

**Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Jost Hillenkamp**

**Quantitative Fundusautofluoreszenz bei systemischer (Hydroxy-)Chloroquin  
Therapie: ein Jahr follow-up.**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Victoria Radun

**aus Landau (Pfalz)**

**Würzburg, Februar 2023**



**Referent: Privatdozent Dr. Thomas Ach**

**Korreferent/Korreferentin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara Braunger**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2024**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. Anatomie und Physiologie der Retina</b> .....	1
1.1.1. Aufbau der Retina .....	1
1.1.2. Aufbau und Funktion des RPE .....	1
1.1.3. Photorezeptoren .....	3
1.1.4. Sehzyklus/Phototransduktion .....	4
<b>1.2. Chloroquin (CQ) und Hydroxychloroquin (HCQ)</b> .....	5
1.2.1. Allgemeine Pharmakologie .....	5
1.2.2. Metabolismus und Pharmakokinetik .....	6
1.2.3. Nebenwirkungen .....	8
<b>1.3. Bull's-Eye Makulopathie</b> .....	8
1.3.1. Definition und Prävalenz .....	8
1.3.2. Pathomechanismus .....	9
1.3.3. Risikofaktoren für die Entwicklung einer BEM .....	10
<b>1.4. Screeningverfahren</b> .....	12
1.4.1. Leitlinie der AAO .....	12
1.4.2. Etablierte Untersuchungstechniken .....	13
1.4.3. Quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF) .....	15
<b>1.5. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	18
<b>2.1. Studiendesign</b> .....	18
<b>2.2. Patientenkollektiv</b> .....	19
<b>2.3. Studienprotokoll</b> .....	20
2.3.1. Untersuchungsablauf .....	20
2.3.2. Multimodale Fundusaufnahmen .....	23
2.3.3. Berechnung der QAF .....	24
2.3.4. Bildverarbeitung und QAF Analyse .....	25
2.3.5. Analyse der atrophen Zone bei BEM Patientinnen .....	27
2.3.6. Analyse der Netzhautdicke .....	28
<b>2.4. Statistische Auswertung</b> .....	29
<b>3. Ergebnisse</b> .....	30
<b>3.1. Demographische Daten</b> .....	30
<b>3.2. Korrelation der QAF zu anamnestischen Daten</b> .....	32
3.2.1. Korrelation der QAF zu Alter, BMI und Rauchverhalten .....	32

3.2.2. Alterskorrigierte Korrelation der QAF zu Kumulativdosis, Einnahmedauer, Grunderkrankung und Linsentrübung .....	33
3.3. Reproduzierbarkeit der QAF Messungen .....	35
3.4. Zeitliche Entwicklung der QAF (BL zu FU) .....	36
3.4.1. Quantitative Veränderung der QAF .....	36
3.4.2. Segmentale Veränderungen .....	38
3.5. Progression der atrophnen Zone bei BEM Patientinnen .....	40
3.6. Analyse der Netzhautdicke .....	42
4. Diskussion .....	45
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	45
4.2. Aufnahmemethoden und Reproduzierbarkeit .....	46
4.3. Untersuchte Einflussfaktoren auf die QAF .....	47
4.4. Einfluss von CQ/HCQ auf die QAF .....	49
4.5. Verlauf der QAF innerhalb eines Jahres .....	50
4.6. Räumliche Verteilung der QAF-Intensität sowie QAF-Entwicklung .....	51
4.7. Messung der atrophnen Zone bei BEM Patientinnen .....	52
4.8. CQ und OCT Veränderungen in Zusammenhang zur QAF .....	53
4.9. Limitationen, Stärken und Ausblick der Studie .....	54
5. Zusammenfassung .....	56
6. Literaturverzeichnis .....	58
I. Abkürzungsverzeichnis .....	
II. Abbildungsverzeichnis .....	
III Tabellenverzeichnis .....	
IV. Danksagung .....	
V. Lebenslauf .....	
IV. Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen .....	

# **1. Einleitung**

## **1.1. Anatomie und Physiologie der Retina**

### **1.1.1. Aufbau der Retina**

Als innerste Schicht kleidet die Netzhaut den Augapfel aus, wobei hier zwischen einem lichtempfindlichen Teil (Pars optica) und einem unempfindlichen Teil (Pars caeca) unterschieden wird (Lang & Esser, 2008, Kapitel 12.1). Der lichtempfindliche Teil enthält spezialisierte Nervenzellen und Sinneszellen, die dazu dienen, einfallendes Licht in Membranpotentiale umzuwandeln, sie weiter zu verarbeiten und an das Sehzentrum des Gehirns weiterzuleiten (Grehn, 2012, Kapitel 13.1; Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2). Histologisch besteht die Netzhaut aus mehreren Schichten. Von außen nach innen folgen aufeinander das retinale Pigmentepithel (RPE), Photorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, amakrine Zellen und Ganglienzellen. Davon sind die Rezeptorzellen, die Bipolarzellen und die Ganglienzellen hintereinandergeschaltet. Die Horizontalzellen und amakrine Zellen sind sogenannte Interneurone, die Querverknüpfungen bilden; Horizontalzellen bilden Verbindungen zwischen den Photosensoren und amakrine Zellen zwischen den Ganglienzellen (Grehn, 2012, Kapitel 13.1).

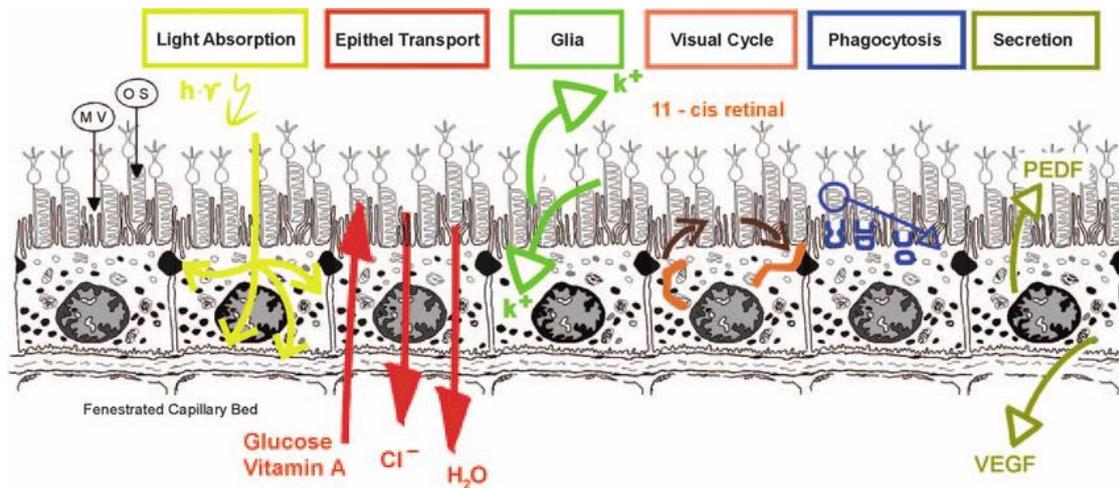
Einfallendes Licht muss zunächst alle Schichten durchdringen, bis es die Außensegmente der Photorezeptoren erreicht bzw. auf das RPE auftrifft und dort absorbiert wird. Durch einen photochemischen Prozess wird das Membranpotential der Photorezeptoren verändert und so die elektrische Information über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet, wo ein Aktionspotential entsteht.

Hierbei kommt es zur initialen Signalverarbeitung durch Konvergenz (d.h. viele Rezeptoren – einige Bipolarzellen - wenige Ganglienzellen) sowie durch inhibitorische Interneurone. Die Axone der Ganglienzellen ziehen zur Papille, dem sog. blinden Fleck, von wo aus sie gemeinsam den N. opticus bilden (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2).

### **1.1.2. Aufbau und Funktion des RPE**

Das RPE besteht aus einer einzelnen Schicht polygonaler Zellen und befindet sich zwischen der Bruch'schen Membran, d.h. der Grenze zur Choroidea, und den Photorezeptorzellen der Netzhaut. Die RPE Zellen sind polar aufgebaut mit einem basalen Anteil, der Mitochondrien enthält und einem apikalen Anteil, der Melanosomen

und Lipofuszin enthält. Die apikalen Mikrovilli umschließen die Außensegmente der Photorezeptoren wie in Abbildung 1 gezeigt (Strauss, 2005).



**Abbildung 1:** Polarer Aufbau und Überblick über die verschiedenen Funktionen des RPE, aus (Strauss, 2005) mit freundlicher Genehmigung via RightsLink. MV: Mikrovilli, OS: Äußere Segmente, PEDF: Pigment epithelium-derived factor, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Die Funktionen des RPE sind vielfältig, Abbildung 1 gibt einen Überblick:

**Lichtabsorption und Schutz vor Sauerstoffradikalen:** Die Photorezeptoren sind durch die Lichtexposition und die sauerstoffreiche Perfusion konstantem photooxidativem Stress ausgesetzt. Das RPE ist einerseits in der Lage, als Lichtfilter zu wirken und Streulicht mit Hilfe von Melanin zu absorbieren, andererseits enthält es enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien zur Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffradikalen (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001).

**Barrierefunktion:** Das RPE bildet die äußere Blut-Retina-Schranke. Tight junctions zwischen den einzelnen Zellen schirmen die Netzhaut vor systemischen Einflüssen ab, wodurch unter anderem das Immunprivileg der Netzhaut zustande kommt.

**Transportfunktion, Ernährung der Photorezeptoren und Sekretion:** Durch basale Einfaltungen im RPE wird der Stoffaustausch mit der Choroidea verbessert, sodass Ionen, Aminosäuren, Glucose und andere Stoffe durch das Zellplasma hin zu den Photorezeptorzellen transportiert werden können. Dies ist einerseits für die Ernährung der Photorezeptoren notwendig, andererseits werden so konstante Umgebungsbedingungen für die Außensegmente geschaffen. Es konnte auch gezeigt werden, dass das RPE

zahlreiche Signalmoleküle, Interleukine und Wachstumsfaktoren sezerniert (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001).

**Phagozytose:** Aufgrund des photooxidativen Stresses müssen die Außensegmente der Photorezeptoren ständig regeneriert werden. Dazu werden die Spitzen über das RPE phagozytiert und degradiert.

**Regeneration von Rhodopsin:** Im Rahmen des Sehzyklus (siehe Kapitel 1.1.4. Sehzyklus/Phototransduktion) wird fortlaufend der Sehfärbstoff Rhodopsin verbraucht und es fällt all-trans Retinal an. Dieses wird vom RPE aufgenommen und zu 11-cis Retinal re-isomerisiert, das mit Opsin erneut zu Rhodopsin verbunden werden kann (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2).

### 1.1.3. Photorezeptoren

Beim Menschen unterscheidet man 2 Arten von Photorezeptoren zur Bilderkennung:

- **Zapfen** für das photopische Sehen (Tag-Sehen und Farbwahrnehmung)
- **Stäbchen** für das skotopische Sehen (Nacht-Sehen) (Grehn, 2012, Kapitel 13.1)

Beide Rezeptortypen sind ähnlich aufgebaut mit dauerhaften Innensegmenten, ständig regenerierenden Außensegmenten und einem Zilium, das beide Teile verbindet. In den Außensegmenten befindet sich jeweils der Sehfärbstoff Rhodopsin (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2).

Insgesamt verfügt die Retina über ca. 120-130 Millionen Photorezeptoren. Davon sind ca. 6 Millionen Zapfen, die sich vor allem im Bereich der Fovea centralis und in angrenzenden Arealen befinden. In der Fovea ist zudem eine enge Verschaltung zu den Ganglienzellen gegeben (teilweise 1:1), um die bestmögliche Auflösung zu ermöglichen. Zapfen müssen insgesamt mit einer höheren Lichtintensität angeregt werden als Stäbchen, wodurch sich die eingeschränkte Farbwahrnehmung bei Nacht erklärt. Durch unterschiedliche Zapfen-Opsine unterscheidet man 3 Zapfentypen, die sich in ihrer spektralen Empfindlichkeitskurve unterscheiden: Das Empfindlichkeitsmaximum für blau liegt bei 414 – 424 nm, für grün bei 522 – 539 nm und für rot bei 549 – 570 nm (Kanski, 2008, Kapitel 1.5.7). Der Farbsinn wird vermittelt durch die Summe der Erregung der verschiedenen Zapfensorten.

Die 120 Millionen Stäbchen des menschlichen Auges befinden sich vor allem in der Peripherie der Netzhaut, am dichtesten bei ca. 30° Exzentrizität. In der Fovea centralis

sind sie gar nicht vorhanden. Sie vermitteln durch ihre stärkere Lichtempfindlichkeit insbesondere das Nacht-Sehen sowie das Gesichtsfeld (Damms, 2014, Kapitel 11.2; Lang & Esser, 2008, Kapitel 12.1).

#### **1.1.4. Sehzyklus/Phototransduktion**

Der Sehzyklus bezeichnet einen Prozess, bei dem in das Auge einfallendes Licht in ein elektrisches Signal in den Photorezeptoren umgewandelt wird.

Unter Ruhebedingungen, d.h. im Dunklen, liegt das Membranpotential der Photorezeptorzellen bei ca. -30 mV. Dementsprechend sind die Photorezeptorzellen im Vergleich zu anderen Körperzellen in Ruhe stärker depolarisiert. Dies lässt sich durch geöffnete zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige Kationentransporter ( $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) erklären, die einen sogenannten Dunkelstrom erzeugen (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2).

Ein Lichtreiz führt durch Schließen der cGMP-abhängigen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer Hyperpolarisation und folglich zu weniger Transmitterausschüttung (Glutamat) in den nachgeschalteten synaptischen Spalt zur Bipolarzelle. Das Sensorpotential wird in den Ganglienzellen dann in eine entsprechende Aktionspotentialfrequenz umgewandelt.

Der Sehfärbstoff Rhodopsin, eine Verbindung aus 11-cis-Retinal und Opsin, ist in großer Menge in flachen Vesikeln im Außensegment der Photorezeptoren enthalten. Trifft Licht auf den Sehfärbstoff, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt:

Im ersten Schritt kommt es zur Photoisomerisierung und Konformationsänderung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal sowie von Rhodopsin zu Meta-Rhodopsin II (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2). Letzteres aktiviert den G-Protein-gekoppelten Komplex Transducin, der wiederum eine Phosphodiesterase aktiviert. Hierdurch wird cGMP vermehrt zu GMP hydrolysiert und die intrazelluläre Konzentration von cGMP sinkt. Die cGMP-abhängigen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle schließen, es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle. Dadurch wird weniger Glutamat ausgeschüttet und das Potential der nachgeschalteten Neurone verändert sich. Der Kreislauf schließt sich, da eine niedrige cGMP Konzentration zur Enthemmung der Guanylatzyklase führt und erneut cGMP gebildet wird (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2).

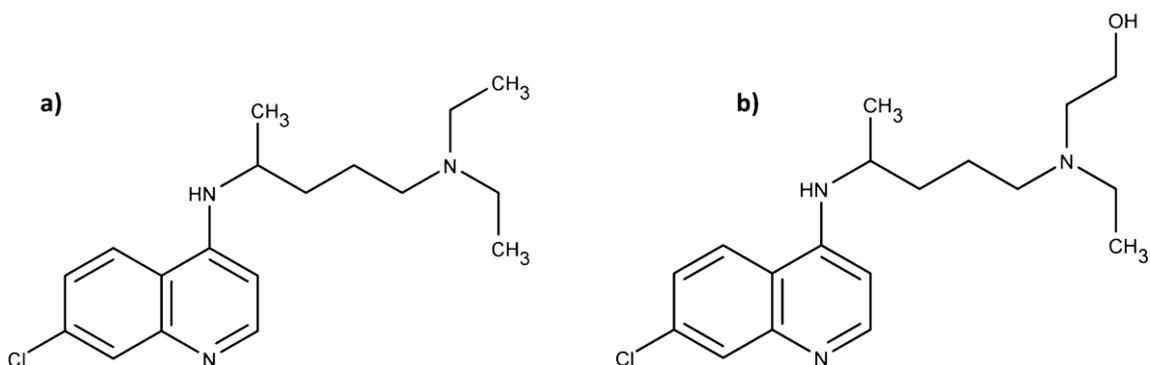
Das entstandene all-trans Retinal wird vom retinalen Pigmentepithel aufgenommen und zu 11-cis Retinal re-isomerisiert (Huppelsberg, 2013, Kapitel 17.2). Anschließend wird

es zurück in die Rezeptorzelle geschleust und kann dort wieder mit Opsin zu Rhodopsin verbunden werden. In Zapfen findet derselbe biochemische Prozess statt, jedoch mit sogenannten Zapfen-Opسينen, die andere Sensitivitätsspektren aufweisen (Lang & Esser, 2008, Kapitel 12.1).

## 1.2. Chloroquin (CQ) und Hydroxychloroquin (HCQ)

### 1.2.1. Allgemeine Pharmakologie

Die beiden Medikamente CQ (Resochin®) und HCQ (Quensyl®) gehören zu den Aminochinolinderivaten und agieren als lipophile Basen. Sie unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur durch eine zusätzliche OH-Gruppe des HCQ wie in Abbildung 2 dargestellt (Schroeder & Gerber, 2014).



**Abbildung 2:** Chemische Strukturformel der Wirkstoffe a) Chloroquin (CQ) und b) Hydroxychloroquin (HCQ), aus (Schroeder & Gerber, 2014b) mit freundlicher Genehmigung via RightsLink.

Der Wirkmechanismus beider Medikamente ist bisher nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die beiden Wirkstoffe sich in vielen Körperzellen und insbesondere im sauren Milieu lysosomaler Vesikel anreichern. Es wird angenommen, dass sie durch die Hemmung lysosomaler Enzyme die Proteolyse von aufgenommenen Antigenen in Antigen-präsentierenden Zellen stören, was zu einer abgeschwächten T-Zellstimulation führt. Die entzündungshemmende Funktion wird darauf zurückgeführt, dass es ebenso zu einer Anreicherung in Lysosomen von Entzündungszellen kommt und so deren Funktion geschwächt wird (Graefe & Lutz, 2016, Kapitel 5.2.4; Herdegen, 2020, Kapitel 19.3.6; Wehling, 2011, Kapitel 5.1).

Der Einsatzbereich von CQ und HCQ ist vielfältig. Ursprünglich wurden beide Medikamente zur Malariaphylaxe und -therapie eingesetzt. Eine weitere Indikation besteht in Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie beispielsweise die rheumatoide Arthritis (RA), verschiedene Kollagenosen und der systemische Lupus erythematoses (SLE) (Herdegen, 2020, Kapitel 19.3.6).

CQ wird mit einer Einzeldosis von  $<3.5\text{mg/kg}$  Idealgewicht und einer Tagesdosis von maximal  $4\text{ mg/kg}$  verabreicht. Für HCQ beträgt die Einzeldosis  $<5\text{-}6\text{ mg/kg}$  Idealgewicht und maximal  $6.5\text{ mg/kg/Tag}$  (Graefe & Lutz, 2016, Kapitel 5.2.4). Bevor die Wirkung der Substanzen auf rheumatoide Erkrankungen evaluiert werden kann, muss meist eine Vorlaufzeit von bis zu 6 Monaten eingehalten werden.

### **1.2.2. Metabolismus und Pharmakokinetik**

Sowohl CQ als auch HCQ werden oral verabreicht und im oberen Gastrointestinal-Trakt resorbiert. Auf diese Weise erreichen sie eine Bioverfügbarkeit von ca. 85 %. Die Biotransformation in die aktiven Metabolite erfolgt in der Leber über Cytochrom P450 Enzyme.

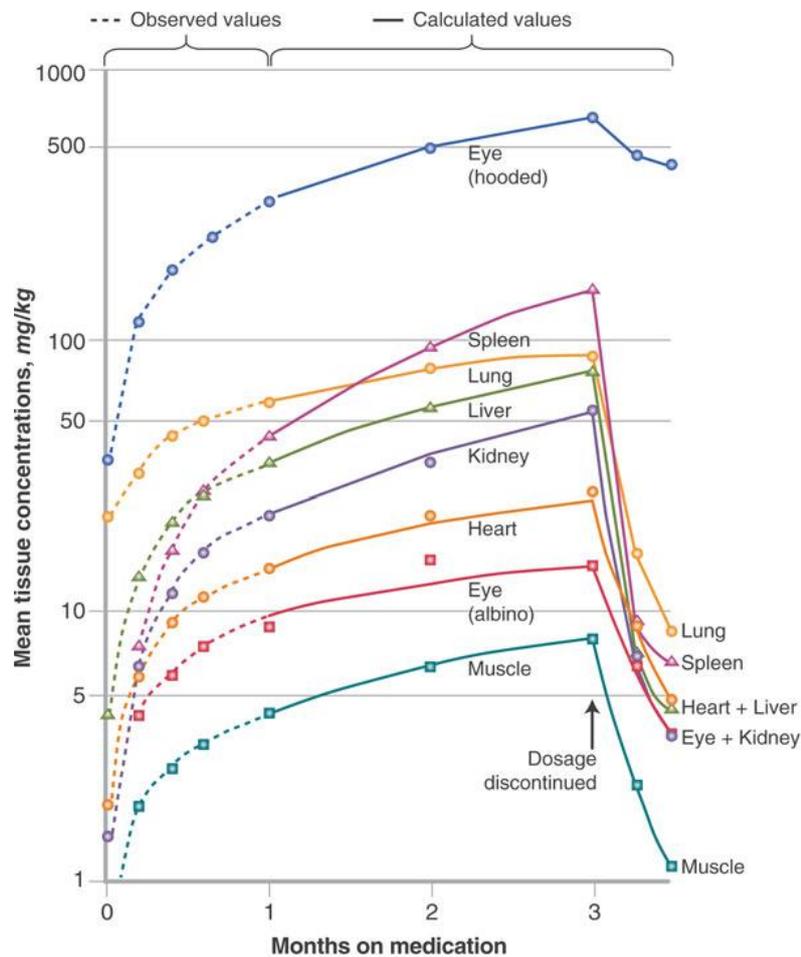
Dort wird CQ in Desethylchloroquin und HCQ zu etwa gleichen Teilen in Desethylhydroxychloroquin und in Desethylchloroquin umgewandelt. Im nächsten Schritt der Biotransformation entsteht aus beiden aktiven Metaboliten Bisdesethylchloroquin (McChesney, 1983; Schrezenmeier & Dörner, 2020).

Aufgrund des Metabolismus über die Leber haben insbesondere lebertoxische Arzneimittel ein hohes Interaktionspotential mit CQ und HCQ. Dazu zählen beispielsweise Glucocorticoide, MAO-Hemmer, Methotrexat und verschiedene Antibiotika (Herdegen, 2020, Kapitel 19.3.6).

Die Ausscheidung der unveränderten Wirkstoffe sowie der aktiven Metabolite geschieht zu 40-60 % über die Niere, wobei die renale Elimination umso größer ist, je saurer der Urin ist. Weitere 8-25 % der Wirkstoffe und Metabolite werden über Fäzes und 5 % durch die Haut eliminiert. Ein Anteil von 25-45 % wird in (bevorzugt melaninhaltigem) Gewebe gespeichert (Browning, 2014; Gustafsson et al., 1983; Mackenzie, 1983; McChesney, 1983; Tett, Cutler, Day, & Brown, 1988).

Die durchschnittliche Halbwertszeit beider Wirkstoffe im Gewebe beträgt etwa 40 Tage, wobei es je nach Gewebeart deutliche Unterschiede gibt. Im Tierversuch mit Ratten

wurde die in Abbildung 3 gezeigte Gewebeverteilung für HCQ gefunden (McChesney, 1983).



**Abbildung 3:** Konzentrationsabhängige Gewebeverteilung von CQ/HCQ in Ratten, aus (Browning, 2014), mit freundlicher Genehmigung via RightsLink.

Den Tieren wurden tägliche Dosen von 40 mg/kg CQ für 3 Monate über eine Magensonde verabreicht. Eine Gewebeanalyse erfolgte nach der Opferrung von 4 Tieren nach jeweils 30 Tagen. Es wurde Gewebe von Albinoratten mit Gewebe von normal pigmentierten Ratten verglichen und ein signifikanter Unterschied bei der CQ/HCQ Konzentration im Auge gefunden. Bei Albinoratten reichert sich der Wirkstoff dort ähnlich wie im übrigen Gewebe an, während normal pigmentierte Rattenaugen eine etwa 50-fach höhere HCQ-Konzentration erreichen. Dies wurde durch die Fähigkeit von CQ/HCQ, an Melanin zu binden, erklärt. CQ scheint verglichen mit HCQ eine höhere Affinität zur Bindung an (synthetisch gewonnenes) Melanin zu haben (Schroeder & Gerber, 2014). CQ/HCQ

bleibt lange im menschlichen Gewebe erhalten; noch bis zu 5 Jahren nach der letzten Einnahme konnten CQ und dessen Metaboliten im Urin von Probanden und Probandinnen gemessen werden (Rubin, Bernstein, & Zvaifler, 1963).

### **1.2.3. Nebenwirkungen**

Am häufigsten treten nach Einnahme von CQ/HCQ gastrointestinale Nebenwirkungen auf wie z.B. Übelkeit und Diarrhö. Seltener kann es auch zu zentralnervösen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Schwindel und Parästhesien oder dermatologischen Nebenwirkungen wie Pruritus und Exanthenen kommen.

Bei den okulären Nebenwirkungen unterscheidet man zwischen der reversiblen Einlagerung der Substanz in die Linse und Hornhaut und der irreversiblen Zerstörung der Photorezeptoren und des RPEs mit resultierender Bulls-Eye-Makulopathie (BEM) (Graefe & Lutz, 2016, Kapitel 5.2.4; Herdegen, 2020, Kapitel 19.3.6; Karow, 2020, Kapitel 9.5.4).

Letztere ist die schwerwiegendste Nebenwirkung der Medikamente und kann im Verlauf zu einem dauerhaften Visusverlust führen. Der vermutete zugrundeliegende Pathomechanismus wird in Kapitel 1.3.2. Pathomechanismus) detailliert diskutiert.

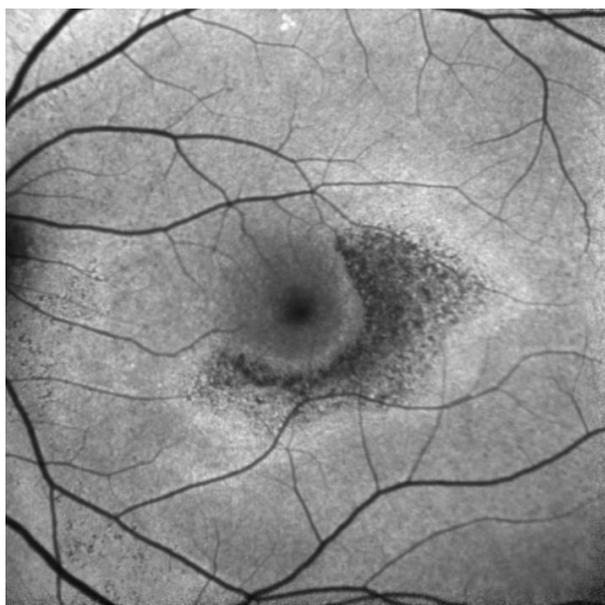
## **1.3. Bull's-Eye Makulopathie**

### **1.3.1. Definition und Prävalenz**

Bisher existiert keine standardisierte Definition der CQ/HCQ Retinopathie (Browning, 2014, Kapitel 4 und 5). Unterschiedliche Studien verwenden derzeit verschiedene eigens definierte Kriterien, was den Vergleich zwischen den Studien erschwert und wodurch sich auch große Unterschiede in der Prävalenz der Erkrankung ergeben (Browning, 2013; Lyons & Severns, 2009; Marmor, Kellner, Lai, Melles, & Mieler, 2016; Marshall et al., 2021; Melles & Marmor, 2014; Singh, Muhieddine, Einstadter, & Ballou, 2019).

Die American Academy of Ophthalmology (AAO) beschreibt das klinische Bild der fortgeschrittenen Toxizität, der sogenannten BEM, als typischerweise bilaterale, parafoveale Depigmentierung des RPE unter Aussparung der Fovea wie in Abbildung 4 gezeigt (Marmor et al., 2016).

Dementsprechend zeigen sich pathologische Befunde im Gesichtsfeld, im multifokalen Elektroretinogramm (mfERG), in der Optischen Kohärenztomographie (OCT) und in den multimodalen Fundusaufnahmen, d.h. den Infrarotaufnahmen (IR), in rotfreien Aufnahmen (RF), den Fundusautofluoreszenz Aufnahmen (FAF) und den quantitativen Fundusautofluoreszenz Aufnahmen (QAF).



*Abbildung 4: Typische FAF-Aufnahme einer BEM mit parafovealer Depigmentierung, 36-jährige Patientin, Visus 20/25, kumulativ 887g HCQ in 9.8 Jahren, Grunderkrankung SLE.*

Das Screening soll helfen, vor allem eine Prä-Makulopathie zu erkennen. Es gibt bisher noch keine einheitliche Definition der Prä-Makulopathie; sie zeichnet sich dadurch aus, dass zwar funktionelle Einschränkungen, jedoch noch keine strukturellen Schäden und eine potentielle Reversibilität bestehen. Letztere wurde anhand einer Metastudie untersucht (Browning, 2014, Kapitel 4).

### **1.3.2. Pathomechanismus**

Der Pathomechanismus, der zu einer BEM durch CQ und HCQ bedingt führt, ist noch nicht abschließend geklärt. Einige potentielle Wirkmechanismen konnten jedoch mittels Zellkulturexperimenten sowie Tierexperimenten nachgewiesen werden.

Die größte Evidenz hat der Effekt von CQ/HCQ auf die Lysosomen der RPE-Zellen. Aufgrund der lipophilen Struktur kann CQ/HCQ in deren Lysosomen hineindiffundieren. Da das Medikament eine schwache Base ist, kann es innerhalb der Lysosomen protoniert

und dadurch dort "gefangen" werden (Ion trapping). Dies führt zu einer Steigerung des pH-Wertes innerhalb der Lysosomen (Normwert: ca. pH 4) und zu einer Reduktion der degradativen Kapazität, da das pH-Optimum für lysosomale Hydrolasen nicht mehr gegeben ist (Sundelin & Terman, 2002). Dadurch wird das RPE in seiner Funktion, die äußeren Segmente der Photorezeptoren zu phagozytieren, gestört. Der Abbau in den Lysosomen funktioniert nicht mehr richtig und es bilden sich vermehrt nicht mehr weiter abbaubare Bisretinoide. Dies ist mit Photorezeptordegradation assoziiert (Jorge, Ung, Young, Melles, & Choi, 2018; Sundelin & Terman, 2002).

Interessanterweise ist HCQ weniger lysosomotrop als CQ und hat gleichzeitig eine geringere Inzidenz der assoziierten Makulopathie (<0.08% vs. 1-2 %) (Sundelin & Terman, 2002).

Ein weiterer in der Literatur diskutierter Pathomechanismus von CQ/HCQ besteht in der Unterbrechung des Sehzyklus (Xu et al., 2016). Dabei wurde in Zellkulturexperimenten nachgewiesen, dass CQ/HCQ einen Transporter für organische Anionen (OATP1A2) inhibiert, der normalerweise das beim Sehzyklus entstehende all-trans-Retinol ins RPE befördern würde. Dadurch kann es nicht im RPE zu 11-cis-Retinal reisomerisiert werden. Es kommt vermutlich zu einem Rückstau von all-trans Retinol und konsekutiv auch von all-trans Retinal. Letzteres bildet in einer Nebenreaktion vermehrt A2E, welches einen Hauptbestandteil vom späteren RPE-Lipofuszin darstellt (Sparrow et al., 2003). Ein Tierexperiment mit Rhesusaffen im Jahr 1978 legt jedoch noch alternative Pathomechanismen nahe (Rosenthal, Kolb, Bergsma, Huxsoll, & Hopkins, 1978). Trotz normaler Funktion und Aussehen der Retina konnte in histologischen Schnitten deutliche pathologische Veränderungen vor allem der Ganglienzellschicht (GCL) gefunden werden. Ebenso konnten in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung eines menschlichen Auges nach jahrelanger CQ/HCQ Therapie Einschlüsse in der GCL gefunden werden. Diese Einschlüsse bestanden aus pathologisch verändertem glatten endoplasmatischem Retikulum (Ramsey & Fine, 1972).

### **1.3.3. Risikofaktoren für die Entwicklung einer BEM**

#### **Tägliche Dosis**

In der Leitlinie des AAO wird eine tägliche Dosis von > 5mg/kg (tatsächliches Körpergewicht) für HCQ und > 2.3 mg/kg (tatsächliches Körpergewicht) für CQ als

Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer BEM festgelegt (Marmor et al., 2016). Dabei ist vor allem die Überdosierung kritisch, da hierdurch in Fallberichten die Inzidenz auf bis zu 25% innerhalb von 2 Jahren steigen kann (Leung, Neal, Wakelee, Sequist, & Marmor, 2015; Navajas et al., 2015).

### **Einnahmedauer**

Ebenso wie die tägliche Dosis spielt die Einnahmedauer bei der Entwicklung einer BEM eine Rolle. Unter Einhaltung der empfohlenen täglichen Maximaldosis von 5 mg/kg/d HCQ beträgt das Risiko innerhalb der ersten 5 Jahre eine Retinopathie zu entwickeln weniger als 1%, innerhalb der ersten 10 Jahre weniger als 2%. Nach ca. 20 Jahren kommt es jedoch zu einem sprunghaften Anstieg des Erkrankungsrisikos auf etwa 20% (Marmor et al., 2016).

### **Kumulative Dosis**

Die kumulative Dosis berechnet sich aus der eingenommenen Dosis/Tag x Zeitraum, über den das Medikament eingenommen wurde. Sie stellt somit keinen eigenständigen Risikofaktor dar, sondern ist der Versuch, die beiden o.g. Risikofaktoren zu vereinen.

### **Nierenfunktionseinschränkung**

Da CQ und HCQ zu einem großen Teil (ca. 60%) über die Niere ausgeschieden werden, kann eine Funktionseinschränkung zur Retention der Metabolite und selbst bei korrekter Dosierung zu höheren Gewebekonzentrationen führen. Besondere Vorsicht ist geboten bei Patienten und Patientinnen mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE), da die Erkrankung häufig mit einer Lupusnephritis einhergeht und demnach die Gefahr einer Überdosierung droht.

### **Tamoxifen**

Ein etwa 5-fach erhöhtes Risiko der Entwicklung einer BEM wurde für die gleichzeitige Einnahme von CQ/HCQ und Tamoxifen gefunden. Es wird eine ungünstige metabolische Synergie vermutet, die tatsächlichen Gründe bleiben jedoch unklar (Marmor et al., 2016).

Risikofaktoren, deren Einfluss bisher nicht sicher belegt werden konnten, sind unter anderem eine bereits bestehende Makulopathie, hohes Alter und Leberfunktionseinschränkungen. In einigen Studien wird eine bereits bestehende Makulopathie zu den eigenständigen Risikofaktoren einer BEM gezählt (Marmor et al., 2016). Einerseits wird die Interpretation der Untersuchungen durch eine bereits bestehende Makulopathie erschwert, andererseits ist es vorstellbar, dass eine bereits geschädigte Netzhaut anfälliger gegenüber einem potentiell toxischen Medikament sein könnte. Weiterhin spielt die Leberfunktion bei der Metabolisierung der Medikamente eine Rolle. Bisher konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen eingeschränkter Leberfunktion und Netzhauttoxizität gefunden werden.

## **1.4. Screeningverfahren**

### **1.4.1. Leitlinie der AAO**

Im Jahr 2016 hat die AAO die bisherigen Empfehlungen zum Screening auf CQ/HCQ-Retinopathie im Angesicht neuer klinischer Daten überarbeitet (Marmor et al., 2016).

#### **Rationale zum Screening**

Die Entwicklung einer CQ/HCQ-Retinopathie ist ein irreversibler, schleichender Prozess, der im Vollbild der BEM mit drastischem Visusverlust enden kann. Selbst nach Absetzen der Medikation wurde teilweise ein Progress der Erkrankung festgestellt. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, frühzeitig die Zeichen der Netzhautschädigung zu erkennen. In diesem Fall kann die Ausbreitung bis zur Fovea verhindert werden und der Visus erhalten bleiben. Durch das Screening kann man also einerseits Netzhautschädigung rechtzeitig erkennen, andererseits ermöglicht es den Patienten und Patientinnen, möglichst lange von den positiven therapeutischen Effekten von CQ und HCQ zu profitieren.

#### **Häufigkeit des Screenings**

Grundsätzlich ist die Häufigkeit eines Screenings auf CQ/HCQ-Retinopathie eine individuelle Entscheidung, die unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren getroffen werden muss. Auf der einen Seite steht das Erkrankungsrisiko unter Anbetracht der

individuellen Risikofaktoren sowie der Prävalenz der Erkrankung, auf der anderen Seite steht der Aufwand für die Patienten und Patientinnen und das Gesundheitswesen.

Innerhalb der ersten Jahre besteht ein sehr geringes Risiko, bei korrekter Dosierung der Medikamente eine Retinopathie zu entwickeln. Daher wird ein Baseline (BL) Screening zu Beginn der Therapie mit ophthalmologischer Untersuchung, Fundusdarstellung und Erhebung des funktionellen Status für spätere Vergleichbarkeit empfohlen. Im Anschluss sollten zunächst 5 Jahre abgewartet werden, bevor die Patienten und Patientinnen zum jährlichen Screening aufgefordert werden sollten. Das 1-Jahres-Intervall kann bei Vorliegen von Risikofaktoren auf ein halbes Jahr reduziert werden.

Tabelle 1 fasst die empfohlenen Untersuchungsmethoden beim Screening auf CQ/HCQ-Retinopathie zusammen. Bei allen Untersuchungsmethoden sollte das besondere Augenmerk auf dem Bereich der Makula liegen, da dort die potentielle Schädigung auftritt.

*Tabelle 1: Empfohlene Untersuchungstechniken zum jährlichen Screening einer CQ/HCQ-Retinopathie gemäß (Marmor et al., 2016); SD OCT: spectral-domain Optische Kohärenztomographie, mfERG: multifokales Elektroretinogramm, FAF: Fundusautofluoreszenz*

<b>Primäre Screeningtests</b>	<b>Weitere objektive Tests</b>	<b>Forschungsgegenstand</b>
SD-OCT	mfERG	Mirkoperimetrie
Computergesteuerte statische Perimetrie	FAF	Adaptive Optics Retinal Imaging

#### **1.4.2. Etablierte Untersuchungstechniken**

##### **Perimetrie**

Unter der Perimetrie versteht man die Untersuchung des Gesichtsfeldes, d.h. die Untersuchung des Wahrnehmungsbereiches eines unbewegten Auges (Lang & Esser, 2008, Kapitel 14.2). Gesichtsfeldausfälle werden als Skotome bezeichnet und können entweder zentral, parazentral oder peripher gelegen sein. Sie können je nach Lage und Ausprägung Symptom unterschiedlicher Augenerkrankungen sein. Am blinden Fleck, der Durchtrittsstelle der Nervenfasern des N.opticus in die Netzhaut, existiert ein physiologisches Skotom (Grehn, 2012, Kapitel 3.5).

Die Untersuchung erfolgt meist monokular. Dabei muss der Patient / die Patientin einen zentralen Punkt in einer Halbkugel fixieren und in der Umgebung auftauchende Stimuli per Knopfdruck als wahrgenommen signalisieren (Lang & Esser, 2008, Kapitel 1.12).

Wichtig für die Untersuchung sind standardisierte Bedingungen. Dazu zählen eine definierte Helligkeit der Umgebung und der Leuchtmarken, gleichbleibende Pupillenweite und optimale Korrektur eines möglichen Refraktionsfehlers. Man unterscheidet grundsätzlich 2 Arten der Gesichtsfeldprüfung; die kinetische und die statische Perimetrie. Im Folgenden wird die von der AAO empfohlene statische Perimetrie genauer erklärt:

Die computergesteuerte statische Perimetrie wird im praktischen Alltag häufig eingesetzt. Es werden unbewegte Leuchtmarken in einem Hohlkugelperimeter an verschiedene Stellen des Gesichtsfeldes projiziert und ihre Helligkeit so lange gesteigert, bis der Untersuchte sie wahrnimmt. Die Helligkeit der Leuchtmarke wird als Zahl oder Graustufe an der entsprechenden Stelle vermerkt. Entsprechend der klinischen Fragestellung können verschiedene Programme gewählt werden. Die Untersuchung ist umso zuverlässiger, je höher die Dichte der Prüfpunkte und je langsamer die Helligkeitssteigerung (Grehn, 2012, Kapitel 3.5; Lang & Esser, 2008, Kapitel 1.12; Schlote & Gelissen, 2007, Kapitel 2).

Als subjektive Untersuchung sind beide Formen der Perimetrie fehleranfällig bei Unaufmerksamkeit oder mangelnder Kooperationsbereitschaft des Patienten / der Patientin. Daher muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen der Exaktheit der Messung und der Untersuchungsdauer bzw. Belastung durch die Untersuchung.

### **Optische Kohärenztomographie (OCT)**

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein nicht-invasives, kontaktloses und schnelles bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Gewebe (Kanski, 2008, Kapitel 2.4). In der Ophthalmologie wird sie für die Darstellung der einzelnen Schichten des hinteren und vorderen Augenabschnittes eingesetzt.

Das Funktionsprinzip der OCT ähnelt dem der Ultraschalldiagnostik, allerdings wird anstelle von Schallwellen monochromatisches Licht verwendet. Das auf die Netzhaut fallende Licht wird von den verschiedenen Gewebestrukturen in unterschiedlicher Tiefe reflektiert. Gleichzeitig wird das Licht auch auf einen Referenzspiegel in bekannter

Distanz gestrahlt und reflektiert. Durch Phasenverschiebung der reflektierten Wellenlängen kommt es zur konstruktiven (helle Bereiche) oder destruktiven (dunkle Bereiche) Interferenz (Daniel Malacara, 2019).

So wird ein bestimmter Ausschnitt des Fundus abgerastert und die Reflektivität ortsabhängig dargestellt (Grehn, 2012, Kapitel 3.4.3). Die Daten werden softwareseitig integriert, wodurch sich das typische Tomogramm von retinalen Strukturen ergibt.

### **Multifokales Elektroretinogramm (mfERG)**

Das mfERG ist ein diagnostisches Verfahren, bei dem elektrische Signale der Netzhaut aufgezeichnet werden. Dazu wird die Netzhaut mit Lichtreizen stimuliert und lokale Antwortsignale über eine mit der Hornhaut in Kontakt stehende Elektrode abgeleitet (Hoffmann et al., 2021).

Das Stimulationsmuster entspricht 61 (bzw. 103) hexagonalen Elementen, die in 5 (bzw. 6) konzentrischen Ringen angeordnet sind. Jedes Element wechselt mit einer zufälligen Sequenz zwischen weißer und schwarzer Füllfarbe (Frequenz = 75 Hz).

Topographisch korrelieren die 5 Ringe zu unterschiedlichen Bereichen der Netzhaut: Ring 1 zur Fovea, Ring 2 zur Parafovea, Ring 3 zur Perifovea, Ring 4 zur nahen Peripherie, Ring 5 zur mittleren Peripherie und Ring 6 zur fernen Peripherie (Dettoraki & Moschos, 2016).

Auf diese Weise entsteht eine topographische Messung der elektrophysiologischen Aktivität verschiedener Netzhautareale.

Als objektive und nicht-invasive Messmethode der visuellen Funktion wird das mfERG häufig zur Diagnostik und Progressionsbewertung vererbbarer und erworbener Netzhauterkrankungen angewandt (Arndt et al., 2018).

### **1.4.3. Quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF)**

Die QAF ist eine nicht-invasive, schnelle und kostengünstige Bildgebungsmethode, die retinale Fluorophore detektiert und eine Aussage über deren Verteilung erlaubt. Im Gegensatz zur bisherigen Beschränkung auf qualitative Aussagen ist es dadurch auch möglich, quantitative inter- und intrapersonelle Vergleiche zu ziehen (Yung, Klufas, & Sarraf, 2016).

### **Entstehung von Autofluoreszenz**

Das Autofluoreszenzsignal des Fundus entsteht durch Anregung sogenannter retinaler Fluorophore. Photonen einer bestimmten Wellenlänge werden von diesen Fluorophoren absorbiert. Dadurch werden Elektronen in einen angeregten Zustand überführt und verweilen dort für eine sehr kurze Zeitspanne. Bei Rückkehr in den Grundzustand kommt es zur Emission von energieärmeren Photonen d.h. langwelligerem Licht. Klassischerweise wird für die Fundusautofluoreszenz (FAF) Laserlicht mit der Wellenlänge 488 nm verwendet, mit welchem hauptsächlich Bisretinoide in Lipofuszin und Melanolipofuszin angeregt werden können (Kellner, Renner, & Tillack, 2006; Sparrow, Duncker, Schuerch, Paavo, & de Carvalho, 2020; Yung et al., 2016).

Das Autofluoreszenzsignal kann geschwächt werden unter anderem durch die absorbierenden Eigenschaften von Makulapigment und Photorezeptorpigment (Rhodopsin) oder einer Trübung der optischen Medien (Yung et al., 2016). Die Intensität des resultierenden Signals hängt von verschiedenen Faktoren ab.

### **Hyperautofluoreszenz**

Häufig lässt sich Hyperautofluoreszenz auf einen erhöhten Anteil von Lipofuszin im RPE zurückführen. Auch andere Mechanismen können Ursache von erhöhter FAF sein, dazu zählen photooxidative Veränderungen der RPE Fluorophore oder angesammelte Bisretinoide in den Außensegmenten der Photorezeptoren (Sepah et al., 2014; Sparrow, Yoon, Wu, & Yamamoto, 2010).

Weiterhin zeigen Ablagerungen von autofluoreszierendem Material (Drusen) hyperautofluoreszente Eigenschaften (Sepah et al., 2014; Tran et al., 2020). Auch Defekte im Photopigment Rhodopsin, die dann dafür sorgen, dass weniger Exzitationslicht absorbiert werden kann, erhöhen die FAF (Yung et al., 2016).

### **Hypoautofluoreszenz**

Eine häufige Ursache von Hypofluoreszenz ist ein verringerter Lipofuszingehalt im RPE (z.B. aufgrund einer Atrophie). Außerdem können verschiedene strahlungsblockierende Mechanismen einen Einfluss haben: So verringert beispielsweise Makulapigment, eine Trübung der optischen Medien oder auch Blut z.B. in den retinalen Gefäßen die

einfallende oder ausfallende Strahlung bestimmter Wellenlängen, sodass die Autofluoreszenz reduziert oder sogar blockiert wird (Sepah et al., 2014).

### **Autofluoreszenzmessung mit dem cSLO und Quantifizierung**

Die QAF wird mit Hilfe eines modifizierten konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskops (cSLO) aufgenommen. Hierbei wird in den Strahlengang eines Spectralis HRA (Heidelberg Retina Angiograph, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) eine interne Referenzprobe eingebaut. Das Basisprinzip ist in (Delori et al., 2011) beschrieben.

Ein Argon-Blau-Laser generiert einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm. Dieser Laserstrahl kann nun über horizontal und vertikal bewegliche Scanner gelenkt werden und dadurch einen bestimmten Bereich der Retina sowie die Referenzprobe abtasten. Entsprechende Optiken erlauben den korrekten Fokus und Vergrößerung des Bildes (Delori et al., 2011).

Der Laserstrahl bewirkt durch Auftreffen auf die Fluorophore im retinalen Pigmentepithel und in den Photorezeptoren die Emission von niederwelligeren Photonen, welche anschließend im Detektor registriert werden können. Die Hauptemittenten bei 488 nm Exzitationswellenlänge sind Bisretinoide. Diese entstehen in einer Nebenreaktion aus all-trans-Retinal im Sehzyklus. Dieses Material ist auch der autofluoreszierende Hauptbestandteil von Lipofuszin im RPE, welches sich dort durch Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente anreichert (Ben-Shabat et al., 2002; Katz, Drea, Eldred, Hess, & Robison, 1986; Sparrow et al., 2003; Yakovleva et al., 2020).

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, die Eignung der QAF als Screening-Methode für die Bulls-Eye-Makulopathie bei CQ/HCQ therapierten Patienten und Patientinnen zu prüfen und die Messmethode zu validieren.

Die zuvor in (Reichel et al., 2020) untersuchte BL-Gruppe wurde nach einem Jahr erneut untersucht, um die QAF Entwicklung in Zusammenschau mit allen anderen Untersuchungsmethoden zu analysieren und zu interpretieren. Hierzu wurden die von der Arbeitsgruppe Ach etablierte Hardware und Software genutzt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Studiendesign**

Die vorliegende Studie ist ein Follow-Up (FU) zur zuvor durchgeführten, prospektiven Kohortenstudie (Reichel et al., 2020). Dabei wurden Patienten und Patientinnen unter systemischer CQ/HCQ Therapie jährlich auf medikamentenassoziierte Netzhauttoxizität gescreent (Marmor et al., 2016). Um mögliche Auswirkungen einer CQ/HCQ Therapie auf die neue Methode der QAF frühzeitig wahrzunehmen, wurde allen Probanden und Probandinnen ein jährliches Screening (QAF + etablierte Screeningmethoden) angeboten. Damit kann die Einnahmedauer auch unter 5 Jahren liegen.

#### **Einschlusskriterien**

- Proband\*Innen zwischen 18 und 79 Jahren mit optisch klaren Medien
- Patient\*Innen, die mit CQ/HCQ aktuell therapiert werden
- Patient\*Innen, die mit CQ/HCQ in der Vergangenheit therapiert wurden
- Patient\*Innen, die durch CQ/HCQ eine Netzhautschädigung entwickelt haben.

#### **Ausschlusskriterien**

- Pseudophakie, fortgeschrittene Katarakt
- Starke Kurz - bzw. Weitsichtigkeit (>5 Dioptrien sphärisches Äquivalent)
- Sonstige retinale Erkrankungen (z.B. altersbedingte Makuladegeneration).

Der Auswertungszeitraum der Studiendaten umfasst die Zeit vom 17.10.2017 bis zum 12.10.2020. Die Patienten und Patientinnen wurden jährlich untersucht. Eine Patientin zeigte ein besonders hohes Risikoprofil (Kumulativedosis 1640 g CQ/HCQ, 11.4 Jahre Einnahmedauer und auffällige Fundusautofluoreszenz), weshalb sie bereits nach einem halben Jahr kontrolluntersucht wurde.

## 2.2. Patientenkollektiv

Alle Probanden und Probandinnen wurden an der Augenklinik der Universität Würzburg rekrutiert. Alle Daten wurden gemäß der Deklaration von Helsinki erhoben und ausgewertet. Gegen die Durchführung der Studie wurden durch die Ethikkommission der Universität Würzburg (69/17) keine Bedenken vorgebracht.

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde in 3 Gruppen eingeteilt: BL- Probanden und Probandinnen, FU- Probanden und Probandinnen und Kontrollgruppe. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die einzelnen Probandengruppen.

Die **BL-Gruppe** enthält alle Patienten und Patientinnen, die das Studienprotokoll einmalig durchlaufen haben. Die **FU-Gruppe** enthält alle Patienten und Patientinnen, die auch einen zweiten Untersuchungstermin nach ca. 1 Jahr wahrgenommen hatten.

Die **Kontrollgruppe** besteht aus nicht ophthalmologisch vorerkrankten Probanden und Probandinnen, die alters- und geschlechtsadaptiert den Patienten und Patientinnen mit systemischer CQ/HCQ Therapie gegenübergestellt wurden. Sie wurden im Rahmen einer eigenständigen Studie untersucht (Kleefeldt et al., 2020).

*Tabelle 2: Übersicht über die Kenngrößen des Studienkollektivs nach Einteilung in Gruppen, BL: Baseline, FU: Follow-up, m: männlich, w: weiblich, BEM: Bull's-Eye Makulopathie, STD: Standardabweichung*

	<b>BL Gruppe</b>	<b>FU Gruppe</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
# Patient*Innen	50 (47w, 3m)	31 (29w, 2m)	32 (30w, 2m)
davon mit BEM	5	3	n/a
Mittleres Alter ± STD [Jahre]	48.5 ± 13.3	50.5 ± 12.5	47.2 ± 14.1
Altersspanne [Jahre]	22 - 68	25 - 69	23 - 69
Mittlere kumulative CQ/ HCQ Dosis ± STD [Gramm]	701 ± 593	802 ± 583	n/a
Dosisspanne [Gramm]	4 - 2374	94 - 2435	n/a

## **2.3. Studienprotokoll**

### **2.3.1. Untersuchungsablauf**

#### **Anamnese**

Bei Eintritt in die Studie wurden die grundlegenden anamnestischen Daten der Patienten und Patientinnen erhoben und bei jeder FU Untersuchung aktualisiert. Dazu zählten neben dem Alter, der Größe und dem Gewicht auch die allgemeinmedizinische und neurologische Vorgeschichte. Die spezifischen Risikofaktoren für die Entwicklung einer BEM wie Nieren- oder Lebererkrankungen sowie gastrointestinale Leiden, die die Medikamentenaufnahme beeinträchtigen könnten, wurden abgefragt. Es erfolgte eine Suchtanamnese sowie eine Medikamentenanamnese, um gegebenenfalls Interaktionsrisiken mit CQ/HCQ zu erheben.

Besonderes Augenmerk der Anamnese lag auf der Eruiierung der kumulativen Dosis, d.h. Startzeitpunkt der CQ/HCQ Einnahme, Dauer der Einnahme, Dosis und eventuelle Pausen.

Daneben wurden Daten zu ophthalmologischen Voroperationen, Traumata, Vorerkrankungen, stattgehabten Entzündungen sowie zur Familienanamnese erhoben.

#### **Refraktionsbestimmung**

Die subjektive Refraktionsbestimmung wurde zu jedem Besuch durchgeführt und bei der folgenden Perimetrie und dem mfERG berücksichtigt. Ausgehend von Werten einer objektiven Refraktionsbestimmung mittels Autorefraktor oder bekannter Brillenwerte wurde die Sehschärfe bestimmt. Hierzu wurden standardisierte Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Tafeln eingesetzt. Diese bestehen aus drei Einzelfafeln: Tafel R zur Bestimmung der besten Korrektur mittels Refraktionsbrille, Tafel 1 für das rechte und Tafel 2 für das linke Auge (Told, Baratsits, Garhöfer, & Schmetterer, 2013). Es wurden standardisierte Bedingungen geschaffen, d.h. die Entfernung zwischen Probanden und Probandinnen und Visustafel betrug 4 Meter, es wurde eine standardisiert hintergrundbeleuchtete Visustafel in einem abgedunkelten Raum verwendet. Die Patienten und Patientinnen wurden aufgefordert, die Buchstabenreihen vorzulesen. Wenn mindestens 3 von 5 Buchstaben einer Reihe erkannt wurden, galt die Visusstufe als erreicht. Die letzte noch lesbare Zeile mit mindestens 3 von 5 Buchstaben definierte den bestkorrigierten Visus (Angabe in Dezimal-Schreibweise).

### **Messung der Hornhautkrümmung**

Zur BL-Untersuchung mussten einmalig die spezifischen Hornhautradien der Probanden und Probandinnen bestimmt und in Spectralis und die HRA2 Software übertragen werden, um Effekte der Hornhautkrümmung auf den OCT-Scan bzw. die FAF-Aufnahmen zu korrigieren. Die Vermessung geschah mittels optischer Laser-Biometrie (IOL Master 500, Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **Perimetrie**

Sowohl zur BL Untersuchung als auch zum FU Termin erfolgte eine computergestützte statische Perimetrie beider Augen am Gerät Octopus 900, Haag-Streit, Bern (Schweiz) mit folgenden Einstellungen:

- Programm: Makula 12°; 10-2 Standard-Weiss/Weiss-Perimetrie
- Untersuchungsstrategie: dynamisch
- Parameter: Hintergrundbeleuchtung / Stimulusstärke: 4 / 1000 asb, Stimulusgröße: Goldmann III (= 4 mm<sup>2</sup>), Stimulusdauer: 100 ms
- Testmarkenverteilung: 45 Punkte von 0-4°, 36 Punkte von 4-9.5°, 38 Punkte von 9.5-26°

Zur Auswertung wurde die Software Haag-Streit EyeSuite verwendet. Die gemessenen Sensitivitäten, ab welcher Helligkeit ein Punkt im Gesichtsfeld wahrgenommen wird, sind unter anderem abhängig vom Patientenalter. Deshalb wird eine softwarehinterlegte Vergleichsgruppe als Referenz genutzt. Durch diesen Vergleich zeigen sich Defekte in den unterschiedlichen Lokalisationen des Gesichtsfeldes (nasal, temporal, inferior, superior) und werden von der Software einerseits als Zahlenwert [in dB] und als Grauskala dargestellt. Es wird außerdem die Wahrscheinlichkeit ausgewertet, mit der an einer bestimmten Stelle tatsächlich ein Defekt existiert. Die sogenannte Bebie-Defektkurve dient zur Unterscheidung zwischen lokalen und diffusen Defekten und wird ebenso von der Software berechnet.

### **Farbsehtests**

Das Oculus HMC-Anomaloskop Typ 47700 wurde eingesetzt, um Störungen der Farbwahrnehmung qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Mithilfe des Manuellen

Rayleigh Tests wurde eine potentielle Rot-Grün-Farbsinnstörung untersucht. Der Moreland Test wurde zur Beurteilung des Blausinns eingesetzt (Hermann, 2015). Als zweiter Farbsehtest wurde der Farnsworth-D15 Farblegetest zur Diagnose von Rot-Grün- und Blau-Gelb-Sehstörungen durchgeführt. Der Test wurde in 2 Versionen (mit gesättigten und ungesättigten Farben) durchgeführt, welche sich in ihrer Sensitivität für milde und moderate Farbsinnstörungen unterscheiden. Durch die Kombination kann ein breites Spektrum der Farbsinnstörung in der jeweiligen Ausprägung erkannt werden (Lanthony, 1978).

### **Multifokales Elektroretinogramm**

Die Aufnahme des mfERG erfolgte entsprechend der derzeitigen ISCEV Standards (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) und mit Hilfe des RetiScan Systems (RETIscan, Version 6.16.3.8, Roland Consult, Brandenburg an der Havel, Germany).

Die Untersuchung wurde nach vorheriger, medikamentöser Mydriasis und Korrektur des refraktiven Fehlers durchgeführt. Die Ableitung der elektrischen Signale erfolgte mittels Fadenelektroden von der Bindehaut.

Für die Stimulation wurden verschiedene Muster aus 61 schwarz-weißen Sechsecken (Hexagons) innerhalb der zentralen 27° der Netzhaut auf einem CRT-Monitor präsentiert. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der RetiScan Software. Dabei wurde das summierte elektrische Signal für die Fovea sowie für die 4 konzentrischen Hexagon-Ringe um die Fovea ausgewertet. Im Antwortsignal wurde das erste Tal (N1) und der folgende Gipfel (P1) manuell markiert, woraus sich Amplitude und Latenz des Signals ergeben. Das elektrische Signal wurde mit einem in der RetiScan-Software hinterlegten Referenzsignal einer gesunden Bevölkerung verglichen (Kellner et al., 2006; Seeliger et al., 2001).

### **SD-OCT**

Die OCT-Aufnahmen der Probanden und Probandinnen wurden mit einem Spectralis SD-OCT (Spectralis Acquisition Module, Version 6.9.4.0, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) aufgenommen. Es wurden folgende Parameter festgelegt:

- Aufzeichnung eines 20° x 20° Makula Scans, zentriert auf die Fovea – 49 B-Scans mit jeweils einem Abstand von 122 µm zueinander
- 35 ART frames (d.h. 35 Einzelaufnahmen werden zu einem B-Scan gemittelt) (Hassan, Raja, Hassan, & Akram, 2016)
- Bildformat B-Scan: 512 x 498 Pixel, Bildformat des en-face IR Bildes: 768 x 768 Pixel

### **Ophthalmologische Untersuchung**

Die abschließende augenärztliche Untersuchung beinhaltete die Beurteilung sämtlicher vorangegangener Untersuchungsmethoden, eine Spaltlampen-Biomikroskopie zur Beurteilung des vorderen Augenabschnittes, eine applanatorische Augendruckmessung nach Goldmann und Funduskopie in Mydriasis. Hierbei lag besonderes Augenmerk auf Veränderungen im Bereich der Makula.

### **2.3.2. Multimodale Fundusaufnahmen**

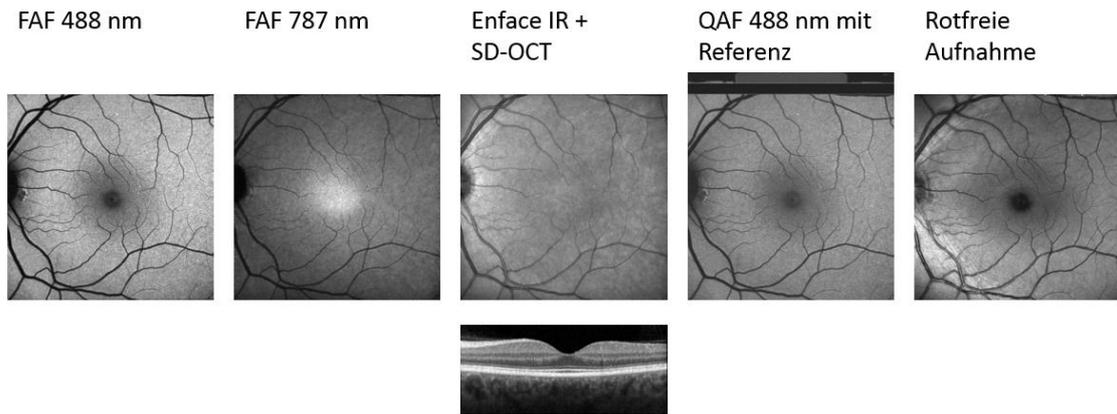
Die multimodalen Fundusaufnahmen bestehen aus einer Infrarot (IR)- und einer rotfreien Aufnahme (30x30°), FAF Aufnahmen (30x30°) mit 488 nm und 787 nm Exzitationswellenlänge sowie der QAF Aufnahme (30x30°) bei 488 nm (Emissionsspektrum zwischen 500 und 750 nm), siehe Abbildung 5. Alle Aufnahmen erfolgten in medikamenteninduzierter Mydriasis mittels 0.5% Tropicamid, 2.5% Phenylephrin.

Für die QAF Aufnahme war ein vorhergehendes Bleichen des Photorezeptorpigments notwendig, da das Photopigment ansonsten z.T. dasjenige Licht absorbiert, welches das RPE treffen würde. Entsprechend der Literatur wurde ein Zeitraum von mindestens 20 Sekunden zum Bleichen der Photorezeptoren gewählt (Delori et al., 2011).

Es wurden anschließend jeweils Serien von 12 Bildern pro Messung aufgenommen. Mindestens 9 dieser Bilder wurden zu einem Bild gemittelt. Gute Bildqualität wurde anhand folgender Kriterien festgelegt:

1. Gleichmäßige Ausleuchtung des posterioren Pols
2. Makula im Fokus
3. Graustufen des Bildes innerhalb der linearen Detektorspanne; bei Überschreitung dieser Spanne erscheint im Bereich des internen Referenzsignals eine rote Warnfarbe.

Es wurden innerhalb einer Sitzung mehrere QAF Bilder aufgenommen und anschließend auf Bildqualität überprüft. Das qualitativ beste Bild wurde für weitere Analysen verwendet. Für die Bestimmung der Test-Retest-Reliabilität der Messungen mussten die zwei qualitativ hochwertigsten Bilder aus einer Sitzung ausgewertet werden. Die Wiederholbarkeit der QAF Messungen wurde an 30 Patienten und Patientinnen (30 Augen) mit jeweils 2 QAF Messungen desselben Tages überprüft.



**Abbildung 5:** Multimodale Bildgebung mit FAF bei Anregungswellenlänge 488 nm und 787 nm, Enface IR mit OCT, QAF bei 488 nm und eine rotfreie Fundusaufnahme.

### 2.3.3. Berechnung der QAF

Für die Berechnung der QAF wird die vom Fundus reflektierte Strahlungsintensität zur bekannten reflektierten Strahlungsintensität der Referenzprobe normiert, sodass unterschiedliche Kenngrößen wie Laser-Leistung oder Detektor-Verstärkung in verschiedenen Aufnahmen kompensiert werden können.

Nach Berücksichtigung von patientenspezifischen Parametern wie Bildvergrößerungsfaktor  $M$  oder Transmissionsverlusten des Laser- bzw. Fluoreszenzstrahles durch die optischen Medien  $T_{\lambda}$  bzw.  $T_{\lambda}$  sowie Normierung auf eine gesunde Vergleichskohorte (üblicherweise emmetrope Augen von gesunden 20-Jährigen mit 7.7 mm Hornhautkrümmungsradius) ergibt sich die QAF aus den Graustufen der Bilder  $GL_F$  bzw. der Referenzprobe  $GL_R$  nach Abzug von Hintergrundaktivität  $GL_0$  zu

$$qAF = RCF \times \frac{GL_F - GL_0}{GL_R - GL_0} \times \left( \frac{M_{em,7.7}}{M} \right)^2 \times \frac{T_{\lambda,20} - T_{\lambda,20}}{T_{\lambda} - T_{\lambda}}, \text{ (Delori et al., 2011)}$$

mit

- RCF: Referenzkalibrierungsfaktor des verwendeten konfokalen Scanning-Laser-

Ophthalmoskops; gerätespezifischer RCF nach Herstellerangabe hier: 91.87

- $GL_F$ ,  $GL_R$ ,  $GL_0$ : Graulevel der Bilder, Graulevel der Referenzprobe, Hintergrundaktivität
- $M$ : Bildvergrößerungsfaktor
- $M_{em,7.7}$ : Vergrößerung  $M$  für ein emmetropes Auge mit einem durchschnittlichen Hornhautkrümmungsradius von ca. 7.7 mm
- $T_{\Lambda,20} - T_{\lambda,20}$ : Transmission der optischen Medien eines emmetropen 20-Jährigen.
- $T_{\Lambda} - T_{\lambda}$ : altersentsprechende Transmission der optischen Medien eines Probanden / einer Probandin. Empirisch konnte folgende Gleichung für den letzten Term ermittelt werden, der die alterskorrigierte Linsentransmission darstellt:

$$\frac{T_{\Lambda,20} - T_{\lambda,20}}{T_{\Lambda} - T_{\lambda}} = 10^{5.56 \times 10^{-5} \times (\text{Alter}^2 - 400)} \quad (\text{Delori et al., 2011})$$

### 2.3.4. Bildverarbeitung und QAF Analyse

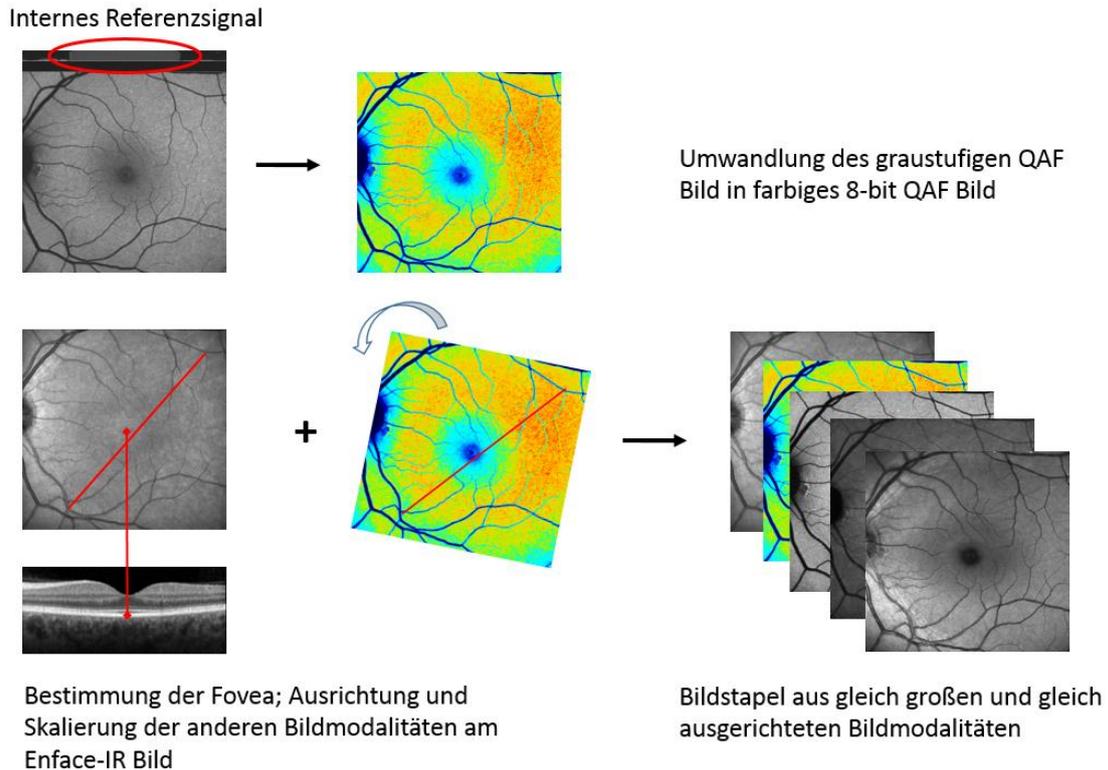
#### Bildverarbeitung

Für die Bildverarbeitung wurden spezialanfertigte FIJI Image J Plugins aus Kollaborationsarbeiten der AG Ach verwendet. Im ersten Schritt wurde das graustufige QAF Bild (Skala 0 - 511) in ein farbiges 8-bit Bild (Skala 0 - 255) unter Berücksichtigung des Referenz-Kalibrationsfaktor (RCF) des HRA Gerätes (Herstellerangabe: RCF = 91.87) sowie der alterskorrigierten Linsentransmission der Studienteilnehmer umgewandelt.

Anschließend wurden alle Bildmodalitäten in ihrer Ausrichtung und Skalierung an das Leitbild (Enface IR Bild), das während der OCT-Messung entsteht, angeglichen. Dazu wurde eine Linie zwischen anatomischen Orientierungspunkten wie z.B. zweier Gefäßbifurkationen auf dem Enface IR Bild sowie dem dazu auszurichtenden Bild einer anderen Modalität manuell gezogen, siehe Abbildung 6.

Dieser Schritt wiederholt sich für sämtliche Bildmodalitäten, sodass ein Bilderstapel aus exakt gleich großen und gleich ausgerichteten Bildern der unterschiedlichen Modalitäten entsteht.

Zur Bestimmung eines einheitlichen Koordinatensystems für den kompletten Bilderstapel wurde die Position der Fovea herangezogen. Diese wurde im OCT anhand der fovealen Senke und der Erhöhung der Membrana limitans externa (ELM) bestimmt. Die Position der Fovea bildet die Grundlage zur Positionierung der später verwendeten Auswertegrids.



**Abbildung 6:** Entstehung des multimodalen Bildstapels: Zunächst Umwandlung des Graustufen-QAF-Bildes in ein farbiges 8-bit Bild unter Berücksichtigung des RCF und Alters des Probanden / der Probandin (oben). Bestimmung der Fovea anhand des OCT. Nutzung einer manuell gezogenen Linie zwischen anatomischen Landmarken (Gefäßbifurkationen) für Drehung, Skalierung und Verschiebung einer anderen Bildmodalität (unten links), um einen genau übereinanderliegenden Bildstapel verschiedener Modalitäten zu generieren (unten rechts).

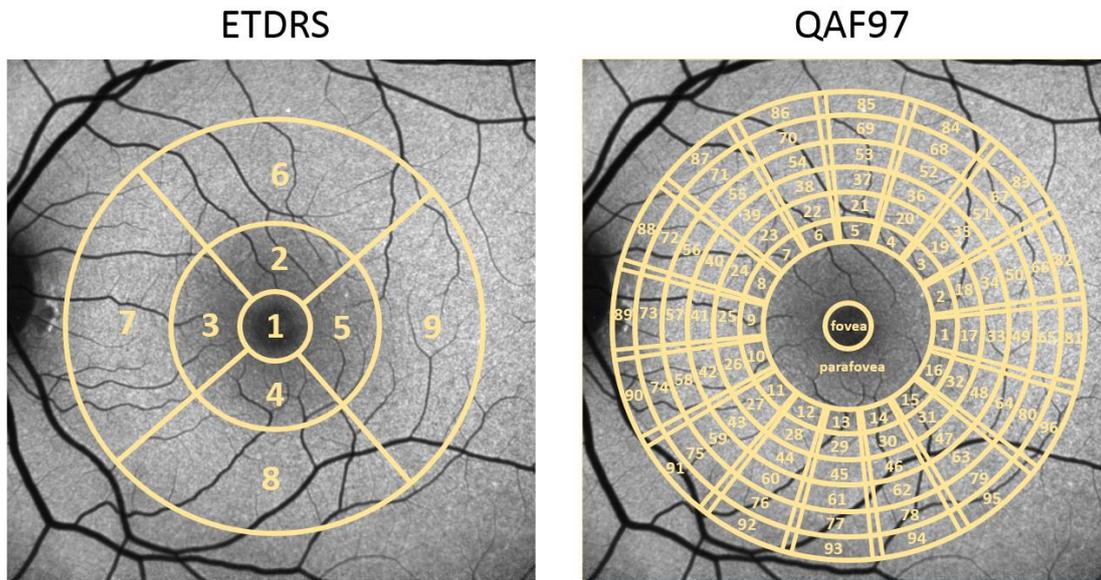
## QAF Analyse

Für die QAF Analyse wurden das ETDRS Grid sowie das QAF97 Grid verwendet, welche beide auf die Fovea zentriert sind (siehe Abbildung 7):

- ETDRS Grid: Das Grid besteht aus 3 konzentrischen Ringen mit einem festen Durchmesser von 1, 3 und 6 mm. Die Ringe 2 und 3 sind in jeweils 4 Segmente unterteilt, sodass insgesamt 9 Segmente ausgewertet werden.
- QAF 97 Grid: Der maximale Durchmesser des QAF97 Grids wird durch den Abstand zwischen der Fovea und dem temporalen Rand der Papille bestimmt, weshalb für unterschiedliche Patienten und Patientinnen unterschiedliche Maße entstehen können. Das Grid selbst besteht aus 6 konzentrischen Ringen mit 16

radialen Segmenten sowie der Fovea und dem parafovealen Bereich, d.h. insgesamt 97 Segmenten.

Es wurden für die jeweiligen Segmente der Grids die Mittelwerte, die Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte der QAF sowie die Anzahl der Pixel im Segment ausgewertet und abgespeichert.

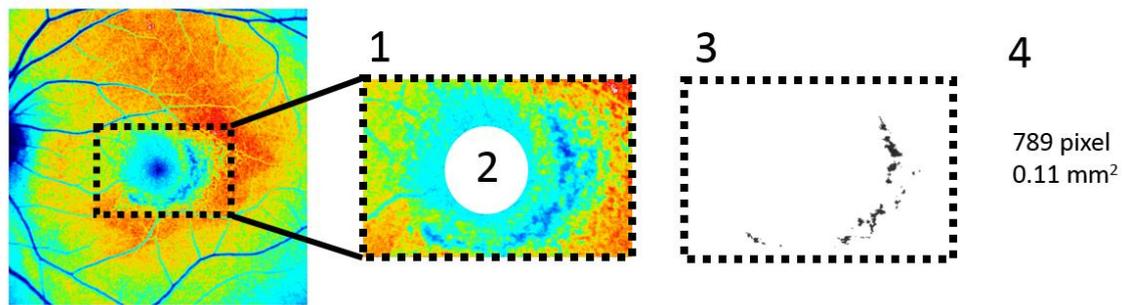


*Abbildung 7: ETDRS und QAF97 Analysegrids zur Auswertung der QAF Intensität in unterschiedlichen Bereichen des posterioren Pols.*

### **2.3.5. Analyse der atropen Zone bei BEM Patientinnen**

Die atrophe Zone im QAF-Bild der BEM Patientinnen kann mit Hilfe des folgenden Algorithmus quantifiziert werden, siehe Abbildung 8:

Im ersten Schritt wurde ein Ausschnitt des 8-bit QAF Bildes gewählt, das die Fovea und Parafovea sowie den atropen Bereich enthält (1). Die Größe des Bildausschnittes wurde entsprechend des Ausmaßes der Atrophie bestimmt. Blutgefäße erscheinen im QAF-Bild hypoautofluoreszent und können softwareseitig daher nicht von atrophem Areal unterschieden werden.



*Abbildung 8: Algorithmus zur Quantifizierung der atrophen Zone bei Patientinnen mit BEM in 4 Schritten.*

Dasselbe gilt für den Bereich der Fovea. In jenem Bereich findet sich die höchste Dichte an Makulapigment, welches die Eigenschaft besitzt, blaues Licht zu absorbieren. Bereits bei ca. 1° Exzentrizität ist die Dichte an Makulapigment auf die Hälfte des Maximalwertes gesunken (Hammond, Wooten, & Snodderly, 1997; Srinivasan et al., 2022) (insofern die Fovea noch erhalten und nicht durch BEM atrophiert ist). Aus diesem Grund wurde ein kreisförmiger Bereich entsprechend 1° Exzentrizität um die Fovea vor der Analyse ausgeschnitten und somit von der Auswertung ausgenommen. Atrophie wurde definiert für QAF-Intensitäten < 120 QAF [a.u.].

Anschließend wurden sämtliche Pixel unterhalb dieser Helligkeitsschwelle gezählt und dargestellt (3). Pixel oberhalb der Helligkeitsschwelle wurden weiß eingefärbt. Mit Hilfe der zuvor bestimmten Hornhaut-Krümmungsradien konnte ein Pixel für den Probanden / die Probandin in eine Fläche umgerechnet werden (4).

### **2.3.6. Analyse der Netzhautdicke**

Um die Schichtdicke der einzelnen Netzhautschichten zu analysieren, wurden zunächst alle Schichten der SD-OCT Scans in der HEYEX2 Software (Heidelberg Eye Explorer, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) automatisch segmentiert und wenn nötig manuell nachkorrigiert. Die Schichtdicke aller inneren Netzhautschichten (d.h. Membrana limitans interna (ILM) bis äußere Körnerschicht (ONL)) und aller äußeren Netzhautschichten (ELM bis Bruch's Membran) wurden für jedes Segment des ETDRS Grids bestimmt. Anschließend wurden die Schichtdicken zu den entsprechenden QAF Werten des ETDRS Grids korreliert.

## 2.4. Statistische Auswertung

Die Datenerhebung, -sortierung und -analyse wurde mittels der Statistik- und Analysesoftware SPSS (IBM SPSS 26.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Kategoriale Variablen wurden als Zahl bzw. Prozentzahl dargestellt, kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert  $< 0.05$  gesetzt.

Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mittels t-Test überprüft (unabhängige Stichproben für den Vergleich zwischen Kontrollgruppe und CQ/HCQ-Gruppen, gepaarte Stichproben für Vergleiche zwischen der CQ/HCQ BL und FU Gruppe). Korrelationen der Netzhautschichtdicken und mittleren QAF wurden mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) oder des Korrelationskoeffizienten nach Pearson analysiert. Der Eta-Koeffizient wurde bestimmt für Korrelationen zwischen metrischen und nominalen Variablen.

Um die Wiederholbarkeit der QAF-Messungen zu bestimmen, wurde der Repeatability-Koeffizient nach Bland-Altman verwendet (Delori et al., 2011).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Demographische Daten

Initial wurden 59 Patienten und Patientinnen untersucht (Reichel et al., 2020). Davon mussten 9 Patienten und Patientinnen aufgrund schlechter Bildqualität oder retinaler Vorerkrankungen im Nachhinein ausgeschlossen werden, sodass 50 Patienten und Patientinnen als **BL**-Gruppe für die Analysen zur Verfügung standen.

Für die 1-Jahres FU Untersuchung wurden initial 42 Patienten untersucht. Nach Anwendung der Ausschlusskriterien konnten die Daten von 31 Patienten und Patientinnen als **FU**-Gruppe für die Analyse verwendet werden. Detaillierte demographische Informationen zur BL und FU Gruppe sind in Tabelle 3 gezeigt.

Die verwendete **Kontrollgruppe** umfasst 32 Probanden und Probandinnen und wurde bereits im Rahmen einer vorigen Studie (Kleefeldt et al., 2020) erhoben.

In unserem Studienkollektiv sind fünf Patientinnen an BEM erkrankt und drei davon auch zu einer Follow-Up Untersuchung erschienen.

*Tabelle 3: Detaillierte demographische Daten zur BL und FU Gruppe; die BL Gruppe besteht aus allen 50 gelisteten Patienten und Patientinnen, die FU Gruppe aus den 31 grau hinterlegten Patienten und Patientinnen*

Pat. ID	Alter [J]		m/f	Erkrankung	Auge	CQ/HCQ Kum.Dosis [g]		CQ/HCQ Einnahmedauer [J]	
	BL	FU				BL	FU	BL	FU
0045	22	-	f	SjS	RA	473	-	6.4	-
0027	24	-	f	RA	RA	26	-	0.4	-
0050	24	-	f	SLE	RA	69	-	1.0	-
0019	27	-	f	RA	LA	146	-	2.0	-
0056	34	-	f	SLE	LA	949	-	13.0	-
0057	37	-	f	SCLE	RA	255	-	3.0	-
0049	42	-	f	SLE	RA	4	-	0.1	-
0001	48	-	f	SLE	LA	1013	-	13.9	-
0038	50	-	f	RA	RA	2010	-	22.3	-
0003	54	-	f	SLE	LA	773	-	5.8	-
0021	55	-	f	SLE	RA	382	-	4.1	-
0053	55	-	m	SCLE	LA	147	-	1.3	-
0055	58	-	f	RA	LA	46	-	0.7	-
<b>0014</b>	58	-	f	RA	LA	1388	-	19	-
<b>0031</b>	58	-	f	RA	RA	729	-	8.1	-
0048	59	-	f	SLE	LA	1336	-	15.3	-

0035	64	-	f	CADM	LA	15	-	0.3	-
0051	66	-	f	UCTD	LA	998	-	6.8	-
0042	67	-	f	UCTD	RA	1568	-	5.8	-
0041	24	25	f	MCTD	RA	758	861	5.5	6.5
0034	31	32	f	SLE	RA	21	94	0.25	1.25
0046	32	34	f	RA	RA	182	318	1.25	2.5
0012	33	34	f	RA, SjS	LA	452	529	6.3	7.3
0020	34	34	f	SLE	RA	730	782	10.1	10.7
0028	34	35	f	SLE	RA	609	682	8.3	9.3
0026	35	37	f	UCTD	RA	924	1031	9	10.5
<b>0011</b>	35	36	f	SLE	LA	887	887	9.8	9.8
0022	40	41	m	SLE	LA	375	428	4.1	4.8
0025	40	41	f	SLE	RA	500	573	6.8	7.8
0013	41	42	f	SLE	LA	1016	1080	9.8	10.8
0039	45	46	f	CDLE	RA	228	336	2.2	3.2
0044	45	46	f	RA	RA	36	164	0.3	1.3
0054	50	51	f	SLE	LA	1640	1677	11.4	11.9
0004	53	54	m	RA	LA	571	720	3.8	4.8
0015	54	55	f	LP	LA	657	657	5.0	5.0
0030	54	55	f	CDLE	LA	284	284	3.2	3.2
0032	54	55	f	SLE	RA	182	265	2.4	3.4
0023	55	56	f	CREST	LA	709	797	9.5	10.7
<b>0002</b>	56	57	f	SLE	RA	1722	1722	9.8	9.8
0016	57	59	f	SCLE	LA	1702	1851	13	14.4
0043	57	58	f	SjS	RA	52	124	0.8	1.8
0024	58	59	f	UCTD	LA	2374	2435	21	22
0007	59	60	f	lcSSc	LA	369	438	5.1	6.0
0018	61	62	f	RA	LA	1329	1405	18.2	19.2
<b>0047</b>	61	62	f	RA	RA	1186	1186	13	13
0017	63	64	f	SCLE	RA	426	426	5	5
0029	63	64	f	SLE	LA	508	582	7.2	8.2
0037	63	64	f	UCTD	RA	1650	1723	17	18
0008	68	69	f	SLE	LA	149	222	2.1	3.1
0009	68	69	f	RS	RA	387	458	4.4	5.4

Pat.ID = Patientenidentifikation, J = Jahre, f = weiblich und m = männlich, RA/LA = rechtes/linkes Auge, Kum.Dosis = kumulative Dosis in Gramm; SjS = Sjögren Syndrom, RA = Rheumatoide Arthritis, MCTD (mixed connective tissue disease) = Mischkollagenose, UCTD (undifferentiated connective tissue disease) = undifferenzierte Kollagenose, SLE = Systemischer Lupus Erythematodes, SCLE = subakut kutaner Lupus erythematodes, CDLE = chronisch diskoider Lupus erythematodes, LP = Lichen ruber planus, CADM = Amyopathische Dermatomyositis, CREST = Sonderform der limitierten kutanen Systemischen Sklerose, lcSSc = Limitierte kutane systemische Sklerose, RS = Morbus Raynaud

### **3.2. Korrelation der QAF zu anamnestischen Daten**

Für alle Analysen der QAF wurde das in Kapitel 2.3.4. Bildverarbeitung und QAF Analyse) vorgestellte QAF97 Analyse-Grid verwendet. Hierfür wurde die Unterteilung des Grids in ein foveales Segment, den parafovealen Bereich und die 96 extrafovealen Segmente genutzt.

Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test konnte eine Normalverteilung der QAF-Werte in den einzelnen Grid-Bereichen für BL, FU und Kontrollgruppe gezeigt werden.

Das QAF Signal unterliegt einigen Einflussfaktoren. Im Folgenden wurde aufgrund einer größeren Probandenanzahl das Patientenkollektiv der BL (n = 50, inkl. 5 BEM Patientinnen) genutzt, um den Einfluss von steigendem Lebensalter sowie weiteren altersabhängigen und -unabhängigen Variablen auf die QAF zu untersuchen.

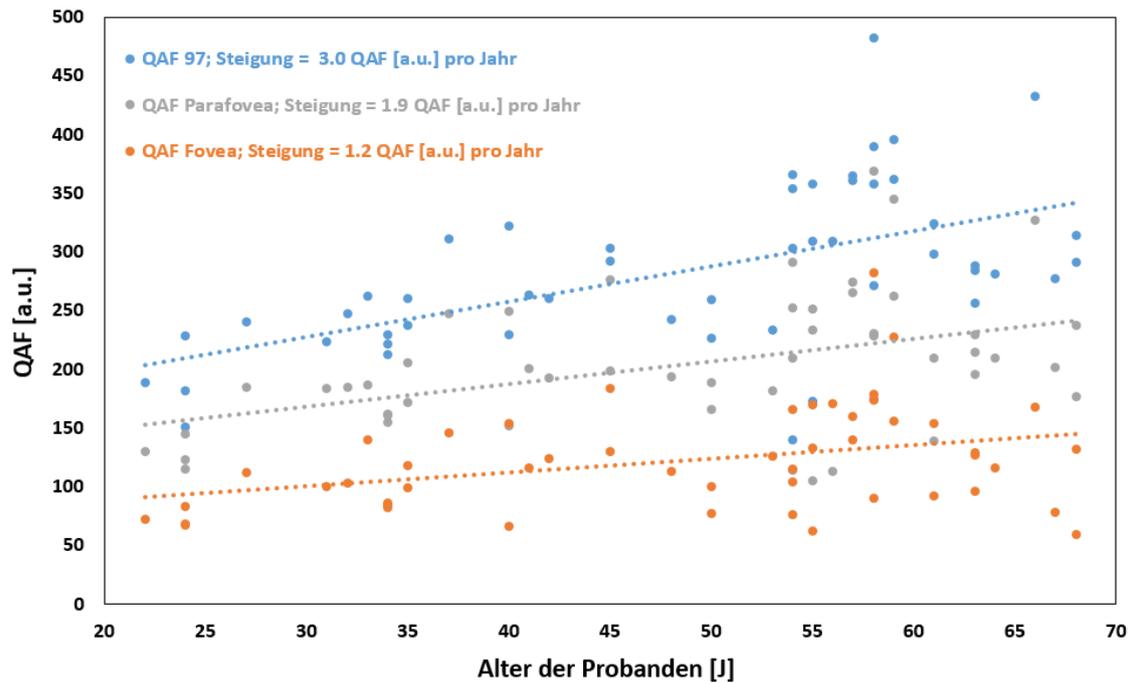
#### **3.2.1. Korrelation der QAF zu Alter, BMI und Rauchverhalten**

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der QAF in den unterschiedlichen Analysebereichen des QAF97 Grids mit steigendem Lebensalter.

Der positive Zusammenhang ist im Bereich der Perifovea am stärksten ausgeprägt mit  $r = 0.57$  ( $p < 0.01$ ). Hier wird eine jährliche Zunahme von ca. 3 QAF [a.u.] pro Lebensjahr erreicht. Es folgt der parafoveale Bereich mit  $r = 0.43$  ( $p < 0.01$ ) und einer Zunahme um 1.9 QAF [a.u.] pro Jahr. Auch im Bereich der Fovea nimmt die QAF signifikant zu  $r = 0.35$ , ( $p < 0.05$ ). Die Steigung pro Lebensjahr ist allerdings hier am geringsten mit 1.2 QAF [a.u.] pro Jahr, siehe Abbildung 9.

Das Rauchverhalten der Probanden und Probandinnen wurde anamnestisch erfragt und eine Unterteilung in Nicht-Raucher (NR = 0, n = 39) und Raucher (R = 1, n = 11) vorgenommen. Es fand sich keine Korrelation zwischen der QAF und dem Rauchverhalten (Eta-Koeffizient = 0.063,  $p = 0.664$ ).

Auch für den anamnestisch erhobenen BMI konnte keine Korrelation zur QAF gezeigt werden (Pearson-Koeffizient = 0.235,  $p = 0.101$ ).

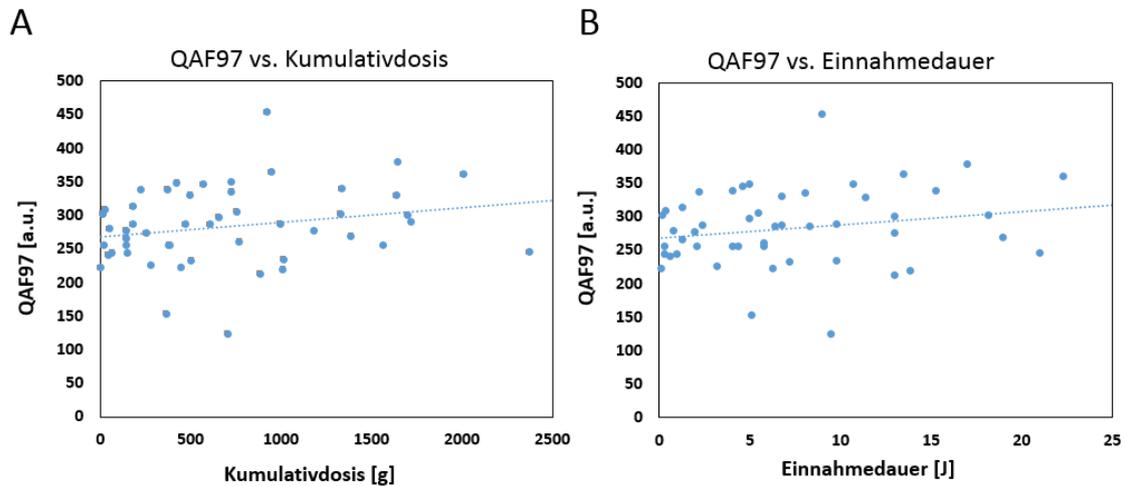


*Abbildung 9: Einfluss von steigendem Lebensalter auf die QAF in den drei Analysebereichen des QAF97 Grids. Es wurde die BL-Gruppe verwendet mit  $n = 50$ . Die blauen Punkte entsprechen den QAF-Werten im QAF97 Bereich, die grauen Punkte denen der Parafovea und die orangenen Punkte denen der Fovea. Die gestrichelten Linien stellen jeweils die Trendlinie mit entsprechender Steigung, d.h. Zunahme der QAF pro Lebensjahr, dar.*

### **3.2.2. Alterskorrigierte Korrelation der QAF zu Kumulativdosis, Einnahmedauer, Grunderkrankung und Linsentrübung**

Aufgrund der weithin bekannten und auch bei unseren Probanden und Probandinnen nachgewiesenen Altersabhängigkeit der QAF (siehe Abbildung 9), wurden für die Ermittlung der Korrelation zu kumulativer Dosis, Einnahmedauer, Grunderkrankung sowie Linsentrübung zunächst die QAF-Werte alterskorrigiert und mit den entsprechenden korrigierten Werten weitergearbeitet.

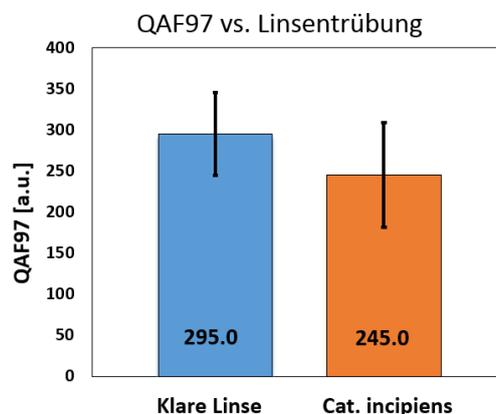
Sowohl für die kumulative CQ/HCQ Dosis als auch für die Einnahmedauer zeigt sich wie in Abbildung 10 dargestellt ein positiver Trend, d.h. je höher die Kumulativdosis bzw. die Einnahmedauer, desto höher die QAF ( $r_{\text{Dosis}} = 0.22$ ,  $r_{\text{Dauer}} = 0.22$ ). Es konnte jedoch für diesen Zusammenhang keine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden ( $p_{\text{Dosis}} = 0.13$ ;  $p_{\text{Dauer}} = 0.14$ ).



**Abbildung 10:** Zusammenhang zwischen der alterskorrigierten QAF97 und A: kumulativer Dosis CQ/HCQ in Gramm; B: Einnahmedauer von CQ/HCQ in Jahren. Die Trendlinie ist jeweils blau gestrichelt dargestellt.

Weiterhin wurde der Einfluss einer beginnenden Linsentrübung auf die QAF-Intensität untersucht. In der Spaltlampenuntersuchung wurde die Linse dementsprechend entweder als klar (n = 38) oder als beginnende Katarakt (Cataracta incipiens) (n = 12) klassifiziert. Da der Beginn einer Linsentrübung mit höherem Alter wahrscheinlicher wird, wurden die QAF-Werte zunächst alterskorrigiert, bevor die Korrelation zwischen QAF-Intensität und Linsenklarkeit gerechnet wurde.

Wie in Abbildung 11 zeigte sich eine signifikant niedrigere QAF97 für Probanden und Probandinnen mit Cataracta incipiens mit  $245.0 \pm 64$  [QAF a.u.] verglichen mit Probanden und Probandinnen, die eine klare Linse haben mit  $295.0 \pm 50$  [QAF a.u.], ( $p = 0.007$ ).



**Abbildung 11:** Alterskorrigierter QAF97-Wert in Abhängigkeit einer bei der augenärztlichen Untersuchung festgestellten Cataracta incipiens vs. klare Linse.

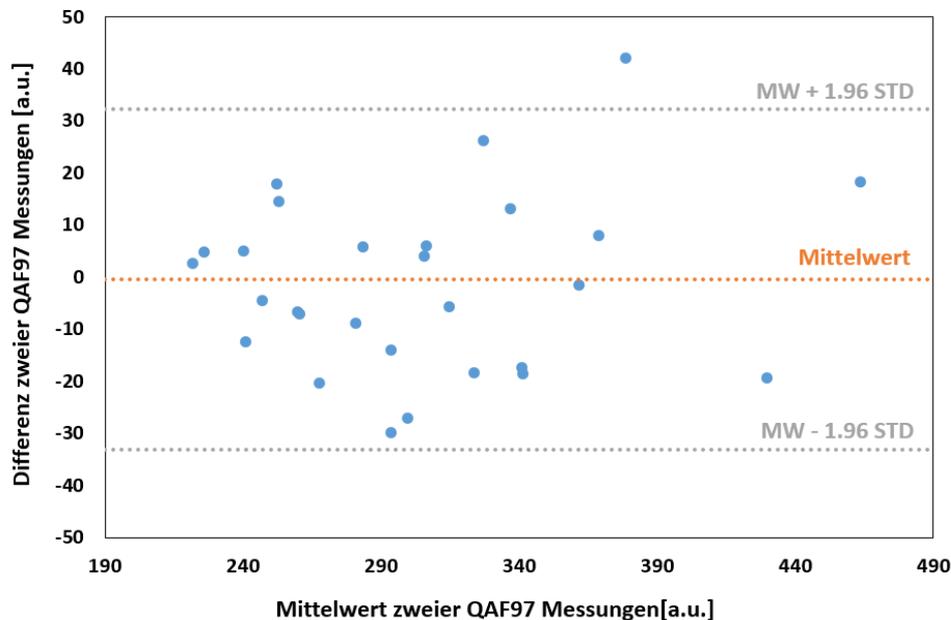
### 3.3. Reproduzierbarkeit der QAF Messungen

Die Test-Retest-Reliabilität der QAF Messungen wurde anhand von Doppelaufnahmen von 30 Patienten und Patientinnen (30 Augen) ermittelt. Hierbei wurden zwei Messungen vom selben Untersucher am selben Tag durchgeführt. Zwischen beiden Messungen wurde das HRA jeweils neu eingestellt.

Der Bland-Altman-Koeffizient für Messreproduzierbarkeit (Delori et al., 2011) betrug 10.7%, d.h. in weniger als 5% der Fälle beträgt der Unterschied zwischen zwei Messungen mehr als 10.7% (Sparrow et al., 2013).

Der zugehörige Bland-Altman Plot ist in Abbildung 12 gezeigt. Dieser Plot wird verwendet, um mögliche Ausreißer oder eine systematische Abweichung zwischen erster und zweiter Messung (den sog. Bias) darzustellen.

Für die Test-Retest-Messungen der QAF zeigt sich keine systematische Diskrepanz, da der Offset zur y-Achse näherungsweise 0 beträgt. Es existiert nur ein Ausreißer, die restlichen Messwerte sind innerhalb von 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ( $2\sigma$ ), was eine gute Messreproduzierbarkeit zeigt.



*Abbildung 12: Bland-Altman Plot zweier QAF97 Messungen vom selben Tag und Untersucher. Auf der x-Achse ist der Mittelwert beider Messungen dargestellt, die y-Achse zeigt die Differenz der Messungen. Die orange gestrichelte Linie stellt den Bias (=eine systematische Abweichung zwischen erster und zweiter Messung) dar, die grauen gestrichelten Linien zeigen das 95% Konfidenzintervall. MW = Mittelwert; STD = Standardabweichung*

### 3.4. Zeitliche Entwicklung der QAF (BL zu FU)

Für die folgenden Auswertungen werden nur jene Patienten und Patientinnen der BL-Gruppe verwendet, die auch zum FU Termin erschienen sind.

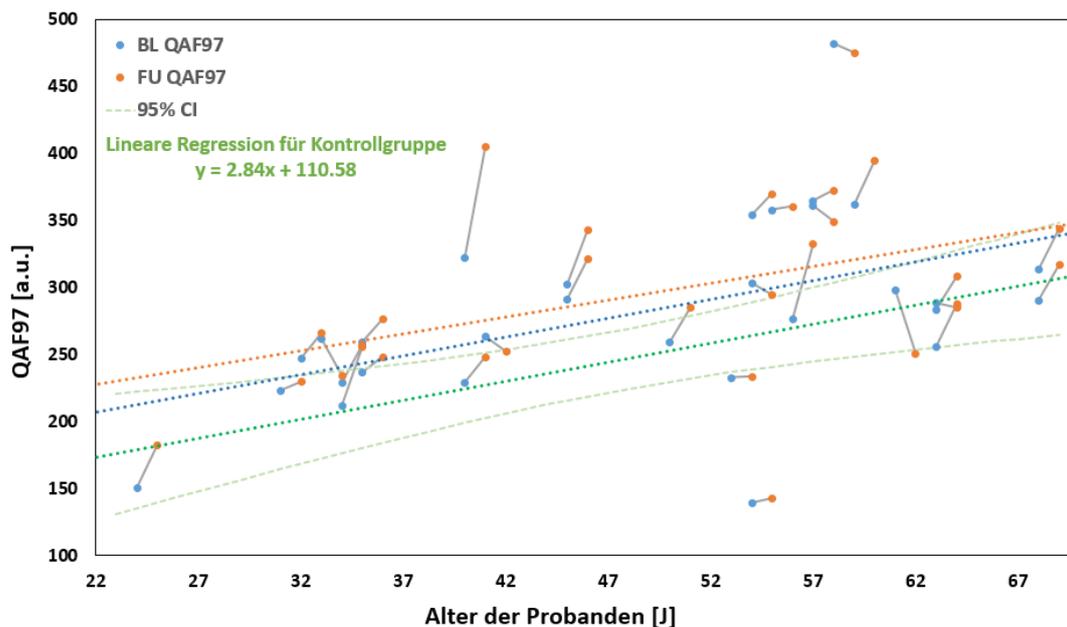
#### 3.4.1. Quantitative Veränderung der QAF

Für alle Bereiche des QAF97 Grids zeigte sich ein signifikanter Anstieg der QAF der CQ/HCQ - Patienten und Patientinnen von BL zu FU (ohne BEM Patientinnen,  $n = 29$ ),  $p_{\text{Fovea}} = 0.05$ ,  $p_{\text{Parafovea}} = 0.01$ ,  $p_{\text{QAF97}} = 0.006$ . Dieselbe Tendenz der ansteigenden QAF ist auch für die BEM Patientinnen erkennbar. Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl ( $n = 3$ ), konnte für die BEM Patientinnen jedoch kein aussagekräftiger Signifikanztest durchgeführt werden. Die konkreten Zahlenwerte können Abbildung 13 und Tabelle 4 entnommen werden.

*Tabelle 4: Übersicht über die Entwicklung der QAF Werte in den drei Bereichen des QAF97 Grids für BL, FU und Kontrollgruppe. Die BEM Patientinnen werden hierbei gesondert aufgeführt.*

<b>Lokalisation im Grid</b>	<b>BL (ohne BEM)</b>	<b>FU (ohne BEM)</b>	<b>BL (BEM Pat.)</b>	<b>FU (BEM Pat.)</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
QAF Fovea	123.0 ± 45.8	129.4 ± 47.6	150.0 ± 30.1	153.1 ± 18.3	110.5 ± 38.7
QAF Parafovea	211.1 ± 55.4	223.2 ± 59.7	152.5 ± 47.7	167.6 ± 52.6	183.4 ± 54.2
QAF97 Perifovea	283.0 ± 70.2	297.2 ± 71.7	287.0 ± 33.3	323.8 ± 43.3	244.2 ± 72.9

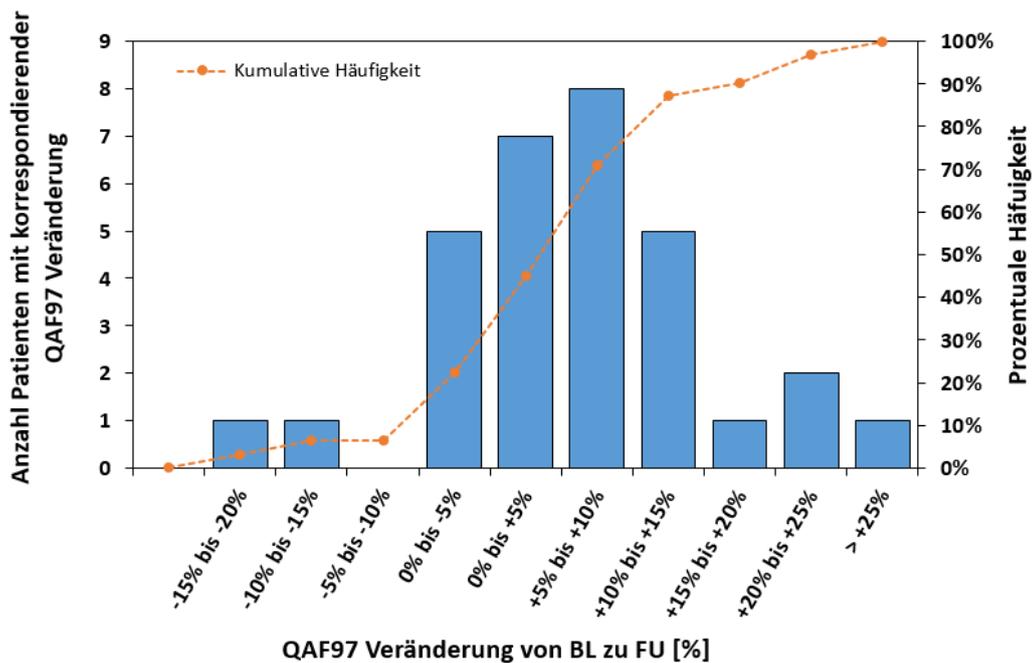
Wie bereits zuvor gezeigt, sind die QAF Intensitäten für CQ/HCQ Patienten und Patientinnen gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht (Reichel et al., 2020). Da für die Kontrollgruppe keine FU Untersuchung durchgeführt wurde, wurde anhand der theoretischen QAF-Entwicklung mit zunehmendem Alter ein durchschnittlicher Anstieg von ca. 2.84 [QAF a.u.] interpoliert (Kleefeldt et al., 2020). Bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen beträgt der QAF-Anstieg pro Lebensjahr  $QAF_{\text{FU}} - QAF_{\text{BL}} = 297.2 - 283.0 = 14.2$  [QAF a.u.], sodass der erwartbare Alterseffekt deutlich übertroffen wird.



**Abbildung 13:** QAF Entwicklung aller CQ/HCQ Patienten und Patientinnen für BL (blaue Marker) und für die FU Untersuchung nach 1 Jahr (orangene Marker). Die gestrichelten Linien repräsentieren Trendlinien für jede Gruppe (Blau = BL, Orange = FU, Grün = Kontrollgruppe). Für alle Gruppen zeigt sich außerdem die vorbeschriebene Zunahme der QAF mit steigendem Alter.

Eine Analyse der QAF Zunahme/Abnahme ist in Abbildung 14 dargestellt und zeigt, dass bei der Mehrheit der Probanden und Probandinnen (20/32) eine Veränderung zwischen BL und FU zwischen -5% und +10% liegt, d.h. innerhalb der in Kapitel 3.3. (Reproduzierbarkeit der QAF Messungen) beschriebenen Messunsicherheit.

Bei 2 Probandinnen zeigen sich um mehr als 10% verringerte QAF97 Intensitäten zum FU Zeitpunkt. Dies konnte auf eine etwas geringere Bildqualität der FU Untersuchung zurückgeführt werden. 9 Patienten und Patientinnen (inklusive 2 BEM Patientinnen) zeigten eine Erhöhung der QAF97 um mehr als 10 und bis zu 25%. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der QAF97 Erhöhung und Kumulativdosis oder dem Alter gezeigt werden.

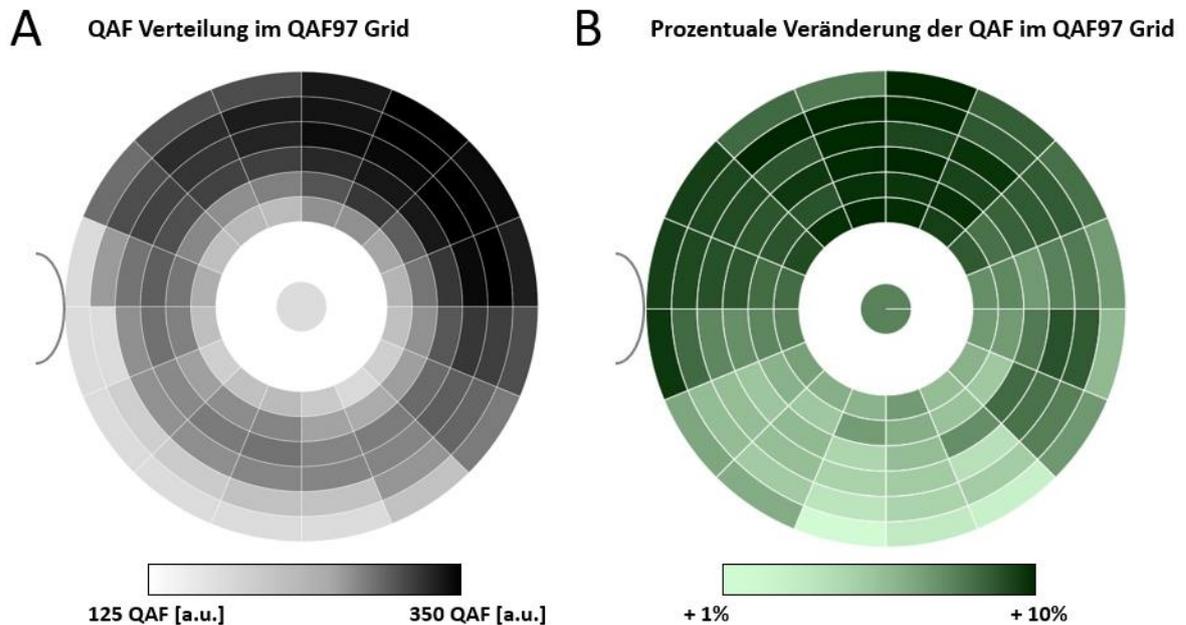


**Abbildung 14:** Veränderung der QAF97-Intensität von BL zu FU. Auf der y-Achse sind die Anzahl Patienten und Patientinnen mit der entsprechenden prozentualen Veränderung dargestellt, die x-Achse zeigt die prozentuale Zu- bzw. Abnahme der QAF-Werte von BL zu FU. Die kumulative Häufigkeit ist als orange gestrichelte Linie dargestellt.

### 3.4.2. Segmentale Veränderungen

Die Intensitätsverteilung der Autofluoreszenz über den posterioren Pol ist bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen wie auch bei der Kontrollgruppe ähnlich. Das Maximum findet sich im temporal-superioren Bereich, nasal-inferior ergeben sich die geringsten QAF Intensitäten (siehe Abbildung 15A). Die größte Veränderung der einzelnen Segmente von BL zu FU zeigt sich im superioren Teil der Netzhaut mit einem Maximum von +10% QAF [a.u.] (siehe Abbildung 15B).

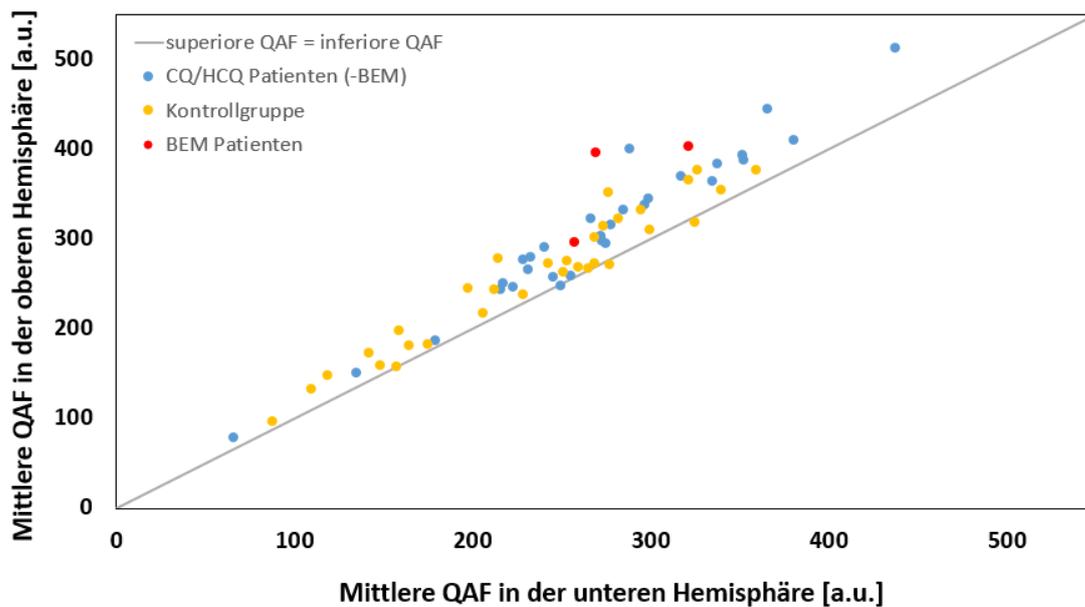
Um die QAF-Intensitätsunterschiede zwischen den Segmenten der superioren und inferioren Hemisphäre zu vergleichen, wurden sämtliche Segmente oberhalb und unterhalb der Horizontalen berechnet und dargestellt. In Abbildung 16 sind die Werte jeweils gegeneinander aufgetragen. Die grau eingezeichnete Winkelhalbierende entspricht gleichen Werten superior wie inferior.



**Abbildung 15:** Räumliche QAF-Intensitäts-Verteilung dargestellt mit Hilfe des QAF97 Analysemodells. A: Die absoluten QAF-Werte wurden in entsprechende Graustufen konvertiert. Die höchste QAF Intensität (schwarz dargestellt) findet sich im temporal-superioren Anteil der Netzhaut, die niedrigsten QAF-Werte (hellgrau dargestellt) finden sich nasal-inferior. B: Prozentuale Veränderungen der QAF von BL zu FU. Die höchste Veränderung mit bis zu +10% Intensitätssteigerung findet sich im superioren Bereich (dunkelgrün), die niedrigste Veränderung mit +1% im inferioren Bereich (hellgrün).

Für alle Patienten und Patientinnen (d.h. CQ/HCQ Patienten und Patientinnen, Kontrollgruppe, BEM Patientinnen) konnten signifikant höhere QAF-Werte in der superioren Hemisphäre verglichen mit der inferioren Hemisphäre gezeigt werden. Dieser Effekt ist für CQ/HCQ Probanden und Probandinnen jedoch nicht ausgeprägter als für die gesunden Kontrollprobanden und -probandinnen.

Für die Kontrollgruppe betrug die mittlere superioren QAF  $259.0 \pm 76.1$  [a.u.] und die mittlere inferioren QAF  $234.1 \pm 71.9$ ,  $p < 0.001$ . Ähnlich verhalten sich auch die QAF-Werte für die CQ/HCQ Patienten und Patientinnen mit superior  $316.7 \pm 79.4$  [a.u.] und inferior  $277.6 \pm 65.3$  [a.u.],  $p < 0.001$ . Die BEM Patientinnen zeigen superior Werte von ca.  $365.0 \pm 59.7$  [a.u.] und inferior  $282.7 \pm 34.0$  [a.u.],  $p = 0.08$  (bei  $n = 3$ ).



*Abbildung 16: Gemittelte QAF-Werte der Segmente der superioren und inferioren Hemisphäre für die einzelnen Patienten und Patientinnen. Als blaue Punkte werden die Werte der CQ/HCQ Probanden und Probandinnen ohne BEM dargestellt, gelb sind selbige Werte für die Kontrollgruppe und die roten Punkte zeigen die Werte der BEM Patientinnen. Die graue Linie entspricht der Winkelhalbierenden, d.h. der Linie, auf der die QAF Werte der superioren wie inferioren Hemisphäre gleich sind.*

### 3.5. Progression der atrophien Zone bei BEM Patientinnen

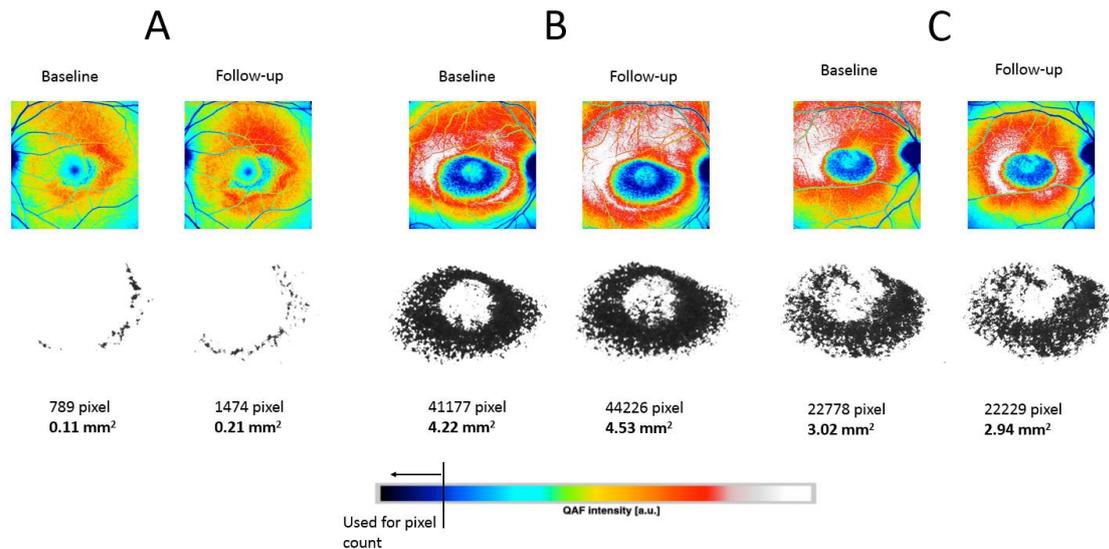
Von den insgesamt 50 BL - Patienten und Patientinnen sind fünf an einer BEM erkrankt und drei davon zu einer FU-Untersuchung erschienen. Detaillierte Informationen zu den BEM Patientinnen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Alle BEM Patientinnen sind weiblich. Bis zum Auftreten der Netzhautveränderungen wurde durchschnittlich 1180g CQ/HCQ (Minimum: 729g, Maximum 1713g) eingenommen über einen Zeitraum von ca. 12 Jahren (Minimum: 8.1 Jahre, Maximum 19 Jahre).

**Tabelle 5:** Übersicht über die BEM Patientinnen mit Patienten ID, ausgewertetem Auge, Alter, eingenommener Kumulativdosis, Datum des Absetzens der Medikamente und Grunderkrankung, grau hinterlegt sind jene drei Patientinnen, die eine FU Untersuchung erhielten.

<b>CQ0002, RA</b>	<b>CQ0011, LA</b>	<b>CQ0014, LA</b>	<b>CQ0031, RA</b>	<b>CQ0047, RA</b>
BL 09/2018 FU 08/2019	BL 10/2017 FU 11/2018	BL 01/2018	BL 09/2018	BL 04/2019 FU 06/2020
56 & 57 Jahre	35 & 36 Jahre	58 Jahre	58 Jahre	61 & 62 Jahre
146g HCQ + 1567g CQ in 9.75 Jahren	887 g HCQ In 9.8 Jahren	1388g HCQ in 19 Jahren	729 g CQ in 8.1 Jahren	1186g CQ in 13 Jahren
Abgesetzt 07/2007	Abgesetzt 09/2017	Abgesetzt 2013	Abgesetzt 02/2016	Abgesetzt 2008
SLE	SLE	RA	RA	RA

Es zeigte sich, dass bei den BEM Patientinnen die atrophe Zone stärker ausgeprägt ist, je länger die Erstdiagnose der Erkrankung zurückliegt. Die Patientinnen CQ0002 (Atrophiezone = 4.69 mm<sup>2</sup>) und CQ0047 (Atrophiezone = 3.02 mm<sup>2</sup>), die vor über 10 Jahren die CQ/HCQ Einnahme gestoppt haben, zeigen deutlich mehr Atrophie als die Patientin CQ0011 (Atrophiezone = 0.11 mm<sup>2</sup>), die im Jahr 2017 die Diagnose BEM erhielt und dementsprechend die Medikamente absetzte. Auch die Makula ist bei letzterer Patientin noch eher erhalten als bei den anderen. Die Gesichtsfeldausfälle zeigen sich in ihrer Ausprägung und Lokalisation entsprechend der atrophien Zone. Selbiges Muster zeigt sich auch im mfERG.

Beim FU Besuch der Patientinnen haben sich keine signifikanten Befundänderungen des Visus, der Gesichtsfelder oder der mfERGs ergeben. Die per QAF-Aufnahme ausgewertete atrophe Zone zeigt eine geringe Vergrößerung. Abbildung 17 zeigt die Fundusautofluoreszenzaufnahmen mit Quantifizierung der atrophien Zone zur BL und zur FU Untersuchung. Für die Patientinnen CQ0002 und CQ0011 konnte eine Zunahme der atrophien Zone festgestellt werden, hierbei sind BL und FU QAF-Aufnahme von vergleichbarer Bildqualität. Die QAF Aufnahme von CQ0047 ist aufgrund der eingeschränkten Bildqualität der FU Untersuchung nur eingeschränkt zu verwerten. Hier zeigt sich eine geringe Abnahme der atrophien Zone, die vermutlich im Rahmen der Messgenauigkeit liegt.



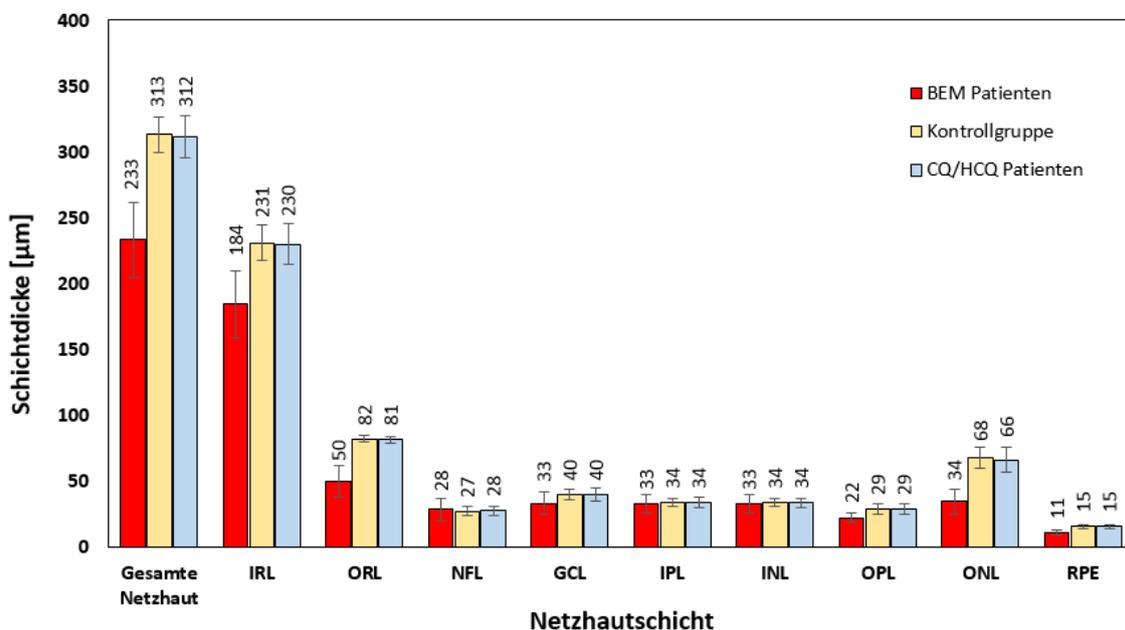
**Abbildung 17:** Quantifizierung der atrophischen Zone der drei BEM Patientinnen mit einer FU Untersuchung. Patientin A (CQ0011) ist 35 Jahre alt, hat eine kumulative Dosis von 887.25g HCQ eingenommen und das Medikament 09/2017 abgesetzt. Patientin B (CQ0002) ist 56 Jahre alt, hat eine kumulative Dosis von 1722g HCQ eingenommen und das Medikament 08/2008 abgesetzt. Patientin C (CQ0047) ist 61 Jahre alt, hat eine kumulative Dosis von 1186g HCQ eingenommen und das Medikament 2008 abgesetzt. Für alle Patientinnen ist die 8-bit QAF Aufnahme zu BL und FU dargestellt mit vergrößertem Ausschnitt der atrophischen Zone. Zusätzlich wurde die atrophe Zone in Anzahl Pixel übersetzt und die korrespondierende retinale Fläche ausgerechnet. Atrophie wird definiert als QAF-Werte < 120 [QAF a.u].

### 3.6. Analyse der Netzhautdicke

Es wurde zunächst ein Vergleich sämtlicher Netzhautschichten zwischen gesunden CQ/HCQ Patienten und Patientinnen, der Kontrollgruppe und den erkrankten BEM-Patientinnen durchgeführt, um nachfolgend jene Netzhautschichten zu identifizieren, die am stärksten von der Erkrankung betroffen sind und in der FU Analyse besonders aufmerksam untersucht werden müssen.

Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Netzhautdicke zwischen Kontrollgruppe und CQ/HCQ Patienten und Patientinnen. Bei Vorliegen einer BEM äußert sich die Netzhautatrophie mit deutlichen Veränderungen der Netzhautschichtdicke. Die gesamte Netzhautdicke verringert sich um durchschnittlich 25%, wobei die äußeren Netzhautschichten mit einer Dickenabnahme von 39% stärker betroffen sind als die inneren Netzhautschichten mit 20%. NFL, INL und IPL zeigen wenig Veränderung (-3%), während ONL (-48%), RPE (-31%) und OPL (-23%) am stärksten betroffen sind.

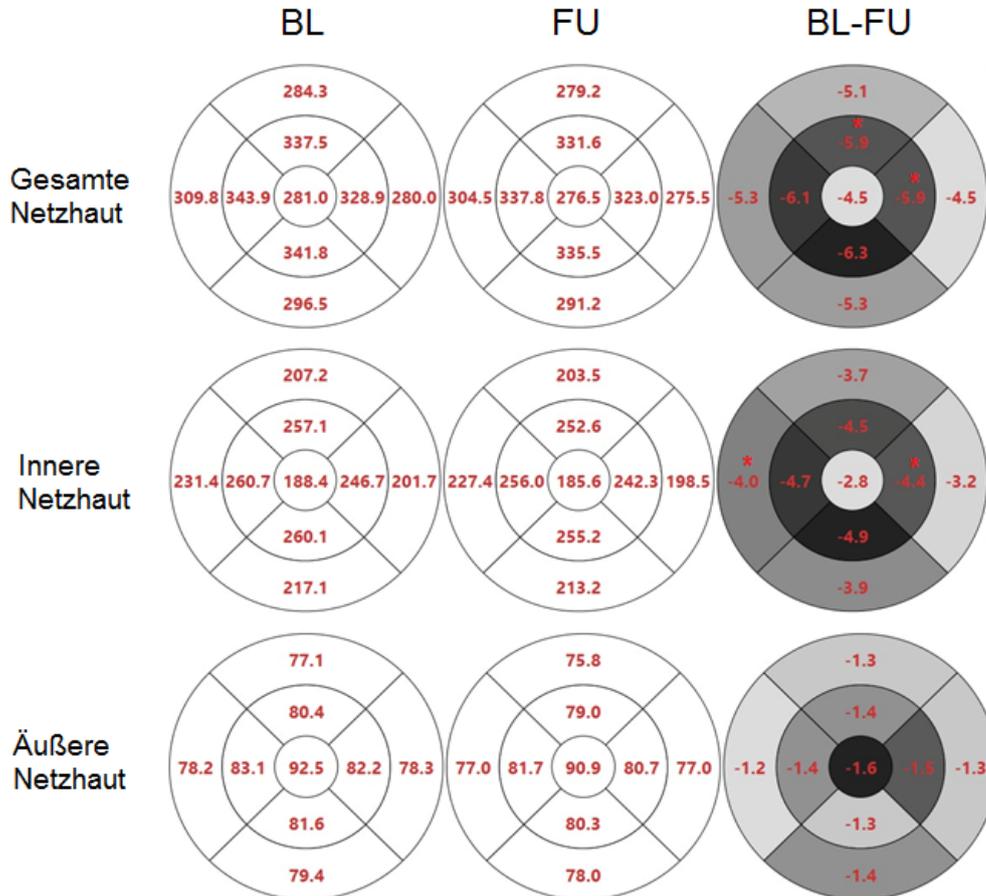
Abbildung 18 gibt einen Überblick über die einzelnen Schichtdicken (in  $\mu\text{m}$ ) von CQ/HCQ Patienten und Patientinnen ohne BEM, BEM Patientinnen und der Kontrollgruppe.



**Abbildung 18:** Durchschnittliche Schichtdicke der einzelnen Netzhautschichten (im ETDRS Grid) von gesunden Probanden und Probandinnen (gelbe Balken) und den CQ/HCQ Patientinnen (blaue Balken) sowie den BEM Patientinnen (rote Balken) jeweils zum Zeitpunkt der BL-Untersuchung. IRL: Inner retinal layer (innere Netzhautschicht), ORL: Outer retinal layer (äußere Netzhautschicht), NFL: Nerve fibre layer (Nervenfaserschicht), GCL: Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht), IPL: Inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht), INL: Inner nuclear layer (innere Körnerschicht), OPL: outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht), ONL: Outer nuclear layer (äußere Körnerschicht), RPE: Retinal pigment epithelium (Retinales Pigmentepithel).

Abbildung 19 illustriert die topographische Verteilung der Schichtdickenänderung innerhalb des ETDRS Grids zwischen BL und FU. Die gesamte Netzhautdicke verringert sich annähernd gleichmäßig um ca.  $5 \mu\text{m}$  mit etwas stärkerer Ausprägung (ca.  $-6 \mu\text{m}$ ) im Bereich der Parafovea, d.h. im 2mm Ring des ETDRS Grids. Es entfällt der Großteil der Schichtdickenreduktion zwischen BL und FU auf die inneren Netzhautschichten mit einer Reduktion von ca.  $4 \mu\text{m}$ . Wie oben beschrieben sind bei den BEM Patientinnen jedoch vor allem die äußeren Netzhautschichten betroffen. Diese zeigen insgesamt keine signifikante Verringerung. Diese Messergebnisse könnten jedoch auch im Bereich der Messvariabilität des OCT-Gerätes liegen. In (Comyn et al., 2012) wurde eine Messgenauigkeit für das verwendete Spectralis OCT im Bereich von  $8 \mu\text{m}$  gemessen.

Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen der Schichtdicke und der QAF oder kumulativer CQ/HCQ Dosis gefunden werden.



**Abbildung 19:** Topographische Verteilung der Schichtdickenveränderung der gesamten Netzhautschicht sowie der inneren und äußeren Netzhautschichten im ETDRS Grid. Die erste Spalte zeigt die Absolutwerte der einzelnen Schichtdicken zur BL Untersuchung, die zweite Spalte zeigt die Werte zur FU Untersuchung. Die Änderung von BL zu FU ist in der dritten Spalte dargestellt. Statistisch signifikante Änderungen sind mit \* markiert, alle Angaben sind in  $\mu\text{m}$ .

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden QAF Netzhautaufnahmen von mit CQ/HCQ therapierten Patienten und Patientinnen mit Augenmerk auf deren Entwicklung im Verlauf eines Jahres untersucht.

Es wurde ein von der Forschungsgruppe etabliertes Aufnahme- und Auswerteverfahren genutzt, mit dem ein Bildstapel der exakt überlagerten Aufnahmen verschiedener Bildmodalitäten (AF488, 787, IR, Rotfrei und QAF) erzeugt wird. Die Ausrichtung und Skalierung erfolgt mittels der gleichzeitig erzeugten SD-OCT Aufnahme. Wie in Kapitel 2.3.4. Bildverarbeitung und QAF Analyse) beschrieben, kommen verschiedene Analysegrids zur Anwendung, darunter neben dem etablierten ETDRS Grid auch das sogenannte QAF97 Grid, das nochmals feinere Segmente enthält und die Beurteilung der Parafovea erlaubt.

Auf diese Art und Weise ist es möglich, einerseits die Patienten und Patientinnen untereinander zu vergleichen, andererseits eine longitudinale Auswertung derjenigen Patienten und Patientinnen zu ermöglichen, die nach einem Jahr eine FU Untersuchung erhielten.

Somit konnten die zuvor gefundenen Ergebnisse (Reichel et al., 2020) anhand einer größeren Probandengruppe bestätigt werden: Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und Probandinnen und der QAF, jedoch keine Korrelation zu anderen anamnestischen Daten wie dem BMI oder dem Rauchverhalten. Die alterskorrigierte QAF zeigte einen positiven Trend zur Kumulativdosis bzw. Einnahmedauer von CQ/HCQ sowie eine signifikante Verringerung der QAF bei Vorliegen einer Cataracta incipiens.

Ebenso wurde die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen quantifiziert. Mit Hilfe des Bland-Altman-Koeffizienten ergab sich eine Messunsicherheit von ca. 10%, d.h. ein 10%iger Messfehler musste einkalkuliert werden.

Unter Berücksichtigung dieses Grenzwertes ergab sich ein signifikanter, den erwarteten altersbedingten Effekt übersteigenden Anstieg der QAF zwischen BL und FU für alle Bereiche des Analyseusters. Einige Patienten und Patientinnen zeigten eine Zunahme der QAF von bis zu 25%. Die QAF-Zunahme zeigte ein Maximum vor allem im superioren Anteil des Augenhintergrunds. Die QAF Intensitätsverteilung hingegen zeigt

auch bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen ein Maximum im temporal-superioren und ein Minimum im nasal-inferioren Anteil des Augenhintergrunds.

Die gesonderte Analyse der fünf weiblichen BEM Patientinnen ergab eine mittlere Einnahmedosis von 1181g und eine mittlere Einnahmedauer von 12 Jahren. In der Literatur werden  $> 5.0\text{mg/kg}$  Körpergewicht tägliche Dosis und eine Einnahmedauer von mehr als 10 Jahren als kritische Grenze für die Erstmanifestation einer BEM beschrieben (Marmor et al., 2016). Bei den BEM Patientinnen zeigen sich in allen Modalitäten pathologische Befunde, die umso ausgeprägter sind, je länger die Erkrankung besteht. Dies spricht für das häufig berichtete Fortschreiten der Erkrankung auch nach dem Absetzen der Medikamente (Jain & Jain, 2017; Lally et al., 2016; Marmor & Hu, 2014). In der Analyse der OCT-Aufnahmen der Probanden und Probandinnen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Netzhautdicke zwischen Kontrollgruppe und CQ/HCQ Patienten und Patientinnen.

## **4.2. Aufnahmemethoden und Reproduzierbarkeit**

QAF-Aufnahmen werden bereits erfolgreich zur Diagnostik unterschiedlicher retinaler Pathologien eingesetzt. Im Jahr 2014 stellten Burke et. al. eine erhöhte QAF im Zusammenhang mit Morbus Stargardt fest und schlugen vor, die QAF Messung als diagnostisches Tool beim genetischen Screening zu verwenden (Burke et al., 2014). Bei der Untersuchung von QAF-Veränderungen im Rahmen einer trockenen altersbedingten Makuladegeneration wurde festgestellt, dass die QAF mit Progress der Erkrankung abnimmt (Orellana-Rios et al., 2018).

Anstatt ausschließlich die QAF-Bilder zu bewerten, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Kombination von QAF-Aufnahmen mit weiteren Bildmodalitäten entwickelt, sodass die jeweiligen Vorteile nutzbar und kombinierbar werden. Dazu wurden alle Aufnahmen in einen genau übereinanderliegenden Bilderstapel vereint, sodass per FIJI Software leicht zwischen den Modalitäten gewechselt werden kann und pathologische Bereiche leichter beurteilt werden können.

Ein weiterer Vorteil des multimodalen Bilderstapels ist, dass pathologische Veränderungen in verschiedenen Aufnahmen korreliert werden können und sie gegebenenfalls in einigen Modalitäten frühzeitiger auffallen als in anderen.

Für die Ausrichtung des Bilderstapels dient die gleichzeitig aufgenommene OCT-Aufnahme, sodass zu jeder Veränderung im IR Bild auch immer strukturelle Informationen über die einzelnen Netzhautschichten vorliegen.

Für die vorliegende longitudinale Studie ist es besonders von Vorteil, dass die FU Untersuchungen in den bestehenden Bilderstapel nachträglich integriert werden können und so Veränderungen besser auffallen. Dies bezieht sich einerseits auf die Entwicklung der QAF bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen, andererseits aber auch auf die Erweiterung der Atrophiezone bei BEM Patienten und Patientinnen. Damit die Beurteilung nicht nur per Augenmaß erfolgt, wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit außerdem ein Tool entwickelt, welches die atrophe Zone in Pixeln quantifiziert und die Ausweitung somit objektiviert.

Zur Auswertung wird einerseits das weithin bekannte ETDRS Grid verwendet, was eine sehr gute Vergleichbarkeit zu anderen Studien zulässt. Andererseits kommt auch das zuvor beschriebene QAF97 Grid zur Anwendung, welches weiter periphere Bereiche mit abdeckt und dort eine feinere Analyse ermöglicht (Kleefeldt et al., 2020). In diesem Grid ist auch der parafoveale Bereich separat enthalten, in welchem die charakteristischen Veränderungen bei CQ/HCQ Toxizität zuerst auftreten (Marmor, 2012; Missner & Kellner, 2012). Die Erkrankung beginnt zumeist im parafoveal inferioren Teil der Netzhaut (Browning, 2014). Alle 5 BEM Patientinnen in dieser Studie zeigen eine dazu passende Atrophieausprägung.

Zur Beurteilung von Unterschieden zwischen BL und FU Aufnahmen wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen bewertet. Hierfür wurde der Bland-Altman Koeffizient aus Doppelaufnahmen vom selben Tag errechnet. Die Messungengenauigkeit zwischen zwei Messungen konnte hiermit auf  $\pm 10.7\%$  beziffert werden. Dies stimmt gut überein mit in der Literatur angegebenen Werten für Bland-Altman Koeffizienten von 6-11% (Delori et al., 2011; Duncker et al., 2014; Duncker et al., 2015).

### **4.3. Untersuchte Einflussfaktoren auf die QAF**

In der vorliegenden Forschungsarbeit zeigt sich ein signifikanter Anstieg der QAF mit zunehmendem Lebensalter. Dies ist im Einklang mit vielen anderen Studien zu diesem Thema (Greenberg et al., 2013; Reichel et al., 2020; Tran et al., 2020).

Eine Erklärung für die erhöhte QAF ergibt sich vor allem aus dem steigenden Anteil des autofluoreszierenden Lipofuszin in den RPE Zellen der Retina mit steigendem Alter. In (Feeney-Burns, Hilderbrand, & Eldridge, 1984) wurde das RPE von menschlichen Augen postmortem histologisch untersucht und das Verhältnis der Lipofuszingranula am Zytoplasma der Zellen bestimmt. Das Hauptergebnis von (Feeney-Burns et al., 1984) ist ein steigender Anteil von Lipofuszingranula und komplexen Granula (Melanolysosomen, Melanolipofuszin) mit steigendem Alter. Der Lipofuszinanteil am RPE Zytoplasma wird beziffert auf 1% (erste Lebensdekade), 7-9% (11-50 Jahre), 12-13% (50-80 Jahre) und schließlich 19% bei über 80-Jährigen. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der Melaningranula im selben Zeitraum. Es wird auch angenommen, dass der Verlust von Melaningranula die RPE Zellen anfälliger für Schäden durch freie Radikale macht. Hierdurch können wiederum photooxidative Veränderungen der RPE Fluorophore auftreten und zur Hyperautofluoreszenz führen. Es gilt zu beachten, dass bei dieser Studie die Anzahl der Granula pro individuellem Schnitt bestimmt wurde statt diese auf das Zellvolumen umzurechnen. Hierzu müsste die Tiefe des untersuchten Schnittes bestimmt werden, was heutzutage beispielsweise mit 3-D Rekonstruktion durch HR-SIM (high resolution structured illumination microscopy) ermöglicht wird. Diese Methoden wurden in (Ach et al., 2014; Ach et al., 2015) angewandt, um menschliche RPE-Zellen histologisch zu charakterisieren und den Zusammenhang zur Fundusautofluoreszenz zu untersuchen. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass die Zellgröße der RPE Zellen mit steigendem Lebensalter zunimmt und diese positiv mit der Fundusautofluoreszenz korreliert.

Auch in (Wing, Blanchard, & Weiter, 1978) wurde mit Hilfe von fluorometrischen Messungen eine Akkumulation von Lipofuszingranula mit steigendem Alter gefunden.

Neben dem Alter wurden weitere anamnestisch erhobene Daten zur QAF korreliert. Eine positive Raucheranamnese führt nachgewiesenermaßen zu oxidativem Stress, indem Radikale oder reaktive Sauerstoff-Spezies in die Lunge gelangen (Kamceva et al., 2016). Dennoch lässt sich kein Effekt auf die QAF zeigen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der oxidative Stress lokal begrenzt bleibt und sich nicht oder gegebenenfalls erst deutlich später auf die RPE Zellen auswirkt.

Auch Adipositas bedingt vermehrten oxidativen Stress (Marseglia et al., 2014). Aus den vorliegenden Daten ergab sich jedoch kein Einfluss des BMI auf die QAF.

#### **4.4. Einfluss von CQ/HCQ auf die QAF**

Bereits in der vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass die systemische CQ/HCQ Medikation generell mit erhöhten QAF-Werte einhergeht (Reichel et al., 2020). Dieses Ergebnis konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden mit einer deutlich erhöhten QAF der CQ/HCQ Patienten und Patientinnen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Interessanterweise zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen der kumulativ eingenommenen Dosis oder der Einnahmedauer, wohl aber ein positiver Trend der beiden Variablen zur QAF. Eine größere Probandengruppe könnte hier mehr statistische Sicherheit bringen.

Verschiedene weitere Studien haben den Zusammenhang zwischen CQ/HCQ Einnahme und QAF untersucht – mit dem Konsens, dass die Einnahme meist zu erhöhten QAF-Werten führt (Duncker et al., 2015; Greenstein et al., 2020; Parrulli et al., 2021; Reichel et al., 2020).

Verschiedene Mechanismen könnten als Ursache für das erhöhte QAF-Signal in Frage kommen. In Tierstudien an Ratten und Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass sich CQ/HCQ und deren Metabolite vor allem im RPE der Netzhaut anreichern – wahrscheinlich aufgrund der Eigenschaft, an Melanin binden zu können (McChesney, 1983; Rosenthal et al., 1978).

Wie in Kapitel 1.3.2. (Pathomechanismus) beschrieben, kann das Medikament über die Membran von Lysosomen diffundieren und wird aufgrund des dortigen, sauren Milieus protoniert und effektiv gefangen. Dadurch erhöht sich der pH-Wert innerhalb der Lysosomen, was wiederum zu verminderter degradativer Kapazität verschiedener Hydrolasen führt (Sundelin & Terman, 2002).

Diese Veränderungen könnten eine Erklärung für eine verminderte Funktionalität des RPEs sein, d.h. die Außensegmente der Photorezeptoren werden nicht mehr korrekt degradiert und es häufen sich Lipofuszingranula innerhalb der Lysosomen an. Dafür spricht auch, dass Chloroquin stärker mit Lipofuszinakkumulation und BEM assoziiert ist als Hydroxychloroquin, welches aufgrund seiner eher hydrophilen

Eigenschaften die Lysosomenmembran schlechter passieren kann (Sundelin & Terman, 2002). Das erhöhte QAF Signal könnte also die Detektion von erhöhtem Lipofuzingehalt im RPE sein.

Eine andere Hypothese ist, dass CQ/HCQ und die entsprechenden Metabolite selbst autofluoreszierende Eigenschaften besitzen und in diesem Fall eher die Speicherung der Metabolite durch die erhöhte QAF gezeigt wird (Kaur et al., 2019).

#### **4.5. Verlauf der QAF innerhalb eines Jahres**

In den vorhergehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe sowie auch in den vorliegenden Daten wird eine Steigerung der QAF pro Lebensjahr um ca. 2-3 QAF [a.u.] berichtet (Kleefeldt et al., 2020; Pröbster et al., 2021). Mit einer durchschnittlichen Steigerung der QAF um 14.2 [QAF a.u.] für dieselben Probanden und Probandinnen innerhalb eines Jahres wird die erwartete und auf das Alter zurückzuführende Erhöhung deutlich übertroffen.

Dies legt nahe, dass entweder die Einnahme von CQ/HCQ oder die rheumatische Grunderkrankung zu einem Mechanismus führen, der die QAF weiter erhöht. Wie oben beschrieben, kommt dafür eine erhöhte Lipofuzingene in Frage. Man könnte hier eine Kettenreaktion vermuten, d.h. sobald die Fähigkeit der RPE Zellen zur Degradation und Phagozytose einmal überschritten wird, gehen Lysosomen unter. Das wiederum führt dann zu einer Übersteigerung der Degradationskapazität angrenzender Bereiche. Im Falle der BEM Patientin CQ0011 zeigt sich im QAF Bild deutlich die Ausbreitung der Hyperautofluoreszenz an angrenzende untergegangene Bereiche, siehe Abbildung 17. Eine weitere Erklärung für die erhöhte QAF könnten untergegangene Photorezeptoren und damit fehlendes Photorezeptorpigment sein. Hierdurch würde weniger RPE AF blockiert werden.

Ein anderer Grund für Hyperautofluoreszenz unter CQ/HCQ Einnahme sowie für die Dynamik innerhalb eines Jahres könnte auch eine erhöhte Speicherung von autofluoreszierendem Material sein.

Weiterhin wäre auch denkbar, dass durch die zugrundeliegende rheumatische Erkrankung ubiquitär entzündliche Aktivität auftritt und es zu einem erhöhten Metabolismus der RPE Zellen kommt, was sich in der erhöhten QAF widerspiegelt.

Um diese Zusammenhänge weiter zu untersuchen, wäre eine Kontrollgruppe – nicht aus gesunden Probanden und Probandinnen – sondern aus rheumatologisch erkrankten (SLE, RA usw.) notwendig, die jedoch kein CQ/HCQ einnehmen.

Abbildung 14 illustriert die Verteilung der QAF-Zunahme. Es wird nicht bei jedem Patienten oder jeder Patientin eine signifikante Zunahme festgestellt. Mit der durch Wiederholungsmessungen ermittelten Messunsicherheit von ca. 10 % ist die QAF für 20/32 Patienten und Patientinnen zur FU Untersuchung im Bereich  $\pm 10\%$  geblieben. 2 Probandinnen zeigen aufgrund einer verringerten Bildqualität zur FU Untersuchung sogar eine geringere QAF. Es bleiben jedoch 9 Patienten und Patientinnen, bei denen eine Zunahme von mehr als 10% und bis zu 25% innerhalb eines Jahres beobachtet werden kann. Bei jenen Patienten und Patientinnen könnte die überdurchschnittliche QAF-Erhöhung ein Warnsignal für zukünftige pathologische Netzhautveränderungen darstellen.

#### **4.6. Räumliche Verteilung der QAF-Intensität sowie QAF-Entwicklung**

In unseren Untersuchungen zeigte sich eine räumliche Verteilung der QAF mit einem perifovealen Maximum temporal-superior und einem Minimum im Bereich der Fovea. Diese Verteilung wurde bereits in verschiedenen Studien zuvor berichtet (Greenberg et al., 2013; Kleefeldt et al., 2020; Pröbster et al., 2021; Reichel et al., 2020) und es fällt eine Ähnlichkeit zur räumlichen Verteilung der Stäbchen-Fotorezeptoren auf (Burke et al., 2014).

Auch Sparrow et. al zeigten in in-vivo Untersuchungen mit Hilfe von Spektralfotometrie und Fluoreszenz-Photomikroskopie, dass im Bereich der temporal-superioren RPE Zellen das Autofluoreszenzsignal am höchsten ist und führten dies auf die dortige Lipofuszin-Dichte zurück (Sparrow & Duncker, 2014).

Anhand histologischer Schnitte menschlicher RPE-Zellen konnte gezeigt werden, dass im perifovealen Bereich die Dichte an Lipofuszingranula am höchsten ist, was das dort hohe Autofluoreszenzsignal erklären könnte (Bermond et al., 2020).

Gleichzeitig kommt es im Bereich der Fovea vermehrt zur Lichtabsorption aufgrund der charakteristischen Verteilung des Makulapigment und der dort hohen Melanindichte, wodurch dort das QAF-Signal niedriger ist (Sparrow & Duncker, 2014).

Unsere Daten zeigten die stärkste räumliche QAF-Zunahme im superioren Teil der Retina. Ursache und Bedeutung dieser Zunahme sind noch ungeklärt. Auch (Greenstein et al., 2020) zeigen einen Unterschied der QAF Intensitäten in der oberen und unteren Hemisphere.

Es wird vermutet, dass die Verteilung von Lipofuszin und damit hoher QAF grundsätzlich auf einige Charakteristika des Augenhintergrundes zurückzuführen sind wie z.B. auf die Dichte der Photorezeptoren, die Zahl der RPE Zellen und die Verteilung der Vitamin A Transporter (Delori, Goger, & Dorey, 2001).

Die Quantität des akkumulierten Lipofuszin scheint individuell und von verschiedenen Variablen wie dem oxidativen Stress, Ernährung und ggf. Lichtexposition abhängig (Delori et al., 2001).

#### **4.7. Messung der atrophen Zone bei BEM Patientinnen**

Die Atrophie der RPE-Zellen bei BEM Patientinnen tritt häufig zuerst inferior der Fovea auf (Browning, 2014). Die Atrophie ist sowohl in SD-OCT Bildern sichtbar als auch in QAF-Aufnahmen, auf denen die geschädigten Areale hypoautofluoreszent erscheinen. Mit Hilfe einer Software, die diese dunklen Bereiche in Pixel quantifiziert, ist es möglich, das Ausmaß des Bereiches zu bestimmen.

Bei der Auswertung zeigt sich, dass sich die Tendenz der inferioren Atrophie auch an unseren BEM Patientinnen beobachten lässt, vor allem bei CQ0011, bei der die beginnende Atrophie im temporal-inferioren Bereich ist und die sich im Verlauf eines Jahres auch in dieser Richtung weiter ausbreitet. In der Literatur wird spekuliert, ob blaues Licht vom Himmel, das vor allem auf der unteren Netzhauthemisphäre auftrifft, dafür verantwortlich sein könnte. Diese Theorie wird kontrovers diskutiert (Zhao, Zhou, Tan, & Li, 2018). Es könnte sein, dass die kürzere Wellenlänge von blauem Licht für retinale Neurone schädlicher ist als langwelligeres Licht (Browning, 2014).

Weiterhin zeigt sich, dass die Atrophie bei jenen Patientinnen stärker ausgeprägt ist, die bereits vor über 10 Jahren die Diagnosestellung der BEM erhielten und seither das Medikament nicht mehr eingenommen haben (CQ002) verglichen mit jenen Patientinnen die das Medikament erst kürzlich abgesetzt hatten (CQ0011). Dies deckt sich mit den

Ergebnissen anderer Studien, dass die Krankheit auch nach Absetzen der CQ/HCQ Medikation weiter progredient ist (Allahdina et al., 2019; de Sisternes, Hu, Rubin, & Marmor, 2015; Jain & Jain, 2017). Eine mögliche Ursache besteht in der langen Halbwertszeit von CQ/HCQ und deren Metaboliten in retinalem Gewebe (Rubin et al., 1963).

Die computergestützte Messung der atrophen Zone anhand der 8-bit QAF-Bilder zeigt bei BEM Patientinnen eine leichte Zunahme der Atrophie im Verlauf eines Jahres. Eine Zunahme der Atrophiezone kann auch bei anderen degenerativen Netzhauterkrankungen wie beispielsweise der AMD beobachtet werden (Abdelfattah, Zhang, Boyer, & Sadda, 2016; Schmitz-Valckenberg, Fleckenstein, Scholl, & Holz, 2009).

#### **4.8. CQ und OCT Veränderungen in Zusammenhang zur QAF**

Die SD-OCT Diagnostik ist eine strukturelle Screeningmethode, die in der Leitlinie der AAO für Patienten und Patientinnen unter CQ/HCQ Therapie jährlich empfohlen wird (Marmor et al., 2016). Obgleich kontrovers diskutiert, haben einige Studien CQ/HCQ-abhängige Veränderungen beschrieben: dazu gehört eine Schichtdickenabnahme der Nervenfaserschicht (Bonanomi, Dantas, & Medeiros, 2006), der Photorezeptorschicht (Uslu et al., 2016), der äußeren Körnerschicht (Lally et al., 2016) und die Unterbrechung sowie verringerte Reflektivität der parafovealen ellipsoiden Zone (Garrity et al., 2019; Lally et al., 2016). Diese Veränderungen spiegeln möglicherweise frühe OCT-Veränderungen bei beginnender Netzhauttoxizität wider.

In unserer FU Auswertung der SD-OCT Bilder zeigt sich eine Abnahme der Netzhautdicke, bei der alle Schichten involviert sind. Es wäre möglich, dass es sich hierbei um eine Messchwankung im Rahmen der Messgenauigkeit des Spectralis OCTs anstatt eines tatsächlichen Effekts handelt.

Eine Korrelation zwischen QAF-Intensität und Netzhaut Schichtdicken bzw. deren Veränderung konnte jedoch nicht gezeigt werden.

#### **4.9. Limitationen, Stärken und Ausblick der Studie**

Bei der vorliegenden Studie gibt es einige Limitationen aufgrund des Studienkollektivs. In der Probandenkohorte gibt es eine ungleiche Geschlechterverteilung aufgrund der höheren Prävalenz rheumatologischer Erkrankungen bei Frauen verglichen mit Männern und demzufolge der häufigeren Verschreibung von CQ/HCQ. Die geschlechterabhängige Prävalenz kann am Beispiel des SLE (ca. 9:1, f:m) (Ramírez Sepúlveda et al., 2019) und der RA (3:1, f:m) (Wolfe, Kellgren, & Masi, 1968) beziffert werden. Um diesen Effekt zu kompensieren, wurde eine alters- und geschlechtsadaptierte Kontrollgruppe aus gesunden Probanden und Probandinnen erstellt.

Bei den Probanden und Probandinnen der Kontrollgruppe ist keine Vorerkrankung bekannt. Es wäre jedoch für die Studie von Vorteil, eine Kontrollgruppe aus rheumatologisch vorerkrankten Patienten und Patientinnen zu verwenden, um bewerten zu können, ob die Erhöhung der QAF bzw. auch die Dynamik der QAF Entwicklung auf die Grunderkrankung oder die Medikation zurückzuführen sein könnte. Weiterhin existieren für die Kontrollgruppe auch keine FU Daten, sodass die QAF Vergleiche hier auf mathematischen Interpolationen beruhen.

Ein weiteres Problem der Patientenkohorte ist die Anzahl BEM Patientinnen, die für eine verlässliche statistische Analyse mit  $n = 5$  zu niedrig ist. Dies ist zurückzuführen auf limitierte Möglichkeiten der Probandenakquise und die Seltenheit der Erkrankung. Bei der Durchführung der Studie muss beachtet werden, dass anamnestische Daten wie die ophthalmologische Anamnese, allgemeine Vorerkrankungen und kumulativ eingenommene CQ/HCQ Dosen auf den Aussagen der einzelnen Patienten und Patientinnen anstatt auf objektiven Parametern wie z.B. der GFR als Marker für die Nierenfunktion beruhen und teilweise deshalb Ungenauigkeiten aufweisen.

Auch die Aufnahme der QAF ist kritisch zu bewerten, da die Bildqualität von mehreren Faktoren abhängt. Einerseits spielt die Kooperation der Patienten und Patientinnen d.h. Fixation und das Offenhalten der Augen eine große Rolle, andererseits macht auch die Erfahrung des Operators große Unterschiede. Technisch beruht die Bildqualität der QAF-Aufnahmen auf klaren Medien, insbesondere der Linse. Durch unsere Einschlusskriterien wurde dies berücksichtigt, jedoch besteht keine Garantie perfekt klarer Medien nach einer Spaltlampenuntersuchung. Hier wäre eine ergänzende Studie zum Alterseffekt der optischen Medien auf die QAF von Vorteil.

Technisch kann auch die Auswertung der Bilder aufgrund händischer Schritte beim Ausmessen und Ausrichten fehleranfällig sein. Eine softwarebasierte Automatisierung und gegebenenfalls händische Nachüberprüfung der Ausrichtung wären hier wünschenswert.

Die Studie zeichnet sich demgegenüber vor allem durch die große Anzahl der CQ/HCQ-therapierten Probanden und Probandinnen inklusive fünf BEM-Patientinnen aus. Es wird eine innovative Softwarelösung zur Bildverarbeitung verwendet, die menschliche Fehler weitgehend reduzieren kann. Es wurde ein Bildstapel verschiedener Modalitäten generiert, die exakt übereinander liegen und die die Erkennung von Pathologien deutlich vereinfacht. Die vorliegenden Daten sind die ersten Daten zur QAF Entwicklung in einer longitudinalen Studie. Gleichzeitig bestätigen sie die Daten aus vorigen Messungen und unterstreichen damit die Verlässlichkeit der Methode.

Es wäre eine interessante Fragestellung, die QAF-Dynamik auch über den Zeitraum von einem Jahr hinaus in einer künftigen Studie zu erfassen.

## 5. Zusammenfassung

CQ und HCQ werden häufig zur Behandlung von Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis wie z.B. SLE oder RA eingesetzt. Hierbei sind meist keine schwerwiegenden kurzfristigen Nebenwirkungen zu befürchten. Die lange Anwendung birgt jedoch das Risiko der Entwicklung einer CQ/HCQ-assoziierten Makulopathie. Diese ist charakterisiert durch den irreversiblen Verlust von Photorezeptoren und RPE und im Verlauf progredienten Visusverlust.

Spätestens nach 5 Jahren CQ/HCQ-Therapie ist ein effektives Screening aufgrund der Irreversibilität und Progressivität der BEM unabdingbar. Die AAO empfiehlt funktionelle und strukturelle Untersuchungen in regelmäßigen Intervallen.

Die QAF-Bildgebung ist eine nicht-invasive, innovative Methode zur Diagnostik krankhafter Netzhautveränderungen. Durch entsprechende technische Modifikationen eines cSLO sind inzwischen quantitative Aussagen bei Verlaufskontrollen der FAF derselben Patienten und Patientinnen sowie interpersonelle Vergleiche möglich.

In der vorliegenden Studie wurden 32 CQ/HCQ Patienten und Patientinnen über den Zeitraum von einem Jahr mittels multimodaler Bildgebung (IR-, FAF bei 488 nm und 787 nm, QAF bei 488 nm, rotfreie Aufnahmen sowie SD-OCT Bilder) auf BEM-typische Veränderungen am Augenhintergrund gescreent bzw. Verlaufskontrollen bei bekannter BEM durchgeführt.

Es wurden multimodale Bildstapel generiert, die anhand einer zeitgleich aufgenommenen OCT Aufnahme positioniert und in ihrer Ausrichtung und Größe angepasst wurden.

Mit Hilfe des QAF97 sowie des ETDRS Grids konnte die QAF ausgewertet werden. Hierbei wurden Korrelationen zu den demographischen Daten der Patienten und Patientinnen überprüft sowie die Reproduzierbarkeit der QAF Messungen verifiziert.

Die QAF Entwicklung innerhalb eines Jahres wurde quantitativ und räumlich analysiert. Hierbei zeigte sich eine den erwarteten Alterseffekt übersteigende Erhöhung der QAF. Dies könnte durch eine erhöhte Lipofuzingenese oder metabolische Aktivität der Netzhaut erklärt werden. Ein anderer Erklärungsansatz ergibt sich aus den Ergebnissen der OCT-gestützten Schichtdickenanalysen. Hierbei kommt es bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen im Laufe eines Jahres zu einer Abnahme der Netzhautschichtdicke. Dadurch, dass auch die Photorezeptorschicht betroffen ist, könnte ein

Demaskierungseffekt die Begründung für die Erhöhung der QAF sein, d.h. durch weniger licht-blockierendes Fotorezeptorpigment kommt es zu einer Erhöhung der QAF.

Die Erhöhung der QAF hatte ihr Maximum im superioren Teil der Retina. Die Ursache hiervon ist derzeit noch weitgehend unbekannt und Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenso bei bereits an BEM erkrankten Patientinnen eine computergestützte Messung der Atrophiezone durchgeführt. Dies bietet die Möglichkeit, das Fortschreiten einer BEM Erkrankung zu objektivieren und könnte vor allem bei Verlaufskontrollen erkrankter Patienten und Patientinnen eine wertvolle Rolle spielen.

Die vorgestellten Methoden könnten zukünftig eine nützliche Erweiterung zu den bereits bestehenden Diagnostik-Tools für Screening auf BEM sein. Bei CQ/HCQ Patienten und Patientinnen zeigt sich eine grundsätzlich erhöhte QAF gegenüber der Kontrollgruppe ohne das Medikament. Im Ein-Jahres-Verlauf gab es weiterhin einige Patienten und Patientinnen, die einen überdurchschnittlich starken Anstieg der QAF zeigen. Es bleibt zu klären, ob diese Ausreißer Hinweise auf die spätere Entwicklung einer BEM liefern. So könnte die QAF im klinischen Alltag Anwendung finden und vor allem bei Verlaufskontrollen zusätzliche Informationen bieten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdelfattah, N. S., Zhang, H., Boyer, D. S., & Sadda, S. R. (2016). Progression of macular atrophy in patients with neovascular age-related macular degeneration undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina*, *36*(10), 1843-1850. doi:10.1097/iae.0000000000001059
- Ach, T., Huisin, C., McGwin, G., Messinger, J. D., Zhang, T., Bentley, M. J., et al. (2014). Quantitative Autofluorescence and Cell Density Maps of the Human Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(8), 4832-4841. doi:10.1167/iovs.14-14802
- Ach, T., Tolstik, E., Messinger, J. D., Zarubina, A. V., Heintzmann, R., & Curcio, C. A. (2015). Lipofuscin Redistribution and Loss Accompanied by Cytoskeletal Stress in Retinal Pigment Epithelium of Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(5), 3242-3252. doi:10.1167/iovs.14-16274
- Allahdina, A. M., Chen, K. G., Alvarez, J. A., Wong, W. T., Chew, E. Y., & Cukras, C. A. (2019). Longitudinal changes in eyes with hydroxychloroquine retinal toxicity. *Retina*, *39*(3), 473-484. doi:10.1097/iae.0000000000002437
- Arndt, C., Costantini, M., Chiquet, C., Afriat, M., Berthemy, S., Vasseur, V., et al. (2018). Comparison between multifocal ERG and C-Scan SD-OCT ("en face" OCT) in patients with a suspicion of antimalarial retinal toxicity: preliminary results. *Documenta Ophthalmologica*, *136*(2), 97-111. doi:10.1007/s10633-018-9625-2
- Ben-Shabat, S., Parish, C. A., Vollmer, H. R., Itagaki, Y., Fishkin, N., Nakanishi, K., et al. (2002). Biosynthetic Studies of A2E, a Major Fluorophore of Retinal Pigment Epithelial Lipofuscin\*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(9), 7183-7190. doi:10.1074/jbc.M108981200
- Bermond, K., Wobbe, C., Tarau, I. S., Heintzmann, R., Hillenkamp, J., Curcio, C. A., et al. (2020). Autofluorescent Granules of the Human Retinal Pigment Epithelium: Phenotypes, Intracellular Distribution, and Age-Related Topography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *61*(5), 35-35. doi:10.1167/iovs.61.5.35

- Bonanomi, M. T., Dantas, N. C., & Medeiros, F. A. (2006). Retinal nerve fibre layer thickness measurements in patients using chloroquine. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 34(2), 130-136. doi:10.1111/j.1442-9071.2006.01167.x
- Boulton, M., & Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye*, 15(3), 384-389. doi:10.1038/eye.2001.141
- Browning, D. J. (2013). Impact of the revised american academy of ophthalmology guidelines regarding hydroxychloroquine screening on actual practice. *American Journal of Ophthalmology*, 155(3), 418-428.e411. doi:10.1016/j.ajo.2012.09.025
- Browning, D. J. (2014). *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. New York, NY: Springer New York.
- Burke, T. R., Duncker, T., Woods, R. L., Greenberg, J. P., Zernant, J., Tsang, S. H., et al. (2014). Quantitative fundus autofluorescence in recessive Stargardt disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(5), 2841-2852. doi:10.1167/iovs.13-13624
- Comyn, O., Heng, L. Z., Ikeji, F., Bibi, K., Hykin, P. G., Bainbridge, J. W., et al. (2012). Repeatability of Spectralis OCT Measurements of Macular Thickness and Volume in Diabetic Macular Edema. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(12), 7754-7759. doi:10.1167/iovs.12-10895
- Damms, T. (2014). *Kurzlehrbuch Augenheilkunde*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Daniel Malacara, Z. M. (2019). *Handbook of Optical Coherence Tomography*. [S.l.]: CRC PRESS.
- de Sisternes, L., Hu, J., Rubin, D. L., & Marmor, M. F. (2015). Localization of damage in progressive hydroxychloroquine retinopathy on and off the drug: inner versus outer retina, parafovea versus peripheral fovea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(5), 3415-3426. doi:10.1167/iovs.14-16345
- Delori, F., Goger, D. G., & Dorey, C. K. (2001). Age-Related Accumulation and Spatial Distribution of Lipofuscin in RPE of Normal Subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(8), 1855-1866.
- Delori, F., Greenberg, J. P., Woods, R. L., Fischer, J., Duncker, T., Sparrow, J., et al. (2011). Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser

- ophthalmoscope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(13), 9379-9390. doi:10.1167/iovs.11-8319
- Dettoraki, M., & Moschos, M. M. (2016). The Role of Multifocal Electroretinography in the Assessment of Drug-Induced Retinopathy: A Review of the Literature. *Ophthalmic Research*, 56(4), 169-177. doi:10.1159/000446321
- Duncker, T., Greenberg, J. P., Ramachandran, R., Hood, D. C., Smith, R. T., Hirose, T., et al. (2014). Quantitative fundus autofluorescence and optical coherence tomography in best vitelliform macular dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(3), 1471-1482. doi:10.1167/iovs.13-13834
- Duncker, T., Tsang, S. H., Lee, W., Zernant, J., Allikmets, R., Delori, F. C., et al. (2015). Quantitative Fundus Autofluorescence Distinguishes ABCA4-Associated and Non-ABCA4-Associated Bull's-Eye Maculopathy. *Ophthalmology*, 122(2), 345-355. doi:10.1016/j.optha.2014.08.017
- Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E. S., & Eldridge, S. (1984). Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25(2), 195-200.
- Garrity, S. T., Jung, J. Y., Zambrowski, O., Pichi, F., Su, D., Arya, M., et al. (2019). Early hydroxychloroquine retinopathy: optical coherence tomography abnormalities preceding Humphrey visual field defects. *British Journal of Ophthalmology*, 103(11), 1600-1604. doi:10.1136/bjophthalmol-2018-313350
- Graefe, K., & Lutz, W. B. (2016). *Pharmakologie und Toxikologie*.
- Greenberg, J. P., Duncker, T., Woods, R. L., Smith, R. T., Sparrow, J. R., & Delori, F. C. (2013). Quantitative Fundus Autofluorescence in Healthy Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(8), 5684-5693. doi:10.1167/iovs.13-12445
- Greenstein, V. C., Lima de Carvalho, J. R., Parmann, R., Amaro-Quireza, L., Lee, W., Hood, D. C., et al. (2020). Quantitative Fundus Autofluorescence in HCQ Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(11), 41-41. doi:10.1167/iovs.61.11.41
- Grehn, F. (2012). *Augenheilkunde*. Heidelberg: Springer.
- Gustafsson, L. L., Walker, O., Alván, G., Beermann, B., Estevez, F., Gleisner, L., et al. (1983). Disposition of chloroquine in man after single intravenous and oral doses.

- British Journal of Clinical Pharmacology*, 15(4), 471-479. doi:10.1111/j.1365-2125.1983.tb01532.x
- Hammond, B. R., Jr., Wooten, B. R., & Snodderly, D. M. (1997). Individual variations in the spatial profile of human macular pigment. *Journal of the Optical Society of America*, 14(6), 1187-1196. doi:10.1364/josaa.14.001187
- Hassan, B., Raja, G., Hassan, T., & Akram, M. (2016). Structure tensor based automated detection of macular edema and central serous retinopathy using optical coherence tomography images. *Journal of the Optical Society of America*, 33, 455. doi:10.1364/JOSAA.33.000455
- Herdegen, T. (2020). *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*.
- Hermann, K. (2015). *ANOMALOSCOPE Users Manual*
- Hoffmann, M. B., Bach, M., Kondo, M., Li, S., Walker, S., Holopigian, K., et al. (2021). ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2021 update). *Documenta Ophthalmologica*, 142(1), 5-16. doi:10.1007/s10633-020-09812-w
- Huppelsberg, J. W. K. (2013). *Kurzlehrbuch Physiologie*: Thieme.
- Jain, S., & Jain, N. G. (2017). Delayed progression of bull's eye maculopathy. *BMJ Case Reports*, 2017. doi:10.1136/bcr-2017-220598
- Jorge, A., Ung, C., Young, L. H., Melles, R. B., & Choi, H. K. (2018). Hydroxychloroquine retinopathy - implications of research advances for rheumatology care. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(12), 693-703. doi:10.1038/s41584-018-0111-8
- Kamceva, G., Arsova-Sarafinovska, Z., Ruskovska, T., Zdravkovska, M., Kamceva-Panova, L., & Stikova, E. (2016). Cigarette Smoking and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease. *Macedonian journal of medical sciences*, 4(4), 636-640. doi:10.3889/oamjms.2016.117
- Kanski, J. J. (2008). *Klinische Ophthalmologie: Lehrbuch und Atlas*. München: Elsevier.
- Karow, T. (2020). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2021*.
- Katz, M. L., Drea, C. M., Eldred, G. E., Hess, H. H., & Robison, W. G., Jr. (1986). Influence of early photoreceptor degeneration on lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, 43(4), 561-573. doi:10.1016/s0014-4835(86)80023-9

- Kaur, S., Prasad, N., Srivastava, A., Kumari, M., Singh, S., Kumar, D., et al. (2019). Fluorescence spectra of chloroquine suspension: A probable tool for quality assessment of the most common antimalarial in a user-friendly manner. *Indian J Pharmacol*, 51(6), 416-417. doi:10.4103/ijp.IJP\_423\_19
- Kellner, U., Renner, A. B., & Tillack, H. (2006). Fundus autofluorescence and mfERG for early detection of retinal alterations in patients using chloroquine/hydroxychloroquine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8), 3531-3538. doi:10.1167/iovs.05-1290
- Kleefeldt, N., Bermond, K., Tarau, I. S., Hillenkamp, J., Berlin, A., Sloan, K. R., et al. (2020). Quantitative Fundus Autofluorescence: Advanced Analysis Tools. *Translational Vision Science & Technology*, 9(8), 2. doi:10.1167/tvst.9.8.2
- Lally, D. R., Heier, J. S., Baomal, C., Witkin, A. J., Maler, S., Shah, C. P., et al. (2016). Expanded spectral domain-OCT findings in the early detection of hydroxychloroquine retinopathy and changes following drug cessation. *International Journal of Retina and Vitreous*, 2, 18. doi:10.1186/s40942-016-0042-y
- Lang, G. K., & Esser, J. (2008). *Augenheilkunde*.
- Lanthony, P. (1978). The desaturated panel D-15. *Documenta Ophthalmologica*, 46(1), 185-189. doi:10.1007/BF00174107
- Leung, L. S., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Sequist, L. V., & Marmor, M. F. (2015). Rapid Onset of Retinal Toxicity From High-Dose Hydroxychloroquine Given for Cancer Therapy. *American Journal of Ophthalmology*, 160(4), 799-805.e791. doi:10.1016/j.ajo.2015.07.012
- Lyons, J. S., & Severns, M. L. (2009). Using multifocal ERG ring ratios to detect and follow Plaquenil retinal toxicity: a review : Review of mfERG ring ratios in Plaquenil toxicity. *Documenta Ophthalmologica*, 118(1), 29-36. doi:10.1007/s10633-008-9130-0
- Mackenzie, A. H. (1983). Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *The American Journal of Medicine*, 75(1a), 40-45. doi:10.1016/0002-9343(83)91269-x

- Marmor, M. F. (2012). Comparison of screening procedures in hydroxychloroquine toxicity. *JAMA Ophthalmology*, *130*(4), 461-469. doi:10.1001/archophthalmol.2011.371
- Marmor, M. F., & Hu, J. (2014). Effect of disease stage on progression of hydroxychloroquine retinopathy. *JAMA Ophthalmology*, *132*(9), 1105-1112. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.1099
- Marmor, M. F., Kellner, U., Lai, T. Y., Melles, R. B., & Mieler, W. F. (2016). Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology*, *123*(6), 1386-1394. doi:10.1016/j.ophtha.2016.01.058
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., et al. (2014). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 378-400. doi:10.3390/ijms16010378
- Marshall, E., Robertson, M., Kam, S., Penwarden, A., Riga, P., & Davies, N. (2021). Prevalence of hydroxychloroquine retinopathy using 2018 Royal College of Ophthalmologists diagnostic criteria. *Eye*, *35*(1), 343-348. doi:10.1038/s41433-020-1038-2
- McChesney, E. W. (1983). Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *The American Journal of Medicine*, *75*(1a), 11-18. doi:10.1016/0002-9343(83)91265-2
- Melles, R. B., & Marmor, M. F. (2014). The risk of toxic retinopathy in patients on long-term hydroxychloroquine therapy. *JAMA Ophthalmology*, *132*(12), 1453-1460. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.3459
- Missner, S., & Kellner, U. (2012). Comparison of different screening methods for chloroquine/hydroxychloroquine retinopathy: multifocal electroretinography, color vision, perimetry, ophthalmoscopy, and fluorescein angiography. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* *250*(3), 319-325. doi:10.1007/s00417-011-1753-2
- Navajas, E. V., Krema, H., Hammoudi, D. S., Lipton, J. H., Simpson, E. R., Boyd, S., et al. (2015). Retinal toxicity of high-dose hydroxychloroquine in patients with chronic graft-versus-host disease. *Canadian Journal of Ophthalmology*, *50*(6), 442-450. doi:10.1016/j.jcjo.2015.08.003

- Orellana-Rios, J., Yokoyama, S., Agee, J. M., Challa, N., Freund, K. B., Yannuzzi, L. A., et al. (2018). Quantitative Fundus Autofluorescence in Non-Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging Retina*, 49(10), S34-s42. doi:10.3928/23258160-20180814-06
- Parrulli, S., Cozzi, M., Airaldi, M., Romano, F., Viola, F., Sarzi-Puttini, P., et al. (2021). Quantitative autofluorescence findings in patients undergoing hydroxychloroquine treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 80(Suppl 1), 979-979. doi:10.1136/annrheumdis-2021-eular.2022
- Pröbster, C., Tarau, I. S., Kleefeldt, N., Hillenkamp, J., Nentwich, M., Sloan, K. R., et al. (2021). Quantitative Fundus Autofluorescence in the Developing and Maturing Healthy Eye. *Translational Vision Science & Technology*, 10(2), 15-15. doi:10.1167/tvst.10.2.15
- Ramírez Sepúlveda, J. I., Bolin, K., Mofors, J., Leonard, D., Svenungsson, E., Jönsen, A., et al. (2019). Sex differences in clinical presentation of systemic lupus erythematosus. *Biology of Sex Differences*, 10(1), 60. doi:10.1186/s13293-019-0274-2
- Ramsey, M. S., & Fine, B. S. (1972). Chloroquine toxicity in the human eye. Histopathologic observations by electron microscopy. *American Journal of Ophthalmology*, 73(2), 229-235. doi:10.1016/0002-9394(72)90137-7
- Reichel, C., Berlin, A., Radun, V., Tarau, I. S., Hillenkamp, J., Kleefeldt, N., et al. (2020). Quantitative Fundus Autofluorescence in Systemic Chloroquine/Hydroxychloroquine Therapy. *Translational Vision Science & Technology*, 9(9), 42-42. doi:10.1167/tvst.9.9.42
- Rosenthal, A. R., Kolb, H., Bergsma, D., Huxsoll, D., & Hopkins, J. L. (1978). Chloroquine retinopathy in the rhesus monkey. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17(12), 1158-1175.
- Rubin, M., Bernstein, H. N., & Zvaifler, N. J. (1963). Studies on the pharmacology of Chloroquine. Recommendations for the treatment of Chloroquine retinopathy. *JAMA Ophthalmology*, 70, 474-481. doi:10.1001/archophth.1963.00960050476009
- Schlote, T., & Gelissen, F. (2007). *Taschenatlas Augenheilkunde*. S.L.: Thieme.

- Schmitz-Valckenberg, S., Fleckenstein, M., Scholl, H. P., & Holz, F. G. (2009). Fundus autofluorescence and progression of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, *54*(1), 96-117. doi:10.1016/j.survophthal.2008.10.004
- Schrezenmeier, E., & Dörner, T. (2020). Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(3), 155-166. doi:10.1038/s41584-020-0372-x
- Schroeder, R. L., & Gerber, J. P. (2014). Chloroquine and hydroxychloroquine binding to melanin: Some possible consequences for pathologies. *Toxicology Reports*, *1*, 963-968. doi:10.1016/j.toxrep.2014.10.019
- Seeliger, M. W., Jurklies, B., Kellner, U., Palmowski, A., Bach, M., & Kretschmann, U. (2001). Multifokale Elektroretinographie (mfERG).
- Sepah, Y. J., Akhtar, A., Sadiq, M. A., Hafeez, Y., Nasir, H., Perez, B., et al. (2014). Fundus autofluorescence imaging: Fundamentals and clinical relevance. *Saudi Journal of Ophthalmology*, *28*(2), 111-116. doi:10.1016/j.sjopt.2014.03.008
- Singh, D. K., Muhieddine, L., Einstadter, D., & Ballou, S. (2019). Incidence of blindness in a population of rheumatic patients treated with hydroxychloroquine. *Rheumatology advances in practice*, *3*(1), rkz009. doi:10.1093/rap/rkz009
- Sparrow, J. R., Blonska, A., Flynn, E., Duncker, T., Greenberg, J. P., Secondi, R., et al. (2013). Quantitative fundus autofluorescence in mice: correlation with HPLC quantitation of RPE lipofuscin and measurement of retina outer nuclear layer thickness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*(4), 2812-2820. doi:10.1167/iovs.12-11490
- Sparrow, J. R., & Duncker, T. (2014). Fundus Autofluorescence and RPE Lipofuscin in Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Clinical Medicine*, *3*(4), 1302-1321. doi:10.3390/jcm3041302
- Sparrow, J. R., Duncker, T., Schuerch, K., Paavo, M., & de Carvalho, J. R. L., Jr. (2020). Lessons learned from quantitative fundus autofluorescence. *Progress in Retinal and Eye Research*, *74*, 100774. doi:10.1016/j.preteyeres.2019.100774
- Sparrow, J. R., Fishkin, N., Zhou, J., Cai, B., Jang, Y. P., Krane, S., et al. (2003). A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Research*, *43*(28), 2983-2990. doi:10.1016/S0042-6989(03)00475-9

- Sparrow, J. R., Yoon, K. D., Wu, Y., & Yamamoto, K. (2010). Interpretations of Fundus Autofluorescence from Studies of the Bisretinoids of the Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(9), 4351-4357. doi:10.1167/iovs.10-5852
- Srinivasan, R., Teussink, M. M., Sloan, K. R., Bharat, R. P. K., Narayanan, R., & Raman, R. (2022). Distribution of macular pigments in macular telangiectasia type 2 and correlation with optical coherence tomography characteristics and visual acuity. *BMC Ophthalmology*, 22(1), 264. doi:10.1186/s12886-022-02483-y
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3), 845-881. doi:10.1152/physrev.00021.2004
- Sundelin, S. P., & Terman, A. (2002). Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 110(6), 481-489. doi:10.1034/j.1600-0463.2002.100606.x
- Tett, S. E., Cutler, D. J., Day, R. O., & Brown, K. F. (1988). A dose-ranging study of the pharmacokinetics of hydroxy-chloroquine following intravenous administration to healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 26(3), 303-313. doi:10.1111/j.1365-2125.1988.tb05281.x
- Told, R., Baratsits, M., Garhöfer, G., & Schmetterer, L. (2013). ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)-Visus. *Der Ophthalmologe*, 110(10), 960-965. doi:10.1007/s00347-013-2813-2
- Tran, T. M., Kim, S., Lin, K. H., Chung, S. H., Park, S., Sazhnyev, Y., et al. (2020). Quantitative Fundus Autofluorescence in Rhesus Macaques in Aging and Age-Related Drusen. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(8), 16. doi:10.1167/iovs.61.8.16
- Uslu, H., Gurler, B., Yildirim, A., Tatar, M. G., Aylin Kantarcı, F., Goker, H., et al. (2016). Effect of Hydroxychloroquine on the Retinal Layers: A Quantitative Evaluation with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Journal of Ophthalmology*, 2016, 8643174. doi:10.1155/2016/8643174
- Wehling, M. (2011). *Klinische Pharmakologie*. Stuttgart: Thieme.
- Wing, G. L., Blanchard, G. C., & Weiter, J. J. (1978). The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17(7), 601-607.

- Wolfe, A. M., Kellgren, J. H., & Masi, A. T. (1968). The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. II. Incidence and diagnostic criteria. *Bulletin on the Rheumatic Diseases*, 19(3), 524-529.
- Xu, C., Zhu, L., Chan, T., Lu, X., Shen, W., Madigan, M. C., et al. (2016). Chloroquine and Hydroxychloroquine Are Novel Inhibitors of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 884-890. doi:10.1002/jps.24663
- Yakovleva, M. A., Radchenko, A., Feldman, T. B., Kostyukov, A. A., Arbukhanova, P. M., Borzenok, S. A., et al. (2020). Fluorescence characteristics of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19(7), 920-930. doi:10.1039/C9PP00406H
- Yung, M., Klufas, M. A., & Sarraf, D. (2016). Clinical applications of fundus autofluorescence in retinal disease. *International Journal of Retina and Vitreous*, 2(1), 12. doi:10.1186/s40942-016-0035-x
- Zhao, Z. C., Zhou, Y., Tan, G., & Li, J. (2018). Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes. *International Journal of Ophthalmology*, 11(12), 1999-2003. doi:10.18240/ijo.2018.12.20

## **I. Abkürzungsverzeichnis**

**AAO:** American Academy of Ophthalmology

**BEM:** Bulls-Eye-Makulopathie

**BL:** Baseline

**CADM:** Amyopathische Dermatomyositis

**CDLE:** Chronisch Diskoider Lupus Erythematodes

**cGMP:** Zyklisches Guanosinmonophosphat

**CREST:** Sonderform der Limitierten Kutanen Systemischen Sklerose

**cSLO:** Konfokales Scanning Laser Ophthalmoskop

**CQ:** Chloroquin

**ELM:** Membrana Limitans Eexterna

**ETDRS:** Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

**FAF:** Fundusautofluorescence

**FU:** Follow-Up

**GCL:** Ganglienzellschicht

**HCQ:** Hydroxychloroquin

**HRA2:** Heidelberg Retina Angiograph

**ILM:** Membrana Limitans Interna

**IR:** Infrarot

**ISCEV:** International Society for Clinical Electrophysiology of Vision

**LP:** Lichen Ruber Planus

**LcSSc:** Limitierte Kutane Systemische Sklerose

**MCTD:** Mixed Connective Tissue Disease = Mischkollagenose,

**M. Raynaud** = Raynaud Syndrom

**mfERG:** Multifokalen Elektroretinogramm

**ONL:** Äußere Körnerschicht

**Pat.ID:** Patientenidentifikation

**QAF:** Quantitative Fundusautofluoreszenzaufnahme

**RA/LA:** Rechtes/Linkes Auge

**RA:** Rheumatoide Arthritis

**RPE:** Retinales Pigmentepithel

**SD-OCT:** Spectral Domain Optische Kohärenztomographie

**SCLE:** Subakut Kutaner Lupus Erythematoses

**SLE:** Systemischer Lupus Erythematoses

**SjS:** Sjögren Syndrom

**UCTD:** Undifferentiated Connective Tissue Disease = Undifferenzierte Kollagenose

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Polarer Aufbau und Überblick über die verschiedenen Funktionen des RPE, aus (Strauss, 2005) mit freundlicher Genehmigung via RightsLink .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Chemische Strukturformel der Wirkstoffe a) Chloroquin (CQ) und b) Hydroxychloroquin (HCQ), aus (Schroeder & Gerber, 2014b) mit freundlicher Genehmigung via RightsLink.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Konzentrationsabhängige Gewebeverteilung von CQ/HCQ in Ratten, aus (Browning, 2014), mit freundlicher Genehmigung via RightsLink. ....	7
<b>Abbildung 4:</b> Typische FAF-Aufnahme einer BEM mit parafovealer Depigmentierung, 36-jährige Patientin, Visus 20/25, kumulativ 887g HCQ in 9.8 Jahren, Grunderkrankung SLE. ....	9
<b>Abbildung 5:</b> Multimodale Bildgebung mit FAF bei 488 nm und 787 nm, Enface IR mit OCT, QAF bei 488 nm und eine rotfreie Fundusaufnahme. ....	24
<b>Abbildung 6:</b> Entstehung des multimodalen Bildstapels. ....	26
<b>Abbildung 7:</b> ETDRS und QAF97 Analysegrids zur Auswertung der QAF Intensität in unterschiedlichen Bereichen des posterioren Pols.....	27
<b>Abbildung 8:</b> Algorithmus zur Quantifizierung der atrophen Zone bei Patientinnen mit BEM in 4 Schritten. ....	28
<b>Abbildung 9:</b> Einfluss von steigendem Lebensalter auf die QAF in den drei Analysebereichen des QAF97 Grids .....	33
<b>Abbildung 10:</b> Zusammenhang zwischen der alterskorrigierten QAF97 und A: kumulativer Dosis CQ/HCQ in Gramm; B: Einnahmedauer von CQ/HCQ in Jahren..	34
<b>Abbildung 11:</b> Alterskorrigierter QAF97-Wert in Abhängigkeit einer bei der augenärztlichen Untersuchung festgestellten Cataracta incipiens vs. klare Linse. ....	34
<b>Abbildung 12:</b> Bland-Altman Plot zweier QAF97 Messungen vom selben Tag und Untersucher.....	35
<b>Abbildung 13:</b> QAF Entwicklung aller CQ/HCQ Patienten und Patientinnen für BL (blaue Marker) und für die FU Untersuchung nach 1 Jahr (orangene Marker).....	37
<b>Abbildung 14:</b> Veränderung der QAF97-Intensität von BL zu FU .....	38
<b>Abbildung 15:</b> Räumliche QAF-Intensitäts-Verteilung dargestellt mit Hilfe des QAF97 Analysemodells.....	39

<b>Abbildung 16:</b> Gemittelte QAF-Werte der Segmente der superioren und inferioren Hemisphäre für die einzelnen Patienten und Patientinnen .....	40
<b>Abbildung 17:</b> Quantifizierung der atrophen Zone der drei BEM Patientinnen mit einer FU Untersuchung.....	42
<b>Abbildung 18:</b> Durchschnittliche Schichtdicke der einzelnen Netzhautschichten (im ETDRS Grid) von gesunden Probanden und Probandinnen (gelbe Balken) und den CQ/HCQ Patienten und Patientinnen (blaue Balken) sowie den BEM Patientinnen (rote Balken) jeweils zum Zeitpunkt der BL-Untersuchung.....	43
<b>Abbildung 19:</b> Topogaphische Verteilung der Schichtdickenveränderung der gesamten Netzhautschicht sowie der inneren und äußeren Netzhautschichten im ETDRS Grid...	44

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Empfohlene Untersuchungstechniken zum jährlichen Screening einer CQ/HCQ-Retinopathie gemäß (Marmor et al., 2016) .....	13
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die Kenngrößen des Studienkollektivs nach Einteilung in Gruppen .....	19
<b>Tabelle 3:</b> Detaillierte demographische Daten zur BL und FU Gruppe .....	30
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht über die Entwicklung der QAF Werte in den drei Bereichen des QAF97 Grids für BL, FU und Kontrollgruppe.....	36
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht über die BEM Patientinnen mit Patienten ID, ausgewertetem Auge, Alter, eingenommener Kumulativdosis, Datum des Absetzens der Medikamente und Grunderkrankung, grau hinterlegt sind jene drei Patientinnen, die eine FU Untersuchung erhielten. ....	41

## **IV. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei dieser Arbeit zur Seite gestanden und zum Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Thomas Ach, der mich über mehrere Jahre mit vielen konstruktiven Vorschlägen, wertvollen Anmerkungen und fachlichem Rat sehr gut betreut hat und der diese Arbeit und meine Arbeitsweise konstant verbessert hat. Ich weiß die vielen aufgewendeten Stunden sehr zu schätzen!

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Jost Hillenkamp bedanken für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung für Augenheilkunde an der Universität Würzburg. Ein weiterer Dank gebührt auch Frau Prof. Dr. Barbara Braunger, die sich bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Clara Reichel für die wertvolle Vorarbeit, an Herrn Dr. Andreas Berlin für all die Unterstützung bei der Datenauswertung, an Frau Susanne Hanusz für die ausführliche Einarbeitung in die Geräte, an Dr. Kenneth Sloan für das Bereitstellen der Auswertesoftware und Danke an die gesamte restliche Arbeitsgruppe.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie danken, die mich immer bedingungslos unterstützt und gestützt hat während des gesamten Prozesses. Ohne diese Hilfe wäre die Arbeit vermutlich gar nicht fertig geworden. Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Michael, der mir durch seine unglaublichen Informatikkenntnisse und sein Allgemeinwissen viele Stunden der Arbeit erspart hat und mich sowohl emotional als auch fachlich am meisten unterstützt hat.

## **V. Lebenslauf**

## IV. Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

### Wissenschaftliche Publikationen:

Manuskript eingereicht bei: Translational Vision Science & Technology  
Manuscript ID: TVST-22-5277

Autoren: **Victoria Radun**, Andreas Berlin, Ioana-Sandra Tarau, Nikolai Kleefeldt, Clara Reichel, Jost Hillenkamp, Frank G. Holz, Kenneth R. Sloan, Marlene Saßmannshausen, Thomas Ach

Titel: Quantitative fundus autofluorescence in systemic chloroquine/hydroxychloroquine therapy: one year follow-up.

Clara Reichel, Andreas Berlin, **Victoria Radun**, Ioana-Sandra Tarau, Jost Hillenkamp, Nikolai Kleefeldt, Kenneth R. Sloan, Thomas Ach; Quantitative Fundus Autofluorescence in Systemic Chloroquine/Hydroxychloroquine Therapy. Trans. Vis. Sci. Tech. 2020;9(9):42. doi: <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.42>