen Zweck vonnöten gewesen wären, standen bis zur Beendigung der Arbeit nicht zur Verfügung. Vor dem Einsatz der MEAs in klinischen Studien sollten ebenfalls tierexperimentelle Studien zur längerfristigen Biokompatibilität und Funktionalität der Elektroden durchgeführt werden.

Generell kann die Empfehlung ausgesprochen werden, die Architektur der Schwerter für zukünftige retinale Implantate weiter zu minimieren. Neben möglichst scharfen Spitzen muss die Dicke des Trägermaterials weiter reduziert werden. Dies könnte zum Beispiel durch chemisches Ätzen der Schwertunterseiten geschehen. Dieses Konzept wurde mit Dipl.-Ing. Stefan Lück (IWE-1, RWTH Aachen) diskutiert und befindet sich in der Erprobungsphase. Die Verkleinerung der Schwerter muss mit der Reduzierung der Stabilität abgewogen werden. Besonders feine Schwerter aus Silizium neigen bei mechanischer Belastung zum Abbrechen an der Basis.

Eine Verbesserung der Stabilität bei kleineren Abmessungen könnte durch die Verwendung alternativer Trägermaterialien erreicht werden. Elastische Trägermaterialien, wie das häufig für flexible planare MEAs verwendete Polyimid (Lacour *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013;), sind zwar unempfindlich gegen Bruch, weisen aber nicht die nötige Steifheit zur Penetration des Gewebes auf. Denkbar wären Trägermaterialien aus sehr dünnen Siliziumschichten, die mit flexiblen Polymeren kombiniert werden, sowie verstärkende Beschichtungen aus biokompatiblen Metallen. Desweiteren die Verwendung von zusätzlichen temporären Stützstrukturen, die nach der Implantation entfernt werden.

Neben der äußeren Architektur der MEAs, beeinflusste die Unterlage innerhalb der Badkammer die Penetrationseigenschaften. Die oben erwähnte PDMS-Unterlage unterstützte die Penetration vermutlich dadurch, dass ein höherer Druck auf das Gewebe ausgeübt werden konnte, ohne das Abbrechen der MEAs zu riskieren. Zudem konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass die ausgebreitete Retina auf der Glasunterlage bei vertikaler Druckausübung zu den Seiten auswich. Das Polymer hingegen verhinderte mit seiner höheren Reibung das seitliche Ausweichen. Es zeigte sich, dass die Steifigkeit des Polymers Einfluss auf die Penetration hat. Die Beschaffenheit des Gegenlagers bestimmte den Gegendruck auf das Gewebe. Die Festigkeit der PDMS-Unterlage wurde entsprechend angepasst. Im Hinblick auf ein zukünftiges retinales Implantat muss erörtert werden, wie sich die Sklera im intakten Auge als Gegenlager bei der Penetration verhält.

Nach der Integration des penetrierenden MEAs in ein zukünftiges retinales Implantat müssen in Tierversuchen am intakten Auge die Penetrationsversuche wiederholt werden und eine chirurgische Methode für die Implantation entwickelt werden. Ähnlich wie einige epiretinale MEAs könnten sie durch Metallstifte verankert werden (Walter *et al.*, 1999; Gerding, 2007; Roessler *et al.*, 2011; de Juan *et al.*, 2013).

6.2.1 Positionierung und Lage der MEAs im Gewebe

Die grobe Positionierung der MEAs im Gewebe über die Mikromanipulatoren wurde unter optischer Kontrolle durchgeführt. Zur Feinpositionierung der MEAs wurde die elektrophysiologische Information auf den oberen Elektroden herangezogen, wenn diese in der Nähe der Ganglienzellen positioniert wurden. Dieses elektrophysiologische Verfahren eignete sich sehr gut, um die MEAs reproduzierbar zu positionieren. Durch das Messen der maximalen Amplitude auf der gewünschten Messelektrode und die, durch die Schwertarchitektur, vorgegebenen Abstände, ließ sich die endgültige Lage der Messpunkte justieren. Die Architektur der Elektroden auf den Schwertern ermöglichte das Ableiten an den Ganglienzellen, während die vordersten Elektroden in Nähe der Bipolarzellen zur Stimulation verwendet werden konnten. Diese Feinpositionierung anhand physiologischer Parameter, könnte ebenfalls für ein späteres Implantat eingesetzt werden, um die endgültige Lage der MEAs ohne optische Kontrolle zu bestimmen.

Da der Ableitort für jede Präparation zufällig ausgewählt wurde, können über die Vergleichbarkeit der Ableitungen nur eingeschränkte Aussagen getroffen werden. Mehrere Parameter bestimmen das Verhalten der Elektrode im Gewebe. Die Abdichtung zwischen Elektrode und Zielzelle bestimmt die Qualität der elektrischen Messung. Ebenso ist die Abdichtung zwischen dem Penetrationstrichter und dem Einzelschwert ein kritischer Faktor. Bleibt der Trichter weiter geöffnet, so kann bei der Stimulation Ladung leichter abfließen und die Schwellen werden vermutlich erhöht. Bei der Verwendung von penetrierenden MEAs im Cortex wurde beobachtet, dass sich die Qualität der Ableitung bis zu sechs Wochen nach der Implantation weiter verbessert, was mit einem Einwachsen der MEAs und erhöhter Abdichtung zum Außenmedium einhergeht (Ludwig *et al.*, 2006). Das Einwachsen der Strukturen erschwert allerdings die Möglichkeit die MEAs nachträglich neu auszurichten oder gewebeschonend zu entfernen.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei der vorgesehenen Positionierung der MEAs in der Retina möglich ist, Aktionspotentiale von den retinalen Ganglienzellen abzuleiten. An welcher Stelle innerhalb der Ganglienzellschicht abgeleitet wurde, während in der IPL stimuliert wurde, ist schwer zu bestimmen. Die Verschaltungen der Bipolarzellen auf die Ganglienzellschicht erstrecken sich nicht nur in exakt vertikaler Richtung, sondern auch auf benachbarte Zellen (Nelson & Connaughton, 1995).

Während der Ableitung und Stimulation mit den penetrierenden MEAs sind folglich zwei Szenarien vorstellbar:

1. Es wird in der Nähe der Ganglienzelle abgeleitet, die direkten Eingang von der stimulierten Bipolarzelle erhält.
2. Es wird an einer Ganglienzelle abgeleitet, die keine direkten Eingänge von der stimulierten Bipolarzelle erhält.

Im ersten Fall ist davon auszugehen, dass bei einer gezielten Stimulation der direkte Effekt der Bipolarzelle auf die Ganglienzelle messbar ist. Dieser Fall ist der erwünschte, da nur auf diesem Weg die direkte Auswirkung der Stimulation der Bipolarzelle auf die Ganglienzelle ablesbar ist.

Der zweite Fall ist im Experiment schwieriger zu deuten. Das Ausbleiben einer physiologischen Reaktion der Ganglienzelle wäre dann nicht zwangsläufig auf eine nicht erfolgreiche Stimulation der Bipolarzellen in Nähe der Stimulationselektrode zurückzuführen. Es können Reaktionen von weiter entfernten Ganglienzellen stattgefunden haben, die am Ableitort nicht gemessen werden konnten. Einige Fälle, in denen es nach Erhöhung der Stimulationspulse nicht zu einer Zellantwort gekommen ist, könnten auf diesen Umstand zurückzuführen sein. Voraussetzung zur Messung des Stimulationserfolges an den Ganglienzellen ist die exakt vertikale Penetration. Nur wenn beide Elektroden an einer Bipolarzelle und an der nachgeschalteten Ganglienzelle gleichzeitig zum Liegen kommen kann der Effekt gemessen werden.

Es ist denkbar, dass ein größerer Anteil der durchgeführten Stimulationen erfolgreich, der Erfolg aber aus oben genannten Gründen nicht messbar war.

6.2.2 Architektur der penetrierenden MEAs

Der limitierende Faktor der penetrierenden MEAs für die Verwendung in einem zukünftigen retinalen Implantat ist die eingeschränkte Auflösung mit den momentan vorhandenen 16 Elektroden auf vier Schwertern. Theoretisch konnte an vier Stellen der Retina gleichzeitig gemessen und stimuliert werden, da jedes Schwert einen Stimulationspunkt repräsentiert. Für die Stimulationsversuche im extrahierten Gewebe konnte dennoch meist nur an einem bzw. zwei Schwertern gleichzeitig stimuliert und abgeleitet werden. Die gleichmäßige Penetration der Retina mit allen vier Schwertern gelang nur selten, da die Spitzen nicht immer gleichmäßig ins Gewebe zu bringen waren. Ein einzelnes Schwert konnte sich bereits am vorgesehenen Ort innerhalb der Retina befinden, während andere Schwerter noch nicht die oberste Schicht penetriert hatten. Um die Auflösung eines zukünftigen Implantats zu erhöhen, muss auch die Anzahl der Schwerter erhöht werden. Um die obersten Schichten der Retina schonend zu penetrieren, müssen die Schwertspitzen einen gewissen Abstand zueinander haben. Dieser sollte bei einer Schwertbreite von 40 μm mindestens 125 μm betragen, wie die Ergebnisse der Penetrationsversuche nahelegen. Durch chemisches Ätzen der Trägerunterseite könnte die Penetration eventuell nochmals verbessert werden. Für das entwickelte MEA wurde ein Spitzenabstand von 125 μm gewählt. Eine weitere Vergrößerung

des Spitzenabstandes auf 250 μm hatte keinen feststellbaren Einfluss auf die Penetrationseigenschaften.

Die seitliche Erweiterung des MEAs durch das Hinzufügen weiterer Schwerter ist theoretisch nur durch die anatomischen Eigenschaften der Retina beschränkt. Für ein späteres retinales Implantat muss die natürliche Wölbung des Auges berücksichtigt werden, damit alle Elektroden gleichzeitig die vorgesehene Penetrationstiefe erreichen. Idealerweise könnten einzeln bewegliche Schwerter auf dem Implantat für möglichst viele Elektroden die beste Positionierung zu gewährleisten. Die technische Umsetzung gestaltet sich aufgrund der starren Zuleitungen auf den Siliziumträgern jedoch kompliziert. Alternativ könnten die Schwerter innerhalb einer Reihe mit unterschiedlichen Längen gefertigt werden, um an jedem Ort der gewölbten Retina die ideale Eindringtiefe zu erreichen.

Die Stapelung mehrerer hintereinander angeordneter MEAs mit mehreren Schwertern, würde die potentielle Auflösung eines zukünftigen Implantates in die zweite Raumbene erhöhen. Wenn auch nicht jedes Schwert in eine optimale Position zu bringen wäre, so stiege zumindest die Wahrscheinlichkeit, mehrere Ganglienzellen an unterschiedlichen Orten gleichzeitig zu erreichen. Natürlich wird diese Anordnung ebenfalls durch die Größenverhältnisse im Auge limitiert.

6.3 Elektrodeneigenschaften

Zu Beginn der Versuche wurde die Impedanz aller verwendeten MEAs mittels Impedanzspektroskopie charakterisiert. Zudem wurde die Impedanz der Elektroden nach den Einsätzen im Gewebe regelmäßig kontrolliert und die Veränderung dokumentiert. Akute Veränderungen der Impedanz während laufender Versuche konnten mit der vorhandenen Messtechnik nicht bestimmt werden. Für die Entwicklung einer Stimulationselektronik im zukünftigen retinalen Implantat sollte die Impedanzmessung im Gewebe technisch umgesetzt werden. Mit diesen Informationen könnten die applizierten Stimulationsparameter an die veränderliche Impedanz angepasst und die Stimulationsprotokolle laufend verbessert werden. Vor der Durchführung der Stimulationsversuche wurden Elektroden aus unterschiedlichen Materialien charakterisiert.

6.3.1 Oberflächenbeschichtungen der Elektroden

Die Impedanzen für nicht aktivierte Iridiumoberflächen lagen, wie erwartet, über denen von Iridiumoxid (vgl. Cogan *et al.*, 2005; Eick *et al.*, 2009; Aryan *et al.*, 2012). Die niedrigsten Impedanzen zeigten PEDOT-beschichtete Elektroden mit 20 μm Durchmesser. Die enorme Oberflächenvergrößerung durch die PEDOT-Beschichtung reduzierte die Impedanz im Vergleich zu den Iridiumoberflächen deutlich. Diese Beobachtungen werden ebenfalls aus früheren Studien berichtet (Wilks *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2012; Negi *et al.*, 2012). Die Impedanz der PEDOT-beschichteten Elektroden mit Elektrodendurchmessern von 20 μm lag im Mittel um 42 % unter denen der PEDOT-Elektroden mit 15 μm Durchmesser. Im Gegensatz hierzu, skalierte die Impedanz der nicht beschichteten Iridiumelektroden nicht mit dem Elektrodendurchmesser. Einige der 15 μm Elektroden wiesen höhere Impedanzen auf als Elektroden mit einem Durchmesser von 20 μm . Die Schwankungen der Impedanz

durch die absolute aktive Oberfläche lagen über dem Effekt, der durch eine Vergrößerung des einfachen Elektrodendurchmessers erreicht wurde.

Die Vergrößerung des Durchmessers von PEDOT-Elektroden um 5 μm wirkte durch die große elektrochemische Oberfläche der Elektrode exponentiell auf die Reduzierung der Impedanz der Elektrode. Die aktive Oberfläche von Iridiumelektroden ist kleiner, weshalb sich die Vergrößerung des Durchmessers nicht bemerkbar machte. Offensichtlich unterliegt die Oberflächenbeschaffenheit von Iridium bei der Herstellung größeren Schwankungen. Für den Einsatz von unbeschichteten Iridiumelektroden war der größere Durchmesser der Stimulationselektrode nicht relevant. Für die PEDOT-beschichteten Elektroden ergibt die Verwendung der größeren Durchmesser allerdings Sinn, da über die größere Oberfläche mehr Ladung während der Stimulation transferiert werden kann.

Die Aktivierung der Iridiumelektroden verringerte die Impedanz durch die Bildung hydratisierter Iridiumoxidschichten, wie auch in anderen Studien berichtet wurde (Robblee *et al.*, 1983; Eick *et al.*, 2009). Durch die Aktivierung konnten im Mittel Impedanzen von $0,173 \text{ M}\Omega \pm 0,09$ (1 kHz) erreicht werden, die damit deutlich unter denen für die nicht-aktivierten Iridiumelektroden von $0,88 \text{ M}\Omega \pm 0,32$ lagen. Die Aktivierung von Iridium wurde durch eine Wechselspannung erreicht. Nach maximal 100 Zyklen zeigten sich keine weiteren Reduzierungen der Impedanz, was für einen Sättigungseffekt bei der Bildung von Iridiumoxid spricht. Dieser Effekt wird in anderen Studien schon nach 40-50 Zyklen beschrieben (Eick *et al.*, 2009).

Die nachträgliche Deposition von PEDOT auf Iridiumelektroden durch das beschriebene Protokoll (Abidian & Martin, 2008) gelang. Die Impedanz konnte durch die beschichteten Oberflächen ebenfalls reduziert werden. Bei hohen Stromstärken kam es zur großflächigen Ablagerung von PEDOT. Diese großen PEDOT-Ablagerungen waren nicht stabil und konnten deshalb nicht eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass die Seiten und die Unterseite der Schwerter des MEAs von PEDOT überdeckt waren. Diese Ablagerungen könnten durch Ladungen entstanden sein, die nicht durch den Potentiostaten flossen, sondern durch Restladungen, die in den Zuleitungen der Elektrode gespeichert waren. Ähnlich könnte die Verringerung der Impedanz bei einer Elektrode zu erklären sein, die in die PEDOT-Lösung getaucht wurde, über die aber aktiv kein Strom transferiert wurde. In diesem Fall war wahrscheinlich eine kleine Ladung in der betreffenden Elektrode und deren Zuleitungen gespeichert, die beim Eintauchen in die Lösung zur Referenzelektrode abfloss. Durch diesen Strom kann es dann zur Ablagerung von PEDOT auf dieser Elektrode gekommen sein. Da es sich vermutlich um einen kleinen Strom handelte, wurde nur eine geringe Menge PEDOT angelagert, was die höhere Impedanz im Vergleich zu den aktiv beschichteten Elektroden erklärt.

Bei den aktiv beschichteten Elektroden führte eine transferierte Gesamtladung von $6,4 \mu\text{C}$ oder $5,4 \mu\text{C}$ zur Deponierung von größeren Mengen PEDOT auf der Oberfläche, wie auf den elektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen ist. Ein Unterschied der Impedanz zwischen beiden Beschichtungsintensitäten ($5,4 \mu\text{C}$ und $6,4 \mu\text{C}$) ist nicht erkennbar. Für beide Elektroden betrug die Impedanz $0,027 \text{ M}\Omega$ (1 kHz). Dies spricht dafür, dass es einen gewissen Sättigungswert bei der Beschichtung einer Oberfläche mit PEDOT gibt. Ist die vorhandene

Fläche komplett mit PEDOT überzogen, führt eine zusätzliche Deposition nicht zu einer weiteren Vergrößerung der elektrochemisch aktiven Oberfläche.

Die kommerziell PEDOT-beschichteten Elektroden wiesen geringe Impedanzen mit kleiner Variabilität auf (vgl. 4.2.4) und lieferten die besten Ergebnisse während der Ableitung und der Stimulation. Aus diesem Grund wurden sie für die weiteren Versuche als Standard verwendet. Wie sich im Verlauf der Experimente herausstellte, zeigten die Oberflächenbeschichtungen aus PEDOT nach wenigen Einsätzen im Gewebe irreversible Schädigungen. Zum Teil kam es zu mechanischen Schädigungen durch die Penetration der Retina und zu Schädigungen, die auf die Verwendung von hohen Stimulationsspannungen zurückzuführen sind.

6.3.2 Abnutzungserscheinungen der Elektroden

Wie im Ergebnisteil durch die Impedanzmessungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt, kam es zu Abnutzungserscheinungen der verwendeten Mess- und Stimulationselektroden. Vermutlich begünstigte die enorme Oberflächenvergrößerung der Beschichtungen chemische Reaktionen zwischen Gewebe und den Messelektroden. Die Elektroden mit Beschichtungen aus Iridium und Iridiumoxid waren prinzipiell stabiler als die Beschichtungen aus PEDOT. Darüber hinaus haftete umliegendes Gewebe stärker an den PEDOT-Oberflächen, was zu größeren Beschädigungen beim Entfernen der MEAs führte.

Die PEDOT-Beschichtungen waren besonders anfällig für mechanische Einflüsse. Beim Penetrieren des Gewebes lösten sich mehrfach vollständige PEDOT-Kissen von der Metallelektrode. Dies geschah auch mit frischen MEAs, ist also nicht auf einen Alterungsprozess zurückzuführen. Vielmehr scheint die chemische Verbindung zwischen Metallelektrode und Polymer nicht ausreichend stabil zu sein. Ebenfalls zeigte sich, dass sich dickere PEDOT-Kissen leichter ablösten als dünne Schichten. Dieses Ablösen wird ebenfalls in früheren Veröffentlichungen beschrieben (Ludwig *et al.*, 2006). Größere Ansammlungen von PEDOT auf den Messelektroden neigen wahrscheinlich aufgrund der Seitenkräfte, die bei der Penetration des Gewebes entstehen, zum Abreißen. Die schwächste Stelle ist hierbei offensichtlich die Verbindung von Metall und Polymer, da es häufiger vorkam, dass sich die Beschichtung als Ganzes von der Unterlage ablöste, als dass nur Stücke abrissen. Aus diesem Grund wurde auf die weitere Verwendung der eigens mit PEDOT-beschichteten Elektroden verzichtet. Diese waren weitaus instabiler als die Elektroden mit kommerziellen Beschichtungen.

Mit fortschreitender Anzahl an Einsätzen im Gewebe verschlechterten sich die Eigenschaften der Elektroden. Unter dem Elektronenmikroskop konnten Risse und Ablagerungen an den Oberflächen sichtbar gemacht werden. Die Risse bildeten sich durch Stimulationspulse mit hoher Ladungsdichte. Initiale Risse legten die Iridiumoberflächen frei und vergrößerten auf diese Weise sukzessive die Impedanz der Elektroden (vgl. Abbildung 32). Bereits die einmalige Verwendung der MEAs konnte zum Anstieg der Impedanzen auf das sechsfache führen. Es wurde zunehmend schwerer, Ladung über die Elektrodenoberfläche ins Gewebe zu transferieren. Um eine erfolgreiche Stimulation auszulösen, mussten in der Folge höhere Spannungen angelegt werden. Das Verlassen des elektrochemisch sicheren Fensters konnte

nötig sein, wodurch innerhalb der Rissen Gasblasen durch Hydrolyse entstanden. Die Gasblasen verdrängten das Polymer und die Risse vergrößerten sich weiter. Auf diese Weise wurde fortlaufend Material abgetragen. Die Bildung von Rissen in PEDOT-Oberflächen wurde ebenfalls in o.g. Veröffentlichung beschrieben (Ludwig *et al.*, 2006). Bei 30 % der Elektroden kam es in jener Studie zu Rissen in den Elektrodenoberflächen und in 23 % zu Ablösungen der Oberfläche, wobei sich dickere PEDOT-Schichten leichter ablösen ließen. Folglich sollte beim Einsatz PEDOT-beschichteter Elektroden darauf geachtet werden, Beschädigungen der Beschichtungen durch mechanische Einflüsse zu minimieren.

Irreversible Schädigungen der PEDOT-Beschichtungen entstanden ebenfalls durch Gewebereste, die sich an der Oberfläche anlagerten. Durch mechanische Kräfte während des Einstechens und Entfernens der Elektrode aus dem Gewebe kam es zur Schädigung der Beschichtungen. Die Stimulation mit erhöhten Spannungs- bzw. Stromamplituden führte zu Reaktionen zwischen dem Gewebe und der Elektrode. Es kam gleichermaßen zur Schädigung des Gewebes und zur Beeinträchtigung der Ableit- und Stimulationseigenschaften der Elektrode. Es ist anzunehmen, dass sich selbst nach erfolgreicher Stimulation über eine bestimmte Elektrode die Impedanz der Elektrode weiter erhöht und immer stärkere Stimulationspulse benötigt werden, um in die umherliegenden Zellen zu stimulieren, wenn diese nicht bereits zerstört wurden. Ergebnisse aus einer anderen Studien zeigen, dass es bei der Verwendung von MEAs im Gewebe bereits nach einmaligen Stimulationen zu einem Anstieg der Elektrodenimpedanz durch Reaktionen an den Grenzflächen kommt (Newbold *et al.*, 2011).

Die Art der irreversiblen elektrochemischen Reaktionen an den Oberflächen konnte nicht näher definiert werden. Möglicherweise kam es durch erhöhte Stimulationspulse zur Denaturierung von Proteinen und dem Verkleben des Gewebes mit den Beschichtungen. Aufgrund der großen aktiven Oberfläche könnte dies besonders bei den PEDOT-Elektroden problematisch gewesen sein. Insgesamt eigneten sich PEDOT-Beschichtungen aufgrund ihrer niedrigen Impedanz gut zum Einsatz auf Stimulationselektroden. Zu erfolgreichen Stimulationen kam es häufiger beim Einsatz frischer PEDOT-Elektroden. Beim Entfernen der penetrierenden MEAs nach mehreren Stunden wurde das Gewebe häufig geschädigt. Die schonende Entfernung der MEAs nach Stimulationsversuchen war nicht immer möglich. Größere Mengen von Geweberesten verblieben an den Schwertern.

Für den Einsatz der Arrays in einem klinischen Implantat eignen sich die PEDOT-Beschichtungen vermutlich nicht. Insbesondere im Hinblick auf die langen Einsatzzeiten der Elektroden in einem retinalen Implantat bleibt fraglich, ob Elektroden mit PEDOT-Beschichtungen über die nötige Stabilität für diesen Versuch verfügen. Der Begriff der Langzeitstabilität aus der vorliegenden Arbeit bezieht sich auf den wiederholten Einsatz der MEAs in unterschiedlichen Experimenten und ist von einem dauerhaften Einsatz an einem Ort abzugrenzen.

Luo *et al.* (2011) berichten, dass das Dotieren von PEDOT mit Kohlenstoffnanoröhrchen (englisch: *carbon nanotubes* = CNT) die Langzeitstabilität erhöht. In weiteren Versuchen könnten die Oberflächen der penetrierenden Elektroden mit CNTs verstärkt werden. Eine detaillierte Untersuchung, die sich auf die mechanische Stabilität von

Elektrodenbeschichtungen konzentriert, könnte klären, ob CNTs auf dem geplanten retinalen Implantat eine höhere Stabilität aufweisen.

6.4 Ableitungen und Stimulationen im retinalen Netzwerk

Nach der Etablierung des Versuchsaufbaus und der penetrierenden MEAs wurden diese erstmals zur Messung und Stimulation im retinalen Gewebe eingesetzt. Dieses Kapitel diskutiert die Ergebnisse der Ableitungen und die Parameter der durchgeführten Stimulationen.

6.4.1 Extrazelluläre Ableitungen mit penetrierenden MEAs in der Retina

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass sich penetrierende MEAs für die Messung elektrischer Aktivität in der extrahierten Retina eignen. Mit den Messelektroden konnten, wie geplant, Aktionspotentiale in der Ganglienzellschicht abgeleitet werden. Die Amplituden gemessener Aktionspotentiale schwankten zwischen 80-250 μV (U_{ss}), je nach eingesetzter Elektrode und deren Lage im Gewebe. Die Amplituden lagen damit im Bereich von früheren Messungen mit penetrierenden MEAs im Cortex (Ludwig *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2009). Die penetrierenden MEAs eigneten sich zur Messung von Aktionspotentialen ebenso wie für die Messung niederfrequenter Oszillationen in der Retina von rd10-Mäusen (vgl. Kapitel 2.11.2). Sie können folglich auch die Grundlage für ein erweitertes retinales Implantat bilden, das, neben der Stimulation, in der Lage ist, die elektrophysiologischen Veränderungen in der degenerierten Retinae zu diagnostizieren.

Eine weitere Verbesserung der Ableiteigenschaften penetrierender MEAs würde die seitliche Abdichtung der Messelektroden zum Außenmedium beitragen. Versenkte Elektroden, die vom Außenmedium durch eine Nanostruktur (englisch: nanocavity) abgetrennt sind, könnten das Ableitergebnis eventuell verbessern (Hofmann *et al.*, 2011).

6.4.2 Optische Stimulation

Die optische Stimulation wurde als Kontrollstimulus eingesetzt, um den physiologischen Zustand des Gewebes zu überprüfen. Die Lichtstimulation führte in 63 % der Präparationen zu einer Antwort der Zellen, wobei die Steigerung der Aktivität die häufigste Antwort darstellte (72 %). In einigen Fällen wurden Inhibitionen registriert (28 %). Die relativ hohe Antwortrate auf die optische Stimulation spricht für den Erhalt der Photorezeptorzellen und des retinalen Netzwerkes in der extrahierten Retina.

Der Lichtkegel der verwendeten LED leuchtete die gesamte Auflagefläche der Retina aus. Das Antwortverhalten der Ganglienzellen war somit eine Reaktion auf die Ausleuchtung ihres kompletten rezeptiven Feldes. Der Versuchsaufbau sah nicht vor, die rezeptiven Felder bestimmter Ganglienzellen mit punkt- oder ringförmigen Lichtstimuli zu untersuchen. Deshalb stellen die erhaltenen Antwortmuster Varianten der klassischen Antwortmuster dar, wie sie von ON-, OFF- oder ON-OFF-Ganglienzellen zu erwarten sind.

In weiteren Versuchen könnte die Stimulation mit Lichtpunkten definierter Größe die genaue Charakterisierung von Ganglienzellen ermöglichen. Die modulare Konstruktionsweise des Versuchsaufbaus ermöglicht zudem den Einbau eines Miniatur-TFT-

Monitors unterhalb des Ableitortes, mit dem in zukünftigen Versuchsreihen komplexe optische Stimulationen realisierbar sind.

6.4.3 Stimulationsparameter

Nach der erfolgreichen Entwicklung des Versuchsaufbaus und der erfolgreichen Ableitung von Ganglienzellen mit penetrierenden MEAs wurden die Bipolarzellen mit unterschiedlichen Parameterkombinationen elektrisch stimuliert. Durch die Anpassung der Architektur der Schwerter und deren Positionierung innerhalb der Retina konnte davon ausgegangen werden, dass die Stimulation in der Nähe der Bipolarzellen ihren maximalen Effekt erreicht.

Es wurden zwei unterschiedliche Stimulationsprinzipien angewandt: Die strombasierte Stimulation über den entwickelten Neurostimulator sowie die spannungsbasierte Stimulation über einen Funktionsgenerator. Hierbei wurden unterschiedliche Parameter der Stimulation variiert und der Effekt der Stimulation an den Ganglienzellen gemessen.

Die Stimulationsparameter, die zu einer neuronalen Antwort führten, schwankten zwischen den einzelnen Präparationen. Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen im Umfeld der Stimulationselektrode, die bei der Penetration zufällig entstanden, müssen die Versuche als Einzelexperimente gewertet werden und sind nur schwer in Gruppen einzuteilen. Es konnte nicht eindeutig bestimmt werden, welches Stimulationsmuster wahrscheinlicher zu Antworten in den Zielstrukturen führt. Die erhobenen Daten lassen jedoch einige Tendenzen erkennen:

Die absolute Ladung, die über die Elektrodenfläche transferiert wird, entscheidet über den Stimulationserfolg. Bei niedriger Impedanz der Oberfläche kann diese Ladung schonend in das Zielgewebe transferiert werden und die Zellen depolarisieren. Hierfür sprechen die Versuche, die zeigen, dass eine minimale Pulsdauer benötigt wird, um eine Reaktion hervorzurufen. Die Pulsdauer konnte reduziert werden, wenn im Gegenzug die Spannung an den Elektroden vergrößert wurde. Hohe Spannungen erhöhten jedoch das Auftreten von Gasblasen und irreversiblen Schädigungen der Elektroden und des Gewebes. Im Folgenden werden die Effekte der getesteten Stimulationsparameter diskutiert.

6.4.3.1 Vergrößerung der Amplitude von Aktionspotentialen

Das Ansteigen der Aktionspotentialamplitude als Reaktion auf elektrische Stimulationen konnte nur in 2,5 % der Ableitungen beobachtet werden. Die Amplitudenvergrößerung stellte somit nicht die typische Reaktion auf elektrische Stimulation dar. Aus physiologischer Sicht ist zu erwarten, dass die Amplituden von Aktionspotentialen unverändert bleiben. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Amplitudenvergrößerung auf einen sekundären, messtechnischen Effekt zurückzuführen ist. Rückstände auf der Elektrode könnten durch die Stimulation entfernt worden sein und spontan zur Verringerung der Elektrodenimpedanz geführt haben, wodurch sich die Ableiteigenschaften verbesserten und die messbare Amplitude vergrößerte. Ebenso kann es durch die Bildung von Gasblasen während der Stimulation zu einer Verschiebung der Elektrode im Gewebe gekommen sein. Die

Messelektrode rückte näher an die Zelle, was zur Vergrößerung der gemessenen Amplitude führte.

6.4.3.2 Erhöhung der Stimulationsamplitude

Die Erhöhung der Amplituden einzelner Stimulationspulse führte mit größerer Wahrscheinlichkeit zu einer physiologischen Reaktion der Ganglienzellen. Sowohl die Steigerung der Spannung, als auch die Steigerung des Stroms erhöht die Ladungsdichte an der Elektrode und die Gesamtladung, die in das Gewebe transferiert wird. Beide Faktoren führen zu einer stärkeren Depolarisation des neuronalen Gewebes und steigern die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion.

Bei der Verwendung von stromdefinierten einzelnen Rechteckpulsen kam es ausschließlich bei Amplituden von 5 μA zu erkennbaren Antworten der Ganglienzellen, die jedoch nicht statistisch nachweisbar sind. Der geringe Stimulationserfolg (11 %) ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die benötigten Schwellenwerte nur selten erreicht wurden. Der elektrotechnische Aufbau des Stimulators limitierte den maximalen Ausgangstrom auf 10 μA , so dass keine höheren Stromstärken erreicht wurden. Bei den verwendeten Stimulationsströmen konnte nur in Einzelfällen genügend Ladung über die Elektroden transferiert werden, um die Bipolarzellen ausreichend zu depolarisieren und einen messbaren Effekt in den Ganglienzellen auszulösen. Die transferierten Ladungen bewegten sich an der unteren Grenze der benötigten Schwellenwerte, so dass nur bei idealer Lage der Stimulationselektroden im Gewebe und ausreichender Abdichtung ein Stimulationserfolg messbar war.

Spannungsgesteuerte Stimulationspulse wurden zwischen 0,5 V und 10 V variiert. Die minimale Spannung mit der Antworten der Zielzellen ausgelöst wurden betrug 0,9 V, reproduzierbare Stimulationserfolge wurden häufiger mit höheren Spannungen (2-10 V) erreicht. Es ist davon auszugehen, dass über die Elektrodenflächen nur ausreichend Ladung transferiert werden konnte, wenn die Spannungen entsprechend groß gewählt wurden. Dies gilt insbesondere für bereits verwendete Elektroden, da die Impedanz bereits durch einmalige vorherige Benutzung ansteigt (vgl. Kap. 4.2.7). Bei der Verwendung hoher Ausgangsspannungen muss beachtet werden, dass das Verlassen des sicheren elektrochemischen Spannungsfensters zu Schädigungen der Elektroden und des Gewebes führen kann.

Um die Ergebnisse mit Stimulationsschwellen aus anderen Untersuchungen vergleichbar zu machen, wurden die Flächenladungsdichten für die verwendeten einzelnen Spannungspulse anhand der Impedanzen der Stimulationselektroden geschätzt. Bei den Schätzungen ist davon auszugehen, dass die Impedanz der Stimulationselektroden im Gewebe zwischen den Impedanzen der benutzten Messelektroden und denen unbenutzter Elektroden liegt (wie in Kap. 4.2.7 bestimmt). Daraus folgt ein geschätzter Wertebereich für die erfolgreichen Stimulationspulse von 4,5- 4321 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ und Schwellenwerte für die dazugehörigen theoretischen Stromstärken von 0,015– 400 μA . Da in den Versuchen mit strombasierten Einzelpulsen bis zu einer Amplitude von 10 μA keine statistisch nachweisbaren Zellantworten gemessen werden konnten, ist auch bei den spannungsbasierten Einzelpulsen davon

auszugehen, dass bei besonders niedrigen effektiven Strömen keine Stimulation der Neurone erfolgt wäre. Folglich ist wahrscheinlich, dass die Impedanz der Stimulationselektroden innerhalb der Retina meistens unter denen der untersuchten stark beeinträchtigten Elektrode lag, aber auch deutlich über denen einer frischen, niederohmigen Elektrode.

Die bereits in der Einleitung erwähnten minimalen Flächenladungstransferraten und Stromstärken die in anderen Studien benötigt wurden, um in der Retina eine neuronale Reaktion auszulösen umfassen ebenfalls relativ weite Bereiche 24- 702 μA bzw. 5- 570 $\mu\text{C}/\text{m}^2$ für epiretinale MEAs (Mahavedappa et al., 2005) und 625 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ für subretinale MEAs (Stett *et al.*, 2007). Unter der Annahme, dass die tatsächlichen Schwellen sich nicht in den Randbereichen der Intervalle von 4,5 - 4321 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ bzw. 0,015 – 400 μA wiederfinden, sind die hier ermittelnden theoretischen Schwellenwerte im Bereich anderer retinaler MEA-Systeme. Neben den reinen Impedanzen der Stimulationselektroden, spielen natürlich auch andere Faktoren, wie Architektur der MEAs, Anatomie des Gewebes am Stimulationsort (mit Hinblick auf das untersuchte Tiermodell), eine Rolle bei der Bestimmung der Schwellenwerte. Weitere Untersuchungen müssen den tatsächlichen Stromfluss bei spannungsgesteuerter Stimulation bestimmen, bzw. es müssen Stimulationssysteme eingesetzt werden, die auch die Applikation höherer Ausgangsströme ($>10 \mu\text{A}$) erlauben, um die tatsächlichen Stimulationsschwellen zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, umfassen auch die Stimulationsschwellen in anderen Studien in einem großen Wertebereich. Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass trotz des standardisierten Penetrationsverfahrens große Schwankungen bei einzelnen Experimenten zu erwarten sind.

Erstrebenswert für ein retinales Implantat ist die ausschließliche Verwendung von Stimulationspulsen, die das sichere elektrochemische Fenster nicht verlassen. Die größte Gefahr, die von hohen Spannungen ausgeht, ist die Bildung von Gasblasen durch Elektrolyse. In einem gewissen Rahmen wären hohe Spannungen tolerierbar, sofern angelegte Stimulationspulse nur kurz angelegt werden. Die Bildung sehr kleiner Gasblasen ist zumindest in den durchgeführten Versuchen tolerierbar. Das wiederholte Auftreten von Gasblasen im Gewebe wird auf längere Sicht zu Schädigungen führen. Im Hinblick auf ein zukünftiges retinales Implantat muss konsequent auf die Verwendung von Spannungen außerhalb des sicheren Bereiches verzichtet werden.

6.4.3.3 Sinusförmige Stimulationspulse unterschiedlicher Frequenz und Länge

Neben rechteckigen Stimulationspulsen wurden sinusförmige stromgesteuerte Stimulationsfolgen getestet. Ein Stimulationserfolg konnte nur bei langanhaltenden Sinusstimulationen von mindestens 125 ms Länge und Amplituden von mindestens 5 μA beobachtet werden. Sinusstimulationen von kürzerer Dauer führten nicht zu Reaktionen, die an den Ganglienzellen gemessen werden konnten. Die meisten erfolgreichen Stimulationen zeigten sich bei sinusförmigen Stimulationsfolgen mit Längen von 1000- 2000 ms.

Im Experiment konnte zudem gezeigt werden, dass die Frequenz der sinusförmigen Stimulationsfolgen die Antwort der Ganglienzellen beeinflusst. Niedrigere Frequenzen (20- 400 Hz) führten häufiger zur erfolgreichen Stimulation, während im direkten Vergleich

höhere Frequenzen (800- 1000 Hz) nicht in der Lage waren, eine Antwort an den Ganglienzelle auszulösen.

Die Frequenz der Sinusstimulation bestimmt die Länge einzelner Stimulationspulse und somit den Zeitraum in dem Ladung im Gewebe verbleibt, bevor diese durch die entgegengesetzte Phase der Wechselspannung wieder abgezogen wird. Bei besonders schnellem Wechsel der Polarität wechseln die Ströme so schnell ihre Richtung, dass nur sehr geringe Ladungen verschoben werden, bevor diese in die entgegengesetzte Richtung wieder abgezogen werden. Diese minimalen Ladungen reichen dann trotz längerer Wiederholung nicht aus, um die Bipolarzellen ausreichend zu depolarisieren.

Der Erfolg der sinusförmigen Stimulationen (47 %; n= 15) ist eher auf die absoluten Längen der Pulsfolgen als auf den sinusförmigen Verlauf des Stimulationsstromes zurückzuführen, da die Stimulation mit einer Folge rechteckiger Stimulationspulse gleicher Frequenz zu ähnlichen Reaktionen führte. Der Signalverlauf der Pulse scheint folglich nicht ausschlaggebend, die Frequenz der zeitlichen Abfolge einzelner Pulse allerdings schon.

Offensichtlich reichte die während einer Phase transferierte Ladung nicht aus, um das Zellnetzwerk zu stimulieren. Erst die Aneinanderreihung mehrerer Schwingungen aktivierte das Netzwerk. Durch die Polaritätsumkehr der biphasischen Pulse wurde während der Stimulation stets ein Teil der Ladung aus dem Gewebe abgezogen. Dennoch verblieb wahrscheinlich eine Nettoladung im Gewebe, die sich erst ab einer längeren Stimulationsdauer ausreichend akkumulieren konnte, um das Netzwerk zu stimulieren.

In klinischen Stimulationsversuchen konnte bei Patienten eine veränderte Wahrnehmung bei der Stimulation mit unterschiedlichen Frequenzen festgestellt werden (Nanduri *et al.*, 2012), weshalb der Effekt unterschiedlicher Stimulationsfrequenzen auf die physiologische Antwort überprüft werden sollte. Ein Vorteil von sinusförmigen Stimulationspulsen gegenüber rechteckigen konnte in dieser Arbeit nicht generell festgestellt werden. Niedrige Frequenzen führten allerdings wahrscheinlicher zu neuronalen Antworten. Dabei handelt es sich aber vermutlich weniger um eine physiologische Präferenz der Zellen für bestimmte Frequenzen, als um eine Reaktion auf das Erreichen einer absoluten Schwelle beim Ladungstransfer, die bei langsamen Frequenzen wahrscheinlicher vorkommt.

6.4.3.4 Akkumulation der Stimulationsladung

Um ein Neuron erfolgreich zu stimulieren, muss eine Ladung akkumuliert werden, die einen gewissen Schwellenwert überschreitet. Durch einzelne Stimulationspulse wird dieser Schwellenwert nicht immer erreicht. Es wurden Experimente mit wiederholten Einzelpulsen durchgeführt, die im Abstand von 10 s zueinander appliziert wurden. Die Einzelpulse führten nicht zu einer Reaktion der Ganglienzelle, die Summe von drei Pulsen jedoch nach 20 s zu einem messbaren Anstieg der Feuerrate. Das Gewebe in der Nähe der Stimulationselektrode verfügt über kapazitive Eigenschaften, die eine Ladung für einen gewissen Zeitraum speichern können. Ab dem Erreichen einer kritischen Ladung wurde die Bipolarzelle ausreichend polarisiert, um die nachgeschaltete Ganglienzelle zu aktivieren.

In dem durchgeführten Versuch war nicht der Zeitpunkt des letzten Stimulationspulses entscheidend, sondern tatsächlich das Auftreten mehrerer aufeinanderfolgender

Stimulationspulse, wie durch Wiederholung des Effekts nach einer Pause von 15 Minuten nachgewiesen werden konnte. Es stellt sich die Frage, in welchem Umfang Ladung über mehrere Sekunden im Gewebe gespeichert werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage könnte in folgenden Versuchen die Kapazität des Gewebes bestimmt werden. Die Impedanzmessung im Gewebe ist prinzipiell möglich, wie Beispiele aus früheren Studien belegen (Hu *et al.*, 2006; Newbold *et al.*, 2013, Pham *et al.*, 2013). Der entwickelte Versuchsaufbau müsste hierzu in folgenden Versuchen entsprechend umgebaut werden.

Die Akkumulierung von Ladung durch mehrere Stimulationspulse, die in kurzem zeitlichen Abstand zueinander auftraten, führte zur Aktivierung der Ganglienzelle, einzelne Pulse allerdings nicht. Bei schnell aufeinanderfolgenden Pulsen wird bei jedem Puls eine gewisse Ladung verschoben. Folgt der nächste Puls in kurzem zeitlichen Abstand, wird wiederholt Ladung auf die bereits akkumulierte Ladung addiert und führt so zu einer größeren Depolarisation der Zielzelle. Erst bei ausreichender Depolarisation der stimulierten Bipolarzelle erfolgt eine Aktivierung der nachgeschalteten Ganglienzellen.

6.4.3.5 Länge von rechteckigen Einzelpulsen

Die Länge einzelner rechteckiger Stimulationspulse wirkte sich auf den Stimulationserfolg aus. Voraussetzung für eine erfolgreiche Stimulation bei variabler Pulslänge war eine ausreichend hohe Stimulationsspannung. Bei Spannungen von 10 V genügten einzelne Pulse von 1 ms Länge, um eine Zellantwort an den Ganglienzellen auszulösen. Bei geringeren Spannungen musste die Länge der Einzelpulse erhöht werden, um erfolgreich zu stimulieren. Die kleinste Spannung, die zu einer messbaren Reaktion der Ganglienzellen führte, betrug 0,9 V bei einer Länge des Einzelpulses von 800 ms. Bei der Verwendung von höheren Spannungen konnte die Länge der Pulse auf 400 ms verkürzt werden. Unter der Annahme, dass neben einer minimalen Stromdichte zusätzlich eine gewisse absolute Ladung transferiert werden muss, um Zellen ausreichend zu depolarisieren, passt dies zu den Erwartungen.

Die Verwendung langer Stimulationspulse innerhalb sicherer Spannungsgrenzen (-0,9 V bis 0,6 V für PEDOT) ist unbedenklich für die Elektrodenoberflächen. Mitunter werden aber bei kleinen Spannungen sehr lange Stimulationspulse benötigt, um die Bipolarzellen zu stimulieren und eine Reaktion in den Ganglienzellen auszulösen. Die Länge einzelner Stimulationspulse oder die Gesamtlänge einer Stimulationsfolge limitieren die zeitliche Auflösung der Messung, da während der Stimulation durch die auftretenden Stimulationsartefakte keine verwertbaren Messergebnisse zu erwarten sind. Zur Erhöhung der zeitlichen Auflösung der Messung und der Stimulation in einem zukünftigen Implantat wären möglichst kurze Stimulationspulse wünschenswert, auch im Hinblick auf die Reaktionszeiten auf visuelle Stimuli beim Patienten.

6.4.4 Nachweis der indirekten elektrischen Stimulation durch CNQX

Die Stimulationen in der Nähe der Bipolarzellen führten mehrfach zu messbaren Veränderungen in der Aktivität der parallel abgeleiteten Ganglienzellen. Aus diesen Experimenten ließ sich allerdings nicht zweifelsfrei schlussfolgern, dass die Reaktionen der Ganglienzellen durch eine indirekte Stimulation der Bipolarzellen hervorgerufen wurden. In darauffolgenden Versuchen wurde die synaptische Übertragung zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen durch den glutaminergen Blocker CNQX ausgeschaltet und die Stimulation wiederholt. CNQX blockiert die synaptische Übertragung glutaminerger Neurone (Yang & Wu, 1989; Hensley *et al.*, 1993; Boos *et al.*, 1993; Dixon *et al.*, 1992; Blasiak *et al.*, 2009).

Die vertikale Informationsweiterleitung innerhalb der extrahierten Retina, also auch zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen, wurde somit unterbunden. Bei blockierter synaptischer Übertragung konnte eine erfolgreiche Stimulation nur durch direkte Aktivierung der Ganglienzellen stattfinden.

Die Applikation von CNQX nach erfolgreichen Stimulationspulsen führte zum Ausbleiben der spontanen Aktivität. Die Weiterleitung im Netzwerk war blockiert. Durch die zuvor erfolgreiche Stimulationsfolge konnten die Zellen während der Blockade nicht stimuliert werden. Nach dem vollständigen Auswaschen des Blockers konnte mit unveränderten Parametern erneut eine Reaktion ausgelöst werden. Aus den Ergebnissen dieser Stimulationsversuche lässt sich folgern, dass die Stimulation in den beobachteten Fällen nicht direkt auf die Ganglienzellen wirkte, sondern auf die Bipolarzellen in der IPL.

Die pharmakologische Blockade mit CNQX wurde nicht bei allen Stimulationen durchgeführt. Es ist also nicht auszuschließen, dass es in einigen der durchgeführten Experimente ebenfalls zu direkten Stimulationen der Ganglienzellen kam. Es wurde versucht die Positionierung der MEAs über das o.g. elektrophysiologische Verfahren reproduzierbar durchzuführen, weshalb anzunehmen ist, dass die Stimulationselektroden immer in einer ähnlichen Tiefe der extrahierten Retina zum Liegen kamen. Die exakten anatomischen Eigenschaften am Ableitort konnten mit der verwendeten Technik allerdings nicht berücksichtigt werden. Diese natürliche Variabilität wird auch bei der Implantation eines zukünftigen retinalen Implantats vorzufinden sein, weshalb die Versuchsbedingungen der hier durchgeführten Tests als durchaus realistisch gelten können.

6.4.5 Einsatz der MEAs in der degenerierten Retina

Bidirektionale penetrierende MEAs könnten, im Auge des Patienten implantiert, der Diagnose von elektrophysiologischen Veränderungen innerhalb der Retina dienen. Um die Möglichkeit eines Einsatzes für weiterführende Studien zu überprüfen, wurden Ableitungen in der Retina von RD10 Mäusen durchgeführt. Durch einen genetischen Effekt kommt es in diesen Tieren zur Degeneration der Photorezeptorzellen und zu einer Neuorganisation der neuronalen Verschaltung. Bei der Ableitung der Ganglienzellen zeigten sich charakteristische niederfrequente Oszillationen mit einer Frequenz von 5 Hz, von denen bereits in früheren Studien berichtet wurde (Goo *et al.*, 2011). Diese Schwingungen traten parallel zu burst-artigen Abfolgen von Aktionspotentialen auf, die phasisch mit den niederfrequenten Schwingungen synchronisiert waren.

Die niederfrequenten Schwingungen konnten auch auf Elektroden gemessen werden auf denen keine Aktionspotentiale zu messen waren. Vermutlich handelte es sich bei den Schwingungen um synchronisierte Massenaktivität von einer größeren Anzahl von Zellen des retinalen Netzwerkes. Diese konnten über die gesamte Fläche gemessen werden, die die Schwerter der MEAs in horizontaler Richtung (500 μm) abdecken.

Die Schwingungen konnten durch den Einsatz von CNQX in drei unabhängigen Tieren reversibel blockiert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Schwingungen unter exzitatorischem Einfluss aus dem Netzwerk entstehen; möglicherweise durch ON-Bipolarzellen, die aufgrund der neuronalen Neuorganisation der degenerierten Retina synchronisiert feuern. Diese Vermutung wurde bereits in einer früheren Studie geäußert (Borowska *et al.*, 2011).

Die Oszillationen traten nach dem Auswaschen von CNQX unmittelbar mit größerer Intensität auf. Dies spricht dafür, dass es sich um eine intrinsische Reaktion des Netzwerkes handelt, die nach einer Störung durch die Blockade der synaptischen Übertragung selbstständig neu startet. Für die Entwicklung eines retinalen Implantats bedeutet dies, dass das etablierte MEA und die verwendete Messtechnik zusammen in der Lage sind, die Oszillationen zuverlässig zu messen. Das zukünftige retinale Implantat könnte auch als diagnostisches Werkzeug eingesetzt werden, mit dem die neuronale Reorganisation bei AMD dokumentiert werden könnte. In zukünftigen Versuchen könnte in der Retina der RD-Maus getestet werden, ob die Oszillationen durch gezielte Stimulation zu beeinflussen sind. Langzeitstudien könnten darüber hinaus klären, ob eine gezielte Stimulation der Bipolarzellen die neuronale Re-Organisation nach dem Absterben der Photorezeptorzellen verhindern kann.

6.5 Technische und physiologische Grenzen der elektrischen Stimulation

Durch die verwendeten Stimulatoren kam es zu Störungen der Ableitungen unmittelbar nach Applikation der Stimulationspulse. Der verwendete Vorverstärker der Firma TDT verfügt über eine Diodenschaltung, die den Verstärker vor hohen Spannungen schützen soll. Diese limitiert Potentiale mit einer Amplitude größer als 4 mV. Nach den Stimulationspulsen dauerte es einige Zeit bis mit dem Verstärker erneut extrazelluläre Potentiale zu messen waren. Bei den Stimulationen kam es zu maximalen Spannungen von 10 V und in deren Folge zu Blindzeiten des Verstärkers von mehreren Sekunden nach Beendigung der Stimulationsfolge.

Die Beeinträchtigungen durch die Stimulationsartefakte wurden durch die kompakte Bauart der MEAs begünstigt. Über die parallelen Zuleitungen auf den Siliziumträgern kam es zur Verstärkung der Störungen auf benachbarten Messelektroden, vermutlich durch induzierte Ströme. Es ist nicht auszuschließen, dass Stimulationserfolge mit kurzen Latenzzeiten in die Refraktärzeit der Stimulationsartefakte gefallen sind und nicht darstellbar waren. Dies würde die Ergebnisse verzerren, da kurze physiologische Antworten so nicht detektiert werden konnten. In der Folge bedeutet dies, dass es theoretisch zu weiteren physiologischen Effekten durch die elektrische Stimulation gekommen sein könnte, die aufgrund der technischen Einschränkungen nicht messbar waren.

Das Auftreten von Gasblasen schädigte die Oberflächen der Messelektroden und das retinale Gewebe und sollte verhindert werden. Trotzdem verlangten die Stimulationsversuche in vielen Fällen die Erhöhung der Amplituden über die sicheren Grenzen hinaus, um eine Antwort in der abgeleiteten Zelle zu generieren. In Anbetracht der Tatsache, dass die Schwellen für die elektrische Stimulation sehr hoch liegen, müssen weitere Modifikationen der Elektrodenoberflächen vorgenommen werden, um die Impedanz der Stimulationselektroden weiter zu reduzieren. Es scheint, dass die verwendeten Stimulationsparameter die unteren Schwellenwerte für erfolgreiche Stimulationen markieren. Einige Stimulationsversuche wurden mit Spannungen durchgeführt, bei denen es schon nach kurzer Pulsdauer zur Bildung von Gasblasen kommt. Dies wurde zwangsweise in Kauf genommen, weil in vielen Fällen nur durch entsprechend hohe Amplituden Reaktionen der Zellen beobachtet werden konnte. Für den dauerhaften Einsatz in einem retinalen Implantat sollten jedoch generell keine Stimulationspulse verwendet werden, die das Gewebe oder die Elektroden nachhaltig schädigen.

6.6 Ausblick

Der Einsatz der entwickelten penetrierenden MEAs als Teil einer bidirektionalen retinalen Prothese ist prinzipiell möglich. Die Stimulationsparameter, die benötigt wurden um eine Reaktion im retinalen Netzwerk hervorzurufen, bewegten sich an den physikalischen Grenzen. Alternative Materialien zur Oberflächenbeschichtung könnten die Impedanz der Stimulationselektroden weiter senken und die benötigten Spannungen für die Stimulation in einen sicheren Bereich führen. Weitere Experimente sollten neben den elektrischen Eigenschaften der MEAs auch die Biokompatibilität über längere Zeiträume untersuchen und die Ergebnisse in die Auswahl verwendeter Materialien mit einbeziehen. Die weitere Miniaturisierung der MEA-Architektur könnte die Penetration der Retina vereinfachen und sicherer machen. Allerdings muss die Verkleinerung der Strukturen gegen die mögliche Beeinträchtigung der mechanischen Stabilität abgewogen werden. Alternative Materialien könnten auch hier von Nutzen sein, um diesen Kompromiss zu ermöglichen. Insbesondere die Anpassung des MEAs für den Einsatz im intakten Auge wird der Inhalt zukünftiger Studien sein. Hierbei wird sich auch die Frage stellen, welche Teile des Implantats im Auge untergebracht werden können und welche externen Teile benötigt werden.

Die Anpassung der Mess- und Stimulationstechnik, die sich in ein retinales Implantat integrieren lässt, stellt besondere Anforderungen an die Planung funktionsfähiger und entsprechend miniaturisierter Schaltkreise. Die Steuerung der Stimulationspulse, die bisher manuell über die grafische Benutzeroberfläche programmiert und gestartet wurde, muss angepasst werden. Im fertiggestellten retinalen Implantat sollte eine prozessorgestützte Ableit- und Stimulationselektronik automatisch Stimulationen durchführen und den Stimulationserfolg an den Ganglienzellen messen. Durch diese Kontrollmessungen könnte dann die Stimulation mit ihren Parametern laufend angepasst werden. Durch die Erfolgskontrolle könnten Stimulationen zuverlässiger durchgeführt werden, da der

Stimulator selbstständig nicht erfolgreiche Stimulationen wiederholen könnte, bis eine Reaktion der Ganglienzellen gemessen wird.

Auf dem Weg zu einem vollständig integriertem retinalen Implantat, welches penetrierende bidirektionale MEAs verwendet, müssen noch einige Unwegsamkeiten beseitigt werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung der Architektur eines ersten Prototyps und die Charakterisierung unterschiedlicher Elektrodenoberflächen sowie erstmals das erfolgreiche Ableiten und Stimulieren von Neuronen in der extrahierten Retina mit dieser Art von MEAs.

Zusammenfassung

Eine Vielzahl von retinalen Degenerationskrankheiten führt zum Absterben der Photorezeptorzellen, wodurch die Retina ihre Lichtempfindlichkeit verliert. Weltweit sind mehrere Millionen Menschen von diesen degenerativen Krankheiten betroffen. Retinale Prothesen versuchen die Funktion der Photorezeptorzellen zu ersetzen, indem sie die verbleibenden Neurone des retinalen Netzwerkes elektrisch stimulieren. Bisherige retinale Implantate nutzen planare Multielektrodenarrays (MEAs), die dem retinalen Netzwerk flächig aufliegen. Diese planaren MEAs erreichen meist nur einzelne Schichten des retinalen Netzwerkes und ermöglichen es nicht, die neuronale Antwort auf eine Stimulation parallel zu messen. Abhilfe können penetrierende, bidirektionale MEAs schaffen, welche die Retina in vertikaler Richtung durchstechen. Mit diesen speziellen MEAs kann neuronale Aktivität abgeleitet werden und parallel elektrisch stimuliert werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines penetrierenden, bidirektionalen MEAs, mit dem in mehreren Schichten des retinalen Netzwerkes parallel stimuliert und abgeleitet werden kann. Das vorgestellte MEA besteht aus vier Schwertern, die die Retina in vertikaler Richtung penetrieren. Jedes Schwert trägt vier linear angeordnete Elektroden. Die Dimensionen des MEAs und die Abstände der Elektroden wurden so gewählt, dass sie als Basis für ein bidirektionales Implantat dienen können, indem sie die Anatomie der Retina berücksichtigen. Als Elektrodenmaterial kamen verschiedene Beschichtungen aus Iridium, Iridiumoxid und dem leitfähigen Polymer Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT) zum Einsatz. Deren Eignung als Stimulations- und Ableitelektroden wurde getestet. Die beste mechanische und chemische Stabilität wiesen Elektroden aus Iridiumoxid auf. Die geringsten Impedanzen wurden mit Elektrodenbeschichtungen aus PEDOT erreicht. Nur mit PEDOT-Elektroden konnte ausreichend Ladung übertragen werden, um messbare neuronale Antworten auszulösen. PEDOT-Beschichtungen zeigten sich jedoch anfällig für mechanische und chemische Einflüsse während der Versuche, wie durch Impedanzspektroskopie und elektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentiert wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die entwickelten penetrierenden MEAs erstmalig in der extrahierten Rattenretina eingesetzt. Es wurde eine Methode entwickelt, die MEAs innerhalb der Retina anhand der elektrischen Aktivität von Ganglienzellen reproduzierbar zu positionieren. Mit unterschiedlichen Stimulationsparametern wurde in der Nähe der Bipolarzellen erfolgreich stimuliert und die Reaktion der Ganglienzellen extrazellulär gemessen. Der Stimulationserfolg war abhängig von der transferierten Ladung und von der Frequenz der Stimulationsfolgen. Durch die anschließende pharmakologische Blockierung der synaptischen Übertragung innerhalb der Retina konnte gezeigt werden, dass die Stimulation auf tiefere Schichten der Retina wirkte - vermutlich auf die Bipolarzellen.

In der degenerierten Retina von rd10 Mäusen konnten charakteristische niederfrequente Oszillationen gemessen werden, die durch die Blockierung der synaptischen Übertragung reversibel geblockt wurden. So konnte gezeigt werden, dass sich die hier entwickelte MEA-Architektur für den prinzipiellen Einsatz in einem bidirektionalen retinalen Implantat eignet.

Summary

A variety of retinal degenerating diseases leads to the loss of photoreceptor cells, causing the retina to lose its light-sensitivity. Several million people worldwide are suffering from those degenerative diseases.

Retinal prostheses try to replace the functionality of photoreceptor cells by electrically stimulating the remaining neurons of the retinal network.

Previous retinal implants use planar multi-electrode arrays (MEAs), covering the retinal network in a 2-dimensional manner. Those MEAs usually contact only single layers within the retina and are not capable of recording the neuronal response and stimulate electrically through the same device. Relief could derive from penetrating, bidirectional MEAs, which penetrate the retina in the vertical direction and are able to both, record neuronal activity and perform electrical stimulation.

The main aim of this thesis was the development of a penetrating, bidirectional MEA, with which multiple layers of the retinal network can be recorded and stimulated simultaneously. The MEA presented in this thesis consists of four shanks penetrating the retina in vertical direction. Every single shank carries four linearly aligned electrodes. The dimensions of the MEA and the arrangement of the electrodes were chosen in a way they could serve as the basis of a retinal implant.

Different materials were used for coating the microelectrodes: iridium, iridiumoxide and the conductive polymer poly-3,4-ethylenedioxythiophene. Their appropriateness to act as coatings on stimulation and recording electrodes was tested. Iridiumoxide proved to have the best mechanical and chemical stability. The lowest impedances were achieved with PEDOT coatings. Only with PEDOT-coated electrodes, it was possible to transfer sufficient charge to elicit neuronal responses. However, PEDOT coatings were easily degraded by mechanical and chemical influences during the experiments as shown by impedance spectroscopy and electron microscopy imaging.

In the second part of this thesis the new penetrating MEAs were used for the first time to perform experiments in the extracted retina of rats. A method was established to reliably position the MEAs, monitoring the electrical activity of retinal ganglion cells.

Different stimulation parameters were used to successfully stimulate close to the retinal bipolar cells. The ganglion cells' reaction to the electrical stimulation of the network was recorded extracellularly. The success of electrical stimulation mainly depended on the absolute amount of charge transferred to the tissue and the frequency of stimulation patterns. By pharmacologically blocking the synaptic transmission within the retina, it could be shown that the stimulation affected the deeper retinal layers – presumably the bipolar cells.

By means of penetrating MEAs, characteristic low-frequency oscillations could be measured in the degenerated retina of rd10 mice. By reversibly blocking the synaptic transmission, it could be shown that the chosen MEA-architecture is feasible for the use in a future bidirectional retinal implant.

Anhang A: Prüfgrößen Kolmogorov-Smirnov-Test

Stichprobengröße (N)	Signifikanzschwelle für: $d_{max} = \max (F_1(x) - F_2(x))$				
	$\alpha=0,20$	$\alpha=0,15$	$\alpha=0,10$	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$
1	0,900	0,925	0,950	0,975	0,995
2	0,684	0,726	0,776	0,842	0,929
3	0,565	0,597	0,642	0,708	0,828
4	0,494	0,525	0,564	0,624	0,733
5	0,446	0,474	0,510	0,565	0,669
6	0,410	0,436	0,470	0,521	0,618
7	0,381	0,405	0,438	0,486	0,577
8	0,358	0,381	0,411	0,457	0,543
9	0,339	0,360	0,388	0,432	0,514
10	0,322	0,342	0,368	0,410	0,490
11	0,307	0,326	0,352	0,391	0,468
12	0,295	0,313	0,338	0,375	0,450
13	0,284	0,302	0,325	0,361	0,433
14	0,274	0,292	0,314	0,349	0,418
15	0,266	0,283	0,304	0,338	0,404
16	0,258	0,274	0,295	0,328	0,392
17	0,250	0,266	0,286	0,318	0,381
18	0,244	0,259	0,278	0,309	0,371
19	0,237	0,252	0,272	0,301	0,363
20	0,231	0,246	0,264	0,294	0,356
25	0,210	0,220	0,240	0,270	0,320
30	0,190	0,200	0,220	0,240	0,290
35	0,180	0,190	0,210	0,230	0,270
>35	$\frac{1,07}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,14}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,22}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,36}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,63}{\sqrt{N}}$

Quelle: http://www.cas.usf.edu/~cconnor/colima/Kolmogorov_Smirnov.htm

Stand: 30.11.2013

Anhang B: Ames-Medium Zusammensetzung

(Sigma-Aldrich nach Ames & Nesbett, 1981)

Stoff	g/l
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,169
MgSO ₄	0,1488
KCl	0,231
KH ₂ PO ₄ (anhyd)	0,068
NaCl	7,01
L-Alanin	0,0024
L-Arginin•HCl	0,00421
L-Asparagin (anhyd,)	0,00084
L-Asparaginsäure	0,00012
L-Cystin•2HCl	0,000065
L-Glutamin	0,073
L-Glutaminsäure•Na	0,001183
Glycin	0,00045
L-Histidin•HCl•H ₂ O	0,002513
L-Isoleucin	0,00058
L-Leucin	0,00144
Lysin•HCl	0,003648
L-Methionin	0,00039
L-Phenylalanin	0,00132
L-Prolin	0,00007
L-Serin	0,00252
Taurin	0,00075
L-Threonin	0,00333
L-Tryptophan	0,00049
L-Tyrosin•2Na•2H ₂ O	0,00211
L-Valin	0,00176
Ascorbinsäure•Na	0,01796
D-Biotin	0,0001
Cholinchlorid	0,0007
Folsäure	0,0001
myo-Inositol	0,0272
Niacinamid	0,0001
D-Pantothensäure•½Ca	0,0001
Pyridoxal•HCl	0,0001
Riboflavin	0,00001
Thiamin•HCl	0,0001
Cytidin	0,00073
Hypoxanthin	1,081
Thymidin	0,00082
Cytidin	0,01333
Hypoxanthin	0,00024
Thymidin	0,00073

+ 1,9 g Natriumbicarbonat. Gelöst in 1 l aqua bidest.

pH-Wert eingestellt auf 7,4 (unter 95% O₂/5%CO₂ bei 32°C)

Anhang C: MATLAB-Skripte

Die Rohdaten, die mit der Software der Firma Tucker-Davis Technologies aufgezeichnet wurden, wurden über eigens programmierte Skripte in MATLAB übertragen. Alle weiteren Analyseschritte sowie die grafische Aufbereitung der Ergebnisse wurden ebenfalls in MATLAB (The Mathworks, Ver. R2012b) vorgenommen. Es wird sich im Folgenden auf die Skripte beschränkt, die letztendlich für die Auswertung der in dieser Arbeit präsentierten Daten verwendet wurden. Der dargestellte Programmiercode wurde auf die essentiellen Programmierschritte gekürzt. Formatierungs- und Darstellungsbefehle werden nicht angegeben.

Skript 1: Export der Rohdaten aus dem TDT-Containerformat

```
%%TDT Daten-Tank Zugriff
    %Aktiviere ActiveX Wrapper
    TTX = actxcontrol('TTank.X');

%%Definiere Server-Parameter

    %Definiere Servername
    parameters.servername= 'Local';

    %Definiere Name des Wavelet-Speichers
    parameters.varsnip= 'Snip';

    %Verbinde mit Server
    TTX.ConnectServer(parameters.servername, 'Me')

    %Öffne Daten-Tank „tankname“ und Block „blockname“
    TTX.OpenTank(tankname, 'R')
    TTX.SelectBlock(blockname);

    %Vergrößere Arbeitsspeicher auf 1GB
    TTX.SetGlobalV('WavesMemLimit',1073741824);

%%Hole Extrazelluläre MEA-Daten
    %Hole 16-Kanal-MEA Rohdaten nach „data.pdec“
    data.pdec= TTX.ReadWavesV('Extr');

%%Erstelle Zeitvektor
    %Übergib Start- und Stoppzeit an Vektor „TR“
    TR = TTX.GetValidTimeRangesV;
```

```

%%Berechne Samplingrate aus Vektorlänge
samplingrates.pdec= length(data.pdec)/(TR(2) - TR(1));

%%Erstelle Zeitvektor aus Samplingrate und Aufnahmezeit
data.time = TR(1):1/samplingrates.pdec:TR(2)-1/samplingrates.pdec

%%Hole Wavelet-Daten für 16 Kanäle
for i=1:16
    snipN=TTX.ReadEventsV(1000, 'Snip',i, 0, 0.0, 0.0, 'ALL');
    snipwave= TTX.ParseEvV(0, snipN);
    data.snipwaves{i}= snipwave;
end

%Hole Timestamps der Wavelet-Daten „Snip“
snipN=TTX.ReadEventsV(10000,'Snip',1,0,0,0,'All');
sniptime= TTX.ParseEvInfoV(0, snipN,6);
data.spiketimes= zeros(16,max(snipnum(2,:)));
data.spiketimes(1,1:length(sniptime))= sniptime;
for i=2:16;
    snipN=TTX.ReadEventsV(10000,'Snip',i,0,0,0,'All');
    sniptime= TTX.ParseEvInfoV(0, snipN,6);
    data.spiketimes(i,1:length(sniptime))= sniptime;
end

%%Hole LED-Daten
%Definiere Namen der LED-Variablen
parameters.ledstore= 'leds'; %Beginn
parameters.ledampstore= 'ampl'; %Amplitude
parameters.leddurstore= 'dura'; %Dauer
parameters.stimstore= 'Para'; %Wiederholrate

%Speichere LED-Stimulation Startzeitpunkte in „led-ledtimes“
ledN=TTX.ReadEventsV(1000,parameters.ledstore,0,0,0,0,'All');
led.ledtimes = TTX.ParseEvInfoV(0, ledN, 6);

%Speichere LED-Amplitude in „led.ledamp“
ledN=TTX.ReadEventsV(1000,parameters.ledampstore,0,0,0,0,'All')
led.ledamp = TTX.ParseEvInfoV(0, ledN, 7);

%Speichere LED-Dauer in „led.leddura“
ledN=TTX.ReadEventsV(1000,parameters.leddurstore,0,0,0,0,'All')
led.leddura = TTX.ParseEvInfoV(0, ledN, 7);

%%Hole Stimulationsdaten
%Definiere Namen der Stimulations-Variablen
parameters.stimdurationstoreA= 'DURa'; %Dauer 1.Phase
parameters.stimdurationstoreB= 'DURb'; %Dauer 2.Phase
parameters.stimamplitudestoreA= 'AMPa'; %Amplitude 1.Phase
parameters.stimamplitudestoreB= 'AMPb'; %Amplitude 2.Phase

%Speichere Stimulationszeitpunkte
pulsN=TTX.ReadEventsV(10000,parameters.stimstore,0,0,0,0,'All')
stim.pulstimes= TTX.ParseEvInfoV(0, pulsN, 6);
stim.pulsesnumber= TTX.ParseEvInfoV(0, pulsN, 7);

```

```

%Dauer Stimulationspuls 1.Phase
pulsN=TTX.ReadEventsV(1000,parameters.stimdurationstoreA,0,0,0,...0,'All')
stim.pulsDURa = TTX.ParseEvInfoV(0,pulsN, 7);

%Dauer Stimulationspuls 2.Phase
pulsN=TTX.ReadEventsV(10000,parameters.stimdurationstoreB,0,0,0,...0, 'All');
stim.pulsDURb = TTX.ParseEvInfoV(0, pulsN, 7);

%Amplitude Stimulationspuls 2.Phase
pulsN=TTX.ReadEventsV(10000,parameters.stimamplitudestoreA,0,0, ...0,0,'All');
stim.pulsAMPa = TTX.ParseEvInfoV(0, pulsN, 7);

%Amplitude Stimulationspuls 2.Phase
pulsN=TTX.ReadEventsV(10000,parameters.stimamplitudestoreB,0,0, ...0,0,'All');
stim.pulsAMPb = TTX.ParseEvInfoV(0,pulsN, 7);

%%Hole Markierungen
%Hole Zeitpunkte „timestamps“ der Markierungen und speichere in „tagN“
tagN=TTX.ReadEventsV(10000,'Tags',0,0,0,0,'All');
data.tagtimes = TTX.ParseEvInfoV(0, tagN, 6);

%% Daten speichern und schließen
% Generiere Dateinamen „filename“ und speichere in Ordner „C:\Daten...“
filename= [tankname '_' blockname]
save (['C:\Daten...' filename])

%SchlieÙe Daten-Tank und melde Server ab
TTX.CloseTank
TTX.ReleaseServer

```


Skript 2: Extraktion von Eventdaten mit variablem Schwellenwert

%%Eventdaten-Detektor für steigende und fallende Flanken

%%Definiere Variablen

```
%Schwellenwert Nutzereingabe
parameters.thresh= -30;
%Definiert Ausblendzeit nach Event
parameters.blankdur= 0.01;
```

%%Berechne gültige Eventdaten

```
%Vordefinition Vektor
data.events=zeros(10000,16);
```

%Eventdaten über Schwellenwert

für negative Schwellen

```
for i=1:16
    if parameters.thresh<0
```

%Hole Daten unterhalb der Schwelle

```
b=sourcedata <parameters.thresh;
```

%Eventdaten über Schwellenwert

für positive Schwellen

%Hole Daten unterhalb der Schwelle

```
else b=sourcedata >parameters.thresh;
end
```

%Differenzen $(X(n+1)-X(n))$ von Vektor b

```
c=diff(b);
```

%Abgleich aller gültigen Zeitpunkte mit Zeitvektor

```
d=data.time(c==1)';
data.events(1:length(d),i)=d;
end
```

Skript 3: Berechnung von mittleren Aktivitätsraten

```
%%Definiere Parameter
    %Definiere Binsize
        binsize= 1;

    %Nutzerauswahl Berechnungszeitraum

        maxtime= length(sourcedata)/samplingrates.pdec;
        xrate= 1:binsize:round(maxtime);
        TR=[min(data.time) max(data.time)];

    %Nutzerauswahl Kanäle
        channelnum=[1:16];

%%Berechne mittlere Aktivitätsraten
    data.spikerates= zeros(round(max(TR)/binsize),16);
    for n=channelnum
        for i=1:round(max(TR)/binsize)
            data.spikerates(i,n)= sum((data.events(:,n)<=i*binsize & ...data.events(:,n) >(i-1)*binsize))/binsize;
        end
    end

%%Drucke mittlere Aktivitätsraten
    figure('name','Spikerate Overview')
    title(['Spikerates Overview' num2str(binsize)])

    for i=1:16
        try %skips error if vector is zero
            subplot (4,4,i)
            plot(xrate,data.spikerates(:,i))
            axis ([0, maxtime,0,(round(max(data.spikerates(:,i)))/10)*10])
            ylabel(['ch' num2str(i) 'spikerate/Hz'])
            xlabel ('time/seconds')
        end
    end
```

Skript 4: Histogramme, Kumulative Verteilungsfunktion & Kolmogorov-Smirnov-Test

%%Berechne IEIHs

```
events.f2=events.c2.*data.events(:,channelnum);  
events.g2=events.f2(events.f2~=0);  
for i=1:length(events.g2)-1;  
events.ieinterval(i)= events.g2(i+1)-events.g2(i);  
end
```

%%Histogramme

 %Definiere Parameter

 %Histogrammgrenze

 hist_limits=[0 100]

 %Plotte Histogramm

 bar(hist_limits1,histc(events.ieinterval,hist_limits1));

%%Kumulative Verteilungsfunktion

 cdfplot(events.ieinterval);

%%Kolmogorov-Smirnov-Test

 kstest2(events.ieinterval_“vorher“,events.ieinterval_“nachher“)

Literaturverzeichnis

- Abidian, M.R., Martin, D.C., 2008. Experimental and theoretical characterization of implantable neural microelectrodes modified with conducting polymer nanotubes. *Biomaterials* 29, 1273–1283.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 107, 2224–2232.
- Ames, A., 3rd, Nesbett, F.B., 1981. In vitro retina as an experimental model of the central nervous system. *J. Neurochem.* 37, 867–877.
- Amthor, F.R., Oyster, C.W., Takahashi, E.S., 1984. Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res.* 298, 187–190.
- Amthor, F.R., Takahashi, E.S., Oyster, C.W., 1989. Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. *J. Comp. Neurol.* 280, 97–121.
- Aryan, N.P., Brendler, C., Rieger, V., Schleeauf, S., Heusel, G., Rothermel, A., 2012. In vitro study of iridium electrodes for neural stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2012, 819–822.
- Baden, T., Berens, P., Bethge, M., Euler, T., 2013. Spikes in mammalian bipolar cells support temporal layering of the inner retina. *Curr. Biol.* 23, 48–52.
- Bae, S.H., Che, J.-H., Seo, J.-M., Jeong, J., Kim, E.T., Lee, S.W., Koo, K., Suaning, G.J., Lovell, N.H., Cho, D.-I.D., Kim, S.J., Chung, H., 2012. In vitro biocompatibility of various polymer-based microelectrode arrays for retinal prosthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2653–2657.
- Barlow, H.B., Hill, R.M., 1963. Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina. *Science* 139, 412–414.
- Barlow, H.B., Hill, R.M., Levick, W.R., 1964. Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J Physiol* 173, 377–407.
- Bear, M., Paradiso, M., Connors, B.W., 2006. *Neuroscience: Exploring the Brain*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 278–307.
- Benton, L.A., Baker, L.L., Bowman, B.R., Waters, R.L., 1983. Grundprinzipien der Elektrostimulation, in: Benton, L.A., Baker, L.L., Bowman, B.R., Waters, R.L. (Eds.), *Funktionelle Elektrostimulation*. Steinkopff, pp. 17–27.
- Berson, E.L., 1993. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1659–1676.

- Blasiak, A., Blasiak, T., Lewandowski, M.H., 2009. Electrophysiology and pharmacology of the optic input to the rat intergeniculate leaflet in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 171–180.
- Boos, R., Schneider, H., Wässle, H., 1993. Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.* 13, 2874–2888.
- Borowska, J., Trenholm, S., Awatramani, G.B., 2011. An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J. Neurosci.* 31, 5000–5012.
- Brindley, G.S., Lewin, W.S., 1968. The sensations produced by electrical stimulation of the visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 196, 479–493.
- Brummer, S.B., Turner, M.J., 1977. Electrochemical considerations for safe electrical stimulation of the nervous system with platinum electrodes. *IEEE Trans Biomed Eng* 24, 59–63.
- Buzsáki, G., 2004. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 7, 446–451.
- Chader, G.J., Weiland, J., Humayun, M.S., 2009. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog. Brain Res.* 175, 317–332.
- Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., Heckenlively, J.R., 2002. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.* 42, 517–525.
- Cheung, K.C., 2007. Implantable microscale neural interfaces. *Biomed Microdevices* 9, 923–938.
- Chow, A.Y., Chow, V.Y., Packo, K.H., Pollack, J.S., Peyman, G.A., Schuchard, R., 2004. The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 122, 460–469.
- Ciavatta, V.T., Kim, M., Wong, P., Nickerson, J.M., Shuler, R.K., Jr, McLean, G.Y., Pardue, M.T., 2009. Retinal expression of Fgf2 in RCS rats with subretinal microphotodiode array. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4523–4530.
- Clause, B.T., 1998. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsl* 2–7.
- Cogan, S.F., 2008. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu Rev Biomed Eng* 10, 275–309.
- Cogan, S.F., Troyk, P.R., Ehrlich, J., Plante, T.D., 2005. In vitro comparison of the charge-injection limits of activated iridium oxide (AIROF) and platinum-iridium microelectrodes. *IEEE Trans Biomed Eng* 52, 1612–1614.
- Cohen, E.D., Miller, R.F., 1995. Quinoxalines block the mechanism of directional selectivity in ganglion cells of the rabbit retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1127–1131.

- Curcio, C.A., Sloan, K.R., Jr, Packer, O., Hendrickson, A.E., Kalina, R.E., 1987. Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science* 236, 579–582.
- Dacheux, R.F., Raviola, E., 1986. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J. Neurosci.* 6, 331–345.
- Datum, K.H., Kohler, K., Zrenner, E., 1993. [Immunohistochemical studies of the role of dopaminergic retinal cells in neuronal light adaptation]. *Klin Monbl Augenheilkd* 203, 59–69.
- De Juan, E., Jr, Spencer, R., Barale, P.-O., da Cruz, L., Neysmith, J., 2013. Extraction of retinal tacks from subjects implanted with an epiretinal visual prosthesis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*
- DeVries, S.H., 2000. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28, 847–856.
- Dixon, D.B., Copenhagen, D.R., 1992. Two types of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *J. Physiol. (Lond.)* 449, 589–606.
- Dobelle, W.H., 2000. Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the visual cortex. *ASAIO J.* 46, 3–9.
- Dobelle, W.H., Mladejovsky, M.G., 1974. Phosphenes produced by electrical stimulation of human occipital cortex, and their application to the development of a prosthesis for the blind. *J. Physiol. (Lond.)* 243, 553–576.
- Dowling, J.E., 1986. Dopamine: a retinal neuromodulator? *Trends in Neurosciences* 9, 236–240.
- Egert, U., Schlosshauer, B., Fennrich, S., Nisch, W., Fejtl, M., Knott, T., Müller, T., Hämmerle, H., 1998. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols* 2, 229–242.
- Ehinger, B., 1983a. Connexions between retinal neurons with identified neurotransmitters. *Vision Res.* 23, 1281–1291.
- Ehinger, B., 1983b. Functional role of dopamine in the retina. *Progress in Retinal Research* 213–232.
- Eick, S., Wallys, J., Hofmann, B., van Ooyen, A., Schnakenberg, U., Ingebrandt, S., Offenhäusser, A., 2009. Iridium oxide microelectrode arrays for in vitro stimulation of individual rat neurons from dissociated cultures. *Front Neuroeng* 2, 16.
- Famiglietti, E.V., Jr, Kolb, H., 1975. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* 84, 293–300.

- Fernandes, R.A.B., Diniz, B., Ribeiro, R., Humayun, M., 2012. Artificial vision through neuronal stimulation. *Neurosci. Lett.* 519, 122–128.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F.S., Parmeggiani, F., 2011. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr. Genomics* 12, 238–249.
- Ferris, F.L., 3rd, Fine, S.L., Hyman, L., 1984. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 102, 1640–1642.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S.N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., Guck, J., 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8287–8292.
- Fried, S.I., Hsueh, H.A., Werblin, F.S., 2006. A method for generating precise temporal patterns of retinal spiking using prosthetic stimulation. *J. Neurophysiol.* 95, 970–978.
- Frost, C., Wei, B., Baghmanli, Z., Cederna, P.S., Urbanchek, M.G., 2012. PEDOT Electrochemical Polymerization Improves Electrode Fidelity and Sensitivity. *Plastic & Reconstructive Surgery* April 2012 129, 933–942.
- Fujikado, T., Kamei, M., Sakaguchi, H., Kanda, H., Morimoto, T., Ikuno, Y., Nishida, Kentaro, Kishima, H., Maruo, T., Konoma, K., Ozawa, M., Nishida, Kohji, 2011. Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4726–4733.
- Gargini, C., Terzibasi, E., Mazzoni, F., Strettoi, E., 2007. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J. Comp. Neurol.* 500, 222–238.
- Gekeler, F., Kobuch, K., Schwahn, H.N., Stett, A., Shinoda, K., Zrenner, E., 2004. Subretinal electrical stimulation of the rabbit retina with acutely implanted electrode arrays. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 242, 587–596.
- Gerding, H., 2007. A new approach towards a minimal invasive retina implant. *J Neural Eng* 4, S30–37.
- Goo, Y.S., Ahn, K.N., Song, Y.J., Ahn, S.H., Han, S.K., Ryu, S.B., Kim, K.H., 2011. Spontaneous Oscillatory Rhythm in Retinal Activities of Two Retinal Degeneration (rd1 and rd10) Mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 15, 415–422.
- Gouy, G., 1910. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J. Phys. Radium* 9, 457–468.
- Grumet, A.E., 1999. Electric stimulation parameters for an epi-retinal prosthesis. [Dissertation] Massachusetts Institute of Technology, Dept. of Electrical Engineering and Computer Science, Massachusetts.

- Grzywacz, N.M., Merwine, D.K., Amthor, F.R., 1998. Complementary roles of two excitatory pathways in retinal directional selectivity. *Vis. Neurosci.* 15, 1119–1127.
- Guymer, R., Luthert, P., Bird, A., 1999. Changes in Bruch's membrane and related structures with age. *Prog Retin Eye Res* 18, 59–90.
- Harris, A.R., Morgan, S.J., Chen, J., Kapsa, R.M.I., Wallace, G.G., Paolini, A.G., 2013. Conducting polymer coated neural recording electrodes. *J Neural Eng* 10, 016004.
- Hartline, H., 1938. The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American Journal of Physiology* 121, 400–415.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809.
- He, S., Masland, R.H., 1997. Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells. *Nature* 389, 378–382.
- Heldmaier, G., Neuweiler, G., 2003. *Vergleichende Tierphysiologie*. Springer DE.
- Helmholtz, H., 1879. Studien über elektrische Grenzschichten. *Annalen der Physik* 243, 337–382.
- Hensley, S.H., Yang, X.L., Wu, S.M., 1993. Identification of glutamate receptor subtypes mediating inputs to bipolar cells and ganglion cells in the tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.* 69, 2099–2107.
- Herrmann, R., Heflin, S.J., Hammond, T., Lee, B., Wang, J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Eggers, E.D., Frishman, L.J., McCall, M.A., Arshavsky, V.Y., 2011. Rod vision is controlled by dopamine-dependent sensitization of rod bipolar cells by GABA. *Neuron* 72, 101–110.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116, 473–496.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B., 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 424–448.
- Hofmann, B., Kätelhöhn, E., Schottdorf, M., Offenhäusser, A., Wolfrum, B., 2011. Nanocavity electrode array for recording from electrogenic cells. *Lab Chip* 11, 1054–1058.
- Hu, Z., Troyk, P.R., Brawn, T.P., Margoliash, D., Cogan, S.F., 2006. In vitro and in vivo charge capacity of AIROF microelectrodes. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 886–889.
- Humayun, M.S., de Juan, E., Jr, Dagnelie, G., Greenberg, R.J., Propst, R.H., Phillips, D.H., 1996. Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. *Arch. Ophthalmol.* 114, 40–46.
- Humayun, M.S., de Juan, E., Jr, Weiland, J.D., Dagnelie, G., Katona, S., Greenberg, R., Suzuki, S., 1999. Pattern electrical stimulation of the human retina. *Vision Res.* 39, 2569–2576.

Humayun, M.S., Weiland, J.D., Fujii, G.Y., Greenberg, R., Williamson, R., Little, J., Mech, B., Cimarusti, V., Van Boemel, G., Dagnelie, G., de Juan, E., 2003. Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis. *Vision Res.* 43, 2573–2581.

Humayun, M.S., Dorn, J.D., da Cruz, L., Dagnelie, G., Sahel, J.-A., Stanga, P.E., Cideciyan, A.V., Duncan, J.L., Elliott, D., Filley, E., Ho, A.C., Santos, A., Safran, A.B., Arditi, A., Del Priore, L.V., Greenberg, R.J., Argus II Study Group, 2012. Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis. *Ophthalmology* 119, 779–788.

Jager, R.D., Mieler, W.F., Miller, J.W., 2008. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 358, 2606–2617.

Jeftinija, S., Urban, L., Kojic, L., 1993. The selective activation of dorsal horn neurons by potassium stimulation of high threshold primary afferent neurons in vitro. *Neuroscience* 56, 473–484.

Jensen, R.J., 2012. Activation of ganglion cells in wild-type and P23H rat retinas with a small subretinal electrode. *Exp. Eye Res.* 99, 71–77.

Jensen, R.J., Rizzo, J.F., 3rd, 2011. Effects of GABA receptor antagonists on thresholds of P23H rat retinal ganglion cells to electrical stimulation of the retina. *J Neural Eng* 8, 035002.

Jensen, R.J., Rizzo, J.F., 3rd, Ziv, O.R., Grumet, A., Wyatt, J., 2003. Thresholds for activation of rabbit retinal ganglion cells with an ultrafine, extracellular microelectrode. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3533–3543.

Jiang, X., Sui, X., Lu, Y., Yan, Y., Zhou, C., Li, L., Ren, Q., Chai, X., 2013. In vitro and in vivo evaluation of a photosensitive polyimide thin-film microelectrode array suitable for epiretinal stimulation. *J Neuroeng Rehabil* 10, 48.

Jin, G.-H., Ye, J.H., Lee, T.S., Goo, Y.S., 2005. Electrical stimulation of isolated rabbit retina. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 6, 5967–5970.

Kolb, H., 1970. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 258, 261–283.

Kolb, H., 1979. The inner plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J. Neurocytol.* 8, 295–329.

Kolb, H., Famiglietti, E.V., 1974. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* 186, 47–49.

Kolb, H., Nelson, R., Ahnelt, P., Cuenca, N., 2001. Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog. Brain Res.* 131, 3–26.

Kolb, H., West, R.W., 1977. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J. Neurocytol.* 6, 155–170.

Kolb, H., Cuenca, N., Wang, H.-H., Dekorver, L., 1990. The synaptic organization of the dopaminergic amacrine cell in the cat retina. *J Neurocytol* 19, 343–366.

Kolb, H., 1995a. Circuitry for Rod Signals through the Retina, in: Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R. (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT).

Kolb, H., 1995b. Gross Anatomy of the Eye, in: Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R. (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT).

Kolb, H., 1995c. Photoreceptors, in: Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R. (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT).

Kuffler, S.W., 1953. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.* 16, 37–68.

Lacour, S.P., Fitzgerald, J.J., Lago, N., Tarte, E., McMahon, S., Fawcett, J., 2009. Long micro-channel electrode arrays: a novel type of regenerative peripheral nerve interface. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 17, 454–460.

Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–1351.

Lee, I.-S., Whang, C.-N., Park, J.-C., Lee, D.-H., Seo, W.-S., 2003. Biocompatibility and charge injection property of iridium film formed by ion beam assisted deposition. *Biomaterials* 24, 2225–2231.

Ludwig, K.A., Uram, J.D., Yang, J., Martin, D.C., Kipke, D.R., 2006. Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film. *J Neural Eng* 3, 59–70.

Luo, S.-C., Mohamed Ali, E., Tansil, N.C., Yu, H.-H., Gao, S., Kantchev, E.A.B., Ying, J.Y., 2008. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanobiointerfaces: thin, ultrasmooth, and functionalized PEDOT films with in vitro and in vivo biocompatibility. *Langmuir* 24, 8071–8077.

Luo, X., Weaver, C.L., Zhou, D.D., Greenberg, R., Cui, X.T., 2011. Highly stable carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for chronic neural stimulation. *Biomaterials* 32, 5551–5557.

Mahadevappa, M., Weiland, J.D., Yanai, D., Fine, I., Greenberg, R.J., Humayun, M.S., 2005. Perceptual thresholds and electrode impedance in three retinal prosthesis subjects. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 13, 201–206.

- Maher, M.P., Pine, J., Wright, J., Tai, Y.C., 1999. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *J. Neurosci. Methods* 87, 45–56.
- Marc, R.E., Jones, B.W., Watt, C.B., Strettoi, E., 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 22, 607–655.
- Mariani, A.P., 1985. Multiaxonal horizontal cells in the retina of the tree shrew, *Tupaia glis*. *J. Comp. Neurol.* 233, 553–563.
- Mariani, A.P., 1990. Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J. Comp. Neurol.* 301, 382–400.
- Masland, R.H., 2012. The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266–280.
- Massey, F., 1951. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *Journal of the American Statistical Association* 46, 68–78.
- Massey, S.C., 1990. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Progress in Retinal Research* 9, 399–425.
- McCreery, D., Pikov, V., Troyk, P.R., 2010. Neuronal loss due to prolonged controlled-current stimulation with chronically implanted microelectrodes in the cat cerebral cortex. *J Neural Eng* 7, 036005.
- Menger, N., Pow, D.V., Wässle, H., 1998. Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 401, 34–46.
- Menzler, J., Zeck, G., 2011. Network oscillations in rod-degenerated mouse retinas. *J. Neurosci.* 31, 2280–2291.
- Morimoto, T., Kamei, M., Nishida, Kentaro, Sakaguchi, H., Kanda, H., Ikuno, Y., Kishima, H., Maruo, T., Konoma, K., Ozawa, M., Nishida, Kohji, Fujikado, T., 2011. Chronic implantation of newly developed suprachoroidal-transretinal stimulation prosthesis in dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6785–6792.
- Morimoto, T., Miyoshi, T., Fujikado, T., Tano, Y., Fukuda, Y., 2002. Electrical stimulation enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Neuroreport* 13, 227–230.
- Nanduri, D., Fine, I., Horsager, A., Boynton, G.M., Humayun, M.S., Greenberg, R.J., Weiland, J.D., 2012. Frequency and amplitude modulation have different effects on the percepts elicited by retinal stimulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 205–214.
- Negi, S., Bhandari, R., Solzbacher, F., 2012. A novel technique for increasing charge injection capacity of neural electrodes for efficacious and safe neural stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2012, 5142–5145.
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802.

- Nelson, R., 1982. All amacrine cells quicken time course of rod signals in the cat retina. *J. Neurophysiol.* 47, 928–947.
- Nelson, R., Famiglietti, E.V., Jr, Kolb, H., 1978. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.* 41, 472–483.
- Nelson, R., Kolb, H., 1985. A17: a broad-field amacrine cell in the rod system of the cat retina. *J. Neurophysiol.* 54, 592–614.
- Nelson, R., 1995. Visual Responses of Ganglion Cells, in: Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R. (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT).
- Nelson, R., Connaughton, V., 1995. Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina, in: Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R. (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT).
- Newbold, C., Mergen, S., Richardson, R., Seligman, P., Millard, R., Cowan, R., Shepherd, R., 2013. Impedance changes in chronically implanted and stimulated cochlear implant electrodes. *Cochlear Implants Int.*
- Newbold, C., Richardson, R., Millard, R., Seligman, P., Cowan, R., Shepherd, R., 2011. Electrical stimulation causes rapid changes in electrode impedance of cell-covered electrodes. *J Neural Eng* 8, 036029.
- Newkirk, G.S., Hoon, M., Wong, R.O., Detwiler, P.B., 2013. Inhibitory inputs tune the light response properties of dopaminergic amacrine cells in mouse retina. *J. Neurophysiol.* 110, 536–552.
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., Nakanishi, S., 1994. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77, 361–369.
- Normann, R.A., Warren, D.J., Ammermuller, J., Fernandez, E., Guillory, S., 2001. High-resolution spatio-temporal mapping of visual pathways using multi-electrode arrays. *Vision Res.* 41, 1261–1275.
- Nyberg, T., Shimada, A., Torimitsu, K., 2007. Ion conducting polymer microelectrodes for interfacing with neural networks. *J. Neurosci. Methods* 160, 16–25.
- Ohta, J., Tokuda, T., Kagawa, K., Sugitani, S., Taniyama, M., Uehara, A., Terasawa, Y., Nakauchi, K., Fujikado, T., Tano, Y., 2007. Laboratory investigation of microelectronics-based stimulators for large-scale suprachoroidal transretinal stimulation (STS). *J Neural Eng* 4, 85–91.

- Oka, H., Shimono, K., Ogawa, R., Sugihara, H., Taketani, M., 1999. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *Journal of Neuroscience Methods* 93, 61–67.
- Opie, N.L., Burkitt, A.N., Meffin, H., Grayden, D.B., 2010. Thermal heating of a retinal prosthesis: thermal model and in-vitro study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010, 1597–1600.
- Østerberg, G., 1935. Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthal. suppl.* 6, 1-103.
- Parmeggiani, F., 2011. Clinics, epidemiology and genetics of retinitis pigmentosa. *Curr. Genomics* 12, 236–237.
- Peichl, L., Buhl, E.H., Boycott, B.B., 1987. Alpha ganglion cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 263, 25–41.
- Pham, P., Roux, S., Matonti, F., Dupont, F., Agache, V., Chavane, F., 2013. Post-implantation impedance spectroscopy of subretinal micro-electrode arrays, OCT imaging and numerical simulation: towards a more precise neuroprosthesis monitoring tool. *J Neural Eng* 10, 046002.
- Pine, J., 1980. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* 2, 19–31.
- Potts, A.M., Inoue, J., 1969. The electrically evoked response (EER) of the visual system. II. Effect of adaptation and retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol* 8, 605–612.
- Pourcho, R.G., 1996. Neurotransmitters in the retina. *Curr. Eye Res.* 15, 797–803.
- Rizzo, J.F., 3rd, Wyatt, J., Loewenstein, J., Kelly, S., Shire, D., 2003a. Methods and perceptual thresholds for short-term electrical stimulation of human retina with microelectrode arrays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5355–5361.
- Rizzo, J.F., 3rd, Wyatt, J., Loewenstein, J., Kelly, S., Shire, D., 2003b. Perceptual efficacy of electrical stimulation of human retina with a microelectrode array during short-term surgical trials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5362–5369.
- Robblee, L.S., Lefko, J.L., Brummer, S.B., 1983. Activated Ir: An Electrode Suitable for Reversible Charge Injection in Saline Solution. *J. Electrochem. Soc.* 130, 731–733.
- Rockhill, R.L., Daly, F.J., MacNeil, M.A., Brown, S.P., Masland, R.H., 2002. The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *J. Neurosci.* 22, 3831–3843.

- Roessler, G., Laube, T., Brockmann, C., Kirschkamp, T., Mazinani, B., Menzel-Severing, J., Bornfeld, N., Walter, P., EPIRET Group, 2011. Angiographic findings following tack fixation of a wireless epiretinal retina implant device in blind RP patients. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249, 1281–1286.
- Roig-Melo, E.A., Afaro, D.V., 3rd, Heredia-Elizondo, M.L., Yarbrough, L.M., Game, A.B., Apple, D.J., Quirol, H.M., 2000. Macular translocation: histopathologic findings in swine eyes. *Eur J Ophthalmol* 10, 297–303.
- Rose, T.L., Robblee, L.S., 1990. Electrical stimulation with Pt electrodes. VIII. Electrochemically safe charge injection limits with 0.2 ms pulses. *IEEE Trans Biomed Eng* 37, 1118–1120.
- Schloesser, M., Cota, O., Heil, R., Brusius, J., Offenhausser, A, Waasen, S.V., Schiek, M., 2013. Embedded device for simultaneous recording and stimulation for retina implant research. *SENSORS, 2013 IEEE* , vol., no., pp.1,4, 3-6 Nov. 2013
- Schmidt, E.M., Bak, M.J., Hambrecht, F.T., Kufta, C.V., O'Rourke, D.K., Vallabhanath, P., 1996. Feasibility of a visual prosthesis for the blind based on intracortical microstimulation of the visual cortex. *Brain* 119 (Pt 2), 507–522.
- Sekirnjak, C., Hottowy, P., Sher, A., Dabrowski, W., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2006. Electrical stimulation of mammalian retinal ganglion cells with multielectrode arrays. *J. Neurophysiol.* 95, 3311–3327.
- Sekirnjak, C., Hottowy, P., Sher, A., Dabrowski, W., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2008. High-resolution electrical stimulation of primate retina for epiretinal implant design. *J. Neurosci.* 28, 4446–4456.
- Sekirnjak, C., Hulse, C., Jepson, L.H., Hottowy, P., Sher, A., Dabrowski, W., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2009. Loss of responses to visual but not electrical stimulation in ganglion cells of rats with severe photoreceptor degeneration. *J. Neurophysiol.* 102, 3260–3269.
- Sekirnjak, C., Jepson, L.H., Hottowy, P., Sher, A., Dabrowski, W., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2011. Changes in physiological properties of rat ganglion cells during retinal degeneration. *J. Neurophysiol.* 105, 2560–2571.
- Shivdasani, M.N., Luu, C.D., Cicione, R., Fallon, J.B., Allen, P.J., Leuenberger, J., Suaning, G.J., Lovell, N.H., Shepherd, R.K., Williams, C.E., 2010. Evaluation of stimulus parameters and electrode geometry for an effective suprachoroidal retinal prosthesis. *J Neural Eng* 7, 036008 (11p).
- Slaughter, M.M., Miller, R.F., 1983. An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. *Science* 219, 1230–1232.
- Sooksood, K., Stieglitz, T., Ortmanns, M., 2009. Recent advances in charge balancing for functional electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009, 5518–5521.

Stern, O., 1924. Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* 30, 508–516.

Stett A., Mai A., Herrmann T., 2007. Retinal charge sensitivity and spatial discrimination obtainable by subretinal implants: key lessons learned from isolated chicken retina. *J Neural Eng.* 4 (1), 7-16.

Steven, M.S., Hansen, P.C., Blakemore, C., 2006. Activation of color-selective areas of the visual cortex in a blind synesthete. *Cortex* 42, 304–308.

Strumwasser, F., 1958. Long-term recording' from single neurons in brain of unrestrained mammals. *Science* 127, 469–470.

Sutton, A.C., Yu, W., Calos, M.E., Mueller, L.E., Berk, M., Shim, J., Molho, E.S., Brotchie, J.M., Carlen, P.L., Shin, D.S., 2013. Elevated potassium provides an ionic mechanism for deep brain stimulation in the hemiparkinsonian rat. *Eur. J. Neurosci.* 37, 231–241.

Tassicker, G.E., 1956. Retinal Stimulator. U.S. Patent No. 2,760,483.

Taylor, W.R., Smith, R.G., 2011. Trigger features and excitation in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 672–678.

Vaney, D.I., 1994. Patterns of neuronal coupling in the retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 13, 301–355.

Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., Sterling, P., 2000. Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J. Comp. Neurol.* 423, 402–412.

Varela, C., Igartua, I., De la Rosa, E.J., De la Villa, P., 2003. Functional modifications in rod bipolar cells in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Vision Res.* 43, 879–885.

Venkatraman, S., Hendricks, J., King, Z.A., Sereno, A.J., Richardson-Burns, S., Martin, D., Carmena, J.M., 2011. In vitro and in vivo evaluation of PEDOT microelectrodes for neural stimulation and recording. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 19, 307–316.

Veraart, C., Raftopoulos, C., Mortimer, J.T., Delbeke, J., Pins, D., Michaux, G., Vanlierde, A., Parrini, S., Wanet-Defalque, M.C., 1998. Visual sensations produced by optic nerve stimulation using an implanted self-sizing spiral cuff electrode. *Brain Res.* 813, 181–186.

Veraart, C., Wanet-Defalque, M.-C., Gérard, B., Vanlierde, A., Delbeke, J., 2003. Pattern recognition with the optic nerve visual prosthesis. *Artif Organs* 27, 996–1004.

Villalobos, J., Nayagam, D.A.X., Allen, P.J., McKelvie, P., Luu, C.D., Ayton, L.N., Freemantle, A.L., McPhedran, M., Basa, M., McGowan, C.C., Shepherd, R.K., Williams, C.E., 2013. A wide-field suprachoroidal retinal prosthesis is stable and well tolerated following chronic implantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 3751–3762.

- Walter, P., Szurman, P., Vobig, M., Berk, H., Lüdtke-Handjery, H.C., Richter, H., Mittermayer, C., Heimann, K., Sellhaus, B., 1999. Successful long-term implantation of electrically inactive epiretinal microelectrode arrays in rabbits. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 19, 546–552.
- Ward, M.P., Rajdev, P., Ellison, C., Irazoqui, P.P., 2009. Toward a comparison of microelectrodes for acute and chronic recordings. *Brain Res.* 1282, 183–200.
- Wässle, H., 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 747–757.
- Weiland, J.D., Anderson, D.J., Humayun, M.S., 2002. In vitro electrical properties for iridium oxide versus titanium nitride stimulating electrodes. *IEEE Trans Biomed Eng* 49, 1574–1579.
- Weiland, J.D., Liu, W., Humayun, M.S., 2005. Retinal prosthesis. *Annu Rev Biomed Eng* 7, 361–401.
- Wiesel, T.N., 1959. Recording inhibition and excitation in the cat's retinal ganglion cells with intracellular electrodes. *Nature* 183, 264–265.
- Wilks, S.J., Richardson-Burns, S.M., Hendricks, J.L., Martin, D.C., Otto, K.J., 2009. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as a Micro-Neural Interface Material for Electrostimulation. *Front Neuroeng* 2, 7.
- Wise, K.D., Angell, J.B., Starr, A., 1970. An integrated-circuit approach to extracellular microelectrodes. *IEEE Trans Biomed Eng* 17, 238–247.
- Wolbarsht, M.L., Macnichol, E.F., Jr, Wagner, H.G., 1960. Glass Insulated Platinum Microelectrode. *Science* 132, 1309–1310.
- Woolley, A.J., Desai, H.A., Otto, K.J., 2013. Chronic intracortical microelectrode arrays induce non-uniform, depth-related tissue responses. *J Neural Eng* 10, 026007.
- Wyatt, H.J., Day, N.W., 1976. Specific effects of neurotransmitter antagonists on ganglion cells in rabbit retina. *Science* 191, 204–205.
- Xiao, Y., Martin, D.C., Cui, X., Shenai, M., 2006. Surface modification of neural probes with conducting polymer poly(hydroxymethylated-3,4- ethylenedioxythiophene) and its biocompatibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128, 117–130.
- Yamada, E., Ishikawa, T., 1965. The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinæ. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 30, 383–392.
- Yang, X.L., Wu, S.M., 1989. Effects of CNQX, APB, PDA, and kynurenate on horizontal cells of the tiger salamander retina. *Vis. Neurosci.* 3, 207–212.
- Ye, J.H., Goo, Y.S., 2007. Comparison of voltage parameters for the stimulation of normal and degenerate retina. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007, 5783–5786.
- Zrenner, E., 2002. Will retinal implants restore vision? *Science* 295, 1022–1025.

Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., Benav, H., Besch, D., Bruckmann, A., Gabel, V.-P., Gekeler, F., Greppmaier, U., Harscher, A., Kibbel, S., Koch, J., Kusnyerik, A., Peters, T., Stingl, K., Sachs, H., Stett, A., Szurman, P., Wilhelm, B., Wilke, R., 2011. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc. Biol. Sci.* 278, 1489–1497.

Bildnachweis

Abb. 1: Talos, 2008 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eye_scheme.svg

Stand: Juli 2013

Abb. 2: Hartmann P., 2007 <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retina.jpg>

Stand: Juli 2013

Abb. 5: Both J., 2011 <http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Doppelschicht-Potentialverteilung.png>

Stand: Juli 2013

Abb. 22: Hartmann P., 2007 <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retina.jpg>

Stand: Juli 2013

Danksagung

Dank geht an:

Prof. Andreas Offenhäusser für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen sowie seinen unerschütterlichen Glauben an das Gelingen.

Prof. Hermann Wagner für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten und den Kontakt zum Fachbereich Biologie der RWTH Aachen.

Prof. Frank Müller, Benjamin Usai, Sonia Biswas. Für die Hilfe bei allen Fragen zur Retina, für die Vermittlung der Präparationsmethode, die Anregungen zum Versuchsaufbau und die theoretischen Überlegungen bei der Entwicklung der penetrierenden MEAs.

Michael Schiek, Mario Schlösser und Oscar Cota Fernando Monjarás für die Planung und theoretischen Überlegungen, die technische Umsetzung und den Aufbau des Stimulators. **Roger Heil** für weitere technische Hinweise. **Michael Schiek** möchte ich zusätzlich für die Kommentare zur Rohfassung dieser Arbeit danken.

Susanne Bippus, Tina Breuer und Rita Fricke für jegliche organisatorische Unterstützung im und außerhalb des Labors sowie motivierende Worte zur richtigen Zeit.

Herbert Bousack, Simone Meffert, Dirk Meyer, Bernhard Wolfrum, Michael Pabst, Wolfgang Schwippert für viele wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen.

Dieter Strobl und allen Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt des PGI-8 für die großartige Arbeit beim Anfertigen der mechanischen Teile des Versuchsaufbaus.

Den Mitarbeiterinnen des Tierhauses des Forschungszentrums Jülich: **Tanja Jurascheck, Steffi Holz** und **Larissa Damm** für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe mit den Versuchstieren.

Stefan Lück für die Anfertigung der MEA-Teststrukturen, mit denen die initialen Penetrationsversuche durchgeführt wurden.

Den anderen Doktoranden innerhalb des BiMEA-Projektes für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit: **Stephan Hesse, , Abdel Marzouk, Nadine Winkin**

Petra Schulte für die Betreuung über Institutsgrenzen hinweg, sowie für die vielen hilfreichen Kommentare zu diesem Manuskript.

Elke Brauweiler-Reuters für das gemeinsame Anfertigen der REM-Bilder.

Marco Banzet und **Michael Prömpers** für die Hilfe bei technischen Fragen.

Francesca Santoro für die Unterstützung bei den PEDOT-Depositionen.

Dieter Lomparski für die Hilfe bei computertechnischen Fragen.

Manuel Wesche für die Erweiterung des Horizontes in medizinischen Fragen.

Vanessa Maybeck für eine zweite Meinung aus der Sicht einer Biologin.

Boris Hofmann und **Stefan Eick** für die gute Mentorenschaft, die das Einleben im Institut enorm erleichterte.

Philipp Rinklin für die Unterstützung bei der Anfertigung der PDMS-Unterlagen.

Soshi und **Simon**, meinen zeitweisen Bürokollegen für die gute Nachbarschaft.

Marieke Kötting für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Enno Kätelhön für die Beantwortung von Spezialfragen zur Matlab-Programmierung und Physik.

Martin Hüske für unzählige Kommentare zu physikalischen Sachverhalten, für die Einführung in Matlab und für die gemeinsame Zeit.

Meiner **Familie** für die Unterstützung in den letzten Jahren.

Ganz besonders **Steffi** dafür, mich über die langen Durststrecken der vergangenen Jahre getragen und ertragen zu haben.

In memoriam: **Kristin E. Michael**.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich, dass ich diesen Promotionsantrag erstmalig einreiche und keine früheren Versuche einer Promotion unternommen habe. Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe. Ich erkläre, dass durch die Veröffentlichung als Dissertation der RWTH Aachen bestehende Schutzrechte - insbesondere Urheberrechte - nicht verletzt werden.

Janis Sebastian Brusius