

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

**Messungen von retinalen
Gewebeveränderungen während der
Photokoagulation mittels Optischer
Kohärenztomographie (OCT)**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Naturwissenschaften -

vorgelegt von Heike Hedwig Müller
aus Cuxhaven
Lübeck 2013



Heike Hedwig Müller

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr.-Ing. Alexander Schlaefer

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 2013

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	5
2.1	Optische Kohärenztomographie	5
2.1.1	Theorie der Spectral-Domain-OCT	7
2.1.2	Axiale und laterale Auflösung	10
2.1.3	Artefakte durch Objektbewegungen (Fringe Washout)	11
2.1.4	Phasenempfindliche (Doppler-) OCT	12
2.1.5	Expansion	16
2.1.5.1	Einfluss des Brechungsindex auf die spezifische Expansion von Wasser	17
2.2	Optoakustische Temperaturmessungen	19
2.2.1	Optoakustik	19
2.2.2	Berechnung der Gewebetemperatur aus dem optoakustischen Signal	21
2.3	Modellierung von Wärmeleitung im Gewebe	22
2.4	Medizinische Grundlagen	24
2.4.1	Anatomie des Auges	24
2.4.2	Krankheitsbilder der Makula	26
2.4.3	Wechselwirkung von Licht und Gewebe	27
2.4.4	Laserkoagulation am Augenhintergrund	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Versuchsaufbau	31
3.1.1	Aufbau zur optoakustischen Temperaturmessung	31

3.1.2	Versuchsaufbau Optische Kohärenztomographie	32
3.1.3	Gesamtsystem	34
3.1.4	Spezifikationen des Gesamtsystems	37
3.2	Algorithmen und Programme	43
3.2.1	Messsoftware	43
3.2.2	Auswertesoftware	47
3.2.3	Entfaltung der Phasensprünge	48
3.2.4	Speckle-Fluktuationen	54
3.3	Versuchsdurchführung	55
3.3.1	<i>Ex-vivo</i> -Experimente an Schweineaugen	55
3.3.1.1	Histologische Präparation	56
3.3.2	<i>In-vivo</i> -Experimente am Kaninchenauge	57
4	Ergebnisse	59
4.1	<i>Ex-vivo</i> -Messungen am Schweineauge	59
4.1.1	Fundusbild nach Bestrahlung	60
4.1.2	Änderung der Gewebestreuung	64
4.1.3	Phasendifferenz	75
4.1.4	Laterale Ausdehnung der Verschiebung und axiale Expansionsverteilung in Abhängigkeit der Fleckdurchmesser	96
4.1.5	Histologie	100
4.2	<i>In-vivo</i> -Messungen am Kaninchenauge	105
5	Diskussion	121
5.1	Aufbau	121
5.2	Echtzeit-Darstellung der Koagulationseffekte in den <i>ex vivo</i> Versuchsreihen	124
5.2.1	Echtzeitmessung der Gewebestreuung	125
5.2.2	Echtzeitmessung der Gewebeverschiebung	126

5.2.2.1	Vergleich der Gewebeverschiebung mit der thermischen Gewebeexpansion	127
5.2.2.2	Bestimmung der Temperaturerhöhung aus der lokalen Expansion des Gewebes	129
5.2.2.3	Ursache der Verschiebung während der Koagulation	131
5.3	Mögliche Parameter für eine Dosimetrie	134
5.4	Übertragung auf die <i>In-vivo</i> -Situation	141
5.4.1	Echtzeitmessung der Gewebestreueung	141
5.4.2	Echtzeitmessung der Gewebeverschiebung	142
6	Zusammenfassung	145
7	Ausblick	147
7.1	Gewebeeffekte während der Photokoagulation	147
7.1.1	Gerätetechnische Änderungen	147
7.1.2	Weitere Experimente	148
7.2	Umsetzung des Messverfahrens zur Dosimetrie	150
A	Anhang	159
A.1	Monti-Graziadei Fixierung	159
A.2	Datensätze	159

1 Einleitung

Seit der Einführung der Photokoagulation im Jahr 1959 durch Meyer-Schwickerath [Meyer-Schwickerath, 1954] hat sich dieses Verfahren zu einer sehr erfolgreichen und gut etablierten Behandlungsmethode in der Augenheilkunde entwickelt. Durch Bestrahlung mit einem cw-Laser wird ein Gewebeschaden am Augenhintergrund erzeugt, der sich vom retinalen Pigmentepithel (RPE) in die angrenzenden neuronalen Retinaschichten erstreckt. Durch die Variation des Strahlungsflusses, des Durchmessers des Bestrahlungsflecks oder der Bestrahlungsdauer ist es möglich, die Größe und die Stärke der Koagulation zu verändern, um ein optimales Behandlungsergebnis zu erzielen. Die optimalen Bestrahlungsparameter sind abhängig von der Pigmentierung des Auges und müssen deshalb für jeden Patienten individuell eingestellt werden. Nach Ermittlung der Bestrahlungsparameter im Randbereich des Auges fällt die Koagulationsstärke über den gesamten Augenhintergrund trotz konstanter Bestrahlungsparameter zum Teil sehr unterschiedlich aus, und es kann im ungünstigsten Fall zu unerwünschten Blutungen am Auge kommen. Eine Verfeinerung der Photokoagulation durch eine Online-Dosimetrie würde von Vorteil sein da sie eine gleichmäßigere Stärke und Größe der Koagulationsareale und eine sicherere und schnellere Behandlung gewährleisten könnte.

Messung der Veränderung der Lichtstreuung [Inderfurth et al., 1994] oder der Autofluoreszenz [Framme et al., 2002] wurden an der Retina als mögliche Dosimetrieverfahren evaluiert, konnten sich klinisch jedoch nicht durchsetzen. Die Histologie, als Goldstandard für die Bewertung der Koagulationen ist zeitaufwendig und *in vivo* nicht durchführbar. Ein wichtiger, den biologischen Effekt bestimmender Evaluationsparameter ist der Temperaturverlauf während der Koagulation. Zeitaufgelöste Temperaturmessungen der Retina während der Laserkoagulation sind mit der Optoakustik, einer neuen nicht invasiven Messtechnik, die den durch einen zusätzlichen gepulsten Messlaser erzeugten Druckunterschied im Auge misst, möglich [Schlott et al., 2007, Brinkmann et al., 2012]. Ein Ringwandler, der in einem Kontaktglas integriert ist, misst die integrale Stärke des akustischen Transienten. Dieser korreliert mit der erzeugten Temperaturerhöhung im Auge [Kandulla et al., 2006]. Die orts aufgelöste Wirkung der Koagulation auf die verschiedenen retinalen Schichten kann mit diesem Verfahren nicht bestimmt werden.

Die Optische Kohärenztomographie (OCT) [Drexler, 2008] ist das bisher einzige Bildgebungsverfahren, das nicht-invasiv und *in vivo* die verschiedenen Gewebeschichten der Retina darstellen kann. Neben morphologischer Information liefert die OCT durch Auswertung der Phase des Signals als Doppler-OCT auch quantitative Informationen über Bewegungsgeschwindigkeiten im Gewebe [Milner et al., 2002]. Die OCT hat sich in den letzten Jahren als eine Untersuchungsmethode zu Diagnose und Nachuntersuchung in der Augenheilkunde etabliert [Sakata et al., 2009]. Die OCT zeigt auch nach einer Photokoagulation die durch Behandlung erzeugten Veränderungen in der Gewebemorphologie mit sehr hoher Auflösung [Framme et al., 2009].

Die direkten Auswirkungen einer Laserbestrahlung auf retinale Gewebe wurden bisher noch nicht mit OCT dargestellt. Es existieren lediglich OCT basierte Untersuchungen zur thermischen Koagulation von Blutgefäßen [Barton et al., 2001, Black et al., 2005]. Eine Darstellung der dynamischen Gewebeveränderungen während der Photokoagulation der Retina mittels OCT verspricht zum einen zu einem tieferen Verständnis der Vorgänge beizutragen, zum anderen könnte sie ein neues nicht invasives Dosimetrieverfahren ermöglichen.

In dieser Arbeit sollten die apparativen Voraussetzungen für OCT-Messungen während der Laserbestrahlung der Retina von enukleierten Tieraugen und anästhierten Kaninchen geschaffen werden. Desweiteren sollten Art und Ausmaß der durch die Laserbestrahlung erzeugten Gewebeveränderungen dokumentiert und analysiert werden. Im Einzelnen beschreibt diese Arbeit die folgenden Punkte:

1. Adaption eines Hochgeschwindigkeits-OCT-Systems an eine Laserspaltlampe:

Um eine Aufnahme von OCT-Bildern während einer Photokoagulation zu ermöglichen, wurde eine Optik zur Einspiegelung eines 2-dimensional scannenden OCT-Systems in den Strahlengang einer Laserspaltlampe entwickelt, welches die Funktionalität der Spaltlampe und der optoakustischen Temperaturmessung nur minimal beeinträchtigt.

2. Charakterisierung des OCT-Aufbaus:

Die zur Aufnahme dynamischer Prozesse durch OCT notwendige Aufnahmegeschwindigkeit wurde abgeschätzt. Bei einer zu geringen Bildrate kommt es durch Verwischung des Interferenzmusters ("Fringe Washout") zu einem Abfall der Signalstärke bis hin zum kompletten Verschwinden des Signals. Besonders bei der Messung von Weglängenänderungen durch Auswertung der Phasendifferenzen des OCT-Signals ist die Aufnahmegeschwindigkeit von elementarer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde eine Abschätzung der minimal und der maximal vom OCT-System aufzulösenden Geschwindigkeiten vor-

genommen.

3. Programmierung der Messsoftware zur Datenerfassung und Entwicklung von Algorithmen zur Auswertung der OCT Messungen:

Zur Erreichung einer hohen Messgeschwindigkeit wurden Datenvolumen von bis zu 200 MB pro Sekunde auf einem RAID-Verbund Festplattensystem abgespeichert. Dazu wurde eine spezielle Messsoftware in LabVIEW entwickelt, die eine Abspeicherung ohne Datenverlust bei der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit des OCT-Gerätes ermöglichte. Zur nachträglichen Auswertung der Messergebnisse wurde ein Auswerteprogramm erstellt, welches auch Bewegungsartefakte korrigiert.

4. Vergleich von OCT-Bildgebung und optoakustischer Temperaturmessung während einer Laserbestrahlung der Retina *ex vivo* an enukleierten Schweineaugen:

Die Darstellbarkeit von Photokoagulationen durch die OCT wurde zunächst an enukleierten Schweineaugen untersucht. Zusätzlich zu der OCT-Bildgebung wurde die Temperatur mittels Optoakustik bestimmt. Neben den Änderungen der Gewebestreuung sollten Gewebeverschiebungen durch Auswertung der Phaseninformation der OCT-Messungen bestimmt werden. Diese wurden mit dem Temperaturverlauf und der Koagulation des Gewebes in Zusammenhang gebracht. Die Temperaturverteilungen in der Retina während der Bestrahlung wurden berechnet, um die thermische Expansion des Gewebes zu modellieren.

5. Vergleich der lateralen und axialen Ausdehnung von Koagulationsherden zwischen OCT und Histologie:

Die Histologie wird als Goldstandard für die Beurteilung von Koagulationsherden angesehen. Der Vergleich zwischen Histologie und der OCT-Bildgebung ist eine gute Methode um die Auswirkungen der Laserbestrahlung auf das Gewebe zu evaluieren [Toth et al., 1997, Birngruber et al., 1995]. Mit einer Bestrahlungsreihe konnte der Bezug zwischen Histologie und den durch die OCT bestimmten Veränderungen in den Streueigenschaften, sowie der mittels phasensensitiver OCT bestimmten Gewebeverschiebung hergestellt werden.

6. Vergleich von OCT-Bildgebung und optoakustischer Temperaturmessung während einer Laserbestrahlung der Retina *in vivo* an Kaninchenaugen:

Durch die *in vivo* unvermeidlich von Herzschlag und Atmung hervorgerufenen Gewebewebungen, wird die Analyse der durch die Laserbestrahlung hervorgerufenen Gewebewebung erschwert. Erste Versuchsreihen an Augen anästhesierter Kaninchen quanti-

1. Einleitung

fizierten diese Bewegungen und zeigten die prinzipielle Möglichkeit einer Kompensation.

2 Theorie

2.1 Optische Kohärenztomographie

Der grundsätzliche Aufbau eines OCT-Systems besteht aus Lichtquelle, Interferometer und Detektor. Das Prinzip der OCT ist in Abbildung 2.1 mit einem Michelson-Interferometer demonstriert. Die Strahlung einer kurzkohärenten Lichtquelle wird hier parallelisiert und durch einen Strahlteilerwürfel gleichmäßig in Referenzstrahlung, beschrieben durch das elektrische Feld $E_R(t)$, und Probenstrahlung $E_S(t)$ aufgeteilt [Fujimoto und Drexler, 2008].

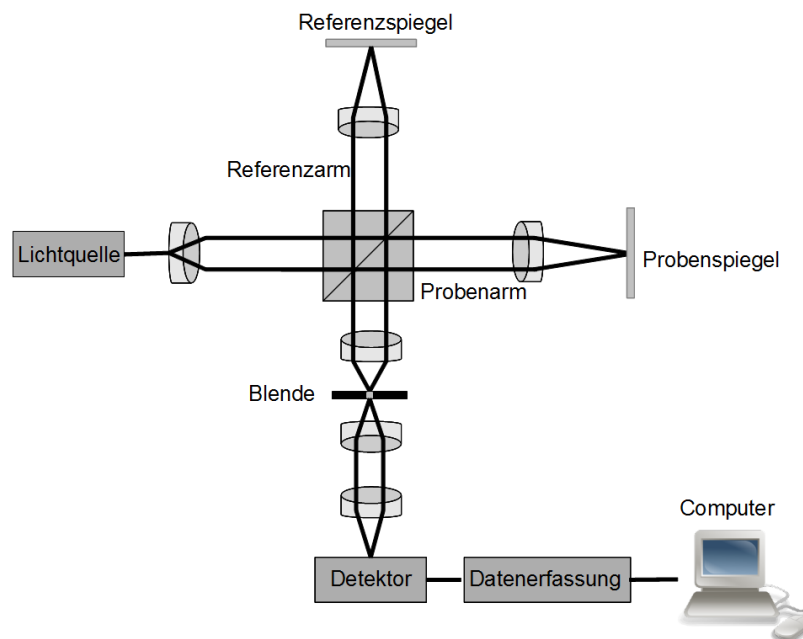


Abbildung 2.1 – Schematischer Aufbau eines OCT-Systems mit Freistrahlint interferometer

Im Referenzarm wird das Licht auf einen Spiegel fokussiert, und bei exakter Justierung des Spiegels orthogonal zum Lichtstrahl wieder direkt zum Strahlteilerwürfel zurückreflektiert. Im Probenarm wird in diesem Beispiel das Licht auf die Probe, hier einen Spiegel, fokussiert und interferiert dann nach Rückreflektion mit dem Referenzlicht. Das elektrische Feld am Ausgang des Interferometers ist die Summe der Felder von Referenz- und Probenstrahlung $E_R(t) + E_S(t)$. Das Interferenzsignal aus Proben- und Referenzarm muss eine ausreichend konfokale Lochblende passieren, um sicherzustellen, dass das

Probenlicht räumlich auf dem Detektor eine konstante Phase besitzt und sich somit der Interferenzkontrast durch Mittelung über verschiedene Phasen des Interferenzsignals nicht reduziert.

Die Signale werden mittels eines Photodetektors aufgenommen, welcher die Intensität der elektrischen Felder misst, die proportional zum Quadrat des Gesamtfeldes ist [Fujimoto und Drexler, 2008]:

$$I_o \sim |E_R|^2 + |E_S|^2 + 2E_R E_S \cos(2k\Delta L) \quad (2.1)$$

ΔL ist die Weglängendifferenz zwischen dem Signal aus dem Referenzarm und dem Signal aus dem Probenarm.

Es gibt verschiedene Ansätze zur technischen Realisierung des OCT Messverfahrens. Das älteste ist das Time-Domain-OCT-Verfahren (TDOCT), bei dem das Interferenzsignal aller spektraler Komponenten mit einer Photodiode aufgenommen wird. Der Referenzarm verändert zyklisch seine Länge, um kontinuierlich die Intensität der Interferenz zu messen und somit die Tiefeninformation aus der Probe zu erhalten. Der Photostrom wird verstärkt, mit einer Datenerfassungskarte digitalisiert und mit dem Computer numerisch bearbeitet. Wird ΔL variiert, erhält man einen A-Scan, welcher das tiefenaufgelöste Reflektionsprofil der Probe an der Stelle des fokussierten Probenstrahls ist. Durch Verwendung einer breitbandigen, d.h. kurzkohärenten, Lichtquelle wird nur dann eine Interferenz gemessen werden, wenn die Weglängendifferenz des Referenzarms und des Probenarms im Bereich der Kohärenzlänge liegt.

Die neueren Fourier-Domain-OCT-Systeme (FDOCT) verwenden hingegen einen Detektor, welcher die Interferenz spektral aufgelöst misst. Bei einem FDOCT ist es nicht mehr notwendig den Referenzarm in der Länge zu variieren und es kann dadurch eine höhere Messgeschwindigkeit mit einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden [de Boer, 2008]. Technisch umsetzen lässt sich FDOCT als Spektralradar, welches mittels einer breitbandigen Superlumineszenzdiode (SLD) und eines Spektrometers das Interferogramm direkt auf einen Liniendetektor abbildet oder als Swept-Source-OCT (SSOCT), bei dem die Breitbandigkeit der Lichtquelle mit einem in der Wellenlänge durchstimmbaren Laser realisiert wird. Spektralradar hat den Vorteil einer hohen axialen Phasenstabilität. Es können mit modernen CMOS-Kameras Aufnahmegeschwindigkeiten von bis zu 312 kHz erreicht werden [Potsaid et al., 2008]. Bei SSOCT liegt das Phasenrauschen höher als bei dem Spektralradar, allerdings können Photodioden und Hochgeschwindigkeits-A/D-Wandler verwendet werden. Dies führt zu einem großen

Geschwindigkeitsvorteil gegenüber den CMOS Kameras und es werden Aufnahmege-
schwindigkeiten von über 5 MHz erreicht [Wieser et al., 2010].

Um eine höhere Flexibilität im Interferometer zu erhalten wird in vielen Fällen der
Strahlteilerwürfel durch einen 2×2 -Faserkoppler mit monomodenen Fasern ersetzt (Abb.
2.2). Dies ist vor allem in der medizinischen Anwendung ein Vorteil, da die Fasern ei-
ne räumliche Trennung zwischen den beiden Interferometerarmen ermöglichen und die
konfokale Lochblende ersetzen. Zudem wird ein scannender Mechanismus integriert, um
einen bestimmten lateralen Bereich abtasten zu können. Während der Scanner schritt-
weise den fokussierten Probenstrahl über die Probe fährt, werden kontinuierlich A-Scans
aufgenommen und im Computer zu einem zweidimensionalen Querschnittsbild (B-Scan)
verarbeitet. Wird ein zweiachsiger Scanner in den Aufbau integriert, sind auch dreidi-
mensionale Volumenbilder möglich.

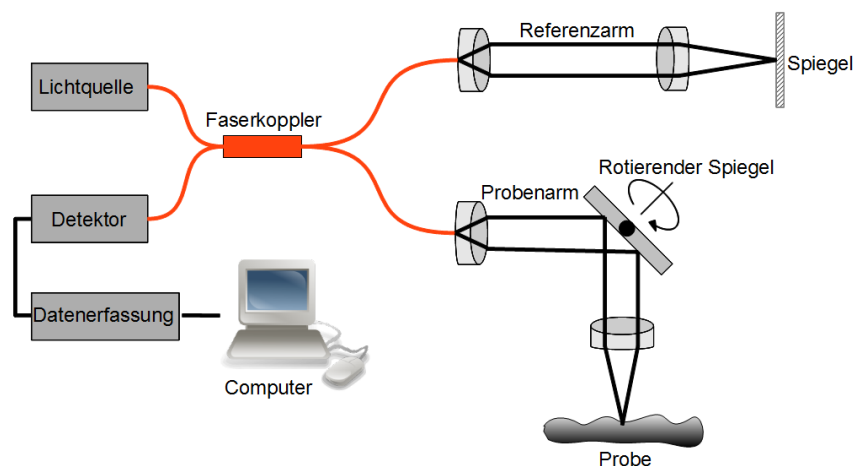


Abbildung 2.2 – Schematischer Aufbau eines fasergekoppelten OCT-Systems mit scannenden Elementen

2.1.1 Theorie der Spectral-Domain-OCT

In dem Michelson-Interferometer von Abbildung 2.1 sei das elektrische Feld in der komplexen Darstellung als [Izatt, 2008]:

$$E_i = s(k)e^{i(kz - \omega t)} \quad (2.2)$$

beschrieben. Die elektrische Feldamplitude $s(k)$ ist dabei eine Funktion der Wellenzahl $k = 2\pi/\lambda$ mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$. Die Wellenlänge λ und die Frequenz ν sind mit dem Brechungsindex $n(\lambda)$ und der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum $c_0/n(\lambda) = \lambda\nu$ ge-

koppelt. Für die weitere Betrachtung wird der Strahlteilerwürfel als achromatisch und mit einem Teilungsverhältnis von 0,5 angenommen und der Referenzspiegel besitze die elektrische Feldreflektivität r_R und entsprechend die Leistungsreflektivität $R_R = |r_R|^2$. Der Abstand zwischen Strahlteiler und Referenzspiegel beträgt z_R . Für den Probenarm wird eine Aufeinanderfolge von N diskreten reflektierenden Flächen mit dem Abstand z_S und der Feldreflektivität r_S angenommen. Jede Reflektion erzeugt ein elektrisches Feld $\frac{s(k,\omega)}{\sqrt{2}} r_{S_n} e^{i(2kz_{S_n} - \omega t)}$. Auch hier wird die Leistungsreflektivität von jedem Reflektor mit dem quadrierten Betrag der Reflektivität für das elektrische Feld beschrieben $R_{S_n} = |r_{S_n}|^2$. Im Falle eines diskreten Streuers ergibt sich somit für die in den Strahlteilerwürfel zurückreflektierten Felder des Referenzarms

$$E_R = \frac{E_i}{\sqrt{2}} r_R e^{i2kz_R} \quad (2.3)$$

und des Probenarms

$$E_S = \frac{E_i}{\sqrt{2}} \sum_{n=1}^N r_{S_n} e^{i2kz_{S_n}} \quad (2.4)$$

Die Felder werden beim zweiten Durchgang durch den Strahlteilerwürfel noch einmal um den Faktor $\sqrt{2}$ abgeschwächt und interferieren auf dem Detektor, welcher mit der Sensitivität ρ einen Photostrom I_D erzeugt, der proportional zum Quadrat der Summe der eingehenden Felder ist.

$$I_D(k) = \frac{\rho}{2} \left\langle \left| \frac{s(k)}{\sqrt{2}} r_R e^{i(2kz_R - \omega t)} + \frac{s(k)}{\sqrt{2}} \sum_{n=1}^N r_{S_n} e^{i(2kz_{S_n} - \omega t)} \right|^2 \right\rangle \quad (2.5)$$

Durch zeitliche Mittelung entfallen die zeitabhängigen Terme. Für die spektrale Abhängigkeit der Emission der Lichtquelle wird zur Vereinfachung $\langle |s(k)|^2 \rangle$ durch $S(k)$ ersetzt.

$$\begin{aligned} I_D(k) &= \frac{\rho}{4} [S(k)(R_R + R_{S_1} + R_{S_2} \dots)] \\ &+ \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{S_n}} \left(e^{i2k(z_R - z_{S_n})} + e^{-i2k(z_R - z_{S_n})} \right) \right] \\ &+ \frac{\rho}{4} \left[S(k) \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{S_n} R_{S_m}} \left(e^{i2k(z_{S_n} - z_{S_m})} + e^{-i2k(z_{S_n} - z_{S_m})} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.6)$$

Vereinfacht man die Gleichung mit der Eulerschen Relation $e^{i\varphi} = \cos(\varphi) + i \sin(\varphi)$ so erhält man eine Gleichung für das spektrale Interferogramm, welches die vom Detektor

gemessene Abhängigkeit der Intensität von der Wellenzahl k widerspiegelt.

$$\begin{aligned}
 I_D(k) &= \frac{\rho}{4} [S(k)(R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots)] \\
 &+ \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{S_n}} \cos[2k(z_R - z_{S_n})] \right] \\
 &+ \frac{\rho}{4} \left[S(k) \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{S_n} R_{S_m}} \cos[2k(z_{S_n} - z_{S_m})] \right]
 \end{aligned} \tag{2.7}$$

Die Gleichung setzt sich aus drei Summen zusammen. Die erste Summe besteht aus weglängenunabhängigen Termen des Lichtquellenspektrums, deren Amplitude proportional zu der vom Referenzspiegel zurückgestreuten Intensität zuzüglich der Summe der Probenintensitäten ist. Häufig werden diese als DC-Komponenten bezeichnet. Sie sind meist die stärkste Komponente auf dem Detektor. Die zweite Summe ist der erwünschte Signalterm. Er entsteht aus der Interferenz zwischen der in der Probe gestreuten Strahlung und der Referenzstrahlung. Die dritte Summe enthält die Autokorrelationsterme. Diese treten bei Interferenz der durch verschiedene Probestrukturen gestreuten Strahlungen auf. Dieser Term ist der schwächste der drei Terme des Interferogramms.

Um das Tiefenprofil $\sqrt{R_s(z_s)}$ der internen Reflektivitäten in der Probe bestimmen zu können, wird die inverse Fouriertransformierte von Gl. (2.7) gebildet.

$$\begin{aligned}
 i_D(z) &= \frac{\rho}{4} [\gamma(z)[R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots]] \\
 &+ \frac{\rho}{4} \left[\gamma(z) \otimes \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{S_n}} (\delta(z \pm 2(z_R - z_{S_n}))) \right] \\
 &+ \frac{\rho}{8} \left[\gamma(z) \otimes \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{S_n} R_{S_m}} (\delta(z \pm 2(z_{S_n} - z_{S_m}))) \right]
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

Die inverse Fouriertransformierte des Lichtquellenspektrums $S(k)$ wird auch als Kohärenzfunktion $\gamma(z)$ bezeichnet. Die Breite der Kohärenzfunktion bestimmt die axiale Auflösung der OCT. Ist sie wesentlich geringer als der Messbereich, kann $\gamma(z)$ durch eine δ -Funktion ersetzt werden und man erhält näherungsweise das Tiefenprofil bzw. den A-Scan.

$$\begin{aligned}
 i_D(z) &= \frac{\rho}{4} [\gamma(z)[R_R + R_{S1} + R_{S2} + \dots]] \\
 &+ \frac{\rho}{4} \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{S_n}} [\gamma[2(z_R - z_{S_n})] + \gamma[-2(z_R - z_{S_n})]] \\
 &+ \frac{\rho}{8} \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{S_n} R_{S_m}} [\gamma[2(z_{S_n} - z_{S_m})] + \gamma[-2(z_{S_n} - z_{S_m})]]
 \end{aligned} \tag{2.9}$$

2.1.2 Axiale und laterale Auflösung

Bei der Betrachtung der lateralen Auflösung eines OCT-Systems wird ein gaußförmiges, zylindersymmetrisches Profil des im Probenarm fokussierten Lichtstrahls angenommen (Abb. 2.3). Vergleichbar ist dies mit einem im Reflektionsbetrieb scannenden konfokalen Mikroskop, wobei die Monomodefaser als Lochblende für die Beleuchtung und die Detektion des zurückgestreuten Lichts fungiert [Izatt, 2008]. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie ist es mit der OCT durch die interferometrische Detektion möglich, eine axiale Auflösung unabhängig von der numerischen Apertur des Fokusses zu realisieren.

Die axiale Auflösung δz wird, wie Gl. 2.8 zeigt, durch die Kohärenzlänge der verwendeten Strahlung bestimmt und ist somit invers proportional zur Bandbreite der Lichtquelle $\Delta\lambda$ [Fujimoto und Drexler, 2008]. Breitbandige Lichtquellen sowie eine geringe Zentralwellenlänge λ_0 führen somit zu einer hohen axialen Auflösung.

$$\delta z = l_c = \frac{2 \cdot \ln(2)}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.10)$$

Die transversale Auflösung δx in der OCT-Bildgebung ist, äquivalent zur konfokalen Bildgebung, abhängig von dem Auflösungsvermögen der Linse oder des Linsensystems. Der Durchmesser des scannenden Gaußschen Strahls ist dabei invers proportional zur Numerischen Apertur (NA) des fokussierten Lichtstrahls [Saleh und Teich, 2007]:

$$\delta x = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \quad (2.11)$$

Eine sehr hohe transversale Auflösung wird also durch eine hohe Numerische Apertur erreicht. Die laterale Auflösung steht allerdings in Beziehung zum Tiefenmessbereich. Wie bei der klassischen konfokalen Bildgebung wird Strahlung nur im Bereich der Schärfentiefe, d.h. der Rayleighlänge des Fokusses, detektiert. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der transversalen Auflösung zu einer Verkleinerung des axialen Bildfeldes FOV_{axial} führt:

$$FOV_{axial} = \frac{2 \cdot n \cdot \lambda_0}{\pi \cdot NA^2} \quad (2.12)$$

Es ist somit von Vorteil für die OCT eine kleine Apertur zu verwenden, um auch in größerer Messtiefe im streuenden Medium noch eine gute Signalintensität zu erreichen. Das laterale Bildfeld FOV_{max} wird im Wesentlichen durch die im Aufbau integrierten Scanner bestimmt:

$$FOV_{lateral} = 2 \cdot f \cdot \theta_{max} \quad (2.13)$$

Im einfachsten Fall bewegen diese den Probenstrahl durch die Eingangsapertur einer Linse der Brennweite f mit einem Winkel von maximal θ_{\max} .

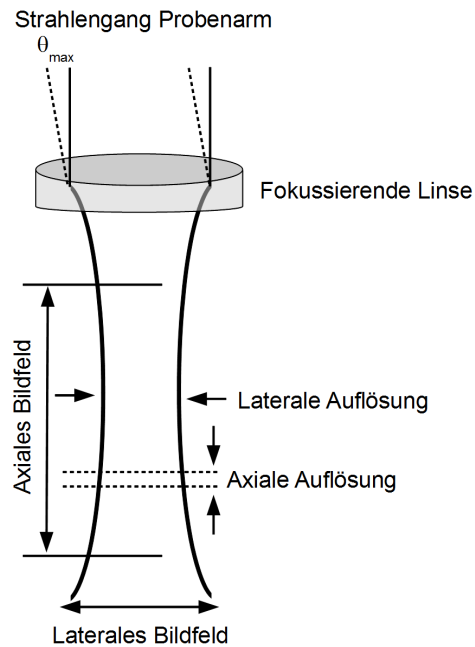


Abbildung 2.3 – Schematische Darstellung der Probenarmoptik unter Annahme eines gaußförmigen Strahlprofils nach [Izatt, 2008]

2.1.3 Artefakte durch Objektbewegungen (Fringe Washout)

In der Optischen Kohärenztomographie können Bildartefakte entstehen, wenn sich das Messobjekt mit hoher Geschwindigkeit bewegt. Dabei wird unterschieden zwischen der axialen und der transversalen Bewegung der Probe [Yun et al., 2004].

Axiale Bewegungen können besonders beim Spectral-Domain-OCT, welches den Vorteil einer sehr hohen Phasenstabilität aufgrund der gleichzeitigen Aufnahme eines kompletten Interferogramms hat, zu Problemen führen [Leitgeb, 2008]. Bei einer Bewegung der Probe verschiebt sich das Interferenzmuster während der Aufnahmezeit über den Liniendetektor und infolge dessen verschlechtert sich die Modulationstiefe und daraus folgend die Sensitivität des Systems. Bei einer axialen Verschiebung der Probe um $\Delta z = |v_z T|$ während der Integrationszeit T der Zeilenkamera verringert sich das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) um den Faktor [Yun et al., 2004]:

$$\Delta \text{SNR}_{\text{Axial}} = \frac{\sin^2(k_0 \Delta z)}{(k_0 \Delta z)^2} \quad (2.14)$$

$k_0 \approx \frac{2\pi}{\lambda_0}$ steht für die zentrale Wellenzahl des verwendeten Spektrums. Der Signalverlust entsteht durch eine kontinuierliche Phasenverschiebung der Interferenz während der Integrationszeit und wird als „Fringe Washout“ bezeichnet, der bei sehr hohen Geschwindigkeiten sogar zu einem kompletten Signalverlust führen kann.

Eine weitere Verminderung des SNR kann durch eine laterale Bewegung im System, zum Beispiel durch schnelles kontinuierliches Abtasten der Probe, verursacht werden [Yun et al., 2004, Leitgeb, 2008]. Hierbei ist der SNR-Verlust abhängig von der Auslenkung der Scanner Δx während der Integrationszeit der Kamera und von der Halbwertsbreite des Gaußschen Strahlprofils δx im Fokus [You et al., 2006].

$$\Delta \text{SNR}_{\text{Lateral}} \cong -5 \cdot \log_{10} \left(1 + 0,5 \cdot \frac{\Delta x^2}{\delta x^2} \right) \quad (2.15)$$

Bei einer lateralen Bewegung der Probe kann es zudem zu einer Verschlechterung der axialen und transversalen Auflösung kommen, da die effektive Größe des fokussierten Probenstrahls durch die Bewegung vergrößert und die Breite des Spektrums eines jeden Streupunkts in der Tiefe reduziert wird. Es gibt mehrere Möglichkeiten die durch hohe laterale oder axiale Bewegungsgeschwindigkeiten verursachten Verluste im SNR zu minimieren. Durch eine Erhöhung der A-Scan Rate und durch schnelleres Auslesen der Zeilenkamera werden die axialen und lateralen Verschiebungen der Probe während der Expositionszeit verringert. Eine gepulste Lichtquelle ermöglicht eine kürzere Belichtungszeit bei gegebener Integrationszeit des Zeilendetektors [You et al., 2006].

2.1.4 Phasenempfindliche (Doppler-) OCT

Spektralradar-OCT hat den Vorteil einer hohen Phasenstabilität. Durch Auswertung der Phase des OCT-Signals können Probenverschiebungen mit einer Auflösung von einigen Nanometern detektiert werden [Leitgeb, 2008]. Das gemessene Interferogramm $I_D(k)$ aus (Gl. 2.7) wird durch die inverse FFT vom Wellenzahlraum k in den Ortsraum z transformiert und resultiert in einem komplexen Ausdruck der Form:

$$\text{FFT}_z^{-1}\{I_D(k)\} = \text{Re } \tilde{I}_D(z) + i \text{Im } \tilde{I}_D(z) = |\tilde{I}_D(z)| e^{i\varphi(z)} \quad (2.16)$$

Der Betrag

$$|\tilde{I}_D(z)| = \sqrt{\text{Re}^2 \tilde{I}_D(z) + \text{Im}^2 \tilde{I}_D(z)} \quad (2.17)$$

der inversen Fouriertransformation ist dabei das Maß für die axiale Amplitudenreflektion, aus der in der weiteren Signalbearbeitung der A-Scan ermittelt wird. Die Phase

$$\tan\varphi(z) = \frac{\text{Im } \tilde{I}_D(z)}{\text{Re } \tilde{I}_D(z)} \quad (2.18)$$

des A-Scans ist dagegen statistisch und trägt keine Information. Werden zwei A-Scans innerhalb der lateralen Auflösung an einer Stelle gemessen, so ist die Änderung der Phase $\Delta\varphi(z)$ zwischen den beiden A-Scans durch die absolute Verschiebung δz der Probe parallel zum Messstrahl gegeben:

$$\Delta\varphi(z) = \varphi_{j+1}(z) - \varphi_j(z) = k_0\delta z \quad (2.19)$$

Aus der Phasenänderung kann die z -Komponente der Geschwindigkeit einer Bewegung von Strukturen in der Probe errechnet werden. Bei Kenntnis des Winkels α zwischen der Strahlachse und dem Geschwindigkeitsvektor kann die Bewegungsgeschwindigkeit berechnet werden.

$$v(z) = \frac{\lambda_0}{4\pi(M-1)\cos(\alpha)} \sum_{j < M} [\varphi_{j+1}(z) - \varphi_j(z)] f_{A\text{-Scan}} \quad (2.20)$$

dabei steht $f_{A\text{-Scan}}$ für die A-Scan-Rate. Im Falle einer langsamen und kontinuierlichen Geschwindigkeit, wie etwa des Blutflusses in einem Gefäß, besteht die Möglichkeit M Phasenprofile an derselben lateralen Position aufzunehmen. Die Bildung der Phasendifferenz kann auch direkt während des Scannens von zwei lateral benachbarten Tiefenprofilen (z.B. x_{11} und x_{12}) erfolgen, wie in Abbildung 2.4 dargestellt.

Damit die Phasen der A-Scans, die subtrahiert werden, noch korreliert sind, müssen sich die zugehörigen Tiefenprofile auf einem gemeinsamen Speckle befinden. Dies wird optimal bei Subtraktion zweier Tiefenprofile aus zeitlich hintereinanderfolgenden B-Scans erreicht. Mit der Zeitdifferenz Δt ergibt sich für die Geschwindigkeit:

$$v(t) = \frac{\lambda_0}{4\pi \cdot \cos \alpha} \frac{[\varphi_{x_{B\text{-Scan}1}} - \varphi_{x_{B\text{-Scan}2}}]}{\Delta t} \quad (2.21)$$

Diese Methode ist vorteilhaft für die Aufnahme zeitlicher Prozesse und Abfolgen von lokal begrenzten Ereignissen.

Für eine zuverlässige Dopplermessung ist es notwendig zwei Phasenwerte in einem Bereich von π aufgenommen zu haben, da ansonsten die Eindeutigkeit der Messung verloren geht. Aus dieser Bedingung ergibt sich die maximal messbare Geschwindigkeitskomponente v_z in Richtung des OCT-Strahls. Diese hängt direkt von der Wellenlänge und der

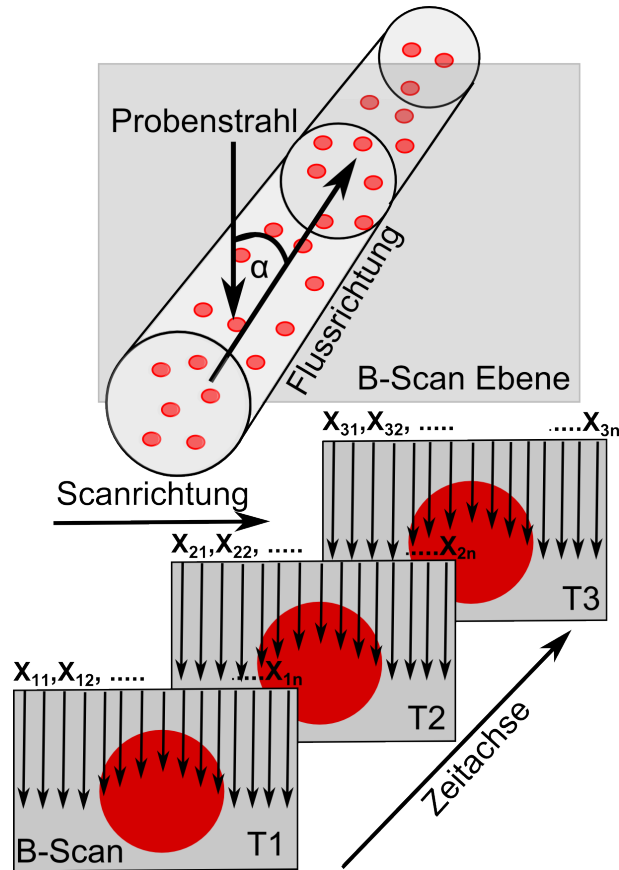


Abbildung 2.4 – Schematische Darstellung eines Gefäßes mit Blutfluss welches von einem B-Scan zu den hintereinanderliegenden Zeitpunkten T1- T3 abgebildet wird.

Messgeschwindigkeit der Kamera ab:

$$v(z_{max}) = \frac{\lambda_0 f_{A-Scan}}{4} \quad (2.22)$$

Im Falle der Differenzbildung zwischen zwei zeitlich nachfolgenden B-Scans muss die Messgeschwindigkeit der Kamera mit der Bildwiederholrate ersetzt werden. Die minimal messbare Geschwindigkeit hängt vom Phasenrauschen des Systems ab [Zhao et al., 2000a, Zhao et al., 2000b]. Ist die Probe in Ruhe, sollten bei der Subtraktion die Phasendifferenzen Null ergeben. Im Realfall erhält man Schwankungen der Phase durch Bewegungsrauschen des Aufbaus und durch das Photonenrauschen. Die Standardabweichung $\sigma\varphi$ des Rauschens als Phasendifferenz in (Gl. 2.20) eingesetzt ergibt die minimal auflösbare Geschwindigkeit.

Um die Phasendifferenz zwischen zwei Tiefenprofilen zu bestimmen, multipliziert man zweckmäßigerweise den einen aus der inversen Fouriertransformation erhaltenen komplexen A-Scan (Gl. 2.16) mit dem konjugiert-komplexen zweiten A-Scan und bestimmt

die Phase dieses Produktes. In Abbildung 2.5 a.) ist dieses Vorgehen in der Gaußschen Zahlenebene mit Vektordiagrammen für die zum ersten Tiefenprofil zugehörige komplexe Zahl z_1 mit dem Phasenwinkel φ_1 und die zum zweiten Tiefenprofil zugehörige Zahl z_2 mit dem Phasenwinkel φ_2 dargestellt. In diesem Beispiel erhält man durch Subtraktion die korrekte Phasendifferenz $\varphi_2 - \varphi_1$, da der resultierende Winkel kleiner als π ist b.). Erhält man eine Phasendifferenz größer als π , wie in 2.5 c.) dargestellt, besteht das Problem einer Mehrdeutigkeit der Winkelkoordinate. Wird z_1 komplex konjugiert, was einer Spiegelung an der reellen Achse entspricht und anschließend mit z_2 multipliziert erhält man die korrekte Phasendifferenz zwischen den Tiefenprofilen d.).

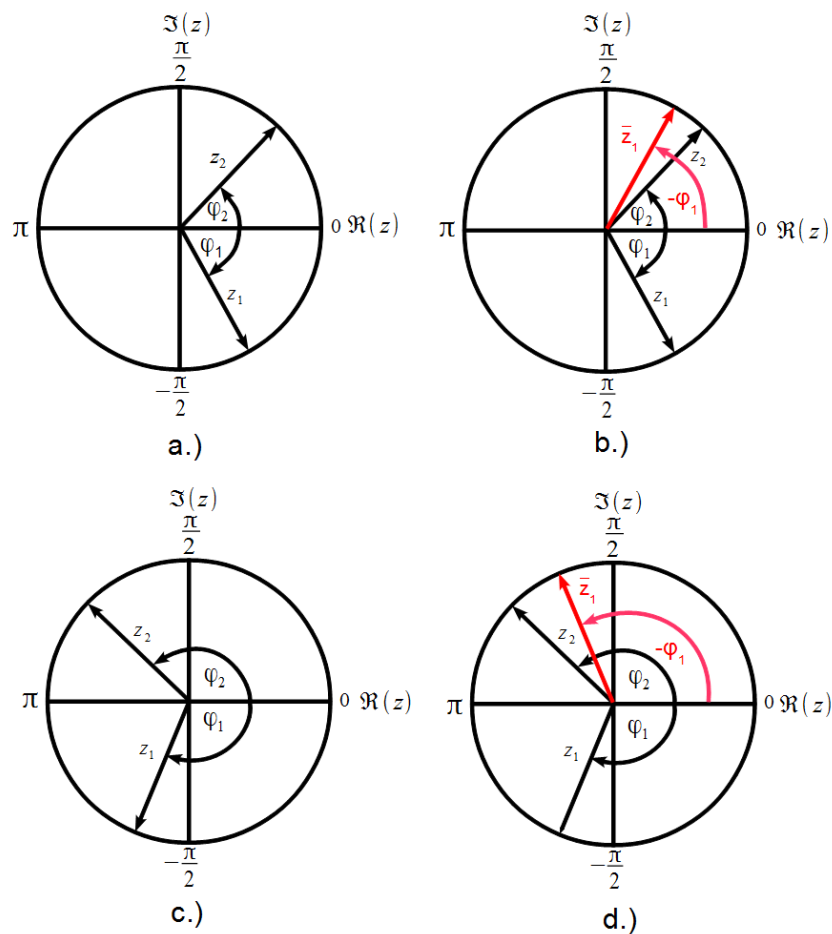


Abbildung 2.5 – Schematische Darstellung zur Subtraktion der komplexen Phasen anhand einer Gaußschen Ebene. a.) Vektordiagramm zweier komplexer Zahlen mit einer Phasendifferenz kleiner π . b.) Vektordiagramm zur Visualisierung der Berechnung einer komplexen Phasendifferenz kleiner π durch komplexe Konjugation und Multiplikation c.) Vektordiagramm zweier komplexer Zahlen mit einer Phasendifferenz größer π . d.) Vektordiagramm zur Visualisierung der Berechnung einer komplexen Phasendifferenz π durch komplexe Konjugation und Multiplikation

2.1.5 Expansion

Für den Vergleich zwischen optoakustisch gemessenen Temperaturen mit den in der Retina auftretenden Verschiebungen wurde zunächst die Geschwindigkeit des Gewebes in z -Richtung durch Subtraktion zweier Tiefenprofile aus zeitlich hintereinanderfolgenden B-Scans mit der Zeitdifferenz Δt bestimmt (Gl. 2.21). Durch die Integration der berechneten Geschwindigkeit $v_z(t)$ über den Zeitraum der Laserbestrahlung kann die lokale Verschiebung des Gewebes $\Delta z(t)$ berechnet werden:

$$\Delta z(t) = \int_0^t v_z(\tau) d\tau. \quad (2.23)$$

Die durch die Laserbestrahlung induzierte Temperaturänderung im absorbierenden Gewebe führt zu einer Volumenänderung. Dieser Effekt ist auf die thermische Expansion zurückzuführen und wird durch den volumetrischen Ausdehnungskoeffizienten γ oder im Spezialfall der eindimensionalen Ausdehnung durch den linearen Ausdehnungskoeffizienten κ bestimmt [Spahr et al., 2012]:

$$\frac{\partial L}{\partial T} = \kappa \cdot L \quad \text{und} \quad \frac{\partial V}{\partial T} = \gamma \cdot V \quad (2.24)$$

Unter der Bedingung der Massenerhaltung gilt die Kontinuitätsgleichung:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \vec{v}) = 0. \quad (2.25)$$

Diese kann unter Berücksichtigung des Geschwindigkeitsvektorfeldes \vec{v} , sowie des Zusammenhangs zwischen der Dichte und der Masse

$$\frac{\partial \rho}{\partial V} = \frac{-m}{V^2} \quad (2.26)$$

angenähert werden durch:

$$-\gamma \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \text{div}(\vec{v}) \approx 0. \quad (2.27)$$

Durch eine Integration über die Zeit erhält man den Zusammenhang zwischen einer Temperaturveränderung ΔT , dem volumetrischen Ausdehnungskoeffizienten γ und der Divergenz des Verschiebungsvektorfeldes $\Delta \vec{r}$:

$$\Delta T \approx \frac{\text{div}(\Delta \vec{r})}{\gamma} \quad (2.28)$$

Eine Temperaturerhöhung führt demnach in der Regel zu einer Verschiebung in allen drei Raumrichtungen.

$$\operatorname{div}(\Delta\vec{r}) = \frac{\partial\Delta x}{\partial x} + \frac{\partial\Delta y}{\partial y} + \frac{\partial\Delta z}{\partial z} \quad (2.29)$$

Die Berechnung der Verschiebung aus den Phasendifferenzen enthält nur die Information über die axiale Verschiebung Δz des Gewebes. Bei einer gleichmäßigen und großflächigen Bestrahlung über ein homogenes Schichtsystem können die Verschiebungen der beiden verbleibenden Raumrichtungen x und y vernachlässigt werden. Da dies jedoch den Idealfall einer Bestrahlung darstellt, ist die Bestimmung der Verschiebung durch die Optische Kohärenztomographie aufgrund Nichtberücksichtigung der Symmetrieeigenschaften nicht exakt. Wegen der großen Unterschiede zwischen der Dicke der absorbierenden Schicht der Netzhaut (Dicke des RPE $6\mu\text{m}$) und dem verwendeten Fleckdurchmesser ($50\mu\text{m} - 200\mu\text{m}$) sind die Bedingungen für ein ausgedehntes Schichtsystem aber annähernd gegeben. Unter dieser Annahme liefert die Ableitung der berechneten Verschiebung in z -Richtung eine gute Näherung für die lokale Expansion:

$$\varepsilon(z) = \operatorname{div}(\Delta\vec{r}) \approx \frac{\partial\Delta z}{\partial z} \quad (2.30)$$

Für kleine Expansionen kann also eine relative Volumenausdehnung mit dem dreifachen Wert einer relativen Längenänderung angenommen werden. Aus der Expansion kann somit eine Temperaturerhöhung durch die Näherung:

$$\Delta T \approx \frac{1}{\gamma} \cdot \frac{\partial\Delta z}{\partial z} \quad (2.31)$$

bestimmt werden, wenn der thermische Expansionskoeffizient für das Gewebe bekannt ist.

2.1.5.1 Einfluss des Brechungsindexes auf die spezifische Expansion von Wasser

Der lokale Temperaturanstieg ΔT führt zu einer Dichteänderung ρ im Gewebe und somit zu einer Volumenänderung.

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{\rho(T_0) - \rho(T(z))}{\rho(T_0)} \quad (2.32)$$

Die Dichte und das Volumen von Wasser und Gewebe hängen nicht linear von der Temperatur ab. Für Wasser im Temperaturbereich zwischen $25\text{ }^\circ\text{C}$ und $50\text{ }^\circ\text{C}$ steigt der thermische Expansionskoeffizient $\gamma = \partial V / \partial T / V$ von $2,5 \times 10^{-4} \text{K}^{-1}$ auf $4,5 \times 10^{-4} \text{K}^{-1}$ und die durch Gleichung 2.32 ermittelte spezifische Expansion $\partial\varepsilon / \partial T$ von $6,6 \times 10^{-5} \text{K}^{-1}$ auf $1,5 \times$

$10^{-4}K^{-1}$ (Abb. 2.6).

In der OCT werden optische Weglängenänderungen gemessen. Eine durch die OCT gemessene thermische Expansion wird deshalb durch die temperaturabhängige Brechungsindexänderung beeinflusst. Die optische Weglänge OWL ist definiert als das Produkt zwischen der geometrischen Weglänge L und dem Brechungsindex n . Beide sind abhängig von der Grundtemperatur T_0 [Guan et al., 2011].

$$OWL(T_0) = \int_0^L n(T_0) dl = n(T_0) L \quad (2.33)$$

Erfolgt eine Temperaturerhöhung ΔT , ändert sich auch der wellenlängenabhängige Brechungsindex des Mediums $n(\lambda)$. Mit dem thermischen Expansionskoeffizienten γ kann der Ausdruck für die optische Weglänge umgeformt werden zu:

$$OWL(T_0 + \Delta T) = \int_0^L \left[n(T_0) + \frac{dn(\lambda)}{dT} \Delta T \right] \cdot (1 + \gamma \Delta T) dl \quad (2.34)$$

Der temperaturabhängige Brechungsindex von Wasser für die OCT-Zentralwellenlänge von 840 nm wird dabei durch eine Approximation von Cauchy-Koeffizienten bestimmt [Bashkatov und Genina, 2003].

$$n(\lambda, T) = A(T) + \frac{B(T)}{\lambda^2} + \frac{C(T)}{\lambda^4} + \frac{D(T)}{\lambda^6} \quad (2.35)$$

Basierend auf Gleichung 2.34 kann die durch OCT gemessene, spezifische Expansion unter Einfluss einer Brechungsindexänderung, somit theoretisch angenähert werden durch:

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial T} \approx n(T_0) \frac{\gamma}{3} \Delta T + \frac{\partial n}{\partial T} \Delta T \quad (2.36)$$

Durch den Brechungsindex reduziert sich die durch OCT ermittelte spezifische Expansion für den Temperaturbereich von 25 °C und 50 °C somit auf Werte zwischen $4,8 \times 10^{-6}K^{-1}$ und $3,5 \times 10^{-5}K^{-1}$ (Abb. 2.6).

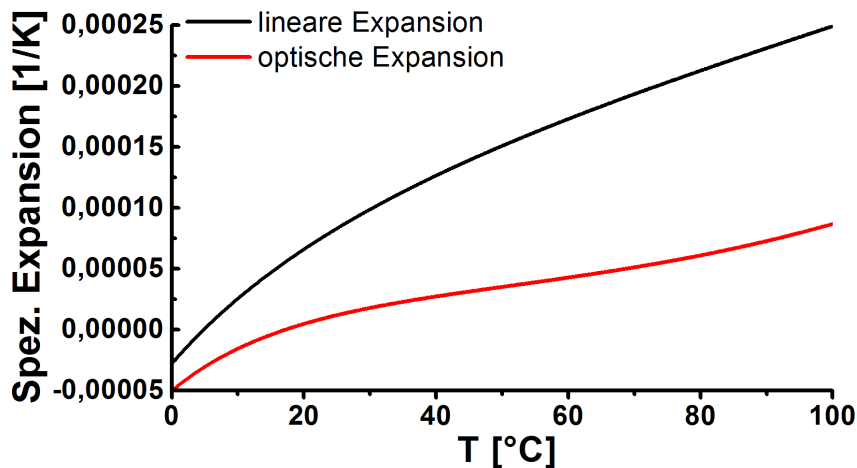


Abbildung 2.6 – Theoretisch angenäherte spezifische Expansion ohne Berücksichtigung des Brechungsindex (schwarz) und mit Berücksichtigung des Brechungsindex (rot)

2.2 Optoakustische Temperaturmessungen

2.2.1 Optoakustik

Die Absorption von gepulster Laserstrahlung führt auf Grund der thermischen Expansion zu einer Druckerhöhung im Gewebe mit anschließender Emission einer Schallwelle [Kandulla, 2009]. Die Schallwelle propagiert mit Schallgeschwindigkeit durch das erhitzte sowie die daran angrenzenden Medien und kann mit einem Sensor detektiert werden. Dabei ist die Amplitude der Schallwelle p_{max} proportional zu dem im Absorber erzeugten maximalen Druck $P_L^{max}(t)$:

$$p_{max} \sim P_L^{max} \quad (2.37)$$

Für ein homogenes, absorbierendes und nicht streuendes Medium nimmt die Bestrahlungsstärke $H(z)$ der Laserstrahlung in diesem Medium mit dem Absorptionskoeffizienten μ_a nach dem Lambert-Beerschen Gesetz exponentiell mit der Tiefe z ab [Kandulla, 2009]:

$$H(z) = H_0 e^{-\mu_a z} \quad (2.38)$$

H_0 steht für die Bestrahlungsstärke auf der Oberfläche des Mediums. Die durch die Absorption im Medium deponierte Energiedichte $W(z)$ ist durch das Produkt aus Absorpti-

onskoeffizient μ_a und der lokalen Bestrahlung $H(z)$ gegeben:

$$W(z) = \mu_a H(z) \quad (2.39)$$

Für die Bedingung des thermischen Einschlusses, wenn die Heizzeit so kurz ist, dass nur vernachlässigbar wenig Wärmeenergie das betrachtete Volumen verlässt, ergibt sich die hierdurch induzierte Temperaturerhöhung $\Delta T(z)$ dann als:

$$\Delta T(z) = \frac{W(z)}{C_v \rho_0} \quad (2.40)$$

dabei bezeichnet C_v die spezifische Wärmekapazität bei konstantem Volumen und ρ_0 die Dichte. Diese Temperaturänderung bewirkt eine Druckerhöhung innerhalb des Mediums, welche zu einer thermoelastischen Ausdehnung des Gewebes führt. Hierdurch erfolgt die Emission einer Druckwelle, welche im akustischen Einschluss, wenn die Heizdauer τ kürzer ist als die Zeit, die der Schalltransient benötigt um das erwärmte Volumen zu durchqueren, durch

$$P_0(z) = \frac{\gamma}{\kappa_T} \Delta T(z) \quad (2.41)$$

beschrieben wird. γ ist hier wieder der thermische Volumenausdehnungskoeffizient und κ_T die isotherme Kompressibilität des Gewebes. Werden die Gleichungen (2.39) und (2.40) in die Gleichung (2.41) eingesetzt, so ergibt sich die thermoelastische Druckerhöhung in einem homogenen absorbierenden Gewebe unendlicher Ausdehnung für Laserpulse, deren Pulsdauern das thermische und akustische Einschlusskriterium erfüllen, als :

$$P_0(z) = \frac{\gamma}{C_v \kappa_T \rho_0} W(z) = \Gamma \mu_a H(z) \quad (2.42)$$

mit:

$$\Gamma = \frac{\gamma}{C_v \kappa_T \rho_0} \quad (2.43)$$

Zur Vereinfachung der Gleichung wird der dimensionslose, materialspezifische Grüneisenkoeffizient Γ eingeführt, welcher die Druckerhöhung mit der absorbierten Energie bei gleichbleibendem Volumen beschreibt.

2.2.2 Berechnung der Gewebetemperatur aus dem optoakustischen Signal

Das Maximum p_{max} der am Schallwandler detektierten akustischen Welle ist abhängig von der Gewebetemperatur, weil der thermische Expansionskoeffizient des Gewebes und damit Γ mit steigender Temperatur T zunehmen. Wird also bei unterschiedlichen Ausgangstemperaturen das Gewebe durch den Laserpuls um einen kleinen zusätzlichen Beitrag ΔT erhitzt, so werden unterschiedlich starke optoakustische Signale gemessen (Abb. 2.7).

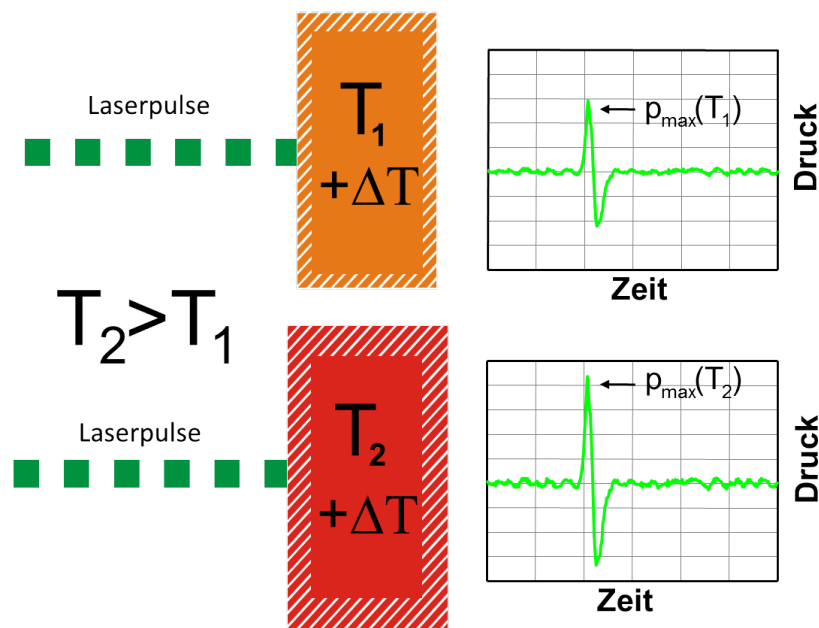


Abbildung 2.7 – Prinzip der optoakustischen Temperaturbestimmung nach [Kandulla, 2009]

Um von den am Schallwandler detektierten optoakustischen Signalen Rückschlüsse auf die Temperatur des absorbierenden Gewebes ziehen zu können, muss die Temperaturabhängigkeit des Grüneisenkoeffizienten bekannt sein.

$$p_{max}(T) \sim H_0 \Gamma(T) = \frac{E_0}{\pi_0 r^2} \Gamma(T) \sim E_0 \Gamma(T) \quad (2.44)$$

Bei bekannter Pulsenergie E_0 , bekanntem Radius des Laserflecks r_0 und bekannter Temperaturabhängigkeit des Grüneisenkoeffizienten ist aber in der Regel der Proportionalitätsfaktor zwischen p_{max} und $H_0 \Gamma(T)$ nicht bekannt, da die akustische Ankoppelung des Detektors an das Gewebe nicht reproduzierbar hergestellt werden kann. Deshalb sind mit optoakustischen Messungen nur Temperaturänderungen über Zeitbereiche, in denen sich der Proportionalitätsfaktor nicht ändert, messbar. Die Temperaturabhängigkeit des

Grüneisenkoeffizienten $\Gamma(T)$ muss experimentell bestimmt werden. Dazu wird das Gewebe, z.B. die Retina, flächig mit einem Infrarotlaser aufgeheizt [Luft, 2010] und die Temperatur mit einem Thermoelement gemessen. Die mit dem Schallwandler bei verschiedenen Ausgangstemperaturen mit einem zweiten Nanosekunden-Laser erzeugten Druckwerte werden dann auf die Temperaturerhöhung mit einem Polynom zweiten Grades zurückgerechnet. Limitiert wird die Temperaturbestimmung durch auftretende starke Streuänderungen im Gewebe im Bereich hoher Bestrahlungsstärken. In diesem Fall verändern sich die Gewebeparameter so stark, dass eine Kalibrierung zwischen Druck und Temperatur nicht mehr gegeben ist. Die mittels Optoakustik bestimmten Temperaturerhöhungen sind die mittleren Temperaturwerte über den Bestrahlungsfleckdurchmesser. Die Spitzentemperatur im Zentrum kann nachfolgend durch eine exponentiell abfallende, von der Bestrahlungsdauer abhängige Anpassungskurve angenähert werden [Schlott et al., 2012].

Das hier beschriebene Prinzip der nicht invasiven optoakustischen Messung von Temperaturänderungen des Gewebes wurde in den letzten Jahren zu einem klinisch einsetzbaren Verfahren zur Messung des Temperaturverlaufs an der Retina während der Photokoagulation entwickelt [Brinkmann et al., 2012].

2.3 Modellierung von Wärmeleitung im Gewebe

Absorption von Laserstrahlung in der Netzhaut bei der Photokoagulation bewirkt eine räumliche Temperaturverteilung $\Delta T(\vec{r}, t)$, die von der lokalen Absorption des Gewebes und der thermischen Diffusion bestimmt wird [Kandulla, 2009, Birngruber et al., 1985]. Die räumliche und zeitliche Temperaturverteilung wird durch die Thermodiffusionsgleichungen beschrieben:

$$\frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} - \alpha \cdot \Delta T(\vec{r}, t) = \frac{q(\vec{r}, t)}{\rho_0 \cdot c_p} \quad (2.45)$$

Die thermische Diffusivität α ergibt sich dabei aus der Gleichung nach $\alpha = k/(\rho_0 \cdot c_p)$ aus der Wärmeleitfähigkeit k , der spezifischen Wärmekapazität c_p und der Dichte ρ_0 . Die in dem Medium pro Zeit deponierte Energiedichte $q(\vec{r}, t)$ ist abhängig von der räumlichen Ausdehnung der Laserbestrahlung und der räumlichen Verteilung der Gewebeabsorption μ_a . Bei den Berechnungen der Gewebetemperaturen wurde davon ausgegangen, dass die räumliche Verteilung der Bestrahlung im Bestrahlungsfleck wegen der Abbildung des Ausgangs der Multimodefaser auf dem Augenhintergrund mit einem Rechteckprofil angenähert werden kann. Der runde Bestrahlungsfleck mit dem Radius r_0 wurde dabei

durch einen rechteckigen Fleck mit gleicher Fläche approximiert [Kandulla, 2009].

Für einen unendlich ausgedehnten, homogenen Absorber der Schichtdicke d mit einem quadratischen Bestrahlungsfleck der Kantenlänge $2a$ und einem rechteckigen zeitlichen Pulsverlauf der Dauer τ ergibt sich als Lösung der Thermodiffusionsgleichung die von der Laserstrahlung verursachte Temperaturänderung als:

$$\begin{aligned} \Delta T(\vec{r}, t) = & \frac{\mu_a \Phi}{8\rho_0 c_p} \int_0^t dt' \theta(\tau + t' - t) \exp(-\mu_a z + \mu_a^2 \alpha t') \\ & \times \left[\operatorname{erf}\left(\frac{x-a}{2\sqrt{\alpha t'}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{x+a}{2\sqrt{\alpha t'}}\right) \right] \left[\operatorname{erf}\left(\frac{y-a}{2\sqrt{\alpha t'}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{y+a}{2\sqrt{\alpha t'}}\right) \right] \\ & \times \left[\operatorname{erf}\left(\frac{z}{2\sqrt{\alpha t'}} - \mu_a \sqrt{\alpha t'}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{z-d}{2\sqrt{\alpha t'}} - \mu_a \sqrt{\alpha t'}\right) \right] \end{aligned} \quad (2.46)$$

Die räumliche Integration wird dabei unter der Verwendung der Errorfunktion ($\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\pi} \int_0^x e^{-\omega^2} d\omega$) sowie der Heaviside-Sprungfunktion θ durchgeführt und die materialspezifischen Parameter des Gewebes für Dichte ρ , spezifische Wärmekapazität c_p und Wärmeleitzahl κ wurden durch die entsprechenden Materialkonstanten für Wasser angenähert. Bei einem mehrschichtigen Gewebe wird die Temperaturerhöhung für jede absorbierende Schicht unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten μ_a getrennt bestimmt und anschließend unter Verwendung des Superpositionsprinzips addiert.

$$\Delta T_{ges}(\vec{r}, t) = \sum_{i=1}^n \Delta T_i(\vec{r}, t) \quad (2.47)$$

Für die Modellierung der Temperaturverteilung am enukleierten Schweineauge wird ein Dreischicht-Modell verwendet. Der komplette vordere Augenabschnitt, der Glaskörper sowie die Netzhaut werden nicht als absorbierende Medien angenommen. Es wird jedoch in den Berechnungen berücksichtigt, dass durch Streuung nur 55% des Laserlichtes die absorbierenden Schichten erreicht und dort zur Erwärmung beitragen kann. Die erste absorbierende Schicht ist das 6 μm dicke RPE mit einem Absorptionskoeffizienten von 1024/mm. Die zweite Schicht besteht aus der unpigmentierten Bruch'schen Membran mit einer Schichtdicke von 4 μm , die an die dritte Schicht, der Choroidea, mit einer Schichtdicke von 200 μm und einem Absorptionskoeffizienten von 270/mm anschließt. Der Temperaturanstieg ist im Bereich des RPE am höchsten (Abb. 2.8) und zeigt einen leicht unsymmetrischen Verlauf mit einem steileren Temperaturabfall in Richtung der Retina, welcher auf die zusätzliche, geringere Absorption des Lichts in der Choroidea zurückzuführen ist.

Der mittlere Temperaturanstieg über den Bestrahlungsfleckradius R kann durch Anpas-

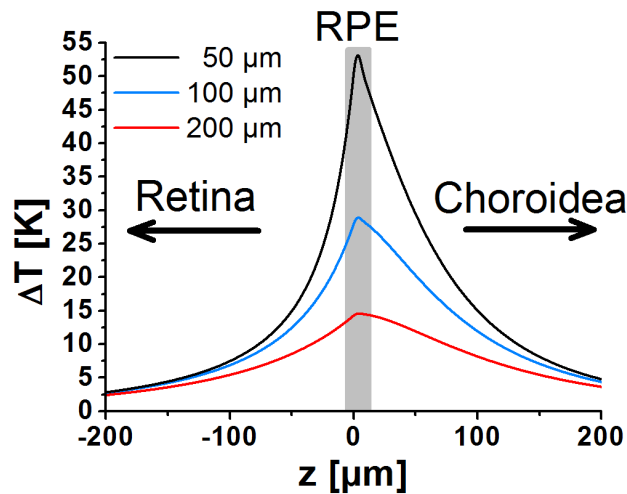


Abbildung 2.8 – Durch Lösung der Thermodiffusionsgleichung (2.46 und 2.47) berechneter Temperaturanstieg ΔT in Abhängigkeit der Tiefe z . Die angenommene Bestrahlungszeit beträgt 400 ms mit einer Leistung von 10 mW mit Fleckdurchmessern von 50 μm , 100 μm und 200 μm .

sung der Thermodiffusionsgleichung punktweise über eine Tiefe z berechnet werden und ist damit direkt vergleichbar mit den optoakustischen Messwerten.

$$T_{\text{mittel}}(t) = \frac{2}{R^2} \int_0^R x \cdot \Delta T(x, t) dx \quad (2.48)$$

Die Verschiebung des Gewebes kann durch eine Integration der temperaturabhängigen, isotropen thermischen Expansion (Gl. 2.32) über die gesamte Retinadicke bestimmt werden. Unter der Annahme einer isotropen Expansion wurde die lineare, thermische Expansion als ein Drittel der volumetrischen Expansion angenommen:

$$\Delta z = \frac{1}{3} \int_{z_1}^{z_2} \frac{\rho(T_0) - \rho(T(z))}{\rho(T_0)} dz \quad (2.49)$$

Der Anstieg der Verschiebung pro K (spezifische Verschiebung) $\zeta = \Delta z / \Delta T_{\text{end}}$ kann nach Gleichung 2.49 für kleine Temperaturanstiege berechnet werden.

2.4 Medizinische Grundlagen

2.4.1 Anatomie des Auges

Betrachtet man das Auge im Schnittbild (Abb. 2.9), so wird dessen komplexe Anatomie ersichtlich. Umgeben wird das Auge von der Lederhaut oder Sklera welche aus hartem, weißem Bindegewebe besteht [Campbell, 1998], und zum Schutz des Augeninneren und

zur Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks dient. An der Vorderseite des Auges ist die Sklera durchsichtig. Dieser Bereich wird als Hornhaut (Cornea) bezeichnet und bildet eine brechende Fläche, durch die das Licht in das Auge eintreten kann. Unter der Sklera befindet sich im hinteren Teil des Auges die pigmentierte und mit großen Arterien und Venen versorgte Aderhaut oder auch Choroidea. Sie ist das am stärksten durchblutete Gewebe des Körpers und sorgt für die Ernährung der äußeren Netzhaut.

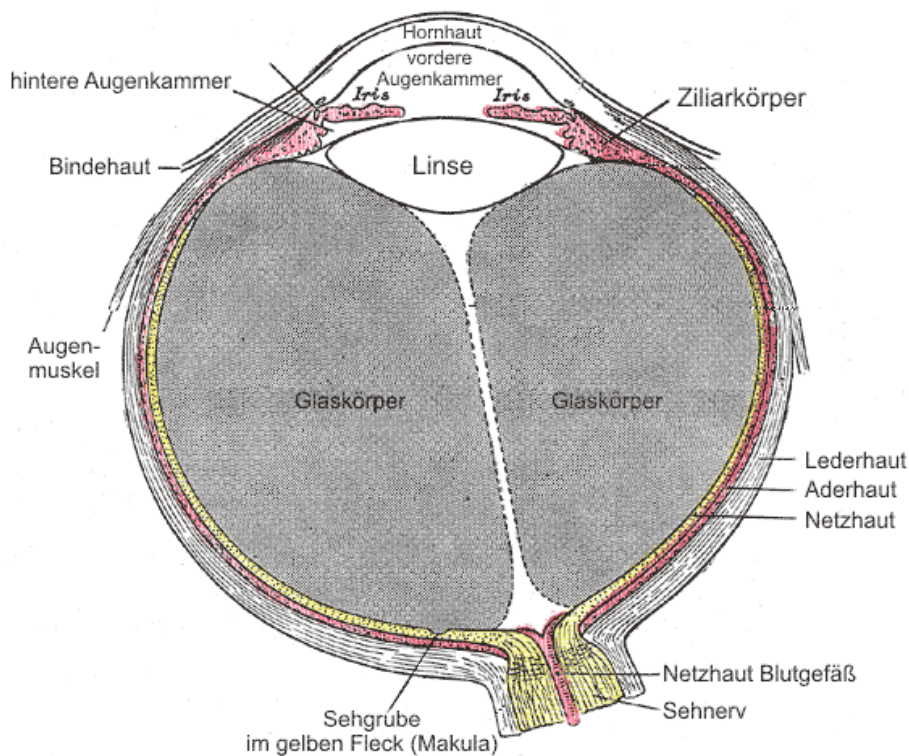


Abbildung 2.9 – Schematische Darstellung des menschlichen Auges nach [Gray, 2000]

Im vorderen Bereich bildet die Aderhaut eine ringförmige Regenbogenhaut (Iris). Diese verleiht dem Auge die Augenfarbe und reguliert die ins Auge eintretende Lichtmenge. Die Linse hinter der Iris ist transparent und kann die Brechkraft des Auges durch Änderung ihrer Form variieren. Die Einstellung der Fokallänge wird als Akkomodation bezeichnet. Der Ziliarkörper produziert das Kammerwasser, welches den Bereich vor der Linse (vordere Augenkammer) und den Bereich hinter der Linse (hintere Augenkammer) füllt.

Die Netzhaut oder auch Retina mit den Photorezeptoren befindet sich auf der Innenseite der Aderhaut und bildet die innerste Zellschicht der Wand des Auges. In der Retina befinden sich als lichtempfindliche Struktur etwa 125 Millionen Stäbchen und sechs Millionen Zapfen. Diese sind in einer Zellschicht angeordnet, die direkt an dem retinalen

Pigmentepithel anschließt (Abb.2.10). Das RPE und die Photorezeptorzellen sind lediglich durch Adhäsion lose miteinander verbunden und das Eindringen von Flüssigkeit bei einer krankheitsbedingten Netzhautablösung führt sehr rasch zu einer Auflösung dieser Verbindung [Coupland und Bechrakis, 2008]. Das RPE und die Choroidea werden durch die Bruch'sche Membran getrennt. Diese versorgt das RPE und die Photorezeptoren mit Sauerstoff und Makromolekülen aus den in der Choroidea gelegenen Gefäßsystemen und bildet in Höhe der RPE-Zellen die äußere Blut-Retina-Schranke.

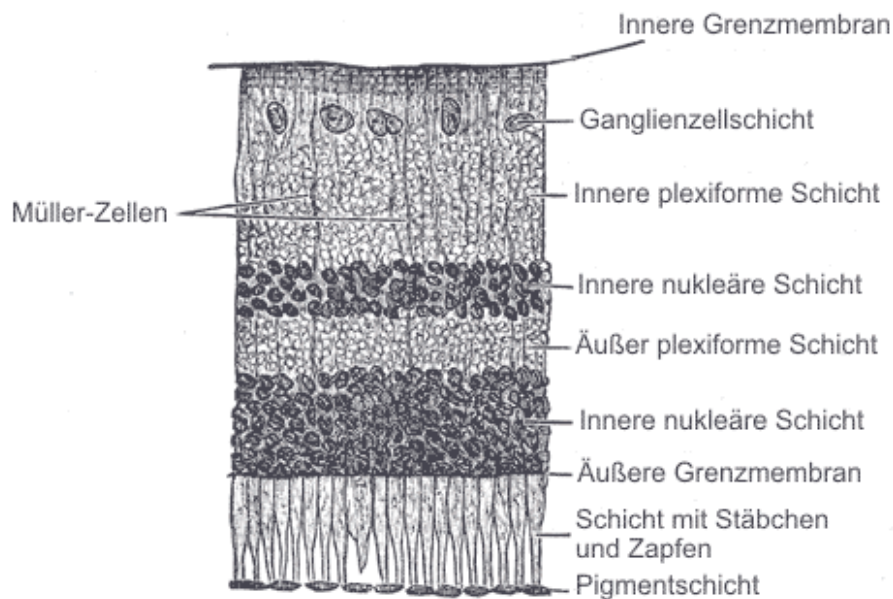


Abbildung 2.10 – Schematischer Schnitt durch die menschliche Retina nach [Gray, 2000]

Die Stäbchen sind sehr lichtempfindlich und für alle sichtbaren Wellenlängen sensitiv. Die Zapfen hingegen werden erst durch stärkeres Licht erregt und können drei Spektralbereiche (Farben) unterscheiden. Die Signalverarbeitung erfolgt durch die in Lichteinfallrichtung vor den Stäbchen und Zapfen gelegenen Zellschichten, welche Nervengewebe (Bipolar- und Ganglienzellen) enthalten. Diese Zellen haben die Aufgabe die Photorezeptoren zu Schalteinheiten, sogenannten Reizfeldern, zusammenzufassen. Anschließend werden die Signale über den Sehnerv ans Gehirn weitergeleitet.

2.4.2 Krankheitsbilder der Makula

Es gibt verschiedene Krankheitsbilder der Makula, die mittels Photokoagulation behandelt werden. Bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) findet eine Einschränkung des hochauflösenden Sehentrums in der Mitte des Gesichtsfeldes statt

[Kirchhof, 2000], welches im Spätstadium auch zur Erblindung führen kann. Mit steigendem Alter nimmt die Häufigkeit des Befundes zu. Die AMD manifestiert sich isoliert am hinteren Augenabschnitt im Bereich der Photorezeptoren, des retinalen Pigmentepithels, der Bruch'schen Membran und der Aderhaut [Hollwich, 1988]. Als Ursache wird eine Ansammlung von lipidreichen Abbauprodukten in der Bruch'schen Membran und in dem RPE selbst angesehen, die normalerweise vom RPE abgebaut werden. Die resultierende Verdickung der Bruch'schen Membran behindert den Stoffaustausch zwischen Aderhaut, RPE und Photorezeptoren. Alterstypisch nehmen die RPE-Zellen ab und so verstärkt sich die Belastung der Einzelzellen. Die Funktionalität der RPE-Zellen nimmt ab. In der Frühform kommt es zu Ablagerungen von extrazellulärem Material unterhalb der Netzhaut, die sich als helle Pigmentation im Fundusbild darstellen. Im Spätstadium tritt ein scharf begrenztes Absterben der RPE-Zellschicht auf oder in selteneren Fällen eine choroidale Neovaskularisation, das heißt eine Neubildung von Blutgefäßen, die aus der Choroidea in die Netzhaut einwachsen. Zudem kann es zur Abhebungen des RPE von der Bruch'schen Membran kommen [Kirchhof, 2000].

Die diabetische Retinopathie wird durch die Zuckerkrankheit Diabetes mellitus hervorgerufen. Der erhöhte Blutzuckerwert führt zu einer zunehmenden Einlagerung von Fett- und Eiweißstoffen in den Gefäßwänden (Mikroangiopathie) [Hammes, 2011]. Durch die Verdickung der Basalmembran und des Gefäßendothels entsteht eine Gefäßsklerose. Die Kapillare verschließen sich, was zu einer Unterversorgung des Gewebes bis hin zum vollständigen Durchblutungsausfall führen kann [Hollwich, 1988]. Durch den Versuch das Gewebe wieder mit Sauerstoff zu versorgen, wird das Wachstum von neuen Blutgefäßen angeregt. Diese können auch in den Glaskörper hineinwachsen und platzen leicht, was zu Einblutungen in den Glaskörper und zu Sehverlusten führen kann. Im schlimmsten Fall können die kleinen Blutgefäße innerhalb der Netzhaut weiterwachsen und somit ihre Funktion, bis zur Erblindung, beeinträchtigen. Das Diabetische Makulaödem ist eine Komplikation der diabetischen Retinopathie. Es kommt dabei zu einer Ansammlung von Flüssigkeiten, Eiweißen und Fetten im Bereich der Makula [Joussen et al., 2003].

2.4.3 Wechselwirkung von Licht und Gewebe

Die Wechselwirkung von Licht und Gewebe wird durch die verwendete Lichtquelle sowie durch die optischen, thermischen und biochemischen Eigenschaften des bestrahlten Gewebes bestimmt, wie die Abbildung 2.11 schematisch darstellt.

Der Laser ermögliche eine präzise Kontrolle der Energiedeposition und wird je nach Ge-

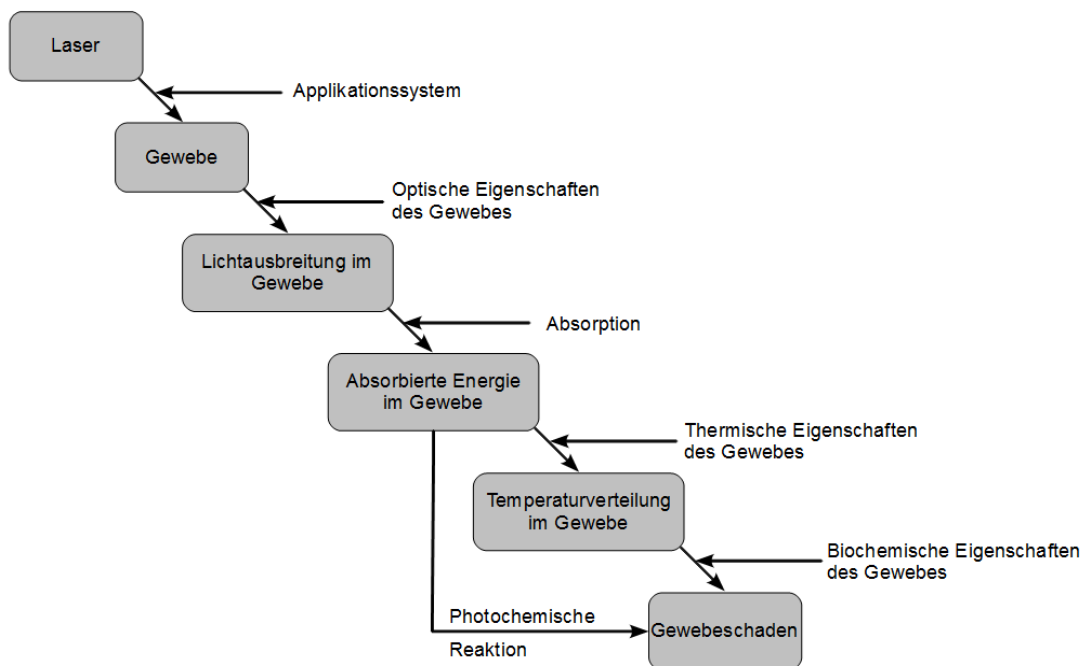


Abbildung 2.11 – Interaktion zwischen Laserlicht und biologischem Gewebe. Nach [Ross und Uebelhoer, 2011]

webe und gewünschter Behandlungsform in seinen Spezifikationen angepasst. Basisparameter sind die Leistung, Fleckgröße und Wellenlänge für continuous wave (cw)-Laser sowie die Energie pro Puls, Pulsdauer, Fleckgröße, Repititionsrate, Anzahl der Pulse und Wellenlänge für gepulste Laser [Ross und Uebelhoer, 2011]. Die optischen Eigenschaften des Gewebes bestimmen die Ausbreitung des Lichts im Gewebe. Die Photonen werden an den verschiedenen Gewebestrukturen gestreut oder durch diese absorbiert. Die absorbierten Photonen führen zu einer Wärmeentwicklung, welche abhängig von den thermischen Eigenschaften des Gewebes eine bestimmte räumliche Verteilung annimmt. Abhängig von der Bestrahlungsdauer und der Bestrahlungsstärke des Lasers kann das Gewebe durch:

photomechanische Effekte: (10 ps - 100 ns ; 10^8 W/cm^2 - 10^{12} W/cm^2),

photothermische Effekte: (1 ms - 100 s ; 1 W/cm^2 - 10^6 W/cm^2) oder

photochemische Effekte: (10 s - 1000 s ; 10^{-3} W/cm^2 - 10 W/cm^2)

verändert werden. Sehr kurze Pulse führen zu photomechanischen Effekten im Gewebe. Aufgrund der kurzen Bestrahlungszeit kommt zum thermischen Einschluss der absorbierten Energie und zu einer starken Temperaturerhöhung, die zur Verdampfung führt [Walsh et al., 2011]. Diese bewirkt einerseits eine direkte Gewebeerstörung, an-

dererseits wegen der starken Expansionstendenzen Stoßwellen und Kavitationserscheinungen [Birngruber, 2002]. Photothermische Effekte führen zu einer thermischen Denaturierung des Gewebes. Die durch die erhöhte Temperatur induzierten Schäden werden während der Bestrahlungszeit akkumuliert [Birngruber und Wacker, 1991]. Die Zeit-/Temperaturabhängigkeit des thermischen Schadens kann durch die Arrheniusgleichung beschrieben werden. Wird die Bestrahlungsstärke stark erhöht, kann es zusätzlich zur Koagulation des Gewebes zu einer Vaporisation kommen. Die aufgrund der Verdampfung des Gewebewassers entstehenden Druck- und Volumenänderungen führen zu lokalisierter Zerreißung des Gewebes [Schüle et al., 2005]. Die photochemischen Effekte erzeugen durch ihre geringe Bestrahlungsstärke über einen langen Zeitraum keine Temperaturerhöhung. Gewebeschäden können aber durch Photochemie erfolgen. Dies ist für die Retina nur bei Wellenlängen unterhalb von 500 nm relevant.

2.4.4 Laserkoagulation am Augenhintergrund

Die gewünschte Zielstruktur für die photothermischen Effekte bei der Behandlung einer Netzhautablösung ist das melaninhaltige retinale Pigmentepithel, welches durch die Lichtabsorption im sichtbaren Spektralbereich am stärksten erhitzt wird. Es entsteht durch Wärmeleitung eine Schädigung durch Koagulation auch in der Netzhaut und der Aderhaut, die während des Heilungsverlaufs vernarben [Birngruber, 2002]. Die neuronale Netzhaut wird dadurch mit der Aderhaut mechanisch verbunden, was einer weiteren Netzhautablösung vorbeugt.

Bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie sind sehr viele Laserherde (1000-2000), die 15-30% der Netzhautfläche einnehmen, notwendig. Diese werden vor allem in der mittleren und äußeren Peripherie des Auges gesetzt und sollen im Vergleich zu der Behandlung der Netzhautablösung viel schwächer sein. Die Laserleistung und die Expositionszeit werden so variiert, dass bei einem Testschuß im peripheren Augenhintergrund eine sichtbare weiß-gräuliche Läsion entsteht [Schüle, 2002]. Die Laserparameter werden dabei nur anhand der visuellen Beurteilung der Färbung und des entstandenen Läsionsdurchmessers eingestellt. In der normalen klinischen Anwendung kann der Fleck des Bestrahlungsareals abhängig vom Behandlungsziel zwischen 50 µm und 500 µm variiert werden. Die von der Pigmentierung des Auges abhängigen Expositionszeiten liegen gewöhnlich zwischen 100 ms und 200 ms [Stoltz und Brucker, 2003].

Bei einer histologischen Betrachtung einer Laserkoagulation zeigt sich ein irreversibler Gewebeschaden. Bei milden Koagulationen werden hauptsächlich die Choroidea,

das RPE und die Photorezeptoren einschließlich der äußeren Körnerschicht zerstört. Bei stärkeren Koagulationen, die im klinischen Alltag durchaus üblich sind, zeigen sich zusätzliche Schäden in den inneren Netzhautanteilen [Schüle, 2002].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Für die experimentellen Arbeiten wurde eine Laser-Spaltlampe mit einem OCT-Gerät, das eine Messrate von über 200.000 A-Scans pro Sekunde ermöglicht, und einem Lasersystem für optoakustische Temperaturmessungen ausgerüstet.

3.1.1 Aufbau zur optoakustischen Temperaturmessung

In Abbildung 3.1 ist der Aufbau zur optoakustischen Temperaturmessung dargestellt. Das Messsystem kombiniert einen Bestrahlungslaser mit einem gepulsten Messlaser. Als Behandlungslaser wird ein Zeiss Visulas 532s mit einer Wellenlänge von 532 nm verwendet, der im cw-Betrieb die Koagulationen am Auge durchführt. Für die optoakustischen Temperaturmessungen wird ein gütegeschalteter Nd:YLF-Laser (QG-523-1000, Crystal-Laser LC, Reno, NV, USA) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 523$ nm, einer Repetitionsrate von $f = 1$ kHz und einer Pulsdauer von $\tau = 75$ ns verwendet. Mit diesem Laser erfolgt die Erzeugung der optoakustischen Transienten. Für eine Normierung des Druckes auf die Laserenergie jedes Pulses nimmt die Photodiode (FND 100, Laser Components) den Verlauf und die Amplitude des Pulses auf. Beide Laser werden mit einem Strahlteilerwürfel auf einen gemeinsamen Strahlengang zusammengeführt und anschließend durch ein Mikroskopobjektiv mit einer NA von 0,25 in eine Multimodefaser mit einer NA von 0,11 und einem Kerndurchmesser von $50\mu\text{m}$ eingekoppelt. Diese verbindet den Laseraufbau flexibel mit der Spaltlampe. Im Mainster Focal/Grid Kontaktglas von Ocular Instruments ist ein piezoelektrischer Ringschallwandler integriert, der die Drucktransienten aufnimmt [Kandulla, 2009]. Dieses wird über einen Vorverstärker mit dem Computer verbunden, auf dem die Daten mit einer im PC eingebauten analogen Datenerfassungskarte (Octopus CompuScope CS 8347, Gage Applied Technologies, Lockport, IL, USA) erfasst werden und anschließend die Echtzeitauswertung mit einer LabVIEW-Routine stattfindet.

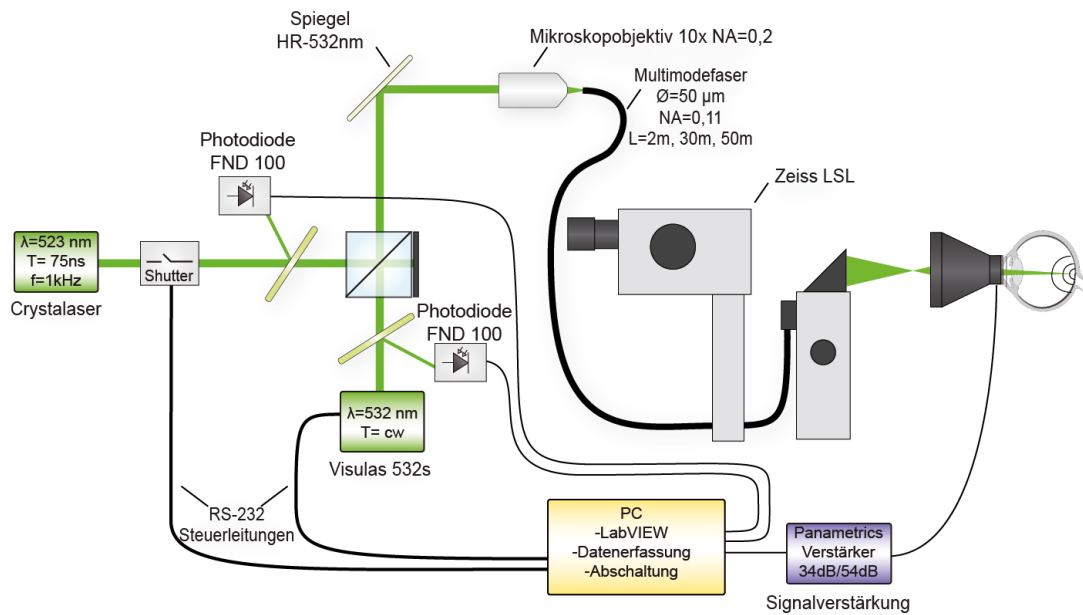


Abbildung 3.1 – Aufbau zur optoakustischen Temperaturmessung

3.1.2 Versuchsaufbau Optische Kohärenztomographie

Für die Abbildung von Koagulationen durch die Optische Kohärenztomographie ist es wichtig, eine möglichst hohe Messgeschwindigkeit bei guter Signalqualität zu erreichen. Als Basissystem wurde ein kundenspezifisches Spektral-Radar-OCT der Serie Hyperion (Thorlabs GmbH, München, Deutschland) verwendet. Durch das Spektral-Radar-OCT wird eine sehr hohe Phasenstabilität gewährleistet, was für die Aufnahme von Doppler Messungen von großem Vorteil ist. Das Hyperion beinhaltet eine Datenerfassungskarte, einen Faserkoppler, ein Spektrometer mit Transmissionsgitter und eine Hochgeschwindigkeitskamera (Sprint spL 4096-140km, Basler AG, Ahrensburg, Deutschland) mit 4096 Pixel. Durch die Einschränkung der ausgelesenen Pixel auf 1024 kann eine A-Scan-Rate von 220 kHz erreicht werden.

Das Hyperion wurde mit einer stärkeren externen Lichtquelle von Superlum (SLD-371-HP3-DBUT-SM-PD, Superlum, Cork, Irland), mit einer Zentralwellenlänge von 842 nm ausgerüstet. Die Halbwertsbreite beträgt 51 nm mit einer Ausgangsleistung von 21,5 mW. Mit dieser erhöhten Leistung ist es möglich, die Retina von Augen mit leicht getrüübter Linse noch in ausreichender Qualität abzubilden.

Um das OCT-System an die Koagulationsspaltlampe (LSL 532s, Carl Zeiss Meditec, Jena, Deutschland) anbringen zu können, wurde ein spezieller Adapter konstruiert (Abbil-

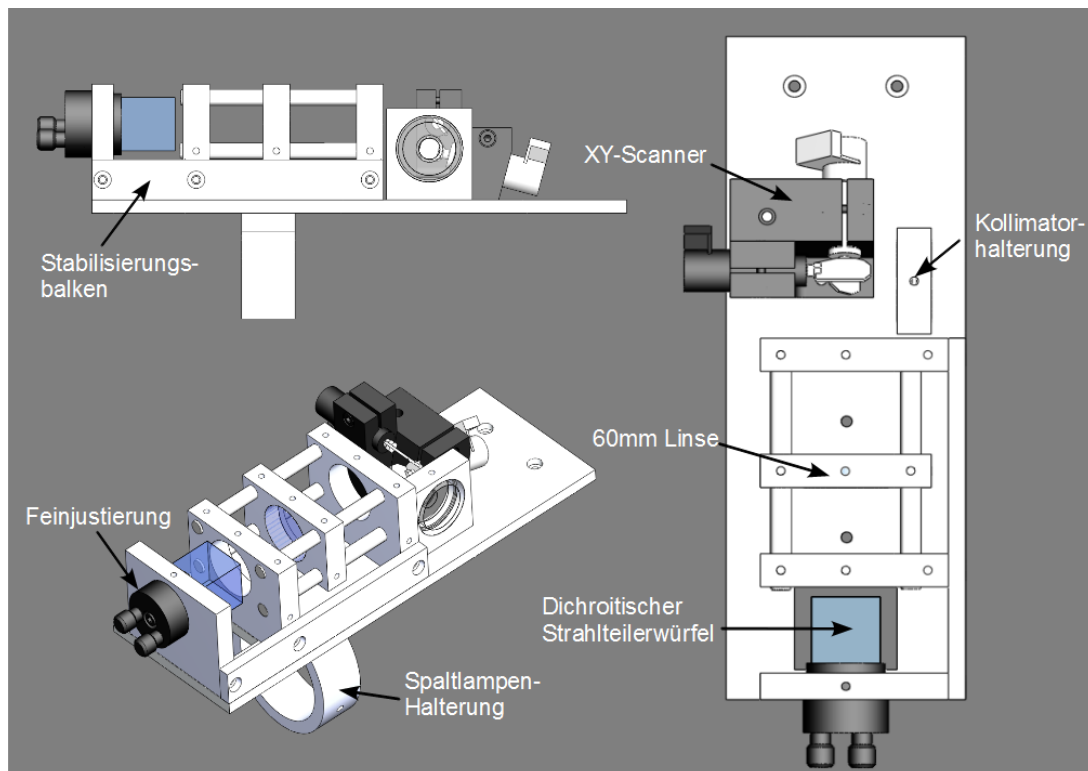


Abbildung 3.2 – Konstruktionszeichnungen des OCT-Adapters.

dungen 3.2 und 3.3). Der Adapter bildet den Probenarm des OCT-Interferometers. Der Referenzarm wurde separat auf einer Lochrasterplatte mit standardisierten Optikbauteilen aufgebaut, um Platz an der Spaltlampe zu sparen und zudem einen Verlust in der Lichtleistung durch einen weiteren Strahlteilerwürfel zu vermeiden. Die einmodige OCT-Faser wird mit einem Kollimator (60FC-4-M20-10, Schäfter + Kirchhoff GmbH, Hamburg, Deutschland) in der Kollimatorhalterung des Adapters verbunden und stellt eine Verbindung zwischen Hyperion und Applikator bzw. Referenzarm her. Direkt hinter der Kollimatorhalterung wurden die xy-Scanner (CTI 6210, Cambridge Technology Inc., Lexington, MA, USA) angebracht, die den kollimierten Lichtstrahl um 90° umlenken. Die Brennweite von 60 mm der nachfolgenden achromatischen Linse (NIR Achromat 25 mm Durchmesser, NIR-II beschichtet, Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, Deutschland), wurde durch Simulation des Strahlengangs mit dem Raytracing Programm ZEMAX bestimmt. Die Position der Linse liegt in etwa mittig zwischen Scannern und Zwischenfokus, kann jedoch mit Hilfe des Stangensystems leicht variiert werden um eine Nachfokussierung zu ermöglichen.

Durch den dichroitischen Strahlteilerwürfel wird der OCT-Strahl wieder um 90° umgelenkt. Der Würfel ist eine Spezialanfertigung mit einer allseitigen Antireflexbeschich-

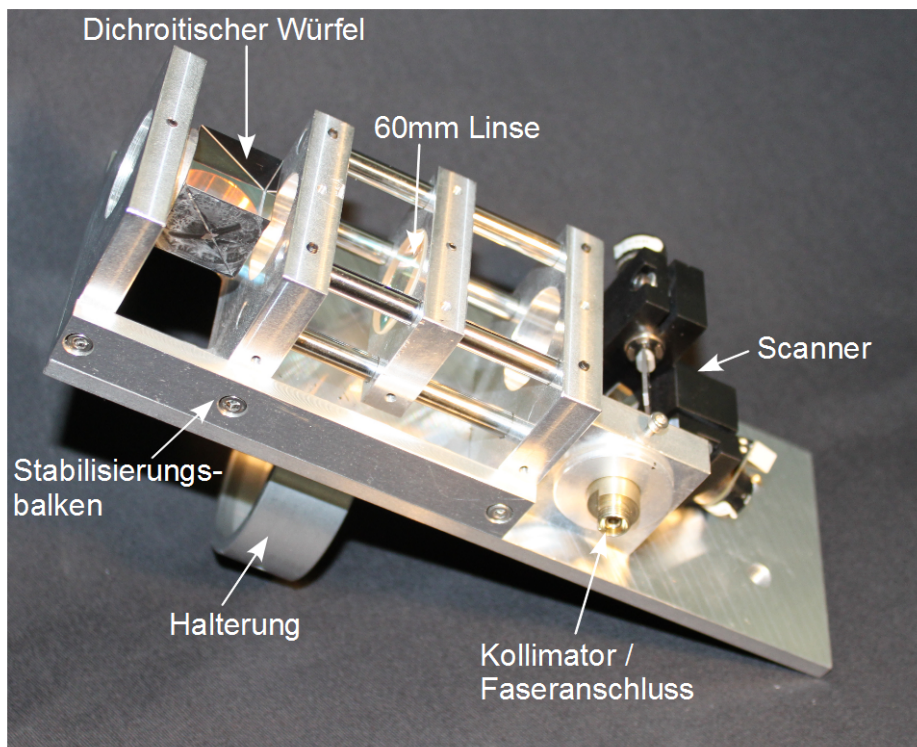


Abbildung 3.3 – Abbildung des konstruierten OCT Adapters mit eingebautem Kollimator, Scanner, Linse und dichroitischen Würfel

tung für den Wellenlängenbereich von 800 nm - 900 nm und einer dreiseitigen Antireflexbeschichtung für Licht im visuellen Bereich (VIS). Die Funktionsschicht besteht aus einer hochreflektiven Beschichtung für den NIR-Bereich von 800 nm - 900 nm, die eine 95% Transmission für VIS-Licht ermöglicht. Der Würfel bildet somit den Schnittpunkt zwischen Spaltlampe, Lasersystemen und Optischer Kohärenztomographie. Der Würfel war nicht justierbar, da es ausreichend war, die Feinjustierung des OCT-Strahls mit den Scannern vorzunehmen. Alle tragenden Elemente wurden fest mit der Grundplatte verschraubt sowie als zusätzliche Verstärkung gegen auftretende Torsionskräfte mit einem Stabilisierungsbalken versehen. Die Grundplatte war ihrerseits durch einen Ring mit Innengewinde auf der Spaltlampe fixiert.

3.1.3 Gesamtsystem

In Abbildung 3.4 ist der Aufbau zur simultanen Messung von OCT-Bildern und optoakustischen Temperaturverläufen während der Photokoagulation abgebildet. Der Teil des Aufbaus für die optoakustischen Temperaturmessungen wird durch den grünen Strahlengang, der OCT-Aufbau durch den roten Strahlengang dargestellt.

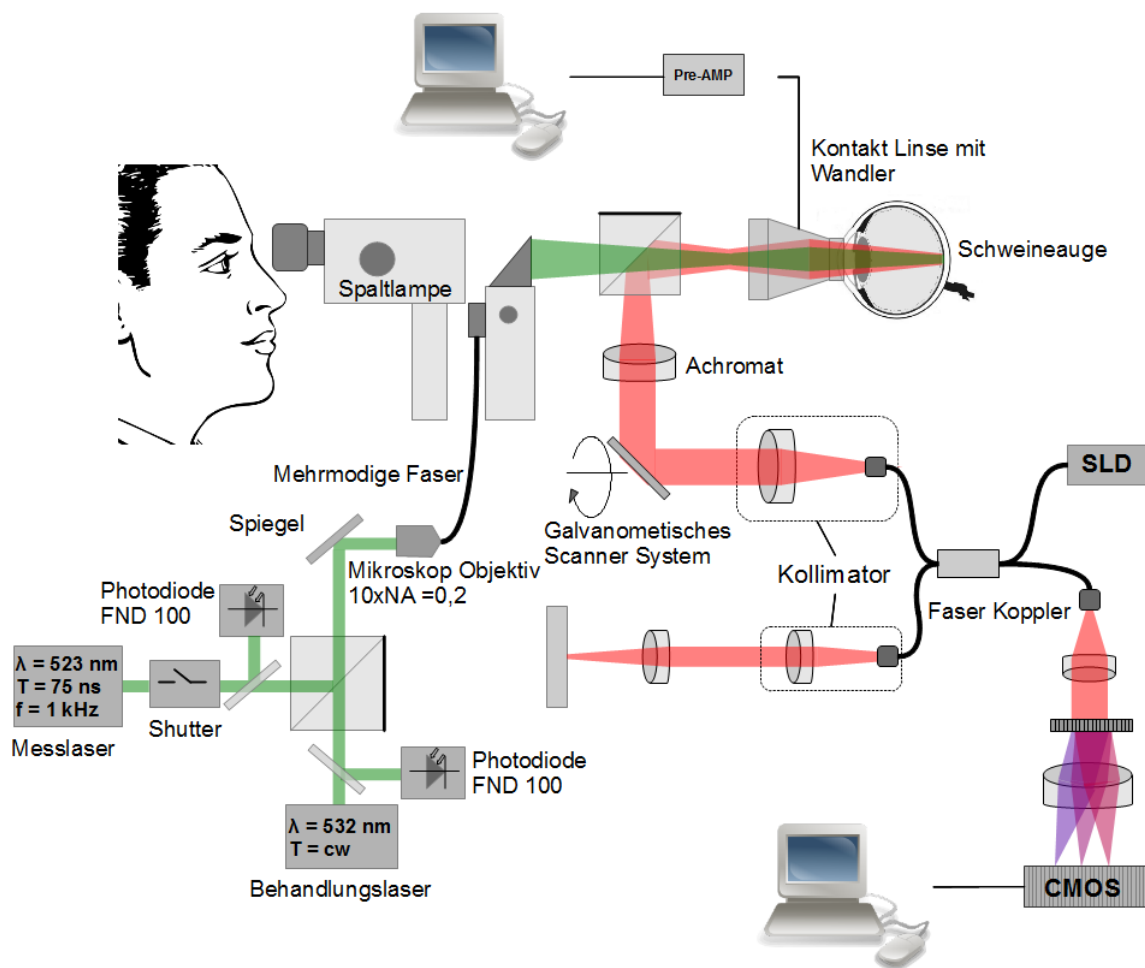


Abbildung 3.4 – Aufbau zur simultanen Messung von OCT-Bildgebung und optoakustischen Temperaturverläufen während der Photokoagulation am Auge

Nach der Einkopplung des Bestrahlungslasers und des Messlasers in die Multimodefaser wird diese durch einen FC-Stecker an die Koagulationsspaltlampe angeschlossen. Die externe Lichtquelle des OCT-Systems wird mit einem 50:50 OCT Breitband-Faserkoppler (850 nm OCT Broadband Fiber Optic Couplers, FC850-40-50-APE, Thorlabs GmbH, München, Deutschland) an den Referenzarm, an den Probenarm sowie an das Spektrometer angeschlossen. Im Referenz- und Probenarm wurden die Ausgänge der Faserkoppler mit einer selbstkonfektionierten Faser verlängert, da in beiden Armen manuelle Polarisationssteller zum Abgleich der Polarisationsrichtung verwendet wurden. Dies ist bei Faserinterferometern in der Regel notwendig, um die Signalqualität zu optimieren [Lankenau, 2002]. Im Referenzarm wird der Strahl durch einen Kollimator auf einen Durchmesser von 4,4 mm parallelisiert, durch eine Irisblende auf die gewünschte Intensität abgeschwächt und auf einen Spiegel fokussiert. Zudem wird die Dispersion mit 23 mm

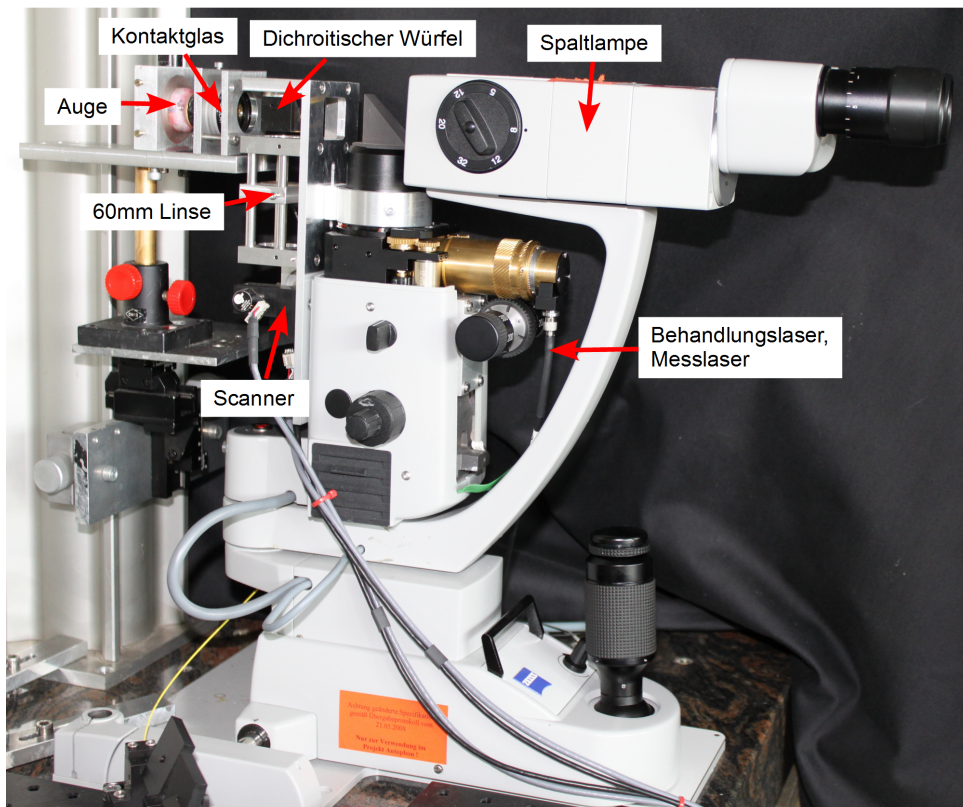


Abbildung 3.5 – Aufbaufoto des an die Spaltlampe angebrachten OCT-Applikators

BK7 ausgeglichen. Im Probenarm lenken die nachfolgenden Scanner den Probenstrahl auf den 60 mm Achromaten, der den Strahl auf den Zwischenfokus hinter den dichroitischen Würfel und letztendlich auf die Retina fokussiert. Die Überlagerung des visuellen Bildes aus der Spaltlampe mit den beiden Strahlengängen der Lasersysteme und des OCT-Strahles erfolgt direkt im dichroitischen Würfel, der somit sehr genau justiert werden muss. Anschließend wird der gemeinsame Strahlengang durch ein Kontaktglas geführt und auf die Retina des Auges fokussiert.

Der Abstand zwischen Spaltlampe und Kontaktglas beträgt nur 90 mm, so dass die Bauhöhe in der gewählten Anbringungsform stark begrenzt ist. Auf dem Aufbaufoto 3.5 wird deutlich, dass der Zwischenfokus nur wenige Millimeter hinter dem dichroitischen Würfel liegt und somit der gesamte Aufbau in einer Entfernung von ca. 20 mm vor dem Kontaktglas positioniert werden muss.

Durch die Konstruktion des OCT-Adapters ist es möglich, die Spaltlampe frei zu schwenken, ohne die Justierung zwischen Lasersystem-Strahlengang und OCT-Strahlengang zu verändern. Somit wurde es möglich erste Tierversuche durchzuführen. Die beiden Computersysteme zur Aufnahme der optoakustischen Signale und der OCT-Bildgebung wur-

den mit einer RS232 Schnittstelle synchronisiert. Durch Betätigung eines Fußschalters wurde zuerst der Messlaser zusammen mit der OCT gestartet und nach einer einstellbaren Vorlaufzeit erfolgte die Aktivierung des Bestrahlungslasers.

3.1.4 Spezifikationen des Gesamtsystems

Um eine Abschätzung zu erhalten, wie gut das System in Bezug auf Signal-zu-Rausch-Verhältnis, Signalabfall in der Tiefe (Roll-Off), laterale und transversale Auflösung, Sensitivität sowie maximal/ minimal aufzulösende Dopplergeschwindigkeit arbeitet, wurde das Gesamtsystem umfangreich charakterisiert. Hierzu wurde ein Phantomaugauge genutzt, in welchem sich an der Stelle der Retina ein Spiegel befand. Das Phantomaugauge entspricht in seinen Abmessungen und optischen Weglängen in etwa einem menschlichen Auge und ist mit dem Halter und Kontaktglas versehen, wie sie auch zur Messung der enukleierten Schweineaugen verwendet werden.

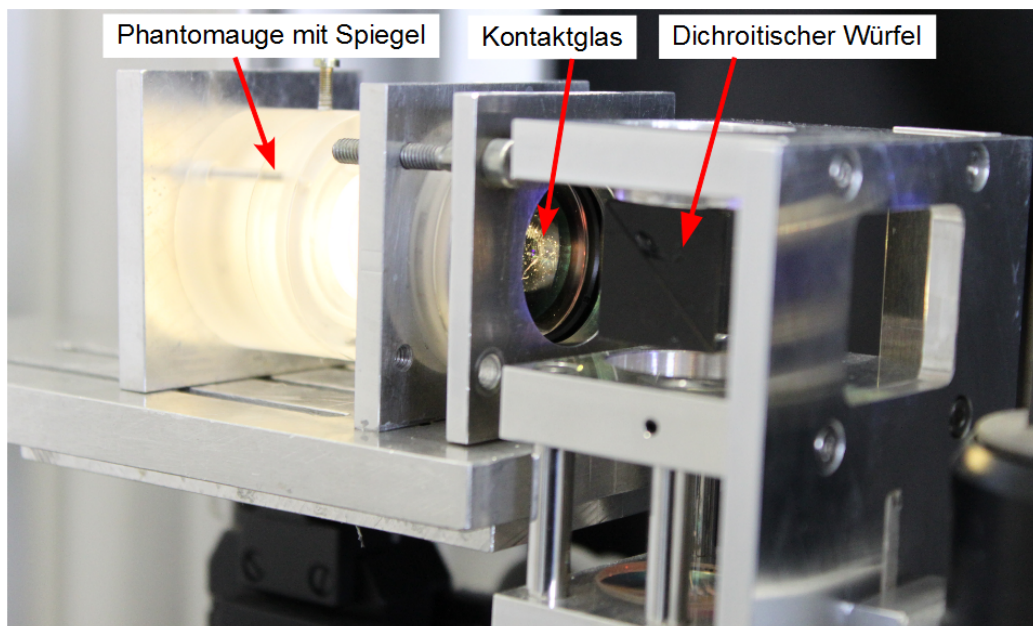


Abbildung 3.6 – Versuchsaufbau mit Phantomaugauge zur Spezifizierung des Gesamtsystems

Durch diesen Aufbau wurde es möglich, die Dispersion auszugleichen, die im Probenarm durch die verwendeten Optiken sowie durch die zum Referenzarm unterschiedlichen Faserlängen entsteht. Experimentell wurden höchste Auflösung und höchster Kontrast bei einem Ausgleich mit 23 mm BK7 festgestellt.

Die Breite der axialen Punktbildfunktion bei -6 dB beträgt dabei $14\ \mu\text{m}$, was der axialen Auflösung entspricht. Lateral kann die Auflösung im Zwischenfokus berechnet werden.

3. Material und Methoden

Der Abbildungsmaßstab für das Kontaktglas liegt nach Datenblatt für die Bildvergrößerung bei 0,96. Die laterale Auflösung im Zwischenfokus beträgt nach Gleichung 2.11 $\delta x = 15,3\mu\text{m}$. Bestätigt wird diese Abschätzung durch die Simulation des Strahlengangs, dargestellt in Abbildung 3.7. Der hier berechnete Airy-Radius beträgt $\delta x = 14,1\mu\text{m}$.

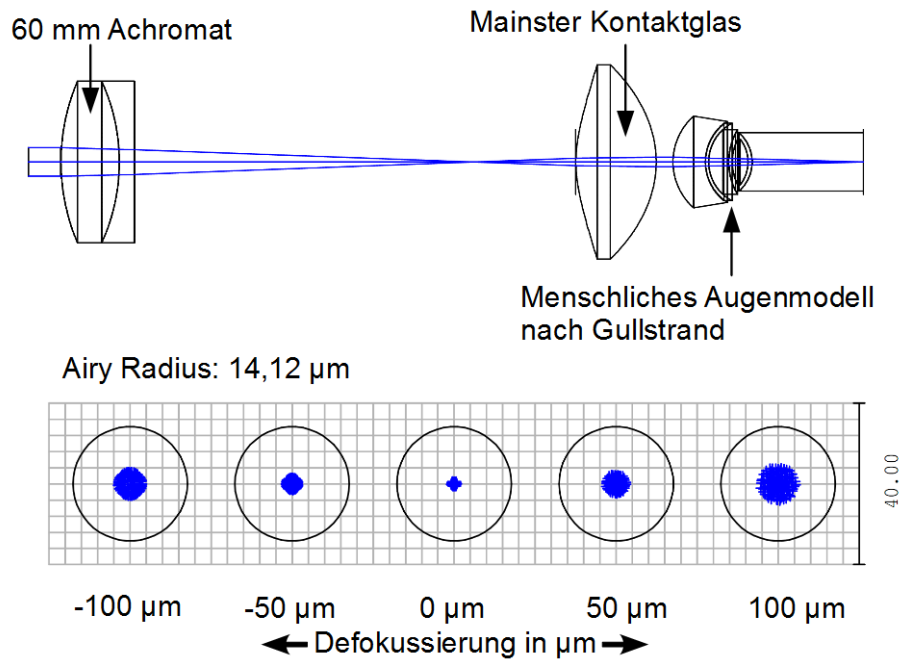


Abbildung 3.7 – ZEMAX-Simulation des Strahlengangs mit Mainster-Kontaktglas und menschlichem Augenmodell nach Gullstrand

Das axiale Bildfeld wird nach Gleichung 2.12 bestimmt und ergibt mit der berechneten numerischen Apertur von 0,037 ein Bildfeld von 1,4 mm. Das laterale Bildfeld wird hauptsächlich durch die optischen Eigenschaften des Kontaktglases sowie die geometrischen Eigenschaften des Auges bestimmt. Je nach Augengröße und Position des Auges zum Kontaktglas wird das Signal ab einem lateralen Bildfeld von etwa 4 mm im Bereich der Bildränder schwächer und erste Bildfeldkrümmungen treten auf.

In Abbildung 3.8 sind die Interferenzsignale des Spiegels bei abgeglicherer Dispersion dargestellt. In a.) ist das gemessene Spektrum ohne Korrekturen abgebildet, in b.) nach erfolgtem Abzug des Detektor-Untergrundes ohne Lichteinstrahlung (Black Adjust) und in c.) nach Multiplikation mit dem Apodisationsvektor (Apodization), der das Signal auf die Gaußform normiert. Nach der FFT erhält man den in d.) dargestellten A-Scan. Aus diesem A-Scan wurde das Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR) von 56 dB für den Gesamtaufbau ermittelt. Nach Abschwächung des Probenlichts mittels OD-Filter konnte außerdem eine Sensitivität von 72 dB bestimmt werden.

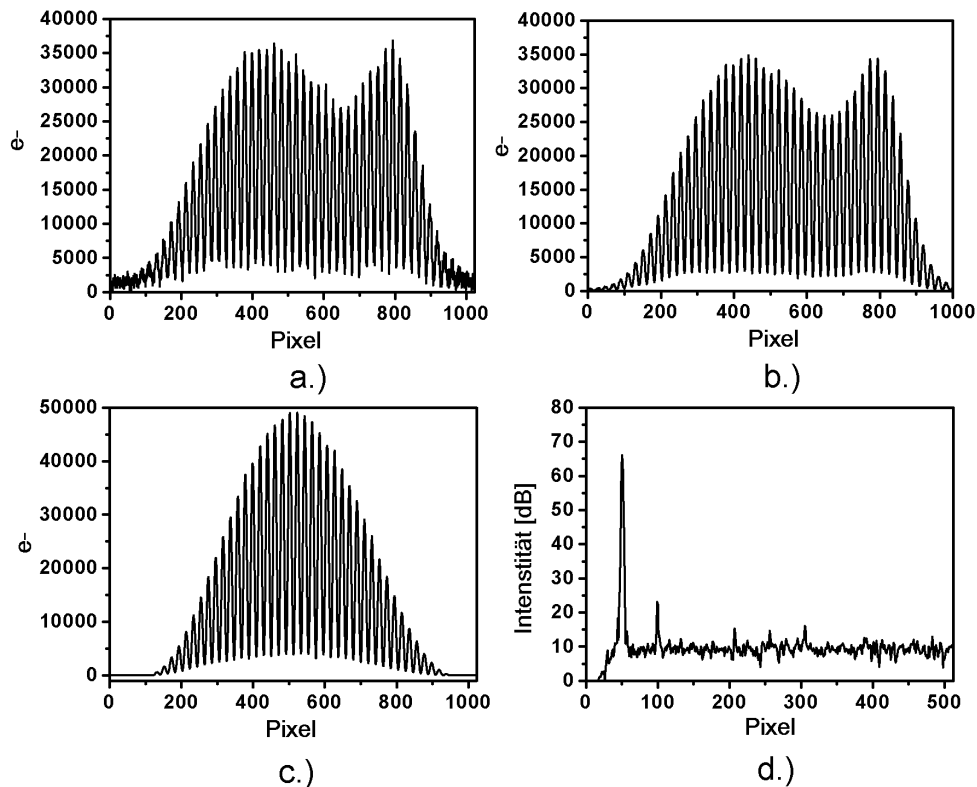


Abbildung 3.8 – Spiegelsignal nach erfolgtem Dispersionausgleich. a.) Interferenz ohne Korrekturen, b.) Interferenz nach Schwarzabgleich, c.) Interferenz nach Apodisation, d.) A-Scan

Ein weiterer wichtiger Parameter, der Einfluss auf die Bildqualität hat, ist der Signalverlust in den höheren Frequenzbereichen durch Übersprechen der Kamerapixel, auch Roll-Off-Verhalten genannt. Für die Abbildung 3.9 wurde die Referenz soweit verschoben, dass im Abstand von 10% des Messbereiches jeweils ein A-Scan in dem oben beschriebenen Aufbau abgespeichert werden konnte. Um das Untergrundrauschen zu minimieren wurde dabei über jeweils zehn Spektren gemittelt. Von den anfänglich ermittelten 56 dB in 10% der Messtiefe bleiben noch 40 dB in 90% der Messtiefe. Es entsteht somit ein Signalverlust (Roll-Off) von 16 dB über 80% des Tiefenmessbereichs. Die Signalbreite ändert sich dabei nicht, was auf einen guten Dispersionausgleich hindeutet.

Die Phasenauflösung wird bestimmt durch die mechanische Stabilität von Interferometer und Messaufbau sowie durch das SNR der A-Scans. Um das Phasenrauschen zu bestimmen, wurde ein Spiegel ohne Winkelablenkung seitens der Scanner durch 10.000 hintereinanderfolgende A-Scans vermessen. Zur Darstellung der Phasenstabilität wurde ein Histogramm der Phasendifferenz aus je zwei benachbarten A-Scans berechnet (Abb. 3.10 a.). Die Halbwertsbreite der an die Verteilung der Phasendifferenz angepassten Gaußkurve beträgt 0,024 rad was nach Gleichung 2.20 bei einer Kamerafrequenz von 220

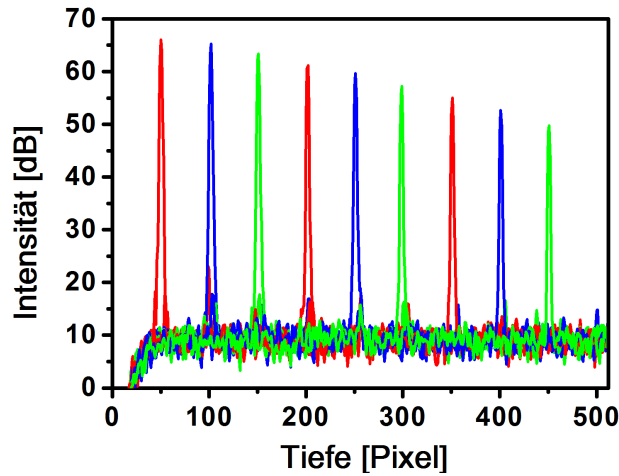


Abbildung 3.9 – Signalverlust (Roll-Off) des OCT-Signals bei zunehmender Messtiefe.

kHz eine minimal auflösbare Geschwindigkeit von $v_{zmin} = 0,35$ mm/s ergibt. Nach Gleichung 2.22 beträgt die maximal eindeutig messbare Geschwindigkeit $v_{zmax} = 46,3$ mm/s. Der dynamische Bereich für die Dopplermessungen liegt bei 132:1.

In Abbildung 3.10 b.) wurde das Phasenrauschen für die später verwendete Subtraktion zweier B-Scans mit einer Bildwiederholrate von 860 Hz berechnet. Durch Subtraktion des A-Scans i mit dem A-Scan $i+250$ wurden die späteren Aufnahmeparameter simuliert. Die Gauß-Verteilung ist mit einer Halbwertsbreite von $0,2$ rad sehr viel breiter als bei der Subtraktion zweier benachbarter A-Scans. Da jedoch der Zeitabstand zwischen den A-Scans mit 860 Hz größer ist, können so im Endresultat sehr viel kleinere Geschwindigkeiten von minimal $v_{zmin} = 0,012$ mm/s aufgenommen werden. Die berechnete maximale Geschwindigkeit beträgt $v_{zmax} = 0,18$ mm/s. Der dynamischen Bereich für die Dopplermessungen reduziert sich somit auf 15:1.

Die durch das Rauschen des OCT-Signals begrenzte Phasenauflösung kann durch die Gleichung

$$\sigma_{\Delta\phi} = (SNR)^{-\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

berechnet werden [Park et al., 2005, Vakoc et al., 2005, Yazdanfar et al., 2005]. Für ein gemessenes maximales SNR von 56 dB ergibt sich eine Phasenauflösung von 1,6 mrad oder eine Messempfindlichkeit für Verschiebungen von 100 pm. Dieser theoretisch ermittelte Wert wird jedoch nur mit einem Common-Path-Interferometer, bei dem die Referenz direkt mit der Probe gekoppelt ist, erreicht. Die mechanischen Vibrationen begrenzen andernfalls die Phasenauflösung. Bei Messungen der Gewebeverschiebung wird ein deut-

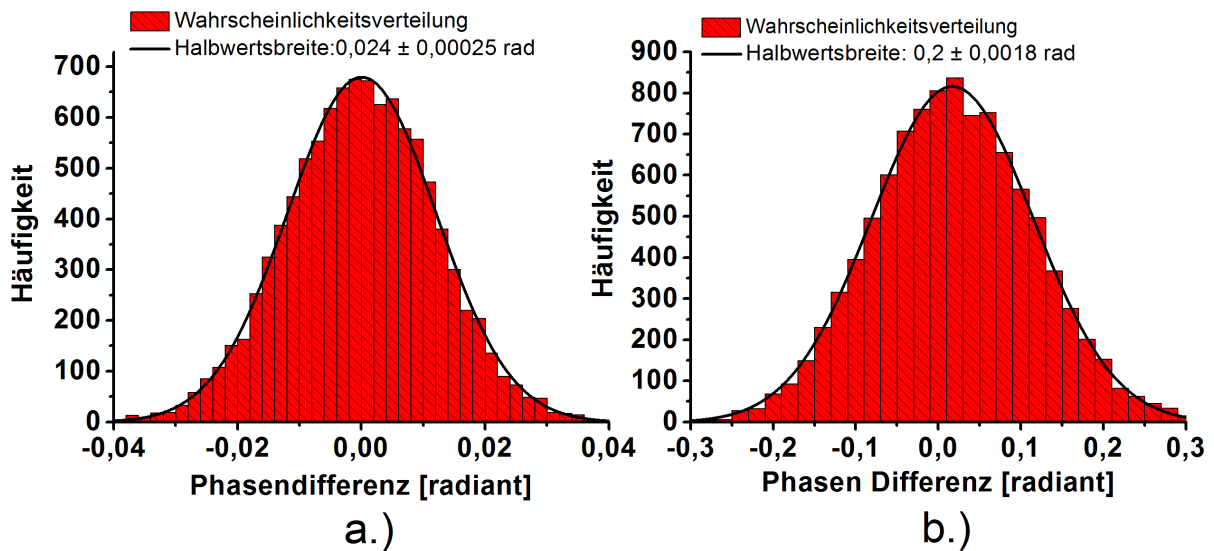


Abbildung 3.10 – Histogramm der Phasendifferenzen einer Spiegelmessung mit 10.000 A-Scans. a.) Histogramm der Phasendifferenz zwischen zwei benachbarten A-Scans. b.) Histogramm der Phasendifferenz zwischen dem i-ten und dem i+250-ten A-Scan.

lich geringeres SNR erreicht. Unterhalb von 30 dB wird das Phasenrauschen durch das SNR der Messung nicht mehr durch die mechanische Stabilität des Aufbaus bestimmt.

Der Signalverlust, der durch das Verwischen des Interferenzmusters (Fringe Washout) entsteht, kann mit den Gleichungen 2.14 und 2.15 abgeschätzt werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird bei der maximal auflösbaren Geschwindigkeit von 64,3 mm/s um den Faktor $\Delta SNR_{Axial} = 0,4$ abgeschwächt, was einem Signalverlust von -4 dB entspricht. Der durch die schnelle laterale Abtastung verursachte Signalverlust bei einer Bewegung des Strahl von $5 \mu\text{m}$ innerhalb der Aufnahmezeit und einer NA von 0,037 beträgt $\Delta SNR_{Lateral} = -0,1$ dB, was somit einen kleineren Einfluss auf die gesamte Bildqualität hat als der durch die Gewebeverschiebung verursachte axiale Verlust.

Um eine Aussage über die Qualität der Bilder des Gesamtsystems im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen System treffen zu können, wurden Vergleichsmessungen an der Retina von enukleierten Schweineauge mit dem SPECTRALIS Spectral-Domain-OCT von Heidelberg Engineering angefertigt. Das SPECTRALIS hat eine Messrate von 40.000 A-Scans pro Sekunde und ist somit 5,5-fach langsamer als das Hyperion System.

Abbildung 3.11 zeigt den Vergleich zwischen einem B-Scan des SPECTRALIS Spectral-Domain-OCT und dem in dieser Arbeit verwendeten Aufbau bestehend aus Hyperion OCT-System und Spaltlampe. In beiden Systemen sind von der retinalen Struktur nur die Netzhaut mit den oberflächlichen Gefäßen und das retinale Pigmentepithel abgrenz-

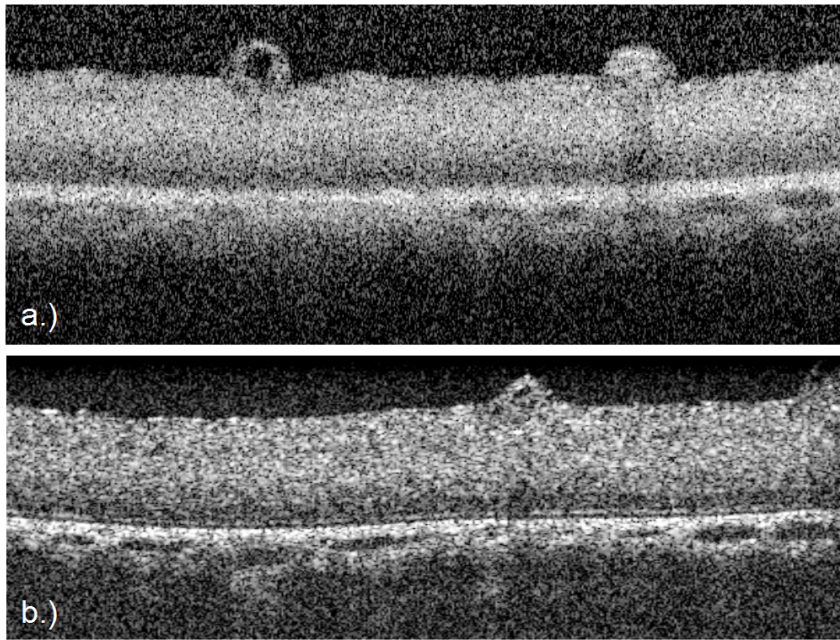


Abbildung 3.11 – Vergleichsmessung zwischen dem SPECTRALIS Spectral-Domain-OCT von Heidelberg Engineering (a.) und dem Hyperion-System mit angeschlossener Spaltlampe (b.). Es sind jeweils ungemittelte B-Scans dargestellt.

bar. Bei der benutzten Wellenlänge um 840 nm ist es nicht möglich detaillierte innere Strukturen der enukleierten Augen aufzulösen [Povazay et al., 2003]. Bei Verwendung einer längeren Wellenlänge mit 1050 nm könnten die tieferliegenden Strukturen der Choroidea besser sichtbar gemacht und die inneren Strukturen der Netzhaut besser aufgelöst werden [Povazay et al., 2003]. Die Abbildungstiefe der beiden Systeme ist in etwa gleich und insgesamt lässt sich mit dem verwendeten Aufbau eine ähnlich gute Bildqualität wie mit dem kommerziellen SPECTRALIS-OCT erreichen. Die durch die höhere Messgeschwindigkeit verursachte geringere Integrationszeit des Hyperion-Systems wurde dabei durch eine 10-fach stärkere Lichtquelle ausgeglichen. Auch Volumenmessungen können mit guter Qualität aufgenommen werden (Abbildung 3.12). Sehr gut zu erkennen sind oberflächliche, sich zum Teil überschneidende Gefäßverästelungen, sowie die Netzhaut und das RPE.

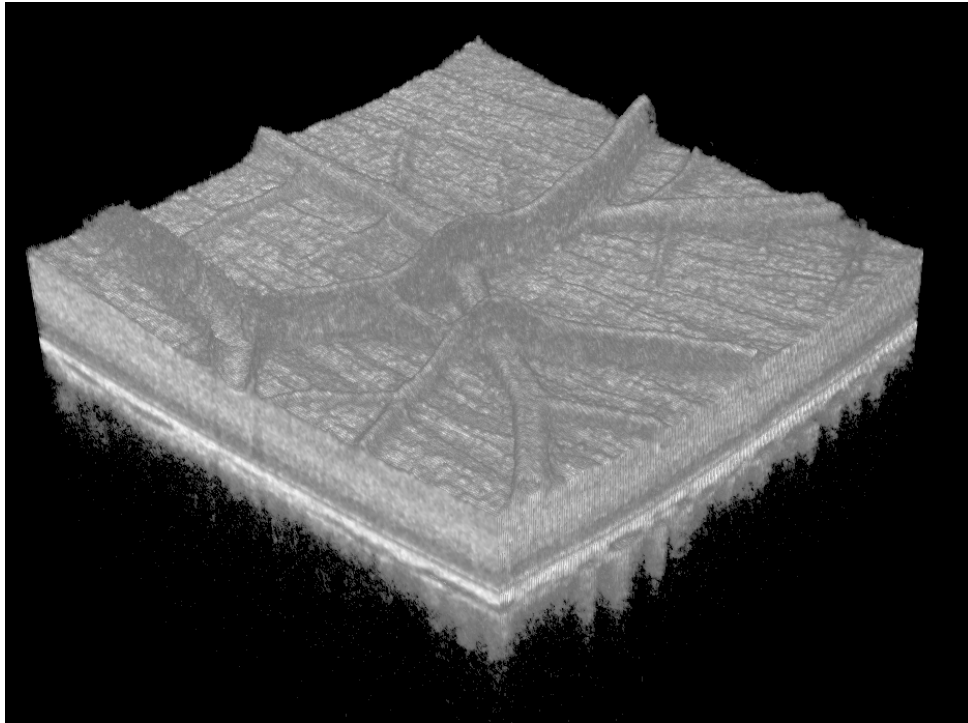


Abbildung 3.12 – Dreidimensionale Darstellung der Retina mit gut sichtbarer Gefäßstruktur auf der Oberseite

3.2 Algorithmen und Programme

Die Software zur Datenerfassung sowie zur Auswertung, Nachbearbeitung und Bildverarbeitung wurde mit der Programmiersprache LabVIEW entwickelt. Zur Beschreibung der jeweiligen Programmabläufe werden Flussdiagramme mit Symbolen der DIN Norm 66001 verwendet. Die grundsätzliche Bedeutung der Flussdiagrammsymbole ist in Abbildung 3.13 zusammengefasst.

Zielsetzung war eine schnelle Datenaufnahme von Interferenzspektren während der Bestrahlung zu ermöglichen. Zur Auswertung und Darstellung der Messung wurde ein zweites Programm entwickelt.

3.2.1 Messsoftware

Durch die sehr schnelle Bildfrequenz der Zeilenkamera wurden sehr große Datensätze mit einer Rate von bis zu 210MB pro Sekunde erzeugt. Dies führt bei einer kontinuierlichen Messung über mehrere Sekunden zu einem Datenvolumen, das die Größe des Arbeitsspeichers überschreitet. Deshalb wurde in der Messsoftware ein Algorith-

3. Material und Methoden



Abbildung 3.13 – Flussdiagrammsymbole nach DIN Norm 66001

mus implementiert, der es ermöglicht innerhalb kürzester Zeit große Datensätze auf ein Festplatten-RAID-0-Verbund zu schreiben. Die mittlere Schreibgeschwindigkeit einer normalen Festplatte liegt derzeit bei durchschnittlichen 60 MB pro Sekunde. Mit einem Verbund unabhängiger Festplatten (RAID - Redundant Array of Independent Disks) können Zugriffe auf allen Platten parallel durchgeführt werden, wobei das Zusammenwirken der Festplatten durch einen Hardware-RAID-Controller organisiert wird. Damit erhält man eine gesteigerte Transferrate, die im optimalen Fall bei vier Festplatten 240 MB pro Sekunde erreicht. Dies reicht aus um das aufkommende Datenvolumen von 210 MB pro Sekunde abzuspeichern und somit eine Limitierung der Messzeit durch den sich langsam füllenden RAM-Speicher zu umgehen. Zur Ansteuerung des OCT-Systems wurden einige Unterprogramme aus dem *Spectral Radar Developers Kit V24* von Thorlabs GmbH verwendet. Diese sind als orangene, nummerierte Unterprogramme im Flussdiagramm in Abbildung 3.14 gekennzeichnet. Startet man das Programm (1), so wird als erstes die angeschlossene Hardware konfiguriert (2). Dazu gehört auch das Einlesen der Korrekturdateien für Offset-Fehler, Linearisierung des Spektrums im k-Raum und Apodisation, welche als Textdateien in dem Konfigurationsverzeichnis abgelegt sind (3). Das Gerät erzeugt im Anschluss neue Korrekturdateien für den Offset-Fehler und die Apodisation (4) und behält diese im Arbeitsspeicher zur weiteren Bildbearbeitung vor (5).

Zur Ausgabe eines kontinuierlichen B-Scans für eine Positionierung und Signalkontrolle, werden zuerst die vom Benutzer eingegebenen Angaben zur Scanbreite und Anzahl der A-Scans pro B-Scan eingelesen (7) und zum Thorlabs Unterprogramm *Start Continuous Measurement* (8) übergeben, welches die Synchronisation zwischen CMOS-Kamera und

Scannern sicherstellt, aus den angegebenen Daten eine Rampe für die Scanner erzeugt, und die Messung startet. In der darauffolgenden While-Schleife werden kontinuierlich die B-Scans aus dem Unterprogramm *Get Latest B-Scan Complex* (9) ausgelesen und dargestellt (10). Wird der Programmteil beendet (11), setzt das Unterprogramm *Stop Measurement* (12) die Kameraeinstellung zurück und beendet den Scanvorgang.

Um die Spektren des Datentyps "Integer 8 Bit" auf die Festplatte zu schreiben, wird zunächst der Pfad zur gewünschten Datei, auf dem die Daten gespeichert werden sollen, vom Benutzer abgefragt und angelegt (13). In dieser Datei werden zuerst die zu den Spektren passenden Korrekturdateien, Offset-Error und der Linearisierungsvektor abgespeichert (14). Anschließend werden die Scanner auf eine Randposition verkippt, auf der kein Signal mehr von der Probe mitdetektiert wird (15). Mit dem alleinig verbliebenen Referenzlicht wird die Apodisation durchgeführt und ebenfalls in die vom Benutzer ausgewählte Datei gespeichert (16). Die für die Messung wichtigen Scan Parameter werden eingelesen und analog zu den vorher beschriebenen kontinuierlichen B-Scan-Messungen werden die Kamera und die Scanner synchronisiert gestartet (18).

Die Consumer-/Producer-Schleife, mit der die Spektren aus der Kamera ausgelesen und auf die Festplatte abgespeichert werden, besteht aus zwei unabhängigen While-Schleifen (20-24, 25-29), die zum Datenaustausch mit einer Warteschlange (Queue) als Kommunikationsschnittstelle verbunden sind. Diese Art der Programmierung ermöglicht den verbesserten Austausch zwischen mehreren Schleifen, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abgearbeitet werden [National Instruments, 2002]. Die erste Schleife im linken Zweig fungiert als Producer Schleife und ist mit dem Unterprogramm *Get I8 Raw Image* (22) für die Datenaufnahme zuständig. Dieser Prozess ist sehr viel schneller als die Abspeicherung der Daten in der Consumer-Schleife. Als Buffer wird deshalb eine Queue implementiert, deren Größe vom Betriebssystem Windows 32bit auf 3 GB limitiert ist und die nach dem FIFO (First In - First Out) Prinzip die Daten übergibt. Nach Ablauf einer vom Benutzer festgelegten Anzahl von B-Scans (21), stoppt zuerst die Producer-Loop während die Consumer-Loop noch solange Daten auf die Festplatte speichert wie Elemente in der Queue vorhanden sind (26). Erst wenn beide Schleifen beendet worden sind (27), stoppen auch die Kamera sowie die Scanner (30). Während der Abspeicherung der Spektren ist keine Bildausgabe vorgesehen, da diese den kompletten Messprozess verlangsamen würde.

3. Material und Methoden

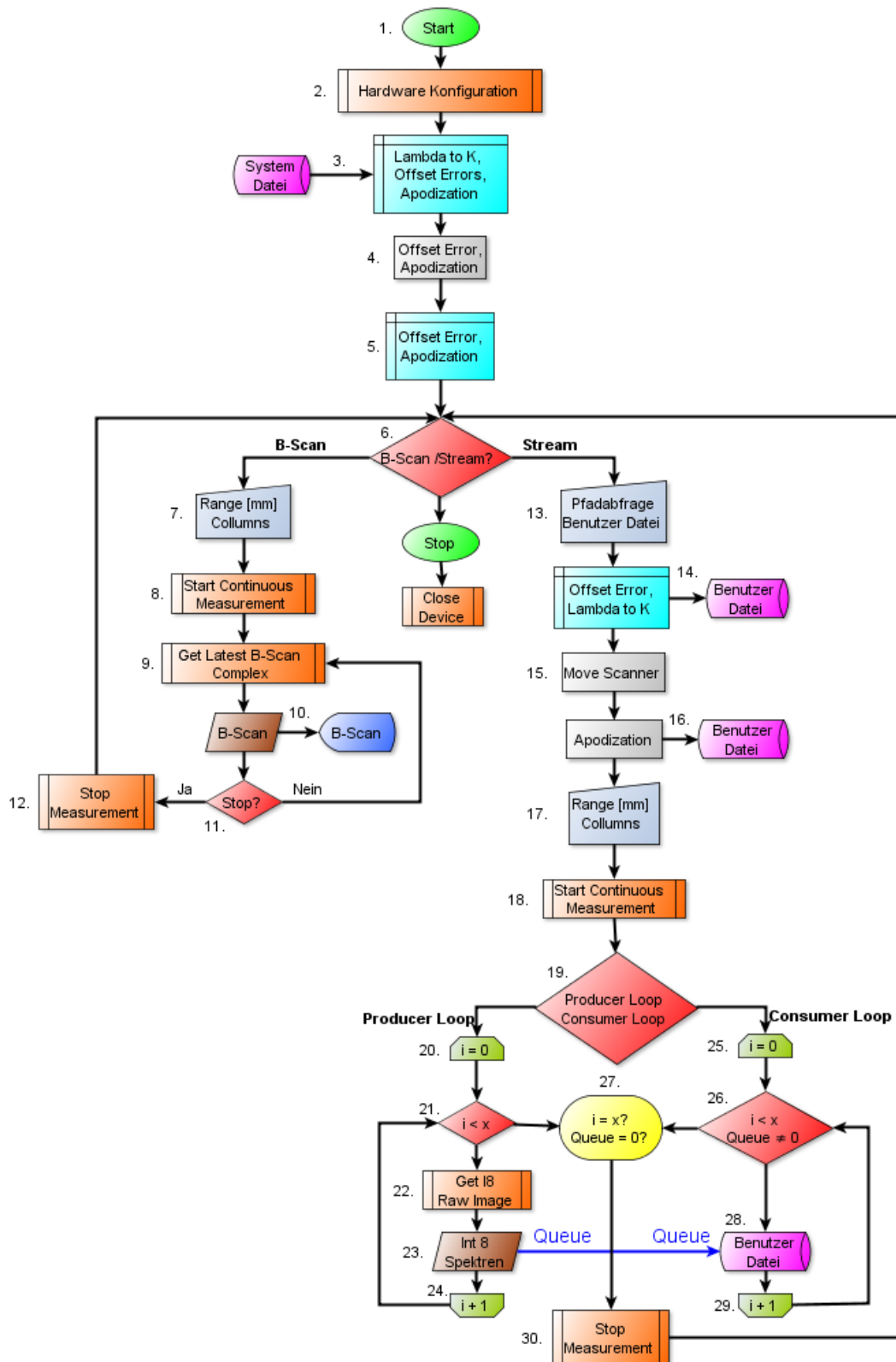


Abbildung 3.14 – Flussdiagramm zur schematischen Visualisierung der Programmstruktur der Messsoftware.

3.2.2 Auswertesoftware

Die Auswertesoftware ermöglicht es die abgespeicherten Spektren in OCT-Bilder umzurechnen und abzuspeichern. Beim Start (1) wird die Anzahl der A-Scans pro B-Scans (2) und der Pfad zu den abgespeicherten Spektren mit den zugehörigen Korrekturdateien abgefragt (3). Die Korrekturdateien, Offset-Error, Linearisierungs- und Apodisationsvektor werden in den Arbeitsspeicher zur weiteren Bildbearbeitung geladen (4).

Für eine Anzeige der B-Scans geht das Programm automatisch nach dem Einladen der Korrekturdateien in den linken Ast der Verzweigung von Abbildung 3.15. Durch einen Schieberegler auf der Programmoberfläche kann der Benutzer den zur Ansicht gewünschten B-Scan auswählen (7). Dieses, sowie die für das Phasendifferenzbild notwendige nachfolgenden Spektren werden geladen (8). Als ersten Schritt der Bildverarbeitung werden die Spektren korrigiert (9). Dazu wird der Offset-Fehler abgezogen und anschließend das Spektrum mit dem Apodisations-Vektor multipliziert und zur Linearisierung im K-Raum interpoliert. Anschließend wird das Spektrum durch eine inverse FFT in den Frequenzraum transformiert (10), um das Tiefenprofil oder den A-Scan zu erhalten. Für die Darstellung jedes B-Scans werden die zwei komplexen Tiefenprofile direkt nach der FFT in Polarkoordinaten umgewandelt und der Mittelwert der Beträge zur Darstellung in die Dezibel Skala umgerechnet (11). Die Mittelung verbessert die Bildqualität (12). Zur Berechnung des Phasendifferenzbildes erfolgt eine Subtraktion der Tiefenprofile zweier zeitlich hintereinander aufgenommenen komplexen B-Scans (14). Die Phasen des Differenzbildes in Polarkoordinaten wird als Bild dargestellt (16). Im nächsten Schritt erfolgt die Korrektur der bei schnellen Bewegungen auftretenden Phasensprünge (17). Dies ist im Kapitel 3.2.3 genauer beschrieben. Um eine Bewegung in der Gewebestruktur besser erkennbar zu machen, werden der gemittelte B-Scan und das Phasendifferenzbild übereinander gelegt. Für den B-Scan wird ein Schwellwert bestimmt, ab dem die Phasendifferenz im kombinierten Bild sichtbar sein soll (19). Bei Pixeln unter diesem Schwellwert ist das Phasenbild transparent, so dass nur der B-Scan erkennbar dargestellt wird. So bleiben die Specklemuster im kombinierten Bild erhalten (20).

Von den gesamten abgespeicherten Daten eines Zeitverlaufs kann ein gewünschter Ausschnitt ausgewählt (21), anschließend analog zu dem oben beschriebenen Datenfluss in OCT-Bilder umgerechnet (22-37) und als Bildserie gespeichert werden (38). Nach Bildung der Phasendifferenz und der Entfernung der Phasensprünge wird zusätzlich die Phasendifferenz der Datensätze über die Zeitserie integriert (31), um die Verschiebung im Gewebe zu messen. Diese integrierten Phasen werden für jeden Zeitpunkt in ein ge-

meinsames, dreidimensionales Array auf der Festplatte gespeichert (32).

Zur Bestimmung der Netzhautoberflächenverschiebung während der Koagulation wird im B-Scan ein Ausschnitt mit dem Durchmesser des Koagulationsflecks ausgewählt (39). Durch ein LabVIEW internes VI (*“Peak Detector“*) wird in jedem A-Scan die Position der Netzhautoberfläche bestimmt (40) und diese über alle A-Scans innerhalb des gesamten Durchmessers des Bestrahlungsflecks gemittelt (41). Dieser Mittelwert wird angezeigt (42) und die jeweiligen Positionen der Retinaoberfläche werden für die gesamte ausgewählte Zeitserie gespeichert (43). Die Bestimmung der durch die Bestrahlung entstehenden Veränderungen in den Streueigenschaften der Retina erfolgt durch die direkte Mittelung der A-Scans über den Durchmesser des Koagulationsflecks (44). Das daraus resultierende gemittelte Tiefenprofil wird sukzessiv als M-Scan über die gesamte Bestrahlungsdauer in einem Graphen dargestellt (45) und abgespeichert (46.). Zur qualitativen Analyse der Daten wird die Netzhautoberfläche begradigt (47), da eine starke Koagulation zu einer Verschiebung der einzelnen Retinaschichten führt und dies eine positionsbezogene Auswertung erschwert. Der Zeitverlauf wird nach Abschluss der Zeitserie ebenfalls gespeichert (48).

3.2.3 Entfaltung der Phasensprünge

Alle OCT-Aufnahmen wurden mit 250 A-Scans pro B-Scan über einen Bereich von 1 mm bei 860 Bildern pro Sekunde aufgenommen. Diese Parameter haben sich im Experiment bewährt, da sie einen guten Kompromiss zwischen den durch Doppler-Effekt messbaren Geschwindigkeitsbereich und dem lateralen Messbereich darstellten. Geschwindigkeiten der Gewebeverschiebung von minimal $v_{z\min} = 0,012\text{mm/s}$ und maximal $v_{z\max} = 0,18\text{mm/s}$ können aus der Bildserie ohne weitergehende Korrekturen bestimmt werden. Übersteigen die Gewebegeschwindigkeiten $v_{z\max}$, so entstehen Phasensprünge, die in Abbildung 3.16 durch den Farbwechsel von rot zu blau bzw. blau zu rot gekennzeichnet sind. Um diese Phasensprünge zu entfernen, wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet.

Im ersten Algorithmus werden die Orte der Phasensprünge durch Kombination eines zweidimensionalen Laplace-Kantenfilter mit einer Spitzenwertdetektion ermittelt. An den Orten der Phasensprünge wurden dann jeweils 2π addiert oder subtrahiert. Dieser Algorithmus braucht ein sehr rauscharmes Phasendifferenzsignal, um zuverlässige Korrekturen vornehmen zu können, und wurde somit nur für die *Ex-vivo*-Experimente an enukleierten Schweineaugen verwendet. Es war möglich, mit dem Laplace-Filter mehrere hintereinander folgende Phasensprünge zu erkennen und zu korrigieren, solange

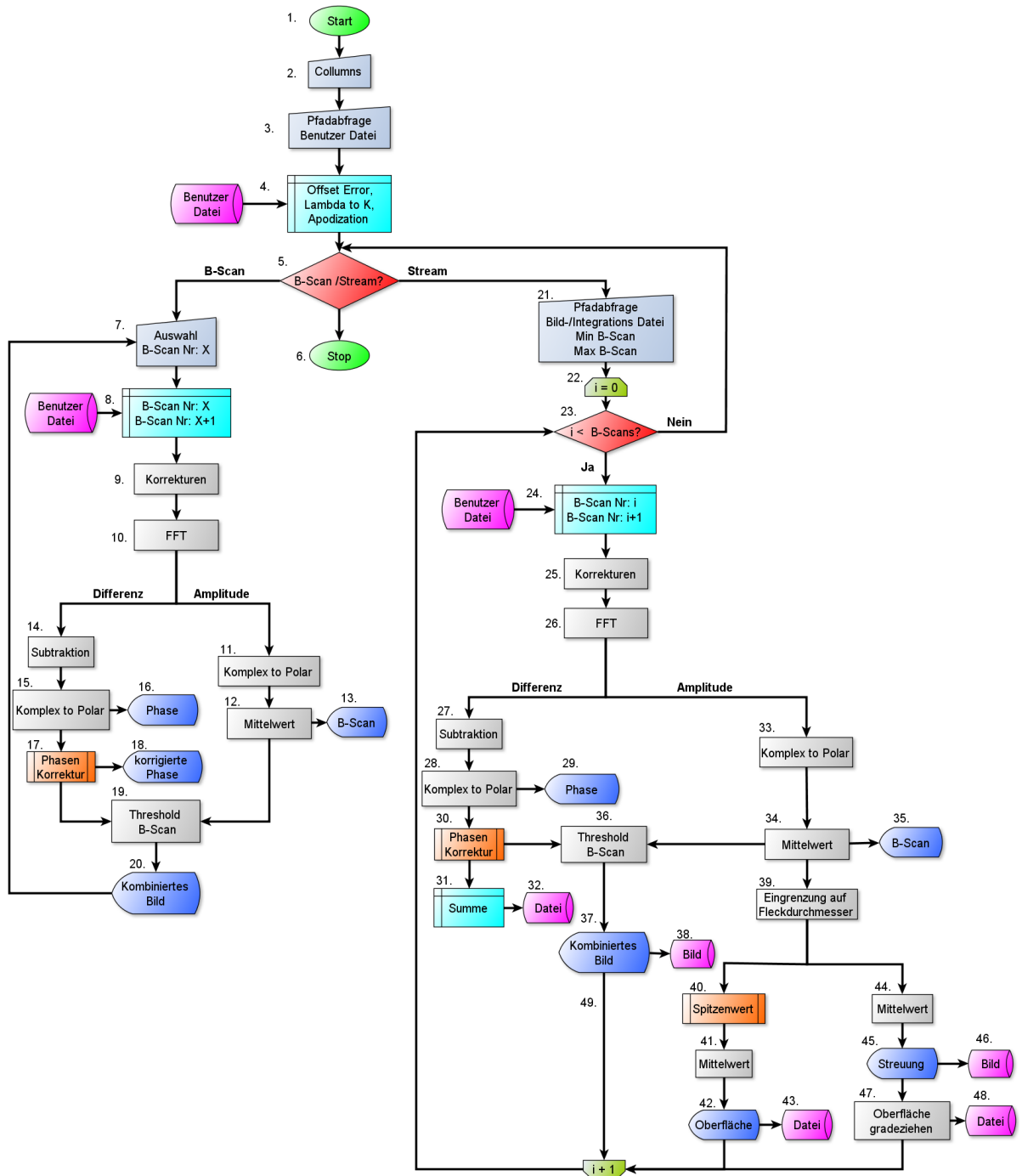


Abbildung 3.15 – Flussdiagramm zur schematischen Visualisierung der Programmstruktur der Auswertesoftware.

diese noch klar voneinander differenzierbar waren.

Der Laplace-Kantenfilter basiert auf dem Laplace-Operator, der die Summe der beiden zweiten Ableitungen berechnet. Eine mögliche Kante befindet sich dabei im Nulldurchgang der zweiten Ableitung [Jähne, 2005]:

$$\nabla^2 f(x, y) = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} = 0 \quad (3.2)$$

Da das Bild aus einem Datensatz mit diskreten Werten besteht, muss die diskrete Faltungsmatrix bestimmt werden, welche die zweiten Ableitungen der Laplace-Gleichung annähern [Steinbrecher, 1993].

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} &\approx \frac{\partial}{\partial x} \frac{f(x+1, y) - f(x, y)}{(x+1) - x} \\ &\approx (f(x+1, y) - f(x, y)) - (f(x, y) - f(x-1, y)) \\ &= f(x+1, y) - 2f(x, y) + f(x-1, y) \end{aligned} \quad (3.3)$$

Analog wird mit der zweiten Koordinate verfahren. Damit ergibt sich die Filtermaske:

$$\Delta_{x,y} f(x, y) = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 1 & -2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0 & -2 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (3.4)$$

Dieser Filter ist allerdings sehr rauschanfällig, da der mittlere Bildpunkt im Gegensatz zu seinen Nachbarn recht stark gewichtet wird. Durch die Verwendung unterschiedlicher Differentialquotienten können unterschiedliche Geometrien zur Kantendetektion verwendet werden. Für eine gleichmäßige Detektion der Kanten in allen Raumrichtungen kann zum Beispiel folgende Faltungsmatrix verwendet werden [Steinbrecher, 1993].

$$\Delta_{x,y} f(x, y) = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.5)$$

Für die Auswertung der Daten hat sich die dritte gebräuchliche Variante als vorteilhaft erwiesen [Maini und Aggarwal, 2009]. Diese zeichnet sich durch eine bessere Isotropie aus und entsteht unter Hinzunahme einer gemischten zweiten Ableitung bei der Appro-

ximation.

$$\Delta_{x,y}f(x,y) = \begin{bmatrix} -1 & 2 & -1 \\ 2 & -4 & 2 \\ -1 & 2 & -1 \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

Abbildung 3.16 a. zeigt ein ungefiltertes Phasendifferenzbild aus einer aufgenommenen Bestrahlungsserie. Die Bestrahlungsstärke von 410 W/cm^2 erzeugte eine lokale Temperaturerhöhung von $> 70 \text{ K}$. Abbildung 3.16 b.) zeigt eine Zeile aus dem Phasendifferenzbild. Phasensprünge treten an den Positionen $170 \mu\text{m}$, $320 \mu\text{m}$, $590 \mu\text{m}$ und $750 \mu\text{m}$ auf. Die Phasendifferenz springt an diesen Stellen durch die zeitlich begrenzte Phasenauflösung nicht immer exakt um $\pm 2\pi$, sondern häufig um einen kleineren Wert. Durch den angewandten Laplace-Filter sind die Phasensprünge als mehrfache Nulldurchgänge in den Abbildung 3.16 c. und 3.16 d. gut zu erkennen. Jede Zeile wird nach der Filterung separat auf Areale mit mehreren zusammenhängenden Spitzenwerten durchsucht. An den Positionen dieser Areale wird in den ungefilterten Daten die Umgebung untersucht. Zeigt diese links und rechts einen positiven Anstieg auf, so werden zu allen nachfolgenden Datenpunkten 2π addiert, bei einem negativen Anstieg werden 2π subtrahiert (Abb. 3.16 e. und f.). Bei Messdaten mit einem geringen SNR-Verhältnis traten in vereinzelt Zeilen Fehler bei der Erkennung der Phasensprünge auf, die zu Ausreißern in der 2-dimensionalen Darstellung der Phasen führten. Diese wurden abschließend mit einem zweidimensionalen Median-Filter der Stufe 9 eliminiert (Abb. 3.16 g. und h.).

Die *in vivo* durchgeführten OCT-Messungen zeigten ein so geringes SNR-Verhältnis, dass eine Erkennung der Phasensprünge durch den Laplace-Filter-Algorithmus nicht möglich war. Dieser konnte keine klaren Kanten an den Sprungstellen detektieren. Deshalb musste hier ein robusterer Algorithmus eingesetzt werden.

Zur Erkennung der Phasensprünge wurde zunächst jede Zeile φ_i des Phasendifferenzbildes mit einem 1-dimensionalen Median-Filter der Stufe 9 gefiltert (Abb. 3.17) und anschließend integriert:

$$\bar{\varphi}_j = \sum_{i=0}^j \varphi_i \quad (3.7)$$

Durch die Integration werden die Kanten der Phasensprünge zu Maxima und Minima, die mittels einer Spitzenwerterkennung detektiert wurden. Die ungefilterten Originaldaten wurden dann zeilenweise von links nach rechts durchgegangen und ab der Position jedes Maximums für alle nachfolgenden Datenpunkten um 2π addiert sowie ab der Position jedes Minimums um 2π subtrahiert. Abbildungen 3.17 f. und g. zeigen die korrigierte

3. Material und Methoden

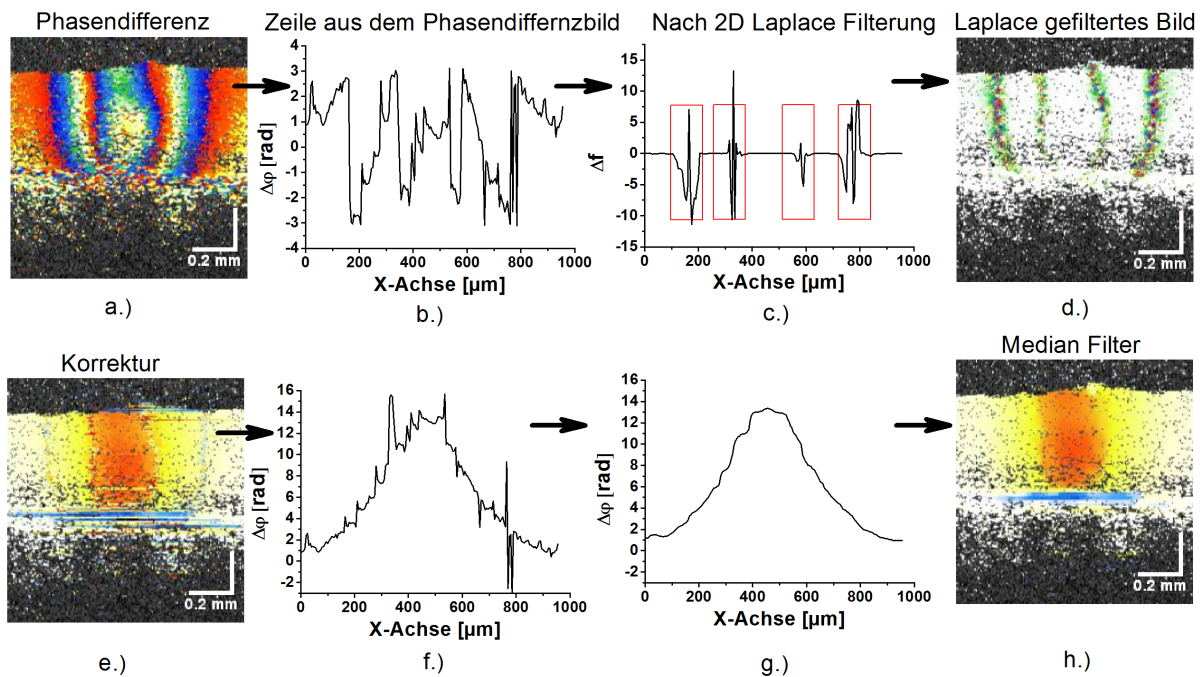


Abbildung 3.16 – Phasenkorrektur der *Ex-vivo*-Versuchsreihe an enukleierten Schweineaugen: a.) Unkorrigierter Datensatz mit zweifachem Phasensprung, b.) Zeile aus Phasendifferenzbild, c.) Zeile nach Laplace-Filterung. Detektion der Phasensprünge mittels Spitzenwerterkennung in den rot eingezeichneten Arealen, d.) Phasendifferenzbild nach Laplace-Filterung, e.) Phasendifferenzbild nach Korrektur der Phasensprünge, f.) Zeile aus korrigiertem Phasendifferenzbild, g.) Zeile nach Median-Filter, h.) Phasendifferenzbild korrigiert und mit Median-Filter geglättet.

Phasendifferenz, die anschließend mit einem zweidimensionalen Median-Filter geglättet wurde (Abb. 3.17 h. und i.). Durch die Medianfilterung und Integration der Zeilen vor Bestimmung der Phasensprünge ist dieser Algorithmus sehr robust gegen Rauschen, besitzt allerdings eine geringe räumliche Auflösung. Dies war *in vivo* akzeptabel, da hier die Verschiebungen kleiner als bei den *Ex-vivo*-Messungen ausfielen.

In vivo war neben der Entfaltung auch eine Korrektur der globalen Bewegungen des Kaninchenauges, welche unter anderem durch Herzschlag und Atmung verursacht werden, notwendig. Diese überlagern, wie in Abbildung 3.18 a. dargestellt, eine durch den Bestrahlungslaser verursachte lokale Verschiebung. Die globalen Bewegungen sind über den jeweiligen B-Scan nicht konstant, sondern erzeugen einen, in erster Näherung, linearen Geschwindigkeitsgradienten über das gesamte Bildfeld. Dieser lineare Anteil wurde subtrahiert, indem nach Mittelung über die gesamte Dicke der Retina die laterale Abhängigkeit der Verschiebung an eine Gerade angepasst wurde (Abb. 3.18 b.). Durch die Subtraktion der Geraden von der Phasendifferenz jedes A-Scans konnten die globalen

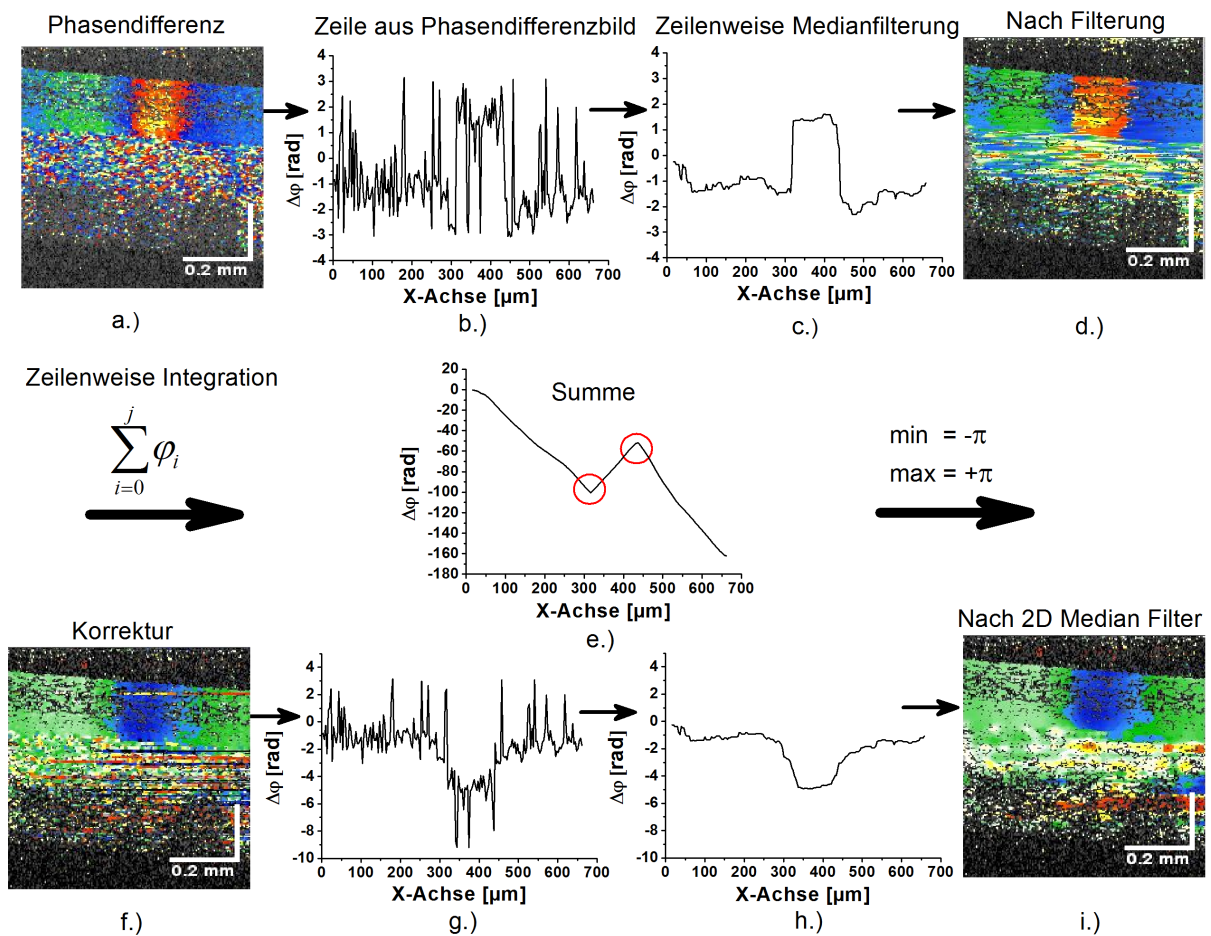


Abbildung 3.17 – Entfaltung der *In-vivo*-Aufnahmen. a.) Unkorrigierter Datensatz mit einfachem Phasensprung, b.) Zeile aus Phasendifferenzbild, c.) Zeile nach Glättung durch Median Filter, d.) Mit Median Filter lateral geglättetes Phasendifferenzbild, e.) integrierte Zeile, f.) korrigiertes Phasendifferenzbild, g.) eine Zeile des korrigierten Phasendifferenzbildes, h.) Zeile des korrigierten Phasendifferenzbildes nach Median Filterung, i.) Entfaltetes Phasendifferenzbild nach Glättung

Bewegungen ausreichend genau korrigiert werden (Abb. 3.18 c. und d.), um eine Auswertung der *In-vivo*-Datensätze zu ermöglichen.

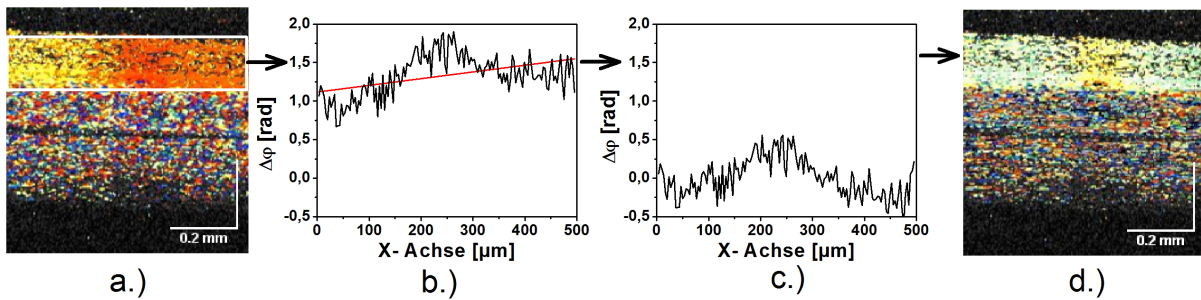


Abbildung 3.18 – Korrektur globaler Bewegungen bei *In-vivo*-Messungen am Kaninchenauge. a.) Unkorrigiertes Phasendifferenzbild b.) Gemittelte Phase über die Dicke der Retina (weißes Quadrat) und lineare Ausgleichsgrade. c.) Korrigierte gemittelte Phasendifferenz. d.) Korrigiertes Phasendifferenzbild.

3.2.4 Speckle-Fluktuationen

Eine Bewegung im Gewebe kann durch Analyse der Speckle-Fluktuationen zeitlich nachfolgender B-Scans dargestellt werden. Die einfachste Methode ist dabei die Berechnung der Standardabweichung über alle B-Scans einer Zeitserie. Bewegt sich das Gewebe nicht, so sind die Specklemuster in der Mittelwertbildung gut zu erkennen, die Standardabweichung wird nur vom Phasen- und Amplitudenrauschen dominiert. Umso größer eine lokale Bewegung ist, desto stärker verschieben sich die Speckle und desto größer wird die Standardabweichung für diesen Bereich. In Abbildung 3.19 sind dazu beispielhaft Mittelwerte und Standardabweichung einer B-Scan Serie *ex vivo* über einen Zeitraum von 130 ms vor und während der Bestrahlung dargestellt. Vor der Bestrahlung sind in einigen Schichten der Retina leichte Specklefluktuationen vom umliegenden Gewebe unterscheidbar, die im Mittelwert nicht zu erkennen sind. Mit dem Einsetzen der Bestrahlung verschwindet das Specklemuster in der Mittelwertbildung, in der Standardabweichung kann hingegen, bei geeigneter Grauwertskalierung, deutlich das Koagulationsareal sichtbar gemacht werden. Da diese Methode sehr bewegungsempfindlich ist, müssen für eine *In-vivo*-Bildgebung globale Bewegungen sehr genau korrigiert werden.

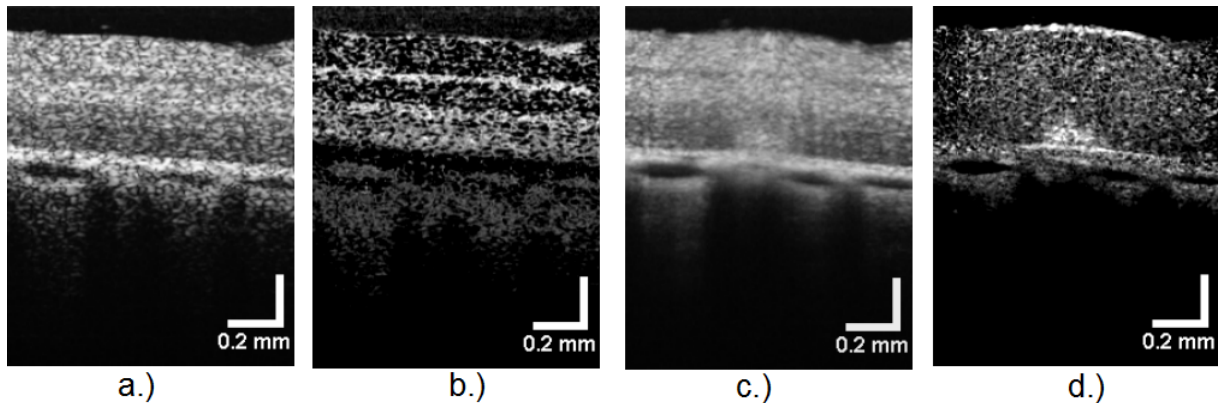


Abbildung 3.19 – a.) Mittelwert aller B-Scans vor Bestrahlungsbeginn über einen Zeitraum von 130 ms. b.) Standardabweichung aller B-Scans vor Bestrahlungsbeginn über einen Zeitraum von 130 ms. c.) Mittelwert während der Bestrahlung über einen Zeitraum von 130 ms. d.) Standardabweichung während der Bestrahlung über einen Zeitraum von 130 ms.

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 *Ex-vivo*-Experimente an Schweineaugen

Der postmortale Zersetzungsprozess des Auges beginnt innerhalb von Minuten. Bereits nach wenigen Stunden wird die Linse trüb, was eine OCT Messung mit ausreichender Bildqualität erschwert. Die Augen wurden deshalb direkt morgens vor der Messung vom Schlachthaus (Versandschlachtereier Hans Schacht GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) abgeholt und mit einem gekühlten Behältnis zum Institut transportiert. Durch das Entfernen der Gewebereste und die gekühlte Aufbewahrung in dem Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) konnte der Zersetzungsprozess soweit verlangsamt werden, dass Messungen bis zu 6 Stunden nach Entnahme der Augen möglich waren. Die Augen wurden direkt vor jeder Messreihe aus dem Nährmedium entnommen und in den Augenhalter eingespannt (Abbildung 3.20). Als Kontaktflüssigkeit zwischen Auge und Kontaktglas diente dazu Methocel 2% (OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland).

Durch die Spaltlampe konnte der Behandlungslaser mit Hilfe eines Pilotlasers auf die richtige Fokusebene eingestellt und mit Verschieben der Referenzlänge das OCT-Bild dementsprechend angepasst werden. Eine Nachfokussierung des OCT-Systems mit der 60 mm-Linse sowie eine Optimierung der Polarisationsachsen mit den eingebauten Polarisationsstellern war nach jedem Auge und zum Teil auch zwischen den Messungen einer Messreihe nötig, um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Zur Feinabstimmung der

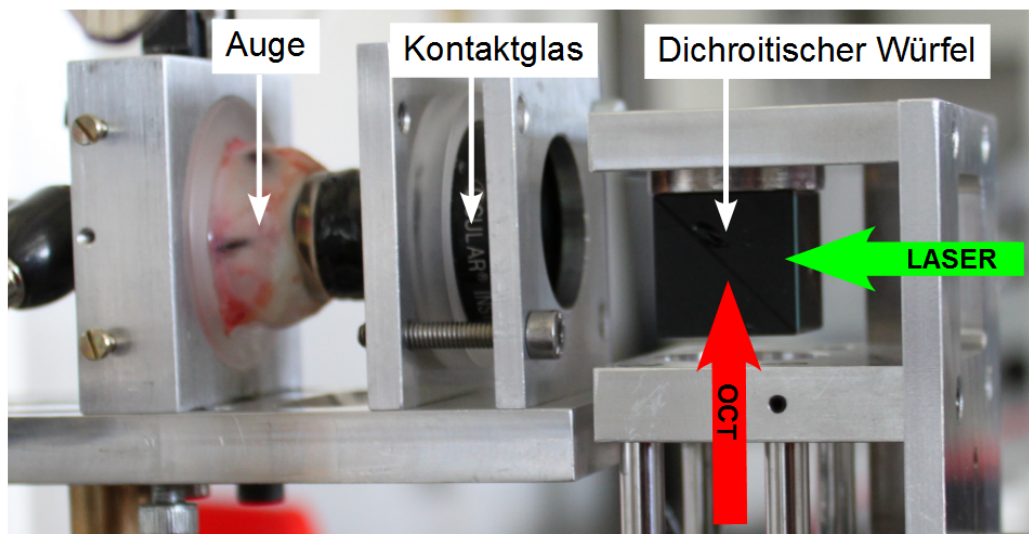


Abbildung 3.20 – Augenhalter mit eingespanntem enukleierten Schweineauge am OCT-Applikator der Spaltlampe

Überlagerung zwischen dem Laserstrahlengang und dem OCT-Strahlengang war es notwendig, eine starke Testläsion zu setzen. Durch einen volumetrischen Scan konnte das Zentrum der Koagulation bestimmt und der Mittelpunkt der Scanner dementsprechend korrigiert werden.

In dieser Arbeit wurden 12 Augen mit verschiedenen Fleckgrößen zwischen $50\mu\text{m}$ und $200\mu\text{m}$ und unterschiedlichen Bestrahlungsdauern von 50ms und 400ms bestrahlt. Aus den Phasendifferenzen konnten die Geschwindigkeiten und durch Integration über die Zeit auch die Verschiebung des Gewebes errechnet und mit den zeitgleich durch die Optoakustik aufgenommenen Temperaturanstiegen verglichen werden.

3.3.1.1 Histologische Präparation

Für den Vergleich der OCT-Bildgebung mit histologischen Präparaten wurden insgesamt vier Augen mit einem quadratischen Raster aus gut sichtbaren Markerläsionen versehen. In die Mitte des Quadrats konnten anschließend jeweils neun Läsionen mit abnehmender Laserleistung appliziert werden. Der Fleckdurchmesser sowie die Bestrahlungsdauer wurden konstant bei $200\mu\text{m}$ und 400ms gehalten. Direkt nach der Behandlung der Augen erfolgte eine vierstündige Vorfixierung des kompletten Auges mit einer Monti-Graziadei-Lösung (Anhang: A.1). Der Bulbus wurde nach der Vorfixierung geöffnet und der Glaskörper entfernt. Anschließend erfolgt die eigentliche viertägige Fixierung des Auges, erneut mit der Monti-Graziadei-Lösung. Nach der Fixierung konnte das bestrahl-

te Areal, welches durch die Markerläsionen gut sichtbar war, ausgeschnitten und eingebettet werden. Dazu wurden das Gewebe zuerst durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 30% bis 100% mit einer 10%igen Schrittweite entwässert und anschließend in einem 1:1 Gemisch aus Isopropylalkohol (100%) und Paraplast bei 58°C für zwei Stunden eingelegt. Für die abschließende Einbettung muss das Isopropylalkohol-Intermedium komplett aus dem Gewebe entfernt werden. Dazu wurde das Gewebe dreimal für jeweils vierundzwanzig Stunden in die reine flüssige Paraplast-Masse eingelegt. Anschließend wurde das Gewebe in Blöckchen ausgegossen und abgekühlt. Die Schnitte wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingefärbt und anschließend geschnitten. Zwischen den Läsionsreihen betrug der Schnittabstand dabei zwischen 40 µm und 60 µm. Im Bereich der Läsionen wurde eine Schnittserie ohne Abstand, mit einer Schrittdicke von 5 µm, angefertigt.

3.3.2 *In-vivo*-Experimente am Kaninchenauge

Für die ersten *In-vivo*-Versuche am Kaninchenauge wurde die Spaltlampe zusammen mit dem Tierhalter auf einen gemeinsamen optischen Tisch montiert. Die so erzeugte Vibrationsdämpfung sollte zusätzliche globale Bewegungsartefakte seitens des Aufbaus oder des Fußbodens minimieren. In Abbildung 3.21 ist die Ankopplung von OCT und Bestrahlungslaser an das Kaninchenauge gezeigt. Das Kontaktglas wird mit einem Halter an dem Stangensystem des Tierhalters befestigt, mit dem auch die Grey Chinchilla-Kaninchen (Charles River Laboratories International, Inc.) fixiert wurden. Als Betäubungsmittel wurde eine Kombination aus einer 10%igen Ketamin-Lösung mit einer Dosierung von 0,5 ml/kg und einer 2%igen Xylazin-Lösung mit einer Dosierung von 0,2 ml/kg verwendet. Die Versuchsdauer wurde auf insgesamt 2 bis 3 Stunden beschränkt. Der Fleckdurchmesser betrug bei allen Tierversuchen 200 µm, wohingegen die Bestrahlungszeit und der Strahlungsfluss variabel verändert wurden. Der Tierversuch wurde unter der Nummer V312-72241.121-11 genehmigt.

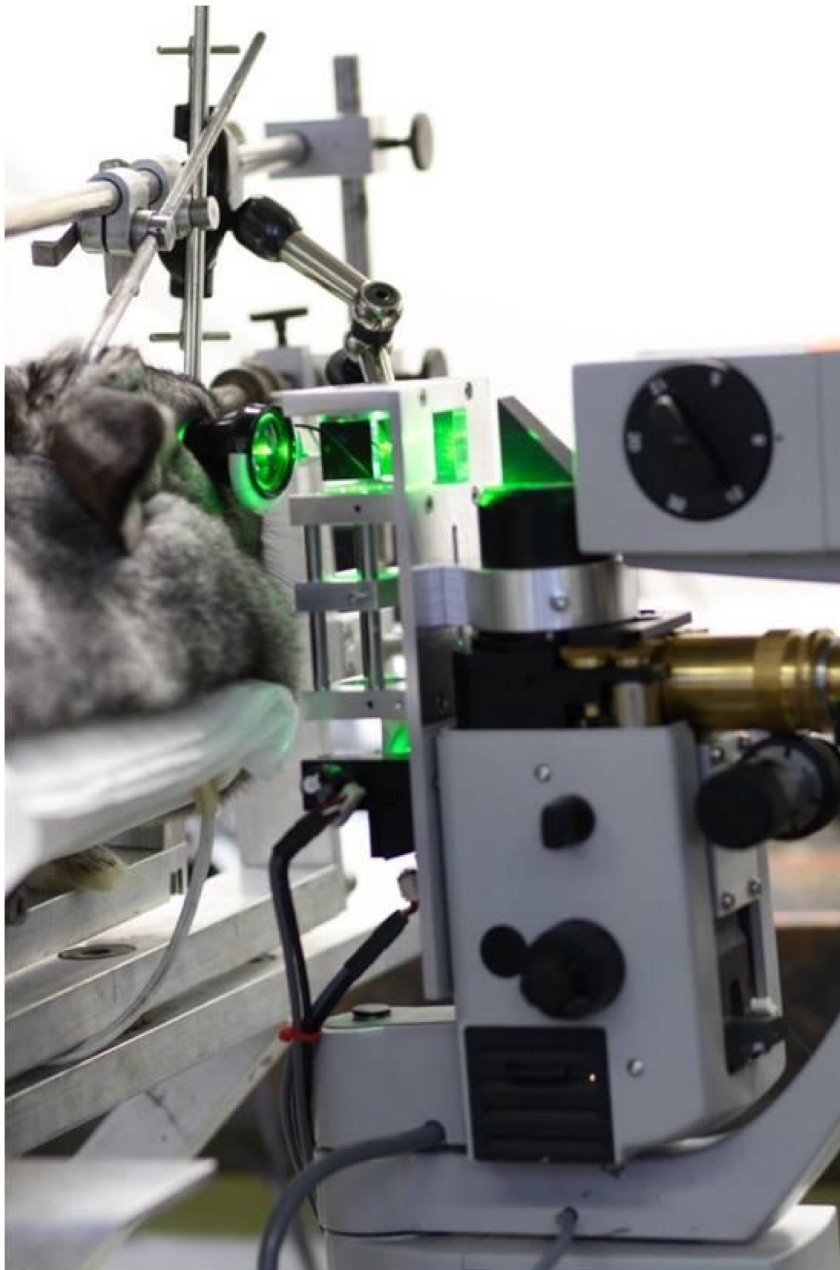


Abbildung 3.21 – Tierversuchshalter mit Grey Chinchilla-Kaninchen und der OCT-Spaltlampe

4 Ergebnisse

Die Darstellbarkeit von thermisch induzierten Gewebeveränderung durch OCT wurde *ex vivo* an enukleierten Augen des Schweins, die in ihrer Morphologie der des menschlichen Auges nahe kommen, und *in vivo* an anästhesierten Kaninchen untersucht.

4.1 *Ex-vivo*-Messungen am Schweineauge

Zur Messung der Gewebeveränderung während der Photokoagulationen der Retina wurden Bestrahlungsserien an 12 enukleierten Schweineaugen mit Fleckdurchmessern von 50 μm bis 200 μm und Bestrahlungszeiten von 50 ms bis 400 ms durchgeführt (Tabelle 4.1). Für jede Parameterkombination wurde die applizierte Leistung zwischen 5 mW und 130 mW in Abstufungen von 4,5 mW variiert. Änderung von Phase und Intensität der OCT-Bilder in den bestrahlten Arealen wurde mit dem makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Fundusbild und mit optoakustisch gemessenen Temperaturen korreliert.

Augenparameter		
Auge Nr.	Pulslänge [ms]	Fleckgröße [μm]
1	400	200
2	400	100
3	400	50
4	200	200
5	200	100
6	200	50
7	100	200
8	100	100
9	100	50
10	50	200
11	50	100
12	50	50

Tabelle 4.1 – Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeit der Bestrahlungsserien an den enukleierten Augen.

4.1.1 Fundusbild nach Bestrahlung

Die Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch auf der linken Seite das Fundusbild von Auge Nummer 1 mit 31 bestrahlten Arealen. Die Fleckgröße betrug in diesem Beispiel $200\mu\text{m}$, die Bestrahlungsdauer 400ms . Die einzelnen bestrahlten Flächen sind nummeriert und in der rechts stehenden Tabelle mit der zugehörigen Bestrahlungsstärke und der optoakustisch ermittelten maximalen Temperaturerhöhung aufgelistet. In der medizinischen Anwendung werden die Laserparameter für die Koagulationsbehandlung bisher nach Grad der Weißfärbung des koagulierten Areals bestimmt. Deshalb wurde auch hier eine Bewertung der einzelnen Bestrahlungsflecke nach ihrer Sichtbarkeit im Fundusbild durchgeführt. Eine gut sichtbare Koagulation sollte einen klar definierten Rand haben und sich deutlich von dem umliegenden Gewebe abgrenzen. Leicht sichtbare Koagulationen erscheinen etwas diffus ohne definiertem Rand, wohingegen Läsionen als nicht sichtbar klassifiziert wurden, wenn sie nicht vom Hintergrund unterscheidbar waren.

Die Abbildung 4.2 zeigt den optoakustisch gemessenen Temperaturverlauf für den Bestrahlungsfleck Nummer 26. Gut zu erkennen sind der Beginn sowie das Ende der Bestrahlungszeit. Beide Zeitpunkte sind durch einen starken Anstieg bzw. Abfall in der Temperatur gekennzeichnet. Die gemessenen Temperaturen sind die Mittelwerte der im Gewebe auftretenden Temperaturen über den Fleckdurchmesser der Laserbestrahlung. Für die Tabelle in Abbildung 4.1 wurden die jeweils zehn vorletzten Temperaturwerte, entsprechend 12ms Bestrahlungszeit, vor dem Ausschalten des Bestrahlungslasers gemittelt und als ΔT_{max} angegeben.

Bei einer Bestrahlungsstärke von 414W/cm^2 bis 344W/cm^2 sind die Koagulationen gut sichtbar. Ab einem Wert von 331W/cm^2 bis 221W/cm^2 gehen sie in den Bereich leicht sichtbarer Koagulationen über und ab einer Bestrahlungsstärke von 208W/cm^2 sind keine Gewebeveränderungen mehr sichtbar. Im oberen Bereich des bestrahlten Feldes fallen die Koagulationseffekte stärker aus. Die Bestrahlungsflecke Nr. 12 und Nr. 13 sowie Nr. 21, Nr. 22 und Nr. 23 sind höher klassifiziert als tiefer liegende Bestrahlungsflecke mit ähnlicher Bestrahlungsstärke. Dies kann durch eine stärkere Pigmentierung oder einen kleineren Fleckdurchmesser aufgrund einer Variation der Abbildungsgeometrie erklärt werden. Beides führt auch bei der Photokoagulationstherapie der Retina zu einer Variation der Behandlungsergebnisse. In Abbildung 4.3 ist die Temperaturerhöhung am Ende der Bestrahlung gegen die Bestrahlungsstärke für die 12, mit unterschiedlichen Bestrahlungszeiten und Fleckgrößen durchgeführten Messreihen zusammenfassend abgebildet. Die unterschiedlichen farbigen Markierungen mit blauen, schwarzen und roten Daten-

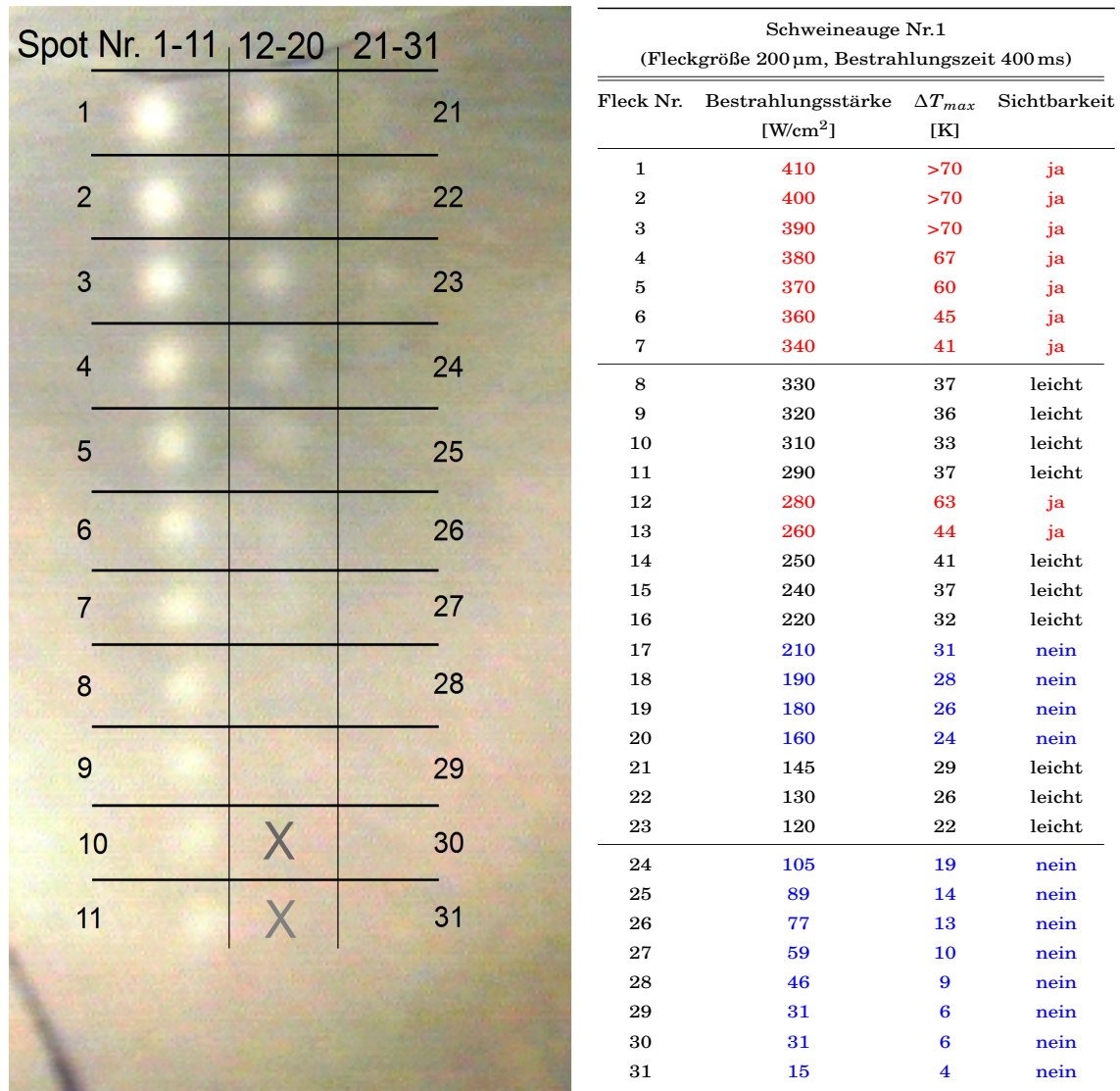


Abbildung 4.1 – Fundusbild des enukleierten Schweineauges Nummer 1 nach der Laserkoagulation mit verschiedenen Bestrahlungsstärken (linke Abbildung). Die Fleckgröße betrug 200 µm, die Bestrahlungsdauer 400 ms. Die Bestrahlungsstärke E , optoakustisch bestimmte Maximaltemperatur ΔT_{max} sowie die Sichtbarkeit der Läsionen sind in der Tabelle auf der rechten Seite gegenübergestellt. Gut sichtbare Läsionen sind in rot markiert, leicht sichtbare Läsionen in schwarz und unsichtbare in blau.

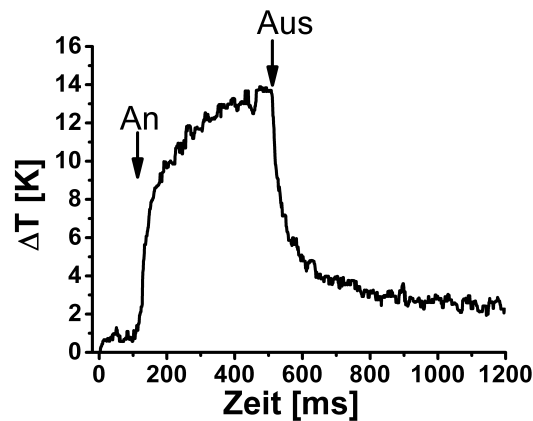


Abbildung 4.2 – Optoakustisch bestimmte über den Bestrahlungsfleck gemittelte Temperaturerhöhung in der Ebene des RPE während der Laserbestrahlung. Der Beginn und das Ende der Bestrahlungszeit ist durch einen starken Anstieg bzw. Abfall im Temperaturverlauf gut erkennbar.

punkten zeigt die Einordnung in nicht sichtbare, leicht sichtbare und gut sichtbare Gewebeeränderung. Die farbliche Hintergrundmarkierung zeigt die Temperaturbereiche, in denen nicht sichtbare, leicht und gut sichtbare Läsionen auftreten. Temperaturwerte, bei denen es nicht möglich war die Temperaturerhöhung mittels Optoakustik zu bestimmen, sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die Temperaturerhöhung liegt hier oberhalb von 70 K. Alle Augen weisen im wesentlichen einen linearen Anstieg der Temperatur mit steigender Bestrahlungsstärke auf. Ab 20 K Temperaturerhöhung werden die Koagulationen leicht sichtbar ab 30 – 40 K werden sie gut sichtbar.

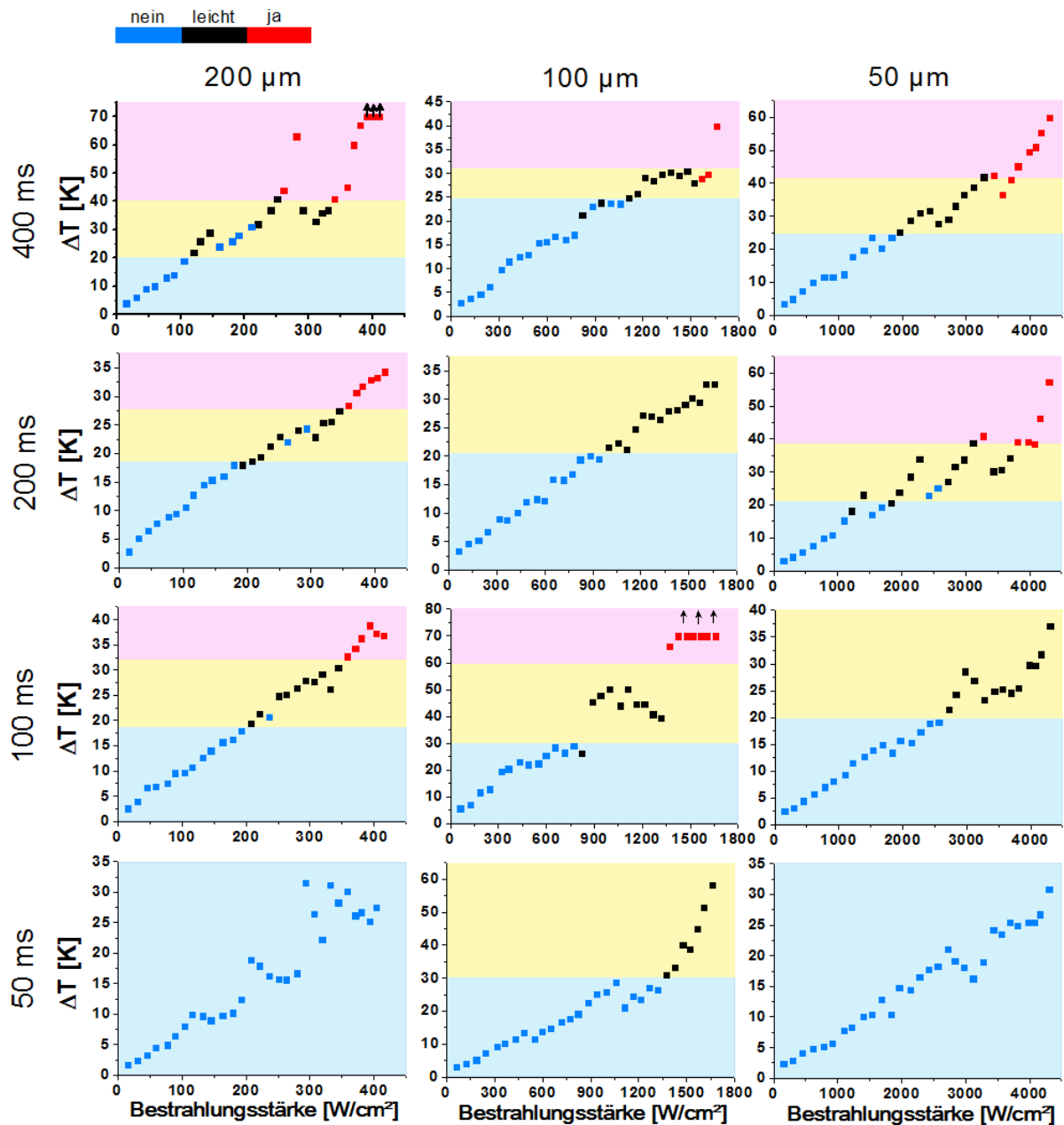


Abbildung 4.3 – Maximale Temperaturerhöhung ΔT_{max} am Ende der Bestrahlung in Abhängigkeit zur Bestrahlungsstärke. Die unterschiedliche farbige Markierung der Datenpunkte in blauer, schwarzer und roter Farbe zeigt die Klassifizierung der Läsionen in nicht sichtbare, leicht sichtbare und gut sichtbare Gewebeeränderung. Der farbige Hintergrund zeigt die zugeordneten Temperaturbereiche für die Sichtbarkeit der Koagulationen. Schwarze Pfeile markieren nicht mehr messbare Temperaturerhöhungen, die oberhalb von 70 K liegen.

4.1.2 Änderung der Gewebestreuung

Mit OCT wurde während und nach der Laserbestrahlung, die mit der Weißfärbung der Retina verbundenen Zunahme Gewebestreuung, mit 1,2ms Zeitauflösung quantitativ dargestellt.

Die Bildserie 4.4 zeigt als Ausschnitt aus einem Hochgeschwindigkeitsfilm mit 860 Bildern pro Sekunde die Veränderungen in der Gewebestreuung während der Bestrahlung. Die Fleckgröße betrug bei dieser Messung 200 μm , die Pulslänge 100 ms und die Bestrahlungsstärke 410 W/cm^2 . Der Bestrahlungslaser beginnt zum Zeitpunkt 0ms und endet nach 100 ms. Es wurde nur jedes dritte Bild der Serie dargestellt. Innerhalb der ersten 14ms nach Beginn der Bestrahlung ist keine signifikante Änderung der Streuung auszumachen. Danach nimmt die Streuung, in dem ansonsten schwach streuenden Bereich zu und wird als halbkreisförmige Veränderung sichtbar. Ausgehend vom RPE nimmt die Streuung mit fortschreitender Zeitdauer axial wie auch lateral zu und bleibt auch nach Beendigung der Bestrahlungsdauer erhalten. Eine genaue Analyse zeigt die lokale Bewegung des Gewebes während der Photokoagulation in der Zeitserie der B-Scans als Verschiebung der Speckle. In Abbildung 4.5 ist die in der Zeitserie sichtbare lokale Verschiebungsrichtung der Speckle mit Vektoren dargestellt. Das Gewebe bewegt sich während der Bestrahlung von außerhalb des Bestrahlungsflecks, parallel zum RPE und zentral zum Koagulationszentrum hin und in dessen Mitte in axialer Richtung aufwärts.

In Abbildung 4.6 ist die mit OCT gemessene Streuung der Retina im Bestrahlungsfleck für die Bestrahlungen im Bereich von 89 W/cm^2 bis 410 W/cm^2 dargestellt. Es ist jeweils die OCT-Aufnahme vor (linke Spalte) und nach (rechte Spalte) der Bestrahlung abgebildet. Um eine Veränderung der Streueigenschaften an der Retina während der Bestrahlung sichtbar zu machen, wurde über alle A-Scans im Bestrahlungsfleck gemittelt und die so erhaltenen mittleren A-Scans über die Zeit aufgetragen (M-Scans in der mittlere Spalte). In den Zeitserien ist der An- und Ausschaltzeitpunkten der Laserbestrahlung durch weiße Pfeile markierten.

Im Fundusbild nicht sichtbaren Laserexpositionen mit einer Bestrahlungsstärke von bis zu 89 W/cm^2 zeigen keine Änderung im Streuverhalten der Retina. Der B-Scan vor und nach der Bestrahlung erscheint identisch und im Zeitverlauf stellen sich die einzelnen Retinaschichten beziehungsweise Speckle als homogene durchgezogenen Linien dar. Für den Bereich der im Fundusbild leicht sichtbaren Koagulationen mit Bestrahlungsstärken von 120 W/cm^2 bis 210 W/cm^2 zeigen die M-Scans Veränderungen der Speckle, die

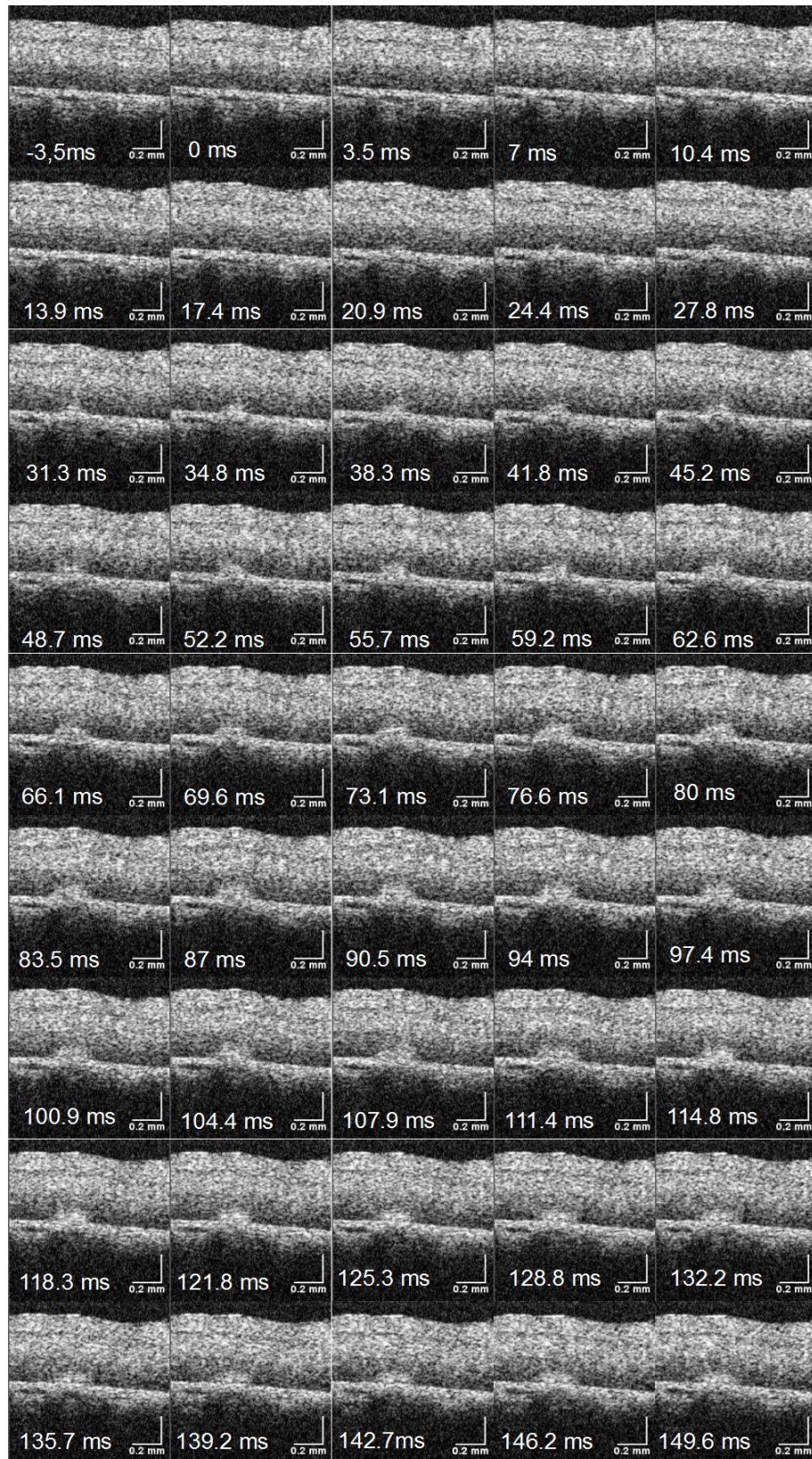


Abbildung 4.4 – Zeitserie von B-Scans, aufgenommen während einer Koagulation mit einer Fleckgröße von 200 μm , einer Bestrahlungszeit von 100 ms (Auge 7) und einer Bestrahlungsstärke von 410 W/cm^2 . Die Bestrahlung beginnt zum Zeitpunkt 0 ms und endet nach 100 ms.

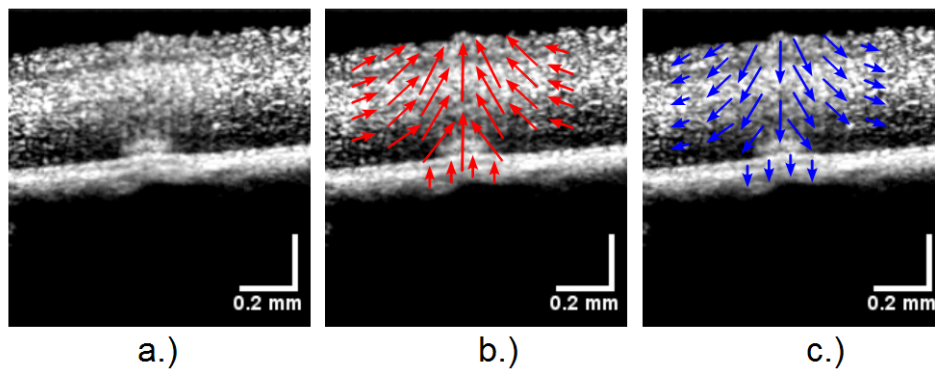


Abbildung 4.5 – Schematische Darstellung der Bewegung im Gewebe während der Photokoagulation (Bilder aus der Zeitserie in Abb. 4.4). a.) Mittelwert des OCT-Signals aller B-Scans während der Photokoagulation. b.) In der Zeitserie erkennbare Bewegung während der Bestrahlung. c.) Bewegung nach Beendigung der Bestrahlung.

nach Einschaltung des Bestrahlungslasers sichtbar werden. Ab 210 W/cm^2 nimmt das OCT-Signal oberhalb des RPE zu. Diese Veränderungen stellen sich dabei nicht direkt beim Einschalten des Bestrahlungslasers, sondern erst 200 ms nach dem Beginn der Bestrahlung ein. Bei Bestrahlungsstärken von 240 W/cm^2 bis 320 W/cm^2 sind Retinaveränderungen im Bestrahlungsverlauf deutlich auszumachen. Die durch Speckle entstandenen Linien verschieben sich direkt nach dem Einschalten des Lasers. In dem ansonsten streuarmeren Bereich zwischen dem RPE und den Außensegment der Netzhaut nimmt die Streuung ebenfalls sofort zu und bleibt permanent erhöht, wie in den ganz rechten Bildern deutlich zu erkennen ist. Die bei mittleren Bestrahlungsstärken beschriebene Streuzunahme, sowie der Verschiebung von Specklen, setzt sich auch in den stärkeren Koagulationen fort. Die im Fundus gut sichtbaren Koagulationen in dem Bereich von 340 W/cm^2 bis 410 W/cm^2 zeigen im OCT eine Veränderung direkt nach dem Einschalten des Bestrahlungslasers, gut sichtbar an der nahezu sofortigen Zunahme der Streuung. Die laterale Ausdehnung der in der OCT sichtbaren Zunahme der Streuung nimmt mit der Bestrahlungsstärke zu. Ab einer Bestrahlungsstärke von 240 W/cm^2 verschiebt sich mit Beginn der Bestrahlung und der Zunahme der Streuung zudem die Retinaoberfläche nach oben.

Für die weitergehende Analyse der OCT-Signale während der Photokoagulation wurden, wie in Abbildung 4.7 dargestellt, mittleren Zunahme der Streuung ΔS_{PRS} in einem Bereich von $100 \mu\text{m}$ oberhalb des RPEs (schwarz) sowie die Oberflächenverschiebung der Retina Δz_s (rot) bestimmt.

Solange unterhalb einer Bestrahlungsstärke von 89 W/cm^2 im Fundus keine Veränderun-

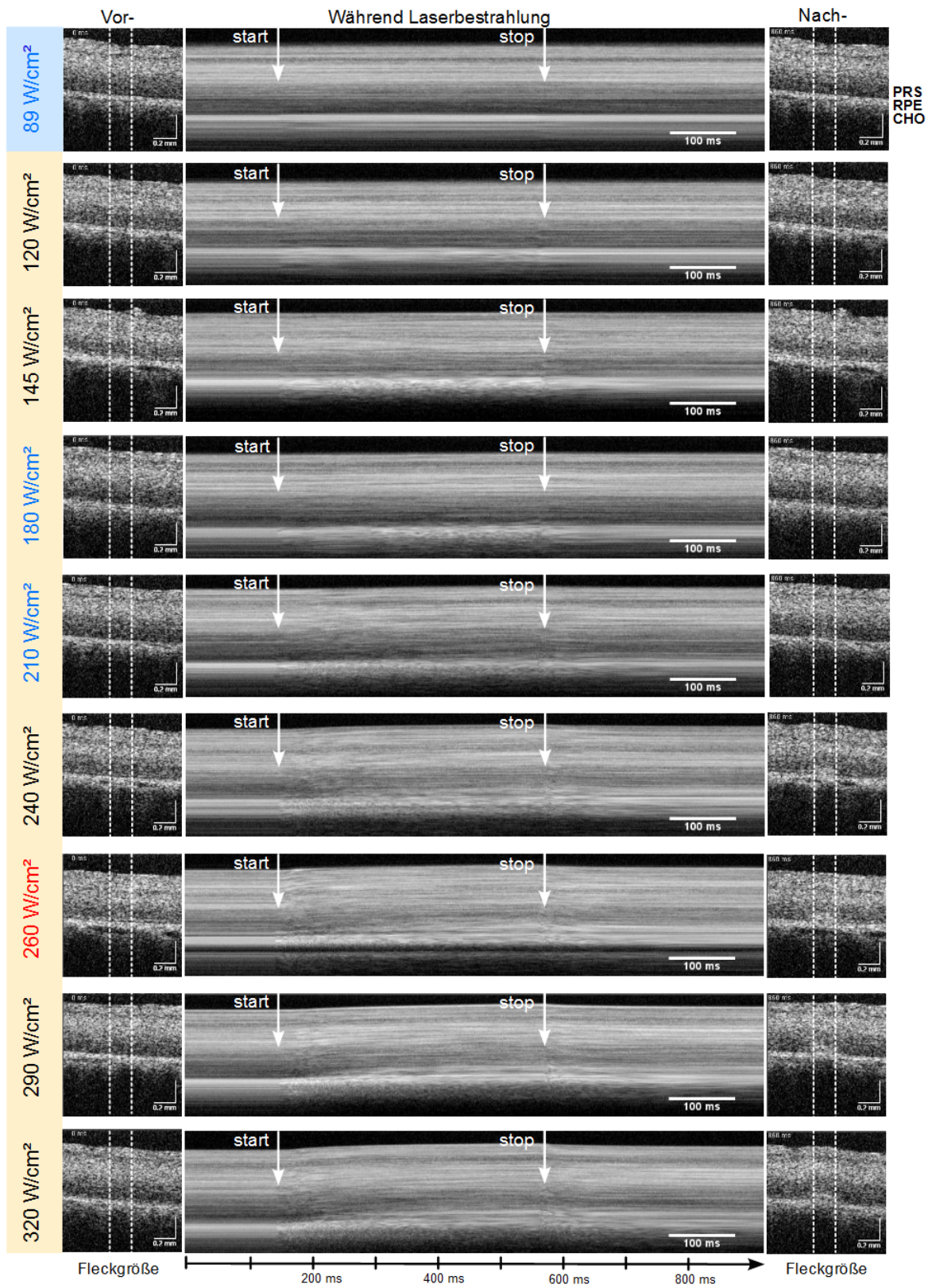


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

4. Ergebnisse

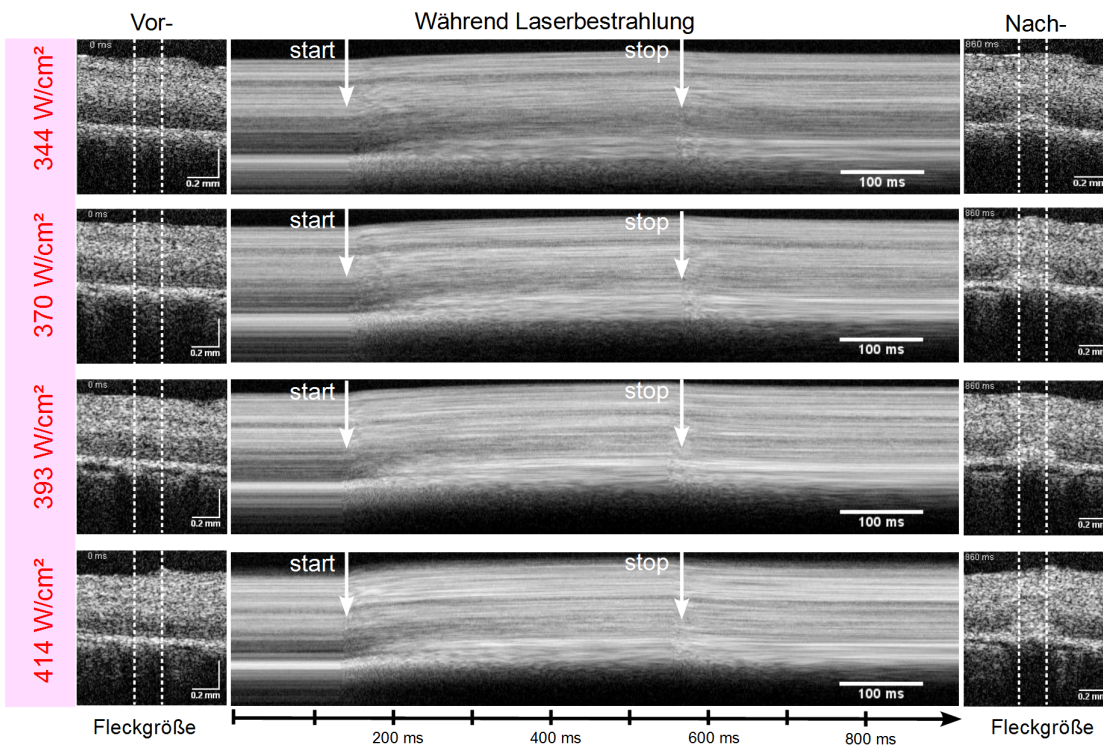


Abbildung 4.6 – OCT-Bild vor (links) und nach (rechts) der Bestrahlung für die Bestrahlungsstärken von 89 W/cm² bis 410 W/cm². Der Bereich der Laserexposition ist mit zwei vertikalen Linien markiert. Durch das laterale Mitteln über den bestrahlten Bereich konnte ein M-Scan (gemittelter A-Scan über die Zeit) berechnet werden (mitte). Der Beginn und das Ende der Bestrahlung sind durch zwei weiße Pfeile markiert. Retinale Strukturen sind markiert als PRS: Photorezeptorschicht, RPE: Retinales Pigmentepithelium, CHO: Choroidea.

gen sichtbar sind, ergeben sich weder eine signifikante Zunahme in der Streuung noch eine Verschiebung der Oberfläche (Abbildung 4.8). Die Genauigkeit der Auswertung wird durch das Untergrundrauschen des OCT-Signals auf 1 dB bzw. 5 µm limitiert. Ab einer Bestrahlungsstärke von 210 W/cm² ist eine kontinuierliche Signalzunahme von mehr als 3 dB und eine Verschiebung der Oberflächenposition um mehr als 10 µm zu beobachten. Für die Koagulationen in dem Bereich von 240 W/cm² bis 320 W/cm² sind bereits in den M-Scans Aufwölbungen der Retina sichtbar, die sich nach der Abschaltung des Lasers wieder in Richtung der Ursprungsposition zurückbewegen. Die quantitative Auswertung der Position der Retinaoberfläche in Abbildung 4.8 zeigt, dass sich nach dem Einschalten des Bestrahlungslasers ein kontinuierliche Verschiebungen bis zu einem Maximalwert von 25 µm bis 35 µm ergibt. Der maximale Wert der Verschiebung wird dabei kurz vor dem Abschalten des Lasers erreicht. Danach bewegt sich die Oberfläche zurück, ohne den Ausgangswert wieder zu erreichen. Im Gegensatz zur Gewebewegung ist die Zu-

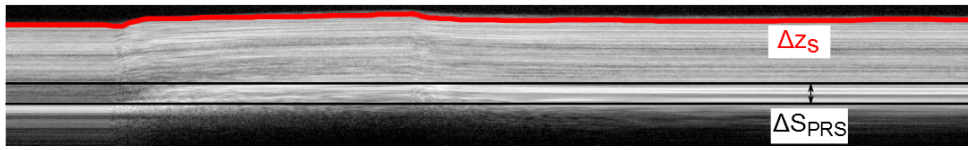


Abbildung 4.7 – Quantifizierung der Oberflächenverschiebung Δz_s (rot) sowie der mittleren Streuzunahme ΔS_{PRS} über einen Bereich von $100\ \mu\text{m}$ in der Photorezeptorschicht oberhalb des RPEs (schwarz)

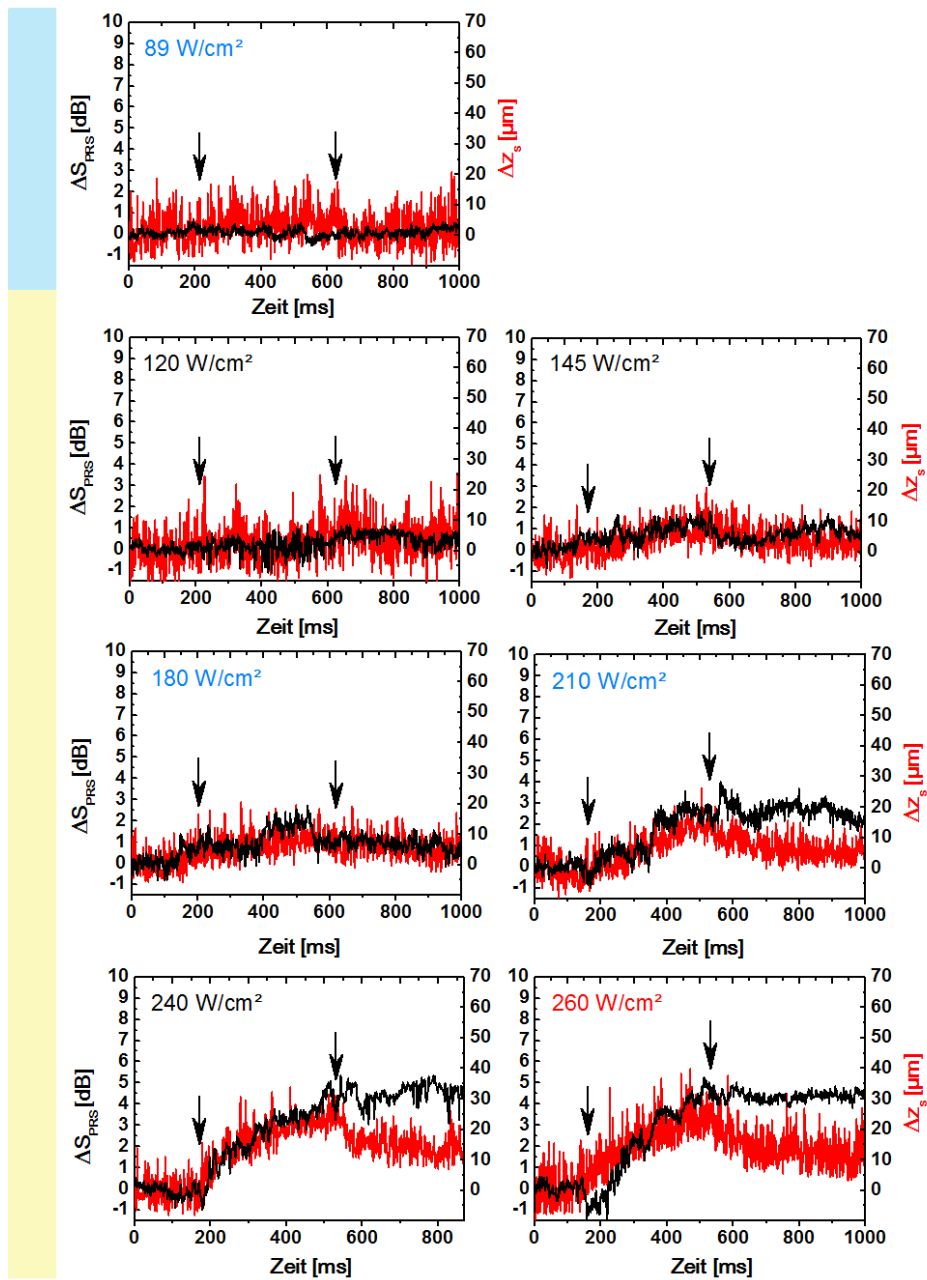


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

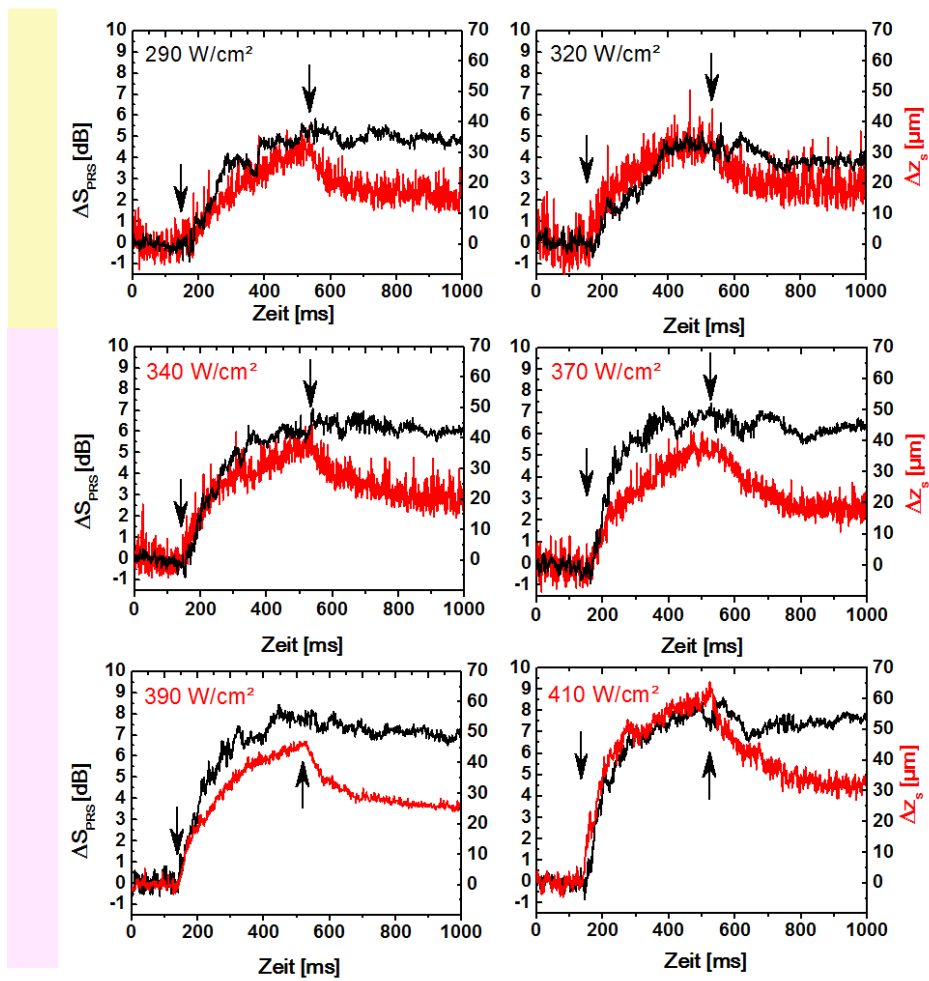


Abbildung 4.8 – Zunahme der Streuung in der Photorezeptorschicht ΔS_{PRS} (schwarz) und Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s (rot) während der Bestrahlung. Der Anschlag- und Abschaltzeitpunkt des Bestrahlungslasers sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die farbige Markierung auf der linken Seite gibt Zuordnung zu den drei Sichtbarkeitsbereichen der Laserläsionen an.

nahme der Streuung, die bei den schwach sichtbaren Läsionen zu einer Signalzunahme von ca. 5 dB führt, nicht reversibel. Für die im Fundusbild gut sichtbaren Koagulationen mit einer Bestrahlungsstärke von 344 W/cm^2 bis 414 W/cm^2 ist erkennbar, dass sich die Oberfläche mit zunehmender Bestrahlungsstärke immer mehr verschiebt. Liegt die maximale Verschiebung bei einer Bestrahlungsstärke von 344 W/cm^2 noch bei in etwa $40 \mu\text{m}$, so steigt sie bei 414 W/cm^2 auf bis zu $60 \mu\text{m}$ an. Äquivalentes gilt für das Streuverhalten. Dieses steigt von 6 dB auf einen Wert von 8 dB. Die Oberflächenveränderung sowie die Streuänderung nehmen in etwa gleicher Weise zu.

Signalzunahme und Gewebeverschiebung am Ende der Bestrahlung wurden für alle Laserexpositionen berechnet und in Abbildung 4.9 getrennt für die verwendeten Bestrahlungszeiten und Fleckdurchmesser gegen die Bestrahlung aufgetragen. Bei festen Fleckdurchmesser sind für kürzere Expositionszeiten höhere Bestrahlungsstärken notwendig, um ähnliche Veränderungen der Streuung oder eine Oberflächenverschiebung zu erzeugen. Die notwendigen Bestrahlungen sowie die Temperaturerhöhungen für 1 dB Signalzunahme E_{th}^{SPRS} , bzw. $5 \mu\text{m}$ Verschiebung $E_{th}^{\Delta z}$ sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt. Generell erhöht sich die notwendige Bestrahlungsstärke wie erwartet mit kleinerem Bestrahlungsfleck und kürzer Bestrahlungszeit. Gleichzeitig nehmen auch die Schwankungen der Messwerte zu. Für $50 \mu\text{m}$ und 50 ms wird eine Bestimmung des Ausmaß der Gewebeveränderung durch OCT sehr unsicher.

Eine von der Pigmentierung des Gewebes unabhängige Korrelation ergibt sich zwischen Zunahme des OCT-Signals bzw. der Verschiebung der Retinaoberfläche und der optoakustisch gemessenen Temperaturerhöhung, dargestellt in Abbildung 4.10. Unterhalb einer Temperaturerhöhung von $20 \text{ K} - 35 \text{ K}$ wird für Δz_s^{\max} und ΔS_{PRS}^{\max} im Rahmen der Messgenauigkeit keine Änderung beobachtet. In diesem Temperaturbereich sind im Fundus keine Läsionen sichtbar. Im Bereich schwach sichtbarer Koagulationen steigen Δz_s^{\max} und ΔS_{PRS}^{\max} weitgehend linear mit zunehmender Temperatur an. Aus der Steigung der überschwelligen Messwerte wurden die spezifische Verschiebung, d.h. Verschiebung je Kelvin Temperaturerhöhung ($\zeta_{th}^{\Delta z}$), und die spezifische Erhöhung der Streuung (ζ_{th}^{SPRS}) errechnet (Tab. 4.2).

4. Ergebnisse

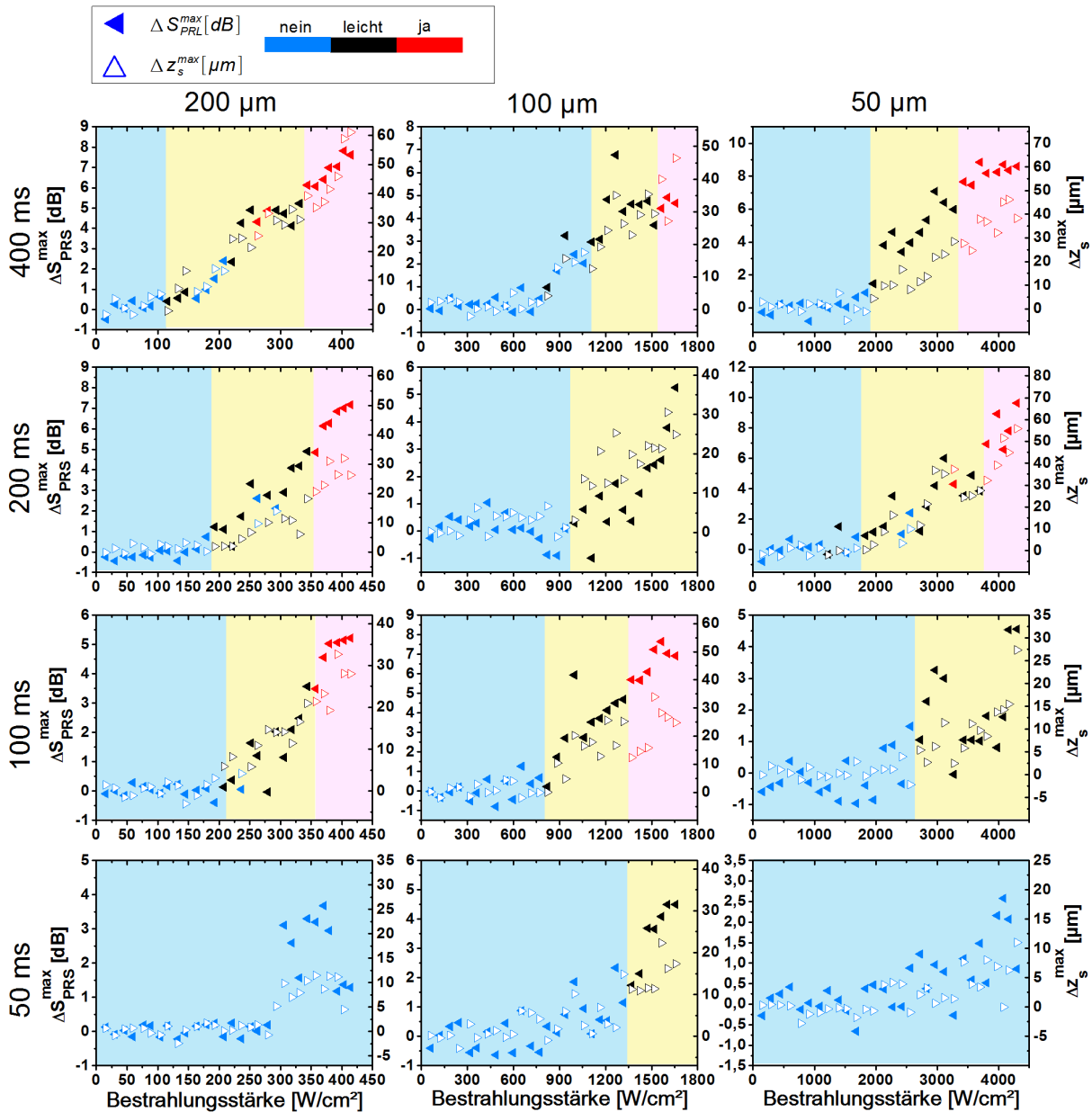


Abbildung 4.9 – Maximale Positionsänderung Δz_s^{max} und maximale Streuänderung ΔS_{PRS}^{max} am Ende der Bestrahlung in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke für die 12 Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeiten von 200 μm - 50 μm sowie 400 ms - 50 ms. Die Hintergrundfarben geben die Parameterbereiche für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

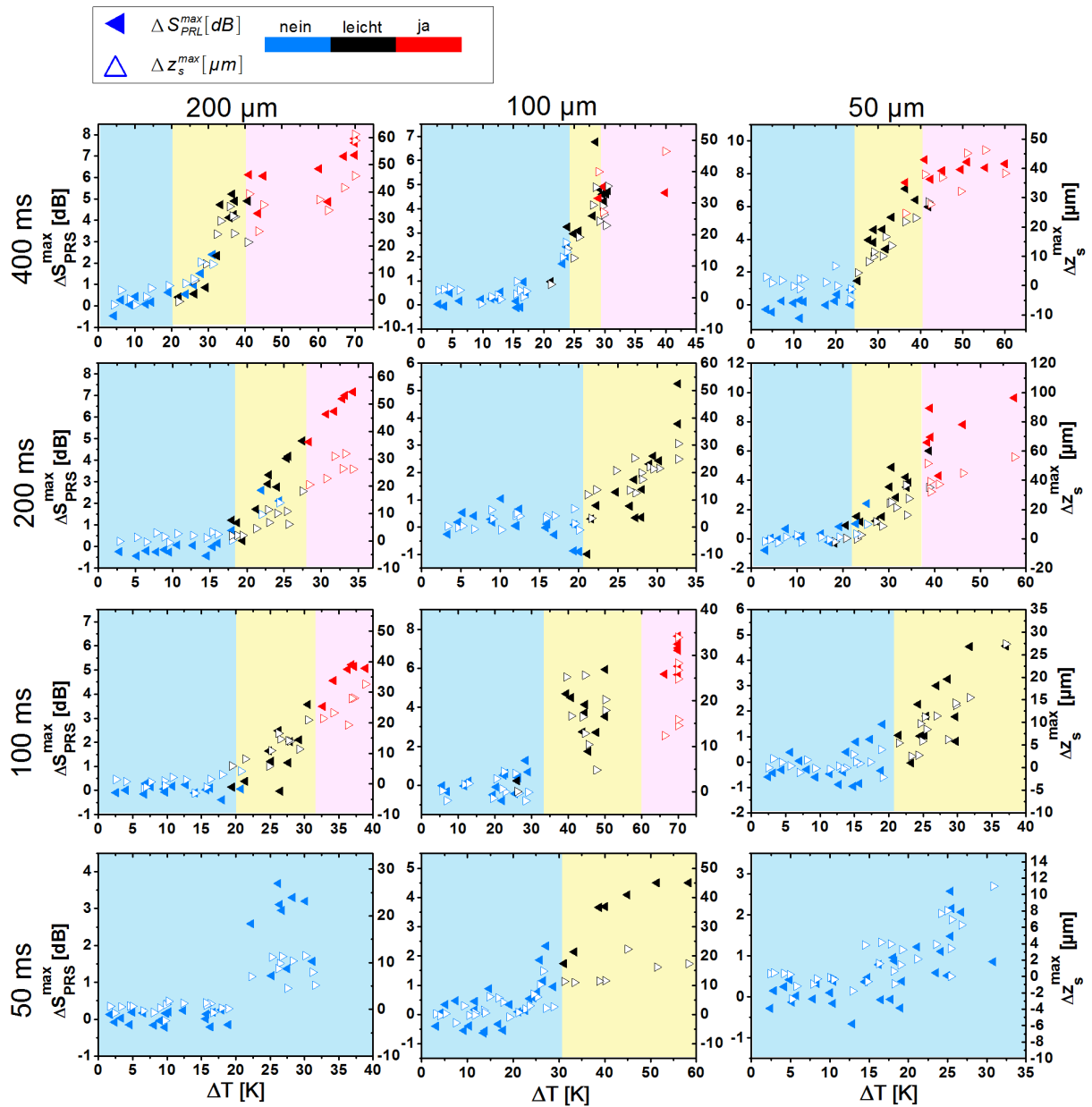


Abbildung 4.10 – Maximale Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s^{max} und maximale Streuänderung ΔS_{PRS}^{max} am Ende der Bestrahlung in Abhängigkeit der maximalen Temperaturerhöhung für die 12 Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeiten von 200 μm - 50 μm sowie 400 ms - 50 ms. Die Hintergrundfarben geben die Parameterbereiche für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

4. Ergebnisse

Bestrahlungszeit [ms]	Fleckdurchmesser [μm]	$\Delta T/E$ K/W/cm ⁻²	$E_{th}^{\Delta z}$ [W/cm ²]	$\Delta T_{th}^{\Delta z}$ [K]	$\zeta_{th}^{\Delta z}$ [nm/K]	E_{th}^{SPRS} [W/cm ²]	ΔT_{th}^{SPRS} [K]	ζ_{th}^{SPRS} [dB/K]
400	200	130	104	19	1230	190	28	190
400	100	19	820	21	1950	885	23	180
400	50	12	1400	20	1390	1960	25	240
200	200	73	251	23	2060	190	18	420
200	100	18	820	19	1610	1163	25	410
200	50	9.9	2130	25	1930	1400	23	280
100	200	88	207	20	1360	257	25	350
100	100	36	885	46	1060	885	28	340
100	50	7.2	2720	21	1400	2560	19	110
50	200	73	292	22	590	305	22	61
50	100	27	714	25	540	996	26	236
50	50	6.3	3430	24	610	3430	24	263

Tabelle 4.2 – Vergleich wichtiger Kenngrößen für verschiedene Bestrahlungszeiten und Fleckdurchmesser. Mittlerer linearer Anstieg der Temperatur mit der Bestrahlungsstärke $\Delta T/E$. Bestrahlungsstärken $E_{th}^{\Delta z}$ und Temperaturen $T_{th}^{\Delta z}$ für eine retinale Verschiebung von mehr als $5\mu\text{m}$ sowie E_{th}^{SPRS} und T_{th}^{SPRS} für eine Signalzunahme über 1 dB. Die spezifischen Verschiebungen $\zeta_{th}^{\Delta z}$ und die spezifische Zunahme der Gewebestreuung ζ_{th}^{SPRS} wurden als Steigungen des linearen Anteils des Anstiegs von Verschiebung und Streuung oberhalb von $E_{th}^{\Delta z}$ und E_{th}^{SPRS} berechnet.

4.1.3 Phasendifferenz

Die Auswertung der Phaseninformation der OCT-Bilder erlaubt eine wesentlich genauere Bestimmung von Gewebeverschiebung als es aus den Amplitudendaten möglich ist. Zudem kann auch tiefenaufgelöst die lokale Verschiebung in Richtung des Messstrahls gemessen werden. Die lokalen Gewebeverschiebungen wurden für alle im vorherigen Kapitel beschriebenen Messungen bestimmt.

Für die exemplarische Darstellung der zeitlichen Entwicklung der Phasendifferenzen über den Bestrahlungsverlauf wurde in Abbildung 4.11 die schon in Abbildung 4.4 gezeigte Messung, mit $200\ \mu\text{m}$ Fleckgröße, $100\ \text{ms}$ Expositionszeit und einer Bestrahlungsstärke $410\ \text{W}/\text{cm}^2$ ausgewählt. Die berechneten Phasendifferenzen wurden dabei farbcodiert mit den B-Scans überlagert. Nach Einschalten des Koagulationslasers bei $0\ \text{ms}$ ist sofort eine positive Phasenänderung zu erkennen, die in den darauf folgenden $7\ \text{ms}$ noch deutlich an Stärke zunimmt. Dies Ausmaß der Bewegung führt zu mehrfachen Phasensprüngen im Signal. Danach bleibt die Phasendifferenz bis zum Ausschalten des Koagulationslasers zum Zeitpunkt $100\ \text{ms}$ in etwa konstant. Beim Ausschalten des Koagulationslasers kontrahiert das Gewebe sofort. Die negative Phasendifferenz ist direkt am Abschaltzeitpunkt sehr groß und enthält demzufolge in den ersten Millisekunden mehrfache Phasensprünge. Bereits $50\ \text{ms}$ nach dem Abschalten ist die negative Phasendifferenz im Koagulationsfleck sehr klein und nur noch schwach vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden.

Um den Effekt der verschiedenen Bestrahlungsstärken auf die gemessenen Phasendifferenzen darzustellen, ist in Abbildung 4.12 das jeweilige Phasendifferenzbild kurz nach Start der Laserbestrahlung, in etwa $100\ \text{ms}$ vor dem Ende der Bestrahlung und beim Ausschalten des Bestrahlungslasers zusammengestellt. Die jeweiligen Zeitpunkte sind in dem ganz rechts abgebildeten, optoakustisch ermittelten Temperaturverlauf, mit roten Pfeilen markiert. Zusammen mit der Temperatur ist die aus den Phasen berechnete Geschwindigkeit der Gewebeverschiebung im Betrachtungsbereich v_z dargestellt. Die größten Temperaturänderungen und auch die größten Momentangeschwindigkeiten werden jeweils beim Ein- bzw. Ausschalten des Koagulationslasers beobachtet.

Bei einer Bestrahlungsstärke von $31\ \text{W}/\text{cm}^2$ und einer Temperaturerhöhung von $5\ \text{K}$ unterscheidet sich in den B-Scans die Phasendifferenz der Bestrahlungsareale noch nicht deutlich von der Phasendifferenz des umliegenden Gewebes. Der Wert in den einzelnen Pixeln liegt kaum über dem Phasenrauschen. Die Phasendifferenz wurde zur Berech-

4. Ergebnisse

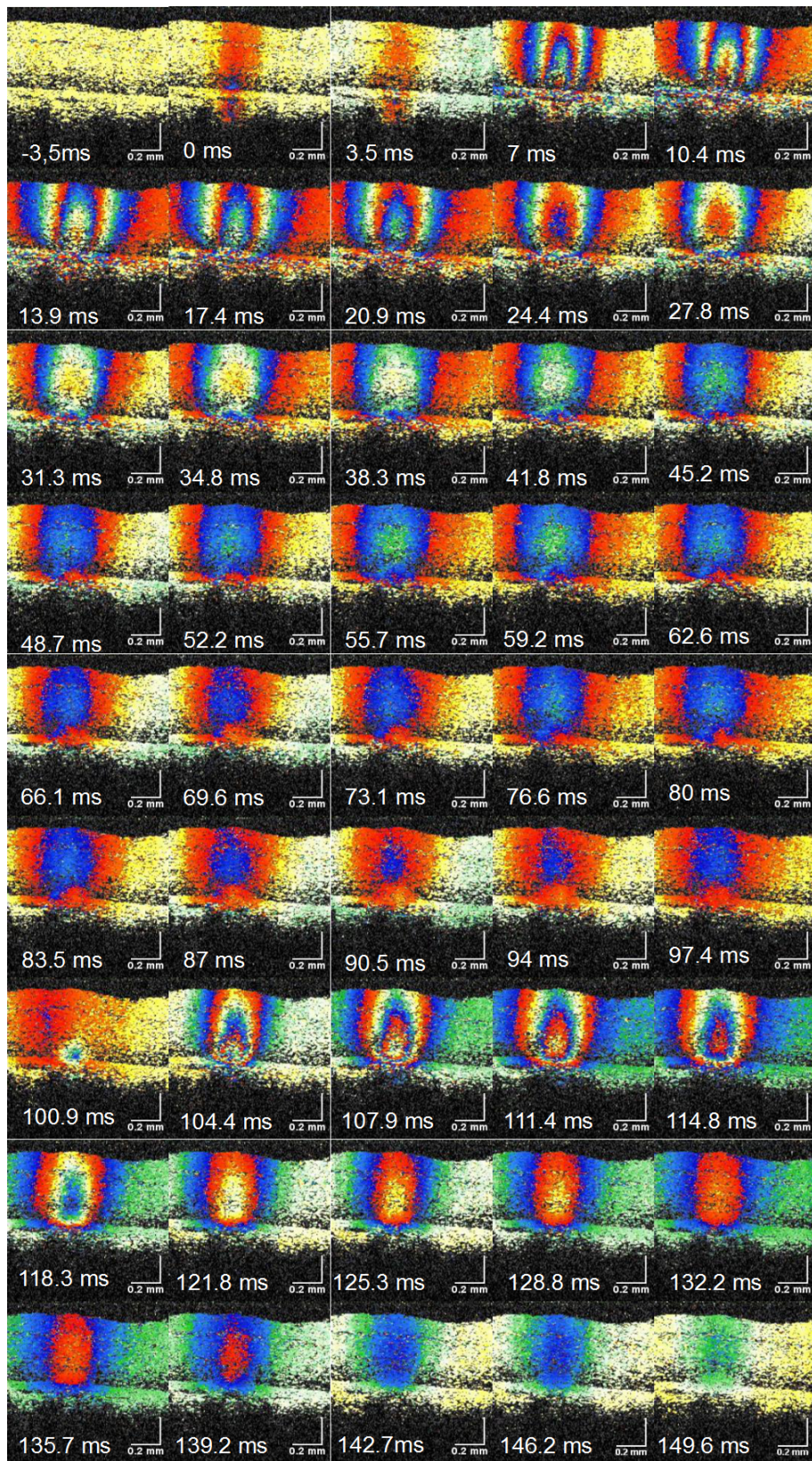


Abbildung 4.11 – Zeitserie von Phasendifferenzbildern einer Koagulation mit einer Fleckgröße von 200 μm , einer Pulslänge von 100 ms (Auge 7). Die Bestrahlungsstärke betrug 410 W/cm^2 .

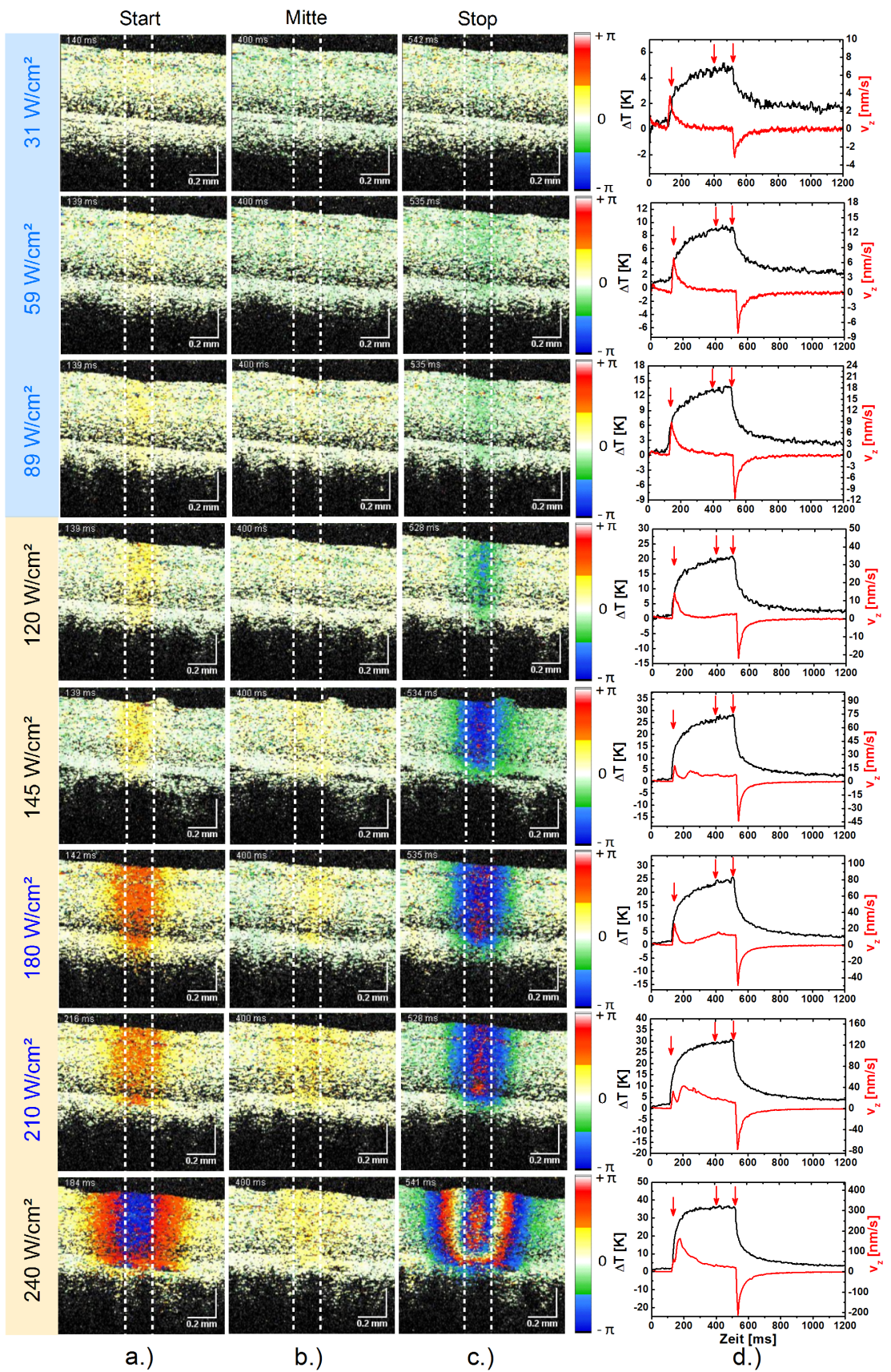


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

4. Ergebnisse

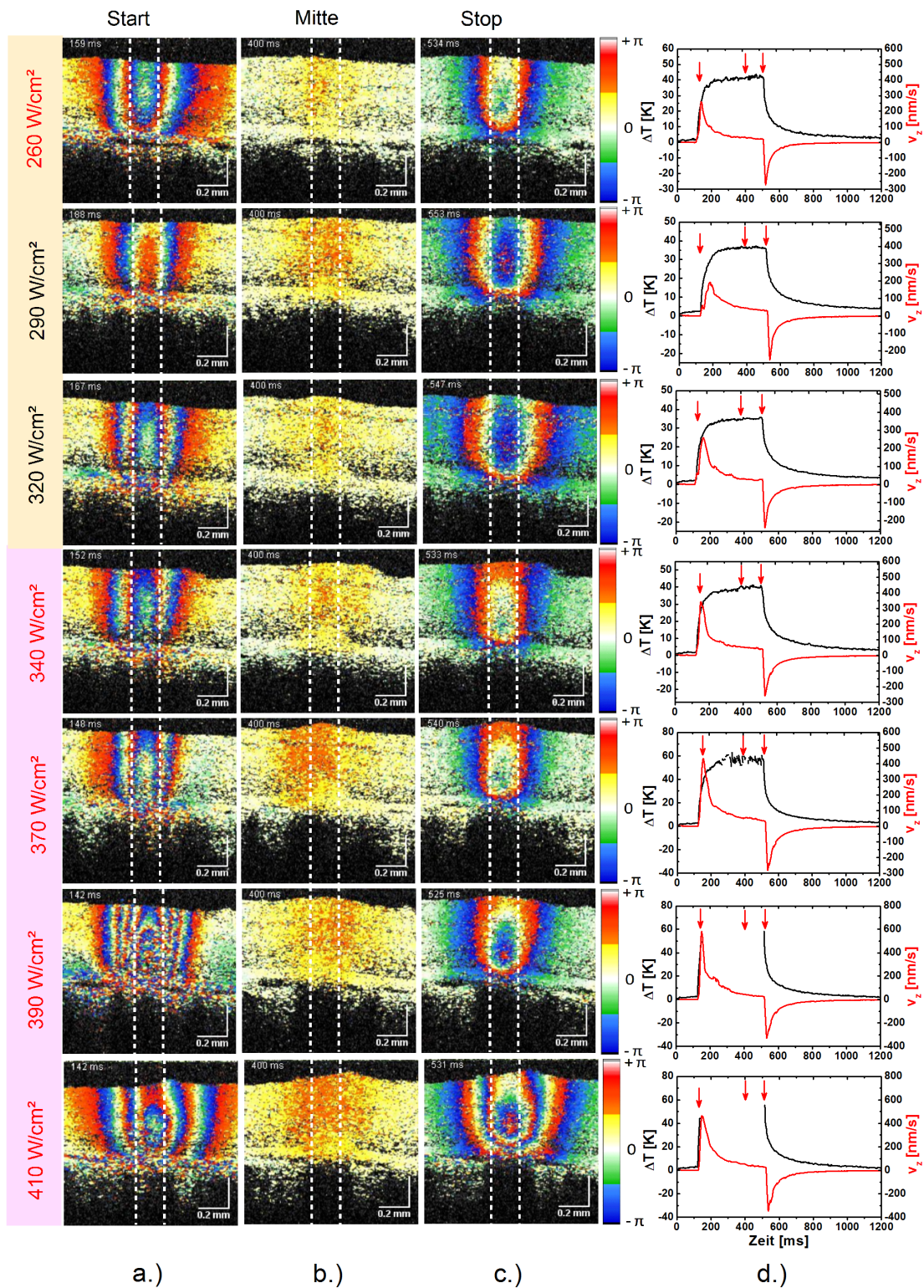


Abbildung 4.12 – Phasendifferenzbilder des Koagulationsprozesses kurz nach dem Beginn (a.), während (b.) und am Ende der Bestrahlungsdauer (c.). In den optoakustisch gemessenen Temperaturverläufen (schwarz) und aus den Phasen berechneten mittleren Geschwindigkeiten des Gewebes im bestrahlten Bereich (rot) sind die jeweiligen Zeitpunkte durch rote Pfeile markiert (d.).

nung der Geschwindigkeit über den lateralen Bereich des jeweiligen Fleckdurchmessers, sowie axial von der Oberseite der Retina bis zum RPE gemittelt. Bei der geringsten Bestrahlungsstärke ist eine positive Geschwindigkeit von 4 nm/s zum Anschlagzeitpunkt und eine negative Geschwindigkeit von -3 nm/s zum Ausschaltzeitpunkt des Bestrahlungslasers deutlich erkennbar. Für Bestrahlungsstärken ab 240 W/cm^2 kommt es aufgrund der auftretenden hohen Geschwindigkeiten von über 200 nm/s zu mehrfachen Phasensprüngen beim Ein- und Ausschalten des Koagulationslasers. Diese erstrecken sich über mehrere hintereinander folgende Bilder bzw. mehreren Millisekunden Zeitdauer. Für die im Fundusbild gut sichtbaren Koagulationen mit Bestrahlungsstärken von 340 W/cm^2 bis 410 W/cm^2 treten vermehrt Phasensprünge auf. Dies kann zu Problemen bei der Entfaltung der Phasen führen. Am Beispiel von 390 W/cm^2 ist gut zu erkennen, dass im Koagulationszentrum die Phasendifferenzen nicht mehr räumlich getrennt aufgelöst werden können. Damit ist die korrekte Entfaltung für diesen Zeitpunkt lokal nicht mehr möglich. Der optoakustische Temperaturverlauf ist für die beiden letzten Bestrahlungsstärken ebenfalls nicht mehr berechenbar, da die Denaturierung des Gewebes zu großen Änderungen der optischen Gewebeeigenschaften führt und dies die optoakustischen Messungen stark beeinträchtigen.

Durch zeitliche Integration der Phasendifferenzen, die proportional zur lokalen Geschwindigkeit des Gewebes sind, erhält man axial und lateral aufgelöst die Verschiebung des Gewebes Δz (Abb. 4.13 a.). Durch die Mittelung bei der Integration, können selbst durch sehr geringe Laserbestrahlung verursachte thermische Verschiebungen, mit Bestrahlungsstärken von 31 W/cm^2 und weniger, gut sichtbar gemacht werden. Die in enukleierten Schweineaugen ist die räumliche Verteilung der gemessenen Verschiebungen in der Regel sehr symmetrisch. Auffällig ist, dass sich bei Bestrahlungsstärken unter 59 W/cm^2 der deutlich abgegrenzte Maximalwert der Verschiebung nicht im Bereich direkt über dem RPE befindet, sondern in den drüberliegenden Zellschichten der Photorezeptorzellen (Abb. 4.13 a.). Bei einer Bestrahlungsstärke von 89 W/cm^2 entsteht ein kleineres zweites Maximum im Bereich zwischen Choroidea und RPE, welches auch für die Bestrahlungsstärken 116 W/cm^2 sowie 145 W/cm^2 sichtbar ist, und für höhere Bestrahlungsstärken wieder in das obere Maximum übergeht. Dieser Effekt findet sich häufig mit unterschiedlicher Ausprägung in den Messreihen mit unterschiedlichen Bestrahlungsparametern wieder.

In der mittleren Abbildung 4.13 b.) ist das laterale Profil der Verschiebung (rot), gemittelt über den Bereich der Netzhaut dargestellt. Hinterlegt wurde der zugehörige B-Scan nach Beendigung der Lasereexposition. Die Skalierung der y-Achse bezieht sich dabei auf den

4. Ergebnisse

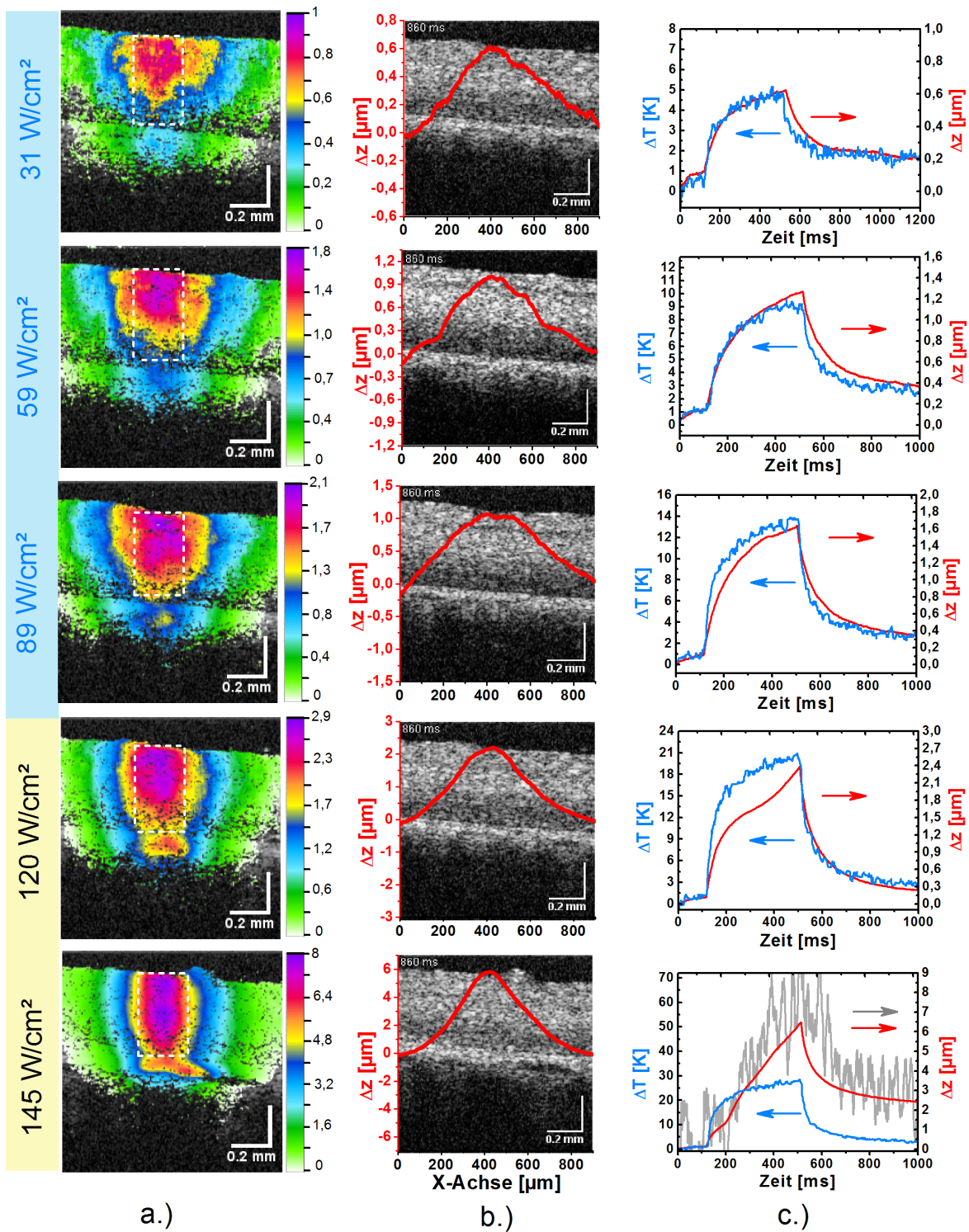


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

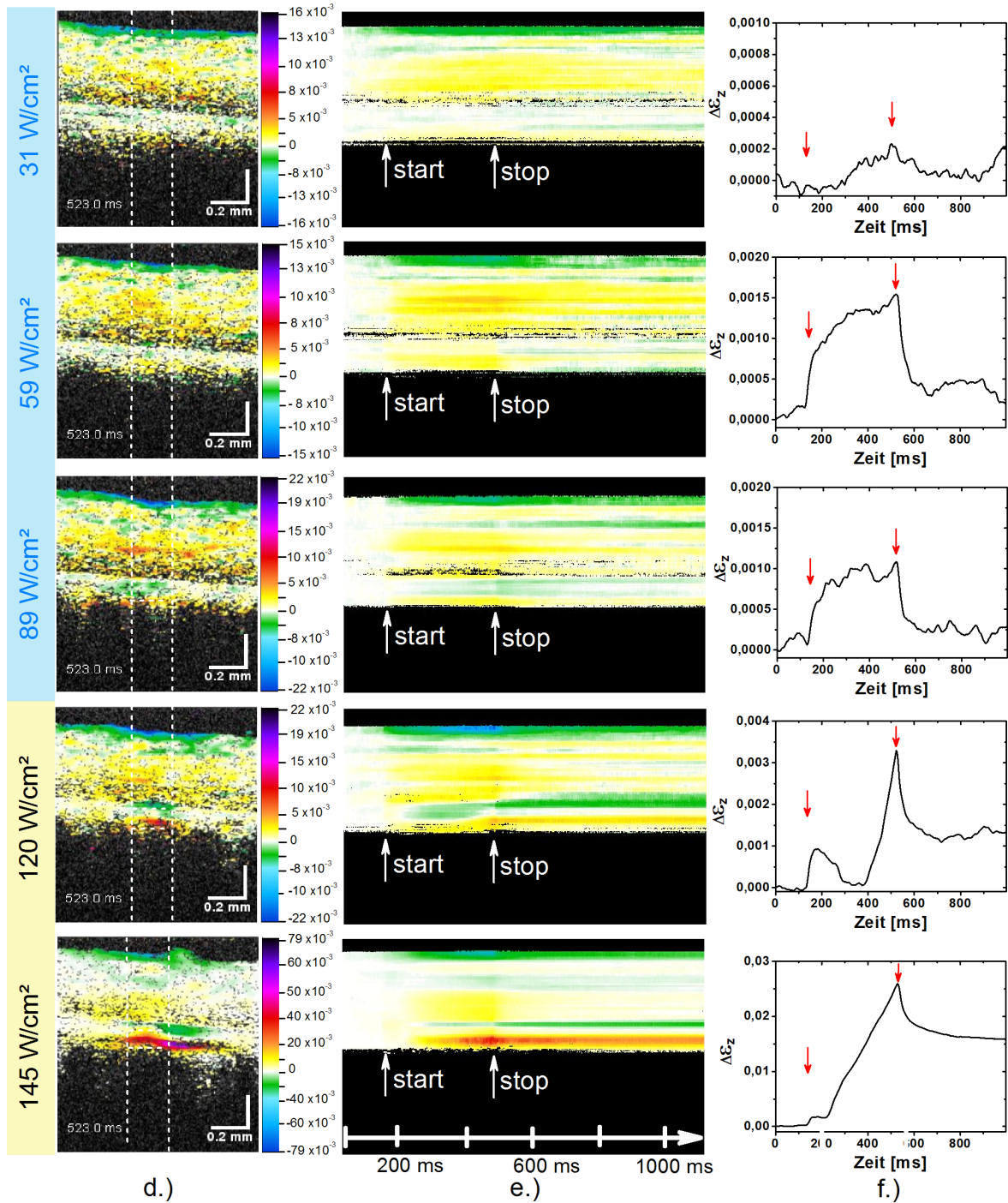


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

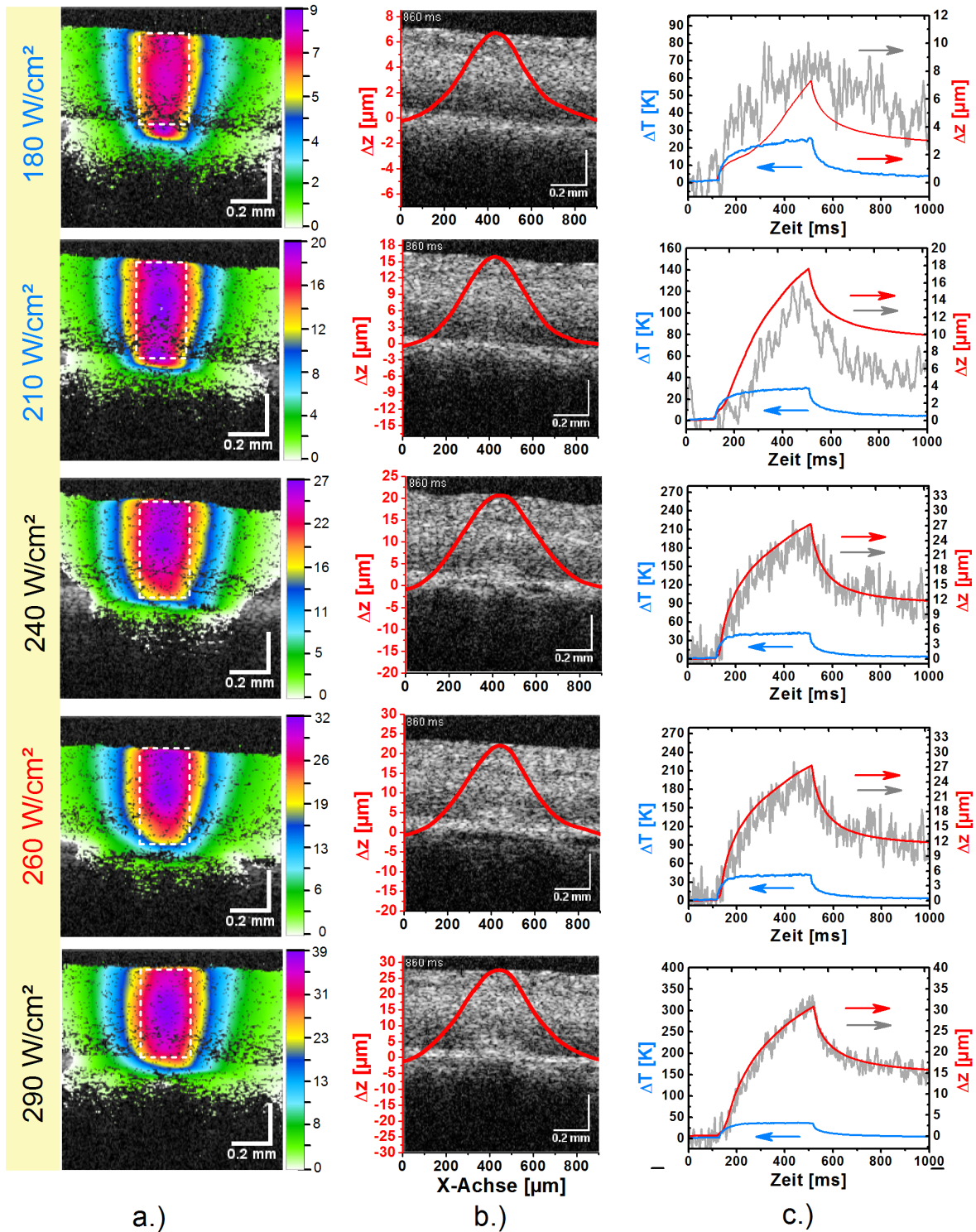


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

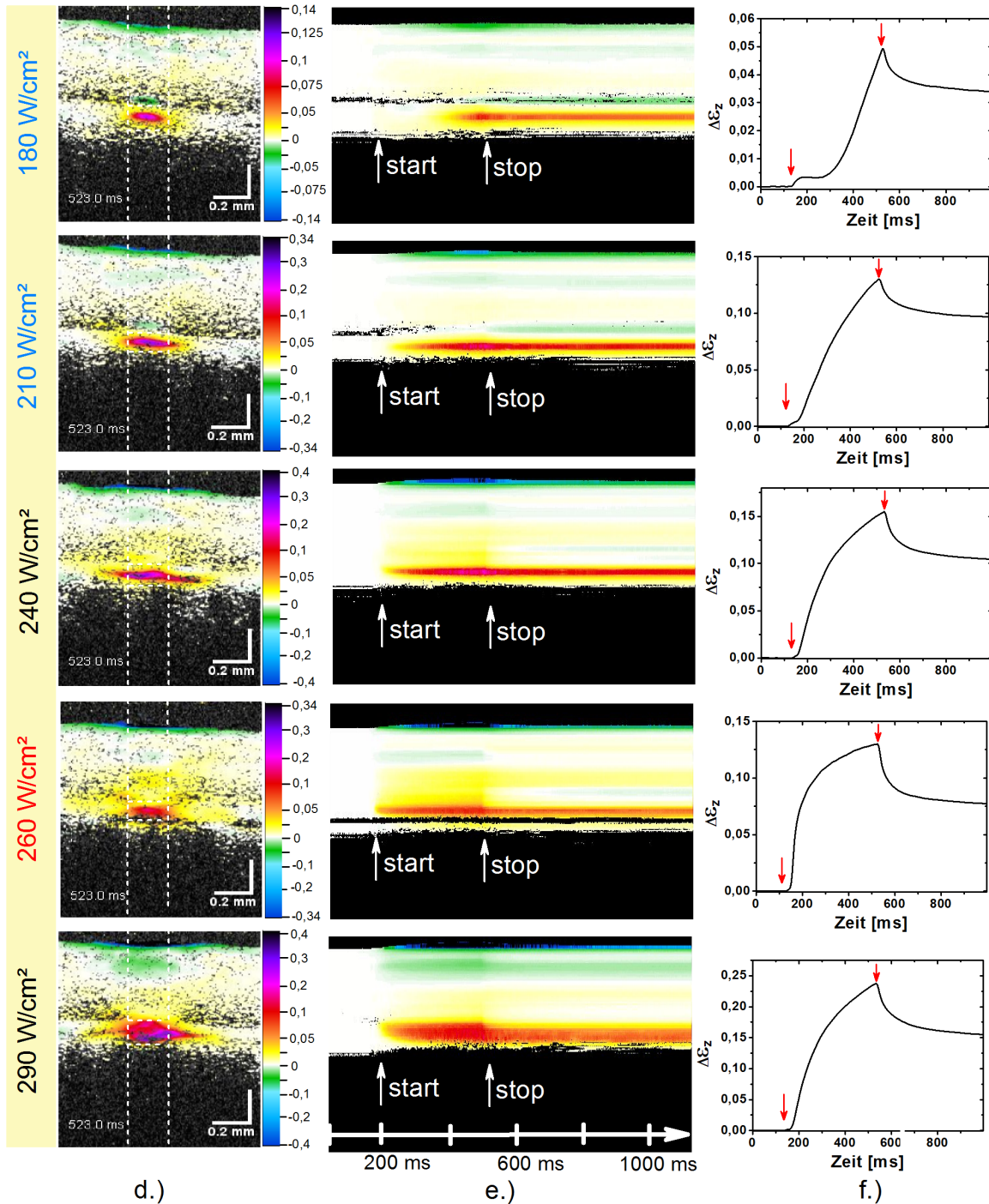


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

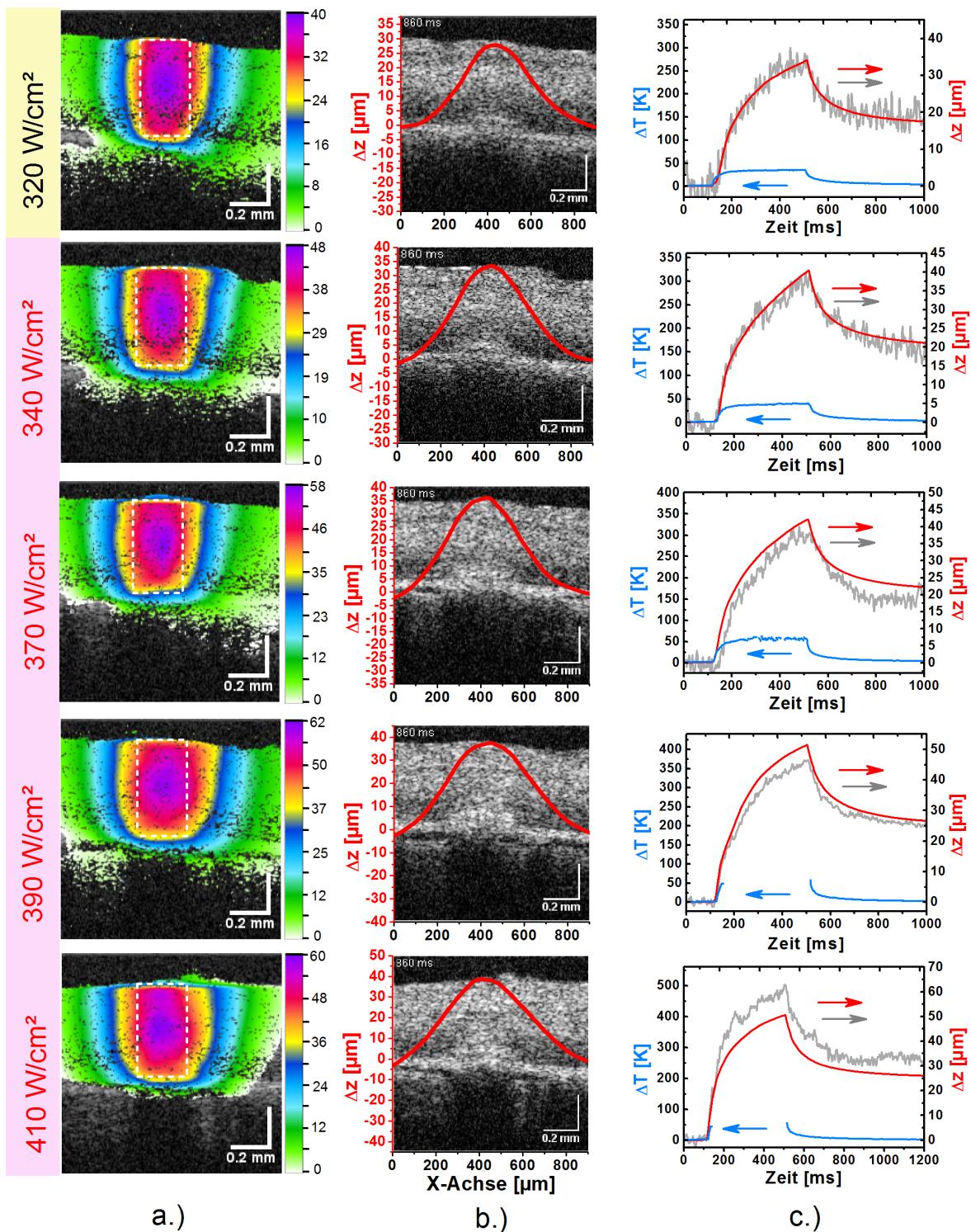
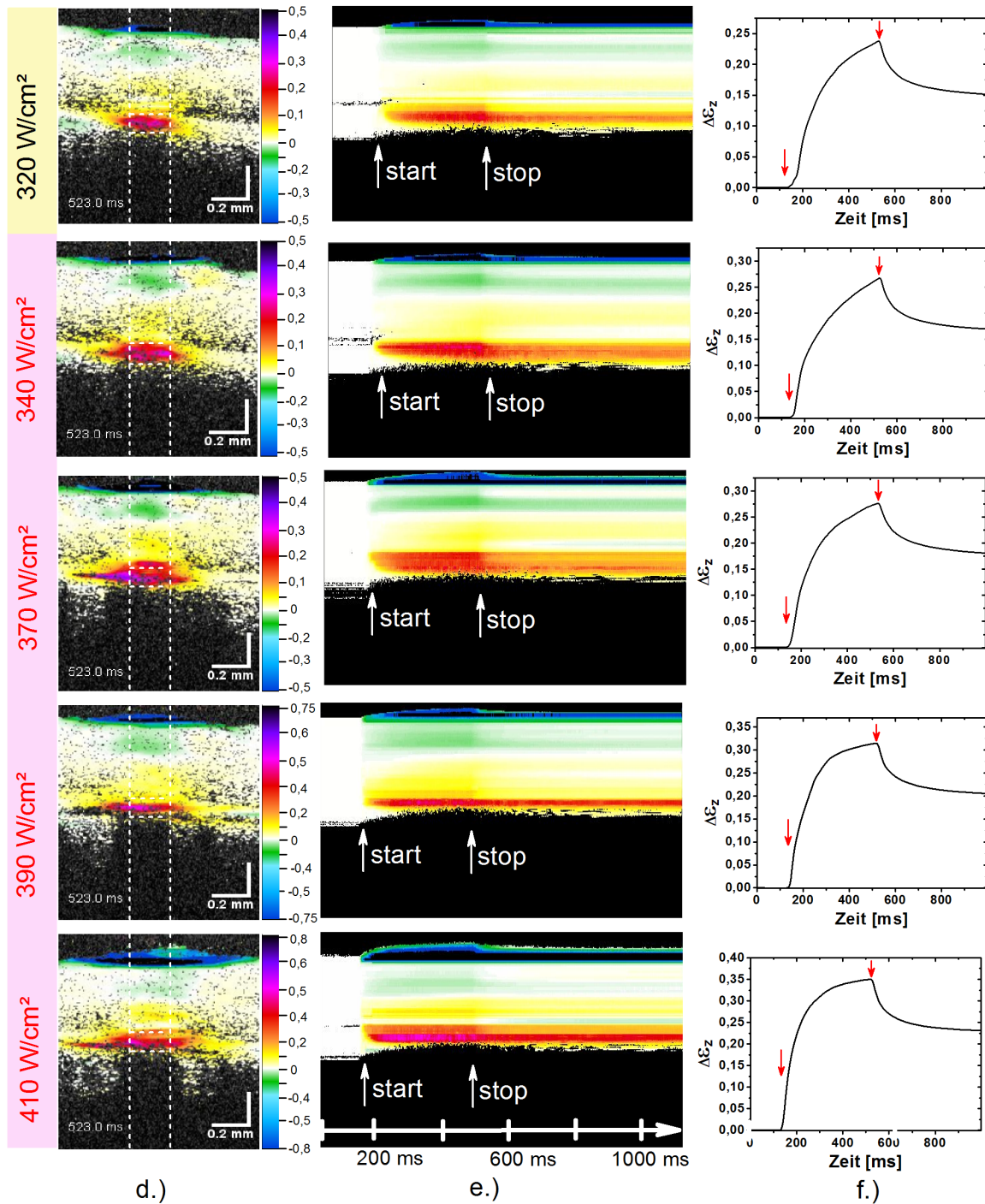


Abbildung 4.13 – a.) Räumlich aufgelöste Verschiebung des Gewebes Δz für Bestrahlungsstärken von 31 W/cm^2 bis 410 W/cm^2 . Zum Vergleich mit den optoakustischen Temperaturverläufen erfolgte eine Mittelung der absoluten Verschiebung über den weiß markierten Bereich. b.) B-Scan mit lateralem Profil der nur über die Tiefe gemittelten Verschiebung (rot). c.) Temperaturanstieg (blau), Verschiebung in dem bestrahlten Bereich Δz (rot) und Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s (grau) in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit.



d.) Aus der Verschiebung bestimmte Expansion des Gewebes für Bestrahlungsstärken von 31 W/cm² bis 410 W/cm². Zur Berechnung des M-Scans erfolgte eine Mittelung über den Fleckdurchmesser (weiße vertikale Linien). e.) M-Scan über den Expansionsverlauf während der Bestrahlungsdauer. Der Anschlag- und Abschaltzeitpunkt des Bestrahlungslasers ist mit weißen Pfeilen markiert. f.) Expansion des Gewebes in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit. Die Farbgebung des seitlichen Streifens gibt den Sichtbarkeitsbereich für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

Profilgraphen und nicht auf den hinterlegten B-Scan. Dies ermöglicht einen Vergleich der laterale Verschiebungsausdehnung zu der, durch die Laserbestrahlung verursachten Veränderung in der Gewebestreuung. Die laterale Ausdehnung der Verschiebung wurde durch Anpassung einer Gaußfunktion an die Messdaten ermittelt. Die Halbwertsbreite der Gaußfunktion bleibt bei zunehmender Bestrahlungsstärke mit durchschnittlich $410\mu\text{m}$ konstant und ist somit doppelt so groß wie der Fleckdurchmesser des Bestrahlungslasers.

Um die axiale Verschiebung des Gewebes mit der optoakustische ermittelten mittleren Temperatur vergleichen zu können, wurde die Verschiebung über den lateralen Bereich des jeweiligen Fleckdurchmessers, sowie axial von der Oberseite der Retina bis zum RPE gemittelt. Dieser Ausschnitt ist in der Verschiebung (Abb. 4.13 a.) mit einem weißen Quadrat markiert. In Abbildung 4.13 c. ist die optoakustisch gemessene mittlere Temperatur im Bestrahlungsfleck (blaue Kurve), der durch OCT gemessene Verschiebung des Gewebes (rote Kurve) gegenübergestellt.

Ursache der retinalen Verschiebung ist eine lokale Expansion oder Kontraktion des Gewebes. Es ist möglich die Komponente der Expansion in Strahlrichtung, d.h. deren z-Komponente durch Ableitung der Verschiebung Δz nach z (Gleichung 2.30), zu berechnen und orts aufgelöst darzustellen (Abb. 4.13 d.). Der jeweilige über das mit weißen Linien markierte Bestrahlungsareal gemittelte Zeitverlauf der Expansion, zeigt als M-Scan in Abbildung 4.13 e. die Auswirkung der Laserbestrahlung auf die unterschiedlichen retinalen Schichten. Die Expansion des RPEs in Abhängigkeit der Zeit (Abbildung 4.13 f.) wurde durch Mittelung über den lateralen Bereich des Fleckdurchmessers, sowie axial von der Oberseite des RPE bis zur maximalen Signaltiefe berechnet, da eine genaue Grenze zwischen RPE und Choroidea nicht bestimmbar war. Dieser Ausschnitt ist in Abbildung 4.13 d. mit zwei horizontalen Linien markiert.

Die Verschiebung des retinalen Gewebes im bestrahlten Bereich folgt für die Bestrahlungsstärken von 31 W/cm^2 bis 89 W/cm^2 recht gut dem Temperaturverlauf mit einer spezifischen Verschiebung der Retina von ungefähr 125 nm/K . Im Gegensatz zur Auswertung der Verschiebung der Retinaoberfläche aus OCT-Intensitätsdaten ist selbst bei der geringsten Bestrahlungsstärken von 31 W/cm^2 , die zu einer Temperaturerhöhung von ca. 5 K führt, eine genaue Messung der Gewebeverschiebung durch Doppler-OCT möglich. Der Anstieg von Temperatur und Verschiebung vor dem Einschalten des Bestrahlungslasers sowie das Absinken auf ein Niveau von 2 K bis 3 K bzw. $0,2\mu\text{m}$ bis $0,4\mu\text{m}$ bei Bestrahlungsstärken von 31 W/cm^2 bis 89 W/cm^2 ist auf die zusätzlichen Erwärmung des

Gewebes durch den optoakustischen Messlasers mit einer Pulsenergie zwischen $3\ \mu\text{J}$ und $7\ \mu\text{J}$ und durch den OCT-Strahl mit einer Leistung von $7\ \text{mW}$ zurückzuführen.

Bei schwach sichtbaren Läsionen ab einer Bestrahlungsstärke von $120\ \text{W}/\text{cm}^2$ entspricht der Kurvenverlauf der Verschiebung nicht mehr dem Kurvenverlauf der Temperatur. Die beiden Verläufe weichen mit zunehmender Bestrahlungsstärke immer stärker voneinander ab. Es scheint noch eine additive und nach Beendigung der Laserexposition nicht mehr reversible Komponente zu der unterschwellig beobachteten, dem Temperaturverlauf folgenden Bewegung aufzutreten. Die aus den Phasendifferenzen berechneten Verschiebungen in Abbildung 4.13 sind ab $145\ \text{W}/\text{cm}^2$ zusammen mit den Temperaturverläufen und der Verschiebung der Retinaoberfläche (grau) dargestellt. Die Verschiebung der Oberfläche wurde wie auch in Abbildung 4.7 aus den B-Scans direkt, als absolute Verschiebung bestimmt, deren Präzision ausschließlich von der Genauigkeit, mit der die Oberfläche bestimmt werden kann, und von der Genauigkeit der Tiefenskalierung abhängt. Die Exaktheit der Bewegungsberechnung des Gewebes aus den integrierte Phasendifferenz beruht dagegen auf der Genauigkeit von Zentralwellenlänge und Zeitabstand zweier B-Scans sowie auf einer korrekten Entfaltung. Bei Verschiebungen über mehr als der halben Zentralwellenlänge können durch die Entfaltung der Phasen Fehler entstehen. Beide Verschiebungsmessungen stimmen, wo sie gemeinsam gemessen werden können, recht gut überein. Die aus den Amplituden der B-Scans bestimmten Verschiebungen der Retinaoberfläche sind allerdings derart rauschbehaftet, dass sie für Bestrahlungsstärken unter $145\ \text{W}/\text{cm}^2$ keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern.

Bei einer Bestrahlungsstärke von $180\ \text{W}/\text{cm}^2$ ist gut zu erkennen, dass Temperaturverlauf und Verschiebung ab $300\ \text{ms}$ nicht mehr übereinstimmen und Δz nicht wieder an den Ursprung zurückkehrt, sondern bei etwa $3\ \mu\text{m}$ verharrt. Trotz des vergleichsweise schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ist dies auch bei der Oberflächendetektion in den Intensitätsbildern erkennbar.

Für die nicht sichtbaren Expositionen mit Bestrahlungsstärken bis $89\ \text{W}/\text{cm}^2$ folgt der Expansionsverlauf während und nach der Bestrahlung im wesentlichen dem Verschiebungsverlauf, jedoch mit einem schlechteren Signal-zu-Rausch Verhältnis. Bei einer Bestrahlungsstärke von $120\ \text{W}/\text{cm}^2$ erfolgt nach dem Einschalten des Bestrahlungslasers eine positiven Anstieg im Bereich zwischen RPE und Choroidea. Nach $50\ \text{ms}$ Bestrahlungsdauer komprimiert das Gewebe, so dass die thermische Expansion reversibel auf den Ursprungswert zurückfällt um anschließend nochmals zu expandieren. Dieser Effekt ist auch für die beiden nächsthöheren Bestrahlungsstärken ($145\ \text{W}/\text{cm}^2$ und $180\ \text{W}/\text{cm}^2$)

4. Ergebnisse

noch gut zu erkennen. Das Gewebe zieht sich hier nicht zusammen, sondern die Expansion bleibt über einen Zeitraum zwischen 50 ms und 100 ms konstant, bevor es erneut expandiert.

Für die weiteren Bestrahlungsstärken von 210 W/cm^2 – 410 W/cm^2 trennen sich der Temperaturverlauf und der Verschiebungsverlauf zunehmend. Bei dem Vergleich der beiden Messkurven für Temperatur und Δz bei einer Bestrahlungsstärke von 340 W/cm^2 ist ersichtlich, dass bei einer Verschiebung von 125 nm/K die Temperatur um 325 K ansteigen müsste, um durch einen rein thermischen Expansion eine Verschiebung von $42 \mu\text{m}$ zu erzielen. Die Bereiche in denen eine Expansion des Gewebes stattfindet, sind in der Abbildung gut von den nicht bestrahlten Arealen zu unterscheiden. Ab einer Bestrahlungsstärke von 290 W/cm^2 ist in den oberen Retinaschichten eine scheinbare Kontraktion sichtbar. Gleichzeitig beginnt sich die Expansion um das RPE lateral über einen größeren Bereich als den Fleckdurchmesser auszudehnen (Abb. 4.14). Der Expansionsverlauf weist dabei eine zum Verschiebungsverlauf äquivalente Kurvenform auf.

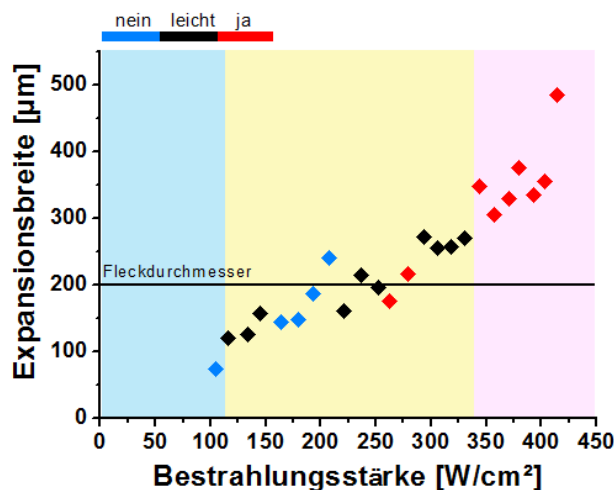


Abbildung 4.14 – Expansionsbreite in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. Die Auswertung konnte nur für Bestrahlungen oberhalb der Koagulationsschwelle durchgeführt werden. Die Hintergrundfarben geben den Sichtbarkeitsbereich für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

Gewebeverschiebungen und Expansion wurden für alle 3 Fleckdurchmesser von $200 \mu\text{m}$ – $50 \mu\text{m}$ und alle 4 Expositionzeiten 400 ms – 50 ms aus den Phasen der OCT-Messungen berechnet. Bei allem Bestrahlungsparametern wurde ein qualitativ ähnliches Verhalten der Gewebeverschiebung beobachtet. In Abbildung 4.15 sind die maximalen, aus den Phasen berechneten Verschiebungen Δz_{max} des Gewebes und die maximalen Temperaturen ΔT_{max} am Ende der Bestrahlung, dargestellt. Die beiden Achsen für Δz_{max} und

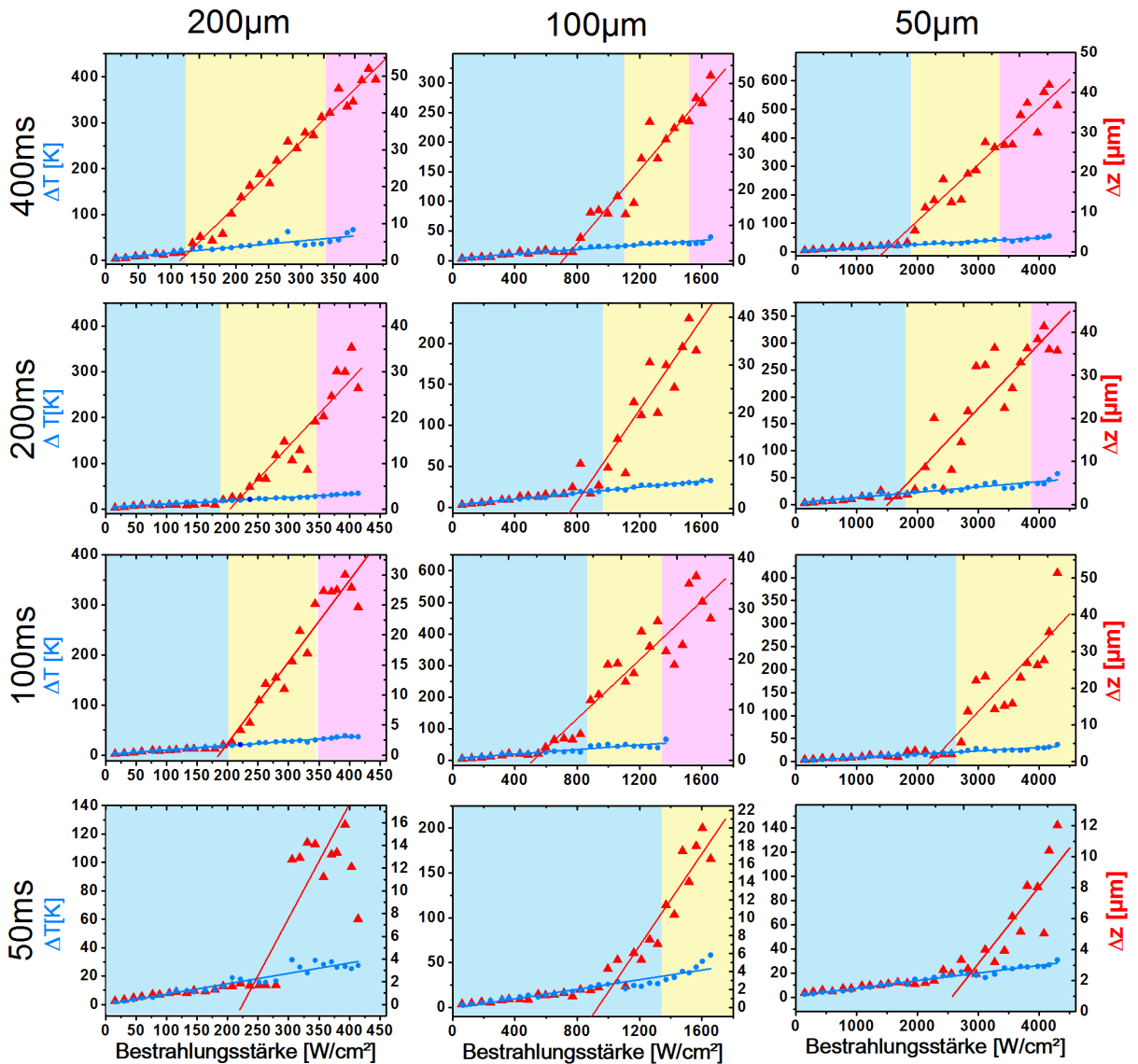


Abbildung 4.15 – Verschiebung Δz_{max} der Retina in dem bestrahlten Bereich und Temperaturanstieg ΔT_{max} am Ende der Bestrahlungszeit in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. Die Fleckgröße variiert von 200 μm – 50 μm und die Bestrahlungszeit von 400 ms – 50 ms. Die Hintergrundfarben geben den Sichtbarkeitsbereich für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

4. Ergebnisse

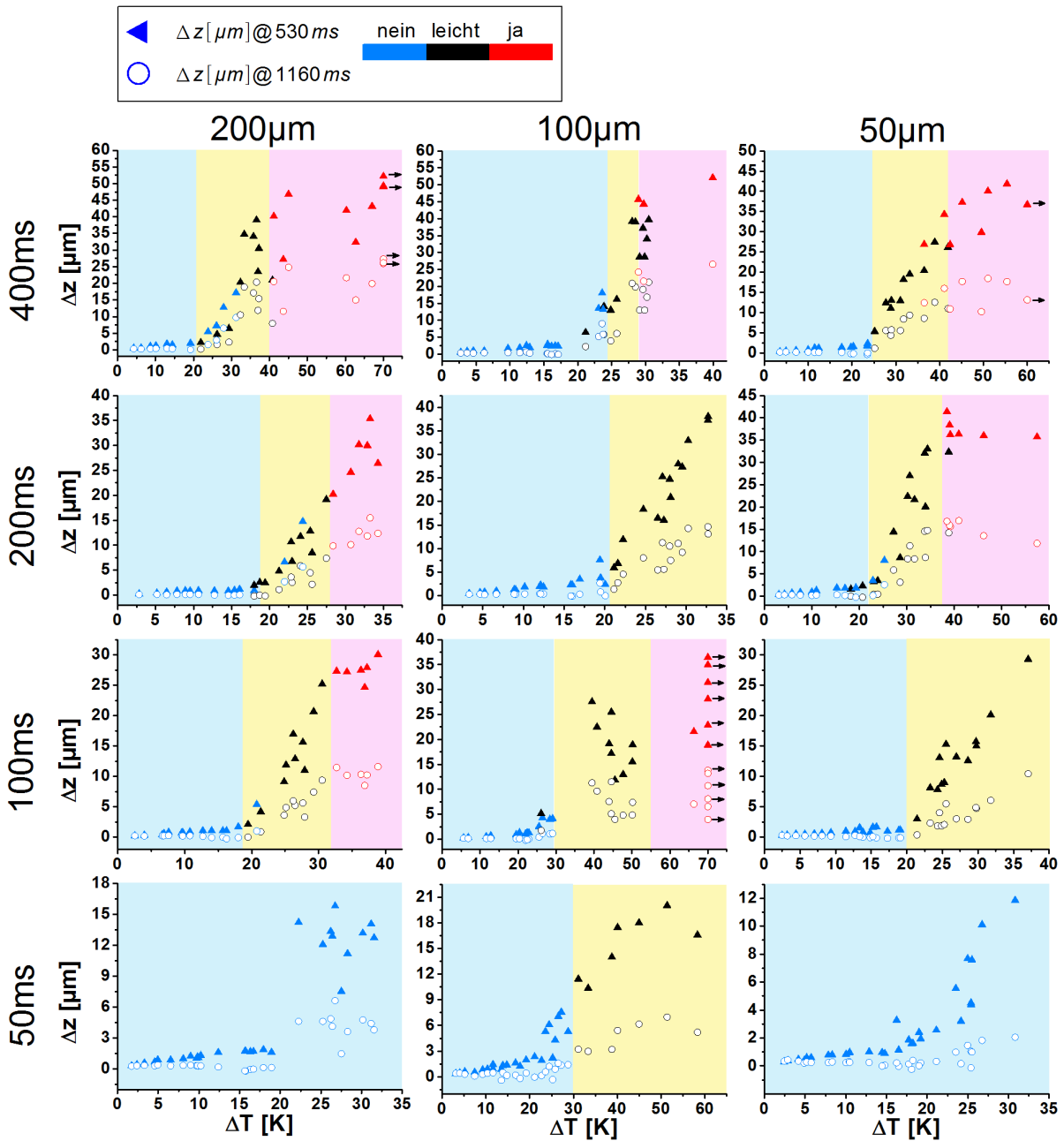


Abbildung 4.16 – Verschiebung Δz_{max} der Retina in dem bestrahlten Bereich am Ende der Bestrahlungszeit (530ms) und am Ende der OCT-Messung (1160ms) in Abhängigkeit des maximalen Temperaturanstiegs ΔT_{max} . Die Hintergrundfarben geben die Parameterbereiche für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

ΔT_{max} wurde für jeden Bestrahlungsparameter so angepasst, dass beide Kurven für geringe Bestrahlungen unterhalb der Koagulationsschwelle zusammenfallen. Das Verhältnis der Steigungen der beiden Kurven, d.h. die spezifische Verschiebung in diesem Bereich schwankte zwischen 70 nm/K und 160 nm/K. Für alle Strahlparameter wurden zwei Bereiche beobachtet, in denen sich das Gewebe linear mit der Bestrahlungsstärke, allerdings mit unterschiedlicher Steigung, verschiebt. In diesen zwei Bereichen wurde jeweils eine Gerade angepasst und deren Steigungen ermittelt. Tendenziell wurde größere spezifische Verschiebungen bei großen Fleckdurchmessern und langen Expositionszeiten beobachtet (Tab. 4.3). Eine gewisse Varianz wird wahrscheinlich durch die nicht immer optimale Überlagerung des Koagulationslasers mit dem OCT-Strahl verursacht. Liegt das Messvolumen nicht exakt im Zentrum des Bestrahlungsflecks herrschen dort effektiv geringere Temperaturen als durch die optoakustische Temperaturmessung bestimmt. Die Schnittpunkte beider Geraden, die an die Messdaten angepasst wurden, bestimmt die Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ in der die zusätzliche Gewebeverschiebung einsetzt (Tab. 4.3). Bei abnehmendem Fleckdurchmesser oder abnehmender Bestrahlungszeit tritt eine Verschiebung von $E_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ zu höheren Bestrahlungsstärken auf. Die Temperatur $T_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ am Schnittpunkt der Gerade zeigte in Abhängigkeit von Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeit keine systematische Abhängigkeit. Schwankungen der Grundtemperaturen der Augen während der gesamten Versuchsdauer verdecken eventuelle systematische Zusammenhänge.

In Abbildung 4.16 sind die aus den Phasen berechneten Verschiebungen des Gewebes Δz_{max} am Ende der Bestrahlung (530 ms) sowie am Ende der OCT-Messung (1160 ms) in Abhängigkeit des maximalen Temperaturanstiegs ΔT_{max} dargestellt. Beide Messwerte zeigen eine deutliche Zunahme der Verschiebung mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit, besonders für große Fleckdurchmesser und lange Bestrahlzeiten. Ab einem Temperaturanstieg von 40 K erreicht die Verschiebung eine Sättigung und steigt für höhere Temperaturen nicht mehr signifikant an.

Aus den jeweiligen Gewebeverschiebungen für die drei Fleckdurchmesser und vier Expositionszeiten wurde ebenfalls die jeweiligen maximalen Expansionen $\Delta \varepsilon_{zmax}$, der gemittelten Messwerte über den Bereich zwischen Pigmentepithel und Choroidea, bestimmt und in Abbildung 4.18 gegen die Bestrahlungsstärke und in (Abb. 4.19) gegen die maximalen Temperaturen ΔT_{max} , dargestellt. Aus dem Verhältnis zwischen den an die Daten angepassten Geraden und dem Temperaturanstieg wurde die spezifische Expansion η ermittelt. Diese schwankt im unterschweligen Bereich zwischen $-30,4 \cdot 10^{-5} K^{-1}$ und $42,1 \cdot 10^{-5} K^{-1}$.

4. Ergebnisse

Bestrahlungszeit [ms]	Fleckdurchmesser [μm]	$\Delta T/E$ K/W/cm ⁻²	ζ [nm/K]	ζ_{th} [nm/K]	$E_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ [W/cm ²]	$\Delta T_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ [K]
400	200	130	130	1300	128	19,4
400	100	19	160	2700	763	17,4
400	50	12	81	1300	1570	20,3
200	200	73	110	2100	217	19,2
200	100	18	170	2100	839	18,4
200	50	9.9	150	1600	1682	20,7
100	200	88	85	1500	198	20,4
100	100	36	63	810	576	26,9
100	50	7.2	63	1500	2372	18,7
50	200	73	83	980	248	18,7
50	100	27	73	920	1030	25,3
50	50	6.3	60	720	2889	20,3

Tabelle 4.3 – Aus der OCT-Phasendifferenz bestimmte spezifische Verschiebung ζ unterhalb der Schwelle für sichtbare Läsionen und spezifische Verschiebung ζ_{th} oberhalb der Schwelle, die sich jeweils als Steigung des linearen Anteils des Anstiegs der Verschiebung mit der Bestrahlungsstärken ergeben. Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ und Temperaturanstieg $T_{th}^{\Delta z_{\varphi}}$ an dem Schnittpunkt der beiden Geraden.

In 12 % der Messungen wurde ein zweites Verschiebungsmaximum im Bereich der Choroidea beobachtet (Abb. 4.17 a.). Dieses hat, im Vergleich zum Maximum im Bereich der Photorezeptorzellen, einen identischen zeitlichen Verlauf über den Bestrahlungszeitraum und erreicht zum Teil auch gleich hohe Spitzenwerte am Ende der Bestrahlungszeit (Abb. 4.17 b.). Auf die Auswertung des Verschiebungsverlaufs hatte dieses sperate zweite Maximum keinen direkten Einfluss, da zur Berechnung der Verschiebung nur über den Bereich von der Oberseite der Retina bis zum RPE gemittelt und somit das Maximum im Bereich der Choroidea nicht berücksichtigt wurde. Der Verschiebungsverlauf entspricht somit dem erwarteten Kurvenverlauf des Temperaturanstiegs. Wird durch Ableitung der Verschiebung Δz nach z die Expansion berechnet, führen die Gradienten der zwei Verschiebungsmaxima zu negativen Werten im Bereich zwischen RPE und Choroidea (Abb. 4.17 c.). Eine lokale Mittelung der Expansion über diesen Bereich zeigt im Zeitverlauf eine deutliche Kompression mit Beginn der Bestrahlung (Abb. 4.17 d. schwarz) , welche nach Beendigung der Bestrahlung reversibel auf ihren Ursprungswert zurückkehrt. Im Gegensatz dazu, ergibt eine Mittelung über den unteren Bereich der Photo-

rezeptoren eine Expansion des Gewebes (pink). Da für die Auswertung der spezifischen Expansion nur über den Bereich zwischen RPE und Choroidea gemittelt wurde, ergeben sich negative Werte für die maximalen Expansionen $\Delta\varepsilon_{zmax}$ am Ende der Bestrahlung. Durch die Anpassung einer Geraden an die unterschwelligen Messwerte, führten diese Kompressionen zu den negativen spezifischen Expansionswerten (Tab.4.4).

Mit dem Einsetzen der Denaturierung steigen die Expansionen linear mit der Bestrahlungsstärke bzw. der Temperatur an. Die spezifische Expansion η_{th} liegt dabei zwischen $6 \cdot 10^{-3} K^{-1}$ und $16 \cdot 10^{-3} K^{-1}$.

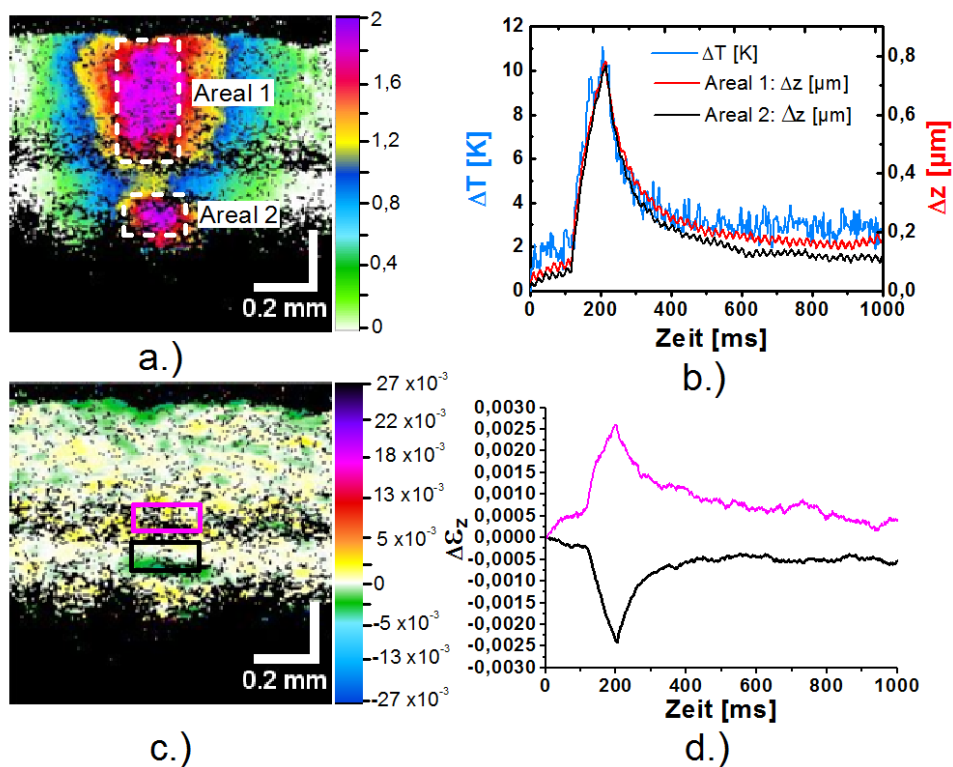


Abbildung 4.17 – a.) Verschiebung des Gewebes Δz mit einem Fleckdurchmesser von $200 \mu\text{m}$, einer Bestrahlungszeit von 100ms und einer Bestrahlungsstärke von 105W/cm^2 . Zum Vergleich mit den optoakustischen Temperaturverläufen erfolgte eine Mittelung der absoluten Verschiebungen über die weiß markierten Bereiche. b.) Temperaturanstieg ΔT (blau), Verschiebung Δz im Bereich der neuronalen Retina (rot) und im Bereich der Choroidea (schwarz) in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit. c.) Aus der Verschiebung bestimmte Expansion des Gewebes. d.) In den zwei Arealen gemessene mittlere Expansion des Gewebes in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit.

4. Ergebnisse

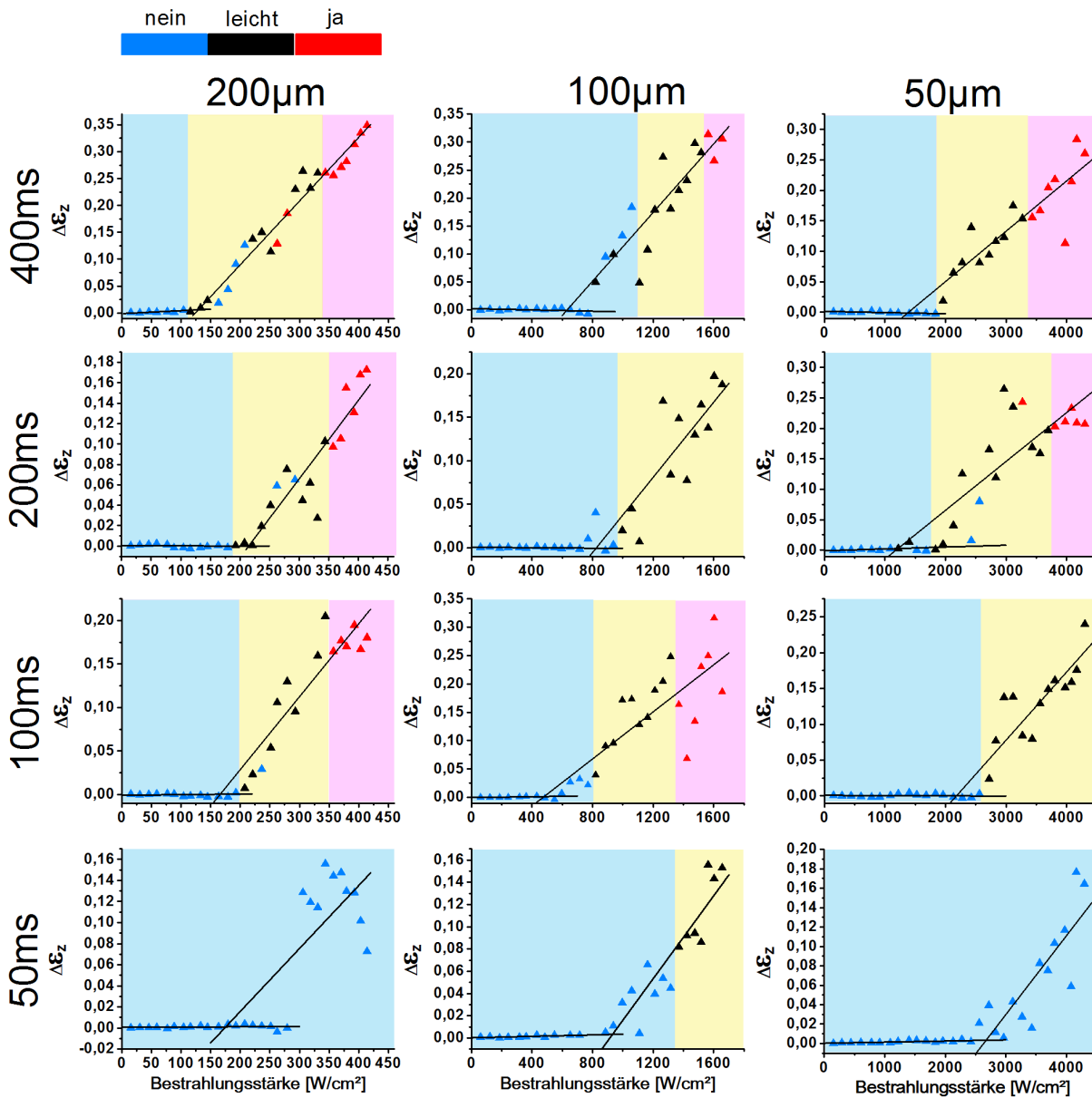


Abbildung 4.18 – Aus der Verschiebung berechnete Expansion $\Delta\varepsilon_{zmax}$ im Bereich des RPEs am Ende der Bestrahlungszeit in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. Die Fleckgröße variiert von 200 μm – 50 μm und die Bestrahlungszeit von 400 ms – 50 ms. Die Hintergrundfarben geben den Sichtbarkeitsbereich für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

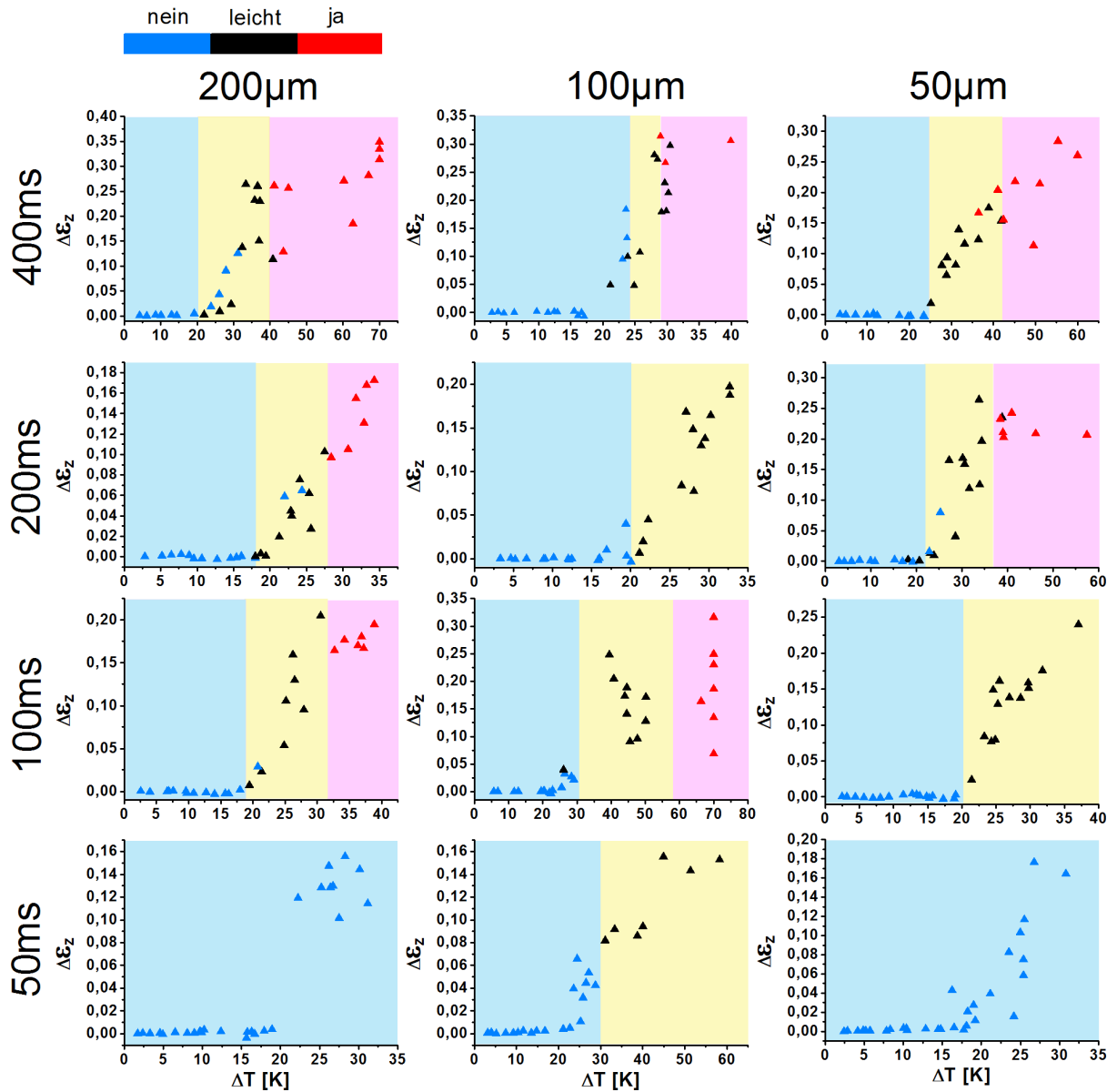


Abbildung 4.19 – Aus der Verschiebung berechnete Expansion $\Delta \epsilon_{zmax}$ im Bereich des RPEs am Ende der Bestrahlungszeit in Abhängigkeit der Temperatur. Die Fleckgröße variiert von 200 μm – 50 μm und die Bestrahlungszeit von 400 ms – 50 ms. Die Hintergrundfarben geben den Sichtbarkeitsbereich für nicht sichtbare (blau), leicht sichtbare (gelb) und gut sichtbare Läsionen (pink) an.

4. Ergebnisse

Bestrahlungszeit [ms]	Fleckdurchmesser [μm]	$\Delta T/E$ K/W/cm ⁻²	η [K ⁻¹]	η_{th} [K ⁻¹]	$E_{th}^{\Delta\epsilon}$ [W/cm ²]	$\Delta T_{th}^{\Delta\epsilon}$ [K]
400	200	130	$42,1 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-3}$	129	26
400	100	19	$-30,4 \cdot 10^{-5}$	$16 \cdot 10^{-3}$	630	21
400	50	12	$-16,5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-3}$	1389	25
200	200	73	$-1,2 \cdot 10^{-5}$	$11 \cdot 10^{-3}$	214	21
200	100	18	$-7,1 \cdot 10^{-5}$	$12 \cdot 10^{-3}$	822	17
200	50	9.9	$30,6 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-3}$	1202	23
100	200	88	$8,2 \cdot 10^{-5}$	$10 \cdot 10^{-3}$	166	19
100	100	36	$10,7 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-3}$	479	28
100	50	7.2	$-4,8 \cdot 10^{-5}$	$13 \cdot 10^{-3}$	2177	21
50	200	73	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-3}$	175	26
50	100	27	$12,1 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-3}$	929	25
50	50	6.3	$18,1 \cdot 10^{-5}$	$12 \cdot 10^{-3}$	2682	18

Tabelle 4.4 – Zusammenfassung der aus Abbildung 4.18 und 4.19 ermittelten Steigungen und Schwellwerte für die verschiedenen Bestrahlungszeiten und Fleckdurchmesser. Mittlerer linearer Anstieg der Temperatur mit der Bestrahlungsstärke $\Delta T/E$. Spezifische Expansion η für die nicht sichtbaren Koagulationen und spezifische Expansion η_{th} für die sichtbaren Koagulationen, ermittelt aus den Steigungen der linearen Funktionen. Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta\epsilon}$ und Temperaturanstieg $\Delta T_{th}^{\Delta\epsilon}$ für Expansionen von mehr als $1 \cdot 10^{-3}$

4.1.4 Laterale Ausdehnung der Verschiebung und axiale Expansionsverteilung in Abhängigkeit der Fleckdurchmesser

Die durch Phasenauswertung gewonnenen orts aufgelösten Verschiebungen und Expansionen wurden bezüglich ihrer lateralen bzw. axialen Ausdehnung für die Fleckdurchmesser von 200 μm , 100 μm und 50 μm bestimmt und miteinander verglichen, um eine eventuelle Abhängigkeit zwischen den Fleckdurchmessern und der Gewebereaktion zu bestimmen.

Um die laterale Verteilung der Verschiebung zu berechnen, wurde die tiefenaufgelöste Verschiebung von der Oberseite der Retina bis zum RPE gemittelt und anschließend durch Anpassung einer Gaußkurve die Halbwertsbreite bestimmt (Abb. 4.20 a.). Die laterale Verteilung der Verschiebung bleibt mit ansteigender Temperatur relativ konstant

(Abb. 4.20 c.). Die jeweiligen Mittelwerte der berechneten Halbwertsbreiten einer Messreihe sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. In Abbildung 4.20 b.) sind exemplarisch drei, über alle Temperaturwerte gemittelte, laterale Verteilungen, mit Fleckdurchmessern von 200 μm , 100 μm und 50 μm zusammengestellt. Die durch Phasendifferenzen ermittelte laterale Ausdehnung der Verschiebung zeigt eine konstante Breite, unabhängig von Bestrahlungszeit und eingestelltem Fleckdurchmesser.

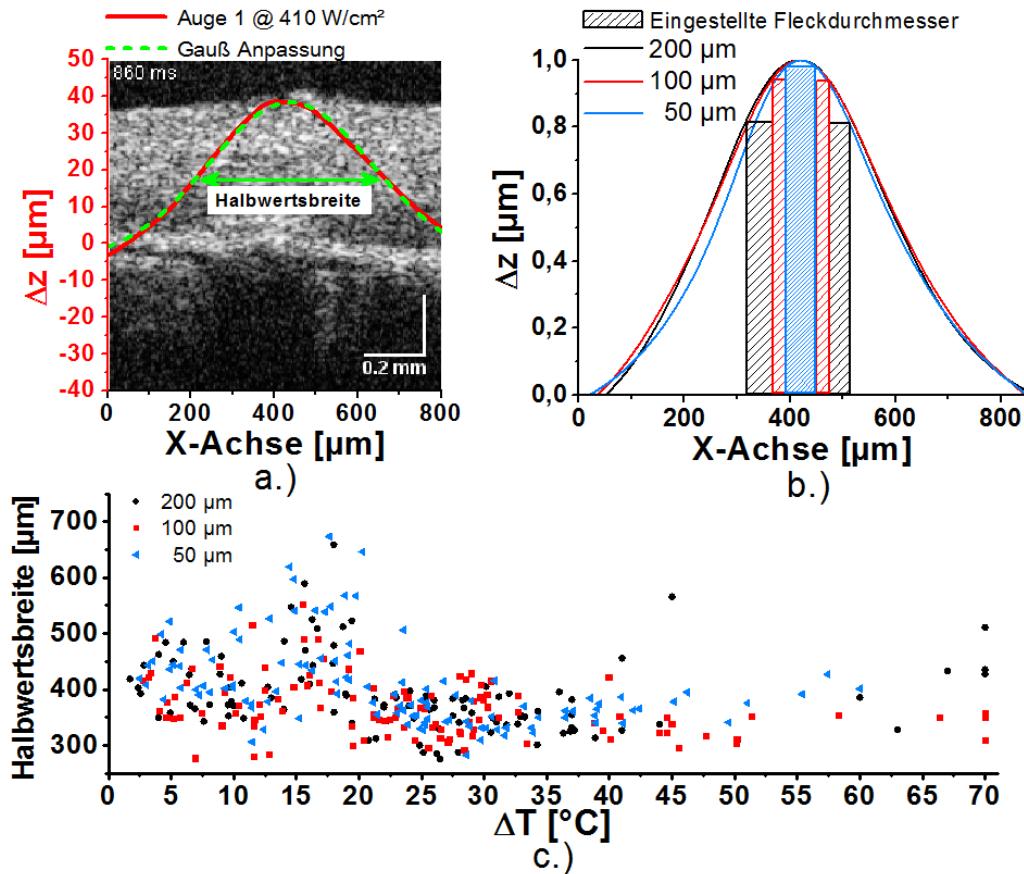


Abbildung 4.20 – a.) Bestimmung der Halbwertsbreite der lateralen Verschiebungsverteilung durch Anpassung einer Gauß-Verteilung. b.) Über alle Temperaturwerte gemittelte Verschiebungsverteilung für die Fleckdurchmesser von 200 μm (schwarz schraffierter Bereich), 100 μm (rot schraffierter Bereich) und 50 μm (blau schraffierter Bereich) mit einer Bestrahlungszeit von 400 ms. c.) Ermittelte Halbwertsbreiten aller Messreihen in Abhängigkeit zur optoakustisch bestimmten Temperaturerhöhung.

Die Retina verlief in einigen Messreihen leicht schräg über das Bildfeld. Zur Bestimmung der axialen Verteilung der Expansion musste diese Schräglage möglichst genau über den Bereich des Fleckdurchmessers korrigieren werden. Eine Korrektur durch eine numerische Begradigung der Retinaoberfläche führte, aufgrund der starken Verschiebungen bei hohen Bestrahlungsstärken, zu einer nicht kontinuierlichen Position der Expansi-

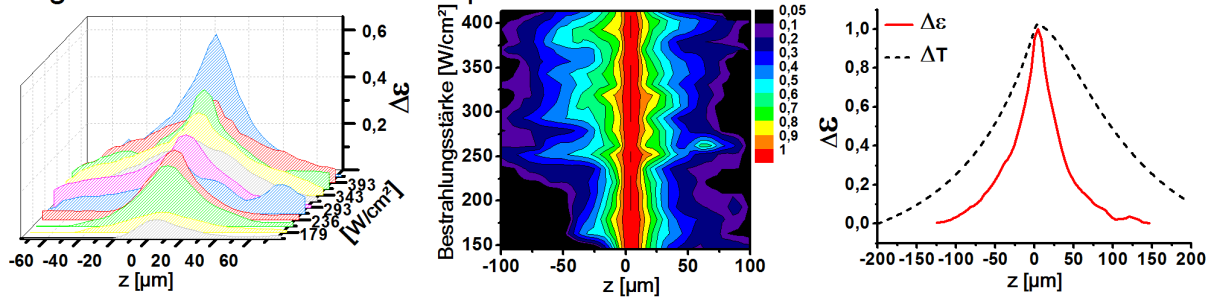
4. Ergebnisse

Bestrahlungszeit	Fleckdurchmesser	Halbwertsbreite
[ms]	[μm]	[μm]
400	200	395
400	100	419
400	50	399
200	200	417
200	100	369
200	50	378
100	200	353
100	100	325
100	50	398
50	200	406
50	100	360
50	50	456

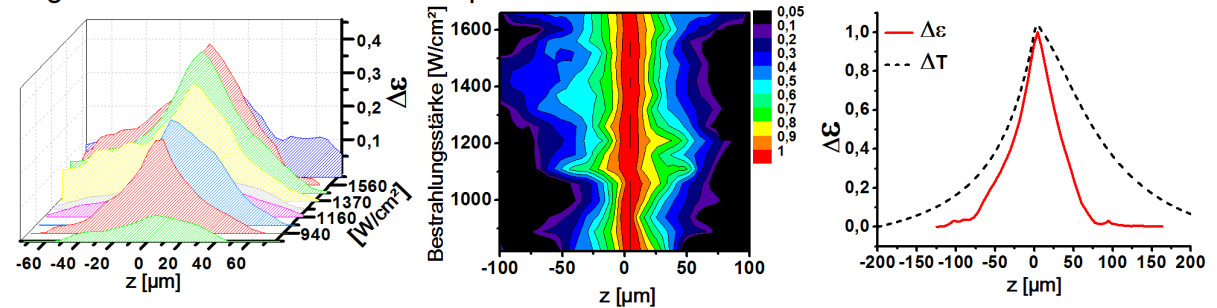
Tabelle 4.5 – Durch Anpassung einer Gaußfunktion bestimmte Halbwertsbreite der lateralen Verschiebungsverteilungen für Fleckdurchmesser von 50 μm bis 200 μm und Bestrahlungszeiten zwischen 50 ms und 200 ms.

on mit fortlaufender Bestrahlung. Deshalb wurde über den Fleckdurchmesser das Expansionsmaxima jedes A-Scans bestimmt und zur Mittelwertbildung numerisch auf eine gemeinsame Tiefenposition gelegt. Da in den ophthalmologisch nicht sichtbaren Bestrahlungen keine lokalen Expansionsmaxima auftraten, konnte dort keine axiale Abhängigkeit der Expansion bestimmt werden. In Abbildung 4.21 ist die Tiefenabhängigkeit der Expansion für sichtbare Läsionen in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke abgebildet. Die Form der Tiefenabhängigkeit der Expansion verändert sich mit steigender Bestrahlungsstärke nicht signifikant. Nach Mittelung der in der Konturdarstellung 4.21 b.) abgebildeten, normierten Expansionsverläufe über die verschiedenen Bestrahlungsstärken, wurde die axialen Expansionsverteilungen mit den theoretisch berechneten Temperaturverteilungen für alle drei Fleckdurchmesser verglichen (Abb. 4.21 c.). Die berechnete Tiefenabhängigkeit der Temperaturerhöhung während der Bestrahlung wird mit kleineren Fleckdurchmessern schmaler, während sich die gemessene Tiefenabhängigkeit der Expansionsbreite mit dem Bestrahlungsfleckdurchmesser nicht ändert.

Auge 1: Fleckdurchmesser 200 μm



Auge 2: Fleckdurchmesser 100 μm



Auge 3: Fleckdurchmesser 50 μm

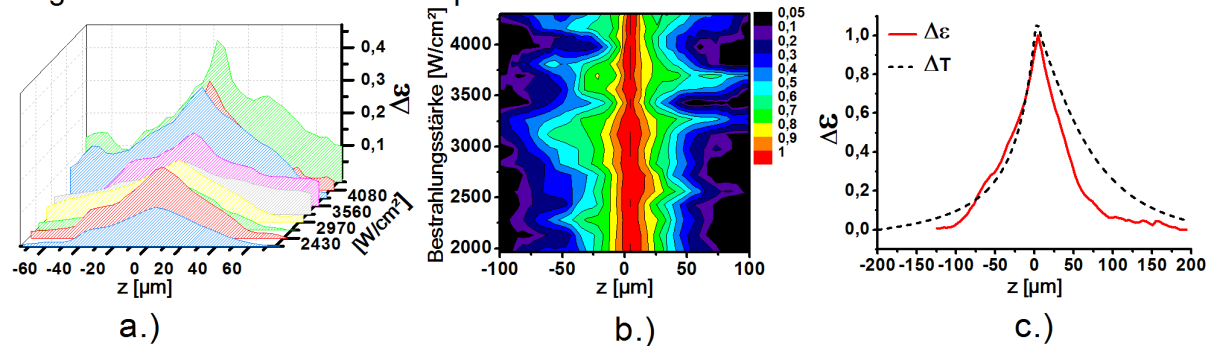


Abbildung 4.21 – a.) Tiefenabhängigkeit der Expansionen im Bereich für ophthalmologisch sichtbare Bestrahlungen, für Fleckdurchmesser von 200 μm , 100 μm und 50 μm . b.) Normierte Expansion in einer Konturdarstellung. c.) Über die normierten Datensätze gemittelter axialer Expansionsverlauf im Vergleich zu den theoretisch berechneten Temperaturverlauf der Expansion.

4.1.5 Histologie

Zur Korrelation der in den B-Scans sichtbaren Streuänderungen und der aus der Phaseninformation berechneten Gewebeverschiebung mit den durch die Koagulation verursachten morphologischen Gewebeeränderungen wurden Histologien von bestrahlten Arealen in einem Auge angefertigt.

Der Fleckdurchmesser und die Koagulationszeit betragen $200\mu\text{m}$ und 400ms . In Abbildung 4.22 ist der Fundus des Auges nach der Bestrahlung dargestellt. Im äußeren Randbereich befinden sich Markerläsionen mit einer Bestrahlungsstärke von 830W/cm^2 . In der Mitte der Marker befindet das drei auf drei Quadrat mit Läsionen zunehmender Bestrahlungsstärke von minimal 110W/cm^2 bis maximal 830W/cm^2 . Die Bestrahlungsstärke wurde so gewählt, dass der gesamte Bereich von sehr starke Koagulationen bis im Fundusbild nicht sichtbaren Läsionen abgedeckt war.

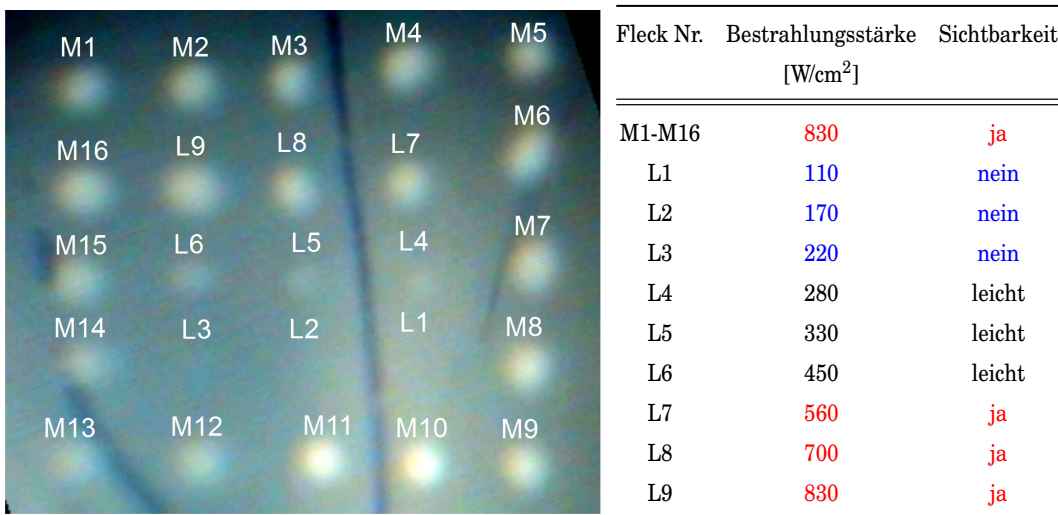


Abbildung 4.22 – Fundusbild des enukleierten Schweineauges nach der Laserbestrahlung zur Gewinnung von Histologien (linke Abbildung). Die Markerläsionen M1-M16 wurden mit einer Bestrahlungsstärke von 830W/cm^2 erzeugt, die Läsionen L1-L9 entstanden mit zunehmender Bestrahlungsstärke. Die Fleckgröße betrug $200\mu\text{m}$, die Bestrahlungsdauer 400ms . Die Bestrahlungsstärke sowie die Sichtbarkeit der Läsionen sind in der Tabelle auf der rechten Seite gegenübergestellt. Gut sichtbare Läsionen sind in rot markiert, leicht sichtbare Läsionen in schwarz und unsichtbare in blau.

Bei der histologischen Präparation war es nicht möglich eine Ablösung des Photorezeptor-Außensegments von dem Pigmentepithel zu verhindern. Abbildung 4.23 zeigt den histologischen Schnitt eines unbestrahlten Areals. Deutlich sichtbar ist die Trennung der

Photorezeptoren von dem RPE. Einen lateralen Versatz der Gewebeschichten wurde hingegen nicht beobachtet.

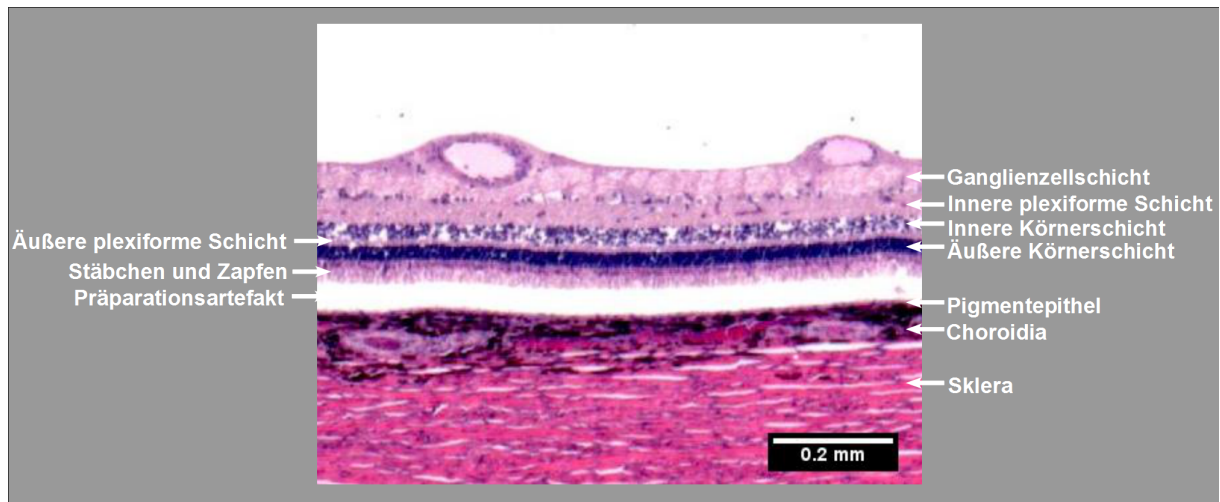


Abbildung 4.23 – Histologie eines unbestrahlten Areals. Sechs relevante neuronalen Netzhautschichten, das Pigmentepithel sowie Choroidea und Sklera sind unterscheidbar. Während der Präparation lösten sich das Photorezeptor Außensegment vom Pigmentepithel, was zu einer Spaltbildung führte. Der Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Für verschiedene Bestrahlungsstärken wurden die histologisch sichtbaren Gewebeveränderungen (Abb. 4.24 c.) mit gemittelten B-Scans über einen Zeitraum von 50 ms nach Ende der Bestrahlung (Abb. 4.24 a.), mit den Fluktuationen der Speckle während der Bestrahlung (Abb. 4.24 b.) und der Verschiebung der neuronalen Retina sowie der Geweboberfläche (Abb. 4.24 d.) verglichen. In den mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Histologie werden die thermischen Gewebeschäden durch eine stärkere Einfärbung sichtbar [Asiyo-Vogel, 1996]. Die koagulierten Areale sind zudem durch morphologische Veränderung der Photorezeptoren gut zu erkennen. In den unbestrahlten Arealen weisen die Photorezeptorzellen alle eine vertikal geordnete Struktur auf. In Bereichen thermischer Gewebeschäden geht die senkrechte Ausrichtung verloren und am Rand der Koagulationszone werden aufgelockerte Bereiche ohne geordnete Zellstruktur sichtbar. Während der Präparation entsteht die Spaltbildung in den koagulierten Arealen nicht mehr zwischen Photorezeptor Außensegment und dem Pigmentepithel, sondern in darüber liegenden retinalen Schichten.

Von den drei ophthalmologisch nicht sichtbaren Bestrahlungen (L1-L3) zeigten sich bei den zwei stärkeren Läsionen histologisch bereits Schäden an den Photorezeptoren. Diese zeigten sich auch in den OCT-Messungen durch eine überproportionale Geweberverschiebung und bei L3 in einer Zunahme des OCT-Signals. Lediglich bei der kleinsten

4. Ergebnisse

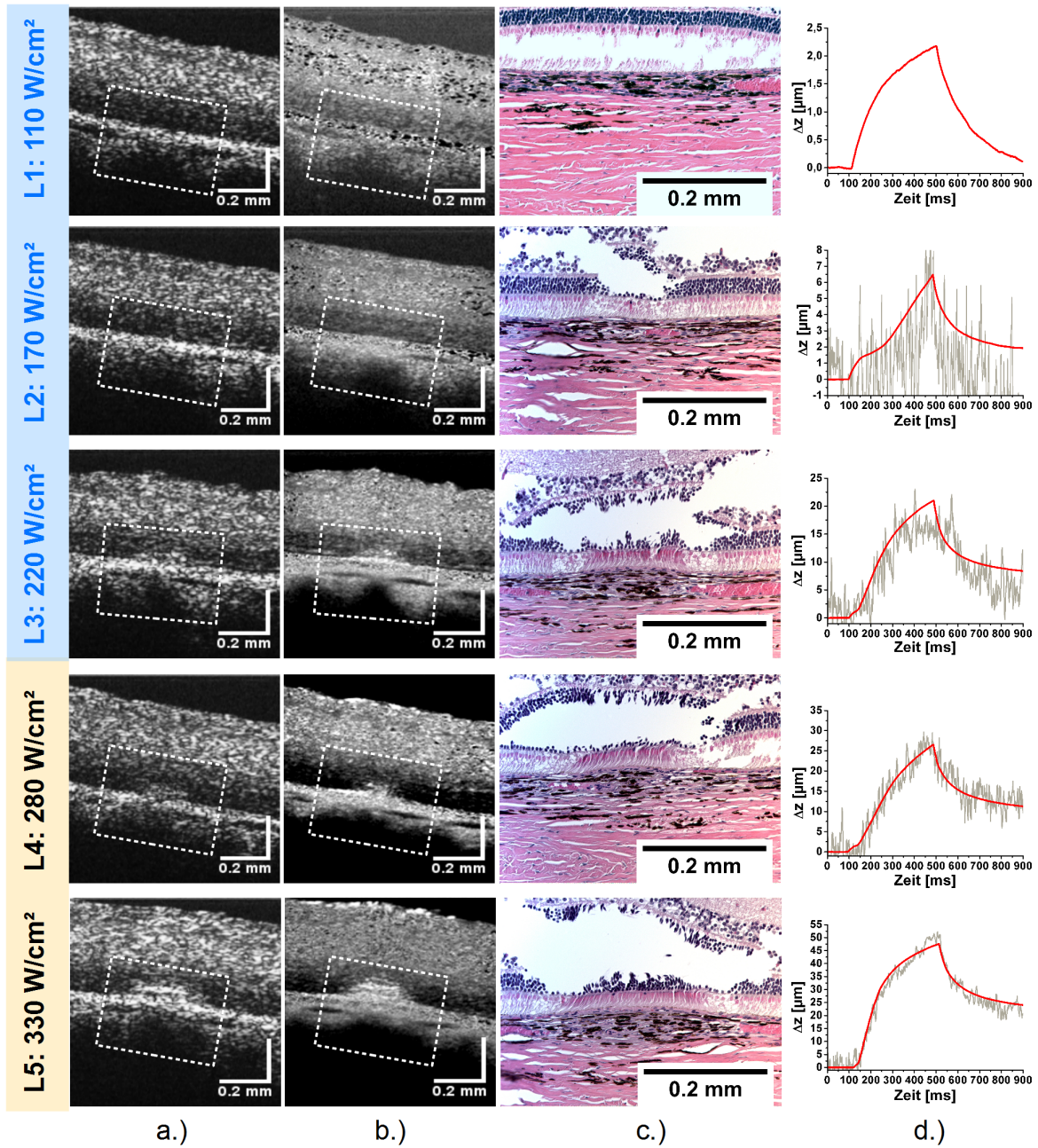


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

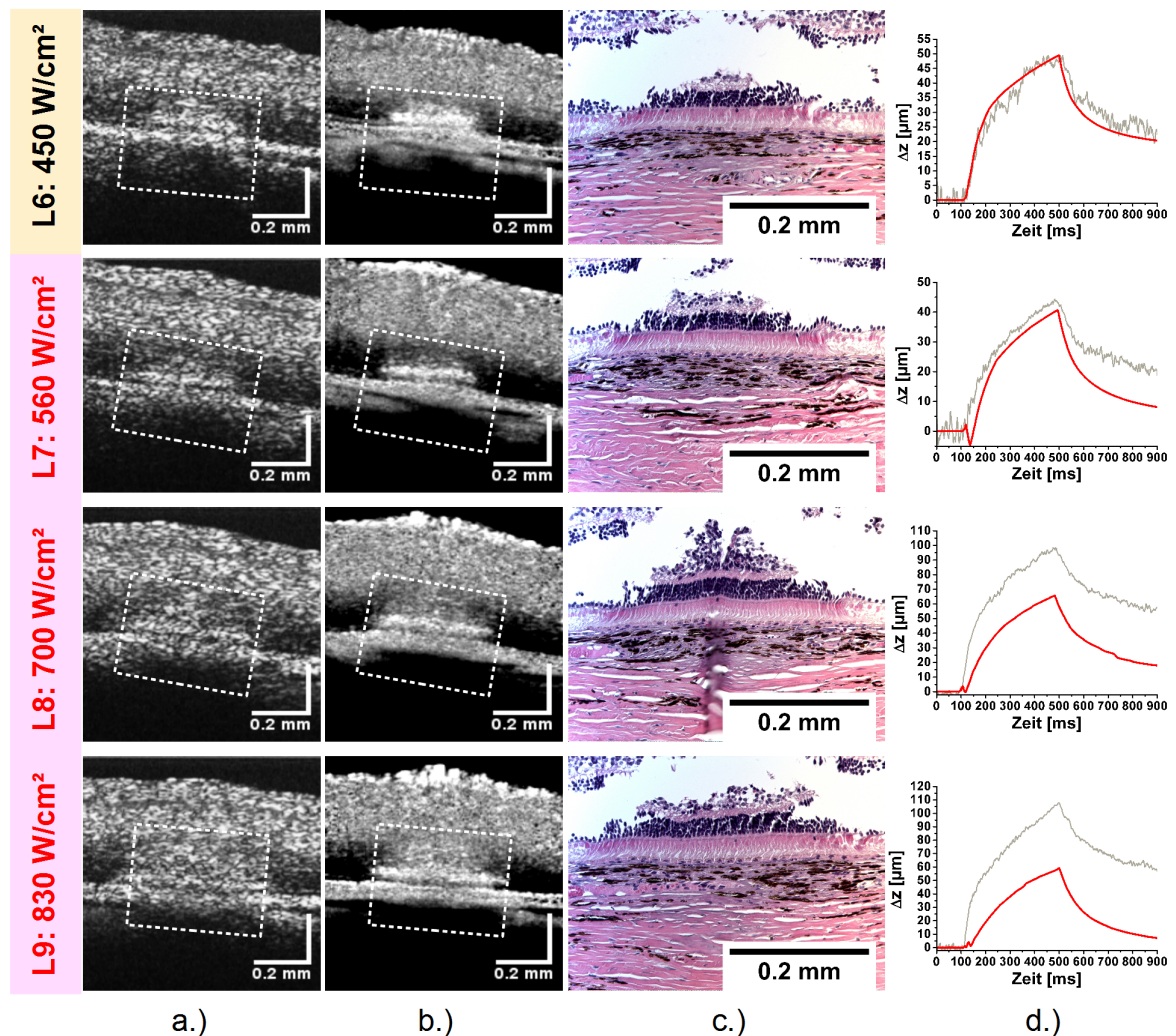


Abbildung 4.24 – Vergleich Histologie mit OCT bei Bestrahlungen von 110 W/cm^2 bis 830 W/cm^2 . a.) über 50 ms nach Ende der Bestrahlung gemittelte B-Scans. b.) Standardabweichung aller B-Scans über den Bestrahlungsverlauf. Eine helle Färbung bedeutet hohe Specklebewegung in dem jeweiligen Areal. Der von der Histologie erfasste Bereich ist in den OCT-Bildern mit einem weißen Quadrat markiert. c.) Histologie der Läsion nach HE-Färbung. d.) Verschiebung Δz in dem bestrahlten Bereich (rote Kurve) und Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s (graue Kurve) während der Bestrahlungszeit.

4. Ergebnisse

Bestrahlungsstärke von 110 W/cm^2 sind in der Histologie und den OCT-Messungen keine Veränderung im Gewebe zu erkennen. Hier zeigt die aus den Phasen berechnete Verschiebung den für thermische Expansion erwarteten, reversiblen Verlauf nach Beendigung der Laserbestrahlung. Bei den nicht ophthalmologisch sichtbaren Läsionen L2 und L3 sowie der schwach sichtbaren Läsion L4 sind die thermischen Schäden auf die Photorezeptorschicht begrenzt. Erst bei stärkerer Bestrahlung dehnt sich der Schaden in die äußere Körnerschicht und die darüber liegenden Gewebeschichten aus. In Tabelle 4.6 und Abbildung 4.25 wurden die axialen und lateralen Ausdehnungen der in OCT und Histologie sichtbaren Gewebeveränderungen gegenübergestellt. Die Abmaße der Läsionen korrelieren relativ gut miteinander. In den OCT-Bildern erscheinen die Läsionen dabei im allgemeinen etwas größer.

Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm^2]	Sichtbarkeit [μm]	Δz_{max} [μm]	$Histo_{Axial}$ [μm]	OCT_{Axial} [μm]	$Histo_{Lat}$ [μm]	OCT_{Lat} [μm]
L1	110	nein	2,2	k.A	k.A	k.A	k.A
L2	170	nein	6,5	40	k.A	70	k.A
L3	220	nein	21	60	70	160	160
L4	280	leicht	27	40	60	170	150
L5	330	leicht	47	60	80	240	230
L6	450	leicht	50	90	100	270	300
L7	560	ja	44	100	120	310	320
L8	700	ja	99	140	140	350	390
L9	830	ja	107	110	160	410	460

Tabelle 4.6 – Vergleich der in der Histologie und der OCT sichtbaren Gewebeveränderungen bei verschiedenen Bestrahlungsstärken. Die durch die Histologien bestimmten axialen ($Histo_{Axial}$) und lateralen ($Histo_{Lat}$) Abmessungen der Gewebeveränderungen korreliert sehr gut mit der, aus den B-Scans bestimmten axialen (OCT_{Axial}) und lateralen (OCT_{Lat}) Ausdehnung der Läsionen. Zusätzlich ist die maximale Verschiebung der Retina Δz_{max} angegeben. Bis zu einer Bestrahlungsstärke von 450 W/cm^2 wurde diese durch Phasenauswertung ermittelt. Ab einer Bestrahlungsstärke von 450 W/cm^2 konnten die Phasendifferenzen nicht mehr korrekt entfaltet werden und die Verschiebung für die höheren Bestrahlungsstärken durch Detektion der retinalen Oberfläche bestimmt.

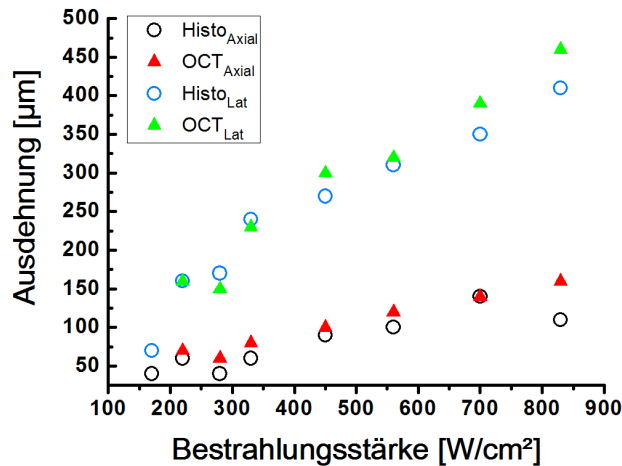


Abbildung 4.25 – Mit steigender Bestrahlungsstärke nimmt die axiale und laterale Ausdehnung der Schädigung in der Histologie ($Histo_{Axial}$, $Histo_{Lat}$) als auch in der OCT-Bildgebung (OCT_{Axial} , OCT_{Lat}) zu. Der Fleckdurchmesser und die Koagulationszeit für diese Messreihe betragen konstant 200 µm und 400 ms.

4.2 *In-vivo*-Messungen am Kaninchenauge

In-vivo-Messungen wurden an drei Kaninchen (Tab. 4.7), mit unterschiedlichen Bestrahlungsparametern durchgeführt. Die Messungen waren wegen der durch die Anästhesie begrenzten Messzeit und unvermeidbarer *In-vivo* -Bewegungen der Retina, verglichen mit den *Ex-vivo*-Messungen, in ihrer Qualität deutlich eingeschränkt (Abb. 4.26).

Versuchsreihe Nr.	Datum	Kaninchen	Auge	Fleckgröße [µm]	Bestrahlungsdauer [ms]	Läsionen Anzahl
1	05.07.2010	Karola	rechts	133	500	34
2	04.11.2010	Gundula	rechts	133	variabel	31
3	04.11.2010	Gundula	links	133	variabel	20
4	22.12.2011	Rüdigerin	rechts	133	variabel	72

Tabelle 4.7 – Durchgeführte Tierversuche mit Anzahl der gemessenen Läsionen

Von über einhundert aufgenommenen einzelnen Bestrahlungen der Retina waren nur etwa 50% verwertbar. Die Qualität der OCT-Bilder war, vor allem in den peripheren Bereichen des Auges, deutlich schlechter als bei den enukleierten Schweineaugen. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis im Bereich der Photorezeptorschicht reduzierte sich im Vergleich zu den enukleierten Schweineaugen um 7 dB, im peripheren Bereich sogar um 18 dB. Somit konnten nur bei einem optimalen und zentralen Durchgang des OCT-Strahls durch

4. Ergebnisse

das Auge, eine für die Auswertung ausreichende Signalqualität erreicht werden. Durch die Atmung und den Herzschlag des Tieres hervorgerufene Untergrundbewegungen erzeugten zudem einen Geschwindigkeitsgradient über das gesamte Bildfeld, der durch Subtraktion eines linearen Phasengradienten der angepassten Geraden von den Messdaten korrigiert wurde (Abb. 4.27). Dies ermöglichte eine quantitative Auswertung der Koagulationen *in vivo*.

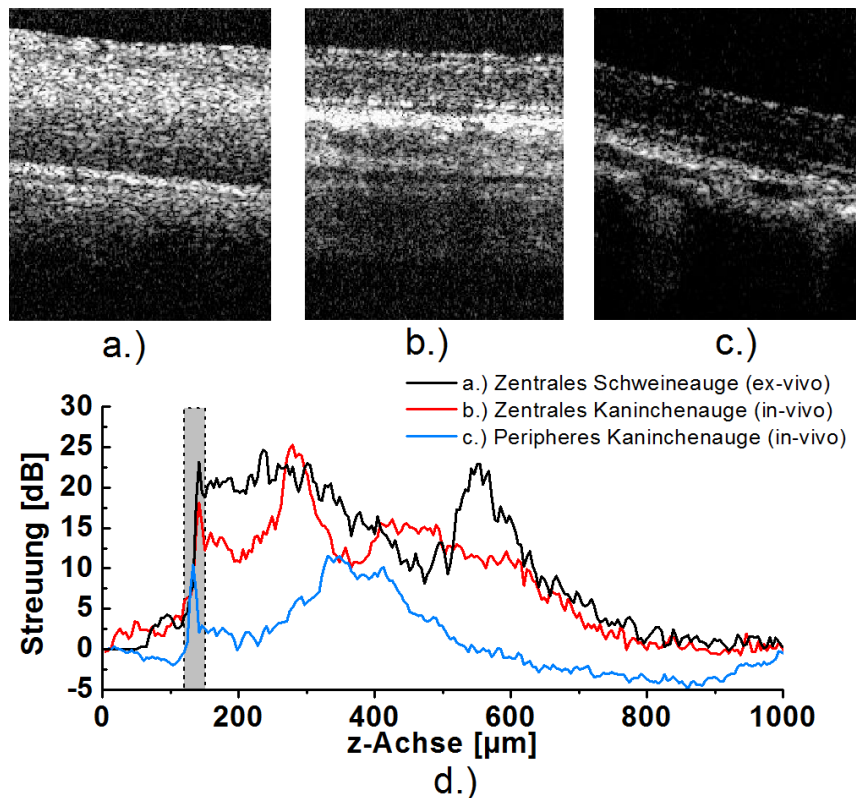


Abbildung 4.26 – a.) Zentrale Messung am Schweineauge *ex vivo*. b.) Zentrale Messung am Kaninchenauge *in vivo*. c.) Periphere Messung am Kaninchenauge *in vivo*. d.) Über den Scanbereich gemittelte A-Scans der in Abbildung a.) - c.) dargestellten Vergleichsmessungen. Der grau hinterlegte Bereich zeigt die gemeinsame Position der jeweiligen Retinaoberflächen.

Beispielhaft ist folgend eine Serie von Koagulationen verschiedener Bestrahlungsstärke, mit einem Fleckdurchmesser von 133 μm sowie einer Bestrahlungszeit von 500 ms dargestellt. Abbildung 4.28 zeigt auf der linken Seite das Fundusbild mit den 26 Laserexpositionen, sowie die zugehörige Fluoreszenzangiographie. Die Sichtbarkeit der Koagulationen wurde im Fundusbild und in der Angiographie beurteilt (Tabelle in 4.28). Schwache Läsionen waren in der Angiographie zwar kontrastreicher als im Fundusbild sichtbar, die Beurteilung stimmte aber trotzdem recht gut überein. Es wurde in der Angiographie nur eine Läsion (63 W/cm^2) zusätzlich als Schädigung klassifiziert. Unterhalb einer Be-

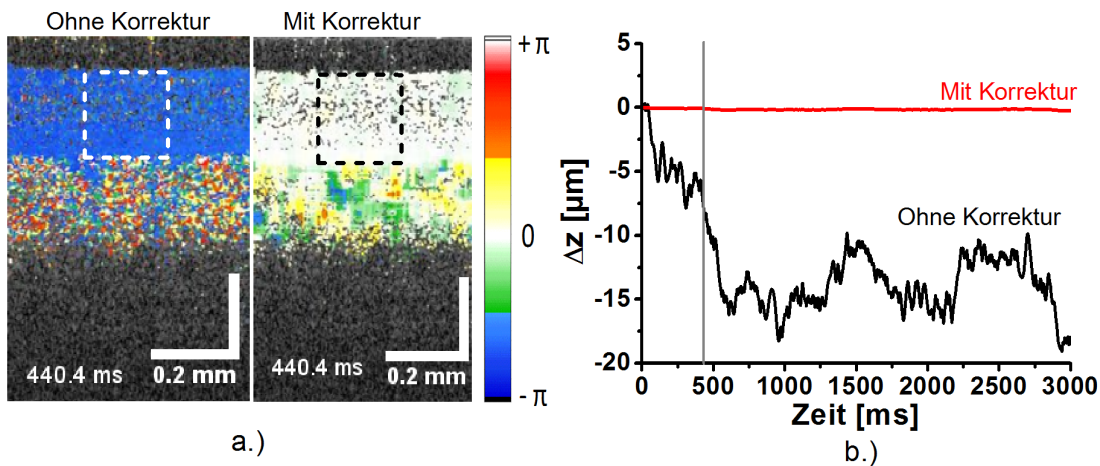


Abbildung 4.27 – OCT-Aufnahme über 3 Sekunden ohne Bestrahlung der Retina. a.) Phasendifferenzbild nach 440 ms ohne Korrektur (links), und mit durchgeführter Korrektur (rechts). b.) Verschiebung der Retina Δz in dem markierten Bereich über einen Zeitraum von 3 Sekunden. Die vertikale graue Linie markiert den Zeitpunkt der beiden Abbildungen.

strahlungsstärke von 59 W/cm^2 waren die bestrahlten Areale weder im Fundusbild noch in der Angiographie vom umliegenden Gewebe unterscheidbar.

Der Einfluss von *In-vivo*-Bewegungen wurde schon bei den gemittelten M-Scans sichtbar, die sich aus der Mittelung über alle A-Scans im bestrahlten Bereich, der in Abbildung 4.29 durch die zwei weißen gestrichelten Linien gekennzeichnet ist, ergab. Die Oberfläche und die unterschiedlichen Schichten der Retina zeigen Verschiebungen in z-Richtung während der Messung.

Schichten der inneren Retina sind in den Kaninchenaugen, im Gegensatz zu den Schweineaugen, schwach unterscheidbar. In den B-Scans gut zu erkennen sind darüber hinaus die Innensegment-/Außensegment-Verbindung der Photorezeptoren, das Retinale Pigmentepithelium sowie die unterliegenden Blutgefäße der Choroidea und die abschließende Sklera. Um Veränderungen in der Streuung in den verschiedenen Schichten der Retina besser sichtbar und auswertbar zu machen, wurde die Retinaoberfläche in den einzelnen gemittelten A-Scans bestimmt und mitsamt den A-Scans numerisch auf eine gemeinsame Position im Bildfeld verschoben. Die Oberfläche wurde quasi "glatt gezogen".

Für die visuell im Fundusbild nicht- und leicht sichtbaren Läsionen mit Bestrahlungsstärken von 43 W/cm^2 bis 78 W/cm^2 , waren in den gemittelten B- und M-Scans keine Veränderungen in der Streuung oder Struktur der Retina sichtbar. Ab einer Bestrahlungsstärke von 94 W/cm^2 wurde der in den B-Scans gut zu erkennende Übergang zwischen

4. Ergebnisse

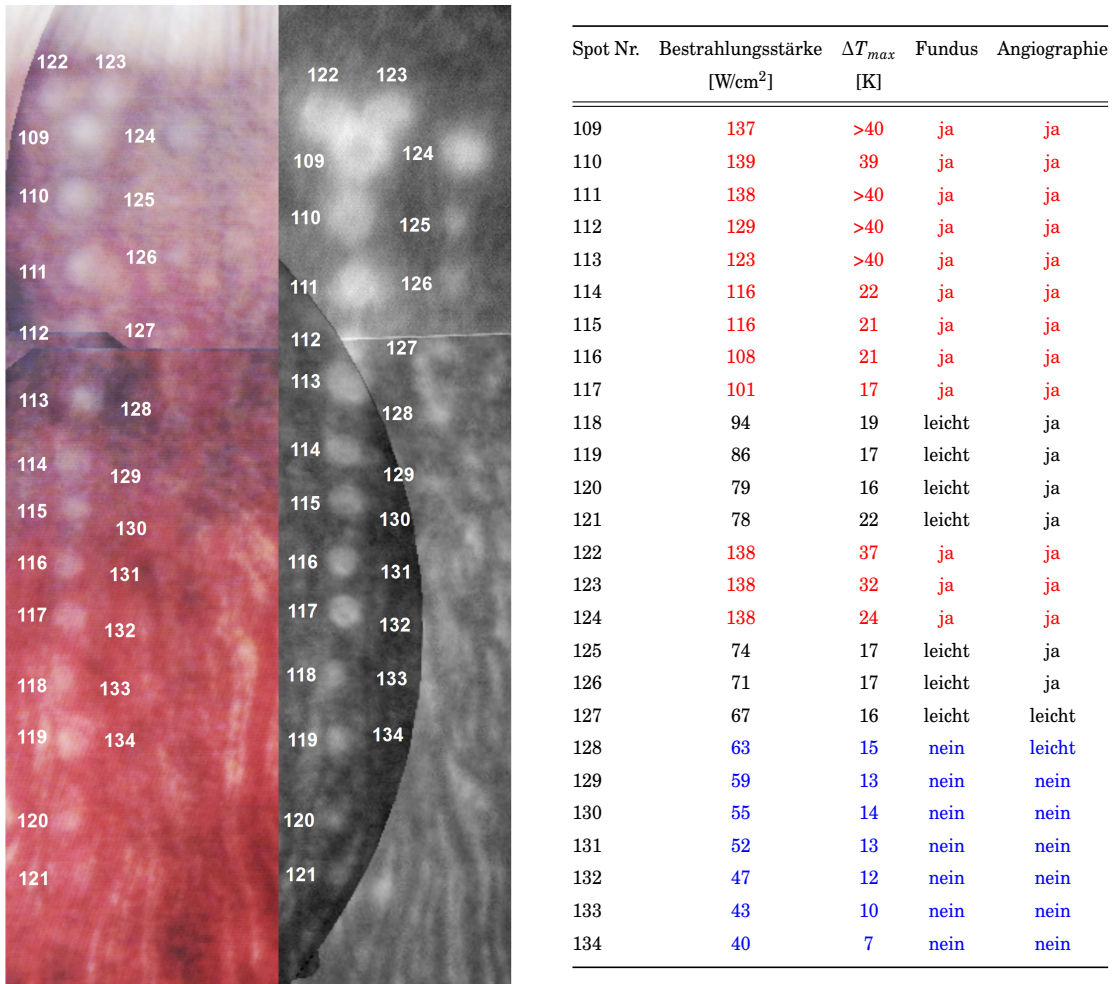


Abbildung 4.28 – Fundusbild und Fluoreszenzangiographie des Kaninchenauges nach der Laserbestrahlung mit verschiedenen Bestrahlungsstärken (linke Abbildung). Die Fleckgröße betrug $133\ \mu\text{m}$, die Bestrahlungsdauer $600\ \text{ms}$. Die Bestrahlungsstärke E , optoakustisch bestimmte Maximaltemperatur ΔT_{max} sowie die Sichtbarkeit der Läsionen im Fundusbild und in der Angiographie sind in der Tabelle auf der rechten Seite gegenübergestellt. Im Fundusbild gut sichtbare Läsionen sind in rot markiert, leicht sichtbare Läsionen in schwarz und nicht sichtbare in blau.

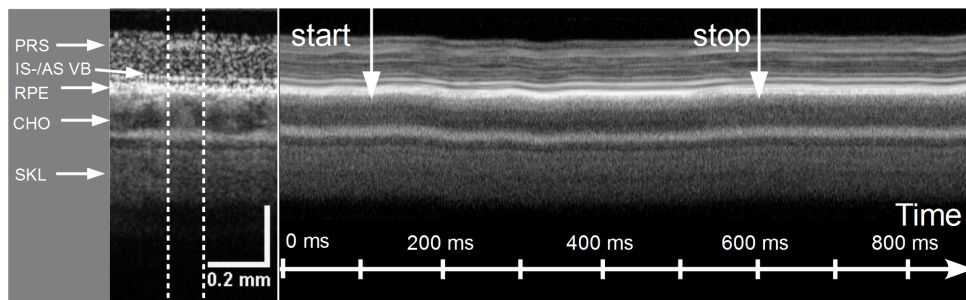


Abbildung 4.29 – Gemittelter M-Scan der Bestrahlung Nummer 130 (Bestrahlungsstärke 55 W/cm^2). Ohne axiale Bewegungskorrekturen sind die axialen Bewegungen durch Atmung und Herzschlag des Tieres gut zu erkennen. Retinale Strukturen sind markiert als PRS: Nervenfaserschicht und Photorezeptorschicht, IS-/AS VB: Innensegment-/ Außensegment Verbindung, RPE: Retinales Pigmentepithelium, CHO: Choroidea, SKL: Sklera

dem Innensegment und dem Außensegment der Photorezeptoren nach der Bestrahlung unterbrochen (Abb. 4.30). Eine signifikante Zunahme der Streuung konnte hingegen auch bei den stärksten Koagulationen nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich bei der stärksten Läsion während der Laserexposition zuerst eine leichte Abnahme des OCT-Signals (Abb. 4.31). Erst nach dem Abschalten des Lasers nimmt die Streuung über dem RPE zu. Im gemittelten B-Scan nach der Exposition eine leichte Erhöhung der Streuung sichtbar.

Die Berechnung der axial und lateral aufgelösten Verschiebung erfolgt äquivalent zu den Auswertungen der *Ex-vivo*-Versuchsreihen, durch eine zeitliche Integration über die bewegungskorrigierten Phasendifferenzen. In Abbildung 4.32 a. ist die räumliche Verteilung der Gewebeverschiebung Δz , kurz vor dem Abschalten des Koagulationslasers dargestellt. Die laterale Ausdehnung der Verschiebung (Abb. 4.32 b.) liegt mit einer Halbwertsbreite von durchschnittlichen $230 \mu\text{m}$ über den bestrahlten Fleckdurchmesser von $133 \mu\text{m}$. Zum Vergleich der Verschiebung mit den optoakustischen Temperaturverläufen wurde die mittlere Verschiebung innerhalb des weiß markierten Bereichs berechnet (Abb. 4.32 c.). Trotz physiologischer Bewegung war es auch bei der geringsten Bestrahlungsstärke möglich, eine Verschiebung des Gewebes von weniger als $1,5 \mu\text{m}$ aus den gemessenen Phasen zu bestimmen. Die Übereinstimmung zwischen der zeitlichen Entwicklung von Verschiebung und Temperatur ist jedoch deutlich schlechter als bei den Experimenten mit enukleierten Schweineaugen. Insbesondere ist die Verschiebung nach Ende der Bestrahlungszeit nicht reversibel und verharrt auch unterhalb der Koagulationsschwelle auf einem Niveau über einem Mikrometer. Auch oberhalb der Koagulationsschwelle folgt die Verschiebung im wesentlichen dem Temperaturverlauf. Die Dena-

4. Ergebnisse

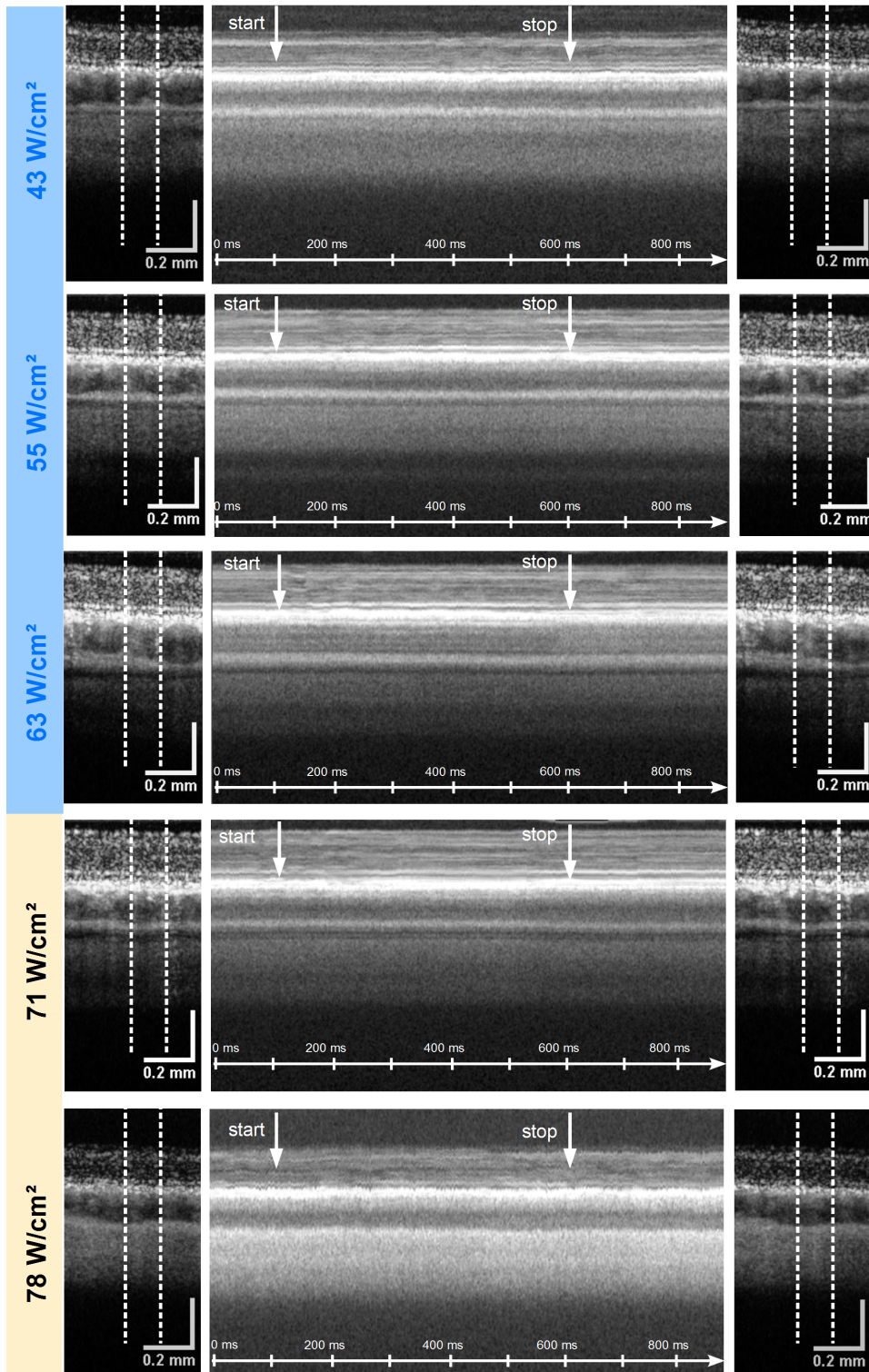


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

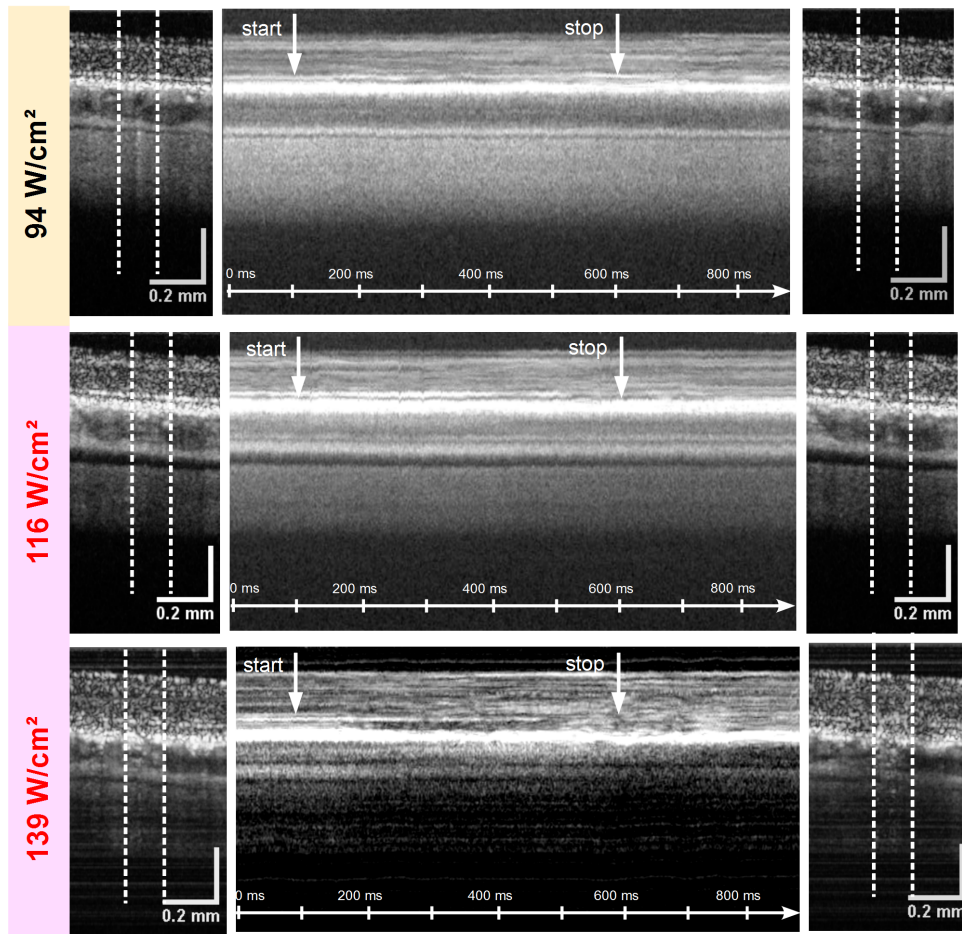


Abbildung 4.30 – OCT-Bild vor (links) und nach (rechts) der Bestrahlung für die Bestrahlungsstärken von 43 W/cm^2 bis 139 W/cm^2 . Der Bereich der Lasereexposition ist mit zwei vertikalen Linien markiert. Durch das laterale Mitteln über den bestrahlten Bereich wurden M-Scans (gemittelter A-Scan über die Zeit) berechnet (mitte). Zunahme der Streuung in der Photorezeptorschicht ΔS_{PRS} (schwarz) und Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s (rot) während der Bestrahlung sind in der rechten Spalte dargestellt.

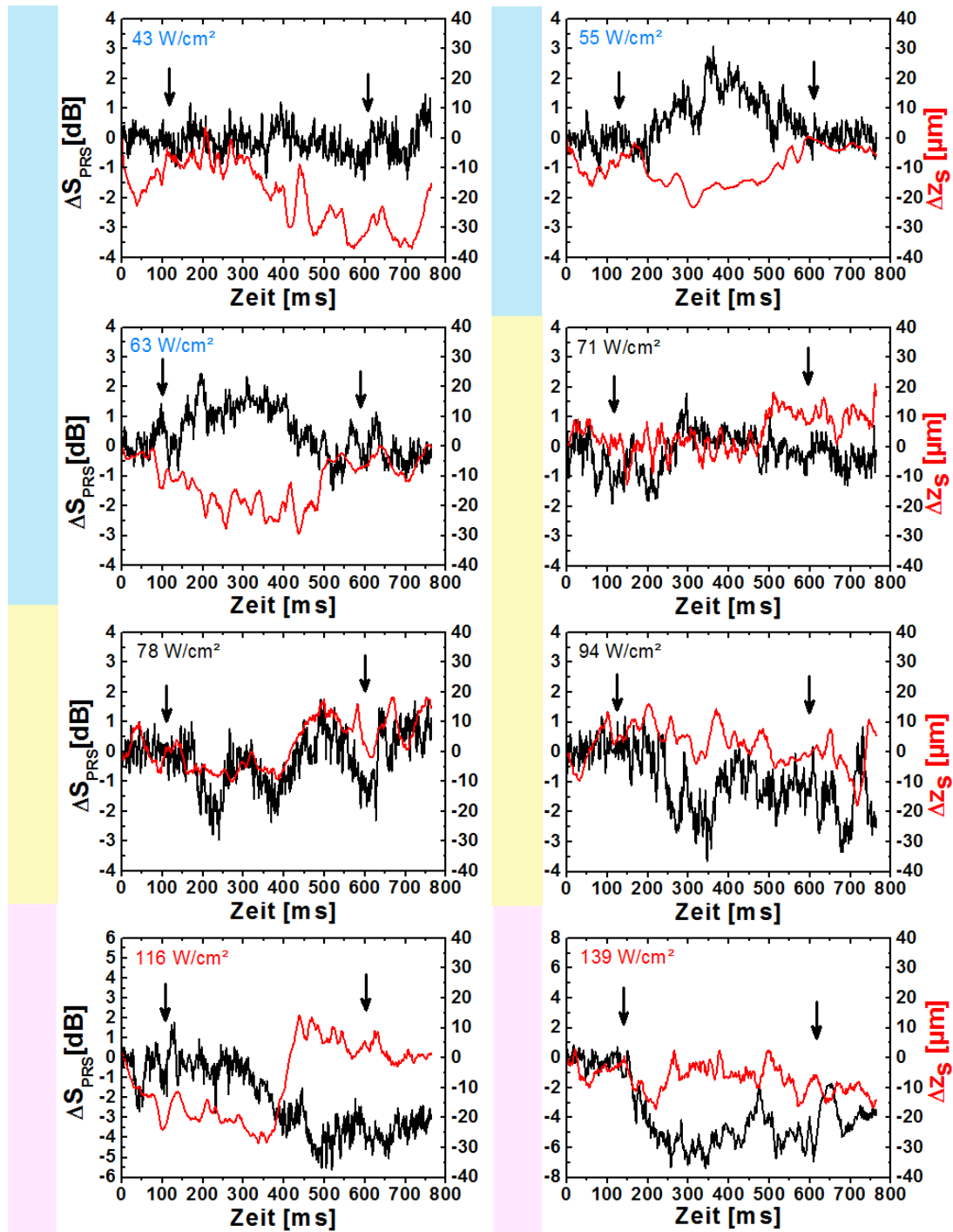


Abbildung 4.31 – Zunahme der Streuung in der Photorezeptorschicht ΔS_{PRS} (schwarz) und Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s (rot) während der Bestrahlung. Der Anschlag- und Abschaltzeitpunkt des Bestrahlungslasers sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die farbige Markierung auf der linken Seite gibt Zuordnung zu den drei Sichtbarkeitsbereichen an.

turierung des Gewebes erzeugt auch bei den im Fundusbild sichtbaren Koagulationen keinen signifikanten zusätzlichen Beitrag zur Verschiebung, welcher zu einer deutlichen Abweichung des Verschiebungsverlaufs vom Temperaturverlauf führen würde. Die laterale Ausdehnung der Verschiebung zeigt mit einsetzender Denaturierung des Gewebes eine veränderte Kurvenform im Zentrum des bestrahlten Areals (Abbildung 4.32 b.). Die Halbwertsbreite der lateralen Ausdehnung reduziert sich dabei von unterschwellig $230\ \mu\text{m}$ auf durchschnittlich $85\ \mu\text{m}$ (Abb. 4.32).

Die Expansion des Gewebes im bestrahlten Bereich ist für Bestrahlungsstärken von $43\ \text{W}/\text{cm}^2$ bis $73\ \text{W}/\text{cm}^2$ kaum von dem umliegenden, nicht bestrahlten Gewebe zu unterscheiden (Abb. 4.32 d.). Ab einer Bestrahlungsstärke von $94\ \text{W}/\text{cm}^2$ ist die Expansion gut sichtbar und bleibt lateral auf den Fleckdurchmesser begrenzt. Der Expansionsverlauf über die Zeit (Abb. 4.32 e.) weist auch bei den kleinsten Bestrahlungsstärken einen Anstieg der Expansion während der Bestrahlungszeit auf.

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den *Ex-vivo*- und *In-vivo*-Messungen ergibt sich in dieser Messreihe bei den hohen Bestrahlungsstärken ab einem Wert von $123\ \text{W}/\text{cm}^2$. In Abbildung 4.32 a.) und b.) ist bei einer Bestrahlungsstärke von $139\ \text{W}/\text{cm}^2$ zu erkennen, dass sich um den positiven Maximalwert, in dem auch eine Veränderung in der Streuung beobachtet wurde, ein ringförmiger Bereich mit negativen Verschiebungen bildet. Diese entsprechen einer Bewegung des Gewebes in Richtung der Choroidea. Die während der Bestrahlungsdauer erreichte Verschiebung bleibt im Vergleich zum Temperaturverlauf weit unter dem aus den *Ex-vivo*-Experimenten erwarteten Wert. Ein sofortiger Abfall der gemittelten Verschiebung in den negativen Wertebereich erfolgt, bei dieser Messung, kurz nach dem Einschalten des Bestrahlungslasers. Erst nach $130\ \text{ms}$ bewegt sich das Gewebe von der Choroidea weg. Die Verschiebung erreicht jedoch nicht mehr den aus dem Temperaturverlauf erwarteten Maximalwert von $> 5\ \mu\text{m}$.

Aus den Verschiebungsverläufen und Expansionsverläufen der gesamten Messreihe wurden die jeweiligen Maximalwerte bestimmt und in Abbildung 4.33 a.) - d.) in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke sowie der Temperatur aufgetragen. Die Halbwertsbreite der laterale Ausdehnung der Verschiebung wurde durch die Anpassung einer Gauß-Verteilung an die gemessenen Verteilungen bestimmt und in Abbildung 4.33 e.) und f.) in Abhängigkeit von Bestrahlungsstärke und Temperatur dargestellt.

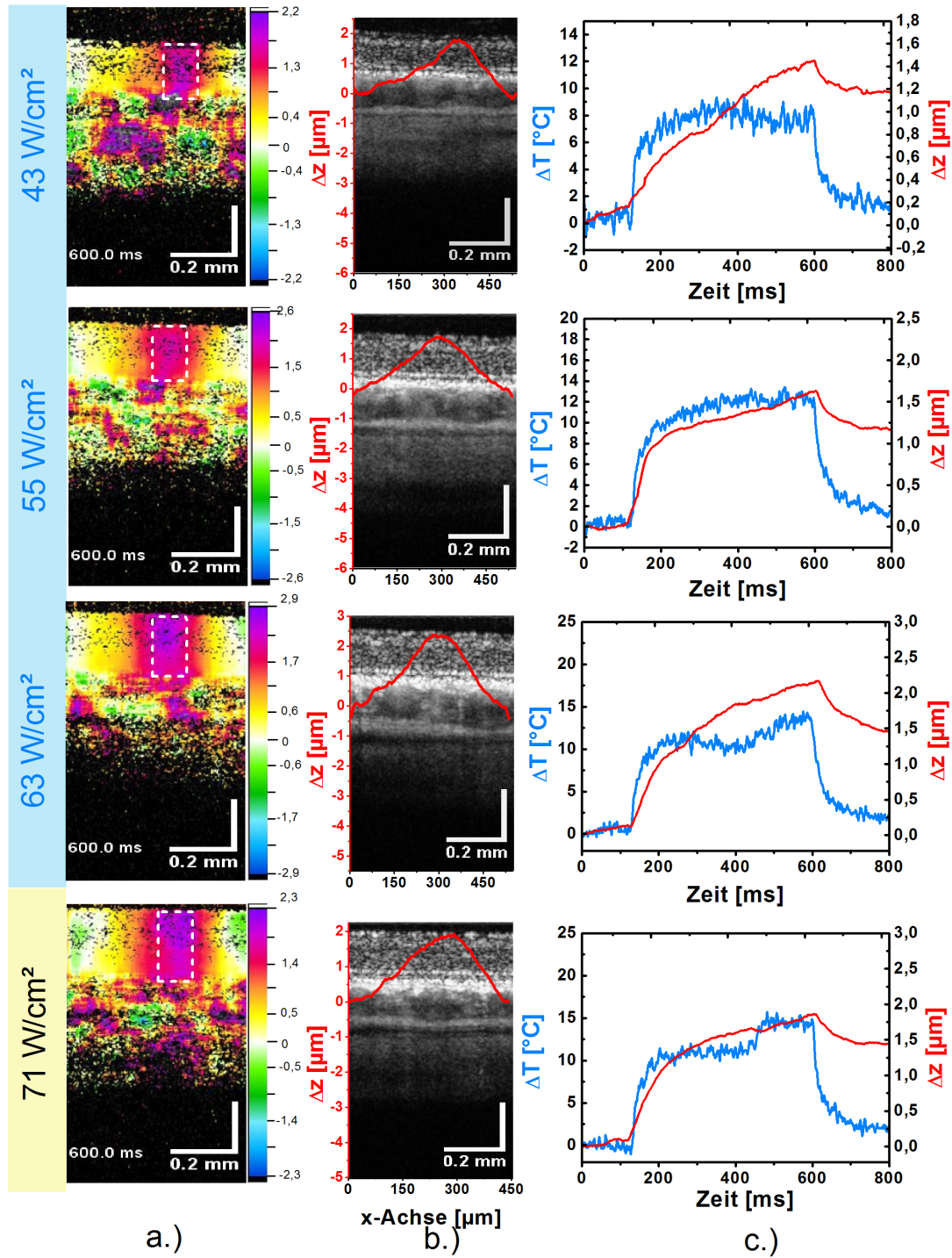


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

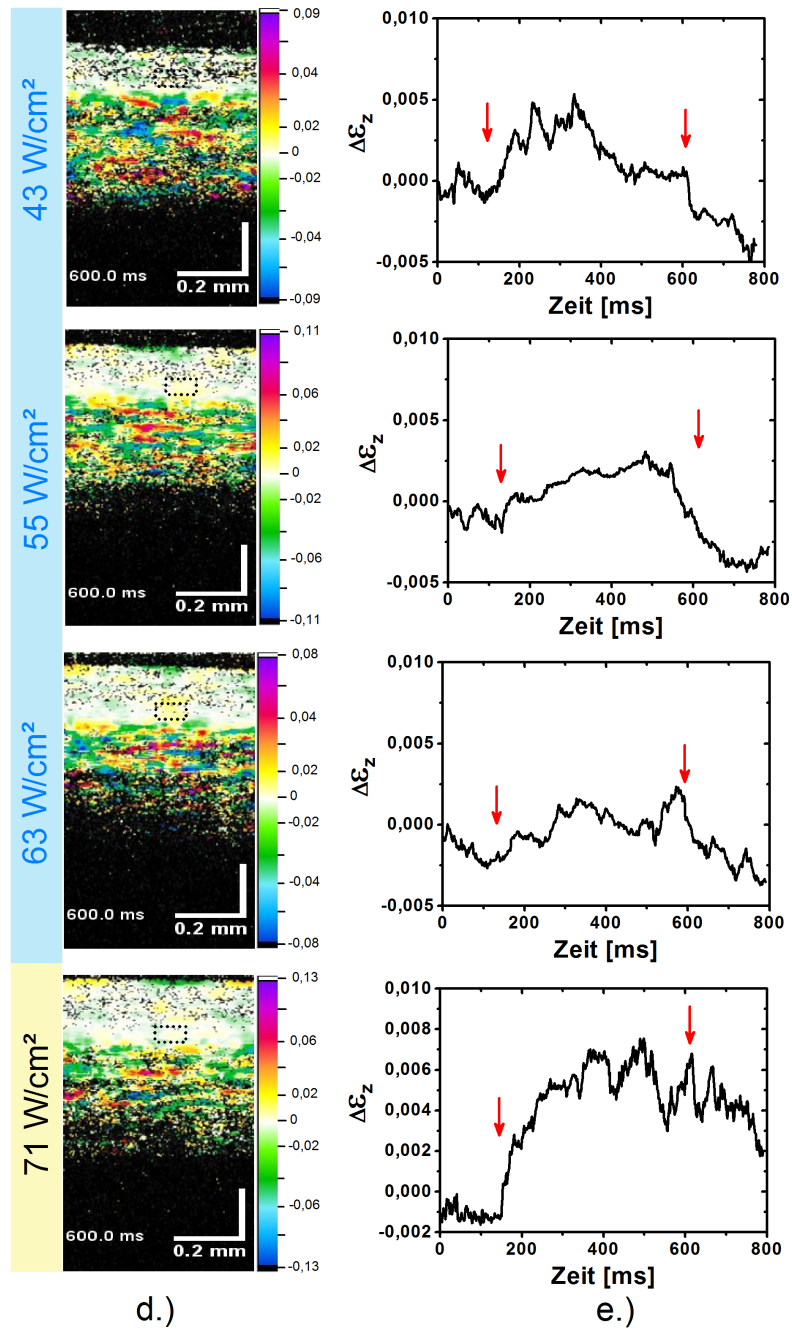


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

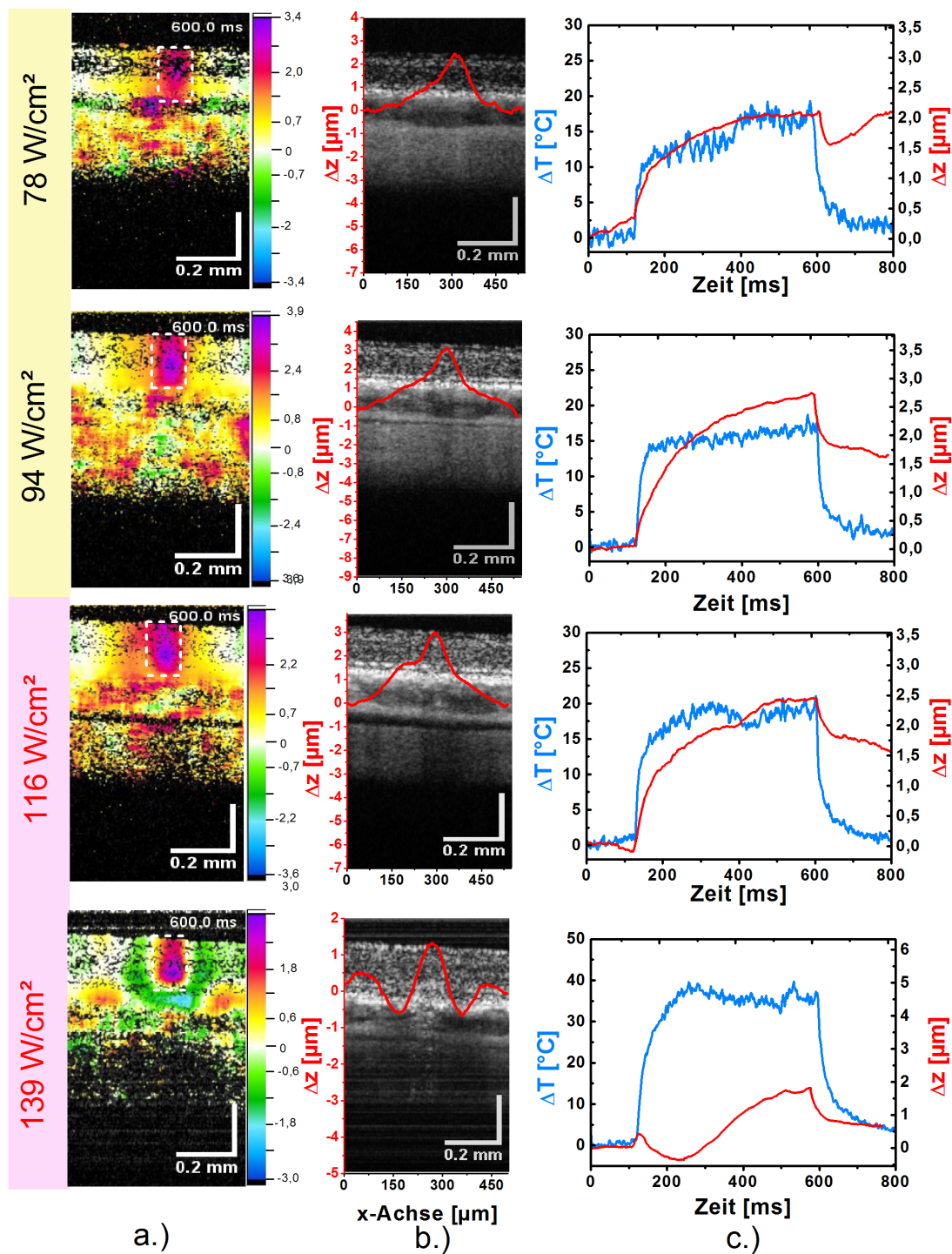
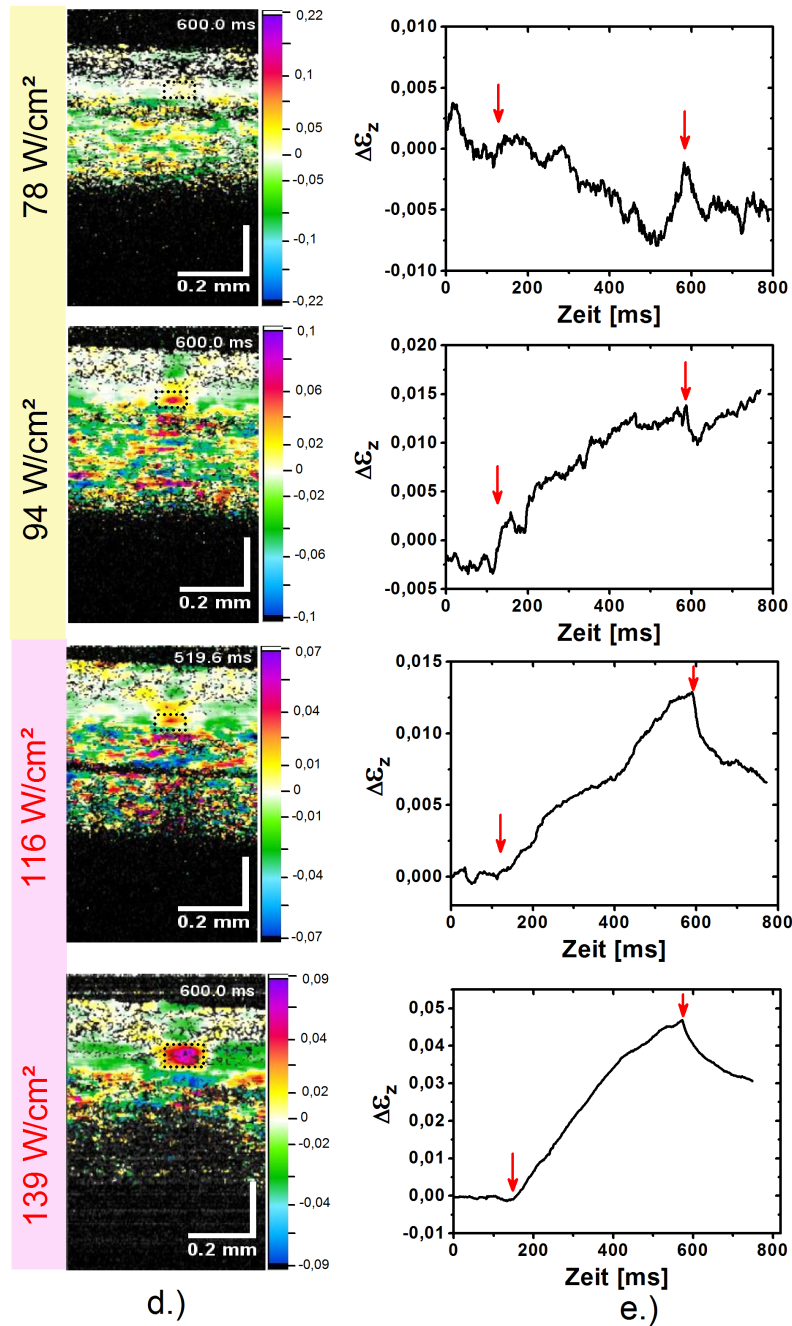


Abbildung 4.32 – a.) Verschiebung des Gewebes Δz für Bestrahlungsstärken von 78 W/cm^2 bis 139 W/cm^2 . Zum Vergleich mit den optoakustischen Temperaturverläufen erfolgte eine Mittelung der absoluten Verschiebung über den weiß markierten Bereich. b.) Laterales Profil der Verschiebung (rot) gemittelt über den Bereich der Netzhaut, überlagert mit den zugehörigen B-Scans. c.) Temperaturanstieg (blau) und Verschiebung in dem bestrahlten Bereich Δz (rot) in Abhängigkeit der Zeit.



d.) Berechnete Expansion. e.) Expansionsverlauf $\Delta\epsilon_z$ über die Zeit. Ein- und Ausschaltzeitpunkt des Bestrahlungslasers sind mit roten Pfeilen markiert.

4. Ergebnisse

Die spezifische Verschiebung unterhalb der Koagulationsschwelle steigt mit 92 nm/K an. Die lineare Anpassung und schneidet die y-Achse allerdings mit einem Achsenabschnitt von 0,6 μm . Ab einer Bestrahlungsstärke von 120 W/cm² bzw. einer Temperaturdifferenz von 30 K nimmt die Verschiebung ab statt zu. Die spezifische Expansion steigt dagegen auch in diesem Bereich, mit $1,5 \cdot 10^{-4}$, weiter an. Die Halbwertsbreite der lateralen Verschiebungsausdehnung nimmt mit einsetzender Gewebedenaturierung ab.

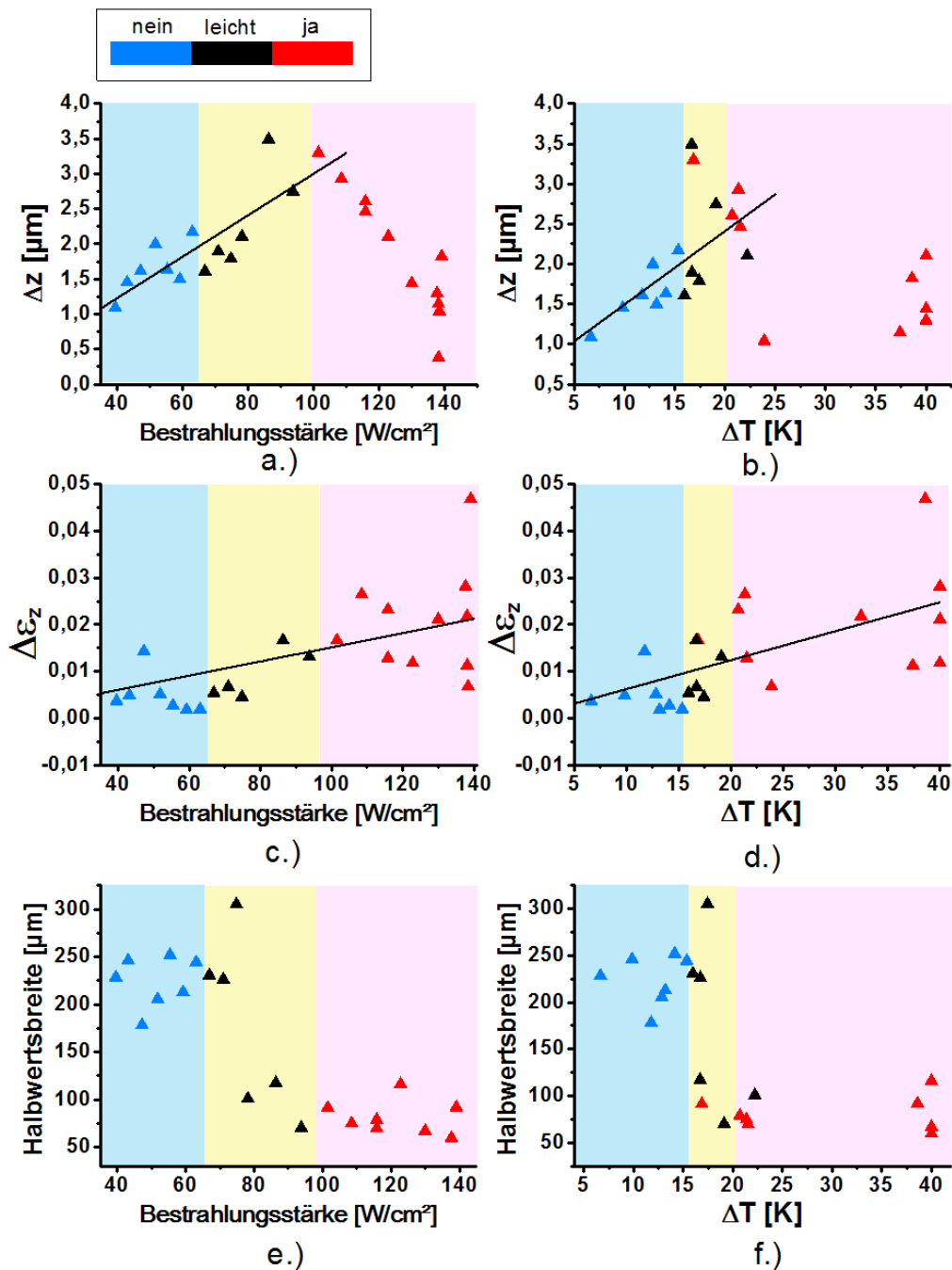


Abbildung 4.33 – a.) Verschiebung Δz_{max} der Retina in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. b.) Verschiebung der Retina in Abhängigkeit der Temperatur. c.) Expansion im Bereich des RPE $\Delta \epsilon_{zmax}$ in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. d.) Expansion im Bereich des RPE in Abhängigkeit der Temperatur. e.) Halbwertsbreite der lateralen Ausdehnung der Verschiebung in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. f.) Halbwertsbreite der lateralen Ausdehnung der Verschiebung in Abhängigkeit der Temperatur.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung temperaturinduzierter Veränderungen in retinalem Gewebe während der Photokoagulation mittels Optischer Kohärenztomographie (OCT). Es sollte zudem die Möglichkeit einer Dosimetrie durch eine OCT-Messung während der Bestrahlung geprüft werden. Dazu wurden erstmalig ein schnelles OCT-Gerät mit einem Laser zur Photokoagulation der Retina und einer optoakustischen *In-vivo*-Temperaturmessung kombiniert.

Nach Erstellung des Aufbaus wurden umfangreiche *Ex-vivo*-Versuche an enukleierten Schweineaugen durchgeführt. Die mittels OCT vermessenen, temperaturinduzierten Veränderungen der Retina, konnten durch Vergleich mit Fundusbildern, den Temperaturverläufen während der Bestrahlung und mit Histologien klassifiziert werden. Anschließend erfolgten erste *In-vivo*-Messungen an Kaninchenretina, welche mit dem Fundusbild beziehungsweise der Fluoreszenzangiographie und den optoakustisch gemessenen Temperaturverläufen verglichen werden konnten.

5.1 Aufbau

Basierend auf einer Laserspaltlampe wurde ein Aufbau für OCT-Messung der Retina erstellt und charakterisiert, der OCT- und Temperaturmessungen während einer Photokoagulationen ermöglicht.

OCT-Aufbauten zur Messung der Gewebereaktionen durch Laserbestrahlung wurden bereits von mehreren Gruppen beschrieben. Die Messung erfolgte dabei an Blut, Gewebeproben und in einer speziellen Messkammer an den kutanen Gefäßen des Hamsters. Mit Time-Domain-OCT durchgeführten Arbeiten wurden mit einer maximalen Messgeschwindigkeit von 800 A-Scans pro Sekunde durchgeführt [Barton et al., 2001, Black et al., 2005]. Sie zeigen, dass eine Untersuchung von Gewebe während der Photokoagulation prinzipiell möglich ist, konnten aber wegen der geringeren Messgeschwindigkeit und der mangelnden Phasenstabilität die Koagulation von Blut und den Verschluss von Blutgefäßen durch Laserbestrahlung nur als eine Veränderung der Streuung in den B-Scans mit einer Zeitauflösung von maximal 30 Hz darstellen. Durch die Einführung schnellerer Fourier-Domain-OCT-Systeme wurde es später möglich, durch Phasenauswertung auch

die Gewebewebungen bei laserinduzierte Photokoagulation der Gewebe zu untersuchen [Vakoc et al., 2007]. Bei einer Messgeschwindigkeit von 10.000 A-Scans pro Sekunde konnten *ex vivo* nur M-Scans, d.h. Folgen einzelner A-Scans am gleichen Ort, gezeigt werden. Erst die in dieser Arbeit realisierte Messgeschwindigkeit von 220 kHz erlaubt es, sowohl die Änderungen der Streuung, als auch über die Auswertung der Phasendifferenzen, die Bewegungen des Gewebes mit ausreichender Zeitaufösung zu messen. Eine parallele Messung der Temperatur, wie sie in dieser Arbeit durch die optoakustische Messungen realisiert wurde, war bisher nicht möglich.

Die erreichte Sensitivität liegt mit 72 dB deutlich unter den Sensitivitäten klinischer OCT-Geräte, war aber ausreichend, um auch in einzelnen B-Scans die Strukturen der Retina darzustellen. Durch Mittelung von B-Scans konnte eine Bildqualität, vergleichbar mit der von klinischen Geräten, wie z.B. dem SPECTRALIS OCT von Heidelberg Engineering, erreicht werden. Die Phasensensitivität wird von mechanische Vibrationen und thermische Fluktuation des Aufbaus, aber auch im hohen Maße von dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der A-Scans beeinflusst. Typischerweise wurde die Photorezeptorschicht mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 22 dB abgebildet, welches einem Phasenrauschen von 80 mrad entspricht und eine Bewegungsaufösung von 5 nm ermöglicht. Dies ist besser als das experimentell bestimmte Phasenrauschen von 250 mrad, wenn jeweils die Phasendifferenzen zwischen zwei nachfolgenden B-Scans berechnet werden. Da sich das SNR durch laterales Mitteln noch beträchtlich erhöhen lässt und die mechanischen Vibrationen bei der Auswertung zum großen Teil kompensiert wurden, lies sich die letztendliche Bewegung des Gewebes im bestrahlten Bereich mit einer höheren Genauigkeit bestimmen. Die kleinsten *ex vivo* am Schweineauge vermessenen Temperaturdifferenzen von wenigen Kelvin bewirkten Phasendifferenzen zwischen zwei B-Scans von 40 mrad, was einer Verschiebung von 2,7 nm entspricht. Die Standardabweichung über die ersten 100 ms beträgt dabei nur 1,2 nm. Nach Median-Filterung und Mittelung über den Fleckdurchmesser hebt sich diese Phasendifferenz noch leicht über den Rauschuntergrund heraus obwohl sie kleiner als das Phasenrauschen in einem Pixel ist (Abb. 5.1 a.). Die kleinste *in vivo* am Kaninchenauge gemessene Phasendifferenz betrug bei einem Temperaturanstieg von 7 K, ungefähr 160 mrad entsprechend 10,7 nm (Abb. 5.1 b.). Die Standardabweichung hier war ca. 3,3 nm.

Zur Abschätzung der Auflösung, mit der Gewebeverschiebungen gemessen werden können, wurden Messungen ohne Bestrahlung ausgewertet. Die berechneten Verschiebungen wurden axial über die Retina und lateral über einen Bereich von 200 μm gemittelt. Für die *Ex-vivo*-Messung ergab die Verschiebung eine Standardabweichung von 15 nm

(Abb. 5.1 c.), für die *In-vivo*-Messungen ohne Bewegungskorrektur schwankte die Verschiebung zwischen 20 μm und 100 μm , mit Bewegungskorrektur reduzierte sich die Verschiebung auf einige hundert Nanometer (Abb. 5.1 d.). Bei einer spezifischen Verschiebung von 100 nm/K sollte mit Bewegungskorrektur somit eine theoretische Temperaturauflösung von wenigen Kelvin erreicht werden. Diese Genauigkeit wird nicht durch das Phasenrauschen, sondern durch mechanische Bewegungen des Tieres beziehungsweise des Aufbaus verursacht.

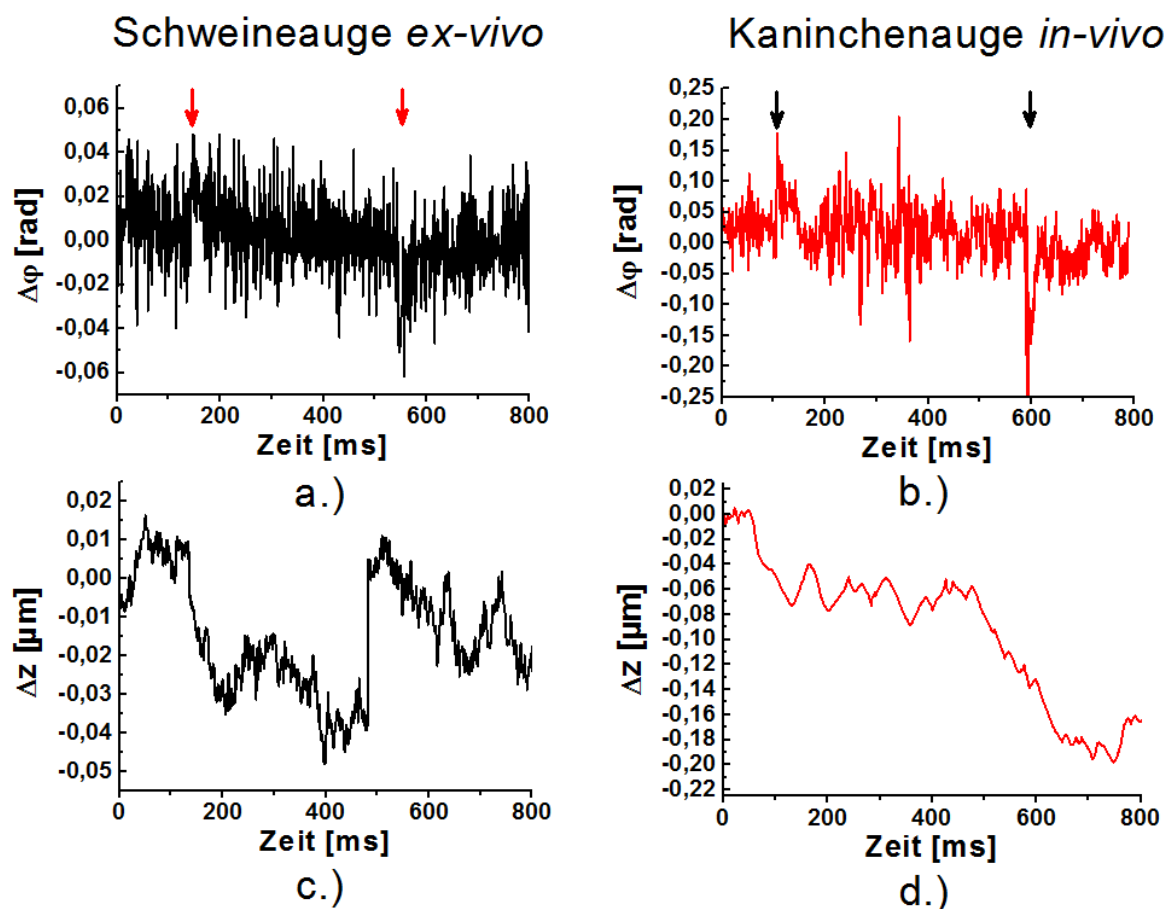


Abbildung 5.1 – a.) Phasendifferenz benachbarter B-Scans für die kleinste *ex vivo* vermessene Temperaturdifferenz am Schweineauge. Die Standardabweichung des Phasenrauschens beträgt 1,2 nm. b.) Phasendifferenz benachbarter B-Scans für die kleinste *in vivo* vermessene Temperaturdifferenz am Kaninchenauge mit einer Standardabweichung des Phasenrauschens von 3,3 nm. c.) Durch Integration der Phasendifferenzen ermittelte Verschiebung des Gewebes über 800 ms ohne Bestrahlung bei einer *Ex-vivo*-Messung. Die Standardabweichung durch die mechanischen Verschiebungen und Schwingungen beträgt 15 nm d.) *In vivo* betrug die Verschiebung des Gewebes ohne Bestrahlung und Bewegungskorrektur einige hundert Nanometer.

Die maximale Phasendifferenz, die eindeutig in einem Bereich von $-\pi$ bis $+\pi$ bestimmt

werden kann, ist direkt von der Auslesegeschwindigkeit der Kamera oder der Anzahl der zur Bildgebung verwendeten A-Scans abhängig. Ein schnelleres OCT-System ist vorteilhaft für die Auswertung schneller Verschiebungen im Gewebe, wie sie bei stark überschwelligen Bestrahlungen durch Verdampfung des Gewebewassers auftreten können. In den *In-vivo*-Experimenten ermöglicht eine schnellere Bildgebung zudem eine bessere Korrektur von globaler Bewegung. Eine höhere Bildgebungsgeschwindigkeit verringert allerdings die Empfindlichkeit der Messung. Für die in der Arbeit vorgestellten Versuchsreihen wurde eine Bildwiederholrate verwendet, die nahe an der technischen Grenze der Scanner liegt. Eine weitere Erhöhung führte zu Artefakten in der Bildgebung. Wesentlich schnellere B-Scan-Raten sind nur durch resonante Scanner, Polygon-Scanner oder MEMS-Scanner zu erreichen [Yeow et al., 2005].

Eine weitere Einschränkung in der Messgenauigkeit ergibt sich durch die Unsicherheit bei der Überlagerung der Foki von Bestrahlungslaser und OCT. Der Strahlengang des Behandlungslasers wird mit dem Strahlengang für die OCT Messung erst durch den dichroitischen Würfel vor dem Kontaktglas zusammengeführt. Kleine Abweichungen in der Justierung führten dabei zu Verschiebungen zwischen dem Koagulationsmittelpunkt und der OCT-Messebene. Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Zentrierung der beiden Strahlengänge durch OCT-Volumenaufnahmen von einer starken Koagulation durchgeführt.

5.2 Echtzeit-Darstellung der Koagulationseffekte in den *ex vivo* Versuchsreihen

Zwei vorhergehende Studien hatten gezeigt, dass durch Laserbestrahlung verursachte morphologische Veränderungen an der Retina auch durch die OCT dargestellt werden können. Die Untersuchung von Laserkoagulationen an Affen Augen *in vivo* mit einem Time-Domain-OCT konnte histologisch Strukturen der OCT-Bildgebung zuordnen [Birngruber et al., 1995, Toth et al., 1997]. In Zeitintervallen von fünf Sekunden während der ersten Minute und von ein- bis fünf Minuten während der ersten Stunde wurden die durch die Koagulation verursachten Streuänderungen mit der OCT vermessen. Die Studie zeigte, dass die OCT die durch den Koagulationslaser verursachte strukturelle Veränderungen an der Retina mit ähnlicher Aussagekraft, wenn auch mit deutlich weniger Auflösung, als die Histopathologie darstellen kann. Mit TD-OCT konnte die Entwicklung der Gewebeveränderungen nach Photokoagulationen sowie die Heilung des Gewebes beurteilt werden. Aufgrund der geringen Messgeschwindigkeit der Time-Domain Systeme

war eine Echtzeitanalyse der Photokoagulationen durch die OCT nicht möglich.

Als weiteres Dosimetrieverfahren zur Echtzeitanalyse von Photokoagulationen an der Retina wurde die Reflektometrie evaluiert. Hierfür wurde ein konfokales Reflektometer in eine Spaltlampe integriert [Inderfurth et al., 1994], das Veränderungen der Streuung an der Retina in Kaninchenaugen *in vivo* zeitaufgelöst darstellen konnte. Der Anstieg des gemessenen Signals zu Beginn der Weißfärbung und die absolute Zunahme der durch die Streuung verursachten Reflexion, ebenso wie die Latenzzeit zwischen Bestrahlungsbeginn und Anstieg der Streuung, wurden mit der ophthalmologischen Sichtbarkeit der Läsionen verglichen. Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme der ophthalmologischen Sichtbarkeit auch der gemessene Reflexionsgrad anstieg. Die Reflexionskurve wurde zudem steiler und die Latenzzeit kürzer. Die relative Änderung der Reflexion betrug dabei zwischen 30% und 400%. Die Reflektometrie ermöglicht keine orts aufgelöste Darstellung der Gewebeveränderungen während der Photokoagulation. Die phasenempfindliche Hochgeschwindigkeits-OCT kann hingegen nicht nur die Änderung der Gewebestreuung mit 10 μm Ortsauflösung messen, sondern auch die Bewegung des Gewebes als Folge der Bestrahlung mit hoher axialer und lateraler Auflösung darstellen.

5.2.1 Echtzeitmessung der Gewebestreuung

Als eine Möglichkeit zur zeitaufgelösten Darstellung von Photokoagulationen durch die OCT wurde die Veränderung der Gewebestreuung *ex vivo* während der Bestrahlung in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke, der Bestrahlungszeit sowie des Fleckdurchmessers untersucht und mit der ophthalmologischen Sichtbarkeit und optoakustischer Temperaturmessung verglichen. Bei einer gleichmäßig pigmentierten Retina sind, unabhängig von dem Ort der Bestrahlung, die Absorption des Lichts und damit der Temperaturanstieg im Gewebe proportional zu der Bestrahlungsstärke des Lasers. Der Koagulationsprozess beginnt, wenn eine ausreichende Temperatur für eine gewisse Zeit erreicht wurde. Die Proteinmoleküle verlieren durch Denaturierung ihre charakteristische molekulare Bindungsstruktur. In der Regel wird dabei eine Zunahme der Streuung beobachtet [Thomson und Pearce, 2011]. Mit höherer Temperatur und längerer Zeit werden zunehmend mehr Moleküle denaturiert, was zu einer Zunahme der Gewebestreuung führt.

Eine ophthalmologisch sichtbare Weißfärbung zeigte sich *ex vivo* in den B-Scans der OCT als eine Zunahme der Gewebestreuung oberhalb des RPEs, die nach Beendigung der Laserbestrahlung nicht reversibel war. Dies ist ein Merkmal für eine erfolgte Denaturierung des Gewebes [Koinzer et al., 2012]. Nach Mittelung über das Bestrahlungsareal

nahm die Änderung der Streuung *ex vivo* aufgrund der anwachsenden Anzahl von denaturierten Molekülen mit steigender Temperatur weitgehend linear mit der Maximaltemperatur zu, bis ab einer Temperaturerhöhung von 40 K eine Sättigung eintrat. Für alle Messungen korrelierte eine relative Änderung der Gewebestreueung von 1 dB (25% Zunahme der gestreuten Strahlung) gut mit einer leichten ophthalmologischen Sichtbarkeit der Läsionen. Eine Erhöhung der Streuung von über 5 dB (220% Zunahme der Streustrahlung) ergab sich bei ophthalmoskopisch gut sichtbare Veränderung im Fundus.

Der Vergleich der Zunahme des OCT-Signals mit der ophthalmologischen Sichtbarkeit und mit der nachfolgenden histopathologischen Aufarbeitung des Gewebes zeigte, dass die Zunahme der Streuung durch eine Denaturierung des Gewebes verursacht wird. Der in der OCT sichtbare Schaden korrelierte in Stärke und räumlicher Ausdehnung mit dem in der Histologie sichtbaren Schaden. Bei lokaler Bestrahlung wird durch Wärmediffusion auch das unbestrahlte Gewebe erwärmt. Aufgrund des Schwellwertverhaltens thermischer Schäden nahm die räumliche Ausdehnung der Koagulationen mit steigender Spitztemperatur zu.

5.2.2 Echtzeitmessung der Gewebeverschiebung

Die Laserbestrahlung des retinalen Gewebes bewirkt einen Temperaturanstieg in den lichtabsorbierenden Schichten und eine daraus resultierenden thermische Expansion, die mit einer Bewegung des Gewebes verbunden ist. Die durch Bestrahlungen ohne ophthalmologisch sichtbare Effekte verursachten Verschiebungen des Gewebes in der Größenordnung von 100 nm/K konnten mit hoher Genauigkeit nur durch die Auswertung der Phasendifferenzen zwischen zeitlich nachfolgenden B-Scans bestimmt werden. Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit der Koagulationen wird *ex vivo* durch die Denaturierung des Gewebes eine zehnfach höhere Verschiebungskomponente in Strahlrichtung verursacht, als im Bereich rein thermischer Expansion beobachtet wurde. Die Auswertung der Verschiebung konnte hier sowohl durch eine direkte Bestimmung der retinalen Oberflächenverschiebung als auch durch eine Integration der Phasendifferenzen benachbarter B-Scans durchgeführt werden. Die OCT-Zeitserien zeigten mit Einsetzen der Koagulation eine Mischung aus lateraler und axialer Verschiebung der Speckle in Richtung des Koagulationszentrums, die sich nach Beendigung der Bestrahlung mit geringerer Ausprägung umkehrt. Zu den Ursachen der Gewebereaktionen bei der Photo-koagulation wurden im Rahmen der Diskussion drei Hypothesen aufgestellt.

5.2.2.1 Vergleich der Gewebeverschiebung mit der thermischen Gewebeexpansion

Experimenteller Sachverhalt: Für die ophthalmologisch nicht sichtbaren Veränderungen der bestrahlten Bereiche, entsprechen die Verschiebungsverläufe den optoakustisch gemessenen Temperaturverläufen. Mit Einschalten des Lasers erhöht sich die Temperatur im Gewebe und die thermische Expansion schiebt das Gewebe in Richtung des Glaskörpers. Nach dem Abschalten des Lasers kühlt das Gewebe wieder ab und relaxiert reversibel in die Ausgangslage zurück. Durch einen Vergleich zwischen den maximalen Temperaturänderungen und den maximalen Verschiebungen in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke, konnte im unterschweligen Bereich ein gemeinsamer linearer Anstieg von Temperatur und Verschiebung mit der Bestrahlungsstärke festgestellt werden. Die ermittelten spezifischen Verschiebungen (Tab. 5.1) korrelieren, mit Ausnahme von drei Parameterkombinationen, mit den auf Basis einer reinen Wasserexpansion in Kapitel 2.3 berechneten Verschiebungen (Abb. 5.2). Es konnte nicht abschließend geklärt werden, warum bei den Augen Nr. 2, Nr. 5 sowie Nr. 6 ein um einen Faktor zwei höhere Messwerte der spezifischen Verschiebung auftrat. Weder zeigten Temperatur- und Verschiebungskurven besondere Auffälligkeiten, noch konnten besondere äußere Merkmale an den Augen oder experimentelle Randbedingungen nachvollzogen werden, die zu den hohen Messwerten führten. Darüber hinaus waren alle experimentell ermittelten spezifischen Verschiebungen 4-5 fach höher als die nach Gleichung 2.49 in Kapitel 2.3 die theoretisch berechnete spezifische Verschiebung.

Hypothese: Das Gewebe expandiert nicht isotrop in alle drei Raumrichtungen.

Diskussion: Für die theoretische Berechnung der spezifischen Verschiebung des Gewebes wurde eine isotrope Expansion mit dem Volumenexpansionskoeffizient von Wasser angenommen. Es wurde folglich davon ausgegangen, dass das erhitzte Gewebe im wesentlichen das thermische Ausdehnungsverhalten von Wasser besitzt und dabei in alle drei Raumrichtungen isotrop expandiert. Aufgrund der zellulären Anordnung der Retina könnte jedoch für Bewegungen eine Vorzugsrichtung, senkrecht zu der retinalen Schichtstruktur vorhanden sein. Diese könnte eine laterale Expansion des Gewebes einschränken, zu einer stärkeren Ausdehnung des RPEs in Richtung Glaskörpers und Choroidea führen und somit ursächlich für die erhöhten Messwerte der spezifischen Verschiebung im Vergleich zu den theoretischen Berechnungen sein (Kapitel 2.3).

Bestrahlungsparameter		Temperaturanstieg	Theoretische Berechnung		Streuung		Verschiebung		Expansion	
Bestrahlungszeit [ms]	Fleckdurchmesser [µm]	$\Delta T/E$ K/W/cm ⁻²	ζ_{Theorie} [nm/K]	η_{Theorie} [K ⁻¹]	$\zeta_{th}^{\Delta z}$ [nm/K]	$\zeta_{th}^{S_{PRS}}$ [dB/K]	ζ [nm/K]	ζ_{th} [nm/K]	η [K ⁻¹]	η_{th} [K ⁻¹]
400	200	130	29,1	6 · 10 ⁻⁵	1230	190	130	1300	42,1 · 10 ⁻⁵	9 · 10 ⁻³
400	100	19	21,6	6 · 10 ⁻⁵	1950	180	160	2700	-30,4 · 10 ⁻⁵	16 · 10 ⁻³
400	50	12	15,8	6 · 10 ⁻⁵	1390	240	81	1300	-16,5 · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻³
200	200	73	25,3	6 · 10 ⁻⁵	2060	420	110	2100	-1,2 · 10 ⁻⁵	11 · 10 ⁻³
200	100	18	19,3	6 · 10 ⁻⁵	1610	410	170	2100	-7,1 · 10 ⁻⁵	12 · 10 ⁻³
200	50	9,9	14,4	6 · 10 ⁻⁵	1930	280	150	1600	30,6 · 10 ⁻⁵	8 · 10 ⁻³
100	200	88	21,4	6 · 10 ⁻⁵	1360	350	85	1500	8,2 · 10 ⁻⁵	10 · 10 ⁻³
100	100	36	16,9	6 · 10 ⁻⁵	1060	340	63	810	10,7 · 10 ⁻⁵	6 · 10 ⁻³
100	50	7,2	13,0	6 · 10 ⁻⁵	1400	110	63	1500	-4,8 · 10 ⁻⁵	13 · 10 ⁻³
50	200	73	17,7	6 · 10 ⁻⁵	590	61	83	980	2,3 · 10 ⁻⁵	8 · 10 ⁻³
50	100	27	14,6	6 · 10 ⁻⁵	540	236	73	920	12,1 · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻³
50	50	6,3	11,5	6 · 10 ⁻⁵	610	263	60	720	18,1 · 10 ⁻⁵	12 · 10 ⁻³

Tabelle 5.1 – Zusammenfassung aller linearen Koeffizienten der Zunahme (“spezifischen Anstiege”) von Temperatur, Streuung, Verschiebung und Expansion für die verschiedenen Bestrahlungszeiten und Fleckdurchmesser. Die Spalten zeigen den mittleren linearen Anstieg der Temperatur mit der Bestrahlungsstärke $\Delta T/E$. Theoretisch ermittelte spezifische Verschiebung ζ_{Theorie} und Expansion η_{Theorie} unter Berücksichtigung des temperaturabhängigen Brechungsindex, für einen Temperaturanstieg von 25 °C auf 26 °C. Aus der Verschiebung der Retinaoberfläche bestimmte spezifische Verschiebung $\zeta_{th}^{\Delta z}$ für die sichtbaren Koagulationen. Durch Auswertung der Streuung im Bereich der Photorezeptorschichten bestimmte spezifische Streuänderung $\zeta_{th}^{S_{PRS}}$ für die sichtbaren Koagulationen. Aus der Phasenauswertung bestimmte spezifische Verschiebung ζ für die nicht sichtbaren Koagulationen und spezifische Verschiebung ζ_{th} für die sichtbaren Koagulationen. Durch Differenzierung nach z bestimmte spezifische Expansion η für die nicht sichtbaren Koagulationen und spezifische Expansion η_{th} für die sichtbaren Koagulationen.

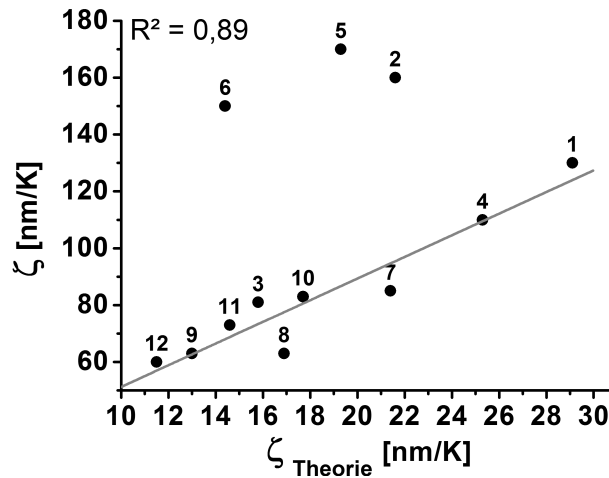


Abbildung 5.2 – Korrelation der theoretisch berechneten spezifischen Verschiebungen $\zeta_{Theorie}$, mit den durch Auswertung der Phasendifferenzen ermittelten spezifischen Verschiebungen ζ für die Parameterkombinationen von Auge Nr. 1 bis Auge Nr. 12.

5.2.2.2 Bestimmung der Temperaturerhöhung aus der lokalen Expansion des Gewebes

Experimenteller Sachverhalt: Aus den Verschiebungen wurde, durch Ableitung der Verschiebung Δz nach z , die Expansion in Strahlrichtung berechnet und orts aufgelöst dargestellt. Zur Ermittlung des Zeitverlaufs wurde die Expansion über den Bereich zwischen RPE und Choroidea gemittelt. Der Expansionsverlauf folgte dabei während und nach der Bestrahlung im wesentlichen dem Verschiebungs- und Temperaturverlauf. Für die maximale Expansion am Ende der Bestrahlungszeit wurde im Bereich ophthalmologisch nicht sichtbarer Läsionen eine hohe Varianz der Messwerte, verursacht durch ein schlechtes SNR Verhältnis aufgrund der Differentiation und durch ein nicht systematisch auftretendes zweites Verschiebungsmaximum im Bereich der Choroidea, beobachtet. Dies führte insgesamt zu einer schlechten Korrelation zwischen Expansions- und Temperaturanstieg. Durch die Berechnung und Darstellung von M-Scans des Expansionsverlaufs wurde auch im Bereich der Photorezeptorzellen eine Expansion während der Laserexposition beobachtet (Abb. 5.3). Diese kann im Einzelfall sogar höhere Messwerte annehmen als die Expansion am RPE.

Hypothese: Die Expansion eignet sich nicht zur Berechnung der Temperaturverteilung in z -Richtung.

Diskussion: Da in der OCT die Expansion aufgrund optischer Weglängenänderungen

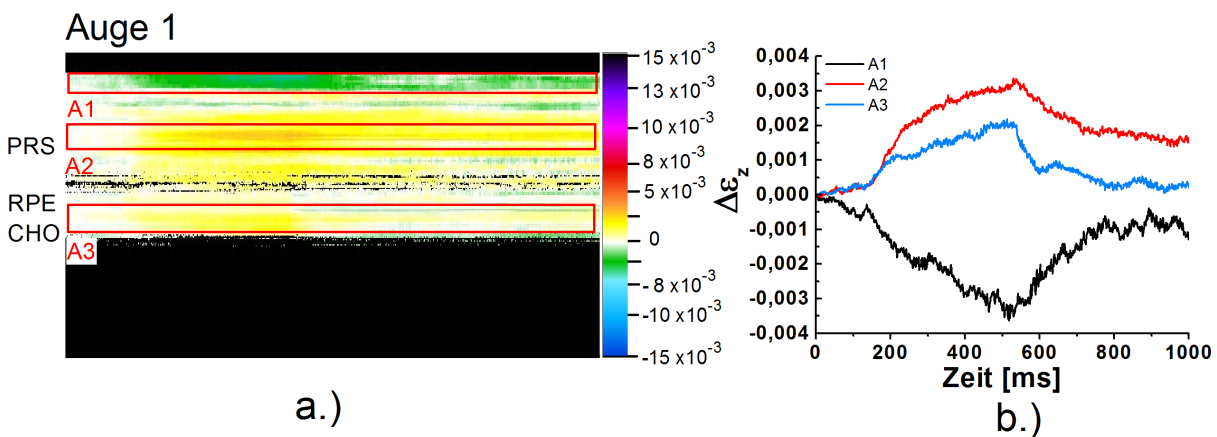


Abbildung 5.3 – a.) Expansionsverlauf des Gewebes im bestrahlten Bereich während der Laserexposition. Fleckdurchmesser $200\ \mu\text{m}$, Bestrahlungszeit $400\ \text{ms}$, Bestrahlungsstärke $59\ \text{W}/\text{cm}^2$, Temperaturanstieg $10\ \text{K}$. b.) Die Expansion der drei Areale zeigt eine Positionsabhängigkeit. In dieser Messung lag das Expansionsmaximum im Bereich der Photorezeptorzellen (A2).

bestimmt wird, beeinflusst der temperaturabhängige Brechungsindex die berechnete Expansion. Die optische Expansion, d.h. die Ableitung der Änderung des optischen Weges nach z , stellt sich abhängig von der Temperatur, um den Faktor fünf bis zehn kleiner als für die geometrische Expansion des Gewebes erwartet würde dar (siehe Abb. 2.6). Die Expansion des Gewebes durch Temperaturerhöhung im Bereich des RPE erscheint im OCT somit wesentlich kleiner als eine Expansion durch Kompression oder Scherung des Gewebes oberhalb des erwärmten Bereiches. Dies ist die Ursache für die in der Photorezeptorschicht beobachtete Expansion. Der durch den vom Glaskörper erzeugten Widerstand bewirkt die in z -Richtung beobachtete Kompression im Bereich zwischen der Ganglienzellschicht und der oberen Grenzmembran.

In einem Aufbau zur Bestimmung der thermischen Expansion von Geweben mittels phasensensitiver Optischer Kohärenztomographie wurden Retinaexplantaten in Öl, bei gleichmäßiger Erwärmung durch ein Peltier-Element, vermessen [Hain, 2012]. Aus der relativen Änderung der geometrischen Dicke ohne Berücksichtigung des Brechungsindex konnte der Expansionskoeffizient bestimmt werden. Dieser entsprach für niedrige Temperaturen bis $40\ ^\circ\text{C}$ zwar im Mittel der erwarteten Wasserexpansion, streuten allerdings in den Messungen der einzelnen Proben sehr stark.

Da bisher noch keine aussagekräftige Korrelation zwischen Expansionsmessungen und Temperaturerhöhung beobachtet wurde, ist die Auswertung der lokale Expansion nicht zur quantitativen Analyse der Temperaturerhöhung nutzbar.

5.2.2.3 Ursache der Verschiebung während der Koagulation

Experimenteller Sachverhalt: Mit dem Beginn der ophthalmologischen Sichtbarkeit erhöhte sich die Verschiebung des Gewebes in z-Richtung um ungefähr eine Größenordnung und kann daher nicht mehr ausschließlich auf thermische Expansion zurückzuführen sein. Die aus den Phasendifferenzen bestimmte Verschiebung stimmte dabei mit der aus den M-Scans bestimmten Verschiebung der Gewebeoberfläche überein. Die zur Berechnung notwendige Entfaltung der Phasendifferenzen gelang somit weitgehend artefaktfrei. Der berechnete Verschiebungsverlauf ist auch von der Form nicht mehr identisch zu dem Temperaturverlauf. Nach dem Abschalten des Lasers ist zwar eine Relaxation des Gewebes messbar, diese erreicht jedoch nicht mehr den Ausgangswert. Der Anstieg der maximalen Verschiebung erfolgte erst linear mit den Temperaturerhöhungen durch die Bestrahlung und ging ab einem Temperaturanstieg von 40 K in Sättigung über. Durch die Anpassung zweier Geraden an die Temperaturabhängigkeit der Verschiebung im Bereich thermischer beziehungsweise nichtthermischer Expansion und Ermittlung des Schnittpunktes wurde die Koagulationsschwelle mit guter Genauigkeit bestimmt.

Die Auswertung der lateralen Ausdehnung der gemessenen Verschiebung ergab eine konstante Breite von ca. 400 μm unabhängig von Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeit. Dies steht im Gegensatz zu der histologischen Untersuchung und der Analyse der Bereiche mit erhöhter Streuung in den B-Scans, die eine stetige Zunahme der laterale Ausdehnung mit steigender Bestrahlungsstärke ergab. Die Expansion ist in der Nähe des RPE am stärksten und breitet sich, mit steigender Temperatur, zunehmend lateral aus. Im Zeitverlauf folgt die Expansion hier qualitativ dem Zeitverlauf der Verschiebung.

Im Bereich der ophthalmologisch sichtbaren Läsionen wurde in den B-Scan Zeitserien eine Specklebewegung von außerhalb des Bestrahlungsflecks, parallel zum RPE und zentral in Richtung des Koagulationszentrum beobachtet, die mit steigender Bestrahlungsstärke zunahm.

Hypothese : Ursache für die beobachtete starke Verschiebung der Retina während der Koagulation ist eine laterale Kontraktion von RPE-Zellen, der Bruch'schen Membran und/oder der Choroidea.

Diskussion: In einem Aufbau zur dynamischen Speckle-Interferometrie [Bliedtner et al., 2013] wurde eine zu den OCT-Messung vergleichbare laterale Gewebeverschiebungen unter Laserbestrahlung beobachtet. Mit einem 532 nm cw-Laser wurden dazu explantierter Augenhintergrund ohne die neuronale Netzhaut kohärent beleuchtet und gleich-

zeitig koaguliert um die Auswirkung der Bestrahlung auf RPE, Bruch'sche Membran und Choroidea zu untersuchen. Die laterale lokale Gewebebewegung wurde durch räumliche Verschiebungen des Specklemusters im Bestrahlungsfleck bestimmt. Mit dem Beginn der Laserexposition setzte eine laterale Specklebewegung in Richtung des Bestrahlungszentrums ein, die nach dem Ende der Bestrahlung nur teilweise reversibel war. Mit steigender Leistung nahm die laterale Specklebewegung zu. Dynamische Speckle-Interferometrie und OCT zeigen somit den gleichen Gewebeeffekt. Da mit der dynamischen Speckle-Interferometrie eine Gewebekontraktion auch ohne Einfluss der neuronalen Retina beobachtet wurde, kann diese durch Bestandteile in der Choroidea, der Bruch'schen Membran oder dem RPE verursacht werden. Besteht in den enukleierten Schweineaugen eine Verbindung zwischen Choroidea, Bruch'scher Membran, RPE und Photorezeptoren, so wird sich die laterale Verschiebung auch auf die drüberliegenden Gewebeschichten auswirken und zu der beobachteten lateralen Verschiebung der neuronalen Netzhaut führen.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Kollagenfasern bei Erwärmung um einen Drittel ihrer ursprünglichen Länge schrumpfen können [Stringer und Parr, 1964, Azar und Stasi, 2009]. Die thermische Energie zerstört dabei die Wasserstoffbrückenbindungen der tertiären Kollagenstruktur und ermöglicht der Helix somit eine partielle Entfaltung und die Bildung neuer Quervernetzungen zu anderen Aminosäuren. In einer experimentellen Untersuchung zur Hitze induzierten Kontraktion von Blutgefäßen [Gorisch und Boergen, 1982], konnte der Nachweis erbracht werden, dass frisch entnommene Venen und Arterien aus dem Mesenterium von Kaninchen in einer erwärmten salinen Lösung, mit dem Erreichen einer vom Blutdruck abhängigen Temperaturschwelle zwischen 69 °C und 75 °C, schrumpfen. Dieser Effekt wurde mit der Denaturierung von Kollagenfaserbündeln, die zusammen mit Elastin-Strängen einen Großteil des Bindegewebes der Zellwände bilden, in Zusammenhang gebracht. Da die Choroidea mit einem Netzwerk aus Blutgefäßen verschiedener Größen durchzogen ist, könnte eine Kontraktion der Gefäßwände für die Verschiebung des Gewebes im überschwelligem Bereich verantwortlich sein. Wenn die Choroidea in den *Ex-vivo*-Versuchsreihen durch den fehlenden Blutdruck zusammengefallen ist, kontrahiert das Gewebe dabei möglicherweise vor allem in lateraler Richtung. Die in den Versuchen von Gorisch/Boergen ermittelte Temperaturschwelle zur Kontraktion der Blutgefäße ist höher als die mittlere Temperatur im Bestrahlungsfleck an der durch die OCT-Messungen bestimmten Schwelle der ophthalmologischen Sichtbarkeit der Läsionen. Im Zentrum der Koagulation treten effektiv höhere Temperaturen auf. Der fehlende Blutdruck setzt zudem die Temperaturschwelle

zur beginnenden Kontraktion der Blutgefäße nach unten. Die Temperaturschwelle für isolierte Kollagenfasern liegt schon im Bereich von 60 °C.

Die Bruch'sche Membran der menschlichen Retina kann in fünf verschiedene Schichten unterteilt werden, welche mit verflochtenen Kollagenfasern von Typ I, III und V durchsetzt sind [Guymer et al., 1998]. Kollagenfasern von Typ I geben dem Gewebe hohen Bruchwiderstand, Typ III eine hohe Elastizität und Typ V verankert die Basalmembran an das Stroma. Ebenso wie in der Choroidea könnten Temperaturerhöhungen über einen Schwellwert hinaus, zu einer Schrumpfung dieser Kollagenfasern und bei fester Verbindung der Bruch'sche Membran mit dem RPE und den Photorezeptoren zu einer lateralen Kontraktion des Gewebes führen.

Die laterale Kontraktion des Gewebes könnte auch direkt durch die RPE Zellen verursacht werden, zum Beispiel durch das Filamentnetzwerk des Zytoskeletts, welches unter anderem für die mechanische Stabilisierung der Zellen verantwortlich ist [Campbell, 1998].

Um die genaue Ursache der lateralen Bewegung des Gewebes zu bestimmen, ist die Durchführung weiterer Versuchsreihen zur Messung der Temperature Auswirkungen auf die einzelnen Gewebeschichten mit freipräparierter Choroidea, RPE und Bruch'scher Membran notwendig.

Die starke laterale Bewegung der Retina führt im Koagulationszentrum zu einer Kompression des Gewebes. Die Choroidea ist in den *Ex-vivo*-Experimenten durch die fehlende Perfusion zusammengefallen oder das Blut ist geronnen. Sie bildet mit der Sklera einen vergleichsweise festen Abschluss des Auges. Da Choroidea und Sklera somit nicht kompressibel sind, verschiebt sich das verdichtete Gewebe im Koagulationszentrum gegen den vom Glaskörper verursachten Widerstand nach oben. Die laterale Kompression führt somit zur dem beobachteten überproportionalen Anstieg der axialen Verschiebung des Gewebes bei Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit. Eine derartige Gewebereaktion erklärt auch die beobachtete Unabhängigkeit zwischen den untersuchten Fleckdurchmessern und der lateralen Verschiebungsausdehnung bzw. der axialen Expansionsausdehnung, da eine laterale Kompression nicht direkt von den eingestellten Fleckdurchmessern abhängig sein muss.

Nach dem Arrhenius-Gesetz werden bei längeren Bestrahlungszeiten geringere Temperaturen an der Koagulationsschwelle erwartet. Die durch Optoakustik bestimmte Temperaturerhöhung an der durch die OCT bestimmten Koagulationsschwelle zeigt hingegen

keine eindeutige Korrelation mit der Bestrahlungszeit (Tab 5.3).

In einer ausführlichen *In-vivo*-Untersuchung von Laserkoagulationen an der Kaninchenretina mittels Optoakustik, konnte durch Auswertung vieler hundert Messungen ein Verlauf nach Arrhenius bestätigt werden [Schlott et al., 2012]. Es könnte bei diesem Experiment die Messgenauigkeit bei der Bestimmung der Koagulationsschwelle durch Ophthalmoskopie und OCT-Messung nicht ausgereicht haben, um die Arrheniusabhängigkeit nachzuweisen. In den einzelnen Messreihen traten Abweichungen zwischen den durch OCT ermittelten Koagulationsschwellen und der ophthalmologischen Sichtbarkeit auf, die im Wesentlichen durch den schwierigen Einblick in den enukleierten Schweineaugen und einer nicht ausreichend präzisen Bestimmung des Schnittpunktes der Gradienten verursacht wurden. Auch die biologische Varianz der Augen kann eine systematische Abnahme der Temperatur an der Koagulationsschwelle mit der Bestrahlungszeit verdecken.

5.3 Mögliche Parameter für eine Dosimetrie

Die in den vorhergehenden Messreihen beobachteten retinalen Gewebeeränderungen während der Laserbestrahlung können für eine online Dosimetrie verwendet werden. Als Dosimetrieparameter könnten sowohl die Streuänderung im Bereich der Photorezeptorzellen und die Verschiebung der Retinaoberfläche (Abb. 4.9 und 4.10), als auch die räumlich aufgelösten Verschiebung der Retina (Abb. 4.15 und 4.16) oder die daraus berechnete lokale Expansion (Abb. 4.18 und 4.19) genutzt werden. Die jeweiligen Schwellwerte wurden durch Auswertung des, mit Beginn der ophthalmologischen Sichtbarkeit einsetzenden überproportionalen Anstiegs der Messparameter, abgeschätzt. Es konnten folgende potentielle Dosimetrieparameter bestimmt werden:

1. Zunahme der Streuung: Eine Zunahme der Streuung oberhalb des RPEs um >1 dB konnte mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 4.9 und 4.10). Dieser Parameter ist, im Vergleich zu den aus Phasendifferenzen bestimmten Parametern, weniger empfindlich gegen Bewegungen und kann auch durch OCT-Systeme mit geringerer Messgeschwindigkeit bestimmt werden. Nachteilig ist das, im Vergleich zur Auswertung der Phasendifferenzen, schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhalten (Abb. 4.13). Eine Dosimetrie von unterschwelligen Bestrahlungen erscheint somit bisher nicht möglich.

2. Verschiebung der Retinaoberfläche: Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen

Sichtbarkeit erfolgte eine Verschiebung der Retinaoberfläche von $>5\ \mu\text{m}$. In der Auswertung der maximalen Streuänderung in Abhängigkeit von Bestrahlungsstärke und Temperaturanstieg (Abb. 4.9 und 4.10), erscheint die Koagulationsschwelle eine vergleichbare Sensitivität wie die Schwelle der Streuzunahme aufzuweisen und besitzt im wesentlichen auch dieselben Vor- und Nachteile.

3. Verschiebung der Retina: Nach Auswertung der Phasendifferenzen wurde eine gemittelte Verschiebung der Retina von $>2,5\ \mu\text{m}$ oder mehr bei ophthalmologisch sichtbaren Läsionen beobachtet (Abb. 4.15 und 4.16). Über die Phasendifferenzen ist auch eine genaue Bestimmung der durch thermische Expansion verursachten Verschiebung unterhalb der Koagulationsschwelle möglich. Es erscheint somit auch eine Dosimetrie unterschwelliger Effekte realisierbar, da die Verschiebung gut mit dem Temperaturanstieg korreliert. Nachteilig ist die starke Bewegungsempfindlichkeit der Messmethode. Diese erfordern, zusammen mit der bei sehr schnellen Verschiebungen auftretenden Mehrdeutigkeit der Phaseninformation, umfangreiche Korrekturen. Zudem werden hohe Messgeschwindigkeiten und Scanraten benötigt. Eine Auswertung der Verschiebung durch A-Scans ist prinzipiell durchführbar und ermöglicht eine Verschiebungsauswertung mit sehr hohen zeitlichen Auflösung. Da eine Mittelwertbildung der Phasendifferenzen jedoch nur in axialer Richtung möglich ist, könnte die Phasenauflösung dabei etwas schlechter sein als bei der zweidimensionalen Auswertung.

4. Expansion: Eine Zunahme der Expansion im Bereich des RPEs um $>0,01$ konnte mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 4.18 und 4.19). Die Expansion ermöglicht, als lokale Größe mit hoher axialer Auflösung, die Spezifizierung des Ursprungsorts einer Gewebeverschiebung. Da die Expansion aus den Verschiebungen berechnet wird, besitzt sie im wesentlichen auch dieselben Vor- und Nachteile. Die thermische Expansion ist prinzipiell auch unterhalb der Schwelle zur ophthalmologischen Sichtbarkeit messbar, und somit theoretisch auch zur Dosierung unterschwelliger Effekte geeignet. Allerdings ist der optische Expansionskoeffizient sehr klein, so dass für eine praktische Anwendung eine Verringerung des sehr hohen Messfehlers notwendig ist.

5. Variation der Speckle: Für die ophthalmologisch sichtbaren Läsionen wurde eine laterale Verschiebung der Speckle während der Bestrahlungszeit beobachtet. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer ausgewertet. Für eine genaue Analyse der Specklebewegungen sind Volumenmessungen sinnvoll, da diese eine dreidimensionale Auswertung der Gewebeverschiebung ermöglichen und somit auch Verschiebun-

5. Diskussion

Streuänderung $\Delta S_{PRS} > 1 \text{ dB}$			Oberflächenverschiebung $\Delta z_{PRS} > 5 \mu\text{m}$		
	Sichtbar	Nicht sichtbar		Sichtbar	Nicht sichtbar
$\Delta S_{PRS} > 1 \text{ dB}$	134	31	$\Delta z_{PRS} > 5 \mu\text{m}$	137	36
$\Delta S_{PRS} < 1 \text{ dB}$	19	175	$\Delta z_{PRS} < 5 \mu\text{m}$	16	170
Sensitivität:	0,876		Sensitivität:	0,895	
Spezifität:	0,849		Spezifität:	0,825	

Verschiebung Phasendifferenz $\Delta z > 2,5 \mu\text{m}$			Expansion $\Delta \epsilon > 0,01$		
	Sichtbar	Nicht sichtbar		Sichtbar	Nicht sichtbar
$\Delta z > 2,5 \mu\text{m}$	148	49	$\Delta \epsilon > 0,01$	138	42
$\Delta z < 2,5 \mu\text{m}$	4	158	$\Delta \epsilon < 0,01$	14	157
Sensitivität:	0,974		Sensitivität:	0,908	
Spezifität:	0,763		Spezifität:	0,789	

Tabelle 5.2 – Klassifikation der verschiedenen Messparameter durch den Vergleich mit der Schwelle zur ophthalmologischen Sichtbarkeit. Aus den B-Scans wurde die Schwelle für eine Streuänderung von $\Delta z_{PRS} > 5 \mu\text{m}$ und einer Oberflächenverschiebung von $\Delta z_{PRS} > 5 \mu\text{m}$ ermittelt. Aus den Phasendifferenzen ergab sich die Schwelle für Verschiebungen der Retina $\Delta z > 2,5 \mu\text{m}$ und für Expansionen im Bereich des RPE $\Delta \epsilon > 0,01$. Ermittelte Häufigkeit der richtig positiven, falsch positiven, falsch negativen und richtig negativen Messwerte aufgrund der ausgewählten Schwellwerte. Berechnete Sensitivität und Spezifität der Klassifikation.

gen der Speckle in die, durch Schnittbilder nicht wiedergegebene, zweite laterale Achse erfassen. Durch eine dreidimensionale Verfolgung der Speckleverschiebung (Speckle Tracking) könnten laterale mikroskopische Gewebeverschiebungen im Bereich einiger Mikrometer, sowie eine eventuell auftretende Deformation des Gewebes bestimmt werden [Schmitt, 1998].

Mit den ermittelten Dosimetrieparametern erfolgte die Klassifikation der Messwerte durch einen Vergleich mit der Schwelle zur ophthalmologischen Sichtbarkeit (Tab. 5.2). Eine Schwelle von 1dB Signalzunahme oder eine Streuänderung der Oberflächenverschiebung von $5 \mu\text{m}$ erreichten eine Sensitivität von mehr als 87 %. Die Schwellen für Verschiebung der Retina von $>2,5 \mu\text{m}$ und der Expansion des RPE von 0,01 erreichten hingegen Sensitivitäten von 97 % und 91 %. Vermutlich hauptursächlich für die geringere Spezifität aller vier Schwellwerte, ist die fehlende ophthalmologische Sichtbarkeit für kleine Bestrahlungsfleckdurchmesser und kurze Bestrahlungszeiten. Im wesentlichen unterscheiden sich die Werte für die verschiedenen Parameter nur leicht voneinander und sind somit gleich gut geeignet um eine Dosimetrie zu realisieren.

Um die Schwellwerte für die Bestrahlungsstärke E_{th} und Temperaturen T_{th} zu ermitteln (Tab. 5.3), wurden deren erste Messwerte für die Zunahme der Streuung oberhalb des RPEs um >1 dB, die Verschiebung der Retinaoberfläche von >5 μm und die Zunahme der Expansion im Bereich des RPEs um $>0,01$, bestimmt. Die durch die Phasendifferenz ermittelten Schwellen der Verschiebung wurden durch eine Anpassung zweier Geraden an die Steigungen der maximalen Verschiebungen in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke bzw. Temperatur im unterschweligen und überschweligen Bereich und nachfolgender Ermittlung des Schnittpunktes festgestellt. Zur Ermittlung der Schwellwert für die Bestrahlungsstärken E_{th}^{vis} und Temperaturen T_{th}^{vis} der ophthalmologischen Sichtbarkeit wurde der Messwert verwendet, an dem die Läsionen vom nichtbestrahlten Gewebe schwach unterscheidbar waren. Die ermittelten Schwellwerte aus den OCT-Messwerten ergeben eine sehr gute Korrelation mit den Bestrahlungsstärken der ophthalmologischen Sichtbarkeit (Abb. 5.4 linke Seite). Die Temperaturschwellen korrelieren hingegen weniger gut (Abb. 5.4 rechte Seite). Aufgrund einer leicht unterschiedlichen Pigmentierung des Augenhintergrundes würde eher eine bessere Korrelation zur Temperatur erwartet werden. Der Messfehler für die optoakustische Temperaturbestimmung liegt im Größenbereich von $\pm 10\%$. Dieser Fehler ist möglicherweise für die schlechte Korrelation zwischen den Ergebnissen und der hohen Streuung der Temperaturmesswerte verantwortlich. Für eine genauere Korrelation der Schwellwerte sind mehrere Messreihen gleicher Fleckdurchmesser und Bestrahlungszeiten notwendig um Messfehler seitens der optoakustischen Temperaturmessung und der OCT zu minimieren.

Bestrahlungsparameter		Sichtbarkeit		Streuung			Verschiebung		Expansion		
Bestrahlungszeit [ms]	Fleckdurchmesser [µm]	E_{th}^{vis} [W/cm ²]	T_{th}^{vis} [K]	$E_{th}^{\Delta z}$ [W/cm ²]	$T_{th}^{\Delta z}$ [K]	E_{th}^{SPRS} [W/cm ²]	T_{th}^{SPRS} [K]	$E_{th}^{\Delta z\phi}$ [W/cm ²]	$T_{th}^{\Delta z\phi}$ [K]	$E_{th}^{\Delta e}$ [W/cm ²]	$T_{th}^{\Delta e}$ [K]
400	200	120	22	104	19	190	28	128	19,4	129	26
400	100	1100	25	820	21	885	23	763	17,1	630	21
400	50	1960	25	1400	20	1960	25	1570	20,3	1389	25
200	200	190	18	251	23	190	18	217	19,2	214	21
200	100	1000	22	820	19	1163	25	839	18,4	822	17
200	50	1835	21	2130	25	1400	23	1682	20,7	1202	23
100	200	210	19	207	20	257	25	198	20,4	166	19
100	100	820	26	885	46	885	28	576	26,9	479	28
100	50	2720	21	2720	21	2560	19	2372	18,7	2177	21
50	200	kein	kein	292	22	305	22	248	18,7	175	26
50	100	1370	31	714	25	996	26	1030	25,3	929	25
50	50	kein	kein	3430	24	3430	24	2889	20,3	2682	18

Tabelle 5.3 – Zusammenfassung aller Schwellwerte für die verschiedenen Bestrahlungszeiten und Fleckdurchmesser. Bestrahlungsstärken E_{th}^{vis} und Temperaturen T_{th}^{vis} , ermittelt aus der ophthalmologischen Sichtbarkeit. Bestrahlungsstärken $E_{th}^{\Delta z}$ und Temperaturen $T_{th}^{\Delta z}$ für eine Verschiebung der Retinaoberfläche von mehr als 5 µm sowie E_{th}^{SPRS} und T_{th}^{SPRS} für eine Signalzunahme über 1 dB. Aus der Verschiebung der Retina bestimmte Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta z\phi}$ und Temperaturschwelle $T_{th}^{\Delta z\phi}$, ermittelt aus den Schnittpunkt der beiden Geraden zwischen unterschwelligen und überschwelligen Messpunkten. Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta e}$ und Temperaturanstieg $T_{th}^{\Delta e}$ für Expansionen von mehr als $1 \cdot 10^{-3}$.

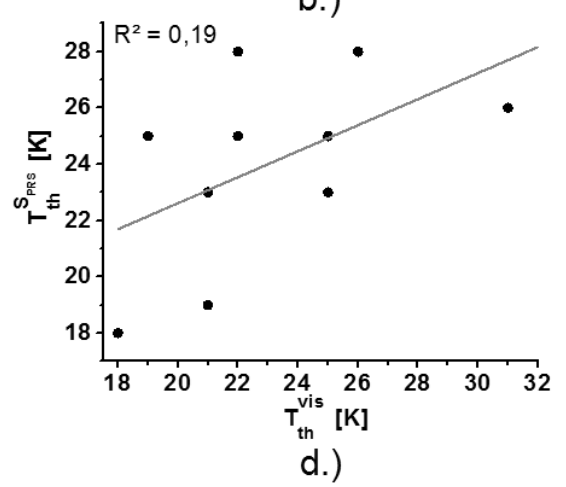
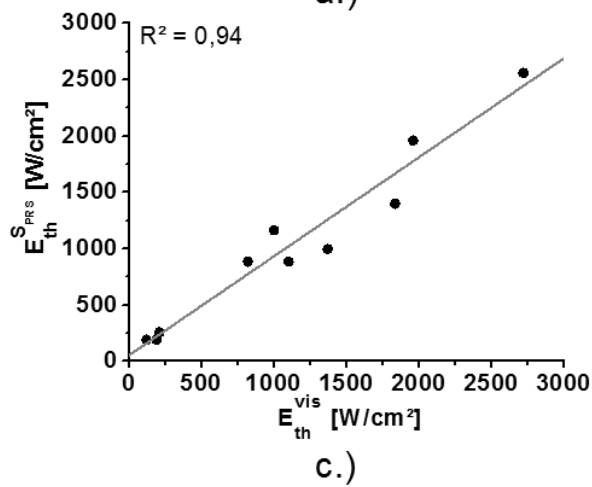
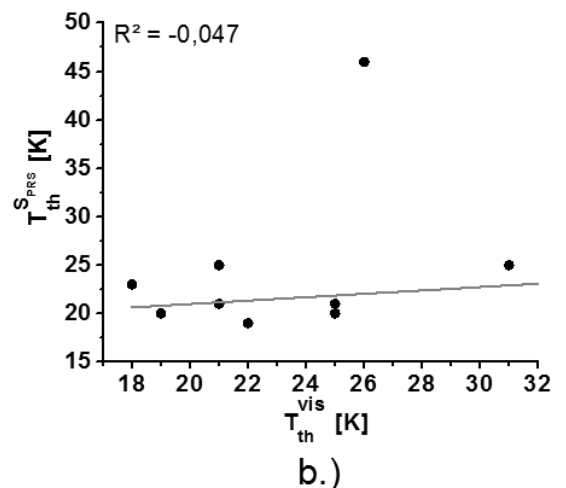
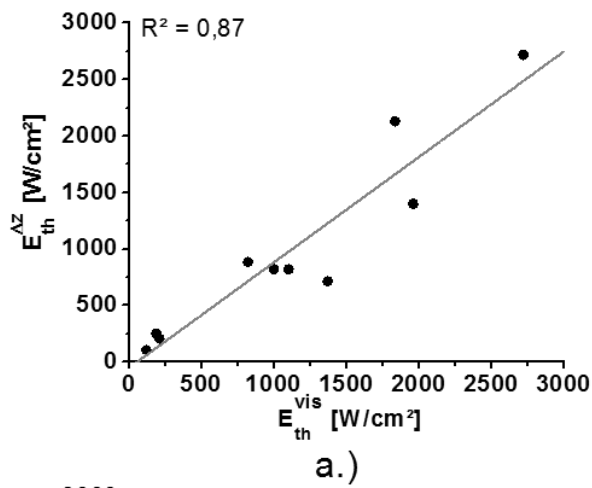


Abbildung ist auf der nächsten Seite fortgesetzt

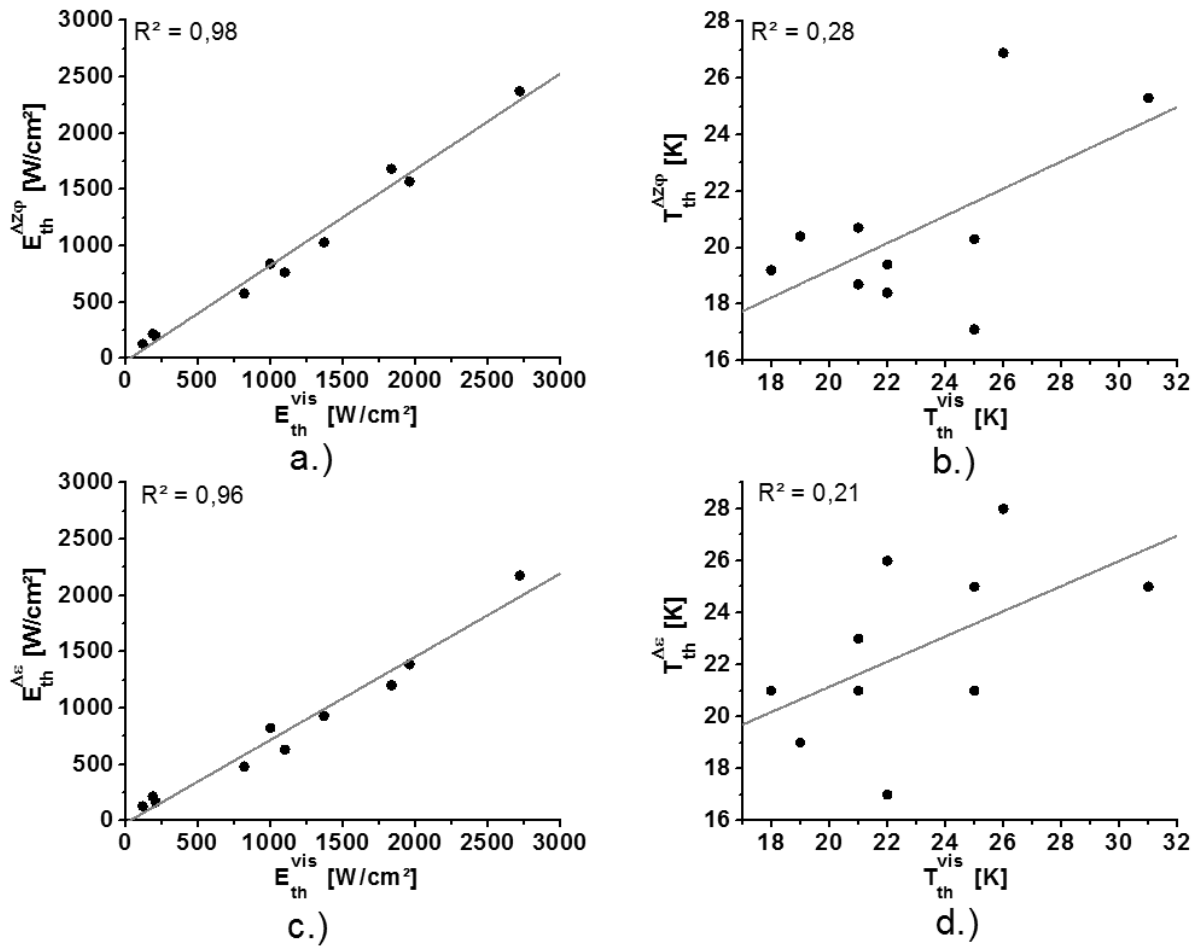


Abbildung 5.4 – Korrelation in Tabelle 5.3 aufgeführten Schwellenparameter. Der aus der ophthalmologische Sichtbarkeit ermittelten Schwellwerte für die benötigte Bestrahlungsstärke E_{th}^{vis} und Temperatur T_{th}^{vis} ist jeweils auf der Abszisse aufgetragen. Die aus der Auswertung der Streuung bestimmten Schwellwerte $E_{th}^{\Delta z}$ und $T_{th}^{\Delta z}$ für eine Retinaverschiebung von mehr als $5 \mu m$ sowie E_{th}^{SPRL} und T_{th}^{SPRL} für eine Signalzunahme über 1 dB und die aus den Verschiebung der Retina bestimmte Bestrahlungsstärke $E_{th}^{\Delta z, \phi}$ und $T_{th}^{\Delta z, \phi}$ sowie die durch Auswertung der lokalen Expansion bestimmte Schwellwert $E_{th}^{\Delta \epsilon}$ und $T_{th}^{\Delta \epsilon}$ wurden auf den jeweils zugehörigen Ordinaten angeordnet.

5.4 Übertragung auf die *In-vivo*-Situation

Mit der Übertragung der an den enukleierten Schweineaugen durchgeführten Messungen auf die *In-vivo*-Situation am Kaninchenauge sollte vor allem der Nachweis erbracht werden, dass die sensitive Bestimmung der Verschiebung aus der Phasendifferenzmessung, *in vivo* prinzipiell durchführbar ist.

Es traten dabei einige technische Probleme auf. Das verwendete Kontaktglas, welches für die Durchführung der optoakustischen Messungen benötigt wurde, war für das menschliche Auge ausgelegt. Die, im Gegensatz zum Schweineauge, stark abweichende Anatomie der Kaninchenaugen führte zu einer schlechteren Bildqualität der OCT-Aufnahmen. So wurde, für den Bereich der Photorezeptoren, zentral im Auge noch ein relativ gutes SNR Verhältnis von bis zu 15 dB erreicht, in der Peripherie sank dieses auf ca. 5 dB. Die Bilddaten waren somit kaum vom Untergrundrauschen zu unterscheiden. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Messreihe wurde deshalb im zentralen Bereich des Auges durchgeführt.

In den OCT-Aufnahmen waren Schichten der neuronalen Retina unterscheidbar. Gut zu erkennen war die Innensegment-/ Außensegment-Grenze der Photorezeptoren, das retinale Pigmentepithelium sowie die unterliegenden Blutgefäße der Choroidea und die abschließende Sklera.

Durch Herzschlag und Atmung wird eine Bewegung der gesamten Retina verursacht, welche die lokale Bewegung im Bestrahlungsfleck überdeckt. Dies konnte soweit korrigiert werden, dass es möglich war, die Auswirkungen der Laserbestrahlung auf die Retina, durch Auswertung der Phasendifferenzen, zu verfolgen. Es gelang *in vivo* Verschiebungen von unter 100 nm zu messen.

Die Machbarkeit von *In-vivo*-Messung am Kaninchenauge konnte mit der vorgestellten Messreihe demonstriert werden. Es wurden jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich zur *Ex-vivo*-Situation festgestellt.

5.4.1 Echtzeitmessung der Gewebestreuung

Oberhalb der Schwelle ophthalmologisch sichtbarer Läsionen konnte keine signifikante Zunahme der Streuung oder laterale Verschiebung der Speckle während der Bestrahlungszeit beobachtet werden. Dies Ergebnis steht im starken Widerspruch zu den Reflektometriemessungen, welche am Kaninchenauge einen Anstieg in der Streuung zwi-

schen 30 % und 400 % innerhalb der Bestrahlungszeit nachweisen konnten [Inderfurth et al., 1994]. Das für die OCT-Abbildung verwendete nahinfrarote Licht könnte für die fehlende Sensitivität der OCT-Messung auf den Anstieg der Streuung im Bereich der Photorezeptorzellen verantwortlich sein. Die Läsionen würde damit während der Bestrahlung für die OCT transparent bleiben, könnten aber durch Messmethoden mit Verwendung anderer Wellenlänge gemessen werden. Ein besseres Bewertungskriterium für eine erfolgte Koagulation des Gewebes war die Unterbrechung der Innensegment-/ Außensegment Verbindung der Photorezeptoren.

5.4.2 Echtzeitmessung der Gewebeverschiebung

Die Verschiebung des Gewebes ist auch *in vivo* durch Auswertung der Phasendifferenz unterhalb der Schwelle ophthalmologisch sichtbarer Läsionen messbar. Die Übereinstimmung des zeitlichen Verlaufs von Verschiebung und Temperatur fiel aber, im Vergleich zu den *Ex-vivo*-Experimenten, deutlich schlechter aus. Der zeitliche Verlauf der Verschiebung ist nach Beendigung der Bestrahlung nicht reversibel, sondern verharrte unterhalb der Koagulationsschwelle bei mindestens 1 μm Verschiebung. Die spezifische Verschiebung lag mit 75 nm/K im gleichen Größenbereich wie bei den *Ex-vivo*-Messungen. Die Nichtreversibilität der Verschiebung kann durch eine nichtthermoelastische Komponente der Gewebeverschiebung oder einer Änderung des optischen Weges erklärt werden. Durch eine physiologische Reaktion der Retina auf den Lichtreiz oder die Temperaturerhöhung kann eine, zur thermischen Expansion des RPE additive Verschiebung oder Änderung des Brechungsindex verursacht werden, die nach Beendigung der Bestrahlung nicht sofort reversibel ist. Mögliche Ursachen könnten zum Beispiel das Ausbleichen des Rhodopsins (Sehpurpur) in den Photorezeptorzellen, eine lokale Erweiterung der choroidalen Gefäße oder ein vermehrter lokaler Wassereinstrom in die Retina, als Folge der Temperaturerhöhung, sein.

Die durch Auswertung der Phasendifferenzen bestimmten Verschiebung des Gewebes im Parameterbereich ophthalmologisch sichtbarer Läsionen, wiesen nicht den *ex vivo* beobachteten überproportionalen Anstieg auf, sondern wurden zum Teil mit steigender Bestrahlungsstärke sogar kleiner. Die Breite der lateralen Verschiebungsverteilung nahm dabei ab. Ursache könnte eine Kontraktion der choroidalen Gefäße sein. Im Gegensatz zu der *Ex-vivo*-Situation kann diese Kontraktion auch in axialer Richtung erfolgen, da die Choroidea im *In-vivo*-Fall nicht zusammengefallen ist. Die Kontraktion erfolgt dabei lokal über den Bestrahlungsdurchmesser und wirkt sich auch auf die drüberliegenden

retinalen Schichten aus. Dies führt mit steigender Bestrahlungsstärke zu kleineren Verschiebungen im Gewebe sowie zu der beobachtet Abnahme in der Breite der lateralen Verschiebungsverteilung.

Die fünf, in den *Ex-vivo*-Messungen ermittelten Dosimetrieparameter, lassen sich nach den Ergebnissen der ersten *In-vivo*-Experimente wahrscheinlich nicht auf die *In-vivo*-Situation übertragen. Eine Zunahme der Streuung während der Laserexposition konnte nicht festgestellt werden. Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit konnte weder für die Verschiebung noch für die Expansion ein aussagekräftiger Dosimetrieparameter ermittelt werden. Möglicherweise ergeben sich aber neue Parameter zur Bestimmung der Koagulationsschwelle.

1. Innensegment-/Außensegment-Grenze der Photorezeptoren: Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit verschwindet die deutlich sichtbare Innensegment-/Außensegment-Grenze der Photorezeptoren. Für weitere Untersuchungen wäre ein hochauflösendes OCT sowie eine verbesserte Signalqualität vorteilhaft, um diese Grenze besser auflösen und dadurch eventuell segmentieren zu können.

2. Verschiebung der Retina: Die durch Phasendifferenzen bestimmte maximale Verschiebung am Ende der Bestrahlungszeit nahm im Bereich der ophthalmologischen Sichtbarkeit mit steigender Bestrahlungsstärke ab. Dies könnte auch als Dosimetrieparameter genutzt werden.

3. Laterale Breite der Verschiebung: Die laterale Breite der Verschiebung nimmt mit dem Einsetzen der Koagulation ab. Sollte dies reproduzierbar mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit auch bei verschiedenen Bestrahlungsfleckdurchmessern auftreten, so könnte die laterale Breite der Verschiebung als Dosimetrieparameter verwendet werden.

6 Zusammenfassung

Durch die Kombination eines Hochgeschwindigkeits-OCTs mit optoakustischer Temperaturmessung an einer Laserspaltlampe, konnten erstmalig Gewebeeränderungen während und nach der Photokoagulation der Retina, mit fast einer Millisekunde Zeitauflösung in verschiedenen Tiefen dargestellt werden. Optoakustisch gemessene Temperaturverläufe und Änderungen in OCT B-Scans wurden mit der ophthalmologischen Sichtbarkeit der Koagulationen verglichen. Die experimentellen Untersuchungen fanden *ex vivo* an enukleierten Schweineaugen und *in vivo* an Kaninchenaugen statt. Die hohe Bildwiederholrate der kontinuierlich in einer Schnittebene durch das Bestrahlungsareal verlaufenden OCT-Scans ermöglichte eine Analyse der durch eine Koagulation entstehenden Veränderungen der Streueigenschaften der Retina. Gleichzeitig konnte durch Auswertung der Phaseninformation, die Bewegung des Gewebes mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung bestimmt werden.

In den *Ex-vivo*-Experimenten wurden Leistungsreihen mit verschiedenen, klinisch relevanten Fleckdurchmessern zwischen $50\mu\text{m}$ und $200\mu\text{m}$ und Bestrahlungszeiten zwischen 50ms und 400ms untersucht. Bei Bestrahlungen ohne ophthalmologisch sichtbare Gewebeeränderung ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem Temperaturverlauf und einer, aus den Phasendifferenzen ermittelten, Verschiebung des Gewebes in Richtung des Glaskörpers. Durch Differentiation der Verschiebung in axialer Richtung und Mittelung über den Bereich zwischen RPE und Choroidea wurde zudem die lokale Expansion dieses Bereiches berechnet. Diese folgte im Zeitverlauf ebenfalls der Temperaturerhöhung. Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit der Bestrahlungseffekte wurde ein Anstieg der Streuung im Bereich der Photorezeptorzellen, zusammen mit einem überproportionalen Anstieg der Gewebeverschiebung festgestellt. Es konnte eine additive und nach Beendigung der Laserbestrahlung nicht mehr reversible Komponente im Verschiebungsverlauf festgestellt werden. Die Expansion war dabei auch hier in einem abgegrenzten Bereich zwischen RPE und Choroidea gut zu lokalisieren. Streuzunahme in der Photorezeptorschicht, Gewebeverschiebung sowie Expansion änderten sich mit der Gewebekoagulation und könnten als Dosimetrieparameter dienen. Es wurde eine gute Korrelation dieser Parameter mit der ophthalmologischen Sichtbarkeit beobachtet.

Für *In-vivo*-Messungen der Gewebebewegung am Kaninchenauge, musste eine Korrek-

tur der durch Herzschlag und Atmung des Tieres auftretenden physiologischen Bewegungen durchgeführt werden. Hierdurch konnten auch *in vivo* sehr kleine Gewebeverschiebungen von <100 nm bestimmt werden. In einer Leistungsreihe mit einem Bestrahlungsfleckdurchmesser von $133\ \mu\text{m}$ und einer Expositionszeit von 500 ms ergaben sich dabei markante Unterschiede im Gewebeverhalten zu den *Ex-vivo*-Versuchsreihen mit enukleierten Schweineaugen. Auch für Bestrahlungen mit ophthalmologisch nicht sichtbaren Effekten war die Gewebeverschiebung nicht reversibel. Mit dem Einsetzen der ophthalmologischen Sichtbarkeit konnte keine signifikante Zunahme der Streuung in den OCT B-Scans festgestellt werden. Die Verschiebung folgte zunächst auch weiterhin dem Temperaturverlauf, statt überproportional anzusteigen, und nahm für stark sichtbare Läsionen mit steigender Bestrahlungsstärke sogar ab. Die Expansion im Bereich zwischen RPE und Choroidea zeigte einen kontinuierlichen Anstieg mit der Bestrahlungsstärke. Die für die *Ex-vivo*-Messungen ermittelten Parameter zur Schwellwertbestimmung lassen sich nach den Ergebnissen der ersten *In-vivo*-Experimente nicht auf die *In-vivo*-Situation übertragen. Als mögliche neue Parameter zur Bestimmung der Koagulationsschwelle wurde das Aufheben der Sichtbarkeit der Innensegment- /Außensegment-Grenze der Photorezeptoren, sowie die Reduzierung der lateralen Ausdehnung der Verschiebung vorgeschlagen.

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden mittels Optischer Kohärenztomographie durch Laserbestrahlung verursachte Gewebeveränderungen an der Retina mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung dargestellt. Allerdings konnten die Ursachen der in den OCT-Bildern beobachteten Gewebeveränderungen und die Unterschiede im Gewebeverhalten zwischen den *Ex-vivo*- und *In-vivo*-Experimenten bislang nicht restlos aufgeklärt werden.

7.1 Gewebefeffekte während der Photokoagulation

Für eine genauere Bestimmung der Gewebefeffekte wäre eine Verbesserung des experimentellen Aufbaus notwendig. Weitere *In-vivo*-Experimente würden zur präziseren Einordnung der biologischen Prozesse und somit auch zu einem besseren Verständnis der Gewebeveränderungen während der Photokoagulation beitragen.

7.1.1 Gerätetechnische Änderungen

Durch den Austausch der galvanometrischen Scanner durch resonante Scanner, Polygon- oder MEMS-Scanner ist eine Aufnahme und Auswertung von dreidimensionalen Datensätzen möglich. Abweichung zwischen Koagulationsmittelpunkt und OCT-Messebene treten dann nicht mehr auf. Zudem können physiologische Bewegungen in den *In-vivo*-Experimenten vollständig korrigiert und bei Auswertung der Specklebewegung auch laterale Bewegungen des Gewebes räumlich dargestellt und quantifiziert werden.

Bei der Verwendung einer gemeinsamen Lichtquelle für OCT und Photokoagulation erlaubt die hohe Leistung des Bestrahlungslasers eine signifikante Verbesserung der Signalqualität der OCT-Bildgebung. Eine breitbandige Lichtquelle im grünen oder nahinfraroten Wellenlängenbereich würde eine Aufnahme von A-Scans mit sehr hoher zeitlicher Auflösung ermöglichen, ohne die Laserspaltlampe bautechnisch stark verändern zu müssen. Durch den gemeinsamen Strahlengang würde die Aufnahme der A-Scans dabei immer im Koagulationsmittelpunkt erfolgen. Da die OCT auf die Verwendung von Monomode-Fasern angewiesen und die Fleckgröße auf wenige μm beschränkt ist, muss der Strahl gescannt werden um ein ausreichendes Areal zu koagulieren. Durch die Kombination einer gemeinsamen Lichtquelle mit einem Full-Field-OCT [Bonin et al., 2010],

könnte eine Laserbestrahlung durchgeführt und gleichzeitig die Reaktion des Gewebes mit sehr schnellen Volumendatensätzen aufgenommen werden. Dazu ist allerdings die Neukonstruktion einer speziell angepassten Spaltlampe notwendig. Bisher sind noch keine geeigneten grünen Lichtquellen mit ausreichender spektraler Breite und Leistung erhältlich. Im nahinfraroten Bereich könnten Swept-Source-Laser verwendet werden, allerdings erfolgt in der klinischen Praxis die Behandlung des Augenhintergrundes bisher mit grünem Laserlicht, da dieses unter anderem vom RPE am besten absorbiert wird.

7.1.2 Weitere Experimente

Um die in den *Ex-vivo*-Versuchsreihen auftretenden lateralen Bewegung des Gewebes besser bestimmen zu können, ist die Durchführung weiterer Versuchsreihen mit freipräparierter Choroidea, RPE und Bruch'scher Membran sowie einer separaten Messung der Temperature Auswirkungen auf die einzelnen Gewebeschichten notwendig. Mit diesen Experimenten kann unterschieden werden, welche der Schichten für die laterale Kontraktion verantwortlich ist und warum diese Schicht kontrahiert. Wird die Kontraktion aufgrund des in Bruch'scher Membran oder Choroidea vorhandenen Kollagens verursacht, könnte dies zum Beispiel durch dynamische Speckleinterferometrie, wie bei Bliedner et al. beschrieben, oder auch durch Lichtmikroskopie bestimmt werden. Diese Experimente würden hauptsächlich zum einem besseren Verständnis der temperaturabhängigen Gewebeeigenschaften beitragen.

Zum Ausschluss von speziesbedingten Unterschieden zwischen *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Experimenten wäre die Durchführung von Versuchsreihen an Schweineaugen *in vivo* oder an enukleierten Kaninchenaugen *ex vivo* der nächstliegende Schritt, zu dessen Durchführung eine Optimierung des optischen Aufbaus zur Verbesserung der Bildqualität an den Kaninchenaugen notwendig ist. Eine *In-vivo*-Bildgebung an Schweineaugen gestaltet sich aufgrund der Größe der Tiere als schwierig. Die Tötung der Tiere während der Versuchsreihen könnte ebenfalls zum besseren Verständnis der durch die OCT gemessenen Unterschiede zwischen *Ex-Vivo*- und *In-Vivo*-Situation beitragen. Erfolgt die Untersuchung dabei durch Auswertung kontinuierlicher B-Scans mit getrennten Bestrahlungslaser und OCT-Strahlengängen sind große Bestrahlungsfleckdurchmesser vorteilhaft, um Zentrierungsabweichungen zwischen den Augen zu minimieren. In *In-vivo*-Versuchen führen große Fleckdurchmesser und kurze Bestrahlzeiten zudem zu kleineren Fehler in der Verschiebungs- und Expansionsberechnung, da Bewegungen dann einen geringeren Einfluss auf die Bildgebung haben. Dieser Sachverhalt ist auch für die Er-

mittlung möglicher Dosimetrieparameter wichtig, da eine hohe Varianz der Messwerte eventuell auftretende Abhängigkeiten verdecken und somit die Bestimmung von geeigneten Parametern zur Dosimetrie erschweren könnte.

Während der Bestrahlung konnte in der OCT keine Veränderung der Streuung im Bereich der Photorezeptorzellen festgestellt werden. Dreidimensionale Volumenscans über einen Zeitraum im Bereich mehreren Minuten bis zu einer Stunde könnten zu interessanten Einblicken über die Langzeitentwicklung der Koagulationen führen und klären, ob die erhöhte Streuung erst zu einem späteren Zeitpunkt in der OCT sichtbar wird.

In weiteren *In-vivo*-Versuchsreihen an Kaninchenaugen im Bereich unter-schwelliger Bestrahlung sollte die Nichtreversibilität der Verschiebungen nach Beendigung der Bestrahlung bestätigt und deren Ursache aufgeklärt werden. Wird die zusätzliche Verschiebung durch den Lichtreiz verursacht, so müssten bei Versuchen mit Durchführung einer Hell-Dunkel-Adaptionen Signaländerungen eintreten. Eventuell könnten so z.B mit einem Streifenmuster beleuchtete Areale von unbeleuchteten Arealen unterschieden werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Durchführung einer induzierten lokalen Netzhautablösung um den Kontakt zwischen RPE und neuronaler Retina zu unterbrechen und so Effekte der neuronalen Retina bei einer Bestrahlung unterscheidbar zu machen. Werden die OCT-Messwerte durch Reaktionen der neuronalen Retina beeinflusst, sollte überprüft werden inwieweit diese die Temperaturabhängigkeit der Messwerte verändern und ob eine Dosimetrie im Bereich unter-schwelliger Bestrahlungen möglich ist.

Die Retina des menschlichen Auges wird durch die OCT deutlich anders dargestellt als die in dieser Arbeit untersuchte Retina von Schweine- und Kaninchenaugen. So sind zum Beispiel die neuronalen Schichten gut zu unterscheiden. Ein entscheidender Schritt ist deshalb eine klinische Studie am Menschen. Mit einem klinisch zugelassenen OCT-Adapter können relativ einfach während der Behandlung von Patienten mit diabetischer Retinopathie zeitgleich Messdaten erhoben und nachfolgend nach geeigneten Dosimetrieparametern untersucht werden. Eine klinischen Studie würde zeigen, ob die Methode auch in der klinischen Praxis verwendet werden kann und darüber hinaus eventuell noch offene Fragestellungen klären oder auch durch neue Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Mechanismen während der Photokoagulation beitragen kann.

7.2 Umsetzung des Messverfahrens zur Dosimetrie

Können Dosimetrieparameter in einer klinischen Studie für die menschliche Retina ermittelt werden, ist mittels Optischer Kohärenztomographie nicht nur eine Untersuchung des Auges vor und nach der Behandlung möglich, sondern es kann auch während der Bestrahlung mit einer Online-Dosimetrie optimal behandelt werden. Durch die OCT sind dabei, im Gegensatz zur optoakustischen Temperaturbestimmung oder Reflektometrie, die Auswirkungen der Bestrahlung auf die einzelnen Gewebeschichten mit hoher räumlicher Auflösung bestimmbar. Diese Informationen könnten zu einer verbesserten Klassifikation der Läsionen und einer Optimierung der Behandlung verwendet werden. Eine an das Therapieziel angepasste Behandlung könnte nachfolgend zu besseren Ergebnissen sowie schnelleren Heilungsverläufen führen und minimiert zudem den Visusverlust des Patienten.

Literaturverzeichnis

- [Asiyo-Vogel, 1996] Asiyo-Vogel M. N. (1996). Methods for the Analysis of Thermal Denaturation of Corneal Collagen in Refractive Laser Surgery. Dissertation, Medizinischen Universität zu Lübeck.
- [Azar und Stasi, 2009] Azar D. T. und Stasi K. (2009). Conductive Keratoplasty and Laser Thermal Keratoplasty for Correction of Hyperopia and Presbyopia. In: Yanoff M. und Duker J. S., *Ophthalmology*, 3. Auflage, Mosby Elsevier, St. Louis M.O., Kapitel 3, Seite 174–180.
- [Barton et al., 2001] Barton J. K., Rollins A., Yazdanfar S., Pfefer J., Westphal V. und Izatt J. A. (2001). Photothermal coagulation of blood vessels: a comparison of high-speed optical coherence tomography and numerical modelling. *Physics in Medicine and Biology*, 46:1665–1678.
- [Bashkatov und Genina, 2003] Bashkatov A. N. und Genina E. A. (2003). Water refractive index in dependence on temperature and wavelength: a simple approximation. *Proceedings of SPIE*, 5068:393–395.
- [Birngruber et al., 1995] Birngruber B., Hee M., Boppard S., Fujimoto J., Swanson E., Toth C., DiCarlo D., Cain C., Noojin G. und Roach W. (1995). In vivo imaging of the development of linear and non-linear retinal laser effects using optical coherence tomography in correlation with histopathological findings. *Proceedings of SPIE*, 2391:21–27.
- [Birngruber et al., 1985] Birngruber B., Hillenkamp F. und Gabel V.-P. (1985). Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Physics*, 48:781–796.
- [Birngruber und Wacker, 1991] Birngruber B. und Wacker H. (1991). Choroidal Circulation and Heat Convection at the Fundus of the Eye. In: Wolbarsht M.L., *Laser Application in Medicine and Biology Volume 5*, 1. Auflage, Plenum Press, New York, Kapitel 6, Seite 277–361.
- [Birngruber, 2002] Birngruber R. (2002). Grundlagen ophthalmologischer Laseranwendungen. In: Kampik A. und Grehn F., *Augenärztliche Therapie*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Kapitel 12, Seite 114–124.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [Black et al., 2005] Black J. F., Wade N. und Barton K. (2005). Mechanistic comparison of blood undergoing laser photocoagulation at 532 and 1064 nm. *Lasers in Surgery and Medicine*, 36:155–165.
- [Bliedtner et al., 2013] Bliedtner K., Seifert E. und Brinkmann R. (2013). Temperature induced tissue deformation monitored by dynamic speckle interferometry. In: Buzug T. M. et al., *Student Conference 2012. Medical Engineering Science*, 1. Auflage, Grin Verlag GmbH, München, Seite 75–78.
- [Bonin et al., 2010] Bonin T., Franke G., Hagen-Eggert M., Koch P. und Hüttmann G. (2010). In vivo Fourier-domain full-field OCT of the human retina with 1.5 million A-lines/s. *Optics Letters*, 35:3432 – 3434.
- [Brinkmann et al., 2012] Brinkmann R., Koinzer S., Schlott K., Ptaszynski L., Bever M., Baade A., Luft S., Miura Y., Roider J. und Birngruber R. (2012). Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *Journal of Biomedical Optics*, 17:061219 1–10.
- [Campbell, 1998] Campbell N. A. (1998). *Biologie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin .
- [Coupland und Bechrakis, 2008] Coupland S. E. und Bechrakis N. E. (2008). Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. In: Kellner, U. und Wachtlin, J., *Retina. Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Kapitel 1, Seite 3–20.
- [de Boer, 2008] de Boer J. (2008). Spectral/Fourier Domain Optical Coherence Tomography. In: Drexler W. und Fujimoto J. G., *Optical Coherence Tomography. Technology and Applications*, 1. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York, Kapitel 5, Seite 147–175.
- [Drexler, 2008] Drexler, W. und Fujimoto J. (2008). *Optical Coherence Tomography. Technology and Applications*. 1. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York.
- [Framme et al., 2002] Framme C., Brinkmann R., Birngruber R. und Roider J. (2002). Autofluorescence imaging after selective RPE laser treatment in macular diseases and clinical outcome: a pilot study. *British Journal of Ophthalmology*, 86:1099–1106.
- [Framme et al., 2009] Framme C., Walter A., Prahs P., Regler R., Theisen-Kunde D., Alt C. und Brinkmann R. (2009). Structural changes of the retina after conventional la-

- ser photocoagulation and selective retina treatment (SRT) in spectral domain OCT. *Current Eye Research*, 34:568 – 579.
- [Fujimoto und Drexler, 2008] Fujimoto J. G. und Drexler W. (2008). Introduction to Optical Coherence Tomography. In: Drexler W. und Fujimoto J., *Optical Coherence Tomography. Technology and Applications*, 1. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York, Kapitel 1, Seite 1–45.
- [Gorisch und Boergen, 1982] Gorisch W. und Boergen K.-P. (1982). Heat-induced contraction of blood vessels. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2:1–13.
- [Gray, 2000] Gray H. (1918, 2000). The Organs of the Sense and the Common Integument. In: Lewis, W. H., *Anatomy of the Human Body*, 20. Auflage, Bartleby.com, New York, Kapitel 10.
- [Guan et al., 2011] Guan G., Reif R., Huang Z. und Wang R. (2011). Depth profiling of photothermal compound concentrations using phase sensitive optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 16:126003 1–19.
- [Guymer et al., 1998] Guymer R., Luthert P. und Bird A. (1998). Changes in Bruch's Membrane and related structures with age. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18:59–90.
- [Hain, 2012] Hain C. (2012). Bestimmung der thermischen Expansion von Geweben mittels phasensensitiver Optischer Kohärenztomographie, Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck.
- [Hammes, 2011] Hammes H.-P. (2011). Diabetische Retinopathie und Makulopathie. *Der Internist*, 52:518 – 532.
- [Hollwich, 1988] Hollwich F. (1988). Netzhaut (Retina). In: *Augenheilkunde*, 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, Kapitel 12, Seite 212 – 270.
- [Inderfurth et al., 1994] Inderfurth J., Ferguson R., Frish M. und Birngruber R. (1994). Dynamic reflectometer for control of laser photocoagulation on the retina. *Laser in Surgery and Medicine*, 15:54–61.
- [Izatt, 2008] Izatt J. A. C. M. A. (2008). Theory of Optical Coherence Tomography. In: Drexler W. und Fujimoto J., *Optical Coherence Tomography. Technology and Applications*, 1. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York, Kapitel 2, Seite 47–72.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [Jähne, 2005] Jähne B. (2005). Kanten. In: *Digitale Bildverarbeitung*, 6. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York, Kapitel 12, Seite 345 – 372.
- [Joussen et al., 2003] Joussen A., Fauser S., Krohne T. U., Lemmen K.-D., Lang G. E. und Kirchhof B. (2003). Diabetische Retinopathie. *Der Ophthalmologe*, 100:363 – 370.
- [Kandulla, 2009] Kandulla J. (2009). Experimentelle und theoretische Untersuchung zur optoakustischen Temperaturbestimmung während Transpupillarer Thermotherapie. Dissertation, Universität zu Lübeck.
- [Kandulla et al., 2006] Kandulla J., Elsner H., Birngruber R. und Brinkmann R. (2006). Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation. *Journal of Biomedical Optics*, 11(4):041111 1–13.
- [Kirchhof, 2000] Kirchhof B. (2000). Die altersabhängige Makuladegeneration. *Deutsches Ärzteblatt*, 21:1458 – 1462.
- [Koinzer et al., 2012] Koinzer S., Schlott K., Portz L., Ptaszynski L., Baade A., Bever M., Saeger M., Caliebe A., Denner R., Birngruber B., Brinkmann R. und Roider J. (2012). Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *Journal of Biophotonics*, 5:889 – 902.
- [Lankenau, 2002] Lankenau E. (2002). Optische Kohärenztomographie: Dispersive Einflüsse und Anwendungen in der medizinischen Diagnostik. Dissertation, Medizinische Universität zu Lübeck.
- [Leitgeb, 2008] Leitgeb R. W. M. (2008). Complex and Coherence Noise Free Fourier Domain Optical Coherence Tomography. In: Drexler W. und Fujimoto J., *Optical Coherence Tomography. Technology and Applications*, 1. Auflage, Springer, Berlin - Heidelberg - New York, Kapitel 6, Seite 177–209.
- [Luft, 2010] Luft S. (2010). Optoakustische Druck - Temperatur - Kalibrierung für die retinale Photokoagulation, Bachelorarbeit, Westsächsische Hochschule Zwickau.
- [Maini und Aggarwal, 2009] Maini R. und Aggarwal H. (2009). Study and Comparison of Various Image Edge Detection Techniques. *International Journal of Image Processing*, 3:1 – 11.
- [Meyer-Schwickerath, 1954] Meyer-Schwickerath G. (1954). Lichtkoagulationen. *Archives of Ophthalmology*, 156:2–34.

- [Milner et al., 2002] Milner T. E., Izatt J. A., Yazdanfar S., Rollins A. M., Lindmo T., Chen Z., Nelson J. S. und Wang X. (2002). Doppler Optical Coherence Tomography. In: Bouma B. E. und Tearney G. J. *Handbook of Optical Coherence Tomography*, 1. Auflage, Marcel Dekker Inc., New York - Basel, Kapitel 8, Seite 203 – 236.
- [Monti-Graziadei und Graziadei, 1979] Monti-Graziadei G. A. und Graziadei P. P. C. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of Neurocytology*, 8:197–213.
- [National Instruments, 2002] National Instruments (2002). Application Design Patterns: Producer/Consumer. www.zone.ni.com.
- [Park et al., 2005] Park B., Pierce M., Cense B., Yun S., Mujat M., Tearney G. J., Bouma B. und de Boer J. F. (2005). Real-time fiber-based multi-functional spectraldomain optical coherence tomography at 1,3µm. *Optics Express*, 13:3931 – 3944.
- [Potsaid et al., 2008] Potsaid B., Gorczynska I., Srinivasan V. J., Chen Y., Jiang J., Cable A. und Fujimoto J. G. (2008). Ultrahigh speed Spectral/Fourier domain OCT ophthalmic imaging at 70,000 to 312,500 axial scans per second. *Optics Express*, 16:15149–15169.
- [Povazay et al., 2003] Povazay B., Bizheva K., Hermann B., A. U., H. S., Fercher A. und Drexler W. (2003). Enhanced visualization of choroidal vessels using ultrahigh resolution ophthalmic OCT at 1050 nm. *Optics Express*, 11:1980–1986.
- [Ross und Uebelhoer, 2011] Ross V. und Uebelhoer N. (2011). Laser-Tissue Interactions. In: Nouri, K., *Lasers in Dermatology and Medicine*, 1. Auflage, Springer, London - Dordrecht - Heidelberg - New York, Kapitel 1, Seite 1–25.
- [Sakata et al., 2009] Sakata L. M., Deleon-Ortega J., Sakata V. und Girkin C. A. (2009). Optical coherence tomography of the retina and optic nerve - a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 37:90–99.
- [Saleh und Teich, 2007] Saleh B. und Teich M. C. (2007). Fundamentals of Photonics. Wiley.
- [Schüle, 2002] Schüle G. (2002). Mechanismen und On-line Dosimetrie bei selektiver RPE Therapie. Dissertation, Medizinische Universität zu Lübeck.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [Schüle et al., 2005] Schüle G., Elsner H., Framme C., Roider J., Birngruber R. und Brinkmann R. (2005). Optoacoustic real-time dosimetry for selective retina treatment. *Journal of Biomedical Optics*, 10:064022 1–11.
- [Schlott et al., 2012] Schlott K., Koinzer S., Ptaszynski L., Bever M., Baade A., Roider J., Birngruber R. und Brinkmann R. (2012). Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *Journal of Biomedical Optics*, 17:06122 31–38.
- [Schlott et al., 2007] Schlott K., Stalljohann J., Weber B., Kandulla J., Herrmann K., Birngruber R. und Brinkmann R. (2007). Optoacoustic online temperature determination during retinal laser photocoagulation *SPIE Proceedings, Conference Volume 6632*.
- [Schmitt, 1998] Schmitt J. M. (1998). OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain of tissue. *Optics Express*, 3:199 – 211.
- [Spahr et al., 2012] Spahr H., Rudolph L., Müller H., Birngruber B. und Hüttmann G. (2012). Imaging of photothermal tissue expansion via phase sensitive optical coherence tomography. In Izatt J., Fujimoto J. und V. T., editors, *SPIE Proceedings, Conference Volume 8213*, volume 8213.
- [Steinbrecher, 1993] Steinbrecher R. (1993). Kantendetektion. In: *Bildverarbeitung in der Praxis*, 1. Auflage, Oldenbourg, München - Wien, Kapitel 11, Seite 137 – 174.
- [Stoltz und Brucker, 2003] Stoltz R. und Brucker A. (2003). Laser in Diabetes. In: Frankhauser F. und Kwasniewska S., *Lasers in Ophthalmology. Basic, Diagnostic and Surgical Aspects: a Review* , 1. Auflage, Kugler Publications, Den Haag, Kapitel 25, Seite 229–240.
- [Stringer und Parr, 1964] Stringer H. und Parr J. (1964). Shrinkage Temperature of Eye Collagen. *Nature*, 204:1307.
- [Thomson und Pearce, 2011] Thomson S. und Pearce J. A. (2011). Thermal Damage and Rate Process in Biologic Tissue. In: Welch A. J. und van Gamert M. J. C., *In: Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. 2. Auflage, Springer, Dordrecht - Heidelberg - London - New York, Kapitel 13, Seite 487–549.
- [Toth et al., 1997] Toth C., Birngruber B., Boppard, S. and Hee M., Fujimoto J., Dicarolo C., Swanson E., Cain C., Narayan D., Noojin G. und Roach W. (1997). Argon laser retinal lesions evaluated in vivo by optical coherence tomography. *American Journal of Ophthalmology*, 123:188–198.

- [Vakoc et al., 2007] Vakoc B. J., Guillermo J. T. und Bouma B. E. (2007). Real-time microscopic visualization of tissue response to laser thermal therapy. *Journal of Biomedical Optics- Letters*, 12:1–3.
- [Vakoc et al., 2005] Vakoc B. J., Yun S. H., de Boer J. F., Tearney G. J. und Bouma B. (2005). Phase-resolved optical frequency domain imaging. *Optics Express*, 14:5483 – 5493.
- [Walsh et al., 2011] Walsh J., van Leeuwen T., Jansen E., Motamedi M. und Welch A. (2011). Pulsed Laser Tissue Interaction. In: Welch A. J. und van Gamert M. J. C., *In: Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. 2. Auflage, Springer, Dordrecht - Heidelberg - London - New York, Kapitel 15, Seite 617–653.
- [Wieser et al., 2010] Wieser W., Biedermann B. R., Klein T., Eigenwillig C. M. und Huber R. (2010). Multi-Megahertz OCT: High quality 3D imaging at 20 million A-scans and 4.5 GVoxels per second. *Optics Express*, 18:14686–14704.
- [Yazdanfar et al., 2005] Yazdanfar S., Yang C., Sarunic M. und Izatt J. A. (2005). Frequency estimation precision in Doppler optical coherence tomography using the Cramer-Rao lower bound. *Optics Express*, 13:410 – 416.
- [Yeow et al., 2005] Yeow J. T. W., Yang V., Chahwan A., Gordon M. L., Vitkin I. A., Wilson B. C. und Goldenberg A. A. (2005). Micromachined 2-D scanner for 3-D optical coherence tomography. *Sensors and Actuators A: Physical*, 117:331–340.
- [You et al., 2006] You J., Chen T., Mujat M., Park B. und de Boer F. (2006). Pulsed illumination spectral-domain optical coherence tomography for human retinal imaging. *Optics Express*, 14:6739–6748.
- [Yun et al., 2004] Yun S., Tearney G. J., de Boer J. und Bouma B. (2004). Motion artifacts in optical coherence tomography with frequency-domain ranging. *Optics Express*, 12:2977–2998.
- [Zhao et al., 2000a] Zhao Y., Chen Z., Saxer C., S. X., de Boer F. und Nelso J. (2000a). Phase-resolved optical coherence tomography and optical Doppler tomography for imaging blood flow in human skin with fast scanning speed and high velocity sensitivity. *Optics Letters*, 25:114–116.
- [Zhao et al., 2000b] Zhao Y., Chen Z., Saxer C., Shen Q., Xiang S., de Boer F. und Nelson J. (2000b). Doppler standard deviation imaging for clinical monitoring of in vivo human skin blood flow. *Optics Letters*, 25:1358–1360.

A Anhang

A.1 Monti-Graziadei Fixierung

Für die Fixierung der histopathologischen Gewebeschnitte wurde eine Lösung nach Monti-Graziadei verwendet [Monti-Graziadei und Graziadei, 1979]:

Kakodylatpuffer 0,12M pH 7,4: 312ml

Parafomaldehyd 10% : 38ml

Calciumchlorid 3%: 6ml

Glutaraldehyd 25% pH 7,35: 50ml

Aqua dest. : 218 ml

A.2 Datensätze

Zusammenfassung der ausgewerteten Datensätze aller 12 enukleierten Schweineaugen mit Fleckdurchmessern von 50 μm bis 200 μm und Bestrahlungszeiten von 50 ms bis 400 ms sowie der *In-vivo*-Leistungsreihe mit einem Fleckdurchmesser von 133 μm und einer Bestrahlungszeit von 500 ms. In den jeweiligen Tabellen sind Fleck Nr., Bestrahlungsstärke, optoakustische gemessene maximale Temperaturerhöhung ΔT_{max} und ophthalmologische Sichtbarkeit zusammen mit den ausgewerteten OCT Parametern für die maximale Verschiebung der Retinaoberfläche Δz_s^{max} , Streuänderung ΔS_{PRS}^{max} , Verschiebung des Gewebes Δz_{max} und Expansion $\Delta \varepsilon_{zmax}$ zusammengestellt.

Schweineauge Nr. 1 (Bestrahlungszeit 400 ms, Fleckgröße 200 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	410	> 70	ja	61	7,6	49	0,35
2	400	> 70	ja	59	7,8	52	0,33
3	390	> 70	ja	46	7,0	49	0,31
4	380	67	ja	42	6,9	43	0,28
5	370	60	ja	37	6,4	42	0,27
6	360	45	ja	35	6,1	47	0,26
7	340	41	ja	39	6,1	40	0,26
8	330	37	leicht	31	5,2	39	0,26
9	320	36	leicht	35	4,1	34	0,23
10	310	33	leicht	29	4,7	35	0,26
11	290	37	leicht	31	4,9	31	0,23
12	280	63	ja	33	4,9	32	0,19
13	260	44	ja	25	4,3	27	0,13
14	250	41	leicht	21	4,9	21	0,11
15	240	37	leicht	25	4,3	23	0,15
16	220	32	leicht	24	2,3	20	0,14
17	210	31	nein	13	2,4	17	0,13
18	190	28	nein	14	1,5	12	$90 \cdot 10^{-3}$
19	180	26	nein	7,8	1,0	7,3	$43 \cdot 10^{-3}$
20	160	24	nein	6,1	0,55	5,4	$19 \cdot 10^{-3}$
21	145	29	leicht	13	0,86	6,4	$23 \cdot 10^{-3}$
22	130	26	leicht	7,2	0,63	4,7	$94 \cdot 10^{-3}$
23	120	22	leicht	-0,5	0,41	2,2	$26 \cdot 10^{-3}$
24	105	19	nein	5,3	0,63	2,0	$5,0 \cdot 10^{-3}$
25	89	14	nein	4,3	0,18	1,5	$1,0 \cdot 10^{-3}$
26	77	13	nein	1,3	0,08	1,8	$2,3 \cdot 10^{-3}$
27	59	10	nein	-1,8	0,43	1,3	$1,5 \cdot 10^{-3}$
28	46	9	nein	0,42	0,06	1,1	$1,8 \cdot 10^{-3}$
29	31	6	nein	0,37	0,27	0,62	$0,14 \cdot 10^{-3}$
31	15	4	nein	-1,7	-0,47	0,53	$0,95 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 2 (Bestrahlungszeit 400 ms, Fleckgröße 100 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	1660	40	ja	46	4,7	52	0,31
2	1600	30	ja	27	4,9	44	0,27
3	1560	29	ja	40	4,4	46	0,31
4	1520	28	leicht	29	3,7	39	0,28
5	1480	31	leicht	35	4,8	40	0,3
6	1420	30	leicht	29	4,6	37	0,23
7	1370	30	leicht	23	4,6	34	0,21
8	1320	30	leicht	26	4,3	29	0,18
9	1260	29	leicht	35	6,8	39	0,27
10	1210	29	leicht	24	4,8	29	0,18
11	1160	26	leicht	19	3,1	16	0,11
12	1100	25	leicht	13	3,0	13	$48 \cdot 10^{-3}$
13	1060	24	nein	18	2,0	18	0,18
14	1000	24	nein	15	2,4	13	0,13
15	940	24	leicht	16	3,2	14	$99 \cdot 10^{-3}$
16	890	23	nein	13	1,7	14	$95 \cdot 10^{-3}$
17	820	21	leicht	4,2	0,97	6,4	$49 \cdot 10^{-3}$
18	770	17	nein	2,1	0,47	2,4	$-7,2 \cdot 10^{-3}$
19	710	16	nein	2,3	-0,09	2,4	$-5,4 \cdot 10^{-3}$
20	650	17	nein	0,25	0,96	2,4	$0,14 \cdot 10^{-3}$
21	600	16	nein	5,1	-0,11	2,9	$2,8 \cdot 10^{-3}$
22	550	15	nein	1,1	0,16	2,6	$1,8 \cdot 10^{-3}$
23	490	13	nein	-0,5	0,54	2,0	$0,82 \cdot 10^{-3}$
24	430	12	nein	0,85	0,25	2,6	$1,9 \cdot 10^{-3}$
25	360	11	nein	0,25	0,26	1,9	$0,33 \cdot 10^{-3}$
26	320	10	nein	-2,0	0,23	1,7	$2,2 \cdot 10^{-3}$
27	240	6	nein	2,3	0,17	1,0	$0,44 \cdot 10^{-3}$
28	190	5	nein	3,2	0,51	1,0	$-1,2 \cdot 10^{-3}$
29	120	4	nein	2,6	-0,05	0,83	$1,2 \cdot 10^{-3}$
31	60	3	nein	2,2	-0,4	0,56	$0,003 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 3 (Bestrahlungszeit 400 ms, Fleckgröße 50 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \epsilon_{zmax}$
1	4300	60	ja	38	8,6	37	0,26
2	4165	55	ja	46	8,4	42	0,28
3	4080	51	ja	45	8,7	40	0,21
4	3975	50	ja	32	8,3	30	0,11
5	3805	45	ja	37	8,2	37	0,22
6	3695	41	ja	38	8,9	34	0,20
7	3560	37	ja	25	7,5	27	0,17
8	3430	42	ja	28	7,7	27	0,16
9	3270	42	leicht	29	6,0	26	0,15
10	3115	39	leicht	23	6,4	27	0,17
11	2965	37	leicht	22	7,1	20	0,12
12	2830	33	leicht	14	5,3	19	0,12
13	2720	29	leicht	11	4,6	13	$94 \cdot 10^{-3}$
14	2560	28	leicht	8,2	4,0	12	$81 \cdot 10^{-3}$
15	2425	32	leicht	17	3,4	18	0,14
16	2275	31	leicht	10	4,6	13	$81 \cdot 10^{-3}$
17	2130	29	leicht	9,8	3,8	11	$65 \cdot 10^{-3}$
18	1960	25	leicht	4,4	1,5	5,3	$18 \cdot 10^{-3}$
19	1835	24	nein	-1,2	0,92	2,3	$-2,6 \cdot 10^{-3}$
20	1680	20	nein	-0,05	0,64	1,6	$-1,9 \cdot 10^{-3}$
21	1525	23	nein	-4,8	0,03	1,7	$-1,5 \cdot 10^{-3}$
22	1400	20	nein	6,7	0,24	1,4	$-2,5 \cdot 10^{-3}$
23	1220	18	nein	1,1	-0,01	1,4	$1,1 \cdot 10^{-3}$
24	1090	13	nein	2,2	0,2	1,2	$1,0 \cdot 10^{-3}$
25	915	11	nein	2,1	-0,81	1,2	$0,95 \cdot 10^{-3}$
26	780	11	nein	-1,1	0,28	1,2	$2,2 \cdot 10^{-3}$
27	605	10	nein	-0,21	0,12	0,76	$-0,15 \cdot 10^{-3}$
28	441	7	nein	1,7	0,24	0,61	$0,11 \cdot 10^{-3}$
29	290	5	nein	0,92	-0,44	0,44	$-0,06 \cdot 10^{-3}$
31	151	4	nein	2,9	-0,27	0,3	$0,7 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 4 (Bestrahlungszeit 200 ms, Fleckgröße 200 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	410	35	ja	26	7,2	26	0,17
2	400	33	ja	32	7,0	35	0,17
3	390	33	ja	26	6,9	30	0,13
4	380	32	ja	31	6,3	30	0,15
5	370	31	ja	23	6,1	25	0,11
6	360	28	ja	21	4,9	20	$97 \cdot 10^{-3}$
7	340	27	leicht	18	4,9	19	$103 \cdot 10^{-3}$
8	330	24	leicht	6	4,2	8,5	$27 \cdot 10^{-3}$
9	320	25	leicht	11	4,1	13	$61 \cdot 10^{-3}$
10	310	23	leicht	11	2,9	11	$45 \cdot 10^{-3}$
11	290	23	nein	14	2,1	15	$64 \cdot 10^{-3}$
12	280	24	leicht	10	2,8	12	$75 \cdot 10^{-3}$
13	260	22	nein	10	2,6	6,6	$59 \cdot 10^{-3}$
14	250	23	leicht	7	3,3	6,8	$40 \cdot 10^{-3}$
15	240	21	leicht	4	1,7	4,8	$19 \cdot 10^{-3}$
16	220	19	leicht	2	0,3	2,5	$0,7 \cdot 10^{-3}$
17	210	19	leicht	2	1,1	2,6	$3 \cdot 10^{-3}$
18	190	18	leicht	2	1,2	2	$0,5 \cdot 10^{-3}$
19	180	18	nein	0,2	0,7	0,9	$-1,4 \cdot 10^{-3}$
20	160	16	nein	2	0,2	1,2	$0,6 \cdot 10^{-3}$
21	145	15	nein	3	-0,01	1	$-0,5 \cdot 10^{-3}$
22	130	15	nein	1	-0,43	0,8	$-1,5 \cdot 10^{-3}$
23	120	13	nein	2	0,05	0,9	$-2,5 \cdot 10^{-3}$
24	105	11	nein	3	0,07	0,9	$-1,6 \cdot 10^{-3}$
25	89	10	nein	-0,6	-0,26	0,8	$-1,7 \cdot 10^{-3}$
26	77	9	nein	2	-0,15	0,9	$1,5 \cdot 10^{-3}$
27	59	8	nein	3	-0,25	0,8	$2,4 \cdot 10^{-3}$
28	46	6	nein	-0,4	-0,2	0,6	$1,7 \cdot 10^{-3}$
29	31	5	nein	1	-0,44	0,4	$0,94 \cdot 10^{-3}$
31	15	3	nein	-0,2	-0,24	0,3	$0,21 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 5							
(Bestrahlungszeit 200 ms, Fleckgröße 100 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \epsilon_{zmax}$
1	1660	33	leicht	25	5,3	38	0,19
2	1600	33	leicht	31	3,8	37	0,20
3	1560	30	leicht	21	2,6	27	0,14
4	1520	30	leicht	21	2,4	33	0,16
5	1480	29	leicht	22	2,3	28	0,13
6	1420	28	leicht	17	1,4	21	$77 \cdot 10^{-3}$
7	1370	28	leicht	20	0,36	25	0,15
8	1320	27	leicht	13	0,77	16	$84 \cdot 10^{-3}$
9	1260	27	leicht	25	1,7	25	0,17
10	1210	27	leicht	13	0,34	16	–
11	1160	25	leicht	21	1,3	18	–
12	1100	21	leicht	12	-1,0	6,0	$6,7 \cdot 10^{-3}$
13	1060	22	leicht	14	0,79	12	$44 \cdot 10^{-3}$
14	1000	22	leicht	3,2	0,3	6,9	$19 \cdot 10^{-3}$
15	940	19	nein	1,3	0,09	3,8	$3,1 \cdot 10^{-3}$
16	890	20	nein	-1,1	-0,9	2,4	$-3,5 \cdot 10^{-3}$
17	820	19	nein	6,7	-0,87	7,6	$40 \cdot 10^{-3}$
18	770	17	nein	4,1	-0,28	3,5	$9,9 \cdot 10^{-3}$
19	710	16	nein	3,2	-0,02	2,3	$-1,6 \cdot 10^{-3}$
20	650	16	nein	3,8	0,11	2,3	$0,48 \cdot 10^{-3}$
21	600	12	nein	5,1	0,05	2,2	$-1,2 \cdot 10^{-3}$
22	550	13	nein	4,0	0,66	1,9	$0,56 \cdot 10^{-3}$
23	490	12	nein	4,2	0,05	2,0	$-1,5 \cdot 10^{-3}$
24	430	10	nein	-0,98	1,04	1,9	$1,22 \cdot 10^{-3}$
25	360	9	nein	6,3	0,29	1,3	$-0,33 \cdot 10^{-3}$
26	320	9	nein	3,1	0,18	1,3	$-0,13 \cdot 10^{-3}$
27	240	7	nein	-0,74	0,41	1,0	$0,055 \cdot 10^{-3}$
28	190	5	nein	0,43	0,53	0,77	$-0,74 \cdot 10^{-3}$
29	120	5	nein	-0,16	0,18	0,68	$0,43 \cdot 10^{-3}$
31	60	3	nein	0,32	-0,26	0,45	$0,24 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 6 (Bestrahlungszeit 200 ms, Fleckgröße 50 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	4300	57	ja	56	9,6	36	0,21
2	4165	46	ja	45	7,8	36	0,21
3	4080	38	ja	52	6,6	41	0,23
4	3975	39	ja	39	8,9	38	0,21
5	3805	39	ja	32	7,0	36	0,20
6	3695	34	leicht	28	3,9	33	0,19
7	3560	31	leicht	25	4,9	27	0,16
8	3430	30	leicht	24	3,6	22	0,17
9	3270	41	ja	37	4,3	36	0,24
10	3115	39	leicht	35	6,0	32	0,24
11	2965	34	leicht	37	4,2	32	0,26
12	2830	32	leicht	21	2,8	22	0,12
13	2720	27	leicht	12	1,2	14	0,17
14	2560	25	nein	10	2,4	8,0	$80 \cdot 10^{-3}$
15	2425	23	nein	3,3	1,0	3,5	$16 \cdot 10^{-3}$
16	2275	34	leicht	16	3,6	20	0,13
17	2130	29	leicht	8,7	1,5	8,6	$41 \cdot 10^{-3}$
18	1960	24	leicht	2,7	1,2	3,5	$9,8 \cdot 10^{-3}$
19	1835	21	leicht	0,35	0,92	2,3	$0,99 \cdot 10^{-3}$
20	1680	19	nein	1,2	0,83	1,9	$-0,78 \cdot 10^{-3}$
21	1525	17	nein	-0,65	-0,22	1,8	$-0,12 \cdot 10^{-3}$
22	1400	23	leicht	-0,04	1,5	3,2	$13 \cdot 10^{-3}$
23	1220	18	leicht	-2,0	-0,31	1,6	$2,6 \cdot 10^{-3}$
24	1090	15	nein	1,2	0,31	1,9	$2,5 \cdot 10^{-3}$
25	915	11	nein	-2,3	0,17	1,3	$-0,54 \cdot 10^{-3}$
26	780	10	nein	2,5	0,15	0,93	$1,0 \cdot 10^{-3}$
27	605	8	nein	1,2	0,68	0,84	$1,7 \cdot 10^{-3}$
28	441	6	nein	-2,7	-0,05	0,72	$0,11 \cdot 10^{-3}$
29	290	4	nein	0,46	0,05	0,47	$0,17 \cdot 10^{-3}$
31	151	3	nein	-1,7	-0,78	0,39	$-0,44 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 7 (Bestrahlungszeit 100 ms, Fleckgröße 200 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \epsilon_{zmax}$
1	410	37	ja	28	5,2	25	0,18
2	400	37	ja	28	5,2	28	0,17
3	390	39	ja	33	5,1	30	0,19
4	380	36	ja	19	5,0	28	0,17
5	370	34	ja	23	4,6	27	0,18
6	360	33	ja	21	3,5	27	0,16
7	340	31	leicht	21	3,6	25	0,20
8	330	26	leicht	17	2,5	17	0,16
9	320	29	leicht	11	2,1	21	–
10	310	28	leicht	14	1,2	16	–
11	290	28	leicht	14	2,0	11	$95 \cdot 10^{-3}$
12	280	26	leicht	15	0	13	0,13
13	260	25	leicht	11	1,2	12	0,11
14	250	25	leicht	5,8	1,6	9,1	$53 \cdot 10^{-3}$
15	240	21	nein	4,1	0	5,3	$29 \cdot 10^{-3}$
16	220	21	leicht	8,2	0,38	4,2	$23 \cdot 10^{-3}$
17	210	19	leicht	6,3	0,14	1,7	$7 \cdot 10^{-3}$
18	190	18	nein	3,1	-0,39	1,0	$17 \cdot 10^{-3}$
19	180	16	nein	1,6	0,1	1,1	$-2,9 \cdot 10^{-3}$
20	160	16	nein	-1,1	0	1,0	$-2,3 \cdot 10^{-3}$
21	145	14	nein	-3	-0,1	1,1	$-2,9 \cdot 10^{-3}$
22	130	13	nein	1,4	0,24	0,85	$-1,1 \cdot 10^{-3}$
23	120	11	nein	2,2	0,18	0,77	$-1,9 \cdot 10^{-3}$
24	105	10	nein	-0,6	0,07	0,73	$-2,3 \cdot 10^{-3}$
25	89	10	nein	1,0	0,06	0,79	$0,32 \cdot 10^{-3}$
26	77	8	nein	0,7	0,16	0,58	$0,71 \cdot 10^{-3}$
27	59	7	nein	-1,1	0,29	0,42	$0,46 \cdot 10^{-3}$
28	46	7	nein	-1,5	-0,15	0,41	$-0,16 \cdot 10^{-3}$
29	31	4	nein	0,8	0,01	0,32	$-0,54 \cdot 10^{-3}$
31	15	3	nein	1,5	-0,09	0,23	$0,28 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 8 (Bestrahlungszeit 100 ms, Fleckgröße 100 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	1660	> 70	ja	25	6,9	28	0,19
2	1600	> 70	ja	27	7,0	31	0,32
3	1560	> 70	ja	28	7,7	36	0,25
4	1520	> 70	ja	34	7,2	35	0,23
5	1480	> 70	ja	16	6,1	23	0,13
6	1420	> 70	ja	15	5,7	19	$68 \cdot 10^{-3}$
7	1370	66	ja	12	5,7	22	0,16
8	1320	39	leicht	25	4,7	28	0,25
9	1260	41	leicht	17	4,5	22	0,20
10	1210	45	leicht	26	4,1	25	0,19
11	1160	45	leicht	13	3,7	17	0,14
12	1100	50	leicht	18	3,5	16	0,13
13	1060	44	leicht	16	2,7	19	0,17
14	1000	50	leicht	20	5,9	19	0,17
15	940	48	leicht	4,77	2,7	13	$96 \cdot 10^{-3}$
16	890	46	leicht	10	1,7	12	$91 \cdot 10^{-3}$
17	820	26	leicht	0,04	0,23	5,2	$39 \cdot 10^{-3}$
18	770	29	nein	-0,09	0,68	4,1	$21 \cdot 10^{-3}$
19	710	26	nein	-0,30	0,38	4,3	$32 \cdot 10^{-3}$
20	650	28	nein	-1,99	1,3	4,0	$27 \cdot 10^{-3}$
21	600	26	nein	4,0	-0,43	2,5	$7,6 \cdot 10^{-3}$
22	550	22	nein	4,4	0,52	1,3	$-3,5 \cdot 10^{-3}$
23	490	22	nein	0,62	-0,79	1,1	$-1,3 \cdot 10^{-3}$
24	430	23	nein	-0,04	0,61	1,3	$2,6 \cdot 10^{-3}$
25	360	20	nein	2,9	-0,09	1,3	$1,9 \cdot 10^{-3}$
26	320	20	nein	-1,4	-0,49	0,94	$0,68 \cdot 10^{-3}$
27	240	23	nein	1,8	0,21	0,71	$0,44 \cdot 10^{-3}$
28	190	12	nein	1,6	-0,03	0,55	$-0,025 \cdot 10^{-3}$
29	120	7	nein	-1,9	-0,32	0,35	$0,17 \cdot 10^{-3}$
31	60	6	nein	0,2	-0,02	0,29	$0,39 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 9							
(Bestrahlungszeit 100 ms, Fleckgröße 50 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \epsilon_{zmax}$
1	4300	37	leicht	27	4,6	29	0,24
2	4165	32	leicht	16	4,5	20	0,18
3	4080	30	leicht	14	1,8	16	0,16
4	3975	30	leicht	14	0,81	15	0,15
5	3805	26	leicht	8,5	1,0	15	0,16
6	3695	25	leicht	9,7	1,0	13	0,15
7	3560	25	leicht	11	1,0	8,9	0,13
8	3430	25	leicht	5,8	-0,04	8,7	$80 \cdot 10^{-3}$
9	3270	23	leicht	2,5	3,0	8,1	$84 \cdot 10^{-3}$
10	3115	27	leicht	11	3,3	13	0,14
11	2965	29	leicht	6,2	2,3	13	0,14
12	2830	24	leicht	2,7	1,1	7,8	$77 \cdot 10^{-3}$
13	2720	21	leicht	5,4	1,5	3,0	$23 \cdot 10^{-3}$
14	2560	19	nein	-2,1	-0,34	1,5	$2,8 \cdot 10^{-3}$
15	2425	19	nein	4,0	0,89	1,1	$-2,3 \cdot 10^{-3}$
16	2275	17	nein	1,2	0,79	0,95	$-2,9 \cdot 10^{-3}$
17	2130	15	nein	1,2	-0,85	1,6	$-1,8 \cdot 10^{-3}$
18	1960	16	nein	0,9	-0,39	1,7	$1,2 \cdot 10^{-3}$
19	1835	13	nein	-0,26	-0,96	1,6	$3,3 \cdot 10^{-3}$
20	1680	15	nein	2,9	0,39	0,73	$0,65 \cdot 10^{-3}$
21	1525	14	nein	0,31	-0,89	0,83	$1,6 \cdot 10^{-3}$
23	1220	11	nein	-0,39	-0,47	0,94	$4,2 \cdot 10^{-3}$
24	1090	9	nein	-0,17	-0,6	0,96	$3,0 \cdot 10^{-3}$
25	915	8	nein	1,7	-0,3	0,73	$0,35 \cdot 10^{-3}$
26	780	7	nein	-1,1	0,04	0,62	$-1,3 \cdot 10^{-3}$
27	605	6	nein	0,38	0,38	0,53	$-1,6 \cdot 10^{-3}$
28	441	4	nein	1,1	-0,31	0,49	$-0,86 \cdot 10^{-3}$
29	290	3	nein	2,0	-0,43	0,52	$0,28 \cdot 10^{-3}$
31	151	2	nein	-0,02	-0,59	0,35	$0,53 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 10 (Bestrahlungszeit 50 ms, Fleckgröße 200 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	410	28	nein	4,5	1,3	7,5	$73 \cdot 10^{-3}$
2	400	25	nein	11,2	1,4	12	0,10
3	390	27	nein	11,3	1,2	16	0,13
4	380	26	nein	8,7	3,0	13	0,13
5	370	30	nein	11,5	3,7	13	0,15
6	360	28	nein	10,4	3,2	11	0,14
7	340	31	nein	7,9	3,3	14	0,16
8	330	22	nein	7,0	1,6	14	0,11
9	320	26	nein	9,9	2,6	13	0,12
10	310	31	nein	5,2	3,1	13	0,13
11	290	17	nein	-0,69	-	1,7	-
12	280	16	nein	1,4	0,19	1,7	$0,1 \cdot 10^{-3}$
13	260	16	nein	0,89	0,01	1,7	$-3,7 \cdot 10^{-3}$
14	250	16	nein	1,2	0,14	1,7	$1,4 \cdot 10^{-3}$
15	240	18	nein	0,27	-0,21	1,9	$1,9 \cdot 10^{-3}$
16	220	19	nein	0,14	0,25	1,6	$2,4 \cdot 10^{-3}$
17	210	12	nein	1,3	-0,15	1,6	$3,9 \cdot 10^{-3}$
18	190	10	nein	1,7	0,24	1,3	$2,0 \cdot 10^{-3}$
19	180	10	nein	1,0	0,2	1,2	$3,5 \cdot 10^{-3}$
20	160	9	nein	0,32	0,16	1,2	$1,2 \cdot 10^{-3}$
21	145	10	nein	-2,4	-0,04	1,0	$0,75 \cdot 10^{-3}$
22	130	10	nein	1,1	-0,22	1,1	$2,1 \cdot 10^{-3}$
23	120	8	nein	-0,67	0,17	1,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$
24	105	7	nein	-0,31	-0,16	0,86	$0,63 \cdot 10^{-3}$
25	89	5	nein	0,66	0,17	0,89	$1,3 \cdot 10^{-3}$
26	77	5	nein	0,7	0,19	0,69	$-0,51 \cdot 10^{-3}$
27	59	3	nein	0,54	-0,15	0,58	$0,60 \cdot 10^{-3}$
28	46	2	nein	-0,79	0,03	0,42	$0,31 \cdot 10^{-3}$
29	31	2	nein	0,65	-0,08	0,31	$0,48 \cdot 10^{-3}$
31	15	3	nein	0,43	-0,13	0,46	$0,16 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 11							
(Bestrahlungszeit 50 ms, Fleckgröße 100 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \epsilon_{zmax}$
1	1660	58	leicht	17	4,5	17	0,15
2	1600	51	leicht	16	4,5	20	0,14
3	1560	45	leicht	22	4,1	18	0,16
4	1520	39	leicht	11	3,7	14	$85 \cdot 10^{-3}$
5	1480	40	leicht	12	3,7	17	$94 \cdot 10^{-3}$
6	1420	33	leicht	11	2,1	10	$92 \cdot 10^{-3}$
7	1370	31	leicht	11	1,7	11	$81 \cdot 10^{-3}$
8	1320	27	nein	15	1,2	7,1	$45 \cdot 10^{-3}$
9	1260	27	nein	2,1	2,3	7,6	$54 \cdot 10^{-3}$
10	1210	24	nein	2,9	0,54	5,3	$40 \cdot 10^{-3}$
11	1160	24	nein	6,9	0,57	6,1	$66 \cdot 10^{-3}$
12	1100	21	nein	0,66	0,09	2,3	$41 \cdot 10^{-3}$
13	1060	29	nein	2,6	0,95	5,3	$43 \cdot 10^{-3}$
14	1000	26	nein	10,2	1,9	4,3	$32 \cdot 10^{-3}$
15	940	25	nein	5,9	0,75	2,2	$11 \cdot 10^{-3}$
16	890	23	nein	1,8	0,13	1,9	$5,1 \cdot 10^{-3}$
17	820	19	nein	-0,92	0,34	2,0	–
18	770	18	nein	4,2	-0,54	1,2	–
19	710	17	nein	5,6	-0,33	1,6	$2,5 \cdot 10^{-3}$
20	650	15	nein	6,1	0,88	1,4	$2,4 \cdot 10^{-3}$
21	600	14	nein	0,54	-0,56	1,3	–
22	550	12	nein	-0,19	0,45	1,4	$2,5 \cdot 10^{-3}$
23	490	14	nein	1,39	-0,63	0,86	$0,74 \cdot 10^{-3}$
24	430	12	nein	0,61	0,16	0,9	$2,6 \cdot 10^{-3}$
25	360	10	nein	-0,29	-0,39	0,91	$1,1 \cdot 10^{-3}$
26	320	9	nein	2,9	-0,55	0,81	$0,78 \cdot 10^{-3}$
27	240	7	nein	-2,8	0,47	0,53	$0,61 \cdot 10^{-3}$
28	190	5	nein	0,27	0,34	0,6	$-0,11 \cdot 10^{-3}$
29	120	4	nein	-0,37	0,04	0,45	$1,1 \cdot 10^{-3}$
31	60	3	nein	0,23	-0,4	0,38	$0,83 \cdot 10^{-3}$

Schweineauge Nr. 12 (Bestrahlungszeit 50 ms, Fleckgröße 50 μm)							
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Sichtbarkeit	Δz_s^{max} [μm]	ΔS_{PRS}^{max} [dB]	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
1	4300	31	nein	11	0,86	12	0,16
2	4165	27	nein	6,3	2,1	10	0,18
3	4080	25	nein	0,008	2,6	4,4	$59 \cdot 10^{-3}$
4	3975	26	nein	6,9	2,2	7,6	0,12
5	3805	25	nein	8,0	0,52	7,7	0,10
6	3695	25	nein	3,4	1,5	4,5	$75 \cdot 10^{-3}$
7	3560	24	nein	3,9	0,59	5,5	$82 \cdot 10^{-3}$
8	3430	24	nein	7,7	-0,27	3,2	$16 \cdot 10^{-3}$
9	3270	19	nein	1,4	0,79	2,4	$27 \cdot 10^{-3}$
10	3115	16	nein	1,6	0,96	3,3	$43 \cdot 10^{-3}$
11	2965	18	nein	0,64	0,38	1,6	$5,9 \cdot 10^{-3}$
12	2830	19	nein	3,3	1,2	1,9	$12 \cdot 10^{-3}$
13	2720	21	nein	2,1	0,88	2,6	$39 \cdot 10^{-3}$
14	2560	18	nein	-0,9	-0,06	1,6	$21 \cdot 10^{-3}$
15	2425	18	nein	3,9	-0,07	1,9	$1,6 \cdot 10^{-3}$
16	2275	17	nein	4,2	0,37	1,1	$4,1 \cdot 10^{-3}$
17	2130	14	nein	3,8	0,47	0,97	$2,0 \cdot 10^{-3}$
18	1960	15	nein	-0,62	0,38	0,89	$2,5 \cdot 10^{-3}$
19	1835	10	nein	-0,36	-0,66	0,97	$1,1 \cdot 10^{-3}$
20	1680	13	nein	-1,8	-0,16	1,0	$2,6 \cdot 10^{-3}$
21	1525	10	nein	-0,26	0,1	0,93	$3,2 \cdot 10^{-3}$
23	1220	10	nein	-0,14	0,33	0,84	$3,4 \cdot 10^{-3}$
24	1090	8	nein	-0,29	-0,05	0,80	$2,0 \cdot 10^{-3}$
25	915	8	nein	-0,93	0,03	0,78	$0,7 \cdot 10^{-3}$
26	780	6	nein	-1,2	-0,13	0,59	$0,87 \cdot 10^{-3}$
27	605	5	nein	-2,8	0,42	0,60	$0,88 \cdot 10^{-3}$
28	441	5	nein	0,23	0,25	0,38	$1,1 \cdot 10^{-3}$
29	290	4	nein	0,36	0,15	0,48	$0,51 \cdot 10^{-3}$
31	151	3	nein	0,33	-0,28	0,36	$0,61 \cdot 10^{-3}$

Kaninchenauge						
(Bestrahlungszeit 500 ms, Fleckgröße 133 μm)						
Fleck Nr.	Bestrahlungsstärke [W/cm ²]	ΔT_{max} [K]	Fundus	Angiographie	Δz_{max} [μm]	$\Delta \varepsilon_{zmax}$
109	137	> 40	ja	ja	-	-
110	139	39	ja	ja	1,8	$46 \cdot 10^{-3}$
111	138	> 40	ja	ja	1,3	$28 \cdot 10^{-3}$
112	129	> 40	ja	ja	1,4	$21 \cdot 10^{-3}$
113	123	> 40	ja	ja	2,1	$12 \cdot 10^{-3}$
114	116	22	ja	ja	2,5	$13 \cdot 10^{-3}$
115	116	21	ja	ja	2,6	$23 \cdot 10^{-3}$
116	108	21	ja	ja	2,9	$27 \cdot 10^{-3}$
117	101	17	ja	ja	3,3	$17 \cdot 10^{-3}$
118	94	19	leicht	ja	2,7	$13 \cdot 10^{-3}$
119	86	17	leicht	ja	3,5	$17 \cdot 10^{-3}$
120	79	16	leicht	ja	-	-
121	78	22	leicht	ja	2,1	-
122	138	37	ja	ja	1,1	$11 \cdot 10^{-3}$
123	138	32	ja	ja	0,4	$22 \cdot 10^{-3}$
124	138	24	ja	ja	1,0	$6,7 \cdot 10^{-3}$
125	74	17	leicht	ja	1,8	$4,5 \cdot 10^{-3}$
126	71	17	leicht	ja	1,9	$6,7 \cdot 10^{-3}$
127	67	16	leicht	leicht	1,6	$5,4 \cdot 10^{-3}$
128	63	15	nein	leicht	2,2	$1,9 \cdot 10^{-3}$
129	59	13	nein	nein	1,5	$1,8 \cdot 10^{-3}$
130	55	14	nein	nein	1,6	$2,7 \cdot 10^{-3}$
131	52	13	nein	nein	2,0	$5,1 \cdot 10^{-3}$
132	47	12	nein	nein	1,6	$14 \cdot 10^{-3}$
133	43	10	nein	nein	1,5	$4,9 \cdot 10^{-3}$
134	40	7	nein	nein	1,1	$3,7 \cdot 10^{-3}$

Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Dr. Gereon Hüttmann für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Durch die vielen hilfreichen Diskussionen, Ermutigungen, nützlichen Ratschläge und kritischen Hinterfragungen habe ich im Laufe der letzten Jahre eine Menge über das wissenschaftliche Arbeiten und die Optische Kohärenztomographie dazugelernt.

Desweiteren Bedanke ich mich bei Prof. Dr. R. Birngruber. Mit seiner langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der retinalen Lasertherapie war er immer ein guter Ansprechpartner um Ergebnisse zu diskutieren. Weiterer Dank gebührt Dr. Ralf Brinkmann für die Einwerbung von Drittmitteln zur Anschlußfinanzierung des Projektes sowie für die zeitweilige Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

Ich möchte mich auch ganz herzlich für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung bei allen Kollegen des Instituts für Biomedizinische Optik sowie des Medizinischen Laserzentrums Lübeck GmbH bedanken. Ohne eure Mitarbeit wäre diese Arbeit vermutlich nie fertig geworden und meine Zeit am Institut hätte auch wesentlich weniger Spaß gemacht.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe der Optischen Kohärenztomographie, insbesondere Dr. Eva Lankenau, die mich in der Anfangsphase unterstützt und auch mal vergessene Bauteile hinter mir her geschickt hat, Tim Bonin für die Hilfe bei der Faserkonfektionierung, Dierck Hillmann als Ansprechpartner im Bereich der Programmierung und Hendrik Spahr für die Übernahme meiner vielfach noch offenen Fragestellungen. In der Autophon Arbeitsgruppe möchte ich mich besonders bei Lars Ptaszynski, Kerstin Schlott, Alexander Baade und Marco Bever für die Hilfestellung bei der Durchführung der optoakustischen Temperaturmessungen bedanken. Weiterer Dank gebührt außerdem Babara Flucke für die Anfertigung der histopathologischen Gewebeschnitte.

Für die Unterstützung bei der Tierstudie und für die Hilfe bei medizinischen Fragestellungen möchte ich mich herzlich bei Dr. Stefan Koinzer von der Klinik für Augenheilkunde der Universität Kiel und Dr. Yoko Miura von der Klinik für Augenheilkunde der Universität Lübeck bedanken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich desweiteren bei der Thorlabs GmbH bedanken, insbesondere bei Peter Koch, Christian Winter und Dennis Boller, die mir häufig in Fragestellungen zur Konstruktion und Problemen im Bereich der OCT-Technik weitergeholfen haben.

Mein größter Dank geht jedoch an meinen Lebensgefährten Bodo Volkmer, der mich in den letzten Jahren liebevoll unterstützt und somit einen großen Teil zu meiner Motivation und damit auch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Diese Arbeit wurde durch das Tandem Projekt (Center of Excellence for Technology and Engineering in Medicine) der Universität und der Fachhochschule zu Lübeck finanziert.