

**Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

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

**Quantitative Fundusautofluoreszenz – Untersuchungen und Anwendung  
erweiterter Analysetechniken an einer gesunden Kohorte und an  
Fallbeispielen**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Nikolai Kleefeldt**

**aus Niederstetten**

**Würzburg, März 2021**

**Referent/Referentin: Privatdozent Dr. Thomas Ach**

**Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Dr. Barbara Braunger**

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2021**

**Der Promovend ist Arzt.**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Retinales Pigmentepithel.....	1
1.1.1	Aufbau des retinalen Pigmentepithels .....	1
1.1.2	Aufgaben und Funktionen des RPEs.....	2
1.1.3	Lipofuszin in RPE-Zellen .....	3
1.2	Autofluoreszenz der Netzhaut .....	5
1.2.1	Fluorophore der Netzhaut und des Auges .....	5
1.2.2	Fundusautofluoreszenz .....	6
1.3	<i>In vivo</i> Fundusautofluoreszenz-Bildgebung mittels konfokalem Scanning-Laser-Ophthalmoskop (cSLO).....	7
1.3.1	Physiologisches Fundusautofluoreszenzbild .....	7
1.3.2	Störfaktoren bei der Fundusautofluoreszenzaufnahme mit einem cSLO.....	8
1.4	Quantitative Autofluoreszenz (QAF).....	9
1.4.1	Delori-Muster, QAF8-Analyse und bisherige Limitationen .....	9
1.5	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Studienpopulation .....	12
2.1.1	Einschlusskriterien.....	13
2.1.2	Ausschlusskriterien.....	13
2.2	Heidelberg Engineering HRA für die QAF-Messung .....	13
2.3	Durchführung der Studie .....	15
2.3.1	Ausführliche allgemeine und ophthalmologische Anamnese und klinische Untersuchung.....	15
2.3.2	Bestimmung des Visus mit bestmöglicher Korrektur.....	16
2.3.3	Medikamentöse Mydriasis .....	16

2.3.4	Messung der Hornhautkrümmungsradien.....	16
2.3.5	Aufnahme der Netzhautbilder (inklusive QAF-Aufnahmen) .....	17
2.3.6	Bildselektion.....	18
2.4	Bildanalyse mittels FIJI-Plugins.....	19
2.4.1	OCT-basierter Aufbau der multimodalen Bildstapel.....	20
2.4.2	Bestimmung der Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs .....	22
2.4.3	Verarbeitung von QAF-Aufnahmen und Erstellung von Standardretinakarten .....	22
2.4.4	Differenzkarten durch Vergleich individueller QAF-Bilder mit QAF-Standardretinakarten .....	23
2.4.5	Anwendung verschiedener Analysemuster.....	24
2.4.6	Freihandanalyse-Tool.....	25
2.5	Berechnung der QAF .....	26
2.6	Statistische Auswertung .....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Veränderung der QAF-Intensität mit steigendem Lebensalter .....	29
3.2	Reproduzierbarkeit der QAF-Intensitätsmessungen.....	33
3.3	QAF-Standardretinakarten für verschiedene Altersdekaden .....	34
3.4	Anwendung der Analysetechniken an Beispielen.....	37
3.4.1	Anwendungsbeispiel 1 .....	37
3.4.2	Anwendungsbeispiel 2.....	41
3.4.3	Anwendungsbeispiel 3.....	47
4	Diskussion .....	51
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4.2	Multimodale Bildstapel und Bildregistrierung.....	52
4.3	Kombination von en-face mit Schnittbildaufnahmen .....	54

4.4	SD-OCT-basierte Positionierung der Analysemuster .....	55
4.5	Altersabhängige Veränderung der QAF-Intensität und -Topografie ....	56
4.6	Vergleich der QAF-Anlysemuster und Einordnung zu bisherigen Forschungsarbeiten.....	59
4.7	Standardretinakarten der quantitativen Autofluoreszenz als Basis für individuelle QAF-Analysen .....	62
4.8	Wiederholbarkeit der QAF-Messungen .....	63
4.9	Limitationen der Studie und der QAF und Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung .....	68
6	Literaturverzeichnis.....	70

## Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Danksagung

V Lebenslauf

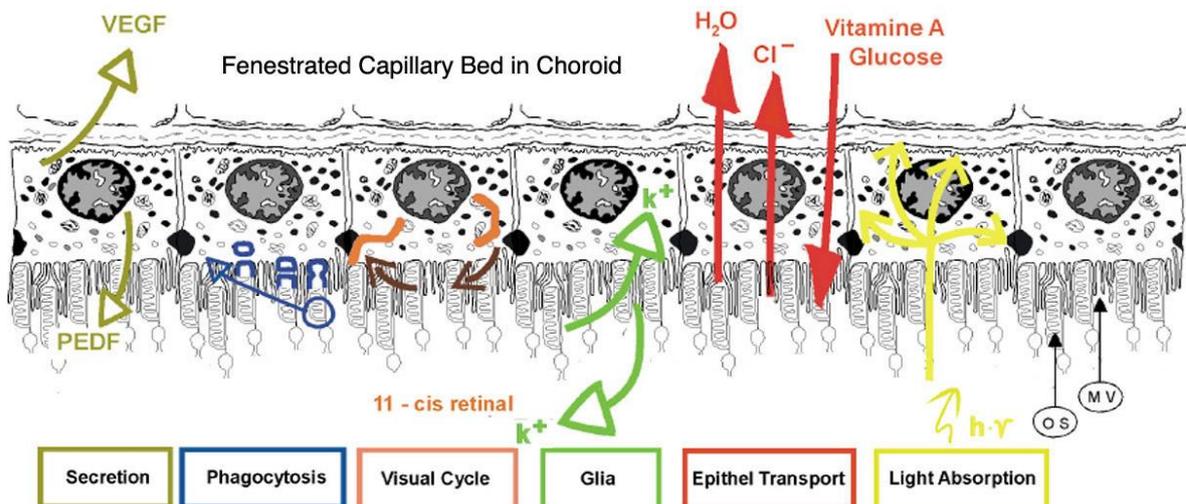
VI Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

# 1 Einleitung

## 1.1 Retinales Pigmentepithel

### 1.1.1 Aufbau des retinalen Pigmentepithels

Das einschichtige, kubische retinale Pigmentepithel (RPE) ist aufgrund seines hohen Melaningehalts stark pigmentiert und liegt als äußerste Schicht der Retina zwischen der neurosensorischen Netzhaut und der Aderhaut. Die Zellen des RPEs sind untereinander mittels Tight Junctions verbunden (Rizzolo et al. 2011). Vom apikalen Pol der RPE-Zellen gehen fingerförmige Fortsätze aus, die mit den Außensegmenten der Photorezeptorzellen im Bereich der sogenannten Interdigitationszone in engem Kontakt stehen (Simó et al. 2010). RPE-Zellen sind postmitotische, stoffwechselaktive Zellen und unterliegen einem ausgeprägten lebenslangen Umbau. So ändert sich die Morphologie der RPE-Zellen mit zunehmendem Lebensalter. Die Anzahl der überwiegend hexagonal konfigurierten Zellen im jüngeren Lebensalter nimmt im höheren Lebensalter ab, was mit einer Zunahme der benachbarter Zellen vergesellschaftet ist (Ach et al. 2014).



**Abbildung 1:** Aufbau und Funktion des retinalen Pigmentepithels mit umgebenden Strukturen. Aus Strauss et al. (2005). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

### 1.1.2 Aufgaben und Funktionen des RPEs

Das RPE übernimmt zahlreiche Aufgaben, welche für den Sehvorgang von entscheidender Bedeutung sind (*Abbildung 1*, Seite 1).

Eine der wichtigsten Aufgaben der RPE-Zellen ist die Phagozytose abgestoßener Spitzen der Photorezeptoraußensegmente. Diese werden im Rahmen des Sehvorgangs am distalen Ende der Photorezeptoraußensegmente intermittierend abgegeben und dann vom RPE mittels Integrin-vermittelter Phagozytose aufgenommen und abgebaut (Finnemann et al. 1997). Das Ausmaß dieser Aufgabe ist so umfangreich, dass es sich bei RPE-Zellen um die phagozytisch aktivsten Zellen im menschlichen Körper handelt (Mazzoni et al. 2014).

Außerdem ist das RPE unter anderem an Transportprozessen, inklusive Resorptions- und Sekretionsvorgängen beteiligt. Durch dichte interzelluläre Verbindungen, die vor allem durch Tight Junctions im apikalen Drittel der Zelle gebildet werden, werden parazelluläre Transporte stark limitiert (Naylor et al. 2020). Stattdessen erfolgen Transportvorgänge unter anderem von Nährstoffen (überwiegend Glukose), Wasser und Ionen zwischen den apikalen Photorezeptorzellen und der basalen Choriocapillaris vor allem mittels Transzytose (Ban und Rizzolo 2000; Strauss 2005). Zudem ist das RPE am Abtransport von metabolischen Endprodukten der Photorezeptorzellen beteiligt (Spaide 2008), wobei insbesondere der Abtransport von Laktat eine wichtige Rolle spielt (La Cour et al. 1994; Hamann et al. 2000).

Die Vorgänge des Sehzyklus finden vor allem in RPE-Zellen und Photorezeptoren statt (siehe auch *Abbildung 2*, Seite 5). In beiden Zelltypen erfolgen Umwandlungsprozesse von Retinol (Vitamin A<sub>1</sub>), außerdem erfolgt auch ein Transport dieser Umbauprodukte zwischen den beiden Zelltypen (Strauss 2005). In der Photorezeptorzelle findet durch Lichteinwirkung die Isomerisierung des Chromophors 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal statt. Für die Aufrechterhaltung der Durchführung des Sehzyklus ist es daher essenziell, dass im RPE durch Umwandlungsprozesse wieder 11-cis-Retinal entsteht und den

Photorezeptorzellen erneut zur Verfügung gestellt wird (*Abbildung 1*, Seite 1) (Rando 2001).

Außerdem sezerniert das RPE zahlreiche Wachstumsfaktoren. Hierzu gehören unter anderem fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2, and FGF-5), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor-I (IGF-I), ciliary neurotrophic factor (CNTF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), lens epithelium-derived growth factor (LEDGF), Interleukine und pigment epithelium-derived factor (PEDF). Diese Faktoren sind für die Aufrechterhaltung von Funktion und Struktur der Netzhaut essenziell (Steinberg 1985; Holz 2001; Strauss 2005).

Darüber hinaus ist das RPE auch am Aufbau der äußeren Blut-Retina-Schranke beteiligt, die durch die Tight Junctions zwischen den RPE-Zellen gebildet wird (Bowling et al. 2017).

Eine weitere wichtige Aufgabe des RPEs ist der Schutz des umgebenden Gewebes vor Photooxidation. Dieser Schutz wird vor allem durch Absorption von Licht durch Melanin der Melanosomen gewährleistet (Boulton und Dayhaw-Barker 2001; Seagle et al. 2005).

### **1.1.3 Lipofuszin in RPE-Zellen**

Mit zunehmendem Alter kommt es in RPE-Zellen zur intrazellulären Akkumulation von Lipofuszin. Der Hauptteil dieser Lipofuszingranula entsteht im Rahmen der oben genannten Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (Sparrow und Boulton 2005).

Generell ist die Ansammlung von Lipofuszin im Rahmen des Alterungsprozesses in vielen postmitotischen, stoffwechselaktiven Zellen zu finden und seit langer Zeit bekannt (Koneff 1886), hierzu gehören neben RPE-Zellen auch Neuronen und Kardiomyozyten (Moreno-García et al. 2018; Kakimoto et al. 2019).

Lipofuszingranula in RPE-Zellen besitzen einen Durchmesser von ungefähr 1  $\mu\text{m}$  (Ach und Bermond 2019) und enthalten vor allem lysosomale Residualkörper mit oxidativ modifizierten Lipiden (Holz et al. 2007) bei einem geringen Proteinanteil von weniger als 2 % (Ng et al. 2008).

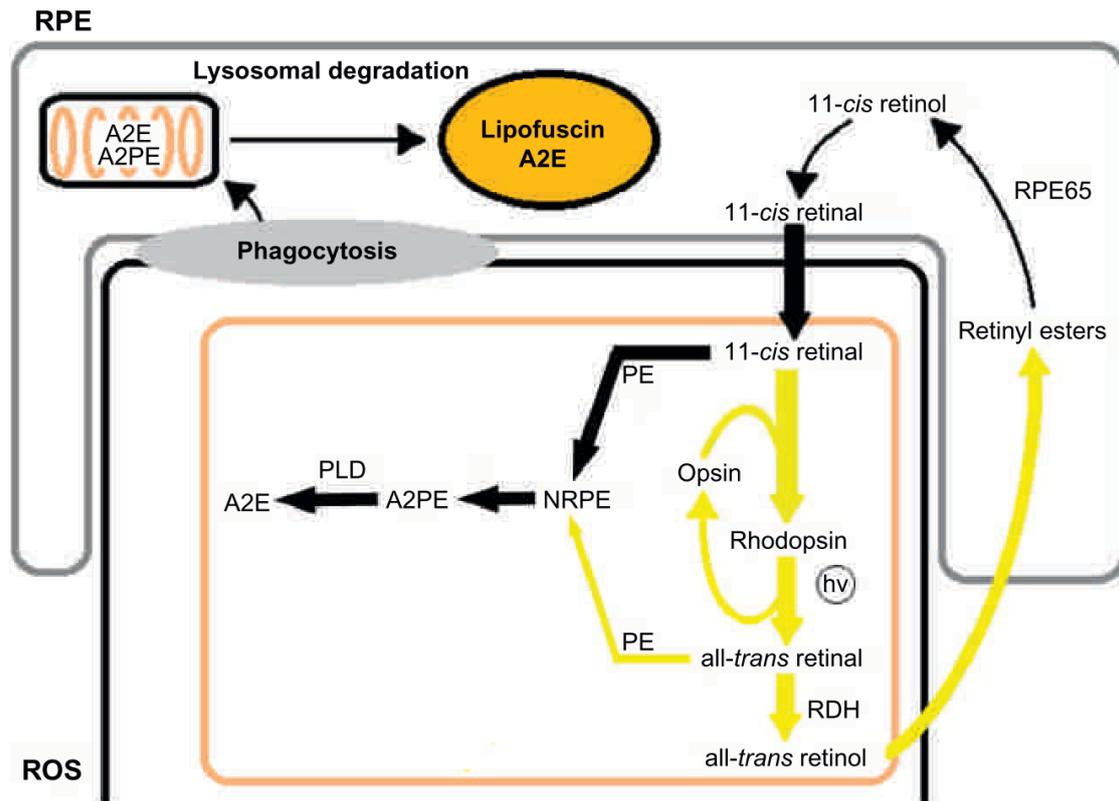
Außerdem enthält Lipofuszin eine bislang noch nicht vollkommen bekannte Mischung an unterschiedlichen Fluorophoren. Hiervon konnten bereits über 20 verschiedene Bisretinoidprodukte nachgewiesen werden (Sparrow et al. 2012; Yakovleva et al. 2020).

Den am intensivsten untersuchten Bestandteil von Lipofuszin stellt das Fluorophor A2E dar, welches durch die Reaktion von zwei Molekülen all-trans-Retinal mit Ethanolamin entsteht (*Abbildung 2*, Seite 5) (Eldred und Lasky 1993; Sakai et al. 1996; Ren et al. 1997; Sparrow et al. 1999; Sparrow et al. 2003; Holz et al. 2007).

In histologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zunahme des Lipofuszin-Gehalts in RPE-Zellen nicht linear erfolgt: die stärkste Zunahme findet zwischen der ersten und zweiten Lebensdekade statt, danach erfolgt ein weiterer, aber deutlich langsamer Anstieg mit zunehmendem Alter. Im hohen Lebensalter konnte eine Abnahme des Lipofuszingehalts nachgewiesen werden, da es zu einem Verlust von Lipofuszin-Granula der RPE-Zellen kommt (Wing et al. 1978; Feeney-Burns et al. 1984; Ach et al. 2014; Ach et al. 2015; Gambril et al. 2019).

Die Verteilung der Lipofuszingranula zeigt deutliche topografische Unterschiede: am hinteren Pol des menschlichen Auges ist der Lipofuszingehalt im Bereich der Fovea am niedrigsten, weist im Bereich der Perifovea die höchste Konzentration auf und sinkt erneut im Bereich der Peripherie (Bermond et al. 2020).

Die Veränderungen der Anzahl und Topografie von Lipofuszingranula in RPE-Zellen lassen sich nicht nur *ex vivo* untersuchen, sondern können auch durch *in vivo* Bildgebung der Retina mittels Fundusautofluoreszenz (FAF) untersucht werden, da Lipofuszin und seine Bestandteile autofluoreszierende Eigenschaften besitzen (siehe auch 1.2.2, Seite 6) (Wing et al. 1978; Weiter et al. 1986).



**Abbildung 2:** Sehzyklus und Entstehung von Lipofuszin und A2E.

A2E wird hauptsächlich aus 11-cis-Retinal und all-trans-Retinal innerhalb der Photorezeptoraußensegmente gebildet. Anschließend wird A2E von der RPE-Zelle mittels Phagozytose aufgenommen, in der es anschließend nach lysosomaler Degradation Bestandteil der Lipofuszingranula werden kann. ROS: rod outer segment, Photorezeptoraußensegment; NRPE: N-Retinyldenphosphatidylethanolamin; PLD: Phospholipase D; RDH: Retinoldehydrogenase. Aus Crouch et al. (2015). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

## 1.2 Autofluoreszenz der Netzhaut

### 1.2.1 Fluorophore der Netzhaut und des Auges

1995 konnte gezeigt werden, dass Lipofuszin den Hauptanteil des Autofluoreszenzsignals in der nicht-invasiven *in vivo* Fundusautofluoreszenz-Untersuchung bedingt (Eldred und Katz 1988; Delori et al. 1995; Rückmann et al. 1995; Heimann et al. 2006). Dabei besitzt Lipofuszin ein Anregungsmaximum bei 510 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 620 und 630 nm (Delori et al. 1995).

In der Netzhaut gibt es neben Lipofuszin aber auch andere Stoffe, die Autofluoreszenzeigenschaften besitzen (Eldred und Katz 1988; Ben Ami et al. 2016).

Ein Beispiel sind Advanced Glycation End Products (AGEs), die durch nichtenzymatische Glykierung von Proteinen wie Elastin und Kollagen entstehen können. Sie befinden sich meist extrazellulär und zeigen eine Zunahme mit steigendem Alter (Yin 1996). Außerdem wurden sie vermehrt bei Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen (Vlassara und Palace 2002). AGEs konnten mittlerweile in zahlreichen unterschiedlichen Bestandteilen des Auges nachgewiesen werden, wie z. B. Hornhaut (Malik et al. 1992; Kaji et al. 2000), Linse (Cheng et al. 2002), Glaskörper (Stitt et al. 1998) und Netzhaut (Glenn und Stitt 2009).

### **1.2.2 Fundusautofluoreszenz**

Die Fundusautofluoreszenz bietet die Möglichkeit einer nicht-invasiven *in vivo* Bildgebung der Netzhaut, durch die Rückschlüsse auf den Stoffwechsel und den Gesundheitszustand des retinalen Pigmentepithels möglich sind (Schmitz-Valckenberg et al. 2008). Physiologischerweise steigt die Intensität der Fundusautofluoreszenz bei gesunden Personen mit zunehmendem Lebensalter an. Im hohen Alter (ab dem 70. Lebensjahr) kommt es vermutlich jedoch zu einer Abnahme der Intensität, wobei möglicherweise auch Einflüsse der optischen Medien und altersabhängige RPE-Veränderungen eine Rolle spielen könnten (Delori et al. 1995).

Die Bildgebung mittels Fundusautofluoreszenz spielt außerdem in der klinischen Diagnostik, Verlaufskontrolle und zum Teil im Therapiemonitoring zahlreicher Netzhauterkrankungen eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Ly et al. 2017), die idiopathische Chorioretinopathia centralis serosa (Spaide und Klanchnik 2005; Govindahari et al. 2019) sowie erbliche Erkrankungen wie Morbus Stargardt (autosomal-rezessiv) und Morbus Best (autosomal-dominant) (Yung et al. 2016).

### **1.3 *In vivo* Fundusautofluoreszenz-Bildgebung mittels konfokalem Scanning-Laser-Ophthalmoskop (cSLO)**

Ein Meilenstein der retinalen Bildgebung war die Einführung der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (cSLO) durch *Webb und Kollegen* im Jahr 1987 (Webb et al. 1987). Im Jahr 1995 wurde dann die *in vivo* Fundusautofluoreszenz-Bildgebung mittels cSLO erstmals durchgeführt (Rückmann et al. 1995).

Der Laser des cSLOs erzeugt hierbei einen konzentrierten Lichtstrahl mit monochromatischem Licht, mit dem die Netzhaut zeilenförmig gescannt werden kann.

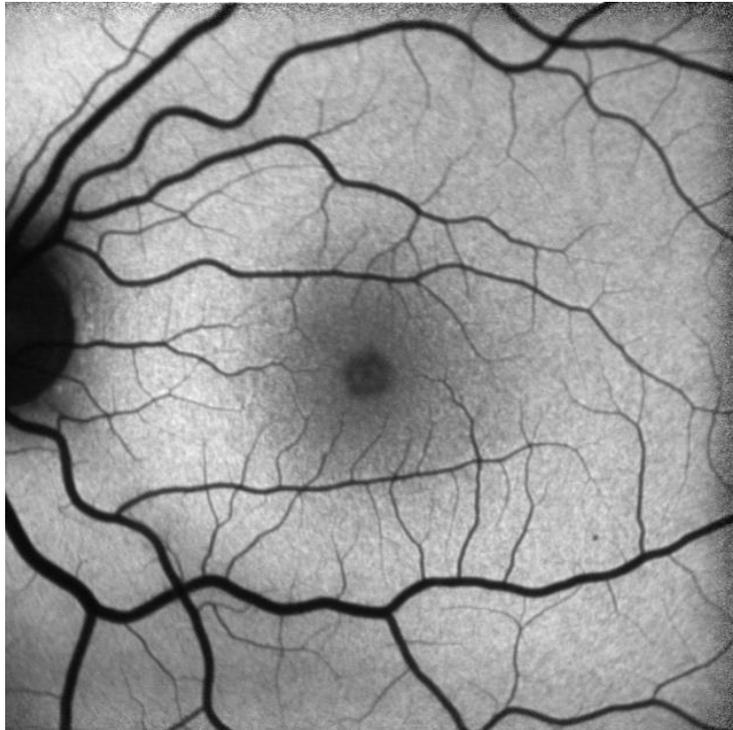
Der Beleuchtungs- und Beobachtungsstrahlengang haben dabei den gleichen Brennpunkt, so kann Streulicht reduziert und der Kontrast erhöht werden. Dadurch kann bei Trübungen der optischen Medien eine bessere Bildqualität ermöglicht werden (Rückmann et al. 1995; Bille 2019).

#### **1.3.1 Physiologisches Fundusautofluoreszenzbild**

Die Autofluoreszenzintensität ist bei einem regelrechten Fundusautofluoreszenzbild im parafovealen Bereich am höchsten und sinkt in Richtung Netzhautperipherie. Außerdem ist die Autofluoreszenz zusätzlich in drei Bereichen physiologischerweise vermindert (Schmitz-Valckenberg et al. 2008):

- 1) Im Bereich der Netzhautgefäße, da sich diese vor der RPE-Zellschicht befinden und so das anregende und das emittierte Licht absorbieren.
- 2) Im Bereich des Sehnervenkopfs, da sich hier kein bis sehr wenig autofluoreszierendes Lipofuszin befindet und die RPE-Zellschicht in diesem Bereich unterbrochen ist.
- 3) Im Bereich der Fovea, da hier das Licht vom gelben, intraretinalen Makulapigment (u. a. Lutein und Zeaxanthin) absorbiert wird und aufgrund der hier geringeren Konzentration von Lipofuszin in den RPE-Zellen (Wing et al. 1978; Li et al. 2020).

Ein physiologisches Fundusautofluoreszenz-Bild ist beispielhaft in *Abbildung 3* dargestellt:



**Abbildung 3:** Physiologisches Fundusautofluoreszenzbild einer 19-jährigen, gesunden Probandin. Das Autofluoreszenzsignal ist im Bereich der Netzhautgefäße, des Sehnervenkopfs und der Fovea vermindert.

### 1.3.2 Störfaktoren bei der Fundusautofluoreszenzaufnahme mit einem cSLO

Die optischen Medien des Auges haben einen wesentlichen Einfluss auf die Bildqualität der Fundusautofluoreszenzaufnahmen. Durch Hornhaut-, Linsen- und Glaskörpertrübungen kann es zu einer ausgeprägten Absorption und Streuung von Licht und damit zu einer Verschlechterung der Aufnahmequalität kommen (Schmitz-Valckenberg et al. 2008). Besonders Linsenkerntürbungen sind relevant, da sie das blaue Anregungslicht besonders stark absorbieren (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

## **1.4 Quantitative Autofluoreszenz (QAF)**

Viele Jahre war die fehlende Quantifizierbarkeit eine der größten Limitationen der Fundusautofluoreszenzbildgebung. Im Jahr 2011 stellten *Delori und Kollegen* ein klinisches, wenn auch noch experimentelles Bildgebungsinstrument vor, mit dem sich die Autofluoreszenzsignale der Retina erstmals quantifizieren ließen (Delori et al. 2011a).

Die Bestimmung der quantitativen Fundusautofluoreszenz (QAF) wird hierbei mit einem modifizierten cSLO durchgeführt, wobei die Autofluoreszenzintensität auf eine interne Referenzprobe, die bei jeder Fundusautofluoreszenzaufnahme mitgemessen wird, normiert wird (siehe auch *Abbildung 4*, Seite 14) (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013; Armenti et al. 2016; Sparrow et al. 2020).

Durch die Quantifizierung bietet die QAF prinzipiell die Möglichkeit, Fundusautofluoreszenzaufnahmen sowohl intrapersonell als auch interpersonell zu vergleichen. So können Veränderungen der Autofluoreszenzintensität von Patienten im zeitlichen Verlauf untersucht werden, aber auch Vergleiche zwischen Personen mit und ohne Netzhauterkrankungen sind möglich.

Insgesamt stellt die quantitative Autofluoreszenz eine Erweiterung der retinalen Bildgebung dar und kann zusätzliche Hilfestellung bei Verlaufskontrollen, Therapiekontrollen und Therapieentscheidungen bei Netzhauterkrankungen bieten (Greenberg et al. 2013; Sparrow et al. 2020).

### **1.4.1 Delori-Muster, QAF8-Analyse und bisherige Limitationen**

Der Großteil der bisher durchgeführten Studien zur QAF untersuchte nur einen kleinen Bereich des hinteren Pols.

Dabei wurde ein Muster aus 25 Segmenten verwendet (Delori-Muster). Dieses Delori-Muster besteht aus einem zentralen fovealen Segment und drei konzentrisch angeordneten Ringsegmenten (*Abbildung 7*, Seite 25) (Delori et al. 2011a).

Das Delori-Muster ist auf die Fovea zentriert und die äußere Begrenzung des peripheren Rings wird durch die Position des Rands des Sehnervenkopfs

definiert (Greenberg et al. 2013). Die Platzierung dieses Analyseusters basiert hierbei auf der visuellen Entscheidung des Untersuchers, der die Position der Fovea und des Sehnervenkopfs bestimmt (Armenti et al. 2016).

Der Großteil der Studien zur QAF untersuchte die durchschnittliche QAF-Intensität des ringförmig angeordneten QAF8-Analysebereichs (Greenberg et al. 2013; Burke et al. 2014; Duncker et al. 2015b; Müller et al. 2015; Gliem et al. 2016b; Boudreault et al. 2017; Eandi et al. 2017; Gliem et al. 2017; Reiter et al. 2019a; Reiter et al. 2019b). Dieser Analysebereich umfasst die acht gleichgroßen Segmente des mittleren Rings des Delori-Musters (*Abbildung 7, Seite 25*) (Greenberg et al. 2013).

Die Beurteilung der QAF bei retinalen Pathologien, insbesondere bei Makulopathien wie der AMD, stellt eine besondere Herausforderung dar (Gliem et al. 2016b). Bei Patienten mit AMD und vielen anderen retinalen Erkrankungen ist die alleinige Analyse des QAF8-Analysebereichs problematisch, da kleine pathologische Bereiche wie Drusen oder winzige atrophe Bereiche nicht ausreichend berücksichtigt werden. So wird bei geringfügigen QAF-Veränderungen die durchschnittliche Autofluoreszenzintensität des relativ großen QAF8-Analysebereichs nur minimal beeinflusst. Außerdem werden Läsionen, die sich außerhalb der Segmente der QAF8 befinden, nicht bei der Analyse berücksichtigt.

Zur Untersuchung physiologischer und pathologischer Befunde wäre außerdem die Möglichkeit eines direkten Vergleichs von QAF-Bildern und die exakte Überlagerung mit anderen retinalen Bildgebungsmodalitäten wünschenswert. So könnten die Vorteile der einzelnen Bildmodalitäten kombiniert und Netzhautstrukturen sowie -pathologien hervorgehoben und besser erkannt werden.

## **1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit**

Aus den oben genannten Limitationen (siehe 1.4.1, Seite 9) der bisherigen Analysen der QAF ergab sich die Zielsetzung dieser Arbeit.

Neben der alleinigen QAF-Aufnahme sollten auch zusätzlich Bildinformationen anderer Modalitäten in den Analyseprozess einbezogen werden. Daher war ein Ziel dieser Studie, multimodale Netzhautaufnahmen (einschließlich QAF-Aufnahmen) gesunder erwachsener Probanden verschiedener Altersdekaden durchzuführen und mittels Spectral-Domain optische Kohärenztomographie (SD-OCT)-basierter Ausrichtung, Drehung und Skalierung exakt übereinander zu lagern, um so für jeden Studienteilnehmer einen individuellen multimodalen Bildstapel zu erstellen.

Basierend auf den individuellen QAF-Aufnahmen der Probanden sollte die Erstellung von QAF-Standardretinakarten erfolgen. Diese spiegeln die Topografie der QAF-Intensität der unterschiedlichen Altersdekaden wider und können somit als Basis für intra- und interpersonelle Vergleiche der QAF-Intensitäten mittels Differenzkarten dienen.

Ein weiteres Ziel war die Erstellung von Hot-Spot-Karten der unterschiedlichen Altersdekaden basierend auf diesen QAF-Standardretinakarten. Hiermit können die Pixel und Segmente mit der höchsten QAF-Intensität der Altersdekaden dargestellt und verglichen werden, um diese Ergebnisse dann mit früheren histologischen Studien zu vergleichen.

Neben den etablierten Analysemustern der QAF (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)-Muster und Delori-Muster) sollte ein zusätzliches subsegmentiertes Analysemuster zur feineren und individuelleren Beurteilung der QAF entwickelt und angewandt werden. Dieses Analysemuster sollte insbesondere die Detektion und Analyse von kleineren Netzhautpathologien erleichtern.

Zur individuellen, musterunabhängigen Analyse sollte darüber hinaus ein Freihandtool zur Bestimmung der QAF-Intensität entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienpopulation

Für diese Studie wurden die Vorgaben in der Deklaration von Helsinki bzw. die Prinzipien der „Good Clinical Practice“ befolgt und die geltenden datenschutzrechtlichen Bestimmungen eingehalten. Bei der Durchführung der Studie wurden personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde erhoben, gespeichert (in anonymisierter Form) und ausgewertet. Probanden wurden nur nach schriftlicher Einwilligung zur Teilnahme in die Studie eingeschlossen. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt (Nr. 134/16). Der Studieneinschluss von Probanden erfolgte im Zeitraum zwischen September 2016 und April 2019.

Im Rahmen dieser Studie wurden 103 Probanden im Alter zwischen 19 und 77 Jahren eingeschlossen, untersucht und, dem Alter entsprechend, jeweils einer Altersdekade zugeordnet. Durchschnittsalter und das mediane Alter der jeweiligen Dekaden sind *Tabelle 1* zu entnehmen. 36 (35 %) der Probanden waren weiblich. Je Teilnehmer wurde nur ein Auge in die Studie eingeschlossen (siehe auch 2.3.6, Seite 18). Alle Studienteilnehmer waren Kaukasier.

**Tabelle 1:** Verteilung der Studienpopulation nach Dekade, Altersbereich, Alter, Probandenzahl und Geschlecht

Dekade	Altersbereich	Alter (Durchschnitt/Median)	Probandenanzahl	♀	♂
3.	19 – 30	24,1 / 23	25	8	17
4.	31 – 40	35,0 / 36	17	6	11
5.	41 – 50	45,5 / 46	19	6	13
6.	51 – 60	57,1 / 58	18	6	12
7.	61 – 70	63,8 / 63	17	7	10
8.	71 – 77	73,6 / 72	7	3	4
<b>Gesamt</b>	<b>19 – 77</b>		<b>103</b>	<b>36</b>	<b>67</b>

### **2.1.1 Einschlusskriterien**

Für die Studie wurden nur Probanden mit einem regelrechten ophthalmologischen Untersuchungsbefund, einem bestkorrigierten Visus von  $\geq 20/25$  und altersentsprechend klaren optischen Medien (Hornhaut, Linse, Glaskörper) eingeschlossen. Außerdem mussten die Probanden zwischen 18 und 100 Jahre alt sein.

### **2.1.2 Ausschlusskriterien**

Von der Studie ausgeschlossen wurden Probanden, die eine Sehminderung (Visus  $< 20/25$ ) auf dem Studienaughäutchen aufwiesen. Zudem wurden Probanden mit strukturellen, funktionellen oder anderweitigen Veränderungen des Studienaughäutches ausgeschlossen. Einen weiteren Ausschlussgrund stellte eine Pseudophakie des untersuchten Auges dar.

## **2.2 Heidelberg Engineering HRA für die QAF-Messung**

Der Heidelberg Engineering HRA (Heidelberg Retina Angiograph) wurde ursprünglich für die digitale retinale Angiographie entwickelt, bietet aber zudem nach entsprechenden Hard- und Softwaremodifikationen die Möglichkeit der QAF-Bildgebung (Armenti et al. 2016; Sparrow et al. 2020). Bei dem verwendeten Spectralis HRA (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland, Baujahr 2015/06, SN Spec-KT 0564) wurden diese Modifikationen herstellereits vorgenommen. Hierzu gehören die Verwendung eines 30°-Objektivs (Seriennummer: WFO2-5240) und einer internen Aufnahme- und Analysesoftware (Heidelberg Eye Explorer, Version 1.9.10.0, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland), sowie der Einbau einer internen Referenzprobe in den Strahlengang.

Diese orangene interne Referenzprobe (siehe *Abbildung 4*, Seite 14) beinhaltet einen Graufilter, der zu einer Abschwächung des anregenden Lichts ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) um den Faktor  $10^{2 \times 1,3} \approx 398$  führt (Delori et al. 2011a). Außerdem enthält die interne Referenzprobe das Fluorophor Texas Red, einen Rhodaminfarbstoff, der

in eine Kunststoffmatrix eingebettet ist (Titus et al. 1982; Delori et al. 2011a). Durch gleichzeitige Messung der Referenzprobe und der Intensität der Fundusautofluoreszenz des Probanden, kann diese auf die Referenzprobe normiert werden und so die QAF bestimmt werden (siehe *Formel 1*, Seite 26).

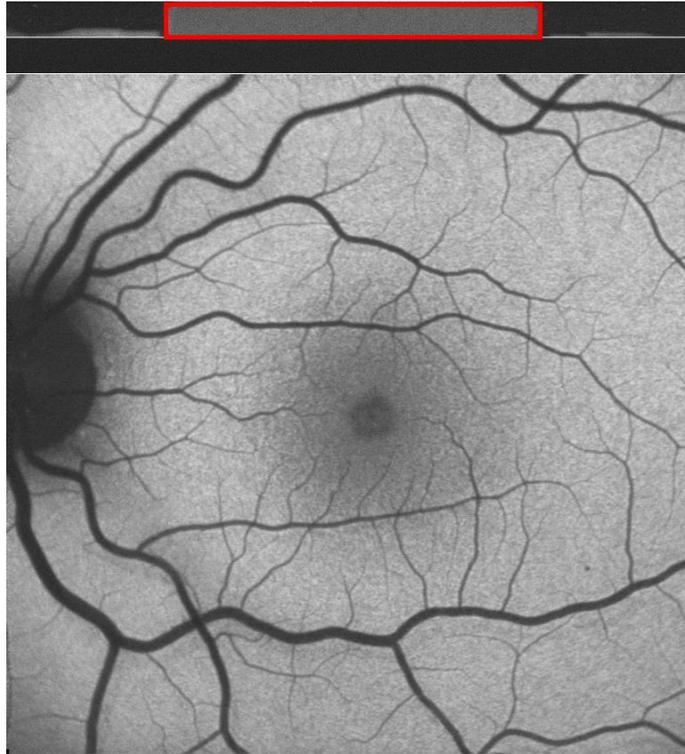
Die interne Referenzprobe wurde entsprechend den Herstellervorgaben einmal jährlich mit einer sogenannten Masterreferenz kalibriert (Delori et al. 2011a).

Zur Erstellung der QAF-Aufnahmen wird der Augenhintergrund mittels eines Argon-Blau-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Nur emittiertes Licht mit einer Wellenlänge  $> 500$  nm kann anschließend den eingebauten Langpassfilter passieren und wird vom Detektor registriert.

Für die QAF-Aufnahmen werden 12 Einzelbilder in Serie aufgenommen und anschließend zu einem Bild mit einer Auflösung von 768x768 Pixel gemittelt (siehe *Abbildung 5*, Seite 15).



**Abbildung 4:** Übersichtsbild (links) und Vergrößerung (rechts) der orangenen internen Referenzprobe zur Bestimmung der QAF.



**Abbildung 5:** Gemitteltetes QAF-Bild einer gesunden 19-jährigen Probandin. Am oberen Bildrand ist die interne Referenzprobe (rot umrandet) sichtbar, mittels der eine Normierung und Quantifizierung der Autofluoreszenzintensität möglich ist.

## **2.3 Durchführung der Studie**

### **2.3.1 Ausführliche allgemeine und ophthalmologische Anamnese und klinische Untersuchung**

Bei jedem Probanden erfolgte die Erhebung einer ausführlichen allgemeinen und ophthalmologischen Anamnese unter Berücksichtigung der Patientenhistorie.

Eine ophthalmologische Untersuchung an einer Spaltlampe wurde durch einen Arzt oder eine Ärztin durchgeführt. Dies umfasste eine Untersuchung des vorderen Augenabschnitts und eine Augeninnendruckbestimmung mittels Applanationstonometrie nach Goldmann. Außerdem erfolgte eine funduskopische Untersuchung der Netzhaut in Mydriasis, um einen altersentsprechend unauffälligen funduskopischen Netzhautbefund sicherzustellen.

### **2.3.2 Bestimmung des Visus mit bestmöglicher Korrektur**

Zur Visusbestimmung im Rahmen dieser Studie wurden ETDRS-Visus-Tafeln verwendet.

Die ETDRS-Visus-Tafeln (Precision Vision, Woodstock, IL, USA) bestehen aus drei unterschiedlichen Einzeltafeln: einer „Chart R“, mit der die beste Korrektur mit der Refraktionsbrille bestimmt wird, außerdem aus einer „Chart 1“ (für das rechte Auge) und einer „Chart 2“ (für das linke Auge).

Bei jedem Probanden wurde der Visus mit bestmöglicher Korrektur (Bestimmung der objektiven Refraktion mit anschließender Bestimmung der subjektiven Refraktion) bestimmt (Friedburg und Krause 2002). Dabei betrug die Entfernung zwischen Probanden und ETDRS-Tafel 4 Meter. Die letzte Zeile, in der noch mindestens 3 von 5 Buchstaben richtig erkannt wurden, wurde als letzte erkannte Zeile definiert und der entsprechende Wert als Visus des entsprechenden Auges übernommen (Told et al. 2013).

### **2.3.3 Medikamentöse Mydriasis**

Um eine hochwertige und vergleichbare Aufnahmequalität der quantitativen Autofluoreszenzmessung zu gewährleisten, erfolgte eine Weitstellung der Pupillen des Probanden. Hierzu wurden jeweils ein Tropfen Mydrum® (Wirkstoff: Tropicamid, Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA) und Neosynephrin® (Wirkstoff: Phenylephrinhydrochlorid, Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken, Deutschland) in den Bindehautsack des Probanden getropft und nach 20 Minuten bei ausreichender Mydriasis (Pupillendurchmesser > 6 mm) mit den Untersuchungen begonnen. Falls keine ausreichende Mydriasis erreicht werden konnte, erfolgte der Studienausschluss.

### **2.3.4 Messung der Hornhautkrümmungsradien**

Für die Bestimmung des Skalierungsfaktors (SF) für die Berechnung der quantitativen Autofluoreszenz werden die Werte der Hornhautkrümmungsradien (C-Curve) des Probanden benötigt (siehe *Formel 1*, Seite 26) (Greenberg et al.

2013). Die Hornhautkrümmung der Probanden wurde mittels eines optischen Biometriegerätes (IOL Master 500, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bestimmt. Die Bestimmung erfolgt dabei mittels Teilkohärenz-Laserinterferometrie (partial coherence interferometry, PCI) unter der Verwendung einer Infrarot-Laserdiode mit  $\lambda = 780 \text{ nm}$  (Stattin et al. 2015).

### **2.3.5 Aufnahme der Netzhautbilder (inklusive QAF-Aufnahmen)**

Für die Erstellung eines multimodalen Bildstapels wurde von jedem Studienteilnehmer ein Infrarotbild ( $\lambda = 820 \text{ nm}$ ), ein nah-infrarot Autofluoreszenzbild ( $\lambda = 787 \text{ nm}$ ), ein Blaulicht-Autofluoreszenzbild ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), ein QAF-Bild ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) und ein rotfreies Bild ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) aufgenommen. Dabei wurde auf eine Zentrierung der Fovea in der Bildmitte geachtet, die mittels Verwendung einer internen und/oder externen Fixationshilfe sichergestellt wurde.

Der Abstand zwischen Probandenauge und Kamera wurde so gewählt, dass sich eine homogene Ausleuchtung des Bilds mit minimalen Helligkeitsunterschieden zu den Bildrändern ergab. Bei der Fokussierung auf die Makula wurde vor allem auf eine scharfe Darstellung der Makula-nahen Gefäße geachtet. Generell wurde bei den Aufnahmen eine möglichst hohe Sensitivität gewählt. Eine Überbelichtung der Bilder wurde jedoch mit Hilfe der Aufnahmesoftware ausgeschlossen.

Vor der Durchführung der eigentlichen QAF-Aufnahme wurde außerdem ein Bleichvorgang von mindestens 20 Sekunden durchgeführt. Das heißt, die Netzhaut wurde mit dem anregenden Licht beleuchtet, ohne eine Bildaufnahme durchzuführen (Delori et al. 2011a). Dieser Bleichvorgang ist notwendig, weil Rhodopsin, eines der Sehpigmente der Retina, das anregende Laserlicht absorbiert und somit die Autofluoreszenz abschwächt (Warrant und Nilsson 1998; Morgan und Pugh 2013). Bei längerer Belichtung nimmt diese Absorptionsfähigkeit jedoch ab (Prieto et al. 2005). Erst die resultierende Reduktion der Absorption des anregenden Lichts nach dem Bleichvorgang ermöglicht vergleichbare QAF-Aufnahmen (Delori et al. 2011).

Bei der Aufnahme der QAF wurden jeweils 12 Bilder pro Messung in Folge aufgenommen. Bei jedem Probanden wurden mindestens zwei dieser Bildaufnahmeserien durchgeführt, wobei zwischen den beiden Serien immer eine Neujustierung mit erneuter Bildeinstellung erfolgte.

Bei allen Probanden wurde neben den oben genannten Netzhautaufnahmen eine SD-OCT durchgeführt, um eine genaue Bestimmung der Position der Fovea im Rahmen der Software-basierten Auswertung der Bilder zu ermöglichen (*Abbildung 6*, Seite 21 und Absatz 2.4.2 Seite 22).

In dieser Forschungsarbeit umfasste die Aufnahmen mittels SD-OCT einen 6 mm breiten horizontalen Makula-Scan mit einer Mittelung von 35 Einzelbildern zu jeweils einem B-Scan (Hassan et al. 2018). Insgesamt wurden bei jeder Aufnahme 49 B-Scans in einem 20° x 20° Fenster aufgezeichnet. Die Bildgröße der OCT B-Scans betrug 512 x 498 Pixel (Breite x Höhe). Die en-face Infrarotbilder hatten eine Auflösung von 768 x 768 Pixel.

### **2.3.6 Bildselektion**

Die aufgenommenen QAF-Bilder wurden vor der Analyse auf deren Qualität (gleichmäßige Ausleuchtung, Ausschluss von Artefakten durch Augen- und Lidbewegungen, korrekte Fokussierung der Aufnahme) überprüft.

Je Aufnahmeserie (bestehend aus jeweils 12 QAF-Einzelbildern) wurden maximal 3 Bilder ausgeschlossen, wenn diese qualitative Mängel, wie z. B. Artefakte durch Lidbewegungen besaßen, sodass die gemittelten QAF-Bilder aus mindestens 9 Einzelaufnahmen bestanden. Diese wurden mittels der geräteeigenen Software zu einem Bild gemittelt, welches in der Folge für die Bildanalyse verwendet wurde.

Bei jedem Probanden wurden nur die Aufnahmen eines Auges für die Studie verwendet. Bei Probanden, bei denen beide Augen untersucht wurden, wurden die Aufnahmen des Auges mit der besseren Bildqualität der QAF-Aufnahme verwendet. Im Falle gleichwertiger Aufnahmequalität beider Augen, wurden die Aufnahmen des linken Auges ausgewählt.

## 2.4 Bildanalyse mittels FIJI-Plugins

Alle Bilder wurden mit der Open-Source-Software FIJI prozessiert und analysiert (Schindelin et al. 2012). Hierzu wurden neue Plugin-Tools entwickelt und verwendet, welche freundlicherweise von Dr. Kenneth Sloan (Department of Computer and Information Sciences, University of Alabama at Birmingham, AL, USA) programmiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden:

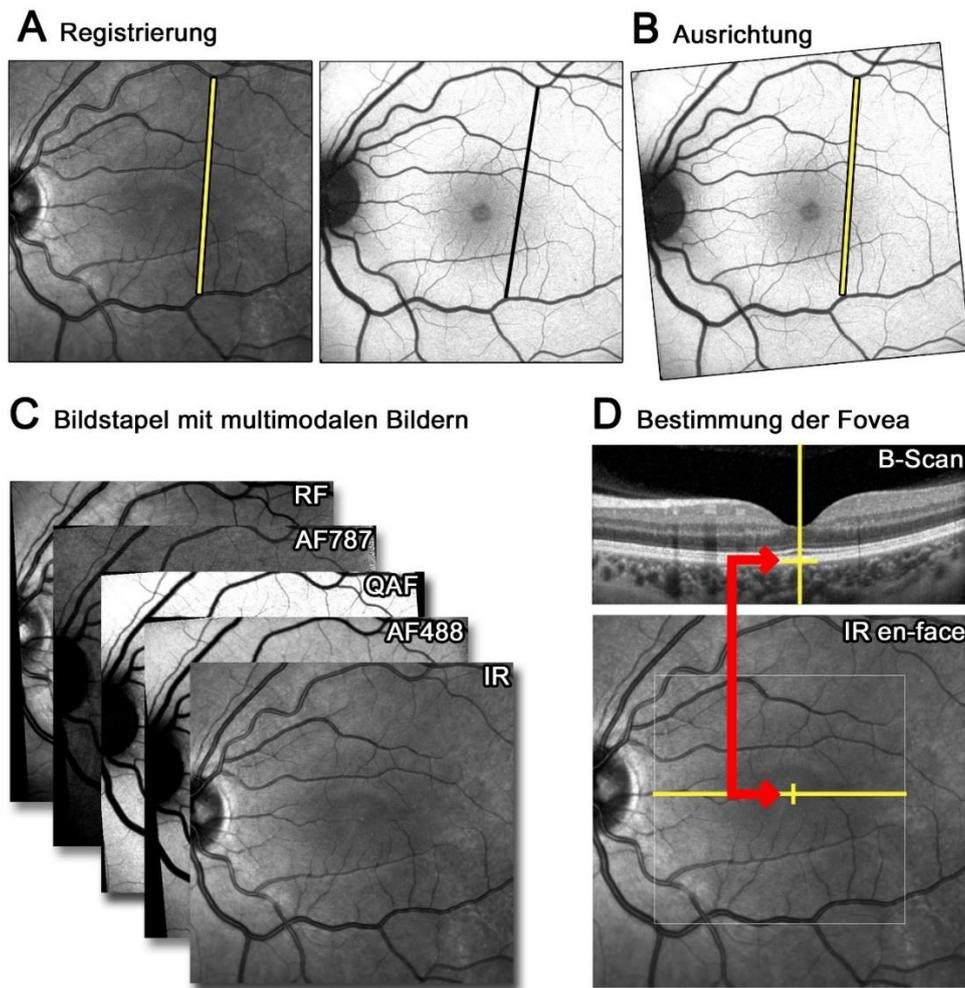
- 1) *Register OCT*: Erstellung der multimodalen Bildstapel (siehe 2.4.1, Seite 20).
- 2) *Find Fovea*: Festlegung der Position der Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs im SD-OCT-Scan und im korrespondierenden en-face Intraotbild (siehe 2.4.2, Seite 22).
- 3) *QAF XML Reader*: Altersentsprechende Anpassung der QAF-Aufnahme an den Einfluss der optischen Medien (siehe Abschnitt 2.4.3, Seite 22 und 2.5, Seite 26).
- 4) *Add to Standardretina OCT*: Hinzufügen einzelner QAF Bilder zur Standardretinakarte der Altersdekaden (siehe 2.4.3, Seite 22 und 3.3, Seite 34).
- 5) *Compare to Standardretina OCT*: Erstellung von Differenzkarten der QAF-Intensität zwischen individuellen QAF-Aufnahmen einzelner Personen und den altersentsprechenden Standardretinakarten (siehe 2.4.4, Seite 23 und 3.4.3, Seite 47).
- 6) *Grids OCT*: Bestimmung der QAF-Intensität der Analysemuster (siehe 2.4.5, Seite 24, 2.5, Seite 26 und 3.1, Seite 29).
- 7) *Freehandtool OCT*: QAF-Intensitätsmessung innerhalb individuell festgelegter Bereiche (siehe 2.4.6, Seite 25, 2.5, Seite 26, 3.4.1, Seite 37, 3.4.2, Seite 41 und 3.4.3, Seite 47).
- 8) *Grids Maxima*: Bestimmung des Pixels mit der maximalen QAF-Intensität innerhalb einer QAF-Aufnahme/Standardretinakarte (siehe 3.3, Seite 34).
- 9) *Grids Heat Map*: Bestimmung des Segments mit der maximalen QAF-Intensität innerhalb eines Grids einer QAF-Aufnahme/Standardretinakarte (siehe 3.3, Seite 34).

#### **2.4.1 OCT-basierter Aufbau der multimodalen Bildstapel**

In *Abbildung 6* (Seite 21) wird der Arbeitsablauf der Bildregistrierung und der SD-OCT-basierten Bestimmung der Position der Fovea dargestellt.

Während der SD-OCT-Aufnahme der Makula wurde gleichzeitig ein en-face Infrarotbild (IR) aufgenommen. Dieses IR-Bild wurde verwendet, um alle anderen Bilder der verschiedenen Modalitäten zu registrieren und basierend auf diesem IR-Bild exakt zu überlagern.

Die Registrierung einer Bildmodalität in Bezug auf das IR-Bild wurde durchgeführt, indem zwei markante Orientierungspunkte (retinale Gefäßbifurkationen) in beiden Bildern ausgewählt wurden und manuell eine Linie zwischen diesen beiden Orientierungspunkten eingezeichnet wurde (*Abbildung 6A*, Seite 21). Die registrierten Bilder wurden dann durch Verschiebung, Drehung und Skalierung mittels des Softwareplugins *Register OCT* verarbeitet (*Abbildung 6B*). So konnte durch die Ausrichtung der unterschiedlichen Bildmodalitäten ein exakt überlagerter multimodaler Bildstapel erstellt werden (*Abbildung 6C*).



**Abbildung 6:** Arbeitsablauf zur Bildregistrierung, Bildstapelerstellung und Bestimmung der Fovea.

**A:** Im ersten Schritt des Bildregistrierungsprozesses werden mit einer Linie zwei markante Bildpunkte (retinale Gefäßbifurkationen) innerhalb des en-face IR-Bilds (gleichzeitig aufgenommenes Infrarotbild während des SD-OCT-Scans) und des zu registrierenden Bilds (hier: QAF-Bild) markiert. **B:** Die Ausrichtung erfolgt auf Basis der beiden festgelegten Punkte durch Verschieben, Drehen und Skalieren des zu registrierenden Bilds. **C:** Die registrierten Bilder der unterschiedlichen Bildmodalitäten werden in einem Bildstapel gruppiert und genau überlagert. **D:** Die exakte Position der Fovea erfolgt durch Bestimmung des tiefsten Punkts der fovealen Senke (beziehungsweise maximale Elevation der Membrana limitans externa) innerhalb des SD-OCT-Scans. Diese Position wird für weitere Bildanalysen genutzt (siehe Abbildung 7, Seite 25). Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020), mit freundlicher Genehmigung des Verlags. RF: red free: Rotfreie Bildaufnahme mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ; AF787: Nahinfrarot-Fundusautofluoreszenzaufnahme mit  $\lambda = 787 \text{ nm}$ ; AF488: Fundusautofluoreszenzaufnahme mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ; IR: Infrarotbild mit  $\lambda = 820 \text{ nm}$ .

### **2.4.2 Bestimmung der Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs**

Die Positionen der Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs wurden mittels Softwareplugin (*Find Fovea*) im SD-OCT-Scan sowie im dazugehörigen en-face Infrarotbild bestimmt (*Abbildung 6D*, Seite 21).

Hierzu wurde zunächst der B-Scan innerhalb des OCT-Scans ausgewählt, der die tiefste foveale Senke beziehungsweise maximale Elevation der Membrana limitans externa aufwies (Bestimmung der Y-Achse). In diesem B-Scan wurde dann dieser Punkt manuell auf Höhe der RPE-Zellschicht markiert (Bestimmung der X- und Z-Achse). Diese Position wurde dann durch das Softwareplugin auf das en-face Infrarotbild übertragen.

Anschließend wurde der Rand des Sehnervenkopfs bestimmt. Hierzu wurde zunächst manuell eine Hilfslinie ausgehend von der zuvor definierten Position der Fovea zum Zentrum des Sehnervenkopfs eingezeichnet und der Schnittpunkt dieser Hilfslinie mit dem Rand des Sehnervenkopfs im en-face Infrarotbild markiert.

Diese beiden Positionen (Fovea und Rand des Sehnervenkopfs) wurden dann für die nachfolgende Definition der Analysemuster verwendet (*Abbildung 7*, Seite 25).

### **2.4.3 Verarbeitung von QAF-Aufnahmen und Erstellung von Standardretinakarten**

Für die Bestimmung der QAF-Intensität erfolgte eine Anpassung der QAF-Aufnahmen entsprechend des gerätespezifischen Referenzkalibrierungsfaktors (RCF) und des altersabhängigen Einflusses der Trübung der optischen Medien mittels Softwareplugin (*QAF XML Reader*) (siehe *Formel 1*, Seite 26 und *Formel 2*, Seite 27) (van Norren und van de Kraats 2007; Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

Die individuellen QAF-Bilder der Probanden wurden basierend auf der Position der Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs ausgerichtet, skaliert und überlagert, um so jeweils Standardretinakarten für die unterschiedlichen

Altersdekaden zu erstellen (Plugin: *Add to Standardretina OCT*) (Abbildung 9, Seite 36).

Die Standardretinakarten beinhalten für jedes Pixel folgenden Informationen:

1. mittlerer QAF-Wert der Probanden einer Altersdekade
2. Standardabweichung dieses mittleren QAF-Werts

Anschließend wurden die QAF-Standardretinakarten zur besseren Visualisierung in 8-Bit-Farbbilder konvertiert, wobei die QAF-Werte auf 0 bis 511 begrenzt (Minimal- und Maximalwerte der Standardretinakarte) und auf Werte zwischen 0 bis 255 skaliert wurden (siehe *Abbildung 9A*, Seite 36).

#### **2.4.4 Differenzkarten durch Vergleich individueller QAF-Bilder mit QAF-Standardretinakarten**

Durch die Erstellung von QAF-Standardretinakarten mit Mittelwerten und Standardabweichungen ergibt sich die Möglichkeit diese mit individuellen QAF-Aufnahmen zu vergleichen. Hierzu können sogenannte Vergleichskarten zwischen QAF-Standardretinakarten und der QAF-Aufnahme individueller Probanden und Patienten erstellt werden (Plugin: *Compare to Standardretina OCT*) (siehe auch *Abbildung 13F*, Seite 49).

Dabei wird für jedes Pixel die Differenz zwischen der Standardretinakarte und der QAF-Aufnahme des Patienten berechnet und diese Abweichung anschließend mittels Farbschema visualisiert. Als Einheit dient die Differenz in Standardabweichungen zwischen der Standardretinakarte und dem individuellen QAF-Bild. Zur Erstellung einer Vergleichskarte wird hierbei die Standardretinakarte der entsprechenden Alterskohorte verwendet.

#### **2.4.5 Anwendung verschiedener Analysemuster**

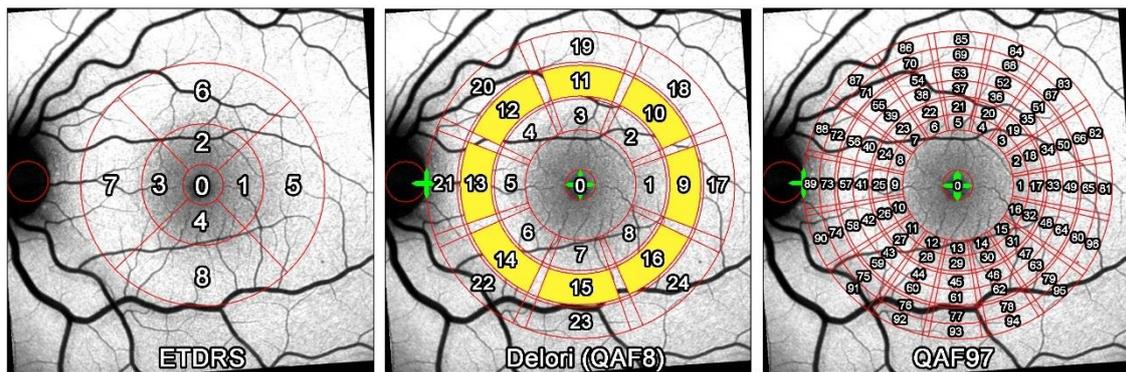
Für die Untersuchung von QAF-Bildern wurden drei verschiedene Analysemuster verwendet. Neben den bekannten ETDRS- und Delori-Mustern wurde zusätzlich ein neues Analysemuster (QAF97-Muster) entwickelt und angewandt (siehe *Abbildung 7*, Seite 25).

Das QAF97-Muster unterteilt jedes Segment des Delori-Analysemusters in vier Subsegmente. Das zentrale foveale Segment bildet eine Ausnahme und ist mit dem des Delori-Musters identisch. Die Bezeichnung QAF97-Muster wurde aufgrund der daraus resultierenden 96 Ring-Segmente + 1 Fovea-Segment gewählt.

Die drei verwendeten Analysemuster bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Ringen und Segmenten, alle mit der Fovea als Zentrum. Die Größe des ETDRS-Musters ist fest definiert, es umfasst drei Ringgrößen, die jeweils einen Durchmesser von 1, 3 und 6 mm besitzen. Insgesamt besteht es aus 9 Segmenten: einem zentralen kreisförmigen Segment, während die beiden periphereren Ringe x-förmig in 4 Untersegmente unterteilt werden (siehe auch *Abbildung 7*, Seite 25) (Xu et al. 2018).

Im Gegensatz dazu ist die Größe des Delori- und des QAF97-Analysemuster nicht einheitlich definiert, sondern resultiert aus dem Abstand zwischen der Fovea und dem Rand des Sehnervenkopfs. Das führt dazu, dass sich die Größe der Segmente dieser beiden Analysemuster zwischen den einzelnen Probanden geringfügig unterscheiden kann.

Für jedes Segment (unabhängig vom verwendeten Analysemuster) wurden der Mittelwert, der Maximal- und Minimalwert, die Standardabweichung der QAF-Intensität und die Anzahl der Pixel des analysierten Bereichs bestimmt (Plugin: *Grids OCT*).



**Abbildung 7:** QAF-Analysemuster (ETDRS-, Delori- und QAF97-Muster). Das ETDRS-Muster besitzt eine fest definierte Größe (Ringdurchmesser 1, 3 und 6 mm). Im Gegensatz dazu ergeben sich die unterschiedlichen Segmentgrößen des Delori- und des QAF97-Analysemusters aus der Distanz zwischen der Fovea und dem Rand des Sehnervenkopfs (grüne Kreuze). Der Mittelwert der Intensitäten des gelb hinterlegten Bereichs des mittleren Bilds (entsprechend den Segmenten 9-16) stellt den QAF8-Analysebereich dar (Greenberg et al. 2013). Zur Erstellung des QAF97-Musters erfolgte eine Unterteilung der Segmente des Delori-Musters in jeweils 4 Subsegmente mit Ausnahme des zentralen fovealen Segments. Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

#### 2.4.6 Freihandanalyse-Tool

Mit dem Plugin *Freehandtool OCT* kann ein individuelles Polygon, das auffällige Netzhautbereiche umfasst, innerhalb eines oder mehrerer Netzhautbilder eingezeichnet werden (siehe *Abbildung 10*, Seite 39, *Abbildung 11*, Seite 43 und *Abbildung 13*, Seite 49). Da alle Bilder der verschiedenen Modalitäten registriert und gleich ausgerichtet sind, kann die genaue Position des Polygons von einer auf eine andere Modalität übertragen werden. Somit kann ein Polygon in einer Bildmodalität (z. B. Infrarotbild) eingezeichnet werden, die Messung aber in einer anderen Modalität (z. B. im QAF-Bild) vorgenommen werden.

Das Freihandwerkzeug bestimmt dabei in den QAF-Aufnahmen den mittleren QAF-Wert, die Standardabweichung, den Minimal- und den Maximalwert der QAF sowie die Anzahl der Pixel innerhalb des Polygons.

## 2.5 Berechnung der QAF

Die Berechnung der QAF-Intensitäten der Analysemuster und -bereiche erfolgte mit dem Plugin *Grids OCT*, die individuelle polygonale QAF-Bestimmung mit dem Plugin *Freehandtool OCT*. Dabei wurde folgende Formel verwendet (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013):

$$QAF = RCF \times \frac{GL_S - GL_0}{GL_R - GL_0} \times \left( \frac{SF}{SF_{em7,7}} \right)^2 \times \frac{T_{media.20}}{T_{media.age}}$$

**Formel 1:** Berechnung der QAF

*QAF*: Dimensionsloser Wert der quantitativen Autofluoreszenz, in Relation zu einem gesunden, emmetropen 20-jährigen Probanden (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

*RCF (Referenzkalibrierungsfaktor)*: Der RCF wurde bestimmt, indem das Aufnahmegerät mittels einer sogenannte Masterreferenz durch den Hersteller kalibriert wurde (Greenberg et al. 2013). Der RCF des verwendeten konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskops betrug 91,87.

*GL<sub>S</sub>*: Gemittelter Grauwert in der betrachteten retinalen Region des Probanden (Delori et al. 2011a).

*GL<sub>R</sub>*: Gemittelter Grauwert der internen Referenzprobe (Delori et al. 2011a).

*GL<sub>0</sub>*: Nulllevel des Grauwerts, der durch die Systemsoftware festgelegt wird. Das Signal wird außerhalb des sichtbaren Bilds mit ausgeschaltetem Laser und eingeschalteten Detektor gemessen (Delori et al. 2011a).

*SF (Skalierungsfaktor)*: Berechnet sich aus den Fokuseinstellungen des cSLOs und den C-Curve-Werten des Probanden und hat die Einheit retinale Millimeter pro Pixel (siehe 2.3.4, Seite 16). Er definiert also, welche retinale Fläche durch ein Bildpixel repräsentiert wird (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

$SF_{em7,7}$ : Skalierungsfaktor eines Emmetropen mit einem Hornhautradius (C-Curve) von 7,7 mm. Er beträgt 11,5  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ . (Delori et al. 2011b; Greenberg et al. 2013).

$T_{media.20}$ : Wert der Transmission für die optischen Medien eines gesunden 20-jährigen.

$T_{media.age}$ : Wert der Transmission für die altersentsprechenden optischen Medien des Probanden.

Folgende Anpassung der QAF-Werte an die altersabhängige Veränderung der optischen Medien wurden von *Delori et al.* und *Greenberg et al.* übernommen und bezieht sich auf eine Forschungsarbeit von *van de Kraats und van Norren* (van Norren und van de Kraats 2007; Delori et al. 2011a; Delori et al. 2011b; Greenberg et al. 2013):

$$\frac{T_{media.20}}{T_{media.age}} = 10^{5,56 \times 10^{-5} \times (age^2 - 400)}$$

**Formel 2:** Anpassung der QAF-Werte an die altersabhängige Veränderung der optischen Medien

Durch diesen Transmissionsfaktor kommt es zu folgenden ausgeprägten, nichtlinear zunehmenden Änderungen der QAF-Werte mit dem Lebensalter:

**Tabelle 2:** Änderung der QAF-Werte durch den Transmissionsfaktor mit zunehmendem Lebensalter

Beispielalter in Jahren	Änderungsfaktor
20	1,0
30	1,066
40	1,166
50	1,308
60	1,506
70	1,779

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics, Version 2019, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO, Version 2011, Redmond, WA, USA) durchgeführt.

Zur Überprüfung der Normalverteilung der QAF-Werte jeder Altersdekade wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test und ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Für die statistische Analyse wurden ein Levene-Test, eine einfaktorische Welch-ANOVA und ein Games-Howell post-hoc Test durchgeführt. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurde für eine Stichprobe jeder Altersdekade der Bland-Altman Koeffizient der Wiederholbarkeit bestimmt (siehe auch 3.2, Seite 33). Verwendet wurde die von *Delori und Kollegen* publizierte Formel (2011a):

$$\text{Repeatability} = \pm 1,96 \times \sigma_{\Delta QAF/\overline{QAF}} \times 100$$

**Formel 3:** Berechnung des Bland-Altman Koeffizienten der Wiederholbarkeit

$\sigma_{\Delta QAF/\overline{QAF}}$ : Standardabweichung des Verhältnis der Differenz ( $\Delta QAF$ ) und des Mittelwerts zweier QAF-Messungen ( $\overline{QAF}$ ) der unterschiedlichen Stichproben.

### 3 Ergebnisse

Von ursprünglich 123 an der Studie teilnehmenden Personen konnten 103 Probanden (*Tabelle 1*, Seite 12) eingeschlossen werden. Insgesamt wurden 20 Probanden aufgrund der folgenden Gründe aus der Studie ausgeschlossen: Pseudophakie des Studienauges (8), Netzhautveränderungen (5), ungenügende Bildqualität der Netzhautaufnahmen (3), unvollständiger Bilddatensatz (2), vorzeitiger Studienabbruch (1) und Unverträglichkeit gegenüber dem Mydriatikum (1).

Für alle eingeschlossenen 103 Probanden (siehe auch *Tabelle 1*, S. 12) wurden exakt ausgerichtete und überlagerte multimodale Bildstapel (QAF-, Fundusautofluoreszenz-, Infrarot-, Nahinfrarot- und rotfreien Aufnahmen sowie SD-OCT-Scans) erstellt (beispielhaft dargestellt in *Abbildung 6C*, Seite 21).

#### 3.1 Veränderung der QAF-Intensität mit steigendem Lebensalter

Für die QAF-Werte aller drei Analysebereiche (QAF8-Analysebereich, QAF97-Muster und QAF-Fovea-Segment, dem zentralen Segment des Delori- bzw. QAF97-Musters) zeigte sich in allen Altersdekaden eine Normalverteilung sowohl im Kolmogorov-Smirnov-Test als auch im Shapiro-Wilk-Test.

Bei allen verwendeten Analysebereichen (QAF8, QAF97-Muster, QAF-Fovea-Segment) stieg die QAF-Intensität mit zunehmendem Lebensalter an ( $p < 0,01$ ). Dabei kam es im QAF8-Analysebereich und im QAF97-Muster mit zunehmendem Lebensalter zwischen allen Altersdekaden zu einem Anstieg der QAF-Intensität. Im Bereich des Fovea-Segments konnte ebenfalls eine Zunahme der QAF-Intensität mit steigendem Lebensalter nachgewiesen werden, nur zwischen der 6. und 7. Lebensdekade konnte eine nicht-signifikante ( $p = 0,24$ ) Abnahme der durchschnittlichen QAF-Intensität um 8,4 QAF-Einheiten bzw. 6,9 % beobachtet werden (siehe *Abbildung 8B*, Seite 31 und *Tabelle 4*, Seite 32).

Interessanterweise zeigte sich in allen drei untersuchten Bereichen (QAF8, QAF97 und QAF-Fovea) ein verminderter Anstieg der QAF-Intensität sowohl zwischen der 4. und 5. Dekade als auch zwischen der 6. und 7. Dekade im

Vergleich zu den anderen Dekaden. Dadurch entstand jeweils ein Plateau der QAF-Intensität zwischen diesen Lebensdekaden (*Abbildung 8B*, Seite 31).

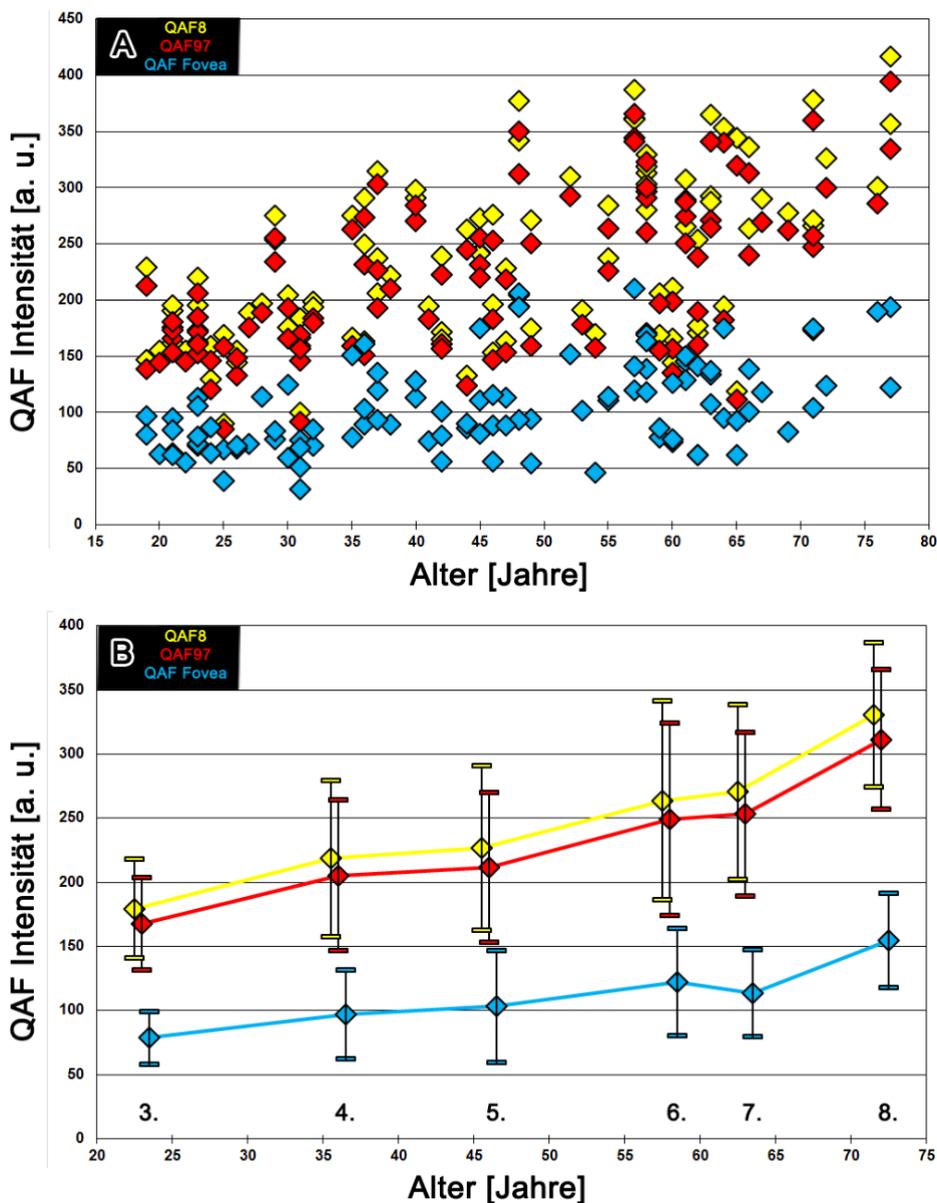
Im Levene-Test zeigte sich bei der Berechnung der Varianz ein signifikanter Unterschied. Bei nicht vorhandener Varianzhomogenität wurde daher eine Welch-ANOVA durchgeführt. Der anschließende Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der QAF-Intensität zwischen folgenden Altersdekaden in den jeweiligen Analysebereichen und -mustern:

**QAF8-Analysebereich und QAF97-Muster:**

- 3. Lebensdekade im Vergleich zur 6., 7. und 8. Lebensdekade
- 4. Lebensdekade im Vergleich zur 8. Lebensdekade
- 5. Lebensdekade im Vergleich zur 8. Lebensdekade

**QAF-Fovea-Segment:**

- 3. Lebensdekade im Vergleich zur 5., 6., 7. und 8. Lebensdekade
- 4. Lebensdekade im Vergleich zur 8. Lebensdekade
- 5. Lebensdekade im Vergleich zur 8. Lebensdekade



**Abbildung 8:** Mittlere QAF-Intensität des QAF8-Analysebereichs, des QAF97-Analysemusters und des QAF-Fovea-Segments **A:** für jeden Probanden und **B:** in den unterschiedlichen Altersdekaden ( $\pm$  Standardabweichung).

**A:** Die individuellen QAF-Werte der Studienteilnehmer zeigen in allen Analysemustern ausgeprägte interpersonelle Unterschiede, jedoch lässt sich ein Trend einer Zunahme der QAF-Intensität mit steigendem Lebensalter erkennen. **B:** Die mittlere QAF-Intensität der Altersdekaden nimmt mit steigendem Lebensalter in allen drei Analysebereichen zu. In allen Analysebereichen zeigt sich jedoch ein Plateau der QAF-Intensität zwischen der 4. und 5. und der 6. und 7. Lebensdekade. Als Wert des Alters (X-Achse) wurde das Durchschnittsalter der jeweiligen Lebensdekade verwendet (Tabelle 1, Seite 12). a. u.: arbitrary units, willkürliche Einheiten. Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

**Tabelle 3:** Mittelwerte der QAF-Intensität und Standardabweichungen der Analysebereiche der verschiedenen Altersdekaden. a. u.: arbitrary units, willkürliche Einheiten.

Dekade	3.	4.	5.	6.	7.	8.
<b>QAF8</b>	179,5 ± 38,8	218,6 ± 60,8	226,8 ± 64,4	263,6 ± 77,5	270,6 ± 68,1	330,9 ± 56,3
<b>QAF97</b>	167,8 ± 35,9	205,4 ± 59,0	211,6 ± 58,6	249,0 ± 74,8	253,1 ± 64,1	311,4 ± 54,3
<b>QAF Fovea</b>	78,7 ± 20,4	96,6 ± 34,6	103,1 ± 43,4	122,0 ± 41,8	113,6 ± 34,1	154,5 ± 36,7

**Tabelle 4:** Änderungen der QAF-Intensität in QAF-Einheiten und in Prozent zwischen den Lebensdekaden. a. u.: arbitrary units, willkürliche Einheiten.

Dekade	3. → 4.	4. → 5.	5. → 6.	6. → 7.	7. → 8.
<b>QAF8</b>	+ 39,1 (21,8%)	+ 8,2 (3,8%)	+ 36,8 (16,2%)	+ 7,0 (2,7%)	+ 60,3 (22,3%)
<b>QAF97</b>	+ 37,6 (22,4%)	+ 6,2 (3,0%)	+ 37,4 (17,7%)	+ 4,1 (1,6%)	+ 58,3 (18,7%)
<b>QAF Fovea</b>	+ 17,9 (22,7%)	+ 6,5 (6,7%)	+18,9 (18,3%)	- 8,4 (-6,9%)	+ 40,9 (26,5%)

Bei der Untersuchung der Veränderungen der QAF-Intensität zwischen den Lebensdekaden im Bereich des QAF8-Analysebereichs zeigte sich folgendes Ergebnis: Die größte absolute und relative Zunahme der mittleren QAF-Intensität zeigte sich mit 60,3 QAF-Einheiten, entsprechend 22,3 %, zwischen der 7. und 8. Lebensdekade. Die geringste Zunahme in absoluten Zahlen mit 7,0 QAF-Einheiten beziehungsweise 2,7 % wurde zwischen der 6. und 7. Lebensdekade gemessen.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung des QAF97-Musters. Mit 58,3 QAF-Einheiten fand sich die größte absolute Zunahme ebenfalls zwischen der 7. und 8. Lebensdekade. Zur größten relativen Zunahme kam es mit 22,4 % allerdings zwischen der 3. und 4. Lebensdekade. Die geringste absolute und relative Zunahme fand sich mit 4,1 QAF-Einheiten beziehungsweise 1,6 % zwischen der 6. und 7. Lebensdekade.

Wie auch im Bereich der QAF8 kam es zur größten absoluten und relativen Zunahme im Fovea-Segment mit 40,9 QAF-Einheiten, entsprechend 26,5 %, zwischen der 7. und 8. Lebensdekade. Im Gegensatz zu den beiden anderen Analysebereichen konnte im QAF-Fovea-Segment keine kontinuierliche Zunahme der QAF-Intensität nachgewiesen werden. So kam es zwischen der 6. und 7. Lebensdekade zu einer Abnahme um 8,4 QAF-Einheiten, beziehungsweise 6,9 %.

### **3.2 Reproduzierbarkeit der QAF-Intensitätsmessungen**

Um die Reproduzierbarkeit der QAF-Analysen zu überprüfen, wurde aus jeder Altersdekade eine Stichprobe von 5 Probanden ausgewählt. Dabei wurden zwei unabhängigen Aufnahmeserien des selben Tages durch den identischen Untersucher verglichen, zwischen denen eine Neueinstellung des Gerätes (inklusive erneuter Bildeinstellung, Fokussierung und Anpassung der Sensitivität des Detektors) erfolgte. Die durchschnittliche Abweichung der QAF-Intensität im QAF8-Analysebereich zwischen zwei Untersuchungen betrug 7,91 % (Median: 6,42 %) Die maximale Abweichung zwischen zwei Untersuchungen betrug 22,33 %, die minimale Abweichung 0,05 %.

Außerdem wurde der Bland-Altman Koeffizient der Wiederholbarkeit für diese Stichproben bestimmt. Diese Berechnung erfolgte mit der von *Delori et al.* veröffentlichten Formel und ergab einen Wert von 19,5 % (siehe auch *Formel 3*, Seite 28) (Delori et al. 2011a).

### **3.3 QAF-Standardretinakarten für verschiedene Altersdekaden**

Mit Hilfe des FIJI-Plugins *Add to Standardretina OCT* wurde für jede Altersdekade eine QAF-Standardretinakarte erstellt.

Die Standardretinakarten der Altersdekaden veranschaulichen den Anstieg der Fundusautofluoreszenz am gesamten hinteren Pol mit zunehmendem Alter (*Abbildung 9A*, Seite 36). Außerdem spiegeln sie die topografischen Unterschiede der QAF-Intensität und deren Entwicklung mit zunehmendem Lebensalter wider.

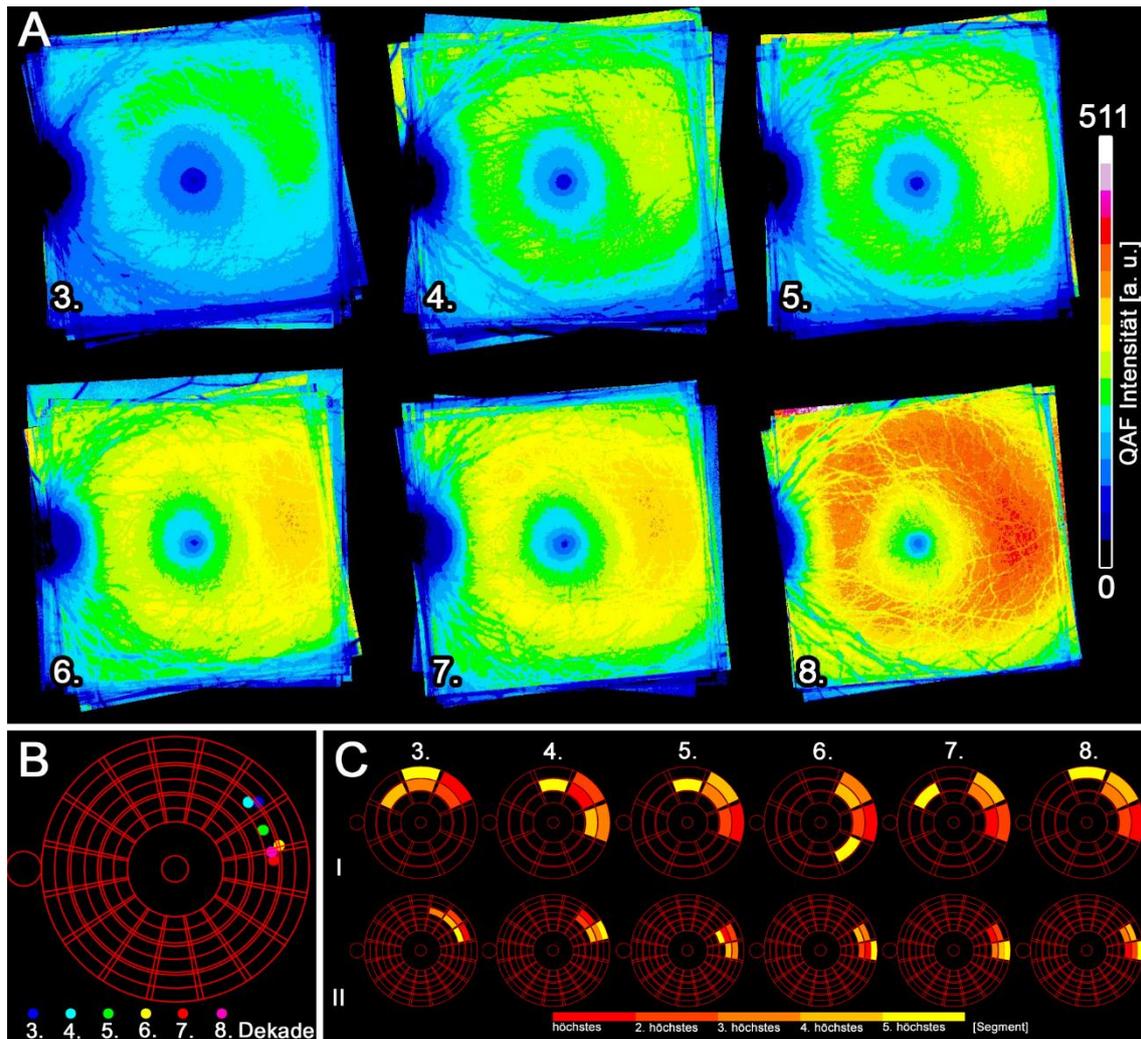
Das Fundusautofluoreszenzsignal der Fovea besaß ein niedrigeres Intensitätsniveau als die umgebende Para- und Perifovea, zeigte aber ebenfalls eine Zunahme der QAF-Intensität mit zunehmendem Lebensalter. Die höchste Intensität des Fundusautofluoreszenzsignals fand sich in allen Altersgruppen in einem ringförmigen perifovealen Bereich. Innerhalb dieses Rings zeigten sich regionale Unterschiede: so fand sich die höchste QAF-Intensität im temporalen bis temporal-superioren Bereich (*Abbildung 9A*, Seite 36).

Um diese Bereiche der höchsten QAF-Intensität im Detail zu untersuchen, wurden mit den Plugins *Grids Maxima* und *Grids Heat Map* für alle Altersdekaden jeweils das Pixel mit der maximalen QAF-Intensität (*Abbildung 9B*, Seite 36) und das Segment mit der höchsten QAF-Intensität innerhalb des Delori- und des QAF97-Musters bestimmt (*Abbildung 9C*, Seite 36).

Bei der Darstellung der Pixel mit den höchsten QAF-Intensitäten („Hotspots“) der einzelnen Altersdekaden zeigte sich, dass sich alle Hotspots innerhalb der perifovealen Region mit vergleichbarem Abstand zur Fovea befanden (*Abbildung 9B*, Seite 36). Interessanterweise zeigte sich mit zunehmendem Alter allerdings

eine Verlagerung der Hotspots von temporal-superior nach temporal (*Abbildung 9B*, Seite 36).

Zur Untersuchung der Segmente mit der höchsten QAF-Intensität im Delori-Muster und im QAF97-Muster der verschiedenen Altersdekaden wurden diese farbcodiert dargestellt (*Abbildung 9C*, Seite 36). Hierbei zeigte sich im Delori-Muster das Segment mit der höchsten QAF-Intensität in allen Altersdekaden im superior-temporalen Bereich. Mit steigendem Alter kam es jedoch, ebenso wie bei den QAF-Hotspots, zu einer Verlagerung von superior-temporal (3. und 4. Lebensdekade) nach temporal (5. bis 8. Dekade) (*Abbildung 9C, Reihe I*, Seite 36). Im QAF97-Muster ergab sich ein ähnliches Ergebnis, allerdings kann hier die Position und die Verlagerung der Segmente aufgrund der geringeren Größe der Einzelsegmente detaillierter nachvollzogen werden (*Abbildung 9C, Reihe II*, Seite 36).



**Abbildung 9:** **A:** Farbcodierte QAF-Standardretinakarten der sechs Altersdekaden, **B:** QAF-Hotspots der Altersdekaden **C:** Segmente mit der höchsten QAF-Intensität in den jeweiligen Altersdekaden.

**A:** Durch exakte Überlagerung einzelner QAF-Bilder wurde für jede Altersdekade eine farbcodierte QAF-Standardretinakarte erstellt. Diese zeigen mit zunehmendem Alter einen deutlichen Intensitätsanstieg der QAF, insbesondere im perifovealen Bereich. Im Bereich der Fovea kommt es zu einem weniger ausgeprägten Anstieg der Autofluoreszenzintensität. **B:** Darstellung der Pixel mit der höchsten QAF-Intensität („Hotspots“) für jede Altersdekade. Diese befinden sich alle in einem ähnlichen Abstand zur Fovea im temporal-superioren bis temporalen Bereich. Mit zunehmendem Alter zeigt sich eine Verlagerung des Hotspots von temporal-superior nach temporal. **C:** Analyse der Segmente mit den höchsten QAF-Intensitäten des Delori (I) - und QAF97 (II) -Musters für die sechs Altersdekaden. Die Segmente mit den fünf höchsten QAF-Werten für jede Lebensdekade wurden farblich visualisiert. a. u.: arbitrary units. Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

### **3.4 Anwendung der Analysetechniken an Beispielen**

Um die Unterschiede zu bereits etablierten Analysemethoden der QAF und die Vorteile zusätzlicher erweiterter Analysetechniken mittels FIJI-Plugins zu untersuchen und zu demonstrieren, wurden diese an klinischen Beispielen angewandt. Verwendet wurde das neue QAF97-Anlysemuster, das mit dem etablierten Delori-Muster verglichen wurde (siehe *Abbildung 6*, Seite 21). In Bereichen von Netzhautpathologien erfolgten außerdem individuelle Messungen der QAF-Intensität mittels Freihandtool. Im *Patientenbeispiel 3* wurde die QAF-Intensität zudem mittels Vergleichskarte zur altersentsprechenden Kohorte dargestellt.

#### **3.4.1 Anwendungsbeispiel 1**

Der 87-jährige, pseudophake Patient im ersten Anwendungsbeispiel leidet an einer fortgeschrittenen nicht-exsudativen altersbedingten Makuladegeneration mit geografischer Atrophie und wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Zwischen den beiden Untersuchungen liegt ein zeitlicher Abstand von 9 Monaten. Während dieses Zeitraums zeigte sich eine Progression der geografischen Atrophie. Da beide QAF-Untersuchungen (Baseline- und Follow-Up-Untersuchung) in einem Bildstapel registriert wurden, sind exakte individuelle QAF-Untersuchungen auch vergleichend zwischen diesen beiden Untersuchungszeitpunkten möglich.

Anhand dieses Beispiels kann der Vorteil eines subsegmentierten Analysemodells demonstriert werden. Das Delori-Muster (*Abbildung 10A, B*, Seite 39) und das QAF97-Muster (*Abbildung 10C, D*, Seite 39) umfassen den gleichen Analysebereich des hinteren Pols, jedoch ermöglicht die Subsegmentierung des QAF97-Musters detailliertere Darstellungen und Analysen der QAF-Intensitäten. Insbesondere bei eher kleineren pathologischen Bereichen und bei Zunahme von Atrophiezonen in Übergangsbereichen zeigen sich Vorteile.

Die Werte der QAF-Intensitäten des Delori-Musters können das veränderte Autofluoreszenzsignal in manchen Segmenten nur eingeschränkt widerspiegeln

(Tabelle 5, Seite 40). Ein Hauptgrund hierfür scheint die Größe der Segmente und die Mittelung der QAF-Intensität zu sein, wodurch Veränderungen der QAF-Intensitäten in kleinen Netzhautbereichen die gesamte QAF-Intensität des Segments kaum beeinflussen (hervorgehobene Segmente Nr. 1-4 (orange) in *Abbildung 10A, B*, Seite 39).

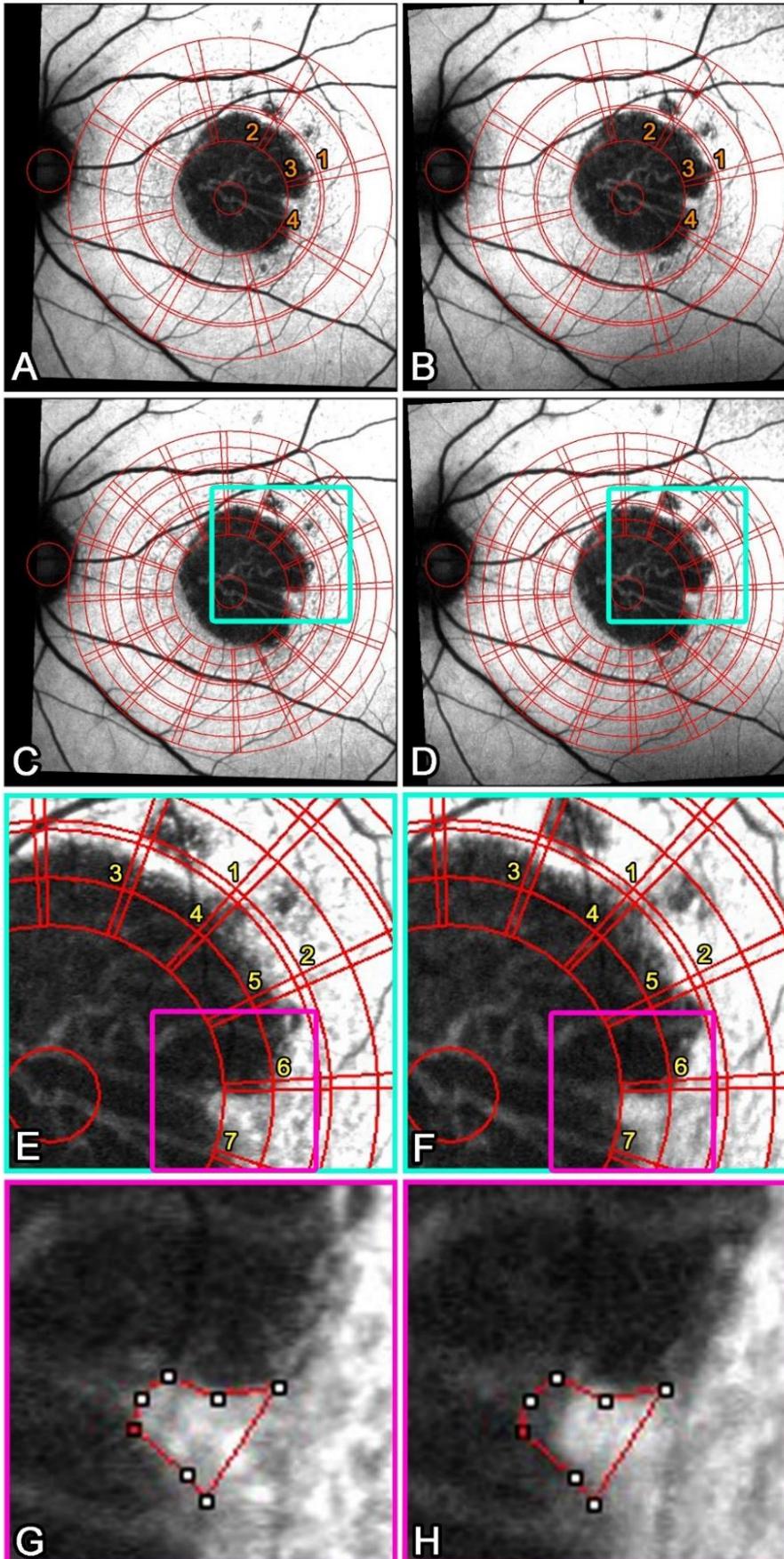
Aufgrund der bereits in der Baseline-Untersuchung ausgeprägten retinalen Veränderungen innerhalb der deutlich größeren Segmente des Delori-Musters, erscheinen die Veränderungen zur Follow-Up-Untersuchung nach 9 Monaten weniger ausgeprägt als im subsegmentieren QAF97-Muster (*Abbildung 10 C-F*, Seite 39). So kommt es bei Betrachtung der Segmente des Delori-Musters in diesem Bereich zu einer Reduktion der QAF-Intensität zwischen -2,12% und -13,52%. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Betrachtung der Segmente des QAF97-Musters in diesem Bereich eine deutlich größere Bandbreite der Veränderungen der QAF-Intensität: So werden Abnahmen der QAF-Intensität zwischen -0,05% und bis zu -19,89% gemessen (*Tabelle 5*, Seite 40). Die Werte der QAF-Intensität der kleineren Segmente des QAF97-Musters können die Zunahme der Atrophiezone sowie die Verlagerung der Übergangszone also differenzierter widerspiegeln.

Neben den oben genannten detaillierteren Untersuchungen der QAF-Intensität mittels QAF97-Analysenmuster ermöglicht die Verwendung des Freihandtools (Plugin *Freehandtool OCT*) zusätzlich die Bestimmung der QAF-Intensität in individuellen Messbereichen und einen Vergleich in diesem Bereich zwischen Baseline- und Follow-Up-Untersuchung (*Abbildung 10G, H*, Seite 39 und *Tabelle 5*, Seite 40).

In diesem Beispiel kommt es im Analysebereich des Freihandtools zu einer Vergrößerung der geografischen Atrophie, die mit einer Abnahme der QAF-Intensität um 10,26% einhergeht. Die Änderung der QAF-Intensität des korrespondierenden Analysesegments des QAF97-Musters unterscheidet sich von der individuellen Freihandanalyse und zeigt lediglich eine Abnahme der QAF-Intensität um 6,54% (siehe *Tabelle 5*, Gelb 7, Seite 40).

Baseline

Follow-Up



**Abbildung 10:** Patientenbeispiel 1.

Vergleich der Analyse der QAF-Intensität mittels Delori-Muster, QAF97-Muster und Freihandtool. Baseline-Untersuchung mit Follow-Up-Untersuchung nach 9 Monaten (QAF-Werte siehe Tabelle 5).

Gezeigt sind die QAF-Aufnahmen eines 87-jährigen, pseudophaken Patienten mit geografischer Atrophie zu Studienbeginn und bei Folgeuntersuchung neun Monaten später, bei der es zu einer Vergrößerung der Atrophiezone gekommen ist. Bei Verwendung der Segmente des Delori-Musters (**A, B**) kann im Vergleich zum QAF97-Muster (**C, D, E, F**) die Größenzunahme der geografischen Atrophie weniger detailliert dargestellt werden (siehe QAF-Werte in Tabelle 5). Das Freihandtool (**G, H**) ermöglicht zusätzlich die individuelle Analyse auffälliger Netzhautbereiche unabhängig von starren Analysemustern. Aus Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

**Tabelle 5:** QAF-Intensitäten  $\pm$  Standardabweichung für einzelne Segmente unter Verwendung des Delori- und QAF97-Musters und des Freihandtools in Anwendungsbeispiel 1 (siehe Abbildung 10). a. u.: arbitrary units; willkürliche Einheiten. Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

Segment	Baseline QAF Intensität [a. u.]	Follow-Up (nach 9 Monaten) QAF Intensität [a. u.], (prozentuale Änderung)
Orange 1	254,2 $\pm$ 51,7	248,8 $\pm$ 53,8 (-2,12%)
Orange 2	92,7 $\pm$ 68,0	86,2 $\pm$ 58,9 (-7,01%)
Orange 3	93,2 $\pm$ 62,6	80,6 $\pm$ 53,4 (-13,52%)
Orange 4	173,5 $\pm$ 62,0	154,8 $\pm$ 59,4 (-10,78%)
Gelb 1	200,0 $\pm$ 76,6	194,2 $\pm$ 86,6 (-2,90%)
Gelb 2	218,1 $\pm$ 60,1	216,8 $\pm$ 75,4 (-0,05%)
Gelb 3	107,1 $\pm$ 69,4	95,3 $\pm$ 54,1 (-11,02%)
Gelb 4	127,3 $\pm$ 77,8	113,3 $\pm$ 74,4 (-11,00%)
Gelb 5	136,0 $\pm$ 65,0	119,5 $\pm$ 66,3 (-12,13%)
Gelb 6	158,9 $\pm$ 73,1	127,3 $\pm$ 71,6 (-19,89%)
Gelb 7	165,2 $\pm$ 36,7	154,4 $\pm$ 38,8 (-6,54%)
Freihandtool	163,8 $\pm$ 39,6	147,0 $\pm$ 51,1 (-10,26%)
QAF8	229,3 $\pm$ 19,4	224,6 $\pm$ 38,2 (-2,05%)
QAF97	205,4 $\pm$ 59,4	197,8 $\pm$ 64,5 (-3,70%)

### 3.4.2 Anwendungsbeispiel 2

Das zweite Anwendungsbeispiel zeigt eine 82-jährige, pseudophake Patientin mit zunächst nicht-exsudativer altersbedingter Makuladegeneration. 22 Monate nach der Baseline-Untersuchung kam es zur Entwicklung von chorioidalen Neovaskularisationen (*Abbildung 11*, Seite 43).

Bei der Follow-Up-Untersuchung zeigte sich perifoveal eine erhöhte Autofluoreszenzintensität im Vergleich zur Baseline-Untersuchung. Die betroffenen Bereiche des Delori-Musters (Segmente Nr. 1-4 (orange) in *Abbildung 11*, Seite 43) sind nicht Bestandteil des etablierten QAF8-Analysbereichs (siehe auch *Abbildung 7*, Seite 25). Daher würde bei der alleinigen Betrachtung der QAF-Intensität der QAF8 die ausgeprägte parafoveale Zunahme der Autofluoreszenz übersehen werden. So kam es im Bereich der QAF8 zu einer Abnahme der QAF-Intensität um 12,05 %, während es im Gegensatz dazu in den betroffenen Segmenten zu einer Zunahme der QAF-Intensität von bis zu 23,97% kam (Orange 1-4 in *Tabelle 6*, Seite 45).

Das QAF97-Muster umfasst ebenso wie das Delori-Muster die betroffenen Bereiche und ermöglicht zusätzlich einen detaillierteren Vergleich der QAF-Intensität zwischen den beiden Untersuchungen (siehe hervorgehobene Segmente Nr. 1-9 (gelb), *Abbildung 11*, Seite 43). In den QAF97-Segmenten war ebenfalls eine deutliche Zunahme der QAF-Intensität detektierbar, jedoch war die Bandbreite der Veränderungen der QAF-Intensität größer als im Delori-Analysemuster. Die Veränderungen im Bereich des QAF97-Musters betragen zwischen - 5,16% und + 31,73%, während sie beim Delori-Muster zwischen + 0,90% und + 23,97 % lagen. So wird mittels QAF97-Muster eine detailliertere Betrachtung der Intensitätsänderungen ermöglicht (*Tabelle 6*, Seite 45).

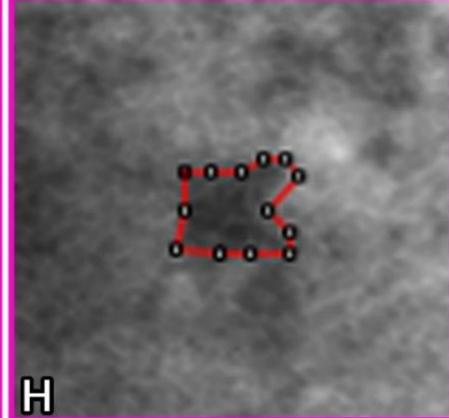
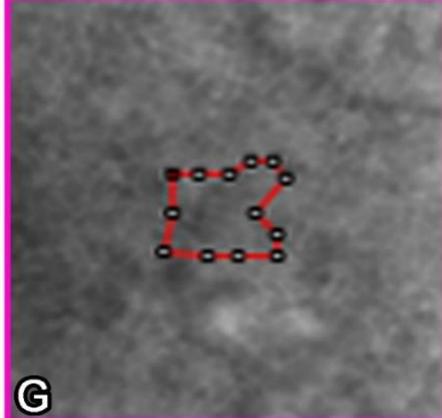
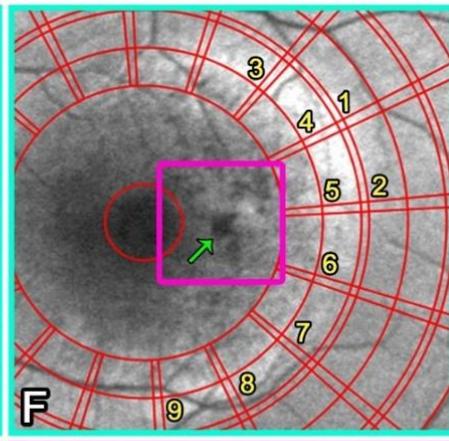
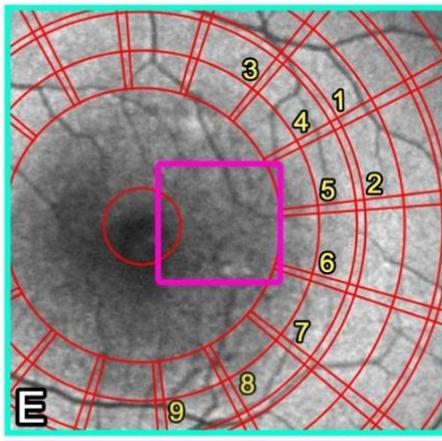
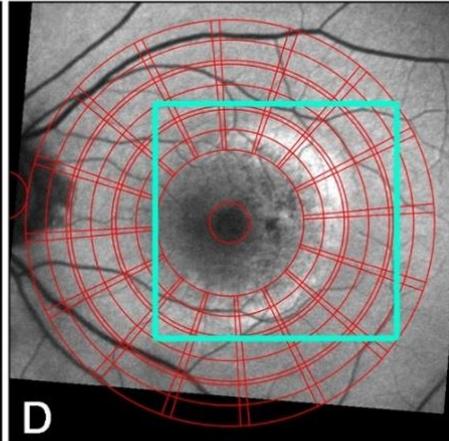
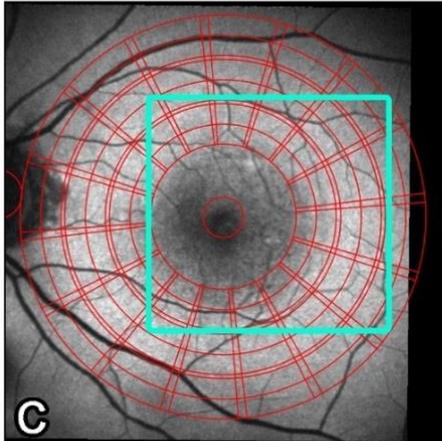
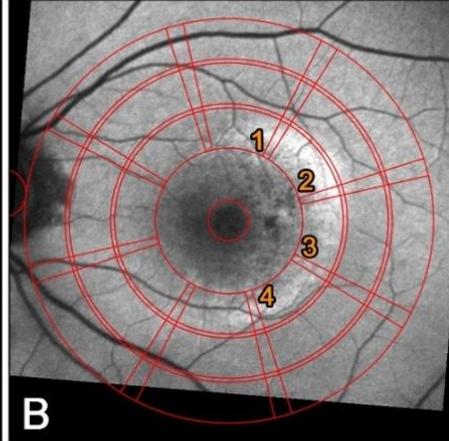
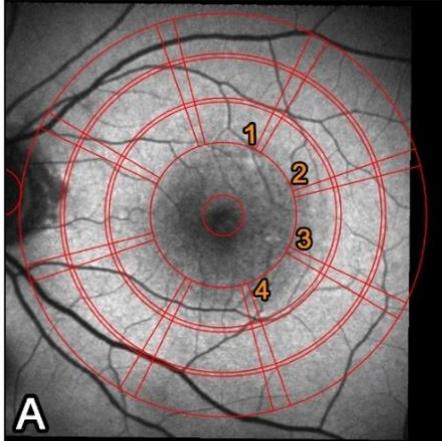
Die Verwendung eines Freihandwerkzeugs ermöglichte außerdem die zusätzliche Analyse von Bereichen außerhalb der starren, standardisierten QAF-Analysemuster (*Abbildung 11E-H*, Seite 43). Durch die individuelle Auswahl und Untersuchung des markierten Bereichs konnte in diesem Beispiel eine Abnahme der QAF-Intensität um 27,68 % im Vergleich zur Baseline-Untersuchung

nachgewiesen werden, wohingegen sie durch das Delori- und QAF97-Muster nicht erfasst worden wäre (*Abbildung 11C-F*, Seite 43 und *Tabelle 6*, Seite 45).

Da alle Bilder der multimodalen Bildstapel mittels SD-OCT registriert wurden, konnten auffällige Netzhautbereiche zusätzlich auch mit Hilfe der dazugehörigen B-Scan-Aufnahmen untersucht werden. In diesem Beispiel zeigte sich im hyperautofluoreszenten Bereich ein Verlust der für Photorezeptoren typischen Reflexionsbänder und im Bereich der Hypoautofluoreszenz ein Verlust von RPE-Zellen (*Abbildung 12*, Seite 46).

# Baseline

# Follow-Up



**Abbildung 11: Patientenbeispiel 2.**

Vergleich der Analyse der QAF-Intensität mittels Delori-Muster, QAF97-Muster und Freihandtool. Baseline-Untersuchung und Follow-Up-Untersuchung nach 22 Monaten.

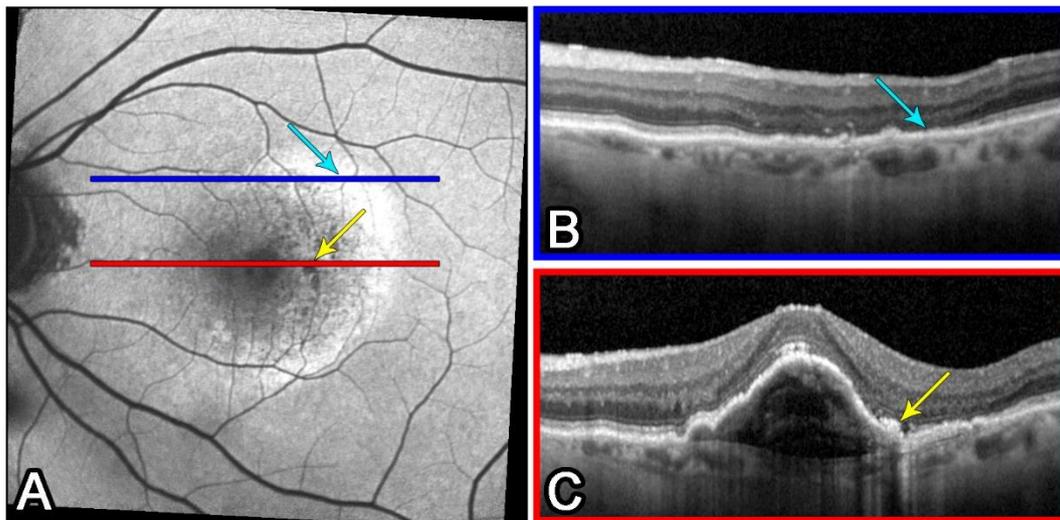
82-jährige, pseudophake Patientin mit zunächst nicht-exsudativer Makulopathie zu Studienbeginn (**A, C, E, G**) und nach Entwicklung einer neovaskulärer Makulopathie nach 22 Monaten (**B, D, F, H**).

Zwischen dem Ausgangswert und dem Follow-Up ist ein deutlicher Anstieg der Autofluoreszenzintensität im Bereich der temporalen Perifovea erkennbar. Dieser Bereich umfasst vor allem die Segmente mit orangenen Zahlen des Delori-Musters (**A, B**), die allerdings nicht Bestandteil des QAF8-Analysebereichs sind. Denn der Analysebereich der QAF8 umfasst lediglich die acht Segmente des mittleren Rings des Delori-Musters und würde diese Autofluoreszenzänderungen nicht erfassen (siehe auch Abbildung 7, Seite 25). Im Vergleich dazu ermöglicht das QAF97-Muster (**C, D**) eine detailliertere Analyse des betroffenen Bereichs (**E, F**, Segmente mit gelben Zahlen; Tabelle 6, Seite 45).

Darüber hinaus ist im Bereich der Parafovea im Follow-Up ein Bereich mit verminderter Autofluoreszenz sichtbar, der zu Studienbeginn noch nicht existierte (grüner Pfeil). Dieser Bereich wurde mit dem Freihandwerkzeug (**G, H** als Bildausschnitte von **E, F**) individuell analysiert, sodass die ermittelten QAF-Intensitätsveränderung verglichen werden können (Tabelle 6, Seite 45). Diese Veränderung würde bei der alleinigen Analyse sowohl mittels QAF97- als auch Delori-Muster nicht berücksichtigt werden.

**Tabelle 6:** QAF-Intensitäten  $\pm$  Standardabweichung einzelner Segmente unter Verwendung des Delori-Musters, QAF97-Musters, des Freihandtools und des QAF8-Analysebereichs des Patientenbeispiels 2 (siehe Abbildung 11, Seite 43). a. u.: arbitrary units; willkürliche Einheiten.

Segment	Baseline QAF Intensität [a. u.]	Follow-Up (nach 22 Monaten) QAF Intensität [a. u.], (prozentuale Änderung)
Orange 1	166,7 $\pm$ 18,9	168,2 $\pm$ 26,6 (+0,90 %)
Orange 2	169,4 $\pm$ 19,5	210,0 $\pm$ 34,3 (+23,97%)
Orange 3	163,4 $\pm$ 23,8	178,8 $\pm$ 24,4 (+9,42%)
Orange 4	149,5 $\pm$ 28,3	161,7 $\pm$ 24,8 (+8,16%)
Gelb 1	179,4 $\pm$ 11,4	211,2 $\pm$ 23,2 (+17,73%)
Gelb 2	174,3 $\pm$ 20,1	229,6 $\pm$ 26,9 (+31,73%)
Gelb 3	176,8 $\pm$ 17,1	227,9 $\pm$ 23,3 (+28,90%)
Gelb 4	178,3 $\pm$ 15,7	188,9 $\pm$ 17,0 (+5,95%)
Gelb 5	176,4 $\pm$ 19,6	167,3 $\pm$ 16,0 (-5,16%)
Gelb 6	165,0 $\pm$ 19,9	161,5 $\pm$ 27,5 (-2,12%)
Gelb 7	147,6 $\pm$ 32,5	158,5 $\pm$ 31,6 (+7,38%)
Gelb 8	171,3 $\pm$ 26,0	189,4 $\pm$ 25,4 (+10,57%)
Gelb 9	181,3 $\pm$ 16,6	186,9 $\pm$ 18,0 (+3,09%)
Freihandtool	95,0 $\pm$ 10,8	68,7 $\pm$ 16,6 (-27,68%)
QAF8	176,8 $\pm$ 14,7	155,5 $\pm$ 14,4 (-12,05%)
QAF97	154,8 $\pm$ 30,9	150,7 $\pm$ 29,5 (-2,65%)



**Abbildung 12:** Autofluoreszenzbild (A) der Follow-Up-Untersuchung und B-Scans der SD-OCT (B, C) des Patientenbeispiels 2 aus Abbildung 11, Seite 43.

Die Pfeile weisen auf Bereiche mit Hyper- (hellblauer Pfeil) bzw. Hypoautofluoreszenz (gelber Pfeil). Im SD-OCT-Scan wird deutlich, dass die gesteigerte Fundusautofluoreszenz im parafovealen Bereich mit einer Reduktion der für Photorezeptoren typischen Reflexionsbändern einhergeht (B, hellblauer Pfeil). Der Bereich der Hypoautofluoreszenz (C, gelber Pfeil) entspricht dem markierten Bereich aus Abbildung 11H, Seite 43. In diesem Bereich zeigt sich ein Befund, der vereinbar mit einem RPE-Zellverlust ist (C, gelber Pfeil), mit daraus resultierender verminderter Autofluoreszenzintensität im Fundusautofluoreszenzbild (A).

### 3.4.3 Anwendungsbeispiel 3

Das Patientenbeispiel zeigt einen 65-jährigen, phaken Patienten mit Morbus Stargardt (*Abbildung 13*, Seite 49) mit zahlreichen Veränderungen der Fundusautofluoreszenz. Es zeigen sich Bereiche mit einer perifovealen generalisierten Hyperautofluoreszenz, einer zentralen Atrophiezone sowie perifovealen hyper- und hypoautofluoreszenten Arealen.

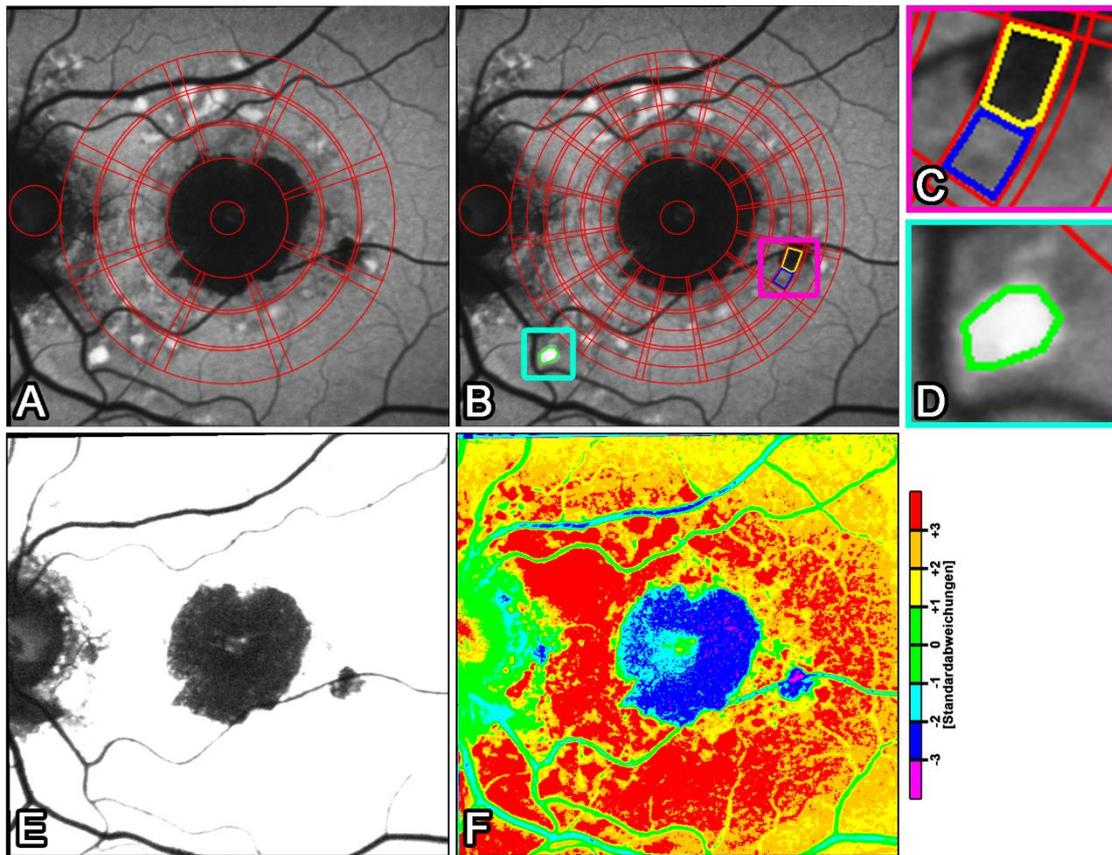
Bei der reinen Auswertung des Analysebereichs der QAF8, (siehe *Abbildung 7* Seite 25), würde ein Großteil dieser Autofluoreszenzveränderungen nicht erfasst werden. So würde die zentraler gelegene Atrophiezone beispielsweise gar nicht berücksichtigt werden. Außerdem würden perifoveale Veränderungen, wie hyperautofluoreszente Spots und kleine Atrophiezonen durch die Mittelung der QAF-Intensität der 8 Segmente des QAF8-Analysebereichs kaum ins Gewicht fallen. So fällt bei der Untersuchung des QAF8-Analysebereichs nur eine stark erhöhte Autofluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Patient:  $518,1 \pm 67,1$  QAF-Einheiten vs. Kontrollgruppe:  $270,6 \pm 68,1$  QAF-Einheiten). Die ausgeprägte Heterogenität der QAF-Intensität innerhalb dieses Bereichs wird durch diesen Wert nicht widerspiegelt.

Das Freihandtool wird in diesem Beispiel unter anderem im Bereich eines QAF97-Segments verwendet (*Abbildung 13B, C*, Seite 49). Bei der reinen Betrachtung des QAF-Werts dieses Segments zeigt sich im Vergleich zur zugehörigen gesunden Vergleichsgruppe interessanterweise ein unauffälliger QAF-Wert (QAF-Wert des Patienten:  $277,4 \pm 166,8$  QAF-Einheiten; QAF-Wert der Kontrollgruppe:  $282,2 \pm 9,4$  QAF-Einheiten, siehe auch Bildbeschreibung *Abbildung 13*, Seite 49). Da sich genau im Bereich dieses Segments sowohl der Bereich einer hypoautofluoreszenten Atrophiezone als auch der Bereich eines hyperautofluoreszenten Spots befinden, ergibt sich in diesem Segment ein im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe unauffälliger Wert der QAF-Intensität.

Insbesondere wenn man das altersangepasste QAF-Bild betrachtet, zeigt sich in diesem Patientenbeispiel jedoch eine generalisierte perifoveale Hyperautofluoreszenz mit Aussparung der zentralen Atrophiezone (*Abbildung*

13E, Seite 49). Diese generalisierte Hyperautofluoreszenz ist typisch für Patienten mit Morbus Stargardt (Burke et al. 2014).

Besonders deutlich wird die gesteigerte Autofluoreszenzintensität im Vergleich zur altersentsprechenden Standardretinakarte (*Abbildung 13F*, Seite 49). So kommt es in der Vergleichskarte perifoveal zu erhöhten Autofluoreszenzintensitäten, die zum Teil um mehr als 3 Standardabweichungen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht sind. Im Gegensatz dazu zeigt sich im Bereich der zentralen Atrophiezone eine ausgeprägte Verminderung der Fundusautofluoreszenz, die teilweise mehr als drei Standardabweichungen im Vergleich zur Standardretinakarte beträgt. Mit Hilfe der Vergleichskarte ist eine übersichtliche Darstellung der Abweichungen der QAF-Intensität und der in diesem Beispiel ausgeprägten Heterogenität der QAF-Intensität im Vergleich zur Kontrollgruppe möglich.



**Abbildung 13:** Patientenbeispiel 3.

Vergleich der QAF-Intensität mittels Delori-Muster, QAF97-Muster, Freihandtool und Darstellung der QAF-Intensität im Vergleich zur Standardretinakarte.

Dieser 65-jährige, phake Patient mit Morbus Stargardt weist ausgeprägte Autofluoreszenzveränderungen auf: es zeigt sich eine zentrale Atrophiezone umgeben von einer generalisierten perifovealen Hyperautofluoreszenz mit hypo- und hyperautofluoreszierenden Spots (A, B, C, D). Zur Bestimmung der QAF wurden das Delori- (A) und QAF97-Muster (B) verwendet. Zudem wurden individuelle Analysen mit dem Freihandtool durchgeführt (pinkes und zyanes Quadrat in B mit Vergrößerung in C und D). In C befindet sich ein Segment mit einer Atrophiezone (gelb, QAF-Wert:  $103,82 \pm 30,00$  QAF-Einheiten; Pixelanzahl: 784) neben einem Bereich mit zunächst unauffälligem Erscheinungsbild (blau, QAF-Wert:  $434,71 \pm 52,84$  QAF-Einheiten; Pixelanzahl: 829). Beide Bereiche haben eine vergleichbare Größe (siehe Pixelanzahl). Überraschenderweise ist die Autofluoreszenzintensität des gesamten Segments nahezu identisch mit der Autofluoreszenzintensität dieses Segments der altersentsprechenden gesunden Standardretinakarte (QAF-Wert des Patienten:  $277,4 \pm 166,8$  QAF-Einheiten; QAF-Wert der Standardretinakarte:  $282,2 \pm 9,4$  QAF-Einheiten). (D) Bereich mit ausgeprägter Hyperautofluoreszenz (grün, QAF-Wert:  $961,8 \pm 111,8$  QAF-Einheiten, Pixelanzahl 692). Beim Vergleich der QAF8-Werte zwischen dem Patienten und der gesunden Kontrollgruppe zeigt sich

jedoch insgesamt eine deutliche Steigerung der QAF-Intensität. (QAF8 des Patienten:  $518,1 \pm 67,1$  QAF-Einheiten; Kontrollgruppe:  $270,6 \pm 68,1$  QAF-Einheiten). **(E)** Altersangepasstes QAF-Bild, in dem die Unterscheidung von einzelnen hyperautofluoreszenten Bereichen aufgrund der insgesamt stark erhöhten Autofluoreszenz nicht mehr möglich ist. **(F)** Differenzkarte, die den Unterschied der QAF-Werte für jedes Pixel in Standardabweichungen zur altersangepassten Standardretinakarte gesunder Probanden darstellt. Bei diesem Stargardt-Patienten zeigen sich Unterschiede von mehr als  $\pm 3$  Standardabweichungen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Alle QAF-Werte wurden unter Verwendung des QAF-Bilds gemessen, Fundusautofluoreszenzbilder **(A-D)** wurden nur zur besseren Demonstration der Pathologien verwendet. Modifiziert nach Kleefeldt et al. (2020). Mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit erfolgte die Erstellung multimodaler Netzhautaufnahmen (einschließlich QAF-, Fundusautofluoreszenz-, Infrarot-Nahinfrarot- und rotfreien Aufnahmen und SD-OCT) gesunder erwachsener Probanden. Diese Aufnahmen wurden anschließend mittels SD-OCT-basierter Ausrichtung, Drehung und Skalierung exakt übereinander gelagert, um für jeden Probanden einen multimodalen Bildstapel zu erstellen, der die Vorteile der unterschiedlichen Aufnahmemodalitäten vereint (beispielhaft gezeigt in *Abbildung 6C*, Seite 21).

Basierend auf den individuellen QAF-Aufnahmen wurde jeweils eine QAF-Standardretinakarte für jede Altersdekade erstellt, die die Topografie der QAF-Intensität am hinteren Pol widerspiegelt und als Basis für Vergleiche mittels Differenzkarten dienen kann (*Abbildung 9A*, Seite 36). In Form einer Differenzkarte wurde dann beispielhaft ein Vergleich der QAF-Intensität eines Patienten mit Morbus Stargardt zur gesunden, altersentsprechenden Kohorte dargestellt (*Abbildung 13F*, Seite 49). Außerdem wurden basierend auf diesen QAF-Standardretinakarten Autofluoreszenz-Hot-Spot-Karten der unterschiedlichen Altersdekaden erstellt und analysiert (*Abbildung 9B*, Seite 36).

Neben den etablierten Analysemustern der QAF (ETDRS-Muster (Reiter et al. 2019b) und Delori-Muster (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013)) wurde das subsegmentierte QAF97-Anlysemuster zur detaillierten individuellen Messung und Beurteilung der QAF neu eingeführt (*Abbildung 7*, Seite 25). Es zeigte insbesondere bei der Detektion und Analyse von kleinen Netzhautpathologien Vorteile im Vergleich zu den etablierten Analysemustern (3.4.1, Seite 37, 3.4.2, Seite 41 und 3.4.3, Seite 47). Zusätzlich wurde zur individuellen, musterunabhängigen Analyse der QAF-Intensität ein Freihandtool eingeführt und angewandt (3.4.1, Seite 37, 3.4.2, Seite 41 und 3.4.3, Seite 47).

## 4.2 Multimodale Bildstapel und Bildregistrierung

Verschiedene retinale Aufnahmemodalitäten eignen sich unterschiedlich gut zur Darstellung und Analyse bestimmter Strukturen und Netzhautpathologien (Keilhauer und Delori 2006; Reznicek et al. 2014; Venkatesh et al. 2015; Ajaz und Kumar 2020; Vaz-Pereira et al. 2020). Daher sind zur Beurteilung von Netzhauterkrankungen multimodale Analysetechniken wünschenswert, mit der sich die Informationen und Vorteile der einzelnen Bildmodalitäten verbinden lassen.

Voraussetzung für die vergleichende Analyse umschriebener retinaler Bereiche ist allerdings eine einheitliche Registrierung und Überlagerung der unterschiedlichen Bildmodalitäten, da sich diese Bilder in Bezug auf Skalierung und Ausrichtung oftmals leicht unterscheiden. So können multimodale Bildstapel mit exakt überlagerten Einzelbildern aller Bildmodalitäten erstellt werden. Dabei kann zwischen der Ansicht dieser Einzelbilder softwarebasiert (beispielsweise mittels FIJI, *Abbildung 6C*, Seite 21) einfach gewechselt werden (Schindelin et al. 2012).

Diese exakte Überlagerung zur Struktur-Funktions-Analyse ist vor allem bei der individuellen Analyse der QAF-Intensität wünschenswert. Nur so können die Daten der quantitativen Autofluoreszenz mit Erkenntnissen anderer Bildmodalitäten verbunden werden und die Vorteile der unterschiedlichen Modalitäten zur Erkennung und Beurteilung von retinalen Pathologien genutzt werden.

Ein weiterer Vorteil eines individuellen multimodalen Bildstapels mit gleich ausgerichteten und skalierten Aufnahmen der verschiedenen Bildmodalitäten ist die Möglichkeit der nachträglichen Erweiterung. Dabei können zusätzliche Bilder anderer Modalitäten (z. B. anderer Autofluoreszenzmodalitäten) oder von Nachuntersuchungen jederzeit hinzugefügt werden. Dies wurde in dieser Studie beispielhaft an Patientenbeispiel 1 und 2 dargestellt. Bei beiden Patienten wurde der Bildstapel um Bilder der Follow-Up-Untersuchungen ergänzt. So sind Vergleiche zwischen zwei Untersuchungszeitpunkten möglich (*Abbildung 10*, Seite 39 und *Abbildung 11*, Seite 43).

Es wurden bereits unterschiedliche Verfahren für die Registrierung der Bildorientierung von Netzhautaufnahmen beschrieben. Beispiele hierfür sind die automatisierte Erkennung von retinalen Gefäßbifurkationen (Chaudhry et al. 2013) und die Berechnung des Winkels zwischen Gefäßen (Laliberté et al. 2003). Andere Autoren verwendeten eine automatische Erkennung von Netzhautgefäßen, um Gefäßstrukturdiagramme zu erstellen, gefolgt von einem Diagrammabgleich der entsprechenden Netzhautbilder (Deng et al. 2010). Die sphärische Darstellung des Auges und die Registrierung in einem 3D-Modell (Lim et al. 2015; Hernandez-Matas et al. 2017) sind weitere Optionen.

Die in dieser Arbeit verwendete Registrierungsmethode basiert auf einer manuellen Auswahl von zwei Kontrollpunkten (retinale Gefäßbifurkationen) in allen Bildmodalitäten (Ryan et al. 2004). Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, da es sich hierbei um eine genaue und einfach umsetzbare Registrierungsmethode handelt. Ein Nachteil dieser Methode ist der relativ große zeitliche Aufwand, der für die individuelle Registrierung aller Bildmodalitäten (und gegebenenfalls der Follow-Up-Untersuchungen) benötigt wird. Eine softwareunterstützte Bildregistrierung ist schneller, sollte jedoch immer noch überprüft werden, um mögliche Registrierungsfehler zu vermeiden, da insbesondere bei schlechter Aufnahmequalität eine automatische Bildregistrierung fehleranfällig ist (Deng et al. 2010).

Multimodale Bildgebungsverfahren im Rahmen von Studien zur QAF wurden teilweise bereits von anderen Arbeitsgruppen angewandt (Duncker et al. 2014; Lima de Carvalho et al. 2019), vor allem bei Untersuchungen zu Morbus Best. Bei diesen Untersuchungen wurden neben der QAF-Bildgebung auch Aufnahmen mittels SD-OCT, Nahinfrarotautofluoreszenz (Lima de Carvalho et al. 2019) und Fundusfotoaufnahmen durchgeführt (Duncker et al. 2014). In den Untersuchungen von *Lima de Carvalho et al.* wurden Nahinfrarotautofluoreszenzaufnahmen zur Beurteilung der Läsionen verwendet und mit den QAF-Intensitäten der QAF-Aufnahmen verglichen. Hierbei konnte im Bereich von vitelliformen Läsionen in beiden Modalitäten ein reduziertes Autofluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Auch eine Bildregistrierung der Bildmodalitäten wurde in beiden Forschungsarbeiten durchgeführt, jedoch ohne

das genaue Verfahren zu nennen oder zu erläutern (Duncker et al. 2014; Lima de Carvalho et al. 2019). Die Vorteile einer multimodalen Bildgebung bei Netzhauterkrankungen konnten bestätigt werden, da sich die Nahinfrarotautofluoreszenz insbesondere zur Detektion von prä-vitelliformen Stufen des Morbus Best eignete, während mittels QAF-Bildgebung vor allem eine Darstellung von Photorezeptordysfunktionen möglich war (Lima de Carvalho et al. 2019).

### **4.3 Kombination von en-face mit Schnittbildaufnahmen**

Als Basis für die Registrierung wurde das während des SD-OCT-Scans simultan aufgenommene en-face Infrarotbild gewählt. Da alle Modalitäten hiermit für das gesamte SD-OCT-Volume registriert wurden, kann im multimodalen Bildstapel anschließend auf B-Scan-Aufnahmen des korrespondierenden SD-OCT-Scans zurückgegriffen werden. So können retinale Auffälligkeiten einer Bildmodalität zusätzlich im Schnittbild des B-Scans der OCT betrachtet und beurteilt werden.

In dieser Studie wurden im *Patientenbeispiel 3* hyper- und hypoautofluoreszente Bereiche im QAF-Bild in den korrespondierenden B-Scans des OCTs untersucht, wodurch sich die zugrunde liegende Ursachen der Autofluoreszenzveränderungen interpretieren ließen (*Abbildung 12*, Seite 46).

Die Kombination der unterschiedlichen retinalen Aufnahmemodalitäten mit SD-OCT-Aufnahmen kann also unterstützend bei der Diagnostik, Verlaufs- und auch Therapiekontrolle von Netzhauterkrankungen sein (Sohrab et al. 2011) und sollte daher auch in weiteren Studien zur QAF, insbesondere bei Fragestellungen zu retinalen Pathologien, berücksichtigt werden. Intraretinale Vorgänge wie beim zystoiden Makulaödem und bei chorioidalen Neovaskularisationen könnten so besser dargestellt und kontrolliert werden, wie z. B. bei der exsudativen altersbedingten Makuladegeneration, der proliferativen diabetischen Retinopathie, retinalen Venenverschlüssen und der Chorioretinopathia centralis serosa (Panozzo et al. 2004; van Velthoven et al. 2005; Hoeh et al. 2009; Regatieri et al. 2011).

#### **4.4 SD-OCT-basierte Positionierung der Analysemuster**

Für die standardisierte Anwendung von Mustern zur Analyse von Netzhautbildern ist die Festlegung von definierten Netzhautpositionen wichtige Voraussetzung. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Studie zwei Lokalisationen am hinteren Pol ausgewählt, die mit einem SD-OCT-Scan (Fovea) und dem korrespondierenden en-face Infrarotbild (Rand des Sehnervenkopfs) bestimmt wurden.

Das ETDRS-Analysemusters, das mit der Fovea im Zentrum definiert ist, wurde ebenfalls in einigen anderen QAF-Studien verwendet (Reiter et al. 2019b; Cozzi et al. 2020). Für die Festlegung des ETDRS-Musters ist nur die Definition einer retinalen Position (Fovea) notwendig, da es sich um ein Analysemuster mit einer fest definierten Ringgröße handelt (*Abbildung 7*, Seite 25).

Im Gegensatz dazu sind für die Definition des Delori- und des QAF97-Analysemusters zwei Netzhautpositionen notwendig. Die Definition des Analyseusters erfolgt hierbei anhand der Position von Fovea und des Rands des Sehnervenkopfs. Dadurch handelt es sich bei diesen beiden Analysemustern nicht um starr definierte Muster mit einem immer identischen Durchmesser, sondern es sind minimale interpersonelle Unterschiede der Größe der Analysesegmente möglich. Der größte Vorteil der individuellen Definition des Analyseusters ist eine Loslösung von starren Größenvorgaben, verbunden mit der individuellen anatomischen Anpassung der Analysebereiche. Das ist besonders wichtig, da teilweise große interindividuelle Unterschiede der Strecke zwischen Sehnervenkopf und Fovea vorliegen. So betrug dieser Abstand in einer populationsbasierten Querschnittsstudie durchschnittlich  $4,76 \pm 0,34$  mm (Median: 4,74 mm), zeigte dabei jedoch aber Extremwerte zwischen 3,76 und 6,53 mm. Dabei konnte außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen Achslänge und Abstand zwischen Sehnervenkopf und Fovea nachgewiesen werden (Jonas et al. 2015). Der Nachteil der individuellen Analysemuster-Definition ist der zusätzliche zeitliche und methodische Mehraufwand der Definition von zwei retinalen Positionen, wobei insgesamt die Vorteile überwiegen (*Abbildung 7*, Seite 25).

Die exakte Definition der Position der Fovea erfolgte in dieser Studie mittels SD-OCT (SD-OCT-basierte Methode), während in anderen Studien zur Untersuchung der QAF die Definition auf der subjektiven Festlegung der Fovea im QAF-Bild beruhte (en-face-Bild-basierte Methode) (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013; Burke et al. 2014; Gliem et al. 2015; Müller et al. 2015; Gliem et al. 2016b; Boudreault et al. 2017; Eandi et al. 2017; Gliem et al. 2017; Schuerch et al. 2017; Orellana-Rios et al. 2018; Reiter et al. 2019a; Reiter et al. 2019b). Eine Ausnahme bildet die Arbeit von *Duncker et al.*, bei der teilweise OCT-Aufnahmen bei Patienten mit Morbus Best verwendet wurden, um die Position der Fovea zu bestimmen. OCT-Aufnahmen wurden hierbei verwendet, wenn makuläre Läsion vorlagen, die eine Bestimmung der fovealen Position im en-face Bild aufgrund der strukturellen Veränderungen erschwerten (Duncker et al. 2014). Dies unterstreicht den Vorteil des hier gewählten Verfahrens zur Bestimmung der fovealen Position, da so die Position der Fovea auch bei zentralen strukturellen Netzhautveränderungen in vielen Fällen noch relativ verlässlich definiert werden kann, im Gegensatz zur en-face-Bild-basierten Methode.

#### **4.5 Altersabhängige Veränderung der QAF-Intensität und - Topografie**

Die Standardretinakarten dieser Forschungsarbeit zeigen, wie bereits von anderen Autoren berichtet, einen Anstieg der Fundusautofluoreszenz mit zunehmendem Alter in einer gesunden Kohorte (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

Interessanterweise scheint der Anstieg der Intensität der Fundusautofluoreszenz zwischen der 3. und 8. Lebensdekade nicht linear zu sein. Die Daten der vorgestellten Forschungsarbeit zeigen die Bildung zweier Plateaus der QAF-Intensität zwischen der 4. und 5., sowie zwischen der 6. und 7. Lebensdekade, während die QAF-Intensität zwischen den anderen Lebensdekaden deutlich stärker ansteigt (*Abbildung 8B* Seite 31).

Die hier beschriebenen Plateaus der QAF-Intensität bei einer gesunden Kohorte wurden weder von *Delori et al.* noch von *Greenberg et al.* beschrieben, die ebenfalls eine gesunde Studienpopulation untersuchten. Im Gegensatz dazu zeigten sich in diesen Arbeiten altersabhängige Veränderungen der QAF-Intensität, die einer Wachstumsfunktion mit linearem oder begrenztem Wachstum ähnelten (Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013). Allerdings wurden die Probanden in diesen Studien nicht in Altersdekaden gruppiert. Die QAF-Werte wurden stattdessen als Trendlinie der Autofluoreszenzentwicklung von Einzelwerten dargestellt. Eine mögliche Ursache für den unterschiedlichen Verlauf der QAF-Intensitätsentwicklung könnte durch die Verwendung von QAF-Einzelwerten bedingt sein, während in der hier vorgestellten Studie eine Unterteilung in Dekaden erfolgte. Hierbei waren die Mittelwerte des Alters der Dekaden leicht unterschiedlich, beispielsweise betrug das Durchschnittsalter der 5. beziehungsweise 6. Lebensdekade 45,5 beziehungsweise 57,1 Jahre, sodass bei der Darstellung der QAF-Intensitäten nicht 10 Jahre zwischen den beiden Werten lagen, sondern in diesem Fall 11,6 Jahre (*Tabelle 1*, Seite 12). Das führte zu geringfügig unterschiedlichen Abständen (abweichend von 10 Jahren) bei der Darstellung der QAF-Werte der Dekaden, wurde aber aufgrund der insgesamt realistischeren Darstellung des Verhältnisses zwischen Alter und QAF-Intensität in Kauf genommen (*Abbildung 8B*, Seite 31).

Die plateauförmigen Veränderungen der Autofluoreszenzintensität beziehungsweise der Anzahl der Lipofuszingranula, die den Hauptanteil des Fundusautofluoreszenzsignals hervorrufen (Eldred und Katz 1988; Delori et al. 1995; Rückmann et al. 1995; Heimann et al. 2006), wurden bereits in früheren histologischen Studien beschrieben, die humane Spenderaugen untersuchten (Wing et al. 1978; Feeney-Burns et al. 1984). *Wing et al.* fanden ähnliche Veränderungen der Autofluoreszenz am hinteren Pol mit dem größten Anstieg in den ersten zwei Lebensdekaden, einer darauffolgenden plateauförmigen Phase und einem erneuten Anstieg der Autofluoreszenzintensität nach dem 60. Lebensjahr (Wing et al. 1978). Auch *Feeney-Burns und Kollegen* berichteten bei der Untersuchung der Anzahl von Lipofuszingranula in humanen RPE-Zellen

über eine plateauförmige Phase zwischen der 3. und 4., sowie zwischen der 6. und 7. Altersdekade (Feeney-Burns et al. 1984).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sich die in dieser Studie nachgewiesenen Veränderungen der QAF-Intensität mit zunehmendem Lebensalter mit den Ergebnissen aus früheren histologischen Studien an humanen Augen übereinstimmen.

Eine neuere histologische Untersuchung an humanen Augen, bei denen eine Gruppe jüngerer Spenderaugen ( $\leq 51$  Jahre) mit einer Gruppe älterer Spenderaugen ( $> 80$  Jahre) verglichen wurde, konnte eine Zunahme von Lipofuszingranula mit dem Lebensalter nachweisen (Bermond et al. 2020). Allerdings zeigten sich dabei deutliche topografische Unterschiede: die stärkste Zunahme von Lipofuszingranula konnte vor allem in der nahen Netzhautperipherie nachgewiesen werden. Die zweitstärkste Zunahme der Granulaanzahl zeigte sich im Bereich der Fovea, in der aber insgesamt nur eine niedrige Granulaanzahl nachgewiesen werden konnte. Im Bereich der Perifovea, die in beiden Gruppen eine hohe Granulaanzahl aufwies, konnte nur ein geringfügiger Anstieg nachgewiesen werden (Bermond et al. 2020). Das ist besonders interessant, da diese Verteilung der Lipofuszingranula mit den in der hier vorgestellten Studie gefundenen QAF-Intensitätswerten korreliert. Die Hotspots der QAF-Intensität und die Segmente mit der höchsten Autofluoreszenz befanden sich bei allen Altersdekaden im Bereich der Perifovea (siehe *Abbildung 9B, C*, Seite 36), in der auch die höchste Anzahl an Lipofuszingranula nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigte sich in diesem Bereich auch eine deutliche Zunahme der QAF-Intensität mit zunehmendem Alter (*Tabelle 3, QAF8*, Seite 32). Im Gegensatz hierzu zeigte sich im perifovealen Bereich in der histologischen Untersuchung nur eine leichte Zunahme der Anzahl an Lipofuszingranula (Bermond et al. 2020).

Die niedrige Anzahl der Lipofuszingranula innerhalb des RPEs im Bereich der Fovea und die hohe Anzahl im Bereich der Perifovea lassen einen Zusammenhang mit der besonderen Verteilung der Photorezeptoren in diesen Bereichen vermuten (Bermond et al. 2020). Im Bereich der Fovea kommen

ausschließlich Zapfen als Photorezeptoren vor, während im Bereich der Perifovea der humanen Retina die höchste Dichte an Stäbchenphotorezeptoren nachgewiesen werden konnte (Curcio et al. 1990). So könnte ein Zusammenhang zwischen der Verteilung von Stäbchenphotorezeptoren und einer erhöhten Anzahl von Lipofuszingranula bestehen.

Die Autofluoreszenzveränderungen mit zunehmendem Lebensalter sind keineswegs homogen und einheitlich. Daher sind erweiterte Analysetechniken und -muster, wie sie im Rahmen dieser Forschungsarbeit angewandt wurden, wünschenswert, um diese Veränderungen detailliert darzustellen und beurteilen zu können. Über die Position der höchsten QAF-Intensität im temporal-superioren bis temporalen Bereich der Perifovea berichteten bereits *Greenberg und Kollegen*. Hierbei untersuchten sie aber nicht die Veränderung dieser Position mit zunehmendem Lebensalter und führten keine Analyse einzelner Segmente durch (Greenberg et al. 2013). Die Subanalyse der Standardretinakarten unter Verwendung des QAF97-Musters zeigte in der hier vorgestellten Studie eine Verlagerung des QAF-Hotspots mit zunehmendem Alter von temporal-superior nach temporal, bei vergleichbarem Abstand zur Fovea. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung der höchsten QAF-Intensität der Segmente des Delori- und des QAF97-Musters (siehe *Abbildung 9B, C* Seite 36). Es ist bislang unklar, ob dies ein biologisches Phänomen oder möglicherweise auch ein optisches Artefakt des alternden Auges darstellt.

#### **4.6 Vergleich der QAF-Anlysemuster und Einordnung zu bisherigen Forschungsarbeiten**

Untersuchungen zur QAF-Intensität sind bereits bei einer Vielzahl von Netzhauterkrankungen erfolgt. Beispiele hierfür sind: nicht-exsudative altersbedingte Makuladegeneration (Gliem et al. 2016b; Orellana-Rios et al. 2018), Morbus Stargardt (Burke et al. 2014), Morbus Best (Duncker et al. 2014; Sparrow et al. 2016), Pseudoxanthoma elasticum (PXE) (Gliem et al. 2017), ABCA4- und PRPH2/RDS-Mutationen (Duncker et al. 2015b; Müller et al. 2015)

sowie akute zonale okkulte äußere Retinopathie (AZOOR) (Boudreault et al. 2017).

In den bisherigen Studien zur QAF wurden meist die QAF-Werte des QAF8-Analysebereichs des Delori-Musters (*Abbildung 7*, Seite 25) bestimmt und analysiert (Greenberg et al. 2013; Burke et al. 2014; Duncker et al. 2015b; Müller et al. 2015; Gliem et al. 2016b; Boudreault et al. 2017; Gliem et al. 2017; Reiter et al. 2019b; Reiter et al. 2019a).

In der vorgestellten Studie konnte jedoch beispielhaft an Untersuchungen pathologischer Netzhautbefunde verdeutlicht werden, dass die alleinige Anwendung und Beurteilung des QAF8-Analysebereichs nur unzureichend geeignet sind, krankhafte Veränderungen darzustellen beziehungsweise überhaupt zu registrieren (3.4.1, Seite 37, 3.4.2, Seite 41 und 3.4.3, Seite 47). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass der QAF8-Analysebereich lediglich einen limitierten perifovealen Bereich umfasst und ein Großteil des hinteren Pols nicht in die Analyse miteinbezogen wird (siehe *Abbildung 7*, Seite 25) (Greenberg et al. 2013).

Nur wenige Forschungsgruppen untersuchten bislang neben dem QAF8-Analysebereich auch andere Segmente des Delori-Musters, die sich zentraler oder peripher befanden oder schlossen einzelne Segmente aus der Analyse aus (Duncker et al. 2014; Eandi et al. 2017; Schuerch et al. 2017):

Die Arbeitsgruppe um *Eandi und Kollegen* untersuchte die Makulapigmentdichte und die QAF-Intensität einer jungen gesunden Kohorte im Alter zwischen 20 bis 34 Jahren (Eandi et al. 2017). Analysiert wurden neben der QAF-Intensität des QAF8-Analysebereichs auch zusätzliche Bereiche des Delori-Musters: das zentrale Kissegment und die Segmente des inneren und des äußeren Rings. Die zusätzliche Untersuchung zentraler Netzhautbereiche war in dieser Studie von besonderem Interesse, da hier die Makulapigmentdichte besonders hoch ist. Es konnte eine negative Korrelation zwischen QAF-Intensität und Makulapigmentdichte nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist im QAF8-Analysebereich die Makulapigmentdichte gering und es konnte kein Zusammenhang zur QAF-Intensität gezeigt werden.

*Duncker und Kollegen* untersuchten die QAF-Intensität bei Patienten mit Morbus Best und führten teilweise individuell angepasste Analysen der QAF durch (Duncker et al. 2014). Hierbei wurden Analysesegmente mit retinalen Läsionen zunächst aus der Analyse ausgeschlossen. Diese exkludierten Segmente wurden dann individuell analysiert. Diese individuelle Anpassung der Analysebereiche war notwendig, um Läsionen aus der Analyse zu exkludieren. Denn in dieser Studie sollten die QAF-Intensitäten, unterteilt in Läsion-freie Netzhautareale und in Bereiche mit Läsionen, bestimmt und verglichen werden. Hierbei zeigte sich in den Bereichen ohne Läsionen eine normwertige QAF-Intensität im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, während im Bereich der Läsionen eine erhöhte QAF-Intensität um mehr als das 20-fache nachgewiesen werden konnte.

Bei der Untersuchung von Patienten mit Retinopathia pigmentosa durch die Arbeitsgruppe um *Schuerch et al.* wurden Segmente aus der Analyse ausgeschlossen, wenn diese in mehr als der Hälfte des Segmentbereichs eine verminderte Autofluoreszenz aufwiesen (Schuerch et al. 2017). Daher konnte nur bei 25 von 40 Patienten die Analyse im QAF8-Analysebereich durchgeführt werden. In den restlichen Fällen erfolgten QAF-Messungen in drei rechteckigen Analysebereichen (superior, temporal und inferior).

Die Abweichungen vom limitierten QAF8-Analysebereich in diesen Studien unterstreichen die Notwendigkeit individualisierter Ansätze der QAF-Analyse bei Retinopathien. Denn oft ist die alleinige Analyse der QAF-Intensität des QAF8-Analysebereichs nur eingeschränkt für die Beurteilung geeignet. Dies verdeutlichten auch die in dieser Arbeit präsentierten Patientenbeispiele (3.4.1, Seite 37, 3.4.2, Seite 41 und 3.4.3, Seite 47). Insbesondere beim Auftreten von Netzhautläsionen, die auch Bereiche außerhalb des Analysebereichs der QAF8 umfassen, können Veränderungen der QAF-Intensität in diesen Bereichen nicht abgebildet werden. Zudem können insbesondere kleinere Veränderungen der QAF-Intensität aufgrund der relativ großen Abmessung der Einzelsegmente des Delori-Analysenmusters nur unzureichend detektiert werden und somit möglicherweise übersehen werden. Für diese Analysen eignet sich das in dieser

Studie neu vorgestellte subsegmentierte QAF97-Analysegmuster deutlich besser (Abbildung 10, Seite 39, Abbildung 11, Seite 43 und Abbildung 13 Seite 49).

Die Vorteile des QAF97-Musters im Vergleich zum häufig verwendeten QAF8-Analysebereich sind insbesondere auf zwei Eigenschaften des neuen Analyseusters zurückzuführen: Es umfasst zusätzlich sowohl den inneren als auch den äußeren Ring des Delori-Musters und somit einen deutlich größeren Analysebereich als die Segmente der QAF8. Somit können auch Veränderungen außerhalb des QAF8-Analysebereichs erfasst werden.

Darüber hinaus können insbesondere kleine Veränderungen der QAF-Intensität innerhalb dieser subsegmentierten Analysebereiche besser dargestellt werden, welche im QAF8-Analysebereich und auch in den größeren Segmenten des Delori-Musters durch die Mittelung der QAF-Intensität verloren gehen würden.

Aufgrund dieser Vorteile, insbesondere bei der Analyse von Retinopathien und Netzhautläsionen, sollte auch das hier vorgestellte QAF97-Analysemuster in künftigen Studien zur QAF verwendet werden.

#### **4.7 Standardretinakarten der quantitativen Autofluoreszenz als Basis für individuelle QAF-Analysen**

Die Darstellung der QAF-Intensität als Standardretinakarten für verschiedene Altersdekaden wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit erstmalig realisiert. Ein ähnlicher Ansatz wurde von *Greenberg et al.* bereits gewählt, bei dem die QAF-Intensität und deren topografische Verteilung am hinteren Pol für die gesamte gesunde Kohorte dargestellt wurde (Greenberg et al. 2013). Eine Einteilung in Altersdekaden und der Vergleich mit individuellen QAF-Aufnahmen erfolgten aber nicht.

Die hier präsentierten QAF-Standardretinakarten und die dazugehörigen Standardabweichungen für jede Altersdekade stellen die Grundlage für direkte Vergleiche der QAF-Intensität einzelner Individuen (mit oder ohne Pathologien) mit der zugehörigen gesunden Altersdekade dar.

Für die Erstellung von individuellen Differenzkarten werden die mittleren QAF-Werte und die Standardabweichungen, die für jedes Pixel der Standardretinakarten angegeben sind, verwendet. Dargestellt wird für jedes Pixel die Differenz der individuellen QAF-Intensität im Vergleich zur Standardretinakararte in der Einheit Standardabweichungen. Durch die Darstellung von Veränderungen der Autofluoreszenz gegenüber einer gesunden Alterskohorte können die Differenzkarten einen Beitrag zur vereinfachten Detektion und Darstellung von retinalen Pathologien leisten. Denn so können Abweichungen der QAF-Intensität von der Norm der gesunden Altersdekade übersichtlich farbcodiert dargestellt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde beispielhaft eine Differenzkarte für einen Patienten mit Morbus Stargardt erstellt (*Abbildung 13F*, Seite 49). Hierbei zeigten sich starke Abweichungen der QAF-Intensität von teilweise mehr als  $\pm 3$  Standardabweichungen in Atrophiezonen beziehungsweise in hyperautofluoreszenten Läsionen. Diese Veränderungen konnten mittels Differenzkarte übersichtlich farbcodiert dargestellt werden.

Die in der Differenzkarte detektierten Netzhautpathologien können anschließend mit einem Freihandtool zur QAF-Messung individuell analysiert (siehe *Abbildung 13B, D, F*, Seite 49) und mit den QAF-Werten der altersentsprechenden gesunden Kohorte verglichen werden. So können Netzhautläsionen noch detaillierter und vor allem unabhängig von starren Analysemustern untersucht und analysiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Standardretinakarten ist die bereits im Absatz 4.5 (Seite 56) erläuterte Untersuchung und Analyse der Veränderung der QAF-Intensität innerhalb einer Altersdekade und der Vergleich zu Standardretinakarten anderer Dekaden (*Abbildung 9B, C*, Seite 36).

#### **4.8 Wiederholbarkeit der QAF-Messungen**

Im Rahmen anderer Untersuchungen zur QAF-Intensität wurde als Maß für die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zwischen zwei Untersuchungen einer zufälligen

Stichprobe der Bland-Altman Koeffizient der Wiederholbarkeit bestimmt. Er betrug hierbei zwischen 6 und 11 % (Delori et al. 2011a; Duncker et al. 2014; Duncker et al. 2015a; Duncker et al. 2015b). In der hier vorgestellten Studie zeigte sich ein Bland-Altman Koeffizient der Wiederholbarkeit von 19,5 %.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte die unterschiedliche Einstellung der Sensitivität des Detektors bei beiden Untersuchungen in dieser Studie sein, da das Bild neujustiert und dabei auch die Sensitivität neu eingestellt wurde. So berichten *Delori et al.* von Schwankungen der QAF-Werte um teilweise mehr als 10% in Abhängigkeit von der gewählten Sensitivität des Aufnahmegeräts (Delori et al. 2011a). Im Gegensatz zur hier vorgestellten Studie wurde in den anderen Studien eine konstante Sensitivität gewählt, was die Abweichung des Bland-Altman Koeffizienten der Wiederholbarkeit erklären könnte (Delori et al. 2011a; Duncker et al. 2014; Duncker et al. 2015a; Duncker et al. 2015b; Sparrow et al. 2020).

Die durchschnittliche Variabilität der QAF-Intensität im QAF8-Analysebereich Stichprobe betrug 7,91 % (Median 6,42 %, Minimal-/Maximalwert 0,05 % – 22,3 %) zwischen zwei Untersuchungen des gleichen Probanden am selben Tag. Dies stellt ein Maß der Intraobserver-Variabilität dar. Eine Bestimmung der Interobserver-Variabilität erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht. Sie wurde aber in einer anderen Studie mit einer Wiederholbarkeit von  $\pm 7$  bis  $\pm 14$  % im Analysebereich der QAF8 an zwei verschiedenen Tagen beschrieben (Delori et al. 2011a).

Die QAF-Intensität zwischen zwei Untersuchungen kann also sowohl bei Aufnahmen am selben Tag als auch bei späteren Aufnahmen unterschiedlich große Schwankungen aufweisen. Diese Schwankungen können durch standardisierte Bildgebungsprotokolle, eine ordnungsgemäße Bildaufnahme, eine sofortige Überprüfung der Bildqualität sowie die Durchführung der Bildgebung durch einen erfahrenen Untersucher reduziert werden und sollten bei einem Einzug der QAF in den klinischen Alltag beachtet werden.

#### **4.9 Limitationen der Studie und der QAF und Ausblick**

Eine Einschränkung des vorgestellten SD-OCT-basierten Verfahrens ist die Notwendigkeit eines OCT-Scans, der mit mindestens einer gleichzeitig erfassten en-face Fundusaufnahme einhergehen muss. OCT-Aufnahmegeräte bieten meist die Möglichkeit der simultanen Aufnahme von en-face Infrarotbilder für die Livebildsteuerung, sodass dies im klinischen Alltag meist möglich ist.

Um die Position der beiden Punkte für die Definition der Analysemuster noch genauer bestimmen zu können, könnten bei zukünftigen Studien SD-OCT-Scans verwendet werden, die die Fovea und zusätzlich auch den Rand des Sehnervenkopfs (erkennbar an der Öffnung der Bruch-Membran) umfassen. So könnten subjektive Einflüsse weiter reduziert werden. Geeignet wären hier beispielsweise OCT-Scans, die für die Posterior-Pole-Analyse bei der Diagnostik und beim Monitoring von Glaukomerkrankungen eingesetzt werden. Hierbei könnte der Rand des Sehnervenkopfs relativ einfach an der Stelle der Unterbrechung der Bruch-Membran bestimmt werden (Bambo et al. 2018).

Weitere Einschränkungen der QAF-Bildgebung und ihrer Analyse sind die starke Abhängigkeit von klaren optischen Medien, insbesondere von einer klaren natürlichen Linse. Für diese Studie wurden daher nur Probanden mit klaren optischen Medien (die Kontrolle erfolgte in der Spaltlampen-Biomikroskopie) und voller Sehschärfe ( $\text{Visus} \geq 20/25$ ) eingeschlossen. Trotzdem erfolgte, wie in allen anderen bisherigen Studien zur QAF, auch eine altersentsprechende Anpassung der QAF-Intensität an die physiologischerweise zunehmend trüber werdenden optischen Medien. Dabei wurde die aktuell etablierte Methode zur Anpassung der QAF-Werte genutzt (*Formel 2*, Seite 27), die allerdings einen starken Einfluss auf die QAF-Werte insbesondere bei älteren Probanden hat (siehe auch Tabelle 2, Seite 27) (van de Kraats und van Norren 2007; Delori et al. 2011a; Greenberg et al. 2013).

Weitere Studien zur Untersuchung des Einflusses der optischen Medien im höheren Lebensalter auf die quantitative Autofluoreszenz und die Überprüfung der aktuell anerkannten Formel zur Anpassung der QAF-Intensität mit Hilfe von klinischen Daten wären wünschenswert. Da sich eine Vielzahl von

Netzhauterkrankungen häufig erst jenseits des 60. Lebensjahrs manifestiert und der Einfluss der aktuell verwendeten Formel besonders in diesem Altersbereich relevante Änderungen der QAF-Intensität hervorruft, sollte insbesondere der Altersbereich ab dem 60. Lebensjahr genauer untersucht werden.

Auch die Berücksichtigung individueller Unterschiede beim Ausmaß der Linsentrübungen bei gleichaltrigen Personen wäre wünschenswert. Bisher wird für die Anpassung der QAF-Intensität als Variable nur das Alter der untersuchten Person verwendet, was jedoch zum Teil ausgeprägte interindividuelle Unterschiede der Linsentrübungen nicht berücksichtigt. Hierbei wäre z. B. durch klinische Einteilung der Linsentrübung, z. B. nach LOCS-III-Kriterien (Chylack et al. 1993) oder mittels Bestimmung der QAF der natürlichen Linse (Charng et al. 2017), die Entwicklung und Anwendung klinisch basierter Korrekturfaktoren der QAF-Werte denkbar. So würde nicht nur das Alter der untersuchten Person berücksichtigt werden, sondern auch die interindividuellen Unterschiede der Trübungen der optischen Medien.

Ebenso unklar ist der Einfluss einer Pseudophakie auf die QAF-Intensität. In Studien, in den auch pseudophake Patienten eingeschlossen wurden, erfolgte bislang keine Anpassung der Werte der QAF-Intensität (Korrekturfaktor = 1,0) (Reiter et al. 2019a; Reiter et al. 2019b). Ob hier möglicherweise doch Korrekturfaktoren verwendet werden sollten, muss sich in aktuell noch laufenden Studien zeigen. Hierbei sollte auch auf die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Kunstlinsen, insbesondere auch in Bezug auf die integrierten Filtereigenschaften, geachtet werden. Außerdem sollte eine Hinterkapsel fibrose ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Faktor, der in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde, ist der Einfluss von typischerweise stark hypoautofluoreszenten Netzhautgefäßen. Wie in dieser Arbeit exkludierten manche Studien zur QAF-Intensität die Netzhautgefäße nicht aus der Analyse (Greenberg et al. 2013; Boudreault et al. 2017; Reichel et al. 2020; Pröbster et al. 2021). In andere Studien wurden die Blutgefäße mittels Histogrammanalyse und/oder durch die interne Aufnahmesoftware aus der Analyse ausgeschlossen (Burke et al. 2014; Gliem et

al. 2016a; Gliem et al. 2016b; Eandi et al. 2017; Schuerch et al. 2017). Bei anderen Forschungsarbeiten wird eine Exklusion von Gefäßen aus der Analyse nicht thematisiert (Delori et al. 2011a; Duncker et al. 2015b). Wie groß der Einfluss der retinalen Blutgefäße auf die Messung der QAF-Intensität ist, wurde bislang noch nicht untersucht und könnte eine Fragestellung zukünftiger Studien sein.

Falls sich hier ein Vorteil durch die Exklusion der Netzhautgefäße zeigt, sollten sie, vor allem aus zeitlichen Gründen und um eine Routineanwendung im klinischen Alltag zu ermöglichen, (halb)automatisiert aus der Analyse ausgeschlossen werden. Allerdings kann insbesondere bei QAF-Aufnahmen, die hypoautofluoreszente retinale Veränderungen, wie beispielweise Atrophiezonen aufweisen, die automatisierte Exklusion von Netzhautgefäßen problematisch sein. Hierbei besteht die Gefahr, auch diese retinalen Veränderungen fälschlicherweise aus der Analyse auszuschließen, da sie ebenso wie die Netzhautgefäße stark reduzierte QAF-Intensitäten aufweisen. Möglicherweise könnten hier halbautomatisierte Verfahren im Vorteil sein, die auf einer automatisierten Gefäßerkennung beruhen, aber beispielweise im Bereich von Atrophiearealen manuell modifiziert werden können. So könnte die Exklusion von Gefäßen durchgeführt werden, ohne dass fälschlicherweise auch hypoautofluoreszente Retinabereich aus der Analyse ausgeschlossen werden.

## 5 Zusammenfassung

Die relativ neue Methode der quantitativen Fundusautofluoreszenz bietet im Gegensatz zur weit verbreiteten konventionellen Fundusautofluoreszenzbildgebung die Möglichkeit, die Autofluoreszenzintensität sowohl intrapersonell als auch interpersonell zu vergleichen. Grundlage hierfür ist eine integrierte interne Referenzprobe, die bei jeder QAF-Aufnahme zusätzlich mitaufgenommen wird und so eine Quantifizierung der Autofluoreszenz ermöglicht.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden 103 gesunde Probanden im Alter zwischen 19 und 77 Lebensjahren eingeschlossen und mittels multimodaler retinaler Bildgebung (QAF-, Fundusautofluoreszenz-, Infrarot-, Nahinfrarot- und rotfreien Aufnahmen sowie SD-OCT-Scans) untersucht und in Altersdekaden eingeteilt. Anschließend wurden diese Aufnahmen mit neu entwickelten FIJI-Plugins untersucht und analysiert. Für jeden Probanden wurde dabei ein exakt überlagerter multimodaler Bildstapel erstellt, indem die einzelnen Bildmodalitäten anhand der en-face Infrarotaufnahme des SD-OCT-Scans durch Verschiebung, Drehung und Skalierung registriert wurden.

Mit Hilfe der SD-OCT wurde dann die exakte Position der Fovea und mittels des korrespondierenden en-face Infrarotbilds der Rand des Sehnervenkopfs bestimmt. Diese beiden Punkte dienten anschließend zur Definition der Analysemuster.

Auf Basis des Delori-Musters wurde ein neues, subsegmentiertes QAF97-Anlysemuster entwickelt und erstmalig angewandt. Das QAF97-Muster zeigte dabei insbesondere bei retinalen Pathologien im Vergleich zum etablierten QAF8-Analysebereich des Delori-Musters Vorteile bei der Analyse der QAF-Intensität. So beinhaltet das QAF97-Muster zusätzliche zentrale und periphere Bereiche, die der QAF8-Analysebereich nicht umfasst. Außerdem ermöglicht die Subsegmentierung des QAF97-Musters die Detektion und Analyse kleiner retinaler QAF-Veränderungen. Diese Veränderungen würden bei alleiniger Anwendung der Segmente des Delori-Musters und des QAF8-Analysebereichs teilweise nicht dargestellt werden können, da diese Bereiche deutlich größer sind

und kleinere QAF-Veränderungen durch die Mittelung nur unzureichend berücksichtigt werden. Es zeigte sich somit, dass das neu eingeführte QAF97-Muster im Rahmen zukünftiger Studien, insbesondere wenn pathologische Veränderungen der Netzhaut untersucht werden, zusätzlich Verwendung finden sollte.

Zudem wurde für jede Altersdekade der Studienpopulation eine Standardretinakarte der QAF-Intensität erstellt. Diese Karten ermöglichen einen Vergleich von individuellen QAF-Aufnahmen mit der gesunden, altersentsprechenden Dekade. Auf diese Weise lassen sich Differenzkarten erstellen, die für jedes Pixel farbcodiert die Abweichung zur Standardretinakarte zeigen. Dadurch können insbesondere Läsionen, die mit Hyper- bzw. Hypoautofluoreszenz einhergehen, vereinfacht detektiert und analysiert werden. Anschließend können diese Bereiche mit einem neuentwickelten Freihandtool unabhängig von starren Analysemustern individuell analysiert werden und auch im Follow-Up beobachtet werden. Dies könnte im Rahmen des Verlaufs- und Therapiemonitorings von Netzhauterkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Verschiebung des Hotspots und der Segmente mit der höchsten QAF-Intensität von temporal-superior nach temporal kommt. Die Ursache und Bedeutung hiervon sind allerdings noch unbekannt.

Die in dieser Studie evaluierten und angefertigten QAF-Standardretinakarten und Softwarelösungen zur erweiterten Analyse stellen die Basis für weitere Studien und Untersuchungen zur QAF, insbesondere bei Netzhauterkrankungen, dar.

In Zukunft könnten die vorgestellten Methoden durch Ergänzung um eine automatisierte Generierung multimodaler Bildstapel und die anschließende Berechnung der QAF-Intensität und Erstellung von Differenzkarten Einzug in den klinischen Alltag finden und so die Diagnostik und Verlaufskontrolle von Retinopathien vereinfachen und verbessern.

## 6 Literaturverzeichnis

Ach, Thomas; Bermond, Katharina (2019): Autofluoreszenz des humanen retinalen Pigmentepithels in der normalen Alterung und bei altersbedingter Makuladegeneration. Histologie und Klinik. In: *Klin Monatsbl Augenheilkd* 236 (05), S. 672–681. DOI: 10.1055/s-0043-109891.

Ach, Thomas; Huisingh, Carrie; McGwin, Gerald, JR; Messinger, Jeffrey D.; Zhang, Tianjiao; Bentley, Mark J. et al. (2014): Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (8), S. 4832–4841. DOI: 10.1167/iovs.14-14802.

Ach, Thomas; Tolstik, Elen; Messinger, Jeffrey D.; Zarubina, Anna V.; Heintzmann, Rainer; Curcio, Christine A. (2015): Lipofuscin Redistribution and Loss Accompanied by Cytoskeletal Stress in Retinal Pigment Epithelium of Eyes With Age-Related Macular Degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (5), S. 3242. DOI: 10.1167/iovs.14-16274.

Ajaz, Aqsa; Kumar, Dinesh K. (2020): Infrared retinal images for flashless detection of macular edema. In: *Sci Rep* 10 (1), S. 14384. DOI: 10.1038/s41598-020-71010-0.

Armenti, Stephen T.; Greenberg, Jonathan P.; Smith, R. Theodore (2016): Quantitative Fundus Autofluorescence for the Evaluation of Retinal Diseases. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (109). DOI: 10.3791/53577.

Bambo, Maria P.; Cameo, Beatriz; Hernandez, Ruben; Fuentemilla, Enrique; Guerri, Noemi; Ferrandez, Blanca et al. (2018): Diagnostic ability of inner macular layers to discriminate early glaucomatous eyes using vertical and horizontal B-scan posterior pole protocols. In: *PloS one* 13 (6), e0198397. DOI: 10.1371/journal.pone.0198397.

Ban, Yuriko; Rizzolo, Lawrence J. (2000): Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. In: *Developmental Brain Research* 121 (1), S. 89–95. DOI: 10.1016/S0165-3806(00)00028-6.

Ben Ami, Tal; Tong, Yuehong; Bhuiyan, Alauddin; Huisingh, Carrie; Ablonczy, Zsolt; Ach, Thomas et al. (2016): Spatial and Spectral Characterization of Human Retinal Pigment Epithelium Fluorophore Families by Ex Vivo Hyperspectral Autofluorescence Imaging. In: *Translational vision science & technology* 5 (3), S. 5. DOI: 10.1167/tvst.5.3.5.

Bermond, Katharina; Wobbe, Christina; Tarau, Ioana-Sandra; Heintzmann, Rainer; Hillenkamp, Jost; Curcio, Christine A. et al. (2020): Autofluorescent Granules of the Human Retinal Pigment Epithelium. Phenotypes, Intracellular Distribution, and Age-Related Topography. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 61 (5), S. 35. DOI: 10.1167/iovs.61.5.35.

Bille, Josef F. (2019): High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology. New Frontiers in Biomedical Optics. 1st ed. 2019. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16638-0>.

Boudreault, Katherine A.; Schuerch, Kaspar; Zhao, Jin; Lee, Winston; Cabral, Thiago; Yannuzzi, Lawrence A. et al. (2017): Quantitative Autofluorescence Intensities in Acute Zonal Occult Outer Retinopathy vs Healthy Eyes. In: *JAMA ophthalmology* 135 (12), S. 1330–1338. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.4499.

Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P. (2001): The role of the retinal pigment epithelium. Topographical variation and ageing changes. In: *Eye (London, England)* 15 (Pt 3), S. 384–389. DOI: 10.1038/eye.2001.141.

Bowling, Brad; Burk, Reinhard; Tönjes, Sibylle (2017): Kanski's Klinische Ophthalmologie. Ein Systematischer Ansatz. 8th ed. Philadelphia: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5553815>.

Burke, Tomas R.; Duncker, Tobias; Woods, Russell L.; Greenberg, Jonathan P.; Zernant, Jana; Tsang, Stephen H. et al. (2014): Quantitative fundus autofluorescence in recessive Stargardt disease. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (5), S. 2841–2852. DOI: 10.1167/iovs.13-13624.

Charng, Jason; Tan, Rose; Luu, Chi D.; Sadigh, Sam; Stambolian, Dwight; Guymer, Robyn H. et al. (2017): Imaging Lenticular Autofluorescence in Older Subjects. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (12), S. 4940–4947. DOI: 10.1167/iovs.17-22540.

Chaudhry; Klein; Parra-Denis (2013): Ophthalmologic Image Registration based on shape-context: Application to Fundus Autofluorescence (FAF) images.

Cheng, Rongzhu; Lin, Bin; Ortwerth, Beryl J. (2002): Rate of formation of AGEs during ascorbate glycation and during aging in human lens tissue. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1587 (1), S. 65–74. DOI: 10.1016/S0925-4439(02)00069-8.

Chylack, L. T.; Wolfe, J. K.; Singer, D. M.; Leske, M. C.; Bullimore, M. A.; Bailey, I. L. et al. (1993): The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 111 (6), S. 831–836. DOI: 10.1001/archophth.1993.01090060119035.

Cozzi, Mariano; Viola, Francesco; Belotti, Maria; Cigada, Mario; Cherepanoff, Svetlana; Staurenghi, Giovanni; Invernizzi, Alessandro (2020): The In Vivo Correlation between Retinal Pigment Epithelium Thickness and Quantitative Fundus Autofluorescence in a White Population. In: *Ophthalmology. Retina*. DOI: 10.1016/j.oret.2020.07.029.

Crouch, Rosalie K.; Koutalos, Yiannis; Kono, Masahiro; Schey, Kevin; Ablonczy, Zsolt (2015): A2E and Lipofuscin. In: *Progress in molecular biology and translational science* 134, S. 449–463. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.005.

Curcio, Christine A.; Sloan, Kenneth R.; Kalina, Robert E.; Hendrickson, Anita E. (1990): Human photoreceptor topography. In: *J. Comp. Neurol.* 292 (4), S. 497–523. DOI: 10.1002/cne.902920402.

Delori, F. C.; Dorey, C. K.; Staurenghi, G.; Arend, O.; Goger, D. G.; Weiter, J. J. (1995): In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 36 (3), S. 718–729.

Delori, Francois; Greenberg, Jonathan P.; Woods, Russell L.; Fischer, Jorg; Duncker, Tobias; Sparrow, Janet; Smith, R. Theodore (2011a): Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (13), S. 9379–9390. DOI: 10.1167/iovs.11-8319.

Delori, François; Greenberg, Jonathan P.; Woods, Russell L.; Fischer, Jörg; Duncker, Tobias; Sparrow, Janet; Smith, R. Theodore (2011b): Appendix of Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (13), S. 9379–9390. DOI: 10.1167/iovs.11-8319.

Deng, Kexin; Tian, Jie; Zheng, Jian; Zhang, Xing; Dai, Xiaoqian; Xu, Min (2010): Retinal Fundus Image Registration via Vascular Structure Graph Matching. In: *International journal of biomedical imaging* 2010. DOI: 10.1155/2010/906067.

Duncker, Tobias; Greenberg, Jonathan P.; Ramachandran, Rithambara; Hood, Donald C.; Smith, R. Theodore; Hirose, Tatsuo et al. (2014): Quantitative Fundus Autofluorescence and Optical Coherence Tomography in Best Vitelliform Macular Dystrophy. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55 (3), S. 1471. DOI: 10.1167/iovs.13-13834.

Duncker, Tobias; Tsang, Stephen H.; Lee, Winston; Zernant, Jana; Allikmets, Rando; Delori, François C.; Sparrow, Janet R. (2015a): Quantitative fundus autofluorescence distinguishes ABCA4-associated and non-ABCA4-associated bull's-eye maculopathy. In: *Ophthalmology* 122 (2), S. 345–355. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.08.017.

Duncker, Tobias; Tsang, Stephen H.; Woods, Russell L.; Lee, Winston; Zernant, Jana; Allikmets, Rando et al. (2015b): Quantitative Fundus Autofluorescence and Optical Coherence Tomography in PRPH2/RDS- and ABCA4-Associated Disease Exhibiting Phenotypic Overlap. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (5), S. 3159–3170. DOI: 10.1167/iovs.14-16343.

Eandi, Chiara M.; Nassisi, Marco; Lavia, Carlo; Alovise, Camilla; Sanctis, Ugo de (2017): Macular Pigment Density and Quantitative Fundus Autofluorescence in

Young Healthy Subjects. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (4), S. 2284–2290. DOI: 10.1167/iovs.16-20510.

Eldred, G. E.; Katz, M. L. (1988): Fluorophores of the human retinal pigment epithelium. Separation and spectral characterization. In: *Experimental Eye Research* 47 (1), S. 71–86.

Eldred, G. E.; Lasky, M. R. (1993): Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. In: *Nature* 361 (6414), S. 724–726. DOI: 10.1038/361724a0.

Feeney-Burns, L.; Hilderbrand, E. S.; Eldridge, S. (1984): Aging human RPE. morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 25 (2), S. 195–200.

Finnemann, S. C.; Bonilha, V. L.; Marmorstein, A. D.; Rodriguez-Boulan, E. (1997): Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha(v)\beta5$  integrin for binding but not for internalization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24), S. 12932–12937. DOI: 10.1073/pnas.94.24.12932.

Friedburg, D.; Krause, K. (2002): Subjektive Refraktionsbestimmung. Teil II: Monokularer Feinabgleich. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 99 (8), 657-63; quiz 664-5, 667. DOI: 10.1007/s00347-002-0671-4.

Gambril, J. Alan; Sloan, Kenneth R.; Swain, Thomas A.; Huisingh, Carrie; Zarubina, Anna V.; Messinger, Jeffrey D. et al. (2019): Quantifying Retinal Pigment Epithelium Dysmorphia and Loss of Histologic Autofluorescence in Age-Related Macular Degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60 (7), S. 2481. DOI: 10.1167/iovs.19-26949.

Glenn, Josephine V.; Stitt, Alan W. (2009): The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1790 (10), S. 1109–1116. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.04.016.

Gliem, Martin; Hendig, Doris; Finger, Robert P.; Holz, Frank G.; Charbel Issa, Peter (2015): Reticular Pseudodrusen Associated With a Diseased Bruch

Membrane in Pseudoxanthoma Elasticum. In: *JAMA Ophthalmol* 133 (5), S. 581. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.117.

Gliem, Martin; Müller, Philipp L.; Birtel, Johannes; Hendig, Doris; Holz, Frank G.; Charbel Issa, Peter (2016a): Frequency, Phenotypic Characteristics and Progression of Atrophy Associated With a Diseased Bruch's Membrane in Pseudoxanthoma Elasticum. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (7), S. 3323. DOI: 10.1167/iovs.16-19388.

Gliem, Martin; Müller, Philipp L.; Birtel, Johannes; McGuinness, Myra B.; Finger, Robert P.; Herrmann, Philipp et al. (2017): Quantitative Fundus Autofluorescence in Pseudoxanthoma Elasticum. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (14), S. 6159–6165. DOI: 10.1167/iovs.17-22007.

Gliem, Martin; Müller, Philipp L.; Finger, Robert P.; McGuinness, Myra B.; Holz, Frank G.; Charbel Issa, Peter (2016b): Quantitative Fundus Autofluorescence in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. In: *JAMA ophthalmology* 134 (7), S. 817–824. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.1475.

Govindahari, Vishal; Singh, Sumit Randhir; Rajesh, Bindu; Gallego-Pinazo, Roberto; Marco, Rosa Dolz; Nair, Dhanya V. et al. (2019): Multicolor imaging in central serous chorioretinopathy – a quantitative and qualitative comparison with fundus autofluorescence. In: *Sci Rep* 9 (1), S. 8. DOI: 10.1038/s41598-019-48040-4.

Greenberg, Jonathan P.; Duncker, Tobias; Woods, Russell L.; Smith, R. Theodore; Sparrow, Janet R.; Delori, François C. (2013): Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 54 (8), S. 5684–5693. DOI: 10.1167/iovs.13-12445.

Hamann, S.; La Cour, M.; Lui, G. M.; Bundgaard, M.; Zeuthen, T. (2000): Transport of protons and lactate in cultured human fetal retinal pigment epithelial cells. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 440 (1), S. 84–92. DOI: 10.1007/s004249900236.

Hassan, Taimur; Akram, Muhammad Usman; Shaukat, Arslan; Gul Khawaja, Sajid; Hassan, Bilal (2018): Structure Tensor Graph Searches Based Fully

Automated Grading and 3D Profiling of Maculopathy From Retinal OCT Images. In: *IEEE Access* 6, S. 44644–44658. DOI: 10.1109/ACCESS.2018.2862626.

Heimann, Heinrich; Foerster, Michael H.; Kellner, Ulrich (2006): *Angiographie-Atlas des Augenhintergrundes*. Stuttgart, New York: Thieme.

Hernandez-Matas, Carlos; Zabulis, Xenophon; Triantafyllou, Areti; Anyfanti, Panagiota; Argyros, Antonis A. (2017): Retinal image registration under the assumption of a spherical eye. In: *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society* 55, S. 95–105. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2016.06.006.

Hoeh, Alexandra E.; Ach, Thomas; Schaal, Karen B.; Scheuerle, Alexander F.; Dithmar, Stefan (2009): Long-term follow-up of OCT-guided bevacizumab treatment of macular edema due to retinal vein occlusion. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247 (12), S. 1635–1641. DOI: 10.1007/s00417-009-1151-1.

Holz, F. G. (2001): Autofluoreszenz-Imaging der Makula. In: *Der Ophthalmologe* 98 (1), S. 10–18. DOI: 10.1007/s003470170194.

Holz, Frank; Bird, Alan C.; Schmitz-Valckenberg, Steffen; Spaide, Richard (Hg.) (2007): *Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Jonas, Rahul Arvo; Wang, Ya Xing; Yang, Hua; Li, Jian Jun; Xu, Liang; Panda-Jonas, Songhomitra; Jonas, Jost Bruno (2015): Optic Disc-Fovea Distance, Axial Length and Parapapillary Zones. The Beijing Eye Study 2011. In: *PloS one* 10 (9), e0138701. DOI: 10.1371/journal.pone.0138701.

Kaji, Yuichi; Usui, Tomohiko; Oshika, Tetsuro; Matsubara, Masao; Yamashita, Hidetoshi; Araie, Makoto et al. (2000): Advanced Glycation End Products in Diabetic Corneas. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2), S. 362–368.

Kakimoto, Yu; Okada, Chisa; Kawabe, Noboru; Sasaki, Ayumi; Tsukamoto, Hideo; Nagao, Ryoko; Osawa, Motoki (2019): Myocardial lipofuscin accumulation

in ageing and sudden cardiac death. In: *Sci Rep* 9 (1), S. 3304. DOI: 10.1038/s41598-019-40250-0.

Keilhauer, Claudia N.; Delori, François C. (2006): Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (8), S. 3556–3564. DOI: 10.1167/iovs.06-0122.

La Cour, M.; Lin, H.; Kenyon, E.; Miller, S. S. (1994): Lactate transport in freshly isolated human fetal retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 35 (2), S. 434–442.

Laliberté, France; Gagnon, Langis; Sheng, Yunlong (2003): Registration and fusion of retinal images--an evaluation study. In: *IEEE transactions on medical imaging* 22 (5), S. 661–673. DOI: 10.1109/TMI.2003.812263.

Li, Binxing; George, Evan W.; Rognon, Gregory T.; Gorusupudi, Aruna; Ranganathan, Arunkumar; Chang, Fu-Yen et al. (2020): Imaging lutein and zeaxanthin in the human retina with confocal resonance Raman microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (22), S. 12352–12358. DOI: 10.1073/pnas.1922793117.

Lim, Henry W.; Grimes, Pearl E.; Agbai, Oma; Hamzavi, Iltefat; Henderson, Marsha; Haddican, Madelaine et al. (2015): Afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for the treatment of vitiligo. A randomized multicenter trial. In: *JAMA dermatology* 151 (1), S. 42–50. DOI: 10.1001/jamadermatol.2014.1875.

Lima de Carvalho, Jose Ronaldo; Paavo, Maarjaliis; Chen, Lijuan; Chiang, John; Tsang, Stephen H.; Sparrow, Janet R. (2019): Multimodal Imaging in Best Vitelliform Macular Dystrophy. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60 (6), S. 2012–2022. DOI: 10.1167/iovs.19-26571.

Ly, Angelica; Nivison-Smith, Lisa; Assaad, Nagi; Kalloniatis, Michael (2017): Fundus Autofluorescence in Age-related Macular Degeneration. In: *Optometry and Vision Science* 94 (2), S. 246–259. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000997.

Malik, N. S.; MOSS, S.; Ahmed, N.; FURTH, A.; WALL, R.; MEEK, K. (1992): Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. In:

*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1138 (3), S. 222–228. DOI: 10.1016/0925-4439(92)90041-k.

Mazzoni, Francesca; Safa, Hussein; Finnemann, Silvia C. (2014): Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. In: *Experimental eye research*, S. 51–60. DOI: 10.1016/j.exer.2014.01.010.

Moreno-García, Alexandra; Kun, Alejandra; Calero, Olga; Medina, Miguel; Calero, Miguel (2018): An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. In: *Frontiers in Neuroscience* 12, S. 464. DOI: 10.3389/fnins.2018.00464.

Morgan, Jessica I. W.; Pugh, Edward N. (2013): Scanning Laser Ophthalmoscope Measurement of Local Fundus Reflectance and Autofluorescence Changes Arising from Rhodopsin Bleaching and Regeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (3), S. 2048. DOI: 10.1167/iovs.12-11089.

Müller, Philipp L.; Gliem, Martin; Mangold, Elisabeth; Bolz, Hanno J.; Finger, Robert P.; McGuinness, Myra et al. (2015): Monoallelic ABCA4 Mutations Appear Insufficient to Cause Retinopathy. A Quantitative Autofluorescence Study. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (13), S. 8179. DOI: 10.1167/iovs.15-17629.

Naylor, Aisling; Hopkins, Alan; Hudson, Natalie; Campbell, Matthew (2020): Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. In: *IJMS* 21 (1), S. 211. DOI: 10.3390/ijms21010211.

Ng, K. P.; Gugiu, B.; Renganathan, K.; Davies, M. W.; Gu, X.; Crabb, J. S. et al. (2008): Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7 (7), S. 1397–1405. DOI: 10.1074/mcp.M700525-MCP200.

Orellana-Rios, Jorge; Yokoyama, Sho; Agee, Julia M.; Challa, Nayanika; Freund, K. Bailey; Yannuzzi, Lawrence A.; Smith, R. Theodore (2018): Quantitative Fundus Autofluorescence in Non-Neovascular Age-Related Macular Degeneration. In: *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 49 (10), S34-S42. DOI: 10.3928/23258160-20180814-06.

Panozzo, G.; Parolini, B.; Gusson, E.; Mercanti, A.; Pinackatt, S.; Bertoldo, G.; Pignatto, S. (2004): Diabetic macular edema: an OCT-based classification. In:

*Seminars in ophthalmology* 19 (1-2), S. 13–20. DOI: 10.1080/08820530490519934.

Prieto, Pedro M.; McLellan, James S.; Burns, Stephen A. (2005): Investigating the light absorption in a single pass through the photoreceptor layer by means of the lipofuscin fluorescence. In: *Vision Research* 45 (15), S. 1957–1965. DOI: 10.1016/j.visres.2005.01.023.

Pröbster, Carla; Tarau, Ioana-Sandra; Berlin, Andreas; Kleefeldt, Nikolai; Hillenkamp, Jost; Nentwich, Martin M. et al. (2021): Quantitative Fundus Autofluorescence in the Developing and Maturing Healthy Eye. In: *Translational vision science & technology* 10 (2), S. 15. DOI: 10.1167/tvst.10.2.15.

Rando, R. R. (2001): The biochemistry of the visual cycle. In: *Chemical reviews* 101 (7), S. 1881–1896. DOI: 10.1021/cr960141c.

Regatieri, Caio V.; Branchini, Lauren; Duker, Jay S. (2011): The role of spectral-domain OCT in the diagnosis and management of neovascular age-related macular degeneration. In: *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye* 42 Suppl, S56-66. DOI: 10.3928/15428877-20110627-05.

Reichel, Clara; Berlin, Andreas; Radun, Victoria; Tarau, Ioana-Sandra; Hillenkamp, Jost; Kleefeldt, Nikolai et al. (2020): Quantitative Fundus Autofluorescence in Systemic Chloroquine/Hydroxychloroquine Therapy. In: *Translational vision science & technology* 9 (9), S. 42. DOI: 10.1167/tvst.9.9.42.

Reiter, Gregor Sebastian; Told, Reinhard; Baratsits, Magdalena; Hecht, Alexander; Schlanitz, Ferdinand Georg; Sacu, Stefan; Schmidt-Erfurth, Ursula (2019a): Repeatability and reliability of quantitative fundus autofluorescence imaging in patients with early and intermediate age-related macular degeneration. In: *Acta ophthalmologica* 97 (4), e526-e532. DOI: 10.1111/aos.13987.

Reiter, Gregor Sebastian; Told, Reinhard; Schlanitz, Ferdinand Georg; Bogunovic, Hrvoje; Baumann, Lukas; Sacu, Stefan et al. (2019b): Impact of Drusen Volume on Quantitative Fundus Autofluorescence in Early and

Intermediate Age-Related Macular Degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60 (6), S. 1937. DOI: 10.1167/iovs.19-26566.

Ren, Rex X.-F.; Sakai, Naomi; Nakanishi, Koji (1997): Total Synthesis of the Ocular Age Pigment A2-E. A Convergent Pathway. In: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (15), S. 3619–3620. DOI: 10.1021/ja9700414.

Reznicek, Lukas; Dabov, Simeon; Kayat, Bader; Liegl, Raffael; Kampik, Anselm; Ulbig, Michael; Kernt, Marcus (2014): Scanning laser 'en face' retinal imaging of epiretinal membranes. In: *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society* 28 (2), S. 134–138. DOI: 10.1016/j.sjopt.2014.03.009.

Rizzolo, Lawrence J.; Peng, Shaomin; Luo, Yan; Xiao, Wei (2011): Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. In: *Progress in retinal and eye research* 30 (5), S. 296–323. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.06.002.

Rückmann, A. von; Fitzke, F. W.; Bird, A. C. (1995): Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. In: *The British journal of ophthalmology* 79 (5), S. 407–412.

Ryan, Neil; Heneghan, Conor; Chazal, Philip de (2004): Registration of digital retinal images using landmark correspondence by expectation maximization. In: *Image and Vision Computing* 22 (11), S. 883–898. DOI: 10.1016/j.imavis.2004.04.004.

Sakai, Naomi; Decatur, John; Nakanishi, Koji; Eldred, Graig E. (1996): Ocular Age Pigment “A2-E”. An Unprecedented Pyridinium Bisretinoid. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (6), S. 1559–1560. DOI: 10.1021/ja953480g.

Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.

Schmitz-Valckenberg, Steffen; Holz, Frank G.; Bird, Alan C.; Spaide, Richard F. (2008): FUNDUS AUTOFLUORESCENCE IMAGING. In: *Retina* 28 (3), S. 385–409. DOI: 10.1097/IAE.0b013e318164a907.

Schuerch, Kaspar; Woods, Russell L.; Lee, Winston; Duncker, Tobias; Delori, François C.; Allikmets, Rando et al. (2017): Quantifying Fundus Autofluorescence in Patients With Retinitis Pigmentosa. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (3), S. 1843–1855. DOI: 10.1167/iops.16-21302.

Seagle, Brandon-Luke L.; Rezai, Kourous A.; Kobori, Yasuhiro; Gasyna, Elzbieta M.; Rezaei, Kasra A.; Norris, James R. (2005): Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (25), S. 8978–8983. DOI: 10.1073/pnas.0501971102.

Simó, Rafael; Villarroel, Marta; Corraliza, Lúdia; Hernández, Cristina; Garcia-Ramírez, Marta (2010): The retinal pigment epithelium. Something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, S. 190724. DOI: 10.1155/2010/190724.

Sohrab, Mahsa A.; Smith, R. Theodore; Salehi-Had, Hani; Sadda, Srinivas R.; Fawzi, Amani A. (2011): Image registration and multimodal imaging of reticular pseudodrusen. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (8), S. 5743–5748. DOI: 10.1167/iops.10-6942.

Spaide, Richard (2008): Autofluorescence from the outer retina and subretinal space: hypothesis and review. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 28 (1), S. 5–35. DOI: 10.1097/IAE.0b013e318158eca4.

Spaide, Richard F.; Klancnik, James M. (2005): Fundus autofluorescence and central serous chorioretinopathy. In: *Ophthalmology* 112 (5), S. 825–833. DOI: 10.1016/j.optha.2005.01.003.

Sparrow, J. R.; Boulton, M. (2005): RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. In: *Experimental eye research* 80 (5), S. 595–606. DOI: 10.1016/j.exer.2005.01.007.

Sparrow, J. R.; Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Nakanishi, K. (1999): A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 40 (12), S. 2988–2995.

Sparrow, Janet R.; Duncker, Tobias; Schuerch, Kaspar; Paavo, Maarjaliis; Carvalho, Jose Ronaldo Lima de (2020): Lessons learned from quantitative fundus autofluorescence. In: *Progress in retinal and eye research* 74, S. 100774. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100774.

Sparrow, Janet R.; Fishkin, Nathan; Zhou, Jilin; Cai, Bolin; Jang, Young P.; Krane, Sonja et al. (2003): A2E, a byproduct of the visual cycle. In: *Vision Research* 43 (28), S. 2983–2990. DOI: 10.1016/S0042-6989(03)00475-9.

Sparrow, Janet R.; Gregory-Roberts, Emily; Yamamoto, Kazunori; Blonska, Anna; Ghosh, Shanti Kaligotla; Ueda, Keiko; Zhou, Jilin (2012): The bisretinoids of retinal pigment epithelium. In: *Progress in retinal and eye research* 31 (2), S. 121–135. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.12.001.

Stattin, M.; Zehetner, C.; Bechrakis, N. E.; Speicher, L. (2015): Vergleich IOL-Master 500 vs. Lenstar LS900 hinsichtlich der Berechnung der Zielrefraktion: Eine retrospektive Analyse. In: *Der Ophthalmologe* 112 (5), S. 444–450. DOI: 10.1007/s00347-014-3143-8.

Steinberg, R. H. (1985): Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 60 (4), S. 327–346. DOI: 10.1007/BF00158922.

Stitt, A. W.; Moore, J. E.; Sharkey, J. A.; Murphy, G.; Simpson, D. A.; Bucala, R. et al. (1998): Advanced glycation end products in vitreous: Structural and functional implications for diabetic vitreopathy. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 39 (13), S. 2517–2523.

Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.

Titus, J. A.; Haugland, R.; Sharrow, S. O.; Segal, D. M. (1982): Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. In: *Journal of*

*immunological methods* 50 (2), S. 193–204. DOI: 10.1016/0022-1759(82)90225-3.

Told, R.; Baratsits, M.; Garhöfer, G.; Schmetterer, L. (2013): ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)-Visus. In: *Der Ophthalmologe* 110 (10), S. 960–965. DOI: 10.1007/s00347-013-2813-2.

van de Kraats, Jan; van Norren, Dirk (2007): Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV. In: *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision* 24 (7), S. 1842–1857.

van Norren, Dirk; van de Kraats, Jan (2007): Spectral transmission of intraocular lenses expressed as a virtual age. In: *The British journal of ophthalmology* 91 (10), S. 1374–1375. DOI: 10.1136/bjo.2007.117903.

van Velthoven, M. E. J.; Verbraak, F. D.; Garcia, P. M.; Schlingemann, R. O.; Rosen, R. B.; Smet, M. D. de (2005): Evaluation of central serous retinopathy with en face optical coherence tomography. In: *The British journal of ophthalmology* 89 (11), S. 1483–1488. DOI: 10.1136/bjo.2005.073056.

Vaz-Pereira, Sara; Monteiro-Grillo, Manuel; Engelbert, Michael (2020): Near-infrared reflectance imaging of neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. In: *Int J Retin Vitr* 6 (1), S. 59. DOI: 10.1186/s40942-020-00263-8.

Venkatesh, Pradeep; Sharma, Reetika; Vashist, Nagender; Vohra, Rajpal; Garg, Satpal (2015): Detection of retinal lesions in diabetic retinopathy: comparative evaluation of 7-field digital color photography versus red-free photography. In: *International ophthalmology* 35 (5), S. 635–640. DOI: 10.1007/s10792-012-9620-7.

Vlassara, H.; Palace, M. R. (2002): Diabetes and advanced glycation endproducts. In: *Journal of internal medicine* 251 (2), S. 87–101. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x.

Warrant, Eric J.; Nilsson, Dan-E. (1998): Absorption of white light in photoreceptors. In: *Vision Research* 38 (2), S. 195–207. DOI: 10.1016/S0042-6989(97)00151-X.

Webb, Robert H.; Hughes, George W.; Delori, Francois C. (1987): Confocal scanning laser ophthalmoscope. In: *Appl. Opt.*, AO 26 (8), S. 1492. DOI: 10.1364/AO.26.001492.

Weiter, J. J.; Delori, F. C.; Wing, G. L.; Fitch, K. A. (1986): Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 27 (2), S. 145–152.

Wing, G. L.; Blanchard, G. C.; Weiter, J. J. (1978): The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 17 (7), S. 601–607.

Xu, Qian; Li, Ying; Cheng, Ying; Qu, Yi (2018): Assessment of the effect of age on macular layer thickness in a healthy Chinese cohort using spectral-domain optical coherence tomography. In: *BMC ophthalmology*, S. 169. DOI: 10.1186/s12886-018-0842-y.

Yakovleva, Marina A.; Radchenko, Alexandra Sh; Feldman, Tatiana B.; Kostyukov, Alexey A.; Arbukhanova, Patimat M.; Borzenok, Sergey A. et al. (2020): Fluorescence characteristics of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium. In: *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 19 (7), S. 920–930. DOI: 10.1039/c9pp00406h.

Yin, Dazhong (1996): Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. In: *Free Radical Biology and Medicine* 21 (6), S. 871–888. DOI: 10.1016/0891-5849(96)00175-X.

Yung, Madeline; Klufas, Michael A.; Sarraf, David (2016): Clinical applications of fundus autofluorescence in retinal disease. In: *Int J Retin Vitr* 2 (1), S. 718. DOI: 10.1186/s40942-016-0035-x.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

a. u.	arbitrary units; willkürliche Einheiten
AGEs	Advanced Glycation End Products
AF	Autofluoreszenz
AF488	Autofluoreszenz mit der Anregungswellenlänge $\lambda=488\text{nm}$
AF787	Nahinfrarotautofluoreszenz; Anregungswellenlänge $\lambda=787\text{nm}$
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
ANSI	American National Standards Institute
AZOOOR	akute zonale okkulte äußere Retinopathie
B-Scan	hier: Bilddarstellung eines OCT-Schnitts in 2D (Z und X-Achse) (B = Brightness: „Helligkeit“)
cSLO	konfokales Scanning-Laser-Ophthalmoskop
CNV	choroidale Neovaskularisationen
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FAF	Fundusautofluoreszenz
HRA	Heidelberg Retina Angiograph
IR	Infrarot
LF	Lipofuszin
OCT	optische Kohärenztomographie
ONH	optic nerve head = Sehnervenkopf, Papille
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
QAF	quantitative Autofluoreszenz

RPE	retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung
SD-OCT	spectral-domain optische Kohärenztomographie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **II Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau und Funktion des retinalen Pigmentepithels.....	1
<b>Abbildung 2:</b> Sehzyklus und Entstehung von Lipofuszin und A2E.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Physiologisches Fundusautofluoreszenzbild .....	8
<b>Abbildung 4:</b> Orangene interne Referenzprobe zur Bestimmung der QAF.....	14
<b>Abbildung 5:</b> Gemittelttes QAF-Bild einer gesunden 19-jährigen Probandin ...	15
<b>Abbildung 6:</b> Arbeitsablauf zur Bildregistrierung, Bildstapelerstellung und Bestimmung der Fovea.....	21
<b>Abbildung 7:</b> Übersicht über die QAF-Analysemuster (ETDRS-, Delori- und QAF97-Muster).....	25
<b>Abbildung 8:</b> Mittlere QAF-Intensität des QAF8-Analysebereichs, des QAF97-Analysemusters und des QAF-Fovea-Segments.....	31
<b>Abbildung 9:</b> Farbcodierte QAF-Standardretinakarten der sechs Altersdekaden, QAF-Hotspots und Segmente mit der höchsten QAF-Intensität	36
<b>Abbildung 10:</b> Patientenbeispiel 1 .....	39
<b>Abbildung 11:</b> Patientenbeispiel 2, Teil 1 .....	43
<b>Abbildung 12:</b> Patientenbeispiel 2, Teil 2 .....	46
<b>Abbildung 13:</b> Patientenbeispiel 3 .....	49

### **III Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Verteilung der Studienpopulation nach Dekade, Altersbereich, Alter, Probandenzahl und Geschlecht.....	12
<b>Tabelle 2:</b> Änderung der QAF-Werte durch den Transmissionsfaktor mit zunehmendem Lebensalter .....	27
<b>Tabelle 3:</b> Mittelwerte der QAF-Intensität und Standardabweichungen der Analysebereiche der verschiedenen Altersdekaden .....	32
<b>Tabelle 4:</b> Änderungen der QAF-Intensität in QAF-Einheiten und in Prozent zwischen den Lebensdekaden.....	32
<b>Tabelle 5:</b> QAF-Intensitäten $\pm$ Standardabweichung für Patientenbeispiel 1 ...	40
<b>Tabelle 6:</b> QAF-Intensitäten $\pm$ Standardabweichung für Patientenbeispiel 2 ...	45

## **IV Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Privatdozenten Dr. Thomas Ach für die sehr gute Betreuung der Arbeit, die ständige Unterstützung und Hilfestellungen, die diese Arbeit erst ermöglichten und mich persönlich als auch fachlich geprägt und geformt haben.

Herrn Prof. Dr. Jost Hillenkamp und Frau Prof. Dr. Barbara Braunger danke ich für die Unterstützung, die sehr gute Betreuung und die außergewöhnliche Möglichkeit an weiteren spannenden Forschungsprojekten mitarbeiten zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Kenneth Sloan, der die Entwicklung der Analyseplugins durchführte, für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Ohne ihn wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Katharina Bermond, Herrn Dr. Andreas Berlin und Frau Dr. Ioana Tarau. Ohne ihre großartige Unterstützung wäre die klinische Durchführung der Studie nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich auch ausdrücklich bei der Dr.-Friedrich-Amend-Stiftung für die Förderung, Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und besonders bei meinen Eltern, meinen Schwiegereltern, meinem Bruder und meiner Frau Viktoria für die großartige Unterstützung bedanken, ohne die diese Promotion und mein Studium nicht möglich gewesen wäre! Deswegen widme ich diese Arbeit meiner Familie.

## V Lebenslauf



## VI Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

### Wissenschaftliche Publikationen:

**Nikolai Kleefeldt**, Katharina Bermond, Ioana-Sandra Tarau, Jost Hillenkamp, Andreas Berlin, Kenneth R. Sloan, Thomas Ach; Quantitative Fundus Autofluorescence: Advanced Analysis Tools. *Trans. Vis. Sci. Tech.* 2020;9(8):2. doi: <https://doi.org/10.1167/tvst.9.8.2>

Carla Pröbster, Ioana-Sandra Tarau, Andreas Berlin, **Nikolai Kleefeldt**, Jost Hillenkamp, Martin M. Nentwich, Kenneth R. Sloan, Thomas Ach; Quantitative Fundus Autofluorescence in the Developing and Maturing Healthy Eye. *Trans. Vis. Sci. Tech.* 2021;10(2):15. doi: <https://doi.org/10.1167/tvst.10.2.15>

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>

### Vorträge:

Thomas Ach, Ioana-Sandra Tarau, Andreas Berlin, **Nikolai Kleefeldt**, Kenneth R. Sloan, Carla Pröbster: Quantitative fundus autofluorescence in the maturing healthy eye, Macula Society, virtual meeting 2021

Thomas Ach; **Nikolai Kleefeldt**; Carla Pröbster; Ioana S Tarau; Katharina Bermond; Clara Reichel; Kenneth R Sloan: Quantified fundus autofluorescence (QAF) imaging – the use of age-related standard retinas and improved methods for analysis, Investigative Ophthalmology & Visual Science August 2019, Vol.60, PB0179.

Clara Reichel; Ioana-Sandra Tarau; **Nikolai Kleefeldt**; Jost Hillenkamp; Kenneth R Sloan; Thomas Ach: Quantified fundus autofluorescence (QAF) in patients with systemic chloroquin/hydroxychloroquin (CQ/HCQ) intake, Investigative Ophthalmology & Visual Science July 2019, Vol.60, 1585.

Carla Pröbster; Ioana-Sandra Tarau; **Nikolai Kleefeldt**; Jost Hillenkamp; Martin M. Nentwich; Kenneth R Sloan; Thomas Ach: Quantified fundus autofluorescence (QAF) in healthy children and adolescents, Investigative Ophthalmology & Visual Science July 2019, Vol.60, 1600.

Andreas Berlin, Clara Reichel, Ioana-Sandra Tarau, **Nikolai Kleefeldt**, Jost Hillenkamp (Würzburg), Kenneth R. Sloan (Birmingham, USA), Thomas Ach (Würzburg): Quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF) bei Patienten mit systemischer Chloroquin/Hydroxychloroquin (CQ/HCQ)-Einnahme, Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2019

Thomas Ach, Carla Pröbster, Ioana-Sandra Tarau, Andreas Berlin, **Nikolai Kleefeldt**, Jost Hillenkamp, Martin Nentwich (Würzburg), Kenneth R. Sloan (Birmingham, USA): Entwicklung der Fundusautofluoreszenz im Kindes- und Jugendalter, Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2019

Ioana-Sandra Tarau, **Nikolai Kleefeldt**, Jost Hillenkamp (Würzburg), Kenneth R. Sloan (Birmingham, USA), Thomas Ach (Würzburg): Einfluss einer Katarakt auf die Fundusautofluoreszenz-Intensität, Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2019

**Nikolai Kleefeldt**, Katharina Bermond (Würzburg), Kenneth R. Sloan (Birmingham, USA), Thomas Ach (Würzburg): Quantified fundus autofluorescence – normative database and methods for in-depth analysis of the healthy and diseased retina, Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2018

Thomas Ach, Katharina Bermond, Kenneth R. Sloan, **Nikolai Kleefeldt**: Quantified Fundus Autofluorescence – Improved Methods for In-Depth Analysis of the Healthy and Diseased Retina, 16th International SPECTRALIS® Symposium (ISS) 2018