

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

Direktor: Professor Dr. med. Jost Hillenkamp

**Quantitative Fundusautofluoreszenz des sich entwickelnden und
reifenden Auges**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carla Pröbster

aus Wiesbaden

Würzburg, April 2022

Referent: Priv.- Doz. Dr. med. Thomas Ach

Koreferent: Professor Dr. med. Kai Schuh

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Literaturübersicht	3
1.1.1	Anatomie, Physiologie und altersabhängige Veränderung der Netzhaut	3
1.1.2	Bildgebungsverfahren	12
1.2	Fragestellung und Zielsetzung	28
2	Probanden und Methoden	29
2.1	Probanden	29
2.1.1	Ethikvotum	29
2.1.2	Einschlusskriterien	29
2.1.3	Ausschlusskriterien	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Allgemeine ophthalmologische Untersuchung	30
2.2.2	Bildgebungsprozess	30
2.3	Bild- und Datenverarbeitung	32
2.3.1	Allgemeine Daten	32
2.3.2	Heidelberg Eye Explorer	33
2.3.3	Export der Bilddateien	33
2.3.4	Bildverarbeitungsprogramm Fiji	33
2.3.5	Berechnung und Kalibrierung des QAF-Bildes	33
2.3.6	Markierung anatomischer Landmarken im SD-OCT und IR-Bild	34
2.3.7	Erstellung eines multimodalen Bildstapels (stack)	35
2.3.8	Analysemuster (grids)	36
2.3.9	Erstellung von Standardretinae	38
2.3.10	Retina Dickenmessungen	39
2.4	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Zusammensetzung der Kohorte	42
3.2	QAF	44
3.2.1	Qualitative Deskription der Fundusautofluoreszenz	44
3.2.2	QAF8	45
3.2.3	QAF97	46
3.2.4	QAF der Fovea	48

3.2.5	Standardretinae	51
3.3	Korrelation von SD-OCT-Dickenmessungen retinaler Schichtdicken und QAF	53
3.3.1	Horizontaler Meridian.....	53
3.3.2	Alter und Korrelation der retinalen Dicken des horizontalen Meridians	60
3.3.3	ETDRS.....	61
4	<i>Diskussion</i>	66
4.1	Diskussion der Methodik	66
4.2	Diskussion der Ergebnisse	70
4.2.1	QAF	70
4.2.2	Netzhautdicken	76
4.2.3	QAF und Netzhautdicken.....	79
4.2.4	Ausblick	79
5	<i>Zusammenfassung</i>	81
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	82
I.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	
II.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	
III.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	
IV.	<i>Danksagung</i>	
V.	<i>Lebenslauf</i>	
VI.	<i>Publikationen</i>	

1 Einleitung

Die Fundusautofluoreszenz (FAF) ist eine nicht-invasive, schnelle und etablierte Bildgebungstechnik des Augenhintergrunds und dient der Diagnostik wie Therapiekontrolle von Netzhauterkrankungen (1). Dazu gehören zum Beispiel erbliche Erkrankungen wie Morbus Stargardt, Retinitis Pigmentosa, vitelliforme Makuladystrophie oder auch altersassoziierte Erkrankungen wie die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) (2-4).

Die Fundusautofluoreszenz hat ihren Ursprung in Fluorophoren (Bisretinoide und andere bisher unbekannte Bestandteile) der äußeren Retina (Photorezeptoren, retinales Pigmentepithel) (5, 6). Einen großen Beitrag leistet dazu das retinale Pigmentepithel (7). In mehreren histologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Lipofuszin- und Melanolipofuszingranula hauptverantwortlich für das FAF-Signal sind (7, 8). Die große Mehrheit dieser Granula akkumuliert in den RPE-Zellen ab der zweiten Lebensdekade und sind bis in das hohe Lebensalter nachweisbar (8). Umfassende Daten über ihre Akkumulation im kindlichen und jugendlichen Auge sind jedoch rar. Wie sich der Gehalt an autofluoreszierenden Granula der RPE-Zelle in den ersten Lebensdekaden ändert, ist weitgehend unbekannt.

Die Fundusautofluoreszenz-Bildgebung erlaubte zunächst nur qualitative Aussagen über die Autofluoreszenzsignale des Fundus. Quantitative Aussagen waren auf Grund technischer Einschränkungen, wie variabler Laserstärken, abweichender Detektorsensitivitäten oder wechselnder äußerer Belichtungen, nicht zu treffen.

Im Jahr 2011 wurde von Delori et al. ein klinisch-experimentelles Messsystem zur quantitativen Erfassung der Fundusautofluoreszenz eingeführt, die sogenannte quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF) (5). Sie ermöglicht quantitative Messungen von QAF-Intensitäten und damit longitudinale Beobachtungen sowie auch den Vergleich von Individuen (5).

EINLEITUNG

Bis jetzt wurde nur von wenigen QAF-Messungen bei Kindern kaukasischer Ethnie berichtet (9). Das Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung der QAF bei augengesunden Kindern und Jugendlichen zu untersuchen. Diese Daten werden neue Erkenntnisse zur frühen Entwicklung der Fundusautofluoreszenz liefern, die indirekt Rückschlüsse auf Stoffwechselfvorgänge in der äußeren Netzhaut zulassen. Der Wissensgewinn zur physiologischen Fundusautofluoreszenz bei Kindern und Jugendlichen wird schließlich helfen, pathologische Veränderungen am Augenhintergrund, die auch die Autofluoreszenz beeinflussen, zu detektieren und abzugrenzen.

1.1 Literaturübersicht

1.1.1 Anatomie, Physiologie und altersabhängige Veränderung der Netzhaut

Die in bisherigen Arbeiten beschriebenen Veränderungen der Fundusautofluoreszenz mit dem Alter legen nahe, dass diese mit Alterungsprozessen in Retina und RPE zusammenhängen. Deswegen wird hier ein Überblick über die beteiligten anatomischen Strukturen, ihre Entwicklung und Alterung gegeben.

1.1.1.1 Neuroretina

Die Netzhaut (Retina) dient der Sinneswahrnehmung von Lichtreizen. Sie ist ihrer Herkunft nach ein frontal vorgelagerter Hirnabschnitt. Während der komplexen embryonalen Entwicklung bilden sich aus den zwei Augenbläschen, die Ausstülpungen des Prosencephalons sind, die doppelwandigen Augenbecher (10). Die Augenbecher umfassen dabei ein inneres und äußeres Blatt (10), wobei sich das äußere Blatt zum RPE (Stratum pigmentosum), das innere Blatt zur neuronalen Retina mit Photorezeptoren, Interneurone und Ganglienzellen (10) weiter entwickelt. Die reife Retina zählt vom RPE bis zur Membrana limitans externa zehn Schichten (10). Ihre Histologie ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Die Photorezeptoren sind die Sinnesrezeptorzellen der Retina, die durch Licht angeregt werden. Sie lassen sich in Stäbchen und Zapfen einteilen. 120 Millionen Stäbchen nehmen Helligkeitsunterschiede wahr (skotopisches Sehen) (10), die rund 6 Millionen Zapfen dienen der Farb- und Helligkeitswahrnehmung (photopisches Sehen).

EINLEITUNG

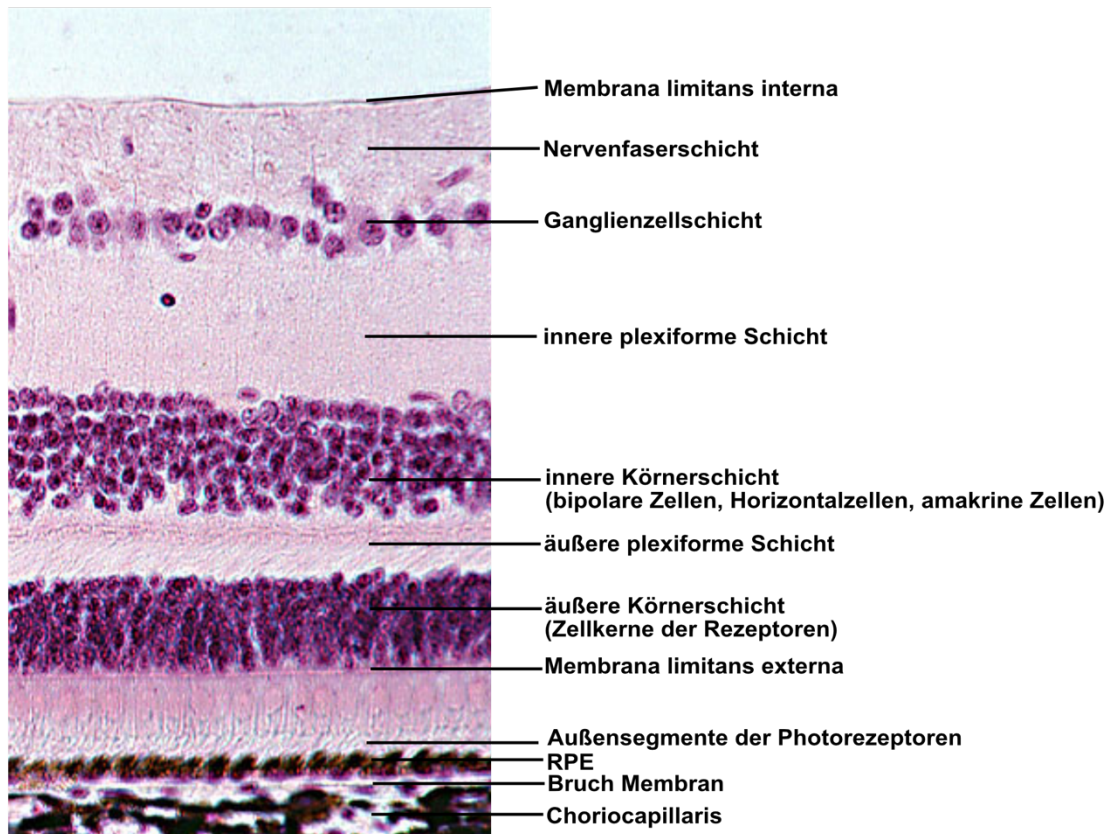


Abbildung 1: Histologie der Retina

Das histologische Präparat zeigt einen mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung aufgearbeiteten Schnitt durch die Retina im Bereich der Perifovea. Die zehn Schichten der Retina (RPE bis Membrana limitans externa) sowie die Bruch Membran als auch die Choriokapillaris sind markiert.

(RPE: retinales Pigmentepithel)

Nachdruck mit Erlaubnis. © Ph.D. Michael J. Werle (University of Kansas Medical Center)

Stäbchen und Zapfen sind unterschiedlich verteilt. Die Zapfen sind in der Makula lutea zu finden und haben ihre größte Dichte (> 150.000 je mm^2) in der Fovea centralis in einem Radius von etwa $500\mu\text{m}$ (11). Im Bereich der Fovea sind die Neurone der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht nach peripher verlagert, sodass eine trichterförmige Einsenkung entsteht.

Die Signale eines zentralen Zapfens werden auf mindestens zwei Ganglienzellen projiziert (ON- und OFF-Ganglienzellen) (11). Mit zunehmender Exzentrizität von der Makula nimmt die Zelldichte der Zapfen ab. Die Zelldichte der Stäbchen nimmt exzentrisch der Fovea zu, wobei die Fovea komplett Stäbchen-frei ist.

EINLEITUNG

Die Photorezeptoren bestehen aus einem Sinnesfortsatz, dem Perikaryon und dem axonalen Fortsatz (10). Der Sinnesfortsatz besteht aus einem Innen- und einem Außensegment, die über das Zilium verbunden sind. Die Außensegmente enthalten die Sehpigmente. Diese sind bei den Stäbchen in intrazelluläre Membranscheiben eingelagert und bei den Zapfen in Falten der Plasmamembran. Die Außensegmente werden kontinuierlich erneuert. Dabei werden die zum RPE zugewandten Membranen abgeschilfert und vom RPE über Phagozytose aufgenommen (12).

Die Zelleiber der Photorezeptoren sind dabei von Ausläufern der Müller-Zellen umgeben, retinalen Gliazellen, die eine Sonderform der Astroglia darstellen (10). Müller-Zellen, deren Zelleiber in der inneren Körnerzellschicht liegen, durchspannen die neuronale Retina. In der Fovea bilden Müller-Zellen den Müller-Zell-Konus, der für die Integrität und korrekte Funktionsweise der Fovea auch klinisch von Bedeutung ist (13, 14). Müller-Zellen liefern Vitamin-A-Derivate an die Zapfen, die für den Phototransduktionsprozess benötigt werden (15).

Mit steigendem Alter nimmt die Stäbchendichte bei einer Exzentrizität von 0,5 bis 3 mm um ungefähr 30 Prozent ab. Die Zapfendichte bleibt mit dem Alter stabil (16).

1.1.1.2 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein einschichtiges Epithel aus polygonalen Zellen und wird als postmitotisch betrachtet (17, 18). Die RPE-Zellen sind polar aufgebaut: apikal finden sich Mikrovilli und Mikroplicae, mit denen sie die Außensegmente der Photorezeptoren umschließen (19), basal steht das RPE über die Bruch Membran in Kontakt mit den darunter liegenden fenestrierten Kapillaren der Lamina choriocapillaris (17). Die Verbindungen zwischen den RPE-Zellen (*junctional zones*) bilden die äußere Blut-Retina-Schranke (10).

Das RPE übernimmt eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben, die entscheidend für die Funktion der Retina sind (**Abb. 2**). Es nimmt nutritive und metabolische

EINLEITUNG

Stoffe wie Fettsäuren, Retinoide und Glukose zur Versorgung der Photorezeptoren aus der Lamina choriocapillaris auf (19) und transportiert Ionen, Wasser, metabolische Endprodukte des subretinalen Raums zum Blutstrom ab (20-22). Das RPE hält die Ionenkonzentration im subretinalen Raum konstant und sorgt damit für eine gleichbleibende Erregbarkeit der Photorezeptoren (20). Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren trägt das RPE zur strukturellen Stabilität des Gefäßendothels der Lamina choriocapillaris und der Photorezeptoren bei (19). Die Ausschüttung von immunsuppressiven Faktoren ist entscheidend für das Immunprivileg des Auges (23).

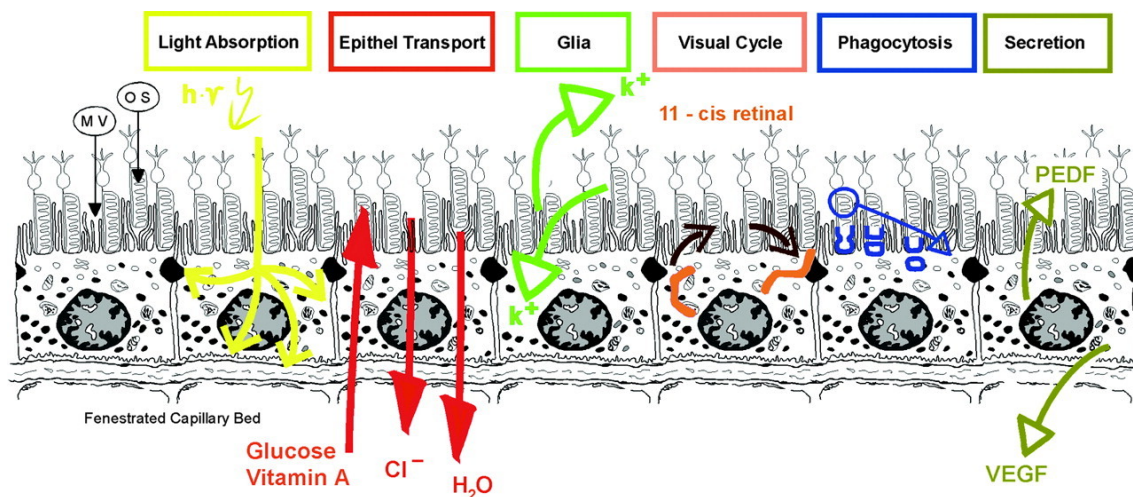


Abbildung 2: Funktionen des RPE

(PEDF: pigment epithelium-derived growth factor, VEGF: vascular epithelium growth factor)

Nachdruck mit Genehmigung. © The American Physiological Society, vermittelt durch das Copyright Clearance Center, Abbildung aus: Strauß et al., 2005 (19)

Für den Sehvorgang ist insbesondere die Aufnahme und Verarbeitung von Retinal wichtig. Durch die Absorption eines Photons ändert sich die Konformation von 11-cis-Retinal, als Bestandteil des Sehpigments der Photorezeptoren, zu all-trans-Retinal (24). Um eine erneute Aktivierung zu ermöglichen muss all-trans-Retinal wieder in 11-cis-Retinal überführt werden (25). In den Photorezeptoren wird keine dafür erforderliche Re-Isomerase exprimiert, jedoch im RPE, welches Photorezeptoraußensegmente phagozytiert und die Bestandteile intrazellulär prozessiert (26, 27).

EINLEITUNG

Der Austausch des Retinals, dessen Konformationsänderungen und Regeneration wird als „Sehzyklus“ bezeichnet.

Bei diesem Prozess kommt es auch zur Ansammlung von nicht-abbaubarem Material, was sich in Lysosomen als Lipofuszin in den Zellen des RPEs anreichert. Eine RPE-Zelle enthält mehrere hundert Lipofuszin-Granula (28, 29), zusätzlich finden sich Melanolipofuszin-Granula und Melanosomen (30). Diese sind wichtig für die autofluoreszierenden Eigenschaften der RPE Zellen (28 - 30).

1.1.1.2.1 Granula des retinalen Pigmentepithels

Im menschlichen Auge wird das Licht durch die Linse auf die Netzhaut gebündelt. Daraus resultiert eine hohe Dichte photooxidativer Energie in der Retina (31). Dieser Faktor in Kombination mit der kontinuierlichen Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente führt zu einer hohen oxidativen Stressbelastung des RPEs. Ein Schutzfaktor des RPE ist sein Melanosomenreichtum. Diese sphärisch und spindelförmigen Organellen liegen vornehmlich in den apikalen Anteilen der RPE-Zellen, den apikalen Fortsätzen und ihrer Mikrovilli (32). Ihr Pigment, das Melanin, absorbiert Licht (33). Durch die Absorption von Licht werden Lichtreflexionen vermindert, damit Streulicht reduziert und die Bildqualität des optischen Systems verbessert (34). Bei Anregung mit kurzwelligem blauem Licht wirken Melanosomen lichtblockierend. Bei Anregung im Licht des Nahinfrarotbereichs werden autofluoreszierende Eigenschaften diskutiert (35). Die höchste Melanosomendichte ist in der Fovea zu finden, dabei zeigt sich jedoch eine hohe Variabilität der Melaningranuladichte zwischen Individuen (8, 30).

Neben Melanosomen finden sich im RPE Lipofuszin- und Melanolipofuszingranula (**Abb. 3 u. 4**). Beide zeigen autofluoreszierende Eigenschaften nach Anregung mit kurzwelligem Licht (36).

Lipofuszingranula haben einen Durchmesser von ungefähr 1 µm und liegen im basolateralen Zytoplasma der RPE-Zellen (29, 30). Sie enthalten nicht-verdaubare autofluoreszierende Endprodukte der Photorezeptoraußensegment-

EINLEITUNG

Phagozytose und der Autophagozytose (12, 30, 37). Lipofuszin autofluoresziert bei Anregung mit Wellenlängen von 440 bis 700 nm und besitzt damit ein breites Exzitationsspektrum. Es trägt wesentlich zur Fluoreszenz der Retina bei (38).

Die Lipofuszin- und Melanolipofuszingranuladichte des RPEs ist abhängig von der retinalen Lokalisation (29, 30). In der Fovea dominiert Melanolipofuszin. In der Perifovea sind Lipofuszingranula in der Überzahl und in der nahen Peripherie sind Melanolipofuszin- und Lipofuszingranula in ungefähr gleichen Anteilen vorhanden (29).

Das Lipofuszin besteht hauptsächlich aus Fetten und zu weniger als zwei Prozent aus Proteinen (39). Hauptfluorophor sind Bis-Retinoide als Beiprodukt des Sehzyklus (40, 41).

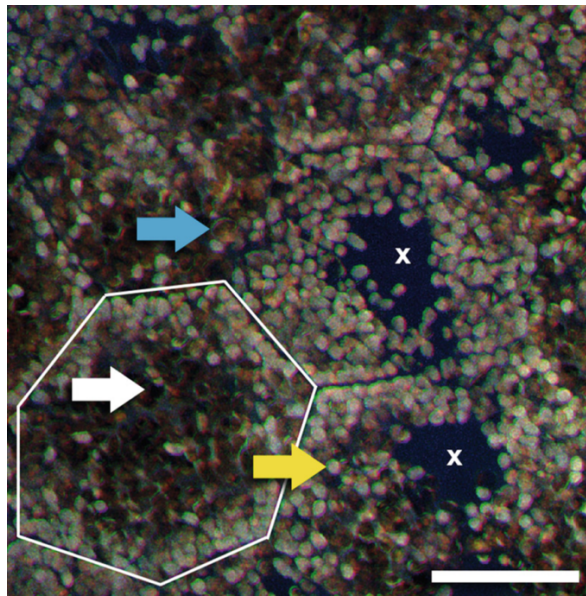


Abbildung 3: Autofluoreszierende Granula in RPE-Zellen

RPE-Zellen sind von der Form polygonal (beispielhaft ist eine weiß umrandet) und beherbergen verschiedene Granulatypen in ihren Zellkörpern: Melanosomen (weißer Pfeil, keine Fluoreszenz), Lipofuszin-Granula (gelber Pfeil, autofluoreszierende Granula) und Melanolipofuszin-Granula (blauer Pfeil, Granula mit reduzierter Fluoreszenz). Die Zellkerne sind nicht autofluoreszierend (x, granulafreie Areale). Aufnahme mittels strukturierter Beleuchtung, Anregung 488 nm; Spender: 82 Jahre, keine retinalen Veränderungen; Maßstab: 10 μ m.

Nachdruck mit Genehmigung. © Georg Thieme Verlag KG, Abbildung aus: Ach et al. 2017 (43). Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc. vermittelt.

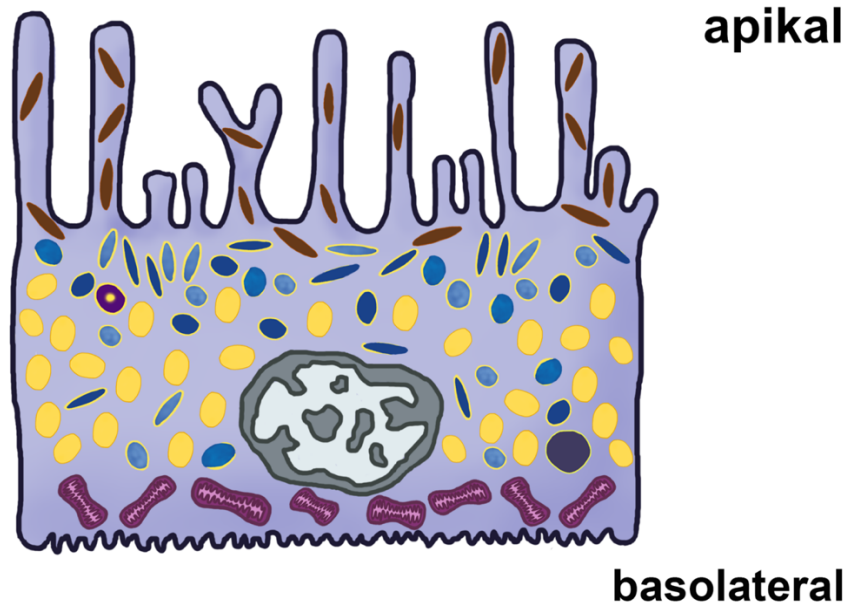


Abbildung 4: Intrazelluläre Granulaverteilung in einer RPE-Zelle

Die schematische Abbildung einer RPE-Zelle zeigt die intrazelluläre Verteilung der Granula. Lipofuszin: gelb, Melanolipofuszin: blau, Melanosom: braun, Nukleus: grau, Mitochondrien: violett.

Nachdruck mit Genehmigung. © Association for Research in Vision & Ophthalmology. Abbildung modifiziert nach: Bermond et al. (29). Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc. vermittelt.

Die Verteilung der intrazellulären Organellen des RPEs verändert sich mit dem Lebensalter. Autofluoreszierende Granula konnten histologisch in geringer Zahl bereits im ersten Lebensjahr nachgewiesen werden (8, 44). Mit dem Alter steigt die Anzahl der Lipofuszin- und Melanolipofuszingranula und das durch sie eingenommene Zellvolumen (8). Es wird diskutiert, ob Melanolipofuszingranula ein Intermediärstadium zwischen Melanosomen und Lipofuszingranula darstellen (29). Dies könnte mit photooxidativen Prozessen zusammenhängen und eine Erklärung für die Abnahme der Melanosomendichte mit steigendem Lebensalter sein (8, 29).

Die Zellen des RPE variieren in ihrer Morphologie über den Fundus hinweg. In der Makularegion sind die Zellen klein, meist hexagonal und mononukleär (43,

EINLEITUNG

45). In der Perifovea tragen ungefähr zehn Prozent der Zellen einen binukleären Zellkern (45).

Ach et al. zeigten an humanen RPE-Flatmounts eine hohe RPE-Zelldichte in der stäbchenreichen Perifovea und eine exzentrische Abnahme zur Peripherie (7). Diese und eine Arbeit von Gao und Hollyfield zeigten eine stabile foveale RPE-Zellzahl im Alter, auch die extrafoveale RPE-Zelldichte blieb stabil (7, 46). Währenddessen nahm durch die vermehrte Lipofuszinakkumulation das Fundusautofluoreszenzsignal mit steigendem Alter zu (7). Bei RPE-Zellen von Spendern in höherem Lebensalter (über 80 Jahre) konnte beobachtet werden, dass sie autofluoreszierende Granula ausschleusten und damit das Autofluoreszenzsignal wieder abnahm (7).

1.1.1.3 Lipofuszin des retinalen Pigmentepithels

Als postmitotisches Gewebe ist die lebenslange Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten des RPE eine außerordentliche Leistung. Dabei kommt es zu einer Lipofuszinakkumulation mit steigendem Lebensalter (44). Die fluoreszierenden Eigenschaften des Lipofuszins erlauben mittels konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (weitere Erläuterung zur Methodik in Kapitel 1.1.2.2) *in vivo* Rückschlüsse auf das RPE zu ziehen. So können pathologische Prozesse des RPE beobachtet werden, die zu Veränderungen des Fundusautofluoreszenzmusters mit verminderten oder verstärkten Signalen führen (55). Zu den Netzhauterkrankungen, die mittels Fundusautofluoreszenz beobachtet werden, gehören zum Beispiel Morbus Stargardt, Morbus Best, Retinitis pigmentosa und die AMD (3, 4, 56-59)

Es wird intensiv diskutiert, ob Lipofuszin an sich zytotoxische Eigenschaften auf das RPE hat (37, 60). Eine vermehrte Akkumulation von Lipofuszin in Fotorezeptoraußensegmenten und RPE kann bei Netzhauterkrankungen mit Assoziationen zu Mutationen im ABCA4-Gen beobachtet werden. Zu diesen Erkrankungen gehören Morbus Stargardt, Retinitis pigmentosa und Zapfen-Stäbchen-Dystrophien (61, 62). Im Mausmodell konnte bei ABCA4-Mutationen

EINLEITUNG

eine vermehrte Akkumulation von Bisretinoiden des Lipofuszins gezeigt werden (63, 64). Klinisch kann die vermehrte Lipofuszinakkumulation über die FAF beobachtet werden. So zeigen in-vivo-Fundusautofluoreszenzmessungen bei Morbus-Stargardt-Patienten erhöhte FAF-Werte (2). Bei QAF-Messungen zeigen Patienten mit ABCA4-Mutationen im Vergleich zum Normalkollektiv erhöhte QAF-Werte (65) und erlauben die Differenzierung zwischen ABCA4- und nicht-ABCA4-assoziierten Erkrankungen (66).

In der Pathophysiologie der altersabhängigen Makuladegeneration scheint die Rolle des Lipofuszins unklarer. Mit dem Alter, bisher der Hauptrisikofaktor der AMD, steigt die LipofuszinKonzentration im RPE, die Zellzahl des RPE bleibt hingegen konstant (7). Daten über den Zusammenhang der Fundusautofluoreszenz (ausgehend von RPE-Lipofuszin) und AMD-Progression sind widersprüchlich (3, 67-69). Histologische Arbeiten über die LipofuszinKonzentration in der Pathogenese der AMD zeigen keinen direkten Einfluss oder sehen sie nicht als Ausdruck einer retinalen Dysfunktion (7).

Zusammenfassend bleibt nach derzeitigem Forschungsstand die Rolle des Lipofuszins bei Netzhauterkrankungen nicht hinreichend beantwortet. Seine fluoreszierenden Eigenschaften erlauben aber die Beobachtung des RPE bei Gesunden wie Kranken und ermöglichen Diagnostik und Therapiekontrollen bei oben erwähnten Pathologien.

1.1.1.4 Bruch Membran

Die Bruch Membran ist ein komplexes Gefüge aus extrazellulärer Matrix zwischen der Retina und der Choroidea mit einer Dicke von 2 - 4 μm (47, 48). Nach Hogan wird sie in fünf Schichten unterteilt: RPE-Basallamina, innere Kollagenschicht, elastische Schicht, äußere Kollagenschicht und Basallamina der Choriocapillaris (49). Neuerdings wird diskutiert, dass nur innere Kollagenschicht, elastische Schicht, äußere Kollagenschicht als Bruch Membran gewertet werden (50).

EINLEITUNG

In der sechsten bis siebten Gestationswoche bildet sich die Bruch Membran aus ektodermalem, die innere Schicht bildend, und mesodermalem Gewebe, das zur äußeren Schicht wird (51). In ihrer weiteren Entwicklung ist die Bruch Membran abhängig von induktiven Signalen des RPEs (50).

Die Bruch Membran übernimmt essenzielle Funktionen für die Integrität des RPE und der Choriodea. Zum einen besitzt sie auf Grund ihrer Elastizität mechanische Eigenschaften, die es ihr ermöglichen, sich an Änderungen des Augendrucks anzupassen und möglicherweise zur Akkomodation beizutragen (52). Zum anderen ist sie als Gefäßwand der Choroidea am komplexen Transportsystem zwischen Choroidea und RPE beteiligt. Zum RPE erfolgt der Transport von Sauerstoff, Elektrolyten, Zytokinen und Nährstoffen für die äußere Retina. Lipoproteine und Wasser des subretinalen Raums werden über die Bruch Membran abtransportiert (50).

Mit steigendem Lebensalter kommt es zur Kalzifizierung und Lipidakkumulation in der Bruch Membran und damit zu einer Einschränkung von Transportprozessen (50, 53, 54).

1.1.2 Bildgebungsverfahren

1.1.2.1 Optische Kohärenztomographie

Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT) handelt es sich um ein mehrdimensionales, nicht invasives optisches Bildgebungsverfahren. Nach Vorarbeiten von unter anderen Fercher et al. (70) und Youngquist et al. (71), veröffentlichten Huang et al. die Technik der optischen Kohärenztomographie 1991 (72). Die OCT beruht im Prinzip auf der Reflexion einer Lichtwelle in einer Probe und deren Detektion. Für die OCT wird niedrig-kohärentes Licht im Nah-Infrarot-Bereich verwendet (72). Die kurze Wellenlänge des Lichts (um 800 nm) ermöglicht eine hohe Auflösung (72). Jedoch sind auch die Laufzeitunterschiede sehr klein. Sie bewegen sich im Sub-Picosekunden-Bereich (73). Damit können

EINLEITUNG

sie nicht mehr elektronisch detektiert werden, sondern müssen interferometrisch gemessen werden.

Basis des Messprinzips ist das Michelson-Interferometer (**Abb. 5**). Der Lichtstrahl einer Superlumineszenzdiode wird auf einen Strahlenteiler gerichtet. Dieser teilt das Licht in zwei Strahlen auf. Einer der Strahlen wird auf die Probe, der andere ist auf die Referenz, einen Spiegel, gerichtet. Sowohl an der Probe als auch am Spiegel werden die Strahlen reflektiert. Ihre Überlagerungen werden dann im Detektor aufgezeichnet. Der generierte Schnitt entsteht entlang der in die Probe einfallenden Strahlen, also in axialer Richtung. Der Schnitt wird deswegen als Axial-Scan, kurz A-Scan, bezeichnet. Wird der Lichtstrahl weiter transversal über die Probe geführt, werden weitere A-Scans nebeneinander aufgenommen. Diese werden zu einem Tiefenschnittbild zusammengefügt. Dies ist der B-Scan. B leitet sich von „Brightness“ (Helligkeit) ab, da die Amplituden der einzelnen A-Scans oft in Graustufen/Helligkeiten kodiert werden (74). Eine Probe kann zeilenförmig mit B-Scans abgescannt werden. Viele B-Scans können dann zu einem Volumen zusammengefasst werden. Mit der OCT können Proben, die optisch streuen und wenige Millimeter dick sind, im Mikrometerbereich aufgelöst dargestellt werden (72). Damit eignet sich die Technik sehr gut zur Darstellung von okulären Strukturen (75). 1993 wurden die ersten retinalen in-vivo-OCT-Aufnahmen durchgeführt (73, 76).

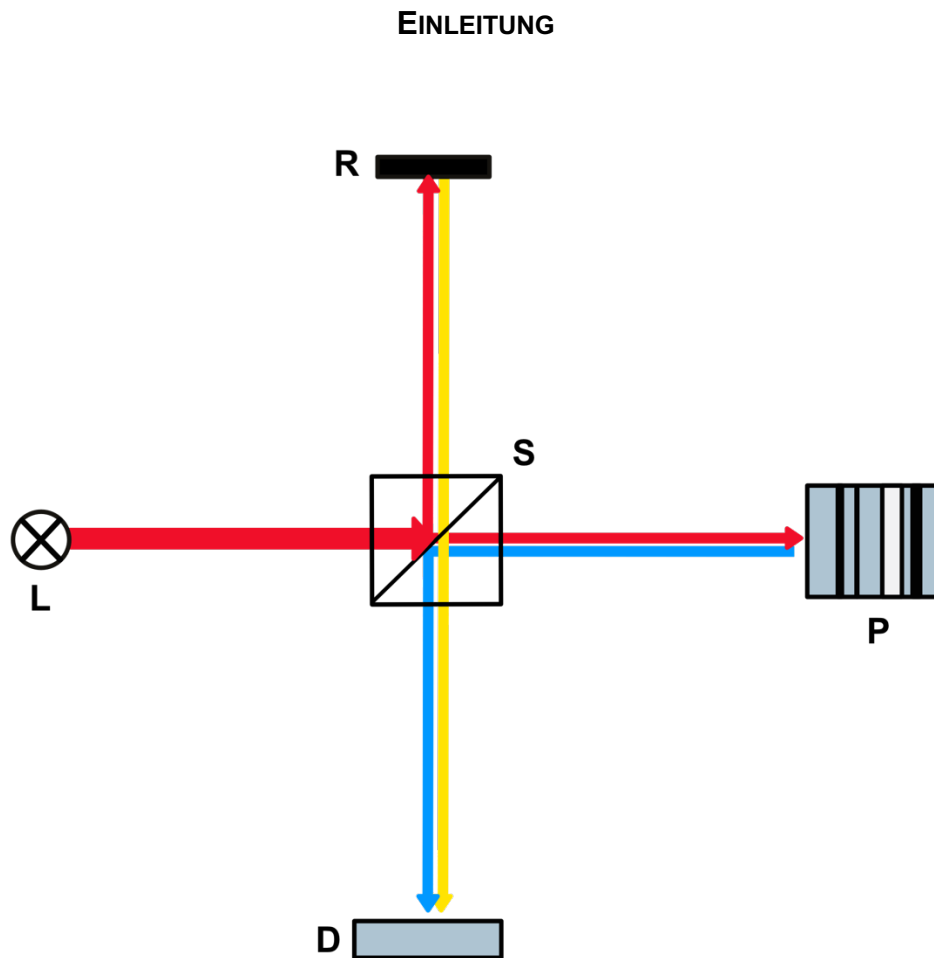


Abbildung 5: Funktionsprinzip der optischen Kohärenztomographie (OCT)

Die Laserstrahlen der Lichtquelle L werden durch den Strahlenteiler S auf die Probe P und die Referenz R gelenkt. Die Reflektionen an der Referenz und der Probe interferieren und werden im Detektor D erfasst.

1.1.2.1.1 Time-Domain- und Spectral-Domain-OCT

Bei der 1991 von Huang et al. beschriebenen optischen Kohärenztomografie erfolgt die Tiefendetektion mittels des Time-Domain-Verfahrens (72). Die Superlumineszenzdiode sendet breitbandiges niedrigkohärentes Licht aus (72). Ein interferometrisches Signal wird nur dann detektiert, wenn die Reflexionen an der Probe und der Referenz in ihrer Laufzeit annähernd übereinstimmen (72). Ist der Gangunterschied größer als die Kohärenzlänge sinkt das Interferenzsignal stark ab (72). Aus diesem Grund muss die Länge des Referenzarms verändert werden, wenn Signale verschiedener Tiefen der Probe interferieren sollen (75). Die von Leitgeb et al. 2000 beschriebene Spectral-Domain-OCT (SD-OCT) benutzt spektrale Analysen des Interferenzmuster basierend auf der Fourier-Transformation zur Tiefenauflösung (77). Die SD-OCT ist schneller (78) und hat

EINLEITUNG

eine höhere Sensitivität als die TD-OCT (79). Die erste in-vivo-SD-OCT-Aufnahme wurde 2002 durchgeführt (80).

1.1.2.1.2 Korrelation der Histologie und der OCT

Der Vergleich von Histologie und OCT-B-Scans in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) im Jahr 1997 zeigte eine zufriedenstellende Korrelation (81). Hyperreflexiv erschienen die Nervenfaserschicht, plexiforme Schichten, das RPE und die Choroidea, hyporeflexiv zeigten sich hingegen die Körnerschichten und die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren. Huang et al. untersuchten Augen von Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) und zeigten die Komplexität der Differenzierung der äußeren Netzhautschichten auf (82). Die Einführung der High-resolution-TD-OCT erlaubte eine bessere axiale Auflösung von 2-3 μm , im Vergleich zu früheren 10 μm , und eine bessere Darstellung der äußeren Retinaschichten (83). Drexler et al. beschrieben drei reflexive Banden in der äußeren Retina: Photorezeptoraußensegmente, RPE und die Lamina choriocapillaris (83). Arbeiten an Schweinen und Affen bestätigten diese Bandeneinteilung (84, 85). 2005 benannten Zawadzki et al. vier hyperreflexive Banden in der äußeren Retina: äußere limitierende Membran, Cilium-Schicht, Verhoeff'sche Membran und RPE (86). Spaide und Curcio korrelierten 2011 Anatomie und OCT-Bildgebung der äußeren Retina (87). Sie definierten vier reflexive Banden in der äußeren Retina: Membrana limitans externa, ellipsoide Zone, Kontaktzone Photorezeptoren mit RPE und das RPE. Die Membrana limitans externa, entstehend durch den Junktionskomplex der Müller-Zellen, sei das erste reflexive Band der äußeren Retina. Das zweite Band werde durch die mitochondrienreiche Ellipsoidzone der Photorezeptorinnensegmente erklärt. Die Kontaktzone von Photorezeptoren und RPE bildeten Band 3. Es handele sich dabei nicht um die Verhoeff'sche Membran. Diese entstehe durch Junktionskomplexe der RPE-Zellen (88, 89). Ein vom RPE separiertes reflexives Band könne damit nicht die Verhoeff'sche Membran sein. Das vierte reflexive Band bilde das RPE ab.

In einem Expertenkonsens wurde 2014 von der American Academy of Ophthalmology die Terminologie der OCT definiert (90). Dieser Terminologie

EINLEITUNG

folgend spricht man von Banden und Schichten oder Zonen, wenn eine genauere Abgrenzung nicht möglich ist (90). Benannt wurden 18 Banden/Schichten/Zonen. Die Terminologie der OCT wird in **Tabelle 1** und **Abbildung 6** dargestellt.

Tabelle 1: Schichtbenennung nach der International Nomenclature for Optical Coherence Tomography Panel (90)

Schicht-Nr.	Reflexivität	Nomenklatur
1	hyperreflexiv	Hinterer Glaskörper
2	hyporeflexiv	Praeretinaler Raum
3	hyperreflexiv	Nervenfaserschicht
4	hyporeflexiv	Ganglionzellschicht
5	hyperreflexiv	Innere plexiforme Schicht
6	hyporeflexiv	Innere Körnerzellschicht
7	hyperreflexiv	Äußere Körnerzellschicht
8	8.1 hyperreflexiv 8.2 hyporeflexiv	Innen: Henle'sche Schicht Außen: äußere Körnerzellschicht
9	hyperreflexiv	Membrana limitans externa
10	hyporeflexiv	Myoide Zone der Fotorezeptoren
11	hyperreflexiv	Ellipsoide Zone der Fotorezeptoren
12	hyporeflexiv	Äußere Segmente der Fotorezeptoren
13	hyperreflexiv	Inderdigitationen der Zapfen mit dem RPE
14	hyperreflexives Band	RPE/Bruch'sche Membran-Komplex
15	hyperreflexiv	Lamina choriocapillaris
16	hyperreflexiv u. hyporeflexiv	Sattler'sche Schicht
17	hyperreflexiv u. hyporeflexiv	Haller'sche Schicht
18	hyperreflexiv u. hyporeflexiv	Choroidal-sklerale Junctionszone

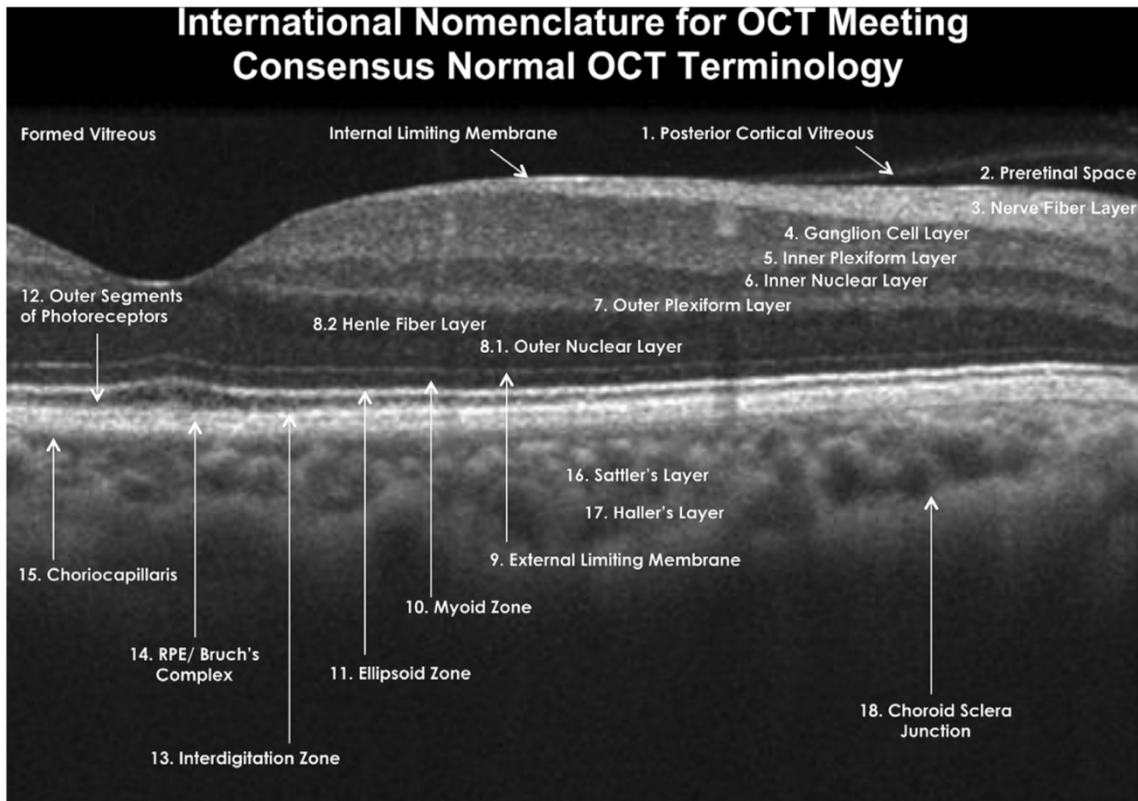


Abbildung 6: Benennung der Retinaschichten in der OCT

Nomenklatur anatomischer Landmarken im gesunden menschlichen Auge. Das Bild wurde mit einem Heidelberg Spectralis OCT aufgenommen.

Nachdruck mit Genehmigung. © Elsevier Verlag. Abbildung aus: Staurenghi et al. (29, 90). Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc. vermittelt.

1.1.2.2 Konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie

Das konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskop (cSLO) wurde von Webb et al. entwickelt (91-93). Ein Laserstrahl wird, nach Durchlaufen eines Modulators, über Spiegel und weitere optische Systeme auf die Netzhaut gerichtet. An der Netzhaut werden die Strahlen reflektiert. Da der Laserstrahl sehr schmal ist, benötigt er nur eine kleine Eintrittslochblende von 0,5 mm² (91). Die von der Retina reflektierenden Strahlen können dann das Auge über die im Vergleich zur Eintrittslochblende 100-fach größere Ausgangsapertur das Auge verlassen. Somit sind geringere Lichtintensitäten als in der konventionellen Ophthalmoskopie ausreichend (um den Faktor 1000 niedriger als in der indirekten Ophthalmoskopie (94)) und die Untersuchung kann so meist ohne

EINLEITUNG

Pupillendilatation erfolgen. Lichtstreuung und Artefakte durch Reflexionen an lichtbrechenden Medien sind vermindert (91).

Über Bewegung der Spiegel wird die Netzhaut punktförmig abgescannt. Die reflektierten Strahlen werden an einen Photomultiplier weitergeleitet. In nachfolgenden elektronischen Prozessen erfolgt dann nahezu in Echtzeit die Generierung des vollständigen Fundusbildes. Das Funktionsprinzip der cSLO ist in **Abbildung 7** illustriert.

Der fokussierte Punkt im Auge wird durch Zwischenschalten optischer Elemente in einer Zwischenebene dargestellt. Er ist dann sowohl auf der Retina als auch in der Zwischenebene fokussiert. Dies bezeichnet man als konfokale Abbildung. Eine Lochblende in dieser Ebene lässt die fokussierten Strahlen, emittiert von der Retinaschicht, durch, nicht jedoch die Strahlen außerhalb des Fokuspunktes. Damit verbessert sich die Schärfentiefe als auch der Kontrast des Bildes (92, 95, 96).

EINLEITUNG

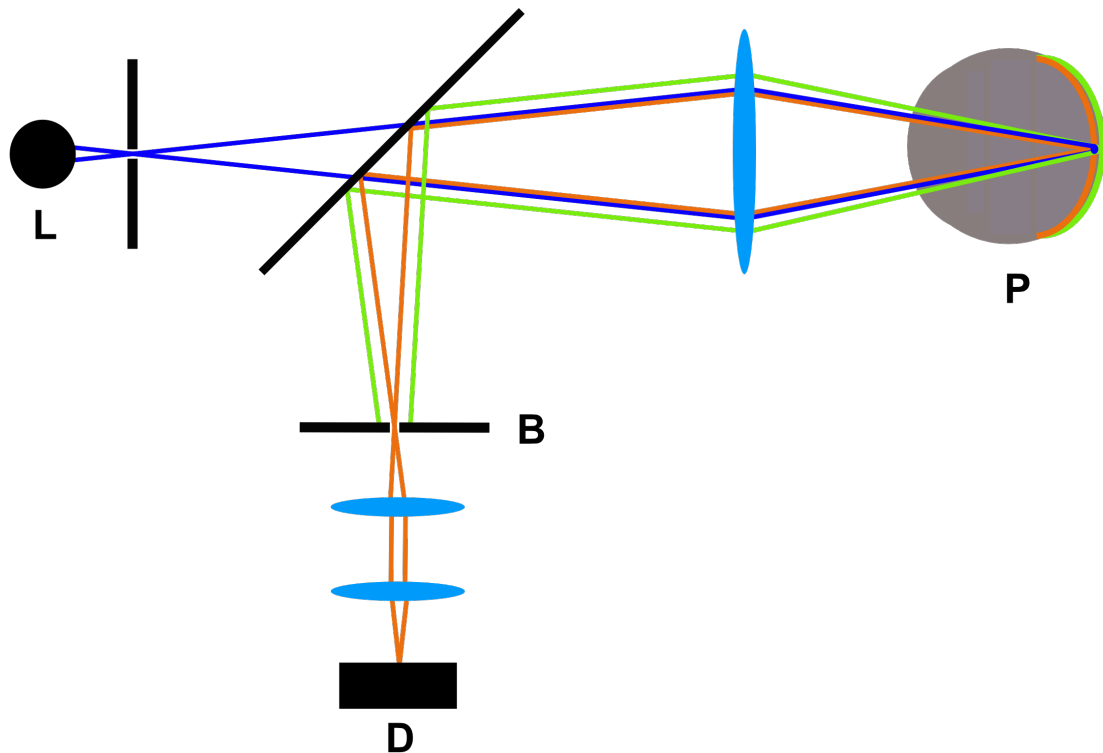


Abbildung 7: Funktionsprinzip der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie

Die Laserstrahlen aus der Lichtquelle L werden auf die Probe P gerichtet. Die von der fokussierten Probenschicht emittierten Strahlen (orange) werden in der Zwischenebene gebündelt. Die Lochblende B verhindert hier, dass Strahlen aus anderen Schichten der Probe (grün) auf den Detektor D treffen. Die Schärfentiefe wird dadurch erhöht.

1.1.2.3 Fundusautofluoreszenz (FAF)

Wird die Retina mit Licht beleuchtet, zeigt sie eine intrinsische Autofluoreszenz. Unter Autofluoreszenz versteht man die Eigenschaft von Stoffen nach Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge wiederum Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren. In histologischen Arbeiten wurde der Hauptursprung der retinalen Autofluoreszenz durch Fluorophore in der äußeren Netzhaut (Fotorezeptoren, RPE) nachgewiesen (30, 36, 44, 97). Hauptquelle ist dabei Lipofuszin, dessen Charakteristika, Zusammensetzung und Verteilung im Kapitel 1.1.1.2 näher dargelegt werden. 1994 stellte Delori ein Spektrofotometer für non-invasive Fundusautofluoreszenz-Messungen vor (98). Die benutzten Wellenlängen lagen zwischen 430 und 550 nm, aufgezeichnet wurden

EINLEITUNG

Wellenlängen zwischen 360 und 900 nm. Ein Jahr später erfolgte die erste in-vivo-Messung (38). Hier zeigte sich ein breites Fluoreszenzsignal des Fundus von 500 bis 800 nm, mit einem Maximum zwischen 630 und 640 nm und optimaler Erregung bei 510 nm (38). Von Rückmann et al. stellten die Kombination der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie und Fundusautofluoreszenz-Messung vor (1). Hier erfolgte eine Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm und unter Gebrauch eines Barrierefilters, der Wellenlängen unter 521 nm nicht hindurchließ. Seitdem wurde die FAF-Aufnahmetechnik sowohl mit cSLO als auch mit einer modifizierten Funduskamera und Ultraweitwinkel-Ophthalmoskopie kombiniert (99, 100). Bei einer Exzitationswellenlänge von 787 nm wird die sogenannte Nahinfrarot-Fundusautofluoreszenz detektiert (101). Sie entsteht vor allem durch Anregung von Melanin des RPE und zu geringeren Anteilen aus Signalen der Choroidea (35).

Die Fundusautofluoreszenz bei 488 nm und 787 nm stellt sich im Gesunden wie folgt dar (**Abb. 8**):

Fundusautofluoreszenz bei 488 nm Anregungswellenlänge: im Bereich der Fovea und Teilen der Parafovea vermindert durch Makulapigment und Melanin. Perifoveal nimmt die FAF zu. Blutgefäße absorbieren das Anregungssignal und stellen sich damit dunkel da. An der Papille gibt es kein RPE. Somit wird hier keine FAF emittiert und es kommt zur hypoautofluoreszenten Darstellung (5, 9).

Fundusautofluoreszenz bei 787 nm Erregungswellenlänge: Das höchste Autofluoreszenzsignal ist foveal mit einem Durchmesser von ungefähr 8 Grad zu finden (35). Gefäße und die Papille werden hypoautofluoreszent abgebildet. Der Bildkontrast ist geringer als bei der 488nm-FAF (35).

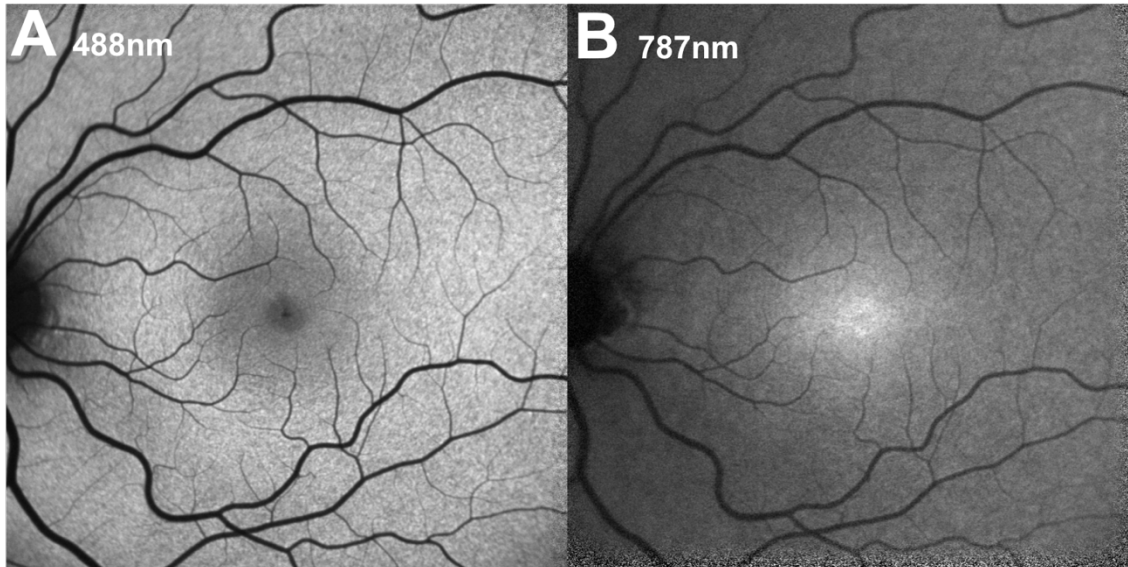


Abbildung 8: Fundusautofluoreszenz bei 488 nm und 787 nm

Fundusautofluoreszenz Bildgebung mittels cSLO. Bild **A** zeigt die Fundusautofluoreszenz bei kurzer Exzitationswellenlänge von 488 nm. Bild **B** zeigt die Nahinfrarotautofluoreszenz bei 787 nm. (cSLO: konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie)

1.1.2.4 Quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF)

Die Detektion der 488-nm-Fundusautofluoreszenz mittels cSLO oder Funduskameras erlaubt die qualitative Beschreibung des Fundusautofluoreszenzsignals. Der Vergleich von Autofluoreszenzintensitäten zwischen Patienten aber auch zwischen verschiedenen Aufnahmen eines Patienten ist ohne Quantifizierung der Fundusautofluoreszenzwerte jedoch nicht möglich. Bei vielen retinalen Erkrankungen, wie Morbus Stargardt, Morbus Best, Retinitis pigmentosa, AMD, verändert sich die Fundusautofluoreszenz im Vergleich zum Normalen (3, 4, 56-59, 102, 103). Um diese Krankheiten zu diagnostizieren oder zu überwachen, benötigt es eine Bildgebung mit quantitativer Information über die FAF-Intensitäten.

Seit der Kombination der cSLO und der FAF-Bildgebung wurden Versuche unternommen FAF-Intensitäten zu quantifizieren. Delori et al. maßen an ausgewählten Punkten (7 Grad temporal und foveal, Durchmesser 2 Grad) die FAF-Intensitäten (2, 38). In anderen Arbeiten wurden FAF-Signalintensitäten in definierten Pixelbereichen berechnet (104-106). Die FAF-Intensitäten wurden

EINLEITUNG

durch Subtraktion des Hintergrundgrauwerts (gemessen über der Papille) von der Durchschnitts-FAF in der jeweiligen Pixel-Box bestimmt.

Bellmann et al. verglichen die FAF-Messung mittels verschiedener cSLO-Geräte und kalkulierte gerätespezifische Graustufen mittels eines Augenmodells. Dieses beinhaltete einen Fluoreszenzstandard. Die Graustufen wurden bestimmt, indem die Autofluoreszenz mit und ohne Fluoreszenzstandard gemessen wurde. Die Differenz dieser Messungen ergab die Spanne der Graustufen (107).

2011 stellten Delori et al. eine weitere Methode zur quantitativen Messung der Fundusautofluoreszenz mittels cSLO vor (5). Hierbei wird das Fundusautofluoreszenzsignal mit dem Signal einer Standardfluoreszenzprobe im Gerät verrechnet. Damit können variierende Laserstärken und Detektorsensitivitäten kompensiert werden. Dies erlaubt die longitudinale Beobachtung eines Patienten, den Vergleich zwischen Augen und den Vergleich mit Aufnahmen anderer Geräte. Die sogenannte quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF) hat damit bei den oben genannten retinalen Krankheitsbildern einen breiten klinischen Anwendungsbereich.

1.1.2.4.1 Grundlagen der QAF-Bildgebung

Delori et al. benutzten cSLOs mit einem Feld von 30 x 30 Grad, Exzitation bei 488 nm und einem Sperrfilter von 500 bis 680 nm (HRA2 und S3300 Spectralis HRA+OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) (5).

Die folgenden Aspekte sind wichtige Grundlagen der QAF-Bildgebung und an einem QAF-Rohbild (**Abb. 9**) mit nachvollziehbar:

Interne Referenz: Die interne Standardfluoreszenzprobe (Referenz) wird in die Zwischenebene des konfokalen SLO montiert und ist damit immer im Fokus mit dem Fundusbild (5). Die Probe besteht aus einem roten Plättchen und einem Neutralschichtfilter (Dämpfung um Faktor $10^{2 \times 1,3}$) (5). Das rote Plättchen enthält den Farbstoff und das Fluorophor Texas Red (Rhodaminfarbstoff mit einem

EINLEITUNG

Exzitationsmaximum bei 596 nm, Emissionsmaximum bei 605 nm (108)) eingebettet in einer Kunststoffmatrix (5).

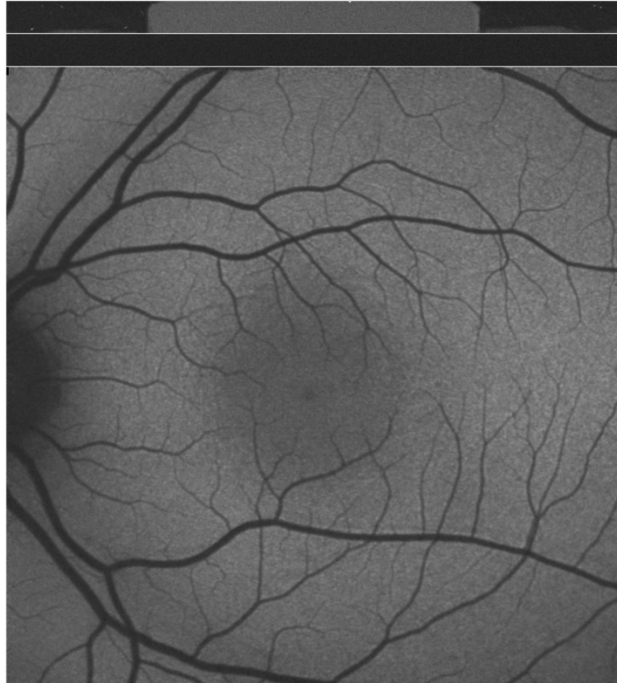


Abbildung 9: QAF-Rohbild

Bei der QAF-Aufnahme wird gleichzeitig zum Fundus eine Referenzprobe im Kameraobjektiv beleuchtet. Diese interne Referenz ist als grauer Balken am oberen Rand des Bildes zu sehen. Die Grauwerte der Referenz werden zum Wert GL_R gemittelt. Dieser Wert geht in die Formel zur Berechnung der quantitativen FAF ein. Das hier abgebildete QAF-Bild entstand durch Mittelung von 12 Einzelaufnahmen. (FAF: Fundusautofluoreszenz; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

Sensitivität des Detektors: Damit die aufgezeichnete FAF-Signalintensität proportional zur tatsächlichen FAF dargestellt wird, muss die Empfindlichkeit des Geräts so angepasst werden, dass innerhalb des linearen Messbereichs des Detektors gemessen wird (5). Sonst kann die Intensität überschätzt (bei sehr niedrigen Grauwerten) oder unterschätzt (bei sehr hohen Grauwerten) werden. Dies muss beim Aufnahmeprozess beachtet werden. Der Heidelberg Retina Angiograph 2 stellt zur visuellen Kontrolle deswegen Werte, die außerhalb des linearen Messbereichs des Detektors liegen, rot dar.

EINLEITUNG

Histogramm-Stretching: In konventionellen Fundusaufnahmen werden häufig die jeweiligen gemessenen Intensitäten auf die gesamte Graustufenskala verteilt („gedehnt“) um die Bildqualität zu verbessern. Dies wird als Histogramm-Stretching bezeichnet. QAF-Bilder müssen im non-normalized-mode (nicht-normalisierter Modus, „ungedehnter“ Modus, kein Histogramm-Stretching) aufgenommen werden. Nur so bleiben sie untereinander quantitativ vergleichbar (109).

Vergrößerungskorrektur: Um die Vergrößerung zwischen Retina und Zwischenebene zu korrigieren, muss entweder der Krümmungsradius der Hornhaut oder die axiale Länge des Auges bestimmt werden (5, 110). Der sogenannte Scaling-Faktor gibt die Netzhautdimensionen in Mikrometern an, die einem Pixel im Bild entsprechen. Er berücksichtigt die Fokuseinstellungen am Gerät und den kornealen Krümmungsradius (5).

Okuläre Medien: Anteriore Strukturen des Auges (besonders die Linse) können Einfluss auf das Fundusautofluoreszenzsignal nehmen, indem sie dieses absorbieren und damit abschwächen. Diese Absorption nimmt mit dem Alter zu. Van de Kraats und van Norren entwickelten eine Funktion um Verluste von fundus-reflektometrischen Signalen durch altersbedingte Medienveränderungen zu korrigieren (111). Mittels dieser Korrektur steigen die im Alter gemessenen QAF-Werte (109). Der Korrekturfaktor nimmt von 0,95 im Alter von 5 Jahren, über 1 im Alter von 20 Jahren zu 1,51 im Alter von 60 Jahren zu (9, 111).

Makulapigment und Rhodopsin der Fotorezeptoren: Makulapigment hat ein Absorptionspektrum zwischen 400 - 540 nm mit einem Maximum bei ~ 460 nm (112). Es besteht hauptsächlich aus den Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin (112). Seine Dichte ist an den Fotorezeptoraxonen und in der inneren plexiformen Schicht im Zentrum der Fovea am höchsten (113). In 488nm-Fundusautofluoreszenzbildern zeigt sich diese Verteilung durch die Lichtabsorption des Makulapigments als dunkler Fleck an der Fovea (5, 9). Dabei variiert die Verteilung des Makulapigments unter Individuen (114). Ab einer

EINLEITUNG

Exzentrizität von circa 7 - 8 Grad ist die Dichte des Makulapigments sehr gering und somit für die Absorption von FAF-Signalen vernachlässigbar (115).

Rhodopsin absorbiert Licht und vermindert dadurch das FAF-Signal (116). Delori et al. ermittelten, dass eine Beleuchtungszeit von 20 Sekunden mit Licht der Wellenlänge von 488 nm Rhodopsin suffizient bleichte (5). So wird die Lichtabsorption durch das Sehpigment auf unter zwei Prozent reduziert (9).

Uniformität: Mit zunehmender Exzentrizität nimmt das QAF-Signal ab (bei einer 10°-Exzentrizität: QAF-Signalabnahme um ca. 5-10%) (5, 9). Die höchste Uniformität besteht in einem 20°-Durchmesser-Kreis im Zentrum des Bildes (keine Abweichung von mehr als 5% im Vergleich zum Wert in der Bildmitte) (5). Die temporale Seite des Bildes ist ungefähr 6% höher als die nasale (9). Es besteht eine vertikale Asymmetrie der Signalintensitäten von 8%, oben höher als unten (9). Um diese Uniformitäten auszugleichen, führten Delori et al. den QAF8-Wert ein, dieser mittelt QAF-Werte ringförmig in einer Region hoher Uniformität (5) (**Abb. 10**).

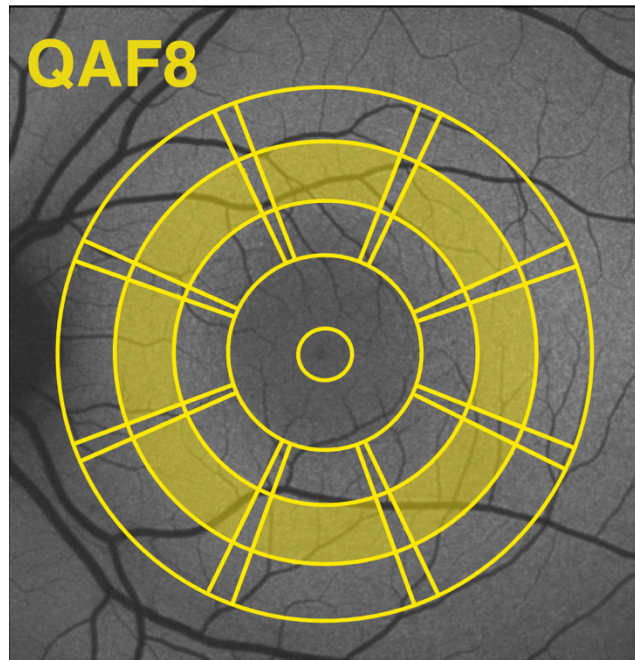


Abbildung 10: QAF8

Quantitatives Fundusautofluoreszenzbild (QAF) eines gesunden Auges mit überlagertem Auswertungsmuster (grid). Es handelt sich hier um das Delori-grid. Die acht Segmente des mittleren Rings (hier in Gelb überlagert) des Delori-grids werden zur sogenannten QAF8 gemittelt.

Wiederholbarkeit: In früheren Arbeiten wurde die Wiederholbarkeit von QAF-Aufnahmen überprüft, nachdem zwischen zwei Aufnahmen eine Wiedereinstellung des Fokus, der Kameraposition und der Detektorsensitivität vorgenommen wurde. Zwischen innerhalb einer Sitzung erstellten Bildern betrug der Bland-Altman-Koeffizient für die Wiederholbarkeit 6 %, zwischen Sitzungen an einem Tag 6 bis 11 % (5, 9). Bei Messungen an verschiedenen Tagen betrug der Bland-Altman-Koeffizient 7 bis 14 % (5).

1.1.2.5 QAF des gesunden Auges

Übereinstimmend mit histologischen Arbeiten, die einen Anstieg von Lipofuszin im RPE mit dem Alter beschrieben (8, 44, 97), steigt die QAF linear mit dem Alter an (9). Greenberg et al. beschrieben eine höhere QAF bei Frauen (9).

QAF-Intensitäten unterscheiden sich zwischen Ethnien. Bei Kaukasiern sind sie am höchsten und bei Asiaten sind sie am niedrigsten (Kaukasier > Inder > Hispanics > Schwarze > Asiaten) (9). Messungen an gesunden Probanden unter

EINLEITUNG

20 Jahren wurden bisher nur an 13 kaukasischen, 23 lateinamerikanischen und 8 afroamerikanischen Probanden durchgeführt (9).

Bei Rauchern zeigte sich ein Trend zu höherer QAF, dieser war jedoch in mehreren Arbeiten nicht signifikant (9, 117).

Die QAF nimmt mit größer werdendem Pupillendurchmesser zu (9). Die axiale Länge war nicht mit den QAF8-Intensitäten assoziiert (9).

Die niedrigsten QAF-Werte finden sich foveal (5, 118). Von dort steigen sie exzentrisch an mit Maxima bei 10 - 15 Grad (5, 118). Die höchsten QAF-Intensitäten finden sich hierbei superior-temporal (9, 118). An den Bildrändern sind die QAF-Werte vermindert (5, 9, 118). Die beschriebenen Charakteristika sind an einem farbkodierten QAF-Bild nachvollziehbar (**Abb. 11**).

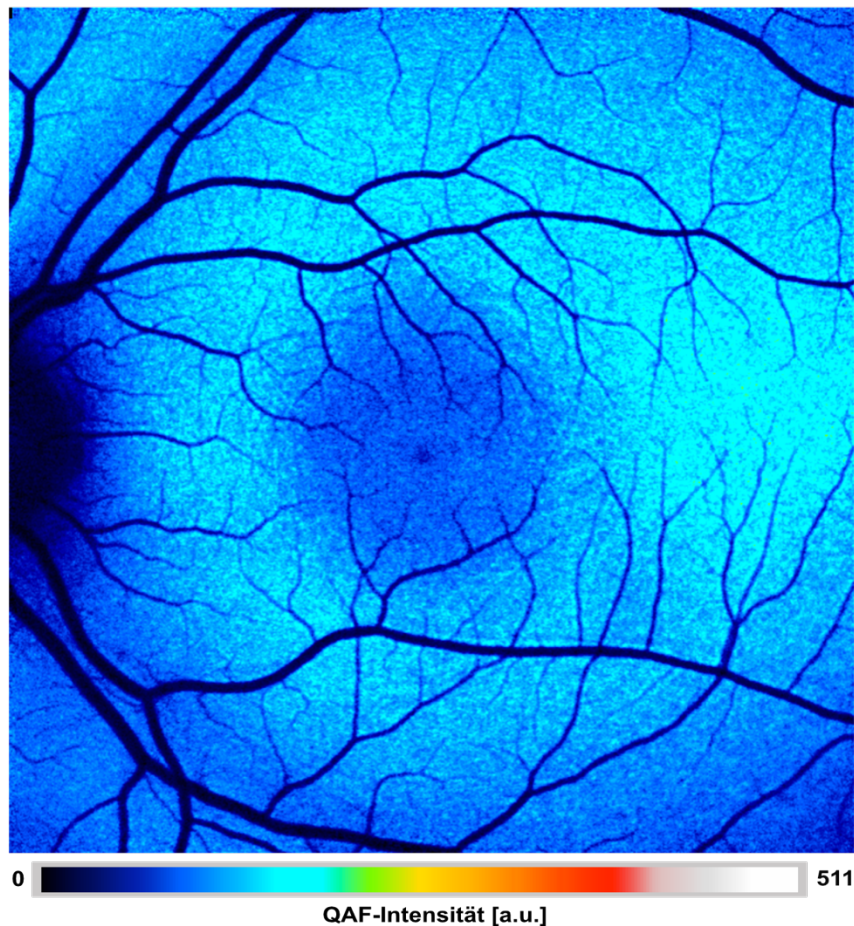


Abbildung 11: Quantitatives Fundusautofluoreszenzbild – farbkodiert

([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Vor dem Hintergrund des erläuterten wissenschaftlichen Kenntnisstandes sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Wie stellt sich die quantitative Fundusautofluoreszenz (QAF) im Kindes- und Jugendalter bei Kaukasiern dar?
- Wie verändert sich die QAF des gesunden kindlichen und jugendlichen Auges im longitudinalen Verlauf?
- Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede der quantitativen Fundusautofluoreszenz?
- Bestehen Zusammenhänge zwischen der quantitativen Fundusautofluoreszenz und in der OCT gemessenen Retinaschichtdicken?

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen:

- zur Erstellung einer Normdatenbank der QAF bei Kindern und Jugendlichen kaukasischer Ethnie genutzt werden (altersabhängige Veränderungen der QAF-Intensitäten im Kindes- und Jugendalter).
- Pathologien von der Norm abzugrenzen und zukünftige Therapien zu überwachen.

2 Probanden und Methoden

2.1 Probanden

Im Zeitraum von 1. April 2018 bis 30. März 2019 wurden 70 Kinder kaukasischer Ethnie aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsklinik Würzburg rekrutiert. Die Teilnahme erfolgte nach ärztlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studie sowie schriftlicher Einwilligung durch den Erziehungsberechtigten oder die Probanden selbst (ab 18. Lebensjahr). Die Studienteilnehmer erhielten keine finanzielle Kompensation. Die Grundsätze der Deklaration von Helsinki wurden zu jedem Zeitpunkt der Studiendurchführung befolgt.

2.1.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Universität Würzburg hatte keine Bedenken zur Durchführung der Studie (AZ 97/17).

2.1.2 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden netzhautgesunde Kinder und Jugendliche im Alter von 5 bis 18 Jahren mit Bereitschaft zur Teilnahme und schriftlicher Einwilligung nach Aufklärung. Die optischen Medien, Kornea und Linse, waren klar.

2.1.3 Ausschlusskriterien

Patienten mit einer Familiengeschichte erblicher retinaler Erkrankungen, Makulopathien (akut oder in der Vorgeschichte), vorangegangene intraokuläre chirurgische Eingriffe, okuläre Traumata und Medikamenteneinnahme, die die Retina oder okuläre Medien affektieren könnten, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Probanden mit mangelnder Teilnahmefähigkeit, wie hoher Blendempfindlichkeit, mangelnder Kooperation oder Fixationsleistung wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine ophthalmologische Untersuchung

Die ausführliche allgemeine ophthalmologische Untersuchung umfasste bei allen Probanden nachfolgend aufgeführte Punkte:

- Der bestkorrigierte Visus wurde an die kindliche Mitarbeit angepasst mittels LEA-Symbolen nach Hyvärinen oder dem C-Test nach Haase erhoben (119, 120).
- Der vordere Augenabschnitt wurde mittels Spaltlampenmikroskopie beurteilt.
- Die Beurteilung des Augenhintergrunds erfolgte mittels Funduskopie in Mydriasis (10,0 mg/ml (1%) Cyclopentolat oder 5 mg/ml (0,5%) Tropicamid).

2.2.2 Bildgebungsprozess

Alle Probanden wurden nach dem gleichen Protokoll untersucht. Dieses basiert in Bezug auf die QAF auf Vorarbeiten von Delori et al. (5) und Greenberg et al. (9).

Das Untersuchungsprotokoll beinhaltet folgende Schritte:

1. Der korneale Krümmungsradius wurde mit dem ZEISS IOLMaster 500 vermessen (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) um dessen Einflüsse auf die Bildgebung zu korrigieren.
2. Die SD-Makula-OCT wurde mit dem Spectralis-OCT-Gerät (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte mit einem Feld von 20° x 20° und generierte sich aus 49 Linienscans. Der Abstand zwischen den Linienscans betrug 120 µm. Jeder Linienscan wurde jeweils aus 35 Einzelbildern gemittelt.
3. Das 488 nm-FAF-Bild wurde mit einem modifizierten Heidelberg Retina Angiographen HRA2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland)

- aufgenommen. Die Bildgebung erfolgte durch Mittelung von 100 Einzelbildern, Aufnahmezeitfeld $30^\circ \times 30^\circ$, Sperrfilter von 500 nm bis 680 nm.
4. Das QAF-Bild wurde mit einem modifizierten Heidelberg Retina Angiographen HRA2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen. Das Aufnahmezeitfeld war $30^\circ \times 30^\circ$. Die Exzitationswellenlänge lag bei 488 nm und das Emissionsspektrum bei 500 bis 680 nm. Die Aufnahme erfolgte im „high speed modus“ des Gerätes. Es wurden mit jedem Auslösen 12 Einzelbilder (frames) aufgenommen. Bei der FAF-Aufnahme war die Lichtexposition ($280 \mu\text{W}$; 488 nm; $30^\circ \times 30^\circ$) weit unter den international angegebenen Grenzwerten (American National Standards Institute, Z136.1 (2014)).

2.2.2.1 Aufnahme des QAF-Bildes

Alle Bilder wurden von einer trainierten Untersucherin (Carla Pröbster) mit einem modifizierten Heidelberg Retina Angiograph 2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen. Die Modifikation des HRA2 umfasste ein Kameraobjektiv mit interner Referenz (vgl. Kapitel 1.1.2.4.1). Dies ermöglichte in der späteren Bildverarbeitung eine Quantifizierung der Bildinformationen (vgl. Kapitel 1.1.2.4.1).

Vor der Bildaufnahme wurde die Pupille des Probanden auf Lichtempfindlichkeit getestet. Die Bildgebung erfolgte in vollständiger Mydriasis von mindestens 6 mm. Der Kopf des Probanden wurde in der Kopf-Kinn-Stütze des Gerätes positioniert. Je nach Größe und Ausdauer des kindlichen Probanden wurde das Einhalten der Körperposition von einer Hilfsperson unterstützt.

Die Kamera wurde auf den Infrarotmodus (IR) eingestellt. Der Proband wurde gebeten auf die interne Fixierungshilfe zu blicken. Nun wurde die Kamera auf das Auge zu bewegt. Im IR-Modus wurde der Fundus gleichmäßig ausgeleuchtet und auf Gefäßarkaden fokussiert. Die Sensitivität des Detektors wurde angepasst, so dass die Graustufen gerade nicht mehr die lineare Messbreite des Detektors überschritten (Graustufe < 175). Nun wurde vom IR-Modus auf den QAF-Modus mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm umgeschaltet. Der Fokus wurde korrigiert. Er betrug im 488 nm-Modus durchschnittlich -1 dpt weniger als im IR-

Bild (5). Die Detektorsensitivität wurde erneut angepasst. Die Systemsoftware (HEYEX, Heidelberg Engineering) stellte Überschreitungen der Detektormessbreite rot dar. Der Fundus wurde für mindestens 20 Sekunden beleuchtet. Das Zapfenphotopigment wurde so ausgebleicht, bis seine Autofluoreszenzextinktion unter zwei Prozent vermindert war (5). Jede QAF-Aufnahme bestand aus zwölf Einzelbildern (frames), die im high-speed-Modus von 8,9 Bildern pro Sekunde aufgenommen wurden. Es wurden mindestens zwei Aufnahmeserien durchgeführt. Zwischenzeitlich wurde der Proband gebeten die Augen zu schließen und die Bildeinstellungen wurden erneut vorgenommen. Direkt nach der Bildaufnahme wurden die Serien in der Systemsoftware auf ihre Qualität kontrolliert: zentrierte Fovea, gleichmäßige Ausleuchtung des posterioren Pols und keine Interferenz durch das Augenlid. Aus den bestehenden zwölf Einzelbildern pro Serie wurden mindestens neun gemittelt und als Rohbild gesichert.

Die retinale Lichtexposition war während des gesamten Aufnahmeprozesses unterhalb der vom American National Standard Institute (ANSI Z136.1 (2014)) empfohlenen Grenzen (121).

2.3 Bild- und Datenverarbeitung

2.3.1 Allgemeine Daten

Von jedem Probanden wurde erhoben:

- Datum der Untersuchung
- Geburtsdatum
- Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung
- Geschlecht
- Visus
- Refraktionswerte
- die Seite des eingeschlossenen Auges (rechts oder links)
- Linsenstatus (in LOCS-Graden)
- kornealer Krümmungsradius.

2.3.2 Heidelberg Eye Explorer

Die Software Heidelberg Eye Explorer (Heidelberg Engineering, Heidelberg) ist mit den jeweiligen Geräten, Spectralis OCT und HRA2, verknüpft. Sie bietet die Benutzeroberfläche zur Betrachtung und Verarbeitungen der Bildaufnahmen des jeweiligen Probanden/Patienten.

2.3.3 Export der Bilddateien

Die Bilddateien wurden pseudoanonymisiert auf ein externes Speichermedium exportiert.

2.3.4 Bildverarbeitungsprogramm Fiji

Zur weiteren Verarbeitung der Bilddateien wurden von Dr. Kenneth Sloan (Department of Computer and Information Sciences, University of Alabama at Birmingham, USA) programmierte Softwarekomponenten (Plug-ins) für das „Open-source“-Bildverarbeitungsprogramm Fiji genutzt (122). Das Programm Fiji wird regelmäßig für wissenschaftliche Bildanalysen genutzt. Die Bilder rechter Augen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf links gespiegelt.

2.3.5 Berechnung und Kalibrierung des QAF-Bildes

Die QAF-Bilder wurden nach der Aufnahme für den gerätespezifischen Referenz-Kalibrierungsfaktor und das Alter des Probanden adjustiert.

Mittels der Formel von Van de Kraats und van Norren entwickelten Funktion wurden Verluste von fundus-reflektometrischen Signalen durch altersbedingte Medienveränderungen korrigiert (111).

Die Korrekturformel lautet (9):

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

T = transmission; Transmission bei gegebenem Alter und Wellenlänge

PROBANDEN UND METHODEN

Bei dem jungen Probandengut dieser Studie betrug der altersadjustierte Korrekturfaktor für Medientrübung 0,95 (111).

Die Berechnung der QAF mit der 2011 veröffentlichten Delori et al. folgende Formel zur Berechnung quantitativer Fundusautofluoreszenzwerte:

$$qAF = RCF \times \frac{GL_F - GL_o}{GL_R - GL_o} \times \left(\frac{SF}{SF_{em7,7}} \right)^2 \times \frac{\overline{T_{\lambda,20}} \times \overline{T_{\lambda,20}}}{\overline{T_{\lambda}} \times \overline{T_{\lambda}}}$$

RCF	reference calibration factor; Referenzkalibrierungsfaktor. Dieser wird spezifisch für das jeweilige Gerät mit einer Masterreferenz (gleiches Fluorophor wie in der internen Referenz, 20 cm vor der Blende des cSLO positioniert) gemessen.
GL _f	grey level f; durchschnittliche Graustufe des Fundus im betrachteten Bereich
GL _r	grey level r; durchschnittliche Graustufe
GL _o	grey level 0, „Null“-Signal, wird bei ausgeschaltetem Laser und angeschaltetem Detektor gemessen
SF	scaling factor; Vergrößerungsfaktor
SF _{em7,7}	Vergrößerungsfaktor eines emmetropen Auges mit einem kornealen Krümmungsradius von 7,7 mm
T _λ	Transmission der okulären Medien bei der Exzitationswellenlänge
T _λ	Transmission der okulären Medien bei der Emissionswellenlänge
T _{λ,20} und T _{λ,20}	Durchschnittstransmission der optischen Medien eines 20-Jährigen

Die Werte für die QAF-Intensitäten wurden von 0 bis 511 festgelegt. Skaliert werden diese von 0 bis 255 dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine willkürliche festgelegte Skala. Das QAF-Bild wurde des Weiteren in ein farbkodiertes 8-bit-Bild mit 768 x 768 Pixel umgewandelt.

2.3.6 Markierung anatomischer Landmarken im SD-OCT und IR-Bild

Der SD-Makula-OCT-Scan und das vom Gerät dazu parallel aufgenommene IR-Fundusbild wurden genutzt, um mit dem Fiji-plugin FindFovea_OCT (Version 2.0.0, Creative Computation) die Position der fovealen Depression als auch den

temporalen Rand der Papille zu bestimmen. Im OCT-B-Scan mit der tiefsten Depression wurde die exakte Position der Foveola markiert. Dies ergab die y-Koordinate. Diese Position wurde automatisch in das IR-Bild übertragen. Aus ihr ergab sich mit der Position des B-Scans im SD-OCT-Makula-Scan die korrespondierende x-Koordinate. Im nächsten Schritt wurde der temporale Rand des Sehnervenkopfes punktförmig bestimmt. Hier wurde eine Hilfslinie zwischen der davor bestimmten Position der Foveola und dem geschätzten Zentrum der Papille gezogen. Der Schnittpunkt dieser Hilfslinie mit dem temporalen Papillenrand wurde dann als Position „temporaler Papillenrand des Sehnervs“ markiert. Die Punkte „foveale Depression“ und „temporaler Papillenrand“ waren Basisorientierungspunkte für die folgende Analysen.

2.3.7 Erstellung eines multimodalen Bildstapels (stack)

Aus den unterschiedlichen Bildern verschiedener Modalitäten (IR, FAF488nm, QAF) eines Probanden wurde ein Bildstapel (stack) erstellt (**Abb. 12**). Hierfür wurde im IR-Bild, das während der SD-Makula-OCT aufgenommen worden war, eine Linie zwischen zwei gut zu identifizierenden Bildpunkten gezogen (meist Bifurkationen von Gefäßen). Diese Punkte wurden dann korrespondierend in den anderen Bildern markiert. Dies ermöglichte eine vom Programm vorgenommene Überlagerung der Bilder mit Skalierung und Rotation. Das Erstellen eines Bildstapels (stack) erleichterte bei weiteren Analysen die Applikation von Analysemustern.

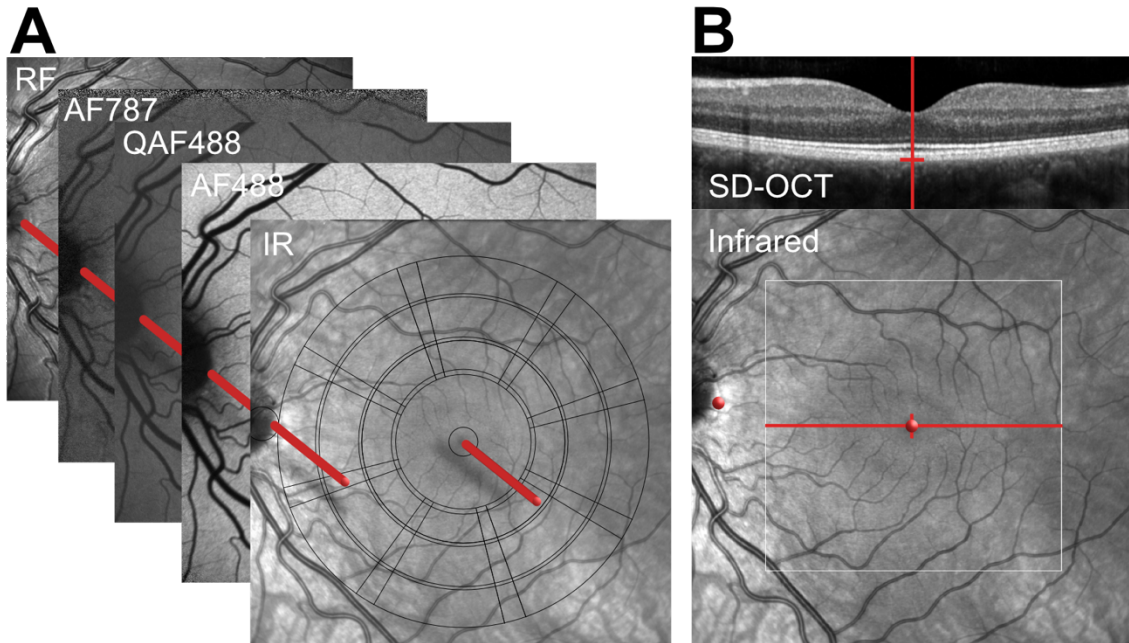


Abbildung 12: Erstellung eines Bildstacks und Markierung anatomischer Positionen

Im ersten Schritt des Alignierungsprozesses wurden in den Bildern die gleichen charakteristischen anatomischen Landmarken markiert (zumeist leicht auszumachende Gefäßbifurkationen). Auf Grund dieser wurden die Bilder zueinander so gedreht und skaliert, dass sie in einem sogenannten Stack exakt übereinander liegen (A). Die Position der Fovea und des temporalen Papillenrandes wurden in der korrespondierenden SD-OCT und deren parallel aufgenommenen Fundusinfrarotbild markiert (B). Diese beiden Positionen dienen im weiteren Prozess der Projektion von Analysemustern (grids) auf die Bildmodalitäten (A, hier das Delori-grid). (AF488: Fundusautofluoreszenz bei 488 nm; AF787: Fundusautofluoreszenz bei 787 nm; IR: Infrarotfundusbild; QAF488: quantitative Fundusautofluoreszenz bei 488 nm; RF: rotfreies Fundusbild)

2.3.8 Analysemuster (grids)

Für die weitere Analyse der QAF-Bilder wurden Auswertungsmuster (grids) über die Bilder projiziert (Abb. 13). Die Applikation dieser Muster erfolgte unter Verwendung des Fiji-plugin-ins QAF_XML_Grids (Version 1.0.1, Creative Computation). Benutzte Analysemuster waren das ETDRS-grid, das Delori-grid (eingeführt von Greenberg et al. 2013 (9)), das erweiterte QAF97-Grid (eingeführt von Kleefeldt et al.(118)) sowie das horizontal-meridian-grid (zuerst vorgestellt bei Reichel et al. (123)), allesamt zentriert auf die Fovea.

Das ETDRS-Grid wurde im Rahmen der Early Treatment Diabetic Retinopathy Studie etabliert (124). Es besitzt Ringe mit definierten Durchmessern von 1, 3 und 6 mm, konzentrisch zur Fovea. Die äußeren beiden Ringe werden in je vier Segmente unterteilt.

Die Größe des Delori-grids und QAF97-grids definieren sich über den Abstand zwischen der Foveola und des temporalen Papillenrandes des Sehnerven (118). Somit werden die Grids auf das jeweilige Fundusbild angepasst. Die Größen der Grids können sich zwischen verschiedenen Augen unterscheiden (118).

Das Delori-Grid besteht aus drei konzentrischen Ringen, diese sind wiederum in acht Segmente unterteilt (5). Beim QAF97-grid werden die Segmente des Delori-grids nochmals unterteilt. Es resultieren 96 Segmente und das Segment der Fovea (118).

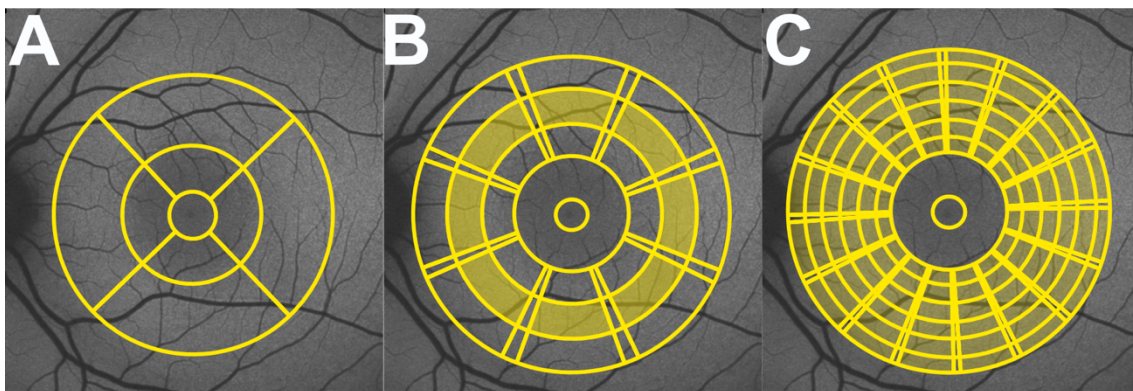


Abbildung 13: Auswertungsmuster (grids) – ETDRS, Delori, QAF97

Auf das quantifizierte Fundusautofluoreszenzbild eines gesunden Auges wurden verschiedene Auswertungsmuster gelegt (**A**, **B**, **C**). Das ETDRS-grid hat eine definierte, nicht-variable Größe (**A**). Die drei Ringe haben den Durchmesser von 1 mm, 3 mm und 6 mm. Die beiden äußeren Ringe sind in vier Segmente unterteilt. Das QAF-Delori-grid (**B**) und das QAF97-grid (**C**) werden in ihrer Größe über den Abstand vom Zentrum der Fovea zum Rand der Sehnervenpapille bestimmt. Damit sind sie in ihrer Größe variabel. Das QAF97-grid ist eine Weiterentwicklung des Delori-grids, die durch Unterteilung jedes Segments in vier Subsegmente entsteht (**C**). Der QAF8-Wert entsteht durch Mittelung der in **B** gelb hinterlegten Segmente. Der QAF97-Wert wird durch die Mittelung der in **C** gelb hinterlegten Segmente berechnet.

Der horizontal-meridian-grid wird mit Hilfe des SD-OCT-Scans auf das QAF-Bild gelegt (**Abb. 14**). Ausgehend von der Foveola, als zentraler Messpunkt, wird in

0,5-mm-Abständen nach nasal und temporal horizontal an je fünf Punkten gemessen. Es resultieren insgesamt elf Messpunkte.

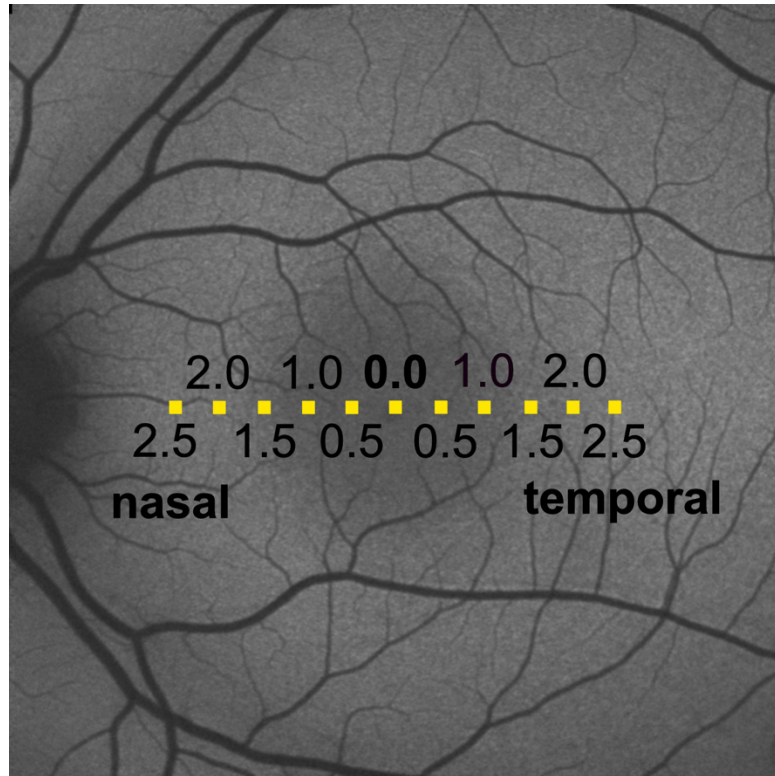


Abbildung 14: Horizontaler-Meridian-Muster (grid)

Das Fiji-plugin QAF_XML_Grids kalkulierte für jedes Segment (ETDRS-grid, Delori-grid, QAF97-grid) oder jeden Punkt (horizontal-meridian-grid) den QAF-Durchschnitt, die Minima und Maxima der QAF-Intensitäten, die Standardabweichung und die Anzahl der ausgewerteten Pixel. Die erhobenen Werte wurden automatisch in Excel-Tabellen ausgegeben.

2.3.9 Erstellung von Standardretinae

Mit dem plug-in AddToStandardRetina_OCT (Version 2.0.0, Creative Computiton) konnten die QAF-Bilder mehrerer Probanden zu einer sogenannten Standardretina zusammengefasst werden. Jede Standardretina beinhaltet den Mittelwert aller QAF-Werte für die jeweiligen Pixel, sowie deren Standardabweichung.

Für die Erstellung der Standardretinae wurden die Probanden nach ihrem Alter zwei Gruppen zugeordnet. Zwischen fünf und zehn Jahre alte Probanden bildeten eine Gruppe und zwischen elf und achtzehn Jahren die zweite Gruppe. Ihre QAF-Bilder wurden zu den jeweiligen zwei Standardretinae hinzugefügt. Durch die Applikation des Grids QAF97 auf die jeweiligen Standardretinae wurden die fünf Segmente des Grids mit der höchsten QAF identifiziert.

2.3.10 Retina Dickenmessungen

Die retinalen Schichtdicken wurden mit den unten aufgeführten Methoden ausgewertet. **Abbildung 15** gibt darüber einen zusammenfassenden Überblick.

2.3.10.1 Spectralis-Segmentations-Software

Mit Hilfe der Spectralis-Segmentations-Software (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) wurde in allen 49 SD-Makula-OCT-B-Scans jedes Probanden eine halbautomatische Segmentierung der Retina in ihre Schichten vorgenommen. Jede Segmentierung wurde visuell überprüft. Die Software kalkulierte die Dicke der Retina zwischen ILM und RPE/BM, der äußeren Retinaschichten zwischen ELM und RPE/BM sowie die Dicke des RPE zwischen der Interdigitationszone und der Bruch Membran. Für jedes Segment des ETDRS-Musters wurden die Werte von der Software gemittelt. Die Daten wurden pseudoanonymisiert exportiert und händisch in Excel-Tabellen übertragen.

2.3.10.2 Manuelle Dickenmessung

Die manuelle Dickenausmessung der retinalen Schichten erfolgte mit dem Fiji plug in Annotate_LRP_XML (Version 1.0.1, Creative Computation).

Im jeweiligen zentralen OCT-B-Scan, der die Foveola abbildete, an den Punkten des horizontalen Meridians (vgl. Kapitel 2.3.8) gemessen. An jedem dieser Punkte wurde manuell im OCT-B-Scan die Membranae limitantes interna et externa sowie die Bruch Membran markiert. Dabei dienten die Histogramme des OCT-Scans am jeweiligen Schnittpunkt zur exakteren Bestimmung der jeweiligen Schicht. Die gemessenen Abstände für die Dicken der gesamten Retina, der inneren Retina und der äußeren Retina wurden in Excel-Tabellen ausgegeben.

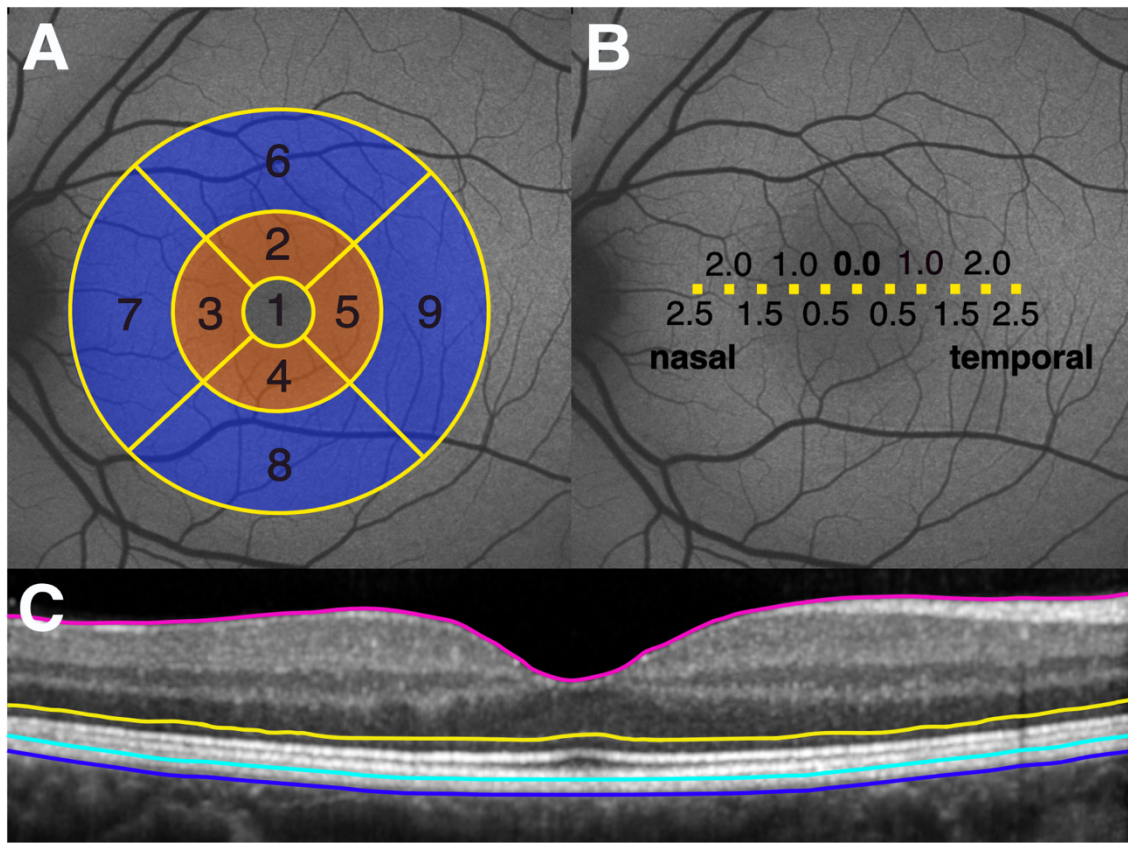


Abbildung 15: Dickenauswertung

Die Auswertungsmuster (grids), das ETDRS-grid (**A**) und der horizontale Meridian (**B**), wurden zur Bestimmung retinaler Schichtdicken auf die SD-Makula-OCT projiziert. **A**. Die Segmente des ETDRS-grid sind gegen den Uhrzeigersinn nummeriert. Ring 1 ist orange hinterlegt, Ring 2 blau. **B**. Der horizontale Meridian besteht aus 11 Messpunkten mit Zentrum in der Foveola. In 0,5 mm Schritten wird jeweils fünfmal nach temporal und nasal gemessen. **C**. An einem exemplarischen SD-Makula-OCT-Schnittbild sind die Membrana limitans interna (ILM) in magenta, die Membrana limitans externa (ELM) in gelb, die Grenze der Interdigitationszone in türkis und die Grenze der Choriokapillaris in dunkelblau eingezeichnet. Die Dicke der gesamten Retina wurde in den OCT-Schnitten zwischen der ILM und der Bruch Membran (BM), die Dicke der inneren Retina zwischen der ILM und ELM, die Dicke der äußeren Retina zwischen ELM und BM und die Dicke des retinalen Pigmentepithels zwischen der Interdigitationszone und der Choriokapillaris ausgemessen.

2.4 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Statistical Package for Social Science) Version 26 für MacOS (SPSS Inc., Chicago, USA). Für die Prüfgrößen

PROBANDEN UND METHODEN

erfolgte die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant, $p < 0,01$ als hoch signifikant und $p < 0,001$ als höchst signifikant angesehen.

Zur Bestimmung der Übereinstimmung von Netzhautdickenmessungen wurden Intra-Class-Korrelationskoeffizienten (ICC) berechnet. Die Annahmen normalverteilter kontinuierlicher Variablen wurden mit Hilfe von Quantil-Quantil-Plots, Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Tests getestet. Der Mann-Whitney U-Test oder der t-Test für unabhängige Stichproben wurde für Mittelwerte der Netzhautdicke und Mittelwerte von QAF97/QAF8/Fovea angewandt. Ein unabhängiger t-Test für zwei Stichproben wurde zur Untersuchung von Geschlechtsunterschieden verwendet. Die Korrelation zwischen der Netzhautdicke und den Mittelwerten von QAF97 wurde mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten oder des Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten berechnet. Um den Effekt des Alters auf die QAF und die Netzhautdicken vorherzusagen, wurden lineare Regressionsmodelle genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung der Kohorte

Von 70 untersuchten Kindern wurden 53 in die späteren Analysen eingeschlossen. Gründe des Ausschlusses von 17 Kindern waren erschwerte Untersuchungsbedingungen durch:

- unzureichende Mitarbeit
- Photophobie
- mangelhafte Blickfixierung

Diese Faktoren hatten zu unvollständigen Aufnahmeserien und/oder mangelhafter Bildqualität geführt.

Von 21 der 53 Probanden wurden beide Augen untersucht. Insgesamt wurden 53 Augen von 53 Probanden ausgewertet. Von 38 Probanden wurde das rechte Auge ausgewertet, dabei wurde stets das Auge mit der QAF-Aufnahme von höherer Bildqualität bevorzugt. 27 Teilnehmer waren weiblich und 26 männlich. 25 Kinder waren in der Altersgruppe von fünf bis zehn. Das durchschnittliche Alter betrug $10,92 \pm 3,79$ Jahre. Die Altersverteilung der Probanden ist in **Abbildung 16** dargestellt. **Tabelle 2** fasst Daten zu Alter, Geschlecht, ausgewertetem Auge, sphärischem Äquivalent und Visus zusammen.

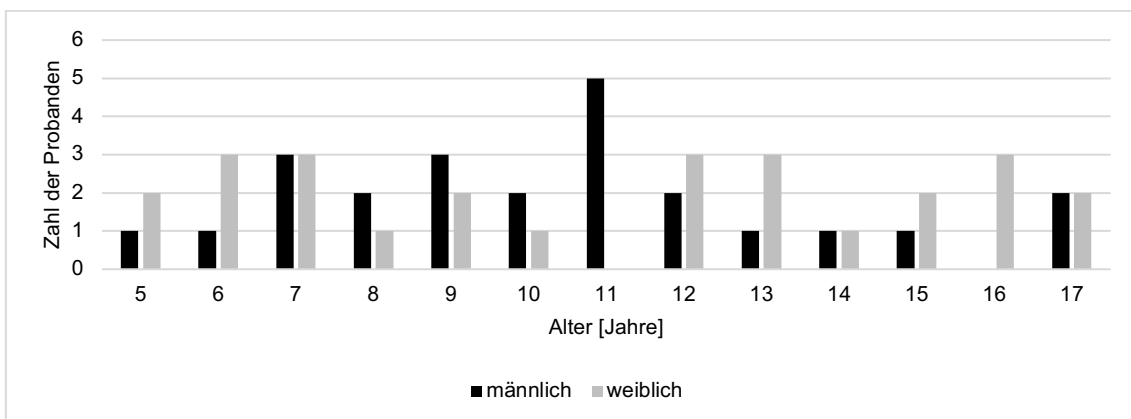


Abbildung 16: Altersverteilung der Probanden (n = 53)

ERGEBNISSE

Tabelle 2: Übersicht über die eingeschlossenen Probanden (n = 43)

Probanden Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [M=männlich, W=weiblich]	Auge	Sphärisches Äquivalent	Snellen- Visus
0002	13	W	OD	0,5	20/20
0003	16	W	OD	-0,125	20/20
0006	5	W	OD	0	20/20
0007	8	M	OD	5,75	20/40
0010	9	M	OD	0	20/20
0011	9	W	OD	1,875	20/20
0012	7	W	OD	1,25	20/20
0013	16	M	OS	0,375	20/30
0014	15	W	OD	-0,625	20/15
0015	13	W	OD	3,125	20/20
0016	17	M	OD	0,5	20/15
0018	12	M	OD	0,5	20/20
0019	11	M	OS	-1,55	20/30
0021	7	W	OS	0,25	20/20
0022	7	M	OS	3,75	20/25
0023	17	M	OD	-0,625	20/20
0025	12	W	OD	0	20/20
0026	14	W	OS	-0,875	20/15
0027	7	M	OD	1	20/15
0028	8	M	OD	0	20/15
0029	9	W	OS	0,75	20/15
0030	12	W	OD	3,75	20/15
0031	6	W	OD	0	20/20
0032	15	M	OD	-0,375	20/15
0036	12	W	OD	-7,125	20/15
0037	8	M	OD	9,25	20/15
0038	11	M	OD	1,375	20/20
0039	5	M	OD	4,375	20/30
0040	9	M	OD	0,5	20/20
0041	9	M	OD	0,5	20/20
0042	13	W	OD	0	20/20
0043	17	W	OD	-5,5	20/25
0044	11	M	OD	-1	20/15

ERGEBNISSE

Probanden Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [M=männlich, W=weiblich]	Auge	Sphärisches Äquivalent	Snellen- Visus
0045	10	M	OD	2,5	20/15
0046	5	W	OD	0,5	20/20
0047	11	M	OD	1,25	20/15
0048	10	W	OD	-1	20/20
0050	14	M	OD	0	20/13
0052	6	W	OD	2,125	20/15
0053	7	W	OD	1,5	20/15
0054	12	M	OD	-0,125	20/16
0055	17	W	OS	0,125	20/20
0057	11	M	OD	0	20/20
0058	15	W	OS	2,25	20/20
0061	6	W	OD	2,625	20/50
0062	6	M	OS	0,5	20/15
0063	7	M	OD	3,125	20/20
0064	10	M	OS	1,25	20/15
0065	16	W	OS	0	20/25
0066	16	W	OS	-3,65	20/15
0067	18	M	OD	2,75	20/15
0069	15	W	OD	0	20/20
0070	7	M	OD	1,25	20/20

3.2 QAF

3.2.1 Qualitative Deskription der Fundusautofluoreszenz

Die höchsten QAF-Werte wurden in der Perifovea mit Maximum in der superior-temporalen Region beobachtet. Exzentrisch der Perifovea nahm die Autofluoreszenz wieder ab. In der Region der Fovea waren die QAF-Werte am niedrigsten. Gefäße und die Sehnervenpapille stellten sich als Strukturen mit sehr niedriger QAF-Intensität dar (**Abb. 17**).

ERGEBNISSE

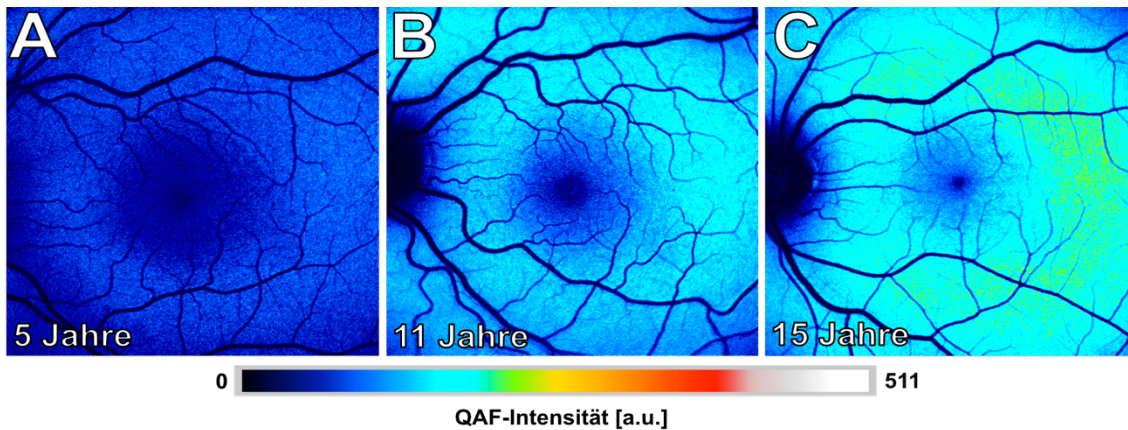


Abbildung 17: QAF-Entwicklung im Kindesalter

Die Abbildung zeigt farbkodierte QAF-Aufnahmen eines 5- (A), eines 11- (B) und eines 15- (C) jährigen Probanden. Im Alter von fünf Jahren sind die QAF-Werte niedrig (A). Mit steigendem Alter nehmen die QAF-Intensitäten zu. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

3.2.2 QAF8

Die QAF8-Werte aller Probanden sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Der Durchschnitts-QAF8-Wert betrug zwischen 5 bis 10 Jahren $89 \pm 22,7$ [a.u.] In der Altersgruppe von 11 bis 18 Jahren $125,3 \pm 23,6$ [a.u.].

3.2.2.1 Einfluss des Alters

Der Prädiktor Alter sagte statistisch höchst signifikant die QAF8 voraus $F(1,51) = 44,567$, $p < 0,001$. Das Modell hatte mit $R^2 = 0,466$ eine hohe Anpassungsgüte nach Cohen (125). Mit einer Basis-QAF8 von $51,2$ [a.u.] im Alter von fünf Jahren nahmen die QAF8-Intensitäten um $5,3$ [a.u.] $\pm 0,8$ [a.u.] pro Lebensjahr zu (95%-CI [3,68- 6,84]). Die erhobenen Werte für alle Probanden sind in **Abbildung 18** dargestellt.

ERGEBNISSE

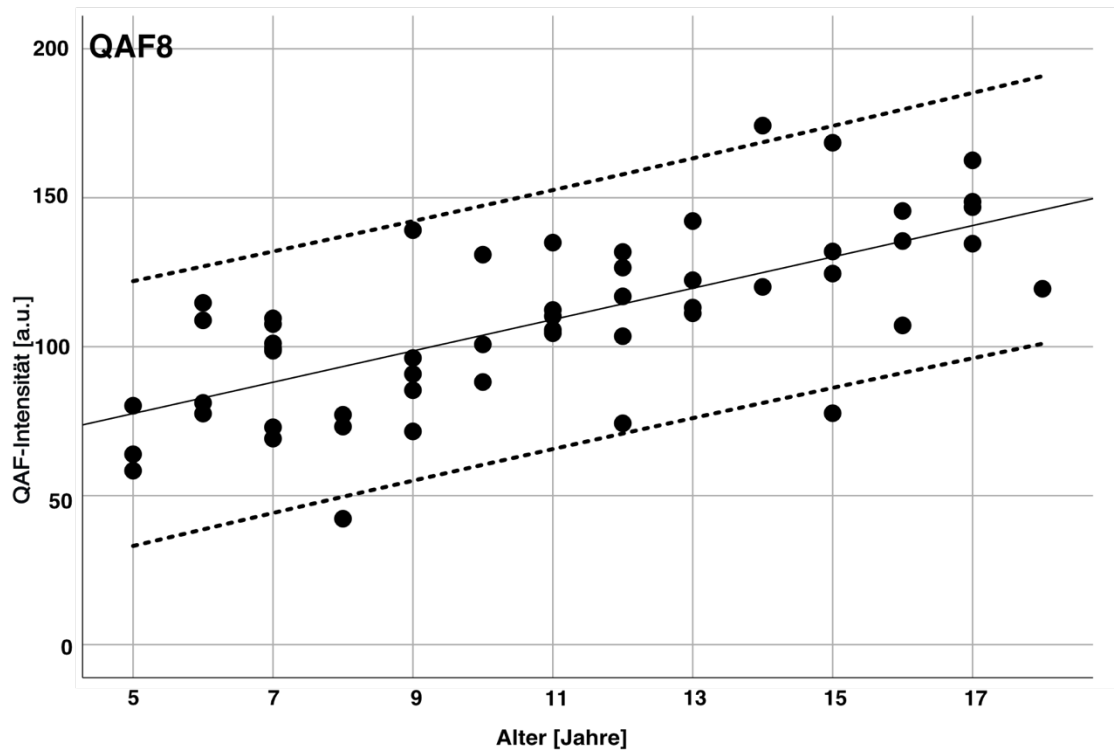


Abbildung 18: QAF8-Werte aller Studienprobanden (n=53)

Die QAF8-Werte aller Probanden sind hier gegenüber dem Alter aufgetragen. Die lineare Regressionsgerade ist als durchgezogene Linie, das 95%-Konfidenzintervall als gestrichelte Linien dargestellt. Die QAF8-Werte wurden durch Mittelung der acht Segmente des mittleren Rings des Delori-grids errechnet. Die QAF8 steigt mit dem Alter an. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

3.2.2.2 Einfluss des Geschlechts

Von den 53 eingeschlossenen Probanden waren 26 männlich und 27 weiblich. Es gab keine Ausreißer im Datensatz. Die beiden Gruppen waren gemäß Shapiro-Wilk Test normalverteilt. Die QAF8 war bei männlichen Probanden im Mittel $110,7 \text{ [a.u.] } \pm 32,2 \text{ [a.u.]}$ und betrug bei den weiblichen Probanden im Mittel $106,2 \text{ [a.u.] } \pm 26,2 \text{ [a.u.]}$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der QAF8 der beiden Geschlechter, $t(51) = 0.569$, $p = 0.572$.

3.2.3 QAF97

Der QAF97-Wert wurde durch Mittelung aller Segmente des QAF97-grids mit Ausnahme der Fovea errechnet. Die QAF97-Werte der Probanden sind in

ERGEBNISSE

Tabelle 3 aufgeführt. Der Durchschnitts-QAF97-Wert betrug bei den 5- bis 10-Jährigen $84,1 \pm 20,6$ [a.u.] In der Altersgruppe von 11 bis 18 Jahren war er $118,2 \pm 22,5$ [a.u.].

3.2.3.1 Einfluss des Alters

Der Prädiktor Alter sagte statistisch höchst signifikant die QAF97 vorher $F(1,51) = 44,3$, $p < 0,001$. Das Modell hatte mit $R^2 = 0,47$ eine hohe Anpassungsgüte nach Cohen (125). Mit einer Basis-QAF der QAF97 von $47,5$ [a.u.] im Alter von fünf Jahren nahmen die QAF-Intensitäten um $5,0$ [a.u.] $\pm 0,8$ [a.u.] pro Lebensjahr zu. **Abbildung 19** stellt die erhobenen Werte für alle Probanden dar.

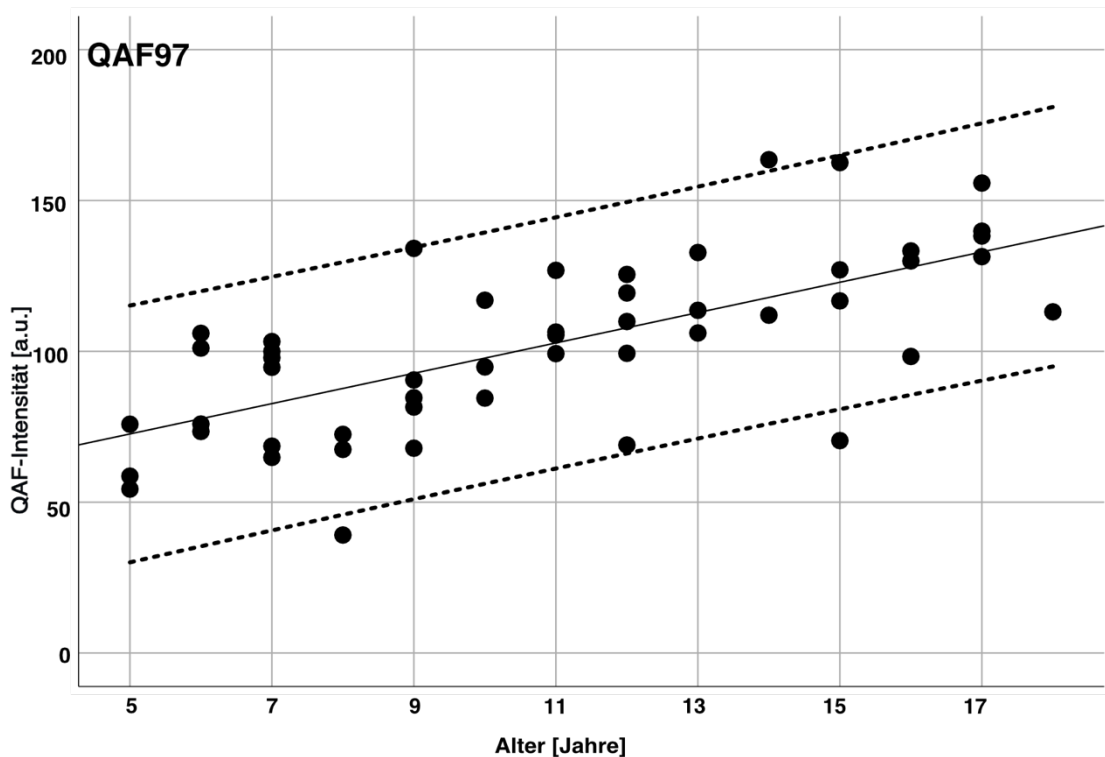


Abbildung 19: QAF97-Werte aller Studienprobanden (n=53)

Die QAF97-Werte aller Probanden sind hier gegenüber dem Alter aufgetragen. Die lineare Regressionsgerade ist als durchgezogene Linie, das 95%-Konfidenzintervall als gestrichelte Linien dargestellt. Die QAF97 steigt mit dem Alter an. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

3.2.4 QAF der Fovea

Die QAF-Werte der Fovea aller Probanden sind in **Tabelle 3** dargestellt. Der Durchschnitts-QAF8-Wert betrug zwischen 5 bis 10 Jahren $50,2 \pm 14,2$ [a.u.] In der Altersgruppe von 11 bis 18 Jahren $63,6 \pm 17,2$ [a.u.].

3.2.4.1 Einfluss des Alters

Der Prädiktor Alter sagte statistisch höchst signifikant die QAF der Fovea voraus $F(1,51) = 44,6$, $p < 0,001$. Das Modell hatte mit $R^2 = 0,21$ eine mittlere Anpassungsgüte nach Cohen (125). Mit einer Basis-QAF der Fovea von 33,7 [a.u.] im Alter von fünf Jahren nahmen die QAF-Intensitäten um $2,2$ [a.u.] $\pm 0,6$ [a.u.] pro Lebensjahr zu. In **Abbildung 20** werden für alle Probanden die QAF-Werte der Fovea abgebildet.

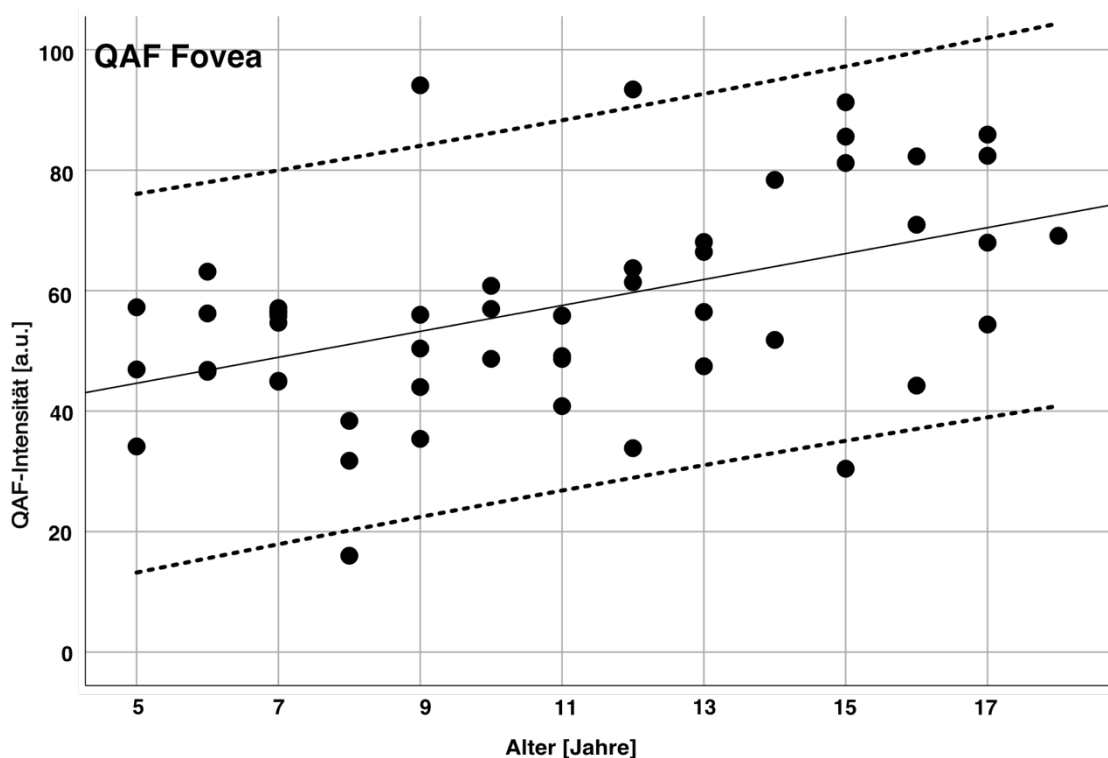


Abbildung 20: QAF-Werte der Fovea aller Studienprobanden (n=53)

Die QAF-Werte der Fovea aller Probanden sind hier gegenüber dem Alter aufgetragen. Die lineare Regressionsgerade ist als durchgezogene Linie, das 95%-Konfidenzintervall als gestrichelte Linien dargestellt. Die QAF-Werte der Fovea steigen mit dem Alter an. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

ERGEBNISSE

3.2.4.2 Einfluss des Geschlechts

Von den 53 Probanden waren 26 männlich und 27 weiblich. Es gab keine Ausreißer im Datensatz. Die beiden Gruppen waren gemäß Shapiro-Wilk Test normalverteilt. Die QAF der Fovea war bei männlichen Probanden im Mittel $56,91 \text{ [a.u.] } \pm 16,58 \text{ [a.u.]}$ und betrug bei den weiblichen Probanden im Mittel $57,59 \text{ [a.u.] } \pm 17,85 \text{ [a.u.]}$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der QAF der Fovea der beiden Geschlechtern, $t(51) = -0,143$, $p = 0,887$.

Tabelle 3: QAF8, QAF97, QAF_{fovea} aller Probanden (n = 53)

Probanden Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [M=männlich, W=weiblich]	Auge	QAF8 ± SD	QAF97 ± SD	QAF _{fovea} ± SD
0006	5	W	OD	80,2 ± 4,7	75,8 ± 10,8	46,9 ± 6,4
0039	5	M	OD	63,9 ± 6,4	58,6 ± 14,0	57,2 ± 6,6
0046	5	W	OD	58,4 ± 3,1	54,3 ± 6,5	34,1 ± 5,8
0031	6	W	OD	81,1 ± 6,4	75,9 ± 9,8	46,9 ± 6,2
0052	6	W	OD	108,9 ± 7,8	101,1 ± 16,6	56,2 ± 8,9
0061	6	W	OD	77,5 ± 5,4	73,4 ± 9,0	46,5 ± 5,2
0062	6	M	OS	114,7 ± 9,2	106,0 ± 13,0	63,2 ± 9,8
0012	7	W	OD	73 ± 10,3	68,6 ± 13,1	44,9 ± 5,5
0021	7	W	OS	109,5 ± 10	103,2 ± 15,2	56,4 ± 5,6
0022	7	M	OS	69,1 ± 8	64,8 ± 11,8	54,7 ± 7,7
0027	7	M	OD	107,6 ± 8,6	100,0 ± 18,7	55,8 ± 10,0
0053	7	W	OD	126,6 ± 8,9	97,9 ± 12,7	57,1 ± 8,6
0063	7	M	OD	98,7 ± 6,6	93,9 ± 10,3	56,5 ± 6,1
0070	7	M	OD	99,6 ± 5,9	94,7 ± 11,4	45,0 ± 8,8
0007	8	M	OD	42,3 ± 4	39,1 ± 5,8	16 ± 3,7
0028	8	M	OD	77,15 ± 7	72,5 ± 8,8	31,8 ± 5,6
0037	8	M	OD	73,2 ± 7,2	67,5 ± 10,4	38,4 ± 5,4
0010	9	M	OD	96,2 ± 9,2	90,5 ± 13,7	50,4 ± 9,7
0011	9	W	OD	85,4 ± 8,9	81,5 ± 11,5	56 ± 7,0
0029	9	W	OS	139,1 ± 13,9	134,1 ± 21,2	94,1 ± 14,6
0040	9	M	OD	90,8 ± 6,8	84,6 ± 11,3	44 ± 8,2
0041	9	M	OD	71,7 ± 3,8	67,9 ± 6,3	35,4 ± 4,9

ERGEBNISSE

Probanden Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [M=männlich, W=weiblich]	Auge	QAF8 ± SD	QAF97 ± SD	QAF _{fovea} ± SD
0045	10	M	OD	130,9 ± 10,9	116,9 ± 27,0	60,8 ± 9,5
0048	10	W	OD	88,2 ± 5,8	84,5 ± 9,0	48,7 ± 10,3
0064	10	M	OS	100,8 ± 3,1	94,8 ± 10,0	57,0 ± 8,1
0019	11	M	OS	112,3 ± 9	106,4 ± 14,0	49,1 ± 12,1
0038	11	M	OD	105,6 ± 6,3	98,8 ± 15,4	40,8 ± 7,8
0044	11	M	OD	110,3 ± 5,6	105,4 ± 9,6	48,7 ± 8,3
0047	11	M	OD	104,5 ± 8,9	99,2 ± 12,7	55,8 ± 8,0
0057	11	M	OD	134,9 ± 10,5	126,8 ± 20,0	55,9 ± 9,5
0018	12	M	OD	126,5 ± 9,5	119,4 ± 15,6	63,7 ± 8,3
0025	12	W	OD	74,3 ± 5,4	68,9 ± 10,3	33,9 ± 6,7
0030	12	W	OD	103,5 ± 5,6	99,3 ± 9,4	61,4 ± 8,1
0036	12	W	OD	116,5 ± 10,3	109,9 ± 14,8	63,7 ± 10,5
0054	12	M	OD	131,8 ± 9,2	125,5 ± 15,4	93,4 ± 8,2
0002	13	W	OD	111,2 ± 7,8	105,7 ± 9,8	56,5 ± 8,4
0015	13	W	OD	113,1 ± 12,3	106,1 ± 16,2	47,4 ± 5,6
0042	13	W	OD	142,2 ± 8,8	132,8 ± 14,8	66,4 ± 11,0
0026	14	W	OS	120,1 ± 15,5	112 ± 15,6	55,8 ± 11,8
0050	14	M	OD	174,2 ± 10,6	163,5 ± 19,7	78,4 ± 11
0014	15	W	OD	77,7 ± 13,7	70,4 ± 20,9	30,4 ± 6,9
0032	15	M	OD	168,5 ± 11,7	162,6 ± 19,5	85,6 ± 15,1
0058	15	W	OS	132 ± 7,8	127,0 ± 20,7	81,2 ± 13,6
0069	15	W	OD	124,5 ± 13,4	116,3 ± 16,7	91,3 ± 9,7
0003	16	W	OD	107,5 ± 16,9	98,3 ± 18,2	44,2 ± 9,6
0013	16	M	OS	122,3 ± 9,6	113,6 ± 20,1	68,1 ± 7,8
0065	16	W	OS	135,5 ± 7,3	130,0 ± 12,8	70,9 ± 17,3
0066	16	W	OS	145,6 ± 12,8	133,3 ± 19,7	82,3 ± 20,7
0016	17	M	OD	146,8 ± 5,8	138,2 ± 14,3	54,4 ± 9,5
0023	17	M	OD	162,6 ± 12,7	155,8 ± 17,4	82,4 ± 20,0
0043	17	W	OD	134,6 ± 13,5	131,4 ± 17,5	85,9 ± 17,1
0055	17	W	OS	148,7 ± 15,6	139,8 ± 24	68,0 ± 10,7
0067	18	M	OD	119,4 ± 11,8	113,1 ± 17,6	69,1 ± 11,8

3.2.5 Standardretinae

Für jede Altersgruppe, 5 - 10 Jahre (n = 25) und 11 - 18 Jahre (n = 28), wurde eine Standardretina erstellt (**Abb. 21**). Die QAF-Verteilung war in beiden Altersgruppen sehr ähnlich. Die höchsten QAF-Werte fanden sich ringförmig in der Perifovea. Die superior-temporalen Maxima zeichneten sich in der Altersgruppe 11 - 18 Jahre deutlicher ab als in Gruppe von 5 - 10 Jahren. Die QAF-Werte nahmen zu den Bildrändern hin ab. Zwischen den beiden Altersgruppen nahm das FAF-Signal mit dem Alter zu. Um die Fovea blieben die FAF-Signale vergleichsweise niedrig. Hier war eine Zunahme der FAF-Intensitäten zwischen der Gruppe 5 bis 10 Jahre und der Gruppe 11 bis 18 Jahre erkennbar.

Die Segmente des QAF97-grids mit den höchsten QAF-Werten sind in **Abbildung 22** dargestellt.

ERGEBNISSE

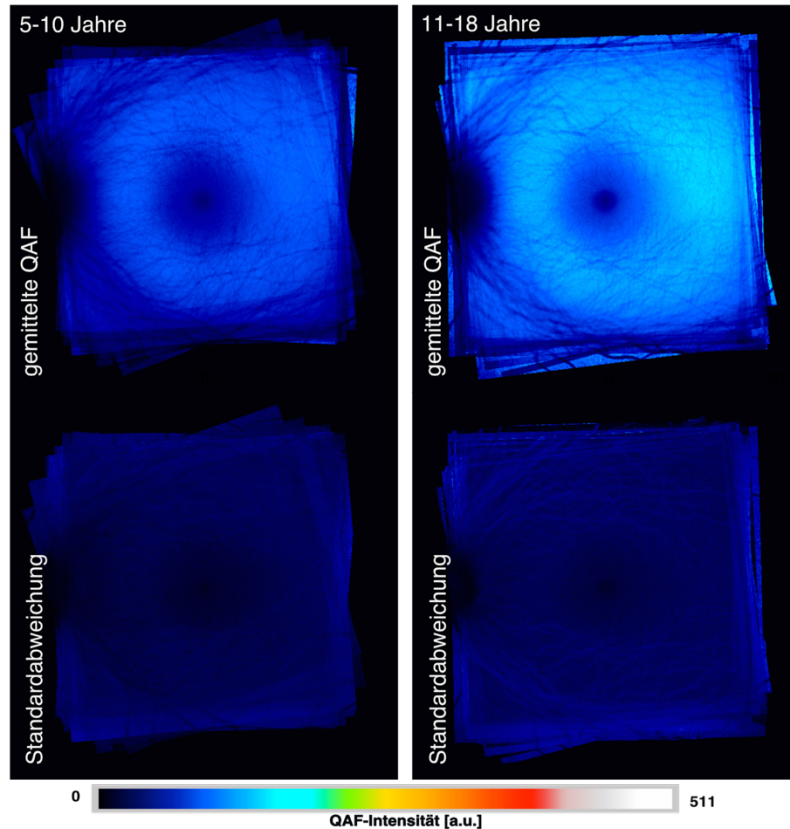


Abbildung 21: Standardretinae

Die Standardretinae wurden durch Überlagerung der individuellen QAF-Bilder erzeugt. Die Kongruenz der Einzelbilder wurde über die Position der Fovea und des temporalen Papillenrandes des Sehnervens errechnet. Die QAF-Standardretinae wurden für die Gruppe der 5-10- und der 11-18-Jährigen erzeugt. Die QAF-Werte sind farbkodiert. Es ist sowohl die gemittelte QAF als auch die korrespondierende Standardabweichung für beide Altersgruppen dargestellt. Zwischen den beiden Altersgruppen ist ein Anstieg der QAF-Intensitäten zu erkennen. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

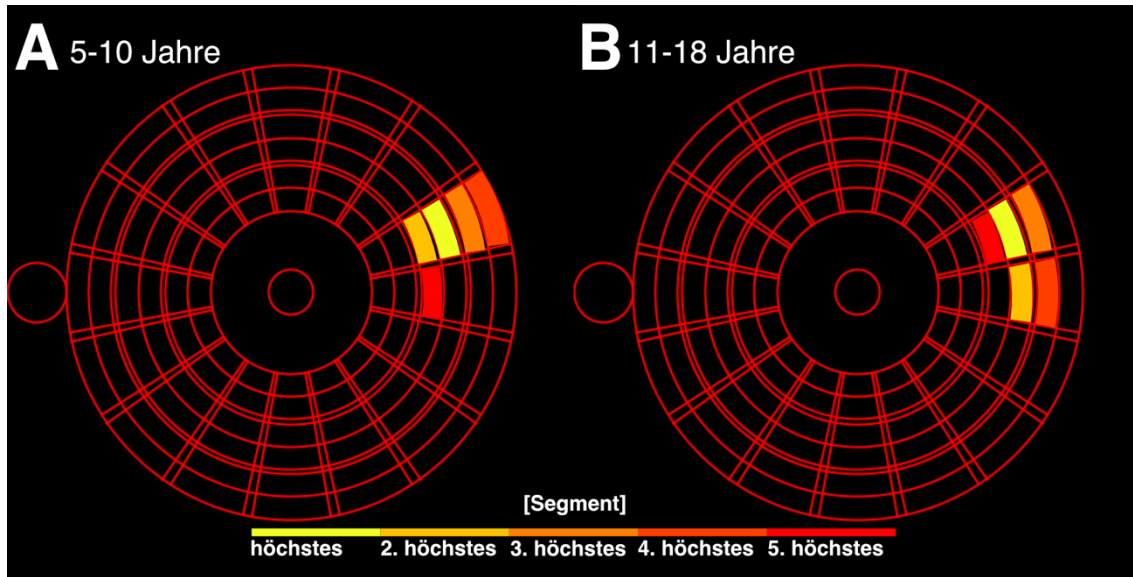


Abbildung 22: Segmente mit den höchsten QAF-Werten

Für beide Altersgruppen sind jeweils die fünf Segmente mit den höchsten QAF-Werten der Standardretinae für 5 bis 10 und 11 bis 18 Jahren dargestellt. Diese Segmente befinden sich in der temporalen Makula.

3.3 Korrelation von SD-OCT-Dickenmessungen retinaler Schichtdicken und QAF

3.3.1 Horizontaler Meridian

3.3.1.1 QAF

Die QAF stieg an allen Punkten, ausgenommen der Fovea, signifikant mit dem Alter an (**Tab. 4**). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den QAF-Werten der beiden Geschlechter (**Tab. 4**).

ERGEBNISSE

Tabelle 4: QAF-Werte des horizontalen Meridians

QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test

Abstand von der Fovea	Gemittelte QAF	Effekt des Alters auf die QAF*	Effekt des Geschlechts auf die QAF**
2,5 mm nasal	106,2 \pm 31,6	p < 0,001 ; R ² = 0,44	p = 0,76
2,0 mm nasal	107,2 \pm 20,0	p < 0,001 ; R ² = 0,35	p = 0,71
1,5 mm nasal	92,2 \pm 27,4	p < 0,001 ; R ² = 0,41	p = 0,81
1,0 mm nasal	77,0 \pm 23,7	p < 0,001 ; R ² = 0,32	p = 0,9
0,5 mm nasal	66,9 \pm 21,0	p < 0,001 ; R ² = 0,3	p = 0,35
0,0 mm (Fovea)	46,0 \pm 13,4	p = 0,08	p = 0,87
0,5 mm temporal	73,0 \pm 22,8	p < 0,001 ; R ² = 0,34	p = 0,85
1,0 mm temporal	85,6 \pm 23,8	p < 0,001 ; R ² = 0,37	p = 0,92
1,5 mm temporal	97,3 \pm 27,6	p < 0,001 ; R ² = 0,47	p = 0,98
2,0 mm temporal	109,7 \pm 31,5	p < 0,001 ; R ² = 0,42	p = 0,72
2,5 mm temporal	119,8 \pm 34,9	p < 0,001 ; R ² = 0,4	p = 0,9

3.3.1.2 Dicke der gesamten Retina

Im horizontalen Meridian zeigte sich nur am Punkt 0.0 (entspricht der Position der Foveola) ein signifikanter Anstieg der Dicke der Retina mit dem Alter (**Tab. 5**). An acht Messpunkten waren die Retinadicken männlicher Probanden signifikant höher, bei drei Punkten nicht (**Tab. 5**). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der QAF-Änderung und der Dicke der gesamten Retina (**Tab. 5**). Die **Abbildung 23** zeigt die Retinadicke und die QAF auf dem horizontalen Meridian.

ERGEBNISSE

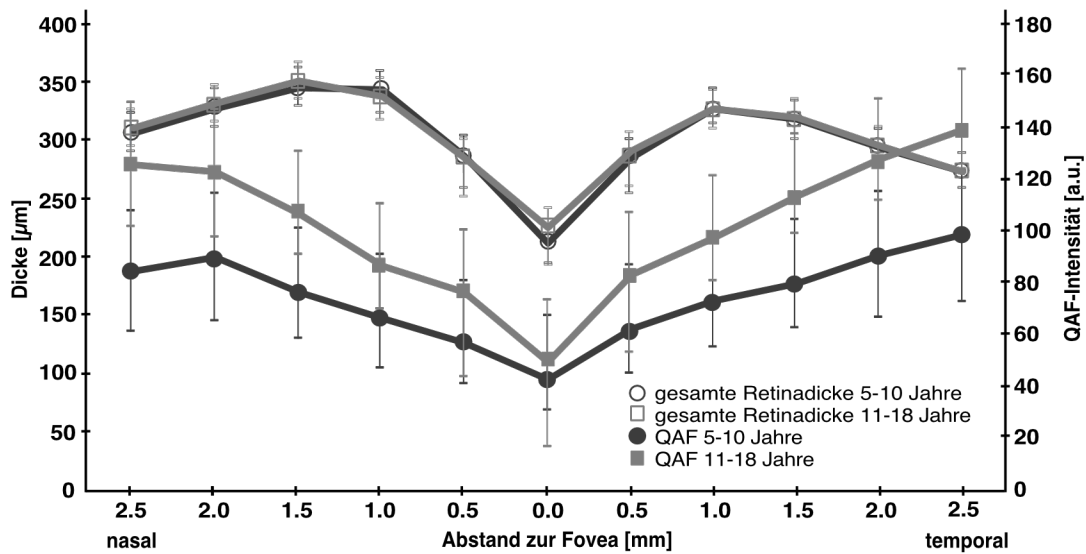


Abbildung 23: Retinadicke (ILM-RPE) und QAF - horizontaler Meridian

Für jeden Punkt des horizontalen Meridians wurden die korrespondierenden QAF- und OCT-Dickenwerte für die Altersgruppen 5-10 Jahre und 11-18 Jahre gemittelt. Die jeweiligen Graphen sind mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Die Dicke der gesamten Retina bleibt zwischen beiden Altersgruppen gleich. Die QAF der 11-18-Jährigen ist höher als die 5-10-Jährigen. In beiden Altersgruppen nimmt die QAF mit zunehmender Exzentrizität zu. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; ILM: Membrana limitans interna; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; RPE: retinales Pigmentepithel)

ERGEBNISSE

Tabelle 5: Dicke der gesamten Retina (ILM-RPE) des horizontalen Meridians

ILM: Membrana limitans interna; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; r: Korrelationskoeffizient; RPE: retinales Pigmentepithel

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test, *** berechnet mit Spearman Rangkorrelationskoeffizient oder Pearson Produkt-Moment-Korrelationkoeffizient und multipler linearer Regression

Abstand von der Fovea	Gemittelte Dicke der Retina [μm]	Effekt des Alters auf die Retinadicke*	Effekt des Geschlechts auf die Dicke der Retina**	Korrelation von retinalen Dicken und QAF***	
				r	p-Wert
2,5 mm nasal	308,7 \pm 16.1	p = 0,2	p<0,01 ; männlich + 11,65 μm	0,07	p = 0,595
2,0 mm nasal	329,9 \pm 16.3	p = 0,06	p = 0,08	-0,01	p = 0,904
1,5 mm nasal	348,5 \pm 16.2	p = 0,025 ; R ² = 0,095	p = 0,57	0,212	p = 0,127
1,0 mm nasal	339,9 \pm 20.0	p = 0,73	p<0,01 , männlich + 16,81 μm	0,147	p = 0,293
0,5 mm nasal	285,4 \pm 31	p = 0,98	p<0,001 , männlich + 7,72 μm	0,147	p = 0,294
0,0 mm (Fovea)	218,64 \pm 27.9	p = 0,003 ; R ² = 0,16	p = 0,5	-0,033	p = 0,813
0,5 mm temporal	287,9 \pm 30.9	p = 0,1	p<0,01 , männlich + 7,73 μm	0,204	p = 0,143
1,0 mm temporal	327,0 \pm 15.5	p = 0,53	p<0,001 , männlich + 14,4 μm	0,171	p = 0,221
1,5 mm temporal	318,3 \pm 15.5	p = 0,52	p<0,05 , männlich + 10,1 μm	0,016	p = 0,911
2,0 mm temporal	294,3 \pm 16.2	p = 0,5	p<0,001 , männlich + 10,23 μm	-0,038	p = 0,788
2,5 mm temporal	272,8 \pm 14.6	p = 0,94	p<0,05 , männlich + 9,34 μm	-0,045	p = 0,751

3.3.1.3 Dicke der inneren Retina

An den Messpunkten 1,5 mm nasal und Fovea des horizontalen Meridians zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Dicke der inneren Retina

ERGEBNISSE

(Tab. 6). Diese nahm mit dem Alter zu (Tab. 6). Bei allen anderen Messpunkten hatte das Alter keinen signifikanten Einfluss auf die Dicke der inneren Retina (Tab. 6). Männliche Probanden hatten 0,5 mm und 1,0 mm nasal wie temporal signifikant höhere Dicken der inneren Retina (Tab. 6). Die **Abbildung 24** zeigt die innere Retinadicke und die QAF auf dem horizontalen Meridians.

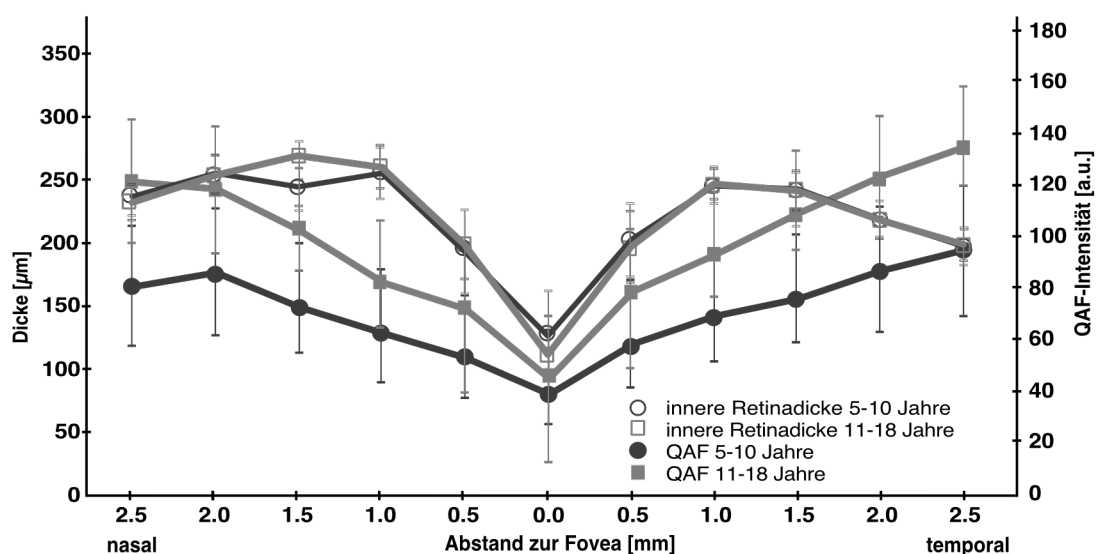


Abbildung 24: Innere Retinadicke (ILM-ELM) und QAF - Horizontaler Meridian

Für jeden Punkt des horizontalen Meridians wurden die korrespondierenden QAF- und OCT-Dickenwerte für die Altersgruppen 5-10 Jahre und 11-18 Jahre gemittelt. Die jeweiligen Graphen sind mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Die Dicke der inneren Retina bleibt zwischen beiden Altersgruppen, ausgenommen Punkt -1,5 mm nasal, gleich. Die QAF der 11-18-Jährigen ist höher als die 5-10-Jährigen. In beiden Altersgruppen nimmt die QAF mit zunehmender Exzentrizität zu. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit)

ERGEBNISSE

Tabelle 6: Dicke der inneren Retina (ILM-ELM) des horizontalen Meridians

ELM: Membrana limitans externa; ILM: Membrana limitans interna; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; r: Korrelationskoeffizient

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test, *** berechnet mit Spearman Rangkorrelationskoeffizient oder Pearson Produkt-Moment-Korrelationkoeffizient und multipler linearer Regression

Abstand von der Fovea	Gemittelte Dicke der inneren Retina \pm SD [μ m]	Effekt des Alters auf die innere Retinadicke*	Effekt des Geschlechts auf die Dicke der inneren Retina**	Korrelation von retinalen Dicken und QAF***	
				r	p-Wert
2,5 mm nasal	234,7 \pm 15,0	p = 0,078	p = 0,074	0,005	p = 0,973
2,0 mm nasal	254,3 \pm 15,0	p = 0,172	p = 0,186	-0,138	p = 0,325
1,5 mm nasal	256,4 \pm 29,0	p = 0,001 ; R ² = 0,19	p = 0,56	-0,836	p < 0,001
1,0 mm nasal	257,6 \pm 19,1	p = 0,686	p = 0,004 , männlich +14,98 μ m	0,160	p = 0,253
0,5 mm nasal	195,7 \pm 31,0	p = 0,73	p = 0,002 , männlich +25,94 μ m	0,050	p = 0,723
0,0 mm (Fovea)	119,3 \pm 29,1	p = 0,002 ; R ² = 0,18	p = 0,293	-0,104	p = 0,459
0,5 mm temporal	200,2 \pm 29,1	p = 0,1	p = 0,001 , männlich +24,93 μ m	0,198	p = 0,155
1,0 mm temporal	245,8 \pm 13,3	p = 0,5	p = 0,001 , männlich +11,34 μ m	0,123	p = 0,381
1,5 mm temporal	242,2 \pm 14,4	p = 0,432	p = 0,056	0,016	p = 0,910
2,0 mm temporal	218,4 \pm 15,0	p = 0,604	p = 0,074	-0,124	p = 0,375
2,5 mm temporal	197,8 \pm 13,9	p = 0,54	p = 0,031	-0,131	p = 0,351

3.3.1.4 Dicke der äußeren Retina

An den Messpunkten des horizontalen Meridians zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Alters auf die Dicke der äußeren Retina (**Tab. 7**). Zwischen den

ERGEBNISSE

Geschlechtern war überwiegend kein signifikanter Unterschied (zehn von elf Messpunkten) (**Tab. 7**).

Die **Abbildung 25** zeigt die äußere Retinadicke und die QAF auf dem horizontalen Meridian.

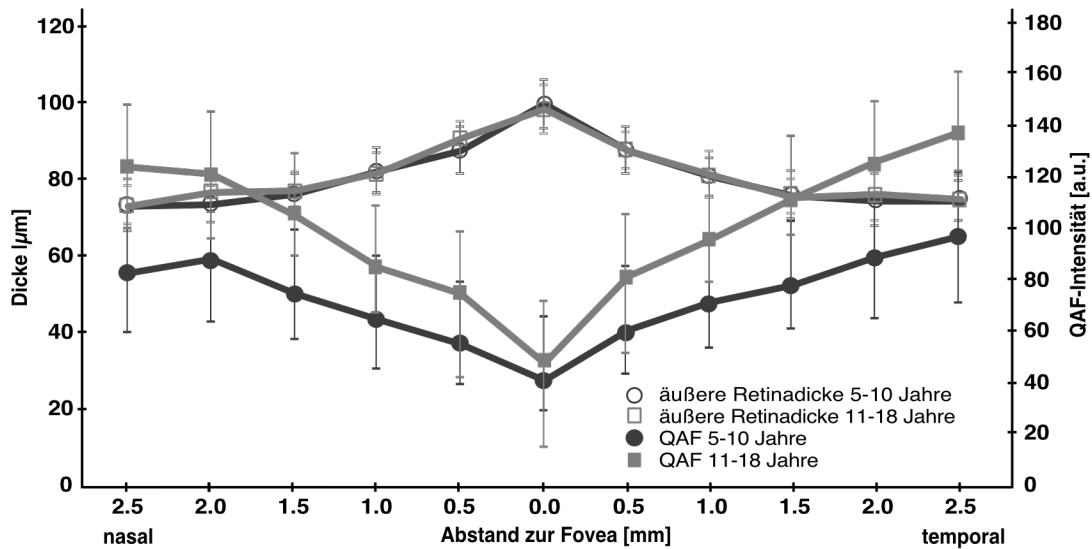


Abbildung 25: Äußere Retinadicke (ELM-RPE) und QAF - horizontaler Meridian

Für jeden Punkt des horizontalen Meridians wurden die korrespondierenden QAF-Werte und OCT-Dickenwerte für die Altersgruppen 5-10 Jahre und 11-18 Jahre gemittelt. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Striche dargestellt. Die Dicke der äußeren Retina bleibt zwischen beiden Altersgruppen gleich. Die QAF der 11-18-Jährigen ist höher als die 5-10-Jährigen. In beiden Altersgruppen nimmt die QAF mit zunehmender Exzentrizität zu. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit)

ERGEBNISSE

Tabelle 7: Dicke der äußeren Retina (ELM-RPE) des horizontalen Meridians

ELM: Membrana limitans externa; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; r: Korrelationskoeffizient; RPE: retinales Pigmentepithel

Werte als Mittel ± Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test, *** berechnet mit Spearman Rangkorrelationskoeffizient oder Pearson Produkt-Moment-Korrelationkoeffizient und multipler linearer Regression

Abstand von der Fovea	Gemittelte Dicke der äußeren Retina	Effekt des Alters auf die äußere Retinadicke*	Effekt des Geschlechts auf die Dicke der äußeren Retina**	Korrelation von retinalen Dicken und QAF***	
				r	p-Wert
2,5 mm nasal	73,6 ± 6,0	p = 0,77	p<0,01 , männlich + 4,26 µm	0,105	p = 0,455
2,0 mm nasal	75,6 ± 5,4	p = 0,06	p = 0,106	0,316	p = 0,021
1,5 mm nasal	77,1 ± 5,1	p = 0,2	p = 0,55	1,000	p < 0,001
1,0 mm nasal	82,3 ± 5,8	p = 0,89	p = 0,23	0,103	p = 0,464
0,5 mm nasal	89,6 ± 5,5	p = 0,07	p = 0,51	0,352	p = 0,010
0,0 mm (Fovea)	99,3 ± 6,5	p = 0,25	p = 0,35	0,081	p = 0,564
0,5 mm temporal	87,9 ± 5,4	p = 0,76	p = 0,32	0,101	p = 0,470
1,0 mm temporal	81,2 ± 5,7	p = 0,93	p = 0,05	0,120	p = 0,392
1,5 mm temporal	76,1 ± 5,6	p = 0,83	p = 0,09	-0,02	p = 0,890
2,0 mm temporal	75,9 ± 7,2	p = 0,67	p = 0,27	0,220	p = 0,114
2,5 mm temporal	75,3 ± 5,6	p = 0,76	p = 0,34	0,283	p = 0,040

3.3.2 Alter und Korrelation der retinalen Dicken des horizontalen Meridians

Die QAF-Werte stiegen signifikant mit dem Alter an allen Punkten des horizontalen Meridians mit Ausnahme der Fovea an (Tab. 4). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der Dicke der gesamten Retina und der QAF im gesamten horizontalen Meridian (Tab. 5). Am Punkt 1,5 mm zeigte sich eine Abnahme der

ERGEBNISSE

QAF bei Zunahme der inneren Retinadicke (**Tab. 6**). Sonst fand sich keine Korrelation zwischen der Dicke der inneren Retina und den QAF-Werten (**Tab. 6**). Zwischen den fokalen retinalen Dicken der nasalen Parafovea (1,5 mm vom Zentrum der Fovea) und der QAF zeigten sich signifikant positive und negative Korrelationen: Ein Anstieg der QAF korrelierte mit einer Zunahme der äußeren Retinadicke und eine Abnahme der QAF mit zunehmender Retinadicke (**Tab. 7**). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der QAF und der äußeren Retina der nasalen Parafovea (0,5 mm und 2,0 mm vom Zentrum der Fovea) und der temporalen Parafovea (2,5 mm vom Zentrum der Fovea) (**Tab. 7**).

Das Alter und die Dicke der äußeren Retina an der nasalen Parafovea (1,5 mm vom Zentrum der Fovea) sagten die QAF-Intensitäten in der Kohorte voraus ($F(2, 50) = 153,4, p < 0,001$). Jedem Jahr zwischen 5 und 18 Jahren wurde eine QAF-Intensität von 1,6 [a.u.] zugeordnet und jedem μm der nasalen äußeren Retinadicke (1,5 mm von der Fovea) eine QAF-Intensität von 0,85 [a.u.].

Das korrigierte R^2 zeigte mit einem Wert von 0,85 eine hohe Anpassungsgüte.

3.3.3 ETDRS

3.3.3.1 QAF

Die untenstehende **Tabelle 8** gibt eine Übersicht über die durchschnittlichen QAF-Werte für alle Segmente des ETDRS-Grids. Des Weiteren sind der Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die jeweiligen Messwerte dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 8: QAF-Werte des ETDRS-grids

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz
Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit
unabhängigem t-Test

	gemittelte QAF	Effekt des Alters auf die QAF*	Effekt des Geschlechts auf die QAF**
ETDRS Segment 1	61,8 \pm 18,4	$p < 0,001$; $R^2 = 0,27$	$p = 0,9$
ETDRS Segment 2	82,5 \pm 23,7	$p < 0,001$; $R^2 = 0,4$	$p = 0,96$
ETDRS Segment 3	81,3 \pm 23,3	$p < 0,001$; $R^2 = 0,39$	$p = 0,72$
ETDRS Segment 4	81,3 \pm 23,2	$p < 0,001$; $R^2 = 0,42$	$p = 0,84$
ETDRS Segment 5	86,6 \pm 24,2	$p < 0,001$; $R^2 = 0,43$	$p = 0,95$
ETDRS Segment 6	106,9 \pm 29,9	$p < 0,001$; $R^2 = 0,47$	$p = 0,89$
ETDRS Segment 7	104,2 \pm 27,4	$p < 0,001$; $R^2 = 0,43$	$p = 0,59$
ETDRS Segment 8	101,6 \pm 27,8	$p < 0,001$; $R^2 = 0,39$	$p = 0,42$
ETDRS Segment 9	110 \pm 30,5	$p < 0,001$; $R^2 = 0,47$	$p = 0,89$
Ring 1	82,9 \pm 23,4	$p < 0,001$; $R^2 = 0,4$	$p = 0,89$
Ring 2	105,8 \pm 28,4	$p < 0,001$; $R^2 = 0,45$	$p = 0,59$

3.3.3.2 Dicke der gesamten Retina

Bei den Messungen mittels des ETDRS-grids hatte das Alter in der Gesamtbetrachtung keinen Einfluss auf die Retinaschichtdicke (**Tab. 9**). Bei der Untersuchung der Geschlechtsunterschiede ergaben sich in sechs Segmenten des ETDRS-grid für männliche Probanden signifikant höhere Schichtdicken (**Tab. 9**). In den übrigen drei Segmenten konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (**Tab. 9**).

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Dicke der gesamten Retina (ILM-RPE) des ETDRS-grids

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; ILM: Membrana limitans interna; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; RPE: retinales Pigmentepithel

Ring 1 ist der Durchschnitt der ETDRS-Segmente 2, 3, 4, 5 und Ring 2 das Mittel der Segmente 6, 7, 8, 9.

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test

	Gemittelte Dicke der Retina	Effekt des Alters auf die Retinadicke	Effekt des Geschlechts auf die Dicke der Retina
ETDRS Segment 1	268,0 \pm 28,1	p = 0,13	p<0,01 , männlich + 25,8 μ m
ETDRS Segment 2	339,6 \pm 21,6	p = 0,18	p = 0,2
ETDRS Segment 3	342,8 \pm 16,3	p = 0,05	p<0,01 , männlich +13,2 μ m
ETDRS Segment 4	339,9 \pm 15,3	p = 0,11	p<0,01 , männlich +11,6 μ m
ETDRS Segment 5	328,9 \pm 15,2	p = 0,22	p<0,01 , männlich +12,3 μ m
ETDRS Segment 6	304,2 \pm 14,6	p = 0,21	p = 0,2
ETDRS Segment 7	320,2 \pm 15,5	p = 0,06	p = 0,19
ETDRS Segment 8	289,3 \pm 43,3	p < 0,05 ; R ² = 0,087	p = 0,26
ETDRS Segment 9	288,4 \pm 14,3	p = 0,66	p<0,05 , männlich + 10,1 μ m
Ring 1	337,8 \pm 15,5	p = 0,09	p<0,01 , männlich + 11,9 μ m
Ring 2	300,7 \pm 17,8	p = 0,06	p<0,05 , männlich + 7,4 μ m

3.3.3.3 Dicke der äußeren Retina

Bei den Messungen in den Segmenten des ETDRS-grids hatte das Alter keinen Einfluss auf die Dicke der äußeren Retinaschichten (**Tab. 10**). Bei der Untersuchung der Geschlechtseinflusses fand sich nur bei zwei von elf Segmenten ein signifikanter Unterschied (**Tab. 10**).

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Dicke der äußeren Retina (ELM-RPE) des ETDRS-grids

ELM: Membrana limitans externa; ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz; RPE: retinales Pigmentepithel

Ring 1 ist der Durchschnitt der ETDRS-Segmente 2, 3, 4, 5 und Ring 2 das Mittel der Segmente 6, 7, 8, 9.

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test

	Gemittelte Dicke der äußeren Retina	Effekt des Alters auf die äußere Retinadicke*	Effekt des Geschlechts auf die Dicke der äußeren Retina**
ETDRS Segment 1	91,1 \pm 3,8	p = 0,99	p = 0,72
ETDRS Segment 2	81,5 \pm 2,8	p = 0,51	p = 0,2
ETDRS Segment 3	83,8 \pm 2,7	p = 0,32	p = 0,06
ETDRS Segment 4	81,3 \pm 3,0	p = 0,47	p = 0,27
ETDRS Segment 5	82,3 \pm 2,4	p = 0,7	p = 0,2
ETDRS Segment 6	79,8 \pm 2,8	p = 0,383	p = 0,08
ETDRS Segment 7	80,1 \pm 3,1	p = 0,8	p < 0,05 , männlich + 1,7 μ m
ETDRS Segment 8	78,3 \pm 3,2	p = 0,94	p < 0,05 , männlich +1.8 μ m
ETDRS Segment 9	78,7 \pm 2,8	p = 0,67	p = 0,14
Ring 1	82,2 \pm 2,6	p = 0,14	p = 0,14
Ring 2	79,2 \pm 2,8	p = 0,056	p = 0,056

3.3.3.4 Dicke des RPE

Bei den Messungen mittels des ETDRS-grids hatte das Alter in den inneren Segmenten (Segment 1, 2, 3, 4, entsprechend Ring 1) einen signifikanten Einfluss auf die RPE-Dickenzunahme (**Tab. 11**). In den äußeren Segmenten (Segmente 5 bis 9, entsprechend Ring 2) zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Alters (**Tab. 11**). Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die RPE-Dicke (**Tab. 11**).

ERGEBNISSE

Tabelle 11: Dicke des RPE (Interdigitationszone-Choriokapillaris) des ETDRS-grid

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz, RPE: retinales Pigmentepithel

Ring 1 ist der Durchschnitt der ETDRS-Segmente 2, 3, 4, 5 und Ring 2 das Mittel der Segmente 6, 7, 8, 9.

Werte als Mittel \pm Standardabweichung, *bestimmt mittels linearer Regression, **berechnet mit unabhängigem t-Test

	gemittelte RPE-Dicke	Effekt des Alters auf die RPE-Dicke*	Effekt des Geschlechts die RPE-Dicke**
ETDRS Segment 1	16,7 \pm 1,7	p < 0,05 ; R ² = 0,1	p = 0,81
ETDRS Segment 2	14,4 \pm 1,3	p < 0,01 ; R ² = 0,16	p = 0,98
ETDRS Segment 3	15 \pm 1,7	p < 0,01 ; R ² = 0,18	p = 0,52
ETDRS Segment 4	14,3 \pm 1,5	p < 0,05 ; R ² = 0,09	p = 0,88
ETDRS Segment 5	13,7 \pm 1,3	p = 0,3	p = 0,98
ETDRS Segment 6	13,3 \pm 1,4	p = 0,23	p = 0,97
ETDRS Segment 7	13,7 \pm 1,6	p = 0,72	p = 0,3
ETDRS Segment 8	13,0 \pm 1,4	p = 0,73	p = 0,54
ETDRS Segment 9	12,2 \pm 1,7	p = 0,95	p = 0,37
Ring 1	14,4 \pm 1,3	p < 0,01 ; R ² = 0,13	p = 0,971
Ring 2	13,1 \pm 1,2	p = 0,83	p = 0,72

4 Diskussion

Die Untersuchung der Fundusautofluoreszenz ist seit fast drei Jahrzehnten eine schnelle und reproduzierbare Darstellungsmethode vornehmlich des RPE (38). Kommt es zu Veränderungen innerhalb des RPE, spiegelt sich dies in Veränderungen der Fundusautofluoreszenz wider. Dies zeigt sich beispielsweise bei Krankheiten wie der altersbedingten Makuladegeneration, Morbus Stargardt und Retinitis pigmentosa (2, 4, 126). Vor der Einführung der QAF wurden FAF-Aufnahmen vor allem in ihrem Muster qualitativ beurteilt. Mit der QAF in Kombination mit der hochauflösenden SD-OCT können Veränderungen in der äußeren Netzhaut histologisch *in vivo* untersucht werden.

4.1 Diskussion der Methodik

Die Qualität der QAF-Aufnahmen beeinflusst die QAF-Messwerte. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die Aufnahmen von geschulten Personen durchgeführt werden. In dieser Studie erfolgten alle Bildaufnahmen durch eine trainierte Untersucherin. Für eine hochwertige und vergleichbare Bildaufnahme sind Kriterien wie Ausleuchtung, Fokussierung und Aufnahme innerhalb der linearen Detektorsensitivität von entscheidender Bedeutung (5, 109). Des Weiteren ist Qualität der QAF-Aufnahmen abhängig von der Mitarbeit der Untersuchten. Bei den in diese Studie eingeschlossenen Kindern und Jugendlichen war diese sehr unterschiedlich und machte einen besonders sensiblen Umgang mit den jungen Probanden und den begleitenden Erziehungsberechtigten erforderlich. 24 % (17 Probanden) der Untersuchten wurden wegen mangelnder Mitarbeit, Photophobie oder unzureichender Blickfixierung ausgeschlossen. Dies zeigt die Limitationen und Herausforderungen dieser Bildgebungstechnik bei jungen Probanden. Dies gewährleistete jedoch, dass in der hier vorgelegten Studie nur qualitativ hochwertige Bilder eingeschlossen wurden.

Gleichwohl macht diese Arbeit deutlich, dass mit der QAF-Bildgebung hochwertige Ergebnisse auch bei sehr jungen Patienten erzielt werden können.

DISKUSSION

Auf Grund der in der Literatur belegten guten Wiederholbarkeit der QAF-Technik wurde bei unserem Probandengut auf Untersuchungen zur Wiederholbarkeit verzichtet (5, 9, 109).

In dieser Studie wie auch in den bisherigen Studien zu QAF wurde das cSLO HRA2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) benutzt (5, 9). Bei anderen Geräten könnte sich die Nonuniformität anders gestalten und eine Vergleichbarkeit einschränken. Studien über die Vergleichbarkeit unquantifizierter FAF bei Aufnahme mit verschiedenen cSLOs zeigten signifikante Unterschiede des Bildkontrasts und der Grauwertverteilung (107). In zukünftigen Untersuchungen muss dies bei der Wahl der Geräte beachtet werden.

Bei den QAF-Aufnahmen dieser Studie wurde auf die Blutgefäße der Retina fokussiert. Dies entspricht dem in der Forschungsgruppe etablierten Aufnahmeprozess. In vorherigen Studien von Delori et al. und Greenberg et al. ist beschrieben, dass die Fokuseinstellungen über das QAF-Signal vorgenommen wurden. Die Fokussierung erfolgte in diesen Arbeiten auf das durch den Untersucher abgeschätzte maximale QAF-Signal (5, 9). Eine Fokuseinstellung über den Schwarz-Weiß-Kontrast der Gefäße ist möglicherweise visuell präziser vorzunehmen als diskrete Graustufenänderungen um das maximale QAF-Signal. Die Fokuseinstellungen nehmen Einfluss auf die QAF-Werte. Delori et al. schätzten einen QAF-Signalverlust von 5% pro 0,6 – 0,7 dpt Abweichung gegenüber den Maximalwerten (5). Beim Vergleich von absoluten QAF-Intensitäten muss also diesem Faktor Rücksicht getragen werden.

Der Bildaufnahmeprozess, insbesondere der QAF-Bilder, war bei den Probanden unterschiedlich lang. Jeder QAF-Aufnahme ging eine 20 Sekunden lange Bleichphase voraus, danach variierte jedoch auf Grund probandenabhängiger Faktoren (zum Beispiel Photophobie oder Fixierungsschwierigkeiten) die Zeit der retinalen Beleuchtung mit der Exzitationswellenlänge von 488 nm. Delori et al.

DISKUSSION

zeigten, dass eine Belichtung über die 20 Sekunden lange Bleichphase hinaus zu keiner weiteren QAF-Intensitätsveränderung führt (5). Somit bleibt die Verwertbarkeit der QAF-Bilder auch bei längerem Aufnahmeprozess erhalten.

Jedes QAF-Bild wurde aus einer Bildserie gemittelt. Bei jeder Aufnahme entstanden dabei 12 Einzelbilder. Mindestens 9 wurden dabei zu einem QAF-Bild gemittelt. Dies entspricht damit der von Delori et al. vorgeschlagenen Auswertungsmethode (5).

Die Einschätzung der Bildqualität erfolgte durch die Untersucherin (Carla Pröbster) in Abstimmung mit dem Studienleiter (Priv.-Doz. Dr. Thomas Ach) und der Arbeitsgruppe Ach. Jede Bildserie wurde auf Zentrierung, Bildschärfe und Ausleuchtung überprüft. Diese Form der untersucherabhängigen Überprüfung könnte in Zukunft durch Software unterstützt werden.

Die Trübung der optischen Medien mit dem Alter sind bei der Beurteilung der QAF-Messungen zu berücksichtigen, da sie zu einer Verminderung der FAF führt. Mit dem Einbezug der Formel nach van de Kraats und van Norren et al. wird diesem Faktor Rechnung getragen und ein Vergleich der QAF-Werte über verschiedene Altersgruppen hinweg möglich. In dem hier untersuchten jungen gesunden Probandengut besteht mit dem Korrekturfaktor 0,95 kein Lichtverlust in den optischen Medien (111).

Des Weiteren könnte die axiale Länge Einfluss auf die QAF-Messungen nehmen (5). Beispielsweise ist die Bildweite bei myopen Augen kleiner als bei hyperopen Augen. Die Ausrichtung der grids erfolgte OCT-basiert anhand von definierten Landmarken und führt somit zu einer individuellen Größenanpassung des grids. Unabhängig der axialen Länge, nimmt nach Delori et al. die Fokussierung des Bildes Einfluss auf die QAF-Intensität. Eine Abweichung vom Fokus kann somit zu einer Verminderung der QAF führen (5).

Systematische Daten zum Zusammenhang der axialen Länge und der QAF liegen bis jetzt nicht vor.

DISKUSSION

In dieser Studie wurden zur Analyse der verschiedenen Bildgebungsmodalitäten verschiedene Auswertungsmuster (grids) verwendet. Benutzt wurden das in der Early-Treatment-Diabetic-Retinopathy-Study eingeführte Auswertungsmuster, das ETDRS-grid, das von Delori et al. etablierte Muster sowie zwei von der Arbeitsgruppe Ach erstmalig vorgestellten grids (QAF97-grid und horizontal meridian) (5, 118, 123). Das sogenannte QAF97-grid unterteilt das Delori-grid in weitere kleinere Segmente. Der QAF97-Wert wird durch Mittelung aller Segmente des grids mit Ausnahme der Fovea errechnet. Der horizontale Meridian umfasst elf punktförmige Messungen im von 0,5 mm Abstand auf einer horizontalen Ebene durch die Fovea. In bisherigen Studien zur QAF wurden hauptsächlich die QAF8-Werte verglichen (5, 9, 65, 68). Dieser Wert entsteht durch Mittelung aller Segmente des mittleren Rings des Delori-grids. Die Wahl des QAF8-Werts als Vergleichsparameter wird wie folgt begründet: QAF-Aufnahmen sind nicht uniform. Fehlende Uniformität in QAF-Aufnahmen ist mit gerätebedingten Nonuniformitäten und fehlerhafter Bildausrichtung und Fokuseinstellung zu erklären (5). Mit zunehmender Exzentrizität nimmt das QAF-Signal ab (5). Delori et al. gaben an, dass bei einer Entfernung von 10° vom Bildzentrum die QAF auf 95% und an den Bildrändern auf 85 % abnahm (5). Dies war für sie der Anlass nur Segmente einer Region mit hoher Uniformität und nur über alle Quadranten als QAF8 gemittelt auszuwerten. Damit können jedoch pathologische QAF-Veränderungen außerhalb dieses Bereiches nicht erfasst werden. Zudem erschwert es Struktur-Funktionsanalysen, da zum Beispiel die Ringe des Delori-grids teilweise außerhalb des in der Makula-OCT aufgenommenen Felds liegen (69).

Ein Vorteil der vorgelegten Arbeit ist die Nutzung eigens für unsere Arbeitsgruppe erstellter Bildverarbeitungsprogramme. Durch sie konnten die Auswertungsmuster (horizontal meridian und ETDRS-grid) auf alle Bildmodalitäten gleichermaßen angewendet werden (118). So können in dieser Arbeit Vergleiche zwischen in der OCT erhobenen Dickenwerten und der QAF gezogen werden. Dem Aspekt der Nonuniformität kann dabei wie folgt begegnet werden: Da die QAF-Messungen des horizontal meridian im Feld der Makula-

DISKUSSION

OCT (20° x 20°) erhoben wurden, wurden nur Messungen mit einer Exzentrizität von je 10 ° vom Zentrum durchgeführt. Damit kam es mit dieser Messmethode nicht zu einem Signalabfall über 5%. Dies entspricht der bei den etablierten QAF8-Werten akzeptierten Signalabschwächung um ebenfalls 5% (5). Somit ist eine Stärke dieser Studie die Entwicklung und der Gebrauch von Analysemethoden für präzise Struktur-Funktionskorrelationen an genau festgelegten Punkten oder Segmenten im horizontalen Meridian und ETDRS-grid. Bei der QAF8 und QAF97 ist auf Grund der fehlenden OCT-Dickenauswertung der Retina diese Korrelation nicht möglich. In dieser Studie wird daher eine bisher einzigartige detaillierte Analyse und Korrelation der QAF mit anderen Bildmodalitäten am hinteren Pol ermöglicht (118, 123).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 QAF

Das Alter war in vorherigen Studien der Haupteinflussfaktor auf die QAF (5, 9, 118). Die bisherigen Studien untersuchten Probanden zwischen 5 und 60 Jahren (5, 9). Bisher wurden allerdings in der Altersspanne von 5 bis 20 Jahren nur ungefähr 10 Probanden kaukasischer Ethnie, 18 hispanischer Ethnie und 8 Afroamerikaner untersucht. QAF-Intensitäten unterschieden sich hier zwischen den Ethnien (9). Asiaten hatten die niedrigste QAF, gefolgt von Afroamerikanern und dann Personen mit hispanischer Ethnie (9). Kaukasier wiesen alterskorrigiert die höchsten QAF-Werte auf. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass bei Untersuchungen der QAF die jeweiligen Ethnien berücksichtigt werden müssen. Die hier vorgestellte Studie ist die bisher größte Untersuchung zur QAF bei Kindern und Jugendlichen kaukasischer Ethnie.

Das FAF-Muster der in dieser Studie untersuchten Kinder und Jugendlichen besaß folgende Charakteristika: verminderte FAF der Fovea-Region, Zunahme der FAF-Intensitäten in der Perifovea mit Maximum im superior-temporalen Quadranten und eine abnehmende FAF-Intensität zu den Bildrändern hin. Dieses FAF-Muster kindlicher Probanden gleicht qualitativ dem Erwachsener (9). Die hohen QAF-Signale in der Perifovea stehen mit der Photorezeptorverteilung und

DISKUSSION

deren Dichte in dieser Region im Zusammenhang (11). Durch die hohe Dichte der Photorezeptoren in der Perifovea fällt hier eine hohe Anzahl abgeschilfter Photorezeptoraußensegmente an (127). Diese werden vom RPE phagozytiert und tragen zur Lipofuszingranulagenese bei (127). Der Zusammenhang zwischen der Stäbchendichte und des Autofluoreszenzsignals ist in **Abbildung 26** veranschaulicht (7). Das höchste FAF-Signal war in dieser Untersuchung wie auch in vorherigen zumeist superior-temporal zu finden (5, 9, 128). Es wird diskutiert, ob die QAF-Intensitäten dort auf Grund gerätebedingter Asymmetrien überschätzt werden (9). Bei der Betrachtung von RPE-flatmounts (*ex vivo* Präparate der Retina, die plan montiert wurden) mittels quantitativer Autofluoreszenzuntersuchungen zeigte sich perifoveal eine erhöhte Autofluoreszenz ohne Maximum im superior-temporalen Quadranten (7). Bis jetzt bleibt das QAF-Maximum superior-temporal noch nicht hinreichend erklärt.

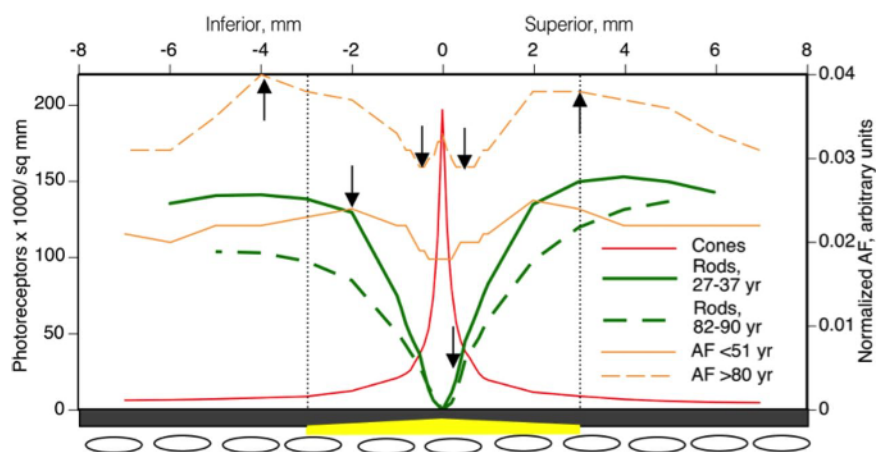


Abbildung 26: Topografie der Photorezeptoren und FAF

Die Abbildung von Ach et al. zeigt die topografische Verteilung der Stäbchen und Zapfen sowie korrespondierende FAF. In den Stäbchen reichen Regionen ist die FAF am höchsten. Mit dem Alter ist ein Anstieg der Fundusautofluoreszenz zu beobachten. (AF: Fundusautofluoreszenz; Cones: engl. Zapfen; Rods: engl. Stäbchen; yr: engl. Jahre; sq mm: engl. Quadratmillimeter) Abbildung von Ach et al., 2014 (7). Nachdruck mit Genehmigung. © Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vermittelt durch das Copyright Clearance Center.

In Übereinstimmung mit der Studie von Greenberg et al., die ebenfalls Probanden unter dem 18. Lebensjahr untersuchte, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den QAF8-Intensitäten und dem Alter (9). Mit dem Alter stieg die QAF8 höchst signifikant an. Unser lineares Modell besaß dabei mit $R^2 = 0,47$ eine hohe Anpassungsgüte nach Cohen (125). Die QAF8-Werte der vorgelegten Studie

DISKUSSION

sind in guter Übereinstimmung mit den wenigen Daten zu kindlichen kaukasischen Probanden der Studie von Greenberg et al. (9).

Die QAF97 Analyse wurde 2020 von Kleefeldt et al. vorgestellt (118). Die Autoren untersuchten die QAF97-Werte gesunder Probanden zwischen 19 und 64 Jahren. In der hier vorgestellten Studie wird zum ersten Mal von kindlichen QAF97-Werten berichtet. **Abbildung 27** fasst die Daten der Kinder und Erwachsenen der Studienteilnehmer an der Universitätsklinik Würzburg zusammen. Sie zeigt einen Anstieg der QAF97 zwischen dem 5 und 64 Lebensjahr. Bemerkenswerterweise passen sie gut zu den Ergebnissen einer histologischen Arbeit von Wing et al. über Lipofuszingranulaakkumulation im RPE aus dem Jahr 1978 (44). Diese zeigt zunächst eine Zunahme der Lipofuszingranula in den ersten beiden Lebensdekaden und darauffolgender Stagnation in den nächsten drei Dekaden. Ab dem fünfzigsten Lebensjahr nimmt dann die Lipofuszingranulakonzentration dann wieder stärker zu. Die Arbeit von Wing et al. untersuchte das RPE bis zum neunzigsten Lebensjahr. In unseren Arbeiten sind nur Aussagen bis zum sechzigsten Lebensjahr möglich. Interessant ist jedoch, dass die Kongruenz der vermehrten Lipofuszinakkumulation in den ersten Lebensdekaden sowohl in der histologischen Arbeit als auch in unseren Beobachtungen der QAF besteht.

DISKUSSION

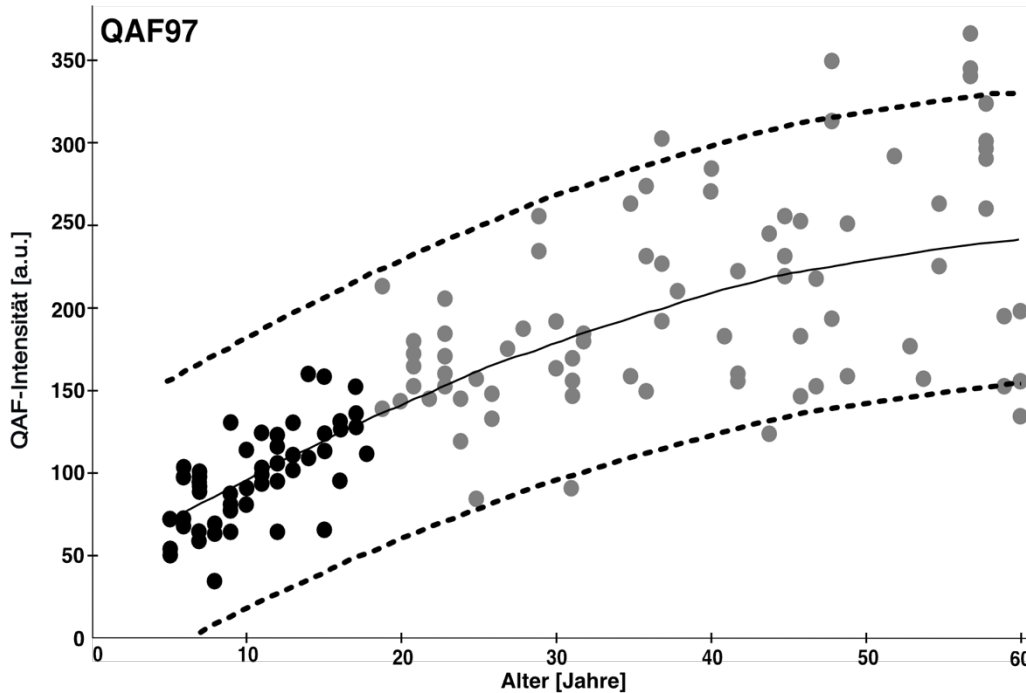


Abbildung 27: QAF97-Werte einer gesunden Kohorte zwischen 5 und 64 Jahren

QAF97-Werte sind für alle Probanden zwischen 5 und 64 Jahren dargestellt. Die schwarzen Punkte stehen für die Kinder der hier vorgelegten Studie. Die grauen Punkte (Probanden zwischen 19-64 Jahre) stammen aus einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe zur QAF von gesunden Erwachsenen (118). Die Trendlinie, quadratische Funktion, ist in schwarz durchgezogen dargestellt. Die 95%-Konfidenzintervalle sind gepunktet abgebildet. ([a.u.] = arbitrary unit, engl. für willkürliche Einheit; QAF: Quantitative Fundusautofluoreszenz)

Kleefeldt et al. beobachteten in ihrer Studie zur QAF-Entwicklung des Erwachsenen eine Verschiebung der QAF-Maxima mit dem Alter (118). Dabei wanderten die Maxima ab der vierten Lebensdekade von superior-temporal nach temporal (118). Interessanterweise kann auch zwischen den beiden kindlichen Gruppen eine leichte Verlagerung der Segmente mit der maximalen QAF nach temporal beobachtet werden (vgl. **Abb. 25**).

Ein Anstieg der QAF-Intensitäten der Fovea wurde bisher bei Delori et. al für Probanden über dem 20. Lebensjahr gezeigt (5). Unsere Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der QAF-Werte der Fovea-Region zwischen dem fünften und achtzehnten Lebensjahr, $R^2 = 0,211$. Bei Betrachtung des posterioren okulären Pols waren die QAF-Intensitäten an der Fovea am niedrigsten. Bei der

DISKUSSION

Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass das hier vorkommende Makulapigment Licht einer Wellenlänge von 400 - 540 nm absorbiert (112). Dies führt zu einer Verminderung des QAF-Signals, da die Anregung des Lipofuszins mit einer Wellenlänge von 488 nm im Absorptionsspektrum des Makulapigments erfolgt. Dies stellt sich als dunkler Punkt in der Fovea dar. Die topografische Verteilung des Makulapigments ist zwischen Individuen verschieden (114). Nach Bone et al. ist bei einer Exzentrizität von 7 - 8 Grad die Extinktion durch das Makulapigment vernachlässigbar (115). Erst hier können also mit der Technik der QAF verlässliche Aussagen gemacht werden. Dennoch legen unsere Ergebnisse nahe, dass es bereits in der kindlichen Fovea zu einer Lipofuzinakkumulation mit zunehmendem Alter kommt. Histologische Untersuchungen mittels SIM-Mikroskopie (structured illumination microscope) und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachteten eine Lipofuzingranulaakkumulation in der Fovea bei 16 bis 90 Jahre alten Gewebespendern, wenn auch deutlich geringerer als in der Perifovea und nahen Peripherie (29). Dabei sind auch bei dem sechszehnjährigen Spender foveale Lipofuzingranula darstellbar. Entgegensetzt zu den vorherigen Beschreibungen verminderter Lipofuzinakkumulation würde man in diesem stoffwechselaktiven und stark am Sehprozess involvierten Retinaareal von einer vermehrten Anzahl an Lipofuzingranula ausgehen. Möglicherweise entsteht die geringere Akkumulation von Lipofuzin in der Fovea durch einen besonderen Zellmetabolismus in dieser nur Zapfen enthaltenden Region (29, 129).

In allen weiteren Messungen der QAF (ETDRS-grid und horizontaler Meridian) zeigten sich ebenfalls signifikante Anstiege der QAF-Intensitäten mit dem Alter. Dabei war eine Zunahme der QAF-Werte mit zunehmender Exzentrizität von der Fovea zu beobachten. Das Auswertungsmuster horizontaler Meridian wurde in dieser Studie erstmalig zur QAF/Dickenbestimmung augengesunder Kinder angewendet. Zuvor wurde es von Reichel et al. in einer Studie zur QAF bei systemischer Chloroquin-Therapie vorgestellt (123). Es ermöglicht eine

DISKUSSION

zusammenhängende Betrachtung der OCT- und QAF-Aufnahmen. Mögliche Limitationen auf Grund von Nonuniformität wurden bereits weiter oben diskutiert.

Der von uns beobachtete Anstieg der QAF mit dem Alter ist kongruent mit histologischen Beobachtungen von Lipofuszingranulaakkumulationen im RPE (8, 109). Zum Zeitpunkt der Geburt enthält das RPE nur Melanosomen (8). Histologische Studien von Feeney-Burns et al. zeigen, dass sich in den RPE-Zellen autofluoreszierendes Material in Melanolysosomen ansammelt, wohin gegen nur wenige Lipofuszingranula bei jungen Kindern gefunden werden können (8, 30). Die geringe Anzahl an RPE-Lipofuszingranula steht in Einklang mit den von uns gemessenen niedrigen QAF-Werten der jüngsten Probanden. Diese Beobachtung kann durch die Reifung des posterioren Pols ab der Geburt mit zunehmender Photorezeptordichte und Sehzyklusmetabolismus (130) und damit verbundener gesteigerter Entstehung von Lipofuszin und Melanolipofuszin erklärt werden (7, 8). Mit steigender Anzahl von Lipofuszin und Melanolipofuszin nimmt auch die QAF-Intensität zu. Dennoch bleibt die QAF-Intensität in den ersten beiden Lebensdekaden niedrig (vgl. **Abb. 27**). Des Weiteren zeigt die QAF bei Kindern und Jugendlichen eine geringe Variabilität, die sich beim Erwachsenen vergrößert (118).

Wie auch in den meisten vorherigen Studien zur QAF von Augengesunden, untersuchten auch wir jeden Probanden zu je einem Zeitpunkt (5, 9, 131, 132). Aussagen über die individuelle Entwicklung der QAF-Werte im Kindesalter können deswegen bisher nicht getroffen werden.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei allen QAF-Messungen. Auch nach Aufteilung der Probanden in eine junge (5 - 10 Jahre) und ältere (10 - 18) Gruppe konnte kein Geschlechtsunterschied nachgewiesen werden. Greenberg et al. berichteten über eine signifikant höhere QAF8 ($p = 0,01$) bei Frauen. Sie fanden dafür jedoch kein Erklärungsmodell. Möglicherweise zeigen sich erhöhte QAF-Werte bei weiblichen Probanden erst im weiter fortgeschrittenen Lebensalter.

DISKUSSION

Die Standardretinae, generiert für die Altersgruppen 5 - 10 und 11 - 18 Jahre, zeigten einen Anstieg der QAF über den posterioren okulären Pol zwischen den beiden Altersgruppen. Sie stellen für jeden Pixel den durchschnittlichen QAF-Wert mit Standardabweichung dar. Diese Standardretinae könnten als Vergleichsmöglichkeit für alterskorrelierte Individuen oder Kohorten dienen. Zwischen den beiden Standardretinae zeigte sich eine Zunahme der QAF mit höherem Alter. Bemerkenswert ist, dass das FAF-Muster dem von Erwachsenen gleicht (9, 118). Die höchsten QAF-Werte sind temporal/temporal-superior zu finden. Wie bereits oben ausführlich ausgeführt, bleibt der Grund für die erhöhten QAF-Signale bei Kindern wie Erwachsenen in diesem Bereich spekulativ.

Die Schichtdicken der gesamten Retina, der äußeren Retina (zwischen Bruch Membran und ILM) sowie des RPE wurden unter Verwendung des ETDRS-grids. Mittels des horizontal meridians wurden die Dicken der gesamten Retina, der äußeren und inneren Retina vermessen.

4.2.2 Netzhautdicken

Die Gesamretinadicke war in der Fovea am geringsten, gefolgt von dem äußeren ETDRS-Ring (Ring 2). Der innere ETDRS-Ring (Ring 1) wies die höchste Retinadicke auf. Die in dieser Arbeit erhobenen Werte der Retinadicken sind vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien zu SD-OCT-Dickenmessungen bei Kindern kaukasischer Ethnie (131, 132). Die Gesamretinadicke bei Kindern asiatischer Ethnie scheint dünner als die von Kaukasiern zu sein (133).

Die Dicke der gesamten Retina veränderte sich in den ETDRS-Segmenten, bis auf Segment 8, nicht mit dem Alter. In Segment 8 zeigte sich ein signifikanter Anstieg mit dem Alter, $p < 0,05$. Allerdings war die Anpassungsgüte mit $R^2 = 0,09$ niedrig. Im horizontal meridian war bei allen Messungen exzentrisch der Fovea keine Veränderung mit dem Alter zu beobachten. An der Foveola zeigte sich ein signifikanter Anstieg mit dem Alter, $p < 0,05$, $R^2 = 0,16$. Diese Dickenzunahme ist konsistent mit anderen OCT-Studien der kindlichen Netzhaut und histologischen Arbeiten (131, 132, 134-137). Dies ist möglicherweise durch eine histologisch

DISKUSSION

gezeigte Verlängerung der Innen- und Außensegmente der Zapfen der Foveolaregion mit dem Alter zu erklären und führt in Verbindung mit deren gleichzeitiger Verdünnung der Photorezeptorsegmente und lateraler Zapfenimmigration zur Erhöhung der foveolären Zapfendichte bis ins mittlere Erwachsenenalter (135, 138). Damit stützen die Daten dieser Studie die Annahme neuerer Arbeiten, dass die Entwicklung der Fovea nicht wie früher angenommen zum fünften Lebensjahr abgeschlossen ist, sondern bis ins junge Erwachsenenalter andauert (137, 138). In den Segmenten 1 ($p < 0,01$), 3 ($p < 0,01$), 4 ($p < 0,01$), 5 ($p < 0,01$) und 9 ($p < 0,05$), sowie Ring 1 ($p < 0,01$) und 2 ($p < 0,05$) des ETDRS-grids und der Messpunkte des horizontalen Meridian zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Retinadicke männlicher und weiblicher Probanden. Damit passen unsere Ergebnisse zu denen einer Untersuchung türkischer Kinder, die in den gleichen Segmenten Geschlechtsunterschiede nachweisen konnte (131). In einer nordamerikanischen und einer schwedischen Arbeit konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern gezeigt werden, wohl aber auch ein Trend zu höheren Retinadicken bei den männlichen Probanden (132, 139). Im Erwachsenenalter ist dieser Geschlechtsunterschied ebenso nachweisbar (140, 141).

Die Dicke der inneren Retina wurde im horizontalen Meridian vermessen. Dabei zeigte sich lediglich am Punkt 1,5 mm nasal und an der Fovea ein signifikanter Anstieg der Schichtdicke mit dem Alter. Die innere Retina der männlichen Probanden war 0,5 mm und 1,0 mm nasal wie temporal signifikant höher.

Die gemessenen Dicken sind mit anderen OCT-Studien sowohl der kindlichen als auch erwachsenen kaukasischen inneren Retina vergleichbar (123, 132).

Die äußere Retinaschichtdicke veränderte sich sowohl in den ETDRS-Segmenten als auch den Messpunkten des horizontalen Meridians nicht mit dem Alter. Somit kann die oben beschriebene Zunahme der Foveoladicke mit dem Alter und den dort genannten Erklärungsmodellen durch die Ergebnisse dieser Studie nicht gestützt werden. Geschlechtsunterschiede konnten nur in den

DISKUSSION

Segmenten 7 ($p < 0,05$), 8 ($p < 0,05$), und Punkt -2,5 ($p < 0,01$) gezeigt werden. Über OCT-Messungen der äußeren Retinaschichtdicke wurde bisher in zwei Studien berichtet. In einer britischen Studie aus dem Jahr 2015 konnte eine Dickenzunahme der äußeren Retinaschichten mit dem Alter gezeigt werden, wobei die größte Dickenzunahme innerhalb der ersten 30 Lebensmonate festgestellt wurde und in höherem Kindesalter geringer war (137). In einer Studie aus China im Jahr 2019 wurden die äußeren Retinaschichten vermessen (142). Die äußere Retinadicke nahm hier mit zunehmendem Alter signifikant ab (142). Jedoch wurden die äußeren Retinaschichten (ORL) hier als Bereich zwischen innerer plexiformer Schicht und RPE-Bruch-Membran-Übergang gewählt. Damit ist ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich. In der Literatur wird als äußere Retina zumeist der Bereich zwischen ELM und RPE/Bruch'scher Membran erachtet (143-145). Dies zeigt die Wichtigkeit einer Standardübereinkunft über die Benennung retinaler Schichten in pädiatrischen OCT-Aufnahmen auf. In einer Studie von Reichel & Berlin et al., die auf den gleichen Analysemethoden wie diese Arbeit beruht, zeigten sich bei den augengesunden erwachsenen Probanden ähnliche Werte der äußeren Retinadicke (123).

Die Vermessung der RPE/Bruch'sche Membran-Komplexdicke unter Verwendung des ETDRS-grids zeigte eine Verdickung mit dem Alter im Ring 1 und den jeweiligen Segmenten. Es gab keine Geschlechtsunterschiede bei allen Segmenten. Die gemessene RPE/Bruch Membran-Komplexdicke war mit den Messergebnissen einer britischen Studie kongruent (137). In dieser Studie nahm die Dicke des RPE in den ersten 30 Lebensmonaten zu und blieb dann konstant. In einer Studie von Yanni et al. mit 83 nordamerikanischen Kindern zwischen 5 bis 15 Jahren wurde die RPE-Schichtdicke zentral und ± 2 mm neben der Fovea mit individueller Segmentations-Software gemessen (132). In diesen Messungen war das RPE ungefähr ein Drittel dicker als in unseren Ergebnissen. Dies ist möglicherweise mit der Verwendung unterschiedlicher Segmentierungs-Software zu begründen. Über Alters- oder Geschlechtseinflüsse wurde in dieser Arbeit nicht berichtet.

DISKUSSION

Eine histologische Arbeit über die RPE-Zelldichte im frühen Kindesalter (2 Jahre postnatal) zeigte eine Zunahme von der RPE-Zelldichte in der Makularegion in den ersten Lebenswochen mit darauf folgender konstanter Zelldichte (146). Dies ging mit einer Abnahme der RPE-Zelldichte in der Peripherie einher. Über das Zellvolumen wurde nicht berichtet.

Eine Arbeit von Cozzi et al. zeigte eine Zunahme der Dicke des RPE/Bruch Membran-Komplex in der OCT bei kaukasischen Erwachsenen (18- 65 Jahre) (147).

4.2.3 QAF und Netzhautdicken

Die Funktions(QAF)-Struktur(retinale Dicken in der SD-OCT)-Analysen zeigten eine Zunahme der QAF mit Verdickung der äußeren Retina. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Studien (147). Des Weiteren zeigte sich eine Verminderung der QAF-Intensitäten bei Verdickung der inneren Retina.

Diese Betrachtungen von QAF und Schichtdicken macht deutlich, dass die FAF nicht nur durch die Autofluoreszenz von Granula im RPE beeinflusst wird. Veränderungen der Transparenz der inneren oder äußeren Retina, zum Beispiel durch Verdickung oder Verdünnung (148, 149), Akkumulation von lichtblockierenden Pigmenten oder Material (150, 151) oder Akkumulation von hyperautofluoreszenten Material (152), können die Fundusautofluoresz verändern. Dies ist unabhängig von den darunterliegenden Granula des RPE.

4.2.4 Ausblick

Die hier vorgelegte Arbeit berichtet über die bisher größte Untersuchung der QAF von Kindern und Jugendlichen kaukasischer Ethnie. Da die QAF-Bildgebungstechnik relativ jung und im klinischen Alltag noch nicht weit etabliert ist, sind Daten besonders zur QAF des reifenden Auges rar. In künftigen Studien könnte die individuelle QAF-Entwicklung der eingeschlossenen Probanden untersucht werden.

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse ermöglichen eine Vergleichsmöglichkeit für Patienten in den ersten beiden Lebensdekaden. Diese könnte in der Diagnostik und Krankheitsüberwachung von retinalen Erkrankungen genutzt werden. Retinale Erkrankungen wie Morbus Stargardt, Retinitis pigmentosa, die mit QAF-Veränderungen verbunden sind, könnten womöglich im Frühstadium bereits vor in der gewöhnlichen Ophthalmoskopie sichtbaren Veränderungen erkannt werden (61, 153, 154). Mit der QAF-Diagnostik könnten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen vorgenommen werden (65, 66), Patienten für mögliche Therapien ausgewählt und diese Therapien in ihrem Erfolg überwacht werden. Des Weiteren wäre es möglich, Risikofaktoren zu identifizieren, die sich nach dem Kindesalter auf die Netzhautgesundheit auswirken könnten.

Unsere Daten mitteleuropäischer Kinder könnten bei der Erweiterung der normativen Daten über kindliche retinale OCT-Schichtdicken dienen. Sie könnten zu dem in Zusammenschau mit weiterer Funktionsdiagnostik (z.B. QAF, 787nm-FAF) insbesondere durch die in dieser Arbeit verwendeten präzisen Analysemethoden das Verständnis über die kindliche Retina im Gesunden wie im Kranken verbessern.

5 Zusammenfassung

Die quantitative Fundusautofluoreszenz ist eine relative junge Weiterentwicklung der Fundusautofluoreszenzmessung. Über eine interne Referenz im konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskop können FAF-Intensitäten eines Probanden, zwischen Probanden oder Kohorten verglichen und longitudinal beobachtet werden. Die Daten über die QAF-Entwicklung des kindlichen kaukasischen Auges sind rar. 53 Probanden ($10,9 \pm 3,8$ Jahre) kaukasischer Ethnie von 5 bis 18 Jahren wurden für diese Studie untersucht. Erhoben wurde der korneale Krümmungsradius, eine SD-Makula-OCT, eine FAF-Aufnahme bei 488 nm und eine QAF-Aufnahme. Mittels für diese Studie programmierter Softwaremodule für die Bildauswertungssoftware Fiji und der Spectralis-Segmentations-Software wurden die Bilder prozessiert. Dies beinhaltete unter anderem die Generierung von Standardretinae sowie die Applikation von Auswertungsmustern über QAF- und OCT-Bildern zur Berechnung von QAF-Intensitäten und retinaler Schichtdicken. Die QAF-Werte stiegen signifikant mit dem Alter an. Die FAF-Werte waren in der Fovea niedrig und der Perifovea am höchsten mit Maxima im superior-temporalen Quadranten. Es gab keine Geschlechtsunterschiede der QAF-Intensitäten. Die Retinadicken blieben mit dem Alter überwiegend stabil. Nur das RPE zeigte eine signifikante Zunahme der Dicke mit dem Alter. In der Gruppe der männlichen Probanden war die Dicke der gesamten Retina höher. Bei den anderen retinalen Schichtdicken bestand kein Geschlechtsunterschied. Dies ist die bisher größte Studie zur kindlichen QAF-Entwicklung. Kongruent mit histologischen und früheren Arbeiten zur QAF steigt die QAF mit dem Alter an. Das kindliche FAF-Muster entspricht qualitativ dem Erwachsener. Die Funktions-Struktur-Korrelation zeigte eine Verdickung des RPE mit zunehmendem Alter, wahrscheinlich durch die zunehmende Akkumulation von autofluoreszierenden Granula. Die erzeugten Standardretinae könnten in Zukunft helfen, pathologische FAF in erkrankten Augen zu beurteilen.

6 Literaturverzeichnis

1. von Ruckmann A, Fitzke FW, Bird AC. Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol.* 1995;79(5):407-12.
2. Delori FC, Staurenghi G, Arend O, Dorey CK, Goger DG, Weiter JJ. In vivo measurement of lipofuscin in Stargardt's disease--Fundus flavimaculatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(11):2327-31.
3. Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schutt F, Volcker HE. Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(5):1051-6.
4. Greenstein VC, Duncker T, Holopigian K, Carr RE, Greenberg JP, Tsang SH, et al. Structural and functional changes associated with normal and abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa. *Retina.* 2012;32(2):349-57.
5. Delori F, Greenberg JP, Woods RL, Fischer J, Duncker T, Sparrow J, et al. Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(13):9379-90.
6. Sparrow JR, Yoon KD, Wu Y, Yamamoto K. Interpretations of fundus autofluorescence from studies of the bisretinoids of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9):4351-7.
7. Ach T, Huisingh C, McGwin G, Jr., Messinger JD, Zhang T, Bentley MJ, et al. Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(8):4832-41.
8. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(2):195-200.
9. Greenberg JP, Duncker T, Woods RL, Smith RT, Sparrow JR, Delori FC. Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(8):5684-93.
10. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2019.
11. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol.* 1990;292(4):497-523.
12. Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol.* 1969;42(2):392-403.
13. Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P, Schein S. How Muller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *J Comp Neurol.* 2002;453(1):100-11.
14. Bringmann A, Unterlauff JD, Wiedemann R, Rehak M, Wiedemann P. Morphology of partial-thickness macular defects: presumed roles of Muller cells and tissue layer interfaces of low mechanical stability. *Int J Retina Vitreous.* 2020;6:28.
15. Mata NL, Radu RA, Clemmons RC, Travis GH. Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron.* 2002;36(1):69-80.

LITERATURVERZEICHNIS

16. Curcio CA, Millican CL, Allen KA, Kalina RE. Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(12):3278-96.
17. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System.* Salt Lake City (UT)1995.
18. Ts'o MO, Friedman E. The retinal pigment epithelium. I. Comparative histology. *Arch Ophthalmol.* 1967;78(5):641-9.
19. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-81.
20. Dornonville de la Cour M. Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1993(209):1-32.
21. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol.* 2002;215:395-431.
22. Miller SS, Edelman JL. Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol.* 1990;424:283-300.
23. Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm.* 2003;11(2):91-105.
24. Okada T, Ernst OP, Palczewski K, Hofmann KP. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(5):318-24.
25. Saari JC. Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(2):337-48.
26. Anderson DH, Fisher SK, Steinberg RH. Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(2):117-33.
27. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(1):8-15.
28. Pollreisz A, Messinger JD, Sloan KR, Mittermueller TJ, Weinhandl AS, Benson EK, et al. Visualizing melanosomes, lipofuscin, and melanolipofuscin in human retinal pigment epithelium using serial block face scanning electron microscopy. *Exp Eye Res.* 2018;166:131-9.
29. Bermond K, Wobbe C, Tarau IS, Heintzmann R, Hillenkamp J, Curcio CA, et al. Autofluorescent Granules of the Human Retinal Pigment Epithelium: Phenotypes, Intracellular Distribution, and Age-Related Topography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(5):35.
30. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(7):583-600.
31. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000;45(2):115-34.
32. Kim IT, Choi JB. Melanosomes of retinal pigment epithelium--distribution, shape, and acid phosphatase activity. *Korean J Ophthalmol.* 1998;12(2):85-91.

LITERATURVERZEICHNIS

33. Auker CR, Parver LM, Doyle T, Carpenter DO. Choroidal blood flow. I. Ocular tissue temperature as a measure of flow. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(8):1323-6.
34. Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:189-95.
35. Keilhauer CN, Delori FC. Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3556-64.
36. Streeten BW. The sudandophilic granules of the human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol*. 1961;66(391)
37. Boulton ME. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Exp Eye Res*. 2014;126:61-7.
38. Delori FC, Dorey CK, Staurenghi G, Arend O, Goger DG, Weiter JJ. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(3):718-29.
39. Ng KP, Gugiu B, Renganathan K, Davies MW, Gu X, Crabb JS, et al. Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(7):1397-405.
40. Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, Blonska A, Ghosh SK, Ueda K, et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(2):121-35.
41. Yamamoto K, Zhou J, Hunter JJ, Williams DR, Sparrow JR. Toward an understanding of bisretinoid autofluorescence bleaching and recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(7):3536-44.
42. Sparrow JR, Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K. A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(12):2988-95.
43. Ach T, Bermond K. [Autofluorescence of the Human Retinal Pigment Epithelium in Normal Aging and in Age-Related Macular Degeneration: Histology and Clinical Correlation]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2017.
44. Wing GL, Blanchard GC, Weiter JJ. The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978;17(7):601-7.
45. Starnes AC, Huisinigh C, McGwin G, Jr., Sloan KR, Ablonczy Z, Smith RT, et al. Multi-nucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution. *Vis Neurosci*. 2016;33:e001.
46. Gao H, Hollyfield JG. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(1):1-17.
47. Marshall J, Hussain A, Starita C, Moore D, Patmore A. The retinal pigment epithelium. Oxford University Press, USA; 1998.
48. Bruch K. Untersuchungen zur Kenntniss des körnigen Pigments der Wirbelthiere in physiologischer und pathologischer Hinsicht: Meyer und Zeller; 1844.
49. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE. Histology of the human eye. An atlas and textbook. Philadelphia: WB Saunders; 1971.

LITERATURVERZEICHNIS

50. Curcio CA, Johnson M. Structure, function, and pathology of Bruch's membrane. *Retina*. 2013;1(Part 2):466-81.
51. Mann I. The development of the human eye. Grune and Stratton. Inc, New York. 1964:68-149.
52. Beers AP, Van Der Heijde GL. In vivo determination of the biomechanical properties of the component elements of the accommodation mechanism. *Vision Res*. 1994;34(21):2897-905.
53. Hussain A, Starita C, Marshall J. Transport characteristics of aging human Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration. *Focus on Macular Degeneration Research (AMD) Nova Biomedical Books*. 2004:59-113.
54. Newsome DA, Huh W, Green WR. Bruch's membrane age-related changes vary by region. *Curr Eye Res*. 1987;6(10):1211-21.
55. Pichi F, Abboud EB, Ghazi NG, Khan AO. Fundus autofluorescence imaging in hereditary retinal diseases. *Acta ophthalmologica*. 2018;96(5):e549-e61.
56. Lois N, Halfyard AS, Bird AC, Holder GE, Fitzke FW. Fundus autofluorescence in Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(1):55-63.
57. Robson AG, Egan CA, Luong VA, Bird AC, Holder GE, Fitzke FW. Comparison of fundus autofluorescence with photopic and scotopic fine-matrix mapping in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(11):4119-25.
58. Lorenz B, Wabbels B, Wegscheider E, Hamel CP, Drexler W, Preising MN. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology*. 2004;111(8):1585-94.
59. Cideciyan AV, Aleman TS, Swider M, Schwartz SB, Steinberg JD, Brucker AJ, et al. Mutations in ABCA4 result in accumulation of lipofuscin before slowing of the retinoid cycle: a reappraisal of the human disease sequence. *Hum Mol Genet*. 2004;13(5):525-34.
60. Sparrow JR, Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res*. 2005;80(5):595-606.
61. Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, et al. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet*. 1998;18(1):11-2.
62. Cremers FP, van de Pol DJ, van Driel M, den Hollander AI, van Haren FJ, Knoers NV, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*. 1998;7(3):355-62.
63. Wu Y, Fishkin NE, Pande A, Pande J, Sparrow JR. Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease. *J Biol Chem*. 2009;284(30):20155-66.
64. Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*. 1999;98(1):13-23.

LITERATURVERZEICHNIS

65. Duncker T, Stein GE, Lee W, Tsang SH, Zernant J, Bearely S, et al. Quantitative Fundus Autofluorescence and Optical Coherence Tomography in ABCA4 Carriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(12):7274-85.
66. Duncker T, Tsang SH, Lee W, Zernant J, Allikmets R, Delori FC, et al. Quantitative fundus autofluorescence distinguishes ABCA4-associated and non-ABCA4-associated bull's-eye maculopathy. *Ophthalmology.* 2015;122(2):345-55.
67. Zanzottera EC, Ach T, Huisinigh C, Messinger JD, Spaide RF, Curcio CA. Visualizing Retinal Pigment Epithelium Phenotypes in the Transition to Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Retina.* 2016;36 Suppl 1:S12-S25.
68. Gliem M, Müller PL, Finger RP, McGuinness MB, Holz FG, Charbel Issa P. Quantitative Fundus Autofluorescence in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *JAMA ophthalmology.* 2016;134(7):817-24.
69. Reiter GS, Told R, Schlanitz FG, Bogunovic H, Baumann L, Sacu S, et al. Impact of Drusen Volume on Quantitative Fundus Autofluorescence in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(6):1937-42.
70. Fercher AF, Mengedocht K, Werner W. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Opt Lett.* 1988;13(3):186-8.
71. Youngquist RC, Carr S, Davies DE. Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique. *Opt Lett.* 1987;12(3):158-60.
72. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science.* 1991;254(5035):1178-81.
73. Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. In vivo optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 1993;116(1):113-4.
74. Reiser M, Kuhn F, Debus J. *Duale Reihe Radiologie.* Stuttgart: Thieme; 2017.
75. Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, et al. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(3):325-32.
76. Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, Huang D, Lin CP, Schuman JS, et al. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Opt Lett.* 1993;18(21):1864-6.
77. Leitgeb R, Wojtkowski M, Kowalczyk A, Hitzenberger CK, Sticker M, Fercher AF. Spectral measurement of absorption by spectroscopic frequency-domain optical coherence tomography. *Opt Lett.* 2000;25(11):820-2.
78. Leitgeb R, Hitzenberger C, Fercher A. Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography. *Opt Express.* 2003;11(8):889-94.
79. Choma M, Sarunic M, Yang C, Izatt J. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Opt Express.* 2003;11(18):2183-9.
80. Wojtkowski M, Leitgeb R, Kowalczyk A, Bajraszewski T, Fercher AF. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2002;7(3):457-63.
81. Toth CA, Narayan DG, Boppart SA, Hee MR, Fujimoto JG, Birngruber R, et al. A comparison of retinal morphology viewed by optical coherence tomography and by light microscopy. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(11):1425-8.

LITERATURVERZEICHNIS

82. Huang Y, Cideciyan AV, Papastergiou GI, Banin E, Semple-Rowland SL, Milam AH, et al. Relation of optical coherence tomography to microanatomy in normal and rd chickens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(12):2405-16.
83. Drexler W, Morgner U, Ghanta RK, Kartner FX, Schuman JS, Fujimoto JG. Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. *Nat Med.* 2001;7(4):502-7.
84. Gloesmann M, Hermann B, Schubert C, Sattmann H, Ahnelt PK, Drexler W. Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(4):1696-703.
85. Anger EM, Unterhuber A, Hermann B, Sattmann H, Schubert C, Morgan JE, et al. Ultrahigh resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections. *Exp Eye Res.* 2004;78(6):1117-25.
86. Zawadzki RJ, Jones SM, Olivier SS, Zhao M, Bower BA, Izatt JA, et al. Adaptive-optics optical coherence tomography for high-resolution and high-speed 3D retinal in vivo imaging. *Opt Express.* 2005;13(21):8532-46.
87. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina.* 2011;31(8):1609-19.
88. Verhoeff Fh. A Hitherto Undescribed Membrane of the Eye and Its Significance. *The Boston Medical and Surgical Journal.* 1903;149(17):456-8.
89. Feeney L. Editorial: Intercellular junctions: sites of permeability barriers and cellular communication. *Invest Ophthalmol.* 1974;13(11):811-4.
90. Staurenghi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF, International Nomenclature for Optical Coherence Tomography P. Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: the IN*OCT consensus. *Ophthalmology.* 2014;121(8):1572-8.
91. Webb RH, Hughes GW. Scanning laser ophthalmoscope. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1981;28(7):488-92.
92. Webb RH, Hughes GW, Delori FC. Confocal scanning laser ophthalmoscope. *Appl Opt.* 1987;26(8):1492-9.
93. Webb RH, Hughes GW, Pomerantzeff O. Flying spot TV ophthalmoscope. *Appl Opt.* 1980;19(17):2991-7.
94. Mainster MA, Timberlake GT, Webb RH, Hughes GW. Scanning laser ophthalmoscopy. Clinical applications. *Ophthalmology.* 1982;89(7):852-7.
95. Augustin AJ. *Bildgebende Verfahren.* Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. p. 961-72.
96. Gramatikov BI. Modern technologies for retinal scanning and imaging: an introduction for the biomedical engineer. *Biomed Eng Online.* 2014;13:52.
97. Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA. Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(2):145-52.
98. Delori FC. Spectrophotometer for noninvasive measurement of intrinsic fluorescence and reflectance of the ocular fundus. *Appl Opt.* 1994;33(31):7439-52.

LITERATURVERZEICHNIS

99. Csutak A, Lengyel I, Jonasson F, Leung I, Geirsdottir A, Xing W, et al. Agreement between image grading of conventional (45 degrees) and ultra wide-angle (200 degrees) digital images in the macula in the Reykjavik eye study. *Eye (Lond)*. 2010;24(10):1568-75.
100. Lengyel I, Csutak A, Florea D, Leung I, Bird AC, Jonasson F, et al. A Population-Based Ultra-Widefield Digital Image Grading Study for Age-Related Macular Degeneration-Like Lesions at the Peripheral Retina. *Ophthalmology*. 2015;122(7):1340-7.
101. Weinberger AW, Lappas A, Kirschkamp T, Mazinani BA, Huth JK, Mohammadi B, et al. Fundus near infrared fluorescence correlates with fundus near infrared reflectance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(7):3098-108.
102. Duncker T, Tabacaru MR, Lee W, Tsang SH, Sparrow JR, Greenstein VC. Comparison of near-infrared and short-wavelength autofluorescence in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):585-91.
103. Gelman R, Chen R, Blonska A, Barile G, Sparrow JR. Fundus autofluorescence imaging in a patient with rapidly developing scotoma. *Retin Cases Brief Rep*. 2012;6(4):345-8.
104. von Ruckmann A, Fitzke FW, Bird AC. Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and its change over time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237(1):1-9.
105. Lois N, Halfyard AS, Bunce C, Bird AC, Fitzke FW. Reproducibility of fundus autofluorescence measurements obtained using a confocal scanning laser ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(3):276-9.
106. Lois N, Halfyard AS, Bird AC, Fitzke FW. Quantitative evaluation of fundus autofluorescence imaged "in vivo" in eyes with retinal disease. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(7):741-5.
107. Bellmann C, Rubin GS, Kabanarou SA, Bird AC, Fitzke FW. Fundus autofluorescence imaging compared with different confocal scanning laser ophthalmoscopes. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(11):1381-6.
108. Titus JA, Haugland R, Sharrow SO, Segal DM. Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *J Immunol Methods*. 1982;50(2):193-204.
109. Sparrow JR, Duncker T, Schuerch K, Paavo M, de Carvalho JRL, Jr. Lessons learned from quantitative fundus autofluorescence. *Prog Retin Eye Res*. 2019:100774.
110. Rudnicka AR, Burk RO, Edgar DF, Fitzke FW. Magnification characteristics of fundus imaging systems. *Ophthalmology*. 1998;105(12):2186-92.
111. van de Kraats J, van Norren D. Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2007;24(7):1842-57.
112. Snodderly DM, Brown PK, Delori FC, Auran JD. The macular pigment. I. Absorbance spectra, localization, and discrimination from other yellow pigments in primate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(6):660-73.
113. Snodderly DM, Auran JD, Delori FC. The macular pigment. II. Spatial distribution in primate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(6):674-85.

LITERATURVERZEICHNIS

114. Delori FC. Autofluorescence method to measure macular pigment optical densities fluorometry and autofluorescence imaging. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(2):156-62.
115. Bone RA, Landrum JT, Fernandez L, Tarsis SL. Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(6):843-9.
116. Morgan JI, Pugh EN, Jr. Scanning laser ophthalmoscope measurement of local fundus reflectance and autofluorescence changes arising from rhodopsin bleaching and regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):2048-59.
117. Wang Y, Tran T, Firl K, Huang N, Yasin O, van Kuijk F, et al. Quantitative fundus autofluorescence in smokers compared to non-smokers. *Exp Eye Res.* 2019;184:48-55.
118. Kleefeldt N, Bermond K, Tarau IS, Hillenkamp J, Berlin A, Sloan KR, et al. Quantitative Fundus Autofluorescence: Advanced Analysis Tools. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(8):2.
119. Hyvärinen L, Näsänen R, Laurinen P. New visual acuity test for pre-school children. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1980;58(4):507-11.
120. Haase W, Hohmann A. [A new test (C-test) for quantitative examination of crowding with test results in amblyopic and ametropic patients (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1982;180(3):210-5.
121. Delori FC, Webb RH, Sliney DH. Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 2007;24(5):1250-65.
122. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods.* 2012;9:676.
123. Reichel C, Berlin A, Radun V, Tarau IS, Hillenkamp J, Kleefeldt N, et al. Quantitative Fundus Autofluorescence in Systemic Chloroquine/Hydroxychloroquine Therapy. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(9):42.
124. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol.* 1985;103(12):1796-806.
125. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates; 1988. xxi, 567 p. p.
126. Holz FG, Bindewald-Wittich A, Fleckenstein M, Dreyhaupt J, Scholl HP, Schmitz-Valckenberg S, et al. Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(3):463-72.
127. Boulton M, McKechnie NM, Breda J, Bayly M, Marshall J. The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(1):82-9.
128. Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(8):1855-66.
129. Wang JS, Kefalov VJ. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(2):115-28.

LITERATURVERZEICHNIS

130. Hendrickson A. A morphological comparison of foveal development in man and monkey. *Eye*. 1992;6(2):136-44.
131. Turk A, Ceylan OM, Arici C, Keskin S, Erdurman C, Durukan AH, et al. Evaluation of the nerve fiber layer and macula in the eyes of healthy children using spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(3):552-9 e1.
132. Yanni SE, Wang J, Cheng CS, Locke KI, Wen Y, Birch DG, et al. Normative reference ranges for the retinal nerve fiber layer, macula, and retinal layer thicknesses in children. *Am J Ophthalmol*. 2013;155(2):354-60 e1.
133. Zhang Z, He X, Zhu J, Jiang K, Zheng W, Ke B. Macular measurements using optical coherence tomography in healthy Chinese school age children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6377-83.
134. Hendrickson AE, Yuodelis C. The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology*. 1984;91(6):603-12.
135. Yuodelis C, Hendrickson A. A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development. *Vision Res*. 1986;26(6):847-55.
136. Subhi Y, Forshaw T, Sorensen TL. Macular thickness and volume in the elderly: A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2016;29:42-9.
137. Lee H, Purohit R, Patel A, Papageorgiou E, Sheth V, Maconachie G, et al. In Vivo Foveal Development Using Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015;56(8):4537-45.
138. Hendrickson A, Possin D, Vajzovic L, Toth CA. Histologic development of the human fovea from midgestation to maturity. *Am J Ophthalmol*. 2012;154(5):767-78.e2.
139. Eriksson U, Holmström G, Alm A, Larsson E. A population-based study of macular thickness in full-term children assessed with Stratus OCT: normative data and repeatability. *Acta ophthalmologica*. 2009;87(7):741-5.
140. Kashani AH, Zimmer-Galler IE, Shah SM, Dustin L, Do DV, Elliott D, et al. Retinal thickness analysis by race, gender, and age using Stratus OCT. *American journal of ophthalmology*. 2010;149(3):496-502. e1.
141. Wong A, Chan C, Hui S. Relationship of gender, body mass index, and axial length with central retinal thickness using optical coherence tomography. *Eye*. 2005;19(3):292-7.
142. Cheng L, Wang M, Deng J, Lv M, Jiang W, Xiong S, et al. Macular Ganglion Cell-Inner Plexiform Layer, Ganglion Cell Complex, and Outer Retinal Layer Thicknesses in a Large Cohort of Chinese Children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(14):4792-802.
143. Kong M, Hwang S, Ko H, Song YM, Ham DI. Heritability of Inner Retinal Layer and Outer Retinal Layer Thickness: The Healthy Twin Study. *Scientific reports*. 2020;10(1):3519.
144. Eliwa TF, Hussein MA, Zaki MA, Raslan OA. Outer Retinal Layer Thickness as Good Visual Predictor in Patients with Diabetic Macular Edema. *Retina*. 2018;38(4):805-11.
145. Wang XN, Li ST, Li W, Hua YJ, Wu Q. The thickness and volume of the choroid, outer retinal layers and retinal pigment epithelium layer changes in patients with diabetic retinopathy. *International journal of ophthalmology*. 2018;11(12):1957-62.

LITERATURVERZEICHNIS

146. Robb RM. Regional changes in retinal pigment epithelial cell density during ocular development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1985;26(5):614-20.
147. Cozzi M, Viola F, Belotti M, Cigada M, Cherepanoff S, Staurenghi G, et al. The in vivo correlation between retinal pigment epithelium thickness and quantitative fundus autofluorescence in a Caucasian population. *Ophthalmol Retina*. 2020.
148. von Ruckmann A, Fitzke FW, Bird AC. In vivo fundus autofluorescence in macular dystrophies. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(5):609-15.
149. Bertolotto M, Borgia L, Lester M. Hyperautofluorescence in outer retinal layers thinning. *Biomed Res Int*. 2014;2014:741538.
150. Rothenbuehler SP, Wolf-Schnurrbusch UE, Wolf S. Macular pigment density at the site of altered fundus autofluorescence. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(4):499-504.
151. Lee CS, Lee AY, Forooghian F, Bergstrom CS, Yan J, Yeh S. Fundus autofluorescence features in the inflammatory maculopathies. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:2001-12.
152. Duncker T, Greenberg JP, Ramachandran R, Hood DC, Smith RT, Hirose T, et al. Quantitative fundus autofluorescence and optical coherence tomography in best vitelliform macular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(3):1471-82.
153. Eagle RC, Jr., Lucier AC, Bernardino VB, Jr., Yanoff M. Retinal pigment epithelial abnormalities in fundus flavimaculatus: a light and electron microscopic study. *Ophthalmology*. 1980;87(12):1189-200.
154. Shroyer NF, Lewis RA, Allikmets R, Singh N, Dean M, Leppert M, et al. The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. *Vision Res*. 1999;39(15):2537-44.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I. Abkürzungsverzeichnis

A2E	<i>N</i> -retinyl- <i>N</i> -retinylidene ethanolamine
ABCA4	ATP binding cassette subfamily A member 4
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
BM	Bruch Membran
cSLO	konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie
dpt	Dioptrien
ELM	Membrana limitans externa
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FAF	Fundusautofluoreszenz
GL	grey level
HRA2	Heidelberg Retinaangiograph 2
ILM	Membrana limitans interna
IOL	Intraokularlinse
IR	Infrarot
mm	Millimeter
nm	Nanometer
OCT	optische Kohärenztomographie
PEDF	pigment epithelium-derived growth factor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

QAF	quantitative Autofluoreszenz des Fundus
QAF8	Mittelwert der quantitativen Fundusautofluoreszenz der acht Segmente des mittleren Rings des Delori-grids
QAF97	Mittelwert der quantitativen Fundusautofluoreszenz aller Segmente des QAF97-Grids mit Ausnahme der Fovea
RCF	reference calibration factor
RF	rotfreies Fundusbild
RPE	retinales Pigmentepithel
SD-OCT	Spectral-Domain optische Kohärenztomographie
SF	scaling factor
T	Transmission
TD-OCT	Time-Domain optische Kohärenztomographie
VEGF	vascular epithelium growth factor
μm	Mikrometer
μW	Mikrowatt

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologie der Retina	4
Abbildung 2: Funktionen des RPE	6
Abbildung 3: Autofluoreszierende Granula in RPE-Zellen	8
Abbildung 4: Intrazelluläre Granulaverteilung in einer RPE-Zelle	9
Abbildung 5: Funktionsprinzip der optischen Kohärenztomographie (OCT)	14
Abbildung 6: Benennung der Retinaschichten in der OCT	17
Abbildung 7: Funktionsprinzip der konfokalen Scanning-Laser- Ophthalmoskopie	19
Abbildung 8: Fundusautofluoreszenz bei 488 nm und 787 nm	21
Abbildung 9: QAF-Rohbild	23
Abbildung 10: QAF8	26
Abbildung 11: Quantitatives Fundusautofluoreszenzbild – farbkodiert	27
Abbildung 12: Erstellung eines Bildstacks und Markierung anatomischer Positionen	36
Abbildung 13: Auswertungsmuster (grids) – ETDRS, Delori, QAF97	37
Abbildung 14: Horizontaler-Meridian-Muster (grid)	38
Abbildung 15: Dickenauswertung	40
Abbildung 16: Altersverteilung der Probanden (n = 53)	42
Abbildung 17: QAF-Entwicklung im Kindesalter	45
Abbildung 18: QAF8-Werte aller Studienprobanden (n=53)	46
Abbildung 19: QAF97-Werte aller Studienprobanden (n=53)	47
Abbildung 20: QAF-Werte der Fovea aller Studienprobanden (n=53)	48
Abbildung 21: Standardretinae	52
Abbildung 22: Segmente mit den höchsten QAF-Werten	53
Abbildung 23: Retinadicke (ILM-RPE) und QAF - horizontaler Meridian ...	55
Abbildung 24: Innere Retinadicke (ILM-ELM) und QAF - Horizontaler Meridian	57
Abbildung 25: Äußere Retinadicke (ELM-RPE) und QAF - horizontaler Meridian	59
Abbildung 26: Topografie der Photorezeptoren und FAF	71

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 27: QAF97-Werte einer gesunden Kohorte zwischen 5 und 64 Jahren.....	73
---	-----------

TABELLENVERZEICHNIS

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schichtbenennung nach der International Nomenclature for Optical Coherence Tomography Panel (90).....	16
Tabelle 2 Übersicht über die eingeschlossenen Probanden (n = 43).....	43
Tabelle 3: QAF8, QAF97, QAF_{fovea} aller Probanden (n = 53).....	49
Tabelle 4: QAF-Werte des horizontalen Meridians.....	54
Tabelle 5: Dicke der gesamten Retina (ILM-RPE) des horizontalen Meridians.....	56
Tabelle 6: Dicke der inneren Retina (ILM-ELM) des horizontalen Meridians	58
Tabelle 7: Dicke der äußeren Retina (ELM-RPE) des horizontalen Meridians.....	60
Tabelle 8: QAF-Werte des ETDRS-grids.....	62
Tabelle 9: Dicke der gesamten Retina (ILM-RPE) des ETDRS-grids	63
Tabelle 10: Dicke der äußeren Retina (ELM-RPE) des ETDRS-grids.....	64
Tabelle 11: Dicke des RPE (Interdigitationszone-Choriokapillaris) des ETDRS-grid	65

DANKSAGUNG

IV. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Priv.- Doz. Dr. Thomas Ach für die freundliche Überlassung des Themas sowie für all seine zahlreichen Ratschläge, die stetige außerordentliche Förderung und seinen umfassenden Einsatz für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jost Hillenkamp danke ich für die Möglichkeit an der Universitätsaugenklinik Würzburg diese Arbeit zu erstellen und seine Förderung dieser Arbeit und meiner Poster-Präsentation auf der ARVO 2019 in Vancouver.

Herrn Prof. Dr. Kai Schuh danke ich für seine vertrauensvolle und freundliche Unterstützung.

Bei Frau Dr. Ioana Tarau möchte ich mich herzlichst für ihren ausdauernden Einsatz bei der Rekrutierung der Probanden bedanken. Ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft hat mich sehr beeindruckt.

Herrn Dr. Andreas Berlin danke sehr ich für seine Unterstützung bei der Auswertung der SD-OCT-Dickenmessungen.

Frau Susanne Hanusz und Frau Nejla Akgünes danke ich für ihre Hilfe bei meiner Einarbeitung in die OCT- und FAF-Aufnahmetechnik sowie ihren Beitrag am reibungslosen Untersuchungsablauf der Probanden.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitenden der kinderophthalmologischen Abteilung der Universitätsaugenklinik Würzburg für ihre Mithilfe bei den Probandenuntersuchungen.

Meiner Familie danke ich für ihre unermüdliche und uneingeschränkte Förderung meiner Interessen und Ziele. Sie haben mich stets motiviert, bestärkt und mir mit vielen wertvollen Ratschlägen geholfen.

LEBENS LAUF

V. Lebenslauf

VI. Publikationen

Originalarbeit

Pröbster C, Tarau I S, Berlin A, Kleefeldt N, Hillenkamp J, Nentwich M M, Sloan K R, Ach T; Quantitative Fundus Autofluorescence in the Developing and Maturing Healthy Eye. *Trans. Vis. Sci. Tech.* 2021;10(2):15.

Kongressbeiträge

Pröbster C, Tarau I S, Kleefeldt N, Hillenkamp J, Nentwich M M, Sloan K R, Ach T. Quantified fundus autofluorescence (QAF) in healthy children and adolescents. ARVO Annual Meeting, Vancouver, 2019

Ach T, Kleefeldt N, **Pröbster C**, Tarau I S, Bermond K, Reichel C, Sloan K R. Quantified fundus autofluorescence (QAF) imaging – the use of age-related standard retinas and improved methods for analysis. ARVO Annual Meeting, Vancouver, 2019

Ach T, **Pröbster C**, Tarau I S, Berlin A, Kleefeldt N, Hillenkamp J, Nentwich M M, Sloan K R. Entwicklung der Fundusautofluoreszenzen im Kindes- und Jugendalter. DOG, Berlin, 2019

Ach T, Tarau I S, Berlin A, Kleefeldt N, Sloan K R, **Pröbster C**. Quantitative fundus autofluorescence in the maturing healthy eye. Macular Society, virtual meeting, 2021