



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Robert Huber

# **Speckle basiertes Monitoring für Laserbehandlungen des Auges**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Katharina Bliedtner**  
aus Jena

angefertigt an der Medizinischen Laserzentrum Lübeck GmbH

Lübeck, 2026



1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2026  
Zum Druck genehmigt: 09.03.2026



# Zusammenfassung

**Motivation:** In Deutschland sind die häufigsten Ursachen für Blindheit und schwere Sehbehinderung altersbedingte Makuladegeneration, gefolgt von Glaukom und diabetischer Retinopathie. In den nächsten Jahren wird weltweit ein weiterer Anstieg der Patientenzahlen erwartet. Die aktuellen primären Behandlungsmöglichkeiten sind meist medikamentös, je nach Krankheit in der Form von wiederholten intravitrealen Injektionen oder der konstanten Einnahme von Augentropfen. Beides erfordert eine gute Compliance der Patienten und kann eine Belastung für die Betroffenen, aber auch für das Gesundheitssystem darstellen. Obwohl beide Krankheiten sehr verschiedene Bereiche des Auges betreffen und sich durch eine unterschiedliche Pathogenese auszeichnen, bietet eine Lasertherapie gleichwohl eine alternative Therapiestrategie. Auch wenn der Laser schon lange Anwendung in der Ophthalmologie findet, konnte er sich bisher für viele Erkrankungen nicht als Primärbehandlung durchsetzen. Eine präzise Dosiskontrolle könnte jedoch dazu beitragen die Lasertherapie als wirksame Behandlungsmethode voranzutreiben. Trotz vieler Innovationen der letzten Jahre ist eine objektive Dosiskontrolle unabdingbar, da das Ausmaß des laserinduzierten Schadens nicht vorhersagbar ist und ein sofortiger Beweis für die erfolgreiche Bestrahlung fehlt. Mit einer automatisierten Überwachung der applizierten Dosis könnten gezielt erkrankte Gewebe behandelt werden, während Gesundes geschont wird. Dadurch könnten potenzielle Risiken und Komplikationen minimiert und die Wirksamkeit der Lasertherapie erhöht werden, was zu einer verbesserten Primärbehandlung führen könnte. In dieser Arbeit wurden specklebasierte Monitoringmethoden für zwei verschiedene Laserbehandlungen im Kammerwinkel und am Fundus auf ihr Potenzial zur Dosiskontrolle untersucht.

**Dosiskontrolle im Kammerwinkel:** Die selektive Lasertrabekuloplastik gilt als schonende Behandlungsoption bei Erkrankungsformen des Glaukoms und hat das Potenzial, Medikamente als primäre Behandlung abzulösen. Durch die Bestrahlung des Trabekelmaschenwerkes im Kammerwinkel des Auges mit einem gepulsten Laser kann durch selektive Schädigung pigmentierter Zellen ein verbesserter Abfluss des Kammerwassers initiiert werden, ohne dabei die Struktur des Kammerwinkelgewebes zu beeinträchtigen. Der optimierte Kammerwasserabfluss hat eine Reduktion des Augeninnendrucks zur Folge, dem Hauptziel bei der Glaukomtherapie.

Zur Überwachung der gezielten Schädigung der Trabekelwerkzellen, deren Ursachen die Entstehung von Mikroblasen ist, wurde in dieser Arbeit ein specklebasiertes Monitoring untersucht, um diese Blasen effektiv zu detektieren. Dafür wurde das Trabekelwerk von enukleierten Schweineaugen mit einer Reihe von 15 Pulsen mit je  $1,7 \mu\text{s}$  Pulsdauer und ansteigender Energie bei einer Wiederholrate von 100 Hz bestrahlt. Die zurückgestreute Strahlung des Behandlungslasers wurde während der Exposition mit einer schnellen Photodiode aufgezeichnet und auf mikroblaseninduzierte Signalveränderungen untersucht. Neben der optischen wurde auch eine akustische Monitoringmethode implementiert. Beide Beobachtungsmethoden können die Bildung von Mikroblasen, mit einer Blasenbildungsschwelle von  $(310 \pm 14) \text{ mJ/cm}^2$ , in Echtzeit nachweisen. Durch Kombination beider Methoden wurde eine Sensitivität und Spezifität von je 0,96 erreicht.

Falls mit diesen Mikroblasen bereits die therapeutisch geforderte Druckreduzierung erreicht wird,

was noch klinisch nachgewiesen werden muss, können die hier vorgestellten Methoden in einer automatischen Rückkopplungsschleife zur Steuerung der Laserbestrahlung eingesetzt werden. Dies entlastet die Ärzte von jeglicher Dosierung während der selektiven Lasertrabekuloplastik.

**Dosiskontrolle am Fundus:** Die Photokoagulation bietet eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten bei diversen retinalen Erkrankungen. Ein einheitlicher Behandlungserfolg mit konstanten laserinduzierten Schäden ist aufgrund intra- und inter-individuellen Schwankungen der okularen Transmission, der Lichtstreuung und vor allem der retinalen Absorption nicht möglich. Ein Echtzeit-Monitoring der Läsionsstärke ist daher notwendig.

In dieser Arbeit wurde für die Erwärmung und Koagulation der Retina von enukleierten Schweineaugen *ex-vivo* und Kaninchenaugen *in-vivo* ein 532 nm Dauerstrich Nd:YAG-Laser genutzt. Der aufgeheizte Bereich wurde während der Bestrahlung zusätzlich großflächig, kohärent bei 633 nm oder 855 nm ausgeleuchtet. Die sich bei einer Abbildung der Retina ergebenden Specklemuster wurden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Durch die Analyse dieser zeitlicher Veränderungen der Specklemuster konnten mit verschiedenen Algorithmen thermoelastische von koagulativen Prozessen unterschieden werden und eine Schädigung von RPE-Zellen mit hoher Genauigkeit, unabhängig von Bestrahlungsdauer (50 ms – 500 ms) und Fleckdurchmesser (50  $\mu\text{m}$  – 200  $\mu\text{m}$ ), vorhergesagt werden. *In-vivo* konnten trotz des starken Einflusses von Atmung und Herzschlag temperaturinduzierte Specklebewegungen detektiert werden, die allerdings mit den *ex-vivo* gefundenen Algorithmen nicht zur Quantifizierung des erzielten Schadens genutzt werden konnten. Daher wurde ein flaches Faltungsnetzwerk trainiert, das eine hohe Präzision von über 99 % bei der Unterscheidung verschiedener Sichtbarkeitsklassen *in-vivo* zeigt. Das Netzwerk wurde nur auf einem kleinen Datensatz trainiert und ist in dieser Form wahrscheinlich nicht generalisierbar, zeigt aber das grundsätzliche Potenzial dieser Methode auch *in-vivo*, trotz nicht vermeidbarer Störeinflüssen, Koagulationsprozesse beurteilen zu können.

**Fazit:** Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse demonstrieren ein Therapiemonitoring, das mit geringem technischen Aufwand die selektive Lasertrabekuloplastik noch schonender und zuverlässiger machen könnte und gleichzeitig die Behandlung für den Arzt erleichtert.

Die grundlegenden Experimente dieser Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass eine Analyse von Intensitätsänderungen der Speckle bei der Abbildung der bestrahlten Fläche Prozesse während der Photokoagulation der Retina detektieren kann, die gut mit den Beobachtungen des komplexeren Bildgebungssystems der optische Kohärenztomografie übereinstimmen. Allerdings stellen Blutfluss, Atmung und eventuell weitere physiologische Prozesse eine Problematik für die hier gezeigte Methode dar, da sie zusätzliche Speckleänderungen verursachen, die bislang nur schwer von den laserinduzierten Signalen zu trennen waren. Diese muss in den nächsten Schritten gelöst werden, eventuell durch Hardwareoptimierungen, wie einer angepassten Detektionsgeometrie oder durch Aufnahme weitere Daten zur Optimierung der Algorithmen, um eine klinische Relevanz dieser Technik zu gewährleisten.

# Abstract

**Motivation:** In Germany, the most common causes of blindness and severe visual impairment are age-related macular degeneration, followed by glaucoma and diabetic retinopathy. In the coming years, a further increase in the number of patients is expected worldwide. Current primary treatment options are mostly pharmacological, depending on the disease, in the form of repeated intravitreal injections or the constant use of eye drops. Both require good patient compliance and can be a burden for the affected individuals as well as for the healthcare system. Although these diseases affect very different parts of the eye and are characterized by distinct pathogeneses, laser therapy offers an alternative treatment strategy. While lasers have been used in ophthalmology for many years, they have yet to establish themselves as a primary treatment option for many conditions. However, precise dose control could help advance laser therapy as an effective treatment method. Despite many innovations in recent years, objective dose control remains indispensable, as the extent of laser-induced damage is unpredictable and there is no immediate confirmation of successful irradiation. With automated monitoring of the applied dose, diseased tissues could be targeted more precisely while sparing healthy tissue. This could minimize potential risks and complications, enhance the efficacy of laser therapy, and lead to improved primary treatment options. In this study, speckle-based monitoring methods for two different laser treatments in the anterior chamber angle and the retina were investigated for their potential in dose control.

**Dose Control in the Anterior Chamber Angle:** Selective laser trabeculoplasty is considered a gentle treatment option for certain types of glaucoma and has the potential to replace medication as a primary treatment. By irradiating the trabecular meshwork in the anterior chamber angle of the eye with a pulsed laser, selective damage to pigmented cells can be induced, initiating improved aqueous humor outflow without affecting the structure of the chamber angle tissue. The optimized outflow of aqueous humor results in a reduction of intraocular pressure, which is the main goal in glaucoma therapy.

To monitor the induced damage to trabecular meshwork cells, which is caused by the formation of microbubbles, a speckle-based monitoring method was investigated in this work to effectively detect these bubbles. For this purpose, the trabecular meshwork of enucleated porcine eyes was irradiated with a series of 15 pulses, each with a pulse duration of  $1.7\ \mu\text{s}$  and increasing energy, at a repetition rate of 100 Hz. The backscattered radiation of the treatment laser was recorded during exposure using a fast photodiode and analyzed for signal changes induced by microbubbles. In addition to this optical method, an acoustic monitoring method was also implemented. Both observation methods can detect the formation of microbubbles in real time, with a bubble formation threshold of  $(310 \pm 14)\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ . By combining both methods, a sensitivity and specificity of 0.96 were achieved.

If these microbubbles already achieve the therapeutically required pressure reduction, which still needs to be clinically verified, the methods presented here could be used in an automatic feedback loop to control the laser irradiation. This would relieve physicians of any dosing responsibilities during selective laser trabeculoplasty.

**Dose Control on the Fundus:** Photocoagulation offers a wide range of applications for various retinal diseases. However, achieving consistent treatment success with uniform laser-induced damage is not possible due to intra- and inter-individual variations in ocular transmission, light scattering, and especially retinal absorption. Real-time monitoring of lesion strength is therefore essential.

In this work, a 532 nm continuous-wave Nd:YAG laser was used for heating and coagulating the retinas of enucleated porcine eyes (*ex-vivo*) and rabbit eyes (*in-vivo*). The heated region was additionally illuminated coherently over a large area at 633 nm or 855 nm during irradiation. The resulting speckle patterns from imaging the retina were recorded using a high-speed camera. By analyzing the temporal changes in the speckle patterns, thermoelastic processes could be distinguished from coagulative processes using various algorithms, and damage to RPE cells could be predicted with high accuracy, independent of irradiation duration (50 ms – 500 ms) and spot diameter (50  $\mu\text{m}$  – 200  $\mu\text{m}$ ).

*In-vivo*, despite the strong influence of breathing and heartbeat, temperature-induced speckle movements were detected. However, these could not be used to quantify the damage achieved with the algorithms developed *ex-vivo*. Therefore, a shallow convolutional neural network was trained, which achieved a high precision of over 99 % in distinguishing between different visibility classes *in vivo*. Although the network was trained on a small dataset and is likely not generalizable in its current form, it demonstrates the fundamental potential of this method to assess coagulation processes *in-vivo*, despite unavoidable disturbances.

**Conclusion:** The results presented in this work demonstrate a therapy monitoring approach that, with minimal technical effort, could make selective laser trabeculoplasty even gentler and more reliable while simultaneously simplifying the treatment process for physicians.

The fundamental experiments of this investigation have also shown that an analysis of intensity changes in the speckle patterns when imaging the irradiated area can detect processes during retinal photocoagulation that align well with the observations made by the more complex imaging system of optical coherence tomography. However, blood flow, respiration, and potentially other physiological processes pose a challenge for the method presented here, as they induce additional speckle changes that have so far been difficult to separate from the laser-induced signals. This problem needs to be addressed in the next steps, possibly through hardware optimizations, such as adjusting the detection geometry, or by collecting additional data to optimize the algorithms in order to ensure the clinical relevance of this technique.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen . . . . .	v
Symbole . . . . .	vi
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Das Auge . . . . .	5
2.1.1 Vordere Kammer . . . . .	6
2.1.2 Retina . . . . .	7
2.1.3 Retinales Pigmentepithel . . . . .	8
2.2 Krankheitsbilder des Augenhintergrundes . . . . .	10
2.2.1 Altersbedingte Makuladegeneration . . . . .	10
2.2.2 Diabetische Retinopathie . . . . .	11
2.2.3 Glaukom . . . . .	12
2.3 Laseranwendungen am Auge . . . . .	13
2.3.1 Wirkung von Laserstrahlung auf okuläre Medien . . . . .	13
2.3.1.1 Zeitabhängigkeit bei thermischer Gewebeschädigung . . . . .	15
2.3.1.2 Modellierung der Wärmeleitung im Gewebe . . . . .	16
2.3.2 Photokoagulation (PK) . . . . .	17
2.3.3 Selektive Retina Therapie (SRT) . . . . .	19
2.3.4 Argonlaser Trabekuloplastik (ALT) . . . . .	20
2.3.5 Selektive Lasertrabekuloplastik (SLT) . . . . .	21
2.4 Monitoringmethoden . . . . .	23
2.4.1 Optoakustische Temperaturmessung während der Photokoagulation . . . . .	23
2.4.1.1 Messung der Temperatur . . . . .	24
2.4.2 OCT während der Photokoagulation . . . . .	25
2.4.3 Monitoring während der SRT . . . . .	29
2.4.3.1 Optoakustik . . . . .	29
2.4.3.2 Lichtreflexion . . . . .	30
2.4.3.3 Interferometrie . . . . .	31
2.4.3.4 OCT . . . . .	32
<b>3 Motivation dieser Arbeit</b>	<b>33</b>
3.1 Monitoring im Kammerwinkel . . . . .	33
3.2 Monitoring am Fundus . . . . .	34
<b>4 Dynamische Speckle</b>	<b>37</b>
4.1 Allgemeiner Hintergrund . . . . .	37
4.1.1 Intensitätsverteilung - Statistiken erster Ordnung . . . . .	37
4.1.1.1 Summe zweier unabhängiger Specklemuster . . . . .	39
4.1.2 Räumliche Ausdehnung der Speckle - Statistik zweiter Ordnung . . . . .	40

4.1.3	Simulation von Specklemustern . . . . .	42
4.1.3.1	Kohärente Abbildung . . . . .	42
4.1.3.2	Simulation kohärenter Abbildung mit Speckle . . . . .	44
4.1.3.3	Aberrationen . . . . .	45
4.1.3.3.1	Fokusfehler . . . . .	46
4.2	Specklemesstechnik . . . . .	47
4.2.1	Specklefotografie . . . . .	47
4.2.2	Berechnung der Speckleänderung bei Bewegung und Änderung des Objektes . . . . .	47
4.2.2.1	Objekttranslation in der Objektebene (in-plane) . . . . .	47
4.2.2.2	Objektrotation aus der Objektebene heraus . . . . .	49
4.2.2.3	Speckledekorrelation in biologischen Proben . . . . .	53
4.2.2.4	Dynamische Speckle während der Photokoagulation . . . . .	53
4.2.2.5	Speckleänderung durch Mikroblasen . . . . .	54
4.3	Darstellung und Analyse dynamischer Speckle . . . . .	56
4.3.1	Vektorkarten . . . . .	56
4.3.2	Zeitverlaufs-Specklemuster . . . . .	57
4.3.3	Aktivitätskarten . . . . .	57
4.3.4	Analyse mittels Convolutional Neural Network . . . . .	60
4.3.4.1	Multilayer Perzeptron (MLP) . . . . .	60
4.3.4.2	Convolutional Neural Network (CNN) . . . . .	61
4.3.4.3	Grad-CAM Methode . . . . .	62
<b>5</b>	<b>Monitoring im Kammerwinkel</b>	<b>63</b>
5.1	Hintergründe . . . . .	63
5.2	Aufbau . . . . .	65
5.2.1	Optische Detektion . . . . .	65
5.2.2	Akustische Detektion . . . . .	66
5.3	<i>Ex-vivo</i> Experimente und Klassifizierung . . . . .	68
5.4	Detektion-Algorithmen . . . . .	69
5.4.1	Auswertung der optischen Signale . . . . .	69
5.4.2	Auswertung der akustischen Signale . . . . .	71
5.5	Ergebnisse . . . . .	73
5.5.1	Vergleich zur SRT . . . . .	73
5.5.2	Übersicht des Datensatzes . . . . .	74
5.5.3	MB Beobachtungen . . . . .	75
5.5.4	Auswertung der optischen Signale . . . . .	75
5.5.5	Auswertung der akustischen Signale . . . . .	76
5.5.6	Statistische Analyse und Vergleich der Detektionsmethoden . . . . .	77
5.5.6.1	Auswertung aller Einzelpulse . . . . .	77
5.5.6.2	Auswertung von Pulsfolgen . . . . .	78
5.6	Diskussion . . . . .	79
5.6.1	SLT mit Mikrosekundenpulsen und Energierampe . . . . .	79
5.6.2	Optische Detektion von Mikroblasen . . . . .	80
5.6.3	Akustische Detektion von Mikroblasen . . . . .	81
5.6.4	Vergleich beider Methoden . . . . .	81
5.6.5	Therapeutisches Fenster . . . . .	83
5.6.6	Auf dem Weg zu einem Feedback-System . . . . .	83
5.7	Fazit . . . . .	84

<b>6</b>	<b>Monitoring am Fundus</b>	<b>85</b>
6.1	Aufbau	85
6.1.1	Datenaufnahme	86
6.1.2	Simultane optoakustische Temperaturmessung	88
6.1.3	Vereinfachter Aufbau zur Untersuchung des Einflusses des Defokus	90
6.2	Übersicht der Experimente	90
6.2.1	<i>Ex-vivo</i> Modell	90
6.2.2	<i>In-vivo</i> Modell	92
6.3	Modell zur Simulation von Specklebewegungen während der Photokoagulation	94
6.3.1	Definition des Abbildungssystems und des Objektes	94
6.3.2	Definition der Bewegung und Gewebeveränderung	95
6.3.3	Propagation durch das definierte System	97
6.3.4	Detektion der Specklemuster in der Fourierebene der Linse	99
6.4	Analyse der Specklebewegungen	99
6.4.1	Vorverarbeitung	99
6.4.2	Bewegungskorrektur	100
6.4.3	Zeitverlauf	101
6.4.3.1	Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster ( $S_{ZSM}$ )	101
6.4.3.2	Generalisierte Differenzen ( $S_{GD}$ )	102
6.4.3.3	Vektorkarten ( $S_{VK}$ )	103
6.4.4	Merkmalsextraktion	103
6.4.4.1	Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlaufs-Specklemuster	103
6.4.4.2	Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlauf	104
6.4.5	Parameteroptimierung	105
6.4.6	Analyse mittels Convolutional Neural Network	108
6.4.6.1	Eingangsdaten	108
6.4.6.2	Transfer Learning	109
6.4.6.3	Flaches Netz für Aktivitätskarten	109
6.5	Ergebnisse	111
6.5.1	<i>Ex-vivo</i> Messreihen an Schweineaugen	111
6.5.1.1	Einfluss des Beleuchtungslasers auf die Zellvitalität	111
6.5.1.2	Analyse temperaturbedingter Specklebewegungen	111
6.5.1.3	Korrelation von Specklebewegung und Temperatur	114
6.5.1.4	Defokus und axiale Bewegung	116
6.5.1.5	Optimierung der Algorithmen und deren Parameter	117
6.5.1.5.1	Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster (ZSM-Algorithmus)	118
6.5.1.5.2	Generalisierte Differenzen (GD-Algorithmus)	121
6.5.1.5.3	Vektorkarten (VK-Algorithmus)	122
6.5.1.5.4	Vergleich der Algorithmen	123
6.5.1.5.5	Analyse der falsch Kategorisierten	123
6.5.1.5.6	Vergleich mit manueller Kategorisierung	125
6.5.1.6	Abhängigkeit von Bestrahlungsparametern	126
6.5.1.6.1	Bestrahlungsdauer und Fleckgröße	127
6.5.1.6.2	Apertur	128
6.5.1.6.3	Wellenlänge	129
6.5.2	<i>In-vivo</i> Messreihen an Kaninchenaugen	132
6.5.2.1	Beleuchtung bei 855 nm	132
6.5.2.2	Beleuchtung bei 633 nm	133
6.5.2.3	Analyse mittels Faltungsnetzwerken	137
6.5.2.3.1	Transfer Learning	137

6.5.2.3.2	Flaches Netz für Aktivitätskarten . . . . .	137
6.6	Diskussion . . . . .	143
6.6.1	Aufbau . . . . .	143
6.6.2	Korrelation der Specklebewegung und der Temperatur . . . . .	144
6.6.3	Optimierung der Algorithmenparameter . . . . .	145
6.6.4	Einfluss der Bestrahlungsparameter . . . . .	146
6.6.4.1	Bestrahlungsdauer und Fleckgröße . . . . .	146
6.6.4.2	Wahl der Blendengröße / Specklegröße . . . . .	146
6.6.4.3	Wahl der Wellenlänge . . . . .	147
6.6.5	<i>In-vivo</i> Messreihen . . . . .	148
6.6.6	Vergleich mit OCT-basierten Monitoring . . . . .	149
6.6.6.1	<i>Ex-vivo</i> . . . . .	149
6.6.6.2	<i>In-vivo</i> . . . . .	150
6.6.7	Defokus und axiale Bewegung . . . . .	151
6.6.8	Echtzeitfähigkeit . . . . .	152
6.7	Fazit . . . . .	153
<b>7</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>155</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>157</b>
	<b>Appendix</b>	<b>A169</b>
A1	Speckle basiertes Monitoring der Photokoagulation . . . . .	A169
A1.1	Optimierung der Algorithmen und deren Parameter . . . . .	A169
A1.1.1	Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster (ZSM-Algorithmus) . . . . .	A169
A1.1.2	Generalisierte Differenzen (GD-Algorithmus) . . . . .	A171
A1.1.3	Vektorkarten (VK-Algorithmus) . . . . .	A173
A1.2	Flaches Netz für Aktivitätskarten . . . . .	A175
A1.3	Convolutional Neuronal Network für <i>ex-vivo</i> Messreihen . . . . .	A175
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

## Abkürzungen

μB	Mikroblase
a.u.	willkürlich Einheit (engl.: arbitrary unit)
AGEs	glykierte Reaktionsprodukte (engl.: advanced glycation end products)
ALT	Argon Laser Trabekuloplastik
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve)
CMOS	komplementärer / sich ergänzender Metall-Oxid-Halbleiter (engl.: complementary metal-oxide-semiconductor)
DFT	Diskrete Fouriertransformation
DR	diabetische Retinopathie
FFT	schnelle Fouriertransformation (engl.: fast Fourier transform)
FPGA	programmierbares Logikgatter (engl.: field programmable gate array)
GD	Generalisierte Differenzen
GM	Grauwertmatrix
IM	Inertia Moment
IMF	Intensitätsmodulationsfaktor
IOD	intraokularer Druck
MB	Makroblase, Champagnerblase
MLP	Multilayer Perzeptron
NA	numerische Apertur
NPV	negativer Vorhersagewert (engl: negative predictive value)
OA	Optoakustik
OCT	Optische Kohärenztomografie
PK	Photokoagulation
PKC	Proteinkinase C
PPV	positive Vorhersagewert (engl: positive predictive value)
ReLu	rectified linear units
RM	Reflektometrie
ROC	receiver operating characteristic

## Symbole

ROI	Bereich von Interesse (engl.: region of interest)
RPE	Retinales Pigmentepithel
SLT	Selektive Laser Trabekuloplastik
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
SRT	Selektive Retina Therapie
THSP	time history speckle pattern
TW	Trabekelwerk
UART	universal asynchronous receiver transmitter
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (engl.: vascular endothelial growth factor)
VK	Vektorkarte
ZSM	Zeitverlaufs-Specklemuster

## Symbole

Symbol	Beschreibung	Einheit
$2\alpha$	Apertur	rad
$A$	Frequenzfaktor	$s^{-1}$
$a$	Kantenlänge des rechteckigen Laserspots	m
$\beta$	Winkel der einfallenden Wellenfront	rad
$f$	Brennweite	m
$C$	Specklekontrast	
$c_0$	Schallgeschwindigkeit	$ms^{-1}$
$c_p$	spezifische Wärmekapazität	$Jkg^{-1}K^{-1}$
$d$	Durchmesser einer Linse	m
$d_{CHOR}$	Dicke der Choroidea	m
$\Delta\phi$	Phasenänderung	
$\delta$	Ausdehnung eines Specklekorns - lateral	m
$\delta z$	Ausdehnung eines Specklekorns - axial	m
$\Delta$	Wegunterschied	m
$\Delta E$	Aktivierungsenergie	$Jmol^{-1}$
$d_{\mu B/\max}$	max. Blasendurchmesser	m
$d_{RPE}$	Dicke des pigmentierten RPE	m
$d_{unp.}$	Dicke des unpigmentierten RPE	m
$E$	Pulsenergie	J
$\varepsilon$	Quellterm	
erf	Errorfunktion	

Symbol	Beschreibung	Einheit
$F$	F-Score (ein-dimensionales Ergebnis der Algorithmen)	
$f_0$	Grenzfrequenz	$\text{m}^{-1}$
$f_W$	Wichtungsfunktion	
$f_X, f_Y$	Frequenzvariablen	$\text{m}^{-1}$
$G_{\odot\ominus}$	Grenzwert zur Unterscheidung von <i>kein Schaden</i> und <i>RPE-Schaden</i>	
$G_{\ominus\bullet}$	Grenzwert zur Unterscheidung von <i>RPE-Schaden</i> und <i>Weißfärbung</i>	
$\Gamma$	Grüneisenkoeffizient	
$\gamma(T)$	Volumenausdehnungskoeffizient	$\text{K}^{-1}$
$\gamma$	Winkel der Objektrotation	rad
$G(f_X, f_Y)$	Spektrum eines Wellenfeldes	
$G$	Greensche Funktion	
$H$	Bestrahlung	$\text{J}/\text{m}^2$
$h(u, v, \xi, \eta)$	Impulsantwort des Abbildungssystems	
$\theta$	Heaviside Sprungfunktion	
$H(f_X, f_Y)$	Amplitudentransferfunktion	
$I$	Intensität, z.B. eines Specklemusters	
$I_0$	Intensität, Bestrahlungsstärke in Tiefe 0	$\text{W}/\text{m}^2$
$I'$	Differenzenbild/Differenzintensität	
$\langle I \rangle$	mittlere Intensität des Specklemusters	
$x', y'$	Koordinaten der Austrittspupille	
$\kappa$	Wärmeleitfähigkeit	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$u, v$	Koordinaten der Bildebene	
$x, y$	Koordinaten der Eintrittspupille	
$\xi, \eta$	Koordinaten der Objektebene	
$\omega$	Radius der Pupille	m
$l$	Größe der Nachbarschaft	Frames
$M$	Vergrößerung	
$M_I$	Charakteristische Funktion	
$\mu_a$	Absorptionskoeffizient	$\text{m}^{-1}$
$\mu_a^{\text{CHOR}}$	Absorptionskoeffizient der Choroidea	$\text{m}^{-1}$
$\mu_a^{\text{RPE}}$	Absorptionskoeffizient des RPE	$\text{m}^{-1}$
$OA$	F-Score des OA-Algorithmus	
$\Omega$	Arrhenius-Schadensintegral	
$p$	Druck	Pa
$p_\infty$	Umgebungsdruck	kPa
$p_{\text{sat}}(T_\infty)$	gesättigter Dampfdruck bei Umgebungstemperatur	kPa
$\phi_i$	Phase einer Feldkomponente	
$p(I)$	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion	

Symbol	Beschreibung	Einheit
$p_{\max}$	Amplitude der Drucktransiente	Pa
$P(x, y)$	Pupillenfunktion	
$P(x, y, z)$	beliebiger Punkt im Raum	
$R$	universelle Gaskonstante	$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
$r$	Radius des Laserspots	m
$\rho$	Dichte	$\text{g/cm}^3$
$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$	Dichte Wasser	$\text{g/cm}^3$
$r$	Korrelationskoeffizient	
$RM$	F-Score des RM-Algorithmus	
$s_t$	t-te Spalte	
$S(t)$	Zeitverlauf der Specklebewegung	
$T$	Temperatur	K
$t$	Zeit	s
$T_0$	Temperatur für $\Gamma = 0$	K
$\tau$	Bestrahlungsdauer	s
$\tau_{\mu B}$	Lebensdauer der Blase	s
$\theta$	Öffnungswinkel	rad
$T^M$	gemessener Transient	
$T_{\max}$	Temperatur für $\Gamma = \max$	K
$T_{\text{OA}}$	optoakustisch gemessener Temperaturanstieg	K
$T^T$	thermoelastischer Transient	
$U$	Wellenfeld	
$U_B$	Wellenfeld in der Bildebene	
$u_i$	Amplitude einer Feldkomponente	
$U_O$	Wellenfeld in der Objektebene	
$W$	effektiver Weglängenfehler	m
$x_i$	Eingabefeature	
$\hat{y}$	Vorhersage	
$z$	Tiefe	m
$z_A$	defokussierter Abstand zwischen Abbildungssystem und Bild	m
$z_B$	Abstand zwischen Abbildungssystem und Bild	m
$\Delta z$	Defokus	m
$z_O$	Abstand zwischen Objekt und Abbildungssystem	m
○	<i>ex-vivo</i> Schadensklasse: <i>kein Schaden</i>	
◐	<i>ex-vivo</i> Schadensklasse: <i>leichter RPE-Schaden</i>	
◑	<i>ex-vivo</i> Schadensklasse: <i>RPE-Schaden</i>	
△	<i>ex-vivo</i> Schadensklasse: <i>unbekannt</i>	
●	<i>ex-vivo</i> Schadensklasse: <i>Weißfärbung</i>	
□	<i>in-vivo</i> Schadensklasse: <i>kaum sichtbar</i>	
▣	<i>in-vivo</i> Schadensklasse: <i>spät sichtbar</i>	
■	<i>in-vivo</i> Schadensklasse: <i>sofort sichtbar</i>	

# Einleitung

Eine der ersten medizinischen Anwendungen des Lasers war neben der Entfernung von Feuermalen und Melanomen auf der Haut [GOLDMAN *et al.*, 1963] die Photokoagulation der Retina [ZARET *et al.*, 1961; CAMPBELL *et al.*, 1965]. Über fünf Dekaden später ist der Laser sowohl in der Dermatologie als auch in der Augenheilkunde als diagnostisches und therapeutisches Hilfsmittel nicht mehr wegzudenken. Insbesondere für die Behandlung von Gefäßerkrankungen der Netzhaut, wie der proliferativen diabetischen Retinopathie, dem diabetischen Makulaödem, retinalen Gefäßverschlüssen, Retinopathia centralis serosa und choroidaler Neovaskularisation wird die Lasertherapie eingesetzt [EVERETT UND PAULUS, 2021]. Der genaue biologische Mechanismus, der für eine Verbesserung bestimmter Krankheitsbilder sorgt, wird noch immer aktiv erforscht. Bei der Photokoagulation wird bei Bestrahlungszeiten von 50 ms – 500 ms die Energie der Laserstrahlung auf der Höhe der Netzhaut absorbiert und in Wärme umgewandelt, was eine Proteindenaturierung zur Folge hat. Für die darauf folgende biologische Reaktion und den damit einhergehenden Therapieerfolg gibt es verschiedene Theorien: Erstens sorgt das direkte Einwirken auf Gefäße für deren Verschluss und eine geringere Leckage. Zweitens wird angenommen, dass durch die Zerstörung eines Teils der Photorezeptoren durch Laserkoagulation die globale Hämodynamik und Oxygenierung in der Retina verbessert werden soll [VON DER BURCHARD UND ROIDER, 2020; MUQIT *et al.*, 2011]. Die panretinale Laserbehandlung erreicht dies durch eine dichte Bestrahlung der peripheren Netzhaut mit hohen Laserleistungen, wodurch die Zahl der sauerstoffbedürftigen Zellen reduziert wird. Da Narbengewebe weniger energieverbrauchend ist, steht somit den übrigen Zellen mehr Sauerstoff zur Verfügung. Die dritte Theorie besagt, dass Veränderungen in der Zytokin-Expression der wichtigste zugrunde liegende Wirkmechanismus ist. Diese Theorie wird durch die Tatsache gestützt, dass mildere, weniger destruktive Photokoagulationstechniken zu ähnlichen Ergebnissen führen wie die Koagulation mit voller Stärke [VON DER BURCHARD UND ROIDER, 2020].

Über Jahrzehnte hinweg war die retinale Photokoagulation der Gold-Standard für z. B. die Behandlung der diabetischen Retinopathie, seit in der Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) gezeigt werden konnte, dass eine Photokoagulation zentraler Mikroaneurysmen einen Visusverlust verhindern kann [EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP, 1991]. Seit der Einführung der medikamentösen Anti-VEGF-Therapie ist die Laser-Photokoagulation bei der Behandlung des diabetischen Makulaödems in den Hintergrund getreten. Sie spielt dennoch bei verschiedenen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle und ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung, um unerwünschten Gewebeschaden und Nebenwirkungen zu reduzieren.

In den letzten Jahren wurden zunehmend die positiven Effekte einer laserinduzierten, sublethalen Hyperthermie auf die Funktion und den Stoffwechsel der RPE-Zellen untersucht [IWAMI *et al.*, 2014; KERN, 2018]. Dadurch wäre auch die Makula und Macula lutea, die relevanteste Region in der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), behandelbar, wenn es gelingt eine thermische Zellnekrose zu vermeiden, da diese zu erheblichen Sehverlusten führt.

Auch wenn in den letzten Jahren die Lasertherapie als Zusatztherapie zur Reduktion der Injektionshäufigkeiten oder gar als frühe Therapiestrategie vorgeschlagen wurde, haben alle bisherigen Methoden das gemeinsame Problem: dass die korrekte Laserleistung und Bestrahlungsdauer lediglich abgeschätzt werden kann. Lokale Unterschiede der Pigmentierung des RPE und der Choroidea können innerhalb eines Auges um einen Faktor bis zu drei schwanken [SCHMIDT UND PEISCH,

1986; GEERAETS *et al.*, 1962], was eine automatische Kontrolle der Behandlungstärke gerade bei Behandlungen im Bereich der Makula unabdingbar macht. Verschiedene Methoden zum Echtzeit-Monitoring z. B. mittels optoakustischer Temperaturmessung [BRINKMANN *et al.*, 2012; BAADE *et al.*, 2017] oder optischer Kohärenztomografie (OCT) [MÜLLER *et al.*, 2012] wurden erforscht; haben den Schritt in den klinischen Alltag allerdings noch nicht geschafft.

Bei einer weiteren Lasertherapie der selektiven Retina Therapie (SRT) und auch der selektiven Laser Trabekuloplastik (SLT) besteht ein ähnliches Problem. Der Wirkmechanismus ist entgegen der Photokoagulation nicht thermischer Natur, sondern die selektive thermomechanische Zerstörung von Zellstrukturen. Durch das Applizieren kurzer ns -  $\mu$ s Pulse können sich die stark absorbierenden Melanosome schneller aufheizen als das umliegende Gewebe, es entstehen Mikroblasen um die Melanosome herum, das Zellvolumen steigt dadurch stark an und schädigt die Zellen [NEUMANN UND BRINKMANN, 2006]. Die Struktur und Funktion der umliegenden Zellen bleibt dabei intakt. Im Fall der SRT werden dadurch im Gegensatz zur Photokoagulation die Photorezeptoren nicht beeinträchtigt und die retinale Funktion bleibt erhalten [KIM *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015]. Sowohl bei zentralen serösen Netzhautschädigungen [FRAMME *et al.*, 2015; KLATT *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2016] als auch bei diabetischen Makulaödemem [ROIDER *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2016] wurde der positive Effekt der SRT nachgewiesen. Im Falle der SLT, welche etwa zur selben Zeit einwickelt wurde, sind es die nichtpigmentierten Trabekelmaschenwerkzellen im Kammerwinkel, die bei der selektiven Schädigung pigmentierter Zellen, intakt bleiben [LATINA UND PARK, 1995]. Dadurch kann der Kammerwasserabfluss verbessert werden ohne die Struktur des Kammerwinkelgewebes zu beeinträchtigen. Der optimierte Kammerwasserabfluss hat eine Reduktion des Augeninnendrucks zur Folge, dem Hauptziel bei der Glaukomtherapie.

Bei SRT und SLT bleiben sowohl die Mikroblasen als auch der erzielte Zellschaden für den Operateur unsichtbar. Hier ist ebenso eine objektive Kontrolle des erzeugten Schadens von großem Interesse, um eine Über- aber auch Unterbehandlung zu vermeiden. All die genannten Laserbehandlungen haben also unabhängig von ihrem Wirkungsmechanismus und der zu behandelnden Krankheit die Gemeinsamkeit, dass ihr Behandlungserfolg nicht sichtbar und stark von den lokalen Gewebeeigenschaften abhängig ist. Bei allen Methoden könnte daher eine objektive Dosimetrie das Behandlungsergebnis verbessern und die Behandlungszeit verkürzen.

Die Möglichkeiten einer solchen Dosimetrie auf der Basis von Specklevideografie soll in dieser Arbeit für die Photokoagulation am Fundus des Auges und für die SLT im Kammerwinkel untersucht werden. Speckle oder Specklemuster sind ein Interferenzphänomen, das bei hinreichend kohärenter Beleuchtung von optisch rauen Oberflächen entsteht. Die Unebenheiten einer solchen Oberfläche können als einzelne Streuzentren betrachtet werden, von denen jeweils eine Kugelwelle mit unterschiedlicher Phase abgestrahlt wird, welche im Fernfeld interferieren. Ein Specklemustern kann somit als zufälliger Informationsträger verwendet werden und zur Quantifizierung von Translation, Rotation oder einer Phasenänderung des Objektes im Allgemeinen nützlich sein.

Specklekorrelationstechniken werden schon seit Jahrzehnten zur Messung thermischer Belastung in technischen Materialien eingesetzt, z. B. zur Bestimmung des Wärmeausdehnungskoeffizienten von dünnen Schichten [LIU UND GAO, 2011] oder zur Untersuchung des thermischen und mechanischen Spannungs-Dehnungs-Verhaltens verschiedener Metalle, Legierungen und Keramikmaterialien bis zu hohen Temperaturen von 1200 °C [ANWANDER *et al.*, 2000]. In biologischen Proben werden vor allem Specklekontrasttechniken häufig eingesetzt, um Gewebepерfusion zu visualisieren. Es wurden allerdings auch Specklekontrastmethoden genutzt, um laservermittelte Knorpelgewebemodifikation zu untersuchen [ZIMNYAKOV *et al.*, 2006]. In Bezug auf die Retina lassen sich bisher nur vereinzelt Studien finden, die thermische Effekte mittels reiner Specklefotografie untersuchen. So haben etwa KIRKPATRICK *et al.* [2019] einen ähnlichen Verlauf der Specklekorrelation im Vergleich

mit dem Temperaturverlauf gefunden. Diese Studie nutzt allerdings Bestrahlungszeiten von mehreren Sekunden, wobei die vorgestellte Methode nur an Gewebe nachahmenden Phantomen getestet wurde. Alle Studien zeigen bisher also lediglich, dass eine Korrelation der Speckleänderung mit der Temperaturänderung möglich sein sollte.

Die zeitliche Änderung von Specklemustern lässt sich mit geringen technischen Aufwand entweder mit einem Flächendetektor in zwei Dimensionen orts aufgelöst oder zeitlich aufgelöst mit einer Photodiode aufzeichnen. Ziel dieser Arbeit war, erstens mit einer schnellen Photodiode während der SLT Intensitätsänderungen der Speckle zu detektieren und Signalanteile zu identifizieren, die auf die Bildung von Mikroblasen und damit einhergehenden Zellschaden hindeuten. Es wurden Algorithmen entwickelt, um die Schwelle der Mikroblasenbildung präzise zu finden, mit dem Ziel diese zur Dosimetrie zu nutzen.

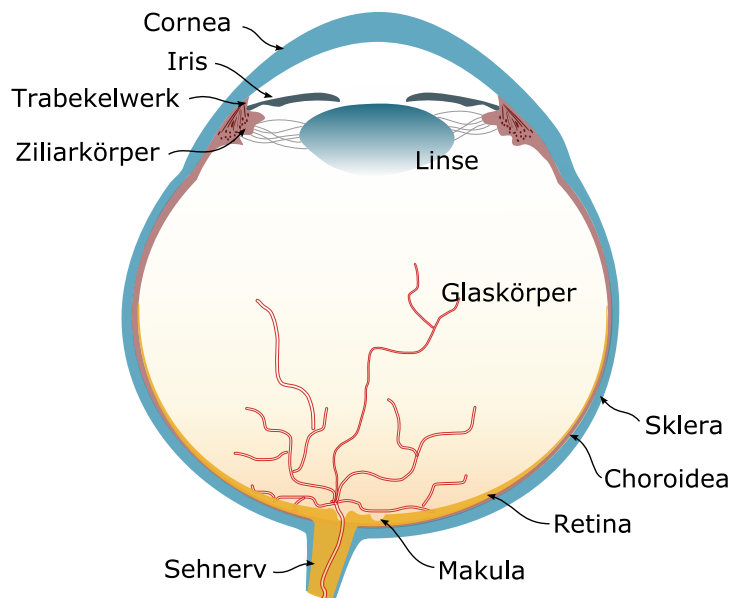
Zweitens wurden während der deutlich langsameren Photokoagulation Specklemuster mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Aus der zeitlichen Änderung der Speckle wurden Rückschlüsse auf die thermische Reaktion des Gewebes während der Bestrahlung gezogen. Auch hier wurden Algorithmen entwickelt, die das Schadensausmaß möglichst bereits während der Bestrahlung erkennen können und als Basis für eine Dosimetrie dienen könnten.

Diese Arbeit ist folgendermaßen gegliedert: Dieser Einleitung schließt sich ein Grundlagenkapitel an, in dem die Anatomie und Physiologie des menschlichen Auges sowie typische Krankheitsbilder erläutert werden. Es folgt eine Übersicht der möglichen Laserbehandlungen und der Stand der Forschung der Monitoringmethoden. Hieraus ergibt sich die Motivation dieser Arbeit. Kapitel 4 befasst sich mit der Theorie dynamischer Speckle, die zum Verständnis dieser Arbeit notwendig ist, sowie mit der Simulation von Specklemustern. Im Anschluss werden in je einem Kapitel die Möglichkeiten der Dosimetrie im Kammerwinkel und am Fundus dargelegt. In beiden Kapiteln werden die jeweiligen Methoden und die erzielten Ergebnisse vorgestellt und diskutiert.



## 2.1 Das Auge

Das Sehsystem liefert mehr Informationen an das Gehirn als alle anderen Sinnessysteme des Menschen zusammen und erbringt bislang eine unnachahmliche Leistung bei der Umwandlung von Licht in elektrische Signale und Sinnesempfindungen, vor allem was räumliche und zeitliche Auflösung, Adaptionfähigkeit, Kontrast- und Farbsehen anbelangt. Das Auge als Aufnahmeorgan hat eine leicht asymmetrisch kugelige Form mit einem Durchmesser von etwa 24 mm [BERGUA, 2017] und besteht aus verschiedenen, teils transparenten Strukturen, die schichtartig angeordnet sind (Abb. 2.1). Durch die äußere Schicht, die zähe, weiße Sklera wird die Form des Auges präzise beibehalten. Die Choroidea versorgt den innen liegenden sensorischen Abschnitt des Auges, die Retina, die entwicklungsgeschichtlich ein Teil des Gehirns ist. Bevor das Licht an der Retina in elektrische Impulse umgewandelt werden kann, durchläuft es zuvor den optischen Apparat des Auges bestehend aus Cornea, Iris, welche als Blende fungiert, Linse und Glaskörper. Die etwa 500 µm dicke Cornea ist die stärkste refraktive Struktur des Auges und sorgt für 45 dpt Brechkraft, während die Linse noch eine weitere brechende Wirkung von 19 dpt – 33 dpt, je nach Grad der Akkommodation, beiträgt. Das verkleinerte und umgekehrte Bild, das auf der Retina entsteht, wird von Photorezeptoren registriert, innerhalb der Retina vorverarbeitet und über den Sehnerv und das Chiasma Opticum zur primären Sehrinde zur Weiterverarbeitung geleitet.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des horizontalen Schnittes durch das menschliche Auge**

Die Wand des Augapfels wird aus der Sklera zusammen mit der Cornea, der Choroidea und der Retina gebildet. Im Inneren befindet sich der Glaskörper und Ziliarkörper sowie die Linse, die zusammen mit der Iris als Blende und der Cornea das optische System des Auges bildet. (In Anlehnung an GREHN [2019])

Das Schema in Abbildung 2.1 deutet die Komplexität dieses Sinnesorgans nur ansatzweise an, und im Folgenden soll das Augenmerk hauptsächlich auf zwei Abschnitten des Auges liegen, die eine entscheidende Rolle im Verlauf der häufigsten Erkrankung und damit auch in deren Therapiestrategien spielen.

### 2.1.1 Vordere Kammer

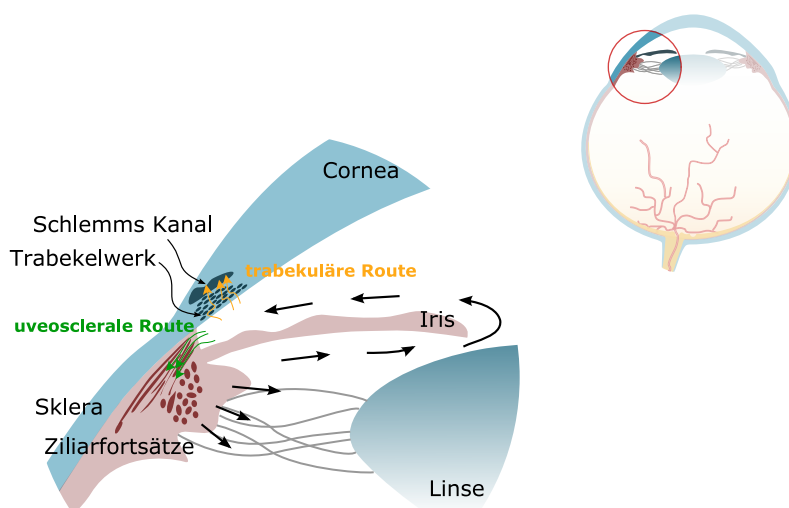
Das Auge hat drei mit Flüssigkeit gefüllte Kammern, die Vordere zwischen Cornea und Iris, die Hintere zwischen Iris und Linse, sowie den Glaskörper zwischen Linse und Retina. Der Glaskörper ist deutlich viskoser als das Kammerwasser, welches die vordere und hintere Kammer füllt. Das Kammerwasser wird in der hinteren Kammer an den Ziliarfortsätzen des Ziliarkörpers gebildet. Der Zufluss geschieht durch eine Kombination aus Ultrafiltration aus arteriellem Blut und aktiver Sekretion. Es strömen ca. 2  $\mu$ L Kammerwasser pro Minute durch die Pupille. Durch das Kammerwasser geschieht ein Stoffaustausch mit Linse und Cornea, bevor es im Kammerwinkel, gebildet durch Cornea und Iris, recycelt wird und in den systemischen Kreislauf zurückkehrt [GREHN, 2019]. Es gibt, wie in Abbildung 2.2 illustriert, zwei verschiedene Abflusswege. Erstens den uveoscleralen; dabei diffundiert das Kammerwasser durch interzelluläre Räume zwischen den Ziliarmuskelfasern und gelangt in das Gefäßsystem der Aderhaut. Obwohl dieser Abflussweg nur einen geringen Anteil am gesamten Abfluss des Kammerwassers hat (etwa 15 %), ist er dennoch Angriffspunkt vieler Medikamente [LLOBET *et al.*, 2003]. Der Hauptteil des Kammerwasserabflusses geschieht über die trabekuläre Route; hier verlässt das Kammerwasser über ein gut strukturiertes Gewebe, das Trabekelwerk, das Auge. Nachdem es das Trabekelwerk durchquert hat, gelangt das Kammerwasser durch Schlemms Kanal direkt in die Venen [LLOBET *et al.*, 2003]. Das Kammerwasser ist ein optisch transparentes Medium, das für eine gute visuelle Funktion sorgt und hat hauptsächlich zwei Aufgaben: Zum einen avaskuläre Strukturen mit Nährstoffen zu versorgen und zum anderen den intraokularen Druck (IOD) aufrecht zu erhalten [STAMPER *et al.*, 2009]. Um einen IOD von 17 mmHg – 19 mmHg gegenüber dem venösen Druck von 7 mmHg – 9 mmHg aufrecht zu erhalten, muss das Abflussgewebe den nötigen Widerstand bieten.

Etwa 50 % des Widerstandes entsteht durch das Trabekelwerk und zwar durch die dichte extrazelluläre Matrix der cribriformen Region, welche im direkten Kontakt mit der Innenwand aus Endothelzellen steht, aus denen der Schlemmsche Kanal besteht [LÜTJEN-DRECOLL, 1999]. Schlemms Kanal ist die letzte Barriere, die das Kammerwasser überwinden muss und trägt aufgrund seiner großen Porendichte schätzungsweise 10 % zum Gesamtwiderstand bei [LLOBET *et al.*, 2003]. Da die Zellen der äußersten, der cribriformen Schicht des schwammartigen Trabekelwerks in eine dichte extrazelluläre Matrix eingebettet sind, gibt es nur enge interzelluläre Räume. Je weiter innen, d. h. weiter Richtung Vorderkammer sich die Schichten des Trabekelwerks befinden, umso größer werden ihre interzellulären Räume und umso geringer demnach auch ihr Widerstand [LLOBET *et al.*, 2003]. Man kann das Trabekelwerk also als Filter des Kammerwassers ansehen, wobei sich die Porengröße durch eine Kombination eines äußeren (der Tonus des Ziliarmuskels) und inneren Faktoren (Kontraktilität, Zellvolumen und Status der extrazellulären Matrix) beeinflussen lässt [LLOBET *et al.*, 2003].

Durch den Fluss des Kammerwassers wird das in Säuglingen ursprünglich glatte und unpigmentierte Trabekelwerk mit zunehmendem Alter immer gröber und Pigmente lagern sich ab [ALWARD UND LONGMUIR, 2008]. Die von der Iris stammenden Pigmente lagern sich in unterschiedlicher Dichte und Tiefe im Trabekelwerk ab [STAMPER *et al.*, 2009], wobei die meisten Pigmente durch Phagozytose aufgenommen werden und intrazellulär zu finden sind [ALWARD UND LONGMUIR, 2008]. Es entsteht ein trabekuläres Pigmentband, das im unteren Kammerwinkel aufgrund der Schwerkraft tendenziell dichter ist. Es können fleckige Bereiche mit stärkerer Pigmentierung auftreten, besonders in Regionen mit Kollektorkanälen, in denen der Abfluss des Kammerwassers erhöht ist [ALWARD UND LONGMUIR, 2008]. Gonioskopisch (bei der Untersuchung des Kammerwinkels mit Spaltlampe und Kontaktglas) hat das unpigmentierte Trabekelwerk eine blassgraue Farbe. Typischerweise

erscheint die trabekuläre Pigmentierung tief im hinteren Trabekelwerk. Pigmente können sich allerdings ebenso auf der Oberfläche des posterioren Trabekelwerks und über das ganze anteriore Trabekelwerk, sowie der Schwalbe-Linie, der Grenze zwischen Trabekelwerk und Cornea, anlagern. Starke Pigmentierung anterior zur Schwalbe-Linie wird als Sampaolesi-Linie bezeichnet [ALWARD UND LONGMUIR, 2008]. Ein Kammerwinkel, der als normal angesehen wird, kann viele verschiedene Variationen, nicht nur was die Pigmentierung betrifft, aufweisen. Eine gute Übersicht geben die Zeichnungen von Lee Allen in z. B. ALWARD UND LONGMUIR [2008].

Das Vorhandensein und Ausmaß der Pigmentierung kann klinische Informationen, z. B. Hinweis auf einen okkulten Fall eines pseudoexfoliativen Syndroms liefern und kann bei der Bewertung des Kammerwinkels etwa mit dem Shaffer-Schema mit einem Grad von 1 (minimale oder keine Pigmentierung) bis 4 (dichte Pigmentablagerung) charakterisiert werden [STAMPER *et al.*, 2009].

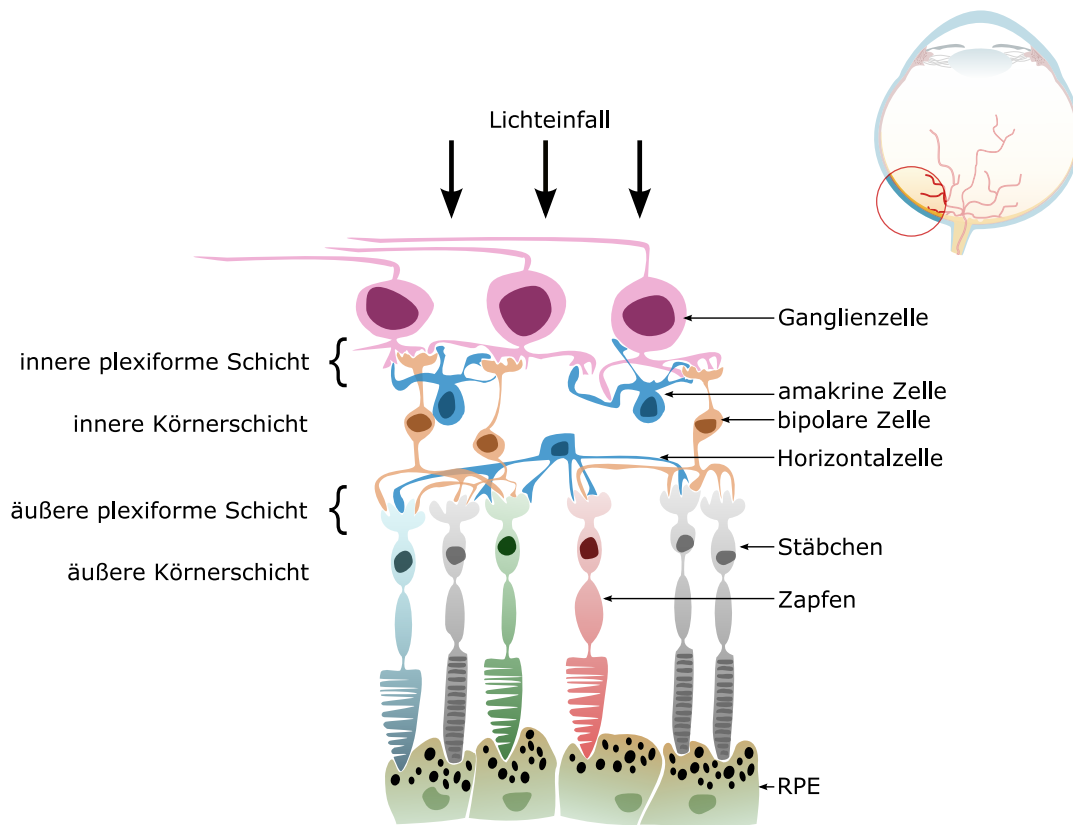


#### Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Kammerwinkels

Das Kammerwasser wird in der hinteren Kammer vom Ziliarkörper gebildet, fließt (dargestellt durch schwarze Pfeile) in die vordere Kammer, wo es Linse und Hornhaut ernährt und verlässt das Auge durch den Kammerwinkel. Entweder über die trabekuläre Route (gelb) durch das Trabekelwerk und Schlemms Kanal oder über die uveosclerale Route (grün) durch den Ziliarmuskel. (In Anlehnung an STAMPER *et al.* [2009])

### 2.1.2 Retina

Die Retina ist eine kaum einen halben Millimeter dicke Schicht. Sie besteht aus zwei Arten lichtsensitiver Rezeptoren, etwa 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen [GREHN, 2019]. Die Stäbchen sind hauptsächlich in der Peripherie zu finden, sie sind für das skotopische Sehen verantwortlich. Die Farbempfindung wird durch die Zapfen vermittelt, man spricht hierbei auch von photopischen Sehen. Zapfen häufen sich in der Makula, einer Region mit einem Durchmesser von ca. 5 mm. In der Mitte der Makula, der Fovea, erreicht die Zapfenkonzentration ein Maximum, was das zentrale, hochauflösende Sehen ermöglicht. Die Photorezeptoren befinden sich auf der äußeren Seite der neuronalen Retina. Die Außensegmente der Photorezeptoren, mit photoaktiven Pigmenten beladenen Membranscheibchen, grenzen an das Pigmentepithel, das die abgestoßenen Scheibchen recycelt und das einfallende Licht nach hinten abschirmt. Die inneren Segmente der Photorezeptoren beinhalten die Zellkerne und bilden die äußere Körnerschicht. Wenn Licht in den Photorezeptoren absorbiert wird, löst dies eine Kaskade an chemischen Vorgängen aus, die dafür



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Retina**

Das von oben einfallende Licht muss zunächst erst einmal alle Netzhautschichten durchdringen, bis an die Photorezeptoren, die mit ihren Rezeptoraußengliedern die Lichtreize aufnehmen. Die dadurch ausgelösten Nervenimpulse werden von den darüber liegenden Nervenzellen verschaltet und an das Gehirn weitergeleitet. (In Anlehnung an GREHN [2019])

sorgen, dass elektrische Impulse zunächst an die nachgeschalteten bipolaren und horizontalen Zellen über die äußeren plexiformen Schicht weitergeleitet werden. Deren Zellkerne bilden zusammen mit den amakrinen Zellen die innere Körnerschicht. Bipolare und amakrine Zellen leiten das Signal durch die zweite synaptische Schicht, die innere plexiforme Schicht, zu den Ganglienzellen, deren lange Axone den optischen Nerv bilden und das Signal zum Gehirn leiten. [KOLB, 2003]

Wie horizontale Zellen haben auch amakrine Zellen ihre Zellkörper in der inneren Körnerschicht und sind für die horizontale Kommunikation innerhalb der Netzhaut verantwortlich und beeinflussen das Ganglienzellensignal. Es gibt verschiedene Arten von Amakrinzellen mit unterschiedlichem Beitrag zur Sehfunktion.

### 2.1.3 Retinales Pigmentepithel

In enger Interaktion mit den Photorezeptoren erfüllt das RPE vielfältige, wichtige Aufgaben im Sehprozess. Das RPE ist eine stark melaninhaltige Einzelzellschicht zwischen einem Gefäßbett der Choriocapillaris und der sensorischen Retina. Auf einer Seite umschließen lange Mikrovilli die äußeren Segmente der Photorezeptoren. Die andere Seite des RPE ist der Bruch-Membran zugewandt. Verbunden durch tight junctions (engl. für „dichte Verbindung“) bilden die eng aneinander liegenden RPE-Zellen einen Teil der Blut-Netzhaut-Schranke.

Zu den Funktionen des RPE gehört die Phagozytose der Außensegmente, die kontinuierlich von den Photorezeptoren abgestoßen werden [YOUNG UND BOK, 1969]. Um 11-*cis*-retinal zu regenerieren, ist ein ständiger Kreislauf von Vitamin A (Retinol) und einigen seiner Derivate zwischen den Stäbchen und dem RPE, dem sogenannten visuellen Zyklus, notwendig. Diese Erneuerung findet im RPE

statt, wo das all-*trans*-Retinal, das Produkt der Photonenabsorption in den Photorezeptoren, durch Reisoomerisierung und Oxidation in seine funktionelle 11-*cis*-Form zurückgeführt wird, bevor es in die Photorezeptoren zurücktransportiert wird.

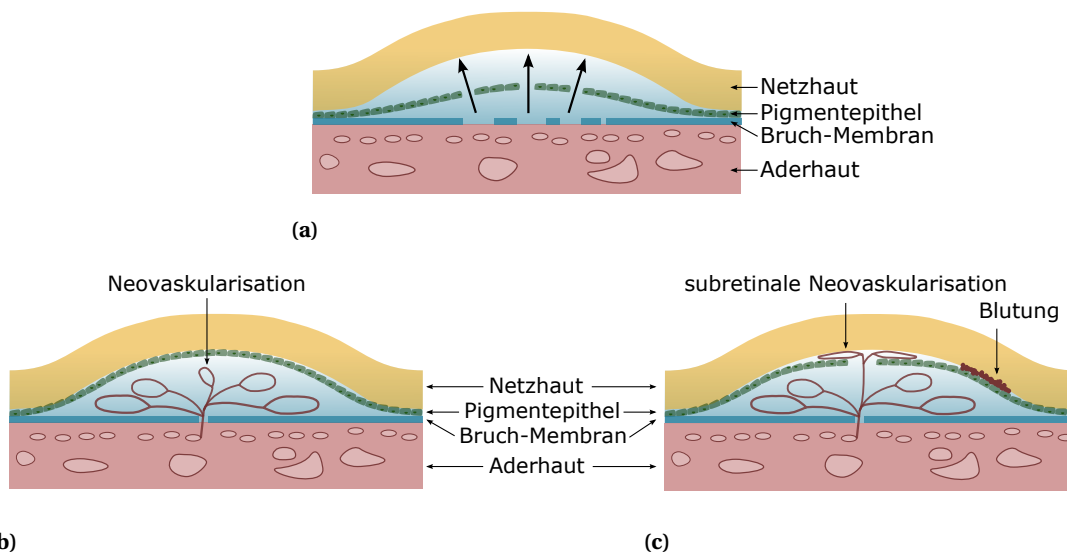
Mit dem Transport von Wasser, Ionen und Stoffwechselendprodukten von der Retina zur Choroidea erfüllt das RPE eine weitere wesentliche Aufgabe. Im Gegenzug werden Glukose, Retinol und Fettsäuren über das RPE vom Blut zu den Photorezeptoren transportiert. Zusätzlich werden über das RPE eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren sowie Faktoren für die strukturelle Aufrechterhaltung der Photorezeptoren und der Choroidea ausgeschieden. Im Hinblick auf die Photokoagulation spielt die starke Pigmentierung eine bedeutende Rolle. Im RPE werden etwa 50 % des einfallenden Lichts im grünen Spektralbereich absorbiert [GABEL *et al.*, 1978], während die neuronale Netzhaut fast transparent ist. Es gibt mehrere unterschiedlich spezialisierte Pigmente, aber im Allgemeinen wird Licht von Melanin absorbiert, um eine Rückstreuung des Lichts auf die Netzhaut zu vermeiden. Ein weiteres Pigment ist Lipofuscin, das sich im Laufe des Lebens ansammelt und mit zunehmenden Alter eine immer höhere Konzentration erreicht. [SCHRAERMAYER UND HEIMANN, 1999; STRAUSS, 2005]

## 2.2 Krankheitsbilder des Augenhintergrundes

### 2.2.1 Altersbedingte Makuladegeneration

Die ersten Anzeichen für AMD können Drusen sein, ein amorpher Einschluss zwischen RPE und Bruch-Membran. Diese können entweder als harte oder weiche Drusen klassifiziert werden. Während eine kleine Anzahl von harten Drusen, punktuelle Läsionen, die normalerweise aus hyalinem Material bestehen und einen Durchmesser von weniger als 63  $\mu\text{m}$  haben, nicht als Risikofaktor für AMD angesehen werden, sind zahlreiche harte und größere weiche Drusen mit einer amorphen vesikulären Struktur und undeutlichen Rändern Risikofaktoren für den Sehverlust. Drusen alleine können zu funktionellen Defiziten in der Makula führen, der Grund für den tatsächlichen Sehverlust ist jedoch die durch Drusen ausgelöste Ablösung von RPE und Netzhaut von der Choroidea [AMBATI *et al.*, 2003; YOUNG, 1987] oder Verluste von RPE-Zellen.

Ein weiterer, die AMD fördernder Prozess ist der unvollständige Abbau der Außensegmente der Photorezeptoren durch das RPE. Es folgt eine kontinuierliche Akkumulation von Lipofuscin, einem gelb-braunen, stark lipidhaltigen Protein. Lipofuscin ist für seine Toxizität in hoher Konzentration bekannt und schädigt möglicherweise DNA und Mitochondrienmembrane, was zur Apoptose führen kann [DE JONG, 2006]. Darüber hinaus absorbieren Teile von Lipofuscin Licht im sichtbaren Spektrum und verursachen lichtinduzierte Läsionen im RPE [DE JONG, 2006]. Das RPE degeneriert, was zu einem fortlaufenden Abbau der Photorezeptoren führt.



**Abbildung 2.4: Entwicklung einer feuchten AMD**

(a) Flüssigkeitseintritt unter das Pigmentepithel, sowie die sensorische Retina bei Defekten der Bruch-Membran und des Pigmentepithels.

(b) Gefäßneubildung unter dem Pigmentepithel: okkulte chorioidale Neovaskularisationen.

(c) Gefäße brechen durch das Pigmentepithel: klassische chorioidale Neovaskularisationen.

(in Anlehnung an GREHN [2019])

Wenn die Neovaskularisation der Aderhaut beginnt, wird aus trockener, feuchte AMD. Diese wird durch eine Überproduktion an angiogenen Faktoren, insbesondere VEGF hervorgerufen. Neue Blutgefäße können aus der Choriokapillaris durch die entstandenen Löcher in der Bruch-Membran unter das Pigmentepithel wachsen (okkulte chorioidale Neovaskularisationen, Abb. 2.4b) oder dieses sogar durchbrechen und in den subretinalen Raum eindringen, klassische chorioidale Neovaskularisationen, Abb. 2.4c). Diese neuen Gefäße lecken üblicherweise und bilden Makulanarben [NOWAK, 2006].

Unbehandelte feuchte AMD kann innerhalb von Monaten zu einem zentralen Sehverlust führen.

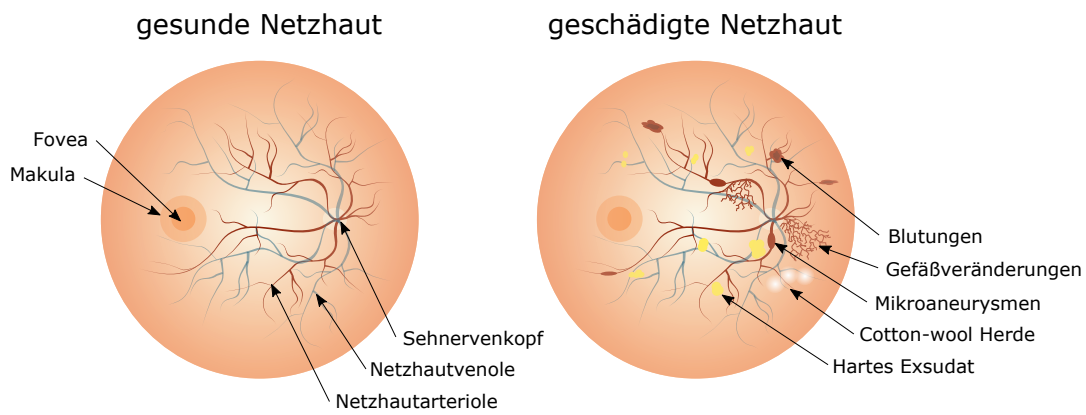
Die Einführung von antiangiogenen Arzneimitteln stellten jedoch einen Durchbruch dar: die funktionelle Prognose von einer fast sicheren Blindheit änderte sich zu einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 90% für eine dreizeilige visuelle Verbesserung nach zweijähriger Behandlung [HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN *et al.*, 2018]. Die antiangiogene Therapie erfolgt intravitreal und zielt auf die Blockade von VEGF ab. Diese Behandlung stellt allerdings keine Heilung der feuchten AMD dar, sondern eine Verzögerung des Voranschreitens der Krankheit. Aufgrund der Kosten für die Medikamente, des Zugangs für Patienten und der zum Teil mangelnden Adhärenz der Behandlung sowie der zunehmenden Belastung durch häufige Arztbesuche, um Injektionen zu erhalten, besteht jedoch ein Bedarf an einer lang anhaltenden Therapielösung für Patienten mit AMD. Laser-Photokoagulation und photodynamische Therapie werden wegen der wesentlich schlechteren Wirksamkeit seit Einführung der antiangiogenen Medikamente selten als alleinige Therapie eingesetzt. Photodynamische Therapie und auch transpupilläre Thermotherapie können jedoch unterstützend in Kombination mit VEGF Inhibitoren genutzt werden, um die Anzahl der Injektionen zu reduzieren. [AL-ZAMIL UND YASSIN, 2017]. Es werden weiterhin stereotaktische Strahlentherapie und Stammzelltherapie untersucht.

Für die trockene Form der AMD werden verschiedene therapeutische Ansätze zur Reduzierung des Krankheitsverlaufs erforscht, darunter unter anderem Medikamente mit antioxidativen Eigenschaften, Inhibitoren der Komplementkaskade, neuroprotektive Wirkstoffe, Hemmstoffe des visuellen Zyklus, Gentherapie und zellbasierte Therapien [DE GUIMARAES *et al.*, 2022]. Im März 2023 wurde erstmal ein Medikament von der FDA (US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel, engl.: U.S. Food and Drug Administration) zur Behandlung der trockenen AMD zugelassen. Der neue Wirkstoff Pegcetacoplan wurde vor seiner Zulassung in den zwei Phase 3 Studien OAKS und DERBY getestet, in denen eine ein- oder zweimonatlich Injektion von Pegcetacoplan die Ausbreitung der geografischen Atrophie verlangsamte [GOLDBERG *et al.*, 2022]. Weiterhin zeigen die LIGHTSITE I - III klinischen Studien mit kleinen Patientenzahlen, dass eine Photobiomodulation bei verschiedenen Wellenlängen zur Verbesserung der bestkorrigierten Sehschärfe bei trockener AMD führt [GIRGIS UND LEE, 2023].

### 2.2.2 Diabetische Retinopathie

Die diabetische Retinopathie ist eine Mikroangiopathie der Netzhaut und ein Phänomen, an dem fast alle Patienten mit Diabetes irgendwann leiden. Die Auswirkungen reichen von eingeschränkter Sehfähigkeit bis hin zu Erblindung [KOLLIAS UND ULBIG, 2010]. Die genauen biochemischen Pfade der Netzhautgefäßschädigung durch Hyperglykämie sind nicht vollständig beschrieben, aber die erhöhte Aktivität der Proteinkinase C (PKC) und die Bildung glykierter Reaktionsprodukte (engl.: Advanced Glycation Endproducts, AGEs), die durch eine erhöhte Blutzuckerkonzentration verursacht werden, scheinen eine Hauptrolle zu spielen. PKC führt zu einer gesteigerten Durchlässigkeit des Gefäßsystems, zu Veränderungen der rheologischen Eigenschaften des Blutes und zur Verdickung der Basalmembran [SHAH, 2008]. Die Anhäufung von AGEs korreliert mit einem Verlust von Perizyten, Bindegewebszellen an der Außenseite der Blutgefäße und der Bildung von Mikroaneurysmen. All dies führt zu Kapillarverschlüssen, gefolgt von retinalen Ischämien und Blutungen. Das Fortschreiten der Gefäßschädigung führt über mehrere biochemische Signalwege zu einem erhöhten VEGF Niveau, das eine Neovaskularisation in den vorderen und hinteren Segmenten des Auges initiiert, was zu einer zunehmenden Gefäßpermeabilität und dem Kollaps der Blut-Retina-Barriere führt [KOLLIAS UND ULBIG, 2010]. In diesem Stadium wird die nicht-proliferative zur proliferativen Retinopathie. Es besteht auch die Gefahr eines diabetischen Makulaödems. Dies wird durch die Leckage von Flüssigkeit, Proteinen und Lipiden in die sensorische Netzhaut verursacht, da die Blut-Retina-Schranke defekt ist. Die Veränderungen am Fundus, die bei der diabetischen Retinopathie auftreten können, sind in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.

Die aktuellen therapeutischen Paradigmen konzentrieren sich auf die Behandlung des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums, sobald sich proliferativen Retinopathie oder ein diabetisches Ma-



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Veränderungen der Retina aufgrund diabetischer Retinopathie**

kulaödem entwickelt haben. Dann können Laser-Photokoagulation, intravitreöse Injektionen von Anti-VEGF- und Steroid-Wirkstoffen sowie vitreoretinale Operationen zum Einsatz kommen [DUH *et al.*, 2017].

### 2.2.3 Glaukom

Unter dem Begriff Glaukom werden eine Reihe unterschiedlicher Erkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsames Kennzeichen die Schädigung der Sehnervenpapille und damit einhergehende Gesichtsfeldausfälle ist. Ein individuell erhöhter Augeninnendruck gilt neben Alter, Hornhautdicke oder Durchblutung des Sehnervs als Hauptrisikofaktor und ist der einzige mit einer effektiven Behandlungsmöglichkeit. Die meisten Offenwinkelglaukome, welche etwa 85 % aller Glaukomarten ausmachen, entstehen durch einen erhöhten Abflusswiderstand in der cribriformen Region des Trabekelwerks und Schlemms Kanal [LLOBET *et al.*, 2003]. Dies führt zu einer fortlaufenden Erhöhung des Augeninnendrucks. Das Mittel der ersten Wahl zur Behandlung des primären Offenwinkelglaukoms mit einer okulären Hypertension sind Augentropfen, die den Augeninnendruck senken sollen [LI *et al.*, 2016]. Ist die Senkung durch Medikamente nicht ausreichend oder wird das Medikament nicht vertragen, kann eine Laser-Trabekuloplastik zur Anwendung kommen. Eine erfolgreiche Therapie mit Augentropfen erfordert eine hohe Compliance der Patienten. Die Therapietreue von Patienten mit chronischen Erkrankungen ist im Allgemeinen nur etwa 75 % [DIMATTEO, 2004]. Trotzdem wurde eine gute Adhärenz für ein tägliches Glaukom-Medikament beobachtet, bei Patienten mit komplexen Dosierungsschemata sinkt jedoch die Adhärenz [ROBIN *et al.*, 2007]. Von einer hohen Anzahl von Dosierungsfehlern wurde berichtet [ROBIN *et al.*, 2007] sowie von einer schlechten Erfolgsrate bei der richtigen Verabreichung von Augentropfen [STONE *et al.*, 2009].

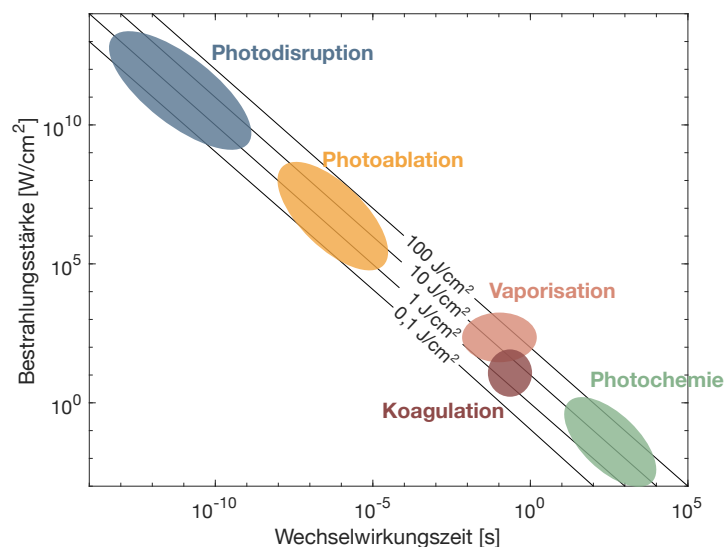
Die letzte Option den Augeninnendruck zu senken sind verschiedene Operationen, die entweder die Vorderkammer eröffnen, um den Abfluss in die Bindehaut zu leiten oder mit Stents den Schlemmschen Kanal mit der Vorderkammer zu verbinden.

## 2.3 Lasieranwendungen am Auge

Das Potenzial des Lasers für Therapien in der Augenheilkunde wurde nahezu sofort nach dessen Entwicklung durch MAIMAN 1960 erkannt; die erste Veröffentlichung über Läsionen am Augenhintergrund, die mit einem Rubin-Laser erzeugt wurden, erschien schon im darauf folgenden Jahr [ZARET *et al.*, 1961]. Die Grundlagen dafür legte allerdings MEYER-SCHWICKERATH [1954], der bereits 1949 Sonnenlicht auf die Retina von Patienten fokussiert, um Netzhautablösungen und Melanome zu behandeln. Mit der Entdeckung des Argon-Lasers konnte Strahlung blauer und grüner Wellenlängen genutzt werden, die deutlich besser von Blut und Melanin absorbiert wird (siehe Abb. 2.7) und somit Kollateralschaden verringert. Mit der Adaption an eine Spaltlampe [LITTLE *et al.*, 1970] und der Verwendung eines Ziellasers konnten weiterhin die Läsionsgröße, deren Lokalisierung, sowie Leistung und Bestrahlungsdauer deutlich präziser kontrolliert werden. Die Photokoagulation etablierte sich in den darauf folgenden 40 Jahren zu einem Standardverfahren in der Augenheilkunde, nicht nur zur Behandlung diverser Erkrankungen am Augenhintergrund, sondern auch für die Behandlung des Kammerwinkels.

### 2.3.1 Wirkung von Laserstrahlung auf okulare Medien

Bei der Bestrahlung von biologischem Gewebe kann die durch Absorption im Gewebe deponierte Energie in Abhängigkeit von Absorber, Leistungsdichte und Dauer der Wechselwirkung verschiedene Prozesse initiieren. Die scheinbar unterschiedlichen Interaktionsmodi teilen sich die Gemeinsamkeit, dass die Gesamtenergiedosis, die benötigt wird, um eine laserinduzierte biologische Transformation zu erreichen, sich in einem Bereich zwischen 10 und 1000 J/cm<sup>2</sup> bewegt. Wie in Abbildung 2.6 zu sehen, sind die optimalen Parameter der verschiedenen Anwendungen über 12 Größenordnungen annähernd auf einer Diagonale innerhalb eines definierten Fluenzbandes ausgerichtet [BOULNOIS, 1986]. Anhand der Zeitskala lassen sich vier Haupteffekte unterscheiden: photodisruptive, photoablative, thermische und photochemische Interaktion.



**Abbildung 2.6: Wirkmechanismen bei der Laserbestrahlung von biologischem Gewebe in Abhängigkeit von Wechselwirkungszeit und Bestrahlungsstärke**

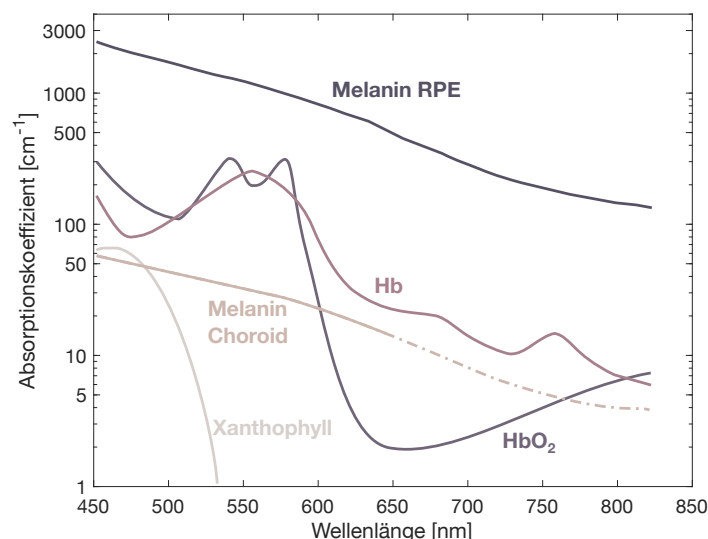
(In Anlehnung an BOULNOIS [1986] und STEINER [2011])

Bei langen Expositionsdauern von einigen Sekunden bis zu Stunden werden nur photochemische Effekte aktiviert, insbesondere im blauen Spektralbereich. Die entstehende Wärme wird durch die

Netzhautdurchblutung so abgeführt, dass keine nennenswerte Erwärmung auftritt [BIRNGRUBER, 1991]. Es werden nur biochemische Prozesse in den Zellen angeregt, was in der Ophthalmologie z. B. bei der photodynamischen Therapie Anwendung findet.

Wird die Expositionszeit in den Bereich von Millisekunden bis Sekunden reduziert und die Bestrahlungsstärke erhöht ( $10 \text{ W/cm}^2 - 100 \text{ W/cm}^2$ ) kann die zugeführte Energie meist nicht durch Konvektion abgeführt werden. Die Wärme staut sich lokal und ein signifikanter Temperaturanstieg wird nur durch Wärmediffusion reduziert [BIRNGRUBER, 1991]. In diesem Zeitbereich treten thermische Schäden, von leichter Denaturierung bis hin zur Koagulation und Verdampfung auf. Die Abhängigkeit der Schädigung von der Expositionszeit und der Temperatur kann durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden, welche im folgenden Kapitel 2.3.1.1 ausführlicher dargelegt wird.

Bei einer Bestrahlungsdauer im Nano- bis Mikrosekundenbereich verdampft das Gewebswasser um die stark absorbierenden Melanosome im RPE. Durch die kurze Expositionszeit kommt es zum thermischen Einschluss, einer starken lokalen Erwärmung der Melanosome und der Bildung von Mikroblassen [KELLY, 1997]. Bei weiterer Verkürzung der Pulsdauer in den Pikosekundenbereich ist neben dem thermischen auch der akustische Einschluss der absorbierten Energie innerhalb der Melanosome gegeben, was zu der Bildung von druckinduzierten Kavitationsblasen führt. Im Bereich von Femtosekunden kann es aufgrund der sehr hohen Spitzenleistungen zum optischen Durchbruch kommen [GLICKMAN, 2002].



**Abbildung 2.7: Absorption am Fundus**

Absorptionskoeffizienten des menschlichen RPE und Choroidea in der mittleren Peripherie, die sich aus ihrem Melaningehalt ergeben, sowie von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin und Xanthophyll, aufgetragen als Funktion der Wellenlänge. (In Anlehnung an VOGEL UND BIRNGRUBER [1992])

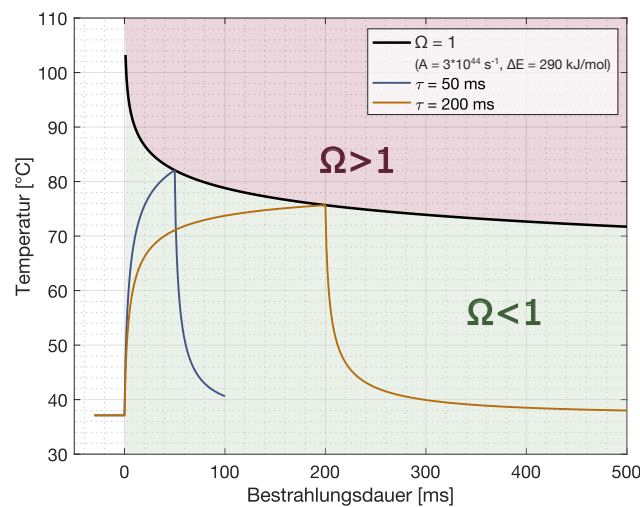
Entscheidend für die räumliche Verteilung der Energiedichte im Gewebe sind dessen optische Eigenschaften, welche die Ausbreitung des Lichtes bestimmen. Photonen werden an bestimmten Gewebestrukturen gestreut oder absorbiert. Neben der Struktur des Gewebes ist die verwendete Laserwellenlänge von entscheidender Bedeutung. Am Fundus sind die wesentlichen Chromophore Wasser, Hämoglobin und Oxyhämoglobin in den Gefäßen sowie Melanin im RPE und der Choroidea, deren Absorptionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge in Abbildung 2.7 dargestellt sind. Im Bereich der Fovea ist außerdem das gelbe Pigment Xanthophyll in der Netzhaut eingelagert.

### 2.3.1.1 Zeitabhängigkeit bei thermischer Gewebeschädigung

Die Absorption von Strahlung hat die Erwärmung des Gewebes zur Folge und sorgt abhängig vom Temperaturanstieg und dessen Dauer für thermische Schäden, was schließlich zur Zerstörung des Gewebes führen kann. Ein übliches Maß für thermische Schädigung ist das Arrhenius-Schadensintegral  $\Omega(t)$  [BIRNGRUBER *et al.*, 1985]:

$$\Omega(t) = A \int_0^{\tau} \exp \left[ \frac{-\Delta E}{R T(t)} \right] dt, \quad (2.1)$$

wobei  $A$  der Frequenzfaktor,  $\Delta E$  die Aktivierungsenergie,  $R$  die universelle Gaskonstante,  $T$  die Temperatur zum Zeitpunkt  $t$  und  $\tau$  die Heizdauer sind. Die Parameter  $A$  und  $\Delta E$  sind gewebeabhängig und müssen empirisch bestimmt werden. Im stark vereinfachten Model der thermischen Schädigung eines uni-molekularen Systems aus Gleichung 2.1 würde ein Kriterium von  $\Omega = 1$  bedeuten, dass 63 % aller Moleküle denaturiert sind. Für das Modell der Retina wird üblicherweise der ED50 Wert (die 50 %-ige Wahrscheinlichkeit einer sichtbaren Läsion) in der Fundusbeobachtung für  $\Omega = 1$  genutzt. Abbildung 2.8 zeigt exemplarisch den Zusammenhang des zeitlichen Temperaturverlaufs und der thermischen Schädigung bei retinaler Laserbestrahlung unter Verwendung eines Frequenzfaktors von  $A = 3 \cdot 10^{44} \text{ s}^{-1}$  und einer Aktivierungsenergie von  $\Delta E = 290 \text{ kJ/mol}$  [BIRNGRUBER *et al.*, 1985]. Die schwarze Kurve ( $\Omega = 1$ ) repräsentiert die Temperaturgrenze für jede Bestrahlungsdauer, ab der ein thermischer Schaden erwartet wird. Bei einer Bestrahlungsdauer von 200 ms (gelbe Kurve) ist demnach eine Temperatur von  $75,6^\circ\text{C}$  am Ende der Bestrahlung nötig, um thermischen Schaden zu erzielen. Die Verkürzung der Bestrahlung auf 50 ms (blaue Kurve) bedeutet eine Erhöhung der benötigten Endtemperatur auf  $82,0^\circ\text{C}$ , um den gleichen Schaden zu erzielen.



**Abbildung 2.8:** Zusammenhang zwischen zeitlichem Temperaturverlauf und thermischer Schädigung bei retinaler Photokoagulation

Auch wenn die akkurate Abschätzung des Zellschadens unter thermischen Stress deutlich komplexer ist, da eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse zum thermischen Schaden beitragen, deren Bedeutsamkeit für das Überleben der Zelle variiert und auch Reparaturmechanismen bei langen Bestrahlungen nicht außer acht gelassen werden können, soll das Arrhenius-Integral für die folgenden Simulationen in dieser Arbeit ausreichend sein, um einen Übergang von reiner thermischer Expansion zur Koagulation zu beschreiben.

### 2.3.1.2 Modellierung der Wärmeleitung im Gewebe

Zur Diskussion der in dieser Arbeit experimentell detektierten Gewebeveränderungen werden Vergleiche zu theoretisch ermittelten Daten gezogen. Die Grundlage dafür bildet die laserinduzierte Wärmeausbreitung im Gewebe. Das dafür genutzte Modell wird in diesem Kapitel vorgestellt.

Die durch Laserstrahlung im Gewebe entstehende Temperaturverteilung kann durch die Thermo-diffusionsgleichung beschrieben werden [BIRNGRUBER *et al.*, 1985; KANDULLA *et al.*, 2006]:

$$\frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \nabla^2 T = \frac{\varepsilon}{\rho c_p} - QT, \quad (2.2)$$

wobei  $\kappa$  die Temperaturleitfähigkeit,  $\rho$  der Dichte und  $c_p$  die spezifische Wärmekapazität des Gewebes sind. Die linke Seite der Gleichung beschreibt die räumliche und zeitliche Temperaturänderung aufgrund von Diffusionsprozessen, während die rechte Seite mit dem sogenannten Quellterm  $\varepsilon$  die im Medium deponierte Energie pro Volumeneinheit und Zeit darstellt. Neben Diffusion sorgt der Blutfluss in der Choroidea auch für Wärmekonvektion, die mit einem globalen Perfusionsterm  $\rho c_p QT$  berücksichtigt werden kann, der von dem Quellterm  $\varepsilon$  subtrahiert wird. Der Perfusionsterm wirkt wie eine Wärmesenke, indem eine bestimmte Wärmemenge mit konstanter Rate  $Q$  innerhalb des gesamten Volumens abgeführt wird. Es wird eine homogene und isotrope Wärmeleitung angenommen und die Lichtstreuung im Gewebe vernachlässigt.

Die analytische Lösung der Wärmeleitungsgleichung (Gl. 2.2) ergibt [ROIDER UND BIRNGRUBER, 1995; FREUND UND SLINEY, 1999],

$$T(\vec{r}, t) = \int_0^t dt' \int_{-\infty}^{+\infty} dr' G(\vec{r}, \vec{r}', t, t') \varepsilon(\vec{r}', t') \exp(-Qt'), \quad (2.3)$$

mit:

$$G(\vec{r}, \vec{r}', t, t') = \frac{\theta(t-t') \exp[-|r-r'|/4\kappa(t-t')]}{8\rho c_p [\pi\kappa(t-t')]^{3/2}}. \quad (2.4)$$

$G$  ist die Greensche Funktion und  $\theta$  die Heaviside Funktion. Die indizierten Variablen  $\vec{r}'$  und  $t'$  in Gleichung 2.4 bezeichnen Ort und Zeit der Quelle, während die nicht indizierten Variablen sich auf Beobachtungsort und -zeit beziehen. Der Quellterm  $\varepsilon$  ist vom Strahlprofil des Laserspots abhängig. Um die Wärmeleitungsgleichung analytisch zu lösen wird eine geometrische Vereinfachung angenommen: der runde Laserspot mit dem Radius  $r$  wird mit einem quadratischen Spot mit der Seitenlänge  $2a$  approximiert, wobei für die Seitenlänge  $2a = r\sqrt{\pi}$  gewählt wird, damit die Fläche beider Geometrien gleich ist. Unter dieser Annahme ergibt sich bei einer absorbierenden Schicht mit der Dicke  $d$  und dem Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  die Intensität der Strahlung  $I(x, y, z)$  aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$I(x, y, z) = \begin{cases} I_0 & \text{für } 0 \leq |x| \leq a, 0 \leq |y| \leq a \text{ und } z < 0 \\ I_0 e^{-\mu_a z} & \text{für } 0 \leq |x| \leq a, 0 \leq |y| \leq a \text{ und } 0 \leq z \leq d \\ I_0 e^{-\mu_a d} & \text{für } 0 \leq |x| \leq a, 0 \leq |y| \leq a \text{ und } d < z \end{cases} \quad (2.5)$$

Die Energie, die pro Volumeneinheit und Zeit deponiert wird, ist die negative Ableitung von Gleichung 2.5:

$$\varepsilon(x, y, z, t) = \begin{cases} \mu_a I_0 e^{-\mu_a z} & \text{für } 0 \leq |x| \leq a, 0 \leq |y| \leq a, 0 \leq z \leq d \text{ und } 0 \leq t \leq \tau, \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.6)$$

wobei  $\tau$  die Bestrahlungsdauer ist. Unter Verwendung von Gleichung 2.6, für den Quellterm  $\varepsilon$ , kann die Gleichung 2.3 analytisch gelöst werden [FREUND UND SLINEY, 1999]:

$$\begin{aligned}
 T(\vec{r}, t) = & \frac{\mu_a I_0}{8\rho c_p} \int_0^t dt' \theta(\tau + t' - t) \exp(-\mu_a z + \mu_a^2 \kappa t' - Qt') \\
 & \times \left[ \operatorname{erf}\left(\frac{x-a}{2\sqrt{\kappa t'}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{x+a}{2\sqrt{\kappa t'}}\right) \right] \\
 & \times \left[ \operatorname{erf}\left(\frac{y-a}{2\sqrt{\kappa t'}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{y+a}{2\sqrt{\kappa t'}}\right) \right] \\
 & \times \left[ \operatorname{erf}\left(\frac{z}{2\sqrt{\kappa t'}} - \mu_a \sqrt{\kappa t'}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{z-d}{2\sqrt{\kappa t'}} - \mu_a \sqrt{\kappa t'}\right) \right].
 \end{aligned} \tag{2.7}$$

Gleichung 2.7 wurde in Mathematica (Wolfram Research, Inc.) implementiert, um die Temperaturerhöhung verschiedener Leistungen und Bestrahlungsdauern für veränderliche Spottdurchmesser in allen drei Raumrichtungen während und nach der Bestrahlung zu berechnen. Aufgrund des Superpositionsprinzips können mehrschichtige Medien simuliert werden, indem die Temperaturerhöhungen der einzelnen Schichten addiert werden.

In dieser Arbeit werden Schweineaugen *ex-vivo* als Versuchsobjekt genutzt, da sie in Größe und Aufbau dem menschlichen Auge ähneln. Daher werden für die Simulationen, die als Vergleich zu den experimentell gewonnenen Daten dienen sollen, die Parameter des menschlichen Auges zugrunde gelegt. Die Geometrie sowie die optischen Eigenschaften des menschlichen Fundus können stark schwanken, wodurch es schwierig ist, ein allgemeingültiges Modell für die Temperaturerhöhung bei retinaler Photokoagulation anzugeben.

Das Modell, das in dieser Arbeit genutzt wird (siehe Abb. 2.9), besteht aus zwei Schichten: dem 10  $\mu\text{m}$  dicken RPE, wobei sich die absorbierenden Melanosome in den vorderen 6  $\mu\text{m}$  befinden und der Choroidea, für die eine Dicke von 400  $\mu\text{m}$  angenommen wird [GABEL, 1974; KANDULLA, 2009]. Die Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  werden für die Schichten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus der jeweiligen Absorption, welche aus HAMMER *et al.* [1995] entnommen sind und der Schichtdicke bestimmt. Für die Retina wird die Absorption von 0 angenommen und es wird weiterhin angenommen, dass Licht, was die Sklera erreicht, aus dem betrachteten Volumen heraus gestreut wird. Die Schichten werden als unendlich ausgedehnt angenommen und haben alle die gleichen materialspezifischen Parameter, deren Temperaturabhängigkeit in den hier simulierten Bereichen der Temperaturänderung vernachlässigt werden kann. Für die materialspezifischen Parameter werden aufgrund des hohen Wasseranteils in biologischen Gewebe (70-80 %) jene von Wasser angenommen.

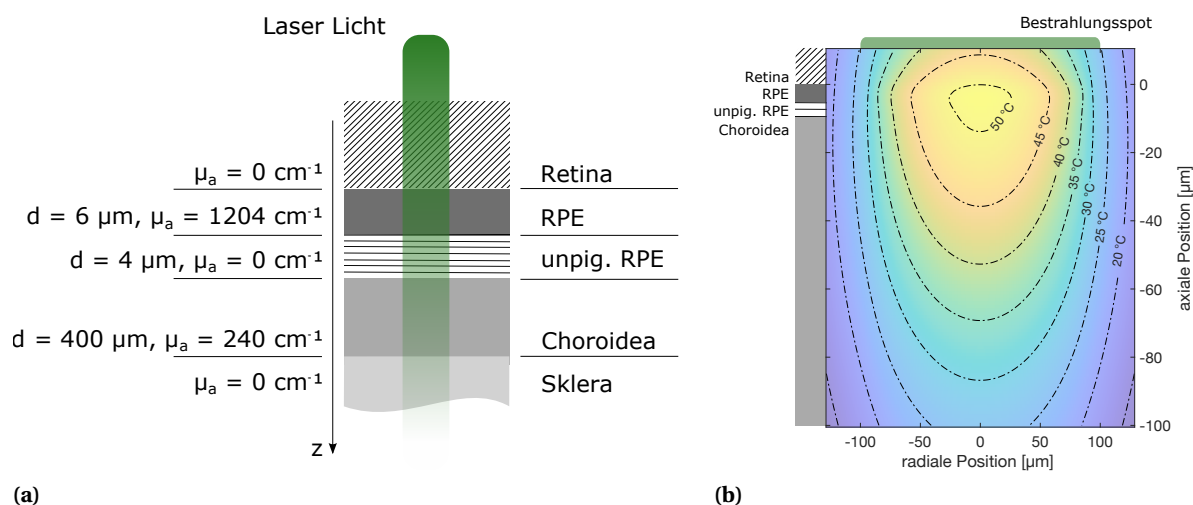
Die für die Simulation genutzten Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 2.1 zu finden.

### 2.3.2 Photokoagulation (PK)

Typischerweise werden heutzutage frequenzverdoppelte Nd:YAG- (532 nm) oder gelbe Halbleiterlaser (577 nm) für die retinale Photokoagulation verwendet [PALANKER, 2016]. Im grünen Wellenlängenbereich werden nur etwa 5 % der eingestrahnten Energie in der neuronalen Retina absorbiert, durchschnittlich 45 % im RPE und die restlichen etwa 50 % in der Choroidea [SRAMEK *et al.*, 2009], wobei diese Zahlen individuell und lokal stark schwanken können. Der Hauptabsorber ist Melanin im RPE und Melanin sowie Hämoglobin im Choroid. Bei Bestrahlungsdauern zwischen 10 ms und 200 ms werden bei der Photokoagulation vorübergehende Temperaturerhöhungen von einigen 10 K erzielt. Bei längeren Bestrahlungszeiten breitet sich die erzeugte Hitze von RPE und Choroidea bis in die Retina aus, wo sie zur Koagulation der Photorezeptoren und in manchen Fällen sogar der inneren Retina führt. Der Trend geht eher zu geringeren Bestrahlungsdauern, um starke thermische Belastung des umgebenden Gewebes und Schmerzempfindung mit zu langen Einwirkzeiten zu

**Tabelle 2.1:** Schichtdicken, Absorptionskoeffizienten und materialspezifische Parameter des menschlichen Fundus, wie im numerischen Modell verwendet. Daten aus [GABEL, 1974; KANDULLA, 2009; HAMMER *et al.*, 1995]

Beschreibung	Symbol	Wert
Dicke pigmentiertes RPE	$d_{\text{RPE}}$	6 $\mu\text{m}$
Dicke unpigmentiertes RPE	$d_{\text{unp.}}$	4 $\mu\text{m}$
Dicke Choroidea	$d_{\text{CHOR}}$	400 $\mu\text{m}$
Absorptionskoeffizient RPE	$\mu_a^{\text{RPE}}$	1204 $\text{cm}^{-1}$
Absorptionskoeffizient Choroidea	$\mu_a^{\text{CHOR}}$	240 $\text{cm}^{-1}$
Transmission durchs Auge	$\text{transm}_{\text{eye}}$	1
Dichte	$\rho$	0,993 $\text{g}/\text{cm}^3$
spez. Wärmekapazität	$c_p$	4,179 $\text{J}/\text{gK}$
Temperaturleitfähigkeit	$\kappa$	$1,51 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$



**Abbildung 2.9:** Zur Temperatursimulation genutzte Geometrie des Fundus

(a) Anordnung der für die Simulation genutzten Fundusschichten. (b) Beispiel einer simulierten Temperaturverteilung in diesen Schichten, bei einer Bestrahlung mit 30 mW über 200 ms und einem Fleckdurchmesser von 200  $\mu\text{m}$ .

vermeiden [MUQIT *et al.*, 2010]. Bei Bestrahlungszeiten unter 10 ms wird die Gefahr einer Netzhautruptur immer größer, da aufgrund der geringeren Bestrahlungszeiten höhere Leistungen benötigt werden, um die gleichen Schäden zu erzielen [JAIN *et al.*, 2008]. Dadurch kann die Temperatur allerdings die Vaporisationsschwelle überschreiten, was zu einer vorübergehenden Dampfblase führen kann, welche eine Netzhautruptur zur Folge haben kann. Die Bestrahlungszeit hat also einen entscheidenden Einfluss auf das therapeutische Fenster, das Verhältnis jener Energien zur Erzeugung einer Ruptur und einer leichten Läsion. Die bei der Photokoagulation verwendeten Spotgrößen variieren je nach Therapie und Position des Spots auf dem Fundus zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  [VON DER BURCHARD UND ROIDER, 2020].

Photokoagulation hat sich z. B. bei der proliferativen diabetischen Retinopathie als eine sichere und effektive Behandlungsoption herausgestellt. Indem eine erhebliche Anzahl (etwa 30 %) der Photorezeptoren, der zahlreichste und metabolisch aktivste Zelltyp der Retina, koaguliert werden, kann der Stoffwechselbedarf deutlich gesenkt werden, was folglich die Produktion von angiogenen Faktoren reduziert. Dadurch kann die Gefahr eines zentralen Sehverlustes durch Neovaskularisation deutlich verringert werden, was die Nebenwirkungen dieser panretinalen Photokoagulation, eine Einschränkung des peripheren Gesichtsfeldes und leichte Nachtblindheit, erträglich macht [EARLY

TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP, 1985].

Durch die Wahl geeigneter Bestrahlungsparameter ist es möglich, nur RPE und Photorezeptoren zu schädigen und die innere Körnerschicht und Ganglienzellen zu erhalten. Damit können schwere Bogendefekte im Sehfeld verhindert werden, ebenso starke, sich über die Zeit ausbreitende Narbenbildung und damit einhergehende Skotome [PALANKER, 2016]. Weiterhin scheinen bei leichten Läsionen die entstehenden Glianarben, welche anstelle der Photorezeptoren entstehen, sich im Laufe der Zeit zu verengen und dabei Photorezeptoren aus angrenzenden Regionen in die Läsion zu ziehen. Die wandernden Photorezeptoren können sich neu mit lokalen Bipolarzellen verschalten und gewisse Signalwege innerhalb der Läsion erhalten [SHER *et al.*, 2013].

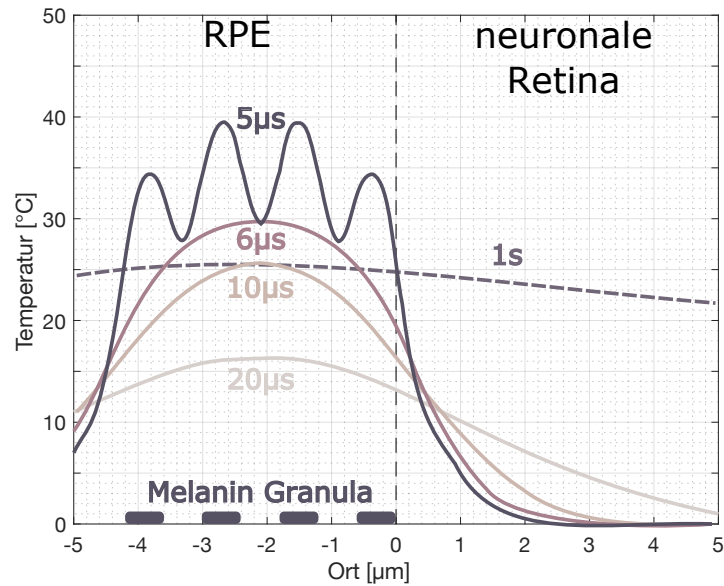
Die geeigneten Laserparameter für ein gezieltes Ausmaß einer Läsion zu finden, stellt allerdings ein großes Problem der Photokoagulation dar. Starke Schwankungen in der Pigmentierung von RPE und Choroidea zwischen verschiedenen Patienten, aber auch innerhalb desselben Auges bis zu einem Faktor von zwei, verlangen eine Anpassung der Laserleistung oder Bestrahlungsdauer für einheitliche Läsionen [SCHMIDT UND PEISCH, 1986; GEERAETS *et al.*, 1962]. Bisher kann nur die Weißfärbung, die bei der Koagulation der Photorezeptoren entsteht, als Dosiskontrolle herangezogen werden. Diese entsteht allerdings erst nach der Bestrahlung und gibt keinen Aufschluss über die korrekte Dosis an der nächsten Behandlungsposition. Eine objektive Echtzeit Überwachung während der Bestrahlung wäre für eine präzise Dosierung der applizierten Energie nötig. Im klinischen Einsatz befinden sich momentan noch keine Dosimetrieverfahren, es werden allerdings verschiedene Ansätze erforscht, die im nächsten Kapitel genauer beschrieben werden.

### 2.3.3 Selektive Retina Therapie (SRT)

Die Zerstörung von Photorezeptoren während der Photokoagulation, die zwangsläufig zu einer Funktionseinschränkung führt, ist in der Makula und besonders in der Fovea unerwünscht. Bestimmte Krankheitsbilder wie das diabetisches Makulaödem, Drusen oder zentrale seröse Netzhautschädigung werden außerdem eher mit einer verminderten Funktion des RPE assoziiert, und ein therapeutischer Effekt wird in einer Regeneration der RPE-Zellen durch Proliferation und Migration, als einer Zerstörung der Retina vermutet. ANDERSON UND PARRISH [1983] veröffentlichten unter dem Begriff der selektiven Photothermolyse das Konzept der selektiven Schädigung von pigmentierten Zellen in einer Umgebung von unpigmentierten Zellen, bzw. Geweben mit unterschiedlicher Absorption. Durch ausreichend kurze Pulse, kürzer als die thermische Relaxationszeit des Gewebes, lässt sich die um stark absorbierende Strukturen entstehende hohe Temperatur auf diese Strukturen beschränken, auch bei großflächiger Ausleuchtung.

Auf die stark mit Melanin versetzte RPE-Zellmonoschicht, umgeben von nahezu transparenten Photorezeptoren, kann dieses Modell angewendet werden und ROIDER *et al.* [1992] konnten zuerst die selektive RPE-Schädigung in Kaninchenaugen mit  $5\ \mu\text{s}$  Argon Laserpulsen bei einer Repetitionsrate von 500 Hz zeigen. Vier Wochen nach der Behandlung war die morphologisch intakte RPE-Zellmonoschicht wiederhergestellt, nachdem die Läsionen wieder mit RPE-Zellen bedeckt waren. Es wurde zunächst angenommen, dass thermische Effekte [ROIDER *et al.*, 1993] zu der selektiven Schädigung führen. ROIDER *et al.* [1993] zeigten mit ihrem thermischen Modell, unter Berücksichtigung der Granularität des absorbierenden Melanins, dass eine selektive Erwärmung des RPE mit  $\mu\text{s}$ -Pulsen möglich ist. Abbildung 2.10 zeigt das axiale Temperaturprofil entlang des RPE und der angrenzenden neuronalen Retina im Zentrum des Laserstrahls für eine  $5\ \mu\text{s}$  Bestrahlung mit  $5,5\ \mu\text{J}$  Pulsenergie. Zusätzlich ist die Temperaturverteilung zu weiteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung gezeigt. Im Vergleich zu einer Bestrahlung von 1 s (ebenfalls in Abb. 2.10) zeigt sich ein starker Temperaturgradient an der Grenze zwischen RPE und neuronaler Retina bei einer  $5\ \mu\text{s}$  Bestrahlung.

LIN UND KELLY [1998] zeigten die Vaporisation um Mikroabsorber nach deren Erwärmung mit Nano- und Pikosekunden Pulsen und widerlegten die Theorie der rein thermischen Schädigung. Der Zelltod wird demnach durch thermomechanische Zerstörung der Zellstrukturen aufgrund des



**Abbildung 2.10: Berechnung der Temperaturverteilung um die RPE-Zellen während der SRT**

Axiales Temperaturprofil im RPE und der angrenzenden neuronalen Retina zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit einem  $5,5 \mu\text{J}$  ( $5 \mu\text{s}$ ) Laserpuls. Die gestrichelte Linie zeigt das Temperaturprofil einer langen 1 s Bestrahlung zum Vergleich. (In Anlehnung an ROIDER *et al.* [1993])

stark ansteigenden Zellvolumens während der Lebenszeit der um Melanosomen entstehenden Mikroblasen ( $\mu\text{B}$ ), hervorgerufen [NEUMANN UND BRINKMANN, 2006]. Sowohl bei zentralen serösen Netzhautschädigungen [FRAMME *et al.*, 2015; KLATT *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2016] als auch bei diabetischen Makulaödemem [ROIDER *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2016] wurde der positive Effekt der SRT nachgewiesen und ebenso der Erhalt der retinalen Funktion [KIM *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015].

Typischerweise wird ein gütegeschalteter, frequenzverdoppelter Nd: YLF-Laser bei 527 nm verwendet, um 15 bis 100 Pulse mit einer Dauer von je  $1,7 \mu\text{s}$  und einer Repetitionsrate von 100 Hz zu applizieren.

### 2.3.4 Argonlaser Trabekuloplastik (ALT)

Die Option, einen Koagulationslaser wie für den Augenhintergrund auch in Kammerwinkel und Iris anzuwenden, schien recht offensichtlich und in den 70ern zeigten WISE UND WITTER [1979] einen Augeninnendruck senkenden Effekt unter Verwendung eines Argonlasers (488 nm oder 514 nm). Sie applizierten etwa 100 Läsion bei 1 bis  $1,5 \text{ W}$  mit einer Pulsdauer von 0,1 s und einem Spotdurchmesser von  $50 \mu\text{m}$  im Kammerwinkel. Es werden typischerweise 50 bis 100 Spots in  $180^\circ$  bis  $360^\circ$  des Kammerwinkels appliziert, wobei der Endpunkt eines jeden Spots ein leichtes Ausbleichen bzw. eine Weißfärbung ist. Mit dieser Argonlaser Trabekuloplastik (ALT) ließ sich eine äquivalente Druckkontrolle wie mittels Filtrationschirurgie (Trabekulektomie) erzeugen [WISE UND WITTER, 1979]. ALT erwies sich bei Patienten mit primären Offenwinkelglaukom als mindestens genauso effektiv wie 0,5 % Timolol als Primärtherapie [GLAUCOMA LASER TRIAL RESEARCH GROUP, 1990, 1995]. Aber auch bei bestimmten sekundären Glaukomformen, wie Pigment- und Pseudoexfoliationssyndrome gilt ALT als sichere und effektive Alternative. Auch nach mehreren Jahren ist eine Drucksenkung zu verzeichnen [DAMJI *et al.*, 1999], allerdings ist ALT über  $360^\circ$  hinaus nicht wiederholbar, da aufgrund der Narbenbildung die Gefahr für folgenden Druckanstieg besteht und die Effizienz als eher gering gilt. Die Laserbehandlung hat koagulativen Schaden im Trabekelwerk zur Folge, worauf sich das Gewebe um geschädigte Zonen zusammen zieht und wahrscheinlich zu einer Vergrößerung der

Poren im umliegenden Gewebe und somit zu einem erhöhten Abfluss führt.

### 2.3.5 Selektive Lasertrabekuloplastik (SLT)

Etwa zeitgleich zur Entwicklung der SRT wurde das Prinzip der selektiven Photothermolyse auch auf die pigmentierten Zellen des Trabekelmaschenwerks im Kammerwinkel angewandt und von LATINA UND PARK [1995] als selektive Lasertrabekuloplastik (SLT) unter Verwendung eines frequenzverdoppelten gütegeschalteten Nd:YAG Lasers bei 532 nm vorgestellt. Es werden Pulse von 3 ns Dauer mit einer Spotgröße von 400 µm im Kammerwinkel appliziert, welche die gesamte anteroposteriore Höhe des Trabekelwerks abdeckt [LATINA *et al.*, 1998; DAMJI *et al.*, 2006]. Im Gegensatz zu ALT zeigte SLT keine koagulativen Schäden und strukturellen Veränderungen im Trabekelwerk [KRAMER UND NOECKER, 2001], was die SLT zu einem sichereren und wiederholbaren Verfahren macht. Eine etwa gleich effektive IOD-Reduktion wurde im Vergleich zu ALT [DAMJI *et al.*, 1999; JUZYCH *et al.*, 2004; MARTINEZ-DE-LA CASA *et al.*, 2004] und zu Prostaglandin-Analoga [MCILRAITH *et al.*, 2006] gezeigt. In einer multizentrischen, randomisierten, kontrollierten Studie [GAZZARD *et al.*, 2019] wird SLT als sichere und effektive First-Line-Behandlung vorgeschlagen, da eine überlegene IOD Stabilität im Vergleich zu topischen Medikamenten gefunden wurde, bei gleichzeitig geringeren Behandlungskosten. Nahezu drei Viertel der Patienten der SLT Gruppe hielten ihren Ziel IOD nach mindestens drei Jahren ohne die Anwendung zusätzlicher Medikamente [GAZZARD *et al.*, 2019]. Der einzige Faktor für eine Vorhersage des Erfolges der Behandlung ist der Ausgangswert des IOD, andere wie Alter, Geschlecht, Art des Glaukoms oder Pigmentierung des Trabekelwerks hatten keinen Einfluss [HODGE *et al.*, 2005]. SLT kann auch bei Patienten mit nicht erfolgreicher ALT effektiv den Druck senken [KANO *et al.*, 1999; DAMJI *et al.*, 1999], obwohl die Anzahl der möglichen Wiederholungen der SLT nicht bekannt ist [STEIN UND CHALLA, 2007].

Der genaue Mechanismus der IOD-Reduktion ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass biologische Veränderungen auf zellulärer Ebene nach der Laserbehandlung einen erhöhten Ausfluss des Kammerwassers auslösen, da keine morphologischen Veränderungen gefunden wurden. Als solche biologischen Effekte wurden Veränderungen in der Genexpression und der Zytokinsekretion sowie die Induktion von Matrixmetalloproteinase, eine erhöhte Zellteilung, die Wiederbesiedlung geschädigter Gebiete und der Rekrutierung von Makrophagen berichtet [KAGAN *et al.*, 2014]. In einigen Studien wurde auch eine Drucksenkung im unbehandelten Auge nachgewiesen [LATINA *et al.*, 1998; MCILRAITH *et al.*, 2006], was die Theorie der Wirkungsweise auf biologischer, nicht struktureller Ebenen bestärkt.

Es gibt kein standardisiertes Protokoll für die SLT. Eine Variation der Anzahl von applizierten Flecken von 50 bis 100 sowie eine Varianz der behandelten Fläche von 180° bis 360° sind der Literatur zu entnehmen [SAMPLES *et al.*, 2011]. NAGAR *et al.* [2005] verglichen 90°, 180° und 380° SLT mit Medikamenten und stellten fest, dass 180° und 360° wirksam sind (allerdings ohne signifikanten Unterschied), 90° SLT jedoch nicht. Auch die Energielevel pro Spot und die insgesamt eingebrachte Energie ist nicht festgelegt. In ihrer initialen Studie schlugen LATINA *et al.* [1998] vor, die Energie auf 0,8 mJ einzustellen und sie in Schritten von 0,1 mJ zu verringern, bis kein sichtbarer Effekt oder keine Blasenbildung (makroskopische, champagnerartige Blasen [MB]) beobachtet wurde. Die Behandlung wurde dann bei diesem Energieniveau durchgeführt, und jeder applizierte Puls wurde überwacht, um die Energie anzupassen, falls erneut Blasenbildung auftritt.

Es werden typischerweise Laserenergien pro Puls zwischen 0,6 mJ und 1,2 mJ bei einem Fleckdurchmesser von 400 µm verwendet [SAMPLES *et al.*, 2011], die optimale Energieeinstellungen werden allerdings noch untersucht. Es wurde gezeigt, dass SLT mit niedrigerer Energie (0,3 mJ – 0,5 mJ über 360°, die Hälfte der konventionellen Energie) den gleichen IOD-Senkungseffekt im Vergleich zu SLT mit konventioneller Energieeinstellung hat, allerdings mit weniger Nebenwirkungen [TANG *et al.*, 2011]. Im Gegensatz dazu zeigten LEE *et al.* [2015], dass eine höhere Gesamtenergie (214,6 mJ – 234,9 mJ im Vergleich zu 100 mJ) mit einer verbesserten Senkung des Augeninnendrucks einher zugehen

scheint, allerdings weist diese Studie nur eine geringe Stichprobengröße und eine kurze Nachbeobachtungszeit auf. Die optimale Dosierung und der Endpunkt der SLT sowie das therapeutische Fenster scheinen noch umstritten zu sein.

## 2.4 Monitoringmethoden

Die meisten im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Laseranwendungen haben einen entscheidenden Nachteil, der verantwortlich sein kann, dass bei vielen Erkrankungen die medikamentöse Therapie vorgezogen wird. Dieser Nachteil besteht in einer unzureichenden Kontrolle über die im Gewebe deponierten Energie und somit über den erzeugten Schaden. Im Falle von SRT und SLT, wo gezielt pigmentierte Zellen durch  $\mu\text{B}$  zerstört werden sollen, bleibt sowohl das Auftreten der  $\mu\text{B}$  als auch der eigentliche Zellschaden dem behandelten Arzt im Moment der Bestrahlung unsichtbar. Bei der SLT wird daher versucht, kurz unterhalb der Energieschwelle für MB zu behandeln. Diese MB sind vermutlich etwa 10-fach oberhalb der Grenzenenergie zur Erzeugung von  $\mu\text{B}$  [LIN, 2003]. Damit scheint der aktuelle Endpunkt der Behandlung deutlich über der Schwelle des selektiven Zellschadens zu liegen und dieser Endpunkt ist weiterhin nicht präzise für jeden Puls einstellbar, was die Gefahr von Unter- aber auch Überbehandlung birgt. Eine Überbehandlung wäre bei der SRT in der Nähe der Retina deutlich dramatischer, daher wird bei der SRT vor der Behandlung in der Peripherie eine Titration mittels Fluoreszenzangiographie durchgeführt, um eine geeignete Behandlungsenergie zu finden. Dadurch lassen sich allerdings nur interindividuelle Abweichungen berücksichtigen, jedoch nicht die Unterschiede der Pigmentierung des RPE und Choroidea innerhalb eines Auges, die um einen Faktor von bis zu drei schwanken können [SCHMIDT UND PEISCH, 1986; GEERAETS *et al.*, 1962].

Hier liegt auch das Problem der Photokoagulation begründet, wo die Weißfärbungen erst nach dem Applizieren eines jeden Spots erfolgt und bei ungleichmäßiger Pigmentierung eben keine Rückschlüsse auf die nachfolgenden Behandlungsstellen bietet. Mit dem Trend hin zu immer kürzeren Bestrahlungsdauern und dem damit einhergehenden kleineren therapeutischen Fenster wird ein objektives Monitoring unabdingbar, um die große Variation des Behandlungsergebnisses mit im schlimmsten Fall Netzhautrupturen oder Blutungen zu verhindern.

Der Bedarf eines Feedbacks zur Dosiskontrolle wurde schon in den 70er-Jahren erkannt, und BIRNGRUBER *et al.* [1977] versuchten das zurückgestreute Licht während der Argonlaser-Koagulation zu nutzen. Auch wenn die temperaturbedingte Gewebereaktion sich in der Rückstreuung zeigt, verhinderte die spät einsetzende Zunahme der Gewebestreuung und der zu große Einfluss von Bewegungsartefakten *in-vivo* den Einzug dieser Methode in die klinische Praxis [INDERFURTH *et al.*, 1994]. Die damals optisch beobachteten Gewebsveränderungen setzten zu spät ein, um direkt während der Bestrahlung eine Dosimetrie durchzuführen. Aktuelle Ansätze zum objektiven Feedback werden im Folgenden beschrieben.

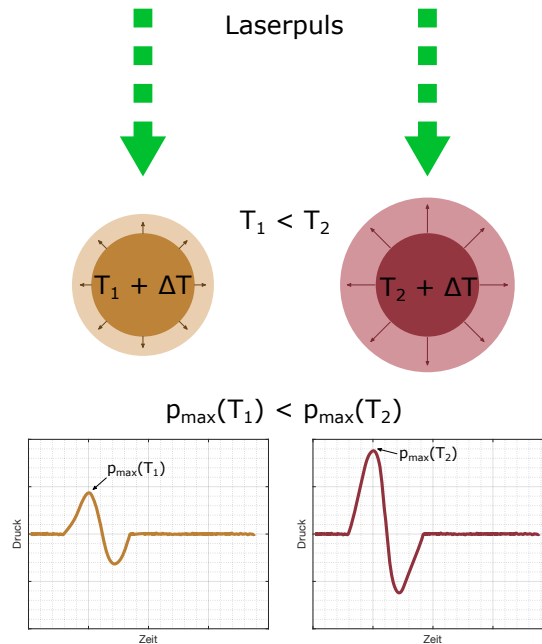
### 2.4.1 Optoakustische Temperaturmessung während der Photokoagulation

Der Ansatz, optoakustisch die Temperatur zu bestimmen, wurde erstmals durch SCHUELE *et al.* [2000] für die SRT beschrieben. KANDULLA *et al.* [2006] haben das Verfahren für Dauerstrichbestrahlung der Retina erweitert und die Methode ist erfolgreich während der Photokoagulation an Patienten getestet [BRINKMANN *et al.*, 2012]. Eine temperaturgestützte Regelung der Leistung, um eine bestimmte Zieltemperatur auch unterhalb der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit zu erreichen, wurde an Kaninchenaugen demonstriert [BAADE *et al.*, 2017]. Dafür kommt neben dem frequenzverdoppeltem Nd:YAG Laser ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) zum Heizen ein zweiter gepulster Nd:YLF Laser ( $\lambda = 523 \text{ nm}$ ) mit einer Repetitionsrate von 1 kHz und einer Pulsdauer von 75 ns zum Einsatz. Die durch diesen Messlaser im Auge erzeugten Druckwellen werden durch einen piezoelektrischen Schallwandler, der in das Kontaktglas integriert ist, detektiert. Die Temperatur kann dann indirekt durch die Erhöhung der Amplitude des optoakustischen Signals aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Grüneisenparameters des Gewebes gemessen werden.

### 2.4.1.1 Messung der Temperatur

Wenn Laserstrahlung im Gewebe absorbiert wird, entsteht aufgrund der thermischen Expansion ein Druck im Gewebe, der abhängig ist vom Absorptionskoeffizienten  $\alpha$ , der Bestrahlung  $H$ , der Absorbertiefe  $z$  und dem temperaturabhängigen Grüneisen-Parameter  $\Gamma$  des Mediums. Für Laserpulse, die kurz genug sind, um das Kriterium des akustischen Einschlusses zu erfüllen, kann der Druck, der in einem homogen absorbierenden und nicht streuenden Medium entsteht, folgendermaßen beschrieben werden [KANDULLA *et al.*, 2006]:

$$p_o(z, T) = \alpha H \Gamma(T) e^{-\alpha z}. \quad (2.8)$$



**Abbildung 2.11: Prinzip der optoakustischen Temperaturbestimmung**

Die thermisch induzierte Expansion eines Absorbers durch die Bestrahlung mit Laserpulsen und die nachfolgende Aussendung einer bipolaren Druckwelle. Die Amplitude des detektierten optoakustischen Signals ist dabei abhängig von der Ausgangstemperatur des Gewebes, wenn es durch den Messlaser zusätzlich um eine konstante  $\Delta T$  erwärmt wird. (In Anlehnung an KANDULLA [2009])

Der dimensionslose, materialspezifische Grüneisen-Parameter  $\Gamma$  ist von der Temperatur  $T$  abhängig und beschreibt das Verhältnis zwischen Druckanstieg und Dichte der absorbierten Energie. Er kann über:

$$\Gamma(T) = \frac{\beta(T) c_0^2(T)}{c_p(T)}, \quad (2.9)$$

aus  $\beta$ , dem Volumenausdehnungskoeffizient,  $c_0$ , der Schallgeschwindigkeit und  $c_p$ , der spezifischen Wärmekapazität des Materials berechnet werden. Durch den temperaturinduzierten Druck wird eine Druckwelle abgestrahlt, deren maximale Amplitude in einiger Distanz direkt proportional zur Bestrahlung und dem Grüneisen-Parameter ist:

$$p_{\max}(T) \sim H \Gamma(T). \quad (2.10)$$

Die Druckwelle breitet sich mit Schallgeschwindigkeit durch das Gewebe und im akustischen Kontakt befindlichen Medien aus und kann von einem Sensor erfasst werden.

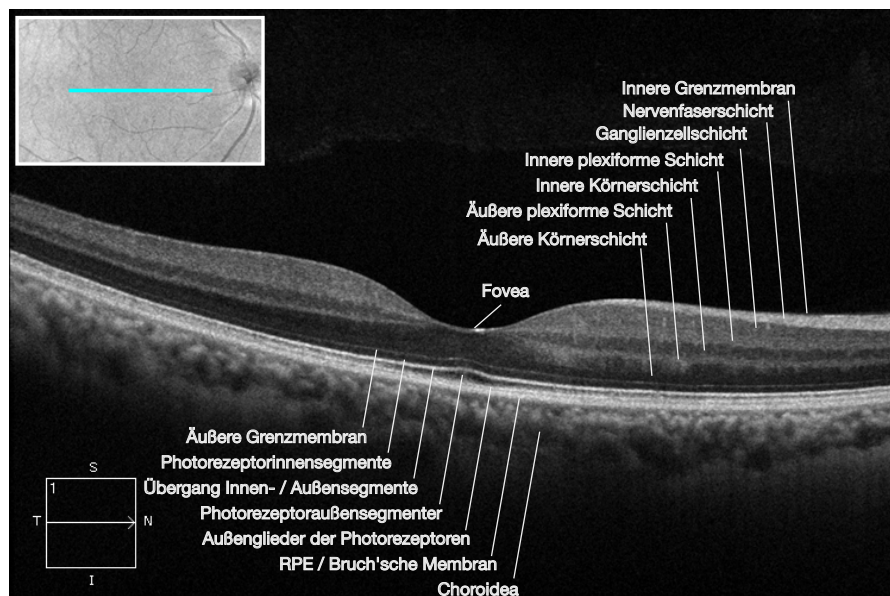
Das Maximum der Druckwelle ist abhängig von der Temperatur im Gewebe, da der volumetrische Ausdehnungskoeffizient und damit der Grüneisen-Parameter ebenfalls von der Temperatur abhängen. Die Amplitude des detektierten optoakustischen Signals ist also unterschiedlich, wenn das Gewebe mit unterschiedlicher Anfangstemperatur zusätzlich um ein konstantes  $\Delta T$  durch den Messlaser erwärmt wird, wie in Abbildung 2.11 verdeutlicht ist. Der Temperaturanstieg  $T_{OA}$  während der laserinduzierten Gewebeerwärmung kann folgendermaßen aus der Amplitude der detektierten Druckwelle  $p_{\max}$  errechnet werden [KANDULLA *et al.*, 2006]:

$$T_{OA}(t) = T(p_{\max}, t) = T_{\max} - \sqrt{(T_{\max} - T_0)^2 + \frac{p_{\max}(t)}{S \cdot E_p}}, \quad (2.11)$$

mit  $E_p$  als Energie des Messlaserpulses.  $T_{\max}$  und  $T_0$  sind gewebespezifische Parameter, die von SCHLOTT *et al.* [2012] experimentell für Schweineaugen mit  $T_0 = (-17,0 \pm 5,0)^\circ\text{C}$  und  $T_{\max} = (93,3 \pm 15,6)^\circ\text{C}$  bestimmt wurden.  $S$  ist eine Proportionalitätskonstante, die für jede Koagulationsstelle variiert und von gewebespezifischen Variablen, wie der Lichtdurchlässigkeit der Augenmedien, der Pigmentierung des Fundus, der Abschwächung der Druckwelle und den Empfangseigenschaften des Schallwandlers abhängt. Sie wird an jeder neuen Messposition durch Messpulse mit bekannter Energie ermittelt, indem  $p_{\max}$  bei bekannter Temperatur  $T = T_{\text{ref}}$  (Körpertemperatur) bestimmt wird. Die mittels Gleichung 2.11 ermittelte Temperatur  $T_{OA}$  stellt eine über das bestrahlte Volumen gewichtete Temperatur dar und kann durch eine zeitabhängige Konversionsfunktion  $f(t)$  in die Maximaltemperatur  $T_{\text{peak}}$  im Zentrum des bestrahlten Areal und direkt oberhalb des RPE überführt werden [BRINKMANN *et al.*, 2012].

#### 2.4.2 OCT während der Photokoagulation

Die optische Kohärenztomografie (OCT) ist gerade in der Augenheilkunde ein etabliertes diagnostisches Verfahren und ermöglicht die Darstellung von Gewebeeränderungen in hoch aufgelösten Schnittbildern nach der Photokoagulation von Patienten [FRAMME *et al.*, 2009]. In Abbildung 2.12 ist ein OCT-Bild einer gesunden Retina zu sehen.

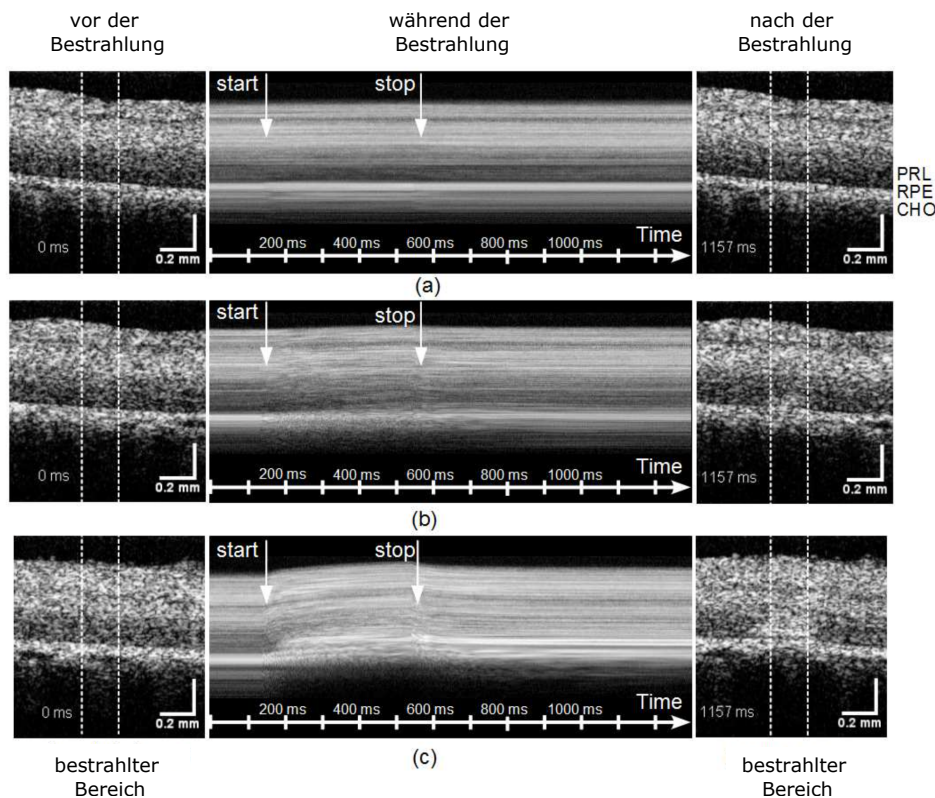


**Abbildung 2.12:** OCT B-Scan einer gesunden Retina

Aufgenommen mit einem Cirrus Photo 600, Carl Zeiss Meditec AG. Dem OCT-Scan überlagert ist das Fundusfoto, in dem die Position des Scans gezeigt ist.

Allerdings bietet sie sich dank ihrer hohen Messgeschwindigkeit ebenso für die Überwachung dynamischer Prozesse im Gewebe während der Bestrahlung an und hat gegenüber dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen optoakustischen Ansatz den Vorteil, dass auch eine räumliche Auflösung möglich ist. OCT misst tiefenaufgelöst Phasen und Amplituden des gestreuten Lichtes. Es liefert somit umfassendere Informationen über Veränderungen im Gewebe in der Tiefe und ermöglicht eine verbesserte Einsicht in die Abläufe während der Bestrahlung.

Mittels phasensensitiver OCT können neben veränderter Streueigenschaften während der Koagulation auch Phaseninformationen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ausgewertet werden. In Studien zur Dosimetrie der Photokoagulation mithilfe von OCT [MÜLLER *et al.*, 2012; MÜLLER, 2013] wurden Läsionen nach ophthalmoskopischer Sichtbarkeit in: *nicht sichtbar*, *leicht sichtbar* und *stark sichtbar* unterteilt. Bei unter-schwelligem Läsionen wurde keine Veränderung der Streuung im B-Scan und auch keine histologischen Änderungen im Gewebe festgestellt. Allerdings konnten durch Bestimmung der Phasendifferenz Gewebeverschiebungen detektiert werden. Weiterhin wurde eine gute Übereinstimmung zwischen dem optoakustisch gemessenen Temperaturverlauf und der aus Phasendifferenzen bestimmten Gewebeverschiebung, hervorgerufen durch thermische Expansion, gefunden. Die lokale Expansion, gemittelt im Bereich von RPE und Choroidea, folgt im zeitlichen Verlauf ebenfalls der Temperatur.

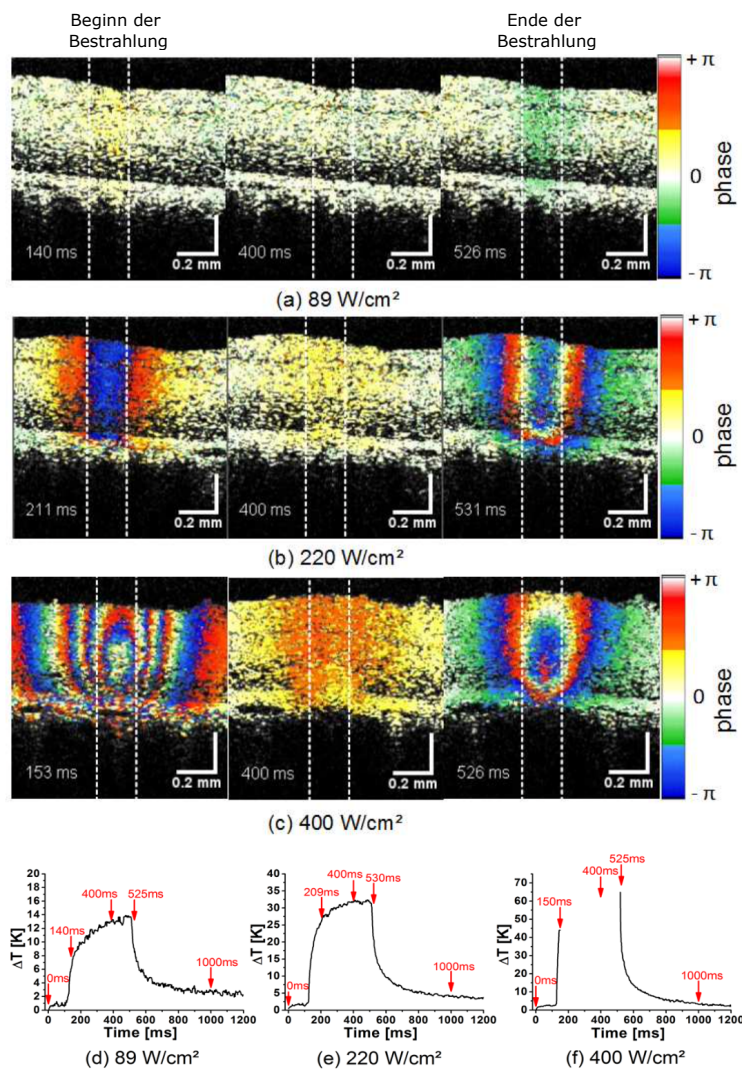


**Abbildung 2.13: Änderung der Streuung während und nach Laserbestrahlung der Retina *ex-vivo***

OCT-Bilder vor (links) und nach (rechts) der Bestrahlung für drei repräsentative Läsionen (a)  $89 \text{ W/cm}^2$ , (b)  $220 \text{ W/cm}^2$  und (c)  $400 \text{ W/cm}^2$ . Der bestrahlte Bereich ist durch zwei vertikale Linien markiert. Durch zeitliche Mittelung von A-Scans im bestrahlten Bereich (innerhalb der weißen Linien) wurde ein M-Scan (gemittelter A-Scan über der Zeit) berechnet (Mitte). Start- und Endpunkt der Bestrahlung sind durch Pfeile markiert. Netzhautschichten sind gekennzeichnet durch PRL: Photorezeptorschicht, RPE: retinales Pigmentepithel, CHO: Choroidea.

Adapted with permission from MÜLLER *et al.* [2012] © Optical Society of America.

Bei überschwelligen Läsionen konnten in den OCT-Studien eine Zunahme der Streuung im Bereich der Photorezeptoren und ein zusätzlicher, nicht linearer, überproportionaler Anstieg der Gewebeverschiebung beobachtet werden. Es gibt eine nach der Bestrahlung nicht mehr reversible Komponente



**Abbildung 2.14: Farb-Doppler-OCT-Aufnahmen des Koagulationsprozesses von Retina *ex-vivo***

Kurz nach Beginn (150 ms, 1. Spalte), während (400 ms, 2. Spalte) und am Ende der Bestrahlung (525 ms, 3. Spalte). (a) 89 W/cm<sup>2</sup>, (b) 220 W/cm<sup>2</sup> und (c) 400 W/cm<sup>2</sup>. (d-f) optoakustisch gemessenen Temperaturkurven, in denen die Zeitpunkte der zugehörigen Dopplerbilder durch Pfeile gekennzeichnet sind.

Adapted with permission from MÜLLER *et al.* [2012] © Optical Society of America.

der Verschiebung. Streuzunahme in der Photorezeptorschicht, Geweberverschiebung sowie Expansion änderten sich mit der Gewebekoagulation und wurden als Dosimetrieparameter vorgeschlagen. Diese Dosimetrieparameter erreichen in den gezeigten Studien *ex-vivo* an Schweineaugen maximal einen Youden-Index von 0,74 [MÜLLER, 2013] um sichtbare von nicht sichtbaren Läsionen zu unterscheiden. Die Änderung der Streuung für Läsionen unterschiedlicher Stärke sind in Abbildung 2.13 zu sehen. Es sind jeweils eine Sequenz von gemittelten A-Scans über die Zeit (M-Scan) gezeigt, welche die Streuzunahme sowie die Verschiebung der Retinaoberfläche verdeutlichen. Abbildung 2.14 veranschaulicht die zusätzliche Auswertung der Phasendifferenzen in aufeinander folgenden B-Scans, welche die Gewebewegung zeigen.

Die *ex-vivo* gefundenen Dosimetrieparameter waren jedoch nicht auf die *in-vivo* Situation übertragbar [MÜLLER, 2013]. Es wurde bei den OCT-Messungen ein starker Einfluss von Perfusion der Choroidea und Atmung beobachtet, was die globale Verschiebung der Retina über das gescannte Bildfeld zur Folge hat. Nach Bewegungskorrektur der prozessierten Daten konnte die kleinste Phasendifferenz von 11 nm (160 mrad) bei 7 K Temperaturanstieg gemessen werden [MÜLLER, 2013].

Die Zunahme der Gewebestreue während oder nach der Exposition, die *ex-vivo* gut sichtbar ist, war nur im Einzelfall und nur bei starken Koagulationen *in-vivo* zu erkennen; teilweise trat sogar eine Verringerung der Gewebestreue auf. Sowohl die Gewebestreue als auch Verschiebung der Gesamtoberfläche ist *in-vivo* wesentlich geringer und bei unterschwelligem Läsionen folgt die axiale Bewegung der Retina nicht mehr der Temperatur. Die über den Bestrahlungsbereich gemittelte axiale Verschiebung ist höher als erwartet und fällt nach Ende der Bestrahlung kaum ab, wofür die Autoren folgende Ursachen in Betracht ziehen. Das Einströmen von Wasser und Ionen in RPE oder Außensegmente, eine Reaktion von Choriocapillaris auf Temperaturen und damit eine Weitstellung der Gefäße, und die Verlängerung der Photorezeptoren durch osmotische Prozesse. Auch bei überschwelligem Läsionen ist die Gewebeverchiebung geringer und deutlich variabler. Durch statistische Auswertung und Entscheidungsbäume ließen sich trotzdem in einer *in-vivo* Studie an Kaninchen eine Sensitivität von 1 und Spezifität von 0,88 für die Klassifizierung der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit erreichen [ELLERKAMP, 2013]. Das beste Ergebnis wurde für das Verschwinden der Innen-/Außensegment-Verbindung und die Änderung der Durchblutung in der Choroidea erreicht.

Neben dem phasensensitiven OCT wurde versucht, basierend auf der Specklebewegung im OCT B-Scan, Gewebebewegungen während der Koagulation zu analysieren [KUROKAWA *et al.*, 2015]. Sie haben versucht, axial und lateral Bewegung anhand von Specklekorrelation und Doppler Phasenshift zu analysieren. Es wurde eine deutlich stärkere laterale als axiale Deformation gemessen, allerdings merken die Autoren an, dass eine zusätzliche axiale Komponente die Dekorrelation verstärkt und den Eindruck einer lateralen Bewegung verstärkt [KUROKAWA *et al.*, 2015]. In einer weiteren Studie beobachteten die Autoren anhand von OCT-Korrelationskarten drei unterschiedliche Arten lateraler Bewegung bei Bestrahlungsreihen *ex-vivo* in Schweineaugen [KUROKAWA *et al.*, 2016]: Erstens eine laterale Ausdehnung während der Bestrahlung mit folgender Kontraktion nach der Bestrahlung. Zweitens das genau entgegengesetzte Verhalten, also eine Kontraktion während der Bestrahlung. Und drittens gar keine laterale Bewegung, die axiale Bewegung ist unabhängig von der Art der lateralen Bewegung gleich. Die Autoren führen diese Variation in der Dynamik auf unterschiedliche, räumlich lokalisierte thermischen Veränderungen und mechanischen Eigenschaften jedes spezifischen Auges und jeder Netzhautstelle zurück.

Die beobachteten lateralen Bewegungen sind zum großen Teil Artefakte, da ein Defokus (wie im kommenden Kapitel 4.2 genauer erläutert) zu einer scheinbaren Verschiebung der Speckle bei einer sich axial ändernden Verschiebung führt. Während es in der Specklemesstechnik möglich ist exakt im Fokus zu arbeiten, zeigten SPAHR *et al.* [2019], dass in der OCT dieser Artefakt nicht vermeidbar ist. Das beobachtete Verhalten wurde aufgrund des über den B-Scan variierenden Defokus hervorgerufen, der axiale und laterale Bewegungen vermischt.

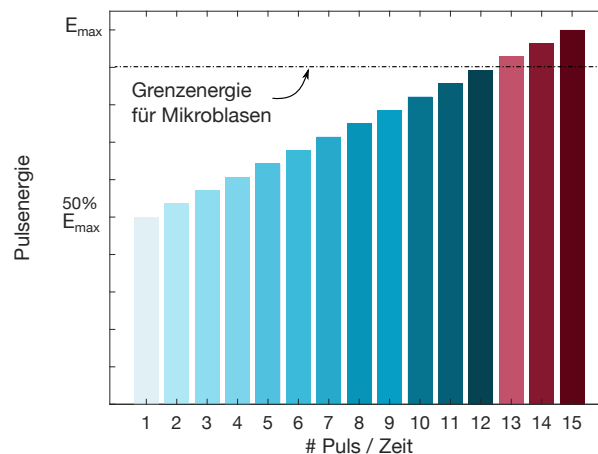
Auch im Patienten stellte sich die Darstellung der dynamischen Koagulationsprozesse mittels OCT als schwierig heraus. Obwohl bei günstigen Bedingungen physiologische und thermische Prozesse visualisierbar waren, konnten nur etwa 10 % der aufgezeichneten Behandlungsspots ausgewertet werden [SPAHR, 2017]. Korrekturalgorithmen konnten zwar viel der zuvor problematischen Auswirkungen der Bildgebung korrigieren, allerdings sind Bewegungen senkrecht zur Scan-Ebene nicht detektierbar und somit nicht korrigierbar, was für den hohen Anteil an nicht auswertbaren Spots verantwortlich ist [SPAHR, 2017]. Um diese unvermeidlichen Bewegungen zu korrigieren, müssten anstatt von Schnittbildern ganze Volumen aufgenommen werden. Eine Möglichkeit, Volumen mit ausreichend hoher Volumenrate zur Detektion der schnellen Prozesse während der Photokoagulation aufzunehmen, bietet die Full-Field-Swept-Source-OCT. Es konnten mittels numerischer Subaperturen sehr präzise drei-dimensionale Bewegungen während der Koagulation detektiert werden [SPAHR, 2017]. Durch die numerische Korrektur von Aberrationen und vor allem vom Defokus konnten die tatsächlichen Bewegungen dargestellt werden, die sich von den Bewegungen vor der

Aberrationskorrektur deutlich unterscheiden.

Dies ist allerdings nur mit vollständig phasenstarrten, volumetrischen Aufnahmen möglich. Die Volumenrate, die für die Aufzeichnung der schnellen Prozesse während der Photokoagulation nötig ist, wird allerdings momentan von scannenden OCT-Systemen nicht erreicht. Full-Field-Swept-Source-OCT erreicht zwar die nötigen Volumenraten, allerdings nur mit einer Hochgeschwindigkeits-2D-Kamera, die aufgrund der aktuell noch sehr hohen Preise für ein kommerzielles Produkt nicht in Frage kommen.

### 2.4.3 Monitoring während der SRT

Der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke durch den Zerfall von RPE-Zellen kann mittels Fluoreszenzangiographie nachgewiesen werden und korreliert stark mit dem Auftreten von  $\mu\text{B}$ , was deren Erscheinen als Nachweis für RPE-Schäden zulässt [SCHUELE *et al.*, 2005a; SEIFERT *et al.*, 2018]. Eine Strategie, um bei der SRT eine Abschaltung der Bestrahlung bei erreichtem Zellschaden zu gewährleisten, besteht in der Applikation einer Reihe von Pulsen mit schrittweise steigender Energie wie in Abbildung 2.15 zu sehen, wobei nach jedem Puls die Entstehung von  $\mu\text{B}$  überprüft werden kann. Dafür sind verschiedene Verfahren in der Entwicklung und teilweise klinischen Erprobung. Diese umfassen Optoakustik, Lichtreflexion, Interferometrie und OCT, welche in den nachfolgenden Kapiteln genauer vorgestellt werden.



**Abbildung 2.15: Applikation der Pulsreihe zur Dosimetrie der SRT**

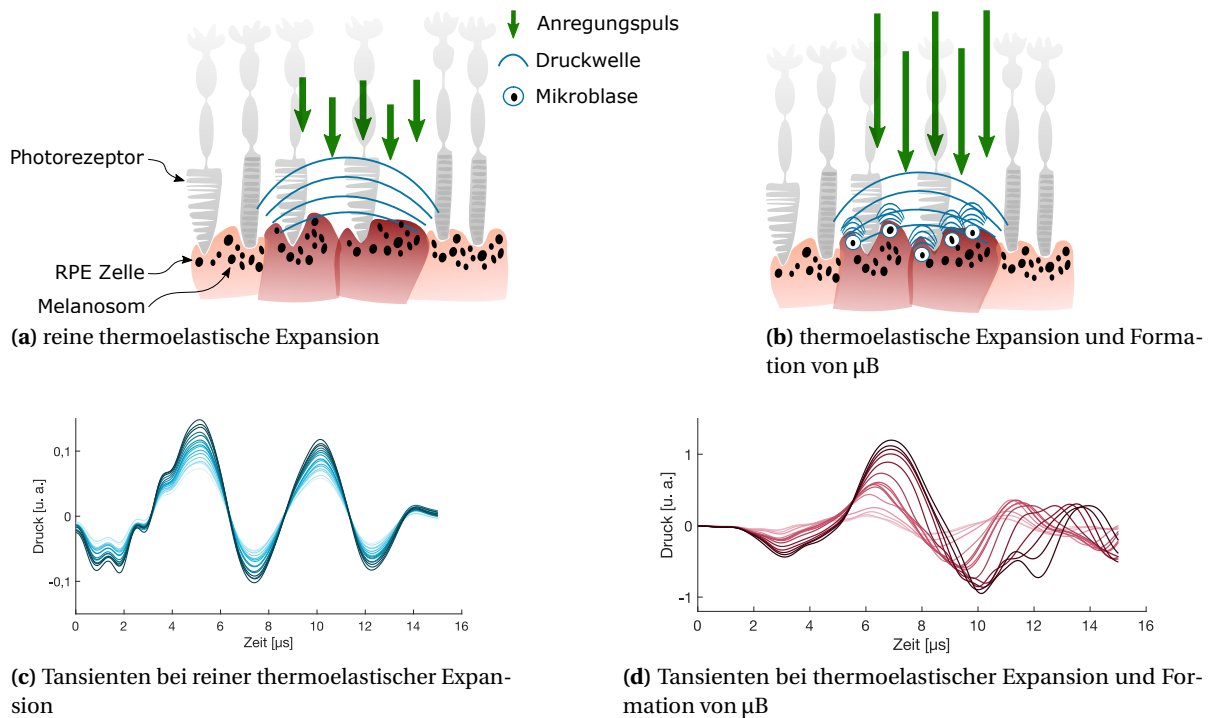
Die Pulsenergie steigt schrittweise an, wobei die Startenergie 50 % der maximalen, vom Arzt eingestellte Energie  $E_{\max}$  ist.

#### 2.4.3.1 Optoakustik

Wie schon zuvor in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, entsteht durch die thermoelastische Expansion eine Druckwelle im bestrahlten Gewebe, deren Amplitude bei sonst gleichbleibenden Bestrahlungsbedingungen mit der eingestrahlt Energie skaliert.

Mit einem Schallwandler, der in das Kontaktglas integriert ist, kann die Superposition aller abgestrahlten Schallwellen aufgezeichnet werden. Werden nun also z. B. 15 Pulse mit linear ansteigender Pulsenergie (siehe Abb. 2.15), die unterhalb der Grenze für Mikroblasenbildung ist, auf derselben Stelle appliziert, werden die detektierten Transienten alle denselben zeitlichen Verlauf haben, nur ihre Amplituden sind entsprechend der Pulsenergie skaliert, wie in Abbildung 2.16c zu sehen ist. Eine grafische Veranschaulichung ist in der Abbildung a dargestellt. Wenn die Temperatur nun die Verdampfungstemperatur an der Oberfläche der Melanosomen überschreitet, entstehen  $\mu\text{B}$ , die sich zunächst ausdehnen und dann kollabieren. Durch das Anwachsen von  $\mu\text{B}$  wird deren umgebende Flüssigkeit radial beschleunigt und es entstehen zusätzliche akustische Transienten, wie

in Abbildung 2.16b zu sehen. Der Beginn der Blasenbildung unterscheidet sich an verschiedenen Melanosomen geringfügig und auch zwischen aufeinander folgenden Pulsen kommt es durch die Verschiebung von Melanosomen durch die Blasen zu Phasen- und Amplitudenfluktuation der aufgezeichneten Transienten. Dies führt dazu, dass die Amplituden nicht mehr linear mit der Pulsenergie skalieren und der zeitliche Verlauf der detektierten Druckwellen von Puls zu Puls verschieden ist, was beispielhaft in Abbildung 2.16d gezeigt ist. Die Änderung der Druckwellen von Puls zu Puls einer Pulsreihe wurden mit einem Optoakustik (OA) - Wert beschrieben, welcher einen RPE-Schaden bei der Fluoreszenzangiographie mit hoher Spezifität vorhersagen kann [SCHUELE *et al.*, 2004]. Der OA - Wert wurde bereits genutzt um Ärzten eine Orientierungshilfe für die geeignete Pulsenergie zu liefern [YASUI *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2017].



**Abbildung 2.16: Einfluss der  $\mu\text{B}$  auf die abgestrahlten Druckwellen**

Schematische Veranschaulichung der Schallentstehung bei gepulster Bestrahlung der Retina (a) reine thermoelastische Expansion (b) thermoelastische Expansion und die Formation von  $\mu\text{B}$ .

Mit dem Schallwandler detektierte Superposition der abgestrahlten Transienten bei 15 mit ansteigender Energie applizierten Pulsen. (c) reine thermoelastische Expansion (d) thermoelastische Expansion und die Formation von  $\mu\text{B}$ .

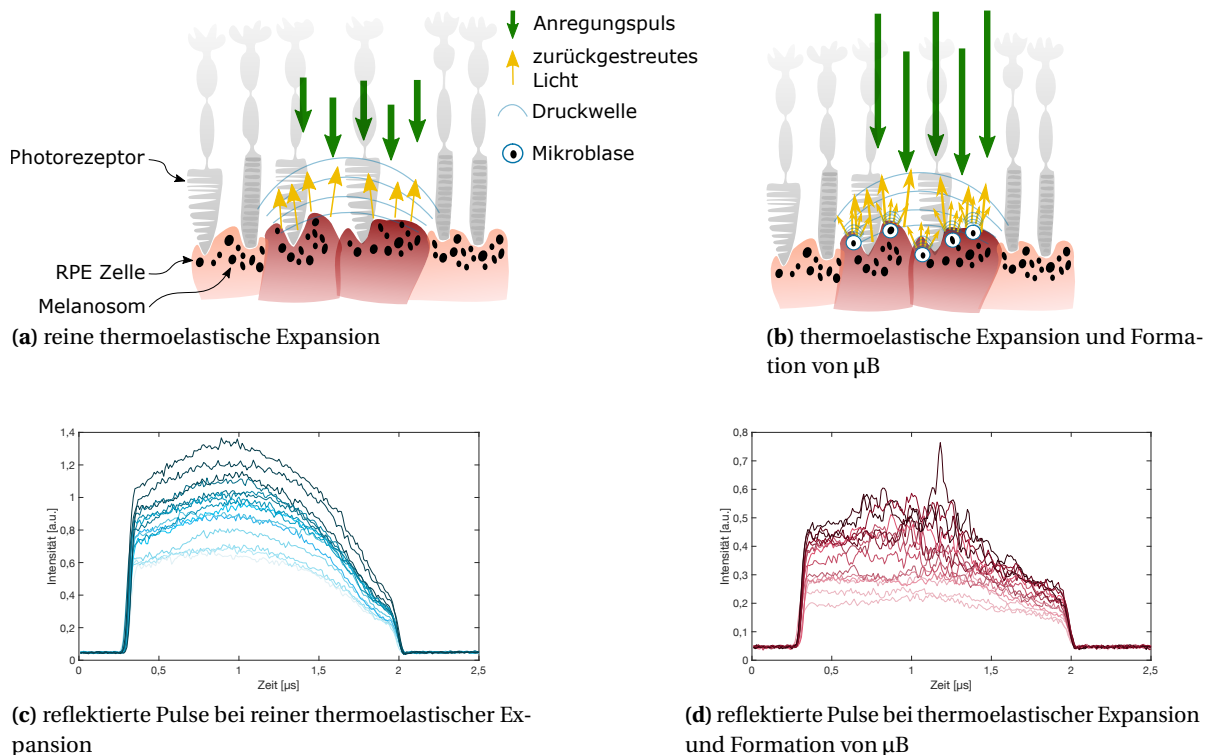
#### 2.4.3.2 Lichtreflexion

Während der Bestrahlung wird Licht von der Retina zurückgestreut und kann vor dem Auge gemessen werden. Da die Bestrahlung mit kohärentem Licht erfolgt, interferiert das zurückgestreute Licht zufällig, da es an unterschiedlichen Strukturen gestreut bzw. reflektiert wird und dem entsprechend eine zufällige Phasenänderung erfährt. Diese zufällige Interferenz wird als Specklemuster bezeichnet und ausführlich im folgenden Abschnitt 4 erläutert.

Wird das Gewebe nur aufgeheizt, bleiben dessen reflektiven Eigenschaften weitestgehend unverändert und das entstandene Specklemuster erfährt ebenso nur geringe Änderungen. Beim Aufschwingen und Kollabieren von  $\mu\text{B}$  kommt es allerdings zu Phasenänderungen im zurückgestreuten Licht durch den Brechungsindexunterschied an der Oberfläche der mit Wasserdampf gefüllten Blase. Außerdem werden andere Streuer durch die Dynamik der Blasen bewegt, was zu einer weiteren Ände-

zung des zurückgestreuten Specklemusters führt. Eine direkte Auswertung des zwei-dimensionalen Specklemusters anhand von Bilddaten ist allerdings bei Pulsdauern im einstelligen  $\mu\text{s}$ -Bereich und Blasenlebensdauern noch darunter kaum möglich. Daher werden bei der SRT die Specklemuster nicht mit einem Flächensensor, sondern einer schnellen Diode aufgezeichnet, welche die Intensität des Specklemusters über die Sensorfläche integriert.

Der Zeitverlauf dieses integrierten Sensorsignals entspricht dem Zeitverlauf des Anregungspulses, solange ausschließlich thermoelastische Expansion vorliegt. Beispiele dafür sind in Abbildung 2.17c gezeigt. Eine grafische Veranschaulichung ist erneut in der Abbildung 2.17a zu sehen. Die durch  $\mu\text{B}$  verursachten Änderungen der Specklemuster sorgen für ein zusätzliches hochfrequentes Signal, das dem Verlauf des Anregungspulses überlagert ist, siehe Abbildung 2.17d.



**Abbildung 2.17: Einfluss der  $\mu\text{B}$  auf die reflektierten Pulse**

Schematische Veranschaulichung der Lichtreflektion bei gepulster Bestrahlung der Retina (a) reine thermoelastische Expansion (b) thermoelastische Expansion und die Formation von  $\mu\text{B}$ .

Zeitlicher Verlauf der detektierten zurückgestreuten Pulse bei 15 mit ansteigender Energie applizierten Pulsen. (c) reine thermoelastische Expansion (d) thermoelastische Expansion und die Formation von  $\mu\text{B}$ .

Die deutlichen Unterschiede im Pulsverlauf der aufgezeichneten Pulse werden bereits genutzt, um in Patientenstudien einen geeigneten Grenzwert für den automatischen Stopp der Pulsrampe zu finden [SEIFERT *et al.*, 2018]. Die Technik wird derzeit in unterschiedlichen klinischen Studien untersucht [PARK *et al.*, 2016, 2017].

### 2.4.3.3 Interferometrie

Mittels Interferometrie können über die reine Detektion des Auftretens der  $\mu\text{B}$  hinaus noch weitere Information über die Dynamik der  $\mu\text{B}$  mit hoher zeitlicher Auflösung dargestellt werden. Unter der Verwendung von Laserstrahlung mit ausreichender Kohärenzlänge kann mit einer schnellen Photodiode das aus dem Auge zurückgestreute Licht im Objektarm des Interferometers aufgezeichnet werden. So kann die thermische Expansion des RPE, das Aufschwingen der  $\mu\text{B}$ , deren Zusammen-

wachsen, Kollaps und schließlich eine langsame thermische Kontraktion des Gewebes nach der Bestrahlung überwacht werden [FRITZ *et al.*, 2007, 2009]. Diese Methode wurde allerdings bisher noch nicht bis zum klinischen Einsatz weiterentwickelt.

#### 2.4.3.4 OCT

FRAMME *et al.* [2009] konnten nach der SRT Gewebeveränderungen mittels OCT sichtbar machen, allerdings blieb bei der SRT die neuronale Retina intakt. Auch hier liegt ebenso die Möglichkeit nahe, die dynamischen Prozesse nicht nur nach, sondern auch während der Bestrahlung mittels OCT zu visualisieren.

Die Wärmeausdehnung eines ausreichend langsamen thermischen Diffusionsprozesses ist mit aktuellen OCT-Systemen bei moderater axialer Auflösung von etwas 10  $\mu\text{m}$  und Tiefenabtastraten um die 100 Hz auch mit lateralen Schnittbildern problemlos visualisierbar. Trotz moderner OCT-Systeme mit Scanraten von über 1 MHz sind die Schockwellen, die von Behandlungspulsen mit weniger als 10  $\mu\text{s}$  Pulsdauer induziert werden, um vier Größenordnungen schneller und deren direkte Darstellung ist nicht möglich [POVAŽAY *et al.*, 2019]. Allerdings können Verschiebungen des Gewebes direkt als zeitliche Änderung der Intensität im OCT- Tiefenscan (A-Scan) detektiert und als zeitliche Sequenz (M-Scan) dargestellt werden. Mittels Zeit-Frequenz-Analyse können feine Unterschiede in der Struktur des M-Scans extrahiert werden. Weiterhin kommt es zu vollständigen Signalauslösungen, welche aus schnellen Schwankungen der spektralen Phase resultieren, die größer sind als die Integrationszeit des Detektors, sodass das zeitgemittelte Signal nahezu null wird [POVAŽAY *et al.*, 2019]. Diese Signalauslöschung wird als Indikator genutzt, um starke axiale Bewegungen, die mit dem Auftreten von  $\mu\text{B}$  assoziiert werden, zu überwachen. Die Dauer der Signalauslöschung korreliert gut mit der Bestrahlung, da stärkere Pulse auch stärkere strukturelle Veränderungen hervorrufen [KAUFMANN *et al.*, 2018]. Neben der kompletten Signalauslöschung können auch kleinere Signaländerungen in den M-Scans detektiert werden, die mit kleineren Spitzen in der Zeit-Frequenz-Analyse übereinstimmen und der erwarteten Wärmeableitung entsprechen. Mittels OCT können demnach thermische Effekte von der Formation von  $\mu\text{B}$  getrennt werden.

Präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass Veränderungen im OCT M-Scan, hervorgerufen von  $\mu\text{B}$  während der SRT für die Vorhersage für RPE-Läsionen genutzt werden können [STEINER *et al.*, 2014, 2015; KAUFMANN *et al.*, 2018].

## Motivation dieser Arbeit

Das vorangegangene Kapitel hat gezeigt, dass die OCT die Chance bietet, Phasenänderungen direkt tiefenaufgelöst zu messen. Die Phase des vom Gewebe zurückgestreuten Lichtes wird sich immer ändern, wenn es eine Veränderung der Gewebegeometrie durch z. B. thermische Expansion oder Denaturierung gibt. Mit der OCT erhält man eindeutige und direkte Information über die Vorgänge im Gewebe. Die zentrale Frage in dieser Arbeit ist, ob diese Phasenänderung, gemessen als scheinbar zufällige Veränderung der Intensitätsverteilung von Specklemustern ebenso ausreichende Rückschlüsse auf die Gewebeveränderungen zulässt, um sie möglicherweise als Dosimetrieparameter einzusetzen. Durch die Verwendung von Specklemustern geht im Vergleich zur OCT jedoch die direkte tiefenaufgelöste Information verloren. Mit der Integration der Intensitäten über die Fläche des Specklemusters durch z. B. die Verwendung einer Photodiode wird der direkte Zusammenhang zur Gewebeveränderung noch weiter reduziert. Allerdings bietet der Ansatz, die Veränderung der Specklemuster mit einem Flächendetektor oder einer Diode aufzuzeichnen die Möglichkeit, den technischen Aufwand für ein potenzielles Dosimetriesystem erheblich zu reduzieren und dadurch eine klinische Anwendung deutlich einfacher zu machen.

### 3.1 Monitoring im Kammerwinkel

Da für die SRT am Fundus bereits verschiedene Monitoringmethoden erforscht werden und es mittlerweile ein kommerzielles Lasersystem gibt, das Blasenbildung überwachen soll, war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob sich dasselbe System auch zur Detektion von Blasenbildung bei der SLT im Kammerwinkel eignet. An einem SRT-Laboraufbau konnte bereits in ersten grundlegenden Experimenten gezeigt werden, dass die Bestrahlung des Trabekelwerks von Schweineaugen *ex-vivo* möglich ist und dass parallel sowohl optische als auch akustische Signale, die auf die Bildung von Mikroblassen ( $\mu\text{B}$ ) hindeutet, aufgezeichnet werden können [SHPYCHAK, 2016]. Darauf aufbauend wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich ein kommerzielles SRT-System auch für die SLT adaptieren lässt, ob Signalanteile detektierbar sind, die auf die Bildung von  $\mu\text{B}$  zurückzuführen sind.

#### 1. Design des Kontaktglases

Für die SLT sind Kontaktgläser mit Spiegel nötig, um den Kammerwinkel des Auges zu visualisieren. Daher sind die Kontaktgläser mit Mikrophon, die vom SRT-System verwendet werden, nicht für die Experimente dieser Studie geeignet. Es wurde ein SLT-Gonio-Kontaktglas um einen Schallwandler erweitert, der die Detektion von laserinduzierten Schallwellen im Trabekelwerk ermöglicht, ohne den Einblick in den Kammerwinkel zu behindern. Hier wird lediglich eine Zusammenfassung präsentiert. Der ausführliche Herstellungsprozess und die Charakterisierung sind Gegenstand einer Bachelorarbeit, die im Kontext der hier dargestellten Forschungsarbeit betreut wurde [MEIER, 2017].

#### 2. Adaption des SRT-Gerätes

Durch die Verwendung eines neuen Kontaktglases konnten die optoakustischen Signale nicht über das SRT-System aufgezeichnet werden. Die Datenaufnahme musste dennoch durch das Lasersystem getriggert und mit der Aufnahme der optischen Daten, welche weiterhin über

das Lasersystem möglich war, synchronisiert werden. Dafür wurde eine LabVIEW Routine implementiert.

### 3. Signalcharakterisierung im Trabekelwerk

Die optischen, specklebasierten und auch die akustischen Signale, die im Trabekelwerk erzeugt wurden und mit dem adaptierten Kontaktglas aufgenommen wurden, konnten mit Signalen, die am RPE entstehen, verglichen und charakterisiert werden.

### 4. *Ex-vivo* Messreihen und Implementierung von Detektionsalgorithmen

Es wurden umfassende Messreihen im Trabekelwerk von enukleierten Schweineaugen *ex-vivo* durchgeführt, um generalisierbare Grenzwerte für die Mikroblasenbildung anhand der optischen und akustischen Signale zu finden. Teile dieser Messreihen sind in Bachelorarbeiten entstanden, in denen auch Analysen mit den ersten Versionen der Detektionsalgorithmen gezeigt sind [ZAREMBA, 2016; MEIER, 2017].

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht [BLIEDTNER *et al.*, 2019b, a, 2018].

## 3.2 Monitoring am Fundus

In grundlegenden Experimenten konnte bereits an Schweine-RPE-Explantaten gezeigt werden, dass mit der Aufnahme von kontinuierlichen Specklephotografien temperaturinduzierte Gewebeveränderungen detektiert werden können [BLIEDTNER, 2014; SEIFERT *et al.*, 2014]. In dieser Arbeit wurde dieser Ansatz weiter verfolgt, indem eine Hochgeschwindigkeits-Specklevideographie mit einer Spaltlampe gekoppelt wurde, um Gewebeveränderungen während der Photokoagulation *ex-vivo* in enukleierten Schweineaugen und *in-vivo* in Kaninchenaugen zu untersuchen.

### 1. Adaption der Hochgeschwindigkeits-Specklephotografie an eine Laserspaltlampe

Damit im Kaninchenauge oder intakten Schweineaugenbulbi Specklemuster während der Photokoagulation aufgenommen werden können, musste eine Standard-Laserkoagulations-Spaltlampe um einen zweiten Laser zur Erzeugung geeigneter Specklemuster auf der Retina und einer schnellen Kamera zur Aufnahme eben dieser erweitert werden. Die Specklemuster wurden mit Bildraten von bis zu 2 kHz aufgezeichnet und entweder nach der Bestrahlung auf temperaturinduzierte Speckleänderungen untersucht oder direkt während der Bestrahlung auf einem programmierbaren Logikgatter (engl.: Field Programmable Gate Array, FPGA) verarbeitet.

### 2. Charakterisierung der Specklefluktuation während der Photokoagulation

Als Referenz für den RPE-Zellschaden wurde einerseits die direkte Sichtbarkeit der Läsionen während der Photokoagulation herangezogen. Andererseits wurde der bestrahlte Bereich anhand von Lebend/Tod-Assays auf Zellebene auf ihre Vitalität nach der Behandlung untersucht. Der erzielte Zellschaden wurde mit den Specklefluktuationen korreliert und diente dazu temperaturbedingten Gewebewegung und Koagulation anhand der unterschiedlicher Specklebewegung zu unterscheiden. Die experimentell gefundenen Specklefluktuation wurden der theoretischen Änderung anhand von Simulationen gegenübergestellt. Zusätzlich wurden teilweise parallel optoakustisch Temperaturen gemessen, um die Speckleänderungen mit dem Temperaturverlauf zu vergleichen.

### 3. Implementierung von Algorithmen zur Auswertung der Speckleänderung

Anhand von *ex-vivo* Messreihen an Schweineaugen wurden Algorithmen entwickelt, um den erzielten Schaden in Geweben zu quantifizieren und globale Bewegungen zu korrigieren. Teile dieser Messreihen sind im Rahmen einer Bachelorarbeit entstanden und wurden auch da zum

ersten Mal mit einer vereinfachten Version eines in dieser Arbeit vorgestellten Algorithmus statistisch ausgewertet [STOCKMANN, 2015]. In den *ex-vivo* Bestrahlungsserien wurde weiterhin der Einfluss verschiedener Bestrahlungsparameter auf die Specklemesstechnik getestet.

#### 4. **Untersuchung der Dosimetriemöglichkeiten *in-vivo***

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob diese Methode sich auch *in-vivo* an Kaninchenaugen für eine mögliche Dosimetrie eignet und ob trotz zusätzlicher Störsignale, verursacht durch Blutfluss und andere Bewegungen, eine temperaturinduzierte Speckleänderung detektierbar und auswertbar ist.

Teile dieser Untersuchungen und Ergebnisse wurden bereits in zwei Proceedings veröffentlicht [BLIEDTNER *et al.*, 2016, 2017].



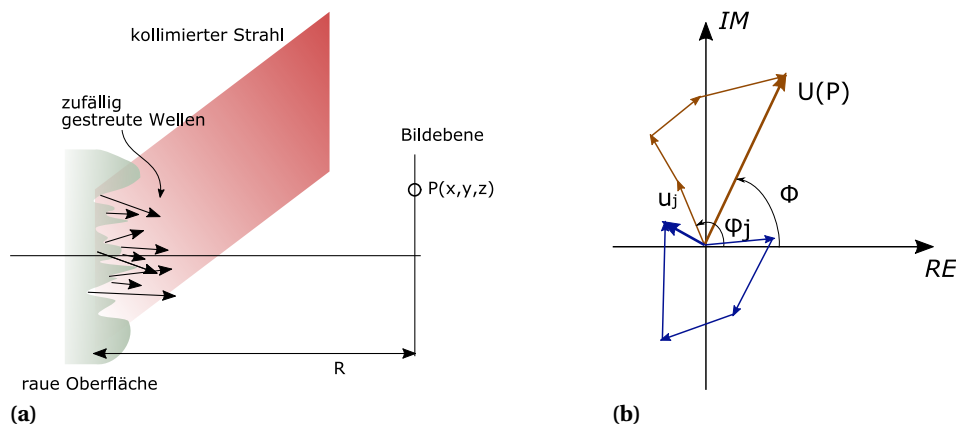
# Dynamische Speckle

## 4.1 Allgemeiner Hintergrund

Speckle treten immer auf, wenn eine optisch raue Oberfläche mit kohärentem Licht beleuchtet wird. Die Rauigkeit der Oberfläche muss dafür in der Größenordnung der Wellenlänge oder größer sein. Die optische Welle an einem mäßig entfernten Punkt besteht aus kohärenten Wellen, die alle an verschiedenen Stellen der Oberfläche entstehen. Der optische Gangunterschied zwischen diesen Wellen kann um bis zu mehreren Wellenlängen unterschiedlich sein und die Interferenz dieser Wellen mit zufälliger Phase und zusätzlich auch zufälliger Amplitude resultiert in einem granulären Intensitätsmuster, das als Specklemuster bekannt ist. Speckle entstehen überall im Raum, in den meisten Anwendungen sind allerdings hauptsächlich die Bild- und Fraunhofer-Beugungsebene von Bedeutung. Bei einem statischen Objekt ist die zufällige Intensitätsverteilung zeitlich stationär und nur eine Funktion der räumlichen Koordinaten. Bei einer Änderung der Probe wird sich auch das Specklemuster verändern, es wird dann häufig von dynamischen Specklen gesprochen, die nun auch eine Funktion der Zeit sind.

### 4.1.1 Intensitätsverteilung - Statistiken erster Ordnung

Geht man nun davon aus, dass die Wellenlänge  $\lambda$  des Beleuchtungslichts deutlich kleiner als die Höhenunterschiede einer bestrahlten Oberfläche ist, so wird dem zurückgestreuten Licht eine zufällige Phase aufgeprägt. In einem Punkt  $P(x, y, z)$ , in einiger Entfernung von der Oberfläche, interferieren dann eine bestimmte Anzahl  $N$  an Einzelwellen mit einer zufälligen Phase.



**Abbildung 4.1: Entstehung von Specklemustern**

(a) Diffuse Reflexion von kohärentem Licht an einer rauhen Oberfläche. (b) Vier verschiedene Wellen, die einmal hauptsächlich konstruktive (orange) und einmal hauptsächlich destruktive (blau) Addition zeigt.

Unter der Voraussetzung von monochromatisch und vollständig polarisiertem Licht, welches von jedem beliebigen Oberflächenelement  $j$  den Beitrag

$$u_j(P) = |u_j| e^{i\phi_j}, \quad (4.1)$$

zur komplexen Amplitude des reflektierten Felds an Punkt  $P$  liefert, ergibt sich die Gesamtamplitude als:

$$U(P) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=1}^N |u_j| e^{i\phi_j}. \quad (4.2)$$

Diese Summe kann als „random walk“ in der komplexen Ebene veranschaulicht werden. Wie Abbildung 4.1b zeigt, können Summanden zufälliger Amplitude und Phase teils konstruktiv oder teils destruktiv wirken.

Unter den folgenden Annahmen:

1. Amplitude  $u_j$  und Phase  $\phi_j$  einer jeden Feldkomponente sind sowohl statisch unabhängig voneinander als auch von Amplitude und Phase aller anderen Feldkomponenten
2. Phasen  $\phi_j$  sind gleichmäßig im Intervall  $(-\pi, \pi)$  verteilt
3. Die Anzahl der Streuer  $N$  ist sehr hoch

Ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $p(I)$  für die Intensität  $|U(P)|^2$  durch eine negative exponentielle Dichtefunktion gegeben [GOODMAN, 2007]:

$$p_I(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} e^{-\frac{I}{\langle I \rangle}} \quad \text{für } I \geq 0. \quad (4.3)$$

$\langle I \rangle$  ist dabei die mittlere Intensität des Specklemusters. Diese Verteilung ist durch das normierte Histogramm der Intensitäten eines simulierten Specklemusters in Abbildung 4.2 dargestellt. Specklemuster mit dieser Verteilung werden als voll entwickelt (*fully developed*) bezeichnet und weisen eine Standardabweichung  $\sigma$  der Intensität auf, die dem Mittelwert entspricht:

$$\sigma = \langle I \rangle. \quad (4.4)$$

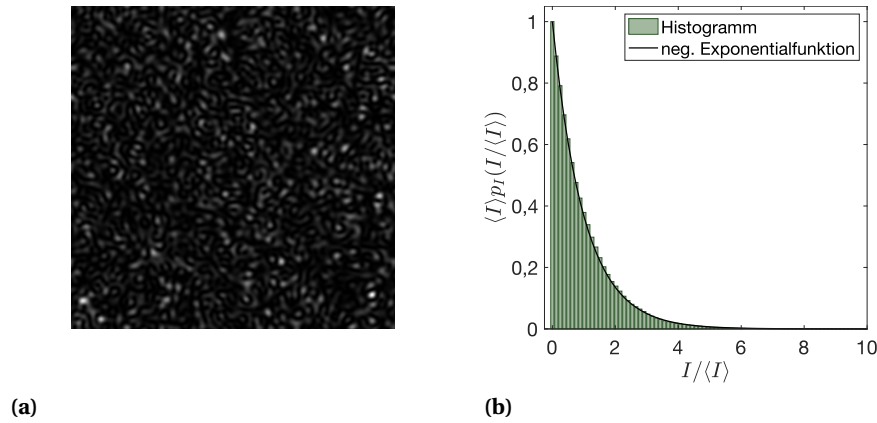
Der Kontrast:

$$C = \sigma / \langle I \rangle \quad (4.5)$$

für ein voll entwickeltes Specklemuster ist eins.

Zusätzlich kann die charakteristische Funktion der Intensitätsschwankungen durch die Fouriertransformation dargestellt werden:

$$\mathbf{M}_I(\omega) = \int_0^{\infty} e^{j\omega I} p(I) dI = \int_0^{\infty} e^{j\omega I} \left[ \frac{1}{\langle I \rangle} e^{-\frac{I}{\langle I \rangle}} \right] dI = \frac{1}{1 - j\omega \langle I \rangle}. \quad (4.6)$$



**Abbildung 4.2: Darstellung eines Specklemusters**

(a) Simuliertes voll entwickeltes Specklemuster (b) Histogramm der Intensitäten des Specklemusters mit überlagerter negativer Exponentialfunktion.

#### 4.1.1.1 Summe zweier unabhängiger Specklemuster

Im Folgenden werden nun zwei Specklemuster bzw. deren Intensitäten überlagert, wobei es sich um zwei statistisch unabhängige, unkorrelierte Specklemuster handelt. Diese können z. B. durch Beleuchtung zweier nicht überlappender Bereiche der Oberfläche oder durch orthogonale Polarisationskomponenten entstehen, um nur zwei von vielen Möglichkeiten zu nennen, bei denen sich zwei statistisch unabhängige Specklemuster inkohärent überlagern. Die Gesamtintensität ist dann proportional zu der Summe der Einzelintensitäten:

$$I_S = I_1 + I_2. \quad (4.7)$$

Beide Specklemuster  $I_1$  und  $I_2$  werden als voll entwickelt angenommen und ihre Intensitätsverteilung folgt demnach der negativen exponentiellen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (Gl. 4.3). Laut Wahrscheinlichkeitstheorie ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Summe unabhängiger Variablen gleich der Faltung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der Summanden. Ebenso, nach dem Faltungstheorem, ist die charakteristische Funktion der Summe gleich dem Produkt der charakteristischen Funktionen der Summanden. Wenn  $M_S$ ,  $M_1$  und  $M_2$  jeweils die charakteristischen Funktionen von  $I_S$ ,  $I_1$  und  $I_2$  repräsentieren, ergibt sich:

$$M_S = M_1 M_2, \quad (4.8)$$

und unter Berücksichtigung von Gleichung 4.6:

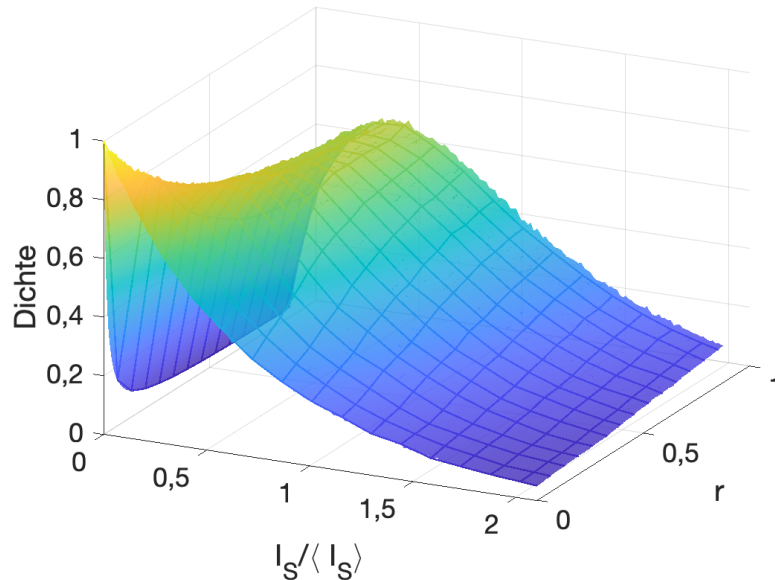
$$M_S = \frac{1}{1 - j\omega\langle I_1 \rangle} \frac{1}{1 - j\omega\langle I_2 \rangle}. \quad (4.9)$$

Die inverse Fouriertransformation dieses Ausdrucks führt zu:

$$p(I_S) = \frac{1}{\langle I_1 \rangle - \langle I_2 \rangle} \left[ \exp\left(-\frac{I_S}{\langle I_1 \rangle}\right) - \exp\left(-\frac{I_S}{\langle I_2 \rangle}\right) \right] \quad \text{für } \langle I_1 \rangle > \langle I_2 \rangle \quad (4.10)$$

$$p(I_S) = \frac{I_S}{\langle I \rangle} \exp\left(-\frac{I_S}{\langle I \rangle}\right) \quad \text{für } \langle I_1 \rangle = \langle I_2 \rangle = \langle I \rangle. \quad (4.11)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für verschiedene Werte von  $r = \langle I_2 \rangle / \langle I_1 \rangle$  zwischen null und eins ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Je mehr sich  $r$  null nähert, d. h. je dominanter eines der beiden Specklemuster ist, umso mehr entspricht die Verteilung der negativen Exponentialfunktion. In diesem Fall ist auch der größte Specklekontrast nahe eins zu erwarten. Je ähnlicher sich die Mittelwerte beider Specklemuster sind umso geringer wird der Specklekontrast ( $C = 1/\sqrt{2}$  bei  $r = 1$ ).



**Abbildung 4.3: Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Summe zweier unabhängiger Specklemuster**  
Die Wahrscheinlichkeitsdichte ist als Funktion von  $I_S / \langle I_S \rangle$  und  $r = \langle I_2 \rangle / \langle I_1 \rangle$  aufgetragen.

Je mehr unabhängige Specklemuster mit gleicher mittlerer Intensität summiert werden, umso mehr entfernt sich die Verteilung von der negativen Exponentialfunktion hin zu einer Funktion, die beginnt, einer Gaußverteilung zu ähneln.

#### 4.1.2 Räumliche Ausdehnung der Speckle - Statistik zweiter Ordnung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel einige statistische Eigenschaften von Specklemustern an einem einzelnen Punkt im Raum geschildert wurden, folgen nun einige gemeinsame Charakteristika von zwei Punkten. Von Interesse soll hier vor allem die Größe eines Specklekorns sein, die allerdings nicht genau definiert ist. Es kann ein Maß für die mittlere Größe eines Specklekorns durch Ausdehnung der normalisierten Autokorrelationsfunktion der Intensität des Specklemusters, das in einer Detektionsebene beobachtet wurde, gefunden werden. Für eine ausführliche mathematische Beschreibung siehe z. B. GOODMAN [2007].

Zur Abschätzung der Speckleausdehnung kann die Herleitung für die beugungsbegrenzte Auflösung herangezogen werden, da die Speckle nicht feiner werden können als das beugungsbegrenzte Auflösungsvermögen. Die Intensität ändert sich von maximaler Intensität an Punkt  $P'_0$  auf minimale Intensität an Punkt  $P$ , wenn sich der Weglängenunterschied der Randstrahlen um  $\lambda$  ändert. Aus dem Schema in Abbildung 4.4a kann entnommen werden, dass dieser maximale Wegunterschied gegeben ist durch:

$$\Delta = \lambda = d \sin \theta, \quad (4.12)$$

wobei  $d$  der Durchmesser der Linse ist und  $\theta$  der Winkel, der zwischen der optischen Achse und der

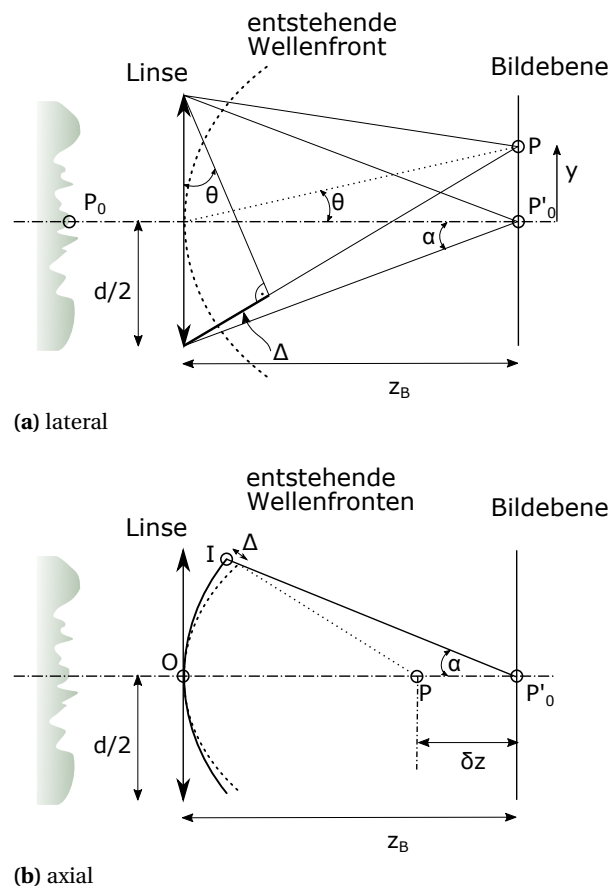
Linie vom Zentrum der Linse zu Punkt  $P$  aufgespannt wird. Der Durchmesser eines hellen Fleckes bzw. die laterale Ausdehnung des Specklekorns  $\delta$  in Punkt  $P'_0$  ist:

$$\delta = 2y = 2z_B \tan \theta, \quad (4.13)$$

mit  $z_B$  als Abstand zwischen Linse und Bildebene. Unter der Annahme, dass  $z_B$  deutlich größer ist als  $y$ , folgt aus der Kleinwinkelnäherung, dass  $\sin \theta \approx \tan \theta \approx \theta$  und es ergibt sich aus den beiden vorangegangenen Gleichungen:

$$\delta = 2\lambda \frac{z_B}{d} = \frac{\lambda}{\alpha}, \quad (4.14)$$

wobei  $2\alpha \approx d/z_B$  die Apertur des Abbildungssystems ist.



**Abbildung 4.4: Geometrische Überlegungen zur Bestimmung der Dimensionen eines Specklekorns**

In (a) ist die Geometrie zur Herleitung der lateralen und (b) der axialen Ausdehnung dargestellt.

Ähnlich zur lateralen Ausdehnung entspricht auch die axiale Ausdehnung eines Specklekorns der beugungsbegrenzten Tiefenaufösung. Dazu kann wie in Abbildung 4.4b dargestellt, nun der Punkt  $P'_0$  aus der Bildebene, in dem die Intensität maximal ist, diesmal axial um  $\delta z$  zu einem Punkt minimaler Intensität  $P$  verschoben werden.

Der Gangunterschied in Punkt  $P$  entspricht:

$$\Delta = IP - OP. \quad (4.15)$$

Für die Strecken in Gleichung 4.15 können entsprechend der Geometrie in Abbildung 4.4 andere Ausdrücke gefunden werden, die zusammen mit der Annahme, dass  $z_B \gg \delta z$  folgenden Ausdruck für den Gangunterschied ergeben [FRANÇON, 2012]:

$$\Delta = \delta z \frac{\alpha^2}{2}. \quad (4.16)$$

Für den Gangunterschied von  $\lambda$  ergibt sich somit für die axiale Specklegröße:

$$\delta z \approx 2 \frac{\lambda}{\alpha^2}. \quad (4.17)$$

Das Specklekorn hat eine ellipsoide, zigarrenartige Form mit typischer Abmessung  $\delta$  und  $\delta z$ . Seine Größe ergibt sich alleine aus der genutzten Wellenlänge und der Apertur des Systems.

### 4.1.3 Simulation von Specklemustern

Im Verlauf dieser Arbeit werden an verschiedenen Stellen Simulationen von Specklemustern und deren Bewegung genutzt; sowohl zum besseren Verständnis dynamischer Speckle im Allgemeinen sowie zum Testen von Algorithmen, mit denen die Specklebewegung ausgewertet werden sollen. An dieser Stelle werden nur die theoretischen Grundlagen beschrieben, die sofern nicht anders referenziert aus [GOODMAN, 2005] entnommen sind. Das eigentliche Modell und dessen Implementierung wird zu einem späteren Zeitpunkt in Kapitel 6.3 genauer betrachtet.

#### 4.1.3.1 Kohärente Abbildung

Eine nützliche Eigenschaft einer Sammellinse ist deren inhärente Fähigkeit, eine optische 2 - dimensionale Fouriertransformation durchzuführen. Auf die genaue Herleitung soll an dieser Stelle allerdings verzichtet werden. Anstelle einer einfachen dünnen Linse wird ein mehrlinsiges System betrachtet, das eine Art Blackbox darstellt, dessen Eintrittspupille und Austrittspupille definiert sind (siehe Abb. 4.5). Die Lichtausbreitung zwischen den beiden kann adäquat mit geometrischer Optik beschrieben werden. Weiterhin wird eine örtlich kohärente Lichtquelle angenommen. Eintritts- und Austrittspupille sind Abbilder derselben limitierenden Apertur innerhalb des Systems, daher können alle Beugungsbegrenzungen auf eine dieser beiden assoziiert werden.

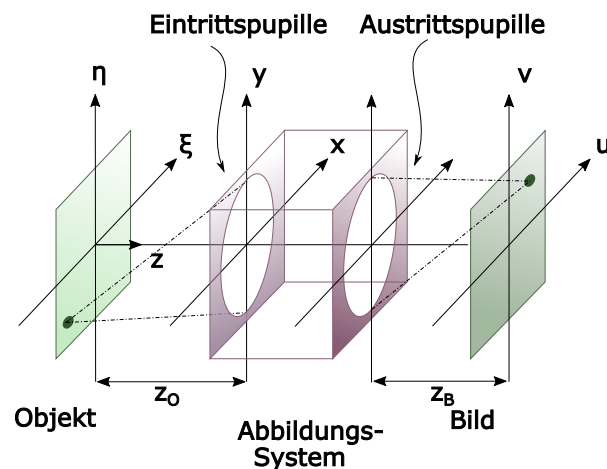


Abbildung 4.5: Verallgemeinertes Modell des Abbildungssystems

Die Entstehung eines Bildes in einem rauminvarianten System kann als zwei-dimensionale Faltung des Objektes mit der Impulsantwort des Abbildungssystems dargestellt werden:

$$U_B(u, v) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(u - \xi, v - \eta) U_O(\xi, \eta) d\xi d\eta. \quad (4.18)$$

$U_O$  ist die Amplitudenverteilung des Objektes und  $U_B$  die des Bildes. Die Funktion  $h$  repräsentiert die Amplituden an den Bildkoordinaten  $(u, v)$  als Antwort auf eine Punktquelle ausgehend von den Objektkoordinaten  $(\xi, \eta)$ . In Abwesenheit von Aberrationen entsteht die Antwort  $h$  von einer sphärischen Welle, die ausgehend von der Austrittspupille zu dem idealen Bildpunkt  $(u = M\xi, v = M\eta)$  konvergiert. Die Vergrößerung  $M$  kann positiv oder negativ sein, um einer eventuellen Invertierung des Bildes Folge zu leisten. Die Amplitudenverteilung im Bildpunkt ist das Fraunhofer-Beugungsmuster der Austrittspupille [siehe GOODMAN, 2005, Kapitel 5.3]. Daher folgt:

$$h(u, v, \xi, \eta) = \frac{A}{\lambda z_B} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \exp\left\{-j \frac{2\pi}{\lambda z_B} [(u - M\xi)x + (v - M\eta)y]\right\} dx dy. \quad (4.19)$$

Die Pupillenfunktion  $P$  ist eins innerhalb und null außerhalb der Apertur,  $A$  ist eine konstante Amplitude,  $z_B$  ist Distanz zwischen der Austrittspupille und Bildebene und  $x, y$  sind Koordinaten in der Ebene der Austrittspupille. Durch die Definition reduzierter Koordinaten kann der Einfluss der Vergrößerung und Bildinvertierung aus der vorangegangenen Gleichung beseitigt werden:

$$\tilde{\xi} = M\xi \quad \tilde{\eta} = M\eta, \quad (4.20)$$

wodurch sich die Amplituden-Punktstrefunktion ändert zu:

$$h(u - \tilde{\xi}, v - \tilde{\eta}) = \frac{A}{\lambda z_B} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \exp\left\{-j \frac{2\pi}{\lambda z_B} [(u - \tilde{\xi})x + (v - \tilde{\eta})y]\right\} dx dy. \quad (4.21)$$

Es kann nun ein ideales Bild  $U_G$  definiert werden, welches die mittels geometrischer Optik gemachte Vorhersage des Bildes unter perfekten Abbildungsbedingungen ist:

$$U_G(\tilde{\xi}, \tilde{\eta}) = \frac{1}{|M|} U_O\left(\frac{\tilde{\xi}}{M}, \frac{\tilde{\eta}}{M}\right), \quad (4.22)$$

und zur Faltungsgleichung für das Bild führt:

$$U_B(u, v) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(u - \tilde{\xi}, v - \tilde{\eta}) U_G(\tilde{\xi}, \tilde{\eta}) d\tilde{\xi} d\tilde{\eta}, \quad (4.23)$$

mit:

$$h(u, v) = \frac{A}{\lambda z_B} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \exp\left\{-j \frac{2\pi}{\lambda z_B} (ux + vy)\right\} dx dy. \quad (4.24)$$

Im allgemeinen Fall eines beugungsbegrenzten Abbildungssystems ist das Bild eine Faltung des durch geometrische Optik vorhergesagten Bildes mit der Impulsantwort, welche das Fraunhofer-Beugungsmuster der Austrittspupille ist.

Die Faltungsformel aus Gleichung 4.23 beschreibt ein verschiebungsinvariantes kohärentes Abbildungssystem. Zur Darstellung im Frequenzbereich werden zunächst die Spektren des Ein- und Ausgangs definiert:

$$G_G(f_X, f_Y) = \iint_{-\infty}^{\infty} U_G(u, v) \exp[-j2\pi(f_X u + f_Y v)] du dv \quad (4.25)$$

$$G_B(f_X, f_Y) = \iint_{-\infty}^{\infty} U_B(u, v) \exp[-j2\pi(f_X u + f_Y v)] du dv. \quad (4.26)$$

Mit der Anwendung des Faltungstheorems ergibt sich direkt:

$$G_B(f_X, f_Y) = H(f_X, f_Y) G_G(f_X, f_Y), \quad (4.27)$$

wenn die Amplitudentransferfunktion  $H$  als die Fouriertransformierte der rauminvarianten Amplituden-Impulsantwort definiert ist:

$$H(f_X, f_Y) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(u, v) \exp[-j2\pi(f_X u + f_Y v)] du dv. \quad (4.28)$$

Die Funktion  $h$  ist wiederum die skalierte Fouriertransformation der Pupillenfunktion (siehe Gl. 4.24). Daher folgt:

$$H(f_X, f_Y) = \mathcal{F} \left\{ \frac{A}{\lambda z_B} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \exp \left\{ -j \frac{2\pi}{\lambda z_B} (ux + vy) \right\} dx dy \right\} \quad (4.29)$$

$$= (A\lambda z_B) P(-\lambda z_B f_X, -\lambda z_B f_Y). \quad (4.30)$$

Der Übersichtlichkeit halber ist  $(A\lambda z_B)$  gleich eins und die negativen Vorzeichen der Argumente in  $P$  können vernachlässigt werden, da die meisten Pupillenfunktion symmetrisch in  $x$  und  $y$  sind. Daher folgt:

$$H(f_X, f_Y) = P(\lambda z_B f_X, \lambda z_B f_Y). \quad (4.31)$$

Diese Funktion agiert wie ein Bandpass mit scharfer Grenze im Frequenzraum.

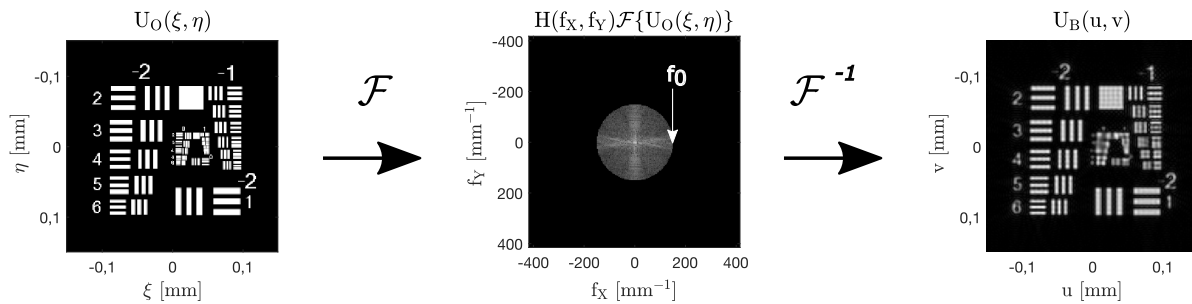
#### 4.1.3.2 Simulation kohärenter Abbildung mit Speckle

Mittels schneller Fouriertransformation (engl.: fast Fourier transform, FFT) kann die kohärente Abbildung, wie in Abbildung 4.6 am Beispiel der USAF-Auflösetesttafel zu sehen, simuliert werden:

$$U_B(u, v) = \mathcal{F}^{-1} \{ H(f_X, f_Y) \mathcal{F} \{ U_O(\xi, \eta) \} \}, \quad (4.32)$$

wobei hier  $M = 1$  und die Amplitudentransferfunktion gegeben ist durch:

$$H(f_X, f_Y) = \text{circ} \left( \frac{\sqrt{f_X^2 + f_Y^2}}{\omega / \lambda z_B} \right), \quad (4.33)$$



**Abbildung 4.6: Simulation einer kohärenten Abbildung**

Das Objekt wird nach der FFT im Frequenzraum mit der Amplitudentransferfunktion multipliziert, was einem Bandpassfilter mit scharfer Grenze gleichkommt. Durch die inverse FFT kann das Bild generiert werden.

mit der Grenzfrequenz  $f_0$  definiert als:

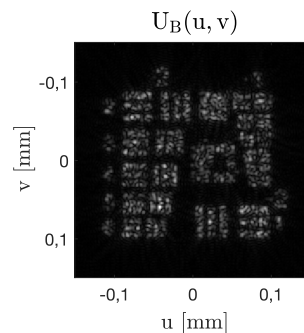
$$f_0 = \frac{\omega}{\lambda z_B}, \quad (4.34)$$

wenn  $\omega$  der Radius der Pupillenöffnung ist.

Die in Gleichung 4.33 genutzte  $\text{circ}(x)$  - Funktion wird hier als die zirkuläre Funktion definiert, die den Einheitskreis repräsentiert:

$$\text{circ}(x) = \begin{cases} 1 & \text{für } x \leq 1 \\ 0 & \text{für } x > 1. \end{cases} \quad (4.35)$$

Durch Hinzufügen eines zufälligen, komplexen, exponentiellen Phasenterms zum Objektfeld, von dem bisher nur die Amplituden betrachtet wurden, entstehen zusätzlich Speckle, wie in Abbildung 4.7 der USAF-Auflösungstesttafel überlagert zu sehen ist.



**Abbildung 4.7: Simulation der kohärenten Abbildung eines Objektes mit rauer Oberfläche**

Die raue Oberfläche wird durch einen zufälligen Phasenterm des Objektfeldes simuliert, was zu Specklen bei der kohärenten Abbildung sorgt.

### 4.1.3.3 Aberrationen

Bisher wurden nur aberrationsfreie, ideale Abbildungen betrachtet. Unter der Annahme einer Punktquelle als Objekt verlässt eine perfekt sphärische Welle die Austrittspupille und konvergiert zum idealen Bildpunkt der Abbildung. Abweichungen von dieser idealen sphärischen Welle sind Aberrationen und können mit einem Phasenfehler von  $kW(x, y)$  am Punkt  $(x, y)$  beschrieben werden. Dadurch ergibt sich für die generalisierte komplexe Pupillenfunktion  $\mathcal{P}$ :

$$\mathcal{P}(x, y) = P(x, y) \exp[jkW(x, y)], \quad (4.36)$$

wobei  $W(x, y)$  der effektive Pfadlängenfehler ist und  $k = 2\pi/\lambda$ .

Damit ändert sich die Amplitudentransferfunktion  $H$  zu:

$$H(f_X, f_Y) = \mathcal{P}(\lambda z_B f_X, \lambda z_B f_Y) \quad (4.37)$$

$$= P(\lambda z_B f_X, \lambda z_B f_Y) \exp[jkW(\lambda z_B f_X, \lambda z_B f_Y)]. \quad (4.38)$$

#### 4.1.3.3.1 Fokusfehler

Der Defokus ist für die folgenden Betrachtungen von besonderem Interesse. Das Zentrum der Wölbung der sphärischen Wellenfront liegt nun entweder hinter oder vor der Bildebene. Die Phase in der Pupillenebene kann beschrieben werden durch:

$$\phi(x, y) = -\frac{\pi}{\lambda z_A}(x^2 + y^2), \quad (4.39)$$

wobei  $z_A \neq z_B$ . Der Weglängenfehler  $W(x, y)$  ergibt sich durch Subtraktion der tatsächlichen Phasenverteilung von der idealen:

$$kW(x, y) = -\frac{\pi}{\lambda z_A}(x^2 + y^2) + \frac{\pi}{\lambda z_B}(x^2 + y^2), \quad (4.40)$$

$$W(x, y) = -\frac{1}{2}\left(\frac{1}{z_A} - \frac{1}{z_B}\right)(x^2 + y^2). \quad (4.41)$$

Allgemein können verschiedene Arten von Aberrationen durch Zernike Polynome dargestellt werden, deren Summe den gesamten Phasenfehler  $W$  ergibt.

## 4.2 Specklemesstechnik

In der Holografie oder bei kohärenter Bildgebung sind Speckle störend und schwierig zu eliminieren. Sie lassen sich durch Überlagerung mehrerer Specklemuster reduzieren. Speckle können aber auch als Informationsträger und nicht als Bildgebungsartefakt oder Rauschen betrachtet und in der Messtechnik eingesetzt werden. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren, Speckle zu nutzen, um beispielsweise die Rauheit von Oberflächen [LÉGER *et al.*, 1975], Oberflächenverschiebung oder -vibrationen [LEENDERTZ, 1970] zu messen.

### 4.2.1 Specklefotografie

Bei der Verschiebung von rauen Oberflächen bewegen sich die Speckle in erster Näherung mit und zwar so, als wären sie Teil ebenjener Oberfläche, und dass obwohl die detaillierte Struktur des Objektes gar nicht aufgelöst werden kann. Die Specklefotografie fasst eine Vielzahl an Techniken zusammen, welche die Änderung zwischen zwei Specklemustern auswerten. Die beiden Specklemuster entstehen durch die Beleuchtung derselben rauen Oberfläche, einmal in ihrem Ausgangszustand und einmal nach deren Veränderung durch Translation, Deformation oder Ähnliches. Dabei werden beide Specklemuster durch ein Abbildungssystem entweder im Fokus oder defokussiert aufgenommen. Früher geschah dies auf demselben fotografischen Film. Die entwickelte Doppelbelichtung, oft als Specklegramm bezeichnet, kann optisch fouriertransformiert werden, indem ein Teil des Specklegramms erneut mit einer kohärenten Lichtquelle ausgeleuchtet wird und das Intensitätsmuster, das in der hinteren Brennebene einer Sammellinse entsteht, analysiert wird. Es resultiert ein Streifenmuster, dessen Periode Aufschluss über die Distanz der Oberflächenbewegung gibt. Die Streifen verlaufen senkrecht zur Bewegungsrichtung des Objektes. Die moderne Form der Streifenanalyse nutzt natürlich digitale Aufnahmen der Specklemuster und digitale Fouriertransformation.

### 4.2.2 Berechnung der Speckleänderung bei Bewegung und Änderung des Objektes

#### 4.2.2.1 Objekttranslation in der Objektebene (in-plane)

Wie in Abschnitt 4.1.3.1 beschrieben und durch Gleichung 4.32 gezeigt ist, besteht eine Fouriertransformationsbeziehung sowohl zwischen der komplexen Amplitudenverteilung des Objektes und der Eintrittspupille als auch zwischen Austrittspupille und dem Bild. Die Bildentstehung ist demnach ein zweistufiger Vorgang, nämlich die Beugung zwischen Objekt und Eintrittspupille sowie zwischen Austrittspupille und Bild. Der Übergang zwischen Ein- und Austrittspupille wird durch die Pupillenfunktion berücksichtigt.

Die komplexe Amplitude an der Eintrittspupille  $G_O$  ist also die Fouriertransformierte des Objektes  $U_O$  (wobei  $U_O$  bereits das skalierte Objekt darstellt und reduzierte Koordinaten genutzt werden):

$$\begin{aligned} \mathcal{F}\{U_O(u, v)\} &= G_O(f_X, f_Y) \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} U_O(u, v) \exp[-j2\pi(f_X u + f_Y v)] du dv. \end{aligned} \quad (4.42)$$

Eine Translation des Objektes um  $(\Delta u, \Delta v)$  im Objektraum sorgt laut Fourier-Shift-Theorem zu einem linearen Phasenshift im Frequenzraum, also an der Eingangspupille:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}\{U_O(u - \Delta u, v - \Delta v)\} &= G_O(f_X, f_Y, \Delta u, \Delta v) \\ &= G_O(f_X, f_Y) \exp[-j2\pi(f_X \Delta u + f_Y \Delta v)]. \end{aligned} \quad (4.43)$$

Unter der Annahme eines idealen optischen Systems ohne Aberrationen ist  $(f_X, f_Y) = (f'_X, f'_Y)$ , d. h. die normierten Koordinaten der Eintrittspupille sind gleich der der Austrittspupille und die Pupillenfunktion  $H(f_X, f_Y)$  ist konstant über die gesamte Pupille, ergibt sich für die komplexe Amplitude des Bildes:

$$U_B(u, v, \Delta u, \Delta v) = \iint_{-\infty}^{\infty} H(f_X, f_Y) G_O(f_X, f_Y, \Delta u, \Delta v) \exp[-j2\pi(f'_X u + f'_Y v)] du dv. \quad (4.44)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 4.43 in die obige Gleichung ergibt sich:

$$U_B(u, v, \Delta u, \Delta v) = G_O(u - \Delta u, v - \Delta v). \quad (4.45)$$

Die Translation des Objektes führt also zu einer gesamtheitlichen Verschiebung der Speckle. Hinzu kommt eine leichte Änderung des Specklemusters an den Rändern, da hier Streuelemente der Oberfläche den ausgeleuchteten Bereich verlassen oder neue in ihn hinein treten.

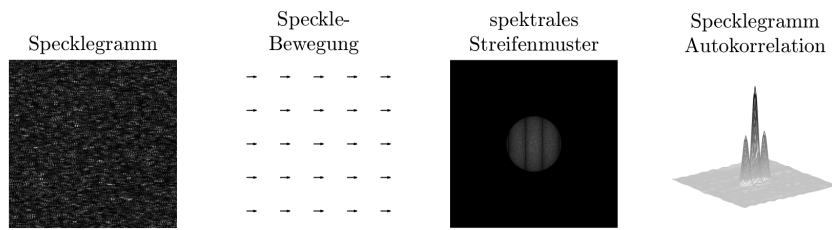
Sei nun die Intensität des ersten Specklemusters  $I_1(u, v)$  und die des zweiten Musters nach Objektverschiebung  $I_2(u - \Delta u, v - \Delta v)$ . Für kleine Verschiebungen sind beide Specklemuster nur schwach dekorreliert und es kann davon ausgegangen werden, dass  $I_2(u - \Delta u, v - \Delta v) \approx I_1(u - \Delta u, v - \Delta v)$ . Die Summe der beiden Intensitätsverteilungen, also das Specklegramm ist  $I_T(u, v) = I_1(u, v) + I_2(u - \Delta u, v - \Delta v)$ . Normalerweise werden nur Teile des Specklegramms weiter ausgewertet, um z. B. verschiedene Bewegungen in verschiedenen Bereichen des Objektes zu detektieren. Daher wird eine Wichtungsfunktion mit  $0 \leq f_w(u, v) \leq 1$  eingeführt. Durch optische oder digitale Fouriertransformation des gewichteten Specklegramms erhält man:

$$\mathcal{F}\{f_w(u, v) I_T(u, v)\} = \mathcal{S}_1(f_X, f_Y) + \mathcal{S}_2(f_X, f_Y) \exp[-j2\pi(\Delta u f_X + \Delta v f_Y)], \quad (4.46)$$

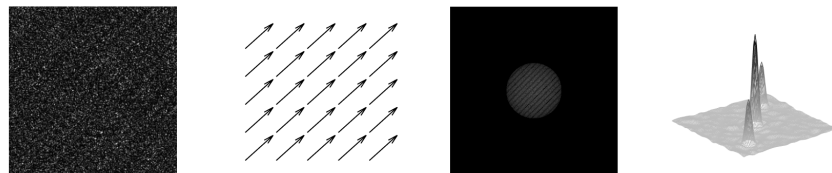
wo  $\mathcal{S}_1(f_X, f_Y)$  und  $\mathcal{S}_2(f_X, f_Y)$  jeweils die Fouriertransformierten von  $f_w(u, v) I_1(u, v)$  und  $f_w(u, v) I_2(u, v)$  sind. Die Intensität des quadratischen Betrags der Fouriertransformation ist:

$$\begin{aligned} |\mathcal{F}\{f_w(u, v) I_T(u, v)\}|^2 &= |\mathcal{S}_1(f_X, f_Y)|^2 + |\mathcal{S}_2(f_X, f_Y)|^2 \\ &\quad + \mathcal{S}_1(f_X, f_Y) \mathcal{S}_2^*(f_X, f_Y) \exp[j2\pi(\Delta u f_X + \Delta v f_Y)] \\ &\quad + \mathcal{S}_1^*(f_X, f_Y) \mathcal{S}_2(f_X, f_Y) \exp[-j2\pi(\Delta u f_X + \Delta v f_Y)] \\ &= (|\mathcal{S}_1|^2 + |\mathcal{S}_2|^2) + 2|\mathcal{S}_1||\mathcal{S}_2| \\ &\quad \times \cos[2\pi(\Delta u f_X + \Delta v f_Y) + \phi_1 - \phi_2] \\ &= 2|\mathcal{S}_1|^2(1 + \cos(2\pi(\Delta u f_Y + \Delta v f_Y))) \quad \text{für } \mathcal{S}_1 = \mathcal{S}_2, \end{aligned} \quad (4.47)$$

mit  $\phi_1(f_X, f_Y) = \arg\{\mathcal{S}_1(f_X, f_Y)\}$  und  $\phi_2(f_X, f_Y) = \arg\{\mathcal{S}_2(f_X, f_Y)\}$ . Die Intensitätsverteilung im Fourierraum ist demnach cosinusförmig mit variabler Ausrichtung, Amplitude und Periode moduliert. In Abbildung 4.8 sind die Streifenmuster zweier Specklegramme mit unterschiedlicher Richtung und Amplitude der Objekttranslationen anhand von simulierten Specklemustern zu sehen. Die Auslenkung der Oberfläche kann prinzipiell aus der Periode der Streifen bestimmt werden. Eine Strategie, die Streifenperiode und auch deren Ausrichtung zu ermitteln, ist eine weitere Fouriertransformation, diesmal vom Leistungsspektrum  $|\mathcal{S}(f_X, f_Y)|^2$ , was der Autokorrelationsfunktion des Specklegramms  $I_T(u, v)$  entspricht. Die Autokorrelationsfunktion sollte ein zentrales Hauptmaximum haben, und zwei Nebenmaxima an den Positionen  $(\Delta u, \Delta v)$  und  $(-\Delta u, -\Delta v)$ . Somit kann, bis auf die Unsicherheit das Vorzeichen der Richtung, die gewünschte Information über die Auslenkung extrahiert werden. In Abbildung 4.8 sind jeweils zusätzlich die Autokorrelationsfunktionen gezeigt und wie zu erwarten, befinden sich die Nebenmaxima genau bei  $\pm(6; 0)\mu\text{m}$  (Abb. 4.8a) und  $\pm(18; 18)\mu\text{m}$  (Abb. 4.8b), was der ursprünglichen Auslenkung des Objektes entspricht.



(a) Objektbewegung:  $\Delta u = 6 \mu\text{m}$ ,  $\Delta v = 0 \mu\text{m}$  [Link zur Animation](#)



(b) Objektbewegung:  $\Delta u = 18 \mu\text{m}$ ,  $\Delta v = 18 \mu\text{m}$  [Link zur Animation](#)

**Abbildung 4.8: Simulation der Specklebewegung bei Objekttranslation in der Objektebene**

Es ist jeweils das Specklegramm (die Überlagerung zweier Specklemuster vor und nach der Translation), die Specklebewegung als Vektorkarte, das spektrale Streifenmuster und die Autokorrelationsfunktion des Specklegramms dargestellt, für: (a) ausschließlich horizontale Objektverschiebung um  $6 \mu\text{m}$  (10 Pixel) (b) horizontale und vertikale Objektverschiebung um je  $18 \mu\text{m}$  (30 Pixel).

**4.2.2.2 Objektrotation aus der Objektebene heraus**

Bei gleicher Abbildungsgeometrie, wie im vorangegangenen Abschnitt ausgeführt, führt eine Rotation des Objektes mit einem Winkel  $\gamma$  um die  $x$ -Achse (Abb. 4.10) zu einem Phasengradienten  $\nabla\phi = 2\gamma k$ , der die ursprüngliche Wellenfront des Objektes  $U_O(\mathbf{u})$  ändert zu:

$$U_{O/\nabla\phi}(\mathbf{u}) = U_O(\mathbf{u}) \exp[-j2\pi\mathbf{u}\nabla\phi], \tag{4.48}$$

was für eine laterale Verschiebung der Fouriertransformierten in der Pupillenebene sorgt:

$$\mathcal{F}\{U_{O/\nabla\phi}(\mathbf{u})\} = G_O[\mathbf{f}_X - \nabla\phi]. \tag{4.49}$$

Der Einfachheit halber wird im Folgenden die ein-dimensionale Notation verwendet und der Vektor  $\mathbf{u}$  repräsentiert die Koordinaten  $(u, v)$  im Ortsraum und  $\mathbf{f}_X$  die Frequenzkoordinaten  $(f_X, f_Y)$ .

Durch erneute Fouriertransformation erhält man in der Bildebene:

$$U_B(\mathbf{u}) = \mathcal{F}^{-1}\{G_O[\mathbf{f}_X - \nabla\phi]\} = U_O(\mathbf{u}) \exp[-j2\pi\mathbf{u}\nabla\phi]. \tag{4.50}$$

Bei idealer Abbildung sorgt diese Verschiebung in der Pupillenebene wiederum für einen Phasenterm in der Bildebene, der allerdings keinen Einfluss hat, da nur Amplituden detektiert werden. Für kleine Winkel bleibt das Specklemuster also nahezu identisch, erst mit zunehmendem Winkel der Verkipfung setzt eine Dekorrelation ein.

Dieses Verhalten ändert sich allerdings, wenn die Abbildung nicht ideal ist. Ist die Abbildung leicht defokussiert, kann eine laterale Bewegung der Speckle beobachtet werden, die mit einer tatsächlichen Translation der Probe verwechselt werden kann. Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln

erläutert, können Phasenfehler in der komplexen Pupillenfunktion berücksichtigt werden. Ein Defokus um  $\Delta z$  sorgt also für die Multiplikation des Raumfrequenzspektrums mit der quadratischen Phasenfehlerfunktion:

$$W(\mathbf{f}_X) = \frac{\Delta z}{2k} \mathbf{f}_X^2, \quad (4.51)$$

was das fokussierte Bild aus Gleichung 4.50 ändert zu:

$$U_B(\mathbf{u}) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ G_O[\mathbf{f}_X - \nabla\phi] \exp \left[ j \frac{\Delta z}{2k} \mathbf{f}_X^2 \right] \right\}. \quad (4.52)$$

Die Raumfrequenzen werden nun entsprechend  $\mathbf{f}_X \rightarrow \mathbf{f}_X + \nabla\phi$  um  $\nabla\phi$  verschoben, was im Ortsraum mit einer Multiplikation mit dem entsprechenden Phasenterm  $\exp[j\mathbf{u}\nabla\phi]$  kompensiert wird (was einer Substitution der Integrationsvariablen der äußeren Fouriertransformation entspricht) [SPAHR, 2017]. Für die defokussierte Abbildung des phasenverschobenen Wellenfeldes ergibt sich dann:

$$\begin{aligned} U_B(\mathbf{u}) &= \mathcal{F}^{-1} \left\{ G_O[\mathbf{f}_X] \exp \left[ j \frac{\Delta z}{2k} (\mathbf{f}_X + \nabla\phi)^2 \right] \right\} \exp[j\mathbf{u}\nabla\phi] \\ &= \mathcal{F}^{-1} \left\{ G_O[\mathbf{f}_X] \exp \left[ j \frac{\Delta z}{2k} (\mathbf{f}_X^2 + (\nabla\phi)^2 + 2\mathbf{f}_X\nabla\phi) \right] \right\} \exp[j\mathbf{u}\nabla\phi]. \end{aligned} \quad (4.53)$$

Der von  $\mathbf{f}_X$  und  $\mathbf{u}$  unabhängige Phasenterm kann aus der Fouriertransformation herausgezogen werden. Durch Anwendung des Fourier-Shift-Theorems kann der Phasenterm  $j \frac{\Delta z}{k} \mathbf{f}_X \nabla\phi$  des Frequenzraums in eine Translation im Ortsraum überführt werden:

$$\begin{aligned} U_B(\mathbf{u}) &= \mathcal{F}^{-1} \left\{ G_O[\mathbf{f}_X] \exp \left[ j \frac{\Delta z}{2k} \mathbf{f}_X^2 \right] \right\} \left( \mathbf{u} - \frac{\Delta z}{k} \nabla\phi \right) \\ &\quad \times \exp \left[ j \mathbf{u} \nabla\phi + j \frac{\Delta z}{2k} (\nabla\phi)^2 \right]. \end{aligned} \quad (4.54)$$

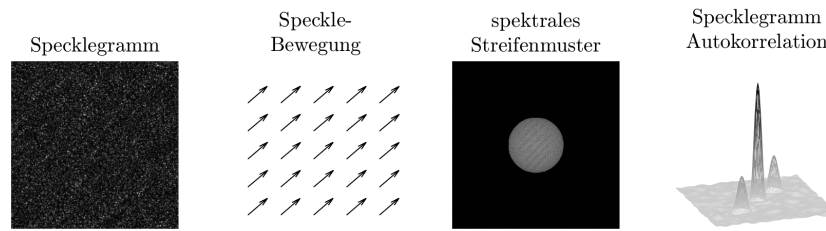
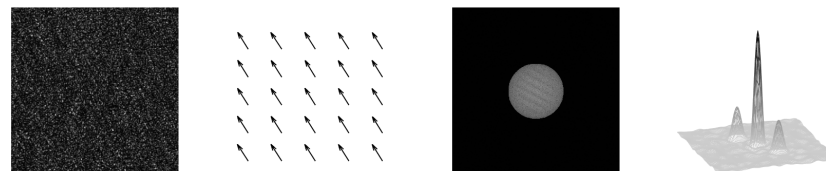
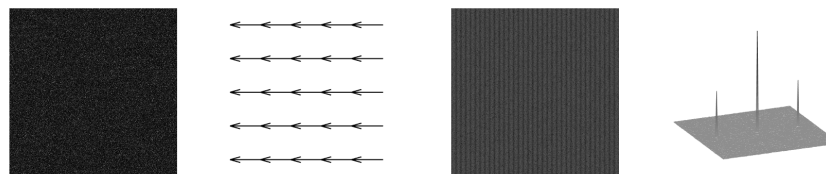
Alle reinen Phasenfaktoren können vernachlässigt werden, da nur die Intensität des Specklemusters detektiert wird. Der Ausdruck aus Gleichung 4.54 ist somit das defokussierte Bild  $U_B^D$  der Wellenfront, die nicht phasenverschoben ist (ohne Rotation des Objektes), da:

$$U_B^D = \mathcal{F}^{-1} \left\{ G_O[\mathbf{f}_X] \exp \left[ j \frac{\Delta z}{2k} \mathbf{f}_X^2 \right] \right\}, \quad (4.55)$$

das um  $-\frac{\Delta z}{k} \nabla\phi$  verschoben ist. Für die detektierte Amplitude in der Bildebene ergibt sich somit:

$$|U_B(\mathbf{u})|^2 = |U_B^D(\mathbf{u} - \frac{\Delta z}{k} \nabla\phi)|^2 = |U_B^D(\mathbf{u} - 2\Delta z\gamma)|^2. \quad (4.56)$$

Eine Rotation des Objektes stellt sich bei defokussierter Abbildung als Translation des Specklemusters dar, die vom Winkel der Verkippung und vom Defokus abhängig ist [SPAHR *et al.*, 2019]. Dieser Effekt ist in Abbildung 4.9 aufgezeigt. Ein Objekt wird gleichzeitig um je 12  $\mu\text{m}$  horizontal und vertikal in der Objektebene ausgelenkt und um 2° aus der Ebene heraus gekippt. Bei fokussierter Abbildung hat die Rotation keinen Einfluss und die Position der Nebenmaxima der Autokorrelationsfunktion stimmen mit der Translation der Oberfläche überein. Bei einem Defokus von 0,5 mm ändert sich die detektierte Richtung der Bewegung und auch die Amplitude und die reine Translation kann somit nicht mehr bestimmt werden. Abbildung 4.9c zeigt die Specklebewegung in der Fourierebene, in der die Translation der Speckle nur noch von der Objektrotation abhängt und die Translation keinen

(a) Bildebene, fokussiert [Link zur Animation](#)(b) Bildebene, defokussiert ( $\Delta z = -0,5 \text{ mm}$ ) [Link zur Animation](#)(c) Fourierebene [Link zur Animation](#)**Abbildung 4.9: Einfluss der Detektionsebene auf die Specklebewegung bei Objektrotation**

Es ist jeweils das Specklegramm (die Überlagerung zweier Specklemuster vor und nach Translation und Rotation), die Specklebewegung als Vektorkarte, das spektrale Streifenmuster und die Autokorrelationsfunktion des Specklegramms bei Objekttranslation um je  $12 \mu\text{m}$  horizontal und vertikal mit gleichzeitiger Rotation um  $2^\circ$  dargestellt.

(a) fokussierte Detektion in der Bildebene (b) um  $-0,5 \text{ mm}$  defokussierte Detektion in der Bildebene (c) Detektion in der Fourierebene.

Einfluss hat, wie TIZIANI [1972] erstmals zeigte. Das Specklemuster wird dazu nicht abgebildet, sondern in der Fourierebene der Linse mit Film oder Kamera aufgenommen. Die Beleuchtung erfolgt dabei mit kollimiertem Licht. GREGORY [1976] zeigte, dass auch nicht kollimiertes Licht genutzt werden kann, wenn die Speckle in der Bildebene der Lichtquelle aufgenommen werden.

Die Phasengradienten  $\nabla\phi$  der ursprünglichen Wellenfront sorgt für eine laterale Verschiebung nicht mehr in der Pupillenebene, sondern in der hinteren Brennebene der Linse.

Wie der Phasengradient mit der Verschiebung der Speckle und dem spektralen Streifenabstand zusammenhängt, kann anhand von Abbildung 4.10 veranschaulicht werden. Wird das Objekt um den Punkt H rotiert, wandert der Punkt  $P_1$  der rauhen Oberfläche nach  $P_2$  und verursacht einen Weglängenunterschied der schräg einfallenden Welle:

$$\begin{aligned}
 [QP_2] &= 2(\xi - \xi_0) \sin \frac{1}{2} \gamma \cos(\beta - \frac{1}{2} \gamma) \\
 &\approx (\xi - \xi_0) \gamma \cos \beta,
 \end{aligned}
 \tag{4.57}$$

für kleine Winkel  $\gamma$ . Die ursprüngliche Wellenfront hinter dem Objekt:

$$U_O(\xi) = u(\xi) \exp[(j2\pi\xi \sin \beta)/\lambda], \quad (4.58)$$

ändert sich dadurch zu:

$$U_O(\xi, \gamma) = u(\xi) \exp[(j2\pi\xi \sin \beta)/\lambda] \exp[j2\pi\xi\gamma/\lambda] \times \exp[(j2\pi(\xi - \xi_0)\gamma \cos \beta)/\lambda]. \quad (4.59)$$

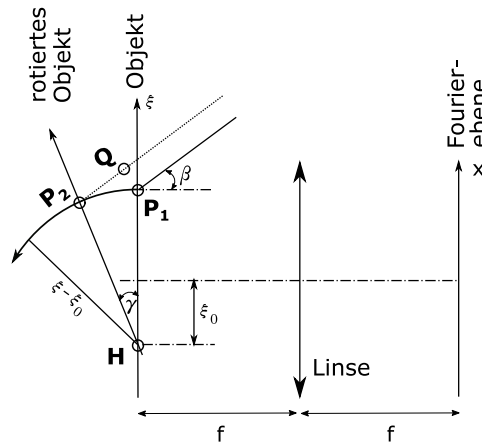


Abbildung 4.10: Anordnung zur Detektion der Speckle in der Fourierebene

Die Fouriertransformierte der ursprünglichen Wellenfront, also das Specklemuster, das in der Fourierebene der Linse detektiert wird:

$$\mathcal{F}\{U_O(\xi)\} = G_O[\mathbf{f}_X - (\sin \beta)/\lambda], \quad (4.60)$$

ändert sich entsprechend zu:

$$\mathcal{F}\{U_O(\xi, \gamma)\} = G_O[\mathbf{f}_X - (\sin \beta)/\lambda - \gamma(1 + \cos \beta)/\lambda] \times \exp[j2\pi\xi_0\gamma \cos \beta/\lambda]. \quad (4.61)$$

Die Summe der aufgezeichneten Intensitäten des Specklemusters vor und nach der Rotation, unter Vernachlässigung von Konstanten, ist:

$$I(\mathbf{f}_X) \approx |G_O[\mathbf{f}_X - (\sin \beta)/\lambda]|^2 + |G_O[\mathbf{f}_X - (\sin \beta)/\lambda - \gamma(1 + \cos \beta)/\lambda]|^2. \quad (4.62)$$

Ebenso wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, kann nun das aufgezeichnete Specklegramm wieder optisch oder digital fouriertransformiert werden, um diesmal allerdings aus der Periode des Streifenmusters  $\Delta\xi'$  den Winkel der Rotation zu bestimmen [TIZIANI, 1972]:

$$\gamma = \frac{\lambda f}{(1 + \cos \beta)\Delta\xi'} \quad (4.63)$$

Eine zusätzliche laterale Translation der Oberfläche würde zu einem weiteren Phasenterm in der Fourierebene führen, der aber nicht detektiert wird, da nur Intensitäten aufgezeichnet werden, es kann allerdings die Korrelation der Specklemuster reduzieren.

### 4.2.2.3 Speckledekorrelation in biologischen Proben

Findet in einer Probe jedoch keine gerichtete Bewegung des gesamten Objektes statt, sondern eine zufällige Bewegung einzelner Streueranteile, eine Änderung des Brechungsindex oder der strukturellen Beschaffenheit, oder eine Kombination daraus, werden auch die Speckle, anstatt sich gerichtet zu bewegen, zufällig verschwinden, wieder auftauchen und ihre Intensität ändern, ohne wesentlich ihre Position zu verändern. Da die Specklebewegung an das Kochen von Flüssigkeiten erinnert, wird diese Art der Bewegung auch *boiling* Speckle genannt.

DUNCAN UND KIRKPATRICK [2008] und SONG *et al.* [2016] haben jeweils Methoden vorgestellt, um physikalisch realistische, zeitlich variierende Specklemuster mit korrekten Statistiken erster und zweiter Ordnung ohne bzw. mit abbildender Optik zu simulieren. Dabei werden nur zwei statisch unabhängige Matrizen mit Zufallszahlen verwendet, um eine Sequenz an Specklemustern mit vordefiniertem Verlauf der Dekorrelation zu erzeugen. Dabei ändert sich ein Ausgangsspecklemuster hin zum Endspecklemuster, wenn sich der Korrelationskoeffizient von eins mit vordefiniertem Verlauf zu null ändert. Die beiden erzeugten Matrizen mit Zufallszahlen sind jeweils die zufälligen Phasen zur Erzeugung von Anfangs- und Endspecklemuster. Im Folgenden wurde jedoch eine einfachere Alternative gewählt, die unabhängig von einem Endspecklemuster ist.

Dabei werden zu der initialen, zufälligen Phasenverteilung, die das vom Objekt zurückgestreute Licht repräsentiert und aus der das initiale Specklemuster generiert wird, in jeden weiteren Zeitschritt normalverteilte zufällige kleine Phasen addiert:

$$U_t = u \exp[j\phi_{t-1} + p_t \Delta\phi], \quad (4.64)$$

wobei  $\Delta\phi$  Zufallszahlen zwischen null und eins sind, die mit dem Faktor  $p_t$  skaliert werden, um verschieden starke Dekorrelation zu berücksichtigen. Abbildung 4.11 zeigt den mittleren Korrelationskoeffizient aufeinander folgender Frames einer Specklesequenz für ansteigende Skalierungsfaktoren  $p_t$ . Der Verlauf der Korrelationskoeffizienten folgt ungefähr einer Sigmoid-Funktion der Form:

$$r_{t,t+1} = a / (c + \exp(b \cdot p_t)), \quad (4.65)$$

und mit den Koeffizienten des Fits:  $a = 21$ ,  $b = 7$  und  $c = 20$  kann die Skalierung entsprechend einer gewünschten Dekorrelation zwischen aufeinander folgenden Specklemustern gewählt werden.

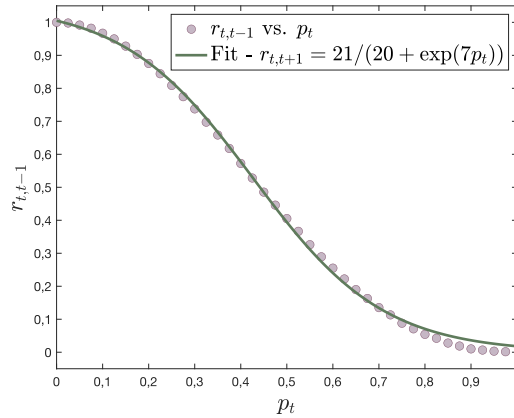
### 4.2.2.4 Dynamische Speckle während der Photokoagulation

Während der Photokoagulation kommt es zunächst zu einer Expansion des Gewebes aufgrund der ansteigenden Temperatur. Diese Ausdehnung hat zur Folge, dass das zurück gestreute Licht eine Phasenänderung erfährt. Basierend auf der simulierten Temperaturverteilung (siehe Abb. 2.9) kann für jeden Zeitpunkt während und nach der Laserbestrahlung die Verschiebung des Gewebes errechnet werden [SPAHR *et al.*, 2012]:

$$\gamma \Delta T \approx \frac{\partial \Delta z}{\partial z}, \quad (4.66)$$

wobei der volumetrische Ausdehnungskoeffizient mit  $\gamma(20^\circ \text{C}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{K}^{-1}$  angenommen wird. Bei einer gleichmäßigen und großflächigen Bestrahlung eines homogenen Schichtsystems kann die Expansion des Gewebes in x und y Richtung vernachlässigt werden. Durch Integration der lokalen Expansion erhält man die Verschiebung  $\Delta z_i$  in axialer Richtung. Hieraus ergibt sich die Phasenänderung des zurückgestreuten Lichtes:

$$\Delta\phi_i = \Delta z_i \frac{4\pi}{\lambda}. \quad (4.67)$$



**Abbildung 4.11: Dekorrelation von Specklemustern**

Abhängigkeit des mittleren Korrelationskoeffizienten aufeinanderfolgender Specklemuster  $r_{t,t-1}$  vom Skalierungsfaktor  $p_t$  der zufällig addierten Phasen. Für verschiedene Werte des Skalierungsfaktors  $p_t$  wurden nach Gleichung 4.64 Sequenzen von Specklemustern simuliert und anschließend der Korrelationskoeffizient zwischen aufeinanderfolgenden Specklemustern innerhalb dieser Sequenz bestimmt. Der mittlere Korrelationskoeffizient  $r_{t,t-1}$  der Specklesequenz ist über den Skalierungsfaktor  $p_t$ , dargestellt als violette Kreise, aufgetragen. Der Fit dieser Kurve ist in grün dargestellt.

Die zusätzlichen Phasen werden auf die ursprüngliche, zufällige Phasenverteilung, welche die Rückstreuung an der rauen Oberfläche repräsentiert, addiert. Wie bei der Rotation aus der Objektebene heraus führt dies, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, bei kleinen Winkeln der Rotation kaum zu einer Änderung des Specklemusters, solange sich die Probe exakt im Fokus befindet. Bei einem Fokusfehler wird die axiale Bewegung der Oberfläche sich als translatorische Bewegung der Speckle darstellen.

Neben der reinen thermischen Expansion werden sich optische und strukturelle Eigenschaften des Gewebes ändern, sobald die Koagulation der Proteine einsetzt. Wie im vorangegangenen Kapitel 4.2.2.3 beschrieben, sorgen die Gewebeveränderungen in Form von Brechungsindexunterschieden, zufälliger Bewegung von Streuern oder Änderung der Streueigenschaften für zusätzliche *boiling* Speckle.

#### 4.2.2.5 Speckleänderung durch Mikroblasen

Im Gegensatz zur Photokoagulation ist bei der Verwendung von kurzen Pulsdauern der Zellschaden nicht thermischer Natur, sondern es konnte gezeigt werden, dass wenige  $\mu\text{m}$  große Mikroblasen um Melanosome herum entstehen [KELLY, 1997] und diese die Ursache für den Zelltod sind [SCHUELE *et al.*, 2005b]. Werden Melanosome ausreichend durch die Laserbestrahlung aufgeheizt, verdampft das sie umgebende Wasser an ihrer Oberfläche. Ist der Dampfdruck im Inneren der Blase größer als der Umgebungsdruck und der Druck durch die Oberflächenspannung, beginnt die Blase zu wachsen. Wenn der Dampf in der Blase an der Dampf-Wasser-Grenzschicht kondensiert, weil sich diese abkühlt, nimmt die Expansionsgeschwindigkeit der Blase ab, bis sie schließlich kontrahiert. Kommt nach dem völligen Kollaps der Blase das Wasser in erneuten Kontakt mit dem immer noch heißen Melanosom, kann erneut eine Blase aufschwingen [NEUMANN UND BRINKMANN, 2008].

Der Zusammenhang zwischen Lebensdauer der Blase  $\tau_{\mu B}$  und deren maximalem Durchmesser  $d_{\mu B/\text{max}}$  lässt sich durch die Rayleigh-Formel für trägheitsbegrenztes Blasenwachstum abschätzen [NEUMANN UND BRINKMANN, 2006; PLESSET UND PROSPERETTI, 1977]:

$$\tau_{\mu B} \approx 0,915 \sqrt{\frac{\rho_{H_2O}}{p_{\infty} - p_{\text{sat}}(T_{\infty})}} d_{\mu B/\text{max}}, \quad (4.68)$$

mit dem Umgebungsdruck  $p_\infty = 101 \text{ kPa}$ , dem gesättigten Dampfdruck bei Umgebungstemperatur  $p_{\text{sat}}(20^\circ\text{C}) = 2,33 \text{ kPa}$  und der Dichte von Wasser  $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1000 \text{ kg/m}^3$ .

Beim Aufschwingen der Blase wird das eingestrahlte Licht an deren Oberfläche aufgrund des Brechungsindexunterschiedes zwischen dem Blaseninneren und dem umgebenden Cytoplasma, teilweise reflektiert. Die Reflexion führt zu einer Änderung der Phase des zurückgestreuten Lichtes und damit zu einer Modulation des Specklemusters. Durch die Dynamik der Blasen verändern auch andere Zellorganellen ihre Position, was das Specklemuster zusätzlich ändern kann.

### 4.3 Darstellung und Analyse dynamischer Speckle

In vorangegangenen Kapiteln wurden Specklebewegungen zu einzelnen Zeitpunkten anhand von Vektorkarten dargestellt, wie z. B. in Abbildung 4.9.

Im folgenden Kapitel wird deren Erzeugung noch einmal genauer beleuchtet. Da mit dieser Methode allerdings nur die Specklebewegung zu einem Zeitpunkt, bzw. die Bewegung zwischen einem Zeitpunkt und einem beliebigen anderen, dargestellt werden können, werden außerdem noch zwei weitere Verfahren vorgestellt, um den temporalen Verlauf der Specklebewegungen aufzuzeigen. Diese drei Methoden werden im Folgenden genutzt, um zum einen allgemein den Verlauf der Speckleänderung darzustellen und werden darüber hinaus auch verwendet, um weitere Informationen über die Art der Bewegung abzuleiten.

#### 4.3.1 Vektorkarten

Eine Möglichkeit, orts aufgelöst die Bewegung zwischen zwei Frames zu visualisieren, sind Vektorkarten. Dazu kann das Ausgangsbild in viele kleine Sub-Bilder unterteilt werden und die zeitlich aufeinander folgenden Sub-Bilder mithilfe des Fourier-Shift-Theorems registriert werden. Um die Translation zwischen den beiden Bildern  $g_1(x, y)$  und  $g_2 = g_1(x - a, y - b)$  mit deren jeweiligen Fouriertransformierten  $G_1$  und  $G_2$  zu finden, wird zunächst ein Korrelationsbild im Frequenzraum berechnet:

$$K(f_X, f_Y) = \frac{G_1(f_X, f_Y)G_2^*(f_X, f_Y)}{|G_1(f_X, f_Y)G_2^*(f_X, f_Y)|} \quad (4.69)$$

wobei \* die komplexe Konjugation beschreibt. Das Fourier-Shift-Theorem:

$$\mathcal{F}\{g(x - a, y - b)\} = \mathcal{F}\{g(x, y)\}(f_X, f_Y) \exp[-j2\pi(f_X a + f_Y b)], \quad (4.70)$$

erlaubt es  $G_2$  durch  $G_1$  auszudrücken, sodass lediglich der Phasenterm übrig bleibt:

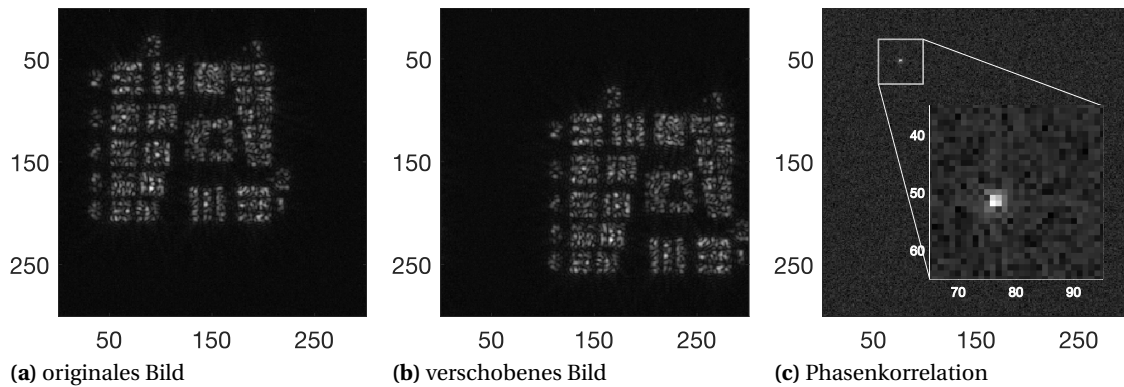
$$K(f_X, f_Y) = \exp[-j2\pi(f_X a + f_Y b)]. \quad (4.71)$$

Indem dieses Bild schließlich zurück in den Ortsraum transformiert wird, kann an die Verschiebungen  $a$  und  $b$  gelangt werden, da die inverse diskrete Fouriertransformation dieser komplexen Exponentialfunktion ein Deltaimpuls ist:

$$k(x, y) = \delta(x - a, y - b). \quad (4.72)$$

Über  $(a, b) = \operatorname{argmax}_{(x, y)} \{k\}$  lässt sich die Position des Peaks bestimmen. Diese gängige Methode zur Registrierung von Bildern ist als Phasenkorrelation bekannt [KUGLIN, 1975].

In der Realität ist das Ergebnis der Phasenkorrelation kein perfekter Deltaimpuls, sondern ein breiterer Peak, wie in Abbildung 4.12c zu sehen ist. Hier wurde das Ausgangsbild um 75,3 Pixel in x und 50,7 Pixel in y-Richtung verschoben und die einfache Phasenkorrelation findet den Peak bei  $x = 76$  und  $y = 52$ . Daher werden Interpolationstechniken genutzt, um die Position des Peaks zu präzisieren. Es wird dann meist von Sub-Pixel-Registrierung gesprochen, da eine nicht-integer Peakposition gefunden werden kann, obwohl es sich um diskrete Daten handelt. Es gibt eine Vielzahl an Sub-Pixel-Registrierungsmethoden und hier wurde die Matlab Funktion `dfregistration.m` genutzt, die auf einem effektiven, aber vor allen schnellen Algorithmus basiert. Dieser ermittelt zunächst auch initial den Kreuzkorrelationspeak mittels diskreter Fouriertransformation (DFT) und verbessert dann die Schätzung der Verschiebung im Frequenzraum, durch Hochabtaben der DFT



**Abbildung 4.12: Demonstration der Phasenkorrelation zur Bildregistrierung**

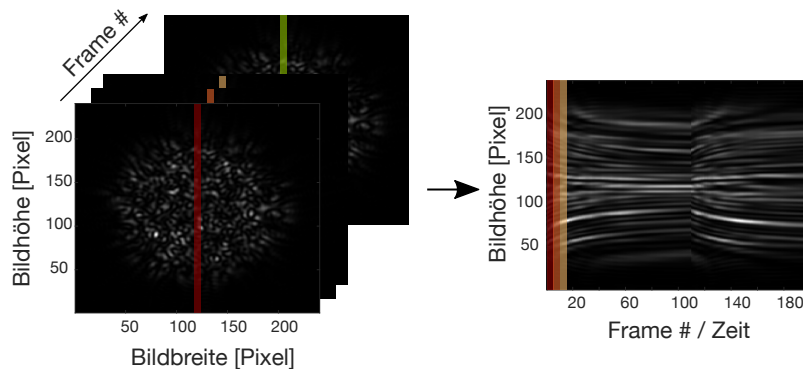
(a) Originales Bild, (b) das gleiche Bild um 75,3 Pixel in x und 50,7 Pixel in y-Richtung verschoben. (c) Phasenkorrelation mit Peak bei  $x = 76$  und  $y = 52$ .

in nur einer kleinen Nachbarschaft [GUIZAR-SICAIROS *et al.*, 2008]. Im Beispiel aus Abbildung 4.12 wird damit der Peak korrekt bei  $x = 75,2$  und  $y = 50,7$  gefunden, was der genauen Verschiebung des Ausgangsbildes entspricht.

Aus den resultierenden Verschiebungen lassen sich Vektorkarten erzeugen, oder es können die Winkel und Amplituden der Vektoren farbcodiert dargestellt werden, wie in Abbildung 4.14 links zu sehen ist.

### 4.3.2 Zeitverlaufs-Specklemuster

Aus einer Bildsequenz wird ein neues Pseudobild erzeugt, indem dieselbe Zeile oder Spalte aus jedem Frame nebeneinander angeordnet werden, wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist. Dieses Pseudobild, das Zeitverlaufs-Specklemuster (ZSM) wird im Englischen als Time History Speckle Pattern (THSP) bezeichnet [OULAMARA *et al.*, 1989; RABAL *et al.*, 2003] und hat die Dimension  $n \times m$ , wobei  $m$  die Anzahl der aufgenommenen Frames ist und  $n$  die Zahl der Pixel der entnommenen Zeile.



**Abbildung 4.13: Erzeugung des Zeitverlaufs-Specklemusters (ZSM) aus einer Bildsequenz**

Aus jedem Frame wird dieselbe Spalte des Bildes genutzt, um ein neues Pseudobild zu erzeugen, das den Verlauf dieser Spalte über die Frames bzw. die Zeit darstellt.

### 4.3.3 Aktivitätskarten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Aktivitätskarten zu erzeugen. Eine der einfachsten ist mittels generalisierter Differenzen [ARIZAGA *et al.*, 2002], indem die pixelweise absoluten Differenzen zweier aufeinander folgender Frames aufsummiert werden. Das resultierende Bild  $I'$  wird demnach

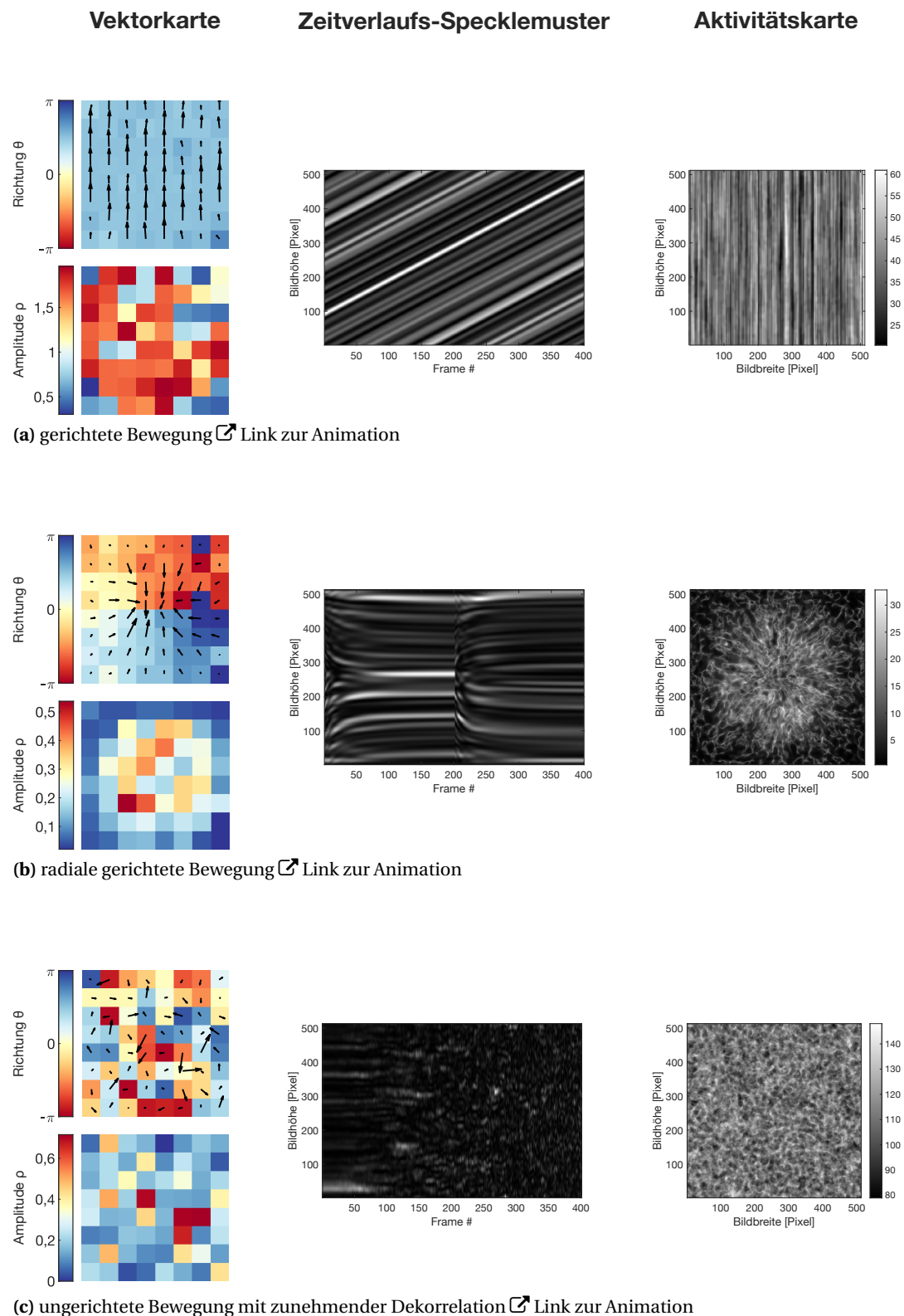
folgendermaßen berechnet:

$$I' = \sum_{k=1}^{m-1} |I_k(i, j) - I_{k+1}(i, j)|, \quad (4.73)$$

wobei  $m$  die Anzahl der Frames ist und  $I_k(i, j)$  der  $k$ -te Frame am Punkt mit den Koordinaten  $i$  und  $j$ . Bildbereiche mit großer Speckleaktivität haben in der resultierenden Aktivitätskarte hohe Pixelwerte, da die Differenzen zwischen den Frames groß sind. Die Differenz der Bilder kann mit deren Summe normiert werden, wie z. B. von FUJII *et al.* [1987, 1985] benutzt:

$$I' = \sum_{k=1}^{n-1} \frac{|I_k(i, j) - I_{k+1}(i, j)|}{I_k(i, j) + I_{k+1}(i, j)}, \quad (4.74)$$

Beispiele für Zeitverlaufs-Specklemuster und Aktivitätskarten sind in Abbildung 4.14 für verschiedene, simulierte Specklebewegungen zu sehen.

**Abbildung 4.14: Möglichkeiten zur Darstellung dynamischer Speckle**

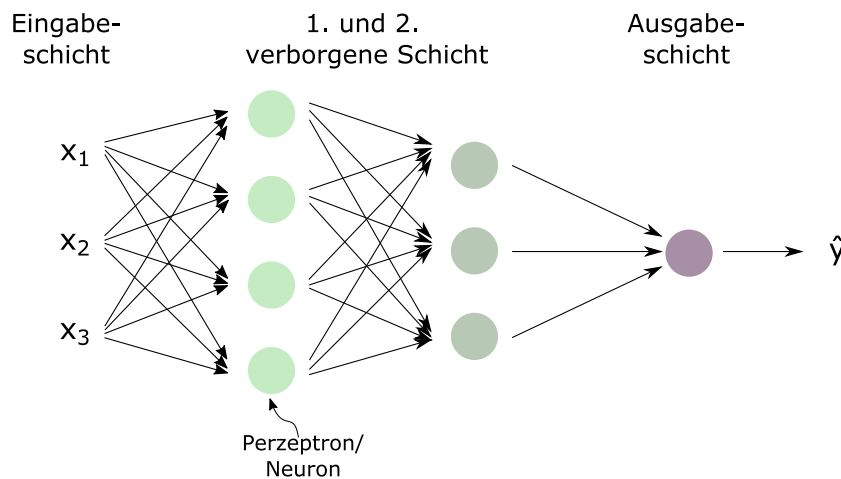
Es sind jeweils links Vektorkarten gezeigt. Zusätzlich zu den Vektoren sind sowohl die Winkel als auch darunter die Amplituden der Vektoren farbcodiert gezeigt. In der Mitte ist jeweils das Zeitverlaufs-Specklemuster und rechts die normierten Aktivitätskarten für die Specklesequenzen gezeigt, mit (a) gerichteter Bewegung (b) radial gerichteter Bewegung und (c) *boiling* der Speckle bzw. ungerichtete Bewegung mit zunehmender Dekorrelation.

#### 4.3.4 Analyse mittels Convolutional Neural Network

Die soeben vorgestellten Algorithmen und Modelle dienen einerseits zur reinen Darstellung der Speckleaktivität aber stellen in dieser Arbeit auch die Basis für weiterführende Analysen dar, um von der Specklebewegung auf einen erzeugten Zellschaden zu schließen. Alle extrahieren dafür aus einer großen Datenmenge nur einige, wenige Merkmale, von denen vermutet wird, dass sie mit dem erzeugten Zellschaden oder der Temperatur korrelieren. Gerade bei einer großen Menge an Eingangsdaten, wie Bildern, können neuronale Netze von Vorteil sein, da sie von alleine lernen, welche die entscheidenden Merkmale für ein bestimmtes Klassifizierungsproblem sind.

##### 4.3.4.1 Multilayer Perzeptron (MLP)

Die grundlegende Idee vieler neuronaler Netze lässt sich zunächst recht anschaulich am Beispiel des Multilayer Perzeptron (MLP) erläutern, welches, wie der Name schon sagt, aus einer Vielzahl an Perzeptronen oder Neuronen besteht, die in einem oder mehreren hidden Layern bzw. verborgenen Schichten angeordnet sind (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15: Schematische Darstellung eines Multilayer Perzeptrons**

Es besteht aus mindestens 3 Schichten, der Eingabeschicht, einer oder mehreren verborgenen Schichten und der Ausgabeschicht. Mit Ausnahme der Eingabeknoten ist jeder Knoten ein Perzeptron/Neuron, das eine nichtlineare Aktivierungsfunktion auf ihren Eingang anwendet, dessen Ergebnis wiederum der Eingang der Neuronen der nächsten Schicht ist.

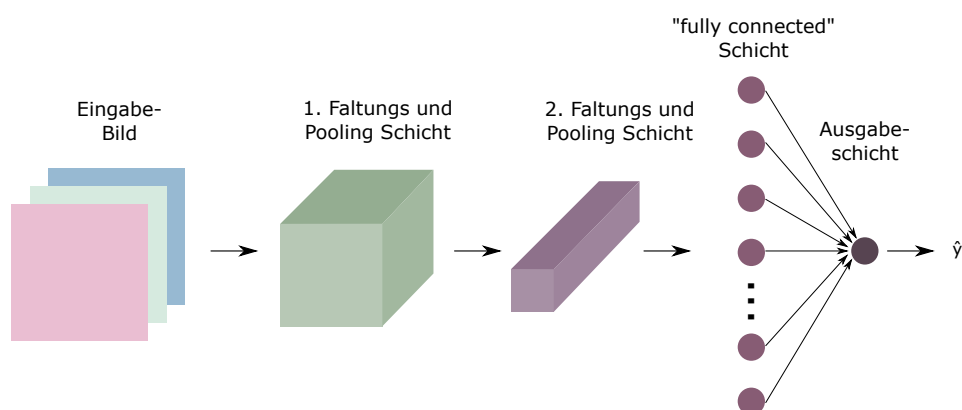
Jedes Neuron der ersten verborgenen Schicht summiert die gewichteten Eingabe-Feature zusammen mit einem Bias Term. Um auch nicht lineare Entscheidungsgrenzen zu lernen, wird noch eine Aktivierungsfunktion hinzugefügt, wie z.B. die Rectified Linear Units (ReLU) Funktion, die null für alle negativen Eingänge ist und für alle positiven Eingänge eben diesen wieder ausgibt. Diese Aktivierungen, oder auch die Ausgabe eines Neurons der ersten verborgenen Schicht, können wiederum Eingabe-Feature für die nächste Schicht sein. Die Ausgabe der letzten Schicht des neuronalen Netzwerkes, die die Vorhersage repräsentiert, wird dann mit dem bekannten Grundwahrscheinlichkeitslabel für den Input verglichen. Über eine Kostenfunktion, häufig in Form des Cross Entropy Loss, wird der Fehler berechnet. Anhand des berechneten Fehlers, können nun in der Rückprojektion alle Gewichte und Bias-Terme jedes Neurons korrigiert werden. Hierzu gibt es verschiedene Optimierungs-Algorithmen, z.B. Stochastic Gradient Descent. Somit können über mehrere Iterationen die optimalen Gewichte gelernt werden, um den Fehler zwischen den bekannten Grundwahrscheinlichkeits-Labels und den Vorhersagen des Netzwerkes zu minimieren. Zur Überwachung des Trainingsprozesses kann in definierten Abständen der Loss überprüft werden. Zusätzlich kann die Klassifizierungsgenauigkeit (engl. accuracy), d. h. der Anteil des Datensatzes, den das Netzwerk korrekt vorhersagt, ermittelt und kontinuierlich

verfolgt werden.

#### 4.3.4.2 Convolutional Neural Network (CNN)

Die Art des eben beschriebenen Netzwerkes ist, gerade für höher aufgelöste Bilder als Eingang nicht ideal. Es könnte zwar jeder Pixelwert des Bildes als Eingabe-Feature  $x_i$  aufgefasst werden, das würde allerdings bei einem 500x500 Pixel großen RGB-Bild und beispielsweise 100 Neuronen in der ersten Schicht bereits zu 75 Millionen Parametern führen, die allein für die erste Schicht gelernt werden müssen. Neben der offensichtlichen rechnerischen Last, wird auch Overfitting ein Problem, das heißt, das Netz lernt aufgrund der vielen Parameter den Trainingsdatensatz auswendig, anstatt allgemeine, generalisierbare Merkmale zu lernen.

Die Faltung mit 2D bzw. 3D Filtern erweist sich als die bessere Alternative, da unabhängig von der Größe der Eingangsbilder nur die Parameter der Filter gelernt werden müssen, räumliche Information und die Nachbarschaft der Pixel mit in Betracht gezogen werden. Durch die Filterung des Eingangsbildes mit einer definierten Anzahl an Filtern entsteht eine Ergebnismatrix pro Filter, welche wiederum in eine Aktivierungsfunktion übergeben wird. Durch Padding des Ursprungsbildes und Wahl des Strides, der Schrittweite, mit welcher der Filter bei der Faltung über das Bild bewegt wird, wird die Größe der Ergebnismatrix bestimmt. Deren Anzahl ist durch die Zahl der Filter gegeben. Durch das Übereinanderstapeln aller Ergebnismatrizen entsteht wiederum eine Art Bild mit 3 Dimensionen, welches der Eingang für die nächste Schicht des Netzwerkes ist (Abb. 4.16). Neben der Faltungsschicht werden meist noch Pooling Schichten eingesetzt, um die Größe der Matrizen zu reduzieren und die Rechengeschwindigkeit zu verbessern. Durch dieses Downsampling, indem in einem definierten Bereich typischerweise jeweils das Maximum oder der Mittelwert gebildet wird, kann das Netzwerk außerdem robuster gegenüber Positionsänderungen detektierter Feature werden, ohne dass in dieser Schicht Parameter gelernt werden. Das Ende des Netzes bildet, ebenso wie bei den MLP, eine Fully-Connected Schicht, deren Ausgabe die Vorhersage für die verschiedenen Klassen beinhaltet. Der Lernprozess besteht ebenso aus einer Vorwärtsprojektion der Bilder durch das Netz und einer Optimierung des Vorhersagefehlers durch Rückprojektion und Aktualisierung der Filterparameter.

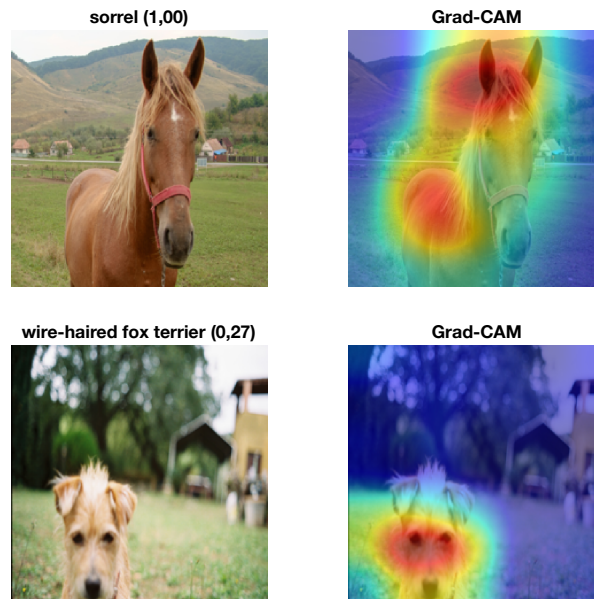


**Abbildung 4.16: Schematische Darstellung eines Convolutional Neural Networks**

Das 3-Kanal RGB-Eingabebild wird mit einer bestimmten Anzahl an Filtern definierter Größe gefaltet, wodurch Aktivierungskarten entstehen, die wiederum Eingang der nächsten Faltungsschicht sind. Am Ende steht eine fully connected Schicht für die Klassifizierung.

#### 4.3.4.3 Grad-CAM Methode

Generell lassen neuronale Netze wenig bis keine Rückschlüsse zu, wie sie zu einer bestimmten Klassifikationsentscheidung gelangt sind. Für CNNs gibt es allerdings verschiedene Visualisierungstechniken, eine davon ist das gradient-weighted class activation mapping (Grad-CAM) [SELVARAJU *et al.*, 2017]. Die Methode verwendet den Gradienten des Klassifizierungsergebnisses in Bezug auf die vom Netzwerk ermittelten Faltungsmerkmale, um zu verstehen, welche Teile des Bildes für die Klassifizierung am wichtigsten sind. Abbildung 4.17 zeigt an zwei Beispielen das Ergebnis der Grad-CAM Methode: eine Heatmap, die dem zu klassifizierenden Bild überlagert ist und zeigt welche Bereiche des Bildes den größten Einfluss auf die Klassifizierung hat. Für die Beispiele wurde das vortrainierte GoogLeNet Netz genutzt. Es klassifiziert beide Bilder korrekt als Sorrel (Pferd) und Drahthaar-Foxterrier.



**Abbildung 4.17: Grad-CAM Methode**

Mittels vortrainiertem GoogLeNet Netz wurden 2 Bilder klassifiziert. Links ist jeweils das Bild zusammen mit seiner Klassifizierung und seinem Klassifizierungsergebnis in Klammern gezeigt. Rechts ist dem Bild die Heatmap überlagert, die den Bereich kennzeichnet, der für die Klassifizierung entscheidend ist.

# Monitoring im Kammerwinkel

Für eine retinale Laseranwendung, die SRT, ist ein specklebasiertes Monitoring schon in der klinischen Erprobung [SEIFERT *et al.*, 2018]. Auch wenn es sich nicht um eine klassische Specklephotografie handelt, so werden doch Specklefluktuationen genutzt, um Rückschlüsse auf Blasenbildung zu ziehen, wie bereits in Kapitel 2.4.3.2 beschrieben. Bei der SRT werden kurze Pulse verwendet, um selektiv pigmentierte Zellen zu schädigen. Die Zellschäden werden dabei der Formation von Bläschen zugeschrieben, die bei ausreichender Erwärmung um Melanosome herum entstehen. Auch bei der Selektiven Lasertrabekuloplastik, SLT werden mit kurzen Laserpulsen gezielt pigmentierte Zellen zerstört. Wenngleich die nachfolgende Reaktionskette, die zur therapeutischen Wirkung führt, nicht ganz geklärt ist, wird das Wirkungsprinzip dem der SRT sehr ähneln. Es liegt nahe, dass auch die für die SRT angewandte Monitoringmethode bei der SLT sehr nützlich sein kann, um die Behandlungsmethode zu optimieren, da auch hier die nötigen Pulsenergien nur abgeschätzt werden können und es keinen sichtbaren Endpunkt der Behandlung gibt.

## 5.1 Hintergründe

Im Gegensatz zur klinisch angewandten SLT, bei der 3 ns Einzelpulse appliziert werden, wurden in dieser Arbeit eine Reihe von 15 Pulsen mit einer Pulsdauer von 1,7  $\mu\text{s}$  verwendet und daher im Folgenden als  $\mu\text{s}$ -SLT bezeichnet. Trotz der erhöhten Pulsdauer liegen die, in dieser Studie verwendeten Pulsenergien im gleichen Bereich oder sogar unter den typischen Pulsenergien, die bei der regulären SLT eingesetzt werden, wie in Tabelle 5.1 gezeigt ist.

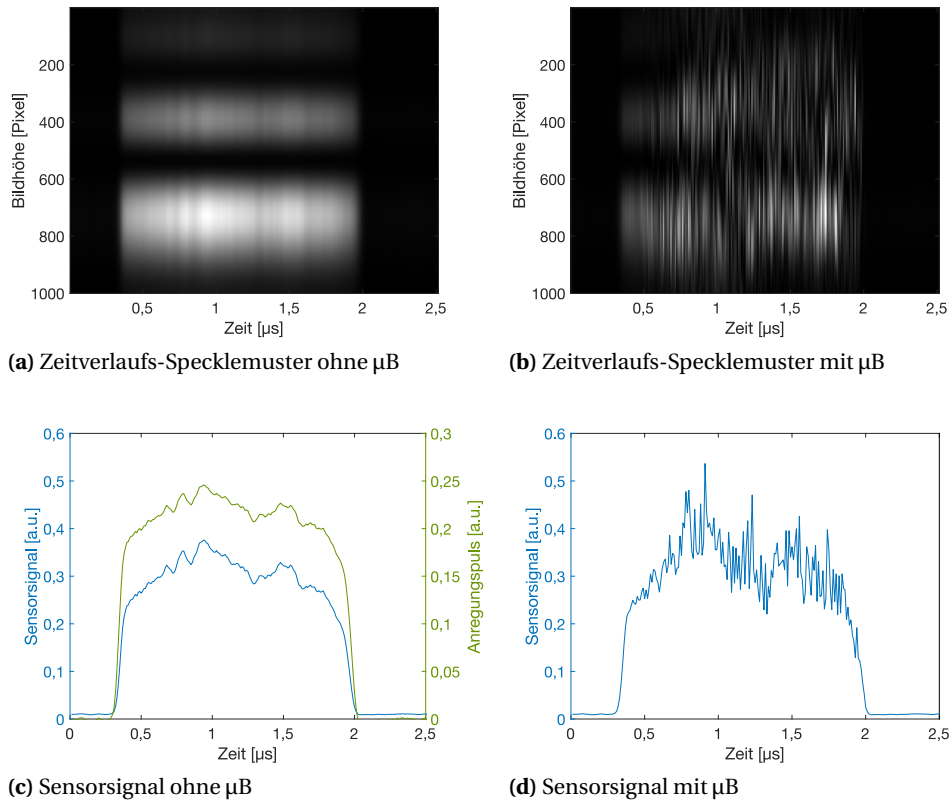
**Tabelle 5.1:** Vergleich der in konventioneller SLT und  $\mu\text{s}$ -SLT verwendeten Parameter

	klinische SLT	$\mu\text{s}$ -SLT	
		Einzelpuls	Pulsreihe <sup>[a]</sup>
Pulsdauer [ns]	3		1700
Fleckgröße [ $\mu\text{m}$ ]	400		200
Pulsenergie [mJ]	0,6 – 1,2	0,03 – 0,35	0,38 – 3,94
Bestrahlung [ $\text{mJ cm}^{-2}$ ]	477 – 955	96 – 1114	1074 – 12 533

<sup>[a]</sup> Pulsreihe von 15 Pulsen mit linear ansteigender Energie, wobei die minimale Energie die Hälfte der im System eingestellten maximalen Energie ist.

Die Pulsdauer gleicht somit der der SRT und das grundlegende Prinzip der  $\mu\text{B}$  - Detektion kann übernommen werden. Diese  $\mu\text{B}$  - Detektion basiert auf der Auswertung von Änderungen des Specklemusters, die durch eine Phasenänderung des zurückgestreuten Lichtes beim Aufschwingen und Kollabieren von  $\mu\text{B}$  entstehen. In Abbildung 5.1a und b ist einmal die Auswirkung von  $\mu\text{B}$  auf die Specklebewegung anhand des Zeitverlaufs-Specklemusters gezeigt. Ohne  $\mu\text{B}$  Bildung gibt es nur leichte Schwankungen in der Helligkeit, die dem Anregungspuls bzw. Schwankungen in der Beleuchtung folgen. Das Zeitverlaufs-Specklemuster in Abbildung 5.1b zeigt die simulierte Speckleänderung

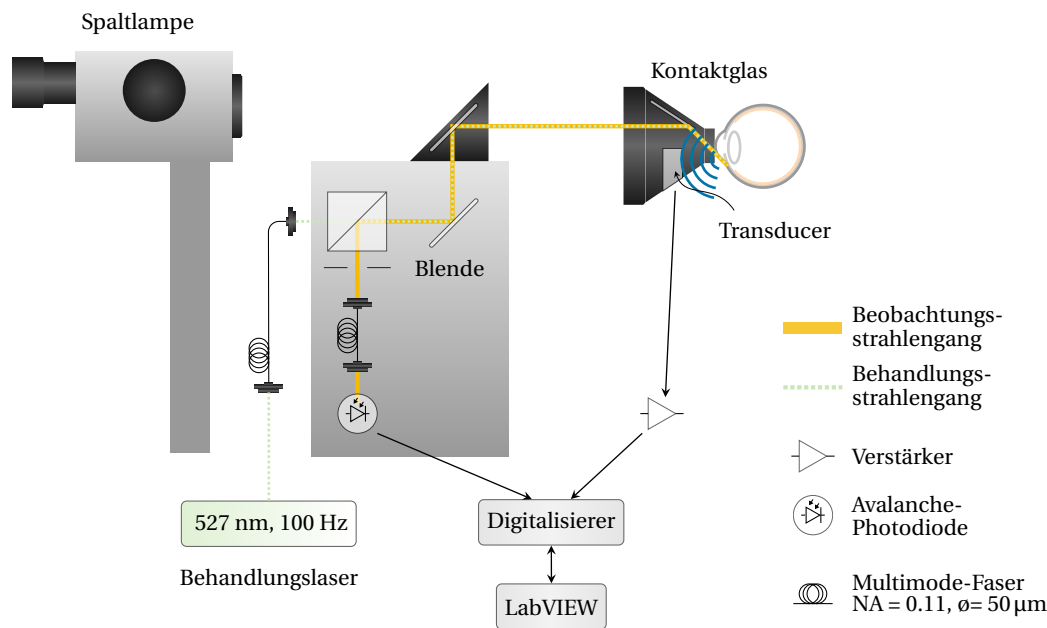
durch das Aufschwingen von  $500 \mu\text{B}$  mit zufälligem Ort und zufälliger Startzeit. Die maximale Blasengröße ist auf  $10 \mu\text{m}$  festgelegt. Das Zeitverlaufs-Specklemuster zeigt die deutliche Dekorrelation der Speckle. Eine Auswertung anhand von Bilddaten ist allerdings bei Pulsdauern im einstelligen  $\mu\text{s}$ -Bereich und Blasenlebensdauern noch darunter kaum möglich. Daher werden bei der SRT die Specklemuster nicht mit einem Flächensensor sondern einer schnellen Diode aufgezeichnet, welche die Intensität des Specklemusters über die Sensorfläche integriert. Der Zeitverlauf dieses integrierten bzw. summierten Sensorsignals ist für den simulierten Speckleverlauf in Abbildung 5.1c und d gezeigt. Wenn keine  $\mu\text{B}$  entstehen, folgt das Sensorsignal, bis auf einen Offset, genau dem Verlauf des Anregungspulses. Die Änderung der Speckle hingegen sorgt für ein zusätzliches hochfrequentes Signal, das dem Verlauf des Anregungspulses überlagert ist.



**Abbildung 5.1: Änderung des Specklemusters durch  $\mu\text{B}$**

Simulierte Speckleänderung dargestellt durch das Zeitverlaufs-Specklemuster (a) ohne Bildung von  $\mu\text{B}$ , (b) 500 verschiedene  $\mu\text{B}$  mit zufälliger Position und zufälliger Startzeit sorgen für starke Änderungen im Specklemuster. Das jeweilige dazugehörige Sensorsignal (Integration über die Sensorfläche) ist über die Zeit aufgetragen. (c) ohne Bildung von  $\mu\text{B}$ . Neben dem Sensorsignal in blau ist der Anregungspuls (aufgezeichneter Anregungspuls des genutzten Systems) in grün dargestellt, der den gleichen Verlauf hat. (d) Durch die Bildung von  $\mu\text{B}$  und die dadurch entstandene Specklebewegung ist dem Verlauf des Anregungspulses ein zusätzlicher Signalanteil überlagert.

Neben der specklebasierten Detektionsmethode, wird bei der SRT weiterhin eine optoakustische eingesetzt (siehe Kapitel 2.4.3.1), welche auch in dieser Studie Anwendung findet. Mit diesen beiden Methoden soll im Folgenden untersucht werden, ob  $\mu\text{B}$  im Kammerwinkel ebenso detektierbar und als Dosimetrieparameter geeignet sind.



**Abbildung 5.2: Optischer Aufbau zur  $\mu\text{B}$  - Detektion während der SLT**

Die gepulste Laserstrahlung wird über eine Multimode-Faser in das Spaltlampensystem eingekoppelt. Die Laserstrahlung wird über das modifizierte Kontaktglas in den Kammerwinkel fokussiert. Das aus dem Auge zurückgestreute Licht wird durch einen Strahlteiler vom Behandlungslicht getrennt, passiert eine Blende und wird von einer weiteren Multimode-Faser zu einer Avalanche-Photodiode geleitet. Das Diodensignal wird extern digitalisiert. Ebenso werden die extern verstärkten Drucksignale des akustischen Transducers digitalisiert.

## 5.2 Aufbau

Das in dieser Arbeit verwendete System ist der R:GEN (Lutronic Corp.), ein SRT - Lasersystem mit Echtzeit-Feedback zur Behandlung verschiedener Erkrankungen am Fundus. Es besteht aus einem frequenzverdoppelten gütegeschalteten Nd:YLF-Laser (527 nm), der eine Reihe von 15 Pulsen mit einer Pulsdauer von  $1,7 \mu\text{s}$  bei schrittweise ansteigender Energie und einer Repetitionsrate von 100 Hz appliziert. Die maximale Energie kann zwischen  $30 \mu\text{J}$  und  $350 \mu\text{J}$  eingestellt werden. Das System erhöht bei der Hälfte der maximalen Energie beginnend die Pulsenergie linear. Die Laserstrahlung wird durch eine Multimode-Faser ( $\text{NA} = 0,11$  und Kerndurchmesser von  $50 \mu\text{m}$ ) an die integrierte Spaltlampe gekoppelt. Der gewählte Vergrößerungsfaktor von 4 führt zu einer festen Fleckgröße von  $200 \mu\text{m}$  in Luft. Es gibt Intensitätsschwankungen im Strahlprofil, und der Intensitätsmodulationsfaktor (IMF), der als das Verhältnis der maximalen zur mittleren Intensität definiert ist, wurde mit 4,1 gemessen. Die Laserstrahlung wird mithilfe einer modifizierten Gonio-Kontaktlinse in den Kammerwinkel des enukleierten Schweineauges fokussiert.

Zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von  $\mu\text{B}$  sind in das Setup integriert, um die Aufzeichnung von rückgestreutem Licht und der optoakustischen Transienten während der Laserbestrahlung zu ermöglichen. Beide nachfolgend beschriebenen Algorithmen sind unabhängig von dem im R:GEN für SRT implementierten Algorithmus.

### 5.2.1 Optische Detektion

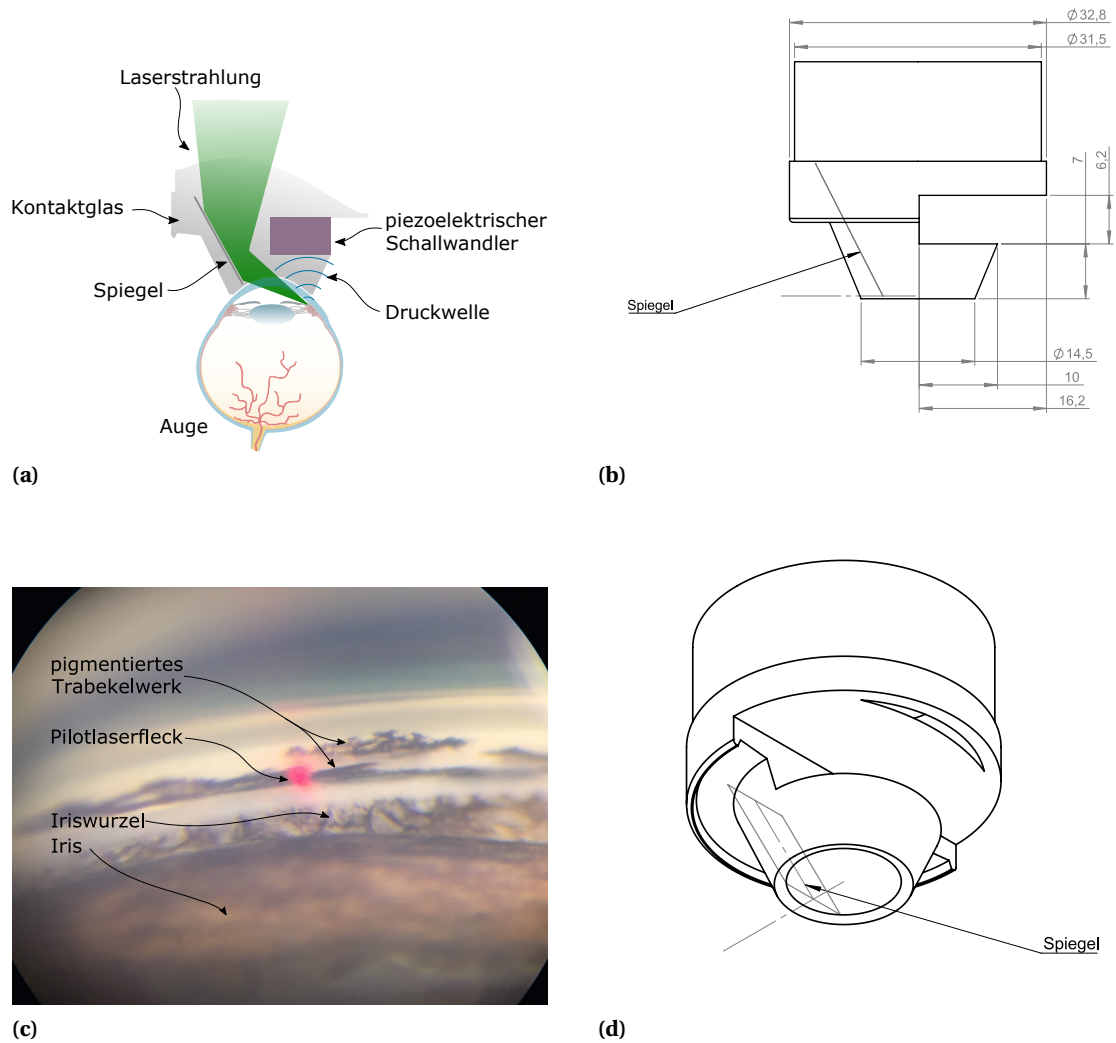
Das vom Trabekelwerk zurückgestreute Licht wird durch einen 80:20-Strahlteiler vom Behandlungsstrahlengang getrennt, bevor es eine 1 mm Apertur passiert, durch die Streulicht reduziert und Specklegröße und Lichtstärke reguliert werden. Nach der Apertur wird das zurückgestreute Licht in eine Faser eingekoppelt und zu einer Avalanche-Diode geleitet. Im Regelbetrieb des Systems wird das Diodensignal intern weiterverarbeitet und ausgewertet. In dieser Arbeit konnte das analoge Dioden-

signal abgegriffen werden und unter Verwendung der Digitalisierungskarte NI PXIe-5122 (National Instruments) mit einer Abtastfrequenz von 100 MS/s und einer Auflösung von 14 Bit außerhalb des R:GEN-Systems digitalisiert werden.

### 5.2.2 Akustische Detektion

Für die Detektion der Druckwellen wird bei der SRT in ein Kontaktglas vom Typ Mainster oder Goldmann ein Ringschallwandler eingebettet [SCHÜLE, 2002]. Mit dem 3-Spiegelkontaktglas nach Goldmann ist in seiner vorgesehenen Verwendung der Kammerwinkel gut visualisierbar. Der für die SRT eingebrachte Schallwandler hat allerdings eine Beeinträchtigung des Einblicks in den Kammerwinkel zur Folge, da Teile der Spiegel, die für die SRT nicht genutzt werden, abgefräst werden. Dieses Kontaktglas sorgt für einen Energieverlust von über 13 %.

Für diese Arbeit wurde eine Ocular Latina 5 Bar Indexing SLT -Kontaktglas (Ocular Instruments Inc.) modifiziert. Eine Öffnung wurde dem Spiegel gegenüberliegend in das Kontaktglas hinein gefräst, wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist. In einem mehrstufigen Klebevorgang wurde ein halbmondförmiger piezoelektrischer Schallwandler mit einem Durchmesser von 19 mm, einer Höhe von 6 mm und einer Resonanzfrequenz von 1 MHz in das Kontaktglas eingeklebt. Die Position des Wandlers ermöglicht eine ausreichende Nähe zur Schallquelle im Kammerwinkel, ohne den Lichtweg des Lasers und die Sicht durch das Gonio-Kontaktglas zu behindern. Der verbesserte Einblick in den Kammerwinkel durch das modifizierte Kontaktglas ist in Abbildung 5.3c zu sehen. Der eingebettete Schallwandler hat keinen nennenswerten Einfluss auf die aufgezeichneten Transienten, kann allerdings die Energieverluste durch das Kontaktglas auf 4,8 % im Vergleich zum Goldmann Kontaktglas reduzieren. Ein detaillierter Herstellungsprozess, Signalcharakterisierung, sowie der Vergleich zweier Prototypen mit dem Goldmann Kontaktglas finden sich in [MEIER, 2017]. Die Druckwellen wandern durch den Kammerwinkel und das Kontaktglas, bevor sie den Schallwandler erreichen. Das aufgezeichnete Signal wird von einem Ladungsverstärker (Panametrics 5662 Ultrasonic PreAmp, Olympus) verstärkt (44 dB) und mit derselben Digitalisierungskarte wie für das Diodensignal digitalisiert. Neben den erfassten optischen und akustischen Rohdaten, die auf der Festplatte gespeichert sind, liefert das R:GEN System Metadaten, wie z. B.. Pulsenergie und Pulsnummer für jeden applizierten Puls.



### Abbildung 5.3: Modifiziertes Gonio-Kontaktglas

In ein SLT Kontaktglas von Ocular Instruments Inc. wurde gegenüber des Spiegels eine Öffnung gefräst, um darin den piezoelektrischen Transducer einzukleben, ohne den Einblick in das Kontaktglas zu behindern (a) Prinzipskizze des Kontaktglases mit Transducer (b) technische Zeichnung des Kontaktglases (c) Blick durch Kontaktglas in den Kammerwinkel (d) 3D Ansicht des Kontaktglases.

### 5.3 *Ex-vivo* Experimente und Klassifizierung

In 44 frisch enukleierten Schweineaugen wurden 743 Pulsreihen mit je 15 Pulsen appliziert. Die Augen wurden innerhalb von 3 Stunden nach der E nukleation verwendet und zusammen mit dem Kontaktglas in einer speziellen Halterung vor der Spaltlampe platziert. Methocel (2 %) wurde als Kontaktflüssigkeit zwischen Auge und Kontaktglas verwendet. Wie bei der klinischen SLT wurde das Auftreten von Makroblasen (MB) von der Experimentatorin für jede Pulsreihe durch die Spaltlampe unter Verwendung des weißen Spaltlampenlichtes während und nach der Bestrahlung beobachtet und dokumentiert. Wenn keine Makroblasen (MB) detektierbar sind, besteht dennoch die Möglichkeit, dass Mikroblasen ( $\mu$ B) entstanden sind, die aufgrund ihrer Größe im  $\mu$ m-Bereich jedoch nicht durch die Spaltlampe zu sehen sind. Es gibt weder einen sichtbaren Nachweis für das Entstehen von Mikroblasen ( $\mu$ B), der als Referenz zur Bewertung der optischen und optoakustischen Monitoringmethoden verwendet werden kann, noch haben sich andere Bildgebungsmodalitäten, Lebend/Tot-Assay, Histologie oder OCT in dieser Studie als geeignet erwiesen, um Schäden durch die applizierte Pulsreihe zu identifizieren. Es wurden jedoch zwei unabhängige Signaltypen gleichzeitig aufgezeichnet, die miteinander verglichen werden können.

Aus Studien zur SRT [SEIFERT *et al.*, 2018] ist bekannt, wie sich die Formation von  $\mu$ B auf das zurückgestreute Licht auswirkt und galt als geeignete Referenz. Daher wurde auch hier das rückgestreute Licht jedes Pulses jeder Pulsreihe zusätzlich manuell klassifiziert. Hat der Puls eine glatte Form und ist der Laserpulsform des R:GEN sehr ähnlich, bis auf Änderungen in der Größenordnung des Rauschen vor und hinter dem Puls, so wird er der Klasse *keine Modulation* zugeordnet. Zeigt der Puls jedoch hochfrequente Signalkomponenten, die dem Anregungspuls überlagert sind, werden sie als *Modulation* klassifiziert. Wenn keine eindeutige Entscheidung getroffen werden kann, wird der Puls als *unbekannt* eingestuft. So klassifizierte Pulse zeigen normalerweise ein oder zwei kleine Spitzen, die nur geringfügig größer als das Rauschen sind.

Diese manuelle Klassifizierung wird als Goldstandard für die Leistungsbewertung der Erkennungsalgorithmen in dieser Arbeit verwendet. Beispiele für die beiden Klassen sind in Abbildung 5.1c für *keine Modulation* und d für die Klasse der *Modulation* zu sehen.

## 5.4 Detektion-Algorithmen

Sowohl für die akustische als auch für die optische Detektionsmethode wird im Folgenden je ein Algorithmus vorgestellt, der das Vorhandensein von  $\mu\text{B}$  quantifizieren soll. Beide Algorithmen bestimmen dazu einen ein-dimensionalen Wert, im Folgenden Reflektometrie-Wert (RM-Wert), für die optische Methode und Optoakustik-Wert (OA-Wert) genannt. Alle nachfolgenden Algorithmusparameter (z. B. Grenzfrequenzen von Filtern, Grenzwerte oder ROIs) wurden manuell angepasst, um die Kombination aus Sensitivität und Spezifität, d. h. den Youden-Index zu maximieren. Für die ROC-Analyse wurde die im vorangegangenen Kapitel beschriebene manuelle Klassifizierung der Messsignale als ground truth herangezogen. Die ROC-Analyse wurde weiterhin verwendet, um den besten Youden-Index zu ermitteln. Die dazugehörigen RM- und OA-Werte stellen den besten Grenzwert dar, um die Modulation von der Kategorie ohne Modulation zu trennen.

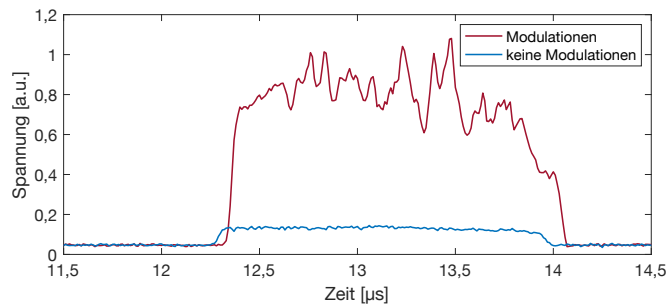
### 5.4.1 Auswertung der optischen Signale

Hochfrequente Modulation um mehrere MHz wurden als Indikator für  $\mu\text{B}$ -Formation verwendet und der folgende Algorithmus berechnet das Ausmaß der Modulationen; dargestellt durch den Reflektometrie (RM) - Wert eines jeden Pulses. Der Algorithmus ähnelt dem in der SRT verwendeten, dessen detaillierte Erklärung bei SEIFERT *et al.* [2018] zu finden ist. Der Hauptalgorithmus besteht aus zwei Teilen: zuerst einer Signalvalidierung und dann einer Merkmalsextraktion. Der Validierungsteil des Algorithmus stellt ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) (der maximale Signalwert muss um einen Faktor 2,5 größer als das mittlere Rauschen sein) sicher und erkennt die Sättigung (mehr als 50 aufeinanderfolgende Abtastwerte erreichen die Sättigungsgrenze von 3,5 a.u.). Die wichtigsten Verarbeitungsschritte, die erforderlich sind, um die Hochfrequenzmodulationen aus dem Laserpuls zu extrahieren, sind in Abbildung 5.4 an zwei Beispielen dargestellt und im Folgenden zusammengefasst:

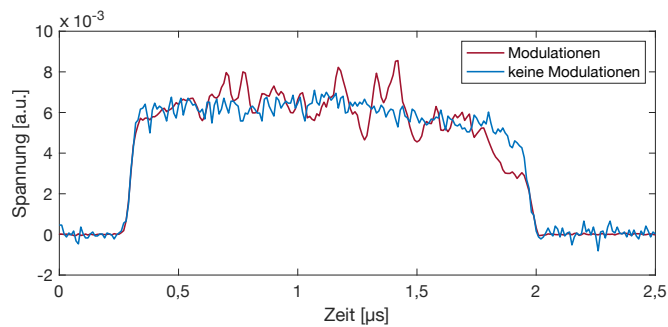
1. Der Offset wurde entfernt.
2. Jeder aufgezeichnete Puls wurde auf die Fläche unter der Kurve normiert.
3. Der Jitter wurde entfernt, um sicherzustellen, dass alle 15 Pulse gleichzeitig starten. Dazu wurde die steigende Flanke gesucht, die das Rauschen für mindestens 100 aufeinanderfolgende Messpunkte überschreitet. Für die weiteren Schritte wurde der so identifizierte Pulse zusammen mit einem Signal  $0,3 \mu\text{s}$  vor Beginn des Pulses verwendet.
4. Die Merkmale wurden dann mit einem Bandpassfilter (Typ Butterworth), mit einer unteren Grenzfrequenz von 7 MHz, einer oberen Grenzfrequenz von 35 MHz und einer Filterordnung von 3 extrahiert.
5. Die gefilterten Daten wurden quadriert und sind im folgenden als  $R_F(t)$  bezeichnet (siehe Abb. 5.4c).
6. Um die Filterartefakte am Anfang und am Ende des Signals zu entfernen, wurde eine ROI (grüne Fläche in Abb. 5.4c mit dem Startpunkt  $t_S = 0,6 \mu\text{s}$  und dem Endpunkt  $t_E = 1,6 \mu\text{s}$  definiert. Innerhalb dieses Bereichs wurden alle Werte summiert, die oberhalb des Grenzwertes  $R_G$  liegen.  $R_G$  ist definiert die 50-fache mittlere Rauschamplitude des Signals vor dem Puls.

Der so für jeden Puls berechnete RM-Wert ist ein Maß für die  $\mu\text{B}$ -induzierten Modulationen und ist in Abbildung 5.4c als rote Fläche unter der Kurve dargestellt.

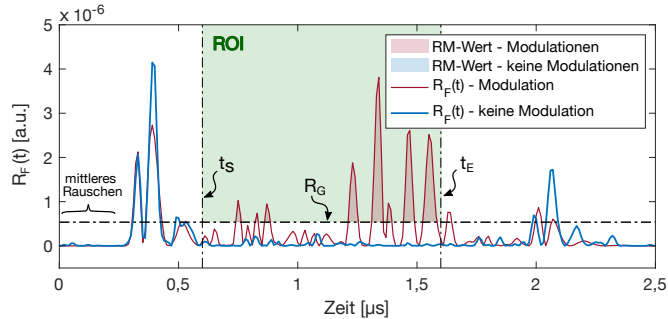
$$RM = \sum_{t=t_S}^{t_E} R_F(t) \quad \text{für alle } R_F(t) \geq R_G. \quad (5.1)$$



(a) Rohsignale



(b) Signale nach Entfernung des Offsets, Normierung und Jitter Korrektur

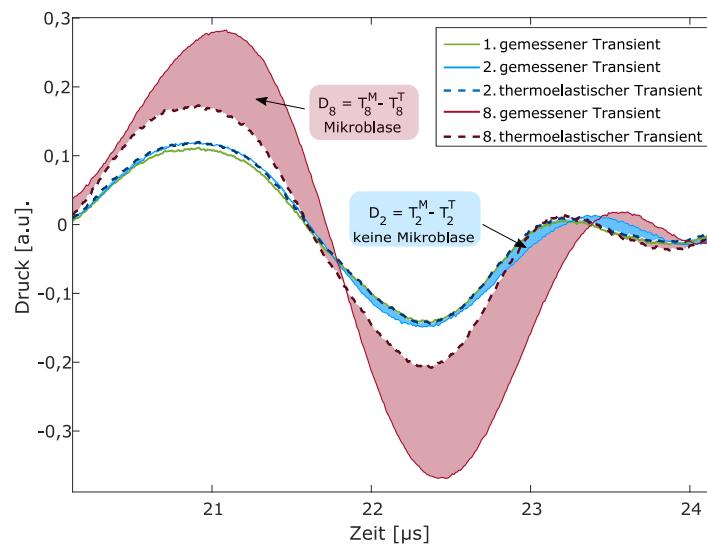
(c)  $R_F$  nach Filterung und Quadrierung

#### Abbildung 5.4: Veranschaulichung des RM-Algorithmus zur Quantifizierung der Signalschwankungen

(a) Digitalisierte Diodespannung je eines Pulses der keine Modulationen (blau) aufweist und eines Pulses mit Modulationen (rot). (b) Bei beiden Pulsen wurde erst der Offset entfernt und anschließend erfolgte die Normierung auf die Fläche unter der Kurve. Danach wurde der Jitter entfernt, wobei Messpunkte  $0,3 \mu\text{s}$  vor Beginn des Pulses zur Bestimmung des Rauschuntergrundes benutzt wurden. (c) Die Signale wurden mit einem Bandpassfilter gefiltert und quadriert. Pulse mit Modulation (rot) weisen deutlich höhere Amplituden auf. In der ROI (grüne Fläche), definiert durch  $t_S$  und  $t_E$  sowie dem Grenzwert  $R_G$  werden alle Werte zu dem finalen RM-Wert aufsummiert. Der RM-Wert ist durch die rote bzw. blaue Fläche unter der jeweiligen Kurve dargestellt, wobei in diesem Beispiel der RM-Wert des blauen Pulses null ist, da das Signal nie den Grenzwert überschreitet.

## 5.4.2 Auswertung der akustischen Signale

Im Gegensatz zur optischen Methode ist es schwierig, an einzelnen akustischen Transienten zwischen  $\mu\text{B}$  und thermoelastischer Ausdehnung zu unterscheiden. Vielmehr muss man jeden Transienten mit einer Referenz z. B. dem jeweils ersten Transienten der Pulsreihe vergleichen. Auf diese Weise ist es möglich, eine nichtlineare Amplitudenänderung oder Verschiebungen zwischen den Transienten zu finden. Zunächst wurde ein Validierungstest durchgeführt, bevor der Algorithmus auf die Signale angewendet wird. Signale, die gesättigt sind (mehr als 50 aufeinanderfolgende Abtastwerte erreichen die Sättigungsgrenze von 2,5 a.u.) oder ein unzureichendes SNR aufweisen (der maximale Signalwert muss um einen Faktor 1,6 größer sein als das mittlere Rauschen), wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Außerdem wurden alle 15 Pulse einer Pulsreihe ausgeschlossen, wenn das SNR des ersten Transienten zu niedrig war, da dieser als Referenz dient.



**Abbildung 5.5: Veranschaulichung des OA-Algorithmus**

Vorverarbeitete Signale (Offset entfernt und gefiltert) eines Pulses unterhalb (blau) und oberhalb (rot) der Grenzenergie für  $\mu\text{B}$ . Der farbige Bereich stellt die Differenz jedes Transienten zu seinem thermoelastischen Transienten dar, welcher dem mit der Energie skalierten ersten Transienten entspricht.

Die folgenden Algorithmusschritte wurden ausgeführt, um die Änderung von Puls zu Puls zu identifizieren:

1. Der Offset wurde entfernt.
2. Ein Bandpassfilter (Typ Butterworth, untere Grenzfrequenzen von 10 kHz, obere Grenzfrequenz von 200 kHz und eine Filterordnung von 4) wurde verwendet, um das Rauschen zu entfernen.
3. Die ROI mit dem Startpunkt  $t_S = 15 \mu\text{s}$  und dem Endpunkt  $t_E = 100 \mu\text{s}$  wurde verwendet, um einen Teil des Signals zu extrahieren. Bei  $t = 0$  beginnt der Laserpuls.
4. Unter Verwendung des gemessenen Transienten des ersten Pulses  $T_1^M(t)$  mit seiner Energie  $E_1$  und der gemessenen Energie jedes Pulses  $E_k$  wurde der erwartete rein thermoelastische Transient  $T_k^T(t)$  für jeden Puls berechnet:

$$T_k^T(t) = \frac{T_1^M(t)}{E_1} E_k, \quad (5.2)$$

wobei  $T_k^T(t)$  die Form des ersten Transienten hat, der mit den Energieanstieg skaliert wurde. Dies ist der Transient, den man erwarten würde, wenn nur die Wärmeausdehnung die Druckwellen verursacht, da die thermische Expansion proportional zur eingestrahnten Energie skaliert.

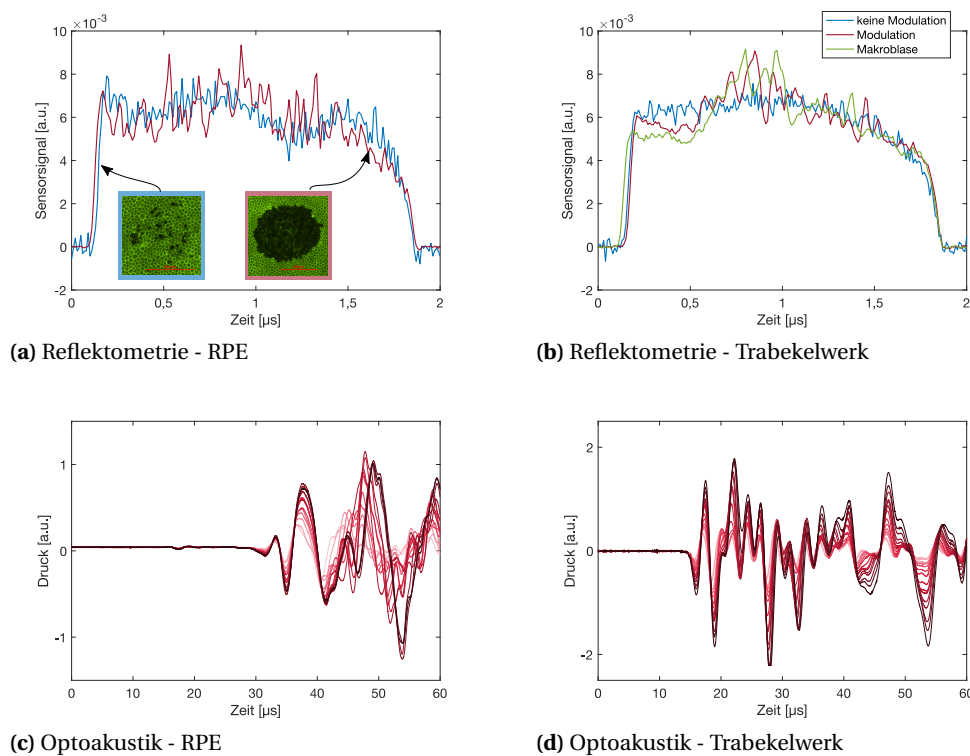
- Die Differenz des thermoelastischen Transienten  $T_k^T$  und des tatsächlich gemessenen Transienten  $T_k^M$  kann dann als Maß für die Existenz von  $\mu\text{B}$  verwendet werden. Abbildung 5.5 zeigt, dass die Differenz eines gemessenen Transienten über der  $\mu\text{B}$  Bildungsschwelle zu seinem thermoelastischen Transienten größer ist als die Differenz eines Transienten unter der  $\mu\text{B}$  Bildungsschwelle. Der Transient des unterschwelligigen Pulses entspricht nahezu seinem thermoelastischen Transienten. Aus der Differenz wurde ein ein-dimensionaler OA-Wert berechnet:

$$\text{OA}_k = \sum_{t=t_S}^{t_E} |T_k^M(t) - T_k^T(t)|. \quad (5.3)$$

## 5.5 Ergebnisse

### 5.5.1 Vergleich zur SRT

Die im Kammerwinkel aufgezeichneten Signale ähneln im Wesentlichen denen der SRT; sowohl die Reflektometrie- als auch die Optoakustikdaten. Abbildung 5.6 zeigt die mit demselben System, allerdings unterschiedlichen Kontaktgläsern aufgenommenen optischen und akustische Transienten, einmal nach Bestrahlung von Schweine-Retinaexplantaten und einmal nach Bestrahlung des Kammerwinkels ganzer Schweineaugen. In Abbildung a und b ist jeweils der letzte Puls zweier



**Abbildung 5.6: Vergleich der Sensorsignale bei Bestrahlung von RPE und TW**

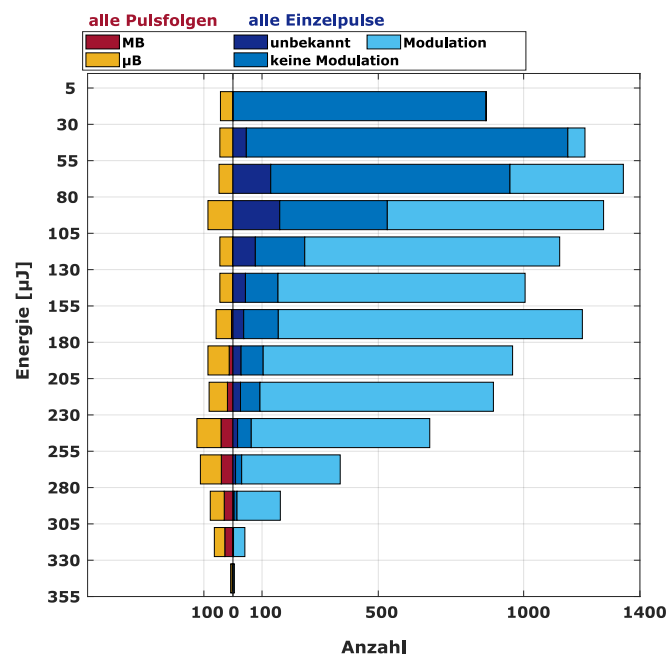
Zum Vergleich mit der SRT wurde mit demselben System, aber unterschiedlichen Kontaktgläsern Schweine-RPE-Explantate und das Trabekelwerk ganzer Schweineaugen bestrahlt. Es ist der letzte zurückgestreute Puls je einer Pulsfolge mit (rot) und ohne (blau) *Modulationen*, die eine Formation von  $\mu\text{B}$  hindeuten, gezeigt. (a) Bestrahlung von RPE-Explantaten. Die Fluoreszenzbilder zeigen den Zellschaden der jeweiligen Pulsfolge. (b) Bestrahlung des Trabekelwerks ganzer Augen. Zusätzlich ist der letzte Puls einer Pulsfolge gezeigt, bei der MB beobachtet wurde. Alle Transienten einer überschwelligen Pulsfolge (15 Pulse mit linear ansteigender Pulsenergie) sind dargestellt für (c) Bestrahlung des RPE und (d) Bestrahlung des Trabekelwerks.

Pulsreihen zu sehen. Die blaue Kurve veranschaulicht einen Puls der keine  $\mu\text{B}$  verursacht hat und daher keine *Modulationen* aufweist. Die rote Kurve hingegen zeigt deutliche *Modulationen*, die auf die Formation von  $\mu\text{B}$  hindeuten. Es wurde bei den Kurven bereits der Offset abgezogen und auf die Fläche unter der Kurve normiert. Daher wirkt der Verlauf der unterschwelligen Läsionen (in blau) denen mit *Modulation* recht ähnlich. Es ist aber anzumerken, dass die Schwankungen, die den blauen Puls überlagern nur in der Größenordnung des Rauschens vor und nach dem Puls sind. Unabhängig vom bestrahlten Gewebe sind die *Modulationen* der roten Kurven deutlich größer als das Rauschen. Die Fluoreszenzbilder verdeutlichen, dass *Modulationen* bei Schädigung der RPE auftreten. Abbildung 5.6c und d zeigen jeweils alle 15 Pulse einer überschwelligen Läsion. Obwohl die Schwankungen der Kurven zwischen den einzelnen Pulsen bei der Bestrahlung des RPE trotz gleicher maximaler Energie, stärker auftreten, sind sie auch im Trabekelwerk deutlich zu erkennen. Die

Unterschiede lassen sich auf die stärkere Pigmentierung des RPE zurückführen. Da die Schallquelle bei der Bestrahlung des Trabekelwerks näher am Schallwandler ist, werden die Transienten auch zeitiger detektiert, etwa  $14\ \mu\text{s}$  nach dem Anregungspuls; die Transienten des RPE werden erst rund  $30\ \mu\text{s}$  nach dem Anregungspuls detektiert. Auch die Frequenz der Transienten ist verschieden. Neben der Resonanzfrequenz des Schallwandlers hat auch dessen Form einen Einfluss auf die Frequenz des Transienten, da das Ausgangssignal des Schallwandlers die Superposition aller Schallwellen ist, die auf der Fläche des Sensors eintreffen. So kann durch eine große Detektorfläche zwar ein größerer Anteil der Druckwelle detektiert werden, gleichzeitig resultiert dies aber auch in einer Art Tiefpassfilterung, da sich hohe Frequenzanteile am Detektionsort negativ überlagern.

## 5.5.2 Übersicht des Datensatzes

Es wurden insgesamt 743 Pulsreihen appliziert, wobei die gemessene Energie des letzten Pulses jeder Reihe von  $25,9\ \mu\text{J}$  –  $340\ \mu\text{J}$  reicht. Die Verteilung der maximalen Energie jeder Pulsfolge ist in Abbildung 5.7 links zusammen mit dem Histogramm der Energien aller 11.145 Einzelpulse rechts dargestellt. In 24,4 % aller Pulsreihen wurden MB während der Bestrahlung durch die Spalllampe beobachtet. Sie werden im Histogramm in Abbildung 5.7 als rote Balken angezeigt. Nach dem manuellen Kategorisierungsprozess werden 60,8 % aller Einzelpulse als *Modulation*, 34,0 % als *keine Modulation* und 5,2 % als keine von beiden eindeutig erkannt und als *unbekannt* eingestuft. Die Energieverteilung aller drei Kategorien ist in Abbildung 5.7 rechts dargestellt.

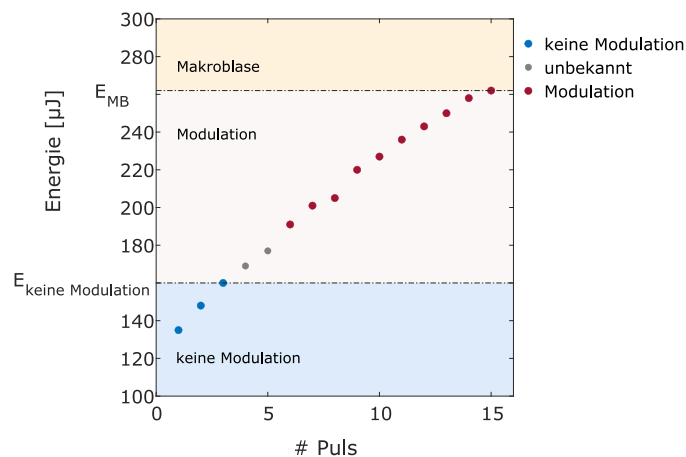


**Abbildung 5.7: Verteilung der applizierten Pulse**

Histogramm der maximal eingestellten Energie jeder Pulsfolge zusammen mit der Pulsenergie aller Einzelpulse. Pulsfolgen, bei denen MB beobachtet wurden, sind rot dargestellt. Die verschiedenen Klassen der manuellen Kategorisierung jedes Einzelpulses sind in unterschiedlichen Blautönen farbcodiert.

### 5.5.3 MB Beobachtungen

Bei 181 aller applizierten Pulsfolgen wurden MB durch die Spaltlampe beobachtet. Die maximale Energie dieser Pulsfolgen liegt zwischen  $117,8 \mu\text{J}$  und  $334 \mu\text{J}$ . Anhand der Daten ist nicht erkennbar welcher Puls der Pulsfolge, bzw. welche Pulsenergie MB verursacht. Bei 95 % aller Pulsfolgen mit MB die manuelle Kategorisierung aller 15 Einzelpulse *Modulation*, das heißt bereits der erste Puls hat  $\mu\text{B}$  verursacht. Die Pulsenergiegrenze für die  $\mu\text{B}$  -Bildung muss demnach unter der Pulsenergie des ersten Pulses der Pulsfolge liegen und kann nicht eindeutig bestimmt werden. Allerdings gibt



**Abbildung 5.8: Energieverhältnis zwischen  $\mu\text{B}$  und MB**

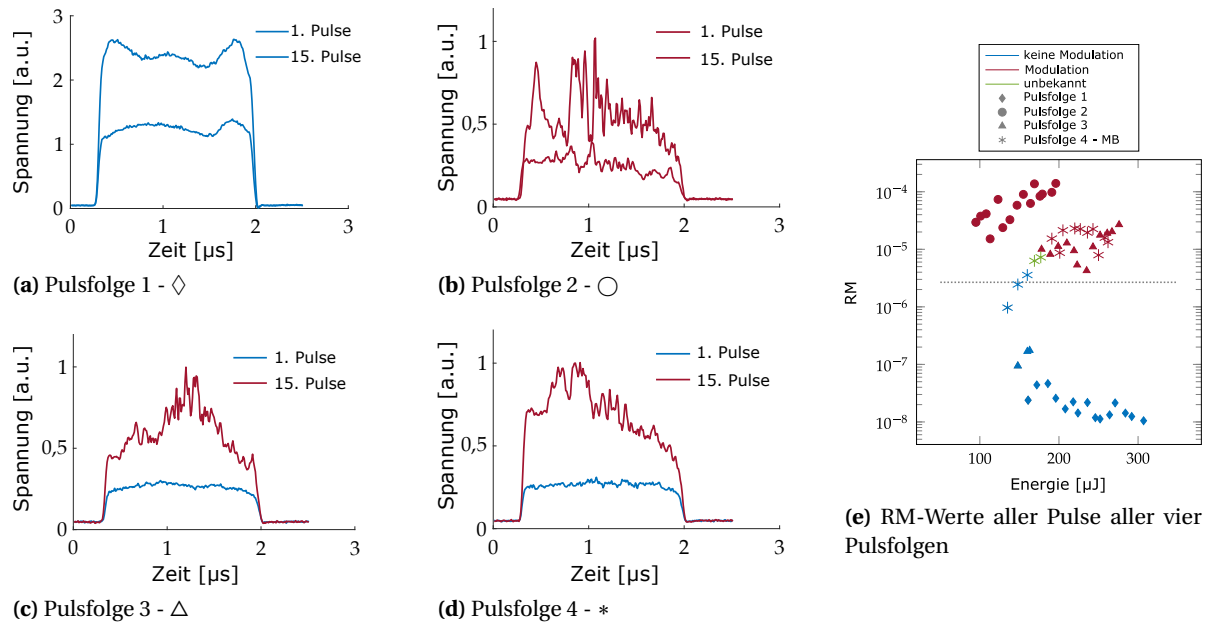
Die Pulsenergie ist über die Pulsnummer einer Beispieldursfolge aufgetragen, die zu MB führte.

es neun Pulsfolgen, bei denen mindestens der erste Puls keine Modulation im RM-Rohsignal zeigt, und eine weitere Pulsfolge hatte mindestens einen Puls, der nicht als Modulation eingestuft wurde, aber nicht der erste war. Wenn man annimmt, dass mindestens der letzte Puls jeder Pulsreihe MB verursachen muss, kann man einen Energiefaktor berechnen, der zur Erzeugung von MB benötigt wird. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.8 zu sehen. Diese Pulsfolge verursacht MB und die Energie ist über die Pulsnummer aufgetragen. Die Energie des letzten Pulses ohne Modulation beträgt  $160 \mu\text{J}$ , während die maximale Energie  $262 \mu\text{J}$  beträgt, was zu einem maximalen Verhältnis von 1,64 führt. Der Mittelwert aller 10 Pulsfolgen, bei denen die Berechnung dieses Verhältnisses möglich ist, beträgt  $1,76 \pm 0,24$ . Dieser Energiefaktor kann hilfreich sein, um ein therapeutisches Fenster zu definieren, oder gezielt die Energie zur Erzeugung von MB einzustellen, sobald  $\mu\text{B}$  detektiert werden.

### 5.5.4 Auswertung der optischen Signale

Von den insgesamt 11 145 Einzelpulsen wurden 9980 zur Auswertung verwendet. Während der Signalvalidierung erzeugten 37 Pulse einen Sättigungsfehler und 576 Pulse hatten kein ausreichendes SNR und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen sowie alle 552 Pulse, die als *unbekannt* klassifiziert wurden. Von den verbleibenden Pulsen sind 68 % (6771 Pulse) in der *Modulation* -Kategorie und 32 % (3209 Pulse) in der Kategorie *keine Modulation*.

Beispiele für RM-Rohdaten sind in Abbildung 5.9a-d dargestellt. In jedem Diagramm werden der erste und der letzte Puls einer Pulsfolge gezeigt. Alle roten Kurven gehören zur *Modulation* -Kategorie und alle zeigen deutliche Ausschläge, die den Puls überlagern. Im Gegensatz dazu haben alle blauen Kurven (*keine Modulation*) eine glatte Form, Pulsfolge 1 zeigt nur eine leichte Verformung der Pulsform. Neben den Rohdaten sind in Abbildung 5.9e die berechneten RM - Werte für jede der vier Pulsfolgen dargestellt. Die RM-Werte werden über die eingestrahlte Pulsenergie aufgetragen.



**Abbildung 5.9: Beispiele für die optische Detektion von  $\mu\text{B}$**

(a-d) RM - Rohdaten des ersten und letzten Pulses von vier Beispielen. Blaue Kurven zeigen Signale der Kategorie *keine Modulation* und rote Kurven wurden als *Modulationen* kategorisiert. (e) Die berechneten RM - Werte aller Pulse derselben vier Pulsfolgen werden über die applizierte Pulsenergie aufgetragen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den besten RM - Grenzwert, der in der ROC-Analyse ermittelt wurde, um die Kategorien optimal zu trennen.

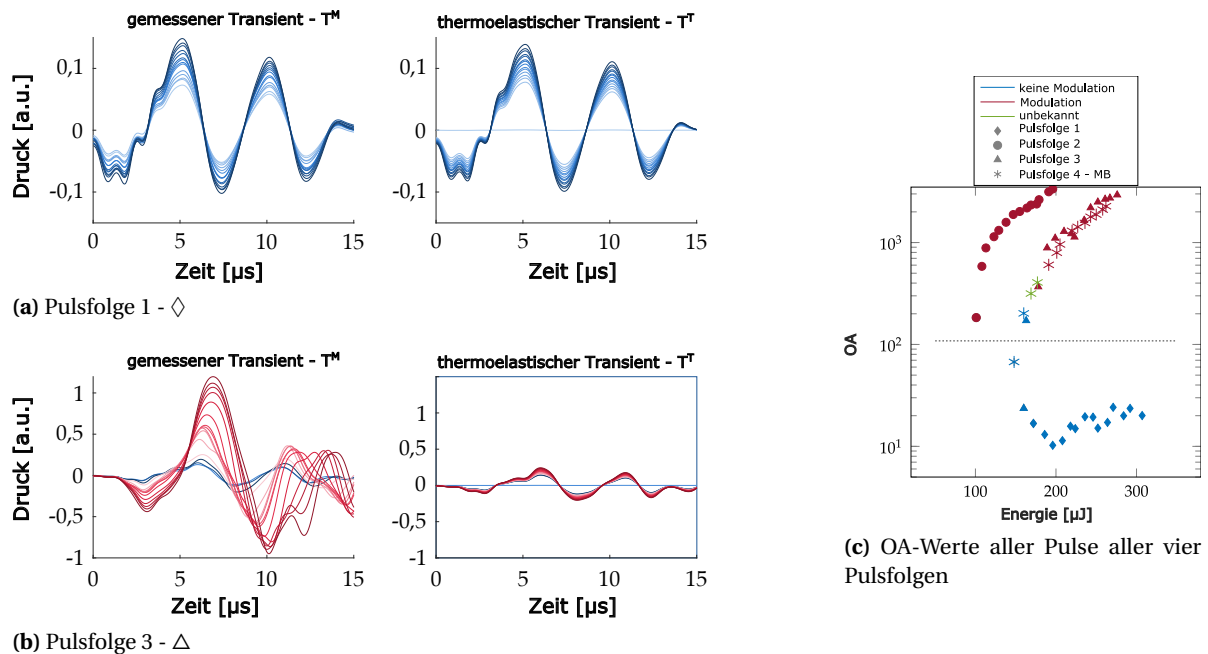
Hohe Energien führen nicht immer zu hohen RM-Werten oder  $\mu\text{B}$ . Alle Pulse von Pulsfolge 1 zeigen keine Modulation; daher sind ihre RM - Werte trotz ihrer hohen Signalamplituden klein. Im Gegensatz dazu haben die Pulse von Pulsfolge 2 viel kleinere Amplituden, aber deutliche Modulation, die hohe RM - Werte verursachen. Die gestrichelte Linie in Abbildung 5.9e repräsentiert den berechneten besten RM - Grenzwert (maximaler Youden-Index).

### 5.5.5 Auswertung der akustischen Signale

Für die Bewertung des OA - Algorithmus konnten nur 7446 Pulse verwendet werden, was im Vergleich zum RM - Algorithmus über 2000 Pulse weniger ist. Alle ersten Pulse jeder Pulsfolge müssen ausgeschlossen werden, da sie als Referenz verwendet werden und alle einen OA - Wert von Null haben (und daher auch nicht im Scatterplot in Abb. 5.10e dargestellt sind). Da der OA - Algorithmus den ersten Puls als Referenz verwendet, müssen die ganze Pulsfolge von der Auswertung ausgeschlossen werden, wenn der erste Puls kein ausreichendes SNR aufweist. Dies führt dazu, dass 1722 Pulse aufgrund eines SNR ausgeschlossen werden. Weiterer 746 verursachten einen Sättigungsfehler. Es werden nur einzelne Pulse ausgeschlossen, die einen Sättigungsfehler verursachen, nicht die gesamte Pulsfolge, da dies keinen Einfluss auf die Berechnung der OA-Werte aller anderen Pulse der Pulsfolge hat. Nach der Signalvalidierung wurden weitere 488 Pulse der Kategorie *unbekannt* ausgeschlossen.

Dies ergibt 75,3 % Pulse in der *Modulation* - Kategorie und 24,7 % in der Kategorie *keine Modulation*. Abbildung 5.10 zeigt zwei der vier Beispieldpulsfolgen, die bereits in Abbildung 5.9 dargestellt sind. Unterhalb der Schwelle für  $\mu\text{B}$  Entstehung ist die Amplitude des aufgezeichneten Drucktransienten proportional zur Pulsenergie, wie bei Pulsfolge 1 von Abbildung 5.10a zu sehen ist, wo die OA - Transienten nach der Vorverarbeitung (Offsetentfernung und Filterung) gezeigt sind.

Die Formen aller aufgezeichneten Transienten dieser Pulsfolge sind ähnlich. Auch die Form und Amplitude des Transients sind nahezu identisch mit dem thermoelastischen Transienten, die in der linken Darstellung von Abbildung 5.10a zu sehen ist. Die Ähnlichkeit der gemessenen und



**Abbildung 5.10: Beispiele für die akustische Detektion von  $\mu\text{B}$**

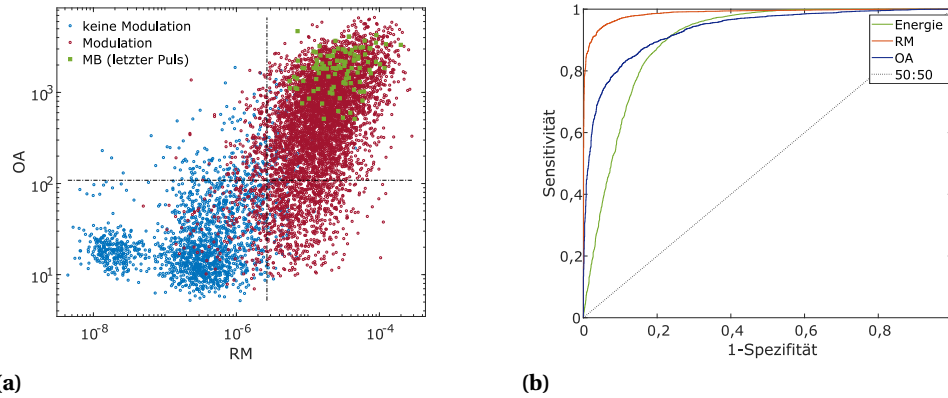
(a-b) Alle 15 gemessenen (links) und theoretisch ermittelten thermoelastischen (rechts) Transienten von zwei Beispielen. (c) Die berechneten OA - Werte der in (a) und (b) gezeigten Pulsfolgen, sowie die OA - Werte zweier weiterer Pulsfolgen sind über die applizierte Pulsenergie aufgetragen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den besten OA - Grenzwert, der in der ROC-Analyse ermittelt wurde, um die Kategorien optimal zu trennen. Blaue Kurven zeigen Signale der Kategorie *keine Modulation*, und rote Kurven wurden als *Modulationen* kategorisiert.

der thermoelastischen Transienten führt zu kleinen OA - Werten, die in Abbildung 5.10c über die applizierte Pulsenergie aufgetragen sind. Alle Transienten von Pulsfolge 1 liegen unter dem OA - Grenzwert, der die Kategorien am besten trennt und durch die gestrichelte Linie angezeigt wird. Im Gegensatz dazu zeigen fast alle Transienten von Pulsfolge 3 (Abb. 5.10b) nicht nur eine höhere Amplitude als ihre thermoelastischen Transienten, sondern auch eine andere Form, was ein Indiz für die Formation von  $\mu\text{B}$  ist. Nur der zweite Transient scheint seinem thermoelastischen ähnlich zu sein und wird daher als unter dem Schwellenwert liegend zugeordnet. Bereits der dritte Transient zeigt einen deutlichen nichtlinearen Amplitudenanstieg und eine Verschiebung nach rechts. Dies führt zu einem höheren OA-Wert, und der Puls wird vom Algorithmus als über dem Schwellenwert liegend zugewiesen.

## 5.5.6 Statistische Analyse und Vergleich der Detektionsmethoden

### 5.5.6.1 Auswertung aller Einzelpulse

In Abbildung 5.11a ist der OA-Werte über den RM-Werte eines jeden Pulses aufgetragen, sofern dieser Puls mit beiden Methoden ausgewertet werden könnte. Es scheint der RM-Algorithmus geeigneter zu sein, um beide Kategorien zu trennen. In demselben Plot wird zusätzlich auch der letzte Puls einer jeden Pulsfolge aufgetragen, die MB verursachen. Diese Pulse lassen sich durch die hier genutzten RM- und OA-Algorithmen nicht von Pulsen trennen, bei denen keine MB beobachtet wurden. Vermutlich da sich MB erst nach der Bestrahlung bilden und somit keinen Einfluss auf die Signalcharakteristik haben. Das ROC-Diagramm beider Algorithmen und der Energie ist in Abbildung 5.11b dargestellt. Mit einer Sensitivität von 0,94 und einer Spezifität von 0,95 übertrifft der RM-Algorithmus die Pulsenergie als Dosimetrieparameter. Der OA-Algorithmus ist im Vergleich zur Energie nur geringfügig besser. Alle Werte sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.



**Abbildung 5.11: Performanz der Algorithmen zur Erkennung von  $\mu\text{B}$**

(a) OA - Werte für jeden auswertbaren Puls über RM - Werte aufgetragen. Die gestrichelten Linien geben jeweils den besten Grenzwert für jeden Algorithmus an. (b) ROC - Diagramm der Einzelpulsauswertung des RM - und OA - Algorithmus zusammen mit der Energie.

**Tabelle 5.2:** Bester Grenzwert, Youden-Index, Sensitivität und Spezifität für jeden Algorithmus

Algorithmus	bester Grenzwert	Youden-Index	Sensitivität	Spezifität
Pulsenergie	87,2 $\mu\text{J}$	0,68	0,90	0,77
RM	$2,67 \cdot 10^{-6}$	0,90	0,94	0,95
OA	108,57	0,72	0,83	0,89

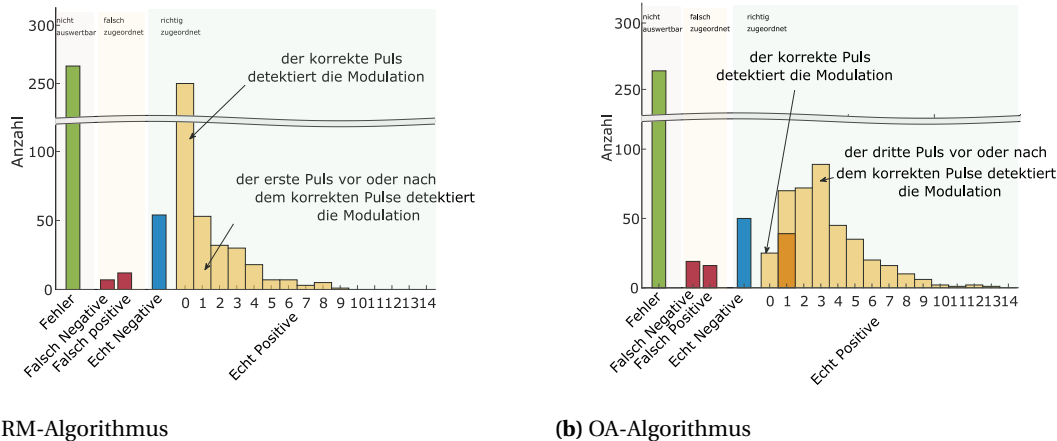
### 5.5.6.2 Auswertung von Pulsfolgen

Neben der Analyse aller Einzelpulse werden auch die gesamten Pulsfolgen untersucht. Dabei gehört eine Pulsfolge zur Kategorie *Modulation*, sobald mindestens einer seiner Pulse dieser Kategorie angehört. Ebenso gilt die Folge als korrekt vom Algorithmus klassifiziert, sobald mindestens ein Puls einen RM- bzw. OA-Wert hat, der oberhalb des Grenzwertes liegt. Bei dieser Bewertung der ganzen Pulsfolgen erreicht der RM-Algorithmus eine Sensitivität von 0,98 und eine Spezifität von 0,82 und der OA-Algorithmus 0,95 und 0,76.

Zusätzlich wurde die Genauigkeit jedes Algorithmus zur Identifizierung der Modulation an der richtigen Position innerhalb jeder Pulsfolge bewertet. Abbildung 5.12a zeigt ein Histogramm aller vom RM-Algorithmus ausgewerteten Pulsfolgen. Der grüne Balken links beinhaltet alle Pulsreihen, in denen mindestens ein Puls von der Analyse ausgeschlossen werden musste, da er entweder bei der RM- oder OA-Signalvalidierung einen Fehler verursacht hat. Die beiden roten Balken daneben enthalten alle falsch zugewiesenen Pulsfolgen. Wenn beispielsweise alle Pulse einer Folge zu der Kategorie *keine Modulation* gehören, der RM- Wert jedoch für mindestens einen Puls über dem Grenzwert liegt, würde dies zu einem falsch positiven Ergebnis führen.

Alle anderen Pulsfolgen werden vom Algorithmus korrekt erkannt. Echt-Negative werden durch den blauen Balken dargestellt, und alle gelben Balken sind Echte-Positive. Innerhalb der Echte-Positiven ist eine weitere Aufteilung möglich. Der erste gelbe Balken zeigt alle Pulsfolgen an, an denen der richtige Puls die Modulation erkennt. Wenn beispielsweise der dritte Puls der erste ist, der zur *Modulation* - Kategorie gehört und dieser auch der erste ist, dessen RM-Wert über dem Grenzwert liegt. Folglich enthält der zweite gelbe Balken alle Pulsfolgen, an denen der Puls vor oder nach dem richtigen Puls die Modulation erkennt, und so weiter. Zunächst fällt auf, dass während der Signalvalidierung ungefähr 35 % aller Pulsfolgen einen Fehler erzeugen. Von den verbleibenden werden nur sehr wenige von den Algorithmen falsch zugewiesen, obwohl der OA-Algorithmus etwas

höhere Falsch-Positive und -Negative aufweist. Ferner scheint der RM-Algorithmus genauer zu sein, da die Mehrheit der echten positiven Pulsfolgen auch an der richtigen Position der Pulsfolge erkannt wird. Der OA-Algorithmus weist eine größere Variation auf. Die Modulationen werden hauptsächlich innerhalb von drei Pulsen vor oder nach dem richtigen Puls erkannt.



**Abbildung 5.12: Genauigkeit der Algorithmen**

Histogramme aller Pulsfolgen, die in Fehler (aussortiert in der Signalvalidierung), Falsch Negativ, Falsch Positiv, Echt Negativ und Echt Positiv gruppiert sind. Alle echt positiven Pulsfolgen sind weiter in Klassen unterteilt, die darstellen, wie weit jeder Algorithmus den  $\mu\text{B}$  vom richtigen Puls entfernt erkennt. (a) RM; (b) OA.

## 5.6 Diskussion

Bisher ist kein zuverlässiges Verfahren für eine angemessene Dosierung für die SLT bekannt. Eine optimale Anzahl von Pulsen und der Pulsenergie ist von großem Interesse, um eine ausreichende IOD - Reduzierung zu induzieren und gleichzeitig Nebenwirkungen zu vermeiden.  $\mu\text{B}$ , die um Melaninkörnchen herum auftreten, nachdem die Temperaturen die Verdampfungsschwelle überschritten haben, könnten die biologisch induzierten therapeutischen Wirkungen durch die Zerstörung von Trabekelwerkzellen auslösen. Es kann daher angenommen werden, dass der Nachweis von  $\mu\text{B}$  geeignet ist, um die Dosierung in SLT zu steuern. Das Ziel dieser Studie war, durch  $\mu\text{B}$  verursachte Signalkomponenten mit zwei verschiedenen Nachweismethoden zu finden und Algorithmen zu entwickeln, die möglicherweise für eine automatische rückkopplungsgesteuerte Dosierung verwendet werden können.

### 5.6.1 SLT mit Mikrosekundenpulsen und Energierampe

LATINA UND PARK [1995] zeigten in ihren ersten Arbeiten, dass pigmentierte Trabekelwerkzellen ohne Koagulation gezielt ohne eine Schädigung des umgebenden Gewebes zerstört werden können. Sie haben die Selektivität ihrer Methode unter Verwendung von Einzelpulsen von 1 ns und 10 ns Pulsdauer in kultivierten Zellen nachgewiesen. Bei einer Pulsdauer von  $8\mu\text{s}$  und mehr geht die Selektivität verloren und die thermische Schädigung des umgebenden Gewebes wurde beobachtet. Für die Pulsdauer von  $1,7\mu\text{s}$ , die in dieser Arbeit verwendet wurde, wurden keine Beweise in der Literatur gefunden, dass diese nicht für eine selektive Zerstörung von Zellen geeignet ist. Obwohl die verwendete Pulsdauer größer als die thermische Relaxationszeit von ca. 420 ns eines einzelnen Melanosoms mit einem Radius von  $0,5\mu\text{m}$  ist; für Zellen mit einer Dicke von  $5\mu\text{m}$  wird eine Relaxa-

tionszeit von etwa  $10\ \mu\text{s}$  geschätzt [BRINKMANN *et al.*, 2006] und verschiedene Studien haben eine Selektivität bis zu einer Pulsdauer von  $15\ \mu\text{s}$  gezeigt [ALT *et al.*, 2005; SCHUELE *et al.*, 2005b].

In Bezug auf thermische Schäden in benachbartem Gewebe zeigen auch wiederholte Pulse mit einer Pulsdauer von  $1,7\ \mu\text{s}$  und einer Repetitionsrate von 100 Hz in-vivo nur selektive Zerstörung von RPE-Zellen [PARK *et al.*, 2014]. Da die Melanindichte im Trabekelwerk im Vergleich zum RPE geringer ist, ist es sehr unwahrscheinlich, dass gleiche Laserparameter im Kammerwinkel thermische Schäden verursachen. Dementsprechend sollte die in dieser Studie verwendete Pulsdauer von  $1,7\ \mu\text{s}$  immer noch selektiv für pigmentierte Zellen sein, obwohl die Pulsdauer verglichen mit der herkömmlichen SLT über 500-mal größer ist. Die erhöhte Pulsdauer hat den weiteren Vorteil, dass die Verdampfung mit Mikrosekundenpulsen weniger explosiv ist und die Blasengröße selbstlimitierend ist, wie NEUMANN UND BRINKMANN [2008] gezeigt haben. Dies sollte die Sicherheit der Methode in Bezug auf Kollateralschäden verbessern.

Anstelle der herkömmlichen Fleckgröße von  $400\ \mu\text{m}$  wurden in dieser Studie  $200\ \mu\text{m}$  verwendet. Der kleinere Durchmesser deckt nicht die gesamte anteroposteriore Höhe des Trabekelwerks ab, was tatsächlich von Vorteil sein könnte. Bei einem größeren Fleckdurchmesser können die äußeren Teile des Spots  $\mu\text{B}$  an der Iriswurzel induzieren, bevor  $\mu\text{B}$  am Trabekelwerk entstehen. Dies würde dazu führen, dass eine  $\mu\text{B}$  - gesteuerte Abschaltung die Bestrahlung stoppt, bevor der beabsichtigte Effekt im Trabekelwerk erreicht wird.

Pulsdauer und Fleckgröße der  $\mu\text{s}$ -SLT scheinen geeignet zu sein, den gleichen Wirkmechanismus der konventionellen SLT zu initiieren. Es werden ebenso selektiv in pigmentierten Zellen  $\mu\text{B}$  verursacht, was dann zu einer Störung der Zellstruktur führt und den eigentlichen biologischen Wirkungspfad auslöst.

## 5.6.2 Optische Detektion von Mikroblasen

Die Photodiodendaten zeigten ähnliche Modulationen wie von der SRT bekannt [SEIFERT *et al.*, 2018] und auf RPE-Explantaten mit demselben System beobachtet, wenn die Energie schrittweise über einen bestimmten Schwellenwert erhöht wird. In der SRT korrelieren diese Modulationen stark mit der Zellschädigung und es wird angenommen, dass sie von  $\mu\text{B}$  stammen, was nachweislich für die Zerstörung der Zellen verantwortlich ist [NEUMANN UND BRINKMANN, 2006].

Bei der Analyse des reflektierten Lichts nach  $\mu\text{s}$ -SLT deutet das Vorhandensein von Modulation darauf hin, dass  $\mu\text{B}$  auch im Trabekelwerk erzeugt werden. Die Erkennung dieser Signaländerungen unter Verwendung des vorgestellten Algorithmus zeigt trotz seiner einfachen Architektur eine hohe Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu einer festen Pulsenergie. Unter Verwendung des berechneten besten Grenzwertes, der durch die gestrichelte Linie in Abbildung 5.9e dargestellt ist, scheinen die RM-Werte geeignet zu sein, die *Modulation* - Klasse von der Klasse *keine Modulation* zu trennen, obwohl in diesem Beispieldatensatz ein falsch zugewiesener Puls vorhanden ist (blauer Puls der Pulsfolge 4 - \* oberhalb des Grenzwertes). Im Gegensatz dazu würde kein Energiegrenzwert zu einer zufriedenstellenden Trennung der beiden Klassen führen. Allerdings muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Referenz der Klassen auch auf dem Dosimetriesignal beruht und nicht den tatsächlichen therapeutischen Effekt widerspiegelt, sondern wie zuvor beschrieben auf den Annahmen beruhen, dass hochfrequente Modulationen mit  $\mu\text{B}$  und Zellschäden korrelieren, was in anderen Arbeiten gezeigt wurde.

Ein Hauptvorteil des vorgestellten RM-Algorithmus besteht darin, dass jeder Puls für sich analysiert werden kann; das Verfahren benötigt keinen Referenzpuls, um vorherzusagen, dass  $\mu\text{B}$  erreicht wurden. Dies eröffnet auch die Möglichkeit einer Einzelpuls- $\mu\text{B}$ -Erkennung. Das hier vorgestellte RM-Detektionsverfahren funktioniert jedoch wahrscheinlich selbst mit einer GHz-Abtastrate bei herkömmlichen 3 ns-SLT-Systemen nicht, da die Blasennukleation am Ende des Anregungspulses stattfindet [NEUMANN UND BRINKMANN, 2006]. Es könnte jedoch ein weiterer Messlaser mit geringer Leistung verwendet werden, um  $\mu\text{B}$  nach dem Anregungspuls zu überwachen. Neben dem hier

vorgestellten Algorithmus, der in diesem Datensatz gut zu funktionieren scheint, gibt es viele andere Optionen zum Erkennen von Modulationen. Der Algorithmus wurde unter anderem wegen seiner geringen Komplexität und guten Leistung bei der SRT ausgewählt. Die Hauptkomponenten des Algorithmus sind ähnlich, für die SLT werden nur Algorithmusparameter angepasst. Ein anderer, einfacher Weg ist der Vergleich des reflektierten Pulses mit dem tatsächlichen Anregungspuls, der unter Verwendung einer identischen Photodiode aufgezeichnet wird. Diese Methode erwies sich in einem Laborsystem als sinnvoll, konnte allerdings bei den hier gezeigten Messungen nicht angewandt werden, da das genutzte kommerzielle System die Anregungspulse nicht entsprechend aufzeichnet bzw. zugänglich macht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Frequenzen im reflektierten Licht direkt zu analysieren, anstatt zu filtern.

### 5.6.3 Akustische Detektion von Mikroblasen

Die Schallwandlerform wurde als Kompromiss zwischen einer möglichst großen Detektorfläche und der Nähe zur Schallquelle gewählt, ohne den Lichtweg ins Auge zu behindern. Eine Halbmondform wurde verwendet, um die maximale Fläche auszunutzen. Die Detektorfläche sollte groß sein, um große Teile der sphärisch emittierten Schallwelle zu erfassen, aber eine große Detektorfläche kann auch Interferenzeffekte mit einer Art Tiefpassfilter verursachen. Experimente und Simulationen könnten durchgeführt werden, um die optimale Wandlergröße noch feiner abzustimmen. Darüber hinaus könnte die Ermittlung der genauen Übertragungsfunktion des Wandlers nützlich sein, um die aufgezeichneten Transienten zu korrigieren. Neben der Wandlerform hat der Winkel zur Ultraschallquelle einen Einfluss auf die Druckamplituden. Bei diesem ersten Prototyp wurde der Wandler parallel zur Kontaktfläche des Auges platziert. Der Winkel könnte geändert werden, um die Transientenamplituden zu optimieren. Ein konstanter Winkel während der gesamten Behandlung kann jedoch nicht garantiert werden, da das Kontaktglas vom Arzt ständig neu positioniert wird, um den Kammerwinkel richtig zu visualisieren und um die Spiegelposition zu verändern, damit bis zu  $360^\circ$  des Kammerwinkels bestrahlt werden können. Eine Puls-zu-Puls-Fluktuation der OA-Transienten von aufeinanderfolgenden Laserpulsen sollte mit einer Zellschädigung von RPE-Zellen bei der SRT verbunden sein [SCHUELE *et al.*, 2005a]. Darauf beruht die Annahme, dass Schwankungen der OA-Signale bei der SLT auch durch die Bildung und den Kollaps von  $\mu\text{B}$  verursacht werden. Diese erzeugen zusätzliche Druckwellen, die sich von den Druckwellen unterscheiden, die aus der thermoelastischen Expansion resultieren.

Eine große Anzahl von Transienten wurde aufgrund eines SNR-Fehlers von der Auswertung ausgeschlossen. Aber nur 55 % der ausgeschlossenen Pulse verursachten tatsächlich den SNR-Fehler; alle anderen wurden ausgeschlossen, weil das Signal ihres Referenzpulses im Vergleich zum Rauschen zu klein war. Die mittlere Bestrahlung von Pulsen, die einen SNR-Fehler verursachen, beträgt  $89 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , was weit unter der mittleren Schwelle für die Formation von  $\mu\text{B}$  von  $310 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  liegt. Daher ist der Energiebereich in dem SNR-Fehler auftreten, für die Formation von  $\mu\text{B}$  nicht relevant, und die Empfindlichkeit des Sensors scheint ausreichend zu sein. Darüber hinaus könnte die Hardware angepasst werden, um eine geeignetere Kombination aus Verstärkung und Digitalisierung auszuwählen, um den Energiebereich zu vergrößern, in dem keine Sättigung auftritt und das SNR ausreichend ist.

### 5.6.4 Vergleich beider Methoden

Beide Algorithmen sind so konzipiert, dass sie eine geringe Komplexität für eine einfache und robuste  $\mu\text{B}$  - Erkennung in Echtzeit aufweisen. Beide waren in der Lage, Signaländerungen, die höchstwahrscheinlich mit  $\mu\text{B}$  in Schweineaugen zusammenhängen, *ex-vivo* zu erkennen. Bei der Mehrzahl aller angelegten Impulse korreliert eine Modulation des optischen Signals mit einer Schwankung des akustischen Signals von Puls zu Puls. Beide Algorithmen haben eine höhere Kombination aus Sensitivität und Spezifität als die Verwendung einer festen Energieschwelle. Die pulsweise Sensi-

vität und Spezifität des RM-Algorithmus ist höher als beim OA-Algorithmus. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass die OA-Methode weniger empfindlich für die Erkennung von  $\mu\text{B}$  ist, da der RM-Algorithmus und die manuelle Klassifizierung, die als Referenz dient, auf denselben Kriterien basieren: Modulationen in den optischen Sensorsignalen und nicht auf der Formation von  $\mu\text{B}$  selbst. Da die Label auf einer manuellen subjektiven Klassifizierung basieren, können Fehlinterpretationen besonders nahe an der  $\mu\text{B}$  - Schwelle auftreten, und es ist möglich, dass die Klassifizierung der *Modulation* und *keine Modulation* nicht genau mit dem Vorhandensein von  $\mu\text{B}$  übereinstimmt. Diese falsch gekennzeichneten Daten könnten verhindern, dass die Algorithmen höhere Sensitivitäten und Spezifitäten erreichen. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass der RM-Algorithmus bei der Bewertung des korrekten Puls innerhalb einer Pulsfolge, der zuerst  $\mu\text{B}$  verursacht, genauer vorhersagte, wie in den Histogrammen von Abbildung 5.12 gezeigt. Die Verwendung dieser Histogramme zum Vergleich hat zwei Nachteile. Erstens kann der OA-Algorithmus keine Modulation beim ersten Puls erfassen. Bei 39 Spots wurde der erste Puls als Modulation klassifiziert, und der OA - Algorithmus hat sie beim zweiten Puls erkannt. Diese Pulse werden als orangefarbener Balken dargestellt. Zweitens können als *unbekannt* klassifizierte Pulse nicht richtig berücksichtigt werden. Beispielsweise hatten 69 (RM) und 72 (OA) Pulsfolgen einen unbekanntem Puls unmittelbar vor dem ersten Puls, der als Modulation kategorisiert wird. Somit ist unklar, welcher dieser Pulse  $\mu\text{B}$  verursachte. Daher könnten alle diese Punkte tatsächlich von den Algorithmen korrekt klassifiziert worden sein. Um die Performanz der Algorithmen besser zu beurteilen, könnten mögliche Fehler bei der manuellen Klassifizierung der Daten durch eine unabhängige Klassifizierung durch mehr als eine Person oder durch Auswahl anderer Kriterien minimiert werden. Neben der unterschiedlichen Genauigkeit den korrekten Puls innerhalb der Pulsfolge zu identifizieren, der zur Formation von  $\mu\text{B}$  führt, erreichen beide Algorithmen eine ähnliche Sensitivität von ca. 0,96. Die Spezifität unterscheidet sich jedoch um ca. 0,06. Es ist zu beachten, dass der verwendete Datensatz ein großes Klassenungleichgewicht aufweist. Über 80 % der Spots werden als *Modulation* eingestuft. Bei einem Klassenungleichgewicht kann die reine Analyse der ROC Kurve täuschen und ein positiveres Bild von der Performanz des Klassifikators zeichnen. Hier kann zusätzlich der positive Vorhersagewert (PPV = Genauigkeit) und der negative Vorhersagewert (NPV) berechnet werden, um die Interpretation der Sensitivität und Spezifität zu unterstützen. Für beide Algorithmen entspricht der NPV dem Regime der Spezifität, und der PPV liegt sehr nahe an der Sensitivität, was die Performanz der Algorithmen bestätigt.

Um die Gesamtleistung des Systems weiter zu verbessern, könnte eine einfache Kombination beider Algorithmen verwendet werden. Im Falle einer SLT würde man die Spezifität maximieren, um eine therapeutische Wirkung sicherzustellen. Daher könnte eine Pulsfolge nur dann als über dem Grenzwert liegend behandelt werden, wenn beide Algorithmen  $\mu\text{B}$  erkennen würden. Dies würde die Gesamtspezifität (bei Auswertung der gesamten Pulsfolge) auf 0,96 erhöhen, während die Sensitivität ebenfalls 0,96 beträgt. Im Falle einer sicherheitskritischeren Anwendung wäre es präferabel die Sensitivität zu erhöhen und den Laser auszuschalten, wenn einer der Algorithmen  $\mu\text{B}$  erkennt. Neben dieser einfachen Kombination von zwei Grenzwerten könnte auch eine komplexere Kombination sowie eine Kombination mehrerer Algorithmen gleichzeitig verwendet werden. In dieser Proof-of-Concept-Studie wurden alle Algorithmusparameter nur manuell angepasst, um den höchstmöglichen Youden-Index zu erreichen. Es besteht die Möglichkeit, eine automatische Parameteroptimierung zu implementieren. Darüber hinaus lassen sich die Parameter so optimieren, dass die höchste Spezifität erreicht wird. Zudem wäre es denkbar, beide Algorithmen zu kombinieren und entsprechend zu gewichten, um einen endgültigen Rückkopplungswert zu generieren. Hierbei wäre auch eine Optimierung des Gewichts vorzunehmen. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Optimierung anhand von Patientendaten durchgeführt werden müsste, da bestimmte Grenzwerte, die an Schweineaugen ermittelt wurden, nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind.

Ein für die SRT beschriebener Nachteil der RM-Methode ist bei der SLT weniger problematisch. Bei Patienten mit weniger transparenter Linse und Hornhaut kann das zurückgestreute Signal extrem niedrig werden. Da bei der SLT das Licht die Linse nicht passiert, spielt dieser Effekt keine Rolle. Im

Gegensatz zu RM-Methode kann der OA-Ansatz nicht nur bei der Bestrahlung des Trabekelwerks durch die Vorderkammer verwendet werden, sondern auch in der transskleralen Version der SLT [GEFFEN *et al.*, 2017].

### 5.6.5 Therapeutisches Fenster

MB wurden über einen großen Energiebereich von 117,8  $\mu\text{J}$  bis 334  $\mu\text{J}$  beobachtet. Aus 10 Pulsfolgen wurde ein maximales Verhältnis zwischen dem letzten Nicht- $\mu\text{B}$ -Puls und dem ersten MB-Puls von  $1,76 \pm 0,24$  berechnet. Da es keine Informationen darüber gibt, welcher Puls die MB verursacht hat, wird angenommen, dass der spätestens letzte Puls jeder Pulsfolge die MB verursacht. Folglich könnte das berechnete Verhältnis tatsächlich kleiner sein.

Dieses Verhältnis könnte als hilfreiche Kennzahl dienen, um ein therapeutisches Fenster zu bestimmen. Es bietet eine potenzielle Leitlinie, um die Energie nach dem Nachweis von  $\mu\text{B}$ -Bildung sicher zu erhöhen und gleichzeitig eine ausreichende therapeutische Wirkung ohne Bildung von MB zu gewährleisten. Der genaue Endpunkt der SLT in Bezug auf den Wirkungsmechanismus ist bisher nicht vollständig geklärt. Es könnte ausreichend sein, den Laser unmittelbar nach der Detektion von  $\mu\text{B}$  zu deaktivieren und die Energie auf ein Minimum zu reduzieren, um potenzielle Nebenwirkungen wie vorübergehende Spitzen im Augeninnendruck oder periphere vordere Synechien zu vermeiden, wie von TANG *et al.* [2011] vorgeschlagen. Alternativ könnte, für den Fall, dass eine größere Gesamtenergie zu einer verbesserten IOD-Reduzierung führt [LEE *et al.*, 2015], der  $\mu\text{B}$ -Grenzwert verwendet werden, um definiert über dem MB-Grenzwert zu therapieren.

Ein Verhältnis zwischen MB und  $\mu\text{B}$  von 1,76 ist kleiner als erwartet. LIN [2003] berichtete einen Energiefaktor von 10 zwischen  $\mu\text{B}$ - und MB-Bildung, um einzelne Rindermelanosome, die mit einem einzelnen Nanosekundenpuls bei 532 nm bestrahlt wurden. Sie fanden außerdem einen Schwellenwert für die Entstehung von  $\mu\text{B}$  von  $55 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ . Für einzelne Schweine-RPE-Melanosomen wurden von [BRINKMANN *et al.*, 2000] Schwellenwerte von  $90 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  und  $290 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , bei Pulsdauern von 8 ns bzw. 1  $\mu\text{s}$  angegeben. Die Schwellenwerte steigen mit der Pulsdauer aufgrund der Wärmediffusion während der Heizzeit. Sie berichteten auch eine verringerte Strahlenexpositionsschwelle für die Schädigung des RPE-Gewebes, sowie eine verringerte Schwelle aufgrund akkumulierender Effekte, bei mehreren Pulsen [BRINKMANN *et al.*, 2000]. Die unterschiedliche Pulsdauer und die Tatsache, dass in dieser Studie eine Pulsfolge verwendet wird, könnte eine Ursache für das geringere Verhältnis der Schwellen von  $\mu\text{B}$  und MB-Bildung sein. Darüber hinaus können in einem Cluster von Melanosomen viele kleine  $\mu\text{B}$  zu MB zusammenwachsen. Der mittlere  $\mu\text{B}$ -Schwellenwert von  $310 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  im gesamten Datensatz liegt im gleichen Bereich der von [BRINKMANN *et al.*, 2000] mit Mikrosekundenpulsen gezeigten Schwelle.

Die in der SLT typischerweise applizierte Bestrahlung liegt im Bereich von  $477 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bis  $955 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , was tatsächlich mindestens einen Faktor 10 über der für die Formation von  $\mu\text{B}$  angegebenen Schwelle der Bestrahlung unter Verwendung von Nanosekundenpulsen auf einem einzelnen Melaninpartikel liegt. Der Vergleich der Bestrahlung ist jedoch aufgrund der Unsicherheit bei der Bestimmung der effektiven Fleckgröße schwierig. Diese Experimente wurden an Schweineaugen durchgeführt und das hier gefundene therapeutische Fenster ist möglicherweise nicht direkt auf menschliche Augen übertragbar. Auch die Anzahl der Pulsfolgen, aus denen das Verhältnis zwischen  $\mu\text{B}$  und MB berechnet wird, ist möglicherweise zu klein, um das therapeutische Fenster zu bestimmen.

### 5.6.6 Auf dem Weg zu einem Feedback-System

Klinische Studien sind erforderlich, um die optimalen Parameter für eine ausreichende IOD-Reduzierung zu bestimmen. Diese Studien erfordern eine reproduzierbare Dosimetrie bei der Behandlung. Die hier vorgestellten Mess- und Auswerteverfahren stellen damit die Grundlage dafür da,

eine optimale Behandlungsstrategie in klinischen Studien zu finden. Die vorgestellten Algorithmen sind in Echtzeit fähig,  $\mu\text{B}$  genau zu erfassen und sind daher geeignet in einer Rückkopplungsschleife verwendet zu werden. Die Pulsrampe könnte beispielsweise bei  $\mu\text{B}$  - Erkennung mit einer oder beiden Erkennungsmethoden automatisch gestoppt werden. Selbst wenn die bessere IOD-Reduktion mit Energien erreicht wird, die näher an der Schwelle der MB - Bildung liegen, wäre dieses System äußerst nützlich, um eine angemessene Energie anzuwenden, die effektiv und sicher ist. Die Integration beider Rückkopplungstechniken in ein SLT-Lasersystem sollte keine großen Herausforderungen verursachen. Die hohe Anzahl von fehlerverursachenden Pulsen, die mit dem hier untersuchten System gefunden wurden, weist jedoch darauf hin, dass die Verstärkung und Digitalisierung sorgfältig ausgewählt werden müssen.

## 5.7 Fazit

Es konnte der Nachweis von  $\mu\text{B}$  im Trabekelwerk von intakten Schweineaugen *ex-vivo* mit einem SRT - Lasersystem gezeigt werden. Mikro- und Makroblasen konnten mit Mikrosekundenpulsen erzielt werden, wobei mit dem vorgestellten System eine durchschnittlichen Bestrahlungsschwelle zur  $\mu\text{B}$  -Bildung von  $(310 \pm 137) \text{ mJ/cm}^2$  gefunden wurden, was kleiner ist als die Bestrahlung, die typischerweise bei der SLT verwendet wird. Mit einer Kombination aus einer optischen, speckleba- sierten und einer akustischen Monitoringmethode kann eine Sensitivität und Spezifität von 0,96 zur Erkennung von  $\mu\text{B}$  mit einem RM-Grenzwert von  $2,67 \cdot 10^{-6}$  bzw. einem OA-Grenzwert von 108,57 erreicht werden, wenn ganze Pulsfolgen (nicht Einzelpulse) ausgewertet werden. Der hier entwickelte RM-Algorithmus scheint empfindlicher für die Erkennung von  $\mu\text{B}$  und genauer für die Erkennung des ersten Pulses innerhalb der Pulsfolge der  $\mu\text{B}$  verursacht, zu sein.

Für den Fall, dass die therapeutisch geforderte IOD-Reduktion bereits mit  $\mu\text{B}$  erreicht wird, was klinisch nachgewiesen werden muss, können die vorgestellten Methoden in einer Rückkopplungsschlei- fe verwendet werden, die die Laserbestrahlung steuert; d. h., die Pulsrampe kann beim Erkennen von  $\mu\text{B}$  automatisch gestoppt werden. Selbst wenn sich die erste Bildung von  $\mu\text{B}$  nicht als idealer End- punkt herausstellt, könnte der Beginn dieser  $\mu\text{B}$  als Richtwert für die Einstellung einer angemessenen Energie dienen. Es wurde ein maximales Verhältnis zwischen  $\mu\text{B}$ - und MB - Bildung von  $1,76 \pm 0,24$  gefunden, mit dem eine Energie nahe dem Schwellenwert für die MB - Bildung eingestellt werden könnte. Die vorgestellten Algorithmen allein können nicht zwischen  $\mu\text{B}$  und MB unterscheiden, da MB keine weiteren Signaländerungen zu verursachen scheinen. MB könnten durch Lichtreflexion unter Verwendung des Pilotlichts überwacht werden, da MB Sekunden andauern. Eine automatische Erkennung von  $\mu\text{B}$  könnte die Ärzte jedoch von der Dosierung während der SLT entlasten und dazu beitragen, Über- und Unterbehandlungen zu reduzieren.

## Monitoring am Fundus

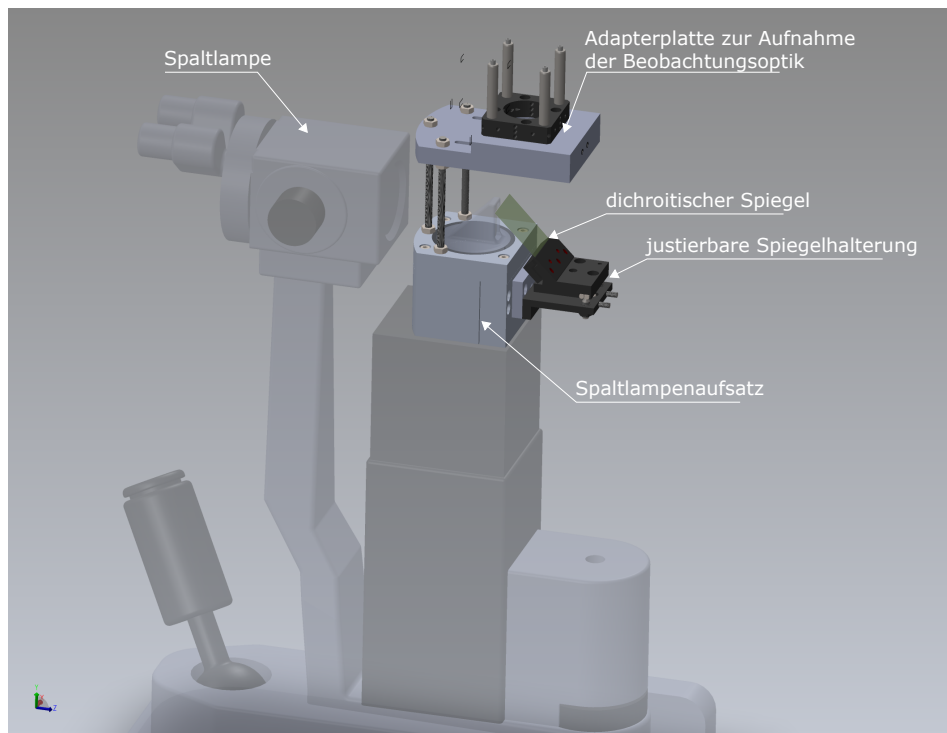
Wie im Kammerwinkel eröffnet die Laserbestrahlung des Fundus ebenso diverse Anwendungswege für die Behandlung verschiedener retinaler Erkrankungen. Ein homogener Behandlungserfolg, begleitet von konstanten laserinduzierten Schäden, gestaltet sich aufgrund intra- und interindividueller Schwankungen der okularen Transmission, Lichtstreuung und vor allem der retinalen Absorption als herausfordernd. Eine entscheidende Maßnahme stellt daher das Echtzeit-Monitoring der Läsionsstärke dar. In diesem Abschnitt werden wie zuvor auch die zeitlichen Veränderungen von Specklemustern analysiert, um Rückschlüsse auf die thermische Reaktion des Gewebes während der Bestrahlung zu ziehen. Während der relativ langsamen Photokoagulation kann die zeitliche Dynamik von Specklemustern im Gegensatz zur SLT mit geringem technischem Aufwand orts aufgelöst mithilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera erfasst werden. Im folgenden Kapitel wird der dazu benötigte optische Aufbau beschrieben, gefolgt von einer Übersicht der Experimente *ex-vivo* und *in-vivo*. Bevor die Ergebnisse präsentiert und diskutiert werden, erfolgt die Einführung eines Modells zur Simulation der Specklebewegungen. Dieses Modell dient als Referenzbasis. Des Weiteren werden die Algorithmen zur Auswertung der zeitlich variierenden Specklemuster vorgestellt.

### 6.1 Aufbau

Abbildung 6.2 zeigt schematisch den gesamten Aufbau des Systems. Zur Beleuchtung wird entweder das Faserende (855 nm Beleuchtung) oder direkt der Laser (633 nm Beleuchtung) mit einer speziell gefertigten Aufnahmeplatte über einen XY-Translation Mount (CXY1, Thorlabs) flexibel mit dem Spaltlampenadapter verbunden.

Zur Erwärmung und Koagulation wurde ein klinisch zugelassener 532 nm cw-Koagulationslaser (Novus Spectra, Lumenis Inc.) benutzt, während die Specklebildung mit Lichtquellen verschiedener Wellenlänge erzeugt wurden, im Wesentlichen bei 855 nm (DL 100DFB-L, Toptica Photonics AG, zusammen mit einem Faser-Isolator für den nahen Infrarot-Bereich (850 nm, IO-F-850, Thorlabs)) und 633 nm (MatchBox2 Mikro-Laser: 633L-21A (SLM,CW), Integrated Optics). Der Heizlaser wird über eine Multimode-Faser (Kerndurchmesser = 50  $\mu\text{m}$ , numerische Apertur (NA) = 0,11) in die Spaltlampe (30 SL/C, Carl Zeiss Meditec AG) eingekoppelt. Es handelt sich um eine Laserspaltlampe, die über einen Laserlink die Einkopplung des Koagulationslasers mit veränderlicher Fleckgröße ermöglicht. Der Beleuchtungslaser zur Specklebildung wird durch einen speziell gefertigten Aufsatz über einen Strahlteiler direkt vor dem Beleuchtungsprisma der Spaltlampe in den Strahlengang eingekoppelt. Abbildung 6.1 zeigt eine 3D Darstellung dieses Spaltlampenaufsatzes. An der Vorderseite des Aufsatzes ist der justierbare Strahlteiler angebracht. Über drei Stäbe, die das stereoskopische Vorbeisehen mit dem Mikroskop möglichst wenig beeinflussen, ist eine Adapterplatte befestigt, die alle weiteren Optiken des Beobachtungsstrahlengangs aufnimmt. Dafür werden Standardkomponenten des 30 mm Cage System von Thorlabs genutzt, welche in Abbildung 6.1 der Übersichtlichkeit halber nur angedeutet sind.

Die Laserstrahlung wird zunächst kollimiert (Linse 2:  $f = 15\text{mm}$ , plankonvex, Thorlabs) und passiert bei der 633 nm Beleuchtung noch ein 600  $\mu\text{m}$  Pinhole und einen OD 0,6 - Filter (NE506B, Thorlabs) zur Abschwächung, bevor es durch ein justierbares Phasenplättchen ( $\lambda/4$ -Plättchen, WPQ05M-830 bzw. WPQ05M-633 mit CRM1, Thorlabs) auf den polarisierenden Strahlteiler (CM1-



**Abbildung 6.1: 3D Darstellung des Spaltlampenaufsatzes**

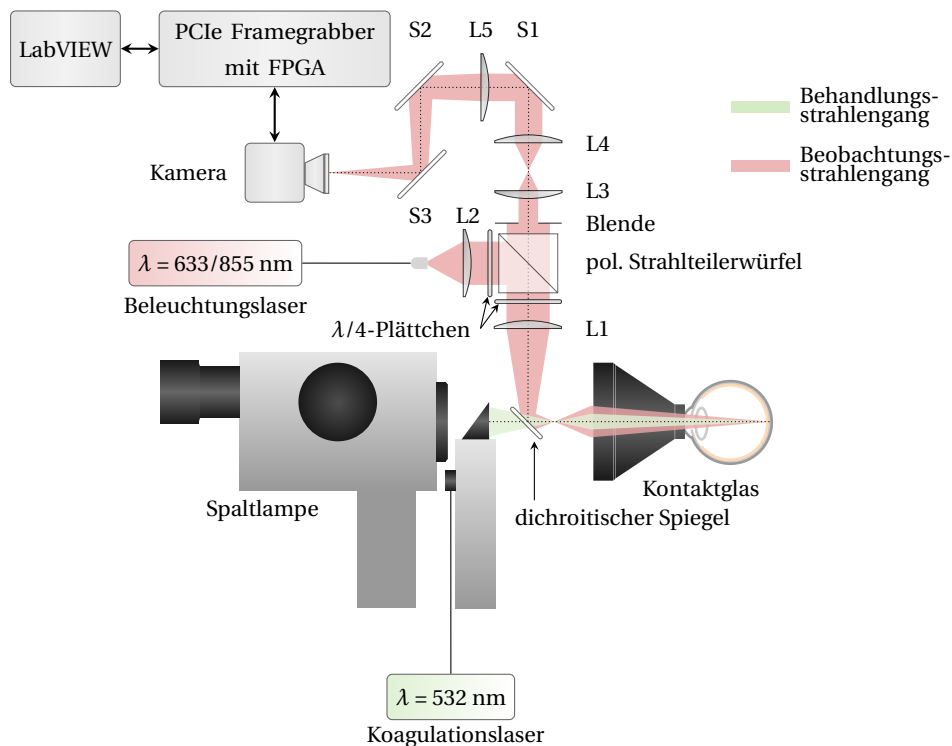
Auf der Spaltlampe (leicht transparent dargestellt), ist der Aufsatz montiert. An dessen Vorderseite befindet sich die justierbare Halterung des dichroitischen Spiegels, der die Überlagerung von Behandlungs- und Beobachtungsstrahlengang ermöglicht. An dem Aufsatz ist oben über drei Stäbe die Adapterplatte befestigt, die alle Komponenten des Beobachtungsstrahlengangs aufnimmt, der zur Übersichtlichkeit nur angedeutet ist.

PBS252, Thorlabs) trifft. Somit kann die Intensität des Beleuchtungslichtes leicht variiert werden, bevor es über eine weitere Linse ( $L1: f = 75 \text{ mm}$ , plankonvex, Thorlabs) und das Kontaktglas (Ocular Reichel-Mainster 1X Retina, Ocular Instruments) auf das Auge fokussiert wird. Dabei wird das Beleuchtungslicht vor der Spaltlampe über einen justierbaren Strahlteiler (T750SPXRXT, CHROMA) mit dem Koagulationslicht kombiniert, sodass sie kollinear in das Auge eintreten, was eine großflächige Ausleuchtung mit einem Durchmesser von etwa  $500 \mu\text{m}$  des aufgeheizten Bereiches ( $50 \mu\text{m} - 200 \mu\text{m}$ ) ermöglicht.

Das aus dem Auge zurückgestreute Licht wird zunächst über den Strahlteiler vom Koagulationslicht getrennt und mit Linse 1 kollimiert. Damit möglichst viel Licht den Polarisationsstrahlteiler passieren kann, wird die Polarisation des zurückgestreuten Lichtes mit einem zweiten Phasenplättchen eingestellt. Das zurückgestreute Licht ist nach dem Strahlteilerwürfel vom Beleuchtungslicht getrennt, durchläuft eine variable Blende, mit der die Specklegröße variiert werden kann, bevor es über drei weitere Linsen ( $L3: f = 75 \text{ mm}$ ,  $L4: f = 15 \text{ mm}$ ,  $L5: f = 200 \text{ mm}$ , plankonvex, Thorlabs) auf den Sensor der CMOS Kamera (CL600x2, Optronis) abgebildet wird. Das 4f-System sorgt für eine Vergrößerung von 13,3. Der Strahlengang wird durch ein Tubussystem vor Umgebungslicht geschützt. Im Beobachtungsstrahlengang befindet sich ein Sperrfilter für  $532 \text{ nm}$  (typische Notch-Bandbreite =  $17 \text{ nm}$ , StopLine, Semrock), um Intensitätsschwankungen am Kamerasensor während der Koagulation zu verhindern.

### 6.1.1 Datenaufnahme

Der Koagulationslaser lässt die Einstellung der Bestrahlungszeit zwischen  $0,01 \text{ s} - 3 \text{ s}$  und der Leistung zwischen  $50 \text{ mW} - 2500 \text{ mW}$  zu. Es wurden stets Einzelpulse appliziert. Die Bestrahlung wird durch



**Abbildung 6.2: Optischer Aufbau zur Aufnahme von Specklemustern während der Photokoagulation**

Behandlungs- und Beobachtungslaserstrahlung wird durch einen dichroitischen Spiegel vor der Spaltlampe überlagert und mittels Kontaktglas auf die Retina fokussiert. Das zurückgestreute Specklemuster wird mit fester Vergrößerung auf eine CMOS Kamera abgebildet. Die Specklegröße ist durch eine Blende variabel. (L: Linse, S: Spiegel) Weiterhin ist die Konstruktion des Spaltlampenadapters zur Aufnahme aller zusätzlichen Optiken zu sehen.

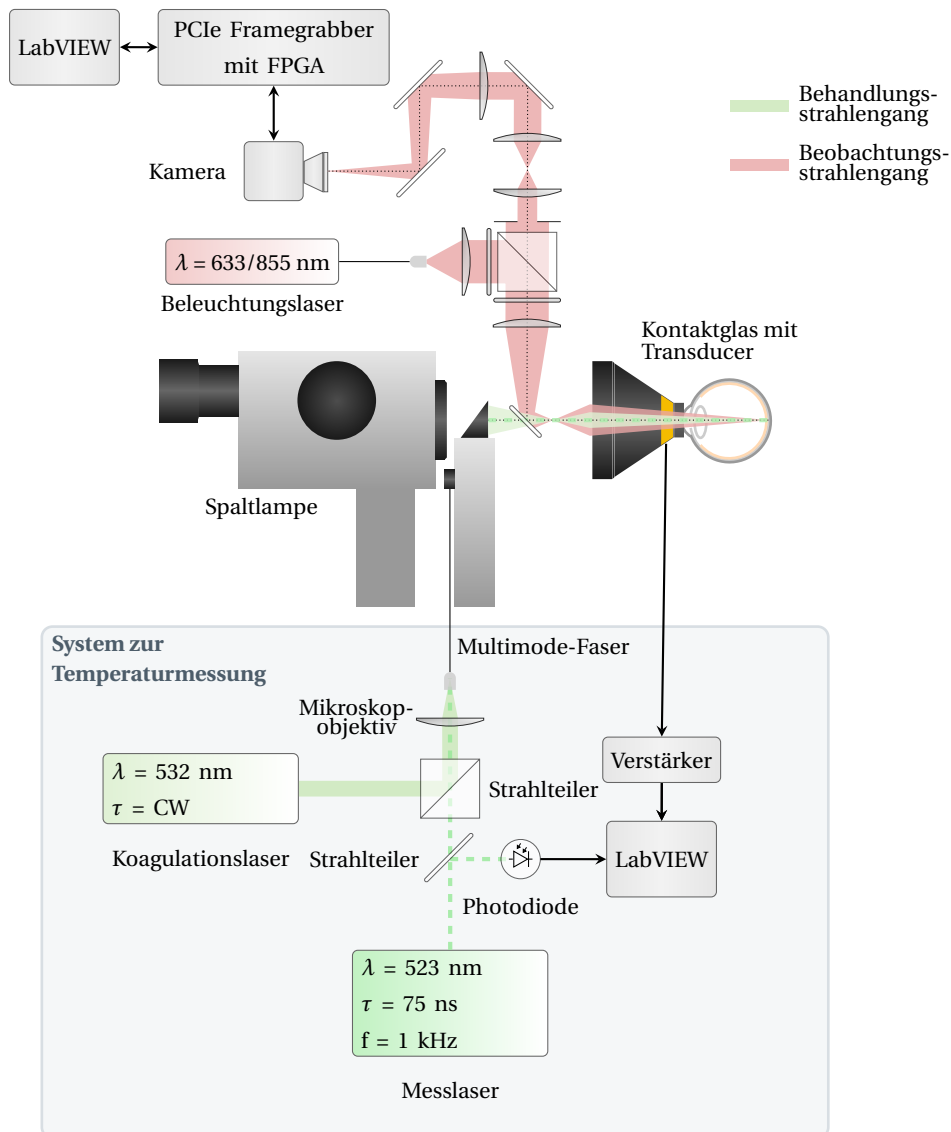
das Betätigen des Fußschalters ausgelöst. Aus dem Laserlinksystem der Spaltlampe wird ein Teil des Koagulationslichtes ausgekoppelt und von einer Photodiode (PDA100A-EC, Thorlabs) erfasst, deren Signal von dem Digitalisierer (CompuScope 14200, Gage Applied Technologies) mit einer Frequenz von 100 MHz aufgezeichnet wird. Das Diodensignal dient zum einen dem Aufzeichnen des zeitlichen Verlaufes des Koagulationslasers, um nach initialer Kalibrierung die applizierte Leistung jeder Bestrahlung zu bestimmen. Zum anderen dient es als Softwaretrigger zur Aufnahme der Kameradaten. Das Specklemuster des zurück reflektierte Lichtes wird von der Kamera (CL600x2, Optronis) mit einer maximalen Bildrate von bis zu 6 kHz detektiert, bevor die Bilder via Camera Link zum Framegrabber mit Onboard-FPGA (NI PCIe-1473R, National Instruments) übermittelt werden. Das Specklemuster wird zunächst als Live-Vorschau auf dem Host-Rechner angezeigt. Dies geschieht mithilfe der LabVIEW (National Instruments) Routine, welche die Aufnahme steuert. Sobald der Fußschalter zur Bestrahlung ausgelöst wird, speichert der Softwaretrigger die Bilder während und nach der Bestrahlung ab. Zusammen mit den Bildern wird auch eine definierte Anzahl an Frames vor dem Triggerevent abgespeichert (im Folgenden meist 10 oder 30). Im Camera Link Full Mode und bei einer Auflösung von 640 x 480 Pixeln lässt sich eine maximale Bildrate von 1869 fps bei entsprechend kurzer Belichtungszeit erreichen. Die Übertragung der Bilddaten über einen Framegrabber mit integriertem FPGA bietet die Möglichkeit Algorithmen zur Analyse dieser Daten direkt auf der Hardware zu implementieren, bevor sie an den Computer übertragen werden. Dazu müssen zunächst die Camera Link Daten den entsprechenden Pixeln zugeordnet werden und können dann entweder auf der FPGA weiter verarbeitet werden oder direkt zum Host gestreamt werden. Das Verhalten des rekonfigurierbaren FPGA wird mittels LabVIEW Code implementiert und von einem Compiler des LabVIEW FPGA Modules in Maschinen-Code übersetzt. Auch die Steuerung der Kamera muss über das FPGA erfolgen, dazu dient eine serielle Schnittstelle, welche die Kommunikation mit der

Kamera ermöglicht. Seitens des Host-Rechners werden von der FPGA ankommende Pixel entweder mit verringerter Bildrate in Grauwertbilder umgewandelt und zusammen mit dem Histogramm angezeigt oder alle Daten werden direkt in Queues gespeichert. Queues ermöglichen ein zunächst schnelles Zwischenspeichern der einkommenden Daten, bevor sie nach der Bildaufnahme lokal auf der Festplatte gespeichert werden. Neben den Bildern der Specklefelder werden zusätzliche eine Reihe an Bestrahlungsparametern und Metadaten für jede einzelne Bestrahlung in einer SQL-Datenbank gespeichert.

### 6.1.2 Simultane optoakustische Temperaturmessung

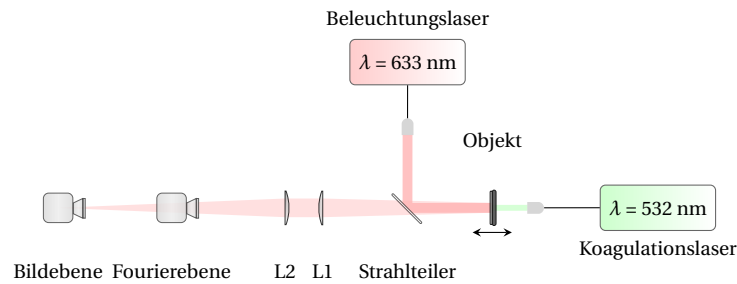
Eine parallele Messung der optoakustischen Temperatur ermöglicht den direkten Vergleich der Specklebewegung mit der erzielten Temperatur. Für einen Teil der Experimente wurde der bereits beschriebene Aufbau zur Specklebildgebung mit einem System zur optoakustischen Temperaturmessung nach BRINKMANN *et al.* [2012] kombiniert, wie in Abbildung 6.3 zu sehen ist. Bei diesen Experimenten wird der Koagulationslaser (Visulas 532s, Carl Zeiss Meditec AG) des optoakustischen Systems genutzt. Während des Aufheizens erzeugt ein zweiter Laser (QG-523-1000, Crysta- Laser LC) mit einer Wellenlänge von 523 nm, Repetitionsrate von 1 kHz und einer Pulsdauer von 75 ns die optoakustischen Transienten. Mit einer Photodiode (FND 100, Laser Components) wird der Verlauf und die Amplitude der Pulse aufgezeichnet, um den Druck über die Energie normiert darstellen zu können. Das Diodensignal dient zusätzlich als Trigger für das optoakustische System. Die Strahlengänge beider Laser werden mit einem Strahlteilerwürfel kombiniert und in eine Multimode-Faser mit einer NA von 0,11 und einem Kerndurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  eingekoppelt. Über die Multimode-Faser wird die Laserstrahlung des optoakustischen Systems in die Spaltlampe des Specklemonitoring-Aufbaus eingekoppelt. Beide Systeme werden getrennt voneinander getriggert und die Datenaufnahme und Auswertung erfolgt unabhängig voneinander. Um die erzeugten Schallwellen aufzunehmen wird ein Kontaktglas (Ocular Mainster (Standard) Focal/Grid, Ocular Instruments) mit piezoelektrischem Transducer verwendet. Die detektierten Transienten werden vorverstärkt (Panametrics Ultrasonic PreAmp, Olympus) und digitalisiert (Octopus CompuScope CS 8347, Gage Applied Technologies). Eine existierende LabVIEW Routine übernimmt die Datenaufnahme und -auswertung hinsichtlich der Temperaturberechnung. In der hier genutzten Version der optoakustischen Temperaturmessung werden die gemessenen Temperaturen nur aufgezeichnet, es findet keine Regelung der Leistung anhand der Daten statt, wie es mit späteren Versionen des Systems möglich ist.

Der Teilaufbau zum Specklemonitoring bedarf einzig eines weiteren Sperrfilters für 523 nm, um die Strahlung des gepulsten Lasers ebenfalls im Beobachtungsstrahlengang zu filtern. Weiter Anpassung sind für die simultane Messung nicht nötig.



**Abbildung 6.3: Optischer Aufbau zur simultanen optoakustischen Temperaturmessung**

Der obere Teil des Aufbaus entspricht exakt dem Aufbau zur Aufnahme von Specklemustern (Abb. 6.2), welcher um das System zur optoakustischen Temperaturmessung (im grauen Bereich) erweitert wurde. Es werden die Strahlengänge des gepulsten- und des Koagulationslasers mittels Strahlteiler überlagert und mithilfe eines Mikroskopobjektives in eine Multimode-Faser eingekoppelt. Über die Faser wird das optoakustische System mit der Spaltlampe des Specklebildungssystems verbunden. Es wird ein Kontaktglas mit integriertem Schallwandler verwendet, um die, durch den gepulsten Laser verursachten Transienten aufzuzeichnen.



**Abbildung 6.4: Vereinfachter optischer Aufbau ohne Spaltlampe zur Aufnahme von Specklemustern während der Photokoagulation**

Das über eine Feingewindeschraube verschiebbare Objekt wird von vorn über einem Strahlteiler mit dem Beleuchtungslaser ausgeleuchtet. Das Specklemuster wird mittels Linse 1 (L1) und Linse 2 (L2) von der Kamera in der Bild- oder Fourierebene aufgenommen. Das Objekt wird durch den Koagulationslaser von hinten aufgeheizt.

### 6.1.3 Vereinfachter Aufbau zur Untersuchung des Einflusses des Defokus

In Abbildung 6.4 ist ein vereinfachter Aufbau für Messungen an Phantomen zu sehen, der es ermöglicht präzise den Defokus einzustellen und gleichzeitig in verschiedenen Detektionsebenen das Specklemuster aufzuzeichnen. Als Objekt wurde ein Segment von einer Diskette, das mit einer weißen streuenden Beschichtung präpariert wurde, verwendet. Das Objekt wird von hinten aufgeheizt und von vorne wird der kollimierte Beleuchtungslaser mit einem Strahlteiler auf das Objekt gebracht und das Specklemuster mit Linsen ( $f_1 = 75 \text{ mm}$  und  $f_2 = 200 \text{ mm}$ , plankonvex, Thorlabs) von der Kamera (CL600x2, Optronis) in der Bild- und Fourierebene aufgezeichnet. Über eine Feingewindeschraube wird die Position des Objektes verschoben.

## 6.2 Übersicht der Experimente

### 6.2.1 Ex-vivo Modell

*Ex-vivo* Versuche wurden hauptsächlich an Schweinebulbi durchgeführt, welche anatomisch und histologisch denen von Menschen sehr ähneln [MCMENAMIN UND STEPTOE, 1991]. Die Augen wurden innerhalb von drei Stunden nach der Entnahme (Versandschlachtereier Hans Schacht GmbH, Bad Oldesloe) für die Versuche verwendet, um das Ablösen der Retina und Eintrüben der vorderen Augenmedien zu verhindern. Gemeinsam mit einem Mainster-Kontaktglas (Ocular Reichel-Mainster 1X Retina, Ocular Instruments) wurden die Augen vor der Spaltlampe platziert, wobei Methocel (2 %) zum Index-Matching verwendet wurde. Die Okulare der Spaltlampe wurden vor jeder Messung mithilfe des Justierstabs auf die jeweilige Sehkraft des Experimentators angepasst. Bei der Fokussierung wurde neben dem scharfen Bild des Fundus durch die Okulare außerdem auch auf die scharfe Abgrenzung des Beleuchtungsspalt der Spaltlampe geachtet, um den Fokus zusätzlich zu überprüfen. Läsionen mit unterschiedlichen Bestrahlungsparametern werden zwischen ein Muster aus gut sichtbaren Markerläsionen platziert, wie an einem Beispiel im Fundusfoto in Abbildung 6.5 zu sehen ist. Es wurden verschiedene Fleckgrößen ( $50 \mu\text{m}$ ,  $100 \mu\text{m}$  und  $200 \mu\text{m}$ ), Bestrahlungsdauern (50 ms, 200 ms und 500 ms) und Blendengrößen (5 mm, 9 mm, 10 mm und 12 mm), und somit auch die Specklegrößen untersucht. Tabelle 6.1 fasst alle Bestrahlungsreihen mit deren Parametern zusammen.

Zur Evaluierung des Schadensausmaßes wurde zunächst während der Bestrahlungsreihe die ophthalmoskopische Sichtbarkeit bei Beobachtung durch die Spaltlampe notiert. Zusätzlich wurden nach der Bestrahlung von jedem Auge Fundusfotos (Zeiss VI-SUCAM lite, Carl Zeiss AG) angefertigt. Um den Schaden unterhalb der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit auszuwerten, wurden Lebend/Tod-Zellassays mithilfe von Calcein AM (Molecular Probes Inc.) durchgeführt. Calcein AM

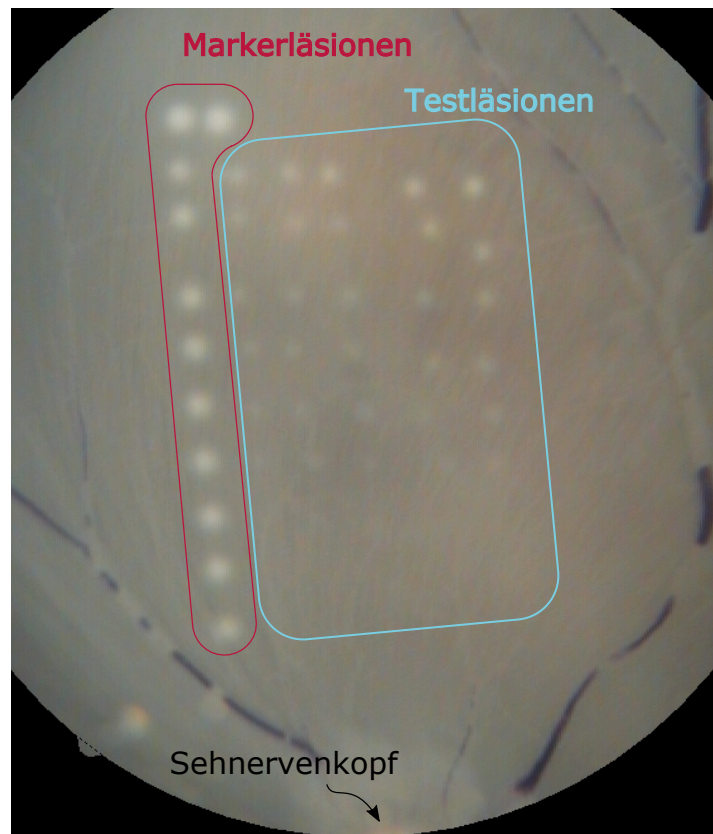
**Tabelle 6.1:** Übersicht der Parameter der *ex-vivo* Bestrahlungsreihen

Reihe	Blende [mm]	Fleckdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Bestrahlungsdauer [ms]	Beleuchtungswellenlänge [nm]	Anzahl der Augen	Anzahl der Läsionen
1	5	100	500	855	7	343
2	9	50	500	855	2	83
3	9	100	200	855	1	49
4	9	100	500	855	1	50
5	9	200	500	855	2	99
6	10	50	200	855	4	186
7	10	50	500	855	6	288
8	10	100	200	855	4	183
9	10	100	500	855	6	254
10	10	200	200	855	5	243
11	10	200	500	855	3	142
12	12	50	200	855	4	208
13	12	50	500	855	7	327
14	12	100	50	855	5	196
15	12	100	200	855	2	190
16	12	100	500	855	11	496
17	12	200	200	855	3	147
18	12	200	500	855	4	193
19	12	100	500	633	2	97

wird nur im Zytoplasma von lebenden Zellen zu einer grün-fluoreszierenden hydrophilen Substanz umgesetzt, welche nicht mehr durch die intakte Zellmembran dringen kann. Calcein AM zeigt demnach enzymatisch aktive Zellen mit intakter Membran an, welche grün unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten, während geschädigte Zellen, die den Farbstoff nicht akkumulieren konnten, dunkel bleiben.

Für die Mikroskopie wurde der bestrahlte Bereich des Auges extrahiert und die neuronale Retina vom RPE abgezogen. Das Explantat wurde für 15 Minuten mit Calcein AM (ca. 2-3,3  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes Inc.) inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (ECLIPSE Ti, Nikon Corporation) ausgewertet. Jede applizierte Läsion wird anhand der gut sichtbaren Markerläsion lokalisiert und in eine von vier Kategorien eingeordnet, die in Abbildung 6.6 verdeutlicht sind. Ist kein kreisförmiger Zusammenschluss von schwarz erscheinenden Zellen im bestrahlten Bereich sichtbar, wird die Läsion der Kategorie *kein Schaden* zugeordnet (Abb. 6.6a). Einzelne schwarze, nicht vitale Zellen deuten auf Schäden während der Präparation des Explantates hin und werden nicht berücksichtigt. Scheinen die Zellmembranen noch intakt, es ist jedoch eine Abnahme der Fluoreszenz im bestrahlten Areal zu erkennen, wie in Abbildung 6.6b, wird der Spot der Kategorie *leichter RPE-Schaden* zugeordnet. Bei runden schwarzen Läsionen (Abb. 6.6c) kann von einem laserinduzierten *RPE-Schaden* ausgegangen werden. Sind einzelne Zellen diffus über das bestrahlte Areal hinweg geschädigt (Abb. 6.6d), sodass keine eindeutige Beurteilung des Zellschadens getroffen werden kann, wird auf die Kategorie *unbekannt* zurückgegriffen.

Durch Kombination dieser Kategorisierung anhand der Zellvitalität mit der Kategorisierung der Spaltlampensichtbarkeit ergeben sich fünf mögliche Kategorien für jede Läsion, nämlich *kein Schaden* (○), *leichter Schaden* (◐), *RPE-Schaden* (◑), *Weißfärbung* (●) unter Spaltlampenbetrachtung oder im Fundusbild und *unbekannt* (△). Jede Kategorie ist mit einem Symbol versehen, um spätere Darstellungen zu vereinfachen.

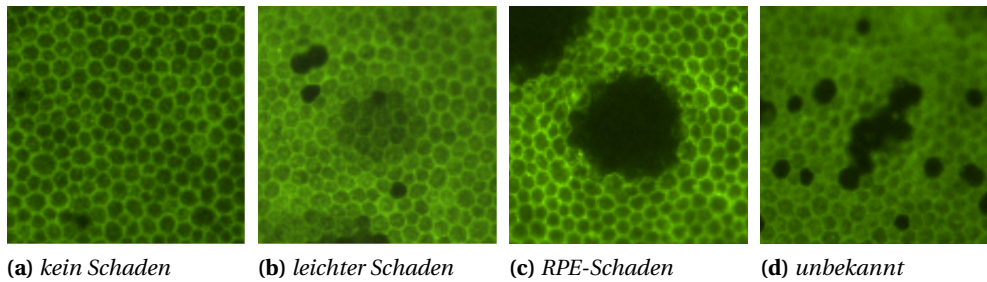


**Abbildung 6.5: Fundusfoto einer Beispielbestrahlung eines Schweinebulbus**

Markierläsionen (rot umrandet) sind deutlich erkennbar und dienen als Orientierung für die Testläsionen (im blau umrandeten Bereich), die in diesem Beispiel zeilenweise mit abnehmender Energie appliziert wurden.

### 6.2.2 *In-vivo* Modell

Die Versuche an Chinchilla-gray Kaninchenaugen wurden entsprechend der Regeln des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Sie wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, Kiel als Tierversuch Nummer V 242-7224.121-12 genehmigt. Vor der Bestrahlung wurde das Kaninchen unter Verwendung von Ketamin (10 %, 0,5 bis 0,7 mL/kg) und Xylazin (2 %, 0,2 bis 0,25 mL/kg) anästhesiert und in einer speziellen Halterung vor der Spaltlampe fixiert. Zum Erweitern der Pupille wurden Phenylephrintropfen (5 %) zusammen mit Oxybuprocain (0,4 %) zur lokalen Betäubung verwendet. Methocel (2 %) wurde genutzt, um die Brechungsindizes von Auge und Kontaktglas anzugleichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Histologien angefertigt. Lediglich die ophthalmoskopische Sichtbarkeit direkt nach der Bestrahlung durch die Spaltlampe wurde notiert und nach der gesamten Bestrahlung mittels Fundusfotografie erneut dokumentiert. Fluoreszenzangiografie kam in der hier vorgestellten Auswertung nicht zum Einsatz. Anhand von ophthalmoskopischer Sichtbarkeit in Kombination mit Fundusfotografien lassen sich drei Klassen unterscheiden: Läsionen, die durch die Spaltlampe direkt nach der Bestrahlung nicht sichtbar sind und anschließend im Fundusfoto kaum bis gar nicht zu sehen sind, werden der Klasse *kaum sichtbar* (□) zugeordnet. Moderate Läsionen zeigen eine weißlich graue Denaturierungszone, die sich allerdings erst innerhalb von etwa 10 min nach der Bestrahlung entwickelt, daher werden Läsionen die nicht sofort, sondern erst im Fundusfoto sichtbar werden als *spät sichtbar* (▣) klassifiziert. Starke Läsionen sind sofort nach der Bestrahlung durch die Spaltlampe sichtbar und können zusätzlich ein helles weißes Zentrum aufgrund thermischer Nekrose haben. Diese starken Läsionen gehören in die Klasse *sofort sichtbar* (■). Zusätzlich kann sich nach einiger



**Abbildung 6.6: Fluoreszenzbilder von bestrahlten RPE-Explantaten**

Es können verschiedene Schadenskategorien unterschieden werden: (a) *kein Schaden*, (b) *leichter RPE-Schaden*, (c) *RPE-Schaden*, (d) *unbekannt*.

Zeit ein Ödemhalo um die Weißfärbung entwickeln. Dieser wird jedoch als Sekundäreffekt betrachtet und nicht zur Klassifizierung der Läsionen herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sieben Bestrahlungsreihen an vier Kaninchen durchgeführt. Bei zwei Kaninchen wurde je nur ein Auge bestrahlt, bei einem beide Augen und bei dem letzten Kaninchen wurden in einem Auge zwei Bestrahlungsreihen vorgenommen. Alle Bestrahlungsreihen mit zugehörigen Parametern sind in Tabelle 6.2 gezeigt, für die Bestrahlungsreihen 2 und 7 sind in dieser Arbeit keine Ergebnisse gezeigt.

Nach Abschluss der Experimente wurden die Kaninchen sorgfältig betreut, um sicherzustellen, dass sie keinen bleibenden Schaden davongetragen haben. Die Tiere erhielten nach der Behandlung eine fortlaufende Fürsorge von spezialisierten Tierpflegerinnen und wurden regelmäßig von Tierärztinnen überwacht.

**Tabelle 6.2:** Übersicht der Parameter der *in-vivo* Bestrahlungsreihen

Reihe	Kaninchen	Blende [mm]	Fleckdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Bestrahlungsdauer [ms]	Beleuchtungswellenlänge [nm]	Anzahl der Läsionen
1	Lili	12	200	200-500	855	38
2	Lili	12	200	500	633	75
3	Karlos	12	200	500	633	102
4	Karlos	12	200	500	633	44
5	Karlos	12	200	500	633	142
6	Rosa*	12	200	500	633	63
7	Lena	12	200	500	633	34

\* es wurde simultan die optoakustische Temperatur gemessen

## 6.3 Modell zur Simulation von Specklebewegungen während der Photokoagulation

In Kapitel 4.2.2 wurde bereits die theoretischen Grundlagen der Änderung von Specklemustern bei unterschiedlicher Bewegung und Veränderungen des Objektes beschrieben, sowie die Grundlagen zur Simulation von Specklemustern in Kapitel 4.1.3 erläutert. Hier wird beides zu einem Modell zusammengeführt, das die Specklebewegung während der retinalen Photokoagulation simulieren soll und im Folgenden genauer vorgestellt wird. Die Simulation erfolgte weitestgehend mit dem Softwarepaket Matlab (The MathWorks, Inc.).

### 6.3.1 Definition des Abbildungssystems und des Objektes

In den folgenden Matlab-Code-Blöcken sind minimale Skripte gezeigt, welche die grundlegende Implementierung beinhalten, die für die Simulation der Speckledynamik nötig ist. Zuerst wird für das Objekt die Seitenlänge (es wird von einem quadratischen Objekt ausgegangen) und der Durchmesser des Beleuchtungsfleckes festgelegt sowie die Anzahl der Pixel (Zeilen 3-6). Daraus kann in den Zeilen 8-11 das Koordinatensystem des Objektes definiert werden. Zur Definition des Objektfeldes wird für dessen Amplitude  $objAmp(x, y)$  ein zwei-dimensionales Array in der Größe des Objektes initialisiert (Zeile 13). Die Amplitude ist innerhalb des Durchmessers des Beleuchtungsfleckes  $D_{obj}$  1 und außerhalb 0. Um Speckle zu erzeugen, muss dem Objektfeld ein komplexer, exponentieller Phasenterm hinzugefügt werden, welcher in Zeile 14 mit zufälligen Zahlen zwischen 0 und  $2\pi$  initialisiert wird. Alle weiteren Parameter in Code-Block 4.1 definieren das Abbildungssystem und sind in Abbildung 6.7 grafisch veranschaulicht. Neben der Grafik ist eine Tabelle mit den verwendeten Abmessungen gezeigt. Die Größe des Objektes berücksichtigt bereits die Vergrößerung des Systems und die Auflösung des Sensors. Die gezeigten Parameter bleiben für alle im Folgenden gezeigten Simulationen konstant, es wird lediglich der Defokus  $\Delta z$  verändert. Für simulierte Specklemuster die rein der Veranschaulichung dienen und nicht zum Vergleich mit Messergebnissen genutzt sind, wurde außerdem die Größe der Blende  $D$  und damit die Specklegröße entsprechend angepasst.

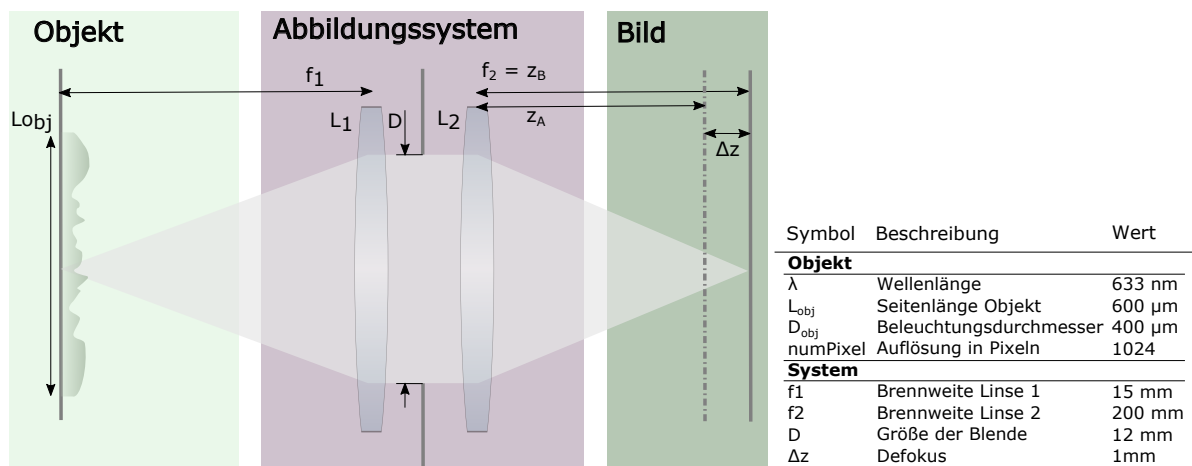


Abbildung 6.7: Übersicht der zur Simulation genutzten Abbildungsgeometrie

#### Matlab-Code-Block 6.1: Minimaler Code zur Simulation dynamischer Specklemuster

```

1 %% Initialisierung des Objektes
2 %-----
3 Lobj = 600*10^-6; % Seitenlänge des Objektes
4 Dobj = 400*10^-6; % Durchmesser des Beleuchtungsfleckes

```

```

5 numPixel = 1000; % Anzahl der Pixel
6
7 % Objekt Koordinaten
8 dx = Lobj/numPixel;
9 x = -numPixel*dx/2:dx:numPixel*dx/2-dx;
10 [X,Y] = meshgrid(x,x);
11
12 % Definition des Objektfelds
13 objAmp = (X.^2+Y.^2)<(Dobj/2)^2; % Amplitude
14 objPha = rand(numPixel)*2*pi; % Phase
15
16 %% Initialisierung des Abbildungssystems
17 %-----
18 lambda = 633*10^-9; % Wellenlänge
19 f1 = 15*10^-3; % Brennweite Linse 1
20 f2 = 200*10^-3; % Brennweite Linse 2
21 D = 12*10^-3; % Größe der Blende
22 fCutoff = D/lambda/f2/2; % Grenzfrequenz
23 k0 = 2*pi/lambda;
24 deltaz = 1*10^-3; % Defokus
25 zB = f2; % Korrekter Fokus
26 zA = zB - beta;
27
28 % Frequenz Koordinaten
29 L = numPixel*dx;
30 fu = -1/(2*dx):1/L:1/(2*dx)-(1/L);
31 [fU,fV] = meshgrid(fu,fu);

```

### 6.3.2 Definition der Bewegung und Gewebeveränderung

Im Kontext der Photokoagulation werden in dieser Simulation zwei Effekte berücksichtigt:

1. Eine temperaturbedingte Ausdehnung des Gewebes
2. Eine Veränderung der Gewebeeigenschaften bei Eintreten der Koagulation.

Dabei wird das Modell hier insofern vereinfacht, dass die Specklemuster rein durch Oberflächenstreuung entstehen. Das aus dem Volumen zurückgestreute Licht, das ebenso zur Formation der Specklemuster beiträgt, wird hier nicht berücksichtigt.

Um den Einfluss der Temperatur zu simulieren, werden nach Gleichung 2.7 in Mathematica für definierte Zeitschritte Temperaturprofile errechnet, wobei die Bestrahlungszeit, der Durchmesser des Bestrahlungsflecks, sowie die applizierte Leistung variiert. Ein Beispiel für ein solches Temperaturprofil wurde bereits in Abbildung 2.9b in radialer und axialer Richtung gezeigt. Dieses zwei-dimensionale Profil ist rotationssymmetrisch, daher kann daraus das ganze Volumen berechnet werden. Es könnten auch komplette drei-dimensionale Temperaturprofile für jeden Zeitschritt in Mathematica errechnet werden, was allerdings ungleich mehr Rechenzeit in Anspruch nimmt. In diesem Volumen der Größe  $l_x = l_y = 600\mu\text{m}$  und  $l_z = 100\mu\text{m}$ , wobei  $z = 0\mu\text{m}$  der Oberfläche des RPE entspricht, wird nach Gleichung 4.66 die lokale Expansion des Gewebes aufgrund der Temperaturerhöhung berechnet. Durch Integration erhält man die axiale Verschiebung an der Oberfläche des Volumens, woraus sich nach Gleichung 4.67 die Phasenänderung des zurückgestreuten Lichtes ergibt, wie bereits in Kapitel 4.2.2.4 erläutert.

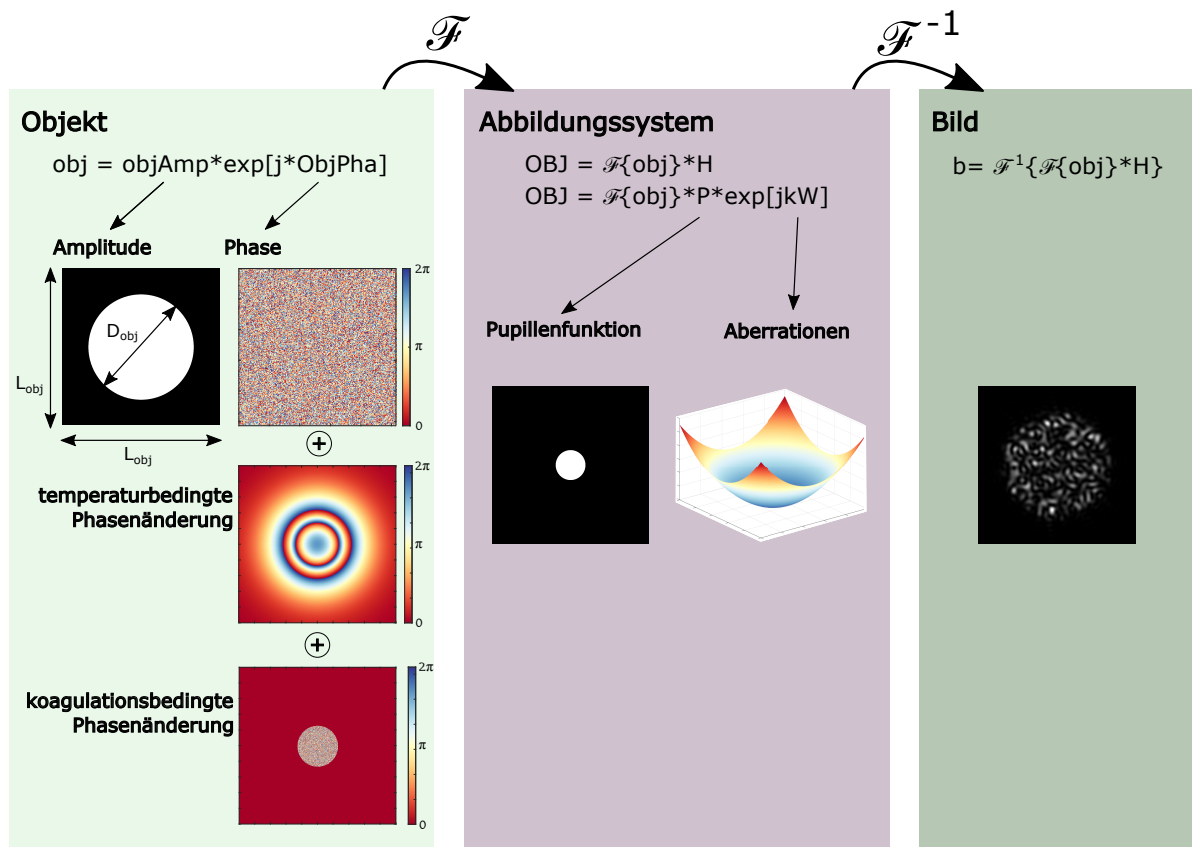


Abbildung 6.8: Schematische Veranschaulichung der Simulation

Im gleichen Kapitel wurde ebenfalls beschrieben, dass eine Koagulation des Gewebes zu Veränderungen dessen optischer und struktureller Eigenschaften führt. Dies resultiert in *boiling* Speckle, die durch eine zusätzliche zufällige Änderung der Phase berücksichtigt werden. Der Bereich, in dem Koagulation eintritt, wird anhand des Arrhenius-Integrals  $\Omega(t)$  bestimmt. In dem Areal der Bestrahlung, in dem  $\Omega(t)$  eins überschreitet, dass heißt irreversibler Schaden im Gewebe erzielt wird, wird die Phasenänderung um einen zufälligen Summanden erweitert. Das Ausmaß dieser Bewegung bzw. die Dekorrelation kann wie zuvor beschrieben über den Faktor  $p_t$  (siehe Gl. 4.64) bestimmt werden, der die zufälligen Phasenänderungen skaliert. Dieser Faktor ist hier abhängig von der Änderung von  $\Omega$ . Somit ist gewährleistet, dass nach der Bestrahlung, wenn sich das Gewebe nur noch sehr langsam strukturell ändert, auch die Specklemuster nur noch wenig Änderung durch *boiling* Speckle erfahren und die Abkühlung den Haupteinfluss auf die Specklebewegung hat.

Die soeben beschriebene Phasenänderungen wird in der Funktion `phaseShiftFrom - Temperature3D` aus den simulierten Temperaturprofilen berechnet (Zeile 44). Für jeden Zeitschritt wird dann in der Schleife ab Zeile 51 das aktuelle Objektfeld berechnet, indem auf die ursprüngliche zufällige Phasenverteilung die temperaturbedingte Phasenänderung addiert wird. In Zeile 56 wird die Phasenverteilung zusätzlich in `x (xDiff)` und `y (yDiff)` lateral verschoben, sofern eine translatorische Bewegung in Pixeln in den Zeilen 34 und 35 definiert wurde. Die Funktion `shiftImage2D` nutzt dazu erneut das Fourier-Shift-Theorem. Anschließend wird Objektamplitude und komplexe Phase multipliziert. Es kann nun zusätzlich noch eine Verkipfung aus der Objektebene heraus simuliert werden, wobei `alpha` der Winkel der Verkipfung in Radiant ist und `theta` die Orientierung der Achse, um die rotiert wird, widerspiegelt. Die Funktion `tilt` verändert das Eingangsfeld folgendermaßen:

$$u_{\text{aus}} = u_{\text{in}} \exp[jk(x \cos \theta + y \sin \theta) \tan \alpha]. \quad (6.1)$$

Ein Beispiel für diese Phasenverteilungen, aus denen sich das Objektfeld zusammensetzt, ist in Abbildung 6.8 gezeigt.

**Matlab-Code-Block 6.2:** Fortsetzung

```

32 % Objektbewegung
33
34 xDiff = 0; % Translation in x Richtung
35 yDiff = 0; % Translation in y Richtung
36 alpha = 0; % Winkel der Verkippung des Objektes
37 theta = 0; % Ausrichtung des Objektes
38
39 % Temperaturbedingte Phasenänderung:
40 % hier werden die Phasenänderungen
41 % aus dem simulierten Temperaturen berechnet. phaseMap ist eine 3D-Array
42 % und hat die Größe numPixel x numPixel x t, wobei t die Zeit ist.
43
44 [phaseMap] = phaseShiftFromTemperature3D(TempProfiles, trange, xrange, zrange, tau);
45
46
47 % Array für das Specklevideo initialisieren
48 dynSpeckle = zeros(size(phaseMap));
49
50 % Für jeden Zeitschritt das Specklemuster berechnen
51 for i = 1:size(phaseMap,3)
52
53     % Aktuelles Objektfeld durch Bewegung/Erwärmung bestimmen
54     % -----
55     ObjPha_i = objPha+phaseMap(:, :, i);
56     ObjPha_i = shiftImage2D(ObjPha_i, xDiff, yDiff);
57     obj = objAmp.*exp(1i*ObjPha_i);
58     obj = tilt(obj, numPixel, lambda, alpha, theta);

```

### 6.3.3 Propagation durch das definierte System

Das für den Zeitschritt vollständig beschriebene Objektfeld wird anschließend durch das System propagiert. Dafür wird die FFT des Objektes bestimmt (Zeile 61) und danach mit der Transferfunktion multipliziert. Diese setzt sich aus der Pupillenfunktion, die mit der Grenzfrequenz  $f_{\text{Cutoff}}$  die Pupillenöffnung berücksichtigt und die Specklegröße definiert, sowie dem Phasenfehler, der hier durch den Defokus gegeben ist, zusammen. Es folgt die Rücktransformation in Zeile 74. Da optische Detektoren nur Intensitäten aufzeichnen, wird diese im letzten Schritt in Zeile 75 berechnet. Ein Beispiel eines so entstandenen Specklemusters ist in Abbildung 6.8 zu sehen. Die Specklebewegung dieser Simulation ist in Abbildung 6.9 gezeigt. Unter dem Verlauf von Temperatur und Arrhenius-Integral im Zentrum der Bestrahlung sind für drei Zeitpunkte während und nach der Bestrahlung die Vektorkarten gezeigt. Zu  $t_1 = 5 \text{ ms}$  dominiert die radial nach außen gerichtete Bewegung, die durch den großen Temperaturanstieg zu Beginn der Bestrahlung und den Defokus hervorgerufen wird. Steigt  $\Omega$  über eins, wie zum Zeitpunkt  $t_2 = 55 \text{ ms}$ , ist in den Randbereichen anhand der Farbcodierung im Wesentlichen immer noch dieselbe gerichtete Bewegung zu sehen, allerdings sorgt die Koagulation im Zentrum für deutlich stärkere Speckleänderungen. Nach der Bestrahlung ( $t_3 = 210 \text{ ms}$ ) zieht sich das Gewebe wieder zusammen und die Speckle bewegen sich radial gerichtet entgegengesetzt im

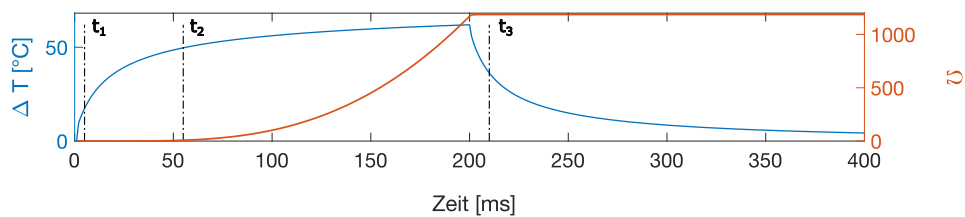
Vergleich zum Beginn der Bestrahlung. Da sich  $\Omega$  nach der Bestrahlung nur noch sehr leicht ändert, verschwindet auch der Einfluss der *boiling* Speckle im Zentrum.

#### Matlab-Code-Block 6.3: Fortsetzung

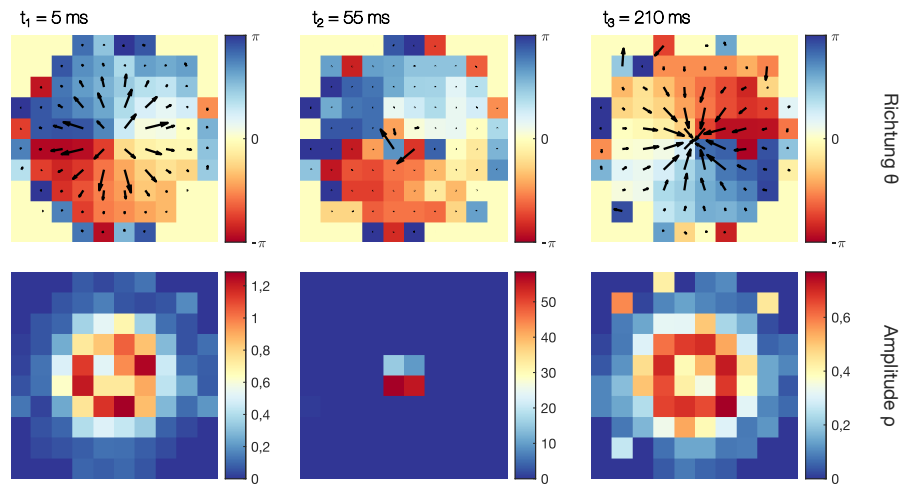
```

59 % Fouriertransformation des Objektfeldes
60 % -----
61 obj_FFT = fftshift(fft2(obj));
62
63 % Multiplikation mit der Transferfunktion
64 % -----
65
66 % Defokus
67 kW = pi*lambda*zi*(zi/zA-1).*(fU.^2+fV.^2);
68 % Transferfunktion
69 H = ((fU.^2+fV.^2)<fCutoff^2).*exp(1i*kW);
70
71 im_FFT = H.*obj_FFT;
72
73 % Erzeugen des Bildes durch Rücktransformation
74 im = ifft2(ifftshift(im_FFT));
75 dynSpeckle(:, :, i) = abs(im).^2;
76
77 end

```



(a) Temperaturverlauf



(b) Vektorkarten

#### Abbildung 6.9: Ergebnis der Simulation

(a) Verlauf der Temperatur und des Arrhenius-Integrals im Zentrum der Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Temperatur wurde für eine Bestrahlung mit 30 mW über 200 ms und einem Fleckdurchmesser von 200  $\mu\text{m}$  simuliert. (b) Vektorkarten der aus der Temperaturänderung resultierenden Specklebewegung zu 3 verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Bestrahlung. [Link zur Animation](#)

### 6.3.4 Detektion der Specklemuster in der Fourierebene der Linse

Um den Einfluss der Detektionsebene zu untersuchen, wurde die Definition der Abbildungsgeometrie verändert. Das Abbildungssystem besteht nur noch aus einer Linse. Das Objekt befindet sich im Abstand zur Linse  $d$ , welcher auch den Defokus berücksichtigt und der Detektor ist in der hinteren Brennebene der Linse im Abstand  $f$  platziert. In dieser Anordnung ergibt sich folgender Ausdruck für das Feld  $U_f(u, v)$  in der Brennebene [GOODMAN, 2005]:

$$U_f(u, v) = \frac{1}{j\lambda f} \exp \left[ j \frac{k}{2f} \left( 1 - \frac{d}{f} \right) (u^2 + v^2) \right] \times \iint_{-\infty}^{\infty} U_{obj}(\xi, \eta) \exp \left[ -j \frac{2\pi}{\lambda f} (\xi u + \eta v) \right] d\xi d\eta. \quad (6.2)$$

Der Tiefpassfilterung der Blende wird hier nicht berücksichtigt, da die Blendenöffnung deutlich größer ist als das hier simulierte Objekt, bzw. die relevanten Strukturen im Objekt. Anstelle der Zeilen in Code-Block 4.3 ist Gleichung 6.2 im Skript zur Simulation der Speckle in der Fourierebene implementiert. Die Definition von Objekt und Objektbewegung bleibt unverändert, lediglich die Koordinatensysteme werden entsprechend angepasst.

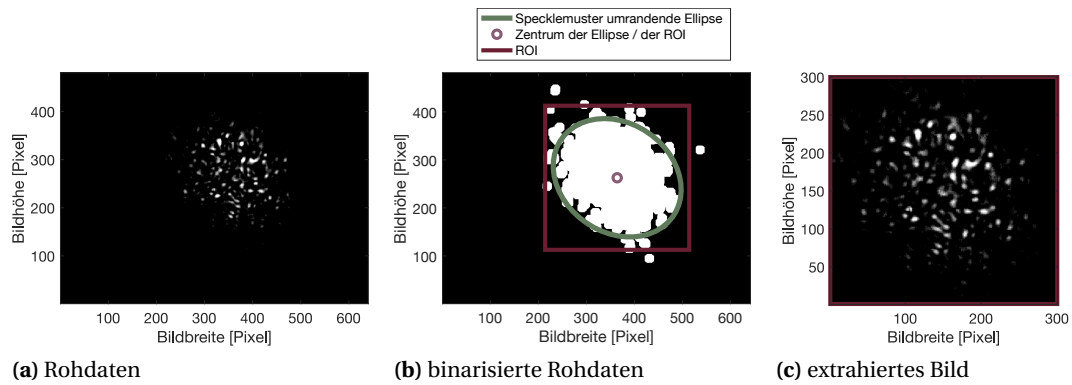
## 6.4 Analyse der Specklebewegungen

Ziel der Speckleanalyse ist die Bestimmung einer Größe, die mit der Temperaturerhöhung oder dem Ausmaß des Schadens korreliert ist. Im folgenden Abschnitt werden Algorithmen vorgestellt, die größtenteils zunächst die zwei-dimensionalen Bilddaten auf eine ein-dimensionale Größe reduziert, die den zeitlichen Verlauf der Specklebewegung repräsentiert. Im Anschluss werden aus diesem Zeitverlauf oder Zeitprofil der Specklebewegung weitere Parameter extrahiert.

### 6.4.1 Vorverarbeitung

Wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben, wird zu jeder applizierten Läsion eine Sequenz an Bildern aufgenommen, wobei die Bilder Grauwertdarstellungen des abgebildeten Specklemusters sind. Die Dimension der einzelnen Bilder beträgt 480 x 460 Pixel. Die Anzahl der Bilder variiert, je nach Bestrahlungsdauer und gewählter Bildrate und beinhaltet meist 10 - 30 Frames vor der Bestrahlung als Referenz, den Zeitraum der Bestrahlung selber und einen mindestens ebenso langen Zeitraum nach der Bestrahlung um das Abkühlverhalten des Gewebes mit aufzuzeichnen. Um den Rechenaufwand für die Algorithmen zu minimieren, wird aus den Rohdaten jedes Bildes der Sequenz zunächst der relevante Bereich (engl.: Region of Interest, ROI) von 300 x 300 Pixeln extrahiert. Zur weiteren Vereinfachung der nachfolgenden Operation wird die ROI so ausgewählt, dass sich das Specklemuster zentral im neuen 300 x 300 Pixel großen Bild befindet. Dies geschieht automatisch, indem Ellipsen in dem binarisierten Specklemuster gesucht werden.

Wird eine Ellipse mit einer Hauptachse im Bereich des erwarteten Spotradius gefunden (siehe Abb. 6.10), ist deren Zentrum auch das Zentrum des neuen Bildausschnitts. Wird keine Ellipse gefunden, was passiert wenn Reflexe das Specklemuster überlagern oder die Intensität des Specklemusters zu gering ist, wird das Zentrum des letzten Bildes genutzt, da davon ausgegangen werden kann, dass sich die Position des Beleuchtungsfleckes innerhalb einer Bestrahlung und auch zwischen zwei Bestrahlungen in derselben Bestrahlungsreihe nicht ändert. An den extrahierten Bildausschnitten wird nachfolgend eine Bewegungskorrektur durchgeführt.



**Abbildung 6.10: Extraktion des Specklemusters aus den Rohdaten**

(a) Rohdaten des Specklemusters (b) binarisiertes Specklemuster mit der gefundenen Ellipse, die das Specklemuster umrandet (c) auf Basis des Ellipsenzentrums extrahiertes Specklemuster.

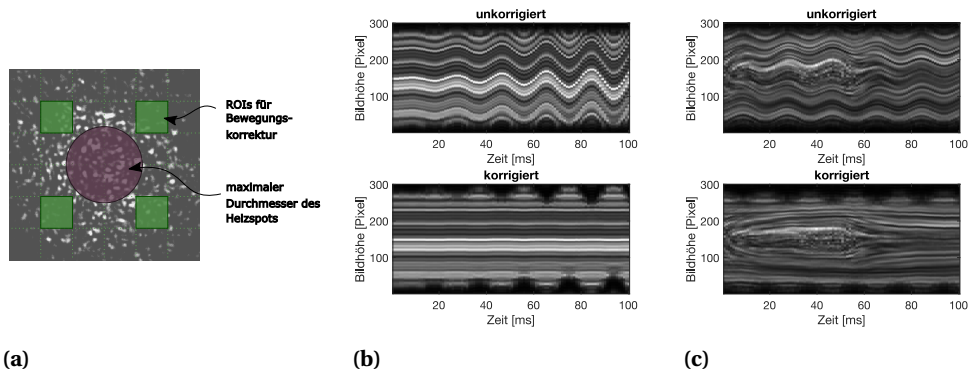
## 6.4.2 Bewegungskorrektur

Ziel der Bewegungskorrektur ist die Reduktion bzw. der Ausgleich von Specklebewegungen, die nicht durch die Bestrahlung entstanden sind. Wie zuvor beschrieben, sorgen zufällige Bewegungen einzelner Streuer in biologischen Proben für ungerichtete Bewegung bzw. eine Änderung der Helligkeit der Speckle. Ein Flimmern bzw. alle schnellen Specklebewegungen wurden in einer Option der Auswertung durch einen drei-dimensionalen Medianfilter der Größe  $3 \times 3 \times 5$  ( $x, y, t$ ) reduzieren.

Weiterhin werden globale Bewegungen der Proben und auch der narkotisierten Kaninchen nicht vermeidbar sein. Im *ex-vivo* Fall sorgen kleine Schwingungen der Augenhalterung durch Bewegung der Spaltlampe oder Auslösen des Fußschalters zu Bewegungen der Netzhaut. *In-vivo* kommen trotz einer möglichen Fixierung, weiterhin Bewegung durch Atmung und Mikrobewegungen des Auges, wie Drift, Tremor und Mikrosakkaden hinzu [JOOS *et al.*, 2003]. Mikrobewegungen können allerdings in anästhesierten Kaninchen stark reduziert sein und hängen von Tiefe der Narkose und Medikament ab. Globale Bewegungen lassen sich gut im Zeitverlaufs-Specklemuster sichtbar machen, da sie eine eindeutige  $x$  und/oder  $y$  Komponente haben, und das Zeitverlaufs-Specklemuster je nach Wahl der Zeile oder Spalte, mit der das Pseudobild erzeugt wird, hauptsächlich horizontale oder vertikale Anteile der Bewegung visualisiert. Eine simulierte schwingende Bewegung der Probe und damit auch der Speckle ist im Zeitverlaufs-Specklemuster in Abbildung 6.11b oben zu sehen, in dem sich die Bewegung wellenförmig darstellt.

Eine Möglichkeit der Bewegungskorrektur direkt anhand der Ausschläge im Zeitverlaufs-Specklemuster stellt sich als recht fehleranfällig heraus, sobald eine leichte Dekorrelation der Speckle hinzukommt, da einzelne Speckle nicht mehr über dem gesamten Zeitraum verfolgt bzw. registriert werden können. Die Kompensation der Bewegungen mittels Korrelation von Sub-Bildern zwischen aufeinander folgenden Frames erweist sich als deutlich präziser und stabiler. Es werden vier quadratische ROIs mit einer Seitenlänge von 50 Pixeln gewählt, deren Positionen in Abbildung 6.11a in Grün zu sehen sind. Mittels Phasenkorrelation (Abschnitt 4.3.1) wird die Verschiebung mit Sub-Pixel Genauigkeit bestimmt. Wenn die Bewegung in mindestens zwei der vier Sub-Bilder die Gleiche ist, wird das gesamte Bild, und alle folgenden, um den Mittelwert aller von null verschiedenen Verschiebungen korrigiert. Dies geschieht durch Multiplikation der Fouriertransformierten mit einer linearen Phasenrampe (Fourier-Shift-Theorem).

Der Zeitverlaufs des Specklemusters der korrigierten Specklesequenz ist im unteren Bild in Abbildung 6.11b zu sehen. Die großflächige Ausleuchtung in Kombination mit der Wahl der Position der ROIs außerhalb des maximalen Spotdurchmessers des Heizlasers ermöglicht eine Bewegungskorrektur.



**Abbildung 6.11: Bewegungskorrektur**

(a) Wahl der Bildausschnitte, die zur Bewegungskorrektur genutzt werden, (b) Zeitverlaufs-Specklemuster vor und nach Bewegungskorrektur einer simulierten Specklesequenz mit reiner globaler Bewegung. (c) Zeitverlaufs-Specklemuster vor und nach Bewegungskorrektur einer simulierten Specklesequenz mit zentraler temperaturbedingter Specklebewegung überlagert mit einer globalen Bewegung.

tur der globalen Bewegungen und nicht der zentralen temperaturbedingten Specklebewegungen. Abbildung 6.11c verdeutlicht den Erhalt der simulierten koagulationsbedingten Specklebewegung, bei nahezu kompletter Reduktion der globalen Bewegung.

### 6.4.3 Zeitverlauf

Nach der Vorverarbeitung und Bewegungskorrektur kann aus den dreidimensionalen Bilddaten ein eindimensionales Zeitprofil generiert werden. Dieser Zeitverlauf kann entweder direkt aus der Bildreihe oder anhand des Zeitverlaufs-Specklemusters extrahiert werden. Er beschreibt die Specklebewegung über die Zeit und wird im Folgenden als  $S(t)$  bezeichnet. Die unterschiedlichen Indizes geben an, welcher Algorithmus zur Berechnung zugrunde lag. Im Folgenden werden drei Algorithmen vorgestellt.

#### 6.4.3.1 Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster ( $S_{ZSM}$ )

In Kapitel 4.3 wurde bereits das Zeitverlaufs-Specklemuster eingeführt, das auf verschiedene Weise bezüglich der konkreten Speckledynamik weiter ausgewertet werden kann. Entweder direkt, worauf im nächsten Abschnitt (6.4.4.1) näher eingegangen wird, oder indem zunächst ein Zeitverlauf bestimmt wird, aus welchem nachfolgend Merkmale extrahiert werden können.

Es gibt verschiedenste Möglichkeiten die Änderung horizontal entlang des Zeitverlaufs-Specklemusters zu beschreiben, eine einfache Option besteht darin die Kreuzkorrelation zwischen aufeinander folgenden Spalten zu bestimmen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  einer Spalte  $s_t$  zu ihrer benachbarten Spalte  $s_{t+1}$  ist definiert als:

$$r_t(s_t, s_{t+1}) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left( \frac{s_{i,t} - \mu_t}{\sigma_t} \right) \left( \frac{s_{i,t+1} - \mu_{t+1}}{\sigma_{t+1}} \right), \quad (6.3)$$

wobei  $\mu$  und  $\sigma$  der Mittelwert bzw. die Standardabweichung ist. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den nachfolgenden Methoden kann der Korrelationskoeffizient noch skaliert werden:

$$S_{ZSM}(t) = |r_t - 1|. \quad (6.4)$$

Da für das Zeitverlaufs-Specklemuster sowohl eine Spalte als auch eine Zeile aus dem ursprünglichen Bild des Specklemusters verwendet werden kann, ergibt sich pro Sequenz je ein Zeitverlauf, der eher die horizontale oder vertikale Specklebewegung widerspiegelt. Für den endgültigen Dosimetrieparameter wird der maximale Wert des jeweiligen extrahierten Merkmals herangezogen.

Es gibt nun verschiedene Parameter, die verändert werden können:

- **Anzahl der Spalten/Zeilen  $n$**

Das Zeitverlaufs-Specklemuster kann anstelle von nur einer Spalte oder Zeile auch mit der Summe über eine größere Anzahl von Zeilen bzw. Spalten berechnet werden, was als eine Art Glättung angesehen werden kann. Unverändert bleibt hingegen die Position; die definierte Anzahl der Zeilen bzw. Spalten wird immer aus der Bildmitte entnommen.

- **Offset  $o$**

Um langsame Bewegung zu detektieren, kann ein Offset  $o$  eingeführt werden, welcher dafür sorgt, dass nicht der Korrelationskoeffizient zwischen einer Spalte  $s_t$  und der direkt benachbarten Spalte  $s_{t+1}$  sondern einer Spalte  $s_{t+o}$  im Abstand  $o$  berechnet wird.

- **Nachbarschaft  $l$**

Weiterhin können die Korrelationskoeffizienten benachbarter Spalten mit einbezogen und gewichtet aufsummiert werden. Es können verschiedene Werte für die Größe und Wichtung (z.B. gaußförmig) der Nachbarschaft gewählt werden.

#### 6.4.3.2 Generalisierte Differenzen ( $S_{GD}$ )

Mittels generalisierter Differenzen lassen sich, wie zuvor in Abschnitt 4.3 beschrieben, Aktivitätskarten erzeugen. Allerdings können die berechneten Differenzen auch über die Zeit dargestellt werden, anstatt direkt zu eine Aktivitätskarte aufsummiert zu werden. Im einfachsten Fall werden die Grauwerte zweier aufeinander folgender Bilder subtrahiert. Um langsamere Bewegungen ebenfalls in Betracht zu ziehen, kann es von Vorteil sein, wiederum statt nur zwei benachbarte Bilder, eine größere Nachbarschaft zu betrachten. Das Differenzenbild  $I'_t(x, y)$  in der Nachbarschaft  $l$  kann folgendermaßen bestimmt werden:

$$I'_t(x, y) = \sum_l |I_t(x, y) - I_{t+l}(x, y)| p_l, \quad (6.5)$$

wobei  $p_l$  einen Wichtungsfaktor darstellt. Dieses Differenzenbild  $I'_t(x, y)$  hat hohe Werte an Orten mit viel Specklebewegung und geringe Werte bei wenig Aktivität. Als Maß für die Gesamtaktivität kann die Summe aller Pixelwerte im Differenzenbild gebildet werden und mit der Summe eines oder mehrerer Referenzbilder normiert werden:

$$S_{GD}(t) = \frac{\sum_x \sum_y |I'_t(x, y)|}{\sum_x \sum_y |I'_{ref}(x, y)|} \quad (6.6)$$

Mögliche Optionen, die Parameter anzupassen, sind:

- **Größe der Nachbarschaft  $l$**
- **Wichtung mit einem Gaußfilter**
- **Normierung.**

### 6.4.3.3 Vektorkarten ( $S_{VK}$ )

Analog zu den zuvor beschriebenen Methoden zu Bewegungskorrektur und Erzeugung von Vektorkarten kann die Bestimmung der Bewegung in Sub-Bildern natürlich auch genutzt werden, um temperaturbedingte Bewegungen auszuwerten. Dazu wird aus den errechneten Verschiebungen in  $x_{ij}$  und  $y_{ij}$  zunächst Betrag  $\rho_{ij}$  und Winkel  $\theta_{ij}$  der Bewegung jedes Subbildes mit der Position  $i, j$  bestimmt:

$$\rho_{ij} = \sqrt{x_{ij}^2 + y_{ij}^2}, \quad (6.7)$$

$$\theta_{ij} = \arctan \frac{x_{ij}}{y_{ij}}. \quad (6.8)$$

Da sich Speckle je nach Richtung des Defokus radial nach innen oder außen bewegen, kann aus den Winkeln die mittlere Richtung, also zum Zentrum oder vom Zentrum weg bestimmt werden. Diese Richtung, ebenso wie die Summe der Beträge und der mittlere Winkel über alle Sub-Bilder, kann dann über die Zeit bestimmt werden. Der mittlere Winkel (und auch die Richtung) werden im Folgenden nur zur Veranschaulichung der Specklebewegung genutzt, da sowohl bei radialer als auch bei ungerichteter Bewegung ein mittlerer Winkel von null zu erwarten ist, wird diese Größe für die weitere Auswertung nicht in Betracht gezogen. Die Summe der Beträge spiegelt die allgemeine Aktivität der Speckle wider und deren Zeitverlauf:

$$S_{VK}(t) = \sum_i \sum_j \rho_{ij}(t) \quad (6.9)$$

wird im Folgenden genutzt, um daraus gewisse Merkmale zu extrahieren. Mögliche Optionen, die Parameter anzupassen, sind:

- **Größe der Sub-Bilder  $n$**
- **Offset  $o$ :**  
Abstand der Frames, zwischen denen die Bewegung berechnet wird
- **Normierung.**

## 6.4.4 Merkmalsextraktion

### 6.4.4.1 Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlaufs-Specklemuster

Wie zuvor schon angedeutet, besteht die Möglichkeit, direkt aus dem Zeitverlaufs-Specklemuster eine zusammenfassende Größe für die Aktivität der Speckle zu bestimmen, ohne zuvor einen ein-dimensionalen Zeitverlauf zu berechnen. Eine Option, die RABAL UND BRAGA JR [2008] beschrieben haben und die ursprünglich verwendet wurde, um Texturen in Bildern zu analysieren, ist die Verwendung einer Grauwertematrix (im Englischen gray level co-occurrence matrix oder kurz co-occurrence matrix genannt). Die Grauwertematrix  $GM$  ist definiert als:

$$GM = [N_{ij}], \quad (6.10)$$

wobei  $N$  die Häufigkeit eines bestimmten Grauwertes  $i$  ist, der sich horizontal genau neben dem Grauwert  $j$  befindet. Angewandt auf die Bilder des Zeitverlaufs-Specklemusters beschreibt die GM allerdings nicht die Textur, sondern die Aktivität über die Zeit, da horizontal aneinander liegende Pixel tatsächlich zeitlich aufeinander folgende Pixel sind. Das bedeutet, dass bei wenig Aktivität der Speckle, die GM eine ausgeprägte Hauptdiagonale hat, während bei stärkerer Specklebewegung

höhere Werte abseits der Diagonalen zu erwarten sind. Zur Normierung ist es zweckmäßig nun jede Zeile der GM durch die Anzahl des Auftretens des Grauwertes zu teilen:

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}}. \quad (6.11)$$

In der normierten Matrix  $M_{ij}$  ist somit die Summe in jeder Zeile eins. Zur Bestimmung der eigentlichen Aktivität kann die Streuung um die Hauptdiagonale bestimmt werden, indem man über die Matrixwerte, die mit ihrem quadratischen Abstand zur Hauptdiagonale multipliziert werden, aufsummiert. Dies kann als Moment zweiter Ordnung oder Inertia Moment (IM) der Matrix beschrieben werden und ist folgendermaßen definiert:

$$IM = \sum_{ij} M_{ij}(i-j)^2. \quad (6.12)$$

#### 6.4.4.2 Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlauf

Aus den zuvor bestimmten Zeitverläufen  $S(t)$  lassen sich unabhängig von dem Algorithmus, mit dem sie errechnet wurden, nun verschiedene Merkmale bzw. Feature  $F$  extrahieren. Das Merkmal  $F$  ist eine ein-dimensionale Größe, die im Laufe dieser Arbeit auch als F-Score oder Dosimetrieparameter bezeichnet wird. Die verschiedenen Indizes geben Aufschluss über die Art, wie das Merkmal bestimmt wurde. Abbildung 6.12 zeigt beispielhaft einen typischen Zeitverlauf für eine unter- und überschwellige Bestrahlung. Anhand dieser Beispiele sind die im Folgenden erläuterten Merkmale grafisch veranschaulicht.

**Maximum:** Der Maximalwert während der Bestrahlungsdauer (grüner Kreis in Abb. 6.12) :

$$F_{max}[S(t)] = \max[S(t)] \quad \text{für} \quad t_{\text{ein}} < t < t_{\text{aus}}, \quad (6.13)$$

wobei  $S(t)$  die Specklebewegung über die Zeit und  $t_{\text{ein}}$  und  $t_{\text{aus}}$  der Einschalt- bzw. Ausschaltzeitpunkt des Lasers ist.

**Summe über die Bestrahlungsdauer:** Normiert auf die Anzahl der Frames während der Bestrahlung, was der normierten Fläche unter der Kurve der Specklebewegung entspricht (rote Fläche in Abb. 6.12):

$$F_{sum}[S(t)] = \frac{\sum_{t=t_{\text{ein}}}^{t_{\text{aus}}} S(t)}{\text{fps} \cdot \tau}, \quad (6.14)$$

die Anzahl der Frames während der Bestrahlung ergibt sich aus dem Produkt der Bildrate fps und der Bestrahlungsdauer  $\tau$ .

**Summe oberhalb eines Grenzwertes:** Es werden nur Werte während der Bestrahlung aufsummiert, die oberhalb einer definierten Schwelle liegen (blaue Fläche in Abb. 6.12). Diese Schwelle wird als 50 % des Maximalwertes definiert, wobei der Maximalwert nur in einem definierten Bereich  $\Delta t_{\text{PeakROI}}$ , dem Peak-ROI, direkt nach den Einschaltzeitpunkt  $t_{\text{ein}}$ , gesucht wird (Abb. 6.12):

$$\begin{aligned} G &= 0.5 \cdot \max[S(t)] \quad \text{für} \quad t_{\text{ein}} < t < t_{\text{ein}} + \Delta t_{\text{PeakROI}}, \\ F_{sumG}[S(t)] &= F_{sum} \quad \text{für} \quad S(t) \geq G. \end{aligned} \quad (6.15)$$

**Zeit unterhalb des Grenzwertes:** Der eben definierte Grenzwert  $G$  wird erneut benutzt, um die Zeit zwischen den ersten beiden Schnittpunkten der Specklebewegungskurve  $S(t)$  mit dem Grenzwert zu bestimmen (lila Strecke in Abb. 6.12). Je schneller die Kurve erneut ansteigt umso kleiner wird  $F_{\Delta tG}$ .

Um diesen Parameter zu berechnen, wird zunächst der Zeitpunkt  $t_{\downarrow}$  als der erste Moment identifiziert, an dem die Kurve unter den Grenzwert  $G$  absinkt:

$$t_{\downarrow} = t_1 \quad \text{für} \quad S(t) \leq G. \quad (6.16)$$

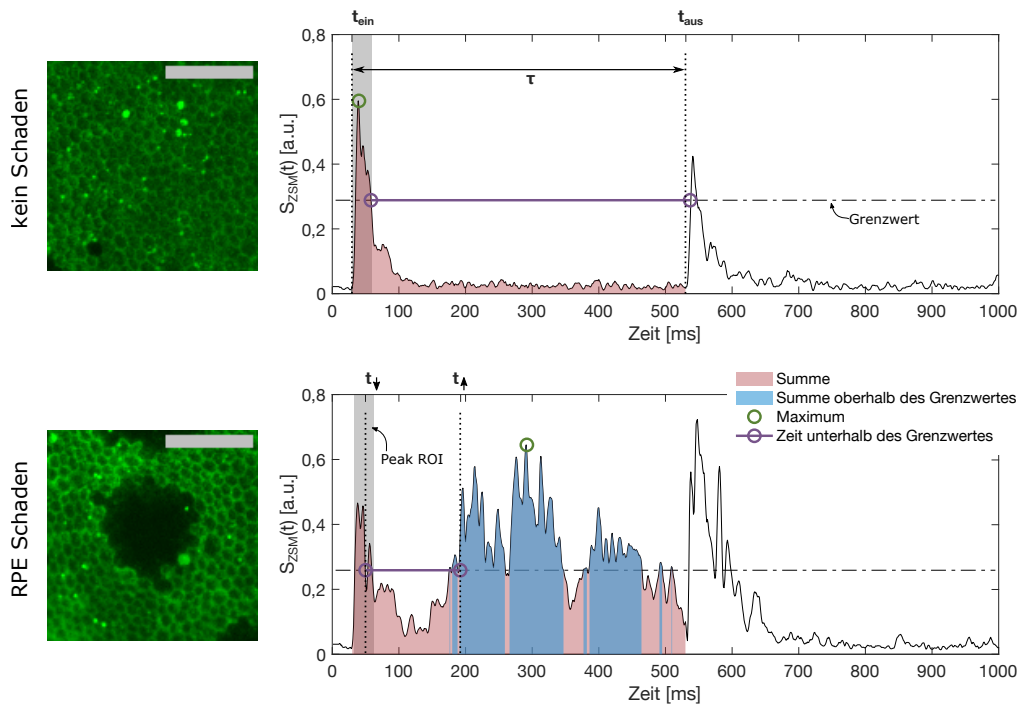
Anschließend wird der Zeitpunkt  $t_{\uparrow}$  gesucht, bei dem die Kurve  $S(t)$  erneut den Grenzwert  $G$  überschreitet und die Specklebewegung für mindestens 20 aufeinanderfolgende Zeitschritte oberhalb dieser Schwelle liegt:

$$t_{\uparrow} = t_1 \quad \text{für} \quad S(t > t_{\downarrow}) \geq G \quad (6.17)$$

mit allen  $S(t_{\downarrow}, \dots, t_{\downarrow} + 20) \geq G$ .

Schließlich wird der Parameter  $F_{\Delta t G}[S(t)]$  als Verhältnis der Zeitdauer, während der die Specklebewegung unterhalb des Grenzwertes liegt und der Gesamtzeitdauer berechnet:

$$F_{\Delta t G}[S(t)] = \frac{t_{\uparrow} - t_{\downarrow}}{t_1}. \quad (6.18)$$



**Abbildung 6.12: Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlauf ( $S_{ZSM}$ ) der Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster**  
Gezeigt sind eine unterschwellige Bestrahlung ohne RPE-Schaden und eine überschwellige Bestrahlung mit RPE-Schaden.

### 6.4.5 Parameteroptimierung

Die soeben vorgestellten Algorithmen können als Ranking- oder Scoring-Klassifikator aufgefasst werden, die eine kontinuierliche Ausgabe, das Merkmal  $F$  bzw. einen  $F$ -Score erzeugen, auf den unterschiedliche Grenzwerte angewendet werden können, um die Klassenmitgliedschaft vorherzusagen.

Abbildung 6.13 fasst die im Folgenden beschriebene Auswertung grafisch am Beispiel des ZSM Algorithmus (Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster) zusammen. Für jede Instanz, jede applizierte Läsion, liegt neben der Specklesequenz ein Label vor, das die Läsion anhand des Vitalitätstests und der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit, wie in Kapitel 6.2.1 definiert, eine von 5 (Schadens)-Klassen annehmen kann. Dieses Label bzw. Klasse kann als Grundwahrheit angesehen werden, anhand derer die Performanz der Algorithmen bestimmt wird.

Für die Auswertung wurden diese Klassen auf drei reduziert. Alle als *unbekannt* ( $\Delta$ ) klassifizierte Läsionen werden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Läsionen der Klasse *leichter Schaden* ( $\ominus$ ) werden mit der Klasse *kein Schaden* ( $\circ$ ) kombiniert, da ihre Specklebewegungen sehr ähnlich sind, was in folgenden Kapiteln gezeigt wird. Es wird außerdem angenommen, dass der in dieser Kategorie erzeugte Schaden nicht instantan ist, sondern eine spätere biologische Reaktion auf die Bestrahlung ist. Aus den übrigen drei Klassen ergeben sich zwei Grenzwerte, die ermittelt werden müssen:

**Grenzwert  $G_{\circ\ominus}$**  zur Unterscheidung zwischen *keinSchaden* ( $\circ$ ) und *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) und

**Grenzwert  $G_{\ominus\bullet}$**  zur Unterscheidung zwischen *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) und *Weißfärbung* ( $\bullet$ ).

Es ist möglich, dass die beiden optimalen Grenzwerte nicht durch denselben Algorithmus bzw. dieselbe Parameterkombination zu finden sind, daher wird für jeden Grenzwert die Analyse einzeln durchgeführt und es werden zwei binäre Klassifikatoren gesucht. Demzufolge werden für jede Läsion zwei  $F$ -Scores  $F_{\circ\ominus}(p_i)$  und  $F_{\ominus\bullet}(p_j)$  basierend auf zwei verschiedenen Modellen bzw. Parameterkombinationen  $p_i$  und  $p_j$  bestimmt. Eine Parameterkombination  $p_i$  beinhaltet u.a. einen der Algorithmen zur Bestimmung des Zeitverlauf inklusiver seiner benutzten Parameter, ob und welche Vorverarbeitung und Bewegungskorrektur angewandt wurde und welche Methode zur Merkmalsextraktion benutzt wurde.

Es werden in einem Datensatz nun alle  $F$ -Scores  $F_{\circ\ominus}(p_i)$  und  $F_{\ominus\bullet}(p_j)$  bestimmt und mittels ROC Analyse optimale Grenzwerte  $G_{\circ\ominus}$  und  $G_{\ominus\bullet}$ , welche die Klassen möglichst optimal voneinander trennen, gesucht. Die ROC Kurve wird bestimmt, indem für jeden möglichen Grenzwert alle falsch Klassifizierte ermittelt, daraus die Sensitivität und 1-Spezifität berechnet und gegeneinander aufgetragen werden. Die Klassifizierung ist perfekt, wenn die ROC Kurve die linke obere Ecke erreicht, wobei die Diagonale eine rein zufällige Klassifikation darstellen würde. Die Fläche unter der Kurve (engl.: Area under the curve, AUC) ist ein gängiges Maß für die Performanz und wird 1 für die optimale Klassifizierung. Für die AUC und die ROC Kurven werden zur besseren Vergleichbarkeit punktweise Konfidenzintervalle (kein Konfidenzband für die gesamte Kurve) mit 1000 Bootstrap-Replikaten und Grenzwertmittelung bestimmt [FAWCETT, 2004]. Die Bootstrap-Methode ist eine Resampling-Methode, bei der aus der ursprünglichen Stichprobe erneut mit zurücklegen, eine Stichprobe der gleichen Größe gezogen wird. Das heißt, manche Datenpunkte können in der neuen Stichprobe mehrfach oder auch gar nicht vorhanden sein. Die Ziehung wird sehr oft, hier 1000 mal wiederholt und für jede Stichprobe werden die Kennwerte von Interesse berechnet und Konfidenzintervalle können bestimmt werden.

Um die optimalen Parameter der Algorithmen zu finden, kann eine Optimierung angewandt werden. Eine einfache und auch hier genutzte Methode der Optimierung ist die Brute-Force-Methode (*brute force* englisch für „rohe Gewalt“), bei der alle möglichen Parameterkombinationen getestet werden. Da es sich bei den Parametern der hier genutzten Algorithmen um diskrete Werte handelt (Entscheidungen, einen bestimmten Algorithmusbaustein zu benutzen oder nicht oder Variablen von zwei- oder ein-dimensionalen Filtern) und nur sechs verschiedene Parameter getestet werden, bleibt der Rechenaufwand überschaubar. Im Falle von kontinuierlichen Parametern würde es theoretisch unendlich viele mögliche Kombinationen geben und Verfahren, wie die Gradientenabstiegsmethode, werden der Brute-Force-Methode bevorzugt behandelt. Dabei wird anstatt alle

Kombination auszutesten, auf einer mehr-dimensionalen Fehleroberfläche ein Minimum gesucht, indem von einem Startpunkt schrittweise entlang des steilsten Gradientens abwärts gegangen wird.

Für alle Parameterkombinationen werden nun die  $F$ -Scores in einem Datensatz berechnet, mittels ROC Analyse mit der Grundwahrheit verglichen und die AUC bestimmt. Um eine Überanpassung der Algorithmen und deren Parameter an diesen Datensatz zu verhindern und die Übertragbarkeit an die Grundgesamtheit zu prüfen, wurde der Datensatz in ein Trainings- und Validierungsdatensatz geteilt. Hier wurden 75 % des Datensatzes genutzt, um einen Parametersatz mit maximalen AUC zu finden und die restlichen 25 % der Daten genutzt, um Performanz der gefundenen Parameter zu überprüfen.

Zur Darstellung der Klassifikation wurden die beiden  $F$ -Scores einer jeden Läsion jeweils über deren applizierte Leistung oder gegeneinander aufgetragen, wie in Abbildung 6.13 zu sehen.

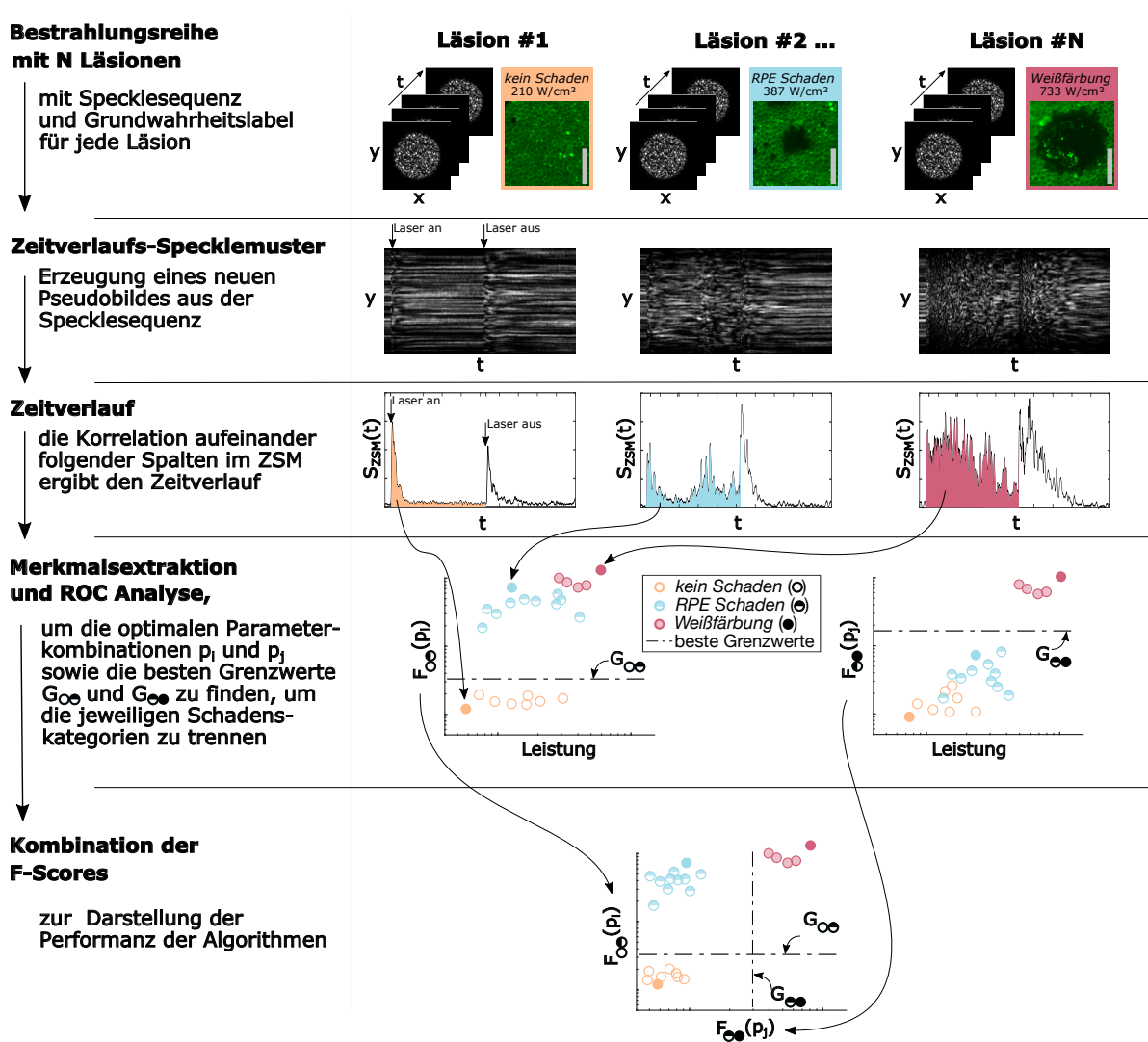


Abbildung 6.13: grafische Veranschaulichung der Auswertung am Beispiel des ZSM Algorithmus

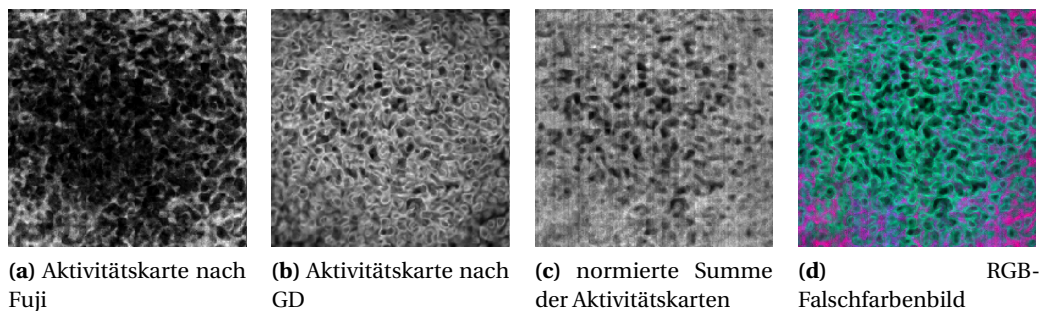
Für alle  $N$  Läsionen der Bestrahlungsreihe wird aus der Specklesequenz das Zeitverlaufs-Specklemuster berechnet und anschließend daraus der Zeitverlauf. Für alle Parameterkombinationen werden die F-Scores bestimmt und mittels ROC Analyse und Grundwahrheitslabel jeder Läsion die optimalen Grenzwerte  $G_{\circ\circ}$  und  $G_{\bullet\bullet}$  für die optimalen Parametersets  $p_i$  und  $p_j$  errechnet. Zur Darstellung der Klassifizierung werden die F-Scores  $F_{\circ\circ}(p_i)$  und  $F_{\bullet\bullet}(p_j)$  jeder Läsion entweder einzeln über die applizierte Leistung geplottet oder gemeinsam gegeneinander aufgetragen.

### 6.4.6 Analyse mittels Convolutional Neural Network

Wenn die hier vorgestellten Algorithmen nicht mehr in der Lage sind, verschiedenartige Specklebewegungen *in-vivo* zu unterscheiden, in fast allen Specklesequenzen aber subjektive temperaturbedingte Bewegung sichtbar sind, kann untersucht werden, ob ein Convolutional Neural Network möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen kann.

#### 6.4.6.1 Eingangsdaten

Als Eingangsbild für ein CNN ist prinzipiell das Zeitverlaufs-Specklemuster denkbar, hat allerdings zwei entscheidende Nachteile. Erstens muss zunächst ein Parameter für die Breite des Ausschnittes aus dem Bild des Specklemusters zur Erzeugung des Zeitverlaufs-Specklemusters gewählt werden, die im Idealfall eigentlich ebenso optimiert werden sollte. Deutlich problematischer ist allerdings, dass das Zeitverlaufs-Specklemuster erst nach der Bestrahlung vollständig entsteht bzw. eine Dimension des Zeitverlaufs-Specklemusters die Zeit ist, wodurch zu jedem Zeitpunkt der Bestrahlung das Eingabebild eine andere Dimension hat. Für ein Echtzeit-Feedback ist das Zeitverlaufs-Specklemuster daher ungeeignet, da die meisten CNNs eine feste Größe für die Eingabebilder haben.



**Abbildung 6.14: Beispiel für Aktivitätskarten als Eingangsdaten**

Es sind die drei unterschiedlich erzeugten Aktivitätskarten einzeln nebeneinander dargestellt (a) nach Fuji's Methode (b) nach der GD Methode und (c) gewichtete Summe der ersten Beiden. (d) Ebendiese Aktivitätskarten überlagert als RGB-Falschfarbenbild, welches als Eingang für das neuronale Netz dient.

Daher erscheint es sinnvoller, z.B. Aktivitätskarten zu nutzen, welche nach der Aufnahme eines jeden Frames mit konstanter Größe erzeugt werden können.

Die Eingangsbilder haben eine Größe von  $224 \times 224 \times 3$  Pixeln, was eine übliche Eingangsgröße für viele bereits trainierte Netze ist. Eine übliche Methode, gerade bei geringer Datenmenge, besteht darin, ein bereits mit einer großen Anzahl an Daten trainiertes Netz zu benutzen und nur einige spätere Schichten auf das neue Klassifizierungsproblem zu trainieren. Da dies auch hier eine mögliche Option darstellt, ist es sinnvoll die Eingabe-Bilder entsprechend dieser Größe zu erzeugen, auch wenn die Netzwerke an unterschiedliche Eingangsgrößen angepasst werden können. Anstelle der RGB Kanäle, können verschiedene Aktivitätskarten, wie in Kapitel 4.3 vorgestellt, verwendet werden. Der erste Kanal ist eine Aktivitätskarte nach Fuji's Methode (Gl. 4.74), der zweite nach der GD Methode (Gl. 4.73) und der dritte eine gewichtete Summe der ersten Beiden, wie in Abbildung 6.14 zu sehen.

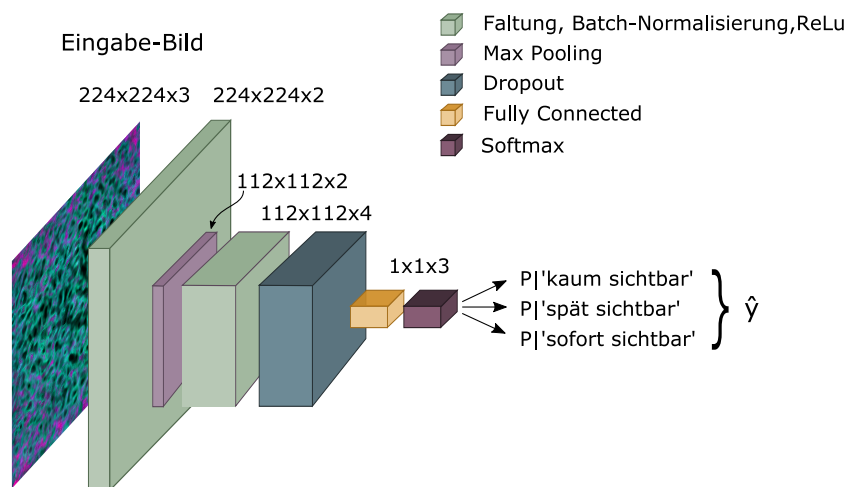
Da gerade bei den *in-vivo* Messreihen die Datenmenge zum Trainieren eines Netzes gering ist, ist es sinnvoll, die Daten „künstlich“ etwas zu vermehren. Klassische Methoden sind Skalierung, Zuschneiden, Rotation, Spiegelung oder Hinzufügen von Rauschen und ähnliche Veränderungen. Bei den hier genutzten Daten bietet sich allerdings an, pro Spot nicht nur ein Bild zu nutzen, sondern nach Ende der Bestrahlung mehrere, da sich die generelle Struktur der Aktivitätskarten nicht mehr ändert; durch die weitere leichte Speckle Bewegung allerdings leicht unterschiedliche Aktivitätskarten

zum effektiveren Training benutzt werden können. Pro Läsion werden fünf 3-Kanal Aktivitätskarten bei konstanten zeitlichen Abständen erzeugt, welche jeweils noch dreimal um je 90° rotiert wurden, was insgesamt in 20 Aktivitätskarten pro Läsion resultiert.

#### 6.4.6.2 Transfer Learning

Aufgrund der geringen Datenmenge kann es nützlich sein, ein vortrainiertes Netz zu benutzen. Diese Methode des „Transfer Learning“ wird genutzt, um Netze, die bereits erfolgreich auf ein bestimmtes Klassifizierungsproblem trainiert wurden, bei einem verwandten Problem mit deutlich weniger Trainingsaufwand zu nutzen. Hier wurde ResNet18 genutzt, ein 'residual' Netz [HE *et al.*, 2016], das mit mehr als einer Millionen Bildern der ImageNet Datenbank trainiert wurde und 1000 Objekte unterscheiden kann. Zur Klassifizierung der Speckledaten wurde die 'fully-connected' Schicht gegen eine mit 3 Klassen ausgetauscht. Die Parameter in den ersten 60 Schichten wurden übernommen und nur die der restlichen Schichten trainiert. 70 % der gesamten Eingangsdaten werden zufällig dem Trainingsset zugeordnet und der Rest dem Validierungsset.

Das genutzte Netz ist auf die Klassifizierung von abgebildeten Objekten trainiert und ist daher eventuell nicht optimal geeignet, um Aktivitätskarten der Specklesequenzen zu analysieren, bei denen keine komplexen Objekte, sondern wahrscheinlich strukturelle Änderungen von feinen Strukturen erkannt werden müssen. Es soll hier trotzdem zunächst als Ausgangsbasis dienen. Bei der Analyse von OCT M-Scans, die zwar eher dem Zeitverlaufs-Specklemuster als den Aktivitätskarten ähneln, aber eine ähnlich feine Struktur statt realen Objekten aufweisen, hat die Strategie bereits gelernte Gewichte als Ausgangspunkt für das Training zu nutzen, funktioniert [FOUNTOUKIDOU *et al.*, 2018].



**Abbildung 6.15: Architektur des benutzten Netzwerkes**

Auf das Eingabebild (3 Aktivitätskarten, errechnet nach dem Abschalten des Lasers) werden nacheinander zwei Faltungsschichten (hellgrün) angewandt. Die Max Pooling Schicht (hellviolett) sorgt für ein Downsampling und Fully Connected (orange) und Softmax (dunkelviolett) Schicht generieren die Vorhersage für die Klassenzugehörigkeit.

#### 6.4.6.3 Flaches Netz für Aktivitätskarten

Da das soeben beschriebene vortrainierte Netz eventuell nicht für Analyse von Specklebewegung wurde noch ein weiteres sehr flache und wesentlich und wesentlich simplere Netz trainiert. Es hat, wie in Abbildung 6.15 zu sehen ist, nur zwei Faltungsschichten. Die zwei Filter der ersten

Schicht haben eine Größe von  $3 \times 3 \times 3$  und es wird mit 'same' Padding und einem Stride von 1 gefaltet (die Größe des Eingangsbildes bleibt dadurch erhalten). Nach der Faltung wird zunächst in der BatchNorm Schicht normiert, was die Lerngeschwindigkeit verbessern soll, da die Schwankungen der Aktivierungen von Iteration zu Iteration so limitiert werden. Nach der Normierung folgt die Aktivierung und danach eine MaxPooling Schicht, welche die Dimension der Aktivierungen halbiert. In der zweiten Faltungsschicht werden 4 Filter mit einer Größe von  $3 \times 3 \times 2$  verwendet. Nach erneuter Normierung und Aktivierung folgt noch eine Dropout Schicht, zur Verringerung von Overfitting, vor der Fully Connected und Softmax Schicht. Die Softmax Schicht stellt eine Normierung dar. Die Ausgabe dieser Schicht beinhaltet positive Werte, die sich zu eins summieren. Die Aufteilung der Daten zum Training und zur Validierung erfolgt wie zuvor zufällig im Verhältnis 70 zu 30.

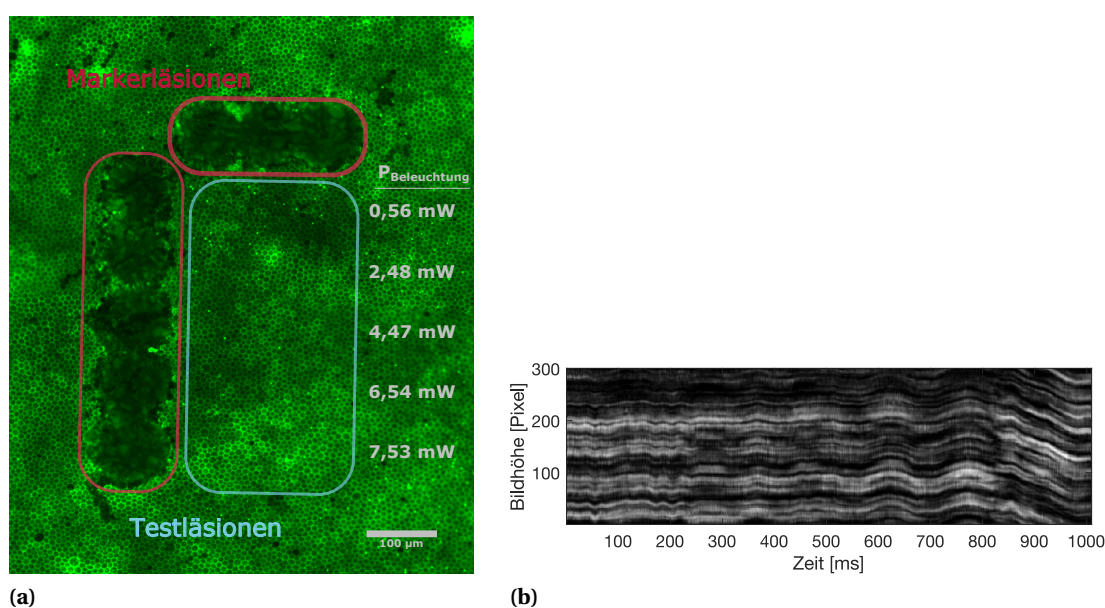
Die Deep Learning Toolbox von Matlab wurde genutzt, um alle Netze zu implementiert sowie deren Training darzustellen und mittels Gram-CAM zu analysieren.

## 6.5 Ergebnisse

### 6.5.1 Ex-vivo Messreihen an Schweineaugen

#### 6.5.1.1 Einfluss des BeleuchtungsLasers auf die Zellvitalität

Für eine Bildrate von 1000 Hz und der damit einhergehenden Integrationszeit der Kamera von  $995 \mu\text{s}$  wurden in den folgenden Versuchen maximale Leistungen des BeleuchtungsLasers von 7,5 mW (855 nm) und 5 mW (633 nm) verwendet. Die Leistung wurde für jede Bestrahlungsreihe individuell angepasst, um eine ausreichende Intensität des Specklemusters am Detektor zu garantieren. Der BeleuchtungsLasers allein, ohne zusätzliche Koagulation, zeigt in je drei Augen keine Schädigung des RPE in den Fluoreszenzbildern. Ein Beispiel ist in Abbildung 6.16a gezeigt. Es wurden je 3 Läsionen in einer Reihe bei 5 verschiedenen Leistungen zwischen einem Muster aus gut sichtbaren Marker-Läsionen appliziert, wobei jede Stelle 1 min lang bestrahlt wurde. Alle Zellmembranen zwischen den deutlich sichtbaren Markerläsionen sind intakt und es erscheinen nur vereinzelt RPE-Zellen schwarz. Auch in den Specklebewegungen, dargestellt als Zeitverlaufs-Specklemuster der unverarbeiteten Rohdaten in Abbildung 6.16b, sind nur globale Bewegungen sichtbar, die sich als Wellen darstellen. Es sind keine zusätzlichen Änderungen zu sehen, die auf einen deutlichen Temperaturanstieg oder Koagulation hindeuten. Die starke, gerichtete Bewegung am Ende der Bestrahlung ist auf die Bewegung der Spaltlampe zurückzuführen, um eine neue Position für die nächste Läsion zu erreichen.



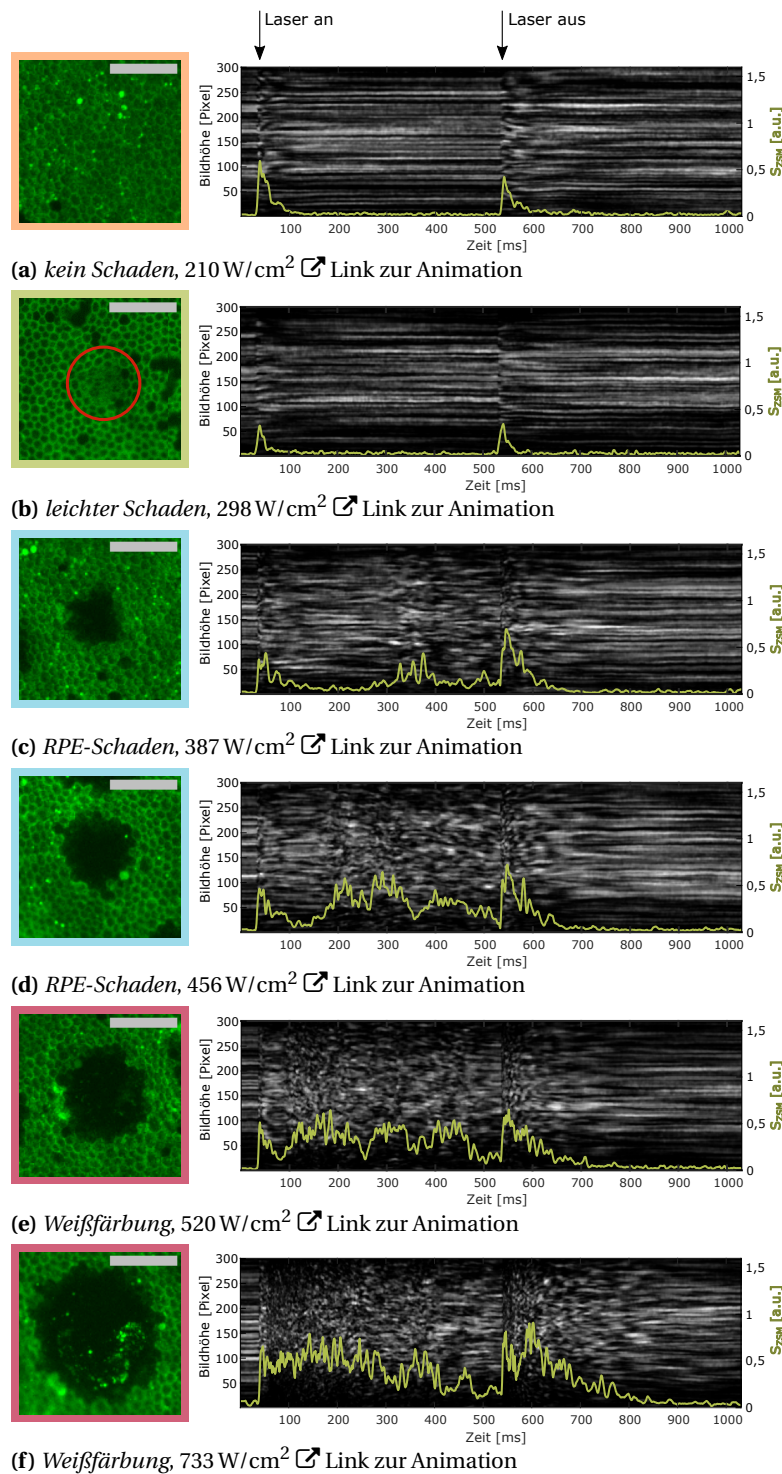
**Abbildung 6.16: Der BeleuchtungsLasers hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität und die Bewegung der Speckle**

- (a) Es sind keine Zellschädigungen innerhalb des Rasters aus Markerläsionen sichtbar, die durch die alleinige Bestrahlung durch den BeleuchtungsLasers mit ansteigender Leistung verursacht wurden.  
 (b) Specklebewegung, dargestellt im Zeitverlaufs-Specklemuster der Rohdaten.  
 (Beleuchtungswellenlänge: 855 nm)

#### 6.5.1.2 Analyse temperaturbedingter Specklebewegungen

Abbildung 6.17 zeigt an Beispielen die Auswirkungen der zunehmenden RPE-Schäden auf die Specklebewegung. Links in den Fluoreszenzbildern der Beispielläsionen ist die Zunahme der Größe des geschädigten Areals zu sehen. Rechts daneben sind die Zeitverlaufs-Specklemuster dargestellt. Die gelben Kurven in Abbildung 6.17 verdeutlichen den Zeitverlauf der Specklebewegung ( $S_{ZSM}$ ), der aus

den Zeitverlaufs-Specklemuster errechnet wurde (Anzahl der Zeilen/Spalten:  $n = 40$  Zeilen, Offset  $o = 9$ , Nachbarschaft  $l = 1$ , siehe Kapitel 6.4.3.1).



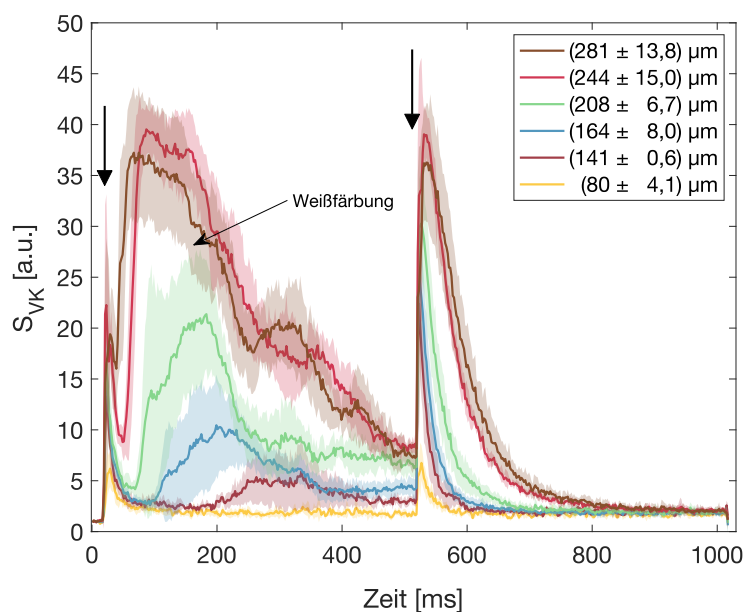
**Abbildung 6.17: Beispiel für temperaturbedingte Specklebewegung**

Zeitverlaufs-Specklemuster bei verschiedenen Ausmaß an Gewebeschäden. Links sind die fluoreszenzmikroskopischen Bilder mit steigender Anzahl an geschädigten RPE-Zellen zu sehen (der Maßstabsbalken entspricht  $100 \mu\text{m}$ ). Daneben jeweils das Zeitverlaufs-Specklemuster mit überlagertem Verlauf der Änderung der Specklebewegung ( $S_{ZSM}$ ) gezeigt.

Bestrahlungsparameter: Beleuchtungswellenlänge:  $855 \text{ nm}$ , Bestrahlungszeit:  $500 \text{ ms}$ , Fleckdurchmesser:  $50, 100 \mu\text{m}$ , Blende:  $10, 12 \text{ mm}$   
 Algorithmus: ZSM, Anzahl der Spalten/Zeilen  $n = 40$ , Offset  $o = 9$ , Nachbarschaft  $l = 1$

Die Änderungen der Speckle sind entsprechend der größten Temperaturänderung auch beim Ein- und Ausschalten maximal. Solange kein ausreichend sichtbarer Schaden im Gewebe entsteht, bleibt nach dieser initialen Bewegung das Specklemuster jedoch weitestgehend statisch, wie im oberen Zeitverlaufs-Specklemuster (nach der Bewegungskorrektur) in Abbildung 6.17a zu sehen ist. Die Kurve der Specklebewegung ( $S_{ZSM}$ ) kehrt während und nach der Bestrahlung wieder nahe des Ausgangspunkts zurück. Dies bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass es sich hierbei um einen reversiblen Effekt handelt, lediglich, dass keine Bewegung mehr vorliegt, da die gelbe Kurve die Korrelation einer Spalte im Zeitverlaufs-Specklemuster zu einer Benachbarten zeigt. In einigen Fällen konnten Regionen im Fluoreszenzbild identifiziert werden, wo die Laserbestrahlung noch nicht den typischen RPE-Schaden in Form von gänzlich schwarzen und nicht mehr sichtbaren Zellen hervorgerufen hat, sondern lediglich die deutlich grüne Umrandung der Zellen verschwindet und der bestrahlte Bereich gesamtheitlich grün, jedoch schwächer gefärbt ist (rot umrandet in Abb. 6.17b). Spots mit diesem Effekt, gehören zu der Kategorie *leichter Schaden* (⊙) und haben einen Verlauf der Specklebewegung, der dem der Kategorie *kein Schaden* (○) ähnelt.

Sobald RPE-Zellen im Fluoreszenzbild komplett verschwinden (Abb. 6.17c), ändert sich auch die aufgezeichnete Specklebewegung. Nach der initialen Bewegung folgt eine zweite Specklebewegung, die mit steigender Anzahl an geschädigten Zellen immer zeitiger eintritt, wie auch in Abbildung 6.18 deutlich wird. Es ist sowohl ein deutlicher Anstieg der zweiten Specklebewegung bei steigendem Durchmesser des geschädigten RPE-Areals zu sehen als auch das immer schmäler werdende lokale Minimum zwischen dem ersten und zweiten Peak. Der Durchmesser des geschädigten Areals wurde anhand des Fluoreszenzbildes exemplarisch für eine Bestrahlungsreihe mit bis auf die Leistung konstanten Parametern bestimmt. Die Kurven in Abbildung 6.18 zeigen weiterhin, dass die Specklebewegung in Abhängigkeit vom Ausmaß des Schadens unterschiedlich schnell während der Abkühlphase zurück auf null absinkt.



**Abbildung 6.18: Specklebewegung während der Bestrahlung bei verschiedenen Durchmessern des geschädigten RPE-Areals**

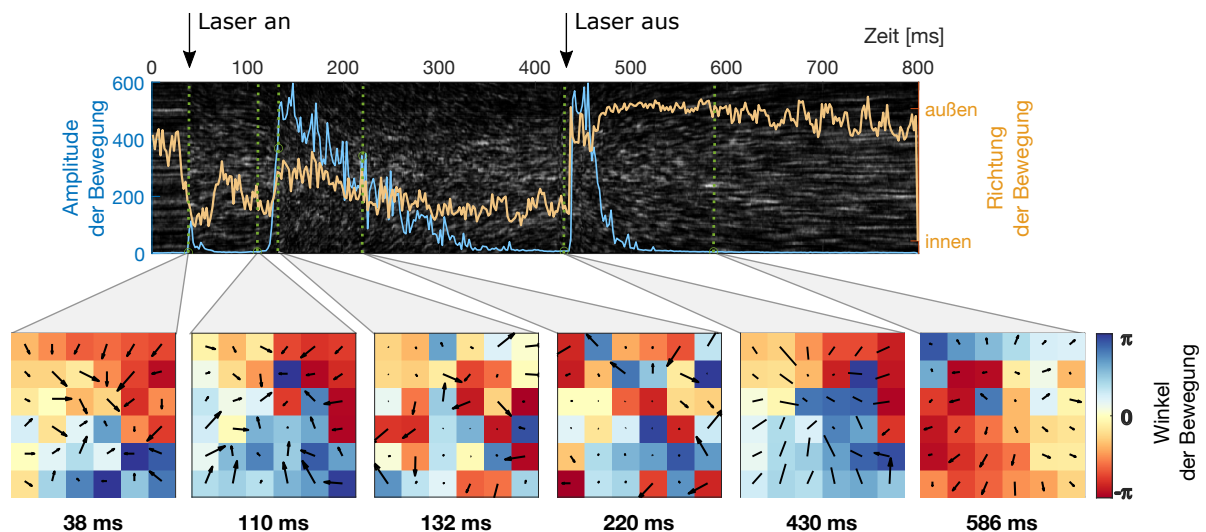
Die durchgezogenen Linien sind Mittelwerte mehrerer Läsionen (jeweils 3 – 6, insgesamt sind es 60 Läsionen aus einem Auge) mit ähnlichen Schadensausmaß, die umgebenden gleichfarbigen Flächen verdeutlichen die Standardabweichung. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte des Ein- und Ausschaltens des Lasers.

Bestrahlungsparameter: Beleuchtungswellenlänge: 855 nm, Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 100 µm, Blende: 12 mm  
Algorithmus: VK, Größe der Sub-Bilder  $n = 10$ , Offset  $o = 2$ .

Ab einer gewissen Schädigung verschwindet das lokale Minimum zwischen dem ersten und zweiten

Peak und es gibt eine stetige Änderung der Speckle während der Bestrahlung direkt nach der initialen Bewegung, wie im letzten Beispiel in Abbildung 6.17f deutlich wird. Bei sehr starken Läsionen ist zu Beginn und Ende der Bestrahlung ein Rückgang der gesamten Intensität des Bildes zu beobachten, was an der sehr schnellen Bewegung und Fluktuationen der Speckle bei starker Temperaturänderung liegt. Dies führt bei der Aufnahmegeschwindigkeit von 1 kHz dazu, dass die Speckle so stark verschmieren, dass sie nahezu verschwinden, was ebenso an der starken Änderung des Specklekontrastes zu erkennen ist. Diese Beobachtung wird im kommenden Kapitel 6.5.1.6.3 mit Abbildung 6.35 beim Vergleich der Beleuchtungswellenlängen noch genauer dargestellt.

Die zweite Specklebewegung, die während der Bestrahlung einsetzt, wenn RPE-Schäden entstehen, unterscheidet sich deutlich von der Bewegung beim Ein- und Ausschalten des Lasers. Während die initiale Bewegung ins Zentrum gerichtet ist, was die Vektorkarte kurz nach Einschalten des Heizlasers bei 38 ms in Abbildung 6.19 zeigt, ist die zweite Bewegung nicht gerichtet, sondern ungeordnet und kann eher als *boiling* Speckle aufgefasst werden. Die Vektorkarten bei 132 und 220 ms, also zu Beginn und während der andauernden zweiten Phase der Specklebewegung zeigen eine chaotische Bewegung. In der Abkühlphase ist sie wieder gerichtet, ihre Richtung wechselt und zeigt nun nach außen. Die Richtung der Bewegung spiegelt hier höchst wahrscheinlich nicht direkt die tatsächliche laterale Gewebewegung aufgrund der Expansion oder Kontraktion des Gewebes wider, sondern ist, wie zuvor beschrieben, ein durch den Defokus verursachter Artefakt einer Bewegung aus der Objektebene heraus. Das heißt alleine die Änderung der Richtung kann interpretiert werden, nicht allerdings die Richtung selber, da sie davon abhängt, ob der Fokus vor oder hinter der Probe liegt.



**Abbildung 6.19: Die unterschiedliche Natur der Specklebewegung in den verschiedenen Phasen der Bestrahlung**

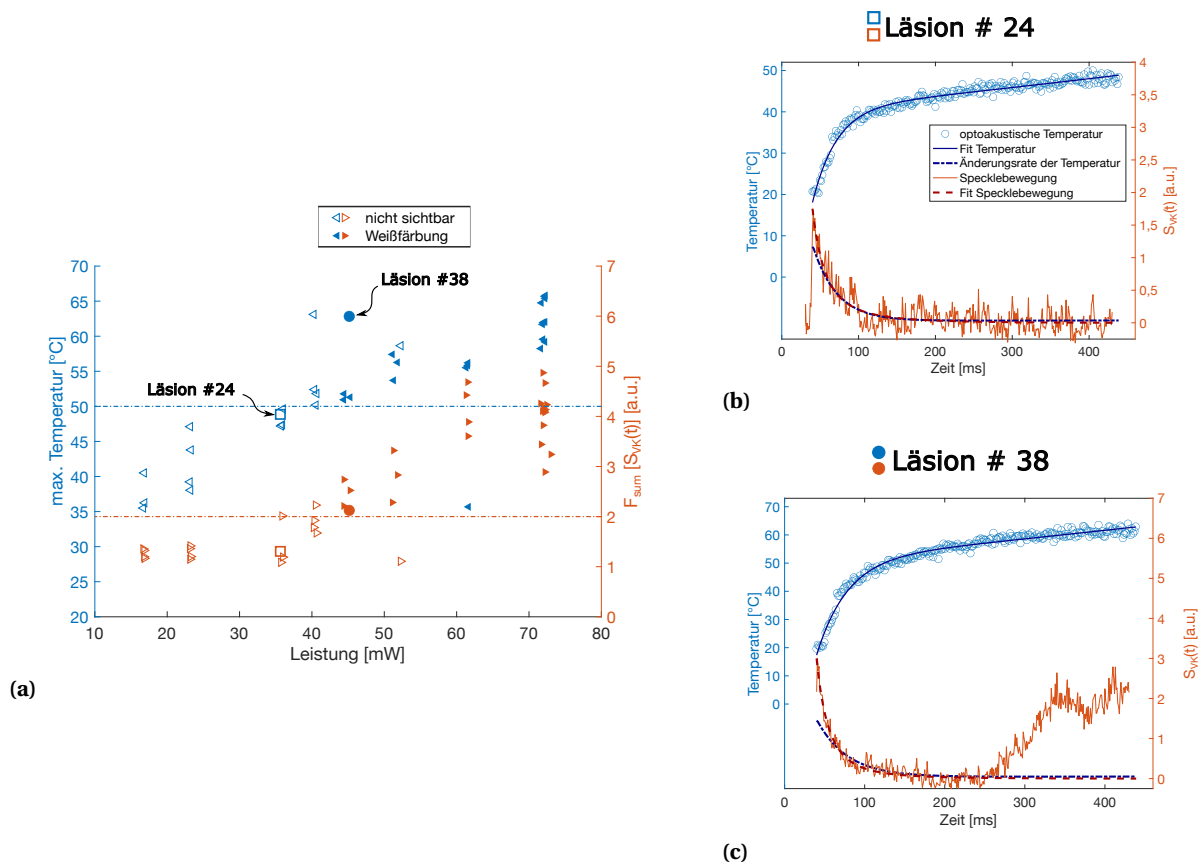
Dem Zeitverlaufs-Specklemuster einer Beispielbestrahlung ist die Summe der Specklebewegungen der Sub-Bilder  $S_{VK}$  in Blau, sowie die gesamtheitliche Richtung der Bewegung (nach innen oder außen) in rot überlagert. Zu sechs Zeitpunkten sind darunter die Vektorkarten der jeweiligen Specklebewegung dargestellt, sowie der ortsabhängige Winkel farbcodiert. Die Vektoren sind in jedem Bild skaliert und entsprechen nicht dem tatsächlichen Betrag der Bewegung der Speckle. [Link zur Animation](#)

Bestrahlungsparameter: Beleuchtungswellenlänge: 633 nm, Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 200  $\mu\text{m}$ , Blende: 12 mm  
Algorithmus: VK, Größe der Sub-Bilder  $n = 50$ , Offset  $o = 2$ .

### 6.5.1.3 Korrelation von Specklebewegung und Temperatur

Eine parallele optoakustische Messung der Temperatur ermöglicht den direkten Vergleich der Specklebewegung mit der erzielten Temperatur. Der Plot in Abbildung 6.20a zeigt zunächst exemplarisch die Maximaltemperatur und die Summe der Specklebewegung während der Bestrahlung

( $F_{\text{sum}}[S_{\text{VK}}(t)]$ ) des VK-Algorithmus nach Gl. 6.14) als Funktion der applizierten Leistung von 41 Läsionen in einem Auge. Bei hohen Temperaturen und Läsionen mit Weißfärbung korreliert eine höhere Endtemperatur gut mit einer höheren gesamten Specklebewegung. Nur bei sehr niedrigen Endtemperaturen scheint die Änderung der Speckle eher konstant zu sein und nicht den steigenden Endtemperaturen zu folgen. Der zeitliche Verlauf der optoakustisch gemessenen Temperatur zusammen mit der Speckleänderung ist für zwei Läsionen rechts in Abbildung 6.20b und c aufgetragen. Der exponentielle Fit der Temperaturdaten ist in Dunkelblau dargestellt. Der numerische Gradient bzw. die Ableitung des Temperaturfits nach der Zeit gibt die Änderungsrate der Temperatur an und ist in Dunkelblau, gestrichelt dargestellt. Wie zuvor beschrieben (Gl. 4.66) korreliert eine Temperaturänderung mit einer Verschiebung des Gewebes, welche wiederum proportional zur Specklebewegung sein sollte.



**Abbildung 6.20: Korrelation von Specklebewegung und Temperatur**

(a) Maximale Temperatur und Summe der Specklebewegung  $F_{\text{sum}}[S_{\text{VK}}(t)]$  für jede Bestrahlung über die Leistung aufgetragen.

(b) Zeitliche Änderung der Temperatur und Specklebewegung  $S_{\text{VK}}$  am Beispiel von Läsion #24 der Bestrahlungsreihe.

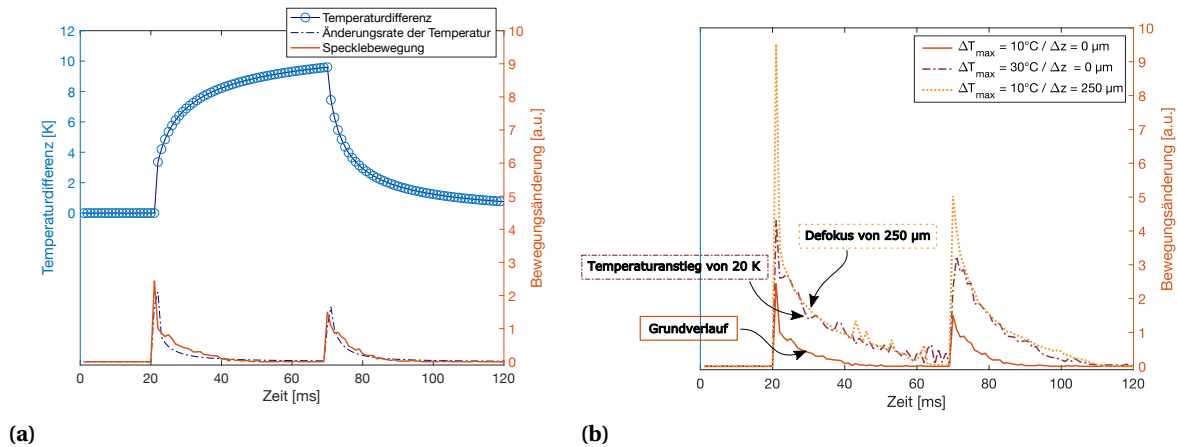
(c) Zeitliche Änderung der Temperatur und Specklebewegung  $S_{\text{VK}}$  am Beispiel von Läsion #38 der Bestrahlungsreihe.

Bestrahlungsparameter: Beleuchtungswellenlänge: 633 nm, Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 200  $\mu\text{m}$ , Blende: 12 mm  
Algorithmus: VK, Größe der Sub-Bilder  $n = 10$ , Offset  $o = 2$ .

Für Spots mit reiner thermoelastischer Expansion korreliert diese Änderungsrate der Temperatur gut mit der Änderung der Offset korrigierten Specklebewegung ( $S_{\text{VK}}$ ) nach dem initialen Anstieg. Es scheint möglich, die Temperatur aus dem Fit der Specklebewegung zu approximieren. Für Beispielläsion #24 (Abb. 6.20b) funktioniert dies auf 0,2 °C genau, ähnlich auch bei weiteren Läsionen der Bestrahlungsreihe. Allerdings hängt vor allem die Amplitude der Specklebewegung nicht ausschließlich von der Temperatur ab, sondern auch vom Defokus. Da dieser in den hier vorgestellten Bestrahlungsreihen nicht vermeidbar und auch nicht quantifizierbar ist, ist eine Bestimmung der Temperatur mit reproduzierbar nicht möglich. Abbildung 6.20a und auch Abbildung 6.18 zeigen

allerdings deutlich, dass sobald Koagulation eintritt, der Durchmesser des Schadensareals und damit auch die Temperatur mit dem Ausmaß der zweiten Specklebewegung, welche deutlich weniger stark vom Defokus beeinflusst zu sein scheint, korreliert.

Es sei noch anzumerken, dass bei dem Experiment, dessen Ergebnisse in Abbildung 6.20 dargestellt sind, keine Fluoreszenzbilder vorliegen, daher ist es möglich, dass bei Läsion, die mit einer Leistung von 40 mW appliziert wurden, tatsächlich schon Koagulationsprozesse eingesetzt haben, was den etwas höheren *F*-Score erklärt, obwohl sie als *nicht sichtbar* klassifiziert sind.



**Abbildung 6.21: Korrelation von Specklebewegung und Temperatur anhand simulierter Daten**

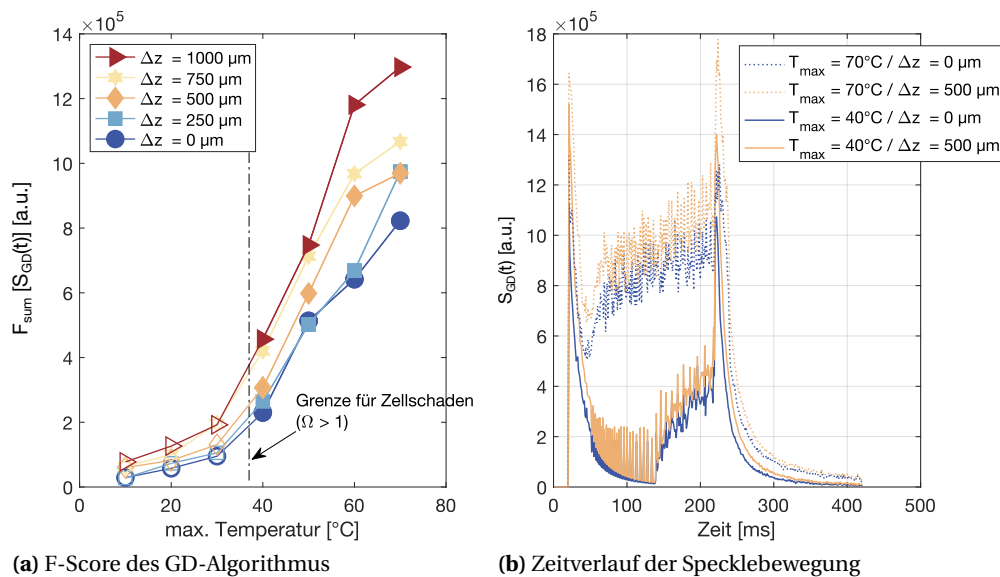
(a) Der Temperaturverlauf (blau, durchgezogen) und die Änderungsrate der Temperatur (dunkelblau, gestrichelt) ist zusammen mit der aus der Temperaturerhöhung resultierenden Specklebewegung (rot) gezeigt.

(b) Derselbe Verlauf der Specklebewegung ist erneut über die Zeit geplottet (Grundverlauf). Darüber hinaus ist der nahezu gleiche Verlauf der Specklebewegung gezeigt, der bei einem Defokus von 250  $\mu\text{m}$  bzw. einer Temperaturerhöhung von 20 K zu erwarten ist.

#### 6.5.1.4 Defokus und axiale Bewegung

Der Einfluss des Defokus auf die unterschiedlichen Phasen der Specklebewegung wurde weiter anhand von Simulationen untersucht. Abbildung 6.21a zeigt anhand simulierter Daten einen prinzipiell ähnlichen Verlauf der Änderungsrate der Temperatur und Specklebewegung. Das heißt für reine thermoelastische Expansion korreliert die Specklebewegung mit dem Temperaturverlauf. Abbildung 6.21b zeigt allerdings, dass ein Defokus von 250  $\mu\text{m}$  den zeitlichen Verlauf der Specklebewegung fast genauso verändert wie eine Temperaturzunahme von 20 K. Daher ist es ohne Kenntnis des Defokus nicht möglich die Temperatur aus der Specklebewegung zu errechnen.

Die Ergebnisse des letzten Kapitels deuten allerdings darauf hin, dass sobald Koagulation eintritt, das Ausmaß des Schadens gut mit Specklebewegung korreliert und der Einfluss des Defokus auf die zweite koagulationsbedingte Bewegung geringer ist. Der GD-Algorithmus scheint, zumindest bei simulierten Speckledaten, am stabilsten gegen einen Defokus zu sein. Abbildung 6.22a zeigt den *F*-Score (GD) gegen die maximale Temperatur bei simulierten Daten mit einer Bestrahlungszeit von 200 ms. In diesem Beispiel würde eine Trennung von *kein Schaden* und *Schaden* anhand des *F*-Scores bis auf einzelne falsch Klassifizierte trotz eines Defokus bis zu einem Millimeter gut funktionieren. Als Klassifizierung des Schadens liegt der Durchmesser zugrunde, bei dem  $\Omega = 1$  ist. Daneben sind in Abbildung 6.22b für zwei überschwellige Maximaltemperaturen die Simulationen der Zeitverläufe mit und ohne Defokus gezeigt. Während der initiale Peak deutlich vom Defokus abhängt; 40 °C mit Defokus (orange, durchgezogene Kurve) hat fast den gleichen Verlauf wie 70 °C ohne Defokus (blaue, gepunktete Kurve), ist der zweite Anstieg doch deutlich stärker vom Temperaturunterschied als vom Defokus abhängig. Der Zeitpunkt des lokalen Minimums ist unabhängig vom Defokus und auch der



**Abbildung 6.22: Einfluss des Defokus auf den GD-Algorithmus bei simulierten Daten**

(a) F-Score als Funktion der maximalen Temperatur für verschiedene Fokusfehler  $\Delta z$  (b) Beispielhafte Zeitverläufe der Specklebewegung (GD-Algorithmus) bei  $40^{\circ}\text{C}$  und  $70^{\circ}\text{C}$ , jeweils mit und ohne Fokusfehler von  $500 \mu\text{m}$ .

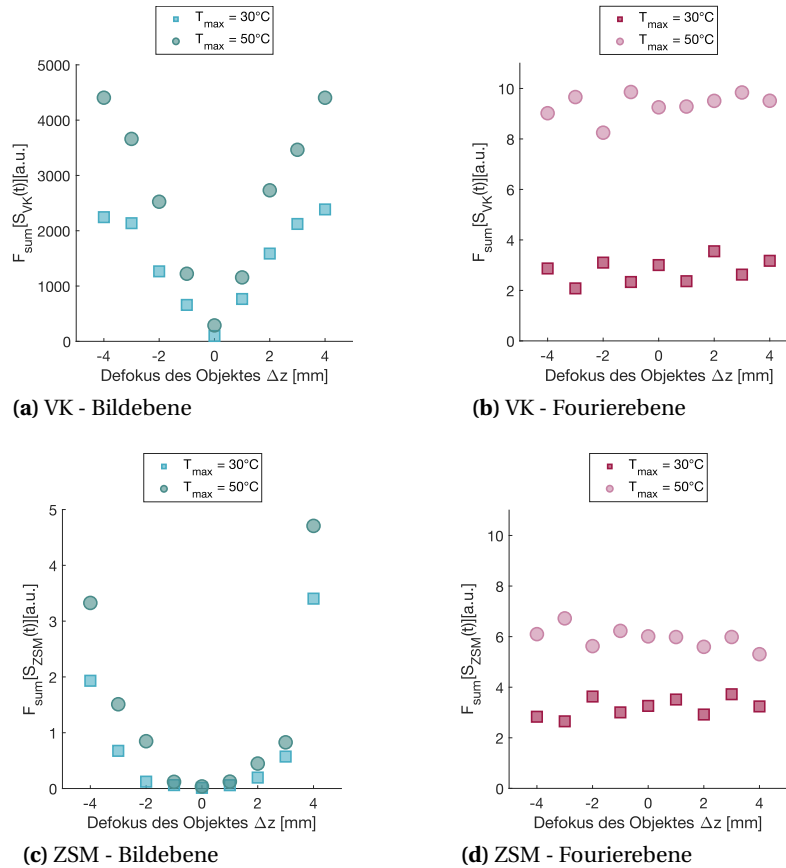
erneute Anstieg der Kurven ist für die jeweiligen Temperaturen sehr ähnlich.

Wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, kann das Specklemuster anstatt in der Bildebene des abbildenden Systems auch in der Fourierebene detektiert werden, wodurch sich der Einfluss axialer Bewegungen und eines Defokus womöglich reduzieren lassen. In Abbildung 6.23 sind die Änderungen der VK und ZSM F-Scores ( $F_{\text{sum}}$ ) für simulierte Specklebewegung bei zwei verschiedenen Maximaltemperaturen in Abhängigkeit des Defokus des Objektes für die Bild- und Fourierebene gezeigt. Wie zu erwarten, ist keine Abhängigkeit in der Fourierebene zu erkennen, allerdings ist der F-score, d.h die Summe der Specklebewegung zumindest beim VK Algorithmus deutlich kleiner.

Die Ergebnisse der Simulation wurden durch Messungen an einem Phantom mit dem Aufbau aus Abbildung 6.4, der die präzise Defokussierung ermöglicht, überprüft. Das bestrahlte Objekt wurde mittels Feingewindeschraube verschoben und an jeder Position je dreimal für 500 ms bestrahlt. Die F-Scores  $F_{\text{sum}}[S_{\text{VK}}(t)]$  aller drei Bestrahlungen sind in Abbildung 6.24a in Abhängigkeit von dem Defokus des Objektes dargestellt. Beispiele des Zeitverlaufs machen zusätzlich deutlich, dass in der Fourierebene die Zeitverläufe unabhängig vom Defokus einen ähnlichen Verlauf haben, im Unterschied zur Bildebene, wo sich die Zeitverläufe deutlich unterscheiden. Bei diesem Experiment war erneut deutlich zu beobachten, dass sich die Richtung der Specklebewegung (nach innen oder außen) mit dem Vorzeichen des Defokus in der Bildebene ändert. In der Fourierebene, ist die Richtung konstant.

### 6.5.1.5 Optimierung der Algorithmen und deren Parameter

Der erzeugte Schaden scheint in den bisher gezeigten Beispielen recht gut mit der allgemein beobachteten Specklebewegung und beispielhaften Summen der Bewegung zu korrelieren. Um herauszufinden, ob sich diese Beobachtungen verallgemeinern lassen und welcher der drei in Abschnitt 6.4 vorgestellten Algorithmen mit welchen dazugehörigen Parametern am besten geeignet ist, um optimal den erzielten Schaden anhand der Specklebewegung vorherzusagen, folgt in diesem Abschnitt eine Parametersuche.



**Abbildung 6.23: Einfluss der Detektionsebene auf den Defokus-Effekt anhand simulierter Daten**

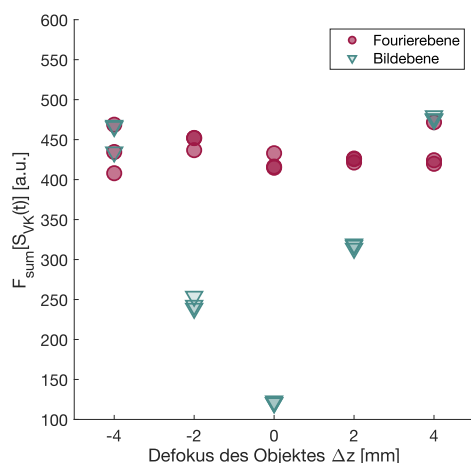
Es wurde für je zwei maximale Temperaturen ( $30^\circ\text{C}$  - Quadrate und  $50^\circ\text{C}$  - Kreise) die Specklebewegung in Abhängigkeit des Defokus  $\Delta z$  in den beiden Detektionsebenen simuliert. Die Bewegung ist einmal als F-Score des VK Algorithmus ( $F_{\text{sum}}[S_{\text{VK}}(t)]$ ) dargestellt (a) in der Bildebene und (b) in der Fourierebene. Zum Vergleich sind dieselben Specklebewegungen noch einmal als F-Score des ZSM-Algorithmus ( $F_{\text{sum}}[S_{\text{ZSM}}(t)]$ ) gezeigt, ebenfalls (c) in der Bildebene und (d) in der Fourierebene.

Dafür wird der größte Datensatz mit einheitlichen Bestrahlungsparametern herangezogen. Es handelt sich um 451 auswertbare Spots aus 11 Augen, die mit einer Fleckgröße von  $100\ \mu\text{m}$  und 500 ms Bestrahlungsdauer appliziert wurden und mit einer Blende von 12 mm und 1000 fps die Speckle aufgezeichnet wurden. Die Wellenlänge des Beleuchtungslasers betrug 855 nm.

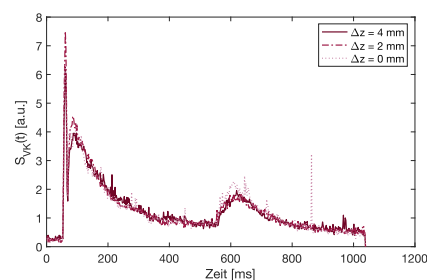
Wie in Abschnitt 6.4.5 beschrieben, wurden auf diesen Datensatz alle Parameterkombinationen für jeden der drei Algorithmen mittels der Brute-Force-Methode angewandt. Mithilfe der ROC-Analyse wird für jede Parameterkombination der AUC berechnet, welcher als Maß für die Performanz zur Trennung der verschiedenen Schadensklassen und somit zum Vergleich der Parametersätze herangezogen wird. Um den Einfluss der verschiedenen Parameter zu veranschaulichen, wurden für jeden Algorithmus die 100 Parameterkombinationen mit der besten AUC ausgewählt und analysiert, wie oft jeder einzelne Parameter in den 100 besten Kombinationen auftrat. Diese Häufigkeiten sind als Balkendiagramm, beispielsweise in Abbildung 6.25, dargestellt.

#### 6.5.1.5.1 Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster (ZSM-Algorithmus)

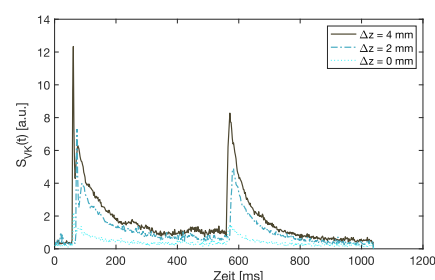
Dieser Algorithmus beschreibt die Speckleänderung durch die Änderung der Korrelation in bestimmten Bildbereichen (siehe Kapitel 6.4.3.1). Er erzeugt zuerst aus der Summe einer bestimmten Anzahl an Zeilen bzw. Spalten das Zeitverlaufs-Specklemuster. Aus diesem wird der Korrelationskoeffizient zwischen zeitlich aufeinander folgenden Zeilen oder Spalten bestimmt, bevor die Merkmale aus dem



(a) Vergleich der F-Scores in Fourier- und Bildebene



(b) Zeitverläufe in der Fourierebene



(c) Zeitverläufe in der Bildebene

**Abbildung 6.24: Einfluss des Defokus auf die Verschiebung der Speckle in der Fourier- und Bildebene**

(a) F-Score mittels VK Algorithmus ( $F_{\text{sum}}[S_{\text{VK}}(t)]$ ) berechnet und über den Defokus  $\Delta z$  geplottet, jeweils bei Beobachtung der Specklebewegung in der Fourierebene (rot) und der Bildebene (blau). Es sind für jede Position drei Wiederholungsmessungen dargestellt.

(b) Beispielhafte Zeitverläufe ( $S_{\text{VK}}(t)$ ) in der Fourierebene. Alle Zeitverläufe sind trotz verschiedenem Defokus nahezu identisch.

(c) Beispielhafte Zeitverläufe ( $S_{\text{VK}}(t)$ ) in der Bildebene. Der Defokus wirkt sich stark auf die Specklebewegung aus.

Zeitverlauf extrahiert werden.

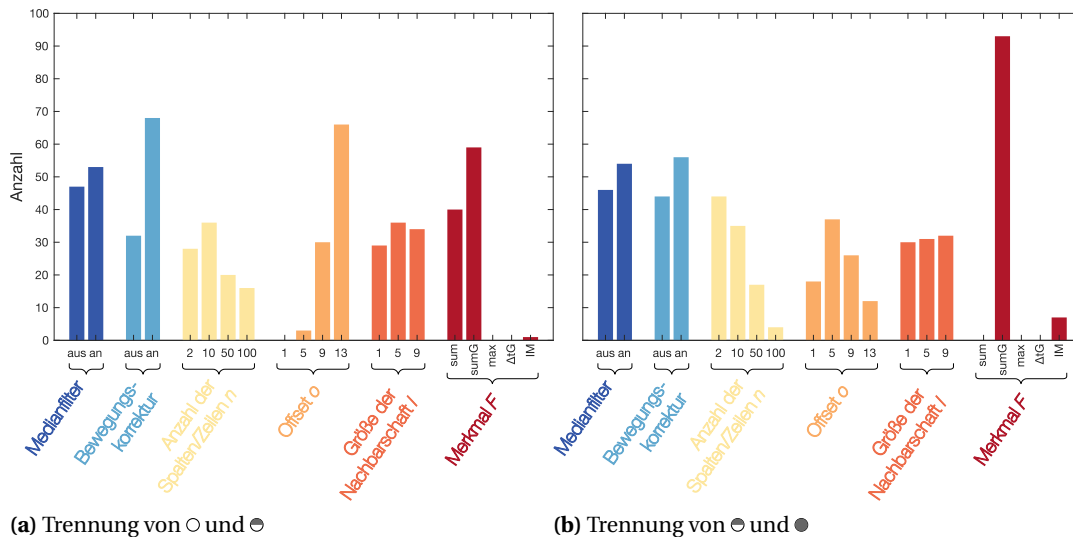
Für diesen, wie für die beiden folgenden Algorithmen wurden verschiedene Vorprozessierungen (Medianfilter und Bewegungskorrektur der Signale) getestet. Um aus der Specklesequenz das Zeitverlaufs-Specklemuster zu bilden, werden Ausschnitte verschiedener Breite gewählt und um den Zeitverlauf zu extrahieren, werden verschieden große Nachbarschaften in Betracht gezogen. Zum Schluss wurden verschiedene Optionen in Abschnitt 6.4 vorgestellt, um eine ein-dimensionale Größe aus dem Zeitverlauf zu ermitteln. Die getesteten Parameter für den ZSM-Algorithmus sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

**Tabelle 6.3:** Getestete Parameter des ZSM-Algorithmus

Phase	Parameter	Wertebereich
Vorprozessierung	Medianfilter	aus; an
	Bewegungskorrektur	aus; an
Zeitverlaufs-Specklemuster	Anzahl der Spalten/Zeilen $n$	2; 10; 50; 100
Zeitverlauf	Offset $o$	1; 5; 9; 13
	Größe der Nachbarschaft $l$	1; 5; 9
Merkmal		$F_{\text{sum}}$ ; $F_{\text{sum}G}$ ; $F_{\text{max}}$ ; $F_{\Delta tG}$ ; $F_{\text{IM}}$

Abbildung 6.25 zeigt die Häufigkeiten der Parameter in den 100 Parameterkombinationen mit den besten AUC. Im Allgemeinen scheint die Bewegungskorrektur unabhängig von anderen Parametern

sinnvoll zu sein, da bei etwa 96 % ( $G_{\odot\odot}$ ) bzw. 92 % ( $G_{\ominus\ominus}$ ) der besten 25 Parameterkombinationen die Bewegungskorrektur „an“ war (alle Parameter der besten 25 Kombinationen sind im Anhang in Tab. A1 ( $\odot\odot$ ) und Tab. A2 ( $\ominus\ominus$ ) zu finden). Der Medianfilter hat fast keinen Einfluss bei den besten Parameterkombinationen. Vermutlich, da bei diesem Algorithmus, der auf dem Zeitverlaufs-Specklemuster beruht, bei der Summierung innerhalb des Ausschnittes, um das Zeitverlaufs-Specklemuster zu erzeugen, schon eine Filterung vorgenommen wird. Recht unabhängig von der Vorprozessierung ist das **Inertia Moment**, vier verschiedene Kombinationen haben die beste Performanz zumindest um die Kategorien *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) und *Weißfärbung* ( $\bullet$ ) zu unterscheiden. Auch die beste Gesamtperformanz (maximale Summe aus  $AUC_{\odot\odot}$  und  $AUC_{\ominus\ominus}$ ) ergibt sich durch Wahl des **Inertia Moment** allerdings mit Vorprozessierung.



**Abbildung 6.25: Parametersuche für den ZSM-Algorithmus**

Für die 100 besten Parameterkombinationen (größte AUC) ist die Häufigkeit aller Parameter als Balkendiagramm dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen die Parameter dar und die einzelnen Balken der Farbe die Werte, die der jeweilige Parameter annehmen kann.

- (a) Zur Unterscheidung von *kein Schaden* ( $\odot$ ) und *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ).  
 (b) Zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) und *Weißfärbung* ( $\bullet$ ).

Die fünf roten Balken ganz rechts in Abbildung 6.25 stellen je eine Methode der Merkmalsextraktion aus dem Zeitverlauf dar, die **Summe (sum)** (Summation aller Speckleänderungen über die Zeit während der Bestrahlung), **Summe + Grenzwerte (sumG)** (es wird nicht die Summe aller Zeitschritte gebildet, sondern nur wenn ein definierter Grenzwert überschritten wird), das **Maximum (max)** in (der Maximalwert während der Bestrahlungsdauer) und die **Zeit unterhalb des Grenzwertes ( $\Delta tG$ )** (beschreibt die Zeit bis die Kurve des Zeitverlaufs erneut ansteigt). Hinzu kommt für den ZSM-Algorithmus das **Inertia Moment (IM)** (welches direkt aus dem Zeitverlaufs-Specklemuster die Aktivität bestimmt).

Wie zu erwarten, liefert die Auswertung des **Maximums** keine gute Performanz, da das reine Maximum des Zeitverlaufes stark von äußeren Faktoren, dem Defokus, aber auch von starken Intensitätsschwankungen oder globalen Bewegungen abhängt. Aber auch die **Zeit unterhalb des Grenzwertes**; ein Maß, dass eher den Verlauf der Specklebewegung als die Amplituden beschreibt, liefert nur bei einzelnen Parameterkombinationen bessere Ergebnisse. Beide Merkmale tauchen nicht in den besten 100 Parameterkombinationen auf. Die **Summe oberhalb des Grenzwertes** scheint insgesamt das Merkmal zu sein, dass die höchsten AUC erzielt. Für die Unterscheidung zwischen *kein Schaden* ( $\odot$ ) und *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) ist ein großer Offset sinnvoller, das heißt, es spielen die langsamen Bewegungen hier eine größere Rolle, während für die Unterscheidung zwischen *RPE-Schaden* ( $\ominus$ )

und *Weißfärbung* (●) kleinere Offsets vorteilhaft scheinen. Für die Größe der Nachbarschaft scheint es keinen eindeutigen Trend zu geben.

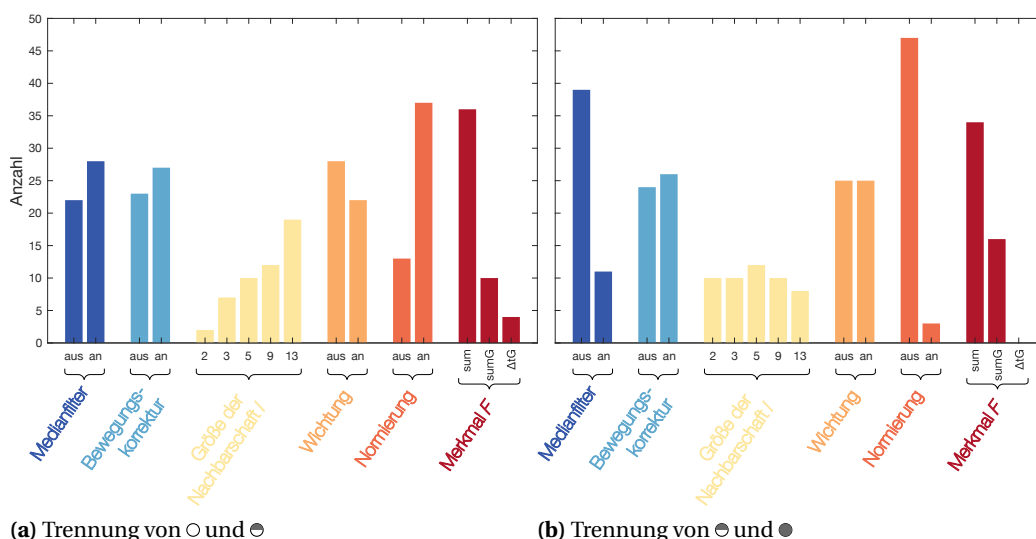
Generell scheinen weniger Spalten bzw. Zeilen zur Erzeugung des Zeitverlaufs-Specklemuster sinnvoll, das heißt der Bereich, in dem Bewegung detektiert wird, ist geringer.

### 6.5.1.5.2 Generalisierte Differenzen (GD-Algorithmus)

Der GD-Algorithmus beruht auf der Berechnung von Differenzbildern aufeinander folgender Frames, die in einer bestimmten zeitlichen Nachbarschaft summiert werden (siehe Kapitel 6.4.3.2). Im Gegensatz zu den anderen beiden Algorithmen ist er damit auch sensitiver für Intensitätsschwankungen der Speckle und detektiert nicht nur die Bewegung der Speckle. Alle anderen Parameterbereiche für den GD-Algorithmus sind in Tabelle 6.4 zu finden. Da das **Maximum** als Merkmal in der Parametersuche des ersten Algorithmus, wie erwartet, keine gute Performanz gezeigt hat, wird es für die folgenden beiden Algorithmen auch nicht mehr für die Parametersuche in Betracht gezogen.

**Tabelle 6.4:** Getestete Parameter des GD-Algorithmus

Phase	Parameter	Wertebereich
Vorprozessierung	Medianfilter	aus; an
	Bewegungskorrektur	aus; an
Zeitverlauf	Größe der Nachbarschaft $l$	2; 3; 5; 9; 13
	Wichtung	aus; an
	Normierung	aus; an
Merkmal		$F_{sum}$ ; $F_{sumG}$ ; $F_{\Delta tG}$



**Abbildung 6.26:** Parametersuche für den GD-Algorithmus

Für die 50 besten Parameterkombinationen (größte AUC) ist die Häufigkeit aller Parameter als Balkendiagramm dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen die Parameter dar und die einzelnen Balken der Farbe die Werte, die der jeweilige Parameter annehmen kann.

(a) Zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (⊙).

(b) Zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (⊙) und *Weißfärbung* (●).

Wie schon beim ZSM-Algorithmus scheint das Merkmal der **Zeit unterhalb des Grenzwertes** nur

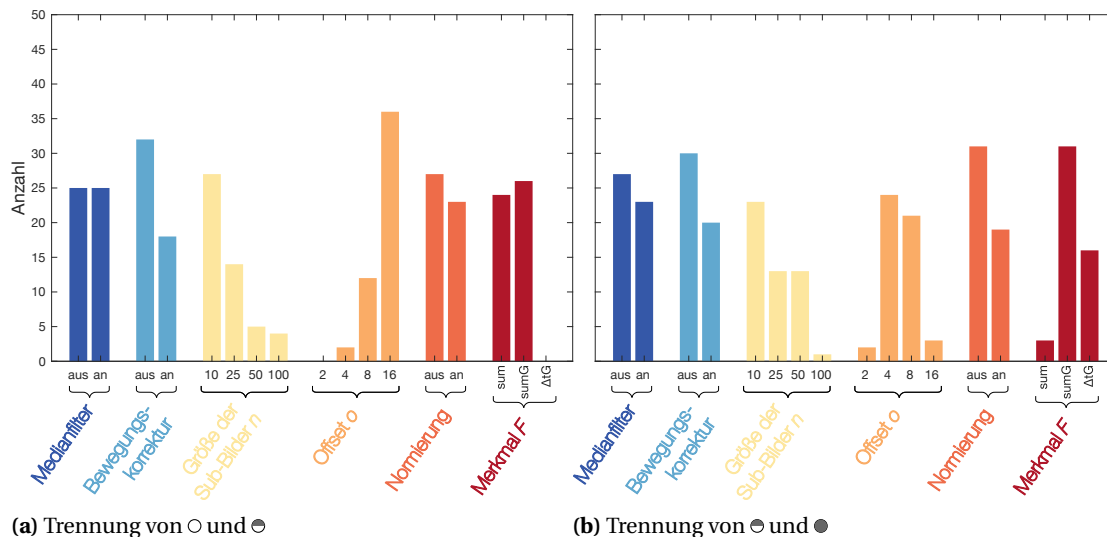
bei einzelnen Parameterkombinationen sinnvoll zu sein, allgemein ist die Performanz dieses Merkmals schlechter als die einfache **Summe** oder die **Summe + Grenzwert**. Es ist wiederum günstig für die Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (⊖) langsamere Bewegungen zu detektieren, also die Nachbarschaft größer zu wählen. Wie in Abbildung 6.26 darüber hinaus zu sehen ist, hat die Vorverarbeitung keinen nützlichen Effekt bei diesem Algorithmus. Aus Abbildung 6.26 und aus den Tabellen A3 und A4 im Anhang, in denen jeweils die besten 25 Kombinationen dargestellt sind, lässt sich entnehmen, dass die Wichtung keine Rolle zu spielen scheint und dass eine Normierung nur zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (⊖) nützlich scheint.

### 6.5.1.5.3 Vektorkarten (VK-Algorithmus)

Der VK-Algorithmus basiert auf der Bewegung in Sub-Bilder, die mittels Phasenkorrelation errechnet wurde (siehe Kapitel 6.4.3.3). Wie schon für vorangegangene Algorithmen sind auch hier die getesteten Parameterbereiche in Tabelle 6.5 zu finden.

**Tabelle 6.5:** Getestete Parameter des VK-Algorithmus

Phase	Parameter	Wertebereich
Vorprozessierung	Medianfilter	aus; an
	Bewegungskorrektur	aus; an
Zeitverlauf	Größe der Sub-Bilder $n$	10; 25; 50; 100
	Offset $o$	2; 4; 8; 16
	Normierung	aus; an
Merkmal		$F_{sum}$ ; $F_{sumG}$ ; $F_{\Delta tG}$



**Abbildung 6.27:** Parametersuche für den VK-Algorithmus

Für die 50 besten Parameterkombinationen (größte AUC) ist die Häufigkeit aller Parameter als Balkendiagramm dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen die Parameter dar und die einzelnen Balken der Farbe die Werte, die der jeweilige Parameter annehmen kann.

- (a) Zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (⊖).  
 (b) Zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (⊖) und *Weißfärbung* (●).

Die Performanz der Parameter zur jeweiligen Trennung der drei Schadenskategorien ist in Ab-

bildung 6.27 anhand der Häufigkeit jedes Parameters in den besten 50 Parameterkombinationen gezeigt. Die Vorprozessierung hat kaum einen Einfluss. Wie schon zuvor hat die Schrittweite einen entscheidenden Einfluss und sollte ebenfalls eher groß zur Unterscheidung der ersten beiden Schadensklassen sein. Im Allgemeinen zeigt Abbildung 6.27, dass kleine Sub-Bilder vorteilhafter zu sein scheinen.

#### 6.5.1.5.4 Vergleich der Algorithmen

Im Tabelle 6.6 sind die AUC für die jeweiligen Trainingsdaten dargestellt, sowie weitere Performanzmaße. Die in Klammern dargestellten Bereiche sind die Konfidenzintervalle. Es wurde jeweils die Parameterkombinationen mit dem größten AUC im Trainingsdatensatz genutzt.

**Tabelle 6.6:** Vergleich der Performanz der Algorithmen im Trainingsdatensatz. (Wertebereiche in Klammern geben die punktwoise Konfidenzintervalle an.)

Algorithmus	Unterscheidung	Training AUC [%]	Youden	Sens.	Spez.	bester Grenzwert
ZSM	○-○	96,6 [ 94,5 - 98,0 ]	0,85	0,85	1	0,1227
	○-●	96,6 [ 94,5 - 97,9 ]	0,79	0,86	0,93	$1,54 \cdot 10^5$
GD	○-○	91,9 [ 88,9 - 94,5 ]	0,82	0,83	1	1,2160
	○-●	93,9 [ 91,0 - 96,1 ]	0,79	0,86	0,93	$4,64 \cdot 10^6$
VK	○-○	96,5 [ 94,3 - 98,0 ]	0,88	0,88	1	10,6394
	○-●	94,4 [ 91,7 - 96,1 ]	0,74	0,84	0,90	322,7561
Bestrahlungsfluss	○-○	86,6 [ 82,4 - 90,0 ]	0,72	0,83	0,89	26,7 mW
	○-●	88,3 [ 84,7 - 91,6 ]	0,68	0,80	0,88	38,1 mW

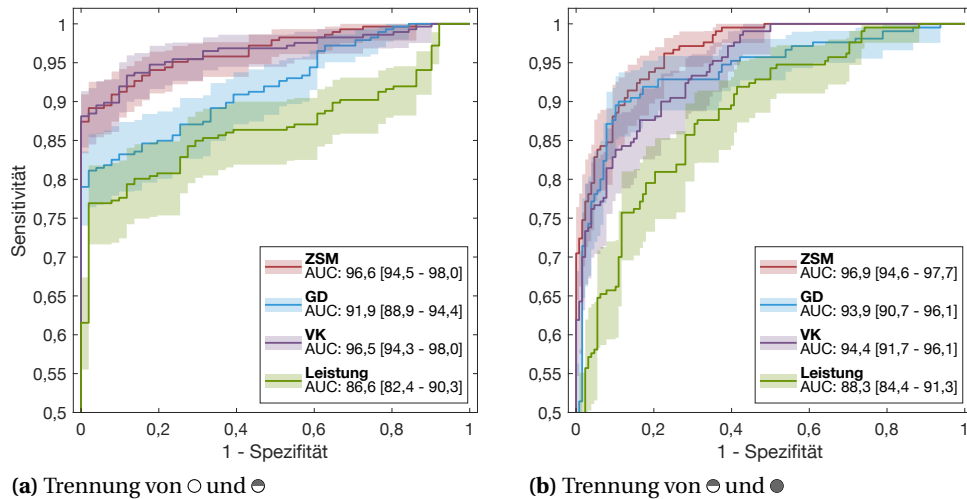
Tabelle 6.6 zeigt, dass alle Algorithmen eine bessere Performanz (höhere AUC) erzielen als Grenzwerte die auf der applizierten Leistung des Behandlungslasers jeder Läsion basieren, wenn es darum geht die Klassen anhand der beiden Grenzwerte zu trennen. Am deutlichsten ist der Unterschied zwischen dem ZSM-Algorithmus und der applizierten Energie als Klassifikator, hier gibt es für beide Grenzwerte keine Überschneidung der Konfidenzintervalle der ROC-Kurven, wie in Abbildung 6.28 zu sehen ist. Zur Verdeutlichung sind alle ROC Kurven des Trainingsdatensatzes in Abbildung 6.28 gezeigt.

Die errechneten AUC im Validierungsdatensatz sind für alle Algorithmen und Grenzwerte maximal 1,8 % kleiner als im Trainingsdatensatz, was für eine gute Generalisierbarkeit der Algorithmen über den Trainingsdatensatz hinaus spricht. Wären die AUC in Validierungsdatensatz deutlich kleiner, wäre dies ein Hinweis auf die Überanpassung der Algorithmen an den Trainingsdatensatz, was nicht der Fall ist.

Der ZSM-Algorithmus erzielt die höchsten AUC, auch wenn der Unterschied zwischen den einzelnen Algorithmen nicht signifikant ist. Für die folgenden Analysen werden die beiden besten ZSM-Algorithmen genutzt. Zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (○) wird die Vorprozessierung und die **Summe + Grenzwerte** zur Merkmalsgewinnung genutzt, während zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (○) und *Weißfärbung* (●) das **Inertia Moment** ohne Median Filter, allerdings mit Bewegungskorrektur am besten funktioniert. Die genauen Parameter sind jeweils in der ersten Zeile in Tabelle A1 und A2 zu finden.

#### 6.5.1.5.5 Analyse der falsch Kategorisierten

Bei den meisten Klassifizierungsproblemen gibt es eine Fehlerrate, die sich nicht weiter reduzieren lässt, da die Label anhand derer die Performanz der Algorithmen getestet wird, manuell von



**Abbildung 6.28: Vergleich der ROC Kurven des Trainingsdatensatzes**

Gezeigt sind die ROC Kurven aller Algorithmen mit dem jeweils besten Parametersatz im Vergleich mit der applizierten Leistung als Klassifikator. Die punktweisen Konfidenzintervalle sind als farbige Fläche dargestellt. (a) Zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (⊖). (b) Zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (⊖) und *Weißfärbung* (●).

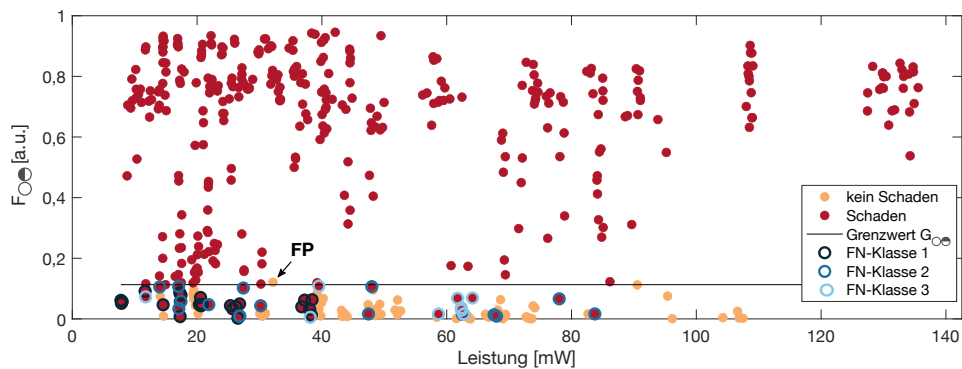
Menschen erstellt sind und deshalb fehlerbehaftet sind. Um herauszufinden, ob auch hier möglicherweise fehlerhafte Label die AUC begrenzen, kann es hilfreich sein, die vom Algorithmus falsch klassifizierten Läsionen genauer anzuschauen.

Dafür wurde der gesamte Datensatz noch einmal mit den beiden ZSM-Algorithmen und deren Parametern, welche die beste Performanz im vorangegangenen Kapitel gezeigt haben, ausgewertet. Jeder Algorithmus errechnet für jede Läsion des Datensatzes den ein-dimensionalen  $F$ -Score bzw. Dosimetrieparameter. Da es drei Klassen zu trennen gilt, gibt es entsprechend 2  $F$ -Scores:  $F_{○⊖}$  zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) zu *RPE-Schaden* (⊖), sowie  $F_{⊖●}$  zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (⊖) zu *Weißfärbung* (●). Erster ist in Abbildung 6.29 über die Leistung aufgetragen. Diese Unterscheidung eignet sich besser, da es Zeitverläufe gibt, während die  $F$ -Scores  $F_{⊖●}$  auf Basis des Inertia Moments ohne einen Zeitverlauf entstanden sind und es schwieriger ist die Grauwertematrix optisch auszuwerten.

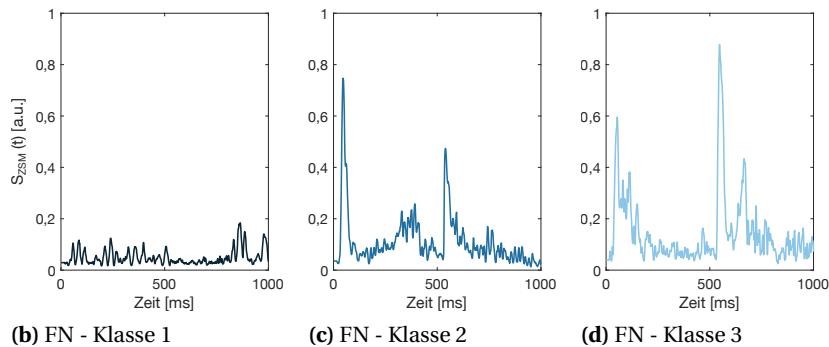
Von insgesamt 451 Läsionen ist eine falsch positiv klassifiziert (orangener Kreis oberhalb des Grenzwertes). Diese zeigt im Zeitverlauf sehr viel Bewegungsrauschen, das vom Algorithmus vermutlich als zweiter Anstieg detektiert wurde. Die 49 falsch negativen Läsionen sind alle roten Kreise in Abbildung 6.29, die einen  $F$ -Scores unterhalb des Grenzwertes haben, d. h. anhand der Specklebewegung klassifiziert der Algorithmus sie als *kein Schaden* (○) obwohl ihr Label der Kategorie *RPE-Schaden* (⊖) angehört. Diese falsch negativen Läsionen lassen sich grob in drei Klassen einteilen, von denen in Abbildung 6.29 je ein beispielhafter Zeitverlauf unter dem Scatterplot zu sehen ist. Die Läsionen in jeder der drei Klassen gehören auch weitestgehend immer derselben Messung im gleichen Auge an. So zeigen 17 Spots eines Auges aus Klasse 1 so viel globale Bewegung, dass der erste Peak der thermoelastischen Expansion verschwindet und somit der Grenzwert zum Aufsummieren nicht korrekt bestimmt werden kann. Diese Spots müsste eine Signalvalidierung, die einen eindeutigen ersten Peak sucht, erkennen und von der Auswertung ausschließen.

Der Zeitverlauf der zweiten Klasse sieht zwar so aus, wie man ihn von Spots mit *RPE-Schaden* (⊖) erwarten würde, scheinbar war der zweite Anstieg allerdings nicht groß genug, um oberhalb des Grenzwertes zur Summenbildung beizutragen. Hier könnten die Parameter zur Bestimmung des Grenzwertes angepasst werden.

Die dritte Klasse bilden 11 Spots eines Auges, die im Fluoreszenzbild deutlichen *RPE-Schaden* (⊖) zeigen aber sowohl im Zeitverlauf als auch im original Specklevideo keine zweite Specklebewe-



(a) Scatterplot aller auswertbaren Läsionen



(b) FN - Klasse 1

(c) FN - Klasse 2

(d) FN - Klasse 3

#### Abbildung 6.29: Analyse der falsch kategorisierten Messungen

(a)  $F_{00}$  (die Ausgabe des Algorithmus als Maßgabe für die Speckleänderung, bzw. der Dosimetrieparameter) ist über die applizierte Leistung jeder auswertbaren Läsion aufgetragen. Alle roten Kreise gehören zu der Klasse *RPE-Schaden* (☉) oder *Weißfärbung* (●) und sind falsch negativ, wenn ihr  $F_{00}$ -Score unterhalb des Grenzwertes liegt. All diese FN lassen sich grob in 3 Klassen einteilen:

(b) FN-Klasse 1: Beispielhafter Zeitverlauf einer Läsion aus Klasse 1, es sind keine temperaturbedingten Specklebewegungen zu erkennen.

(c) FN-Klasse 2: Der Zeitverlauf ist wie zu erwarten für eine Läsion, die Schaden verursacht, der zweite Anstieg wurde vermutlich nicht detektiert.

(d) FN-Klasse 3: Der Zeitverlauf sieht nach einer Läsion ohne Schaden aus und wird eigentlich korrekt vom Algorithmus erkannt, eventuell ist Klassifizierung der Ground Truth dieser Läsion nicht korrekt.

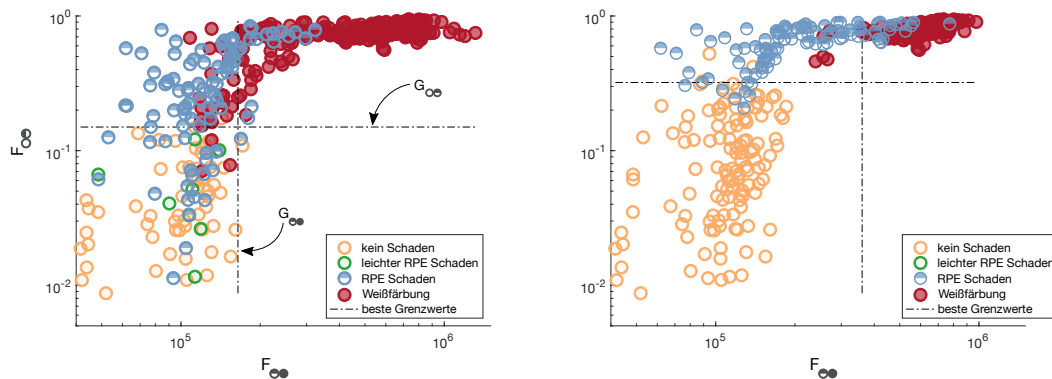
gung zu sehen ist. Hier könnte es sich um individuelle Unterschiede dieses einen Auges handeln, die nicht kompensiert werden können. Nach Signalvalidierung und angepassten Grenzwert zur Summenbildung bleiben 26 falsch Negative, wovon 10 aus Klasse 3 sind.

In Abbildung 6.29 wird außerdem deutlich, dass die Schadensklassen nur sehr wenig mit der applizierten Leistung korrelieren. Der Effekt wird hier vermutlich noch verstärkt, da dieser Datensatz aus 11 unterschiedlichen Augen, mit unterschiedlicher Pigmentierung, stammt.

#### 6.5.1.5.6 Vergleich mit manueller Kategorisierung

Um noch weiter abzuschätzen, welchen Einfluss die Bewertung der Läsionen zur Erstellung des Ground Truth hat, bzw. ob der Algorithmus oder die Bewertung Schuld an falsch kategorisierten Spots sind, wurden alle Spots noch einmal manuell anhand des Zeitverlaufs-Specklemuster bewertet. Entsprechend der Charakteristik, die in Abbildung 6.17 zu sehen ist, wurden Läsionen, die nur Änderungen beim Ein- und Ausschalten im Zeitverlaufs-Specklemuster zeigen, als *kein Schaden* (○) kategorisiert. Läsionen mit einer deutlichen Reduktion der Specklebewegung nach der initialen Bewegung und späteren erneuten Anstieg werden als *RPE-Schaden* (☉) klassifiziert und als *Weißfärbung* (●) gelten alle Läsionen, die eine nahezu konstante Specklebewegung während der gesamten Bestrahlung im Zeitverlaufs-Specklemuster zeigen. Die bessere Trennung der Kategorien wird im

Scatterplot in Abbildung 6.30 deutlich, wo die beiden  $F$ -Scores  $F_{\circ\circ}$  und  $F_{\bullet\bullet}$  eines jeden Spots gegeneinander aufgetragen sind. Die Performanzmaße in Tabelle 6.7 haben sich durch die manuelle Klassifizierung der Specklevariationen als Ground Truth deutlich verbessert.



(a) Ground Truth basierend auf dem Gewebeschaden (b) Ground Truth basierend auf der manuellen Klassifizierung der Bewegung im Zeitverlaufs-Specklemuster

#### Abbildung 6.30: Einfluss des Ground Truth

Scatterplot aller auswertbaren Spots, die mit 500 ms und bei einem Fleckdurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  appliziert wurden. Es sind jeweils die beiden  $F$ -Scores gegeneinander aufgetragen. Die Farbcodierung entspricht der jeweiligen Schadensklasse, die (a) auf dem Schaden anhand der Fluoreszenzbilder basiert oder (b) auf der manuellen Klassifizierung anhand der Bewegung im Zeitverlaufs-Specklemuster.

Algorithmus: ZSM, mit den jeweils optimalen Parametersatz (siehe Kap. 6.5.1.5.4).

Anhand der manuellen Klassifizierung wird deutlich, dass die Algorithmen tatsächlich wie erwartet funktionieren. Die Fehl kategorisierungen entstehen im Wesentlichen durch untypische Zeitverläufe der Specklemuster. Daher ist eine bessere Signalvalidierung notwendig, um zu erkennen, ob beispielsweise das Signal-zu-Rauschverhältnis ausreichend ist oder eine initiale Bewegung detektierbar ist. So kann gewährleistet werden, dass die Algorithmen nicht auswertbare Läsionen automatisch von der Analyse ausschließen.

**Tabelle 6.7:** Vergleich der Performanz der Algorithmen bei unterschiedlicher Bestimmung des Ground Truth, entweder anhand des Gewebeschadens oder mittels einer manuellen Klassifizierung der zeitlichen Speckleänderungen.

Label	Unterscheidung	AUC	Youden	Sens.	Spez.	bester Grenzwert
Gewebeschaden	$\circ - \bullet$	97,59 [96,04 - 98,62]	0,91	0,93	0,99	0,1498
	$\bullet - \bullet$	96,09 [94,02 - 97,43]	0,80	0,90	0,90	$1,6463 \cdot 10^5$
manuelle Kategorisierung	$\circ - \bullet$	99,08 [96,35 - 99,79]	0,94	0,97	0,97	0,3107
	$\bullet - \bullet$	98,33 [96,86 - 99,09]	0,89	0,96	0,92	$3,5994 \cdot 10^5$

#### 6.5.1.6 Abhängigkeit von Bestrahlungsparametern

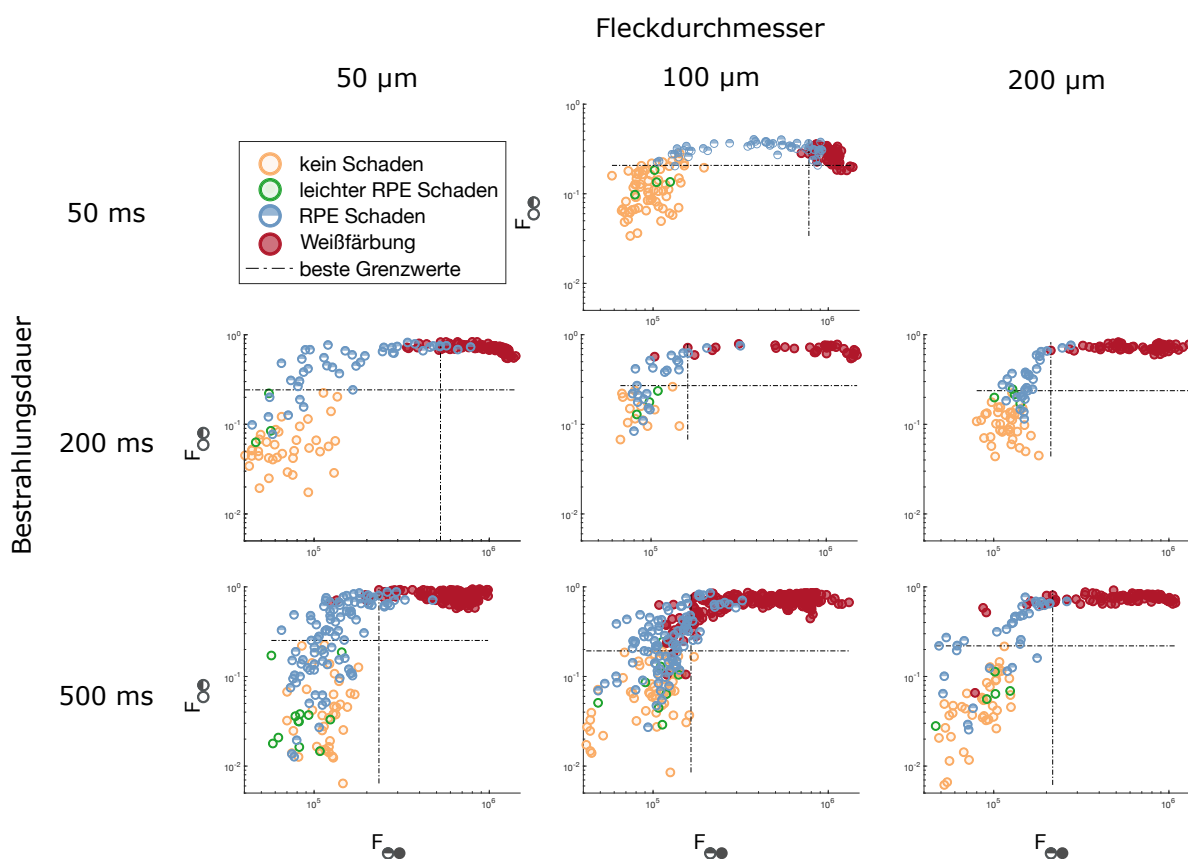
Es kann nun überprüft werden, ob die im vorangegangenen Kapitel gefundenen Algorithmen sich auch auf andere Bestrahlungsparameter wie Fleckgröße und Bestrahlungsdauer übertragen lassen. Die Auswertung erfolgt mit dem ZSM-Algorithmus und den jeweiligen optimalen Parameterkombinationen (siehe Kap. 6.5.1.5.4). Es werden im Folgenden zunächst bei gleichbleibender Blende, d. h. konstanter Specklegröße, der Einfluss von Bestrahlungsdauer und Fleckgröße untersucht und danach die Specklegröße sowie die Wellenlänge variiert. Die Anzahl der bestrahlten Augen und applizierten Läsionen variiert etwas zwischen den verschiedenen Datensätzen mit unterschiedlichen

Bestrahlungsparametern und reicht von zwei Augen mit 77 auswertbaren Spots bis 400 Spots in 11 Augen.

Für jeden Datensatz werden mittels ROC Analyse je der optimale Grenzwert  $G_{\circ\circ}$  und  $G_{\bullet\bullet}$ , basierend auf der besten Kombination von Sensitivität und Spezifität bestimmt und die AUC ausgewertet.

### 6.5.1.6.1 Bestrahlungsdauer und Fleckgröße

In Abbildung 6.31 sind Scatterplots für die verschiedenen Datensätze bei Fleckgrößen von 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  und 50  $\mu\text{m}$ , sowie Bestrahlungsdauern von 500 ms, 200 ms und 50 ms zu sehen. Es wurden für jede Läsion die jeweiligen  $F$ -Scores gegeneinander aufgetragen. Die Performanz zur Trennung der Klassen anhand der Scatterplots scheint bei allen anderen Parameterkombinationen etwas besser zu sein als bei dem 100  $\mu\text{m}$ / 500 ms Datensatz, der die Grundlage aller bisherigen Analysen war. Allerdings ist die Anzahl der Datenpunkte bei allen anderen Datensätzen geringer. Die AUC in Tabelle 6.8 zeigen außerdem, dass auf Grundlage dieser Datensätze der Unterschied nicht signifikant ist, da sich die Konfidenzintervalle überlappen. Der Spotdurchmesser scheint keinen Einfluss auf die Algorithmen zu haben und auch für kleine Bestrahlungsdauern funktioniert die Trennung der Kategorien problemlos, was ein guter Indikator für eine ausreichende Bildrate ist. Die optimalen Grenzwerte für die Trennung von *kein Schaden* ( $\circ$ ) und *RPE-Schaden* ( $\bullet$ ) ist in allen Datensätzen nahezu identisch, nur der Grenzwert zur Trennung der anderen beiden Kategorien scheint von den Bestrahlungsparametern abzuhängen.



**Abbildung 6.31: Performanz der Algorithmen bei unterschiedlichen Bestrahlungsparametern**

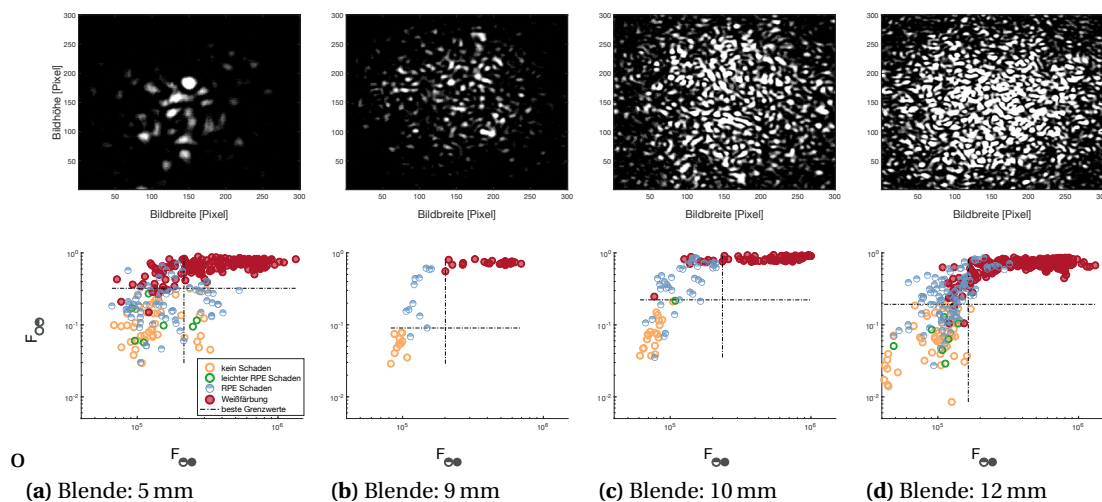
Für die verschiedenen Kombinationen von Bestrahlungsdauer und Fleckdurchmesser sind jeweils die Scatterplots gezeigt. Es sind jeweils die beiden Dosimetriewerte gegeneinander aufgetragen. Die Farbcodierung entspricht der Schadensklasse. Die gestrichelten Linien sind die besten Grenzwerte für jeden Datensatz.

**Tabelle 6.8:** AUC für die verschiedenen Kombinationen aus Fleckdurchmesser und Bestrahlungsdauer. Die Wertebereiche in Klammern geben die punktweisen Konfidenzintervalle an.

Bestrahlungsdauer	Unterscheidung	Fleckgröße					
		50 $\mu\text{m}$		100 $\mu\text{m}$		200 $\mu\text{m}$	
50 ms	○ - ○	-	[- - -]	97,88	[95,46 - 99,08]	-	[- - -]
	○ - ●	-	[- - -]	98,63	[96,99 - 99,48]	-	[- - -]
200 ms	○ - ○	99,41	[98,25 - 99,83]	92,94	[84,43 - 96,95]	98,49	[96,11 - 99,47]
	○ - ●	98,91	[97,23 - 99,60]	98,51	[93,35 - 99,73]	99,93	[99,42 - 100,00]
500 ms	○ - ○	96,52	[93,75 - 98,13]	96,57	[94,42 - 97,82]	97,32	[94,50 - 99,13]
	○ - ●	98,70	[97,26 - 99,43]	96,09	[94,23 - 97,28]	97,41	[93,42 - 99,10]

### 6.5.1.6.2 Apertur

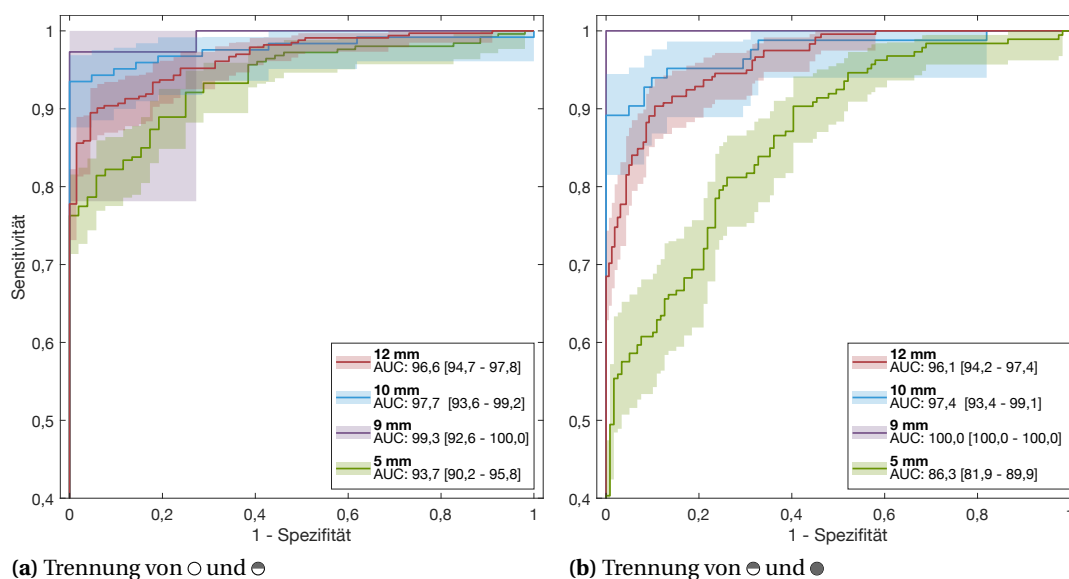
Zum Vergleich des Einflusses der Blende, also der Specklegröße auf die Algorithmen, sind im Folgenden Datensätze bei vier verschiedenen Blendengrößen (5 mm, 9 mm, 10 mm und 12 mm) bei konstanter Bestrahlungsdauer (500 ms) und konstantem Spotdurchmesser (100  $\mu\text{m}$ ) dargestellt. Zwei Augen aus dem Datensatz von Blende 10 wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da keine temperaturbedingte Bewegung sichtbar war, was nicht zur eindeutigen Beobachtung von RPE-Schaden oder gar Weißfärbung passt.



**Abbildung 6.32:** Einfluss der Blendengröße

Die verstellbare Blende im Beobachtungsstrahlengang wurde für Bestrahlungsreihen zwischen 5 mm und 12 mm variiert. Gezeigt ist jeweils das resultierende Specklemuster mit immer kleiner werdenden Speckeln sowie der Scatterplot, in dem die beiden Feedbackwerte gegeneinander aufgetragen sind. (a) Blende: 5 mm (b) Blende: 9 mm (c) Blende: 10 mm (d) Blende: 12 mm.

Anhand der Scatterplots in Abbildung 6.32 könnte man annehmen, dass je kleiner die Speckle sind, die Algorithmen umso besser funktionieren, da die Grenzwerte die Kategorien besser separieren. Bei großen Speckeln scheinen die  $F$ -Scores verstreuter zu sein. Da bei Blende 9 nur Daten aus einem Auge vorliegen, könnte die Aussagekraft des Scatterplots etwas verzerrt sein. Daher sind in Abbildung 6.33 noch einmal die ROC Plots für alle Blendengrößen mit Konfidenzintervallen aufgetragen, da diese von der Größe der Datensätze abhängen. Tatsächlich ist die Performanz bei Blende 5 mm signifikant schlechter, zumindest was die Trennung von *RPE-Schaden* (○) und *Weißfärbung* (●) betrifft.



**Abbildung 6.33: ROC Plots zum Vergleich verschiedener Blenden-/Specklegrößen**

Die mittleren ROC Plots für die vier verschiedenen Blenden (5 mm, 9 mm, 10 mm und 12 mm) sind als Linien dargestellt. Die entsprechend farbige Fläche um jede Linie repräsentiert das punktweise Konfidenzintervall. In der Legende sind für jede Blendengröße das dazugehörige AUC gezeigt, erneut mit den Konfidenzintervallen in Klammern.

(a) Unterscheidung von *kein Schaden* ( $\circ$ ) und *RPE-Schaden* ( $\ominus$ );

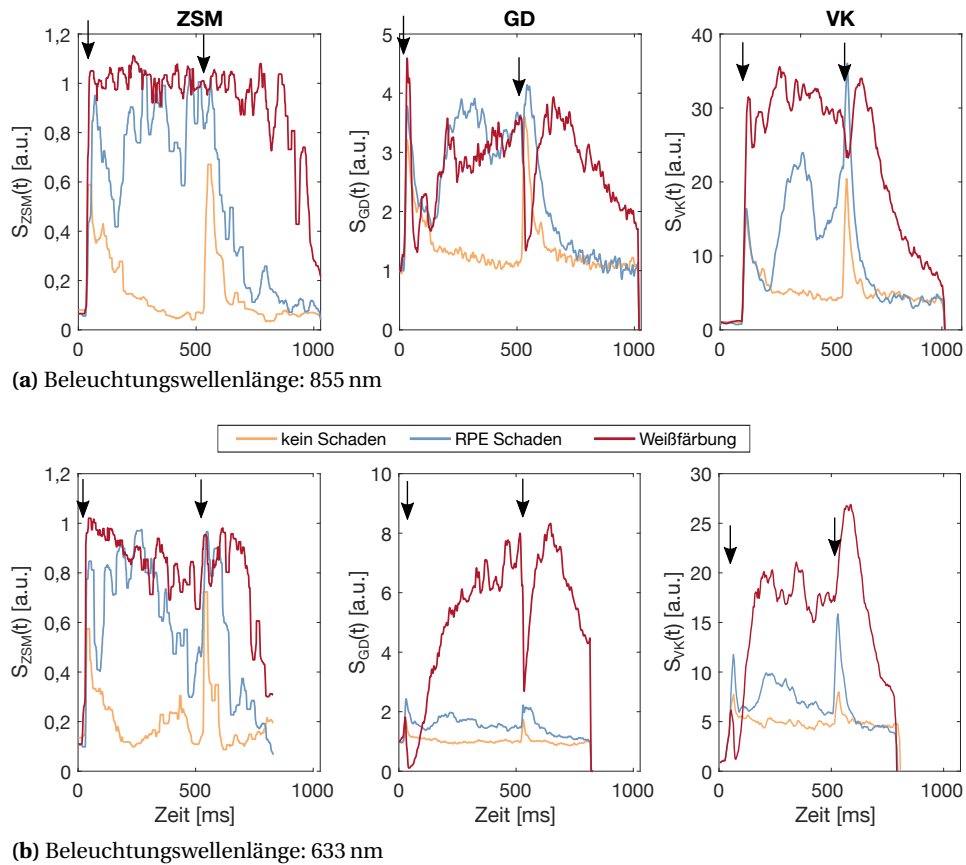
(b) Unterscheidung von *RPE-Schaden* ( $\ominus$ ) und *Weißfärbung* ( $\bullet$ ).

### 6.5.1.6.3 Wellenlänge

Die Experimente aller bisher gezeigten Ergebnisse wurden bei einer Beleuchtungswellenlänge von 855 nm durchgeführt. Der Vergleich mit einer Beleuchtungswellenlänge von 633 nm zeigt erwartungsgemäß ein ähnliches Specklemuster. Auch die Specklebewegung sieht ähnlich aus und zeigt die typischen Unterschiede der drei Schadensklassen. Die Auswertung der Bewegung zeigt allerdings bei dem GD-Algorithmus einen deutlichen Unterschied (Abb. 6.34). Es ist der Zeitverlauf je einer Läsion aus jeder der drei Schadensklasse geplottet, wobei der Zeitverlauf mit allen drei Algorithmen bestimmt wurde. Für den ZSM- und auch den VK-Algorithmus haben die Zeitverläufe unabhängig von der Beleuchtungswellenlänge einen ähnlichen Verlauf. Für Spots mit Weißfärbung fällt die mittels GD-Algorithmus berechnete Bewegung zunächst nach dem initialen Peak deutlich unter den Ausgangswert, bevor die Kurve kontinuierlich bis über ein Vielfaches des ersten Peaks hinaus ansteigt. Da Differenzbilder die Grundlage für den GD-Algorithmus sind, wird hier auch die Änderung der Intensität mit berücksichtigt, während die anderen beiden Algorithmen eher auf einer tatsächlichen Specklebewegung beruhen. Wie im Zeitverlaufs-Specklemuster in Abbildung 6.35 zu sehen, gibt es bei starken Läsionen eine erhöhte Rückstreuung, die bei der Beleuchtung mit 855 nm nicht sichtbar ist. Deutlich wird dieser Effekt, in den Plots der normierten Summe  $I_{\text{sum}}(t)$  der Intensität aller Pixel der Bilder:

$$I_{\text{sum}}(t) = \frac{\sum_x \sum_y I(x, y, t)}{\sum_x \sum_y I(x, y, t = 1)}. \quad (6.19)$$

Diese Summe ist für jeden Frame  $I(x, y, t)$  über die Zeit aufgetragen, was als roter Graph dem Zeitverlaufs-Specklemuster in Abbildung 6.35 überlagert ist. Bei 855 nm ist zu Beginn und Ende der Bestrahlung ein Rückgang der Intensität zu beobachten, was an der sehr schnellen Bewegung der Speckle bei starker Temperaturänderung liegt. Dies führt dazu, dass bei der Aufnahmegeschwindigkeit von 1 kHz die Speckle so stark verschmieren, dass sie nahezu verschwinden. Dies ist in der



**Abbildung 6.34: Einfluss der Beleuchtungswellenlänge auf die Specklebewegung**

Es sind für die unterschiedlichen Beleuchtungswellenlängen die Zeitverläufe der Specklebewegung gezeigt. Für jede Schadensklasse ist eine Beispielläsion gezeigt, deren Zeitverlauf mit allen drei Algorithmen berechnet wurde. Die Pfeile markieren das Ein- und Ausschalten des Lasers. (a) Beleuchtungswellenlänge: 855 nm (b) Beleuchtungswellenlänge: 633 nm.

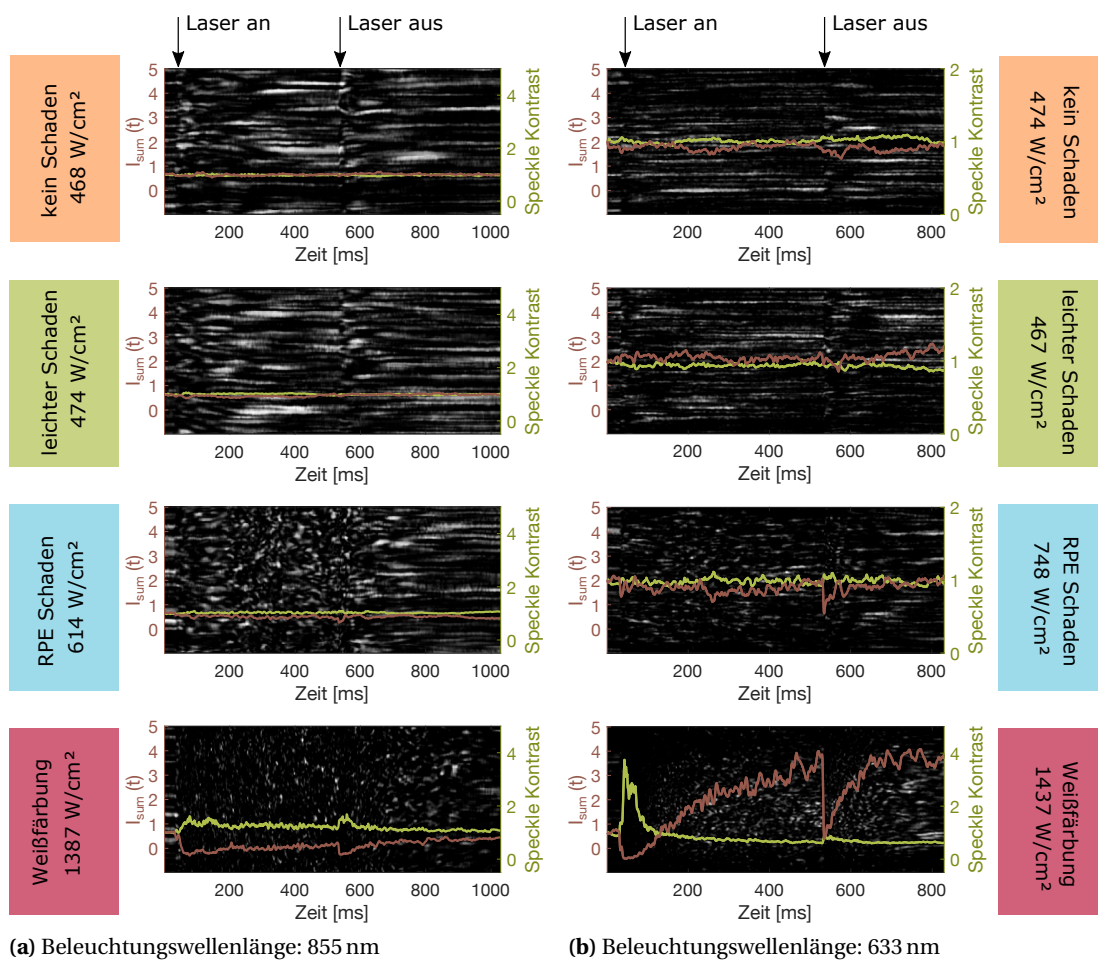
Bestrahlungsparameter: Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 100  $\mu\text{m}$ , Blende: 12 mm

ZSM-Algorithmus: Anzahl der Spalten/Zeilen  $n = 10$ , Offset  $o = 13$ , Nachbarschaft  $l = 9$

GD-Algorithmus: Nachbarschaft  $l = 13$ , Wichtung: 0, Normierung: 1

VK-Algorithmus: Größe der Sub-Bilder  $n = 10$ , Offset  $o = 4$ , Normierung: 0.

gleichzeitig starken Änderung des Specklekontrastes (Gl. 4.5) zu erkennen, der als gelbe Kurve dargestellt ist. Der Effekt der verschwindenden Speckle ist auch bei 633 nm deutlich zu sehen, bevor die erhöhte Rückstreuung einsetzt, was die Gesamtintensität ansteigen lässt, allerdings keinen Einfluss auf den Specklekontrast hat.



**Abbildung 6.35: Einfluss der Beleuchtungswellenlänge auf das Zeitverlaufs-Specklemuster und die Intensität des Specklemusters**

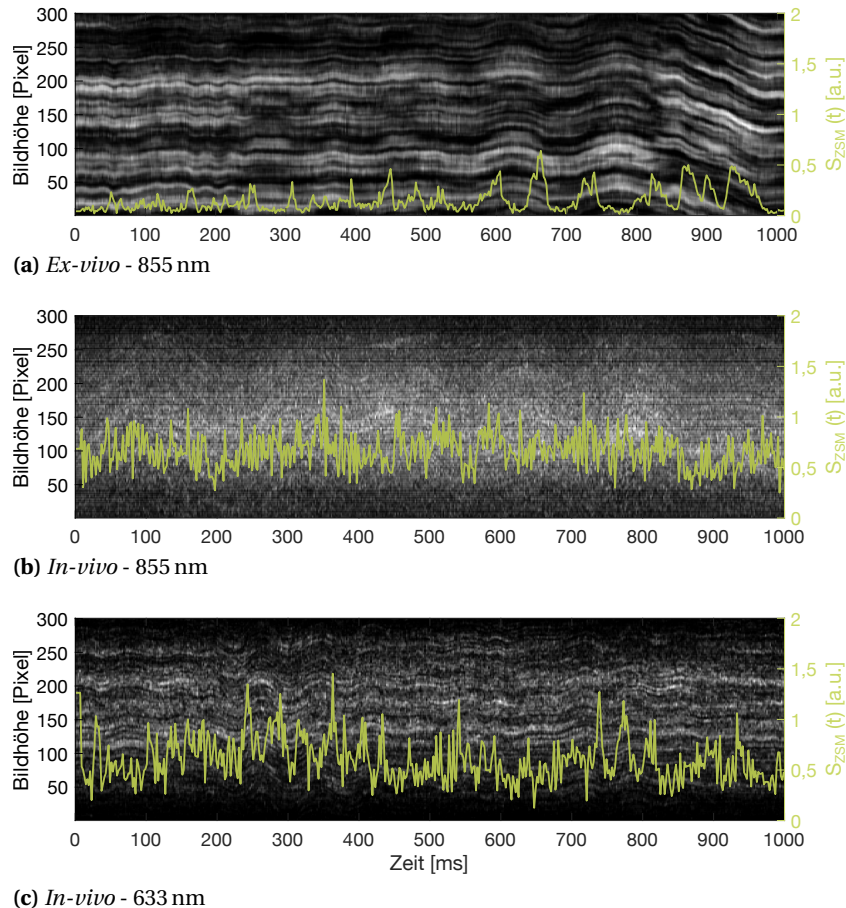
Es ist für die beiden verschiedenen Beleuchtungswellenlängen für jede Schadensklasse exemplarisch das Zeitverlaufs-Specklemuster einer Läsion gezeigt. Dem Zeitverlaufs-Specklemuster überlagert ist der Verlauf der normierten Gesamtintensität  $I_{sum}(t)$  des Specklemusters (rot) und der Verlauf des Kontrastes (gelb) als Funktion der Zeit. Die Pfeile markieren das Ein- und Ausschalten des Lasers. (a) Beleuchtungswellenlänge: 855 nm (b) Beleuchtungswellenlänge: 633 nm.

Bestrahlungsparameter: Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 100  $\mu m$ , Blende: 12 mm

## 6.5.2 *In-vivo* Messreihen an Kaninchenaugen

### 6.5.2.1 Beleuchtung bei 855 nm

Mit einer mittleren Leistung des Beleuchtungslasers von etwa 2,3 mW und einer Bildrate von 500 Hz lässt sich eine für die Auswertung ausreichende Helligkeit der Specklebilder im Kaninchenauge erzielen. Koagulationsläsionen wurden bei 80 mW mit einer Pulsdauer von 200 ms gesetzt, wobei der Fleckdurchmesser auf 300  $\mu\text{m}$  eingestellt wurde, was durch die verkleinernde Wirkung des Kaninchenauges zu einem tatsächlichen Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  führt.



**Abbildung 6.36: Vergleich des Untergrundrauschens der Specklebewegung *in-vivo* und *ex-vivo***  
 Zeitverlaufs-Specklemuster sind zusammen mit dem Zeitverlauf der Specklebewegung ( $S_{ZSM}$ ) für Aufnahmen ohne Photokoagulation gezeigt. Die Daten wurden der Bewegungskorrektur unterzogen. [Link zur Animation](#)  
 (a) *Ex-vivo* bei einer Beleuchtungswellenlänge von 855 nm (Blende: 12 mm, Bildrate: 1000 fps).  
 (b) *In-vivo* bei einer Beleuchtungswellenlänge von 855 nm (Blende: 12 mm, Bildrate: 500 fps).  
 (c) *In-vivo* bei einer Beleuchtungswellenlänge von 633 nm (Blende: 12 mm, Bildrate: 500 fps).  
 ZSM-Algorithmus: Anzahl der Spalten/Zeilen  $n = 50$ , Offset  $o = 3$ , Nachbarschaft  $l = 3$ .

Betrachtet man zunächst die allgemeinen Specklebewegungen ohne zusätzliches Aufheizen des Gewebes, fällt im Vergleich zu den Specklebewegungen *ex-vivo* auf, dass es deutlich mehr und schnellere Fluktuationen der Speckle gibt (Abb. 6.36). Diese Fluktuationen haben zwei Anteile, denen scheinbar auch zwei verschiedene Specklemuster zugrunde liegen, die sich überlagern. Ein Specklemuster zeichnet sich durch schnelle *boiling* Speckle aus, eine schnelle Fluktuation in der Helligkeit der Speckle, sowie deren Verschwinden und erneutes Auftauchen. Dieses überlagert ein zweites Specklemuster, das langsame globale translatorische Bewegung des gesamten Musters zeigt. Diese Bewegung hat eine konstante Periode der Richtungsänderung, die vermutlich mit Herzschlag und Atmung zusammenhängen. Zur Evaluierung der Machbarkeit einer *in-vivo* Dosimetrie wurden

38 Läsionen mit einer Leistung zwischen 65-117 mW appliziert (Bestrahlungsreihe 1, Kaninchen Lili, siehe Tab. 6.2), die im Fundusbild deutlich sichtbar sind, da es sich um Markerläsionen handelt. Von diesen sind nur bei 4 Läsionen Änderungen in der Specklebewegung zu erkennen, die möglicherweise mit der Koagulation zusammenhängen. Bei allen anderen Läsionen ist trotz Rausch- und Bewegungskorrektur keine eindeutige zusätzliche, temperaturinduzierte Bewegung zu erkennen.

Da der Hauptanteil des Specklesignals sehr stark vom Blutfluss in der Choroidea beeinflusst zu sein scheint, wurde im Folgenden die Beleuchtungswellenlänge reduziert, um somit die Eindringtiefe zu verringern und den Einfluss vom Choroid zu minimieren.

### 6.5.2.2 Beleuchtung bei 633 nm

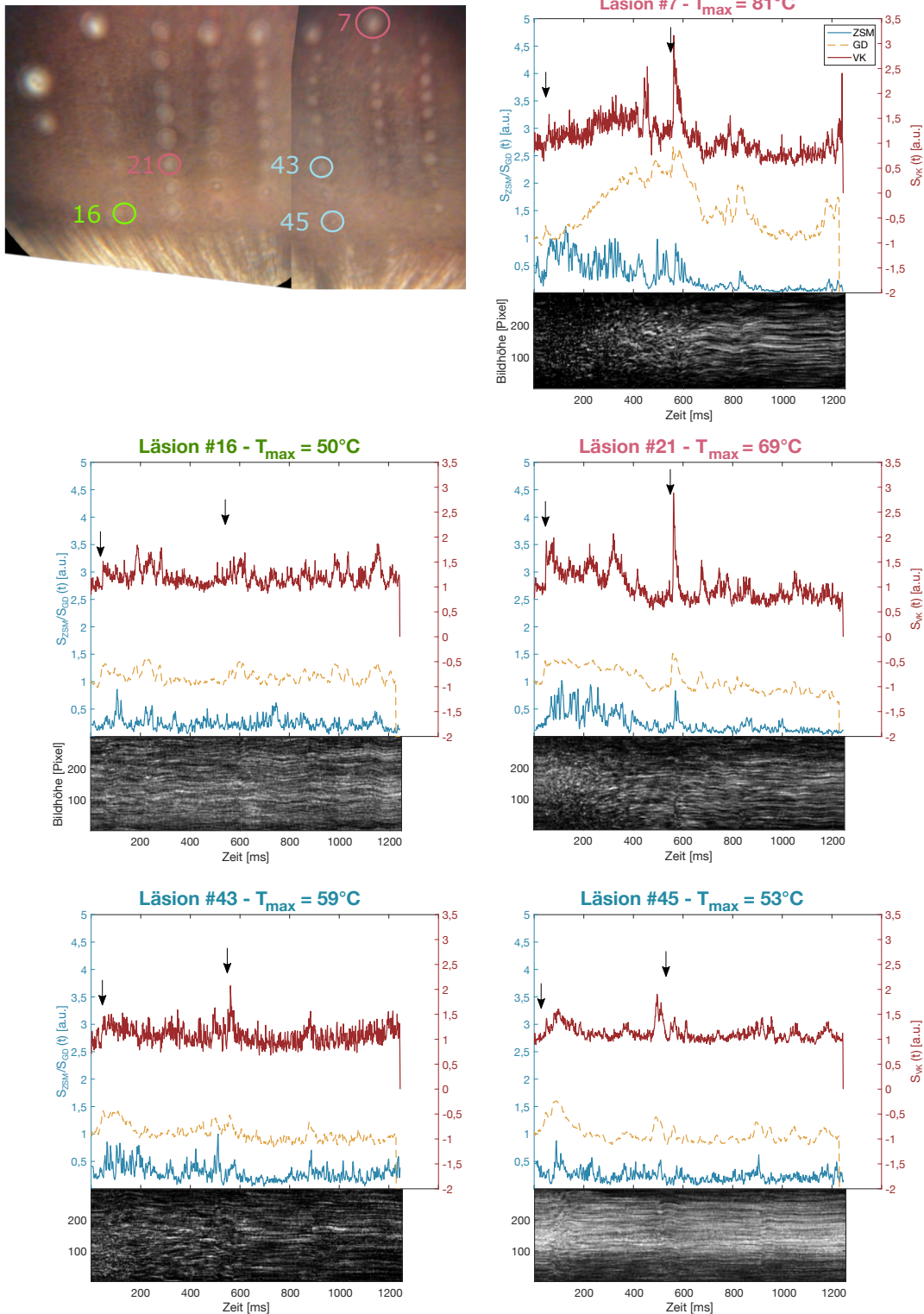
Bei der visuellen Beurteilung der Specklesequenzen erscheint das Rauschen der *boiling* Speckle geringer als mit der Beleuchtung bei 855 nm, auch wenn die Unterschiede im Zeitverlauf der Specklebewegung in Abbildung 6.36 eher gering zu sein scheinen. Das allgemeine Rauschen im Zeitverlaufs-Specklemuster wirkt bei 855 nm deutlich stärker als bei 633 nm, allerdings ist anhand des Zeitverlaufs-Specklemusters alleine schwer festzustellen, ob dies tatsächlich an der veränderten Beleuchtungswellenlänge liegt, oder an den allgemeinen Beleuchtungsbedingungen, wie die Streuung und der Einblick in die verschiedenen Augen. Auch bei der Beleuchtung bei der Wellenlänge von 633 nm überlagern die *boiling* Speckle ein zweites Specklemuster, welches sich global bewegt.

Allerdings sind neben der globalen Bewegung auch bestrahlungsbedingte Speckleänderungen in der Sequenz und im Zeitverlaufs-Specklemuster sichtbar. Von 63 Läsionen in einem Auge (Bestrahlungsreihe 6, Kaninchen Rosa, siehe Tab. 6.2) lassen sich in 58 subjektive Bewegungen zum Beginn und teilweise auch am Ende der Laserbestrahlung sehen, auch bei Läsionen mit unterschiedlicher Sichtbarkeit im Fundusfoto. Drei Läsionsklassen lassen sich unterscheiden und Beispiele dafür sind in der Funduskarte in Abbildung 6.37 eingetragen:

1. nicht oder kaum sichtbar (□): Läsion #16
2. spät sichtbar (▣) (nicht sichtbar während der Behandlung, aber sichtbar im Fundusfoto): Läsion #43 und #45
3. sofort sichtbar (■): Läsion #7 und #21

Für alle fünf Beispielbestrahlungen sind neben der Funduskarte in Abbildung 6.37 das Zeitverlaufs-Specklemuster sowie die Zeitverläufe, die mit den 3 verschiedenen Algorithmen berechnet wurden, dargestellt. Zusätzlich ist als weitere Referenz für das Ausmaß des Schadens die optoakustisch bestimmte Maximaltemperatur jeder Bestrahlung zu sehen.

Die größte Gemeinsamkeit, welche die Specklebewegung im Vergleich zur *ex-vivo* Situation aufweist, ist die Änderung beim Ausschalten des Lasers. Hier ist in den meisten Fällen ein deutlicher Peak sichtbar, nachdem die Bewegung bis zum Ende der Aufnahmezeit schnell abnimmt. Diese Bewegung ist auch in der Specklesequenz häufig die am stärksten subjektiv wahrgenommene Bewegung. Wie bei der *ex-vivo* Beleuchtung mit 633 nm ist auch hier bei sehr starken Läsionen (Läsion #7) direkt nach Einschalten des Lasers, aufgrund der starken Specklebewegung eine Abnahme der Intensität zu beobachten. Die darauf folgende Intensitätszunahme während der Bestrahlung wird wie erwartet vom GD-Algorithmus erkannt, der Zeitverlauf  $S_{GD}(t)$  nimmt ähnlich wie in der *ex-vivo* Situation kontinuierlich im Laufe der Bestrahlung zu, vermutlich aufgrund der erhöhten Rückstreuung. Die Bewegung, die von den anderen beiden Algorithmen erkannt wird, unterscheidet sich allerdings deutlich, verglichen mit der *ex-vivo* Bestrahlung. Der markante erste Peak ist nicht mehr erkennbar und auch ein erneuter Anstieg als Indikator für einsetzende Koagulation ist nicht mehr sichtbar. Stattdessen ist eher ein breiter Peak zu Beginn der Bestrahlung zu sehen, wie bei Läsion #45. Mit steigender Temperatur wird dieser Peak immer breiter, obwohl die verschiedenen Algorithmen auch leicht unterschiedliche Bewegungen detektieren. Im Zeitverlaufs-Specklemuster lassen sich



**Abbildung 6.37: Beispielbestrahlungen *in-vivo***

Im Fundusfoto sind 5 Beispielläsionen bei verschiedener Sichtbarkeit markiert:

- kaum sichtbar: Spot 16 ([↗ Link zur Animation](#))
- spät sichtbar: Spot 43 ([↗ Link zur Animation](#)) und 45 ([↗ Link zur Animation](#))
- sofort sichtbar: Spot 7 ([↗ Link zur Animation](#)) und 21 ([↗ Link zur Animation](#))

Für jede Läsion ist das Zeitverlaufs-Specklemuster gezeigt und dazu der Zeitverlauf  $S(t)$ , der mit allen drei Algorithmen bestimmt wurde, auf der linken Y-Achse,  $S_{ZSM}$  in Blau und  $S_{GD}$  in Gelb. Auf der rechten Y-Achse ist  $S_{VK}$  in Rot geplottet. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte des Ein- und Ausschaltens des Lasers.

Bestrahlungsparameter: Beleuchtungswellenlänge: 633 nm Bestrahlungszeit: 500 ms, Fleckdurchmesser: 200  $\mu\text{m}$ , Blende: 12 mm

ZSM-Algorithmus: Anzahl der Spalten/Zeilen  $n = 50$ , Offset  $o = 13$ , Nachbarschaft  $l = 9$

GD-Algorithmus: Nachbarschaft  $l = 13$ , Wichtung: 0, Normierung: 1

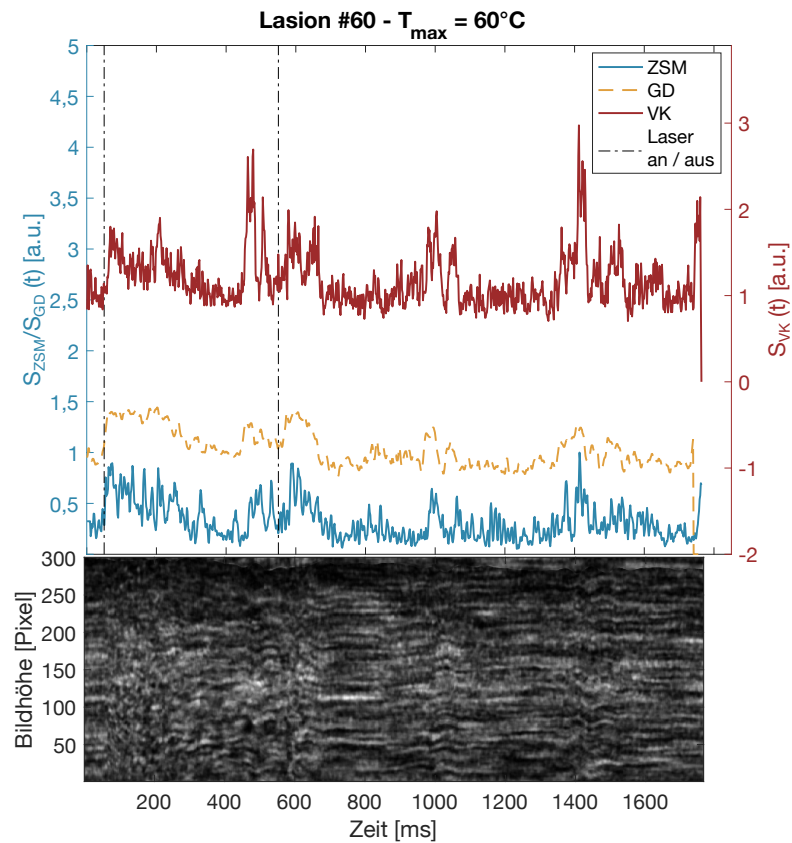
VK-Algorithmus: Größe der Sub-Bilder  $n = 10$ , Offset  $o = 4$ , Normierung: 0.

Änderungen der Specklebewegung zu Beginn und Ende der Bestrahlung vermuten, soagr bei der *kaum sichtbaren* (□) Läsion #7. Die Zeitverlaufs-Specklemuster weisen auch eine gewisse Ähnlichkeit zum Verlauf *ex-vivo* auf. Dennoch heben sich die von den Algorithmen detektierten Peaks kaum vom allgemeinen Rauschen ab und stellen sich zusätzlich noch unterschiedlich bei verschiedenen Algorithmen dar. Hinzu kommt eine ähnliche Speckleänderung, die einen mindestens genauso deutlichen Peak verursacht, der bei vielen Bestrahlungen etwa zwischen 800 und 1000 ms sichtbar wird. Es kann somit nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Peak bei kaum sichtbaren Läsionen tatsächlich bestrahlungsbedingt ist. Was bei Läsion #45 weiterhin auffällt, ist der scheinbar etwas zu zeitige zweite Peak, der kurz vor Ausschalten des Lasers erscheint. Dieses Verhalten ist auch bei weiteren Läsionen, wie zum Beispiel Läsion #60 in Abbildung 6.38 zu beobachten. Der Ein- und Ausschaltzeitpunkt des Lasers ist hier zur besseren Orientierung noch als gestrichelte Linie dargestellt. Da dieser Spot mit verringerter Bildrate, bei gleicher Gesamtzahl an Bildern aufgenommen wurde, ist es möglich auch hier deutlich nach der Bestrahlung noch weitere ausgeprägte Peaks und Veränderungen im Zeitverlaufs-Specklemuster zu finden.

Wie die Zeitverläufe  $S(t)$  in Abbildung 6.37 vermuten lassen, ist es anhand der Merkmalsextraktion dieser Kurven kaum möglich die drei Sichtbarkeitsklassen zu unterscheiden. Alle in den vorangegangenen Kapiteln gezeigten Algorithmen erzielen maximal einen AUC von 0,71 für die Trennung von zwei der drei Sichtbarkeitsklassen für die 63 Läsionen dieser Bestrahlungsreihe. Die Übersicht aller AUCs in Tabelle 6.9 zeigt, dass die Algorithmen meist kaum besser als eine zufällige Klassifikation sind, die einen AUC von 50 % hat. Es wurden hier jeweils die Parameterkombinationen verwendet, die *ex-vivo* die beste Performanz hatten.

**Tabelle 6.9:** Performanz (AUC) der drei Algorithmen zur Unterscheidung der drei Sichtbarkeitsklassen *in-vivo*

Algorithmus	Unterscheidung von	AUC in %
ZSM-Zeitverlauf	□ - ▣	59,00
	▣ - ■	70,34
ZSM-Inertia Moment	□ - ▣	57,75
	▣ - ■	46,69
GD	□ - ▣	40,00
	▣ - ■	60,29
VK	□ - ▣	58,75
	▣ - ■	70,96



**Abbildung 6.38: Zeitverläufe der Speckleänderung von Läsion #60**

Der Zeitverlauf berechnet mit allen drei Algorithmen ist zusammen mit dem Zeitverlaufs-Specklemuster dargestellt. Das Ein- und Ausschalten des Lasers ist durch die gestrichelten Linien markiert. Es sind mehrere deutliche Peaks auch nach dem Ausschalten des Lasers zu sehen.

### 6.5.2.3 Analyse mittels Faltungsnetzwerken

Da die vorgestellten klassischen Algorithmen nicht in der Lage sind, verschiedenartige Specklebewegungen *in-vivo* zu unterscheiden, in fast allen Specklesequenzen aber subjektive bestrahlungsbedingte Bewegung sichtbar war, soll im Folgenden untersucht werden, ob ein Faltungsnetzwerken möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen kann.

#### 6.5.2.3.1 Transfer Learning

Da 58 von 63 auswertbare Spots zum Trainieren eines Netzes recht wenig sind, wurden die Daten, wie in Kapitel 6.4.6.1 beschrieben, augmentiert, sodass insgesamt 20 Aktivitätskarten pro Läsion genutzt werden können. Die 1160 Aktivitätskarten teilen sich wie folgt auf die 3 Klassen auf:

Klasse	Anzahl
nicht/kaum sichtbar (□)	160
spät sichtbar (▣)	520
sofort sichtbar (■)	480

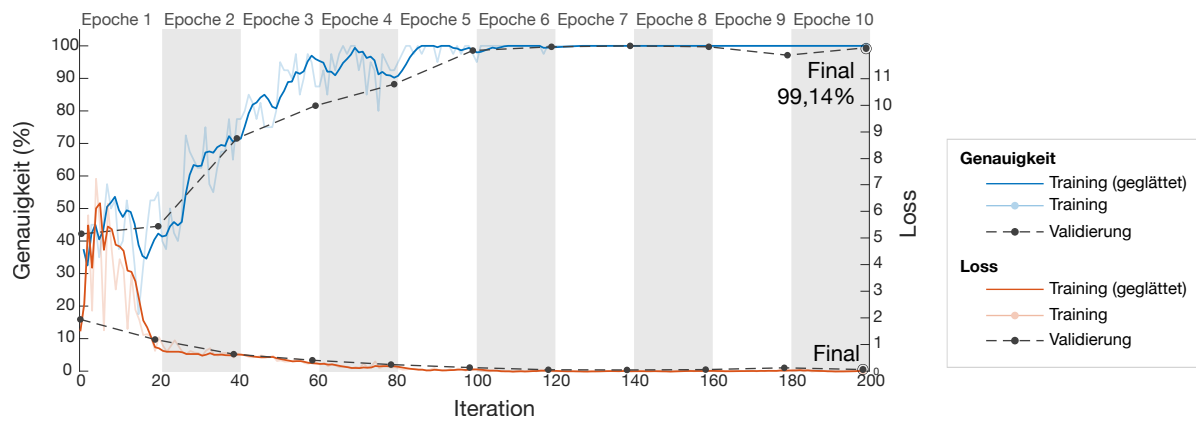
70 % des Datensatzes werden zufällig dem Trainingsdatensatz und der Rest dem Validierungsdatsatz zugeordnet. Mit einer MiniBatch Größe von 15, maximal 10 Epochen, bei einer initialen Lernrate von  $2 \cdot 10^{-4}$  und Stochastic Gradient Decent mit Momentum als Optimierung konnte bei einer Genauigkeit bzw. Accuracy (Anteil der korrekt vorhersagten Datenpunkte) von 98,89 % im Trainingsset nur 82,47 % im Validierungsset erreicht werden. Da die Genauigkeit im Trainingsset deutlich höher ist, scheint das Netz schlecht zu generalisieren und eine Überanpassung der Trainingsdaten zu erzielen.

#### 6.5.2.3.2 Flaches Netz für Aktivitätskarten

Das eben vorgestellt Netz lernt die Daten des Trainingsdatensatzes auswendig und kann dadurch ungesehene Daten des Validierungsdatsatzes schlechter vorhersagen. Diesem Problem kann im Allgemeinen mit mehr Daten oder einem simpleren Netz begegnet werden. Ein vereinfachtes flacheres Netz (wie in Abs. 6.4.6.3 beschrieben) könnte im Fall der Speckleklassifizierung hilfreich sein. Es müssen keine komplexen Objekte erkannt werden, worauf das hier genutzte ResNet18 trainiert wurde, sondern eher strukturelle Unterschiede gefunden werden. Die Detektion dieser low-level Feature findet eher in den frühen Schichten des Netzes statt, das heißt es kann auch sinnvoll sein diese zu trainieren und nur wenige davon zu benutzen. Mit einer MiniBatch Größe von 40, maximal 10 Epochen, einer initialen Lernrate von  $2 \cdot 10^{-3}$ , L2Regularisierung von 0,5 ergibt sich mit Stochastic Gradient Descent mit Momentum als Optimierung eine Genauigkeit im Training von 99,88 % bei 99,14 % im Validierungsdatsatz. Der Verlauf von Genauigkeit und des Loss ist in Abbildung 6.39 dargestellt. Trotz der Einfachheit erzielt dieses Netz schon nach kurzer Lernphase sehr hohe Genauigkeiten bei der Klassifizierung ohne Overfitting.

Um zu verstehen, wie das Netz mit den Eingangsdaten der verschiedenen Klassen umgeht, wurde die Grad-CAM Methode angewendet. In Abbildung 6.40 sind für je ein Beispiel der drei Klassen die Eingangsbilder zusammen mit der Darstellung der Grad-CAM gezeigt.

In den einzelnen Bildunterschriften ist zudem die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der das Netz dieses Beispiel in der jeweiligen Klasse vermutet. Es sind Beispiele gewählt, die sehr ähnliche Eingangsbilder haben. Sie weisen keine eindeutigen Merkmale auf, anhand derer eine Unterscheidung möglich scheint. Mit der Grad-CAM Methode werden die Bereiche gezeigt, die den größten Einfluss im jeweiligen Beispiel auf die Klassifizierung haben. Für die Läsion, die *kaum sichtbar* (□) ist, scheinen die wichtigen Regionen kleine abgegrenzte Bereiche zu sein (Abb. 6.40a). Die hohen Werte, in Rot dargestellt, verteilen sich granulär über das ganze Bild. Für die Läsion der Kategorie



**Abbildung 6.39: Trainingsverlauf**

Die Genauigkeit (blau) und der Loss (rot) des Trainingsdatensatzes sind während des Trainingsprozesses über die Zeit aufgetragen. Am Ende jeder Epoche sind außerdem Loss und Genauigkeit des Validierungsdatensatzes gezeigt, der denen der Trainingsdaten gut folgt.

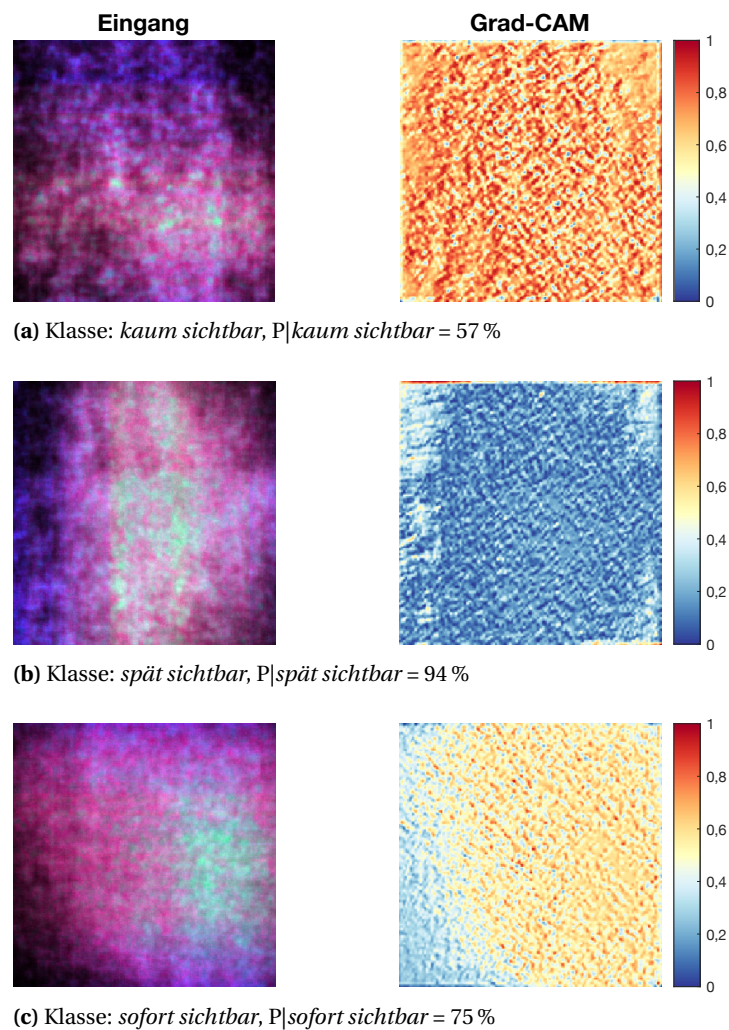
*spät sichtbar* (■) scheint kein spezieller Bereich einen besonderen Einfluss auf die Klassifizierung zu haben, denn die ganze Grad-CAM Karte ist homogen blau (Abb. 6.40b). Einzig am oberen und unteren Rand sind hohe Werte zu sehen, was darauf hindeuten könnte, dass hier ein Artefakt detektiert wird. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass nur bei einer Klasse bestimmte Artefakte in den Eingangsdaten entstehen. Bei weiteren Beispielen dieser Klasse sind ebenfalls höhere Werte in schmalen Bereichen am Rand in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten. Die Grad-CAM Karte ist für fünf weitere Beispiele in Abbildung A1b im Anhang gezeigt. Die dritte Beispielläsion der Kategorie *sofort sichtbar* (■) (Abb. 6.40c) zeigt eine deutlich homogenere Grad-CAM Karte, es gibt vereinzelt sehr hohe Werte. In der Mitte der Bestrahlung und vor allem zum Rand hin nehmen die Werte bedeutend ab. Es ist ein Zusammenhang der Grad-CAM Karte mit der Specklebewegung zu erkennen. Bewegen sich die Speckle wenig, oder sehr gerichtet, gibt es deutlich abgegrenzte Bereiche in den Aktivitätskarten, wo die Aktivität hoch ist und große Bereiche die aufgrund der geringen Aktivität dunkel bleiben (siehe Abb. 4.14b und die entsprechende Animation). Je mehr sich die Speckle, vor allem ungerichtet, bewegen umso homogener wird die Aktivitätskarte (siehe Abb. 4.14c), was sich auch in der Grad-CAM Karte widerzuspiegeln scheint.

Deutlicher wird dieser Zusammenhang an den *ex-vivo* Daten, für die das gleiche Netz ebenfalls trainiert wurde. Abbildung A2 im Anhang verdeutlicht, dass die Grad-CAM Karte ebenso wie die Eingangsaktivitätskarte immer homogener wird, je größer der Schaden ist. Bei *kein Schaden* (○) zeigt sich hingegen eine granuläre Struktur. Für die *ex-vivo* Daten erreicht das Netz nahezu perfekte Performanz in Trainings- und Validierungsdatensatz.

### 1. Feedbackmöglichkeiten anhand von Aktivitätskarten

Um die Klassifizierung des Netzwerkes als Echtzeit-Feedback nutzen zu können, müssen nach jedem Frame die drei Aktivitätskarten erzeugt, durch das trainierte Netz propagiert und klassifiziert werden. Die Softmax Schicht des Netzes gibt ein Array mit den Wahrscheinlichkeiten bzw. Sicherheit aus, mit der das Netz das jeweilige Eingangsbild in jede der 3 Klassen einsortiert. Diese können als Funktion der Zeit genutzt werden, um Grenzwerte zu definieren, ab denen stärkerer Schaden eintritt. Der Verlauf dieser Wahrscheinlichkeiten über die Bestrahlungszeit und darüber hinaus ist in Abbildung 6.41 dargestellt. Es sind die gleichen Läsionen, wie in Abbildung 6.37 gezeigt, wo deutlich wurde, dass die klassischen Algorithmen zwar Bewegung detektieren können, diese allerdings nicht zu Klassifizierung genutzt werden kann.

Abbildung 6.41 zeigt, dass die Klassifizierung zumindest nach der Bestrahlung, mit der beobachteten Sichtbarkeit übereinstimmt, dennoch scheinen diese Wahrscheinlichkeiten im

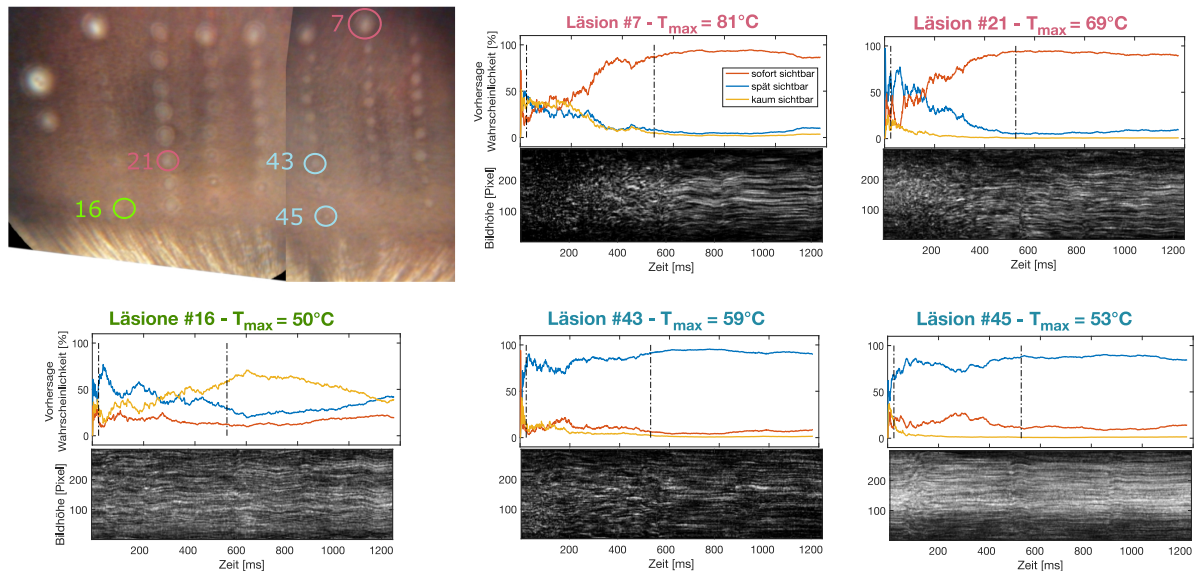


**Abbildung 6.40: Eingangsbild und Grad-CAM für die drei Klassen**

(a) *kaum sichtbar*, (b) *spät sichtbar* und (c) *sofort sichtbar*. Die jeweilige Wahrscheinlichkeit gibt an, mit welcher Sicherheit das Netz dieses Beispiel in der jeweiligen Klasse vermutet.

aktuellen Zustand noch nicht als Dosimetrieparameter geeignet. So wird z.B. bei Läsion #16, bis etwa zur Hälfte der Bestrahlungszeit *spät sichtbar* (▣) vorhergesagt und erst nach etwa 250 ms hat die Klasse *kaum sichtbar* (□) die höchste Wahrscheinlichkeit, obwohl ein Wechsel der Schadensklassen in dieser Richtung theoretisch nicht möglich sein sollte. Die Grad-CAM Karten zeigen Ähnlichkeiten, gerade zwischen den Klassen *kaum sichtbar* (□) und *spät sichtbar* (▣), es kann möglich sein, dass gerade diesen beiden Kategorien nicht gut trennbar sind. Die Genauigkeit der Vorhersage, gerade am Anfang, verbessert sich allerdings, je mehr augmentierte Daten zum Training genutzt werden. Ein größerer echter Datensatz würde die Präzision wahrscheinlich noch weiter erhöhen.

Anhand der Zeitverlaufs-Specklemuster ist schwer einschätzbar, ob der Übergang von frühen zu späten Schaden zum korrekten Zeitpunkt passiert. Man würde allerdings die Überschneidung der Kurven, bzw. ein Anstieg der Wahrscheinlichkeit für *sofort sichtbar* (■) über 50 % bei Spot 7 aufgrund der höheren Endtemperatur zeitlich eher erwarten als bei Spot 21. *Ex vivo* scheint es besser zu funktionieren den Übergang von *RPE-Schaden* (☉) zu *Weißfärbung* (●) mit der Änderung im Zeitverlaufs-Specklemuster in Verbindung zu bringen und korrekt vorherzusagen (Abb. A3 im Anhang).



**Abbildung 6.41: CNN Vorhersagen als mögliches Echtzeit-Feedback anhand von fünf Beispielen**

Im Fundusfoto sind dieselben 5 Beispielläsionen wie zuvor bei verschiedener Sichtbarkeit markiert. Für jede Läsion wird zu jedem Zeitpunkt die aktuelle Aktivitätskarte durch das trainierte CNN propagiert, welches drei Wahrscheinlichkeiten ausgibt. Diese repräsentieren die vorhergesagte Klassenzugehörigkeit und sind über die Zeit geplottet. Zusätzlich ist erneut für jede Läsion das Zeitverlaufs-Specklemuster gezeigt.

## 2. Übertragbarkeit des Netzes

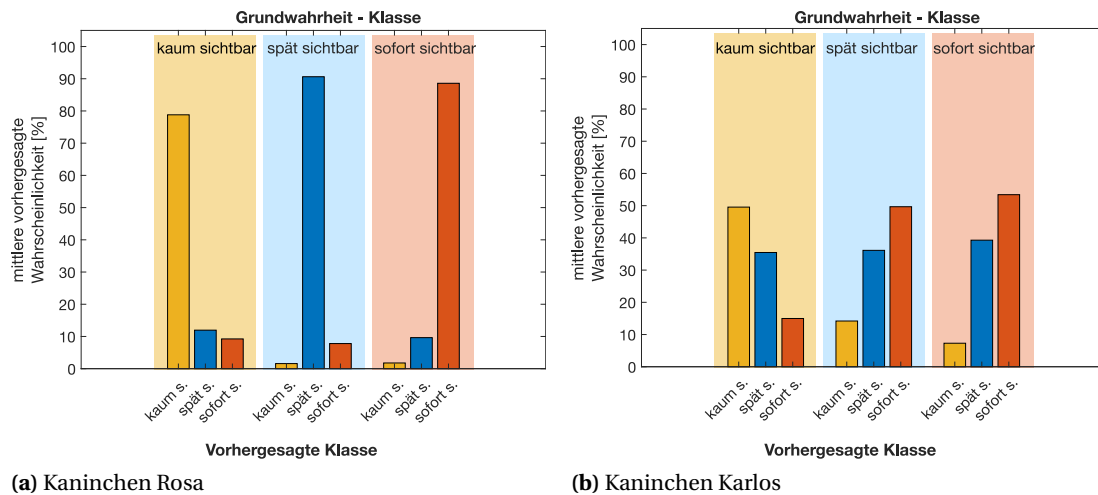
Das bisher gezeigte Verfahren hat eine entscheidende Schwachstelle: Aufgrund der geringen Datenlage wurden pro Läsion 5 Aktivitätskarten an verschiedenen Stellen erzeugt. Die Gesamtheit dieser pseudo-augmentierten Daten zusammen mit den tatsächlich augmentierten (rotierten) Daten wurde in Trainings- und Validierungsset aufgeteilt. Nun könnten die Unterschiede der Aktivitätskarten, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung als Netz-Eingang genutzt wurden, so gering sein, dass sich die Daten in Trainings- und Validierungsdatensatz zu stark ähneln. Damit ist die Aussagekraft der Generalisierbarkeit, aufgrund der hohen Genauigkeit des Validierungssets, etwas zweifelhaft.

Aus diesem Grund wurde eine erneute Validierung mit Daten von einem weiteren Kaninchen (Karlos, siehe Tab. 6.2) vorgenommen. Es wurden die Aktivitätskarten am Ende der Bestrahlung von 42 auswertbaren Spots aus 3 Versuchstagen von 2 Augen durch das trainierte Netz propagiert. Ein Großteil der Läsionen wurden als Marker appliziert, daher teilen sich die auswertbaren Spots ungleich wie folgt auf die 3 Sichtbarkeitsklassen auf:

Klasse	Anzahl
nicht/kaum sichtbar (□)	1
spät sichtbar (▣)	6
sofort sichtbar (■)	35

Es wird eine Genauigkeit der Klassifizierung von 73,81 % erreicht, was in Anbetracht der geringen Datenmenge doch zunächst einmal für eine zufriedenstellende Generalisierbarkeit spricht.

Das Netz gibt für jeden Spot die Wahrscheinlichkeiten für die Zugehörigkeit zu allen 3 Klassen aus. Diese sind gemittelt innerhalb der Grundwahrheits-Schadensklassen in Abbildung 6.42 als Balkendiagramm dargestellt.



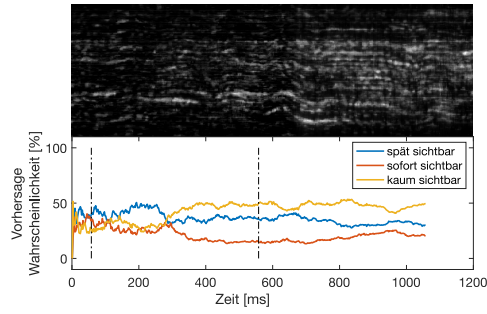
(a) Kaninchen Rosa

(b) Kaninchen Karlos

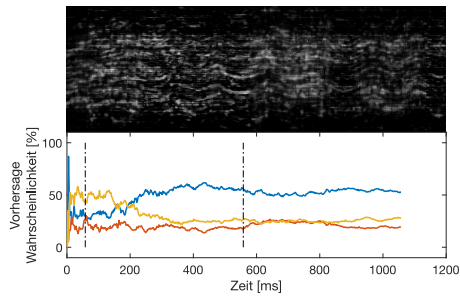
#### Abbildung 6.42: Mittlere vorhergesagte Wahrscheinlichkeiten aller Spots einer Klasse

Für alle Läsionen, die in eine Klasse gehören, ist die mittlere Wahrscheinlichkeit geplottet, die das Netz für jede mögliche Klasse vorhersagt. (a) Kaninchen Rosa: Das Netz wurde mit diesen Daten trainiert. Die mittlere vorhergesagte Wahrscheinlichkeit stimmt sehr gut mit der tatsächlichen Klasse überein. (b) Kaninchen Karlos: Die Daten von diesem Tier waren nicht im Trainingsdatensatz. Die mittlere vorhergesagte Wahrscheinlichkeit stimmt nur in zwei Klassen mit der tatsächlichen Klasse überein, mit Wahrscheinlichkeiten nur knapp über 50 %.

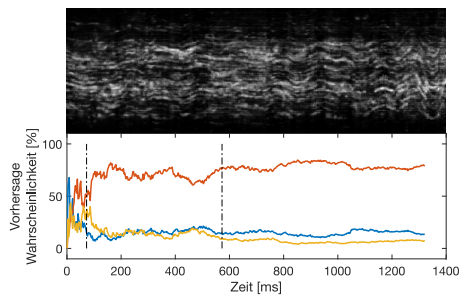
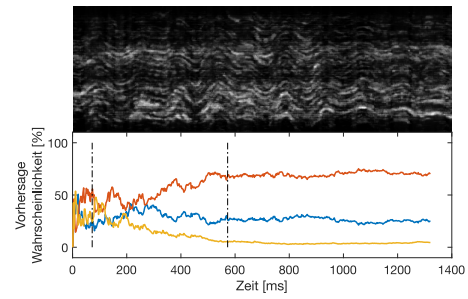
Im Vergleich zu Kaninchen Rosa (auf dessen Daten das Netz trainiert wurde), sind zum einen die Wahrscheinlichkeiten insgesamt deutlich kleiner, das heißt, das Netz kann die meisten Läsionen nicht eindeutig zuordnen und zum andern werden die meisten *spät sichtbaren* (▣) Läsionen der Klasse *sofort sichtbar* (■) zugeordnet. Allerdings sind schon in den Zeitverlaufs-Specklemustern von Kaninchen Karlos kaum Bewegungen sichtbar (Abb. 6.43). Diese Aufnahmen wurden mit einer im Vergleich zu Kaninchen Rosa geringeren Bildrate von 500 fps und 400 fps aufgenommen, da die Beleuchtungsleistung in diesen Messreihen nur maximal 1,3 mW – 1,4 mW betrug. Abbildung 6.43 zeigt Zeitverlaufs-Specklemuster zusammen mit den vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten der Klassenzugehörigkeit über die Zeit aufgetragen an 5 Beispielen. An diesen wird sichtbar, dass zunächst die globalen Bewegungen nicht ausreichend korrigiert worden sind. Für Kaninchen Karlos scheint die Unterscheidung zwischen *später* (▣) und *sofort sichtbaren* (■) Läsionen schwierig, was möglicherweise aber auch an inkorrekten Labeln liegt. Insgesamt waren nur sehr wenige der Läsionen in den Versuchsreihen von Kaninchen Karlos auswertbar, da aufgrund der geringen Beleuchtungsleistung die Bildaufnahmezeit vermutlich nicht ausreichend war. Durch den Austausch des Beleuchtungslasers, konnten nach Bestrahlungsreihe 5 deutlich höhere Leistungen und damit auch Bildraten erzielt werden.



(a) *kaum sichtbar*



(b) *spät sichtbar*



(c) *sofort sichtbar*

**Abbildung 6.43: Beispiele für die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten**

Die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten sind als Funktion der Zeit für Beispiele des Kaninchens Karlos zusammen mit dem jeweiligen Zeitverlaufs-Specklemuster gezeigt. (a) *kaum sichtbar* (b) *spät sichtbar* (c) *sofort sichtbar*.

## 6.6 Diskussion

Ziel in diesem Teil der Arbeit war die Untersuchung temperaturinduzierter Änderungen von retinalem Gewebe während der Hyperthermie und Photokoagulation mittels Specklevideografie. Es wurden die Möglichkeiten untersucht, Veränderungen der Speckle während der Bestrahlung zur Dosimetrie zu verwenden. An umfangreichen *ex-vivo* Bestrahlungsreihen wurden bestrahlungsinduzierte Speckleänderungen mit Zellschäden, ophthalmoskopischer Sichtbarkeit und optoakustischen Temperaturmessung verglichen. Der Einfluss verschiedener Bestrahlungsparameter auf die Specklebewegung wurde untersucht.

Es folgten erste *in-vivo* Messungen an Kaninchenaugen, bei denen ebenso temperaturbedingte Gewebeveränderungen detektiert und mit ophthalmoskopischer Sichtbarkeit sowie optoakustischer Temperatur verglichen wurden.

### 6.6.1 Aufbau

Specklekorrelationstechniken werden schon seit Jahrzehnten zur Messung thermischer Belastung in technischen Materialien eingesetzt. In biologischen Proben werden vor allen Specklekontrasttechniken häufig genutzt, um Gewebepfusion zu visualisieren; in Bezug auf die Retina lassen sich bisher nur vereinzelt Studien finden, die thermische Effekte mittels reiner Specklefotografie untersuchen. KIRKPATRICK *et al.* [2019] haben Zusammenhänge der zeitabhängigen Speckle-Kreuzkorrelation, sowie der momentanen und kumulativen Speckle-Verschiebung mit der Temperatur gefunden. Diese Studie nutzt allerdings kein biologisches Gewebe und Bestrahlungszeiten von mehreren Sekunden, was deutlich über den üblichen Bestrahlungszeiten der Photokoagulation liegt. Diese Studie zeigt bisher also lediglich, dass eine Korrelation der Speckleänderung mit der erzielten Temperatur möglich sein sollte. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen mittels OCT während der Photokoagulation unterstützt. Hier konnten temperatur- und koagulationsbedingte Phasenänderungen detektiert werden [MÜLLER *et al.*, 2012] und sogar Speckle als Träger dieser Information genutzt werden [KUROKAWA *et al.*, 2015].

Der hier vorgestellte Aufbau ermöglicht erstmals die realitätsnahe Detektion von Specklebewegung *ex-vivo* in enukleierten Schweineaugen und *in-vivo* an Kaninchenaugen während der Koagulation mit einer Spaltlampe. Das System ermöglicht die Aufnahme von Specklemustern mit einer Bildrate von 1000 Hz. In den gezeigten Messungen ist diese Bildrate ausreichend, um bestrahlungsbedingte Bewegung zu detektieren, sowohl *translatorische* als auch *boiling* Speckle konnten detektiert werden. Auch bei kurzen Bestrahlungsdauern von 50 ms ist die Bildrate ausreichend, um koagulationsbedingte Speckleänderungen zu extrahieren. Einzig bei sehr starken Läsionen scheinen die Speckle zu verschwinden, da sie sich zu schnell bewegen, was aber problemlos zu detektieren ist und somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Dosimetrie hat.

Bei nicht ausreichender Bildrate besteht die Möglichkeit, die Aufnahmegeschwindigkeit zu erhöhen, z.B. auf 3 kHz bei reduzierter Auflösung von 640x100 Pixel. Die vorgestellten Algorithmen sind hier noch problemlos in der Lage die Specklebewegungen auszuwerten. Als problematisch könnte sich ein verringertes SNR in den Bildern erweisen, wenn die Belichtungszeit abnimmt. Die Beleuchtungsstärke zur Speckleerzeugung wird durch mögliche Schäden an der Netzhaut begrenzt. Für die verwendete Bestrahlungsstärke wurde gezeigt, dass keine Schäden des Beleuchtungslichtes zu erwarten sind. In mehreren Augen war kein im Fluoreszenzmikroskop sichtbarer RPE-Schaden nachweisbar (siehe Abb. 6.16a), was nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass es keine Veränderungen in den Zellen gibt. Allerdings ist auch keine temperaturbedingte Specklebewegung zu beobachten (siehe Abb. 6.16b), das heißt eine Temperaturerhöhung durch den Beleuchtungslaser ist nicht detektierbar. Folglich können die beobachteten Bewegungen dem Behandlungslaser zugeschrieben werden. Mit Temperaturrechnungen kann die Temperaturerhöhung durch den Beleuchtungslaser

auf etwa 1,4 K bei 855 nm und 3,5 K bei 633 nm abgeschätzt werden. Erst bei einem optoakustisch gemessenen Temperaturunterschied von 7 K, sind deutliche Änderungen im Specklessignal zu sehen, vereinzelt auch schon bei 4 K.

### 6.6.2 Korrelation der Specklebewegung und der Temperatur

Die *ex-vivo* aufgezeichneten Verläufe der Specklebewegung stimmen gut mit den theoretischen Überlegungen und auch den Simulationen überein, sowohl das Zeitverlaufs-Specklemuster als auch die Zeitverläufe betreffend.

Zu Beginn der Laserexposition steigt die Temperatur im Gewebe schnell an und konvergiert langsam über die Zeit der Bestrahlung gegen die Gleichgewichtstemperatur. Entsprechend des stärksten Temperaturgradienten ist auch die Gewebewegung zu Beginn am größten und stellt sich im Wesentlichen als gerichtete laterale Bewegung der Speckle dar. Nach der initialen Bewegung bleiben die Speckle während der Bestrahlung statisch und folgen der Gewebewegung nach Ende der Bestrahlung erneut als gerichtete Speckleänderung bei der Abkühlphase. Koagulation wurde in den Experimenten durch Zellschaden im Lebend-Tod-Assay nachgewiesen. Dieser Zellschaden geht mit einer zweiten ungerichteten Bewegung der Speckle einher, wie in Abbildung 6.17 und 6.19 an Beispielen verdeutlicht ist. Beim Eintreten von Koagulation kommt es neben der temperaturbedingten Ausdehnung des Gewebes auch zu strukturellen Änderungen im Gewebe. Einzelne Streueranteile bewegen sich zufällig und Streueigenschaften verändern sich, was anstelle gerichteter Specklebewegung, *boiling* Speckle zur Folge hat, wie in Kapitel 4.2.2.3 beschrieben. Die Amplitude der ungerichteten Bewegungskomponente und auch der Zeitpunkt zu dem sie einsetzen, skaliert mit dem erzielten Gewebeschaden (siehe Abb. 6.18). Das heißt je zeitiger und je stärker die Koagulation einsetzt, umso größer ist die Summe der Specklebewegung, die sehr gut mit der optoakustisch gemessenen maximalen Temperatur für Läsionen oberhalb der Grenze für *RPE-Schaden* korreliert. Im Vergleich zum initialen Peak, der durch die thermoelastische Expansion des Gewebes hervorgerufen wird, hat die zweite koagulationsbedingte Specklebewegung den Hauptanteil an der Summe der Specklebewegung.

Unterhalb der Zellschadens - oder Sichtbarkeitsgrenze, also bei rein thermoelastischer Expansion, korreliert eine höhere Temperatur nicht zwangsläufig mit der stärkeren Specklebewegung, da der initiale Peak, der hauptsächlich eine gerichtete Specklebewegung repräsentiert, nicht nur von der Temperaturänderung, sondern ebenso vom Defokus abhängt. In Abbildung 6.20 sind alle *F*-Scores unterhalb der Sichtbarkeitsgrenze fast gleich. Erst bei etwa 40 mW steigen die *F*-Scores mit der Temperatur an. Der Einfluss des Defokus wurde durch Simulationen bestätigt (siehe Abb. 6.21). Eine direkte Bestimmung der erzielten Temperatur im Gewebe ist also nicht möglich, solange der Defokus nicht quantifiziert werden kann. Der Einfluss des Defokus wird in einem kommenden Unterkapitel der Diskussion noch einmal genauer beleuchtet.

### 6.6.3 Optimierung der Algorithmenparameter

Unabhängig vom Defokus, der bei allen Messungen nicht auszuschließen und vermutlich auch unterschiedlich war, zeigten alle drei Algorithmen mit ihren jeweiligen optimalen Parametern ähnlich gute Vorhersagen für die Schadensklasse der Läsionen *ex-vivo*, wobei der ZSM-Algorithmus am besten funktioniert hat. Alle Algorithmen sind besser geeignet als die applizierte Leistung, den korrekten Schaden vorherzusagen. Dies unterstützt die These, dass die Pigmentierungsunterschiede innerhalb und zwischen Augen so groß sind, dass rein anhand der Bestrahlungsleistung bei sonst konstanten Bestrahlungsparametern kein reproduzierbares Ergebnis erzielt werden kann. Im Auge des Patienten wird sich der Effekt wohl noch verstärken, da die Transmission des Auges (Katarakt) noch stärker variieren kann.

Die Parametersuche hat gezeigt, dass es sinnvoll ist, zwei verschiedene Algorithmen bzw. Parametersätze zur Unterscheidung der drei Schadensklassen zu nutzen, da abhängig vom erzielten Schaden unterschiedliche Merkmale in den Signalen zu finden sind und extrahiert werden. Den größten Einfluss auf die Performanz hat die Größe der temporalen Nachbarschaft und der Offset, der zur Berechnung des Zeitverlaufs genutzt wird. Diese beiden Parameter bestimmten, ob eher langsame oder schnelle Bewegungen detektiert werden. Durch die Beobachtung der Speckleänderung in einer großen Nachbarschaft bzw. über einen größeren Zeitbereich werden langsame Bewegungen detektiert. Dies ist von Vorteil, um die langsame Bewegung der gerichteten Speckleänderung bei reiner thermoelastischer Ausdehnung von der schnelleren Specklefluktuation bei einsetzender Koagulation, also *RPE-Schaden* (☉) zu unterscheiden.

Zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (☉) und *Weißfärbung* (●) kommt es auf die Detektion von Unterschieden in der schnelleren, koagulationsbedingten Bewegung an. Hier stellen sich kleinere zeitliche Nachbarschaften als geeigneter heraus, da sie die schnellen Bewegungen besser auflösen können.

Der Datensatz wurde zusätzlich zu dem Label basierend auf Lebend-Tod-Assay und ophthalmoskopischer Weißfärbung noch einmal manuelle anhand des visuellen Eindrucks der Specklebewegung kategorisiert. Mit diesen manuellen Labeln steigerte sich die Performanz der Algorithmen um etwa 2 % bezüglich der AUC. Die AUC von über 98 % belegen, dass die Algorithmen wie erwartet zuverlässig die verschiedenen Specklebewegung unterscheiden können.

Die leicht geringere Performanz der Algorithmen bei der Analyse der Daten basierend auf Fluoreszenzbildern und ophthalmoskopischer Sichtbarkeit, könnte daher durch Fehler beim Labeling der Daten zu erklären sein. Inkorrekte Label einzelner Läsionen können durch den Experimentator verursacht sein, da eventuelle sehr schwache Weißfärbung nicht direkt nach der Bestrahlung durch die Spaltlampe identifiziert werden konnten. Moderate Läsionen entwickeln teilweise auch erst in den Minuten nach der Bestrahlung die typische Weißfärbung [KÖINZER *et al.*, 2012]. Ein weiterer Einfluss kann das unterschiedliche Verhalten der Augen auch im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Bestrahlung sein. Die Beobachtungen während der Experimente haben gezeigt, dass mit zunehmendem Zeitraum zwischen der Entnahme der Augen und der Durchführung der Bestrahlungsreihen die benötigte Energie, um Zellschäden zu verursachen, anstieg. Auch bei anhaltender Kühlung der enukleierten Augen löst sich mit der Zeit die neuronale Netzhaut immer stärker vom RPE ab, was die Rückstreuung erhöht und die in RPE und Choroid deponierte Energie verringert. Die Analyse von falsch klassifizierten Läsionen hat gezeigt, dass viele dieser meist aus demselben Auge stammen, was vermuten lässt, dass es tatsächlich strukturelle Veränderung in diesem Auge gibt, welche die detektierte Specklebewegung beeinflussen können.

Eine weitere Unsicherheit wird durch die Beobachtung der Zellschäden im Fluoreszenzbild von Läsionen der Klasse *leichter RPE-Schaden* (☉) deutlich. Die Specklebewegungen dieser Läsionen zeigen nur die rein thermoelastische Komponente und ist zumindest teilweise reversible, genau wie bei Läsionen der Klasse *kein Schaden* (○). Im Fluoreszenzbild sind allerdings schon Veränderungen sichtbar. Die Zellmembran scheint zwar noch intakt zu sein, die Zellen grenzen sich noch deutlich

voneinander ab und sind in den Zellverbund integriert, allerdings ist die Fluoreszenz im Vergleich zu angrenzenden unbestrahlten Arealen deutlich reduziert (rot umrandet in Abb. 6.17b). Vermutlich wurde die Umwandlung von Calcein AM in Calcein eingeschränkt, was ein Hinweis auf reduzierte Zellaktivität oder teilweise permeable Zellmembranen, vermutlich ausgelöst durch die erhöhten Temperaturen, sein kann. Das heißt, auch wenn keine koagulativen Effekte eine makroskopische Gewebeveränderung während der Bestrahlung bewirken, besteht die Möglichkeit einer Reaktion der RPE-Zellen auf die erhöhten Temperaturen, was im Calcein-Vitalitäts-Assay sichtbar sein könnte.

Die Analyse der falsch klassifizierten Läsionen zeigt weiterhin, dass eine Signalvalidierung unabdingbar ist. In diesem Validierungsschritt müssen Läsionen, die entweder keine temperaturbedingte Bewegung aufweisen oder deren Bewegung durch unzureichend korrigierte globale Bewegungen überlagert wird, von der Analyse ausgeschlossen werden. Im Falle eines Dosimetriesystems müsste in solchen Fällen direkt abgeschaltet werden, da der Algorithmus bei diesen Läsionen keinen Schaden identifizieren kann, obwohl dieser vorliegt. Es könnte z. B. innerhalb eines definierten Zeitraumes nach Einschalten des Lasers nach einem eindeutigen Anstieg der Specklebewegung gesucht werden, um zu garantieren, dass temperaturbedingte Bewegungen vorhanden sind.

## 6.6.4 Einfluss der Bestrahlungsparameter

### 6.6.4.1 Bestrahlungsdauer und Fleckgröße

Es konnte kein Einfluss von Bestrahlungsdauer und Fleckgröße auf die Performanz der Algorithmen oder auf die subjektive Specklebewegung festgestellt werden. Die gefundenen Grenzwerte variieren leicht, gerade bei unterschiedlichen Fleckgrößen ist der Bereich, in dem sich Speckle bewegen, verschieden groß und kann sich potenziell auf die Auswertung auswirken. Neben der größeren radialen Ausdehnung bei größeren Fleckdurchmessern ist auch der axiale Wärmefluss größer und thermische Effekte treten auch in tieferen Schichten auf. Da Speckle nicht nur durch die Reflexion an der Oberfläche der Retina, sondern auch durch Streuung aus dem Gewebe heraus entstehen, können auch Bewegungen tieferer Schichten einen Einfluss je nach Eindringtiefe des BeleuchtungsLasers haben. Gerade für lange Bestrahlungsdauern von 500 ms scheint dieser Effekt vernachlässigbar zu sein, da die Grenzwerte zur Trennung der Klassen unabhängig von der Fleckgröße sehr ähnlich sind (siehe Abb. 6.31).

Verschiedene Fleckdurchmesser stellen also keine Limitierung dieser Messmethode dar und die leicht unterschiedlichen Grenzwerte könnten durch eine Skalierung eben dieser für die verschiedenen Parameter der Bestrahlung berücksichtigt werden. Auch bei kürzeren Bestrahlungsdauern bis zu 50 ms ist keine Verschlechterung der Algorithmen zu erkennen. Wie zuvor gezeigt, haben allerdings die Parameter der Auswertalgorithmen, die bestimmen, ob langsame oder schnelle Bewegungen detektiert werden, den größten Einfluss auf die Performanz. Dies bedeutet, dass eventuell eine weitere Anpassung der Algorithmenparameter an die verkürzte Bestrahlungsdauer bei gleichbleibender Bildrate vorteilhaft sein könnte.

### 6.6.4.2 Wahl der Blendengröße / Specklegröße

Größere Blenden und damit kleinere Speckle scheinen vorteilhafter zu sein. Zumindest für die Unterscheidung von *RPE-Schaden* (☉) und *Weißfärbung* (●) zeigt der Algorithmus bei einer Blende von 5 mm eine signifikant schlechtere Performanz (siehe Abb. 6.32) mit einer über 10 % geringeren AUC im Vergleich zu den anderen Blendengrößen von 9 - 12 mm. Das birgt zusätzlich den Vorteil, dass mehr Licht auf die Kamera trifft und höhere Bildraten möglich sind. Für kleine Blenden nimmt die Lichtintensität am Sensor bei gleicher eingestrahelter Leistung ab. Die Vignettierung scheint bei kleineren Blenden stärker und die Speckle in den Randbereichen sind dunkler, was das gesamte Specklemuster verkleinert. Das hat zur Folge, dass auch nur in einem kleineren Bereich Bewegung detektiert werden kann.

Ein kleinerer auswertbarer Bereich sorgt weiterhin dafür, dass die Bewegungskorrektur nicht optimal funktionieren kann, da diese die globalen Specklebewegungen in den Randbereichen analysiert, in denen die Speckle nahezu verschwinden.

#### 6.6.4.3 Wahl der Wellenlänge

Die Wahl der Wellenlänge hat auf die reine Specklebewegung *ex-vivo* einen geringen Einfluss. Allerdings gibt es starke Unterschiede in der Rückstreuung. Bei 633 nm konnte eine höhere Rückstreuung beobachtet werden, was sich besonders im Zeitverlauf des GD-Algorithmus niederschlägt, da dieser eher die Änderung der Pixelwerte auswertet und nicht die reine Bewegung der Speckle. Aber auch die Auswertung der Gesamtintensität am Sensor zeigt eine deutliche Zunahme für starke Läsionen mit Weißfärbung. BIRNGRUBER *et al.* [1977] und INDERFURTH *et al.* [1994] hatten bereits gezeigt, dass im Kaninchenauge die Zunahme des zurückgestreuten Lichts als Maß für die einsetzende Weißfärbung und den Gewebeschaden genutzt werden kann. Auch im Patienten [INDERFURTH *et al.*, 1995] konnten Reflexionskurven aufgezeichnet werden und ein Zusammenhang zwischen Energiedichte auf der Retina und dem initialen Anstieg und der Latenzzeit der Reflexion gezeigt werden. Allerdings führten Bewegungen zu einer Veränderung der Reflexionskurven, sodass sie ihren charakteristischen Verlauf verlor. In diesen Studien wurde kein zusätzlicher Beleuchtungslaser eingesetzt, sondern direkt die Behandlungslaserstrahlung für die Reflexionsmessungen genutzt, wobei argongrüne (514 nm), gelbe (577 nm) und rote (630 nm) Laser verwendet wurden. Bei Wellenlängen im infraroten Bereich konnte allerdings in den hier gezeigten Experimenten keine erhöhte Rückstreuung festgestellt werden. Weder der Zeitverlauf des GD-Algorithmus zeigt den deutlichen Einfluss der Rückstreuung, der bei Bestrahlung mit 633 nm den Zeitverlauf dominiert (siehe Abb. 6.34). Noch ist eine deutliche Veränderung der normierten Gesamtintensität des Specklemusters zu beobachten (Abb. 6.35). Auch bei OCT-Messungen konnte im nahen Infrarot *in-vivo* keine Zunahme der Streuung beobachtet werden [MÜLLER, 2013]. Das infrarote Licht scheint also nicht so sensitiv für die veränderten Streueigenschaften in der Retina nach thermischen Schäden zu sein.

Für die Specklevideografie wären prinzipiell beide Wellenlängen geeignet, da die erhöhte Rückstreuung nur ein zusätzliches, aber nicht das alleinige Signal ausmacht, das ausgewertet wird und für unerschwerliche Läsionen auch nicht nutzbar ist. Im Falle der Specklevideografie hat die Wellenlänge allerdings noch einen weiteren Einfluss. Das Specklemuster entsteht nicht nur durch Reflexion an der Retinoberfläche, sondern auch zurückgestreutes Licht aus tieferen Schichten hat einen Anteil. Umso größer die Wellenlänge und damit die Eindringtiefe in das Gewebe ist, umso größer ist der Anteil der Bewegung oder Gewebeänderungen aus tieferen Schichten des Fundus an der gesamten Änderung des Specklesignals. Die *in-vivo* Versuche dieser Arbeit lassen vermuten, dass bei der Verwendung der Lichtquelle im nahen Infrarot der Einfluss des Blutflusses im Choroid sehr groß ist, da fast ausschließlich sehr schnelle ungerichtete Specklefluktuationen, aber keine temperaturinduzierte Specklebewegung detektiert werden konnten. Durch die Reduktion der Wellenlänge konnten diese Specklebewegungen reduziert werden und die Detektion temperaturbedingter Bewegungen und Gewebeveränderungen war möglich.

Das infrarote Licht hätte allerdings den Vorteil, dass es den Patienten nicht noch zusätzlich zwischen den eigentlichen Behandlungsläsionen blendet. Auch für den behandelnden Arzt wäre eine infrarote Beleuchtung vorteilhafter, da bei roter großflächiger Beleuchtung mit recht hoher Leistung das Beleuchtungslicht den Einblick in den Fundus überstrahlen würde, was allerdings auch durch den Einsatz von Filtern lösbar ist. Theoretisch wäre es auch denkbar, die Strahlung des Behandlungslasers im grünen Wellenlängenbereich zu nutzen, wodurch allerdings die Informationen der Abkühlphase verloren gingen. Diese ist jedoch nur in den grundlegenden Experimenten von Interesse und für ein potenzielles Dosimetriesystem nicht relevant. Entscheidender ist die fehlende Referenz vor der eigentlichen Bestrahlung, was aber ähnlich wie bei der optoakustischen Temperaturmessung mit Leistungskontrolle [BAADE *et al.*, 2017] mit einem kurzen Kalibrierungspuls ohne signifikante

Temperaturerhöhung vor der eigentlichen Koagulation gelöst werden könnte. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, den Laser dauerhaft auf einer geringen Leistung zu betreiben und nur für die Koagulation die Leistung zu erhöhen. Die Nutzung der Behandlungsstrahlung hätte den Vorteil, dass keine weiteren Grenzwerte für eine zusätzliche Beleuchtung eingehalten werden müssen und die Intensität am Sensor immer ausreichend groß ist. Dadurch wären weiterhin noch höhere Bildraten für die Aufnahme der Specklemuster möglich, da die Intensität dann auch für kürzere Integrationszeiten des Sensor ausreichend wäre. Ohne großflächige Ausleuchtung könnte auf der anderen Seite die jetzige Bewegungskorrektur nicht mehr durchgeführt werden.

### 6.6.5 *In-vivo* Messreihen

Auch im Kaninchenauge konnten mit Bildraten zwischen 500 Hz – 1000 Hz auswertbare Videos der Specklebewegung aufgenommen werden. Durch teilweise starke Schwankungen der Rückstreuung innerhalb eines Auges gab es Läsionen bei denen mit der oben genannten Bildrate und der damit einhergehenden Integrationszeit die Intensität am Sensor nicht ausreichend war, um die Specklemuster auszuwerten. Im Vergleich zur *ex-vivo* Situation gibt es deutlich mehr Rauschen. Atmung und Herzschlag verursachen Verschiebungen der ganzen Retina und sorgen für eine globale Bewegung des gesamten Specklemusters, die nicht in allen Fällen ausreichend korrigiert werden konnte. Neben der stärkeren globalen *translatorischen* Bewegungen gibt es auch deutlich mehr *boiling* Speckle (Abb. 6.36 mit zugehöriger Animation). Fasst alle Speckle haben entweder schnelle Fluktuationen in ihrer Helligkeit oder sie bewegen sich unabhängig von benachbarten Specklen ungerichtet um mehrere Pixel zwischen aufeinander folgenden Frames. Das aus dem Auge zurückgestreute Licht, das zur Bildung des Specklemusters beiträgt, wurde mehrfach im Gewebe gestreut und in aktiven biologischen Gewebe sorgen Bewegung und Veränderung der Streuer, hier vermutlich hauptsächlich verursacht vom Blutfluss, für einen Weglängenunterschied und somit zu einer Modulation der Speckle, die prinzipiell größer ist als in inaktiven Zellen *ex-vivo*.

Da in dieser Studie aber ein polarisierender Strahlteiler genutzt wurde, um einfallendes Licht vom reflektierten zu trennen, sollte das Licht, das den Sensor erreicht, weitestgehend polarisiert sein. Das polarisierte eingestrahlte Licht würde allerdings im Gewebe seine Polarisation verlieren und wird daher gegenüber dem von der Oberfläche reflektierten Licht abgeschwächt. *Boiling* Speckle aufgrund des aktiven Gewebes sollten somit zumindest reduziert sein, da ein Teil davon den polarisierenden Strahlteiler nicht passieren kann. Der Einfluss der Polarisation auf die aufgezeichneten Specklesignale wurde in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

Nicht nur die starken Specklefluktuationen, die bereits ohne die Bestrahlung des Gewebes auftreten, auch die temperaturinduzierte Specklebewegung unterscheidet sich *in-vivo*. Bei der Beleuchtungswellenlänge von 633 nm ist beim Ein- und Ausschalten des Lasers subjektiv eine Specklebewegung wahrnehmbar, auch bei Läsionen ohne Weißfärbung. Diese ist allerdings nicht so deutlich und zeigt nicht die beiden typischen Komponenten, die *ex-vivo* gut zu unterscheiden waren. Es gibt keine starke, schnelle, gerichtete Bewegung beim Einschalten des Lasers, sondern eher eine ungerichtete langsame. Das Ausschalten ist meist besser in der Specklesequenz zu beobachten (siehe Abb. 6.37 und zugehörige Animation). Auch die Analyse der Specklebewegung mit den Algorithmen, die *ex-vivo* eine gute Korrelation zum erzielten Schaden gezeigt haben, können kaum reproduzierbare Merkmale aus den Zeitverläufen extrahieren. Die Zeitverläufe zeigen zwar meist zu Beginn der Bestrahlung eine Änderung, die sich aber teilweise bei den verschiedenen Algorithmen unterschiedlich darstellt und sich oft auch nur geringfügig vom Rauschen abhebt. Wie auch bei der subjektiven Beurteilung der Specklesequenz tritt die Bewegung beim Ausschalten des Lasers auch im Zeitverlauf stärker hervor. Bei starken Läsionen (#7 in Abb. 6.37) ist eine erhöhte Rückstreuung mit dem GD-Algorithmus detektierbar, die deutlich mit der Helligkeitsänderung im Zeitverlaufs-Specklemuster übereinstimmt. Die erhöhte Rückstreuung war allerdings nur für starke Läsionen zu beobachten und nicht für alle Läsionen, die Weißfärbung verursacht haben. Einige Läsionen zeigen nach dem Abschalten des

Lasers weitere deutliche Peaks, die denen zum Zeitpunkt des Abschaltens ähneln. Die Ursache dieser Veränderungen konnte nicht geklärt werden. Biologische Veränderungen im Gewebe als Reaktion auf die Bestrahlung, wie z. B. eine Perfusionsänderung könnten eine mögliche Erklärung sein. Der Einfluss des Probelasers der parallelen optoakustischen Temperaturmessung kann allerdings weitestgehend ausgeschlossen werden, da der Probelaser selbst keinen nennenswerten Temperatur- bzw. Gewebeeffekt erzielen sollte und Strahlung des Lasers durch entsprechende Filter geblockt wurde und die Kamera nicht erreichen konnte.

Nichtsdestotrotz sind in den meisten Zeitverlaufs-Specklemustern deutlich Änderungen durch die Koagulation zu erkennen und daher wurde versucht, diese mit einem neuronalen Netz auszuwerten. Während die klassischen Algorithmen meist nicht besser als ein zufälliger Klassifikator (AUC zwischen 40 % und 70 %) bei der Trennung der drei Sichtbarkeitsklassen waren, konnten schon mit einem flachen Netzwerk Klassifizierungsgenauigkeiten von 99,88 % und 99,14 % in Trainings- und Validierungsdatensatz erreicht werden.

Aufgrund der geringen Datenmenge wurden zum Trainieren des Netzes Daten augmentiert. Diese Daten stammen nur aus einem Kaninchen und wurden sowohl im Trainings- als auch Validierungsdatensatz verwendet. Es besteht die große Wahrscheinlichkeit, dass die hohe Klassifizierungsgenauigkeit im Validierungsdatensatz nur durch die zu große Ähnlichkeit zum Trainingsdatensatz zustande kommt. Die Genauigkeit der Validierung bietet daher keine ausreichende Aussagekraft über die Generalisierbarkeit des trainierten Netzes. Aus diesem Grund wurde das Netz noch mit mehreren Messreihen eines weiteren Kaninchens, die nicht im Trainings- und Validierungsdatensatz enthalten waren, getestet. Es wurde eine Genauigkeit von 74 % erzielt, das heißt, das Netz ist in der Lage einige generalisierbare Eigenschaften zu extrahieren, obwohl die Genauigkeit in Vergleich zum ersten Tier deutlich nachlässt.

Es besteht der Verdacht, dass die Anzahl der Trainingsdaten unzureichend war und eine zu starke Korrelation zwischen den Trainings- und Validierungsdaten bestand. Die schlechte Signalqualität erschwert eine definitive Aussage über das Potenzial eines CNN zur Analyse der Specklebewegung *in-vivo*. Ein flaches Netz reicht für diese Anwendung vermutlich aus, da die ersten Schichten in einem Netz eher strukturelle Unterschiede lernen, wie im einfachsten Fall einen Kantenfilter. Da hier keine komplexen Objekte erkannt werden müssen, reichen scheinbar einige wenige Schichten. Diese flachen einfachen Netze haben den Vorteil, dass man alle Filter kennt und problemlos weiter analysieren und auch verschiedenartig implementieren kann.

Trotz der deutlich verbesserten Analysemöglichkeiten mittels CNN, bleibt die Frage bestehen, ob das Verhalten des Gewebes *in-vivo* dem *ex-vivo* ähnlich ist, lediglich überlagert von ungeordneter Specklebewegung und globalen Bewegungen oder von anderen Faktoren beeinträchtigt ist und deshalb schwer zu detektieren und zu analysieren ist. Biologische Vorgänge während der Bestrahlung könnten die eigentliche Gewebewegung beeinflussen.

## 6.6.6 Vergleich mit OCT-basierten Monitoring

Mittels OCT lassen sich tiefenaufgelöst Phasen und Amplituden des zurückgestreuten Lichtes messen und sie liefert mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung Informationen über Gewebeveränderungen. In Kapitel 2.4.2 wurden bereits verschiedene Studien vorgestellt, die mittels OCT Veränderungen der Retina während der Photokoagulation untersucht haben. Die Beobachtungen dieser Studien soll in der folgenden Diskussion helfen die beobachteten zwei-dimensionalen Specklebewegungen besser einzuordnen.

### 6.6.6.1 *Ex-vivo*

Mittels phasensensitiver OCT haben MÜLLER *et al.* [2012] bei unterschwelligem Läsionen keine Änderung der Streuung im B-Scan und auch keine histologischen Änderungen im Gewebe feststel-

len können. Allerdings konnten durch Bestimmung der Phasendifferenz Gewebeverschiebungen detektiert werden. Es wurde eine gute Übereinstimmung zwischen dem optoakustisch gemessenen Temperaturverlauf und der aus Phasendifferenzen bestimmten Gewebeverschiebung gefunden.

Diese Erkenntnisse passen gut mit den hier vorgestellten Ergebnissen zusammen. Auch hier konnte bei unterschwelligem Läsionen die Specklebewegung durch eine thermische Expansion erklärt werden. Aufgrund der Defokuseffekte kann bei der specklebasierten Methode die Specklebewegung nicht in eine Temperatur umgerechnet werden.

Bei überschwelligem Läsionen wurde in den OCT-Studien die Zunahme der mittleren Streuung in der Photorezeptorschicht, die Gewebeverschiebung sowie die Expansion als mögliche Dosimetrieparameter identifiziert, die in *ex-vivo* Studien an Schweineaugen maximal einen Youden-Index von 0,74 erreichen, um sichtbare und nicht sichtbare Läsionen zu unterscheiden [MÜLLER, 2013]. Basierend auf der Kombination der Sensitivität und Spezifität ist die hier vorgestellte Specklemethode mindestens genauso gut. Hier wurde ein Youden-Index zur Unterscheidung von sichtbaren zu nicht sichtbaren Läsionen von 0,79 erreicht und zur Unterscheidung von kein und RPE-Schaden einen Youden-Index von 0,88.

Die OCT-Studie gibt für die geringen Spezifitäten die fehlende ophthalmoskopische Sichtbarkeit für kleine Bestrahlungsfleckdurchmesser und kurze Bestrahlungszeiten an. Die hier vorgestellten Ergebnisse, haben gezeigt, dass thermische Effekte an RPE-Zellen *ex-vivo* schon unterhalb der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit auftreten. Für die OCT-Studie bedeutet dies wahrscheinlich eine höhere Falsch-Positiv-Rate, da Koagulation korrekt mittels OCT detektiert wird, aber das Label der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit noch negativ ist, was zu einer verringerten Spezifität führt. Das heißt der direkte Vergleich der Performanz der beiden Methoden als Dosimetrie ist hier nicht sinnvoll, da in den OCT-Studien nicht versucht wurde die Dosimetrie zu optimieren und auch eine volumetrische Messung an Stelle der zwei-dimensionalen Messung noch einmal deutlich verbesserte Ergebnisse liefern würde.

Es kann allerdings geschlussfolgert werden, dass *ex-vivo* die indirekte Messung der Phasen über die Veränderung der Speckle sehr gute und der OCT gleichwertige Daten für eine mögliche Dosimetrie liefert und dabei das einfachere Messverfahren darstellt. Es werden jedoch weniger Informationen geliefert. Die direkte Messung der Phasen mittels OCT liefert durch den unmittelbaren Zusammenhang Informationen über die thermische Expansion beziehungsweise die Gewebeänderungen durch thermische Denaturierung. Dieser direkte Zusammenhang ist bei der Messung der Specklefluktuation nicht gegeben und es ist schwierig physikalische Informationen zu extrahieren, was z. B. die schlechte Korrelation zur Temperatur bei unterschwelligem Läsionen zeigt.

Wie ebenfalls zuvor genauer erläutert, hat neben den Studien zur phasensensitiven OCT eine andere Gruppe versucht basierend auf der Specklebewegung im OCT B-Scan, Gewebewebungen während der Koagulation zu analysieren [KUROKAWA *et al.*, 2015]. Allerdings zeigten SPAHR *et al.* [2019], dass die in der Studie beobachteten inkonsistenten Specklebewegungen vermutlich aufgrund eines Defokus hervorgerufen wurden, der eigentlich axiale Bewegungen als laterale erschienen lässt.

Das Gleiche gilt für die detektierten Bewegungen der Speckle in dieser Arbeit. Simulationen und die *ex-vivo* Experimente zeigen, dass die Richtung der lateralen Specklebewegung von der Richtung des Defokus abhängig ist. In den Simulationen wurde weiterhin gezeigt, dass das Ausmaß der lateralen Bewegung auch sehr stark von der Größe des Defokus abhängt.

#### 6.6.6.2 *In-vivo*

Wie auch bei den hier gezeigten Ergebnissen sind bei der OCT die Dosimetrieparameter, die *ex-vivo* gefunden wurden, nicht auf die *in-vivo* Studien übertragbar [MÜLLER, 2013]. Ebenso wie in den OCT-Studien ist auch bei dem specklebasierten Monitoring, gerade bei einer Beleuchtung im nahen infraroten Bereich der Einfluss des Blutflusses und der Atmung groß. Durch statistische Auswertung und Entscheidungsbäume ließen sich trotzdem *in-vivo* in Kaninchenstudien eine Sensitivität von 1

und Spezifität von 0,88 bei Klassifizierung der ophthalmoskopischen Sichtbarkeit erreichen [ELLERKAMP, 2013], wobei das beste Ergebnis für das Verschwinden der Innen/Außensegment-Verbindung und die Änderung der Durchblutung in der Choroidea erzielt wurde. Der erste Parameter zeigt sich nicht in den Speckleaufnahmen. Möglicherweise ist der Zweite bereits erkennbar, jedoch könnten dafür höhere Abtastraten erforderlich sein.

Ebenso wie in dieser Arbeit hat die mittels OCT detektierte Verschiebung der Gesamtoberfläche der Retina stark abgenommen und die axiale Bewegung folgt bei unterschwelligem Läsionen nicht mehr der Temperatur. In dieser Arbeit wurden zwar Speckleänderungen detektiert, es ist aber kein eindeutiges Muster und auch kein Zusammenhang mit Temperatur oder ophthalmoskopischen Sichtbarkeit zu erkennen. Allerdings zeigten ebenso wie bei den OCT-Studien, dass anspruchsvollere Auswertalgorithmen anhand der scheinbar nicht geeigneten Rohdaten, möglicherweise akzeptable Performanz bei der Klassifizierung erreichen können. Allerdings fehlen bei beiden Studien eine ausreichende Validierung an unabhängigen Daten.

Die specklebasierte Dosimetrie wäre im Vergleich mit der OCT eine einfachere, aber vor allem preiswerte Alternative, wenn *in-vivo* zuverlässig Koagulation detektiert werden könnte. Die *ex-vivo* sichtbar gewordenen morphologische Änderung bei Therapieerfolg scheint es *in-vivo* nicht zu geben bzw. es gibt eventuell andere störende physiologische Effekte.

Wie auch bei der OCT stellen wahrscheinlich axiale Bewegungen eine Störquelle *in-vivo* dar. Bei der Specklefotografie wird es nicht möglich sein diese axialen Bewegungen zu korrigieren. Es besteht aber die Möglichkeit, durch eine andere Abbildungsgeometrie den Einfluss von axialen Bewegungen und auch des Defokus zu verringern, was im folgenden Kapitel genauer diskutiert wird.

### 6.6.7 Defokus und axiale Bewegung

In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen war ein Defokus auch bei akkurater Justage der Okulare vor jeder Bestrahlung und Fokussierung durch die Spaltlampe anhand des kleinsten Pilotlaserfleckes und nicht des scharfen Funduseindrucks nicht mit Sicherheit zu vermeiden und bei jeder Läsion vermutlich auch unterschiedlich. Die Performanz der Algorithmen belegt allerdings, dass sie *ex-vivo* weitestgehend unbeeinflusst vom Defokus sind, das sie Merkmale extrahieren, die eine Trennung der Schadensklassen zulassen. Nur der Maximalwert der Specklebewegung, bzw. das **Maximum** des Zeitverlaufes erzielte die schlechteste Trennung der Schadensklassen, da das Maximum tatsächlich hauptsächlich vom Defokus abhängt, alle anderen extrahierten Merkmale sind aber eher ein Maß für den Verlauf der Specklebewegung bzw. ein Maß wie stark der zweite Anstieg, also die Koagulation ist. Simulationen zeigen, dass die Algorithmen unterschiedlich stark auf den Defokus reagieren. Wie bereits in Abschnitt 6.5.1.4 in Abbildung 6.21 gezeigt, hat bei der Auswertung mit dem VK-Algorithmus ein Defokus von 250  $\mu\text{m}$  den gleichen Einfluss auf den Verlauf der Specklebewegung wie eine Temperaturerhöhung um 20 K. Der Einfluss auf den finalen F-Score hingegen ist nicht so drastisch. Durch Simulation wurde in Abschnitt 6.5.1.4 weiterhin gezeigt, dass eine Klassifizierung von überschwelligem Läsionen trotz eines Defokus bis zu 1 mm möglich sein sollte, da die koagulationsbedingte Specklebewegung weniger beeinflusst zu sein scheint.

Durch einen konstanten Defokus oder dessen effektive Eliminierung, wäre eventuell der initiale Anstieg besser auswertbar und besser mit der Temperatur bei unterschwelligem Läsionen zu korrelieren. Hierzu könnte eine verbesserte oder gar automatisierte Fokussierung dienen. Eine Möglichkeit wären zwei Pilotstrahlen, die unter einem Winkel ins Auge gestrahlt werden und der Operateur nur auf die Überlagerung der beiden Spots fokussiert und nicht auf ein scharfes Fundusbild.

Eine Möglichkeit, den Einfluss sowohl des Defokus als auch axialer Bewegungen zu reduzieren, ist eine andere Abbildungsgeometrie. Wie im Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, kann das Specklemuster anstatt in der Bildebene des abbildenden Systems auch in der Fourierebene detektiert werden, wodurch eine Bewegung aus der Objektebene heraus eine laterale Specklebewegung verursacht und eine gleichzeitige globale laterale Bewegung der Probe innerhalb der Objektebene keinen Einfluss

auf die Specklebewegung hat. Weiterhin hat in dieser Konfiguration der Abstand zwischen Objekt und abbildender Optik keinen Einfluss, was bedeuten würde, dass ein zusätzlicher Defokus und auch kleine axiale Bewegung keinen Einfluss auf die Specklebewegung hätten.

Formal lässt sich dies durch die fouriertransformierende Eigenschaft einer Linse zeigen, wie bereits in Abschnitt 6.3.4 beschrieben. Die Simulation nach Formel 6.2 wurden in Abbildung 6.23 in Kapitel 6.5.1.4 gezeigt. Wie zu erwarten, ist keine Abhängigkeit der Specklebewegung vom Defokus in der Fourierebene zu erkennen, allerdings ist der F-Score, d. h. die Summe der Specklebewegung zumindest beim VK Algorithmus deutlich kleiner. Das lässt vermuten, dass die in der Fourierebene aufgezeichneten, temperaturbedingten Specklebewegungen sich weniger als große laterale Bewegungen, sondern eher als Fluktuation darstellen, da die F-Scores des ZSM Algorithmus in beiden Detektionsebenen ähnlich sind und dieser Algorithmus nicht nur die reine Bewegung detektiert.

Diese Theorie wurde an einem vereinfachten Versuchsaufbau überprüft und bei der Bestrahlung eines Phantoms wurde verifiziert, dass bei der Detektion in der Fourierebene ein zusätzlicher Defokus keinen Einfluss auf den Verlauf der Specklebewegung hat (siehe Abb. 6.24). Weiterhin ist die Richtung der Specklebewegung konstant.

### 6.6.8 Echtzeitfähigkeit

Für eine Dosimetrie muss das System in der Lage sein, innerhalb der Bestrahlungszeit den Laser abzuschalten, wenn der gewünschte Schaden oder die Zieltemperatur erreicht ist. Daher wurde in dieser Arbeit bereits ein Framegrabber mit onboard FPGA verwendet, wo die Bilddaten direkt, ohne Eingriff der CPU verarbeitet werden können. Der einfachste GD-Algorithmus wurde auf dem FPGA implementiert und es konnte der Zeitverlauf der Specklebewegung problemlos bis zu einer 3 kHz Bildrate in Echtzeit bestimmt und übertragen werden.

Die anderen Algorithmen sollten ebenso auf dem FPGA implementierbar sein, auch FFTs sind möglich, wodurch der VK-Algorithmus und die Bewegungskorrektur realisierbar wären. Da das CNN, das hier trainiert wurde nur wenige Filter und Schichten hat, wären auch diese als Faltung implementierbar, sofern die Filter einmal trainiert sind.

## 6.7 Fazit

Mit dem hier gezeigten System, das ein Standard Laserkoagulations-Spaltlampensystem mit einer schnellen Specklevideografie verbindet, konnten thermoelastische und koagulative Effekte in retinalem Gewebe von Schweineaugen *ex-vivo* detektiert und auch voneinander unterschieden werden. Der rein thermische Anteil der Specklebewegung ist stark vom Defokus beeinflusst, der bei der Koagulation mit der Spaltlampe nur schwer vermeidbar ist. Daher lässt die Specklebewegung keinen direkten Rückschluss auf die Temperatur zu. Oberhalb der Schwelle für Gewebeschaden korreliert die Temperatur gut mit der summierten Speckleänderung. Die entwickelten Algorithmen können den Gewebeschaden zuverlässig mit AUC über 96 % vorhersagen. Was signifikant besser ist, als den Schaden anhand der applizierten Leistung zu prognostizieren. Die Algorithmen sind dabei unabhängig von Bestrahlungsdauer (50 ms – 500 ms) und Fleckgröße (50  $\mu\text{m}$  – 200  $\mu\text{m}$ ). Kleine Speckle bei einer großen Blende funktionieren besser. Der Defokus hat nur einen geringen Einfluss auf die Performanz der Algorithmen.

*In-vivo* wurde deutlich mehr Untergrundbewegung der Speckle, sowohl laterale Bewegung der Speckle als auch deren schnelle Fluktuation, beobachtet und die Unterscheidung von thermoelastischer Gewebewegung und Koagulation war nicht mehr möglich. Die mit Strahlung im roten Wellenlängenbereich erzeugten Speckle zeigen deutlich weniger Rauschen als im nahen infraroten Bereich, vermutlich da durch die verringerte Eindringtiefe der Einfluss des Blutflusses in der Choroidea reduziert wird. Die Algorithmen, die *ex-vivo* gefunden wurden, sind durchschnittlich, mit AUC zwischen 40 % und 70 % kaum besser als ein zufälliger Klassifikator, um die verschiedenen Sichtbarkeitsklassen zu unterscheiden. Mit flachen neuronalen Netzen ließen sich allerdings im gleichen Datensatz Genauigkeiten von über 99 % im Trainings- und Validierungsdatsatz erreichen. Es konnte hier nur ein sehr kleiner Datensatz aus einem Kaninchen zum Trainieren verwendet werden, allerdings konnte mit einer Klassifizierungsgenauigkeit von immerhin noch 74 % eine zufriedenstellende Generalisierbarkeit in einem weiteren Datensatz von mehreren Messungen eines zweiten Kaninchens gezeigt werden. Das CNN könnte das Potenzial haben, Gewebeveränderungen *in-vivo* zu unterscheiden und ist in der gezeigten Form aufgrund der geringen Komplexität auch echtzeitfähig, müsste allerdings mit einem größeren Datensatz trainiert werden.

Das Potenzial der Methode konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, auch wenn die Detektion *in-vivo* wie schon bei der OCT erheblich schwieriger war. Der Einfluss des Defokus und der axialen Gewebewegung stellte ein Problem dar, das sich eventuell durch die Aufnahme der Speckle, nicht in der Bild- sondern Fourierebene reduzieren ließe, was *in-vivo* allerdings noch demonstriert werden muss.

Trotz der vielversprechenden Resultate und der möglichen Optimierungen des Systems, die in dieser Arbeit gezeigt und vorgeschlagen wurden, besteht die Möglichkeit, dass die indirekte Messung der Phasen über die Specklemuster während der Photokoagulation keine geeignete Dosimetriemethode darstellt. Anhand der Daten, die in dieser Arbeit erzeugt wurden, ist nicht abzuleiten, ob *in-vivo* während der Photokoagulation eventuell physiologische Prozesse einsetzen, welche die Detektion der morphologischen Veränderungen im Gewebe behindern.



## Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wurde das Potenzial specklebasierter Überwachungsmethoden für die Laserbehandlungen zweier Erkrankungen des Auges untersucht. Obwohl die Pathogenese der AMD und des Glaukoms verschieden sind und auch mit der Retina und dem Kammerwinkel teils verschiedene Bereiche des Auges betreffen, haben sie doch Gemeinsamkeiten. Für beide existiert eine Lasertherapie, die allerdings selten als Primärbehandlung eingesetzt wird. Eine automatisierte Überwachung der applizierten Dosis könnte eine gezielte Behandlung des erkrankten Gewebes ermöglichen, während gesundes Gewebe geschont wird. Dadurch könnten potenzielle Risiken und Komplikationen minimiert und die Wirksamkeit der Lasertherapie gesteigert werden, was zu einer verbesserten Primärbehandlung führen könnte. Die Laserbestrahlung verursacht eine thermische Expansion, Denaturierung oder Veränderung des Gewebes durch Mikroblassenbildung, was immer mit einer Phasenänderung des zurückgestreuten Lichtes einhergeht. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit betrifft die Analyse dieser Phasenänderung, gemessen als scheinbar zufällige Veränderung der Intensitätsverteilung von Specklemustern, als mögliche Dosimetrieparameter.

Für das Monitoring im Kammerwinkel wurde dafür ein kommerzielles SRT-System auch für die SLT adaptiert. Dieses System für die Behandlung der Retina musste dafür um ein spezielles Kontaktglas erweitert werden, um den Einblick des Operateurs in den Kammerwinkel zu gewährleisten. Ein SLT-Gonio-Kontaktglas wurde in dieser Arbeit um einen Schallwandler erweitert, der die zusätzliche Detektion von laserinduzierten Schallwellen im Trabekelwerk ermöglicht, ohne den Einblick in den Kammerwinkel zu behindern. Unter Verwendung des neuen Kontaktglases und mit leichten Anpassungen des Lasersystems war es möglich optische und akustische Rohsignale simultan während der Bestrahlung aufzunehmen und auszuwerten. Umfassende Experimente *ex-vivo* an enukleierten Schweineaugen zeigten, dass sowohl in den akustischen als auch optischen Signalen Anteile detektiert werden können, die auf Mikroblassenbildung hindeuten und denen der SRT stark ähneln. Anhand der entwickelten Algorithmen konnten diese Signalanteile und damit die Schwelle für Mikroblassenbildung in einer Pulsreihe effektiv gefunden werden. Das hier verwendete System nutzte Mikrosekundenpulse entgegen der in der klinischen SLT verwendeten Pulsdauer im Nanosekundenbereich. Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass auch mit der längeren Pulsdauer problemlos Mikroblassen erzeugt werden können, von denen mit hoher Wahrscheinlichkeit der therapeutische Effekt bei der SLT ausgeht. Auch wenn der konkrete Endpunkt der SLT noch nicht endgültig erforscht ist, kann die hier gezeigte automatische Erkennung von Mikroblassen für die Dosierung während der Behandlung eingesetzt werden, um den Arzt von manuellen Dosierung zu entlasten und Über- und Unterbehandlungen zu reduzieren.

In den nächsten Schritten muss klinisch nachgewiesen werden, ob die Detektion der Mikroblassen bereits die gewünschte Reduktion des IOD erreicht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Specklemuster ebenso während der Photokoagulation am Fundus des Auges analysiert. Dazu wurde eine Spaltlampe mit einer Hochgeschwindigkeitskamera und einem weiteren Laser zur großflächigen Ausleuchtung des bestrahlten Areals erweitert. Mit diesem System konnten Laserkoagulationen sowohl *ex-vivo* an intakten enukleierten Schweineaugen, als auch *in-vivo* an Kaninchenaugen bei simultaner Aufnahme von zweidimensionalen Specklemustern mit einer Bildrate von bis zu 2kHz realisiert werden. *Ex-vivo* konnten mit diesem System sowohl

thermoelastische als auch koagulative Effekte detektiert werden, die gut mit den theoretischen Überlegungen und der Simulation übereinstimmen. Die entwickelten Algorithmen zur Analyse der Specklefluktuation können zuverlässig die beiden Gewebefeffekte und das damit einhergehende Schadenausmaß voneinander trennen. Der Gewebeschaden wurde anhand von Lebend/Tod-Assays auf Zellebene im bestrahlten Areal überprüft. Die Performanz der Algorithmen ist unabhängig von der Fleckgröße des BehandlungsLasers sowie der Bestrahlungszeit. Die Algorithmen sind weiterhin signifikant besser geeignet als die applizierte Laserleistung, um den Gewebeschaden vorherzusagen, da, wie zu erwarten die Pigmentierung der Augen stark schwanken.

Die deutlichen Specklebewegungen, die *ex-vivo* gut thermischen und koagulativen Effekten zugeordnet werden konnten, traten *in-vivo* kaum auf und die gefundenen Algorithmen waren nicht übertragbar. *In-vivo* waren deutlich mehr globale Specklefluktuationen zu beobachten, die eine Detektion von laserinduzierten Specklebewegungen deutlich erschwerten und zusätzlich abhängig von der Beleuchtungswellenlänge sind. Es wurden die Möglichkeiten eines neuronalen Netzes zur Auswertung der Specklesequenzen analysiert und das Potenzial aufgezeigt. Allerdings reichte die Datenmenge für das in dieser Arbeit trainierte Netz nicht aus, um generalisierte, zuverlässige Vorhersagen zu treffen.

Das in dieser Arbeit gezeigte System wäre eine kostengünstige und einfache Methode Gewebeveränderungen während der Koagulation und potentiell auch bei sublethalen Laserbehandlungen zu detektieren. Allerdings ist anhand der hier gezeigten Daten nicht eindeutig abzuleiten, ob eine optimierte Analyse der Specklefluktuationen *in-vivo* robust genug für ein klinisches Dosimetriesystem ist, oder ob sogar physiologische Prozesse während der Koagulation die Detektion verhindern.

# Literaturverzeichnis

- Al-Zamil, W. M. und Yassin, S. A. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical Interventions in Aging*, 12:1313, 2017. doi: 10.2147/cia.s143508.
- Alt, C., Framme, C., Schnell, S., Lee, H., Brinkmann, R., und Lin, C. P. Selective targeting of the retinal pigment epithelium using an acousto-optic laser scanner. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6): 064014, 2005. doi: 10.1117/1.2136314.
- Alward, W. L. und Longmuir, R. A. *Color Atlas of Gonioscopy*. American Academy of Ophthalmology, 2008.
- Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S., und Adamis, A. P. Age-related macular degeneration: Etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of Ophthalmology*, 48(3):257–293, 2003. doi: 10.1016/s0039-6257(03)00030-4.
- Anderson, R. R. und Parrish, J. A. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220(4596):524–527, 1983.
- Anwander, M., Zagar, B. G., Weiss, B., und Weiss, H. Noncontacting strain measurements at high temperatures by the digital laser speckle technique. *Experimental Mechanics*, 40(1):98–105, 2000. doi: 10.1007/bf02327556.
- Arizaga, R. A., Cap, N. L., Rabal, H. J., und Trivi, M. Display of local activity using dynamical speckle patterns. *Optical Engineering*, 41(2):287–295, 2002.
- Baade, A., von der Burchard, C., Lawin, M., Koinzer, S., Schmarbeck, B., Schlott, K., Miura, Y., Roeder, J., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Power-controlled temperature guided retinal laser therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 22(11):118001, 2017. doi: 10.1117/1.jbo.22.11.118001.
- Bergua, A. *Das menschliche Auge in Zahlen*. Springer-Verlag, 2017. doi: 10.1007/978-3-662-47284-2.
- Birngruber, R. Choroidal circulation and heat convection at the fundus of the eye. implications for laser coagulation and the stabilization of retinal temperature. *Laser Application in Medicine and Biology*, 5:277–361, 1991. doi: 10.1007/978-1-4899-1704-1\_6.
- Birngruber, R., Gabel, V.-P., und Hillenkamp, F. Fundus reflectometry: A step towards optimization of the retina photocoagulation. *Modern Problems in Ophthalmology*, 18:383, 1977.
- Birngruber, R., Hillenkamp, F., und Gabel, V.-P. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Physics*, 48(6):781–796, 1985. doi: 10.1097/00004032-198506000-00006.
- Bliedtner, K. Dynamic speckle tracking to monitor retinal tissue changes during photocoagulation. Masterarbeit, Universität zu Lübeck, 2014.
- Bliedtner, K., Seifert, E., Stockmann, L., Effe, L., und Brinkmann, R. Towards real time speckle controlled retinal photocoagulation. In *Ophthalmic Technologies XXVI*, volume 9693, page 96931A. International Society for Optics and Photonics, 2016. doi: 10.1117/12.2212703.

- Bliedtner, K., Seifert, E., und Brinkmann, R. Real time speckle monitoring to control retinal photocoagulation. In *European Conference on Biomedical Optics*, page 1041308. Optical Society of America, 2017. doi: 10.1117/12.2287815.
- Bliedtner, K., Meier, D., Seifert, E., und Brinkmann, R. Towards feedback controlled selective laser trabeculoplasty (SLT). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(9):6094–6094, 2018.
- Bliedtner, K., Seifert, E., und Brinkmann, R. Dosimetry for microsecond selective laser trabeculoplasty. In *European Conference on Biomedical Optics*, page 11079\_1. Optical Society of America, 2019a. doi: 10.1117/12.2526987.
- Bliedtner, K., Seifert, E., und Brinkmann, R. Towards automatically controlled dosing for selective laser trabeculoplasty. *Translational Vision Science & Technology*, 8(6):24–24, 2019b. doi: 10.1167/tvst.8.6.24.
- Boulnois, J.-L. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science*, 1(1):47–66, 1986. doi: 10.1007/bf02030737.
- Brinkmann, R., Hüttmann, G., Rögner, J., Roeder, J., Birngruber, R., und Lin, C. P. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers in Surgery and Medicine*, 27:451–464, 2000.
- Brinkmann, R., Roeder, J., und Birngruber, R. Selective retina therapy SRT: a review on methods, techniques, preclinical and first clinical results. *Bull. Soc. Belge Ophtalmol*, 302:51–69, 2006.
- Brinkmann, R., Koinzer, S., Schlott, K., Ptaszynski, L., Bever, M., Baade, A., Luft, S., Miura, Y., Roeder, J., und Birngruber, R. Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *Journal of Biomedical Optics*, 17(6):0612191–06121910, 2012.
- Campbell, C. J., Koester, C. J., Curtice, V., Noyori, K. S., und Rittler, M. C. Clinical studies in laser photocoagulation. *Archives of Ophthalmology*, 74(1):57–65, 1965. doi: 10.1001/archoph.1965.00970040059014.
- Damji, K. F., Shah, K. C., Rock, W. J., Bains, H. S., und Hodge, W. G. Selective laser trabeculoplasty v argon laser trabeculoplasty: a prospective randomised clinical trial. *British Journal of Ophthalmology*, 83(6):718–722, 1999.
- Damji, K. F., Bovell, A. M., Hodge, W. G., Rock, W., Shah, K., Buhrmann, R., und Pan, Y. I. Selective laser trabeculoplasty versus argon laser trabeculoplasty: results from a 1-year randomised clinical trial. *British Journal of Ophthalmology*, 90(12):1490–1494, 2006. doi: 10.1136/bjo.2006.098855.
- de Guimaraes, T. A. C., Varela, M. D., Georgiou, M., und Michaelides, M. Treatments for dry age-related macular degeneration: therapeutic avenues, clinical trials and future directions. *British Journal of Ophthalmology*, 106(3):297–304, 2022.
- de Jong, P. T. Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 355(14):1474–1485, 2006. doi: 10.1056/nejmra062326.
- DiMatteo, M. R. Variations in patients' adherence to medical recommendations: a quantitative review of 50 years of research. *Medical Care*, 42(3):200–209, 2004. doi: 10.1097/01.mlr.0000114908.90348.f9.
- Duh, E. J., Sun, J. K., und Stitt, A. W. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI insight*, 2(14), 2017. doi: 10.1172/jci.insight.93751.

- Duncan, D. und Kirkpatrick, S. The copula: A tool for simulating speckle dynamics. *JOSA A*, 25(1): 231–237, 02 2008. doi: 10.1364/JOSAA.25.000231.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. *Arch. Ophthalmol.*, 103(12): 1796–1806, 1985.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy: ETDRS report number 9. *Ophthalmology*, 98(5):766–785, 1991.
- Ellerkamp, I. *Auswertung einer ersten Tierversuchsstudie zur OCT-kontrollierten Photokoagulation*. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck, 2013.
- Everett, L. A. und Paulus, Y. M. Laser therapy in the treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current Diabetes Reports*, 21(9):1–12, 2021. doi: 10.1007/s11892-021-01403-6.
- Fawcett, T. ROC graphs: Notes and practical considerations for researchers. *Machine learning*, 31(1): 1–38, 2004.
- Fountoukidou, T., Raisin, P., Kaufmann, D., Justiz, J., Sznitman, R., und Wolf, S. Motion-invariant SRT treatment detection from direct M-scan OCT imaging. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, 13(5):683–691, 2018. doi: 10.1007/s11548-018-1720-z.
- Framme, C., Walter, A., Prahns, P., Regler, R., Theisen-Kunde, D., Alt, C., und Brinkmann, R. Structural changes of the retina after conventional laser photocoagulation and selective retina treatment (SRT) in spectral domain OCT. *Current Eye Research*, 34(7):568–579, 2009. doi: 10.1080/02713680902964892.
- Framme, C., Walter, A., Berger, L., Prahns, P., Alt, C., Theisen-Kunde, D., Kowal, J., und Brinkmann, R. Selective retina therapy in acute and chronic-recurrent central serous chorioretinopathy. *Ophthalmologica*, 234(4):177–188, 2015. doi: 10.1159/000439188.
- Françon, M. *Laser speckle and applications in optics*. Elsevier, 2012.
- Freund, D. und Sliney, D. Dependence of retinal model temperature calculations on beam shape and absorption coefficients. *Lasers in the Life Sciences*, 8(4):229–247, 1999.
- Fritz, A., Ptaszynski, L., Stoehr, H., und Brinkmann, R. Dynamics and detection of laser induced micro bubbles in the retinal pigment epithelium (RPE). In *European Conference on Biomedical Optics*, page 6632\_68. Optical Society of America, 2007. doi: 10.1364/ecbo.2007.6632\_68.
- Fritz, A., Ptaszynski, L., Stoehr, H., und Brinkmann, R. Dynamics of laser induced transient micro bubble clusters. In *European Conference on Biomedical Optics*, page 7373\_0D. Optical Society of America, 2009. doi: 10.1364/ecbo.2009.7373\_0d.
- Fujii, H., Asakura, T., Nohira, K., Shintomi, Y., und Ohura, T. Blood flow observed by time-varying laser speckle. *Optics Letters*, 10(3):104–106, 1985. doi: 10.1364/ol.10.000104.
- Fujii, H., Nohira, K., Yamamoto, Y., Ikawa, H., und Ohura, T. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing. part 1. *Applied Optics*, 26(24):5321–5325, 1987. doi: 10.1364/ao.26.005321.
- Gabel, V., Birngruber, R., und Hillenkamp, F. Visible and near infrared light absorption in pigment epithelium and choroid. *Proc. 23rd Consilium Ophthalmologicum, Kyoto) Excerpta Medica*, pages 658–662, 1978.

- Gabel, V. P. *Die Lichtabsorption am Augenhintergrund*. Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München, 1974.
- Gazzard, G., Konstantakopoulou, E., Garway-Heath, D., Garg, A., Vickerstaff, V., Hunter, R., Ambler, G., Bunce, C., Wormald, R., Nathwani, N., et al. Selective laser trabeculoplasty versus eye drops for first-line treatment of ocular hypertension and glaucoma (LiGHT): a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*, 393(10180):1505–1516, 2019. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32213-X.
- Geeraets, W., Williams, R., Chan, G., Ham Jr, W., Guerry III, D., und Schmidt, F. The relative absorption of thermal energy in retina and choroid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1(3): 340–347, 1962.
- Geffen, N., Ofir, S., Belkin, A., Segev, F., Barkana, Y., Kaplan Messas, A., Assia, E. I., und Belkin, M. Transscleral selective laser trabeculoplasty without a gonioscopy lens. *Journal of Glaucoma*, 26(3): 201–207, 2017. doi: 10.1097/ijg.0000000000000464.
- Girgis, S. und Lee, L. R. Treatment of dry age-related macular degeneration: A review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2023.
- Glaucoma Laser Trial Research Group. The glaucoma laser trial (GLT): 2. results of argon laser trabeculoplasty versus topical medicines. *Ophthalmology*, 97(11):1403–1413, 1990. doi: 10.1016/s0161-6420(90)32394-1.
- Glaucoma Laser Trial Research Group. The glaucoma laser trial (GLT) and glaucoma laser trial follow-up study: 7. results. *American Journal of Ophthalmology*, 120(6):718–731, 1995. doi: 10.1016/s0002-9394(14)72725-4.
- Glickman, R. D. Phototoxicity to the retina: Mechanisms of damage. *International Journal of Toxicology*, 21(6):473–490, 2002. doi: 10.1080/10915810290169909.
- Goldberg, R., Heier, J. S., Wykoff, C. C., Staurenghi, G., Singh, R. P., Steinle, N., Boyer, D. S., Mones, J., Holz, F. G., Bliss, C., et al. Efficacy of intravitreal pegcetacoplan in patients with geographic atrophy (ga): 12-month results from the phase 3 oaks and derby studies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(7):1500–1500, 2022.
- Goldman, L., Blaney, D. J., Kindel, D., und Franke, E. K. Effect of the laser beam on the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 40(121):2, 1963. doi: 10.1038/jid.1964.56.
- Goodman, J. W. *Introduction to Fourier optics*. Roberts and Company Publishers, 2005.
- Goodman, J. W. *Speckle phenomena in optics: theory and applications*. Roberts and Company Publishers, 2007.
- Gregory, D. Basic physical principles of defocused speckle photography: a tilt topology inspection technique. *Optics & Laser Technology*, 8(5):201–213, 1976. doi: 10.1016/0030-3992(76)90004-9.
- Grehn, F. *Augenheilkunde*. Springer Berlin Heidelberg, 32 edition, 2019. doi: 10.1007/978-3-662-59154-3.
- Guizar-Sicairos, M., Thurman, S. T., und Fienup, J. R. Efficient subpixel image registration algorithms. *Optics Letters*, 33(2):156–158, 2008. doi: 10.1364/ol.33.000156.
- Hammer, M., Roggan, A., Schweitzer, D., und Müller, G. Optical properties of ocular fundus tissues-an in vitro study using the double-integrating-sphere technique and inverse monte carlo simulation. *Phys. Med. Biol.*, 40:963–978, 1995. doi: 10.1088/0031-9155/40/6/001.

- He, K., Zhang, X., Ren, S., und Sun, J. Deep residual learning for image recognition. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, pages 770–778, 2016. doi: 10.1109/cvpr.2016.90.
- Hernández-Zimbrón, L. F., Zamora-Alvarado, R., Velez-Montoya, R., Zenteno, E., Gullias-Cañizo, R., Quiroz-Mercado, H., Gonzalez-Salinas, R., et al. Age-related macular degeneration: new paradigms for treatment and management of AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. doi: 10.1155/2018/8374647.
- Hodge, W., Damji, K., Rock, W., Buhrmann, R., Bovell, A., und Pan, Y. Baseline IOP predicts selective laser trabeculoplasty success at 1 year post-treatment: results from a randomised clinical trial. *British Journal of Ophthalmology*, 89(9):1157–1160, 2005. doi: 10.1136/bjo.2004.062414.
- Inderfurth, J., Fergusson, R., Puliafito, C., Frish, M., und Birngruber, R. Reflexionsmessung während Netzhautlaserkoagulationen bei Patienten: Entwicklung einer automatisch gesteuerten Dosiseinrichtung: Netzhaut/Aderhaut: Glaskörper. *Der Ophthalmologe (Berlin. Print)*, 92(5):717–722, 1995.
- Inderfurth, J. H., Ferguson, R. D., Frish, M. B., und Birngruber, R. Dynamic reflectometer for control of laser photocoagulation on the retina. *Lasers in Surgery and Medicine*, 15(1):54–61, 1994. doi: 10.1002/lsm.1900150108.
- Iwami, H., Pruessner, J., Shiraki, K., Brinkmann, R., und Miura, Y. Protective effect of a laser-induced sub-lethal temperature rise on RPE cells from oxidative stress. *Experimental Eye Research*, 124: 37–47, 2014. doi: 10.1016/j.exer.2014.04.014.
- Jain, A., Blumenkranz, M. S., Paulus, Y., Wiltberger, M. W., Andersen, D. E., Huie, P., und Palanker, D. Effect of pulse duration on size and character of the lesion in retinal photocoagulation. *Archives of Ophthalmology*, 126(1):78–85, 2008. doi: 10.1001/archophthalmol.2007.29.
- Joos, M., Rötting, M., und Velichkovsky, B. M. 10. spezielle verfahren i: Bewegungen des menschlichen auges: Fakten, methoden und innovative anwendungen. In *Psycholinguistik*, pages 142–168. Walter de Gruyter, 2003. doi: 10.1515/9783110114249.2.142.
- Juzych, M. S., Chopra, V., Banitt, M. R., Hughes, B. A., Kim, C., Goulas, M. T., und Shin, D. H. Comparison of long-term outcomes of selective laser trabeculoplasty versus argon laser trabeculoplasty in open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 111(10):1853–1859, 2004. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.04.030.
- Kagan, D. B., Gorfinkel, N. S., und Hutnik, C. M. Mechanisms of selective laser trabeculoplasty: a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 42(7):675–681, 2014.
- Kandulla, J. *Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur optoakustischen Temperaturbestimmung während Transpupillarer Thermoerapie*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2009.
- Kandulla, J., Elsner, H., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4):041111–1 – 041111–13, 2006.
- Kang, S., Park, Y. G., Kim, J. R., Seifert, E., Dirk, T.-K., Ralf, B., und Roh, Y. J. Selective retina therapy in patients with chronic central serous chorioretinopathy: A pilot study. *Medicine*, 95(3), 2016. doi: 10.1097/md.0000000000002524.
- Kano, K., Kuwayama, Y., Mizoue, S., und Ito, N. Clinical results of selective laser trabeculoplasty. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 103(8):612–616, 1999. doi: 10.1016/s0021-5155(99)00166-5.

- Kaufmann, D., Burri, C., Arnold, P., Koch, V. M., Meier, C., Považay, B., und Justiz, J. Selective retina therapy enhanced with optical coherence tomography for dosimetry control and monitoring: a proof of concept study. *Biomedical Optics Express*, 9(7):3320–3334, 2018. doi: 10.1364/boe.9.003320.
- Kelly, M. W. *Intracellular cavitation as a mechanism of short-pulse laser injury to the retinal pigment epithelium*. Dissertation, Tufts University, 1997.
- Kern, K. *Reaktionen von Zellen des retinalen Pigmentepithels auf transiente Hyperthermie*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2018.
- Kim, H. D., Han, J. W., Ohn, Y.-H., Brinkmann, R., und Park, T. K. Functional evaluation using multifocal electroretinogram after selective retina therapy with a microsecond-pulsed laser. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(1):122–131, 2015. doi: 10.1167/iovs.14-15132.
- Kirkpatrick, S. J., Sevilla, N., Saytashev, I., und Ramella-Roman, J. C. Non-invasive determination of retinal temperature through stimulated laser speckle imaging (sLSI)(conference presentation). In *Optical Elastography and Tissue Biomechanics VI*, volume 10880, page 108800I. International Society for Optics and Photonics, 2019. doi: 10.1117/12.2509841.
- Klatt, C., Saeger, M., Oppermann, T., Pörksen, E., Treumer, F., Hillenkamp, J., Fritzer, E., Brinkmann, R., Birngruber, R., und Roeder, J. Selective retina therapy for acute central serous chorioretinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, 95(1):83–88, 2011. doi: 10.1136/bjo.2009.178327.
- Koinzer, S., Schlott, K., Portz, L., Ptaszynski, L., Baade, A., Bever, M., Saeger, M., Caliebe, A., Denner, R., Birngruber, R., et al. Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *Journal of Biophotonics*, 5(11-12):889–902, 2012. doi: 10.1002/jbio.201200091.
- Kolb, H. How the retina works: Much of the construction of an image takes place in the retina itself through the use of specialized neural circuits. *American scientist*, 91(1):28–35, 2003. doi: 10.1511/2003.1.28.
- Kollias, A. N. und Ulbig, M. W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107(5):75–84, 2010. doi: 10.3238/arztebl.2010.0075.
- Kramer, T. R. und Noecker, R. J. Comparison of the morphologic changes after selective laser trabeculoplasty and argon laser trabeculoplasty in human eye bank eyes. *Ophthalmology*, 108(4):773–779, 2001. doi: 10.1016/s0161-6420(00)00660-6.
- Kuglin, C. D. The phase correlation image alignment method. In *IEEE Int. Conf. on Cybernetics and Society, 1975*, pages 163–165, 1975.
- Kurokawa, K., Makita, S., Hong, Y.-J., und Yasuno, Y. Two-dimensional micro-displacement measurement for laser coagulation using optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 6(1):170–190, 2015. doi: 10.1364/boe.6.000170.
- Kurokawa, K., Makita, S., und Yasuno, Y. Investigation of thermal effects of photocoagulation on retinal tissue using fine-motion-sensitive dynamic optical coherence tomography. *PloS one*, 11(6), 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0156761.
- Latina, M. A. und Park, C. Selective targeting of trabecular meshwork cells: in vitro studies of pulsed and cw laser interactions. *Experimental Eye Research*, 60(4):359–371, 1995. doi: 10.1016/s0014-4835(05)80093-4.

- Latina, M. A., Sibayan, S. A., Shin, D. H., Noecker, R. J., und Marcellino, G. Q-switched 532-nm Nd:YAG laser trabeculoplasty (selective laser trabeculoplasty): A multicenter, pilot, clinical study. *Ophthalmology*, 105(11):2082–2090, 1998. doi: 10.1016/s0161-6420(98)91129-0.
- Lee, J. W., Wong, M. O., Liu, C. C., und Lai, J. S. Optimal selective laser trabeculoplasty energy for maximal intraocular pressure reduction in open-angle glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 24(5): e128–e131, 2015. doi: 10.1097/ijg.0000000000000215.
- Leendertz, J. Interferometric displacement measurement on scattering surfaces utilizing speckle effect. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 3(3):214, 1970. doi: 10.1088/0022-3735/3/3/312.
- Léger, D., Mathieu, E., und Perrin, J. Optical surface roughness determination using speckle correlation technique. *Applied Optics*, 14(4):872–877, 1975. doi: 10.1364/ao.14.000872.
- Li, T., Lindsley, K., Rouse, B., Hong, H., Shi, Q., Friedman, D. S., Wormald, R., und Dickersin, K. Comparative effectiveness of first-line medications for primary open-angle glaucoma: a systematic review and network meta-analysis. *Ophthalmology*, 123(1):129–140, 2016.
- Lin, C. P. Selective absorption by melanin granules and selective cell targeting. *Lasers in Ophthalmology—Basic, Diagnostic and Surgical Aspects*, pages 91–98, 2003.
- Lin, C. P. und Kelly, M. W. Cavitation and acoustic emission around laser-heated microparticles. *Applied Physics Letters*, 72(22):2800–2802, 1998. doi: 10.1063/1.121462.
- Little, H., Zweng, H. C., und Peabody, R. Argon laser slit-lamp retinal photocoagulation. *Transactions-American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 74(1):85–97, 1970.
- Liu, Z. und Gao, J. Deformation-pattern-based digital speckle correlation for coefficient of thermal expansion evaluation of film. *Optics Express*, 19(18):17469–17479, 2011. doi: 10.1364/oe.19.017469.
- Llobet, A., Gasull, X., und Gual, A. Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure? *Physiology*, 18(5):205–209, 2003. doi: 10.1152/nips.01443.2003.
- Lütjen-Drecoll, E. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(1):91–119, 1999. doi: 10.1016/s1350-9462(98)00011-1.
- Martinez-de-la Casa, J., Garcia-Feijoo, J., Castillo, A., Matilla, M., Macias, J., Benitez-del Castillo, J., und Garcia-Sanchez, J. Selective vs argon laser trabeculoplasty: hypotensive efficacy, anterior chamber inflammation, and postoperative pain. *Eye*, 18(5):498, 2004. doi: 10.1038/sj.eye.6700695.
- McIlraith, I., Strasfeld, M., Colev, G., und Hutnik, C. M. Selective laser trabeculoplasty as initial and adjunctive treatment for open-angle glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 15(2):124–130, 2006. doi: 10.1097/00061198-200604000-00009.
- McMenamin, P. G. und Steptoe, R. J. Normal anatomy of the aqueous humour outflow system in the domestic pig eye. *Journal of Anatomy*, 178:65, 1991.
- Meier, D. *Evaluierung eines optimierten Kontaktglasdesigns zur kontrollieren Selektiven Lasertrabekuloplastik (SLT)*. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck, 2017.
- Meyer-Schwickerath, G. Lichtkoagulation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 156(1):2–34, 1954. doi: 10.1007/bf00703328.
- Müller, H. *Messungen von retinalen Gewebeeränderungen während der Photokoagulation mittels Optischer Kohärenztomographie (OCT)*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2013.

- Müller, H., Ptaszynski, L., Schlott, K., Debbeler, C., Bever, M., Koinzer, S., Birngruber, R., Brinkmann, R., und Hüttmann, G. Imaging thermal expansion and retinal tissue changes during photocoagulation by high speed OCT. *Biomedical Optics Express*, 3(5):1025–1046, 2012. doi: 10.1364/boe.3.001025.
- Muqit, M., Marcellino, G. R., Gray, J., Mclauchlan, R., Henson, D. B., Young, L. B., Patton, N., Charles, S. J., Turner, G. S., und Stanga, P. E. Pain responses of pascal 20 ms multi-spot and 100 ms single-spot panretinal photocoagulation: Manchester pascal study, MAPASS report 2. *British Journal of Ophthalmology*, 94(11):1493–1498, 2010. doi: 10.1136/bjo.2009.176677.
- Muqit, M. M., Denniss, J., Nourrit, V., Marcellino, G. R., Henson, D. B., Schiessl, I., und Stanga, P. E. Spatial and spectral imaging of retinal laser photocoagulation burns. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(2):994–1002, 2011. doi: 10.1167/iovs.10-6309.
- Nagar, M., Ogunyomade, A., O'brart, D., Howes, E., und Marshall, J. A randomised, prospective study comparing selective laser trabeculoplasty with latanoprost for the control of intraocular pressure in ocular hypertension and open angle glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*, 89(11):1413–1417, 2005. doi: 10.1136/bjo.2004.052795.
- Neumann, J. und Brinkmann, R. Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4):041112, 2006.
- Neumann, J. und Brinkmann, R. Self-limited growth of laser-induced vapor bubbles around single microabsorbers. *Applied Physics Letters*, 93(3):033901, 2008. doi: 10.1063/1.2957030.
- Nowak, J. Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological Reports*, 58(3):353–363, 2006.
- Oulamara, A., Tribillon, G., und Duvernoy, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, 36(2): 165–179, 1989. doi: 10.1080/09500348914550221.
- Palanker, D. Evolution of concepts and technologies in ophthalmic laser therapy. *Annual Review of Vision Science*, 2:295–319, 2016. doi: 10.1146/annurev-vision-111815-114358.
- Park, Y.-G., Seifert, E., Roh, Y. J., Theisen-Kunde, D., Kang, S., und Brinkmann, R. Tissue response of selective retina therapy by means of a feedback-controlled energy ramping mode. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 42(9):846–855, 2014. doi: 10.1111/ceo.12342.
- Park, Y. G., Kang, S., Brinkmann, R., und Roh, Y.-J. A comparative study of retinal function in rabbits after panretinal selective retina therapy versus conventional panretinal photocoagulation. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 2015. doi: 10.1155/2015/247259.
- Park, Y. G., Kim, J. R., Kang, S., Seifert, E., Theisen-Kunde, D., Brinkmann, R., und Roh, Y.-J. Safety and efficacy of selective retina therapy (SRT) for the treatment of diabetic macular edema in korean patients. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(9):1703–1713, 2016. doi: 10.1007/s00417-015-3262-1.
- Park, Y. G., Kang, S., Kim, M., Yoo, N., und Roh, Y. J. Selective retina therapy with automatic real-time feedback-controlled dosimetry for chronic central serous chorioretinopathy in korean patients. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 255(7):1375–1383, 2017. doi: 10.1007/s00417-017-3672-3.
- Plesset, M. S. und Prosperetti, A. Bubble dynamics and cavitation. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 9(1):145–185, 1977. doi: 10.1146/annurev.fl.09.010177.001045.

- Považay, B., Brinkmann, R., Stoller, M., und Kessler, R. Selective retina therapy. In *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology*, pages 237–259. Springer, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-16638-0\_11.
- Rabal, H. und Braga Jr, R. *Dynamic Laser Speckle and Applications*, volume 139 of *Optical Science and Engineering*. CRC, ISBN-13: 978-1-4200-6015-7, 2008. doi: 10.1201/9781420060164.
- Rabal, H. J., Arizaga, R., Cap, N. L., Grumel, E., und Trivi, M. Numerical model for dynamic speckle: an approach using the movement of the scatterers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 5 (5):S381, 2003. doi: 10.1088/1464-4258/5/5/396.
- Robin, A. L., Novack, G. D., Covert, D. W., Crockett, R. S., und Marcic, T. S. Adherence in glaucoma: objective measurements of once-daily and adjunctive medication use. *American Journal of Ophthalmology*, 144(4):533–540, 2007. doi: 10.1016/j.ajo.2007.06.012.
- Roider, J. und Birngruber, R. Solution of the heat conduction equation. In *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, pages 385–409. Springer, 1995. doi: 10.1007/978-1-4757-6092-7\_12.
- Roider, J., Michaud, N. A., Flotte, T. J., und Birngruber, R. Response of the retinal pigment epithelium to selective photocoagulation. *Archives of Ophthalmology*, 110(12):1786–1792, 1992. doi: 10.1001/archophth.1992.01080240126045.
- Roider, J., Hillenkamp, F., Flotte, T., und Birngruber, R. Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18):8643–8647, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.18.8643.
- Roider, J., Liew, S. H. M., Klatt, C., Elsner, H., Poerksen, E., Hillenkamp, J., Brinkmann, R., und Birngruber, R. Selective retina therapy (SRT) for clinically significant diabetic macular edema. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248(9):1263–1272, 2010. doi: 10.1007/s00417-010-1356-3.
- Samples, J. R., Singh, K., Lin, S. C., Francis, B. A., Hodapp, E., Jampel, H. D., und Smith, S. D. Laser trabeculoplasty for open-angle glaucoma: a report by the american academy of ophthalmology. *Ophthalmology*, 118(11):2296–2302, 2011. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.04.037.
- Schlott, K., Koinzer, S., Ptaszynski, L., Bever, M., Baade, A., Roider, J., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *Journal of Biomedical Optics*, 17 (6):061223–1, 2012. doi: 10.1117/1.JBO.17.6.061223.
- Schmidt, S. und Peisch, R. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. regional variation and age-related reduction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 27(7): 1063–1067, 1986.
- Schraermeyer, U. und Heimann, K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Research*, 12(4):219–236, 1999. doi: 10.1111/j.1600-0749.1999.tb00755.x.
- Schuele, G., Huettmann, G., Roider, J., Wirbelauer, C., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Optoacoustic measurements during  $\mu\text{s}$ -irradiation of the retinal pigment epithelium. In *Laser-Tissue Interaction XI: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*, volume 3914, pages 230–236. International Society for Optics and Photonics, 2000. doi: 10.1117/12.388090.
- Schuele, G., Elsner, H., Hoerauf, H., Framme, C., Roider, J., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Optoacoustic online dosimetry during selective RPE treatment. In *Ophthalmic Technologies XIV*, volume 5314, pages 286–297. International Society for Optics and Photonics, 2004. doi: 10.1117/12.529384.

- Schuele, G., Elsner, H., Framme, C., Roeder, J., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Optoacoustic real-time dosimetry for selective retina treatment. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6):064022, 2005a. doi: 10.1117/1.2136327.
- Schuele, G., Rumohr, M., Huettmann, G., und Brinkmann, R. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the microsecond-to-millisecond time regimen. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(2):714–719, 2005b. doi: 10.1167/iovs.04-0136.
- Schüle, G. *Mechanismen und On-line Dosimetrie bei selektiver RPE Therapie*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2002.
- Seifert, E., Bliedtner, K., und Brinkmann, R. Laser speckle tracking for monitoring and analysis of retinal photocoagulation. In *SPIE BiOS*, pages 89460F–89460F. International Society for Optics and Photonics, 2014. doi: 10.1117/12.2038860.
- Seifert, E., Tode, J., Pielen, A., Theisen-Kunde, D., Framme, C., Roeder, J., Miura, Y., Birngruber, R., und Brinkmann, R. Selective retina therapy: toward an optically controlled automatic dosing. *Journal of Biomedical Optics*, 23(11):115002, 2018. doi: 10.1117/1.JBO.23.11.115002.
- Selvaraju, R. R., Cogswell, M., Das, A., Vedantam, R., Parikh, D., und Batra, D. Grad-cam: Visual explanations from deep networks via gradient-based localization. In *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision*, pages 618–626, 2017. doi: 10.48550/arXiv.1610.02391.
- Shah, C. A. Diabetic retinopathy: A comprehensive review. *Indian Journal of Medical Sciences*, 62(12): 500–519, 2008.
- Sher, A., Jones, B. W., Huie, P., Paulus, Y. M., Lavinsky, D., Leung, L.-S. S., Nomoto, H., Beier, C., Marc, R. E., und Palanker, D. Restoration of retinal structure and function after selective photocoagulation. *Journal of Neuroscience*, 33(16):6800–6808, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1044-12.2013.
- Shpychak, A. *Schadensmonitoring bei der selektiven lasertrabekuloplastik*. Masterarbeit, Universität zu Lübeck, 2016.
- Song, L., Zhou, Z., Wang, X., Zhao, X., und Elson, D. S. Simulation of speckle patterns with pre-defined correlation distributions. *Biomedical Optics Express*, 7(3):798–809, 2016. doi: 10.1364/BOE.7.000798.
- Spahr, H. *Detektion von retinalen Mikrobewegungen mit phasensensitiver optischer Kohärenztomografie*. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2017.
- Spahr, H., Rudolph, L., Müller, H., Birngruber, R., und Hüttmann, G. Imaging of photothermal tissue expansion via phase sensitive optical coherence tomography. In *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVI*, volume 8213, page 82131S. International Society for Optics and Photonics, 2012. doi: 10.1117/12.911429.
- Spahr, H., Pfäffle, C., Hüttmann, G., und Hillmann, D. Artifacts in speckle tracking and multi-aperture doppler oct imaging of lateral motion. *Optics Letters*, 44(6):1315–1318, 2019. doi: 10.1364/OL.44.001315.
- Sramek, C., Paulus, Y. M., Nomoto, H., Huie, P., Brown, J., und Palanker, D. V. Dynamics of retinal photocoagulation and rupture. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3):034007, 2009. doi: 10.1117/1.3130282.
- Stamper, R. L., Lieberman, M. F., und Drake, M. V. *Becker-Shaffer's diagnosis and therapy of the glaucomas E-Book*. Elsevier Health Sciences, Edinburgh, New York, 2009.

- Stein, J. D. und Challa, P. Mechanisms of action and efficacy of argon laser trabeculoplasty and selective laser trabeculoplasty. *Current Opinion in Ophthalmology*, 18(2):140–145, 2007. doi: 10.1097/ICU.0b013e328086aebf.
- Steiner, P., Enzmann, V., Meier, C., Považay, B., und Kowal, J. H. Retinal laser lesion visibility in simultaneous ultra-high axial resolution optical coherence tomography. *IEEE Photonics Journal*, 6(6):1–11, 2014. doi: 10.1109/JPHOT.2014.2374594.
- Steiner, P., Ebnetter, A., Berger, L. E., Zinkernagel, M., Považay, B., Meier, C., Kowal, J. H., Framme, C., Brinkmann, R., Wolf, S., und Sznitman, R. Time-resolved ultra-high resolution optical coherence tomography for real-time monitoring of selective retina therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(11):6654–6662, Oct 2015. doi: 10.1167/iovs.15-17151.
- Steiner, R. Laser-tissue interactions. In Raulin, C. und Karsai, S., editors, *Laser and IPL Technology in Dermatology and Aesthetic Medicine*, pages 23–36. Springer, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-03438-1\_2.
- Stockmann, L. *Speckle-basierte Überwachung der retinalen Photokoagulation*. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck, 2015.
- Stone, J. L., Robin, A. L., Novack, G. D., Covert, D. W., und Cagle, G. D. An objective evaluation of eyedrop instillation in patients with glaucoma. *Archives of ophthalmology*, 127(6):732–736, 2009.
- Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3):845–881, 2005.
- Tang, M., Fu, Y., Shui Fu, M., Fan, Y., Dong Zou, H., Dong Sun, X., und Xu, X. The efficacy of low-energy selective laser trabeculoplasty. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*, 42(1):59–63, 2011. doi: 10.3928/15428877-20101124-07.
- Tiziani, H. J. A study of the use of laser speckle to measure small tilts of optically rough surfaces accurately. *Optics Communications*, 5(4):271–276, 1972. doi: 10.1016/0030-4018(72)90095-8.
- Vogel, A. und Birngruber, R. Temperature profiles in human retina and choroid during laser coagulation with different wavelengths ranging from 514 to 810 nm. *Lasers Light Ophthalmol*, 5(1):9–16, 1992.
- von der Burchard, C. und Roider, J. RPE and laser. In *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*, pages 281–292. Springer, 2020. doi: 10.1007/978-3-030-28384-1\_16.
- Wise, J. B. und Witter, S. L. Argon laser therapy for open-angle glaucoma: a pilot study. *Archives of ophthalmology*, 97(2):319–322, 1979.
- Yasui, A., Yamamoto, M., Hirayama, K., Shiraki, K., Theisen-Kunde, D., Brinkmann, R., Miura, Y., und Kohno, T. Retinal sensitivity after selective retina therapy (SRT) on patients with central serous chorioretinopathy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 255(2):243–254, 2017. doi: 10.1007/s00417-016-3441-8.
- Young, R. W. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 31(5): 291–306, 1987. doi: 10.1016/0039-6257(87)90115-9.
- Young, R. W. und Bok, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *The Journal of Cell Biology*, 42(2):392–403, 1969.

Zaremba, T. *Experimentelle Analyse der Realisierbarkeit einer Echtzeit-Dosimetrie für die Selektive Lasertrabekuloplastik*. Bachelorarbeit, Hochschule für angewandte Wissenschaften Landshut, 2016.

Zaret, M. M., Breinin, G. M., Schmidt, H., Ripps, H., Siegel, I. M., und Solon, L. R. Ocular lesions produced by an optical maser (laser). *Science*, 134(3489):1525–1526, 1961. doi: 10.1126/science.134.3489.1525.

Zimnyakov, D. A., Sviridov, A. P., Kuznetsova, L. V., Baranov, S. A., und Ignatieva, N. Y. Monitoring of tissue thermal modification with a bundle-based full-field speckle analyzer. *Applied Optics*, 45(18): 4480–4490, 2006. doi: 10.1364/AO.45.004480.

# Appendix

## A1 Speckle basiertes Monitoring der Photokoagulation

### A1.1 Optimierung der Algorithmen und deren Parameter

#### A1.1.1 Korrelation im Zeitverlaufs-Specklemuster (ZSM-Algorithmus)

**Tabelle A1:** Performanz des ZSM-Algorithmus zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (●) (besten 25 Parameterkombinationen).

Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf			AUC		
	Medianfilter	Bew. -korrektur	ZSM $n$	Offset $o$	Nachbarschaft $l$	Merkmal $F$	○ - ●	● - ●
97	1	1	10	13	9	sumG	0,965 86	0,920 13
538	0	1	50	13	9	sumG	0,965 45	0,8965
534	0	1	50	13	5	sumG	0,964 21	0,901 41
93	1	1	10	13	5	sumG	0,963 94	0,924 81
146	1	1	50	13	9	sumG	0,9625	0,889 96
89	1	1	10	13	1	sumG	0,962 22	0,927 86
48	1	1	2	13	9	sumG	0,961 61	0,932 51
530	0	1	50	13	1	sumG	0,961 61	0,907 92
489	0	1	10	13	9	sumG	0,961 47	0,923 36
142	1	1	50	13	5	sumG	0,961 13	0,8968
485	0	1	10	13	5	sumG	0,960 44	0,927 42
44	1	1	2	13	5	sumG	0,959 86	0,935 68
481	0	1	10	13	1	sumG	0,959 76	0,932 03
440	0	1	2	13	9	sumG	0,959 28	0,934 64
138	1	1	50	13	1	sumG	0,959 07	0,901 93
587	0	1	100	13	9	sumG	0,9588	0,878 35
583	0	1	100	13	5	sumG	0,958 32	0,887 87
40	1	1	2	13	1	sumG	0,9579	0,9394
436	0	1	2	13	5	sumG	0,9579	0,937 05
46	1	1	2	13	9	sum	0,957 42	0,906 21
191	1	1	100	13	5	sumG	0,957 36	0,881 29
195	1	1	100	13	9	sumG	0,957 08	0,872 36
342	1	0	50	13	9	sumG	0,956 74	0,883 26
42	1	1	2	13	5	sum	0,956 53	0,908 18
432	0	1	2	13	1	sumG	0,9564	0,939 77

**Tabelle A2:** Performanz des ZSM-Algorithmus zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (☉) und *Weißfärbung* (●) (besten 25 Parameterkombinationen). Die Zeile mit der besten Gesamt-Performanz (maximale Summe aus  $AUC_{☉☉}$  und  $AUC_{☉●}$ ) ist Hellgrau gekennzeichnet.

Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf				AUC	
	Medianfilter	Bew. -korrektur	ZSM $n$	Offset $o$	Nachbarschaft $l$	Merkmal $F$	☉ - ☉	☉ - ●
393	0	1	2	0	0	IM	0,907 45	0,9657
589	0	0	2	0	0	IM	0,905 18	0,962 95
1	1	1	2	0	0	IM	0,955 51	0,949 89
197	1	0	2	0	0	IM	0,928 77	0,948 14
16	1	1	2	5	1	sumG	0,915 06	0,947 95
20	1	1	2	5	5	sumG	0,915 06	0,947 95
24	1	1	2	5	9	sumG	0,935 73	0,946 58
65	1	1	10	5	1	sumG	0,921 36	0,946 32
69	1	1	10	5	5	sumG	0,921 36	0,946 32
28	1	1	2	9	1	sumG	0,944 57	0,9458
36	1	1	2	9	9	sumG	0,944 57	0,9458
420	0	1	2	9	1	sumG	0,941 48	0,945 72
428	0	1	2	9	9	sumG	0,941 48	0,945 72
32	1	1	2	9	5	sumG	0,948 51	0,945 57
12	1	1	2	1	9	sumG	0,911 42	0,945 35
8	1	1	2	1	5	sumG	0,899 97	0,945 28
61	1	1	10	1	9	sumG	0,920 33	0,944 94
416	0	1	2	5	9	sumG	0,927 29	0,944 75
424	0	1	2	9	5	sumG	0,946 08	0,944 64
73	1	1	10	5	9	sumG	0,9419	0,944 01
408	0	1	2	5	1	sumG	0,902 78	0,944 01
412	0	1	2	5	5	sumG	0,902 78	0,944 01
57	1	1	10	1	5	sumG	0,903 47	0,942 93
457	0	1	10	5	1	sumG	0,904 19	0,942 15
461	0	1	10	5	5	sumG	0,904 19	0,942 15

## A1.1.2 Generalisierte Differenzen (GD-Algorithmus)

**Tabelle A3:** Performanz des GD-Algorithmus zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (●) (besten 25 Parameterkombinationen)

Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf				AUC	
	Medianfilter	Bew. -korrektur	Nachbarschaft $l$	Wichtung	Normierung	Merkmal $F$	○ - ●	● - ●
38	1	1	13	0	1	sumG	0,91944	0,86484
37	1	1	13	0	0	sumG	0,91944	0,89795
190	0	0	5	0	1	sum	0,91862	0,90874
192	0	0	5	1	1	sum	0,91752	0,90283
196	0	0	9	1	1	sum	0,91622	0,91287
39	1	1	13	1	0	sumG	0,91478	0,90212
186	0	0	3	0	1	sum	0,91382	0,9026
194	0	0	9	0	1	sum	0,91341	0,90934
20	1	1	13	1	1	sum	0,91286	0,87444
14	1	1	9	0	1	sum	0,91272	0,88464
134	0	1	9	0	1	sum	0,91259	0,90037
62	1	0	2	0	1	sum	0,91259	0,89565
64	1	0	2	1	1	sum	0,91259	0,89565
40	1	1	13	1	1	sumG	0,91252	0,87299
16	1	1	9	1	1	sum	0,91115	0,89289
140	0	1	13	1	1	sum	0,91087	0,89263
130	0	1	5	0	1	sum	0,91087	0,89528
72	1	0	5	1	1	sum	0,91067	0,89937
200	0	0	13	1	1	sum	0,91067	0,89844
66	1	0	3	0	1	sum	0,91067	0,89978
68	1	0	3	1	1	sum	0,91053	0,89963
136	0	1	9	1	1	sum	0,91032	0,90249
74	1	0	9	0	1	sum	0,90985	0,88464
76	1	0	9	1	1	sum	0,90916	0,89289
157	0	1	13	0	0	sumG	0,90909	0,92299

**Tabelle A4:** Performanz des GD-Algorithmus zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (☉) und *Weißfärbung* (●) (besten 25 Parameterkombinationen). Die Zeile mit der besten Gesamt-Performanz (maximale Summe aus  $AUC_{☉☉}$  und  $AUC_{☉●}$ ) ist Hellgrau gekennzeichnet.

Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf				AUC	
	Medianfilter	Bew. -korrektur	Nachbarschaft $l$	Wichtung	Normierung	Merkmal $F$	☉ - ☉	☉ - ●
129	0	1	5	0	0	sum	0,882 63	0,938 69
131	0	1	5	1	0	sum	0,875 29	0,938 17
135	0	1	9	1	0	sum	0,8986	0,9365
125	0	1	3	0	0	sum	0,863 64	0,9362
191	0	0	5	1	0	sum	0,870 29	0,935 08
189	0	0	5	0	0	sum	0,877 55	0,934 75
127	0	1	3	1	0	sum	0,851 71	0,933
133	0	1	9	0	0	sum	0,900 11	0,932 85
185	0	0	3	0	0	sum	0,859 93	0,932 85
121	0	1	2	0	0	sum	0,849 86	0,9324
123	0	1	2	1	0	sum	0,849 86	0,9324
195	0	0	9	1	0	sum	0,888 73	0,931 77
187	0	0	3	1	0	sum	0,8478	0,929 65
139	0	1	13	1	0	sum	0,9069	0,929 43
181	0	0	2	0	0	sum	0,845 88	0,928 83
183	0	0	2	1	0	sum	0,845 88	0,928 83
193	0	0	9	0	0	sum	0,888 45	0,928 42
137	0	1	13	0	0	sum	0,906 55	0,925 56
159	0	1	13	1	0	sumG	0,904 29	0,923 07
157	0	1	13	0	0	sumG	0,909 09	0,922 99
199	0	0	13	1	0	sum	0,890 99	0,922 77
153	0	1	9	0	0	sumG	0,890 65	0,920 01
219	0	0	13	1	0	sumG	0,889 41	0,919 64
217	0	0	13	0	0	sumG	0,893 05	0,919 12
213	0	0	9	0	0	sumG	0,880 02	0,918 97

## A1.1.3 Vektorkarten (VK-Algorithmus)

**Tabelle A5:** Performanz des VK-Algorithmus zur Unterscheidung von *kein Schaden* (○) und *RPE-Schaden* (●) (besten 25 Parameterkombinationen). Die Zeile mit der besten Gesamt-Performanz (maximale Summe aus  $AUC_{○○}$  und  $AUC_{●●}$ ) ist Hellgrau gekennzeichnet.

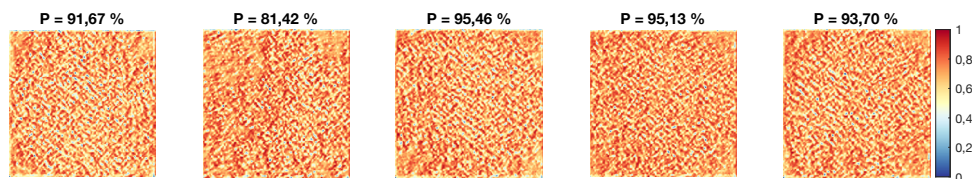
Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf				AUC	
	Medianfilter	Bew. -korrektur	Sub-Bild $n$	Offset $o$	Normierung	Merkmal $F$	○ - ●	● - ●
94	1	1	10	16	1	sumG	0,964 69	0,885 57
93	1	1	10	16	0	sumG	0,962 36	0,899 74
286	0	1	10	16	1	sumG	0,957 15	0,882 25
358	0	0	25	16	1	sumG	0,953 93	0,884 56
166	1	0	25	16	1	sumG	0,953 24	0,888 17
285	0	1	10	16	0	sumG	0,952 21	0,916 18
190	1	0	10	16	1	sumG	0,950 77	0,868 71
380	0	0	10	16	1	sum	0,950 64	0,868 53
382	0	0	10	16	1	sumG	0,948 79	0,879 35
357	0	0	25	16	0	sumG	0,947 62	0,926 75
379	0	0	10	16	0	sum	0,947	0,911 87
165	1	0	25	16	0	sumG	0,946 94	0,921 43
91	1	1	10	16	0	sum	0,945 29	0,884 64
374	0	0	10	8	1	sum	0,945 02	0,906 36
92	1	1	10	16	1	sum	0,944 74	0,864 77
189	1	0	10	16	0	sumG	0,944 47	0,884 41
187	1	0	10	16	0	sum	0,943 64	0,876 49
87	1	1	10	8	0	sumG	0,942 14	0,937 2
381	0	0	10	16	0	sumG	0,942 07	0,912 2
88	1	1	10	8	1	sumG	0,940 83	0,926 97
333	0	0	50	16	0	sumG	0,940 77	0,930 62
356	0	0	25	16	1	sum	0,940 42	0,865 55
182	1	0	10	8	1	sum	0,939 46	0,899 4
181	1	0	10	8	0	sum	0,938 16	0,913 32
188	1	0	10	16	1	sum	0,937 54	0,851 08

**Tabelle A6:** Performanz des VK-Algorithmus zur Unterscheidung von *RPE-Schaden* (☉) und *Weißfärbung* (●) (besten 25 Parameterkombinationen). Die Zeile mit der besten Gesamt-Performanz (maximale Summe aus  $AUC_{☉☉}$  und  $AUC_{☉●}$ ) ist Hellgrau gekennzeichnet.

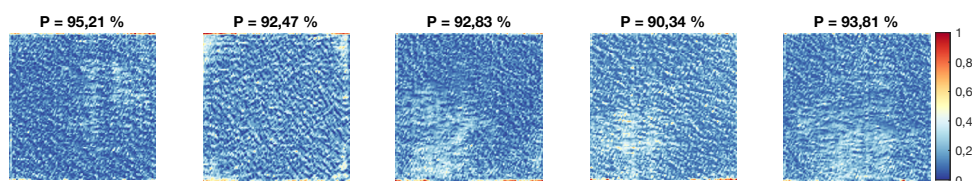
Index	Vorprozessierung		Zeitverlauf				AUC	
	Medianfilter	Bew. -korrektur	Nachbarschaft $l$	Wichtung	Normierung	Merkmal $F$	☉ - ☉	☉ - ●
81	1	1	10	4	0	sumG	0,9021	0,944 05
83	1	1	10	4	0	$\Delta tG$	0,892 43	0,942 19
84	1	1	10	4	1	$\Delta tG$	0,892 43	0,942 19
82	1	1	10	4	1	sumG	0,899 63	0,941 33
58	1	1	25	4	1	sumG	0,896 54	0,9401
329	0	0	50	8	0	$\Delta tG$	0,906 21	0,937 48
330	0	0	50	8	1	$\Delta tG$	0,906 21	0,937 48
87	1	1	10	8	0	sumG	0,942 14	0,9372
173	1	0	10	2	0	$\Delta tG$	0,899 42	0,935 53
174	1	0	10	2	1	$\Delta tG$	0,899 42	0,935 53
351	0	0	25	8	0	sumG	0,923 42	0,933 52
279	0	1	10	8	0	sumG	0,927 81	0,933 22
375	0	0	10	8	0	sumG	0,922 73	0,932 07
64	1	1	25	8	1	sumG	0,930 34	0,932 07
159	1	0	25	8	0	sumG	0,919 58	0,931 47
57	1	1	25	4	0	sumG	0,8925	0,931 44
177	1	0	10	4	0	sumG	0,887 77	0,930 65
333	0	0	50	16	0	sumG	0,940 77	0,930 62
179	1	0	10	4	0	$\Delta tG$	0,877 52	0,930 47
180	1	0	10	4	1	$\Delta tG$	0,877 52	0,930 47
369	0	0	10	4	0	sumG	0,878 51	0,929 87
233	0	1	50	8	0	$\Delta tG$	0,893 05	0,929 43
234	0	1	50	8	1	$\Delta tG$	0,893 05	0,929 43
377	0	0	10	8	0	$\Delta tG$	0,894 49	0,929 24
378	0	0	10	8	1	$\Delta tG$	0,894 49	0,929 24

## A1.2 Flaches Netz für Aktivitätskarten

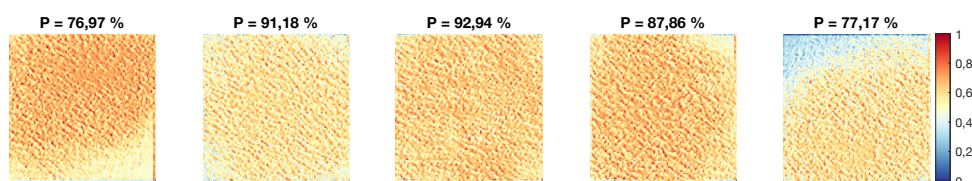
In Abbildung A1 sind die Grad-CAM Karten für weitere Beispiele gezeigt.



(a) Klasse: *kaum sichtbar*



(b) Klasse: *spät sichtbar*



(c) Klasse: *sofort sichtbar*

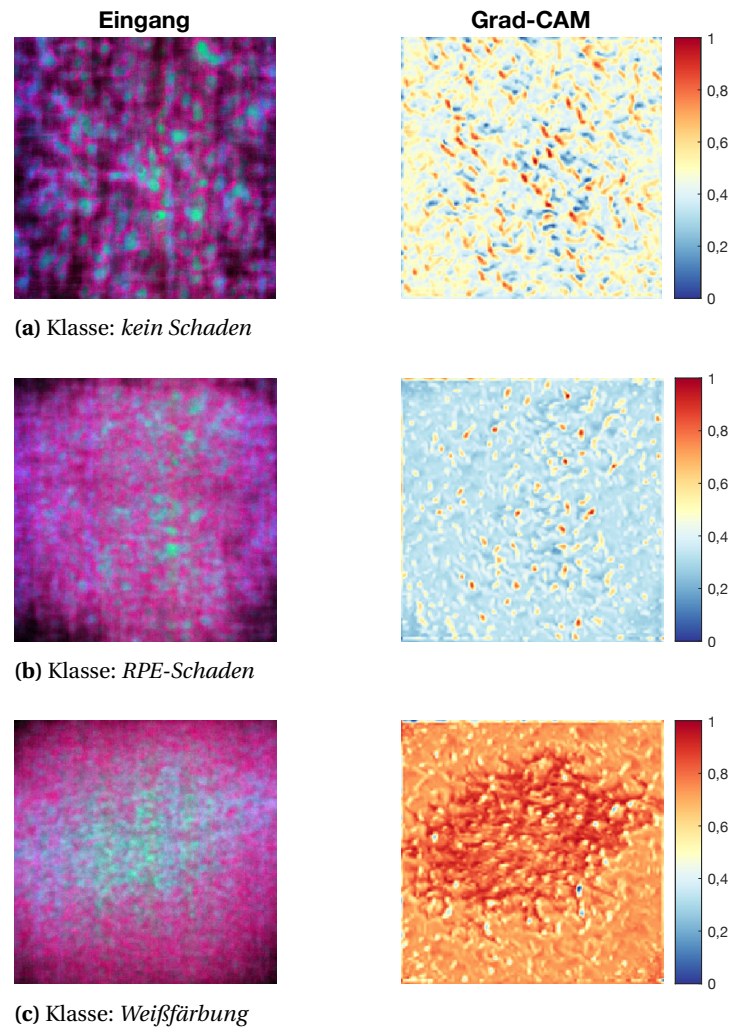
### Abbildung A1: Grad-CAM Karten für je fünf Beispiele der drei Klassen

Die Zahl über jedem Bild repräsentiert die Sicherheit, mit der das Netz das jeweilige Beispiel in diese Klasse einsortiert.

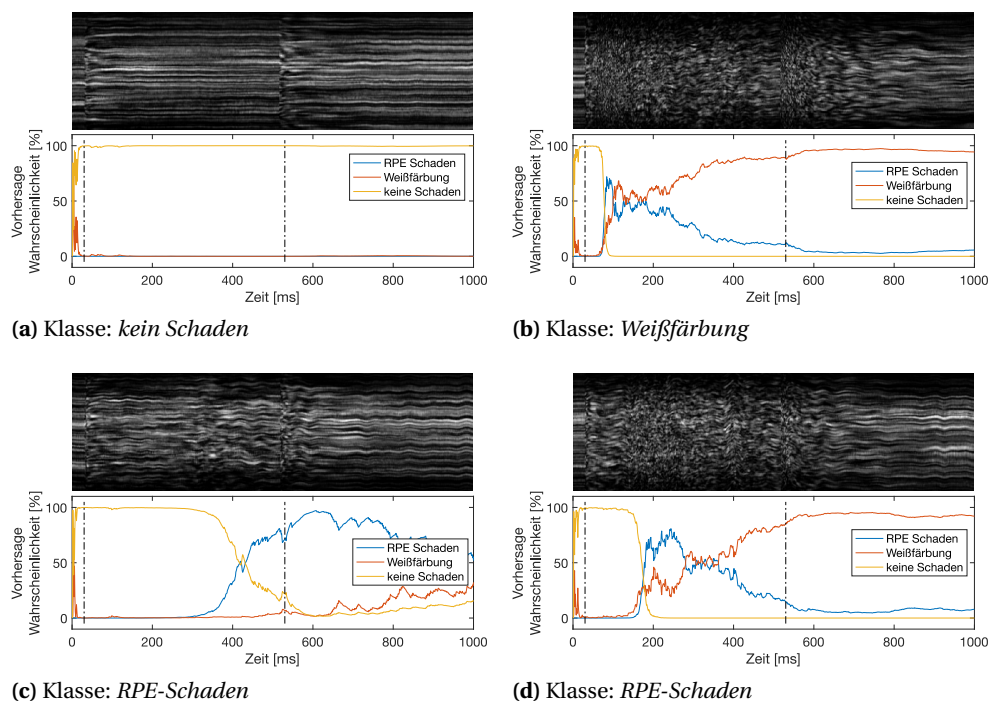
(a) *kaum sichtbar*, (b) *spät sichtbar* und (c) *sofort sichtbar*.

## A1.3 Convolutional Neuronal Network für *ex-vivo* Messreihen

Mit der gleichen flachen CNN-Struktur kann in dem *ex-vivo* Datensatz eine Genauigkeit von 0,9999 im Trainingsdatensatz und von 0,9985 im Validierungsdatensatz erreicht werden.



**Abbildung A2: Eingangsbild und Grad-CAM für die drei Klassen**  
 (a) kein Schaden (○), (b) RPE-Schaden (⊖) und (c) Weißfärbung (●).



### Abbildung A3: Beispiele für die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten *ex-vivo*

Die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten sind als Funktion der Zeit für vier Beispiele zusammen mit dem jeweiligen Zeitverlaufs-Specklemuster gezeigt. (a) *kein Schaden* (○). (b) *Weißfärbung* (●) (c) *RPE-Schaden* (⊙) (d) *RPE-Schaden* (⊙), als Beispiel für eine falsche Klassifizierung.



# Danksagung

Ich möchte meinen tiefsten Dank an Prof. Dr. Gereon Hüttmann für seine wertvolle Unterstützung während meiner Forschung aussprechen. Sein aufschlussreiches Feedback und seine konstruktiven Diskussionen haben wesentlich zur Entwicklung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ralf Brinkmann, der mich in seine Forschungsgruppe aufgenommen und mich während des gesamten Prozesses mit großem Engagement unterstützt hat. Seine Expertise und Ratschläge waren entscheidend, um die Herausforderungen dieses Projekts zu bewältigen.

Ich möchte den Teams der Augenkliniken in Lübeck und Kiel für ihre wesentliche Unterstützung bei den präklinischen Studien herzlich danken, insbesondere Prof. Dr. Yoko Miura und Dr. Claus von der Burchard, sowie den KollegInnen der GTH der Universität zu Lübeck für die Betreuung während der Versuche.

Ich möchte auch meine KollegInnen anerkennen, die direkt zu meinen Forschungsprojekten beigetragen haben und möchte mich insbesondere bei Dr. Eric Seifert bedanken, der mich schon während meiner Masterarbeit mit seiner Begeisterung für Lasertechnik und Data Science angesteckt hat und mir immer mit wertvollen Diskussionen und Ideen zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt außerdem Tobias Zaremba, Denise Meier, Alexander Shpychak und Leoni Stockmann für ihre Mitarbeit und Unterstützung bei den Experimenten.

Ich bin auch meinen KollegInnen von BMO und MLL für ihre technische und intellektuelle Unterstützung dankbar. Vor allem dem Photoakustik-Team mit Alexander Baade, Kerstin Schlott und Meike Lawin, die mit mir ihr Labor und sogar ihren Messaufbau geteilt haben und mir die Temperaturmessungen ermöglicht haben. Die Kameradschaft und Motivation meiner Bürogenossen waren eine bedeutende Quelle der Ermutigung und Freude, besonders in unseren weniger wissenschaftlichen Seitenprojekten.

Darüber hinaus schätze ich die finanzielle Unterstützung und den fruchtbaren Austausch mit dem Team von Lutronic Corp.

Schließlich möchte ich meiner Familie meinen herzlichen Dank aussprechen. Eure unerschütterliche Unterstützung und manchmal unkonventionellen Methoden der Motivation waren entscheidend, um auf diesem Weg durchzuhalten.