

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Salvatore Grisanti

---

# **Präklinische Studie zur Fluoreszenzlebensdauer der Netzhaut nach Laserbestrahlung am Kaninchenauge**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

aus der Sektion Medizin

vorgelegt von

Maximilian Lukas Johannes Hamann aus Erlangen

Lübeck, 2025

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Yoko Miura

Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. K.-F. Klotz

2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Vogel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.02.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

**„Sabbel nich, dat geit!“**

Jan Tode

## Zusammenfassung

**Wissenschaftlicher Hintergrund:** Die Netzhautlasertherapie ist eine der etabliertesten Laserbehandlungen in der Medizin: Seit fast 60 Jahren zielt diese auf die Koagulation der äußeren Netzhautschichten ab. In den letzten Jahren entwickelte sich jedoch eine neue Behandlungsstrategie: die minimalinvasive Lasertherapie. Diese zerstört - im Gegensatz zur Laserkoagulation - nicht die Photorezeptorzellen der Netzhaut, sondern stimuliert die RPE-Zellen und umliegende Gewebe. Durch diese Stimulation wird versucht, die Stoffwechselfunktion der Netzhaut zu verbessern und, sofern möglich, fortschreitende degenerative Erkrankungen wie die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zu verhindern oder in der Progression zu verlangsamen. Bei dieser Art der Behandlung ist der bestrahlte Bereich funduskopisch nicht sichtbar. Darüber hinaus gibt es bisher keine Methoden, um die Wirksamkeit der Behandlung (z. B. Verbesserung des Stoffwechsels) zu bewerten. Die Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmometrie (FLIO) kann die Fluoreszenzlebensdauer (FLD) des Augenhintergrunds messen und hat aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften das Potenzial, sowohl morphologische als auch zelluläre Stoffwechselveränderungen im Netzhautgewebe zu erkennen. Ziel dieser Arbeit ist die FLD der Kaninchen-Netzhaut nach einer stimulierenden Laserbestrahlung in vivo mittels FLIO zu untersuchen und mit den bereits klinisch etablierten Bildgebungs-modalitäten zu vergleichen, um potenziell eine Therapiekontrolle und Wirkungsbewertung der minimalinvasiven Laserbehandlung zu finden.

**Methoden:** Die Kaninchennetzhaut wurde mit einem Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 514 nm mit vier verschiedenen Pulsdauern (5  $\mu$ s, 2  $\mu$ s, 12  $\mu$ s, 20  $\mu$ s und 50  $\mu$ s) und eine Spotgröße von 200  $\mu$ m bestrahlt. Die Laserleistung wurde beginnend von einem nicht zellschädigenden Wert und mittels Spaltlampe (SL) funduskopisch nicht sichtbaren Spot schrittweise hin zu sichtbaren Spots erhöht. Die bestrahlte Region bestand aus einer Fläche von 4x10 Spots und wurde direkt (30 Minuten) sowie eine und drei Wochen nach der Behandlung mittels Fundusfoto (FC), optischer Kohärenztomografie (OCT), Fundus-Autofluoreszenz (AF), FLIO und Fluoreszeinangiografie (FA) untersucht. Die Sichtbarkeit der Laserspots direkt nach Bestrahlung wurde durch zwei unabhängige Untersucher bewertet. Die effektive Dosis (Laserpulsenergie) für eine 50-prozentige Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines beobachtbaren Effekts (ED 50) wurde für die genannten Bildgebungsmodalitäten bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Enukleation sowie histologische Aufarbeitung von zwei Augenpaaren, um mögliche morphologische Veränderungen in einem Detailgrad erkennen zu können, welcher durch die oben genannten Bildgebungsmodalitäten nicht erreicht werden kann.

**Ergebnisse:** Die FLD an den Laserspots (50  $\mu$ s sowie 800  $\mu$ J) war 30 Minuten nach der Bestrahlung statistisch signifikant verlängert, zeigte jedoch eine statistisch signifikante Verkürzung der FLD nach 9-11 Tagen.

Veränderungen der FLD nach Laserbestrahlung wurden nicht nur im bestrahlten Bereich, sondern auch in der Umgebung beobachtet: Die FLD außerhalb des Spots korrelierte mit der Laserpulsenergie während der Bestrahlung. An Stelle einer verlängerten FLD außerhalb des Spots war in den OCT-B-Scans die Ellipsoid-Zone (EZ) nicht sichtbar. Ferner war eine Woche nach der Bestrahlung im OCT-B-Scan an der Stelle außerhalb des Spots die EZ wieder sichtbar. Ausgehend von der erhöhten FLD direkt nach Bestrahlung, nahm die FLD

über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab. Wurde eine niedrige Pulsenergie verwendet, wobei keine Diskontinuität der EZ, also keine Verlängerung der FLD um den Laserspot beobachtet wurde, kam es unmittelbar nach Bestrahlung zu einer Verkürzung der FLD um den applizierten Laserspot.

Im Vergleich mit den unterschiedlichen Bildgebungsmodalitäten zeigte die FA den niedrigsten Mittelwert des ED50-Energiewerts, die SL dagegen den höchsten. Dies bedeutet, dass die FA die höchste, SL die niedrigste Sensitivität für die Erkennung von RPE-selektiven Laserspots aufwies. Durch die FLIO konnte bei den Laserpulsdauern 5,2  $\mu$ s, 20  $\mu$ s und 50  $\mu$ s die Laserspots signifikant empfindlicher als durch die SL erkannt werden. Die ED50 Werte von FLIO und FA waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. AF war bei 5,2  $\mu$ s und 50  $\mu$ s signifikant sensitiver als SL. Der Unterschied war jedoch mit 0,001 (p-Wert AF) vs. <0,001 (p-Wert FLIO) bei 5,2  $\mu$ s sowie 0,003 (p-Wert AF) vs. <0,0001 (p-Wert FLIO) weniger statistisch signifikant als bei FLIO.

**Diskussion:** Die Ergebnisse der Untersuchung der FLD deuten darauf hin, dass der zeitliche Zerfall von Photorezeptoren direkt nach der Bestrahlung um den Laserspot herum auftreten kann, was von der Energie des Laserpulses abhängen kann, und dass dieser Zerfall mit der zeitlichen FLD-Verlängerung um den Laserspot herum verbunden ist. Es ist bekannt, dass die für die Wundheilung notwendige Zellproliferation und -migration energieintensiv ist. Des Weiteren ist bekannt, dass eine verkürzte FLD unter anderem auf ein erhöhtes Vorkommen des für die biochemische Energiebereitstellung notwendigen [NAD<sup>+</sup>/NADH] zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse haben eine verkürzte FLD an den Rändern der Spots gezeigt. Daher schließen wir aus dieser Verkürzung der FLD auf eine metabolische Aktivierung.

Bezüglich der Auswertung der unterschiedlichen Bildgebungsmodalitäten interpretierten wir die statistisch nicht unterscheidbaren Grenzwerte zwischen FA und FLIO als eine vergleichbare Empfindlichkeit zur Erkennung unterschwelliger Laserspots.

**Schlussfolgerung:** In Anbetracht ihrer Möglichkeit in der Detektion von unterschwelligem Laserspots sowie ihres nachgewiesenen Potenzials, lokale Wundheilung sowie metabolische Veränderungen um die Laserspots zu detektieren, könnte die FLIO als ein nicht-invasives Überwachungsinstrument sowohl während als auch nach einer minimalinvasiven Netzhautlaserbehandlung verwendet werden.

## Abstract

**Scientific Background:** Retinal laser therapy is one of the most established laser treatments in medicine: for almost 60 years, it has been used to coagulate the outer layers of the retina. In recent years, however, a new treatment strategy has emerged: minimally invasive laser therapy. Unlike laser coagulation, it does not destroy the photoreceptor cells of the retina, but instead stimulates the RPE cells and surrounding tissue. This stimulation is used to try to improve the metabolic function of the retina and, if possible, prevent or slow the progression of progressive degenerative diseases such as age-related macular degeneration (AMD). With this type of treatment, the irradiated area is not visible on funduscopy. In addition, there are currently no methods to evaluate the effectiveness of the treatment (e.g., improvement in metabolism). Fluorescence Lifetime Ophthalmometry (FLIO) can measure the fluorescence lifetime (FLD) of the ocular fundus and, due to its physical properties, has the potential to detect both morphological and cellular metabolic changes in retinal tissue. The aim of this work is to investigate the fluorescence lifetime of the rabbit retina after stimulating laser irradiation in vivo using FLIO and to compare it with already clinically established imaging modalities in order to potentially find a therapy control and effect evaluation of minimally invasive laser treatment.

**Methods:** The rabbit retina was irradiated with a diode laser at a wavelength of 514 nm with four different pulse durations (5.2  $\mu$ s, 12  $\mu$ s, 20  $\mu$ s and 50  $\mu$ s) and a spot size of 200  $\mu$ m. The laser power was gradually increased from a non-damaging level until a visible spot was seen with slit lamp (SL) funduscopy. The irradiated region consisted of an area of 4x10 spots and was evaluated immediately (30 minutes) and 1 and 3 weeks after treatment by fundus photography (FC), optical coherence tomography (OCT), fundus autofluorescence (AF), FLIO, and fluorescein angiography (FA). The visibility of the laser spots immediately after irradiation was assessed by two independent examiners. The effective dose (laser pulse energy) for a 50% probability of an observable effect (ED 50) was determined for the mentioned imaging modalities. In addition, enucleation and histologic processing of two pairs of eyes were performed to detect possible morphologic changes at a level of detail not achievable with the above imaging modalities.

**Results:** FLD at the laser spots (50  $\mu$ s and 800  $\mu$ J) was statistically significantly prolonged 30 minutes after irradiation, but showed a statistically significant shortening of FLD at 9-11 days.

Changes in FLD after laser irradiation were observed not only in the irradiated area but also in the surrounding area: FLD outside the spot correlated with laser pulse energy during irradiation. Instead of prolonged FLD outside the spot, the ellipsoid zone (EZ) was not visible in the OCT-B scans. Furthermore, one week after irradiation, the EZ was again visible at the location of the outer spot on the OCT-B scan. Starting from the increased FLD immediately after irradiation, the FLD decreased continuously during the observation period. When a low pulse energy was used and no EZ discontinuity, i.e. no extension of the FLD around the laser spot, was observed, there was a shortening of the FLD around the applied laser spot immediately after irradiation.

Compared to the different imaging modalities, FA showed the lowest mean ED50 energy value, while SL showed the highest. This means that FA had the highest and SL the lowest sensitivity for detecting RPE-selective laser spots. FLIO was significantly more sensitive than SL for laser pulse durations of 5.2  $\mu$ s, 20  $\mu$ s, and 50  $\mu$ s. The ED50 values of FLIO and FA were not statistically significantly different. AF was significantly more sensitive than SL for 5.2  $\mu$ s and 50  $\mu$ s. However, the difference was less statistically significant with FLIO than with FA.

**Discussion:** The results of the FLD study indicate that photoreceptor decay around the laser spot can occur immediately after irradiation, which may depend on the energy of the laser pulse, and that this decay is associated with the temporal FLD expansion around the laser spot. It is known that the cell proliferation and migration required for wound healing is energy intensive. It is also known that a shortened FLD is due in part to increased levels of [NAD<sup>+</sup>/NADH], which is required for biochemical energy supply. The results showed a shortened FLD at the edges of the spots. Therefore, we conclude that this shortening of the FLD indicates metabolic activation.

Regarding the evaluation of the different imaging modalities, we interpreted the statistically indistinguishable thresholds between FA and FLIO as a comparable sensitivity for the detection of subthreshold laser spots.

**Conclusions:** Given its ability to detect subthreshold laser spots, as well as its demonstrated potential to detect local wound healing and metabolic changes around laser spots, FLIO could be used as a non-invasive monitoring tool during and after minimally invasive retinal laser treatment.

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung und Ziele dieser Arbeit

## 2 Grundlagen

### 2.1 Biologische Grundlagen

2.1.1 Die Anatomie des Auges

2.1.2 Die Retina

2.1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

2.1.4 Die Melanosomen des RPE

### 2.2 Lasertherapie in der Augenheilkunde

2.2.1 Allgemein

2.2.2 Photothermische Lasertherapie der Netzhaut

2.2.3 Photodisruption – Selektive Retinatherapie

2.2.4 Detektion selektiver Retinaschäden mittels Fluoreszenzangiographie

### 2.3 Fluoreszenzlebensdauer

### 2.4 Fluorescence Lifetime Imagin Ophthalmoscopy (FLIO)

2.4.1 Technische Grundlagen der FLIO

2.4.2 Fluorophore im Auge

2.4.3 Bisherige Forschungsarbeiten über die FLD der Netzhauthaut und FLIO

2.4.4 Klinische Anwendung der FLIO

### 2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

## 3 Material und Methoden

3.1 Das Lasersystem und die Laserbestrahlung

3.2 Die Versuchstiere und der Versuchsaufbau

3.3 Multimodale Bildgebung

3.4 Standardprotokoll

3.5 FLIO

3.5.1 Durchführung der FLD-Messung

3.5.2 Auswertung der FLD-Messung

3.6 Analyse der Laserspots

3.7 Berechnung der ED50-Werte

3.8 Histologie

3.9 Substanzen und Geräte



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Teil I: Nachweis laserinduzierter Netzhautläsionen durch FLIO – ein Vergleich mit etablierten bildgebenden Diagnostika**

#### 4.1.1 Vergleich der Sichtbarkeitsschwellen (ED50) zwischen den Modalitäten

4.1.1.1 ED50 bei der Laserpulsdauer von 5,2  $\mu$ s

4.1.1.2 ED50 bei der Laserpulsdauer von 12,  $\mu$ s

4.1.1.3 ED50 bei der Laserpulsdauer von 20  $\mu$ s

4.1.1.4 ED50 bei der Laserpulsdauer von 50  $\mu$ s

#### 4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Teil I

### **4.2 Teil II: Detaillierte Evaluation der Fluoreszenzlebensdauer der Kaninchenretina nach der Laserbestrahlung mittels FLIO**

#### 4.2.1 Der Sehstreifen des Kaninchens

#### 4.2.2 Einfluss starker Laserenergie auf die FLD am Beispiel der Markerspots

4.2.2.1 Tag 0 (30 Minuten) nach der Laserbestrahlung

4.2.2.2 Tag 9-11 nach der Laserbestrahlung

4.2.2.3 Tag 20 nach der Laserbestrahlung

#### 4.2.3 Histologische Beobachtungen im Bereich der Laserspots mit hoher Energie

4.2.3.1 Tag 0 (30 Minuten) nach der Laserbestrahlung

4.2.3.2 9-11 Tage nach der Laserbestrahlung

#### 4.2.4 Stimulierende Laserspots

4.2.4.1 Tag 0 (30 Minuten) nach der Laserbestrahlung

4.2.4.2 Tag 7 nach der Laserbestrahlung

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse von Teil II

## **5 Diskussion**

### **5.1 Teil I: Sichtbarkeit der Laserspots**

5.1.1 Spaltlampe

5.1.2 Funduskamera

5.1.3 Optische Kohärenztomographie

5.1.4 Fluoreszenzangiographie

5.1.5 Fundusautofluoreszenz

5.1.6 FLIO

#### 5.1.7 Laserpulsdauer

### **5.2 Teil II: Veränderung der FLD nach Laserbestrahlung**

5.2.1 Potentielle Ursachen der FLD-Änderung

5.2.2 Sehstreifen des Kaninchens

### **5.3 Kaninchenmodell**

### **5.4 Histologie**

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

## **7 Abkürzungsverzeichnis**

## **8 Auswertung der FLIO-Ergebnisse mittels SPCImage**

## **9 Danksagung**

**10 Lebenslauf**

**11 Literaturverzeichnis**

## 1 Einleitung und Ziele dieser Arbeit

Die Netzhautlasertherapie ist eine der etabliertesten Laserbehandlungen in der Medizin. Während eine erfolgreiche Behandlung mancher Netzhauterkrankungen eine Beeinflussung der Photorezeptoren, zum Beispiel durch Destruktion, erfordert, scheint wiederum die Therapie anderer Erkrankungen, wie der zentralen serösen Retinopathie (CSCR) und des diabetischen Makulaödems (DMÖ), von der heilenden Wirkung der wichtigsten lichtabsorbierenden Zellschicht, des retinalen Pigmentepithels (RPE), abzuhängen, welches direkt hinter den Photorezeptoren ist.[1–5] Daher entwickelte sich in den letzten etwa 20 Jahren eine neue Behandlungsstrategie: die minimalinvasive Lasertherapie, die das Therapiespektrum erweitert hat.[6] Hierbei handelt es sich zum einen um die milde RPE-Thermotherapie und zum anderen um die selektive Retinatherapie (SRT), bei der Pulse im unteren Mikrosekundenbereich (typisch 1,7  $\mu$ s) zur selektiven und mechanischen Zerstörung des RPE eingesetzt werden.[7] Beide Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass die behandelte Stelle funduskopisch nicht sichtbar ist und keine Narben hinterlässt.[7] Ziel beider Behandlungen ist es, den Stoffwechsel und die Funktion der bestrahlten Netzhaut zu fördern, um die Krankheit zu heilen, deren Fortschreiten zu verhindern oder sogar ihrer Entstehung vorzubeugen.[8–10] Diese Art der Laserbehandlung findet bereits ihren Einsatz in der Therapie der CSCR sowie des DMÖs finden.[9,11,12]

Die SRT kann das RPE selektiv zerstören, ohne das umliegende Gewebe, wie z. B. die Photorezeptorzellen, zu schädigen.[13] Wie bereits erwähnt, ist dies mit einem Fundoskop nicht zu erkennen. Um die Destruktion des RPEs nachweisen zu können, ist in der derzeitigen klinischen Praxis eine Autofluoreszenz-Messung oder Fluoreszenzangiographie (FAG) notwendig.[13] Insbesondere die FAG ist derzeit die empfindlichste Methode zum Nachweis applizierter Laserspots in der SRT. Dem ist so, da das RPE eine zentrale Rolle in der Blut-Retina-Schranke spielt. Das Fluorescein kann diese Barriere normalerweise nicht durchdringen. An beschädigten Stellen der RPE-Zellen oder ihrer Membranen kann Fluorescein jedoch in den Bereich vor dem Melanin eindringen. Die FAG zielt also darauf ab, speziell die Zellschicht zu detektieren, die durch die thermische Wirkung des Lasers zuerst geschädigt wird. Da die FAG jedoch ein hochinvasiver Test, bei dem der Farbstoff Fluorescein intravenös injiziert wird, ist eine nicht-invasive und empfindlichere Methode zum Nachweis von RPE-Veränderungen wünschenswert.

Die Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (FLIO) ist eine neue diagnostische Methode, die die Messung und Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer (FLD) von autofluoreszierenden Substanzen im Augenhintergrund ermöglicht.[14] Die Fluorophoren im Augenhintergrund werden durch einen sehr kurzen blauen Puls laser (473 nm, 80 ps, 80 MHz) angeregt und von zwei Detektionskanälen (490-560 nm, 560-720 nm) erfasst.[14] Zur Messung der FLD wird die TCSPC (*Time-Correlated Single Photon Counting*) verwendet, und die Daten der FLD für 256x256 Pixel innerhalb des Messbereichs (30x30°) werden in Falschfarben dargestellt.[14,15]

Die FLD ist ein fluorophorspezifisch und ist unabhängig von der Fluoreszenzintensität.[14,16] Es gibt viele autofluoreszierende Substanzen in Augengewebe und -zellen, von denen einige sehr stark mit ihrem Energiestoffwechsel

verbunden sind.[16] FLIO hat daher das Potenzial, sowohl morphologische als auch zelluläre Stoffwechselveränderungen im Netzhautgewebe zu erkennen.[17–20]

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, durch FLIO morphologische und metabolische Veränderungen an laserbehandelten Stellen sowie ihrer Umgebung, insbesondere an selektiv zerstörten RPE-Stellen, zu untersuchen. Die Studie ist Teil eines vom BMBF geförderten Verbundprojekts zur Entwicklung einer neuen selektiven Lasertherapie und wurde in Form einer Tierstudie mit Kaninchen durchgeführt.

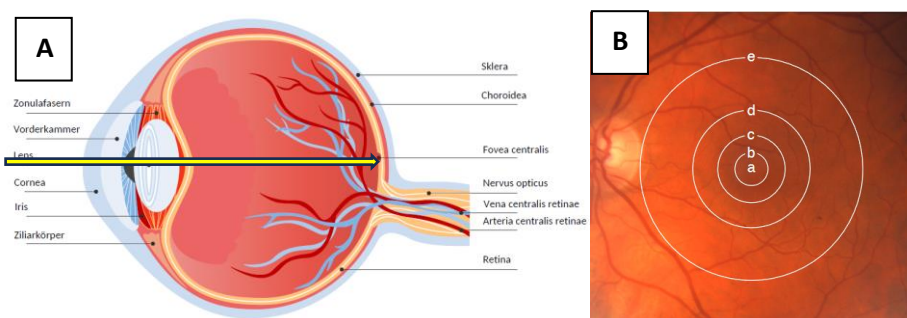
## 2 Grundlagen

### 2.1 Biologische Grundlagen

#### 2.1.1 Die Anatomie des Auges

Das Auge ist ein paarig angelegtes Sinnesorgan. Die Aufgabe des Auges besteht darin, Objekte aus der Umgebung auf die Netzhaut abzubilden und das Licht in Nervenimpulse umzuwandeln. In den Gehirnarealen bleibt die von der Retina bestimmte Topologie erhalten („retinotopie Abbildung“). Das Auge liegt geschützt in der knöchernen Orbita und wird von der Lederhaut (Sklera) sowie Bindehaut (Konjunktiva) umgeben. Sechs direkt an den Bulbus oculi ansetzende Muskeln ermöglichen dessen Bewegung in alle Blickrichtungen.

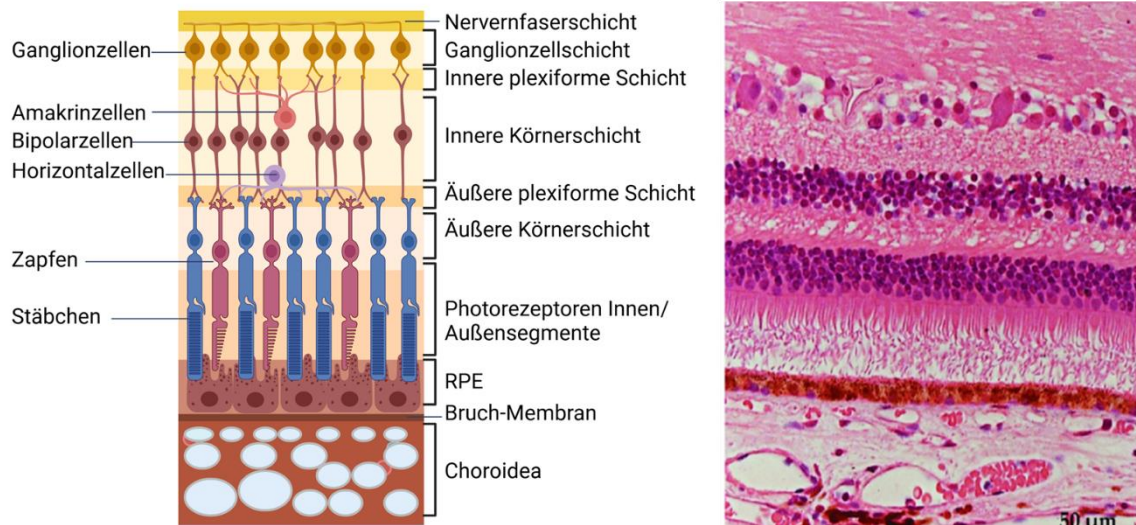
Vereinfacht besteht das Auge aus einem lichtleitenden sowie einem lichtverarbeitenden Abschnitt. Das Licht gelangt hierbei über die Hornhaut (Cornea), die etwa zwei Drittel der Brechkraft des Auges übernimmt, durch die die Pupille formende Regenbogenhaut (Iris) und die am Ziliarkörper (Corpus ciliare) aufgehängte Linse (Lens), die zusätzlich zur Brechkraftregulierung für die Akkommodation verantwortlich ist, über den gallertartigen Glaskörper (Corpus vitreum) auf die Netzhaut. Diese verarbeitet die Lichtsignale über ihre spezialisierten Nervenzellen, einschließlich der Photorezeptoren Zapfen und Stäbchen, in elektrische Impulse, welche über den Sehnerv (Nervus opticus) an die Sehrinde des Gehirns weitergeleitet werden und dort den Sehprozess ermöglichen.[21] Durch die Bündelung der Nervenfasern aller Lichtrezeptoren im Sehnerv, genauer an der Papille (Papilla nervi optici), fehlen in diesem Bereich Sehsinneszellen, wodurch dort kein Sehen möglich ist. Daher wird dies als blinder Fleck bezeichnet. Da beide Augen ein leicht unterschiedliches Bild wahrnehmen, überlappen die jeweiligen Gesichtsfelder beider Augen. Somit wird der blinde Fleck eines Auges durch das Bild des anderen Auges ausgeglichen. Der Punkt des schärfsten Sehens hingegen befindet sich im Bereich des gelben Flecks (Macula lutea), der sogenannten Fovea centralis (Abbildung 1). In jener befindet sich die höchste Dichte an Zapfen, während Stäbchen dort fast vollständig fehlen. Die Fovea ist daher speziell für die Farb- und Detailwahrnehmung unter photopischen Lichtverhältnissen optimiert.[22]



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung des menschlichen Auges (A) sowie ein hierzu korrespondierendes Fundusfoto des linken Auges (B). Der gelbe Pfeil symbolisiert den Einfall des Lichts durch die verschiedenen anatomischen Strukturen auf die Retina. a = Umbo, b = Foveola, c = Fovea centralis, c-d = parafoveal, d-e = perifoveal, e = Makula. Entnommen und modifiziert nach [23–25].

### 2.1.2. Die Retina

Die Retina besteht aus dem außen liegenden, einschichtigen retinalen Pigmentepithel (RPE, Stratum pigmentosum) sowie der inneren, laminar aufgebauten neuralen Netzhaut (Stratum nervosum) (Abbildung 2). Das Licht durchdringt erst alle signalleitenden Schichten der Netzhaut bevor es die Außensegmente der Photorezeptorzellen erreicht. Wenn das Licht von den Photopigmenten (Rhodopsin und Opsin) im äußeren Segment des Photorezeptors absorbiert wird, wird die Lichtenergie durch Phototransduktion als elektrisches Signal durch die Netzhaut übertragen. Phototransduktion ist der Prozess, bei dem die Lichtenergie in chemische und elektrische Signale umgewandelt wird, indem ein G-Protein-gekoppeltes System (Transducin) in den Photorezeptoren aktiviert wird.[26] Die Stäbchen und Zapfen leiten ihre Signale an das zweite Neuron der Sehbahn weiter, die Bipolarzellen der Netzhaut. Horizontalzellen regulieren die laterale Hemmung zwischen den Photorezeptoren, um Kontraste zu verstärken, während Amakrinzellen zeitliche und räumliche Anpassungen der Signale vornehmen und die Detektion von Bewegungen ermöglichen. Diese komplexe Interaktion leitet die Signale der Photorezeptoren an das dritte Neuron der Sehbahn weiter, die in der inneren Retina liegenden, multipolaren Ganglienzellen. Diese verlassen gebündelt als Nervus opticus das Auge, ziehen durch das Chiasma opticum, wo etwa 50 % der Axone die Seite wechseln, und werden im Corpus geniculatum laterale, dem vierten und letzten Neuron der Sehbahn, umgeschaltet. Von dort ziehen sie zur primären Sehrinde, der Area striata, im okzipitalen Kortex und werden dort zu einem bewussten Seheindruck verarbeitet. Neben den Neuronen spielen Müllerzellen, die als radiale Gliazellen die gesamte Dicke der Netzhaut durchspannen, eine zentrale Rolle. Sie sorgen für die strukturelle Stabilität der Netzhaut, regulieren den Ionenaustausch und beseitigen Stoffwechselprodukte. Darüber hinaus leiten sie Licht effizient durch die Netzhaut bis zu den Photorezeptoren, wodurch die Lichtstreuung minimiert und die Sehschärfe optimiert wird.[27] In Untersuchungen konnte in Müllerzellen NAD<sup>+</sup>/NADH nachgewiesen werden.[28] Die Netzhaut wird zu etwa 65 % durch die 300 µm dicke Aderhaut (Choroidea) und zu etwa 35 % durch das Netzhautgefäßsystem, das über der Netzhaut liegt, mit Blut versorgt. Dabei erhalten die äußeren Schichten der Netzhaut, einschließlich der RPE und Photorezeptoren, ihre Blutversorgung ausschließlich von der Choroidea, während die inneren Schichten durch das auf der Netzhaut liegende retinale Gefäßsystem ernährt werden. [29,30]

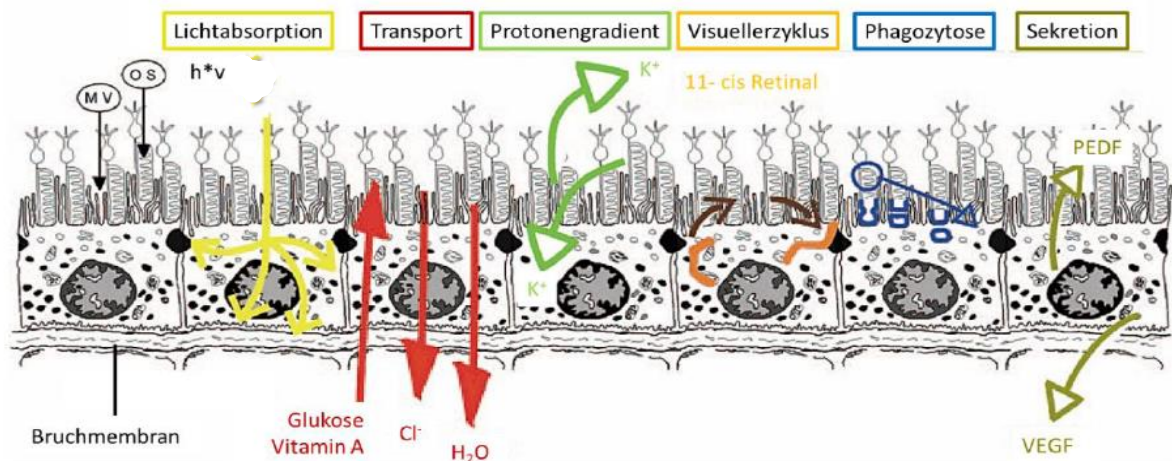


**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der menschlichen Netzhaut und histologischer Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Die schematische Darstellung auf der linken Seite wurde mittels BioLender erstellt, und das Bild an der rechten Seite wurde entnommen und modifiziert nach [31].

### 2.1.2 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das RPE ist eine stark pigmentierte, hexagonale Einzelzellschicht von 10 µm Dicke.[7,32] Diese einzelnen RPE-Zellen sind lateral durch Tight-Junctions (Zonulae occludentes) miteinander verbunden und bilden somit die äußere Blut-Hirn-Schranke zwischen Aderhaut und neuraler Netzhaut.[33] Apikal steht es über Mikrovilli im direkten Kontakt mit den äußeren Segmenten der Photorezeptoren.[33] Dies erklärt, warum innerhalb des RPEs viel endoplasmatisches Retikulum, viele Mitochondrien sowie Lysosomen vorhanden sind.[34] An der basalen Seite obliegt es der Bruch-Membran, welche das RPE von der Choriocapillaris trennt.[35,36] Im Bereich der Makula sind die RPE-Zellen höher (14 µm) mit kleinerem Durchmesser und dichter als in der Peripherie.[37,38] Das Zytoplasma der RPE-Zellen enthält mehrere Melanosomen, welche Licht aufgrund ihres hohen Melaningehalts absorbieren.[33] Neben dem Melanin sind jedoch zwei weitere Pigmente in die RPE-Zellen eingelagert: das Lipofuszin, das durch die unvollständige Phagozytose von Photorezeptoraussensegmenten (POS) entsteht, sowie das Melanolipofuszin, welches eine Verschmelzung der Melanosomen mit den Lipofuszinen darstellt.[39]

Das RPE spielt eine entscheidende Rolle an der Lichtabsorption aufgrund seines hohen Melaningehaltes, an der Phagozytose abgestoßener Photorezeptor-Außensegmente, die bei der Phototransduktion entstehen, am visuellen Zyklus, dem Nähr- sowie Sauerstofftransport von der Aderhaut in die äußeren, nicht perfundierten Netzhautschichten sowie als Bestandteil der Blut-Retina-Schranke zum Aufrechterhalt der Homöostase und des Schutzes der Netzhaut (Abbildung 3).[40,41]



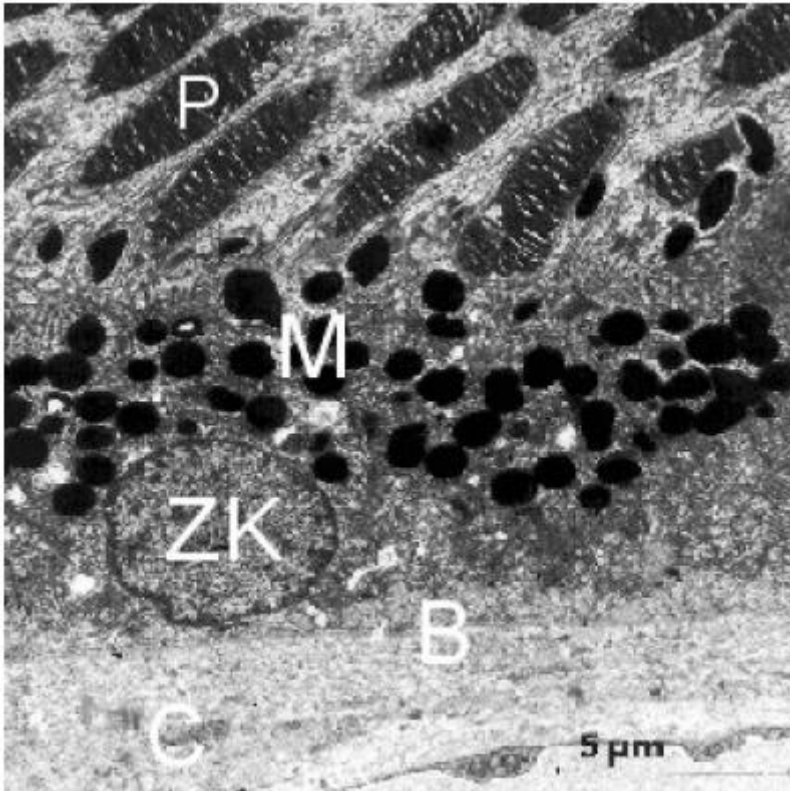
**Abbildung 3.** Schematische Darstellung des retinalen Pigmentepithels (RPE) mit seinen Funktionen: Lichtabsorption (gelb), epithelialer Transport (rot), Aufbau eines Protonengradienten (grün), Bestandteil des visuellen Zyklus (orange), Phagozytose der Fotorezeptor Außensegmente (blau) sowie Sekretion verschiedener Faktoren (oliv). Man beachte die Zellinterdigitationen des RPE mit den äußeren Segmenten der äußeren Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) durch seine zottenförmigen Ausläufer. Abkürzungen: MV = Mikrovilli; OS = Fotorezeptor Außensegmente, PEDF = pigment epithelium-derived factor, VEGF = vascular endothelial growth factor. Entnommen und modifiziert nach [36].



### 2.1.3 Die Melanosomen des RPE

In einer RPE-Zelle können sich bis zu 100 Melanosomen mit einer Größe von 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$  befinden.[42] Diese befinden sich vorwiegend am apikalen Pol der RPE-Zelle in direkter Nähe zu den Photorezeptoreaußensegmenten (Abbildung 4). Das Melanin schützt die Netzhaut vor oxidativem Stress, indem es reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eliminiert und somit eine antioxidative Wirkung entfaltet.[43]

Im Kontext von Lasertherapien sind die Absorptionseigenschaften von Melanin mit einem Absorptionskoeffizienten von  $1 \mu\text{m}^{-1}$  besonders bedeutsam.[42] Im grünen Spektralbereich (490 – 575 nm) absorbieren die Melanosomen etwa 50% des einfallenden Lichts.[44]



**Abbildung 4.** Aufnahme der RPE-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskop. Abkürzungen: P = Außensegmente der Photorezeptoren, M = Melanosomen, ZK = Zellkern einer RPE-Zelle, B = Bruch-Membran, C = Chorioidea. Entnommen aus [45].

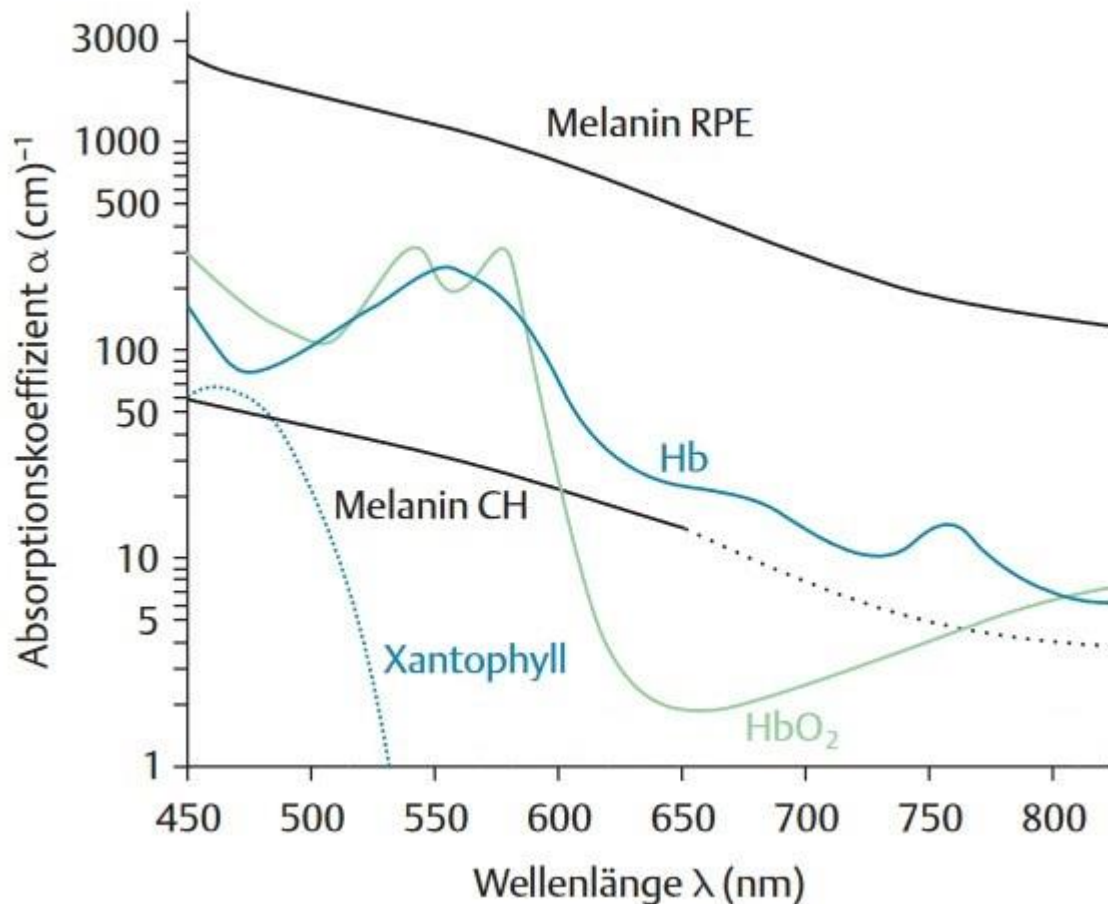
## 2.2 Lasertherapie in der Augenheilkunde

### 2.2.1 Allgemein

Die Therapie mit Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) in der Augenheilkunde ist aus der klinischen Routine nicht mehr wegzudenken. Zu den okularen Zielgeweben gehören Augenlider, Hornhaut, Sklera, Iris, Kammerwinkel, Linse, Glaskörper, Ziliarkörper, Netzhaut und Aderhaut. Zu den verwendeten Lasertypen gehören Excimer-Laser (193 nm), Farblaser (sichtbarer Bereich), Diodenlasern bis hin zu Nd:YAG-Lasern (1064 nm), die eine große Bandbreite an Wellenlängen aufweisen.[46] Die Wechselwirkungen zwischen Laserlicht und Gewebe können wie folgt klassifiziert werden: photothermische, thermomechanische, oder photochemische Reaktionen, Photoablation sowie Plasma induzierte Disruption.[47] Auch die Absorber (Ziele) des Laserlichts variieren, wobei die Hornhaut, die Linsenkapsel, Melanin (Iris, Eckwinkel, RPE, Aderhaut) die wichtigsten Ziele sind. Je nach Pulsdauer, Repetitionsrate (Duty Cycle, Hz), Pulsenergie (J) sowie Bestrahlungsstärke ( $W/cm^2$ ) (J) kommt es zu unterschiedlichen Gewebereaktionen.

Die Laserbehandlung der Netzhaut war die erste medizinisch genutzte Laserbehandlung. Das Konzept der Photokoagulation der Netzhaut wurde 1949 von Gerhard Meyer-Schwickerath entwickelt, der zunächst Sonnenlicht zur Koagulation der Netzhaut einsetzte.[48,49] In den 1950er Jahren folgten die ersten Behandlungen mit Xenon-Lampen, die als Vorläufer der retinalen Photokoagulation gelten.[50] 1960 wurde der erste Laser (Rubinlaser) erfunden und seine Verwendung in der Augenheilkunde erforscht.[51] Mit der Erfindung des ersten Lasers (Rubinlaser) im Jahr 1960 begann die Erforschung seiner Anwendung in der Augenheilkunde. Ein entscheidender Fortschritt gelang 1968 mit der Entwicklung des Argonlasers, der die Präzision und Wirksamkeit der Netzhautbehandlungen erheblich steigerte.[52] Seitdem konzentriert sich die Netzhautlasertherapie hauptsächlich auf die Koagulation des äußeren Netzhautgewebes; aber seit etwa 2000 werden sogenannte minimalinvasive retinale Lasertherapien entwickelt und angewendet (die einzelnen Themen werden in den folgenden Kapiteln behandelt).

Bei retinalen Laserbehandlungen ist das Melanin in RPE und Choroidea der Hauptabsorber. Im Folgenden werden zwei retinale Lasertherapien, die photothermische und die photomechanische, näher beschrieben, die sich dieselbe Melaninabsorption zunutze machen, aber sehr unterschiedliche Wirkungsmechanismen haben. Die erste, die photothermische Therapie, beschreibt auch ein neues Behandlungskonzept für die Hyperthermie, die bisher nur zur Gewebekoagulation eingesetzt wurde.



**Abbildung 5.** Absorptionskoeffizienten verschiedener Chromophore der Netzhaut in Abhängigkeit der Wellenlänge. Man beachte, dass das Melanin im RPE den höchsten Absorptionskoeffizienten hat, insbesondere im Wellenlängenbereich zwischen 400 – 700 nm. Hb = Hämoglobin, HbO<sub>2</sub> = Oxyhämoglobin. Entnommen und modifiziert nach [53,54]

### 2.2.2 Photothermische Lasertherapie der Netzhaut (Photokoagulation, thermische Stimulation)

Bei der Photokoagulation wird in der Regel Laserlicht im sichtbaren Wellenlängenbereich (grün, gelb, rot) verwendet, welches primär durch Melanin im RPE und teilweise auch der Aderhaut absorbiert wird.[44,45] Durch diese Absorption wird Licht in Wärme umgewandelt und diffundiert. Je nach Ausmaß dieser Temperaturerhöhung und Diffusion werden intrazelluläre Proteine denaturiert (Koagulation), was zum Zelltod führt. Das Ausmaß der Ausbreitung des Temperaturanstiegs bestimmt das Ausmaß der Schädigung.

Im Allgemeinen zeigt sich die Denaturierung der Photorezeptoren ophthalmoskopisch als sichtbare gräulich-weiße Läsion. Die Koagulation ist eine irreversible thermische Schädigung und das geschädigte Volumen nimmt mit der Laserpulsenergie zu. Die Photokoagulation der Netzhaut wird beispielsweise zur Therapie der diabetischen Retinopathie oder von Netzhautlöchern verwendet.[13] Normalerweise wird der Laserspot mit einem Durchmesser von 100-400  $\mu\text{m}$  und einer Dauer von 50-200 ms eingesetzt. In der Regel wird ein Dauerstrich-Laserpuls verwendet. Die Leistung des Laserpulses zur Erzeugung des Koagulationsspots liegt in der Regel im Bereich von 50 bis 300 mW, abhängig

von Bestrahlungsbedingungen wie der Spotgröße und der Bestrahlungszeit sowie von patientenspezifischen Faktoren wie Lichtabsorption und -streuung.

In den letzten Jahren wurden bei dieser Wärmetherapie auch sogenannte unterschwellige Lasertherapien eingesetzt, bei denen die Energie des eingestrahlt Laserpulses gesenkt wird und keine Vernarbung auftritt.[6,10,55] Diese Therapie führt einer subletalen Erwärmung des RPE, wodurch sichtbare Narben vermieden werden. Ein typisches Beispiel hierfür ist die Verwendung von Mikropuls-Lasertherapie. In der klinischen Praxis werden üblicherweise 500-Hz-Pulse verwendet, häufig in Kombination mit einem Duty Cycle von 5 bis 15 %. Die Bestrahlung erfolgt durch wiederholte Pulse mit einer Dauer von 100 bis 300  $\mu$ s. Die Spotgröße und Bestrahlungsdauer ähneln der konventionellen Photokoagulation und liegen typischerweise zwischen 100 und 200  $\mu$ m sowie 100 bis 200 ms. Hauptindikation dieser Therapie ist Chorioretinopathia Centralis Serosa (CCS). Zudem gibt es Berichte über eine verringerte Injektionsfrequenz bei Makulaödemem wie diabetischem Makulaödem (DMÖ) in Kombination mit Anti-VEGF-Injektionen.[9,56]

Als möglicher therapeutischen Mechanismus gilt die Aktivierung des Zellstoffwechsels von RPE-Zellen durch Hyperthermie, was zu einer Verbesserung verschiedener Funktionen führt. Unterstützung hierfür liefern Daten aus der Grundlagenforschung, die zum Beispiel eine Erhöhung von Hitzeschockproteinen (HSP), eine verbesserte antioxidative Kapazität sowie eine gesteigerte Autophagie-Funktion zeigen.[57–61]

Grundsätzlich folgt die Reaktion von molekularen Prozessen bei einem Temperaturanstieg dem **Arrhenius-Gesetz**. [62] Dieses Gesetz, das vom schwedischen Chemiker Svante Arrhenius im Jahr 1884 formuliert wurde, beschreibt den Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion und der Temperatur. Gemäß der Formel

$$k = A \cdot e^{-Ea/(RT)}$$

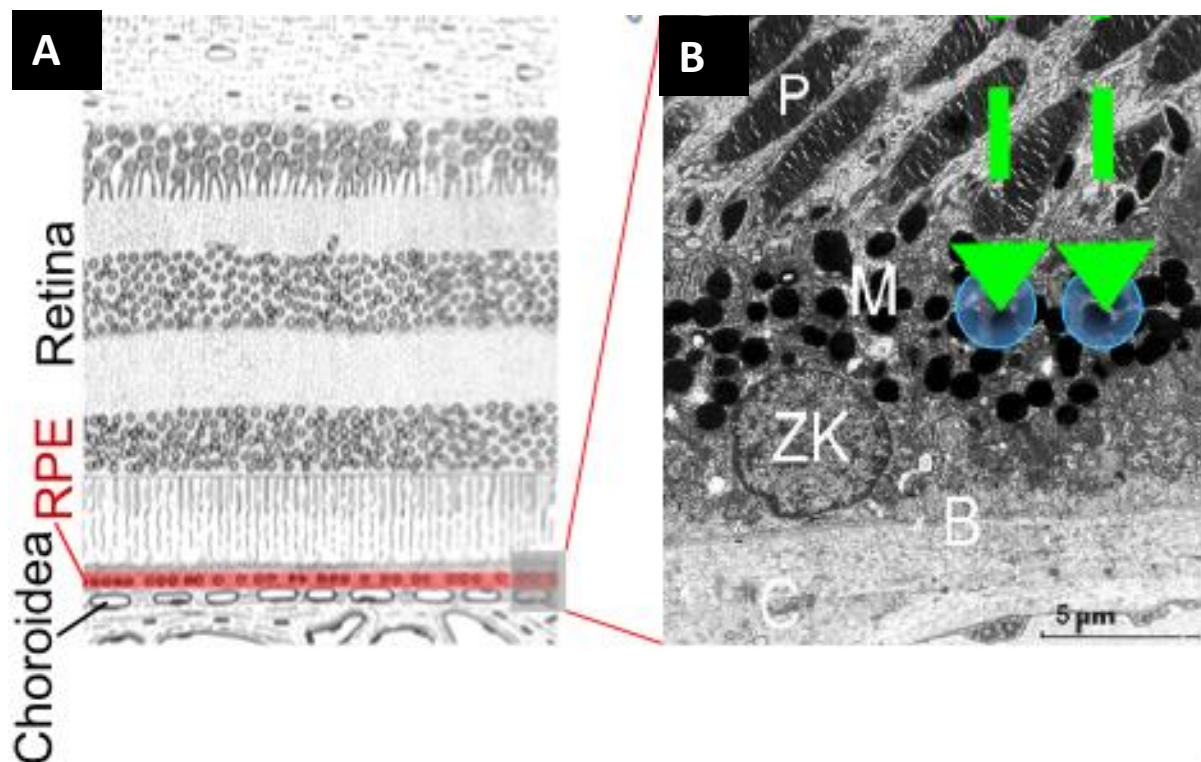
hängt die Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  exponentiell von der Temperatur  $T$  ab, wobei  $Ea$  die Aktivierungsenergie,  $R$  die universelle Gaskonstante und  $A$  der präexponentielle Faktor ist. In der Hyperthermie-Therapie bedeutet dies, dass selbst kleine Temperaturerhöhungen eine erhebliche Beschleunigung biochemischer Prozesse im RPE bewirken können. Allerdings ist die Einwirkungsdauer entscheidend: Zu lange oder zu hohe Temperaturen können subletale Schwellen überschreiten und zu einem irreversiblen Zelltod führen. Daher müssen Temperatur und Dauer genau kontrolliert werden, um eine gezielte subletale Hyperthermie zu gewährleisten.

Da der Melaningehalt in RPE-Zellen, der Grad der Streuung und Absorption des Laserlichts durch die Augenmedien interindividuell variieren, wird üblicherweise vor der Behandlung eine individuelle Titration der Laserleistung außerhalb der Makula durchgeführt. Die Behandlung der pathologischen Läsion erfolgt dann mit der auf dieser Grundlage berechneten Laserleistung. Häufig wird dabei eine Leistung verwendet, die 30-50 % der Funduskopie-Sichtbarkeitsschwelle bei der Titration entspricht. Es ist jedoch durchaus möglich, dass Pigmentierungsunterschiede sowie Variationen im Grad der Lichtstreuung zwischen Titrations- und Behandlungsbereichen zu Abweichungen führen können. Daher wäre es ideal, individuelle Bestrahlungen mit strenger Temperaturmessung und -kontrolle

durchzuführen. In diesem Bereich wird weiter intensiv geforscht und es bleibt zu hoffen, dass in Zukunft präzisere und optimierte Hyperthermiebehandlungen verfügbar sein werden.[63]

### 2.2.3 Photodisruption (thermomechanische Disruption)

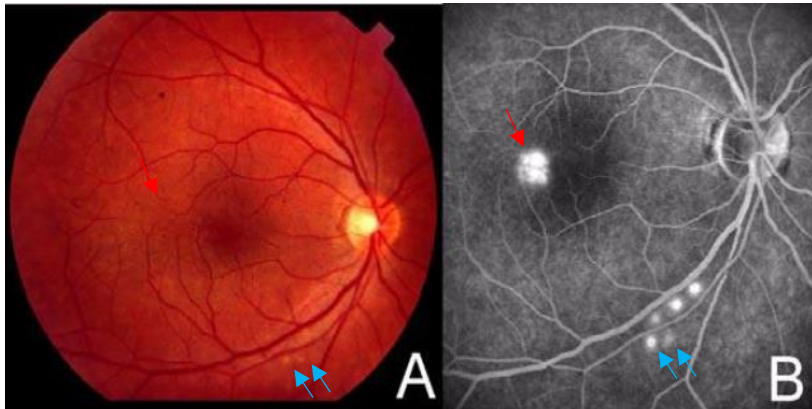
Frühere Forschungen haben gezeigt, dass Laserpulsdauern von weniger als 5  $\mu\text{s}$  zum Absterben von RPE-Zellen infolge der Bildung von Mikroblasen durch den schnellen Temperaturanstieg der Melanosomen führen, d.h. zu einer thermomechanischen Zerstörung.[64] In der klinischen Praxis kamen hierfür bisher Frequenzverdoppelter gepulster Nd:YLF-Laser oder 532 nm Q-switched-Laser zum Einsatz. Die Pulsdauer beträgt hierbei von 1,7  $\mu\text{s}$  (selektive Retinatherapie: SRT) [7] bzw. 3 ns (2RT) [65]. Bei SRT, zum Beispiel, beträgt die Laserpulsdauer 1,7  $\mu\text{s}$ , die Wiederholrate 100Hz und die Bestrahlungszeit etwa 300 ms.[4,7,66,67]. Diese selektive Zerstörung der RPE-Zellen ist funduskopisch nicht sichtbar. Der laserinduzierter Zelluntergang führt zu einer Wundheilung durch das umgebende RPE, d.h. zu einer Migration und ggf. Proliferation der RPE-Zellen. Die daraus resultierende morphologische und funktionelle Regeneration des RPE wird als erfolgreicher Reaktionsmechanismus der Behandlung angesehen.[7,68] Die Wirksamkeit der SRT wurde bei CCS [11,69,70], dem diabetischen Makulaödem[4,71,72] sowie dem Makulaödem nach Netzhautastverschluss[73] gezeigt.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung der retinalen Schichten (A) sowie der SRT am histologischen Schnittbild durch eine RPE-Zelle (B). Die rote Markierung (links) kennzeichnet das RPE. Die grünen Pfeile markieren die Bestrahlung der blauumkreisten Melanosomen (M) innerhalb der RPE-Zellen. Abkürzungen: P = Außensegmente der Photorezeptoren, M = Melanosomen, ZK = Zellkern einer RPE-Zelle, B = Bruch-Membran, C = Chorioidea. Entnommen und modifiziert nach [45]

#### 2.2.4 Detektion selektiver Retinaschäden mittels Fluoreszenzangiographie

Wie bereits erwähnt ist die auf das RPE begrenzte Zerstörung funduskopisch nicht sichtbar (Abbildung 7A). Das FAG kann jedoch die RPE-Schäden feststellen. Aufgrund des Schadens des RPEs, welches als Blut-Retina-Schranke fungieren soll, kommt es zum Durchtritt von Fluoreszein aus der Choriokapillaris in den subretinalen Raum. Diese Leckage von Fluoreszein ist detektierbar (Abbildung 7B).



**Abbildung 7.** Fundusfoto (A, FC), Fluoreszenz- (B, FAG) nach einer SRT bei Chorioretinopathia centralis serosa. Die SRT-Läsionen sind in der FAG (B) deutlich zu erkennen (roter Pfeil), jedoch funduskopisch nicht sichtbar. Die blauen Pfeile zeigen Testläsionen mit ansteigender Energie zur Dosisfindung am unteren Gefäßbogen. Funduskopisch leicht sichtbar sind lediglich Spots mit hoher (blaue Pfeile). Entnommen und modifiziert nach [7]

Jegliche Angiographie ist jedoch ein invasiver Eingriff mit potenziellen Risiken, wie z.B. einer Anaphylaxie.[74] Da diese aufwändige Untersuchungsmethode in den meisten augenärztlichen Praxen nicht durchgeführt wird, erfolgt die Untersuchung primär in Kliniken. Jüngste Entwicklungen ermöglichen die Echtzeitdetektion von Mikroblassen sowie ein automatisches Feedback-Kontrollsystem, sodass die Zerstörung des RPE so früh wie möglich erkannt und eine Überbehandlung vermieden werden kann.[75] Um diese neuen Technologien zu überprüfen, ist eine weniger invasive und ebenso empfindliche Bildgebungsmodalität wie die FAG erwünscht. Die Fundus-Autofluoreszenz (AF) sowie Infrarotreflektion (IR) sind einige der nicht-invasiven Bildgebungsmodalitäten, deren Empfindlichkeit im Vergleich zur FAG bei der Erkennung von SRT-Spots bisher nicht gründlich untersucht wurde.

### 2.3 Fluoreszenzlebensdauer (FLD)

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht, wenn ein Molekül von einem elektronisch angeregten Zustand in einen Zustand niedrigerer Energie übergeht. Dieser Prozess gehört zur Kategorie der strahlenden Relaxation. Die Fluoreszenzlebensdauer (FLD,  $\tau$ ) wird definiert als die Zeit, in der die Fluoreszenzintensität auf  $1/e$  (etwa 37 %) ihres Ausgangswerts abfällt (Abbildung 8). Die FLD ist fluorophorspezifisch und unabhängig von der Fluoreszenzintensität. Sie ist ein direkter Indikator für die Energieübertragungsrate eines angeregten Moleküls auf seine Umgebung.[15,76] Die Emission nimmt mit der Zeit exponentiell ab. Die Zeitskala liegt typischerweise im Bereich von Pico- (ps) bis Nanosekunden (ns). Gleichung (1) beschreibt die Fluoreszenzintensität ( $I$ ) als Funktion der Zeit ( $t$ ), der FLD ( $\tau$ ) und der jeweiligen Amplituden ( $\alpha$ ), wobei  $\alpha$  die relative Gewichtung einer Abfallkomponenten angibt. Über einen Sensor können Signale von verschiedenen Molekülen registriert werden, die fluoreszieren und dabei Licht mit unterschiedlichen Abklingzeiten emittieren. Entscheidend für die Messung ist, dass vor dem Sensor ein Filter platziert wird, der bestimmt, welche Wellenlängen detektiert werden. Allerdings gibt dieser Filter keine Auskunft darüber, von welchem Molekül oder welcher spezifischen Struktur das Signal stammt. Wenn innerhalb des erfassten Wellenlängenbereichs zwei oder mehr Moleküle Fluoreszenzsignale emittieren und diese Moleküle unterschiedliche Fluoreszenzabklingzeiten aufweisen, entsteht eine komplexere Signalstruktur. In solchen Fällen ist die Abklingkurve des Signals nicht mehr einfach negativ exponentiell. Stattdessen ergibt sich das Gesamtfluoreszenzsignal aus der Summe mehrerer Abklingkurven, die jeweils die Charakteristika der beteiligten Moleküle repräsentieren. Für die quantitative Analyse solcher gemischten Signale ist es erforderlich, mathematische Modelle zu verwenden, die diese Summe aus mehreren exponentiellen Funktionen beschreiben können. [14]

$$I(t) = I(0) * \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1)$$

$I$ : Fluoreszenzintensität,  $t$ : Zeit,  $\tau$ : FLD,  $i$ : Komponent,  $n$ : Anzahl der Komponenten  
 $\alpha$ : Amplitude

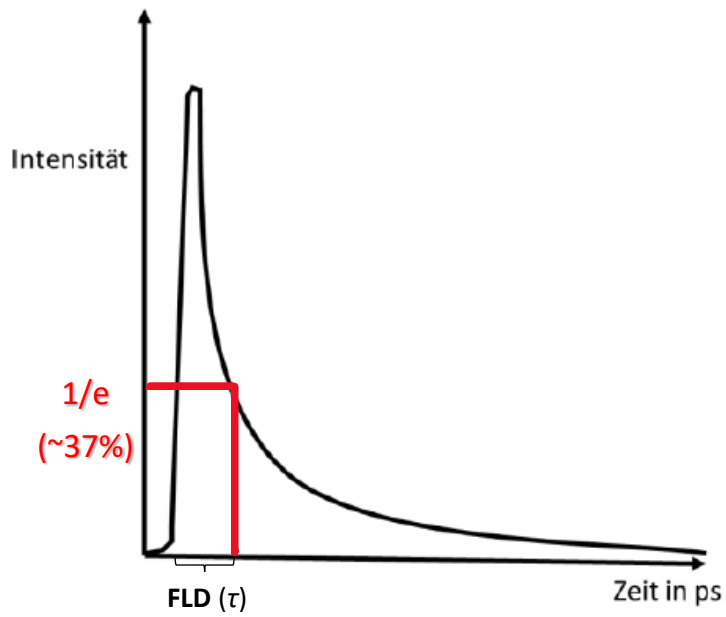
$I(t)$ : Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$ .

$I(0)$ : Anfängliche Fluoreszenzintensität bei  $t=0$ .

$\tau_i$ : die Fluoreszenzlebensdauer der jeweiligen Zerfallskomponente  $i$ .

$\alpha_i$ : die Amplitude oder der relative Beitrag jeder Zerfallskomponente  $i$  zur gesamten Fluoreszenzintensität





**Abbildung 8.** Zeitabhängige Entwicklung des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors nach Erregung auf ein höheres Energieniveau und Abfall auf seinen Ausgangswert: Die FLD ( $\tau$ ) kann für jedes Fluorophor als exponentielle Zerfallsfunktion der Fluoreszenz über die Zeit (hier in ps) beschrieben werden. Entnommen und modifiziert nach [21]

## 2.4 Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)

Die FLIO ist ein neues bildgebendes Verfahren zur In-vivo-Messung der Lebensdauer endogener Fluorophore des Augenhintergrundes, das ca. 2001 von Dr. Dietrich Schweitzer an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena entworfen und 2010 durch die Firma Heidelberg Engineering weiterentwickelt wurde.[77] Ein auf dem Spectralis-Scanner von Heidelberg Engineering basierender, industriell entwickelter FLIO-Prototyp kam erstmalig unter Dysli et al. zum Einsatz.[16]

### 2.4.1 Technische Grundlagen der FLIO

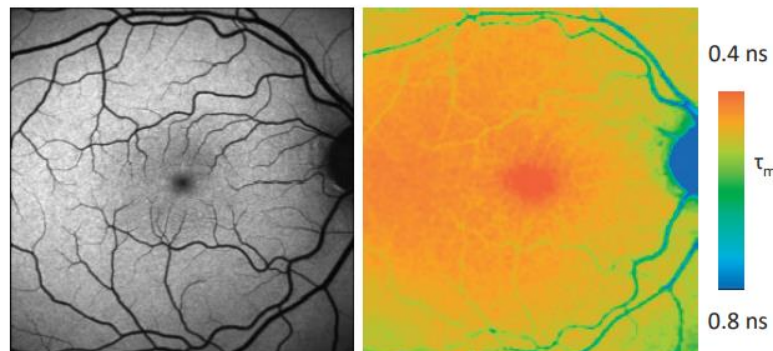
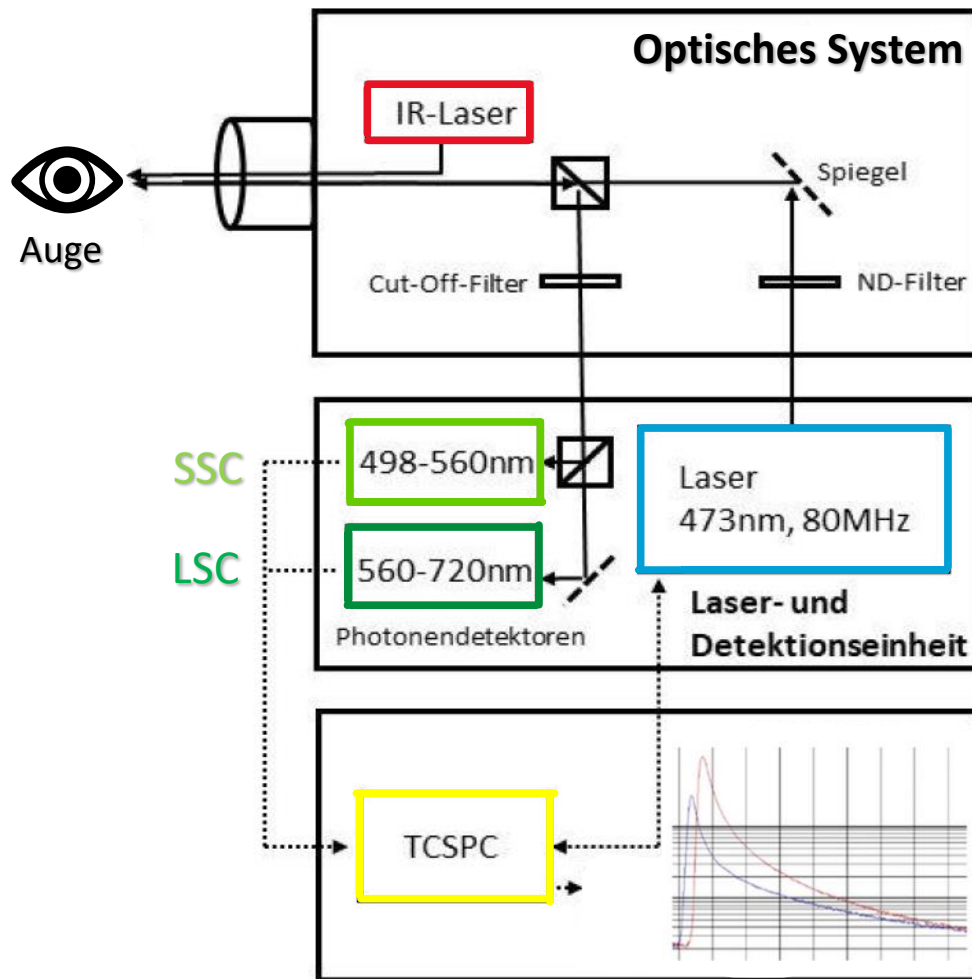
Das FLIO-System setzt sich aus einer gepulsten Laserquelle, einem Eye-Tracking-System, zwei Photonendetektionskanälen sowie einem TCSPC (Time-Correlated single photon counting) -Modul zusammen (Abbildung 9).

Die FLIO hat einen Pikosekunden-gepulsten Anregungsdiodenlaser mit einer Lichtsignalleistung von 200  $\mu$ W, einer Repetitionsrate von 80MHz und einer Wellenlänge von 473 nm (Becker & Hickl, Berlin, Deutschland), wobei ein Neutralfilter die Lichtstärke des Lasers vor dem Auftreffen auf das Gewebe reduziert.[78] Durch eine Infrarotkamera ist eine aktive Augenverfolgung möglich, Durch diese Augenverfolgung kann ein erfasstes Signal nach einer Augenbewegung immer noch dem korrekten Ursprung im bisher erfassten Bild zugeordnet werden. Dadurch kann jedes ankommende Photon innerhalb eines 256x256 Pixel großen Areals registriert werden. Ein konfokaler Laserstrahl rastert mit einer Bildfrequenz von 9 Hz und einer Laserwiederholrate von 80 MHz die zentralen 30° des Fundus und führt in diesem Bereich zur Anregung der Autofluoreszenz.

Zwei spektral getrennte Einzelphotonenzähl-Detektoren (HPM-100-40, Becker & Hickl, Berlin, Deutschland), die mit zwei zeitkorrelierten Einzelphotonenzählkarten (TCSPC, Becker & Hickl, Berlin, Deutschland) verbunden sind, detektieren jedes einzelne emittierte Photon. Die Photonen werden entsprechend ihrer Wellenlänge dem jeweiligen Kanal zugeordnet. Der kurze Spektralkanal (SSC) deckt eine Wellenlänge von 498 bis 560 nm ab, der lange Spektralkanal (LSC) dagegen einen Bereich von 560 bis 720 nm. Anschließend erfolgt die Berechnung der Fluoreszenzabklingkurve. Hierbei wird von einer doppelten Abklingkurve ausgegangen. Ein Optimierungsalgorithmus aktualisiert die variablen dieser Kurve(n) so lang bis die Summe beider Abklingzeiten mit einem geringst möglichen Fehler an die vom TCSPC bereitgestellten Daten passen.[79]

Aufgrund unterschiedlichster Störphänomene und der Totzeit der Photonendetektoren ist es unwahrscheinlich, jedes einzelne dieser Photonen erfassen zu können. Daher wird jede Messung so lange wiederholt, bis mindestens 1000 Photonen pro Pixel erfasst werden.

FLIO erfüllt gemäß *ANSI Z136.1-2007* sowie der *International Electrotechnical Commission* jegliche Anforderungen der Laserschutzklasse 1.[80,81] Das Gerät wird mit einer modifizierten Version der Heidelberg Eye Explorer (HEYEX) Software (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) bedient. Die Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt mit der integrierten Version SPCImage (Becker & Hickl, Berlin, Deutschland).



**Abbildung 9. (Oben)** Technischer Aufbau der FLIO. Ein Laser (blau) mit einer Wellenlänge von 473 nm fährt im Rasterverfahren zeilenartig über den Augenhintergrund und provoziert dort Fluoreszenzsignale, die mit Hilfe von zwei Photonendetektoren (SSC 498-560 nm (hellgrün), LSC 560-720 nm (dunkelgrün) erfasst werden. Durch ein mit Infrarotlaser (rot) gestütztes Eyetracking können ungewollte Augenbewegungen korrigiert und die Informationen einem spezifischen Punkt auf der Netzhaut zugeordnet werden. Das TCSPC-Modul (gelb) berechnet anschließend die Fluoreszenzzerfallskurve sowie die mittlere FLD. Entnommen und modifiziert nach [21,79] **(Unten)** FLIO-Bild eines gesunden Auges (links: Autofluoreszenzintensitätsbild, durchschnittliche FLD ( $\tau_m$ ) mit Pseudofarbe).

## 2.4.2 Fluorophore im Auge

Im Auge gibt es verschiedene Arten von fluoreszierenden Molekülen. In den Intensitätsbildern der Fundusautofluoreszenz (FAF) werden Summensignale von Fluorophoren wiedergegeben. Daher werden Moleküle mit geringer Fluoreszenzintensität und niedriger Gewebekonzentration möglicherweise nicht erkannt oder durch die Fluoreszenz konzentrierterer und intensiverer Fluorophore überdeckt. Die FLIO kann durch die Unterteilung von SSC und LSC Signalunterscheidungen treffen, was durch die FAF nicht möglich ist. Ferner ist die FLIO weniger empfindlich gegenüber der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenz-Quantenausbeute von Fluorophoren und hat somit das Potenzial, schwache Fluorophore zu erkennen. Was bisher über Fluorochrome im Auge, insbesondere im Augenhintergrund, und ihre Fluoreszenzeigenschaften bekannt ist, wird im Folgenden beschrieben. Zu den bisher identifizierten autofluoreszierenden Substanzen in der Aderhaut und der Netzhaut, die durch das von FLIO verwendete 473-nm-Licht angeregt werden können, gehören Makulapigment, Lipofuszin, Coenzyme (Flavin-Adenin-Dinukleotid: FAD, Flavin-Mononukleotid: FMN), Melanin, Kollagen, Elastin, Blut, Advanced Glycation Endproduct (AGE). Im Folgenden werden diese fluoreszierenden Moleküle ausführlicher erläutert. Moleküle mit einem Fluoreszenzspektrum, das von FLIO nicht erfasst werden kann, sind nicht aufgeführt.

### 2.4.2.1 Makulapigment (Lutein, Zeaxanthin)

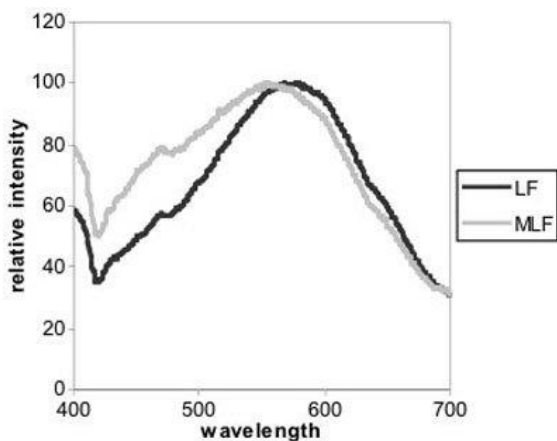
Von den oben genannten fluoreszierenden Substanzen haben Makulapigmente wie Lutein und Zeaxanthin die kürzesten FLD. In-vitro-Messungen zeigen ihre Fluoreszenzspitze bei 500-550 nm, wenn sie mit einer Wellenlänge von 420-490 nm (blaues Licht) angeregt werden, wobei ihre FLD im Femtosekundenbereich (200-250 fs) liegt, weit unterhalb der Nachweisgrenze von FLIO (einige zehn ps).[82] In vivo zeigt der zentrale Bereich des ETDRS-Gitters  $\tau_m$  Werte zwischen 50 und 200 ps in der SSC und 100-240 ps in der LSC.[16,83] Der Grund für den Unterschied zwischen In-vitro- und In-vivo-Messungen ist noch unklar, könnte aber durch andere fluoreszierende Substanzen beeinflusst werden, die im selben Bereich der Netzhaut vorhanden sind. In jedem Fall ist die FLD der zentralen Fovea im gesunden Augenhintergrund am kürzesten und unterscheidet sich erheblich von der umgebenden Netzhaut. Anomalien in der Menge oder Verteilung des Makulapigments werden daher eindeutig als Veränderungen der FLD der zentralen Fovea erkannt (Abbildung 9).[14,84]

### 2.4.2.2 Lipofuscin (Bisretinoid)

Lipofuscin ist eine fluoreszierende Substanz mit einem Fluoreszenzspektrum von 400 bis 700 nm und einem Emissionsmaximum bei 578 nm bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm (vgl. Abbildung 10). Lipofuscin wird vor allem in der Messung der FAF (Intensität) als Hauptfluorophor nachgewiesen wird.

Die FLD von Lipofuscin wird mit 1,4 – 3 ns als lang angesehen, aber die spezifischen Werte variieren zwischen den Berichten, die Spenderaugen verwenden; Schweitzer et al. berichteten über eine  $\tau_m$  von etwa 1,4 ns und Yakovleva et al. über 3 ns.[85,86] In-vitro-Messungen zeigten, dass die FLD von Bisretinoid und die von all-trans-Retinal 0,1 ns betrug. Die FLD von A2E, einem der Bis-Retinoide, beträgt etwa 0,2 ns, während die von all-trans-

Retinal weniger als 0,1 ns beträgt und damit kürzer ist als die FLD von Lipofuscin selbst. Lipofuscin wird hauptsächlich im langwelligen Bereich (LSC) nachgewiesen und es wird angenommen, dass die Zunahme der FLD auf der LSC-Seite mit dem Alter hauptsächlich auf die Akkumulation von Lipofuscin zurückzuführen ist.[78] Andererseits wurde berichtet, dass lipidreiche Drusen in FLIO weniger gut erkannt werden.[17] Dies ist höchstwahrscheinlich auf ihr Vorhandensein unter dem RPE mit Melanin zurückzuführen, das Licht absorbiert, was auf ihr Vorhandensein in FLIO durch Veränderung der FLD der RPE-Zellen an dieser Stelle hindeutet.



**Abbildung 10.** Fluoreszenzemissionsspektren von Lipofuscin (LF) und Melanolipofuscin (MLF) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm. Obwohl beide Granula ähnliche Anregungsspektren aufweisen (nicht dargestellt), unterscheiden sie sich deutlich in ihren Emissionsmaxima. Das Emissionsmaximum von MLF ist 554 nm, jenes von LF 578 nm. Entnommen aus[87]

#### 2.4.2.3 Redox Coenzyme (FAD, FMN)

Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) sind Coenzyme auf der Basis von Flavin und spielen eine wichtige Rolle im zellulären Energiestoffwechsel und bei Redoxreaktionen. Beide Moleküle haben deutliche Anregungspeaks bei 360 nm (UV-Bereich, schwächerer Peak) und 450 nm (blaues Licht, dominanter Peak), die hauptsächlich auf den Flavinring zurückzuführen sind. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei 520–530 nm (grünes Licht). Diese Wellenlängen sind charakteristisch für den Übergang vom angeregten Zustand zurück in den Grundzustand des Flavinmoleküls.

**FMN** ist ein Molekül, das aus einer Phosphatgruppe besteht, die an Riboflavin (Vitamin B2) gebunden ist, und strukturell aus einem Flavinring und Ribosephosphat aufgebaut ist. Es fungiert als Cofaktor im Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) des Elektronentransfersystems (ETC), vermittelt Redoxreaktionen und überträgt Elektronen in enzymatischen Reaktionen. FMN weist photochemische und fluoreszierende Eigenschaften auf, wobei sich die Fluoreszenzeigenschaften je nach Oxidationsstufe ändern. An Proteine gebundenes FMN weist eine längere FLD (ca. 4,7 ns) auf als freies FMN (ca. 1,5 ns). Die Fluoreszenz von FMN hängt auch von seiner lokalen molekularen Umgebung ab, einschließlich des pH-Werts und des Konformationszustands, wie z. B. gestapelte oder offene Konformationen.[88]

**FAD** ist ein Molekül, das aus einem Adenin-Nukleotid besteht, das an FMN gebunden ist und strukturell Riboflavin, Phosphatgruppen, Ribose und Adenin enthält. Es fungiert als Cofaktor für Enzyme und dient als Elektronenüberträger bei Redoxreaktionen, wobei es eine zentrale Rolle in zahlreichen Stoffwechselwegen spielt, wie etwa bei der Succinat-Dehydrogenase im Zitronensäurezyklus (TCA-Zyklus) und der Beta-Oxidation von Fettsäuren. In Flavoenzymen reguliert es Stoffwechselreaktionen durch den Transfer von zwei oder einem Elektron. Die FLD von FAD variiert je nach Zustand: Proteingebundene FADs haben eine kurze Lebensdauer ( $\sim 0,5\text{--}2$  ns), während freie FADs eine längere Lebensdauer ( $\sim 2,5\text{--}3,5$  ns) aufweisen. Sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Lebensdauer hängen stark von der Umgebung und dem Redoxzustand ab, in dem FAD gebunden ist.[88]

Diese Eigenschaften machen FAD und FMN zu vielseitigen Biomarkern für oxidativen Stress, Stoffwechselaktivität und Redoxzuständen in biologischen Systemen.

In der folgenden Tabelle 1 sind die Eigenschaften von der FLD in verschiedenen Proteinbindungszuständen von FAD und FMN zusammengefasst.

	$\tau_{\text{free}}$ (Protein-ungebunden)	$\tau_{\text{bound}}$ (Protein-gebunden)
FAD	2,3 ns	0,3 ns
FMN	1,5 ns	5 ns

**Tabelle 1.** Eigenschaften von der FLD in verschiedenen Proteinbindungszuständen von FAD und FMN.

#### 2.4.2.4 Melanin

Melanin hat die höchste Absorption im UV-Bereich um 335 nm, die mit der Wellenlänge abnimmt und die Absorption wird bei Wellenlängen über 700 nm fast vollständig abgeschwächt.[89] Diese außergewöhnliche Absorptionseigenschaft macht es zu einem effektiven Lichtabsorber in biologischen Geweben. Trotz der breiten Absorption zeigt Melanin ein nahezu konstantes Fluoreszenzspektrum mit einem Peak um 550 nm, unabhängig von der Anregungswellenlänge. Allerdings ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute extrem niedrig (0,1–0,2 %), was bedeutet, dass die Fluoreszenzintensität sehr gering ist und schwer nachzuweisen ist; insbesondere in Gegenwart anderer fluoreszierender Substanzen.[90] Die FLD von Melanin, gemessen in RPE-Zellen (Melanosomen), ist sehr kurz und beträgt im Durchschnitt 0,1–0,2 ns.[91]

#### 2.4.2.5 Collagen/Elastin

Kollagen und Elastin sind hauptsächlich durch Fluoreszenz im UV-Bereich unter 400 nm charakterisiert aber wenn sie im sichtbaren Wellenlängenbereich von 450–480 nm angeregt werden, wird auch Fluoreszenzemission um 470–520 nm beobachtet, wenn auch mit geringerer Intensität.[92] Kollagen ist ein wichtiges Strukturprotein, das im extrazellulären Lumen verschiedener Bindegewebe vorkommt und in der Gefäßwand, der Bruch'schen Membran und der Aderhaut des menschlichen Augenhintergrunds zu finden ist; die durchschnittliche FLD von Kollagen Typ I, II, III und IV betrug 1,75 ns, 1,44 ns, 1,11 ns und

1,62 ns.[85] Elastin ist in der vaskulären Tunica media und damit in der dicken Arterienwand häufiger anzutreffen und seine FLD wurde mit 1,38 ns angegeben.[85] In normalen Augen ist die FLD von Blutgefäßen viel länger als die des umgebenden Netzhautgewebes und kann daher mit FLIO deutlich beobachtet werden (Abbildung 9).[14,84]

#### 2.4.2.6 Blutzellen

Obwohl die FLD von Blut noch nicht ausführlich erörtert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie zum FLD-Wert des Gefäßteils beiträgt. Die FLD von Erythrozyten (Hämoglobin) ist sehr kurz und liegt zwischen 0,1 und weniger als 0,2 ns, während sie für andere Blutzellen (0,7 bis 1,25 ns) und Plasma (1,1 ns) länger ist, was der des Cholangiogens nahe kommt.[93]

#### 2.4.2.9 AGEs (Advanced Glycation End Products)

AGEs, die Endprodukte nicht-enzymatischer Glykierungsreaktionen, besitzen spezifische Fluoreszenzeigenschaften. Die typischen Anregungs- und Emissionswellenlängen ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) liegen bei etwa 370 nm/440 nm.[94] Zudem wurde in einigen Studien berichtet, dass AGEs bei einer Anregung bei 468 nm eine Emission bei etwa 490 nm zeigen. Die FLD von AGEs beträgt typischerweise etwa 1,7 ns.[85] Dieser Wert spiegelt die spezifischen Fluoreszenzeigenschaften der in Geweben oder Zellen angesammelten AGEs wider. Die Akkumulation von AGEs in der Netzhaut von Patient:innen mit Diabetes wird als eine der Hauptursachen für die Verlängerung der FLD in der FLIO-Bildgebung angesehen.[95] Diese Anhäufung steht in Zusammenhang mit der Progression der diabetischen Retinopathie. Die spezifischen Fluoreszenzeigenschaften von AGEs könnten somit als wichtiger Biomarker dienen, um das Fortschreiten der Erkrankung zu bewerten und die Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen zu überwachen.[84]

Die nachstehende Tabelle 2 fasst die obigen Erläuterungen zusammen.

Fluorophor	dominanter Kanal (SSC or LSC)	FLD	Lokalisation
Makulapigment (Lutein, Zeaxanthin)	SSC	200-250 fs	Fovea
Lipofusin	LSC	1,4-3 ns	In RPE-Zellen
Redox Coenzyme (FAD, FMN) <b>-gebunden</b>	SSC	FAD: 0,3 ns FMN: 5 ns	Alle Zellen
Redox Coenzyme (FAD, FMN) <b>-frei</b>	SSC	FAD: 2,3 ns FMN: 1,5 ns	Alle Zellen
Melanin	SSC≈LSC	0,1-0,2 ns	RPE, Choroid
Collagen, Elastin	SSC≈LSC	1-2 ns	Blutgefäße, Papille, Bruch-Membran, Choroid
Blutzellen	unklar	Elythrozyten: 0,1-0,2 ns Andere Blutzellen: 0,7-1,25 ns	Blutgefäße, Kapillaren
AGE	SSC	1,7 ns	Alle Zellen

**Tabelle 2.** Zusammenfassung der in Kapitel 2.4.2 aufgeführten Fluorophore mit ihrer FLD sowie Lokalisation im Gewebe.

### 2.4.3 Bisherige Forschungsarbeiten über die FLD der Netzhaut und FLIO

Das derzeitige Wissen über die FLD und FLIO basiert auf Grundlagenforschung, die sowohl ex vivo als auch in vivo durchgeführt wurde. Diese Studien tragen wesentlich zum Verständnis der FLD am Augenhintergrund und der FLIO bei. Eine ex vivo Studie an Schweinegewebe zeigte eine kurze FLD des gesunden RPEs an, die wahrscheinlich durch die kurze FLD des Fluorophors Melanin verursacht wird. Zellulärer Stress führte zu einer signifikant verlängerten FLD bei RPE-Zellen, was zumindest teilweise mit Veränderungen im Proteinbindungszustand der fluoreszierenden Cofaktormoleküle zusammenhängen könnte.[91]

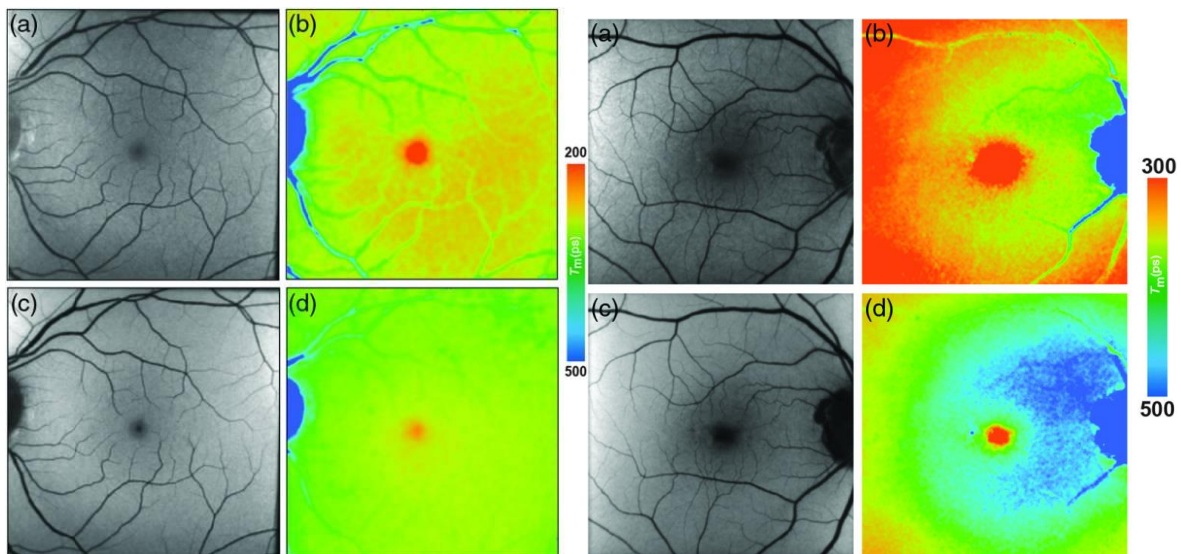
Die Hemmung der Autophagie-Funktion durch Bafilomycin A1 im RPE führte zu einer signifikanten Verlängerung der mittleren FLD ( $\tau_m$ ) im SSC. Es wurde vermutet, dass dies mit einer reduzierten mitochondrialen Aktivität und einer damit einhergehenden erhöhten Konzentration von freiem FAD assoziiert ist.[21] Eine weitere Studie untersuchte ex vivo die FLD in hyperaktiven Mitochondrien und fand eine signifikant kürzere mittlere FLD ( $\tau_m$ ) im SSC entsprechender RPE-Zellen nach der Entkopplung der mitochondrialen Aktivität. Diese Verkürzung der FLD könnte auch ein Hinweis auf Veränderungen im Proteinbindungszustand des Cofaktors sein.[96] Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei einer ex vivo Studie mit AMD-ähnlichen Veränderungen an RPE-Zellen, die 14-tägigen Serumentzug ausgesetzt waren, signifikant verlängerte FLDs im Vergleich zu normalen Serumbedingungen. Es wird diskutiert, dass dies auf eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität und einen anschließenden Anstieg von freiem FAD und proteingebundenem FMN zurückzuführen ist.[91,96,97] In vivo Studien an AMD-Mausmodellen deuteten auf eine vorübergehende, frühzeitige, signifikant kürzere FLD am Augenhintergrund hin, die vermutlich auf stressbedingte kurzzeitige Stoffwechselaktivierung zurückgeführt wurde.[98] Dies deutet darauf hin, dass FLIO früh Stoffwechsel- und Redox-Veränderungen detektieren kann, bevor die Netzhauterkrankung auftritt.[98]



#### 2.4.4 Klinische Anwendung der FLIO

Im gesunden Auge verkürzt sich die mittlere FLD ( $\tau_m$ ) von peripher nach zentral. Im Zentrum der Makula ist aufgrund des hohen Gehalts an Makulapigment die kürzeste FLD messbar, wohingegen die längste FLD im Bereich der retinalen Gefäße sowie des Sehnervenkopfes detektierbar ist.[19] Dies wird durch ein vermehrtes Aufkommen von Elastin sowie Kollagen begründet.[19] Mit zunehmendem Alter verlängert sich die FLD sowohl im SSC als auch im LSC. Dies wird am ehesten auf die altersbedingt zunehmende Konzentration von Lipofuszin sowie einer veränderten Zusammensetzung retinaler Fluorophore zurückgeführt.[14] Nicht unbeachtet darf hierbei eine sukzessive AMD (z.B. Katarakt) bleiben, die ebenfalls zu einer Verlängerung der FLD führen kann.

Es wurde gezeigt, dass die mittlere FLD bei Patienten mit einer AMD im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert gewesen ist (Abbildung 11).[14,99] Als Ursache hierfür wurde eine Akkumulation von Bisretinoiden in den RPE-Zellen angenommen. Morphologisch stellt sich diese FLD-Verlängerung ringförmig um die Makula dar und zeigt ihre stärkste Ausprägung im LSC.[16] Bemerkenswerterweise konnte dieses spezifische Muster einer verlängerten FLD bereits vor der funduskopischen Sichtbarkeit von Drusen mittels FLIO erfasst werden.[100]



**Abbildung 11.** AF- und FLIO-Bilder einer gesunden Netzhaut (a-d, links) sowie einer an AMD erkrankten Netzhaut (a-d, rechts) mit den Kanälen SSC (b) und LSC (d). Entnommen und modifiziert nach [78]

#### Rauchen

Nicht nur bestimmte Krankheiten, wie die AMD, sondern auch Lebensgewohnheiten können die FLD des Augenhintergrundes nachweislich beeinflussen. Eine Studie der Forschungsgruppe der Augenklinik des UKSH Campus Lübeck hat gezeigt, dass Raucher bei gesunden jungen Erwachsenen (20-37 Jahre) einen signifikanten Unterschied in der FLD der Netzhaut im Vergleich zu Nichtrauchern aufweisen. Hierbei wurde angenommen, dass die beobachteten FLD-Änderungen wahrscheinlich auf rauchbedingte Stoffwechselveränderungen zurückzuführen sind.[18]

## **2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

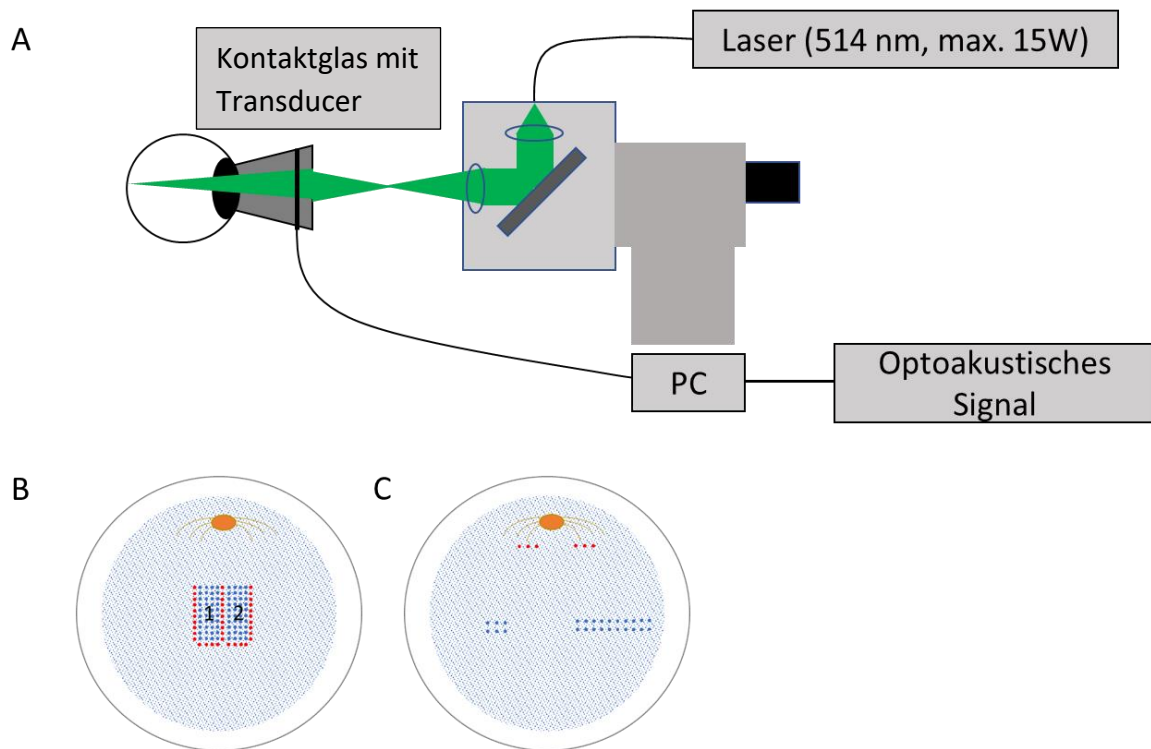
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FLIO das Potenzial hat, durch ihre nicht-invasive Messmethode neben strukturellen Veränderungen auch Informationen über den metabolischen Zustand der Netzhaut zu liefern. Die Laserbehandlung der Netzhaut ist eines der therapeutischen Verfahren, die den Stoffwechsellzustand der Netzhaut beeinflussen können. Insbesondere minimal-invasive Laserbehandlungen wie die SRT wurden eingeführt, um den Stoffwechsellzustand der Netzhaut und schließlich ihre Funktion zu verbessern. Die Wirkung dieser Verfahren auf die FLD wurde jedoch bisher noch nie in vivo untersucht. In dieser Doktorarbeit wurde daher an Kaninchen in vivo untersucht, inwiefern sich eine selektive Laserbehandlung an der Netzhaut auf die FLD auswirkt und wie diese mittels FLIO detektiert werden kann. Dies wurde im Rahmen eines Verbundprojektes (BMBF-Projekt „MetaNetz“: FKZ 13N14443, 13N14444, 13N14445) in Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Laserzentrum Lübeck GmbH, dem Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck, Heidelberg Engineering, Becker & Hickl GmbH und A.R.C. Laser GmbH durchgeführt, bei dem ein neuer selektiver Netzhautlaser und neue Diagnosemöglichkeiten entwickelt werden sollten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Das Lasersystem und die Laserbestrahlung

Es wurde ein 15-W-Diodenlaser (A.R.C. Laser GmbH, Nürnberg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 514 nm und einstellbarer Pulsdauer von 2  $\mu$ s bis 50  $\mu$ s bei einer Spotgröße von 85  $\mu$ m verwendet (Abbildung 12A). Hiermit wurden zwei unterschiedliche Pattern gelasert (Abbildung 12B). Im ersten Experiment wurden die Pattern mit unterschiedlichen Laserpulsdauern sowie -energien gelasert, sodass ein Muster mit funduskopisch unsichtbaren bis hin zu deutlich sichtbaren, starken Photokoagulationsstellen entstand (Markerspots 80  $\mu$ J, 50  $\mu$ s, 11 W). Die energie- sowie pulsdauerstarken Markerspots bildeten die Rahmen. Innerhalb dieser Rahmen wurden analog der vier Pulsdauern 5, 2, 12, 20 sowie 20  $\mu$ s vier Reihen à zehn Laserspots mit geringer Pulsenergie (15  $\mu$ J bis 680  $\mu$ J) gesetzt. Zur Evaluation einer zeitabhängigen Veränderung wurde das zweite Pattern nach etwa sieben bis elf Tagen nach selbem Schema direkt neben jenes aus der ersten Behandlung gelasert. (Abbildung 12B, Pattern 1 links, Pattern 2 rechts). Die Laserung innerhalb des Patterns hatte als Ziel, jene Energieschwelle des RPE-Zelltodes für jede Pulsdauer zu untersuchen, welche bereits bei Seifert et al. beschrieben wurde.[64]

Das zweite Experiment zielte darauf ab, bestrahltes Gewebe minimalinvasiv zu zerstören, indem das RPE nahezu selektiv geschädigt wurde, und Veränderungen an und um die Stelle zu beobachten. Um die Schwellenenergie des Laserpulses zu bestimmen, wurde ein Testspot in der Nähe des Sehnervenkopfes platziert und die von den Mikrobläschen erzeugten photoakustischen Signale wurden mit einem in ein Kontaktglas eingebetteten Ultraschallwandler aufgezeichnet. Da die Erzeugung von Mikrobläschen eine mechanische Zerstörung der RPE-Zellen bedeutet, kann die niedrigste für die Bläschenerzeugung erforderliche Laserpulsenergie verwendet werden, um das RPE auf die am wenigsten invasive und nahezu selektive Weise zu zerstören. Die Laserbestrahlung hierbei erfolgte mit einer Pulslänge von 5  $\mu$ s und mit zwei Laserpulsenergien, 15  $\mu$ J und 40  $\mu$ J, welche um den Schwellenwert für die Mikroblasenbildung lagen. Für diese Fragestellung wurden zwei Kaninchen (vier Augen) mit zwei Pattern bestrahlt. Das erste Pattern hatte eine Größe von 3x2 Spots, das zweite Pattern eine Größe von 10x2 Spots.



**Abbildung 12.** Versuchsaufbau sowie schematische Darstellung der Lasermethoden auf der Kaninchennetzhaut. (A) Versuchsaufbau für die Laserung mit optoakustischer Mikroblasendetektion. (B) Schematische Darstellung der Laserung des ersten sowie zweiten Patterns: Vier Reihen mit unterschiedlichen Pulsdauern à zehn Laserspots (blau) mit zunehmender Pulsenergie sowie 14 Markerspots (rot), welche als orientierender Rahmen für die Laserung dienten. (C) Schematische Darstellung der RPE-selektiven Laserung um den Schwellenwert der Mikrobläschenbildung: zweireihig applizierte Laserspots (blau) mit entweder drei oder zehn Spots. Aufzeichnung der Mikrobläschenbildung mittels Optoakustik. Entnommen und modifiziert nach [101]

### 3.2 Die Versuchstiere und der Versuchsaufbau

In den Versuchen (wurden adulte Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard mit ähnlichem Alter (9 Monate) und ähnlichem Gewicht (3 kg) verwendet. Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit den ARVO-Richtlinien und nach Genehmigung durch das Ethikkomitee des Ministeriums für Umwelt und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (Genehmigungsreferenznummer: V242-12638/2018 (31-4/18)). Die Tiere stammten aus der Zucht der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld) sowie eigenen Nachzuchten der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck. Aufgrund seiner Pigmentierung des Augenhintergrundes ist die gewählte Kaninchenrasse Chinchilla Bastard sehr gut für Laserexperimente an der Netzhaut geeignet ist. Die Achsenlänge der Kaninchenaugen beträgt ca. 16 mm (durchschnittlich 24 mm beim Menschen), sodass eine Verwendung von Patientenkontaktgläsern am Kaninchenauge möglich ist.

Die Kaninchen wurden mit Ketamin (30 mg/kg) und Medetomidin (0,25 mg/kg) über eine intramuskuläre Injektion anästhesiert. Eine medizinische Mydriasis der Pupillen erfolgte durch die lokale Applikation der Augentropfen Phenylephrin und Tropicamid. Die Augenoberfläche wurde mittels Oxybuprocainhydrochlorid (Conjuncain®) lokal betäubt.

Anschließend wurde das Kaninchen mit Hilfe einer Haltevorrichtung vor die Laser-Spaltlampe gesetzt (Abbildung 13). Auf die Hornhaut des Behandlungsauges wurde eine Kontaktlinse mit integriertem optoakustischen Sensor mit einem indexangepassten Gel (Methocel® 2%) aufgesetzt. Das unbehandelte Auge wurde zum Schutz vor einer Austrocknung der Augenoberfläche mit einem Klebeband (Leukofix®) verschlossen. Die anatomischen und optischen Eigenschaften des Auges führen bei dem auch in der klinischen Praxis verwendeten Mainster-Kontaktglas zu einer reduzierten Spotgröße von  $85 \mu\text{m}$  (66 % der Spotgröße in der Zwischenbildebene).[70]

Zudem wurden vor Beginn der eigentlichen Experimente zwei bis vier Kaninchenaugen für Kalibrierungs- und Positionierungszwecke genutzt, um nachfolgend die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen.

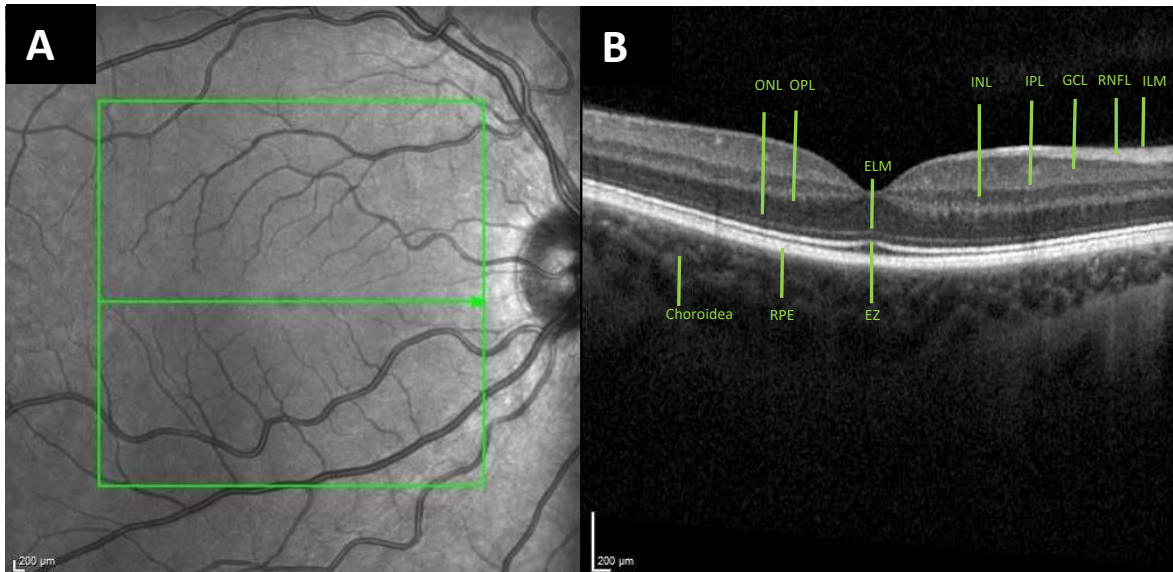


**Abbildung 13.** Versuchsaufbau für die Laserbestrahlung der Netzhaut von Kaninchen mittels eigens erbauter Haltevorrichtung. Die Abbildung zeigt den Aufbau der Laserung des linken Auges eines anästhesierten Kaninchens. Das rechte Auge wurde zum Schutz vor einer Austrocknung der Augenoberfläche mittels Klebestreifen abgeklebt. Quelle: Private Aufnahme.

### **3.3 Multimodale Bildgebung**

Die Laserspots wurden direkt nach der Laserbehandlung (im Schnitt etwa nach 30 Minuten) mittels Fundus-Colorfotographie (FC), Spectra-Domain optischer Kohärenztomographie (SD-OCT), Fluorescence-Lifetime-Imaging-Ophthalmoscopy (FLIO), Fundusautofluoreszenz (AF), Infrarot Reflektionsbild (IR) und Fluoreszenzangiographie (FAG) analysiert (Geräte siehe in der Tabelle xx).

Die FC ist eine Methode zur Aufnahme eines Bildes des Augenhintergrunds mit Hilfe eines Blitzlichts. SD-OCT ist eine Methode zur Gewinnung von Querschnittsbildern der Netzhaut mit Hilfe einer Scanning-Lasertechnik. Für die Bildgebung wird eine Wellenlänge von etwa 870 nm verwendet. Die Scangeschwindigkeit für das verwendete System beträgt 85 KHz für A-Scan. Die axiale und laterale Auflösung beträgt 7  $\mu\text{m}$  bzw. 14  $\mu\text{m}$ . Ein typisches OCT-Bild der menschlichen Netzhaut ist in Abbildung 14 dargestellt. Bei der AF wurde das blaue Licht (um 480 nm) verwendet, um natürliche fluoreszierende Moleküle in der Netzhaut anzuregen. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einer Kamera und einem Filter erfasst. Da die RPE-Zellen viel fluoreszierendes Lipofuszin enthalten, können Veränderungen in den RPE-Zellen oft als Abnahme der Fluoreszenzintensität in der AF erkannt werden. Außerdem können einige strukturelle Veränderungen die Fluoreszenzintensität verändern und als Hyper- oder Hypofluoreszenz sichtbar werden. Diese nicht invasive Methode, die heutzutage meist mit einem Laser-Scanning-System durchgeführt wird, ist auch eine der Routineuntersuchungen in der klinischen Praxis. Die IR-Bildgebung wird häufig zusammen mit der OCT-Bildgebung durchgeführt, da die Fundusbeobachtung während der OCT-Bildgebung in der Regel mit IR durchgeführt wird. IR ist aufgrund seiner langen Wellenlänge besonders nützlich für die Beobachtung tieferer Schichten, wie des RPE oder der Aderhaut. FAG ist eine Methode zur Untersuchung des Blutflusses des Augenhintergrunds mit Hilfe einer Fluoreszenz, die typischerweise über die Armvene injiziert wird. Wenn es durch Laserbestrahlung zu einem Leck in der äußeren Blut-Retina-Schranke, d.h. der RPE Tight-Junction, kommt, kann das Fluorescein in der Choriocapillaris in den subretinalen Raum zwischen RPE und Photorezeptoren fließen und als Leckage der Fluoreszenz erkennbar sein. FLIO wird im nächsten Unterkapitel ausführlicher erklärt.



**Abbildung 14.** OCT Aufnahme eines gesunden menschlichen Auges. (A) das IR-Bild der Makula, (B) der hierzu korrespondierende Querschnitt. ILM = Membrana limitans interna, RNFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglienzellschicht, IPL = Innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht, ELM = Membrana limitans externa, EZ = ellipsoide Zone, RPE = retinales Pigmentepithel. Quelle: Private Aufnahme.

### 3.4 Standardprotokoll des Versuchablaufs

Verfahren	Gerät/Substanz
Narkose (i.m.)	Ketamin (30 mg/kg) Medetomidin (0,25 mg/kg)
Medizinische Mydriasis	Phenylephrin und Tropicamid
Betäubung der Augenoberfläche	Oxybuprocainhydrochlorid (Conjucaïn®)
Laserung	15-W-Diodenlaser A.R.C. Germany, Nürnberg
Fundusfotographie	Zeiss VISUCAM®: Carl Zeiss Meditec AG, Jena
OCT	Spectralis OCT, Heidelberg Engineering
FLIO	Prototyp, Heidelberg Engineering, Heidelberg
FAG	0,3 mL 10% Fluorescein-Natrium; Zeiss VISUCAM®: Carl Zeiss Meditec AG, Jena

**Tabelle 3.** Standardprotokoll des Tierversuchs in zeitlich korrekter Reihenfolge (von oben nach unten). i.m. = intramuskulär, OCT: Optische Kohärenztomographie, FLIO: Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie, FAG: Fluoreszenzangiographie



### 3.5 FLIO

Hierfür wurde ein FLIO-Prototyp verwendet, der von der Firma Heidelberg Engineering GmbH (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung der für die Kaninchen-FLIO bei dieser Studie.

#### 3.5.1 Durchführung der FLD-Messung

Um die FLD des Kaninchenfundus zu messen, wurde das sedierte Kaninchen vor den FLIO-Prototypen gelegt. Die Messung wurde im abgedunkelten Raum durchgeführt, um die Detektion der Photonen aus der Umgebung zu vermeiden. Die FLD wurde so lange gemessen, bis an den beiden Spektralkanälen (SSC und LSC) mindestens 1000 Photonen pro Pixel erfasst wurden. Dieser Mindestwert von 1000 Photonen pro Pixel wird derzeit als klinischer Standard verwendet, da dies der Wert ist, der erforderlich ist, um eine ausreichende Genauigkeit für die Anpassung der Abklingkurve zu erreichen.

#### 3.5.2 Auswertung der FLD-Messung

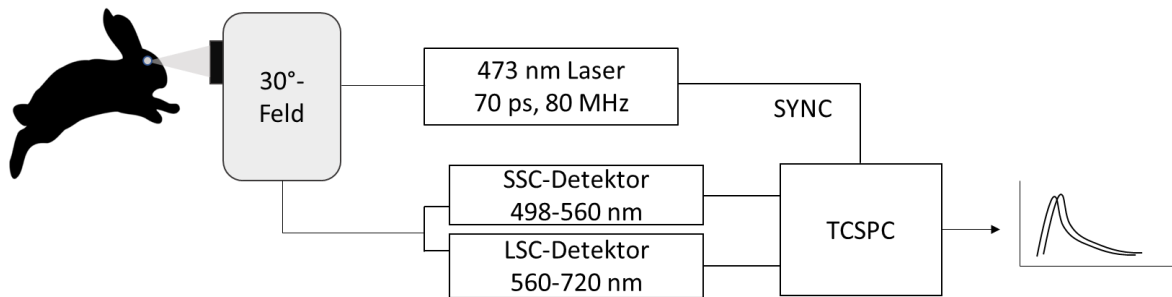
Nach dieser Messung wurde der durch die FLIO erfasste 256x256 Pixel große Datensatz mit der Software SPCLmage 8.0 (Becker und Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) ausgewertet. Zur Auswertung wurde der Fluoreszenzabfalls jedes Pixels an eine bi-exponentielle Kurve mit einem Pixel-Binning von 1 angepasst. Die Gesamtfunktion der FLD summiert sich somit aus den jeweils einzelnen Exponentialkomponenten, wobei  $\tau_1$  und  $\tau_2$  für die FLD der kurzen bzw. langen Exponentialkomponenten stehen und  $a_1$  und  $a_2$  für die jeweiligen Amplituden:

$$f(t) = a_1 \times e^{-t/\tau_1} + a_2 \times e^{-t/\tau_2}$$

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau_m$ ) wird dabei durch folgende Gleichung definiert:

$$\tau_m = \frac{a_1 \times \tau_1 + a_2 \times \tau_2}{a_1 + a_2}$$

Das Programm SPCImage erstellt durch eine Berechnung der Zerfallsmatrix ein Pseudofarbbild gemäß der räumlichen Verteilung aus dem gewonnenen Datensatz der FLD.



**Abbildung 15.** Schematische Darstellung der FLIO. Die Netzhaut des Kaninchens wird mittels gepulstem Picosekunden-Laser (473 nm, 70 ps, 80 MHz) in einem 30°-Feld abgetastet. Die hierbei emittierten Photonen werden von zwei Photonenzähl-detektoren erfasst und in einen kurzen Spektralkanal (SSC) sowie einen langen Spektralkanal (LSC) aufgeteilt. TCSPC: time-correlated single-photon counting (=zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung). Entnommen und modifiziert nach [101]

### 3.6 Analyse der Laserspots

Für jede Modalität wurde jeder Laserspot nach seiner Sichtbarkeit klassifiziert, wobei jeder Spot von zwei unabhängigen Untersuchern als sichtbar, nicht sichtbar oder nicht bewertbar, z.B. aufgrund der schlechten Bildqualität, eingestuft wurde. In der FLIO wurde die Sichtbarkeit der Spots anhand des errechneten Pseudofarbbildes überprüft. Ein Spot in der AF wurde als sichtbar bewertet, wenn dieser mindestens in einem Fluoreszenzintensitätsbild entweder im SSC oder LSC erkannt wurde. Da manche Spots jedoch schwierig zu klassifizieren waren, wurde zur endgültigen Bestätigung ein dritter Untersucher hinzugezogen. Zusätzlich zu den bildgebenden Verfahren wurde auch die Sichtbarkeit direkt nach der Bestrahlung für jede bestrahlte Stelle entsprechend der subjektiven Wahrnehmung der operierenden Person (Augenärztin) erfasst (hier definiert als "Spaltlampe (SL)") und mit den Sichtbarkeitsergebnissen der bildgebenden Verfahren verglichen.

### 3.7 Berechnung der ED50-Werte

Es wurden 11 Kaninchen bzw. 21 Augen ausgewertet. Ein Auge konnte aufgrund fehlender Daten nicht ausgewertet werden. 15.558 Laserspots wurden demnach auf ihre Sichtbarkeit hin analysiert. 6938 Laserspots wurden als sichtbar klassifiziert. 360 Spots wurden aufgrund der schlechten Aufnahmequalität ausgeschlossen.

Die ED50-Pulsenergie, bei der der Laserspot in der jeweiligen Untersuchungsmodalität mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% erkannt wird, wurde in das Statistikprogramm OriginLab® (OriginPro 2019, 64-bit, 9.6.5.169, Northhampton, USA) bestimmt. Zuerst wurde die ED50-Werte der einzelnen Augen und Pulsdauern mittels der Formel

$(max/2) * (1 + erf(\sqrt{2} * ((x-L)/w)))$  (Abramowitz and Stegun: Handbook of Mathematical Function, 1972) für jede Pulsdauer berechnet.

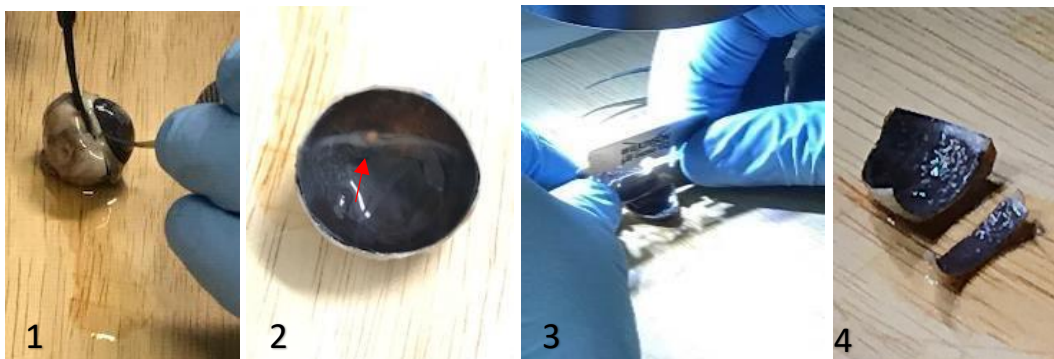
Die ED50-Werte wurden dann für jede Modalität in Bezug auf die Sichtbarkeitsschwelle bei der SL berechnet, d.h. der ED50-Wert, der auf der subjektiven Beurteilung eines Arztes basiert, der direkt nach der Laserbestrahlung mit einer Spaltlampe untersucht hat. Die ED50-Werte bei der Spaltlampenuntersuchung wurden auf 100% normiert. Einer der Gründe für diese Standardisierung ist die große Variation der Schwellenwerte zwischen den Augen. Als eine mögliche Ursache für die hohe Varianz der absoluten ED50-Werte wurde die interindividuelle Melanosomendichte des RPEs in Betracht gezogen. [102]

Die darauffolgende statistische Analyse der relativen ED50-Werte wurde mit GraphPad® Prism 7.04 (GraphPad Software, inc. San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Normalitätstest nach D'Agostino und Pearson nachgewiesen, während die Homogenität der Varianz mit dem Brown-Forsythe-Test geprüft wurde. Die ED50-Werte innerhalb der unterschiedlichen Kategorien wurden mittels Varianzanalyse und anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen, da die Normalität für alle Gruppen gegeben war.  $\alpha$  war 0,05 und  $p < 0,05$  wurde als signifikant bezeichnet.

### 3.8 Histologie

Für die histologische Auswertung wurden sechs Augen von drei Tieren verwendet, welche mit der eingangs erwähnten Pattern-Laserung behandelt wurden. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen wurden drei Pattern zu verschiedenen Zeitpunkten gelasert. Aus diesem Grund befinden sich auf den enukleierten Augen drei Pattern, die eine Stunde, eine Woche sowie zwei Wochen nach der initialen Laserbehandlung untersucht wurden.

Vor der Eukleation wurden die Tiere nach § 4a des Tierschutzgesetzes in eine tiefe Narkose versetzt und anschließend mit Pentobarbital (200mg/kg Körpergewicht) über einen intravenösen Zugang am Ohr euthanasiert. Die Eukleation erfolgte nach Sicherstellung des Todes innerhalb von zwei Minuten nach der Euthanasie. Die enukleierten Augen wurden von extraokularem Gewebe getrennt und sofort in einer Margo-Fixierlösung (1% Formaldehyd / 1,25% Glutaraldehyd) für 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Nach 24 Stunden wurde der vordere Augenabschnitt, einschließlich Hornhaut, Iris und Linse, sowie der Glaskörper durch einen Kreisschnitt an der Pars plana reseziert und somit vom hinteren Augenabschnitt getrennt. Im hinteren Augenabschnitt wurde unter dem Mikroskop der mit dem Laser behandelte Netzhautbereich sicher anhand der Markerspots identifiziert. Das überschüssige Gewebe um die gelaserten Pattern wurde mit einer Rasierklinge (Wilkinson) entfernt, sodass ein 5x5 mm großes Präparat für die HE-Färbung übrig blieb (Abbildung 16 1-4). Dieses Explantat wurde in einen beschrifteten Metallkorb gelegt und in Paraffin eingebettet. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden 5 µm-Längsschnitte durch die Laserspots in 30 µm-Schritten mit einem Mikrotom (Leica RM 2165, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Färbung erfolgte nach einem Routineprotokoll. Die Objektträger wurden mit einem Mikroskop (Eclipse Ti-E; Nikon, Tokyo, Japan) untersucht. Um die Spots innerhalb der Präparate zuordnen zu können, wurden die Markerläsionen, der Sehnerv und die Lagebeziehung zwischen den gelaserten Spots verwendet.



**Abbildung 16.** Präparation eines Kaninchenauges etwa 30 Minuten nach der Eukleation. (1) Eröffnung der limbusnahen Sklera. (2) Blick auf den posterioren Pol der Kaninchenretina; der rote Pfeil in (2) markiert die Papille am Kaninchenfundus. (3) Freischneiden des identifizierten Patterns mittels Rasierklinge. (4) Für die Histologie fertiges Präparat. Quelle: eigene Aufnahmen.

### 3.9 Substanzen und Geräte

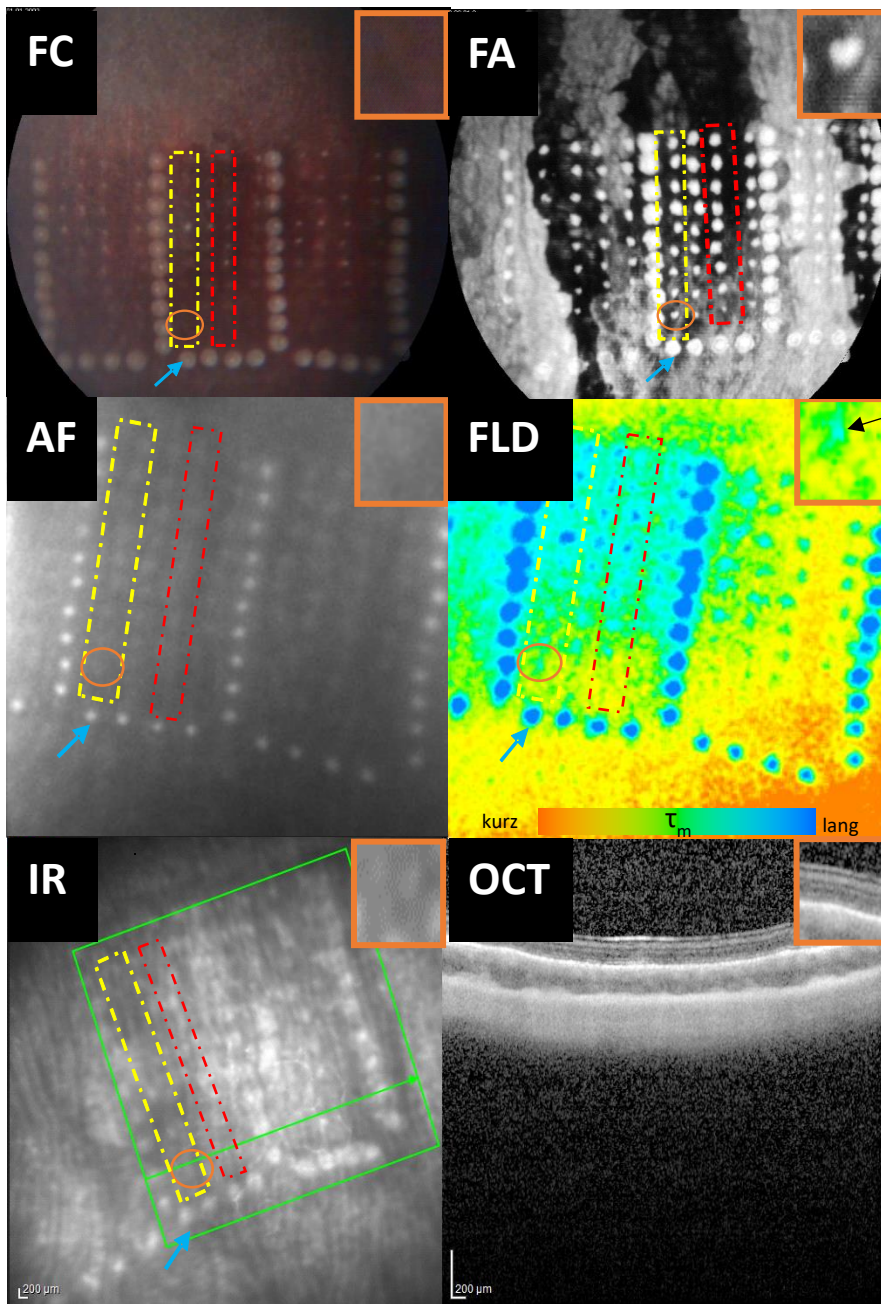
Die histologischen Verfahren sind in den Laboren des Instituts für Biomedizinische Optik (BMO) sowie der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck etabliert und wurden nach einem Routineprotokoll durchgeführt.

Formaldehyd	(Formaldehydlösung 37%, CP10.1, Carl Roth, Deutschland)
Glutaraldehyd Deutschland)	(Glutaraldehyd 25%, 1.04239.0250, Merck,
Xylol	(9713.3, Carl Roth, Deutschland)
Ethanol – 100, 90, 80, 70, 50%	(Ethanol Rotipuran®, 9065.2, Carl Roth, Deutschland)
A. dest.	(3478.3, Carl Roth, Deutschland)
Hämalaun	(Hämalaunlösung sauer n. Mayer, T865.2, Carl Roth, Deutschland)
Lauwarmes Leitungswasser	(Wasserleitungssystem, UKSH Lübeck, Deutschland)
Erythrosin	(Certistain® Erythrosin B, 1.15936.0025, Merck, Deutschland)
Entellan	(Entellan® Neu, 1.07961.0500, Merck, Deutschland)
Paraplast	(Paraplast® Plus, 39602004, Leica, Deutschland)
Mikrotom	(Leica RM 2165, Leica, Deutschland)
Mikrotom Klingen	(Microtom Blades A35 Type, Feather, Japan)
Objektträger	(Menzel-Gläser Superfrost® Plus, Gerhard Menzel, Deutschland)
Mikroskop	(Eclipse Ti-E, Nikon, Japan)
Rasierklingen	(Wilkinson Sword Classic, Vereinigtes Königreich)

#### Bildverarbeitungsprogramme

NIS-Elements	(Nikon, Japan)
Fiji	( <a href="https://imagej.nih.gov/ij/download.html">https://imagej.nih.gov/ij/download.html</a> , USA)





**Abbildung 18.** Multimodale Bildgebung der gelaserten Pattern eines rechten Kaninchenauges aufgenommen innerhalb von 30 Minuten nach der Laserbestrahlung. Die blauen Pfeile weisen auf die U-förmig applizierte Markerläsionen (800  $\mu\text{J}$ , 50  $\mu\text{s}$ ) hin. Die gestrichelte gelbe Linie repräsentiert eine Pulsdauer von 5,2  $\mu\text{s}$ , die gestrichelte rote Linie eine Pulsdauer von 20  $\mu\text{s}$  mit absteigender Energie [ $\mu\text{J}$ ] von superior („offener Bereich“) nach inferior („Laserriegel“). Im IR-Bild erscheinen die Markerläsionen als hyperreflektiver Bereich (blauer Pfeil) und zeigen in der OCT-Untersuchung eine lokalisierte Ausdünnung der äußeren retinalen Schichten. Im Pseudofarbbild der FLIO (FLD) werden Markerläsionen blau abgebildet (blauer Pfeil). Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Detektion selektiver Laserspots im niedrigen Energiebereich (11-50  $\mu\text{J}$ ) der Untersuchungsmodalitäten. Am besten konnten diese durch die Fluoreszenzangiographie (FA) dargestellt werden. Exemplarisch hierfür ein Laserspot mit 5,2  $\mu\text{s}$  und einer Pulsenergie von 18,58  $\mu\text{J}$  (orangener Kreis), welcher nur in der Fluoreszenzangiographie sowie der FLIO von den anderen differenziert und als Spot erkannt werden konnte. Oben rechts in der Ecke die Vergrößerung des

jeweiligen orange markierten Spots. Quelle: Eigene Aufnahmen. FC = Funduskamera, FA = Fluoreszenzangiographie, IR = Infrarotreflektionsbild, OCT = optische Kohärenztomographie, AF = Autofluoreszenz, FLIO = Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy, FLD = Fluoreszenzlebensdauer. Quelle: eigene Aufnahmen sowie entnommen und modifiziert nach [103]

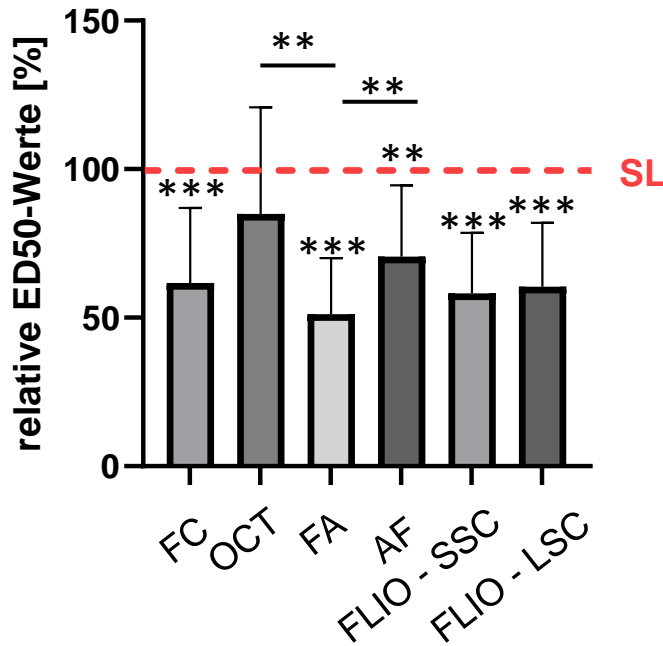
#### **4.1.1 Vergleich der Sichtbarkeitsschwellen (ED50) zwischen den Modalitäten**

Um die Sichtbarkeit des Laserspots bei jeder Bildgebungsmodalität zu vergleichen, wurde die ED50 der Pulsenergie für jede Modalität verglichen. Wie in der Methodik erwähnt, wurde der ED50-Wert für SL für jedes Auge auf 100 % gesetzt, um den Einfluss der absoluten Wertschwankungen zwischen den Augen zu minimieren und die Vergleichsergebnisse zwischen den Modalitäten aussagekräftiger zu machen. Im Folgenden sind die Ergebnisse für jede Laserpulsdauer aufgeführt. Zusätzlich zu den relativen Werten sind in der Tabelle zu jeder Abbildung auch die absoluten Basiswerte als Hinweis angegeben.



#### 4.1.1.1 ED50 bei der Laserpulsdauer von 5,2 $\mu$ s

Bei der kürzesten Laserpulsdauer von 5,2  $\mu$ s, zeigten alle Untersuchungsmodalitäten außer der OCT signifikant niedrigere ED50-Werte als SL. Dies bedeutet, dass jene Bildgebungen die Laserspots empfindlicher als SL detektierten. In der Spoterkennung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen FA und OCT ( $p = 0.003$ ) sowie zwischen FA und AF ( $p = 0.001$ ). Der niedrigste absolute Mittelwert unter den ED50-Werten aller Untersuchungsmethoden ist bei FA ( $63.64 \pm 47.70$ ) gewesen, direkt gefolgt von der FLIO (SSC:  $80.84 \pm 72.46$  sowie LSC:  $82.96 \pm 71.87$ ) (Abbildung 19, Tab. 4).



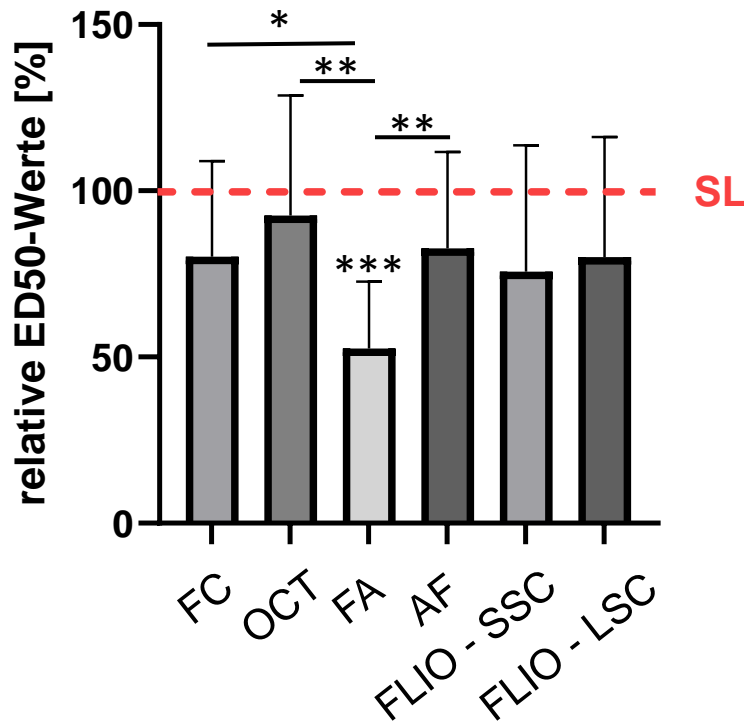
**Abbildung 19. Vergleich relativer ED50-Werte bei 5,2  $\mu$ s:** Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden an beiden Augen (OS + OD vereint) anhand der ermittelten ED-50-Schwellenwerte 30 Minuten nach der Laserbestrahlung. Die Spaltlampe (SL) wurde als Baseline (100%) rot gestrichelt dargestellt. Entnommen und modifiziert nach [103]

	ED50 Werte [MW $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ ]	relativ [%]						
SL	156,41 $\pm$ 154,75	100 $\pm$ 0	<b>&lt;0,001</b>	0,518	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
FC	81,36 $\pm$ 67,70	64,80 $\pm$ 21,47	/	0,259	0,121	0,753	0,989	0,999
OCT	122,43 $\pm$ 119,28	84,90 $\pm$ 35,90	/	/	<b>0,003</b>	0,550	0,033	0,057
FA	63,64 $\pm$ 47,70	51,13 $\pm$ 18,96	/	/	/	<b>0,001</b>	0,639	0,208
AF	85,56 $\pm$ 78,96	70,61 $\pm$ 23,97	/	/	/	/	0,279	0,334
FLIO (SSC)	80,84 $\pm$ 72,46	58,17 $\pm$ 20,34	/	/	/	/	/	0,983
FLIO (LSC)	82,96 $\pm$ 71,87	60,41 $\pm$ 21,49	/	/	/	/	/	/

**Tabelle 4.** p-Werte sowie absoluter und relativer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten beider Augen bei einer Pulsdauer von 5,2  $\mu$ s innerhalb von 30 Minuten nach Bestrahlung. Die signifikanten Unterschiede wurden zur Veranschaulichung fett gedruckt. Entnommen und modifiziert nach [103]

#### 4.1.1.2 ED50 bei der Laserpulsdauer von 12 $\mu$ s

Bei der Laserpulsdauer von 12  $\mu$ s konnte nur die FA eine signifikant höhere Empfindlichkeit im Vergleich zur SL aufweisen (Abbildung 20). Die ED50-Werte von FC ( $p = 0.013$ ), OCT ( $p = 0.001$ ) und AF ( $p = 0.001$ ) waren signifikant höher als jene der FA. Die ED50-Werte von FLIO unterschieden sich weder im SSC noch im LSC signifikant von den anderen Modalitäten. (Tab. 5).



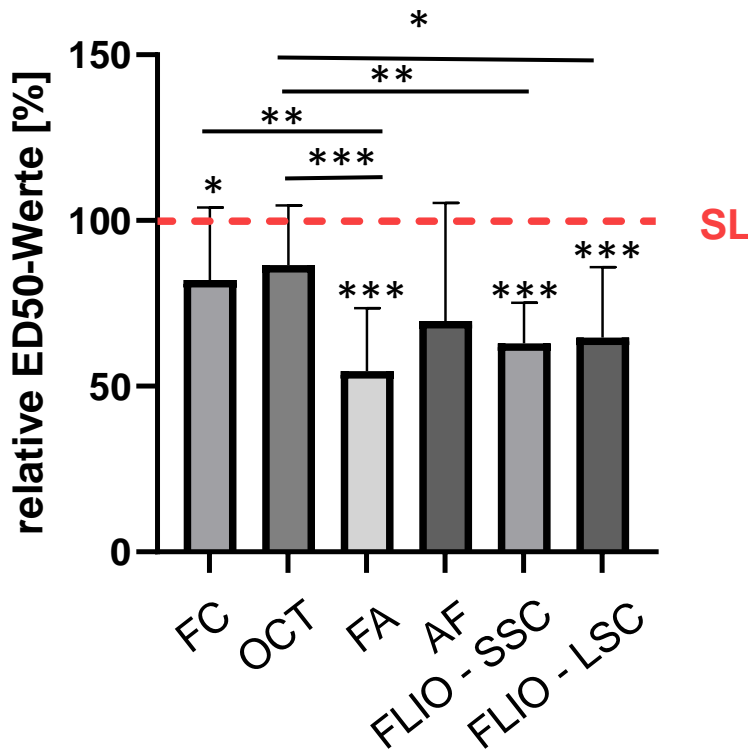
**Abbildung 20. Vergleich relativer ED50-Werte bei 12  $\mu$ s:** Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden anhand der ermittelten ED-50-Schwellenwerte 30 Minuten nach Laserbestrahlung. Die Spaltlampe (SL) wurde als Baseline (100%) rot gestrichelt dargestellt. Entnommen und modifiziert nach [103]

	ED50 Werte [MW $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ ]	relativ [%]						
SL	98,41 $\pm$ 25,20	100 $\pm$ 0	0,106	0,972	<b>&lt;0,0001</b>	0,243	0,167	0,297
FC	78,53 $\pm$ 34,05	80,20 $\pm$ 28,74	/	0,323	<b>0,013</b>	>0,999	0,999	>0,999
OCT	90,20 $\pm$ 37,37	92,58 $\pm$ 36,06	/	/	<b>0,001</b>	0,942	0,613	0,877
FA	50,91 $\pm$ 22,06	52,53 $\pm$ 20,15	/	/	/	<b>0,001</b>	0,246	0,121
AF	82,40 $\pm$ 40,00	82,70 $\pm$ 29,02	/	/	/	/	0,82	0,999
FLIO (SSC)	77,58 $\pm$ 47,52	75,68 $\pm$ 37,96	/	/	/	/	/	0,958
FLIO (LSC)	82,42 $\pm$ 41,91	80,02 $\pm$ 36,17	/	/	/	/	/	/

**Tabelle 5.** p-Werte sowie absoluter und relativer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten bei einer Pulsdauer von 12  $\mu$ s. Die signifikanten Unterschiede wurden zur Veranschaulichung fett gedruckt. Entnommen und modifiziert nach [103]

#### 4.1.1.3 ED50 bei der Laserpulsdauer von 20 $\mu$ s

Bei einer Laserpulsdauer von 20  $\mu$ s (Abbildung 21) waren die ED50-Werte für FC ( $p = 0.030$ ), FA ( $p < 0.0001$ ) und FLIO (SSC sowie LSC:  $p < 0.0001$ ) deutlich niedriger als für SL. Im Vergleich zu den anderen Modalitäten war die ED50 für OCT ( $p < 0.001$ ) signifikant höher als die für FA und FLIO (beide Kanäle) (Abbildung 20). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen FA und FLIO (SSC:  $p = 0.607$ , LSC: 0.533) (Tab. 6).



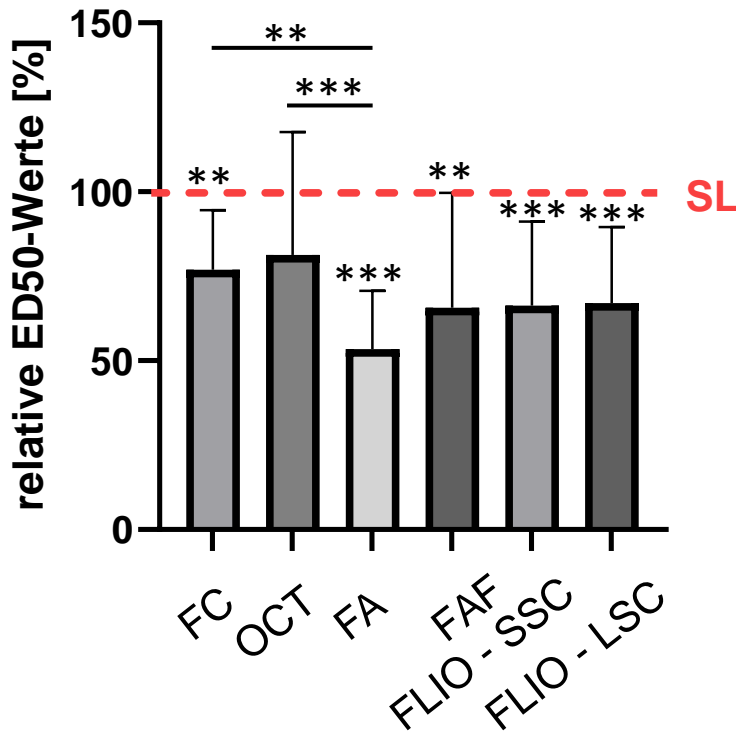
**Abbildung 21. Vergleich relativer ED50-Werte bei 20  $\mu$ s:** Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden anhand der ermittelten ED-50-Schwellenwerte 30 Minuten nach der Laserbestrahlung. Die Spaltlampe (SL) wurde als Baseline (100%) rot gestrichelt dargestellt. Entnommen und modifiziert nach [103]

	ED50 Werte [Werte $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ ]	relativ [%]						
SL	129,87 $\pm$ 58,09	100 $\pm$ 0	<b>0,03</b>	0,072	<b>&lt;0,0001</b>	0,203	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
FC	106,50 $\pm$ 59,63	82,04 $\pm$ 21,94		0,909	<b>0,003</b>	0,993	0,059	0,227
OCT	116,82 $\pm$ 59,95	86,60 $\pm$ 17,99			<b>&lt;0,001</b>	0,865	<b>0,003</b>	<b>0,0472</b>
FA	66,04 $\pm$ 29,68	54,54 $\pm$ 18,96				0,481	0,607	0,533
AF	86,48 $\pm$ 39,04	79,83 $\pm$ 37,49					0,845	0,89
FLIO (SSC)	85,74 $\pm$ 43,66	62,99 $\pm$ 12,19						0,999
FLIO (LSC)	83,01 $\pm$ 39,53	64,71 $\pm$ 21,27						

**Tabelle 6.** p-Werte sowie absoluter und relativer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten bei einer Pulsdauer von 20  $\mu$ s. Die signifikanten Unterschiede wurden zur Veranschaulichung fett gedruckt. Entnommen und modifiziert nach [103]

#### 4.1.1.4 ED50 bei der Laserpulsdauer von 50 $\mu\text{s}$

Bei der in diesem Experiment längsten verwendeten Laserpulsdauer von 50  $\mu\text{s}$  (Abbildung 22) zeigten wiederum alle Untersuchungsmodalitäten bis auf die OCT eine signifikant bessere Detektionsempfindlichkeit der Laserspots als SL. Die FA und die FLIO (SSC sowie LSC) wiesen hierbei mit einem p-Wert < 0.0001 das höchste Signifikanzniveau (Tabelle 7) auf. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen FA und FC (p = 0.001) sowie zwischen FA und OCT (p = 0.048).



**Abbildung 22. Vergleich relativer ED50-Werte bei 50  $\mu\text{s}$ :** Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden anhand der ermittelten ED-50-Schwellenwerte 30 Minuten nach der Laserbestrahlung. Die Spaltlampe (SL) wurde als Baseline (100%) rot gestrichelt dargestellt. Entnommen und modifiziert nach [103]

	ED50 Werte [MW $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu\text{J}$ ]	relativ [%]						
SL	204,08 $\pm$ 125,22	100 $\pm$ 0	<b>0,001</b>	0,298	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
FC	129,86 $\pm$ 54,41	76,96 $\pm$ 17,60	/	0,999	<b>0,001</b>	0,759	0,246	0,44
OCT	157,45 $\pm$ 107,89	81,33 $\pm$ 36,31	/	/	<b>0,048</b>	0,756	0,611	0,681
FA	98,72 $\pm$ 35,50	53,46 $\pm$ 17,23	/	/	/	0,396	0,217	0,052
AF	120,63 $\pm$ 68,95	72,92 $\pm$ 27,14	/	/	/	/	>0,9999	>0,9999
FLIO (SSC)	120,69 $\pm$ 68,95	66,30 $\pm$ 24,92	/	/	/	/	/	>0,9999
FLIO (LSC)	126,53 $\pm$ 73,88	67,00 $\pm$ 22,50	/	/	/	/	/	/

**Tabelle 7.** p-Werte sowie absoluter und relativer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten bei einer Pulsdauer von 50  $\mu\text{s}$ . Die signifikanten Unterschiede wurden zur Veranschaulichung fett gedruckt. Entnommen und modifiziert nach [103]

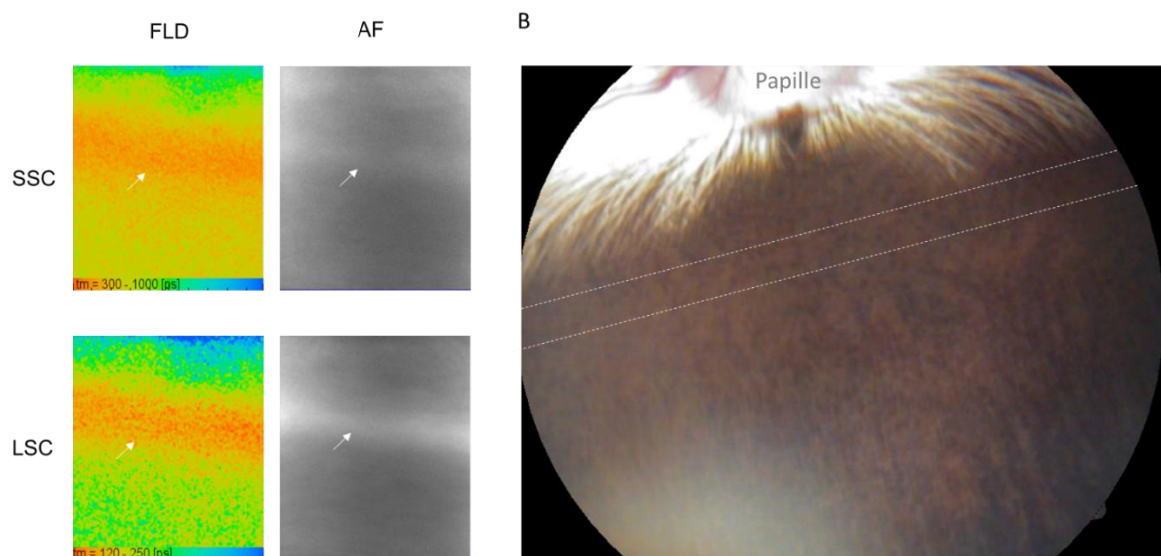
#### **4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Teil I**

Von den untersuchten Bildgebungsmodalitäten zeigte die FA den niedrigsten, die SL den höchsten ED50-Wert. Dies bedeutet, dass die FA die höchste, die SL die niedrigste Empfindlichkeit bei der Detektion RPE-selektiver Laserspots aufwies. FLIO erkannte die Spots bei den meisten Laserpulsdauern ebenfalls signifikant empfindlicher als die SL und war im Vergleich zur FA nicht signifikant schlechter. Die AF war oft empfindlicher als die SL. Jedoch war der Unterschied im Gegensatz zur FLIO etwas weniger signifikant.

## 4.2 Teil II: Detaillierte Evaluation der Fluoreszenzlebensdauer der Kaninchennetzhaut nach der Laserbestrahlung mittels FLIO

### 4.2.1 Der *Sehstreifen* des Kaninchens

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde zufällig bei den Untersuchungen mit FLIO und AF am posterioren Pol des Kaninchenfundus unterhalb des Sehnervenkopfes ein bandförmiger Bereich entdeckt. Dieser imponierte mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität (Hyperfluoreszenz) sowie einer verkürzten FLD sowohl in AF als auch in der FLIO (Abbildung 23). Funduskopisch ist diese Struktur nicht sichtbar gewesen. Somit wurde vermutet, dass dieser Bereich dem bei Kaninchen anatomisch veranlagten visuellen Streifen entsprechen muss, der nachweislich längere äußere Photorezeptorsegmente aufweist.[104] Bisher gab es in der Literatur keine Berichte über die AF oder FLD für diesen Bereich.

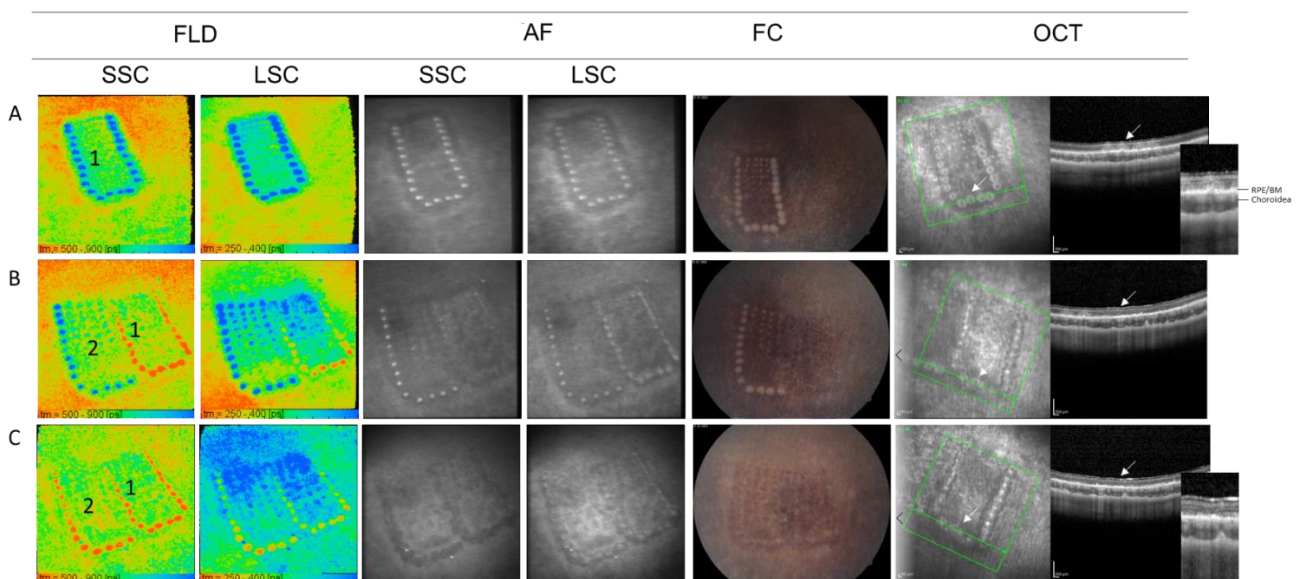


**Abbildung 23.** *Sehstreifen* des Kaninchenauges: (A) In der FLIO gibt es einen hyperfluoreszierenden, schmalbandigen Bereich (Pfeil) mit kurzer FLD inferior des Sehnervs. (B) Fundusbild des posterioren Pols: Der *Sehstreifen* ist funduskopisch nicht zu erkennen. Der Bereich zwischen den beiden gestrichelten Linien ist der aus früheren Berichten geschätzte Ort des *Sehstreifens*, der nahezu mit dem in FLD und AF beobachteten gebänderten Bereich übereinstimmt. FLD: Fluoreszenzlebensdauer. AF: Fundus-Autofluoreszenz. Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.2 Einfluss starker Laserenergie auf die Fluoreszenzlebensdauer am Beispiel der Markerspots

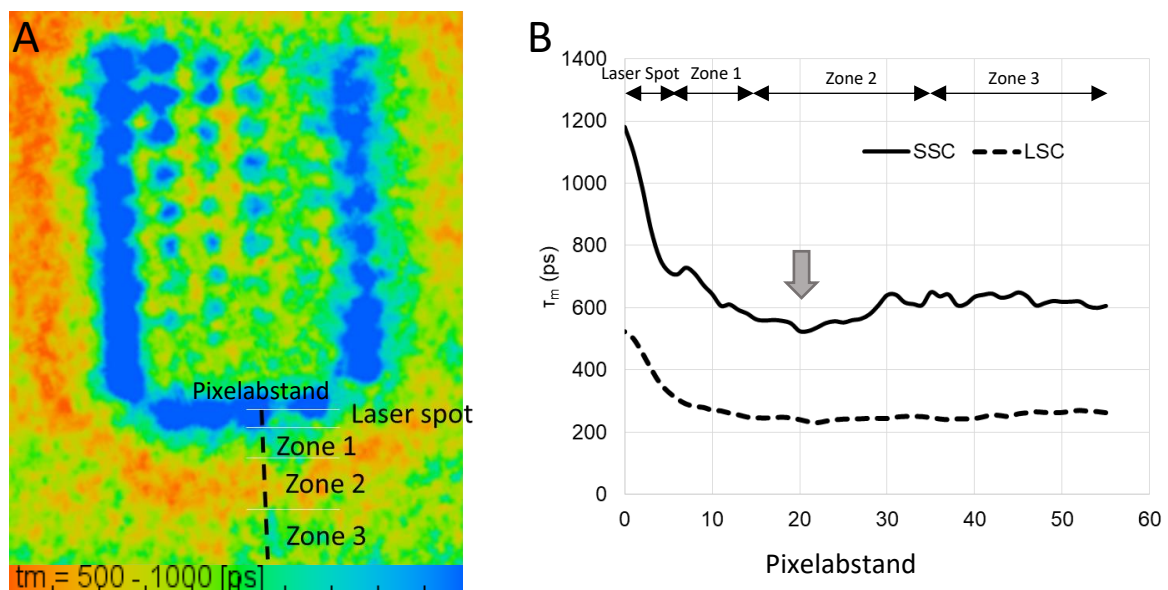
Die Markerspots waren direkt nach der Bestrahlung in AF, FC und OCT deutlich sichtbar und zeigten eine deutlich längere FLD als ihre Umgebung in der FLIO (Abbildung 24). In der OCT wurde eine Veränderung der Gewebereflektivität in nahezu allen Schichten der Netzhaut beobachtet (Abbildung 24A - OCT). Nach etwa einer Woche waren die Spots in AF und FC weniger sichtbar. In der OCT war die Reflektivität der inneren Netzhautschichten wieder physiologisch. Es zeigte sich jedoch eine lokale Ausdünnung der äußeren Netzhautschichten mit einer Hypertransmission der Aderhaut einhergehend (Abbildung 24B- OCT). Die FLD erwies sich zu diesem Zeitpunkt als deutlich verkürzt (Abbildung 24B-FLIO, Pattern 1).

Die Fluoreszenzintensität in der AF sowie die Sichtbarkeit der Spots in der FC nahmen nach 20 Tagen weiter ab. Dem hingegen blieben die strukturellen Veränderungen in der OCT und die kurze FLD in der FLIO bestehen (Abbildung 24C). Die neun Tage später durchgeführte Laserbestrahlung (Abbildung 24B/C, Pattern 2) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie das erste applizierte Pattern. Die FLD der mit niedrigeren Energiepulsen bestrahlten Laserspots innerhalb des Patterns blieb nach 20 Tagen verlängert. Im Bereich dieser wurde keine Ausdünnung der äußeren Netzhautschicht in der OCT beobachtet.



**Abbildung 24.** Multimodale Bildgebung gelasierter Pattern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Laserbestrahlung. Es wurden zwei Pattern nebeneinander an Tag 0 (Pattern 1) und Tag 9 (Pattern 2) appliziert. (A) 30 Minuten nach Laserbestrahlung von Pattern 1, (B) 9 Tage nach der Laserbestrahlung von Pattern 1, 30 Minuten nach Laserbestrahlung von Pattern 2, (C) 20 Tage nach Laserbestrahlung von Pattern 1, 11 Tage nach Laserbestrahlung von Pattern 2. Die Pfeile zeigen die entsprechenden Punkte im Infrarotbild und der OCT. Die Pfeilspitze markiert eine lokale Ausdünnung der äußeren Netzhautschicht nach der Laserkoagulation. FLD: Fluoreszenzlebensdauer, SSC: kurzer Spektralkanal, LSC: langer Spektralkanal, AF: Fundusautofluoreszenz, FC: Fundusfotographie, OCT: optische Kohärenztomografie, IR: Infrarot-Reflexionsbild, RPE: retinales Pigmentepithel, EZ: ellipsoide Zone. Entnommen und modifiziert nach [101]

In der Auswertung der Laserspots konnte eine weitere charakteristische Änderung der FLD entdeckt werden. Diese Veränderung zeigte sich in einem nicht direkt an die Markerspots angrenzenden Areal. Dieses Areal stellte sich als eine Verkürzung der FLD dar (Abbildung 25A, orangefarbener Bereich außerhalb des Patterns). Aufgrund dieser FLD-Veränderung wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. Um die unterschiedlichen FLD-Profile des Markerspots sowie der betroffenen Peripherie statistisch repräsentativ auswerten zu können, wurden vom Markerspot in einem bestimmten Pixelabstand ausgehend drei Zonen definiert: Zone 1 15 Pixel (direkt an den Markerspot angrenzend), Zone 2 35 Pixel (distal Zone 1), Zone 3 55 Pixel (distal Zone 2) (Abbildung 25A und B). Die Messung des Pixelabstands durch FLIO auf dem Kaninchenfundus betrug in etwa 30  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ . Bezogen auf die durchschnittliche FLD  $\tau_m$  [ps] wurde anhand des Markerspots sowie der drei ihm folgenden Zonen mit den definierten Pixelabständen ein graphisches Profil (Abbildung 25B) dargestellt. Hierbei ist deutlich eine in Zone 2 (Pixelabstand 35 Pixel) singuläre Verkürzung der FLD zu erkennen (Abbildung 25B, Pfeil). Diese FLD-Verkürzung deckte sich mit der orangefarbenen Darstellung des errechneten Pseudofarbbildes (Abbildung 25A).



**Abbildung 25.** FLD an und um die Markerspots: (A) Pseudofarbbild von  $\tau_m$  im SSC bei einem gelaserten Pattern etwa 30 Minuten nach der Laserbestrahlung. (B) Die FLD-Profile beider Kanäle an den in (A) markierten Zonen wurden mittels FIJI-Software analysiert. Es ist zu erkennen, dass ein Bereich innerhalb der Zone 2 eine kürzere FLD als die Umgebung aufweist (Pfeil). Entnommen und modifiziert nach [101]

In einem weiteren Schritt wurde  $\tau_m$  [ps] für die einzelnen Zonen zu den Zeitpunkten 0 (30 Minuten), Tag 9-11 sowie Tag 20 nach der Laserbehandlung in Form von Tukey-Boxplots für jeden der Kanäle SSC und LSC berechnet (Abbildungen 24-26). Die hierzu gehörigen Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 8 angegeben. Die Ergebnisse der multifaktoriellen Varianzanalyse von  $\tau_m$  (p-Wert) aller Zeitpunkten und Zonen der beiden Kanäle sind in Tabelle 9 dargestellt.



SSC MW ± SAW [ps]					LSC MW ± SAW [ps]				
	Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3		Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Tag 0 (30 Min)	897,8 ± 101,0	681,2 ± 49,4	609,1 ± 58,0	633,1 ± 67,2	Tag 0 (30 Min)	476,1 ± 58,4	320,2 ± 35,3	280,4 ± 34,8	284,6 ± 35,2
Tag 9 – 11	520,7 ± 43,7	644,1 ± 48,8	642,4 ± 51,9	629,9 ± 51,8	Tag 9 – 11	310,1 ± 34,0	337,3 ± 42,6	330,2 ± 49,2	325,2 ± 49,0
Tag 20	534,7 ± 31,3	636,8 ± 46,6	631,4 ± 58,5	635,5 ± 77,1	Tag 20	309,8 ± 16,7	329,1 ± 40,9	318,7 ± 64,8	311,9 ± 70,0

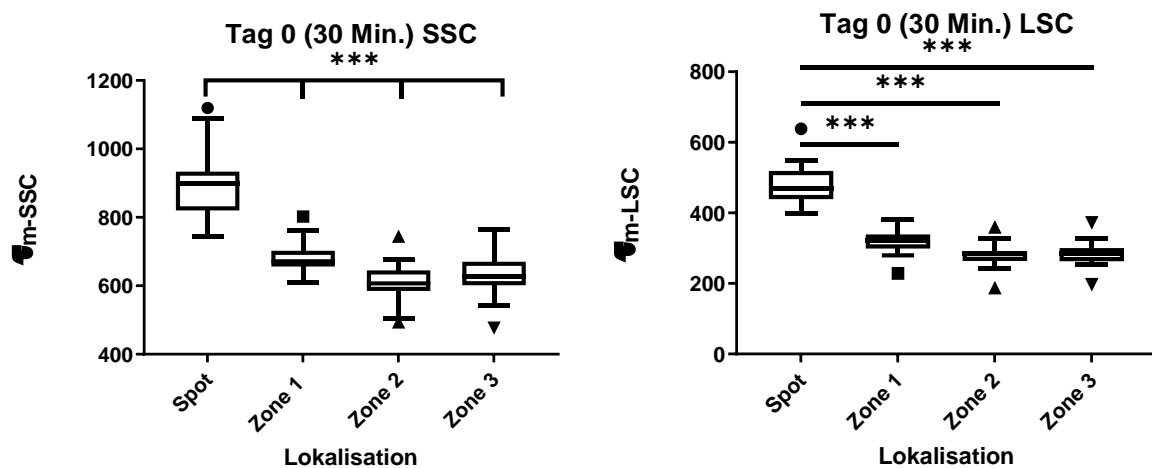
**Tabelle 8.** Mittelwert ± Standardabweichung der FLD [ps] in den verschiedenen Zonen zu verschiedenen Zeitpunkten nach SSC und LSC eingeteilt. Entnommen und modifiziert nach [101]

SSC		Tag 0 (30 Min)				Tag 9-11				Tag 20			
		Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Tag 0 (30 min)	Spot	/	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	/	<b>0,014</b>	0,173	<b>&lt;0,001</b>	0,958	0,944	0,721	<b>0,021</b>	0,994	0,985	0,992
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,014</b>	/	0,729	<b>0,046</b>	0,973	0,9811	0,999	0,789	>0,999	>0,999	>0,999
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	0,173	0,7292	/	<b>0,002</b>	>0,999	>0,999	>0,999	0,387	>0,999	>0,999	>0,999
Tag 9-11	Spot	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,046</b>	<b>0,002</b>	/	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	>0,999	0,247	0,316	0,264
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	0,958	0,973	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	/	0,999	0,927	>0,999	>0,999	0,334	>0,999
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	0,944	0,981	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	0,999	/	0,948	0,356	>0,999	>0,999	>0,999
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	0,721	0,999	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	0,927	0,948	/	0,553	>0,999	>0,999	>0,999
Tag 20	Spot	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,021</b>	0,789	0,387	>0,999	>0,999	0,356	0,553	/	0,193	0,226	0,201
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	0,994	>0,999	>0,999	0,247	>0,999	>0,999	>0,999	0,193	/	0,999	>0,999
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	0,985	>0,999	>0,999	0,316	0,334	>0,999	>0,999	0,226	0,999	/	0,999
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	0,992	>0,999	>0,999	0,264	>0,999	>0,999	>0,999	0,201	>0,999	0,999	/
LSC		Tag 0 (30 Min)				Tag 9-11				Tag 20			
		Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Spot	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Tag 0 (30 min)	Spot	/	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	/	<b>0,024</b>	0,053	>0,999	0,998	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,024</b>	/	0,99	0,871	0,068	0,183	0,324	0,995	0,995	0,958	0,991
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	0,053	0,99	/	0,951	0,125	0,298	0,478	0,999	0,999	0,982	0,997
Tag 9- 11	Spot	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,871	0,951	/	0,077	0,254	0,475	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	0,998	0,068	0,125	0,077	/	0,34	0,255	>0,999	>0,999	>0,999	0,999
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,183	0,298	0,254	0,34	/	0,66	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,324	0,478	0,475	0,255	0,66	/	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
Tag 20	Spot	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,995	0,999	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	/	0,968	0,997	>0,999
	Zone 1	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,814	0,887	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	0,968	/	0,995	0,977
	Zone 2	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,958	0,982	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	0,997	0,995	/	0,998
	Zone 3	<b>&lt; 0,001</b>	>0,999	0,991	0,997	>0,999	0,999	>0,999	>0,999	>0,999	0,997	0,998	/

**Tabelle 9.** p-Werte der multifaktoriellen Varianzanalyse der FLD in den Zonen 1 bis 3 in unterschiedlichen Zeitabständen zur Laserung der Kanäle SSC und LSC. Die p-Werte unter 0,05 sind zur Veranschaulichung fett gedruckt. Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.2.1 Tag 0 (30 Min.) nach der Laserbestrahlung

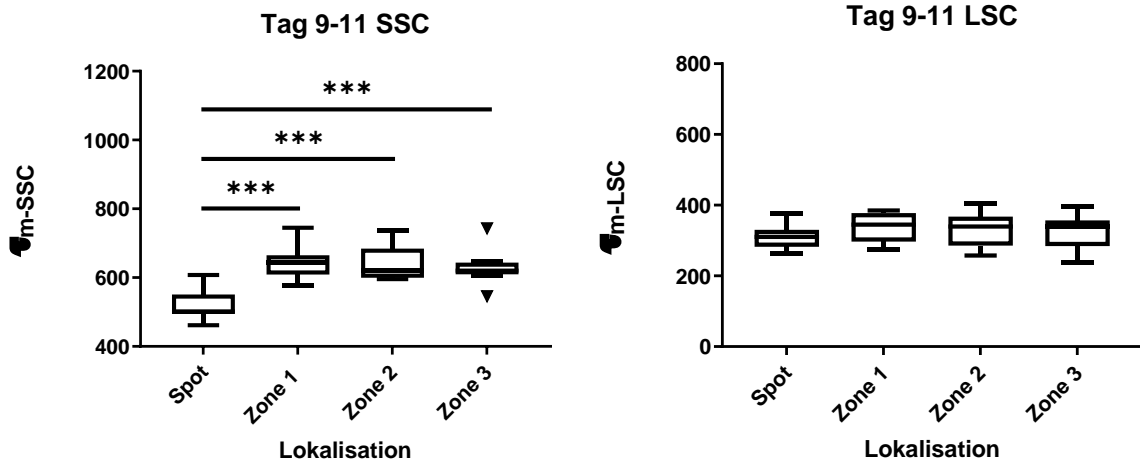
Durch die zonenspezifische Analyse wurde die im Pseudofarbbild beobachtete FLD-Veränderung bestätigt. Der Unterschied zwischen den einzelnen Zonen ist innerhalb der ersten 30 Minuten nach Laserbestrahlung im SSC-Kanal am größten gewesen (Abbildung 26 – SSC-Kanal). Es konnte gezeigt werden, dass die FLD der Zone 1 (15 Pixel) – der Bereich, der direkt an den Markerspot angrenzt – signifikant länger ( $p < 0.001$ ) gewesen ist als die der Zonen 2 (35 Pixel) und 3 (55 Pixel), welche weiter peripher der Laserung lagen. Eine signifikant kürzere FLD als in den umliegenden Zonen konnte nur in der Zone 2 (35 Pixel) entdeckt werden. Im LSC spiegelte sich eine ähnliche Tendenz wider. Im Unterschied zum SSC konnte jedoch ein signifikanter Unterschied ( $p < 0.001$ ) nur zwischen der FLD am Markerspot und den einzelnen Zonen nachgewiesen werden (Abbildung 26– LSC-Kanal).



**Abbildung 26.** Tukey-Box-Plots für  $\tau_m$  der vier verschiedenen Zonen (Markerspot, Zone 1, Zone 2, Zone 3) etwa 30 Minuten nach der Bestrahlung im SSC- und LSC-Kanal der FLIO. Anzahl der analysierten Muster:  $n = 19$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.2.2 Tag 9-11 nach der Laserbestrahlung

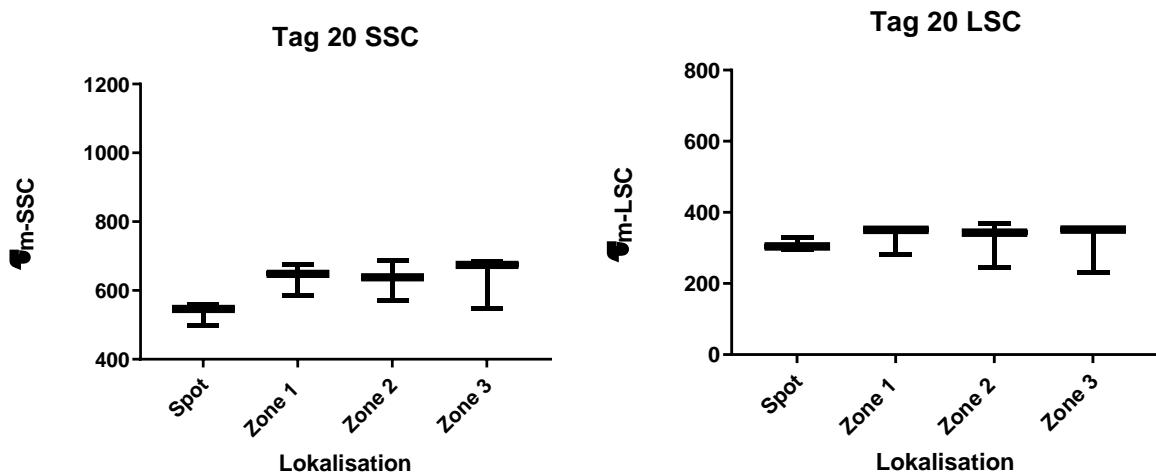
Neun bis elf Tage nach der Laserbehandlung verkürzte sich die FLD an den Markerspots signifikant ( $p < 0.001$ ) von  $897,9 \pm 101,0$  ps auf  $520,7 \pm 43,7$  ps sowohl im SSC (Abbildung 27 – SSC-Kanal) als auch von  $476,1 \pm 58,4$  ps auf  $310,1 \pm 34,0$  ps (Abbildung 27 – LSC-Kanal). Die FLD der Markerspots im SSC zeigte sich passend zum FLD-Pseudofarbbild (Abbildung 25) signifikant kürzer verglichen mit den drei definierten Zonen ( $p < 0,001$ ). Im LSC konnte nach neun bis elf Tagen kein signifikanter Unterschied der FLD innerhalb der Zonen gezeigt werden (Abbildung 27 – LSC-Kanal).



**Abbildung 27.** Tukey-Box-Plots für  $\tau_m$  den vier verschiedenen Zonen (Laserspot, Zone 1, Zone 2, Zone 3) etwa 9-11 Tage nach der Bestrahlung im SSC- und LSC-Kanal. (Anzahl der analysierten Muster:  $n = 9$ ), \*\*\* =  $p < 0.001$ . Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.2.3 Tag 20 nach der Laserbestrahlung

20 Tage nach der Laserapplikation konnte weder im SSC noch im LSC ein statistisch signifikanter Unterschied der FLD innerhalb der definierten Zonen nachgewiesen werden (Abbildung 28 – SSC-/LSC-Kanal).

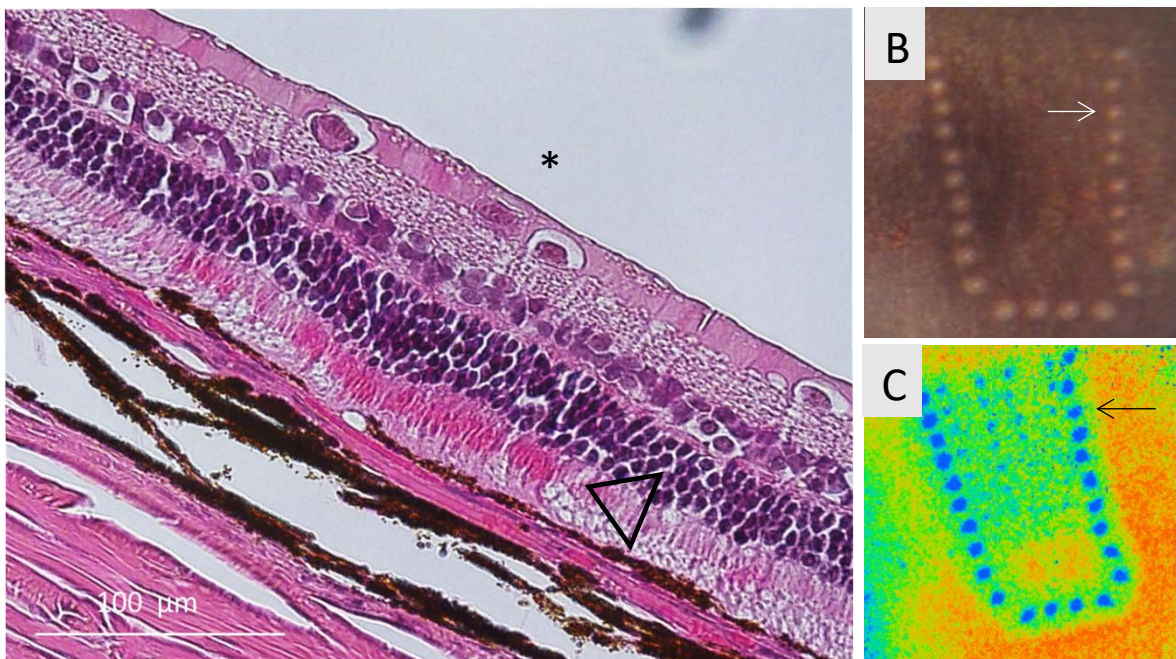


**Abbildung 28.** Tukey-Box-Plots für  $\tau_m$  den vier verschiedenen Zonen (Laserspot, Zone 1, Zone 2, Zone 3) etwa 20 Tage nach der Bestrahlung im SSC- und LSC-Kanal. (Anzahl der analysierten Muster:  $n = 4$ ). Entnommen und modifiziert nach [101]

## 4.2.3 Histologische Beobachtungen im Bereich Laserspots mit hoher Energie

### 4.2.3.1 30 Minuten nach der Laserbestrahlung

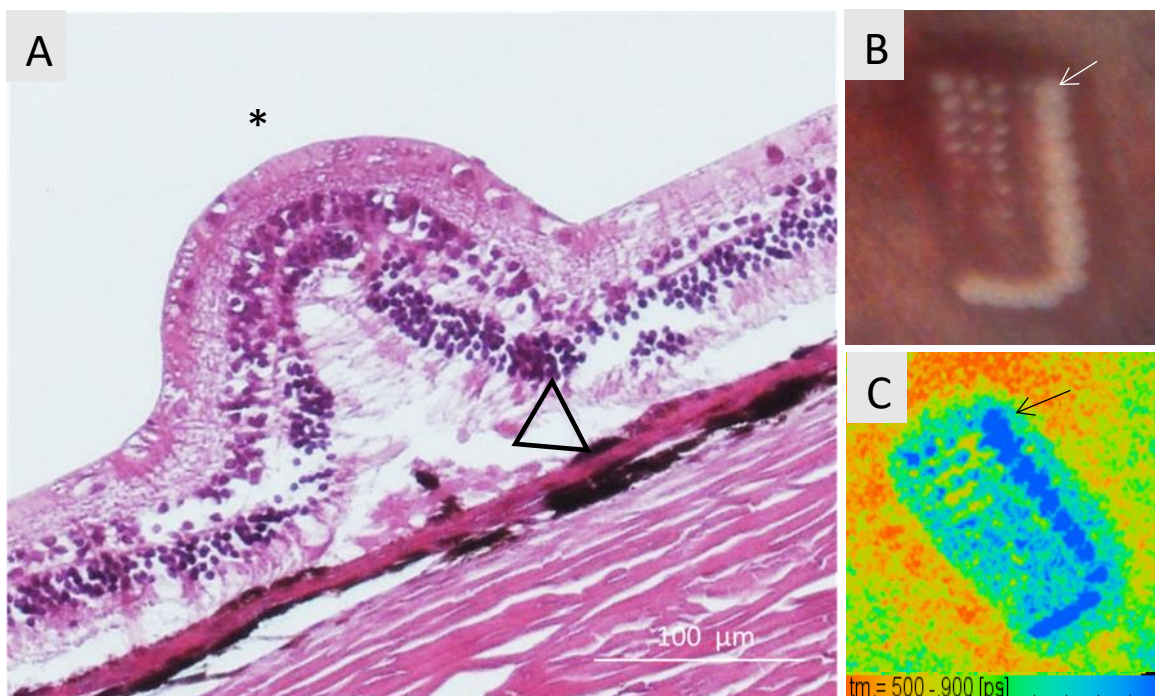
Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden vier aller durch Laser behandelten Augen zweier Kaninchen enukleiert. Im Anschluss wurden die enukleierten Augen histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt und schlussendlich mikroskopisch untersucht. Hierbei zeigten die frisch applizierten (Tag 0, 30 Minuten) Markerspots mit einer Pulsdauer von 50  $\mu$ s sowie 800  $\mu$ J morphologische Veränderungen im äußeren sowie inneren Photorezeptorsegment. Die inneren Photorezeptorsegmente wiesen eine verstärkte Eosinfärbung sowie eine gering veränderte äußere Körnerschicht auf. Deutlich erkennbar ist das Melanin in der RPE-Schicht gewesen. Starke photokoagulationsbedingte Veränderungen der Kaninchenretina blieben jedoch aus. In der unmittelbar nach Laserbestrahlung (Tag 0, 30 Minuten) durchgeführten Fundusfotographie stellten sich die Markerspots als intensive, weiße, kreisrunde Spots dar (Abbildungen 29B und 30B). Das hierzu korrespondierenden Pseudofarbbild der FLIO im SSC-Kanal berechnete für diese Markerspots eine Blaufärbung (Abbildungen 29C und 30C). Diese Blaufärbung entspricht einer Verlängerung der FLD.



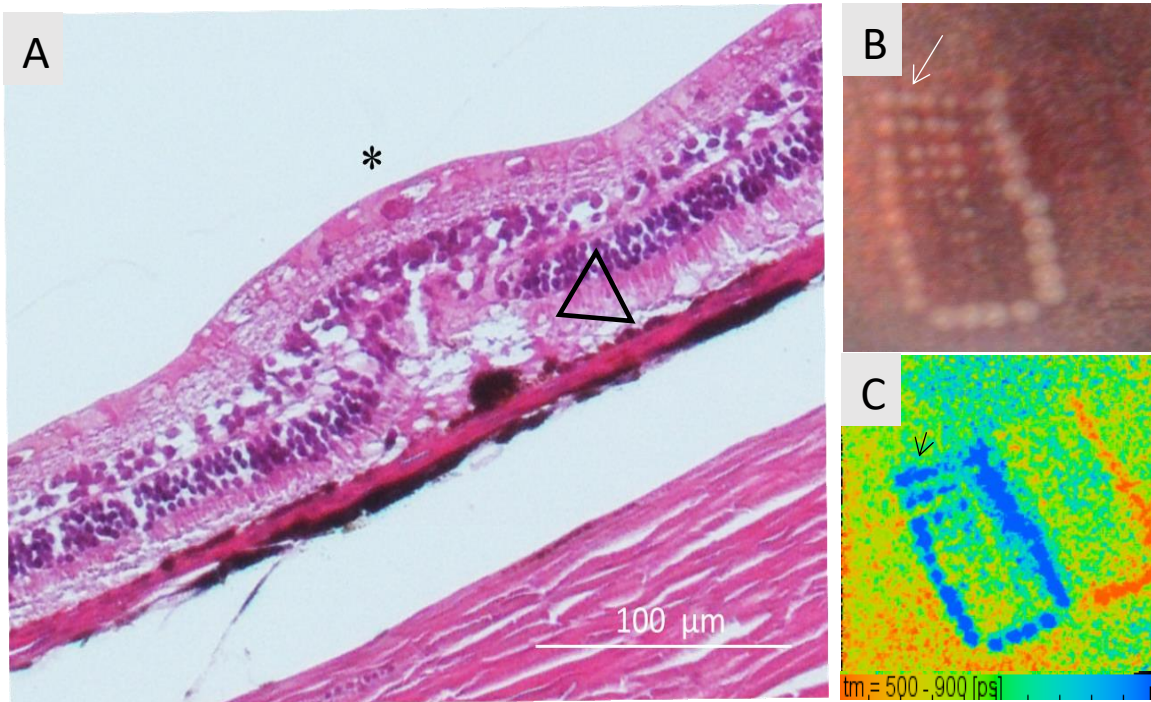
**Abbildung 29.** Histologischer Schnitt (A, Hämatoxylin-Eosin-Färbung) sowie die hierzu korrespondierenden Bildgebungen mittels Funduskamera (B) sowie FLIO-Pseudofarbbild im SSC-Kanal (C) eines Markerspots mit starker Photokoagulation (50  $\mu$ s, 800  $\mu$ J) etwa 30 Minuten nach Laserbestrahlung kurz vor Euthanasie und Enukleation des Auges. In der HE-Färbung kam es im Bereich der Laserung (\*) zu einer verstärkten Eosinfärbung sowie einer gering veränderten äußeren Körnerschicht (schwarzer Pfeilkopf). Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.3.2 9-11 Tage nach Laserbestrahlung

Der Markerspot mit hohem Photokoagulationseffekt (50  $\mu$ s, 800  $\mu$ J, Abbildung 30A) sowie ein energetisch etwas niedriger dosierter Laserspot (50  $\mu$ s, 550  $\mu$ J, Abbildung 30A) stellten sich histologisch kuppelförmig dar. Diese kuppelartige Struktur der Netzhaut nach Laserbestrahlung unterscheidet sich deutlich von der in vivo Aufnahme durch die optische Kohärenztomographie und ist ein bekanntes Artefakt.[104] Morphologisch zeigte sich im subretinalen Raum typischerweise eine eosinophile, strukturlose Substanz sowie große Verklumpungen von Melaninpigmenten (Pfeilköpfe Abbildungen 30A sowie 31A). Im hierzu durchgeführten Fundusfoto sind beide Spots als rundlich weiße, vernarbte Areale erkennbar (Abbildungen 29-31A). Die FLD beider Spots zeigte im errechneten Pseudofarbbild eine Verlängerung in Form einer Blaufärbung (Abbildungen 29-31C).



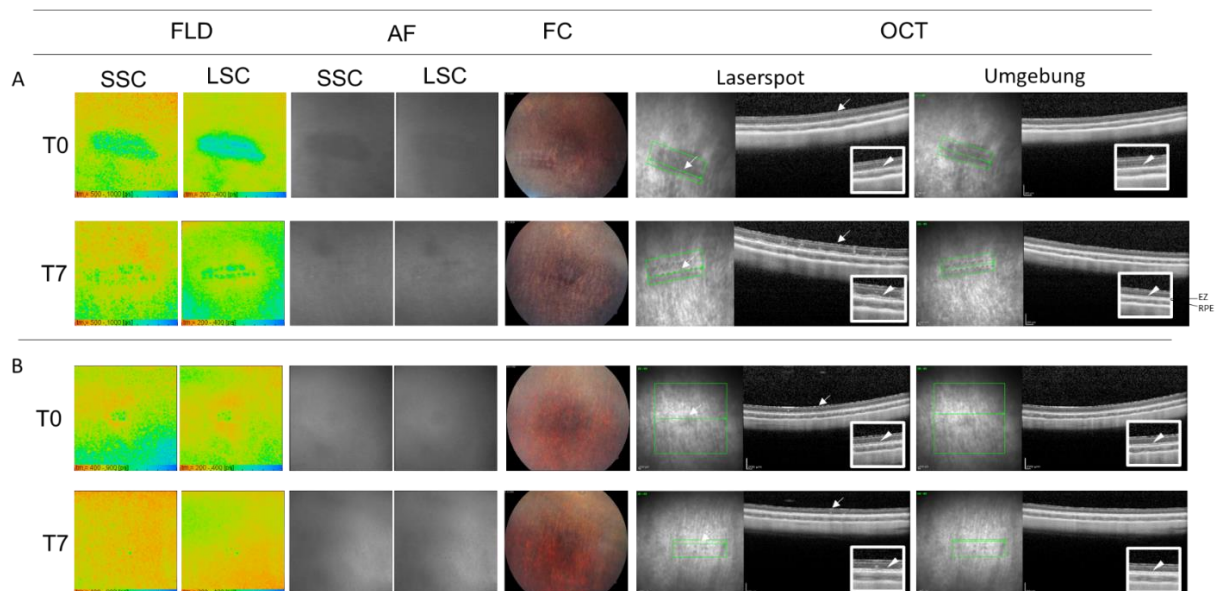
**Abbildung 30.** Histologischer Schnitt (A) sowie die hierzu korrespondierenden Bildgebungen mittels Funduskamera (B) sowie FLIO-Pseudofarbbild im SSC-Kanal (C) eines Markerspots (50  $\mu$ s, 800  $\mu$ J) etwa 9 Tage nach Laserbestrahlung. Die in (A) gezeigte kuppelförmige Morphologie der Netzhaut (\*) in der Histologie ist ein typisches Artefakt, das an mittelstarken bis starken Koagulationsstellen auftritt. Der schwarze Pfeilkopf weist auf eine eosinophile strukturlose Substanz sowie Pigmentverklumpungen hin. In der FLIO konnte eine Verlängerung der FLD verzeichnet werden, welche im Pseudofarbbild mit einer Blaufärbung dargestellt wird. Entnommen und modifiziert nach [101]



**Abbildung 31.** Histologischer Schnitt (A) sowie die hierzu korrespondierenden Bildgebungen mittels Funduskamera (B) sowie FLIO-Pseudofarbbild im SSC-Kanal (C) eines niedriger dosierten Laserspots (50  $\mu$ s, 550  $\mu$ J) etwa 9 Tage nach der Laserbestrahlung (\*). Der schwarze Pfeilkopf weist auf eine eosinophile strukturlose Substanz sowie Pigmentverklumpungen hin. In der FLIO konnte eine Verlängerung der FLD verzeichnet werden, welche im Pseudofarbbild mit einer Blaufärbung dargestellt wird. Entnommen und modifiziert nach [101]

#### 4.2.4 Stimulierende Laserspots

Um den Einfluss starker Bestrahlungsstellen wie Marker-Spots auszuschließen und die Wirkung einer Laserbestrahlung, die schwach genug ist, um das RPE nahezu selektiv zu zerstören, auf die FLD der Retina zu beurteilen, wurde die Bestrahlung mit einer kurzen Pulsdauer von 5  $\mu\text{s}$  durchgeführt. Hierbei wurden Laserenergien verwendet, die an der Schwelle zur Mikroblasenbildung lagen. Diese Schwelle zur Bildung von Mikroblasen wurde mittels Photoakustik ermittelt. Hierbei impliziert die Mikroblasenbildung eine Zerstörung des RPE. Demnach kann eine Bestrahlung mit einer Laserpulsenergie nahe über dem Schwellenwert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine selektive Zerstörung des RPE mit minimaler Schädigung angrenzender Strukturen erreicht werden. Die mittlere Schwellenenergie für die Bildung von Mikroblasen wurde bei etwa 33  $\mu\text{J}$  bestimmt. Lokale Schwellenwerte lagen innerhalb eines Spektrums von 13  $\mu\text{J}$  bis 66  $\mu\text{J}$ . Beispielhaft wurden hierbei zwei unterschiedliche Energien, 40  $\mu\text{J}$  (Abbildung 32A) und 18  $\mu\text{J}$  (Abbildung 32B) gewählt.



**Abbildung 32.** Multimodale Bildgebung zweier Pattern, die mit kurzer Pulsdauer [5  $\mu\text{s}$ ] bestrahlt wurden und deren Energieniveaus knapp über der Mikroblasenbildung liegen; (A) Pattern, das mit einer Laserpulsenergie von 40  $\mu\text{J}$  bestrahlt wurde, (B) Pattern, das mit einer Laserpulsenergie von 18  $\mu\text{J}$  bestrahlt wurde. FLD und FAF in FLIO mit den Kanälen SSC und LSC, Fundusfotographie (FC) sowie OCT-Bilder der Laserspots als auch der Umgebung an Tag 0 (etwa 30 Minuten nach der Bestrahlung, T0) und Tag 7 (T7). Die Pfeile zeigen die Stellen der Laserspots an. Die Pfeilspitzen zeigen die ellipsoide Zone. FLD: Fluoreszenzlebensdauer, AF: Fundusautofluoreszenz, SSC: kurzer Spektralkanal, LSC: langer Spektralkanal, OCT: optische Kohärenztomographie. Entnommen und modifiziert nach [101]



#### **4.2.4.1 Tag 0 (30 Min) nach der Laserbestrahlung**

Direkt nach der Bestrahlung kam es sowohl in beiden Pattern als auch in den durch die FLIO gemessenen beiden Kanälen zur Verlängerung der FLD. Die Umgebungsreaktionen erwiesen sich jedoch dagegen unterschiedlich. Während es in der Umgebung der Spots, die mit einer Laserpulsenergie von 40  $\mu\text{J}$  appliziert wurden, zu einer Verlängerung der FLD (Abbildung 30A) kam, verkürzte sich diese bei einer Laserpulsenergie von 18  $\mu\text{J}$  (Abbildung 30B – FLIO T0). In der AF korrespondierte die Verlängerung der FLD um die Laserspots mit einer Hypoautofluoreszenz in der Fundusautofluoreszenz (Abbildung 30A – AF T0). In der Fundusfotographie stellten sich die Spots als runde, weiße Koagulationsherde dar (Abbildung 30A – FC T0). In der OCT-Untersuchung konnten keine mit den applizierten Laserspots korrelierende morphologischen Veränderungen erkannt werden (Abbildung 30A – OCT T0). Bei genauerer Betrachtung der OCT-Bilder zeigte sich jedoch das Signal in der ellipsoiden Zone (EZ) im und um den Bereich der Laserspots reduziert sowie diskontinuierlich (Abbildung 30A – OCT T0, weiße Pfeilköpfe im vergrößerten Bild).

Das mit einer niedrigeren Energie von 18  $\mu\text{J}$  gelaserte Pattern war in der AF sowie in der Fundusfotographie kaum sichtbar (Abbildung 30B – AF sowie FC). Ebenso zeigten sich keinerlei morphologische Veränderungen im Bereich der Laserspots in der OCT-Untersuchung (Abbildung 30B – OCT T0). Interessanterweise und im Unterschied zu den mit 40  $\mu\text{J}$  gelaserten Spots blieb die ellipsoide Zone im Bereich sowie in der Umgebung jener Spots morphologisch unverändert (Abbildung 30B – OCT T0, weiße Pfeilköpfe im vergrößerten Bild).

#### **4.2.4.2 Tag 7 nach der Laserbestrahlung**

Sieben Tage nach der Laserung mit einer Pulsenergie von 40  $\mu\text{J}$  waren die Laserspots in der AF fast nicht mehr zu erkennen. Sie stellten sich nahezu isoautofluoreszent dar (Abbildung 30A – AF T7). In der Fundusfotographie spiegelten sich an den Orten der applizierten Laserspots dunkle, kreisrunde Spots wider (Abbildung 30A – FC T7). In der OCT-Untersuchung zeigten sich im Bereich der Spots betont in den äußeren Netzhautschichten abgrenzbare, hyperreflektive Bereiche (Abbildung 30A- OCT T7, Laserspot). Die EZ erwies sich am sowie um den jeweils applizierten Laserspot als deutlich sichtbar (Abbildung 30A – OCT T7, Laserspot und Umgebung, weiße Pfeile in vergrößertem Bild). Die FLD verkürzte sich sieben Tage nach der Laserapplikation nicht nur um die Laserspots, sondern auch im angrenzenden, umliegenden Gewebe jener. Dem entgegen blieb die FLD der Laserspots selbst verlängert (Abbildung 30A – FLIO SSC und LSC T0).

Das Pattern, welches mit einer Pulsenergie von 18  $\mu\text{J}$  gelasert wurde, war nach sieben Tagen in der Fundusfotographie nahezu nicht mehr zu erkennen (Abbildung 30B – FC T7). In der AF waren im Bereich der Laserspots kleine punktuelle Hypoautofluoreszenzen – im LSC besser als im SSC – erkennbar (Abbildung 30B – AF T7). In der OCT-Untersuchung stellten sich die Laserspots sieben Tage nach der Bestrahlung als feine Hyperreflexionen innerhalb der äußeren Netzhautschichten dar (Abbildung 30B – OCT T7, Laserspots). Die ellipsoide Zone blieb sowohl am als auch um die Laserspots stets gut abgrenzbar (Abbildung 30B – OCT T7, Laserspots und Umgebung, Pfeilköpfe in den vergrößerten Bildern). Die FLD der Laserspots blieb verlängert, wohingegen die verkürzte FLD in der Umgebung sich kaum merklich von der Umgebung mehr unterschied (Abbildung 30B – FLIO SSC und LSC T7).

#### **4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse von Teil II**

Nach starker Laserkoagulation war die FLD an den Laserspots unmittelbar nach der Bestrahlung deutlich verlängert, wohingegen sie sich nach mehr als einer Woche als verkürzt darstellte. Die histologische Untersuchung zeigte im Bereich der Koagulationsstellen, die älter als eine Woche waren, eosinophile Substanz sowie Melaninverklumpungen im subretinalen Raum. Die FLD war außerdem direkt um die Koagulationsstellen herum verlängert. Dies entsprach in der OCT einer diskontinuierlichen ellipsoiden Zone (EZ). Diese EZ-Veränderung regenerierte sich nach einer Woche. Ebenso zeigte sich die FLD bezüglich ihrer Morphologie ihrer Umgebung gleichwertig. Es gab einen Bereich um den Laserspot, in dem die FLD vorübergehend kürzer war als in der Umgebung. Wenn schwache Pulsenergie angewendet wurde, um selektiv nur das RPE zu zerstören, wurde eine Verkürzung der FLD unmittelbar um den Laserpunkt herum innerhalb einer Woche nach der Bestrahlung beobachtet.

## 5 Diskussion

Die Diskussion ist wie der Ergebnisteil in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wird auf die Detektion der Laserherde mittels FLIO im Vergleich zu den klinisch etablierten Verfahren eingegangen. Im zweiten Teil erfolgt eine Diskussion über die Änderung der FLD in Folge in der Laserbestrahlung auf der Netzhaut. Des Weiteren wird auf allgemein diskutierbare Punkte wie das Laborsetting sowie das gewählte Tiermodell eingegangen.

### 5.1 Teil I: Sichtbarkeit der Laserspot

In dieser Studie wurde erstmals die Sensitivität der Laserspotdetektion zwischen FLIO und den bereits im klinischen Alltag etablierten Methoden FA, OCT, AF und FC direkt verglichen.

Die Bestrahlung, welche für die Netzhautlasertherapie verwendet wird, wird wie bereits erwähnt vom Melanin in den RPE-Zellen absorbiert. Diese absorbierte Energie wird anschließend in Wärme umgewandelt, was einen Temperaturanstieg im Gewebe zur Folge hat. Die Dauer sowie das Ausmaß dieses Temperaturanstieges bestimmen, ob es zu einer rein subletalen Erwärmung der RPE-Zellen kommt oder gar eine Koagulation der umliegenden Zellen entsteht.

#### 5.1.1 Spaltlampe

Die Fundusuntersuchung mit der Spaltlampe ist ein typisches Verfahren in der Routinepraxis und bei der Netzhautlaser-Behandlung. Dabei wird die Netzhaut mit einer Weißlichtbeleuchtung und einer berührungslosen Linse oder Kontaktlinse betrachtet. Während einer Netzhaut-Lasertherapie verwendet der behandelnde Arzt typischerweise ein Kontaktglas. Bei der herkömmlichen Laserkoagulation, z.B. bei der panretinalen Netzhautkoagulation zur Behandlung der diabetischen Retinopathie, ist eine grau-weiße Farbveränderung der Netzhaut der einzige Indikator für eine Netzhautkoagulation (zumindest der äußeren Netzhautschicht). Es hat sich gezeigt, dass eine selektive RPE-Schädigung keine Farbveränderungen der Netzhaut verursacht.[105] Es wird deshalb weithin angenommen, dass diese Farbveränderung der Netzhaut zumindest ein Hinweis auf eine Photorezeptorschädigung ist, die direkt über dem RPE liegt.

#### 5.1.2 Funduskamera

Bei diesem Verfahren gilt jedoch zu beachten, dass sich die Sichtbarkeit koagulierter Laserherde mit der Zeit ändern kann, insbesondere zwischen dem Zeitpunkt unmittelbar nach der Bestrahlung und einigen Minuten später. Oft ist die Läsion nicht sofort nach der Bestrahlung sichtbar. Eine sichtbare morphologische Veränderung kann sich durchaus erst nach einigen Sekunden einstellen. In der vorliegenden Studie bewertete die behandelnde Person die Sichtbarkeit der Laserspots nach einigen Sekunden auf Grundlage ihrer subjektiven Empfindungen. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass sich die Schwellenwerte leicht von denen der Untersuchung mittels Funduskamera (Fundusfotografie) unterscheiden. Diese wurde ebenfalls mit Weißlicht durchgeführt und fand in einem Zeitrahmen von 10-30 Minuten nach der Bestrahlung statt.

#### 5.1.3 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (OCT) des Fundus, zumindest die aktuelle OCT, hat die beste axiale bzw. laterale Auflösung bei 3-7  $\mu\text{m}$  sowie 14  $\mu\text{m}$ . [106] Die OCT-Bilder

entstehen durch reflektiertes Licht, das durch Unterschiede im Brechungsindex erkannt wird. Veränderungen, die sich auf das RPE beschränken, sind bei der oben genannten Auflösung schwer zu erkennen, es sei denn, die Zellen verkümmern oder lösen sich von der Bruchschens Membran ab. Eine Ablösung des RPE von der Bruchschens Membran kann bei einer Schrumpfung aufgrund einer starken Photokoagulation zu sehen sein, andernfalls wären die Veränderungen nicht nachweisbar.

Wenn die Wärme vom RPE auf die apikal gelegenen Photorezeptorzellen übergreift, verursacht sie dort eine thermische Degeneration der Photorezeptoren, die durch die OCT aufgrund einer Veränderung des Brechungsindex über einen weiten Bereich nachweisbar ist. Im Falle einer starken Photokoagulation bildet sich unmittelbar danach auf der apikalen Seite des betroffenen RPE eine stark reflektierende Zone quer über die Netzhaut.[107] Diese Veränderung ist am Tag nach der Bestrahlung nicht mehr zu sehen und könnte ein Befund sein, der auf vorübergehende intrazelluläre ödemartige Veränderungen zurückzuführen ist.[107]

#### **5.1.4 Fluoreszenzangiographie**

Die Fluoreszenzangiographie (FAG) ist ein Verfahren, bei dem der fluoreszierende Farbstoff Fluorescein intravenös injiziert wird. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs wird durch Anregung mit blauem Licht sichtbar gemacht, sobald dieser in die retinalen Gefäße gelangt. Diese Untersuchungsmethode ermöglicht nicht nur die Darstellung der Netzhautgefäße, sondern auch die Erkennung von Leckagen aus krankhaften Gefäßen. Normalerweise gelangt der in die Aderhaut eingedrungene Farbstoff aufgrund der Barrierefunktion der Tight Junctions im retinalen Pigmentepithel (RPE), auch bekannt als äußere Blut-Retina-Schranke, nicht in die Netzhaut. Bei einer Dysfunktion der Tight Junctions kann das Fluorescein jedoch aus den Aderhautkapillaren in den subretinalen Raum austreten und als Leckage identifiziert werden. Eine Zerstörung der RPE-Zellen durch Laserbestrahlung führt zu einer Unterbrechung der Tight Junctions zwischen den Zellen, was bei der FAG zu einer Leckage führt. Dies kann sogar dann auftreten, wenn die Schädigung auf das RPE beschränkt ist. Daher kann eine Schädigung des RPE mittels FAG früher erkannt werden als mit der Spaltlampe oder einer Fundusfotografie.

#### **5.1.5 Fundusautofluoreszenz**

Die Fundus-Autofluoreszenz (AF) ist eine nicht-invasive Bildgebungsmodalität, die Fluorophore am Augenhintergrund abbildet. Im Gegensatz zur Fluoreszenzangiographie ist die AF nicht invasiv und benötigt keine intravenöse Injektion von Fluorescein zur Darstellung der Netzhaut und ihrer Gefäße. Die AF nutzt die fluoreszierenden Eigenschaften des im retinalen Pigmentepithel (RPE) vorkommenden Lipofuszin. Lipofuszin ist ein Abbauprodukt von Photorezeptoraussensegmenten und akkumuliert im RPE als Alterspigment. Eine Vielzahl von Netzhauterkrankungen führt zur Schädigung des RPEs, die als hypo- oder hyperfluoreszente Änderung darstellbar ist. Diese Änderung der Autofluoreszenz kann jedoch auch iatrogen durch eine Laserbestrahlung eintreten und somit als Marker bei der Lasertherapie dienen. So ist nach konventioneller milder Laserbestrahlung bei einer diabetischen Makulopathie ein Abfall der Autofluoreszenz im behandelten Areal nachweisbar.[108] Insbesondere bei der selektiven Retinatherapie wird angenommen, dass die Hypoautofluoreszenz durch die ophthalmoskopisch nicht sichtbare

Destruktion des RPEs und der damit einhergehenden Fluorophore verursacht wird. Im Verlauf stellen sich die hypofluoreszenten Laserbereiche hyperfluoreszent dar. Ursächlich hierfür sind womöglich Reparaturmechanismen auf RPE-Ebene.[109] In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die AF selektive Laserspots im Bereich oberhalb der Schwelle zur Mikroblasenbildung hypoautofluoreszent darstellte. Im Verlauf zeigten sich diese isoautofluoreszent. Im Bereich unterhalb der Schwellenenergie zur Mikroblasenbildung konnte die AF jedoch keine Veränderungen detektieren, weshalb sie sich zur Steuerung einer Laserbestrahlung in diesem Energieniveau als unzuverlässig erweisen könnte.

#### **5.1.6 FLIO**

In dieser Studie konnte erstmalig das Potential der FLIO in der Detektion unterschwelliger, RPE selektiver Laserspots im Vergleich zu den bisher etablierten Methoden untersucht werden. Hierbei konnte die nicht invasive FLIO selektive RPE-Schäden ähnlich sensitiv wie die FAG detektieren, was sie zu einem potentiellen Diagnostikum in der klinischen Routine zur Überwachung und Therapiesteuerung nach unterschwelliger Laserbehandlung macht. Es ist jedoch zu beachten, dass weitere Untersuchungen – insbesondere an der menschlichen Netzhaut – notwendig sind, um die veränderte FLD, die durch die stimulierende Laserbestrahlung verursacht wurde, korrekt mit der FLIO zu interpretieren. Derzeit ist unklar, welche Auswirkungen die Verkürzung bzw. Verlängerung der FLD auf den behandelten Netzhautbereich und gegebenenfalls die retinale Erkrankung hat, insbesondere über einen längeren Zeitraum betrachtet.

FLIO nutzt auch die Fluoreszenzeigenschaften der Autofluoreszenzmoleküle in der Netzhaut. Anders als die Fluoreszenzintensität, die bei der Fundus-AF erfasst wird, ist die FLD fluorophorspezifisch und auch unabhängig von der Fluoreszenzintensität. Sie kann deshalb den Nachweis verschiedener Fluorophore ermöglichen, nicht nur von Lipofuszin. Dazu gehören intrazelluläre Moleküle, die mit dem Energiestoffwechsel zusammenhängen, und auch fluoreszierende Vitamin A-assoziierte Moleküle. Außerdem wird die unterschiedliche FLD durch die unterschiedliche Pseudofarbe angezeigt. Man geht davon aus, dass dies der Grund dafür sind, dass FLIO den Laserspot, auch wenn er sehr schwach ist, empfindlicher als die Fundus-AF (Intensitätsbild) erkennen bzw. darstellen kann.

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich die FLD innerhalb von einer bis zwei Wochen nach der Laserbehandlung kontinuierlich verändert. Es ist daher von großer Bedeutung, auf Grundlage dieser beobachtbaren Veränderung die notwendigen Einstellungen der Laserparameter für weitere Laserbehandlungen zu etablieren.

Weiterhin ist auch bekannt, dass die Autofluoreszenz der Linse den  $\tau_m$ -Wert der FLIO beeinflusst, insbesondere im SSC.[110,111] Klinisch gesehen hatte jedoch keines der Kaninchen eine Linsentrübung. Es ist jedoch ein möglicher Einfluss der Linse im Sinne einer Verlängerung der  $\tau_m$  im SSC nicht vollständig ausschließbar.

### 5.1.7 Laserpulsdauer

Bezüglich der Spotdetektionsempfindlichkeit der bildgebenden Verfahren wurden keine signifikanten charakteristischen Unterschiede in der Spotdetektionsempfindlichkeit zwischen den in dieser Studie untersuchten Pulslängen von 5,2  $\mu\text{s}$  bis 50  $\mu\text{s}$  gefunden. Es ist bekannt, dass die RPE-Selektivität mit abnehmender Pulslänge zunimmt, da sich der Mechanismus des RPE-Zelltods mit abnehmender Laserpulslänge von thermisch zu thermomechanisch verschiebt.[64,112–116] Eine thermomechanische Schädigung tritt auf, wenn hohe Temperaturen zu einer Verdampfung der Melanosomen in einem sehr kurzen Zeitintervall führen, bevor eine thermische Diffusion in die Umgebung stattfindet und die Mikroblassenbildung die Zellmembran durch ihre schnelle Ausdehnung mechanisch zerstört.[114,115] Unsere frühere Studie[64] zeigte, dass bei Pulsdauern von mehr als 50  $\mu\text{s}$  thermische Schäden für den Zelltod verantwortlich sind, was mit Schüle et al. übereinstimmt.[117] Unterhalb dieser Pulsdauer können jedoch sowohl thermomechanische als auch thermische Schäden zum Absterben von RPE-Zellen beitragen, und unterhalb von etwa 2  $\mu\text{s}$  ist die Schädigung rein thermomechanisch.[64] Eine thermische Schädigung des RPE kann zwangsläufig auch die äußere Netzhaut, z.B. das äußere Photorezeptorsegment, betreffen und zu Refraktionsänderungen in der Netzhaut führen. Burri et al. fanden auch eine spätere Sichtbarkeit von Spots in der OCT nach Bestrahlung mit niedrigeren Pulsdauern und eine frühere Sichtbarkeit bei längeren Pulsdauern, was auf eine erhöhte Netzhautreflexion zurückzuführen ist.[118] Der größte Unterschied in der ED50 zwischen SL und den anderen Modalitäten bei der kürzesten Pulsdauer von 5,2  $\mu\text{s}$  ist zwar gering, kann aber auf diese Tatsache zurückgeführt werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die FLIO bei den meisten Pulslängen von 5,2  $\mu\text{s}$  bis 50  $\mu\text{s}$  empfindlicher als die Funduskopie ist, wenn es darum geht, frühe Spots von Laserschäden am RPE zu erkennen. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied zur FA, jedoch eine potenzielle, leichte Überlegenheit gegenüber der AF. Angesichts des zusätzlichen Potentials von FLIO, Wundheilung und metabolische Veränderungen am und um den Laserspot anzuzeigen, wie in unseren früheren Studien[101,119] gezeigt, erscheint es plausibel, FLIO in das Monitoring minimal-invasiver Lasertherapien zu integrieren und weitere klinische Studien diesbezüglich durchzuführen.

## 5.2 Teil II: Veränderungen der FLD nach Laserbestrahlung

Der zweite Teil dieser Studie beschäftigte sich mit der Änderung der FLD nach Laserbestrahlung, um etwaige Rückschlüsse auf den Mechanismus der FLD-Änderung schließen zu können.

### 5.2.1 Potentielle Ursachen der FLD-Änderung

Als eine potentielle Ursache der Verlängerung der FLD direkt an den Laserspots wird angenommen, dass es zur Auflösung der Ausrichtung der dichten Melanosomen in den RPE-Zellen mit kurzer FLD und der darunter liegenden freigelegten Aderhautstruktur mit langer FLD kommt. Dies stimmt mit Ergebnissen von RPE-Aderhaut-Sklera-Explantaten[119] und dem klinischen Befund einer geographischen Atrophie überein.[120] Diese Erklärung kann jedoch nicht auf die verlängerte FLD um die Laserspots kurz nach der Bestrahlung übertragen werden. Bezüglich der Verlängerung der FLD um die Laserspots ziehen wir folgende zwei Möglichkeiten in Betracht: (1) Die FLD-Verlängerung könnte auf transienten hypoxischen Stress in den umliegenden Zellen zurückzuführen sein, der durch eine akute Entzündungsreaktion infolge des nekrotischen Zelltods von RPE-Zellen hervorgerufen wird. Das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), einer der Kofaktoren vieler enzymatischer Aktivitäten im Energiestoffwechsel der Zellen in den Mitochondrien, könnte seine FLD unter zellulärem Stress verändern. Die FLD des freien FAD ist lang und beträgt etwa  $2300 \pm 700$  ps, während das proteingebundene FAD eine kurze FLD aufweist (monomere Form:  $130 \pm 20$  ps, dimere Form:  $40 \pm 10$  ps).[121] Bei relativer Hypoxie kann sich der zelluläre Energiestoffwechsel von der aeroben Zellatmung auf die anaerobe Glykolyse verlagern, wodurch sich die relative Menge an freiem FAD erhöhen kann, was zu einer Verlängerung der FLD führt.[122–125] Eine andere Erklärung ist, dass die Verlängerung der FLD um die Laserspots durch Streuungsartefakt verursacht werden könnte. Die laserinduzierte Störung benachbarter RPE-Zellen kann zu einer vorübergehenden Veränderung der zellulären Mikrostruktur in den Photorezeptoren führen. Die Streuung kann durch Unregelmäßigkeiten im Brechungsindex verursacht werden, die durch Strukturen wie Zellkerne und Organellen, Zelldicke und Kollagengehalt hervorgerufen werden. Eine erhöhte Streuung kann die Durchdringung des Anregungslichts verringern und zu einem reduzierten Fluoreszenzsignal führen. Dieses Streuungsartefakt, das innerhalb des RPE auftritt, kann dessen Autofluoreszenz blockieren und könnte den Beitrag der kürzeren FLD des RPE reduzieren, was zu einer insgesamt längeren FLD führt. In der vorliegenden Studie stimmte die Verlängerung der FLD um den stark bestrahlten Bereich genau mit dem hypofluoreszenten Bereich in der AF und dem Bereich der unscharfen ellipsoiden Zone im OCT überein. Alle Laserspots zeigten eine lange FLD unmittelbar nach der Bestrahlung. Es gab jedoch einen signifikanten Unterschied in den nachfolgenden Veränderungen in Abhängigkeit von der applizierten Laserpulsenergie. Die FLD der Markerspots und einiger starker Koagulationssspots verkürzte sich nach einer Woche. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das OCT eine Ausdünnung der Photorezeptorschicht. Die histologische Beurteilung zeigte eosinophile, strukturlose Zell- und Pigmentverklumpungen im bestrahlten Bereich. Obwohl die genaue Ursache für diese FLD-Verkürzung an den starken Laserspots noch unklar ist, vermuten wir, dass fibrotische Vernarbung und RPE-Proliferation damit in Zusammenhang stehen könnten.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist die Region mit kurzer FLD in einem bestimmten Bereich um den Spot zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Bestrahlung. Ort und Zeitpunkt dieser Veränderungen scheinen von der Intensität der Bestrahlung abzuhängen. Je schwächer die Bestrahlung war, desto früher wurde die Verkürzung der FLD in der Umgebung beobachtet. Diese Veränderung wurde in einer Entfernung von mehreren hundert Mikrometern oder mehr vom Laserspot beobachtet. Mit den anderen Bildgebungsverfahren wie AF oder OCT wurden keine offensichtlichen Veränderungen festgestellt. Dies könnte auf Stoffwechselveränderungen in den umgebenden Zellen als Reaktion auf die Laserbestrahlung hindeuten. Der Mechanismus dieser FLD-Veränderung ist bis heute nicht geklärt, aber der Einfluss durch den Kofaktor FAD kann als eine der Möglichkeiten angesehen werden. Erhöhte mitochondriale Aktivität könnte die Menge an proteingebundenem FAD erhöhen, was die FLD der aktivierten Zellen verkürzen könnte. Obwohl eine direkte Beurteilung des Zellstoffwechsels in vivo nicht möglich ist, erscheint diese Theorie plausibel, wenn man die Gewebe- und Zellreaktionen während der Wundheilung nach Laserbestrahlung betrachtet.

### **5.2.2 Der Sehstreifen des Kaninchens**

Bei der Durchführung dieser Studie fanden wir einen bandenförmigen Bereich mit hoher Fluoreszenzintensität und kurzer FLD in der Nähe des Sehnervs. Diese Region stimmt höchstwahrscheinlich mit der früher berichteten visuellen Bande in Kaninchenaugen überein, die im OCT verdickte äußere Photorezeptorsegmente aufweist.[126] Die frühere klinische Studie von Dysli et al. zeigte eine positive Korrelation zwischen der Verlängerung der äußeren Photorezeptorsegmente und der Verkürzung der FLD bei Patienten mit zentraler seröser Chorioretinopathie.[127] All-trans-Retinal, eines der Bisretinoide, die mit dem visuellen Zyklus in den äußeren Photorezeptorsegmenten assoziiert sind, zeigte eine sehr kurze FLD (rein in Lösung: ca. 40 und 50 ps, mit RPE-Zellen 120 und 63 ps, in SSC bzw. LSC.[127])

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FLIO nicht nur auf strukturelle Veränderungen an der behandelten Stelle, sondern auch auf Stoffwechselveränderungen des umliegenden Gewebes nach einer Laserbehandlung hinweisen kann.



### 5.3 Kaninchenmodell

In dieser Studie wurde aus praktischen Gründen auf das Kaninchen als Tiermodell zurückgegriffen, aufgrund seiner Größe, Handhabung und der anatomischen Ähnlichkeit zum menschlichen Auge. Dabei gilt es zu bedenken, dass es sich hierbei um ein Tiermodell handelt und die durch die durchgeführten Experimente gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne Weiteres direkt auf das menschliche Auge übertragen lassen. So muss bedacht werden, dass im Vergleich zum Menschen stets eine Sedierung zur Durchführung der Laserintervention mit folgender Bildgebung notwendig gewesen ist. Bei nicht ausreichender Sedierung bestand die Gefahr, dass das Kaninchen allmählich wach und unruhig wurde, worunter die Qualität der Aufnahmen litt. Ferner konnte beobachtet werden, dass – trotz ausreichender Benetzung der Augenoberfläche – die Hornhautoberfläche im Laufe des Experiments trockener sowie durch Manipulation trüber wurde, wodurch es wiederum zu Einbußen bei der Aufnahmequalität kommen konnte. Aufgrund der durch die räumlichen Gegebenheiten des Labors bedingten notwendigen Ortswechsel für die unterschiedlichen Untersuchungen – Laser sowie die Fluoreszenzangiographie als erste Untersuchungsmethode fanden in einem anderen Raum als FLIO sowie OCT statt – war ein zusätzlicher Transport der Kaninchen notwendig. Dieser könnte Stress bei den Tieren ausgelöst und zu einem stressbedingten erhöhten Stoffwechsel geführt haben. Dieser erhöhte Stoffwechsel könnte eine schnellere Elimination der Sedativa sowie eine Änderung des gesamten Metabolismus im Körper, einschließlich der Retina, bewirkt haben. Da durch die FLIO Rohdaten über den retinalen Metabolismus aufgenommen werden, könnten eine Veränderung des eigentlichen Ruhemetabolismus und somit verfälschte Werte durchaus denkbar sein.

Ebenso müssen anatomische Besonderheiten in Betracht gezogen werden, welche sich auf das Experiment – insbesondere auf den Verlauf der Laserstrahlung durch die optischen Medien – ausgewirkt haben können.[128] Im Vergleich zur menschlichen Hornhaut, welche eine Dicke von etwa 0,55 mm hat, ist jene des Kaninchens mit etwa 0,4 mm merklich dünner.[129] Ein weiterer gravierender Unterschied bezüglich der optischen Medien besteht hinsichtlich der menschlichen Linse, welche etwa 4,00 mm dick ist, und der Linse des Kaninchens, die nahezu das Doppelte mit etwa 7,9 mm misst. Des Weiteren unterscheiden sich die Bulbi von Mensch und Kaninchen deutlich hinsichtlich der Länge. So beträgt die durchschnittliche Achsenlänge des menschlichen Bulbus ca. 23,5 – 24 mm, die des Kaninchens ca. 18 mm. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist der unterschiedliche Gehalt an Melanin im Vergleich Mensch und Kaninchen.[130] So konnte nachgewiesen werden, dass bei gleicher Melaninverteilung innerhalb des Kaninchen- sowie Menschauges eine unterschiedliche Menge an Melanin [ $\mu\text{g}/\text{mg}$  Gewebe] besteht. Sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Choroidea und Retina zeigte sich der Melaningehalt des Kaninchenauges signifikant höher als im menschlichen Auge. Dies ist ein entscheidender Aspekt hinsichtlich der Lichtabsorption (siehe Einleitung) und könnte somit zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, wenn dieses Experiment am menschlichen Auge wiederholt wird. Daher ist es von großer Bedeutung, diese Messwerte zu kennen und zu berücksichtigen, da sich die gemessenen Ergebnisse nach der Laserbestrahlung aufgrund der unterschiedlichen Brechungen sowie des Melaningehalts nicht direkt auf das

menschliche Auge übertragen lassen und eine Anpassung der Laserenergie vor der Intervention am Menschen vorgenommen werden muss.

#### **5.4 Histologie**

Für die histologische Aufarbeitung des bestrahlten Areal wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin gewählt. Diese Routinefärbung ist eine der etabliertesten Färbungen, die eine Unterscheidung sämtlicher retinaler Strukturen ermöglicht. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen, mussten die Kaninchenaugen nach der Euthanasie schnellstmöglich enukleiert und in Formalin eingelegt werden. Aufgrund der Lernkurve gestaltete sich das Entfernen des ersten Augenpaars schwieriger und somit zeitaufwändiger als das Entfernen der anderen Augen. Dadurch könnte eine etwaige Qualitätsminderung im weiteren Färbeprozess entstanden sein. Eine schlechtere Qualität des histologischen Schnitts, im Sinne einer verminderten Farbstoffaufnahme oder gelöster Zellverbände, könnte sich negativ auf die Auswertung – speziell der unterschwellig Laserherde – ausgewirkt haben. Aus ethischen Gründen wurde jedoch erstens auf E nukleationsprobeläufe sowie auf die Euthanasie weiterer Kaninchen verzichtet.

Die histologische Untersuchung mit HE-Färbung direkt nach der Behandlung zeigte eine stärkere Eosin-Färbung in der Photorezeptorschicht. Eosin färbt eosinophile Organellen wie Lysosomen oder Mitochondrien.[131] Die stärkere Färbung könnte daher auch auf eine Veränderung des Stoffwechsels hinweisen und mit der Zunahme von FLD aufgrund von Stoffwechselveränderungen einhergehen. Neben der Verlängerung der FLD an den Laserpunkten war besonders die Verkürzung der FLD nach einer Woche an den Markerspots im SSC interessant. Um die unterschiedlichen FLIO-Ergebnisse im SSC- sowie LSC-Kanal zu verstehen, muss man wissen, dass der SSC eher Veränderungen bei Fluorophoren mit einem Emissionsspektrum zwischen 498 und 560 nm und der LSC-Kanal zwischen 560 und 720 nm detektiert. Hierzu gehören Fluorophore wie Melanin, AGE, FAD oder Kollagen.[84] Da die HE-Färbung nach einer Woche eine Hyperpigmentierung auf RPE-Ebene zeigt, könnte die Verkürzung der FLD im SSC auf eine Ansammlung von Melanin zurückzuführen sein.

Ein Blick auf frühere Studien[104,132] zeigt, dass die HE-Färbung von frisch behandeltem Fundusgewebe ebenfalls eine stärkere Eosin-Färbung in den verschiedenen Schichten in Abhängigkeit von der Laserleistung ergab. Bei hoher Laserleistung mit Photokoagulation vergrößerte sich der Spotdurchmesser, und nicht nur die Photorezeptor- und RPE-Schicht, sondern auch die Ganglienzellschicht und die inneren Schichten wurden geschädigt. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass die dauerhafte Schädigung der von uns definierten RPE-selektiven Spots, wenn überhaupt, nur gering sein könnte. Die Ergebnisse nach einer Woche waren identisch mit denen unserer Spots mit hoher Leistung. Sie zeigten ebenfalls eine Hyperpigmentierung auf RPE-Ebene. Außerdem waren unsere als selektiv definierten Spots im OCT direkt nach der Behandlung nicht detektierbar. Diese Läsionen waren in den IR-Bildern nach sechs Monaten nur selten sichtbar und könnten daher tatsächlich RPE-selektiv sein.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem tierexperimentellen Forschungsprojekt konnten wesentliche Punkte zum besseren Verständnis der Funktionsweise der FLIO als Diagnostikum anhand von Laserbestrahlung erarbeitet werden: Zum einen ist die FLIO ein Diagnostikum, das zur Therapiesteuerung und -überwachung den derzeit klinisch etablierten Methoden ebenbürtig, wenn nicht sogar überlegen sein kann. Zum anderen liefert die FLIO eine große Menge an Informationen über die Stoffwechsellage der Retina, welche für eine optimale Therapie von Bedeutung sein können. Wir konnten zeigen, dass die FLIO in der Lage ist, eine Veränderung der FLD nicht nur am Laserspot, sondern auch in der Umgebung zu zeigen, selbst bei niedrigen, unterschwelligen Laserbestrahlungs-Energieniveaus, wie bei der selektiven RPE-Laserbehandlung. Diese Tatsache deutet stark darauf hin, dass unterschwellige Laserbestrahlung an der Retina einen Effekt auf den dortigen Metabolismus hat und somit – früh genug eingesetzt – ein mögliches Therapeutikum für Netzhauterkrankungen sein kann, welche sich noch im Anfangsstadium befinden. Um diese Daten jedoch richtig einzuordnen und zu interpretieren sowie den größtmöglichen Nutzen für Patientinnen und Patienten zu erzielen, sind weitere Studien an PatientInnen zur Evaluation des Einflusses der über- oder unterschwelligen Laserbestrahlung notwendig. Die FLIO wird aufgrund einer zunehmenden Menge an durch Untersuchungen generierter Daten und deren Analyse das Potenzial haben, ihr Anwendungsspektrum stetig erweitern zu können. Ebenso ist der breitere Einsatz einer unterschwelligen Netzhautlasertherapie zur Behandlung von Netzhauterkrankungen durchaus zu begrüßen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology* 1991; 98: 741–756. doi:10.1016/s0161-6420(13)38009-9
- [2] Roider J, Brinkmann R, Wirbelauer C, et al. Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 40–47. doi:10.1136/bjo.84.1.40
- [3] Klatt C, Elsner H, Pörksen E, et al. [Selective retina therapy in central serous chorioretinopathy with detachment of the pigmentary epithelium]. *Ophthalmologe* 2006; 103: 850–855. doi:10.1007/s00347-006-1415-7
- [4] Roider J, Liew SHM, Klatt C, et al. Selective retina therapy (SRT) for clinically significant diabetic macular edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248: 1263–1272. doi:10.1007/s00417-010-1356-3
- [5] Klatt C, Saeger M, Oppermann T, et al. Selective retina therapy for acute central serous chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol* 2011; 95: 83–88. doi:10.1136/bjo.2009.178327
- [6] Grzybowski A, Sulaviková Z, Gawęcki M, et al. Subthreshold laser treatment in retinal diseases: a mini review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2024; doi:10.1007/s00417-024-06382-4
- [7] Brinkmann R, Roider J, Birngruber R. Selective retina therapy (SRT): a review on methods, techniques, preclinical and first clinical results. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2006; 51–69
- [8] Wood EH, Karth PA, Sanislo SR, et al. NONDAMAGING RETINAL LASER THERAPY FOR TREATMENT OF CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY: What is the Evidence? *Retina* 2017; 37: 1021–1033. doi:10.1097/IAE.0000000000001386
- [9] Moisseiev E, Abbassi S, Thinda S, et al. Subthreshold micropulse laser reduces anti-VEGF injection burden in patients with diabetic macular edema. *Eur J Ophthalmol* 2018; 28: 68–73. doi:10.5301/ejo.5001000
- [10] Scholz P, Altay L, Fauser S. A Review of Subthreshold Micropulse Laser for Treatment of Macular Disorders. *Adv Ther* 2017; 34: 1528–1555. doi:10.1007/s12325-017-0559-y
- [11] Framme C, Walter A, Berger L, et al. Selective Retina Therapy in Acute and Chronic-Recurrent Central Serous Chorioretinopathy. *Ophthalmologica* 2015; 234: 177–188. doi:10.1159/000439188
- [12] Mei JH, Lin Z. Subthreshold micropulse diode laser treatment in diabetic macular edema: biological impact, therapeutic effects, and safety. *Int Ophthalmol* 2024; 44: 3. doi:10.1007/s10792-024-02973-6
- [13] Brinkmann R, Birngruber R. [Selective Retina Therapy (SRT)]. *Z Med Phys* 2007; 17: 6–22. doi:10.1016/j.zemedi.2006.11.002
- [14] Dysli C, Wolf S, Berezin MY, et al. Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Prog Retin Eye Res* 2017; 60: 120–143. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.06.005

- [15] Becker W, Bergmann A, Hink MA, et al. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* 2004; 63: 58–66. doi:10.1002/jemt.10421
- [16] Dysli C, Quellec G, Abegg M, et al. Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 2106–2113. doi:10.1167/iovs.13-13627
- [17] Dysli C, Fink R, Wolf S, et al. Fluorescence Lifetimes of Drusen in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58: 4856–4862. doi:10.1167/iovs.17-22184
- [18] Sonntag SR, Kreikenbohm M, Böhmerle G, et al. Impact of cigarette smoking on fluorescence lifetime of ocular fundus. *Sci Rep* 2023; 13: 11484. doi:10.1038/s41598-023-37484-4
- [19] Sauer L, Peters S, Schmidt J, et al. Monitoring macular pigment changes in macular holes using fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Acta Ophthalmol* 2017; 95: 481–492. doi:10.1111/aos.13269
- [20] Dysli C, Wolf S, Zinkernagel MS. Fluorescence Lifetime Imaging in Retinal Artery Occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 3329. doi:10.1167/iovs.14-16203
- [21] Förster GR. Energiestoffwechsel und Fluoreszenzlebensdauer des retinalen Pigmentepithels unter Autophagieinhibition. Universität zu Lübeck; 2021
- [22] Yu, D.Y., Cringle, S.J., Yu, P.K., Su, E.N. (2020). Anatomy and Histology of the Macula. In: Chang, A., Mieler, W.F., Ohji, M. (eds) *Macular Surgery*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7644-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7644-7_1).
- [23] <https://www.edrawsoft.com/templates/pdf/eye-diagram.pdf>; aufgerufen am 18.07.2023 um 14:30 Uhr.
- [24] <https://apellismedicalhub.com/science/geographic-atrophy/macula-society-2022/efficacy-of-pegcetacoplan-in-subgroups-defined-by-distance-from-the-foveal-center-point-in-the-phase-3-oaks-and-derby-studies-of-patients-with-geographic-atrophy-ms-2022/?>; aufgerufen am 01.08.2024 um 20:01 Uhr.
- [25] Kim SJ, Fawzi A, Kovach JL, et al., Hrsg. *Retina and vitreous*. 2023.–2024., last major revision 2020-2021 Aufl. San Francisco, Calif: American Academy of Ophthalmology; 2023; S.28.
- [26] Lamb TD, Pugh EN Jr. Phototransduction, Dark Adaptation, and Rhodopsin Regeneration The Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006; 47: 5138–5152. doi:10.1167/iovs.06-0849
- [27] Pfeiffer RL, Anderson JR, Yang J-H, et al. Glial Connectomics: Inner Retinal Müller Cell Connectivity in the Healthy and Degenerate Retina. *Microscopy and Microanalysis* 2024; 30: ozae044.476. doi:10.1093/mam/ozae044.476
- [28] Tu Y, Song E, Wang Z, et al. Melatonin attenuates oxidative stress and inflammation of Müller cells in diabetic retinopathy via activating the Sirt1 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021; 137: 111274. doi:10.1016/j.biopha.2021.111274
- [29] Abràmoff MD, Garvin MK, Sonka M. Retinal imaging and image analysis. *IEEE Rev Biomed Eng* 2010; 3: 169–208. doi:10.1109/RBME.2010.2084567

- [30] Entezari M, Karimi S, Ramezani A, et al. Choroidal Thickness in Healthy Subjects. *J Ophthalmic Vis Res* 2018; 13: 39–43. doi:10.4103/jovr.jovr\_148\_16
- [31] Ding S, Kumar S, Mok P. Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *IJMS* 2017; 18: 1406. doi:10.3390/ijms18081406
- [32] Schuele G, Elsner H, Framme C, et al. Optoacoustic real-time dosimetry for selective retina treatment. *J Biomed Opt* 2005; 10: 064022. doi:10.1117/1.2136327
- [33] Szalai E, Nickerson JM, Grossniklaus HE. RPE Histopathology and Morphometry. In: Klettner AK, Dithmar S, Hrsg. *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing; 2020: 3–17
- [34] Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* 2001; 15: 384–389. doi:10.1038/eye.2001.141
- [35] Nakanishi M, Grebe R, Bhutto IA, et al. Albumen Transport to Bruch's Membrane and RPE by Choriocapillaris Caveolae. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2016; 57: 2213–2224. doi:10.1167/iovs.15-17934
- [36] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85: 845–881. doi:10.1152/physrev.00021.2004
- [37] Kim J, Lee YJ, Won JY. Molecular Mechanisms of Retinal Pigment Epithelium Dysfunction in Age-Related Macular Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22: 12298. doi:10.3390/ijms222212298
- [38] Salzmann M. *Anatomie und Histologie des menschlichen Augapfels im Normalzustände*. F. Deuticke; 1912
- [39] Pollreisz A, Messinger JD, Sloan KR, et al. Visualizing melanosomes, lipofuscin, and melanolipofuscin in human retinal pigment epithelium using serial block face scanning electron microscopy. *Exp Eye Res* 2018; 166: 131–139. doi:10.1016/j.exer.2017.10.018
- [40] Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 1993; 17: 189–195. doi:10.1242/jcs.1993.supplement\_17.27
- [41] Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol* 1985; 60: 327–346. doi:10.1007/BF00158922
- [42] Brinkmann R, Schüle G, Neumann J, et al. Selektive Retinatherapie: Methodik, Technik und Online-Dosimetrie. *Ophthalmologe* 2006; 103: 839–849. doi:10.1007/s00347-006-1416-6
- [43] Pelkonen L, Reinisalo M, Morin-Picardat E, et al. Isolation of Intact and Functional Melanosomes from the Retinal Pigment Epithelium. *PLOS ONE* 2016; 11: e0160352. doi:10.1371/journal.pone.0160352
- [44] Gabel: Visible and near infrared light absorption... - Google Scholar. . Im Internet: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Proc+23rd+Consilium+Ophthalmologicum+Kyoto+Excerpta+Medica&title=Visible+and+near+infrared+light+absorption+in+pigment+epithelium+and+choroid&volume=450&publication\\_year=1978&pages=658-662&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Proc+23rd+Consilium+Ophthalmologicum+Kyoto+Excerpta+Medica&title=Visible+and+near+infrared+light+absorption+in+pigment+epithelium+and+choroid&volume=450&publication_year=1978&pages=658-662&); Stand: 17.04.2024

- [45] Gabel VP, Birngruber R, Hillenkamp F, et al. Über die Lichtabsorption am Augenhintergrund. In: Jaeger W, Hrsg. Erkrankungen der Macula. Munich: J.F. Bergmann-Verlag; 1975: 362–367
- [46] Gilmour MA. Lasers in ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 649–672. doi:10.1016/s0195-5616(02)00009-8
- [47] Bille J. Laser-Gewebe-Wechselwirkungen. In: Medizinische Physik 3. Springer, Berlin, Heidelberg; 2005: 323–344
- [48] Sen M, Honavar SG. Gerhard Meyer-Schwickerath: Fiddler on the roof. *Indian J Ophthalmol* 2022; 70: 1086–1088. doi:10.4103/ijo.IJO\_573\_22
- [49] Sathyan S. ‘From sun to lasers’: The story of retinal photocoagulation. *Kerala Journal of Ophthalmology* 2024; 36: 170. doi:10.4103/kjo.kjo\_68\_24
- [50] Meyer-Schwickerath G. History and development of photocoagulation \*. *American Journal of Ophthalmology* 1967; 63: 1812–1814. doi:10.1016/0002-9394(67)93681-1
- [51] Hecht J. A short history of laser development. *Appl Opt, AO* 2010; 49: F99–F122. doi:10.1364/AO.49.000F99
- [52] Argon Laser Photocoagulation. *Medical Journal of Australia* 1972; 2: 918–918. doi:10.5694/j.1326-5377.1972.tb103634.x
- [53] Birngruber R, Weinberg W, Gabel V-P. Der Einfluß der Expositionsparameter auf die Schadensausdehnung bei der Netzhautkoagulation, dargestellt anhand eines thermischen Modells. In: Jaeger W, Hrsg. Uveitis. Munich: J.F. Bergmann-Verlag; 1981: 599–602
- [54] Framme C, Roider J, Brinkmann R, et al. [Basic principles and clinical application of retinal laser therapy]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2008; 225: 259–268. doi:10.1055/s-2008-1027202
- [55] Lavinsky D, Wang J, Huie P, et al. Nondamaging Retinal Laser Therapy: Rationale and Applications to the Macula. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: 2488–2500. doi:10.1167/iovs.15-18981
- [56] Liu J, Li R, Han K, et al. Intravitreal injection of Conbercept combined with micropulse laser therapy enhances clinical efficacy in patients with diabetic macular edema. *Am J Transl Res* 2023; 15: 531–538
- [57] Kern K, Mertineit C-L, Brinkmann R, et al. Expression of heat shock protein 70 and cell death kinetics after different thermal impacts on cultured retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2018; 170: 117–126. doi:10.1016/j.exer.2018.02.013
- [58] Inagaki K, Ohkoshi K, Ohde S, et al. Subthreshold Micropulse Photocoagulation for Persistent Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion including Best-Corrected Visual Acuity Greater Than 20/40. *J Ophthalmol* 2014; 2014: 251257. doi:10.1155/2014/251257
- [59] Iwami H, Pruessner J, Shiraki K, et al. Protective effect of a laser-induced sub-lethal temperature rise on RPE cells from oxidative stress. *Exp Eye Res* 2014; 124: 37–47. doi:10.1016/j.exer.2014.04.014
- [60] De Cillà S, Vezzola D, Farruggio S, et al. The subthreshold micropulse laser treatment of the retina restores the oxidant/antioxidant balance and counteracts programmed forms of cell death in the mice eyes. *Acta Ophthalmol* 2019; 97: e559–e567. doi:10.1111/aos.13995

- [61] Amirkavei M, Plastino F, Kvanta A, et al. Hormetic Heat Shock Enhances Autophagy through HSF1 in Retinal Pigment Epithelium Cells. *Cells* 2022; 11: 1778. doi:10.3390/cells11111778
- [62] Arrhenius S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1889; 4U: 226–248. doi:10.1515/zpch-1889-0416
- [63] Baade A, von der Burchard C, Lawin M, et al. Power-controlled temperature guided retinal laser therapy. *J Biomed Opt* 2017; 22: 1–11. doi:10.1117/1.JBO.22.11.118001
- [64] Seifert E, Sonntag SR, Kleingarn P, et al. Investigations on Retinal Pigment Epithelial Damage at Laser Irradiation in the Lower Microsecond Time Regime. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021; 62: 32. doi:10.1167/iovs.62.3.32
- [65] Kaymak H, Funk S, Fricke A, et al. Efficacy of nanosecond laser treatment in central serous chorioretinopathy with and without atrophy of retinal pigment epithelium. *Int J Retina Vitreous* 2020; 6: 11. doi:10.1186/s40942-020-00214-3
- [66] Elsner H, Pörksen E, Klatt C, et al. Selective retina therapy in patients with central serous chorioretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244: 1638–1645. doi:10.1007/s00417-006-0368-5
- [67] Roider J, Michaud NA, Flotte TJ, et al. Response of the retinal pigment epithelium to selective photocoagulation. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 1786–1792. doi:10.1001/archopht.1992.01080240126045
- [68] Richert E, Koinzer S, Tode J, et al. Release of Different Cell Mediators During Retinal Pigment Epithelium Regeneration Following Selective Retina Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59: 1323–1331. doi:10.1167/iovs.17-23163
- [69] Büttner M, Luger B, Abou Moulig W, et al. Selective retina therapy (SRT) in patients with therapy refractory persistent acute central serous chorioretinopathy (CSC): 3 months functional and morphological results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2021; 259: 1401–1410. doi:10.1007/s00417-020-04999-9
- [70] Birngruber R, Gabel VP, Hillenkamp F. Experimental studies of laser thermal retinal injury. *Health Phys* 1983; 44: 519–531. doi:10.1097/00004032-198305000-00006
- [71] Park YG, Kim JR, Kang S, et al. Safety and efficacy of selective retina therapy (SRT) for the treatment of diabetic macular edema in Korean patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016; 254: 1703–1713. doi:10.1007/s00417-015-3262-1
- [72] Yamamoto M, Miura Y, Hirayama K, et al. Predictive factors of outcome of selective retina therapy for diabetic macular edema. *Int Ophthalmol* 2020; 40: 1221–1232. doi:10.1007/s10792-020-01288-6
- [73] Yamamoto M, Miura Y, Hirayama K, et al. Comparative Treatment Study on Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion by Intravitreal Ranibizumab with and without Selective Retina Therapy. *Life (Basel)* 2023; 13: 769. doi:10.3390/life13030769
- [74] 2 Nebenwirkungen der Angiografie und Behandlung des anaphylaktischen Schocks. 2010. Aufl. Thieme Verlag; 2010



- [75] Seifert E, Tode J, Pielen A, et al. Selective retina therapy: toward an optically controlled automatic dosing. *J Biomed Opt* 2018; 23: 1–12. doi:10.1117/1.JBO.23.11.115002
- [76] Cox G.: *Optical Imaging Techniques*, S. 29-37, S. 195-209, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, USA (2007).
- [77] Schweitzer D, Kolb A, Hammer M. Autofluorescence lifetime measurements in images of the human ocular fundus. In: Papazoglou TG, Wagnieres GA, Hrsg. . Munich, Germany; 2001: 29–39
- [78] Sauer L, Andersen KM, Dysli C, et al. Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *J Biomed Opt* 2018; 23: 1–20. doi:10.1117/1.JBO.23.9.091415
- [79] Dysli C., Zinkernagel M., Wolf S.: *The Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscope*. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 17-21, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019).
- [80] Han: International electrotechnical commission - Google Scholar. . Im Internet: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=IEC+International+Electrotechnical+Commission.+Standard+60825%E2%80%9331:2007&publication\\_year=2014&Stand:17.04.2024](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=IEC+International+Electrotechnical+Commission.+Standard+60825%E2%80%9331:2007&publication_year=2014&Stand:17.04.2024)
- [81] American National Standards Institute, Laser Institute of America. *American National Standard for safe use of lasers: approved March 16, 2007*. Orlando, FL: The Laser Institute of America; 2007
- [82] Kandori H, Sasabe H, Mimuro M. Direct Determination of a Lifetime of the S<sub>2</sub> State of .beta.-Carotene by Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 2671–2672. doi:10.1021/ja00085a078
- [83] Sauer L, Schweitzer D, Ramm L, et al. Impact of Macular Pigment on Fundus Autofluorescence Lifetimes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 4668. doi:10.1167/iovs.14-15335
- [84] Miura Y, Bernstein PS, Dysli C, et al. Fluorophores in the Eye. In: Zinkernagel M, Dysli C, Hrsg. *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Cham: Springer International Publishing; 2019: 35–48
- [85] Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, et al. Towards metabolic mapping of the human retina. *Microsc Res Tech* 2007; 70: 410–419. doi:10.1002/jemt.20427
- [86] Yakovleva MA, Feldman TB, Arbukhanova PM, et al. The fluorescence lifetime of lipofuscin granule fluorophores contained in the retinal pigment epithelium cells from human cadaver eyes in normal state and in the case of visualized pathology. *Dokl Biochem Biophys* 2017; 474: 239–243. doi:10.1134/S1607672917030231
- [87] Warburton S, Davis WE, Southwick K, et al. Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. *Mol Vis* 2007; 13: 318–329
- [88] Kalinina S, Freymueller C, Naskar N, et al. Bioenergetic Alterations of Metabolic Redox Coenzymes as NADH, FAD and FMN by Means of Fluorescence Lifetime Imaging Techniques. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 5952. doi:10.3390/ijms22115952

- [89] Vogel A, Dlugos C, Nuffer R, et al. Optical properties of human sclera, and their consequences for transscleral laser applications. *Lasers Surg Med* 1991; 11: 331–340. doi:10.1002/lsm.1900110404
- [90] Meredith P, Riesz J. Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 211–216. doi:10.1562/0031-8655(2004)079<0211:rcrqyf>2.0.co;2
- [91] Miura Y, Huettmann G, Orzekowsky-Schroeder R, et al. Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 3366–3377. doi:10.1167/iovs.13-11808
- [92] Schenke-Layland K. Non-invasive multiphoton imaging of extracellular matrix structures. *J Biophotonics* 2008; 1: 451–462. doi:10.1002/jbio.200810045
- [93] Yakimov BP, Gogoleva MA, Semenov AN, et al. Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis [Invited]. *Biomed Opt Express* 2019; 10: 4220–4236. doi:10.1364/BOE.10.004220
- [94] Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism* 1998; 47: 1348–1353. doi:10.1016/s0026-0495(98)90303-1
- [95] Schweitzer D, Deutsch L, Klemm M, et al. Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in type 2 diabetic patients who have no signs of diabetic retinopathy. *J Biomed Opt* 2015; 20: 061106. doi:10.1117/1.JBO.20.6.061106
- [96] Kubota N, Kempaska J, Shima K, et al. Fluorescence lifetime of ex-vivo retinal pigment epithelium in the state of enhanced mitochondrial uncoupling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2022; 63: 2471-F0178
- [97] Kempaska J, Enzian P, Shima K, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy to assess energy metabolism of cultured retinal pigment epithelial cells under serum deprivation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2023; 64: 2091
- [98] Sonntag SR, Klein B, Brinkmann R, et al. Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy of Mouse Models of Age-related Macular Degeneration. *Transl Vis Sci Technol* 2024; 13: 24. doi:10.1167/tvst.13.1.24
- [99] Sauer L, Gensure RH, Andersen KM, et al. Patterns of Fundus Autofluorescence Lifetimes In Eyes of Individuals With Nonexudative Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59: AMD65–AMD77. doi:10.1167/iovs.17-23764
- [100] Dysli C. und Sauer L.: Age-Related Macular Degeneration. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 57-64, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019).
- [101] Sonntag SR, Seifert E, Hamann M, et al. Fluorescence Lifetime Changes Induced by Laser Irradiation: A Preclinical Study towards the Evaluation of Retinal Metabolic States. *Life (Basel)* 2021; 11: 555. doi:10.3390/life11060555

- [102] Richert E, Papenkort J, Von Der Burchard C, et al. Selective retina therapy and thermal stimulation of the retina: different regenerative properties - implications for AMD therapy. *BMC Ophthalmol* 2021; 21: 412. doi:10.1186/s12886-021-02188-8
- [103] Sonntag SR, Hamann M, Seifert E, et al. Detection sensitivity of fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy for laser-induced selective damage of retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2024; doi:10.1007/s00417-024-06449-2
- [104] Koinzer S, Saeger M, Hesse C, et al. Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits. *Acta Ophthalmol* 2013; 91: e603-611. doi:10.1111/aos.12188
- [105] Framme C, Roider J, Brinkmann R, et al. Grundlagen und klinische Anwendung der Lasertherapie an der Netzhaut. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008; 225: 259–268. doi:10.1055/s-2008-1027202
- [106] Wojtkowski M, Srinivasan VJ, Ko TH, et al. Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation. *Opt Express, OE* 2004; 12: 2404–2422. doi:10.1364/OPEX.12.002404
- [107] Koinzer S, Schlott K, Portz L, et al. Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *Journal of Biophotonics* 2012; 5: 889–902. doi:10.1002/jbio.201200091
- [108] Framme C, Roider J. Fundus-autofluorescence after conventional mild laser photocoagulation in diabetic retinopathy. In: *INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE*. BETHESDA: ASSOC RESEARCH VISION OPHTHALMOLOGY INC; 2000: S655
- [109] Framme C, Schüle G, Brinkmann R, et al. Fundus-Autofluoreszenz nach selektiver RPE-Laserbehandlung. *Der Ophthalmologe* 2002; 99: 854–860. doi:10.1007/s00347-002-0684-z
- [110] Sauer L, Vitale AS, Milliken CM, et al. Autofluorescence Lifetimes Measured with Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO) Are Affected by Age, but Not by Pigmentation or Gender. *Transl Vis Sci Technol* 2020; 9: 2. doi:10.1167/tvst.9.9.2
- [111] Dysli C, Dysli M, Wolf S, et al. Fluorescence lifetime distribution in phakic and pseudophakic healthy eyes. *PLoS One* 2023; 18: e0279158. doi:10.1371/journal.pone.0279158
- [112] Neumann J, Brinkmann R. Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *J Biomed Opt* 2005; 10: 024001. doi:10.1117/1.1896969
- [113] Neumann J, Brinkmann R. Nucleation dynamics around single microabsorbers in water heated by nanosecond laser irradiation. *Journal of Applied Physics* 2007; 101: 114701. doi:10.1063/1.2740348
- [114] Brinkmann R, Hüttmann G, Rögner J, et al. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers Surg Med* 2000; 27: 451–464. doi:10.1002/1096-9101(2000)27:5<451::AID-LSM1006>3.0.CO;2-1
- [115] Neumann J, Brinkmann R. Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *J Biomed Opt* 2006; 11: 041112. doi:10.1117/1.2339815

- [116] Framme C, Schuele G, Roeder J, et al. Influence of pulse duration and pulse number in selective RPE laser treatment. *Lasers Surg Med* 2004; 34: 206–215. doi:10.1002/lsm.20022
- [117] Schuele G, Rumohr M, Huettmann G, et al. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the microsecond-to-millisecond time regimen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 714–719. doi:10.1167/iovs.04-0136
- [118] Burri C, Al-Nawaiseh S, Wakili P, et al. Selective Large-Area Retinal Pigment Epithelial Removal by Microsecond Laser in Preparation for Cell Therapy. *Trans Vis Sci Tech* 2021; 10: 17. doi:10.1167/tvst.10.10.17
- [119] Hutfilz A, Sonntag SR, Lewke B, et al. Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy of the Retinal Pigment Epithelium During Wound Healing After Laser Irradiation. *Transl Vis Sci Technol* 2019; 8: 12. doi:10.1167/tvst.8.5.12
- [120] Dysli C, Wolf S, Zinkernagel MS. Autofluorescence Lifetimes in Geographic Atrophy in Patients With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: 2479–2487. doi:10.1167/iovs.15-18381
- [121] Nakashima N, Yoshihara K, Tanaka F, et al. Picosecond fluorescence lifetime of the coenzyme of D-amino acid oxidase. *J Biol Chem* 1980; 255: 5261–5263
- [122] Walsh AJ, Cook RS, Manning HC, et al. Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, subtypes, and early-treatment response in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 6164–6174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0527
- [123] Meleshina AV, Dudenkova VV, Bystrova AS, et al. Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 15. doi:10.1186/s13287-017-0484-7
- [124] Alam SR, Wallrabe H, Svindrych Z, et al. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci Rep* 2017; 7: 10451. doi:10.1038/s41598-017-10856-3
- [125] Skala M, Ramanujam N. Multiphoton redox ratio imaging for metabolic monitoring in vivo. *Methods Mol Biol* 2010; 594: 155–162. doi:10.1007/978-1-60761-411-1\_11
- [126] Lavaud A, Soukup P, Martin L, et al. Spectral Domain Optical Coherence Tomography in Awake Rabbits Allows Identification of the Visual Streak, a Comparison with Histology. *Transl Vis Sci Technol* 2020; 9: 13. doi:10.1167/tvst.9.5.13
- [127] Dysli C, Berger L, Wolf S, et al. FUNDUS AUTOFLUORESCENCE LIFETIMES AND CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY. *Retina* 2017; 37: 2151–2161. doi:10.1097/IAE.0000000000001452
- [128] Zernii EY, Baksheeva VE, Iomdina EN, et al. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016; 15: 267–291. doi:10.2174/1871527315666151110124957
- [129] Peiffer RL, Pohm-Thorsen L, Corcoran K. Models in Ophthalmology and Vision Research. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Elsevier; 1994: 409–433
- [130] Durairaj C, Chastain JE, Kompella UB. Intraocular distribution of melanin in human, monkey, rabbit, minipig and dog eyes. *Exp Eye Res* 2012; 98: 23–27. doi:10.1016/j.exer.2012.03.004

- [131] Yamashita K, Wakabayashi T, Adachi K. Visualization of Mitochondria and Some Other Cytoplasmic Structures in Hematoxylin-eosin Stained Sections by Fluorescence Microscopy. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 1986; 63: 311–321. doi:10.2535/ofaj1936.63.5\_311
- [132] Koinzer S, Hesse C, Caliebe A, et al. Photocoagulation in rabbits: Optical coherence tomographic lesion classification, wound healing reaction, and retinal temperatures. *Lasers Surg Med* 2013; 45: 427–436. doi:10.1002/lsm.22163

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Anti-VEGF	Anti-vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
bzw.	beziehungsweise
BM	Bruchmembran
ca.	circa
EZ	Ellipsoide Zone
FA	Fluoreszenzangiographie
FAD	Oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
(F)AF	(Fundus)Autofluoreszenz
FADH	Reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FC	Funduskamera
FLD	Fluoreszenzlebensdauer
FLIO	Fluorescence Lifetime Imaging Ophtalmoscopy
FMN	Flavinmononukleotid
HE	Hämatoxylin-Eosin
LSC	Long Spectrum Channel
OCT	Optische Kohärenztomographie
p	Signifikanzwert
RPE	Retinales Pigmentepithel
SSC	Short Spectrum Channel
SL	Spaltlampe
TCSP	Time-correlated single photon counting

## 9 Auswertung der FLIO-Ergebnisse mittels SPImage (Version 8.5)

1. Einzelne Bilder importieren (File → Import)

2. Für jeden Channel Einstellungsparameter manuell auswählen oder über *conditions* → *equalize channels* angleichen:

a) Intensity-Parameter (Options → Intensity):

- Lifetime Image: Brightness and Contrast auf 100%

b) Preferences-Parameter (Options → Preferences):

- Deaktivieren von *Individual channel settings for binning and position*

c) Model-Parameter (*Option* → *Model*):

- *Incomplete Multiexponentials* (Repetition Time Laser: 12,5 ns)

3. Weitere Parameter:

- Components: 2
- Offset: default
- Pixel Pos. Zentral im Bereich einer Probe:
- Bin: 1
- automatic threshold

b. Alle Bilder inkl. beider Channel sowie Model überprüfen

c. Berechnung (*Calculate* → *Decay Matrix (all channels)*)

4. Anpassung der Intervallskalierung des Histogramms (Options -> Color -> Min und Max)

5. Rahmen so ziehen, dass alle Zellproben im Bild sind

6. Bilder berechnen lassen (calculate → decay matrix(all channels))

7. Img. Datei erstellen (*File*->*Save*)

8. Daten exportieren:

(*File* → *Export* → Parameter\* auswählen -> Export all channels in eigenen Ordner "Export")

\*Benötigte Parameter:

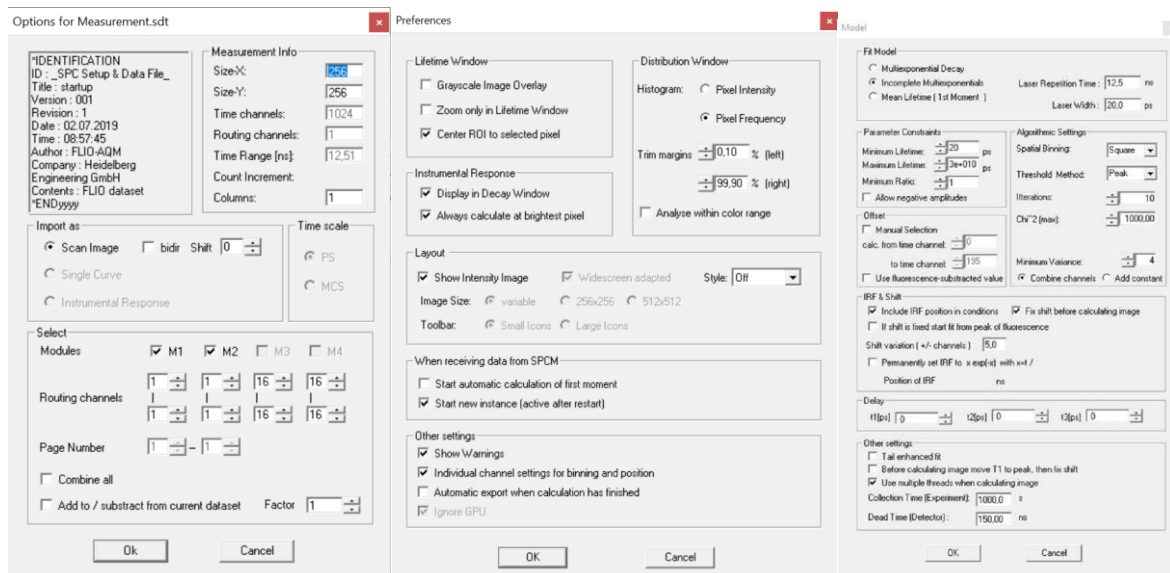
- Color coded value
- t1, a1[%], t2, a2 [%]
- Shift, Chi
- IRF, Distribution, ROI
- Color Coded Image + Legend (Format TIF), Gray-Sacle-Image

9. Import der ASC-Datei "color coded value" mit Fiji (ImageJ 1.52n)

10. Auswahl eines Explantats mittels eines kreisförmigen Auswahlwerkzeugs

11. Bestimmung des Mittelwerts in dem ausgewählten Bereich (analyze →measure)  
Wert „mean“ zeigt mittlere FLD an

12. Wiederholung dieses Vorgangs für beide Spektralkanäle aller Messungen. Durch den Import der ASC-Dateien t1, t2, a1[%] und a2[%] können die Mittelwerte der einzelnen Komponenten  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , a1 und a2 bestimmt werden.



**Abbildung 33.** Startoptionen sowie die Einstellungen von *preferences* und *model*. Quelle: Screenshot BMO Lübeck



## 10 Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Doktormutter Privatdozentin Yoko Miura für die Möglichkeit und das Vertrauen, diese Doktorarbeit in der Klinik für Augenheilkunde an der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Herrn Prof. Grisanti durchgeführt zu haben.

Yoko, deine Betreuung und Unterstützung zu jeglichen Tages- und Nachtzeiten – sogar aus dem Flugzeug heraus - suchen ihresgleichen. Du hast mich für das Fach Augenheilkunde und die Forschung begeistert. Ich hoffe, dass wir weiterhin in gemeinsamen Forschungsprojekten unseren Beitrag für die Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie in der Augenheilkunde leisten können. ありがとう !

Vielen Dank auch an den Rest der AG Miura mit Privatdozentin Svenja Sonntag und Doktor Eric Seifert, die mich gut aufgenommen haben und für Rückfragen immer zur Verfügung standen. Ferner ein großes Dankeschön an Christine Örün, die mich in die Arbeit im Labor für experimentelle Ophthalmologie eingewiesen hat, um die Histologie durchzuführen.

Vielen Dank an die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft sowie die AG Young DOG, die mir das Doktorandenstipendium verliehen hat, was mir ermöglichte, die Forschungsarbeit besser mit Studium und Familie zu vereinen.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern für ihren stetigen Rückhalt und ihre uneingeschränkte Hilfe, auf die ich immer bauen konnte und kann und die mir dieses Studium ermöglichten.

Danke an meine alten und neuen Wegbegleiterinnen und Wegbegleiter aus Klinik und Wissenschaft, welche mich stets motivier(t)en. Ein ganz besonderer Dank geht an Jan dafür, dass du trotz deines eh schon so vollen Terminkalenders immer Zeit hattest, meine Arbeit Korrektur zu lesen und mich zu unterstützen!

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie. Meiner Frau und Mutter unserer wunderbaren Töchter, die viel zurückstecken musste und muss, während ich in der Klinik oder auf Kongressen bin und sie alleine alles managen muss(te). Ohne dich, Toya, wäre dies alles hier zu keiner Zeit möglich gewesen. Danke <3

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Information

Name: Maximilian Lukas Johannes Hamann  
Geburtstag: 17.03.1992  
Geburtsort: Erlangen

### Schule und Studium

Abschlüsse: 11/2021: 3. Staatsexamen Humanmedizin (Approbation)  
10/2020: 2. Staatsexamen Humanmedizin  
08/2017: 1. Staatsexamen Humanmedizin  
07/2013: Staatliche Prüfung zum Rettungsassistenten  
07/2011: Abitur  
Studium: 10/2015 – 11/2021 Humanmedizin, Universität zu Lübeck  
Schule: 09/2012 – 07/2013: ASB-Schulen Lauf  
09/2002 – 05/2011: Marie-Therese-Gymnasium Erlangen  
09/1998 – 07/2002: Grundschule Dormitz

### Berufliche Erfahrung

Arzt: seit 01/2022: Assistenzarzt, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. Dr. C. Framme  
Praktisches Jahr: 06/2021 – 10/2021: Klinik für Pneumologie MHH, Prof. Dr. Welte sowie Klinik für Kardiologie und Angiologie MHH, Prof. Dr. Bauersachs  
03/2021 – 06/2021: Klinik für Herz-Thorax-Gefäßchirurgie MHH, Prof. Dr. Haverich sowie Klinik für Allgemein- und Transplantationschirurgie MHH, Prof. Dr. Klempnauer  
11/2020 – 03/2021: Klinik für Augenheilkunde UKSH Lübeck, Prof. Dr. Grisanti  
Famulaturen: 08/2019 – 09/2019: Klinik für Psychiatrie UKSH Lübeck, Prof. Dr. Junghanns  
08/2019: Klinik für Augenheilkunde UKSH Lübeck, Prof. Dr. Grisanti  
08/2018 – 09/2018: Kinderärzte im Südstadtforum Hannover, Dres. Bömeke, Mack, Schott  
03/2018 – 04/2018: Unfallchirurgie Diakovere Friederikenstift Hannover BG Klinik Hamburg, Prof. Dr. Lill  
Schlaflabor: 11/2017 – 01/2021: Schlaflabor der Psychiatrie UKSH Lübeck  
OP-Assistenz: 10/2018 – 01/2021: Allgemeinchirurgie UKSH Lübeck, Prof. Dr. Keck  
01/2014 – 01/2019: Kompetenzzentrum für Wirbelsäulen- und Hypophysenchirurgie Nürnberg, PD Dr. Böhm  
Rettungsassistent: 10/2014 – 07/2015: ASB Notfallhilfe Erlangen  
Pflegepraktikum: 07/2012 – 08/2012: Kinderorthopädie Waldkrankenhaus, Erlangen  
04/2012 – 05/2012: Sanitätszentrum der Bundeswehr, Flensburg

## **Zeitraum der Dissertation**

Oktober 2020 – August 2024

## **Publikationen**

1. Sonntag SR, Seifert E, **Hamann M**, Lewke B, Theisen-Kunde D, Grisanti S, Brinkmann R, Miura Y. Fluorescence Lifetime Changes Induced by Laser Irradiation: A Preclinical Study towards the Evaluation of Retinal Metabolic States. *Life (Basel)*. 2021 Jun 13;11(6):555. doi: 10.3390/life11060555. PMID: 34199212; PMCID: PMC8231852.
2. Framme C, Book B, Hufendiek K, Panidou-Marschelke E, Sinicin E, Lindziute M, Rauscher J, **Hamann M**, Agostini H, Gabel-Pfisterer A. Spektrum von Feuerwerksverletzungen an einer Universitäts-Augenklinik nach dem COVID-19-Lockdown [Spectrum of firework injuries at a university eye clinic after the COVID-19 lockdown]. *Ophthalmologie*. 2023 Oct 10. German. doi: 10.1007/s00347-023-01927-0. Epub ahead of print. PMID: 37815541.
3. Howaldt A, **Hamann M**, Hohberger B, Schnichels S. Leadership aus Sicht des ophthalmologischen Nachwuchses [Leadership from the perspective of next generation ophthalmologists]. *Ophthalmologie*. 2023 Sep;120(9):898-905. German. doi: 10.1007/s00347-023-01913-6. Epub 2023 Aug 15. PMID: 37582890.
4. Sonntag SR, **Hamann M**, Seifert E, Grisanti S, Brinkmann R, Miura Y. Detection sensitivity of fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy for laser-induced selective damage of retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2024 Apr 8. doi: 10.1007/s00417-024-06449-2. Epub ahead of print. PMID: 38587656.

## **Wissenschaftliche Preise**

2021: DOG- Doktorandenstipendium

2019: DOG- Reisestipendium

## **Sprachkenntnisse**

Deutsch – Muttersprache

Englisch – fließend in Wort und Schrift

Latein - verhandlungssicher