

Aus der Klinik für Augenheilkunde
(Prof. Dr. med. H. Hoerauf)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Lipidemulsionen als Kontrastmittel
für die Optische Kohärenztomographie
zur Darstellung der
Kammerwasserabflusswege**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hanna Marie Gottschalk

aus

Eutin

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: PD Dr. med. C. van Oterendorp

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. W. Staab

Prüfungskommission

Referent/in: PD Dr. med. C. van Oterendorp

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. F. Wouters

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. W. Staab

Datum der mündlichen Prüfung: 20.07.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Lipidemulsionen als Kontrastmittel für die Optische Kohärenztomographie zur Darstellung der Kammerwasserabflusswege" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Gottschalk HM, Wecker T, Khattab MH, Fischer CV, Callizo J, Rehfeldt F, Lubjuhn R, Russmann C, Hoerauf H, van Oterendorp C (2019): Lipid emulsion-based OCT angiography for ex vivo imaging of the aqueous outflow tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60, 397–406

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Kammerwasserabfluss im menschlichen Auge.....	2
1.1.1 Anatomie des Auges und des vorderen Augenabschnitts.....	2
1.1.2 Physiologie des Kammerwassersystems	3
1.1.3 Pathogenese und Therapie des Glaukoms	6
1.1.4 Vergleich mit dem Kammerwasserabfluss bei Schweinen.....	8
1.2 Optische Kohärenztomographie in der Augenheilkunde.....	10
1.2.1 Funktionsprinzip der OCT.....	11
1.2.2 Technische Details und Varianten der OCT	13
1.2.3 OCT-Angiographie	14
1.3 Stand der Forschung im Bereich der Kammerwasserabflusswege.....	15
1.3.1 Historische Forschungsergebnisse vor dem späten 20. Jahrhundert.....	16
1.3.2 Neue Erkenntnisse und aktuelle Fragestellungen	17
1.3.3 Bisherige Bildgebungsmodalitäten.....	19
1.3.4 Vorangegangene Forschung zu OCT-Kontrastmitteln.....	20
1.4 Zielsetzung der Promotionsarbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Modellaugen	23
2.2 OCT-System.....	23
2.3 LE-basierte OCT des Kammerwasserabflusses	24
2.3.1 Lipidemulsionen	24
2.3.2 Versuchsaufbau.....	24
2.3.3 Versuchsdurchführung.....	27
2.3.4 Bildbearbeitung.....	29
2.4 Histologische Vergleichspräparate.....	30
2.5 ICG-basierte Bildgebung des Kammerwasserabflusses	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 LE-Detektion im Schweineauge am Spectralis-OCT-System	31
3.2 LE-basierte OCTA am Cirrus HD-OCT-System	35
3.2.1 Bilderzeugung aus den OCTA-Rohbilddaten.....	36
3.2.2 Zeitaufgelöste LE-basierte OCTA.....	38
3.2.3 LE-basierte OCTA in späten Perfusionsphasen	40
3.3 Vergleich mit einem histologischen Sklerapräparat	41
3.4 Vergleich mit ICG-basierter Bildgebung.....	43

3.5	Einfluss von Bildbearbeitung auf die Bildqualität.....	45
4	Diskussion.....	47
4.1	Auswahl der Versuchsmaterialien.....	47
4.2	Evaluation der Versuchsergebnisse.....	49
4.3	Ausblick.....	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Anhang.....	56
7	Literaturverzeichnis.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Trabekulärer Weg des Kammerwasserabflusses im OCT-Bild.....	4
Abbildung 2: Kammerwinkelregion eines Primaten und eines niederen Plazentatieres.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der OCT.	12
Abbildung 4: OCT von verschiedenen Lipidemulsionen in Schlauchphantomen.	21
Abbildung 5: Versuchsaufbau für LE-Detektion im Schweineauge.	25
Abbildung 6: Detektion von Kammerwassergefäßen mittels OCT an Schweineaugen.	32
Abbildung 7: <i>Workflow</i> zur LE-Detektion am Spectralis-OCT-Gerät.....	34
Abbildung 8: <i>Workflow</i> zur Bilderzeugung am Cirrus HD-OCT-Gerät.....	37
Abbildung 9: Zeitaufgelöste LE-basierte OCTA an Schweineaugen.....	39
Abbildung 10: LE-basierte OCTA in späten Perfusionsphasen an Schweineaugen.	41
Abbildung 11: Darstellung des Kammerwassergefäßsystems im Sklerapräparat.	42
Abbildung 12: Vergleich von LE-basierter OCT- und ICG-basierter Angiographie.....	44
Abbildung 13: LE-basierte OCTA-Aufnahmen vor und nach Mittelwertbildung.	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusätzliches Versuchsequipment.	26
Tabelle 2: Vorbereitung einer Messung.	27
Tabelle 3: Messvorgang am Cirrus HD-OCT-System.	27
Tabelle 4: Softwaregestützte Modifikationen bei der Bildbearbeitung.	29

Abkürzungsverzeichnis

A	<i>amplitude</i>
AM	<i>angular meshwork</i>
anat.	anatomisch
AP	<i>angular aqueous plexus</i>
AVI	<i>audio video interleave</i>
B	<i>brightness</i>
BSS	<i>balanced salt solution</i>
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V.
CC	<i>ciliary cleft</i>
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
EGS	European Glaucoma Society
FD	<i>frequency domain</i> , auch: <i>Fourier domain</i>
HD	<i>high definition</i>
ICG	Indocyaningrün
IOD	Intraokulardruck
LE	Lipidemulsion/-en
OCT	<i>optical coherence tomography</i>
OCTA	<i>optical coherence tomography angiography</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
RKI	Robert Koch-Institut
SD	<i>spectral domain</i>
SS	<i>swept source</i>
TD	<i>time domain</i>
TMW	Trabekelmaschenwerk

1 Einleitung

Auch im 21. Jahrhundert ist die Erblindung von Patientinnen und Patienten noch eine mögliche Folge verschiedener Augenerkrankungen. In Deutschland zählt hierbei neben der altersbedingten Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie das Glaukom zu den vorrangigen Ursachen (RKI 2017). Weltweit stellt diese auch als grüner Star bekannte Erkrankung nach dem grauen Star (Katarakt) sogar den zweithäufigsten Grund für Blindheit dar (Pascolini und Mariotti 2012).

Da ein Glaukom häufig mit einem erhöhten Augeninnendruck assoziiert ist, hat dessen Senkung durch die Hemmung der Kammerwasserproduktion oder die Verbesserung des Kammerwasserabflusses eine therapeutische Konsequenz (Leske et al. 2003). Dabei basiert die Therapie neben der medikamentösen Behandlung auch auf Laserverfahren und chirurgischen Eingriffen wie der Trabekulektomie oder der Viskokanaloplastik (Cairns 1968; Lewis et al. 2007). Bisher bergen diese operativen Interventionen zur Senkung des intraokularen Drucks allerdings noch einige Herausforderungen. Dabei ist von Bedeutung, dass bislang meist das Trabekelmaschenwerk als die entscheidende Struktur zur Regulation des Kammerwasserabflusses angesehen wurde (Tamm 2009; Tektas und Lütjen-Drecoll 2009). Allerdings gewinnen die distal des Trabekelmaschenwerks liegenden Abflussstrukturen zunehmend an Bedeutung (Fellman et al. 2015; Carreon et al. 2017; Wecker et al. 2017). Dies sind feine Gefäße, die ein komplex verzweigtes Netzwerk bilden, welches zum Teil weit intraskleral liegt (Dvorak-Theobald 1934; Ashton 1951).

Um Näheres über die Morphologie und Funktionsweise dieser intraskleralen Kammerwasservenien herausfinden zu können, erscheint der Einsatz eines Bildgebungsverfahrens erstrebenswert, das die dreidimensionale Darstellung des gesamten Drainagesystems ermöglicht. Hierfür bietet sich die Optische Kohärenztomographie (engl.: *optical coherence tomography* (OCT)) als nichtinvasives Verfahren an. Seit ihrer Erfindung 1991 hat sich diese zu einem der wichtigsten bilderzeugenden Instrumente im klinischen Alltag der Augenheilkunde entwickelt und sich dabei insbesondere bei der Untersuchung des hinteren Augenabschnitts etabliert (Huang et al. 1991; Puliafito et al. 1995; Adhi und Duker 2013). Mittlerweile konnte die OCT-Technik für die Anwendung im vorderen Augenabschnitt weiterentwickelt werden (Koop et al. 1997; Venkateswaran et al. 2018). Allerdings ist die Beurteilung der Kammerwasserabflusswege mithilfe der OCT, unter anderem aufgrund der schwierigen anatomischen Gegebenheiten, bisher nicht zufriedenstellend möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass das

Kammerwasser ein klares Medium ist und daher schlecht zur direkten Bilderzeugung genutzt werden kann. Analog zur Magnetresonanz- oder Computertomographie könnte daher die Verwendung eines geeigneten Kontrastmittels hilfreich sein. Im Falle der OCT sollte ein Kontrastmittel durch Licht stark reflektiert werden, um so einen Signalkontrast gegenüber der Umgebung zu erzeugen. Diese Voraussetzung erfüllen Lipidemulsionen, da die Molekulanordnung der enthaltenen Fetttröpfchen stark fluktuiert (Gottschalk et al. 2019).

Vor diesem Hintergrund soll im Rahmen dieses Promotionsprojektes exploriert werden, inwieweit Lipidemulsionen als OCT-Kontrastmittel zur Darstellung des Kammerwasserabflusssystemes geeignet sind. Langfristig könnte damit eine Basis für neue Erkenntnisse in der Grundlagenforschung geschaffen werden. Möglicherweise könnte ihre intraoperative Anwendung die Effektivität der Trabekelwerkschirurgie und folglich die Therapie des Glaukoms nachhaltig verbessern.

Die nachfolgenden Kapitel 1.1 bis 1.3 über den Kammerwasserabfluss im menschlichen Auge und die Technik der Optischen Kohärenztomographie sollen auf die in Kapitel 1.4 konkretisierte Zielsetzung dieses Promotionsprojektes hinführen. Sie dienen außerdem als theoretische Grundlage zum Verständnis der in Kapitel 2 beschriebenen Experimente und der in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse dieser Forschungsarbeit. Letztere werden in Kapitel 4 kritisch diskutiert. Einen zusammenfassenden Überblick bietet Kapitel 5.

1.1 Kammerwasserabfluss im menschlichen Auge

1.1.1 Anatomie des Auges und des vorderen Augenabschnitts

Um einen Seheindruck gewinnen zu können, muss ein Lichtsignal von außen nach innen verschiedene anatomische Strukturen durchdringen (vgl. Schünke et al. (2018)). Zunächst trifft ein Lichtstrahl aus der Luft auf die transparente Hornhaut (anatomisch: Cornea). Sie ist als Teil der optischen Achse lichtdurchlässig und geht am sog. *Limbus corneae* in die weiße, lichtundurchlässige Lederhaut (anat.: Sklera) über. Der sichtbare Teil der Sklera ist bis zum *Limbus* von einer schützenden Bindehaut (anat.: Konjunktiva) überzogen. Hinter der Cornea gelangt das Licht in die mit Kammerwasser gefüllte vordere Augenkammer. Diese wird an der Rückseite durch die Regenbogenhaut (anat.: Iris) begrenzt. Als Öffnung zwischen den beidseitigen Irisanteilen befindet sich die Pupille, sodass die Iris die Funktion einer Blende übernimmt. Direkt hinter der Pupille werden die Lichtstrahlen von der akkommodationsfähigen Linse gebündelt. Sie ist über Zonulafasern (anat.: *Fibrae zonulares*) am kontraktionsfähigen Ziliarkörper (anat.: *Corpus ciliare*) verankert. Hinter der Linse gelangt das Licht durch

den Glaskörper auf die Netzhaut (anat.: Retina), welche den Lichtreiz wahrnimmt und als Sinnesinformation ans Gehirn weiterleitet.

Während die weiter innen liegenden Strukturen wie die Netzhaut und der Glaskörper den hinteren Augenabschnitt bilden, zählen Cornea, Sklera, Iris und Linse zum vorderen Augenabschnitt. Der Vorderabschnitt beinhaltet ebenfalls die von Ziliarkörper, Iris und Linse umgebene hintere Augenkammer sowie die zwischen Cornea und Iris liegende vordere Augenkammer (oder Vorderkammer). Letztere läuft nach außen zum Kammerwinkel hin spitz zu und mündet dort in den sog. Schlemm-Kanal¹. Die Strukturen des Vorderabschnitts sind wesentliche Elemente des Kammerwasserabflusses und damit von zentraler Bedeutung für diese Arbeit. Sie sind orientierend in einem nativen OCT-Bild in Abbildung 1 gekennzeichnet. Eine übersichtliche und detailreiche anatomische Darstellung des vorderen Augenabschnitts findet sich ergänzend beispielsweise in Schünke et al. (2018) auf Seite 166.

1.1.2 Physiologie des Kammerwassersystems

Das Kammerwasser ist eine klare Flüssigkeit, die die vordere und hintere Augenkammer füllt. Seine Funktionen sind die Aufrechterhaltung eines relativ stabilen Augeninnendrucks (vgl. Kapitel 1.1.3), der Abtransport zellulärer Abfallprodukte sowie die Nährstoffversorgung von Cornea und Linse, welche selbst keine eigenen Blutgefäße besitzen (Goel et al. 2010). Das Kammerwasser wird an der basolateralen Membran des nichtpigmentierten Epithels des Ziliarkörpers gebildet. Folglich wird die Kammerwasserzusammensetzung durch die dort ablaufenden biochemischen Prozesse bestimmt, durch die organische und anorganische Substanzen per aktivem Transport gegen den Konzentrationsgradienten ins Kammerwasser befördert werden (Levin 2011). So entsteht ein Medium bestehend aus einer Vielfalt von Elektrolyten, Proteinen und Stoffwechselprodukten. Dabei sind neben Glukose, Laktat, Citrat, Harnstoff, Pyruvat, Transferrin und Hyaluronsäure auch Fibronectin, Immunglobuline, Prostaglandine sowie viele Interleukine und andere Zytokine zu finden (Bergua 2017). Das Kammerwasser unterscheidet sich vom Blutplasma vor allem in der höheren Ascorbat- und der deutlich geringeren Proteinkonzentration. Dadurch ist es mit einer Viskosität von ca. 0,75 mPa s deutlich fließfähiger als Blut (Bergua 2017). Die molekulare Zusammensetzung ist letztlich entscheidend für die optischen Eigenschaften. So gewährleisten der geringe Lipid- und Proteingehalt die erforderliche Transparenz des Kammerwassers als Bestandteil des optischen Apparates (Brechungsindex $n \approx 1,3336$) (Bergua 2017). Gleichzeitig erschwert

¹ Erstbeschreibung durch den Anatom und Arzt Friedrich Schlemm im Jahre 1830 (Schlemm 1830; Schlemm 1831).

diese Eigenschaft dessen Detektion mittels optischer Instrumente. Denn anders als Blut, das reich an Erythrozyten, Lymphozyten und anderen Leukozyten ist, beinhaltet das Kammerwasser keine Zellen oder Moleküle, welche ein Lichtsignal stark reflektieren könnten.

Bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts galt die Auffassung, dass das Kammerwasser eine stehende Flüssigkeit, also ein Medium ohne Fluss sei (Levin 2011). Heutzutage geht man jedoch davon aus, dass zur Homöostase des Kammerwasservolumens ein ständiger Austausch des Kammerwassers stattfindet, also Kammerwasser neu gebildet und ersetzt wird (Levin 2011). Das Minutenvolumen in der Vorderkammer wurde bereits von Goldmann (1951) mit $2,2 \pm 0,4 \mu\text{l}/\text{min}$ angegeben. Produktion und Abfluss sind demnach physiologisch aufeinander abgestimmte, kontinuierlich ablaufende Prozesse. Zur Veranschaulichung dient Abbildung 1.

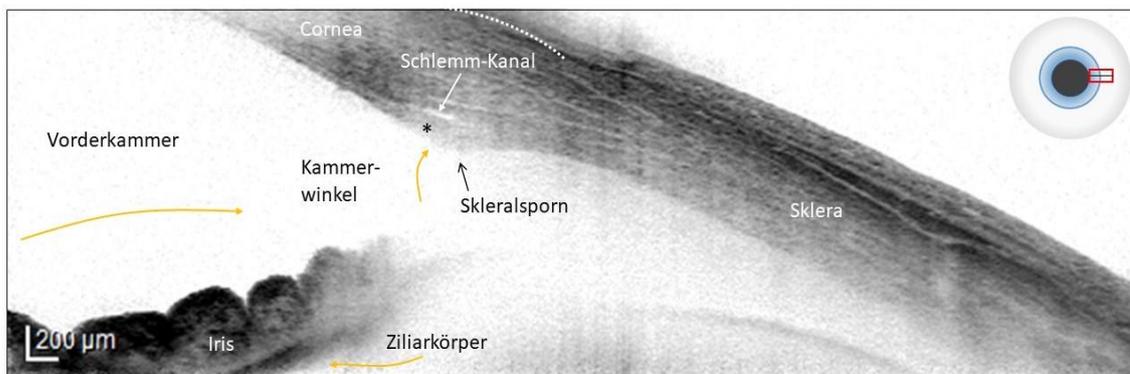


Abbildung 1: Trabekulärer Weg des Kammerwasserabflusses im OCT-Bild.

Die an der Kammerwasserhomöostase beteiligten Strukturen liegen im vorderen Augenabschnitt. Hierzu gehören u. a. die transparente Hornhaut (anat.: Cornea) und die weiße Lederhaut (anat.: Sklera), welche am *Limbus corneae* (mit gestrichelter Linie angedeutet) ineinander übergehen. Die Produktion des Kammerwassers erfolgt in nichtpigmentierten Epithelzellen des Ziliarkörpers (Lokalisation im Bild nicht sicher definierbar). Von dort strömt es in die hintere Augenkammer, um die Iris herum, durch die Pupille in die vordere Augenkammer, welche im Kammerwinkel spitz zuläuft. Beim trabekulären Weg gelangt das Kammerwasser von hier in die Zwischenräume des angrenzenden Trabekelmaschenwerks (mit * markiert), welche in den Schlemm-Kanal drainieren. Schließlich fließt das Kammerwasser über Kollektorkanäle (nicht gekennzeichnet) in intra- und episklerale Venen ab. Der Skleralsporn beschreibt einen kantigen Vorsprung an der Innenseite der Sklera und dient als anatomische Landmarke. Der Weg des Kammerwassers bis zum Trabekelmaschenwerk ist durch gelbe Pfeile skizziert. Zur Orientierung ist in einem Augensymbol am rechten Bildrand die Position des OCT-Scanareals gekennzeichnet.

Die Bildung des Kammerwassers erfolgt durch das nichtpigmentierte Epithel am *Processus ciliares* des Ziliarkörpers (Levin 2011). Dabei spielen nicht nur Diffusion sowie hydrostatische und osmotische Druckgradienten, sondern auch Ultrafiltration und aktive Ionentransportprozesse eine wesentliche Rolle. Die Filtrationskomponente reagiert dabei auf Änderungen

des Augeninnen- und Blutdrucks, d. h., bei Druckzunahme sinkt die Filtrationsrate. Zusätzlich können bestimmte Vorgänge in der Produktion adrenerg und cholinerg reguliert werden, was als Ansatzpunkt in der medikamentösen Therapie genutzt wird (Levin 2011).

Nach Austritt aus dem Ziliarkörper in die hintere Augenkammer fließt das Kammerwasser zunächst zwischen Linse und Iris entlang und dann durch die Pupille in die vordere Augenkammer. Der dünne Spalt zwischen Linse und Iris im Bereich der Pupille wird auch erster physiologischer Widerstand genannt und wird beeinflusst durch Faktoren wie die Bulbuslänge, die Linsendicke, die Pupillenweite oder das Vorhandensein von Synechien².

Der Abfluss aus der vorderen Augenkammer geschieht über zwei verschiedene Wege:

Mit einem Anteil von ca. 85 % des Gesamtabflusses fließt der Großteil des Kammerwassers über den konventionellen trabekulären Weg ab (Bergua 2017). Dabei strömt das Kammerwasser vom Kammerwinkel in das Trabekelmaschenwerk (TMW). Dies ist ein unregelmäßiges, in Trabekeln angeordnetes gitterartiges Netzwerk aus mehr als einer Million Zellen und Fasern angrenzend an den Kammerwinkel (Gabelt und Kaufman 2005). Es stellt damit den zweiten physiologischen Widerstand für das Kammerwasser dar. Alle Strukturen, die hinter dem TMW liegen, werden als distale Abflusswege bezeichnet. Das TMW findet sich nahe des Skleralsporns, einem kantigen Vorsprung an der Innenseite der Sklera, der als anatomische Landmarke dienen kann. Zwischen den Trabekeln weist das TMW zahlreiche Spalträume auf, die auch als Fontana-Räume³ bezeichnet werden. Durch sie gelangt das Kammerwasser wie durch eine Art Filter in das Lumen des Schlemm-Kanals. Hierfür muss es im Bereich der juxtakanikulären Zone⁴ dessen innere Endothelzellschicht durchdringen, was durch Poren oder Invaginationen in die endothelialen Schichten der inneren Kanalwand geschieht (Bill et al. 1989). Der Schlemm-Kanal ist eine zirkuläre, parallel zum Äquator des Auges verlaufende Kammerwasservene, die mit einem Durchmesser von ca. 300 µm den breitesten Abschnitt der distalen Abflusswege darstellt (Moses 1979). Von hier mündet der Kammerwasserfluss über Kollektorkanalöffnungen (engl.: *collector channel entrances*) in kleinere Kollektor- oder Sammelkanäle und schließlich in intra- und episklerale Venen. Die Venen, in die das Kammerwasser aus den Kollektorkanälen strömt, verlaufen beim Menschen in verschiedenen Schichttiefen, d. h. in tiefen und oberflächlichen Plexus (Dvorak-Theobald 1934; Carreon et al. 2017).

² Als Synechien werden bindegewebige Verwachsungen von Gewebsschichten bezeichnet.

³ nach dem italienischen Naturwissenschaftler Felice Fontana.

⁴ d. h. in dem Teil des Trabekelmaschenwerks nahe des Kanals; von lateinisch.: *juxta* – nahe bei, in der Nähe.

Der kleinere Anteil des Kammerwassers fließt uveoskleral ab (Bill 1965). Das heißt, die Flüssigkeit tritt vom Kammerwinkel an der Iriswurzel in das Uvea-Gewebe und den Ziliarmuskel über. Von dort gelangt das Kammerwasser zwischen den Muskelbündeln in den suprachoroidalen Raum und mündet schließlich in die Sklera (Bill und Phillips 1971). Dabei scheint der uveoskleral abfließende Anteil nachts vermindert, also das Verhältnis von trabekulärem zu uveoskleralem Abfluss einer Tag-Nacht-Verschiebung zu unterliegen (Liu et al. 2011).

Auch wenn dem trabekulären Weg bisher meist die größte Bedeutung für den Abtransport des Kammerwassers zugeschrieben wird, ist noch nicht abschließend geklärt, wie hoch der prozentuale Anteil der jeweiligen Abflussroute am Gesamtabfluss ist. Zudem ist die Rolle eines alternativen uveolymphatischen Abflussweges zu diskutieren, der auf Basis der Entdeckung von Lymphgefäßen im Ziliarkörper beschrieben wurde (Yücel et al. 2009).

Weitere aktuelle Fragestellungen und tiefere Erkenntnisse der Forschung im Bereich der Kammerwasserabflusswege werden in Kapitel 1.3 erläutert.

1.1.3 Pathogenese und Therapie des Glaukoms

Die Homöostase zwischen Produktion und Abfluss ist entscheidend für die Menge an vorhandenem Kammerwasser in der hinteren und vorderen Augenkammer. Ein konstantes Kammerwasservolumen ist wiederum essenziell für den Erhalt eines stabilen Augeninnendrucks (auch: Intraokularer Druck (IOD)) (Johnson 2006). Dieser beträgt physiologisch 10 – 21 mmHg und liegt damit deutlich über dem Gewebedruck vieler anderer Organe (Greiner 2008). Seine Funktionen sind die Wölbung und Faltenfreiheit der Cornea-Oberfläche, die homogene Anordnung der Photorezeptoren und des Pigmentepithels auf der Bruch-Membran⁵ sowie die Aufrechterhaltung der optischen Abmessungen im Auge, genauer gesagt der Abstände zwischen Hornhaut, Linse und Netzhaut (Lang 2014). Ein konstanter IOD ermöglicht also sowohl den Formerhalt des Augapfels als auch stabile Verhältnisse im optischen Apparat des Auges.

Ist der Abfluss des Kammerwassers durch einen erhöhten Abflusswiderstand gestört, so kann ein Anstieg des intraokularen Drucks die Folge sein (Leber 1873). Eine Erhöhung des IOD hat nicht *per se* einen Krankheitswert, sollte jedoch kritisch hinterfragt werden. Insbesondere eine Erhöhung um die zweifache Standardabweichung über dem Mittelwert des IOD in der Bevölkerung kann ein Hinweis auf eine Pathologie darstellen (BVA und DOG 2006a). Als Beispiel für Erkrankungen, die mit einem erhöhten IOD assoziiert sein können,

⁵ Die Bruch-Membran ist eine Grenzmembran zwischen dem retinalen Pigmentepithel, d. h. der untersten Netzhautschicht, und der angrenzenden Choroidea.

ist das Glaukom zu nennen (BVA und DOG 2006b). Definitionsgemäß umfasst der Begriff Glaukom (oder grüner Star) mehrere ätiologisch verschiedene Krankheitsformen, deren gemeinsames Merkmal eine Optikusneuropathie, also eine Schädigung des Sehnervs im Bereich der *Lamina cribrosa*⁶ ist (Quigley 1993; Quigley 2011). Diese Schädigung geht mit dem Verlust retinaler Ganglienzellen sowie einem dafür charakteristischen Papillenbefund und Gesichtsfeldausfall einher und kann im Endstadium zur Erblindung führen. In Deutschland ist das Glaukom heutzutage für ca. 15 % aller Neuerblindungen verantwortlich und damit nach der altersbedingten Makuladegeneration deren zweithäufigste Ursache (RKI 2017). Von den in Deutschland erkrankten Patienten und Patientinnen müssen ca. 10 % eine Erblindung befürchten, wenn ihre Erkrankung zu spät erkannt oder behandelt wird (Lang 2014). Dabei leiden in der Bundesrepublik mehr als 950.000 Menschen an einem grünen Star, zehnmal so viele sind erkrankungsgefährdet. Zu den Risikofaktoren des Glaukoms zählen neben einem erhöhten IOD vor allem eine afrikanische Abstammung und ein hohes Lebensalter. Der Einfluss weiterer Risikofaktoren, wie eine geringe Hornhautdicke, eine korneale Hysterese⁷, ein erhöhter arterieller Blutdruck, eine Fehlregulation der Blutversorgung, ein Diabetes mellitus oder eine Myopie, wurde in einzelnen Studien nachgewiesen (Coleman und Miglior 2008; Schroeder et al. 2008).

Als ätiopathogenetisch inhomogenes Krankheitsbild existieren verschiedene Varianten des Glaukoms. Neben der kongenitalen Form bei Kindern unterscheidet man bei Erwachsenen unter anderem zwischen dem Winkelblockglaukom und dem Offenwinkelglaukom (EGS 2017). Beide treten häufig primär, selten auch sekundär als Folge anderer Funktionsstörungen auf. Die Abflussbehinderung befindet sich in beiden Fällen an einem der beiden physiologischen Widerstände (vgl. Kapitel 1.1.2). So liegt beim Winkelblockglaukom meist eine mechanische Blockade des Kammerwinkels vor. Dies stellt einen akuten augenärztlichen Notfall dar, der mit starken Augenschmerzen, plötzlichem Visusverlust und vegetativer Begleitsymptomatik assoziiert ist. Im Gegensatz dazu kommt das Offenwinkelglaukom in der Regel durch eine Abflussstörung im konventionellen Abflussweg bei freiem Kammerwinkel zustande. Das chronische Offenwinkelglaukom ist mit über 90 % die häufigste Erscheinungsform aller Glaukome (Grehn 2008). Da in diesem Fall die Gesichtsfeldausfälle peripher beginnen und nur sehr langsam fortschreiten, bleibt die Erkrankung oft lange unerkannt.

⁶ Die *Lamina cribrosa* (deutsch: Siebplatte) ist eine dünne, siebartige Gewebsschicht, an welcher der Sehnerv aus der Augenhöhle austritt.

⁷ Der Begriff „korneale Hysterese“ bezeichnet die Veränderung viskoelastischer Eigenschaften der Hornhaut.

Neben einem erhöhten Lebensalter ist ein erhöhter IOD der wichtigste bekannte Risikofaktor für ein Glaukom. Die Senkung des IOD ist der einzige validierte therapeutische Ansatzpunkt (Leske et al. 2003)⁸. Dies ist einerseits über die Hemmung der Kammerwasserproduktion und andererseits durch eine Verbesserung des Kammerwasserabflusses möglich. Zusätzlich zur medikamentösen Behandlung gibt es interventionelle Verfahren zur Senkung des intraokularen Druckes. So hat die Zyklphotokoagulation oder die Zyklokryotherapie eine Verminderung der Kammerwasserproduktion durch Laser- bzw. Kälte-induzierte Destruktion des Ziliarkörpers zum Ziel (Augustin 2007). Zur Verbesserung des Kammerwasserabflusses sind je nach Pathogenese verschiedene Verfahren sinnvoll. Beim Winkelblockglaukom mit verlegtem Kammerwinkel infolge eines Pupillarblocks kommen vorrangig eine chirurgische Iridektomie oder eine Laser-Iridotomie sowie ggf. eine Iridoplastik zum Einsatz. Beim primären Offenwinkelglaukom mit Abflussbehinderung im TMW kann versucht werden, den Abflusswiderstand des TMW durch Einschnitte oder Shunts zu überwinden bzw. einen alternativen Kammerwasserabfluss über die Bindehaut oder den Subarachnoidalraum zu etablieren, z. B. mittels Trabekulektomie, tiefer Sklerektomie, trabekulären Bypass-Stents oder einer Viskokanaloplastik (Augustin 2007). Als Goldstandard in der Therapie des primär chronischen Offenwinkelglaukoms ist die Trabekulektomie der häufigste Eingriff in der Glaukomchirurgie in Deutschland (Matlach und Klink 2015). Dabei wird durch Eröffnung des TMW das Kammerwasser in ein sog. Filterkissen unter die Konjunktiva geleitet, von wo es absorbiert wird. Mithilfe dieser Technik kann eine starke Senkung des IOD erreicht werden. Allerdings weisen die postoperativen Ergebnisse individuelle Unterschiede auf; der Eingriff ist also nicht bei allen Patienten oder Patientinnen gleich effektiv (Fernández-Barrientos et al. 2010; Grieshaber et al. 2010; Jordan et al. 2013).

1.1.4 Vergleich mit dem Kammerwasserabfluss bei Schweinen

Die Anatomie des Kammerwasserabflusses verschiedener Wirbeltiere wurde ausführlich untersucht und verglichen (Tripathi und Tripathi 1972; Tripathi 1974). So konnte gezeigt werden, dass der Ort und die grundlegenden Mechanismen der Kammerwasserdrainage prinzipiell uniform sind. Allerdings gibt es hinsichtlich der strukturellen Organisation im Detail interspezifische Unterschiede (Davson 1989). Zur Veranschaulichung dient Abbildung 2, in

⁸ Dies gilt sogar für Normaldruckglaukome. Ein Normaldruckglaukom ist eine Variante des grünen Stars, bei der zwar eine Sehnervenschädigung vorliegt, diese aber nicht mit einem erhöhten IOD einhergeht.

der von Tripathi (1974) die Kammerwinkelregion eines Primaten der eines niederen Säugetieres gegenübergestellt wurde.

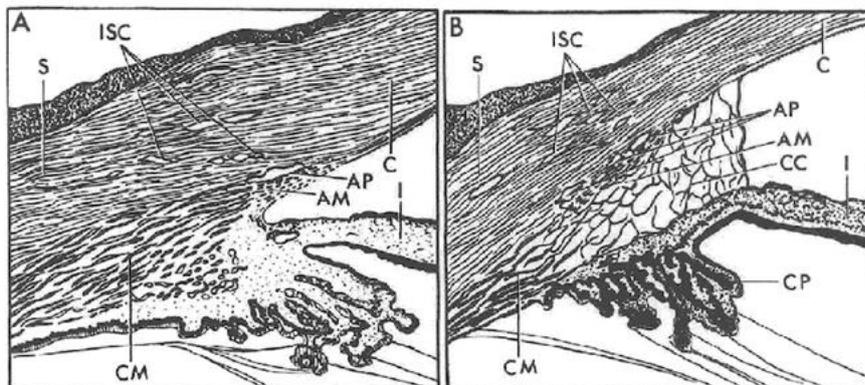


Abbildung 2: Kammerwinkelregion eines Primaten und eines niederen Plazentatieres.

A: Bei Primaten läuft der Kammerwinkel zwischen der Cornea (engl.: *cornea*) und der Iris (engl.: *iris*) stumpf zu und ist gut abgrenzbar. Außerdem ist die (analog zum Trabekelmaschenwerk beim Menschen) hier als *angular meshwork* bezeichnete Struktur kompakt. Als Pendant zum Schlemm-Kanal findet sich der sog. *angular aqueous plexus*.

B: Bei niederen Plazentatieren existiert durch Aufspaltung des Ziliarkörpers (engl.: *ciliary muscle*) in zwei Teile eine Lücke (engl.: *ciliary cleft*), in der sich das *angular meshwork* als grobmaschiges Faser-Zellen-Netzwerk aufspannt. Der *angular aqueous plexus* besteht hier aus mehreren Gefäßen. Der *Processus ciliares* des Ziliarkörpers (engl.: *ciliary processes*) ist verdichtet.

Im Bereich des Übergangs von Cornea und Sklera (engl.: *sclera*) finden sich jeweils intrasklerale Kollektorkanäle (engl.: *intrasceral collector channels*).

[AM: *angular meshwork*, AP: *angular aqueous plexus*, C: *cornea*, CC: *ciliary cleft*, CM: *ciliary muscle*, CP: *ciliary processes*, I: *iris*, ISC: *intrasceral collector channels*, S: *sclera*.]

(Die Abbildung ist wiederzufinden in: Davson (1989, Seite 15) und wurde ursprünglich veröffentlicht von: Tripathi (1974). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.)

Während der Kammerwinkel und der Ziliarkörper bei Primaten kompakt sind, wird der Ziliarkörper bei anderen Plazentatieren⁹ (und vor allem auch bei Schweinen) aus zwei Teilen gebildet. Der äußere Part liegt der inneren Skleraschicht an, der innere Teil bildet die Basis des Ziliarkörpers an der Iriswurzel. Die resultierende Lücke zwischen beiden Anteilen (engl.: *ciliary cleft* (CC)) kann als Erweiterung der Vorderkammer angesehen werden. Durch sie ziehen wenig organisierte fibrozelluläre Stränge, wodurch ein weitmaschiges Netzwerk (sog. *angular meshwork* (AM)) geformt wird. Dies stellt einen Hauptunterschied zwischen Primaten- und Schweineaugen dar. Zugleich impliziert die Lücke, dass das trabekuläre Drainagegewebe

⁹ Säugetiere stellen eine Klasse von Wirbeltieren dar und werden in die Unterklassen Plazentatier, Beuteltiere und Kloakentiere unterteilt.

ein deutlich größeres Volumen als das menschliche TMW einnimmt und dass es, anders als bei Primaten, keine klare anatomische Verbindung zwischen dem Ziliarmuskel und dem Drainagegewebe gibt. Außerdem ist der Ziliarmuskel deutlich weniger stark entwickelt (Davson 1989; McMenemy und Steptoe 1991).

Darüber hinaus existiert im Gegensatz zu den Primaten bei anderen Plazentatieren kein singularer, zirkulär verlaufender Schlemm-Kanal. Stattdessen findet sich als Schlemm-Kanal-Äquivalent eine Gruppe von mehreren Gefäßen, für die der Begriff *angular aqueous plexus* (AP) geprägt wurde (Tripathi und Tripathi 1972; Davson 1989).

Doch neben den genannten Unterschieden gibt es auch einige Ähnlichkeiten zwischen menschlichen Augen und Schweineaugen. So konnte durch nähere Untersuchungen speziell an Schweineaugen gezeigt werden, dass das Kammerwinkelgewebe einen weniger retikulären und stärker trabekulären Charakter aufweist. Dadurch ist es sowohl in seiner Architektur als auch in seiner Form und Größe dem humanen TMW deutlicher ähnlicher. Weiterhin wurde beschrieben, dass Augen von Schweinen und Menschen eine annähernd gleiche Augapfelgröße mit einem Durchmesser von ca. 23 mm sowie ein ungefähres Vorderkammervolumen von 300 μ l aufweisen (McMenemy und Steptoe 1991).

1.2 Optische Kohärenztomographie in der Augenheilkunde

Die Optische Kohärenztomographie (engl.: *optical coherence tomography* (OCT)) ist ein bildgebendes Verfahren, das auf der Reflexion von Licht an Grenzflächen basiert. Sie wurde von Huang et al. (1991) aufbauend auf den Arbeiten von (Fercher et al. 1988) entwickelt. Durch Interferometrie und den Einsatz von kurzkohärentem Licht kann die Reflektivität einzelner Gewebeschichten ermittelt und so die Organstruktur in Form eines Schnittbildes visualisiert werden. Durch eine Aneinanderreihung eindimensionaler Scans erzeugt die OCT zweidimensionale Schichtaufnahmen analog zur Sonographie – und zwar ebenfalls nichtinvasiv, allerdings kontaktfrei und mithilfe von elektromagnetischen Wellen anstelle von Ultraschallwellen. Dies sind Eigenschaften, die dazu beigetragen haben, dass sich die OCT seit ihrer Erfindung schnell als diagnostisches Instrument etabliert hat. Die zugrundeliegende Technik ist für die Ophthalmologie besonders geeignet, weil der optische Apparat des Auges ohnehin lichtdurchlässig ist und daher optimale Voraussetzungen bietet. So ist beispielsweise die Darstellung der retinalen Schichten in sehr hoher Auflösung möglich, was zur Diagnostik von vitrealen Traktionen, Makulaödemen und -foramina oder anderen Retinopathien herangezogen wird (Schaudig 2001). Im Bereich des vorderen Augenabschnitts dient die OCT der Beurteilung der Vorderkammertiefe, des Kammerwinkels, der Hornhaut und der Lage von

künstlichen Linsen (Koop et al. 1997). Darüber hinaus findet sie bereits Anwendung in weiteren Fachdisziplinen, wie beispielsweise der Dermatologie (Welzel 2001; Sattler et al. 2013), Neurologie (Dziennis et al. 2015), Kardiologie (Bezerra et al. 2009), Gynäkologie (Löning et al. 2007) oder Urologie und Gastroenterologie (Zagaynova et al. 2008).

1.2.1 Funktionsprinzip der OCT

Die Funktionsweise der OCT wird in Abbildung 3 veranschaulicht. Sie basiert auf der Interferometrie, also der Bestimmung von Messgrößen durch Erzeugung von Interferenzen (Fercher et al. 1988). Dazu wird analog zum Michelson-Interferometer Licht von einem Strahlteiler¹⁰ in zwei Teile geteilt (Michelson und Morley 1887). Während ein Anteil ohne Richtungsänderung hindurchgelassen wird und so auf ein Untersuchungsobjekt (wie beispielsweise ein Auge) auftreffen kann, wird der andere Anteil abgelenkt und dient als Referenzstrahl. Die elektromagnetische Welle des zur Probe gelangenden Lichtes wird nach dem Brechungsgesetz der Physik an jeder neuen Grenzfläche, d. h. in diesem Fall an den verschiedenen Gewebsschichten des Auges, einerseits transmittiert und andererseits reflektiert (Meschede 2010). Das reflektierte Licht wird in Richtung Detektor geführt. Das transmittierte Licht wird an der nächsten Gewebeschicht im Auge ebenfalls teilweise reflektiert und erreicht somit kurze Zeit später den Detektor. Analog wird das Licht des Referenzstrahls von einem Spiegel zurückgeworfen und so zum Detektor geleitet. Werden das vom Auge reflektierte und das vom Spiegel zurückgeworfene Licht überlagert, so können die beiden Lichtwellen interferieren. Da beide ursprünglich aus derselben Lichtquelle stammen, sind sie *per definitionem* zueinander kohärent¹¹, sodass ein zeitlich stabiles Interferenzmuster entsteht, welches detektiert werden kann (Meschede 2010). Die Besonderheit bei der OCT ist, dass Licht mit einer großen optischen Bandbreite bzw. mit einer kurzen Kohärenzlänge¹² verwendet wird (Huang et al. 1991). Das bedeutet, dass die beiden Lichtstrahlen nur dann ein stabiles Interferenzmuster erzeugen, wenn ihre Weglängendifferenz sehr kurz ist. Eine Interferenz entsteht nämlich nur, wenn die Weglängendifferenz beider Strahlen kleiner als die Kohärenzlänge des verwendeten Lichtes ist (Meschede 2010). Daher

¹⁰ z. B. in Form eines halbdurchlässigen Spiegels.

¹¹ d. h., sie haben eine feste zeitliche Phasenbeziehung zueinander.

¹² Die Bandbreite $\Delta\lambda$ und Kohärenzlänge L_C einer Lichtquelle der Wellenlänge λ sind gegensätzlich verknüpft über: $L_C \approx \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}$. Je größer die Bandbreite ist, desto kleiner ist demnach die Kohärenzlänge.

muss zur Gewinnung eines starken Signals die vom Referenzstrahl zurückgelegte Wegstrecke der des Probenstrahls entsprechen.

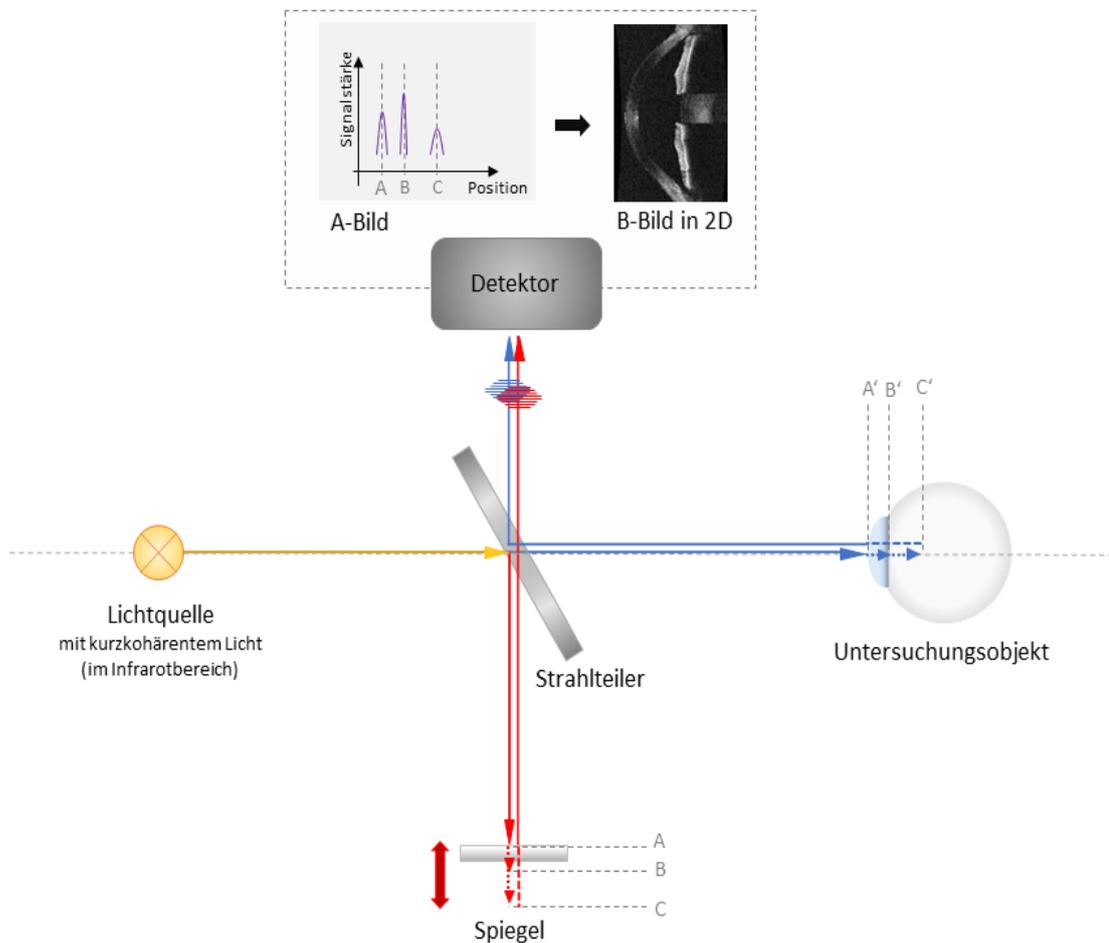


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der OCT.

Von einer Lichtquelle ausgesandte Strahlen treffen auf einen Strahlteiler (gelber Pfeil), welcher die Strahlen teilweise durchlässt (blauer Pfeil) und teilweise ablenkt (roter Pfeil). Das hindurchgelassene Licht trifft auf ein Untersuchungsobjekt wie beispielsweise ein Auge. An jeder der verschiedenen Gewebsschichten im Auge wird ein Teil der elektromagnetischen Welle reflektiert und ein Teil in tiefere Schichten transmittiert. Der reflektierte Anteil kann detektiert werden (blauer Pfeil). Der vom Strahlteiler abgelenkte Anteil dient als Referenzstrahl. Nach Reflexion an einem beweglichen Spiegel erreicht dieser ebenfalls den Detektor (roter Pfeil). Bei Überlagerung des vom Auge reflektierten und des vom Spiegel zurückgeworfenen Lichts kommt es zur Interferenz beider Lichtwellen. Das gewonnene Interferenzsignal wird vom Detektor registriert. Die Verwendung von kurzkohärentem Licht (hier als kurzer Wellenpuls veranschaulicht) und die Änderung der Position des beweglichen Spiegels (A, B, C) ermöglichen die Zuordnung zu verschiedenen Gewebstiefen (A', B', C'). Durch Verarbeiten der Signalamplituden-Informationen kann ein A-Bild und durch zusätzliches Scannen durch die gesamte Probe schließlich ein zweidimensionales B-Bild der Gewebsschicht erzeugt werden.

(Hier ist die OCT-Funktionsweise als Variante im Zeitbereich (engl.: *time domain* (TD)) in vereinfachter Form veranschaulicht, basierend auf dem Prinzip nach Huang et al. (1991).)

Der Vorteil ist, dass durch Anpassen der Spiegelposition die Weglänge eines Strahls aus einer ganz bestimmten Gewebsschicht mit der zurückgelegten Strecke des Referenzstrahls in Übereinstimmung gebracht werden kann. Durch Variieren der Position des beweglichen Spiegels können so Interferenzen mit Strahlen aus unterschiedlichen Probtiefen generiert werden. Folglich ist die Zuordnung von Signalamplitude und Probtiefe möglich, was zur Erzeugung eines Schnittbildes der durchdrungenen Gewebsstrukturen genutzt wird. Geeignete Lichtquellen mit einer kurzen Kohärenzlänge sind beispielsweise Superlumineszenzdiioden. Sie weisen wie Leuchtdioden eine Kohärenzlänge von ca. 10 – 20 μm auf und haben zugleich eine annähernd so starke Intensität wie Laserlicht, sie emittieren in der Regel Licht im näheren Infrarotbereich.

Analog zur Sonographie wird die Auftragung der Amplitude (engl.: *amplitude* (A)) gegenüber der Eindringtiefe (an einer festen Position) A-Bild genannt. Wird dem Amplitudenwert ein bestimmter Helligkeitswert (engl.: *brightness* (B)) zugeschrieben, so ist die Darstellung in Form eines sog. B-Bildes mit unterschiedlichen Graustufen möglich. Durch punktweises Abscannen der Probe an Nachbarpositionen kann ein zweidimensionales B-Bild gewonnen werden; durch mehrfaches Scannen entlang der dritten Raumachse und die Aneinanderreihung der zweidimensionalen Aufnahmen ist ein Volumen konstruierbar.

1.2.2 Technische Details und Varianten der OCT

Da die Lichtgeschwindigkeit eine Konstante ist, können Weglängendifferenzen auch als Laufzeitdifferenzen beschrieben werden¹³ (Meschede 2010). Bildlich gesprochen, führt eine Verlängerung der Wegstrecke des Strahls zu einer verspäteten Ankunft des Lichts am Detektor. Daher wird beim oben beschriebenen OCT-Typ auch vom Signal im Zeitbereich (engl.: *time domain* (TD)) gesprochen (Liu und Brezinski 2007). Das Signal kann aber auch im Frequenzbereich (engl.: *frequency domain* oder *Fourier domain* (FD)) ausgelesen werden¹⁴ (Chinn et al. 1997; Leitgeb et al. 2003; Leitgeb et al. 2004). Zur Realisierung eines FD-OCT-Gerätes wird der Aufbau angepasst. Es wird dann nicht mehr die Positionsänderung des Spiegels registriert, sondern bei festem Referenzarm das Interferenzsignal mittels eines Spektrometers in seine spektralen Komponenten zerlegt, weshalb man in diesem Falle auch von SD-OCT (engl.: *spectral domain* (SD)) spricht. Anders als bei der TD-OCT wird dafür

¹³ Über die Lichtgeschwindigkeit c hängen die zurückgelegte Wegstrecke Δs und die Laufzeit Δt sowie die Wellenlänge λ und die Frequenz f des Lichts zusammen: $c = \frac{\Delta s}{\Delta t} = \lambda \cdot f$.

¹⁴ Prinzipiell geht das Frequenzspektrum (FD) aus der Fourier-Transformation der Autokorrelationsfunktion des zeitlichen Signals (TD) hervor.

polychromatisches¹⁵ und nicht monochromatisches Licht benötigt. Eine neuere Variante der FD-OCT ist die SS-OCT (engl.: *swept source* (SS)), bei der die Frequenz bzw. die Wellenlänge des Lichts kontinuierlich durchgerastert wird (Choma et al. 2003; Liu und Brezinski 2007). So werden die einzelnen spektralen Komponenten nicht gleichzeitig, sondern zeitlich aufeinanderfolgend detektiert. Bei einem SS-OCT-System ist daher kein Spektrometer erforderlich, allerdings muss eine Strahlungsquelle vorhanden sein, die die einzelnen Wellenlängen durchlaufen kann. Vorteile der FD-OCT gegenüber der TD-OCT sind einerseits, dass keine Elemente mehr mechanisch bewegt werden müssen und dass andererseits die einzelnen Signalpeaks in einem Messvorgang zusammen ausgelesen werden können. Das spart Verarbeitungszeit ein und ermöglicht so deutlich höhere Scanraten. So können OCT-Geräte im TD-Modus in der Regel <2000 Scans pro Sekunde erzeugen, während manche kommerziellen FD-OCT-Geräte heutzutage bereits Scanraten bis 85 kHz aufweisen (Cereda et al. 2019).

Die Qualität eines OCT-Gerätes kann anhand des Auflösungsvermögens beurteilt werden (Drexler 2004). Moderne FD-OCT-Geräte können eine transversale oder laterale Auflösung von 15 – 20 μm sowie eine axiale Tiefenauflösung von <3 – 10 μm erreichen (Leitgeb et al. 2004; Heimann und Kellner 2010). Während die transversale Auflösung¹⁶ von der numerischen Apertur des Gerätes und der Wellenlänge des Lichts abhängig ist, ist die axiale Auflösung¹⁷ durch die Kohärenzlänge des Lichts festgelegt (Drexler 2004; Meschede 2010). In Luft beträgt die axiale Auflösung in etwa der halben Kohärenzlänge. In Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts weisen heutige FD-OCT-Systeme meist eine Eindringtiefe von 1,5 – 2 mm in Gewebe auf (Heimann und Kellner 2010).

1.2.3 OCT-Angiographie

Die Optische Kohärenztomographie hat sich als nichtinvasives Verfahren zur Erzeugung von Schichtaufnahmen des Auges durchgesetzt. Limitationen bestehen allerdings darin, dass Flüsse nicht dargestellt werden können bzw. Blutgefäße nicht vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden sind. Für eine Blutgefäßdarstellung bedurfte es bis zu Beginn der 2000er einem

¹⁵ Während polychromatisches Licht aus einem Spektrum mehrerer Wellenlängen zusammengesetzt ist, besitzt monochromatisches Licht eine definierte Wellenlänge.

¹⁶ Die transversale Auflösung $\Delta x, y$ ist wie bei einem Mikroskop bestimmt durch die numerische Apertur NA und die Wellenlänge des Lichts λ , wobei gilt: $\Delta x, y = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$.

¹⁷ Die axiale Tiefenauflösung Δz ist abhängig von der Kohärenzlänge L_c des Lichts und dem Brechungsindex n des umgebenden Mediums, wobei gilt $\Delta z = \frac{L_c}{2 \cdot n}$.

invasiven Eingriff, nämlich der Durchführung einer Fluoreszenzangiographie mit intravenöser Injektion von Farbstoffen wie Indocyaningrün (ICG) oder Fluoreszein (Richard et al. 1998). Mit der Weiterentwicklung der OCT zur OCT-Angiographie (engl.: OCT *angiography* (OCTA)) ist heutzutage auch die nichtinvasive Darstellung vaskulärer Strukturen am Auge, insbesondere die Darstellung der Aderhaut und Netzhaut, möglich (Chow und de Oliveira 2018). Die der OCTA zugrundeliegende Methode wurde in ihren Anfängen von Wang et al. (2007) vorgestellt und basiert auf der Detektion und Analyse von Bewegungskontrasten (Fang et al. 2016). Dabei dient das Blut in den Gefäßen quasi als intrinsisches Kontrastmittel. Konkret werden bei der OCTA mehrere B-Scans zeitlich kurz aufeinanderfolgend aufgenommen und deren Bildinformation an jeder Pixelposition miteinander verglichen. Da sich die in den Gefäßen vorhandenen Erythrozyten und anderen Blutbestandteile mit dem Blutfluss fortbewegen, ändert sich im zeitlichen Verlauf das Reflexionsverhalten und damit das vom OCT-Detektor erfasste Signal. Entscheidend ist, dass sich die Bildinformation in den Gefäßen also deutlich stärker ändert als in der statischen Umgebung um die Blutgefäße. Diese Unterschiede lassen sich durch softwarebasierte Bildverarbeitung hervorheben, wodurch die Blutgefäße von ihrer Umgebung abgegrenzt und bildlich dargestellt werden können. Dazu werden beispielsweise die Analyse des Doppler-Shifts oder die Berechnung der Standardabweichung an jeder Pixelposition genutzt (Zhang et al. 2015). Das neu konstruierte Bild visualisiert das Gefäßnetzwerk zweidimensional im Sinne einer Orthogonalprojektion¹⁸ (oder Z-Projektion) als Aufsicht auf das gescannte Areal. Dies wird *En-face*-Darstellung genannt (vgl. Kapitel 3.2). Da jeder Linie in der *En-face*-Darstellung ein B-Scan zugeordnet werden kann, bleibt die Tiefeninformation der klassischen OCT-Bilder erhalten. Im vorderen Augenabschnitt hat sich die OCTA bisher nur wenig für eine klinische Anwendung etabliert (Koop et al. 1997; Wirbelauer et al. 2001; Müller et al. 2006).

1.3 Stand der Forschung im Bereich der Kammerwasserabflusswege

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, sind die grundlegenden Mechanismen der Kammerwasserhomöostase bekannt. Allerdings sind Details der Kammerwasserphysiologie, Einflussfaktoren zur Entstehung des Glaukoms oder die pathogenetische Relevanz von strukturellen Veränderungen im Drainage-Netzwerk weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Zudem gibt

¹⁸ Eine Orthogonalprojektion beschreibt die geometrische Operation, bei der Punkte eines dreidimensionalen Raumes (mit den drei Raumrichtungen \vec{x} , \vec{y} , \vec{z}) entlang einer senkrechten Projektionsachse (z. B. der \vec{z} -Achse) auf eine zweidimensionale Fläche (z. B. die x - y -Ebene) abgebildet werden.

es verschiedene wissenschaftliche Ansätze bei der Suche nach einem geeigneten Verfahren zur Visualisierung des Kammerwasserabflusssystemes.

1.3.1 Historische Forschungsergebnisse vor dem späten 20. Jahrhundert

Historisch gab es schon früh wissenschaftliche Kontroversen über die noch wenig bekannten, makroskopisch verborgenen Strukturen des vorderen Augenabschnitts und deren Funktionen beim Menschen. Einen ausführlichen Überblick über erste wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema aus dem 18. und 19. Jahrhundert lieferte Dvorak-Theobald (1934). Zu den entscheidenden Erkenntnissen aus dieser Zeit zählt die Entdeckung des Schlemm-Kanals durch Friedrich Schlemm im Jahre 1830 (Schlemm 1830). Dieser wurde später beschrieben als: „*the circular canal running equatorially at the border of the sclera and cornea*“ (Dvorak-Theobald 1934, Seite 574).

Zunächst ging man davon aus, dass dieser Kanal ein einfaches, zirkulär durchgehendes Rohr sei, bereits Ende der 1950er Jahre wurde jedoch eine irreguläre Form der Schlemm-Kanal-Wand mit Septen und Gewebebrücken erkannt (Unger und Rohen 1959).

Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung der Kammerwasservenen (engl.: *aqueous veins*) von Ascher (1942). Durch die Fluorescein-Injektionen von Goldmann (1946) konnte bewiesen werden, dass diese Venen nicht Blut, sondern ein rein intraokulares Medium, nämlich Kammerwasser (engl.: *aqueous humour*), enthalten. Mithilfe von detailreichen Neopren-Ausgusspräparaten lieferte schließlich Ashton (1951; 1952) zu Beginn der 1950er Jahre den Nachweis, „daß die ophthalmoskopisch Kammerwasser führenden Gefäße tatsächlich mit dem Schlemmschen Kanal verbunden sind“ (Rohen und Rentsch 1968, S. 310).

Rohen und Rentsch (1968) steuerten neue Erkenntnisse über die Kollektorkanäle bei, wobei sie zwischen direkten und indirekten Abflusskanälen unterschieden. Während die indirekten Abflusskanäle einen Durchmesser von nur ca. 50 µm aufweisen, ca. 15 – 20 Mal pro Auge vorkommen und mit dem intraskleralem Kapillarnetzwerk verbunden sind, haben die spiral- und bogenförmig verlaufenden direkten Abflusskanäle einen größeren Durchmesser von ca. 70 µm, finden sich 4 – 6 Mal pro Auge und hängen direkt mit dem episkleralen Netzwerk zusammen.

Durch weitere Studien von Rohen und van der Zypen (1968) sowie Inomata et al. (1972) konnte bestätigt werden, dass das Kammerwasser vom Trabekelmaschenwerk aus durch Poren oder Invaginationen in das vom Endothel ausgekleidete Lumen des Schlemm-Kanals gelangt, wobei „die Poren im Bereich der inneren Wand des Schlemmschen Kanals sehr

ungleich verteilt sind“ (Bill et al. 1989, S. 278). Dabei werden einige Areale stärker perfundiert als andere.

1.3.2 Neue Erkenntnisse und aktuelle Fragestellungen

Aktuelle wissenschaftliche Bestrebungen im Forschungsgebiet der Kammerwasserdrainage beschäftigen sich unter anderem mit der Frage, wo unter physiologischen Bedingungen der Hauptabflusswiderstand der Kammerwasserdrainage liegt und ob diese Bereiche auch gleichzeitig die entscheidenden Strukturen darstellen, die für die Erhöhung des Abflusswiderstandes beim Glaukom relevant sind. Wie Bill et al. (1989) beschreiben, bestärkten zunächst Studien von Goldmann (1951), Grant (1963), Hamanaka und Bill (1988) die Annahme, dass der Hauptabflusswiderstand zwischen der Vorderkammer und dem Schlemm-Kanal, also im Bereich des TMW liegt. Untersuchungen von Mäepea und Bill (1992) ergaben, dass sich der Hauptabflusswiderstand in der juxtakanalikulären Zone des TMW nahe des Schlemm-Kanals befindet. Weitere *Ex-vivo*-Untersuchungen an *Post-mortem*-Augen, bei denen eine Trabekulektomie durchgeführt oder Teile der Sklera und des Schlemm-Kanals unter Einsatz eines Laser entfernt wurden, wiesen jedoch darauf hin, dass ungefähr ein Drittel des Abflusswiderstands im menschlichen Augen distal der inneren Wand des Schlemm-Kanals, also in den distalen Abflusswegen, liegt und dass die Abnahme des Abflusswiderstandes nicht linear mit der Größe der Trabekelwerkseröffnung korreliert (Rosenquist et al. 1989; Schuman et al. 1999). Johnson (2006) legte sich konkreter fest und gab an, dass der Großteil des Abflusswiderstandes vor allem nahe der inneren Endothelwand des Schlemm-Kanals lokalisiert ist und am ehesten in der extrazellulären Matrix des juxtakanikulären Bindegewebes oder der Basalmembran des Schlemm-Kanals generiert wird. So schlussfolgert er, dass, auch wenn ein signifikanter Anteil des physiologischen Kammerwasserabflusswiderstandes möglicherweise von den Kollektorkanälen oder Kammerwasservenen generiert werden könnte, diese nicht verantwortlich für die Erhöhung des Abflusswiderstandes beim Glaukom seien (Johnson 2006). Unabhängig davon ist bekannt, dass der Abflusswiderstand (beim konventionellen trabekulären Abflussweg) mit zunehmendem Alter und bei Vorliegen eines Glaukoms ansteigt (Tamm 2009). In den letzten Jahren wird daher die Rolle der distalen Kammerwasserabflusswege, also die Bedeutung der Strukturen hinter dem TMW, neu in den Fokus gerückt (Swaminathan et al. 2014). Die Vermutung basiert auch auf der Tatsache, dass chirurgische Bypass-Eingriffe, die die Umgehung des TMW zum Ziel haben, nicht immer die gewünschten Erfolge erzielen (vgl. Kapitel 1.1.3). Auch Wecker et al. (2017) zeigten, dass die Größe einer im Rahmen einer Trabekulektomie eröffnete Fläche des TMW nicht automatisch mit der Senkung des IOD korreliert. Als mögliche Ursache werden neben der Ungleichverteilung

der Kollektorkanäle (s. u.) auch postoperative Veränderungen in distalen Bereichen (wie die Obstruktion von Kollektorkanälen oder Kammerwasservenen) diskutiert.

Darüber hinaus besteht ein großes Interesse darin, morphologische Veränderungen unter IOD-Änderung zu identifizieren. Hierzu ist bekannt, dass bei einem Anstieg des Augeninnendrucks das TMW expandiert und gleichzeitig der Schlemm-Kanal kollabiert (Grant 1963). So führt vermutlich eine Vorwölbung der inneren Wand vor die Kollektorkanalöffnungen zu einer Kompression der Kammerwasservenen und geht mit einer Verringerung der möglichen Abflussfläche des Kammerwassers einher (Battista et al. 2008). Im Gegensatz dazu vergrößert sich das Schlemm-Kanal-Lumen durch Wirkstoffe wie Pilocarpin (Li et al. 2014) oder Rho-Kinase-Inhibitoren (Li et al. 2016) sowie durch Laser-Trabekuloplastik (Skaat et al. 2017). Weiterhin unterscheiden sich beim Vorliegen und Nichtvorliegen eines Glaukoms sowohl das Ausmaß der Füllung der episkleralen Venen als auch die Durchlässigkeit des TMW und der inneren Wand des Schlemm-Kanals, was mittels *Channelography*-Untersuchungen¹⁹ gezeigt wurde (Grieshaber et al. 2009). Zusätzlich kommt es beim primären Offenwinkelglaukom zu einem signifikanten Anstieg von Plaques aufgrund von feinen Fibrillen und extrazellulären Bestandteilen (Tektas und Lütjen-Drecoll 2009).

Neben den pathophysiologischen Veränderungen konnten in den letzten Jahren auch neue Erkenntnisse über die physiologische Anatomie der Kammerwasserwege gewonnen werden, genauer gesagt über den komplexen und segmentalen Aufbau des Drainagesystems. So zeigten neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen aus dem 21. Jahrhundert, dass der Großteil der Kollektorkanäle keine einfachen Öffnungen, sondern anatomisch komplexe Ostien mit Klappen oder Gewebebrücken aufweist, wodurch die Regulation des Kammerwasserabflusses beeinflusst werden kann (Bentley et al. 2016). Außerdem konnte, wie von Swaminathan et al. (2014) zusammengefasst, vielfach gezeigt werden, dass der Kammerwasserabfluss über das TMW nicht überall gleich, sondern sektoriell unterschiedlich, strukturiert ist. So veranschaulichen Mikro-Computertomographie-Rekonstruktionen des vorderen Augenabschnitts von Hann et al. (2011) (vgl. Kapitel 1.3.3), dass die Kollektorkanäle nicht homogen über die Zirkumferenz des Auges verteilt sind. Auch bezüglich des intraskleralen venösen Plexus wurden dichtere und weniger dichtere Areale beschrieben (Kagemann et al. 2011). Ein segmentales Muster konnte ebenfalls bei der Bildgebung des Kammerwasserabflusses mittels Fluorescein (sog. *aqueous angiography*) beobachtet werden (Huang et al. 2017).

¹⁹ Bei der *Channelography* wird ein flexibler Mikrokatheter in den Schlemm-Kanal eingebracht und darüber Fluorescein injiziert, um den Weg im Kammerwasserabflussnetzwerk aufzuzeichnen (Grieshaber et al. 2009).

In *Ex-vivo*-Untersuchungen an *Post-mortem*-Augen im Anschluss an diese Fluorescein-Darstellung konnten dann trabekuläre Stents in Regionen mit schlechtem Abfluss eingesetzt werden, wodurch der Kammerwasserabfluss in diesem Areal verbessert wurde (Huang et al. 2016). Möglicherweise könnten so bislang ungenutzte Bereiche des Abflussnetzwerkes rekrutiert werden.

Doch nicht nur strukturelle Veränderungen, sondern auch das dynamische Verhalten des Kammerwassersabflusssystems werden untersucht. So werden beispielsweise bereits durch Bill et al. (1989) kontinuierliche Vorgänge mit Auftreten und Verschwinden von Poren an der Wand des Schlemm-Kanals erwähnt. Neuere Untersuchungen lassen zusätzlich eine pulsatile Natur des Kammerwasserabflusses vermuten. So zeigten sich an enukleierten Primatenaugen pulsabhängige Bewegungen des TMW (Li et al. 2013). Durch Versuche mit humanen Augen konnte diese Annahme bestätigt und aufgrund der Synchronität zum peripheren Pulsschlag eine kardiale Ursache vermutet werden (Hariri et al. 2014). So wird beschrieben, dass es durch Änderungen im Gefäßvolumen der Choroidea beim Wechsel zwischen Systole und Diastole zu pulsatilen Druckschwankungen im Auge kommt (Carreon et al. 2017). Diese wird als okuläre Pulsamplitude bezeichnet. Dabei sei die Regulation des pulsatilen Flusses vermutlich nicht auf eine Region begrenzt, sondern erfordere das koordinierte Zusammenspiel eines miteinander vernetzten Organsystems.

1.3.3 Bisherige Bildgebungsmodalitäten

Die Wahl einer geeigneten Bildgebung zur Darstellung des Kammerwassersystems ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Derzeit werden verschiedene Techniken für verschiedene Anwendungsgebiete genutzt.

Eine detailreiche strukturelle Darstellung der Kammerwinkelregion wurde mittels *high resolution* SD-OCT in ähnlicher Auflösung wie bei der Rasterelektronenmikroskopie an nichthumanen Primatenaugen bereits erzielt (Hariri et al. 2014; Carreon et al. 2017). Dabei wird jedoch nur die Anatomie an einer einzelnen Position abgebildet. Eine umfassendere Visualisierung der Abflusswege ist beispielsweise durch das Überlappen von mehreren OCT-Bildern möglich. So erstellten Kagemann et al. (2011) mehrere limbusnahe OCT-Scans von der gesamten Zirkumferenz enukleierter menschlicher Augen und fügten diese nachträglich zu einer Gesamtübersicht zusammen. Außerdem sind Hann et al. (2011) die dreidimensionale Rekonstruktion des Vorderabschnitts und Identifizierung des Schlemm-Kanals mit abgehenden Kollektorkanälen mittels Mikro-Computertomographie gelungen. Ein Nachteil der genannten Bildgebungsmodalitäten ist, dass sie rein strukturell und nicht funktionell sind.

Eine Option zur Darstellung des Kammerwasserflusses im Sinne einer funktionellen Bildgebung stellt derzeit die *Time-of-flight*-Magnetresonanzangiographie (TOF-MRA) dar (Wecker et al. 2018b; Wecker et al. 2018a). Bei dieser Technik können Gefäße mithilfe der Magnetresonanstechnik ohne Kontrastmittel abgebildet werden, wobei ausgenutzt wird, dass eine strömende Flüssigkeit wie Blut eine höhere Magnetisierung als das umgebende stationäre Gewebe besitzt. Dies wurde für die Kammerwassergefäße bereits an Rinderaugen experimentell gezeigt (Wecker et al. 2018a). Allerdings sind der Methode durch Bewegungsartefakte, lange Sequenzzeiten und ein derzeit noch geringes Auflösungsvermögen Grenzen bezüglich der Nutzung bei Menschen gesetzt.

Unter Inkaufnahme von Invasivität kann das Spektrum der bildgebenden Verfahren um jene erweitert werden, bei denen ein Kontrastmittel zum Einsatz kommt. Eine Möglichkeit stellt die Injektion von Farbstoffen wie Fluoreszein oder ICG im Rahmen der Fluoreszenz-Angiographie dar, welche ursprünglich zur Erforschung der Netzhaut entwickelt wurde (Wessing 1968). Fluoreszein wurde von Grieshaber et al. (2009) zur sog. *Channelography* genutzt, bei der zur Bewertung der Abflussleistung des distalen Kammerwassersystems der Farbstoff intraoperativ in den Schlemm-Kanal injiziert wird. Weiterhin kommt Fluoreszein bei der sog. *Aqueous angiography* zum Einsatz (Saraswathy et al. 2016; Huang et al. 2017; Huang et al. 2018). Dabei wurden Fluoreszein-Farbstoffe in das Auge gebracht und nachfolgend Fluoreszenzaufnahmen erstellt, die Teile des Kammerwasserabflusses zeigten. Hierbei wurden Schweine-, Primaten- oder humane Augen verwendet. Leider ist der Fluoreszenz-Farbstoff nur nahe der Sklera-Oberfläche sichtbar und lediglich eine zweidimensionale Darstellung der Gefäße möglich.

1.3.4 Vorangegangene Forschung zu OCT-Kontrastmitteln

Möchte man als bildgebende Methode auf die Optische Kohärenztomographie (vgl. Kapitel 1.2) zurückgreifen, so kann der Einsatz eines Kontrastmittels der nächste mögliche Schritt sein. Die Darstellung des Kammerwassersystems mittels nativer OCT ist nämlich aufgrund des kleinen Durchmessers der Kammerwassergefäße und der umgebenden stark streuenden Sklera limitiert (Kagemann et al. 2012). Zudem kann – anders als Blut bei der OCTA (vgl. Kapitel 1.2.3) – das klare und einphasige Kammerwasser nicht selbst als intrinsisches Kontrastmittel für die OCT fungieren, weshalb es aktuell nötig scheint, ein Kontrastmittel von außen zuzuführen. Ein geeignetes OCT-Kontrastmittel hat sich jedoch bislang nicht durchgesetzt.

Als Option wurden Goldstäbchen im Nanometerbereich evaluiert (Troutman et al. 2007; de la Zerda et al. 2015). Diese sind stark reflektiv und können zum Beispiel mittels Doppler-Verfahren die Detektion eines Flusses ermöglichen.

Darüber hinaus wurden im Vorfeld dieser Promotionsarbeit von der Arbeitsgruppe Lipidemulsionen (LE) als mögliche Substanzklasse untersucht²⁰. Ihre optischen Eigenschaften erschienen vielversprechend (van Oterendorp et al. 2016; van Oterendorp 2018). Denn *In-vitro*-Versuche an Schlauchphantomen ergaben, dass fettige Lösungen tatsächlich ein starkes OCT-Signal erzeugen. Es wurden dünne Polyethylen-Schläuche mit verschiedenen LE und zum Vergleich mit der Pufferlösung BSS (von engl.: *balanced salt solution*) befüllt und anschließend vor verschiedenen OCT-Geräten vom SD- und SS-Typ positioniert (siehe Abbildung 4). Konkret wurde Milch unterschiedlichen Fettgehaltes (1,5 %, 3,8 %, 12 %) und das als Narkotikum bekannte Präparat Propofol untersucht (Gottschalk et al. 2019). Dabei ist zu betonen, dass für die Verwendung der Propofol-Lösung als Kontrastmittel nicht der klare anästhetische Wirkstoff 2,6-Diisopropylphenol relevant ist, sondern die auf Sojaöl basierende Fettemulsion, in der der Arzneistoff handelsüblich gelöst ist.

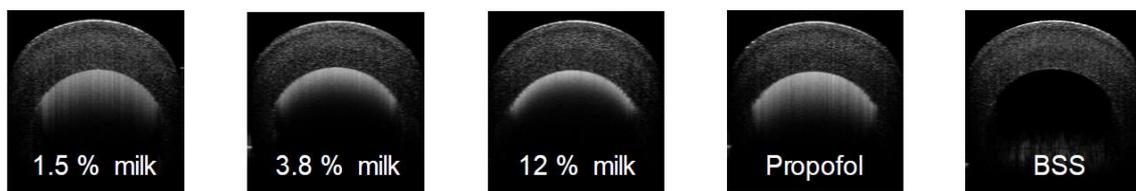


Abbildung 4: OCT von verschiedenen Lipidemulsionen in Schlauchphantomen.

Bei steigendem Fettgehalt der Milch (1,5 %, 3,8 %, 12 % *milk*) nimmt die Signalintensität in der OCT qualitativ zu (von links nach rechts). Gleichzeitig nimmt die Eindringtiefe deutlich ab. Bei der verwendeten Propofol-Emulsion auf Sojaöl-Basis zeigt sich auch bei relativ hoher Signalintensität noch eine gute Eindringtiefe. In der Nullprobe mit der nichtlipiden Pufferlösung BSS (engl.: *balanced salt solution*) entsteht kein intraluminales OCT-Signal.

(Abbildung veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

Es zeigte sich sowohl qualitativ als auch quantitativ, dass bei steigendem Fettgehalt, d. h. bei größerer Fetttröpfchen-Dichte, die Signalintensität in der OCT zunimmt. Gleichzeitig nahm aufgrund der vermehrten Absorption und Reflexion mit steigendem Fettgehalt die Eindringtiefe ab. Die Propofol-Emulsion lieferte insgesamt die aussichtsreichste Kombination für den Einsatz als OCT-Kontrastmittel, da sie bei relativ starker Reflektivität trotzdem eine gute Eindringtiefe aufwies (Gottschalk et al. 2019). Als Ursache hierfür ist zu diskutieren, ob die

²⁰ In der Augenheilkunde sind Lipidemulsionen bisher bekannt durch die Verwendung als Augentropfen zur besseren Darstellung des Tränenmeniskus mittels Vorderabschnitt-OCT (Napoli et al. 2014).

Transmission von Licht bei Propofol-Lösungen möglicherweise vorrangig durch Streuung, und nicht durch Absorption, determiniert ist. Denn spektrometrische Untersuchungen ergaben, dass Propofol-Lösungen bei höheren Wellenlängen (950 – 1100 nm) Licht weniger stark absorbieren, während die verwendeten Milchprodukte in diesem Bereich ein zunehmendes Absorptionsverhalten aufzeigten (Gottschalk et al. 2019).

Zusätzlich wurde das native OCT-Signal einer Propofol-Lösung mit dem von Blut verglichen. Während das Blut in dem statischen Zustand im Schlauch nur ein schwaches OCT-Signal lieferte, zeigte sich bei der Propofol-Lösung auch ohne Fluss eine starke intraluminalen Reflexion (Gottschalk et al. 2019). Blut kann also bisher nur durch die Bewegung der Erythrozyten mit dem Blutfluss in der OCTA gut detektiert werden, während LE auch ohne gerichtete Strömung in der nativen OCT sichtbar sind.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Signale der LE *in vitro* fluktuieren. So zeigte sich innerhalb eines mit Milch oder Propofol befüllten Lumens an einer Pixelposition eine deutlich höhere Standardabweichung der Signalintensität im Vergleich zum Signal des statischen Polyethylen-Schlauchs (Gottschalk et al. 2019).

1.4 Zielsetzung der Promotionsarbeit

Anknüpfend an die vorherigen Experimente der Arbeitsgruppe ist es das Ziel dieses Promotionsprojektes, herauszufinden, inwiefern Lipidemulsionen (LE), genauer gesagt v. a. Propofol-Lösungen, als OCT-Kontrastmittel im Auge anwendbar sind (vgl. Kapitel 1.3.4). Konkret sollen die bereits durchgeführten *In-vitro*-Experimente durch *Ex-vivo*-Versuche an enukleierten Schweineaugen vervollständigt werden. Es soll untersucht werden, ob LE grundsätzlich in okulaem Gewebe detektiert werden können und ob ein LE-Signal extrahiert werden kann. Dabei ist zu klären, unter welchen Voraussetzungen dies möglich wird, welche Eigenschaften der LE dabei genutzt werden können, welche Optimierungsmöglichkeiten bestehen und welche Vor- und Nachteile die verwendete Methode birgt. Zudem soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich durch den Einsatz solcher Kontrastmittel das Kammerwasserabflusssystem des Auges visualisieren lässt. Idealerweise ließe sich das gesamte Drainagenetzwerk von der Vorderkammer bis in die episkleralen Venen abbilden. Hierbei ist zu explorieren, ob möglicherweise Artefakte vorliegen, die ein verfälschtes Abbild erzeugen. Gleichzeitig sind ggf. strukturelle Unterschiede zwischen dem Modellauge und dem menschlichen Auge zu berücksichtigen (vgl. Kapitel 1.1.4). Bestenfalls ließen sich neue Erkenntnisse über die Anatomie und Physiologie des Drainagenetzwerkes gewinnen und damit Fortschritte in der Grundlagen- und Glaukomforschung erzielen.

2 Material und Methoden

Um gemäß der Projektidee experimentell zu untersuchen, inwieweit Lipidemulsionen (LE) als OCT-Kontrastmittel zur Darstellung des Kammerwasserabflusses geeignet sind, wurden im Wesentlichen dem menschlichen Auge möglichst ähnliche Modellaugen, eine potenziell als Kontrastmittel taugliche LE sowie ein passendes OCT-System benötigt. Die in diesem Falle ausgewählten Objekte werden nachfolgend einzeln vorgestellt. Zudem werden der Versuchsaufbau und Ablauf der LE-basierten Bildgebungsexperimente sowie das Verfahren zur Erzeugung von histologischen und fluoreszenzangiographischen Vergleichsbildern erläutert. Die Auswahl der Materialien sowie Einflussfaktoren des experimentellen Setups werden in Kapitel 4 reflektiert und kommentiert.

2.1 Modellaugen

Als Modellaugen kamen in der frühen Projektphase Rinderaugen, später dann ausschließlich Schweineaugen zum Einsatz. Alle Versuchstieraugen wurden im Vorfeld von einem lokalen Schlachtbetrieb enukleiert, d. h. vollständig im Ganzen aus der Augenhöhle herausgetrennt. Um die Augen vor möglichen hitzebedingten Schäden zu schützen, erfolgte dies zeitlich vor einem im Schlachtprozess stattfindenden Brühvorgang zur Entfernung von Borsten. Nach der E nukleation wurden die Augen einzeln in Aluminiumfolie verpackt, bei Raumtemperatur transportiert, zur Lagerung bei -20 °C tiefgefroren und vor Versuchsbeginn wieder aufgetaut.

2.2 OCT-System

Für frühe *Ex-vivo*-Experimente wurde zunächst auf das Spectralis-OCT-System (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) zurückgegriffen. Im Verlauf und bei dem im Folgenden beschriebenen Versuchsaufbau kam das Cirrus HD-OCT-Gerät (Modell 5000) (Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, USA) zum Einsatz²¹. Bei beiden OCT-Varianten handelt es sich um ein *spectral domain*-, also ein SD-OCT, basierend auf der Analyse im Frequenzbereich. Die technischen Daten des verwendeten Spectralis- sowie Cirrus HD-OCT-Modells sind im Anhang angefügt. Die Firma Zeiss (Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, USA) stellte zudem eine externe Linseneinheit als Prototyp eines Vorderabschnittmoduls zur Verfügung, wodurch mithilfe der Zeiss AngioPlex-Einheit (vgl. Rosenfeld et al. (2016)) die Nutzung des OCT-Angiographie-Modus im Vorderabschnitt des Auges und damit die Ausnutzung der OCTA-Algorithmen zur Detektion der LE möglich wurde (vgl. Kapitel 1.2.3).

²¹ Die Abkürzung HD steht hierbei für Hochauflösung (von engl.: *high definition*).

2.3 LE-basierte OCT des Kammerwasserabflusses

2.3.1 Lipidemulsionen

Als LE wurden Propofol-Präparate eingesetzt. Konkret wurden die Produkte Propofol-Lipuro (10 mg/ml) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Propofol 1 % MCT Fresenius (10 mg/ml) (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Die Inhaltsstoffe umfassen jeweils Sojaöl, mittelkettige Triglyceride, Glycerol, Eilecithin, Natriumhydroxid und Ölsäure bzw. Natriumoleat sowie Wasser für Injektionszwecke. Die Inhaltsstoffe sind herstellereigenspezifisch und nicht bekannt. Die Propofol-Präparate wurden meist unverdünnt, aber auch teils (zu 50 % oder 25 %) mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate-buffered saline* (PBS)) verdünnt. Zudem ist eine indirekte, inkonstante Verdünnung der Propofol-Lösungen mit dem Kammerwasser der Vorderkammer zu berücksichtigen.

2.3.2 Versuchsaufbau

Eine Voraussetzung zur Durchführung der LE-basierten Bildgebungsexperimente ist, dass die Schweineaugen stabil und in idealer Messposition vor dem OCT-Gerät platziert sowie die als Kontrastmittel fungierenden LE in die Vorderkammer infundiert werden können. Dies wurde durch den in Abbildung 5 gezeigten Versuchsaufbau gewährleistet. Die Ausarbeitung dieses festen Setups war ein langer Prozess, der einen wesentlichen Anteil dieses Promotionsprojektes ausmacht und vielen Änderungen unterlag, bis sich der Aufbau in der gezeigten Form als zielführend und praktikabel erwiesen hat.

Wie in Abbildung 5 gekennzeichnet, wurde ein Schweineauge (*) in der angefertigten Haltevorrichtung (3) befestigt. Die Halterung wurde mithilfe der Open-Source-Software Tinkercad digital selbst konstruiert (Autodesk, Inc. 2020). Anschließend wurde diese mittels 3D-Druck aus speziellem Kunststoff²² angefertigt und mit handelsüblichem Klarlack versiegelt. Das Auge wurde durch einen Unterdruck in der Halterung stabilisiert, welcher mithilfe des aufgesetzten Pipettierballs (4) erzeugt wurde. Dazu besitzt die Haltevorrichtung im Inneren ein Lumen, sodass der Unterdruck vom Ball bis zur trichterförmigen Öffnung aufrechterhalten werden kann. Über ein Gewinde im Zwischenstück der Haltevorrichtung ist die Konstruktion mit einer Verbindungsplatte (5) und über diese mit dem Stativ (6) fest

²² Es handelte sich in diesem Falle um PLA-Plastik (von engl.: *polylactic acid*), einen biokompatiblen Kunststoff aus Polymilchsäuren, der durch Hitze verformbar ist und daher für die Verwendung in 3D-Drucksystemen geeignet ist.

verbunden. Durch den stabilen Stativfuß und durch die Höhenverstellbarkeit der Stativstangen, konnte das Auge in optimaler Entfernung und gewünschter Höhe vor dem hier verwendeten Cirrus HD-OCT-Gerät (1) positioniert werden. Die zum Gerät gehörenden Kinn- (1') und Kopfstützen (1'') kommen im klinischen Alltag zum Einsatz, wurden aber für diesen Versuchsaufbau nicht benötigt. Durch die Nutzung der externen Linse als Vorderabschnittsmodul (2) wurde eine Messung im Angiographie-Modus möglich.

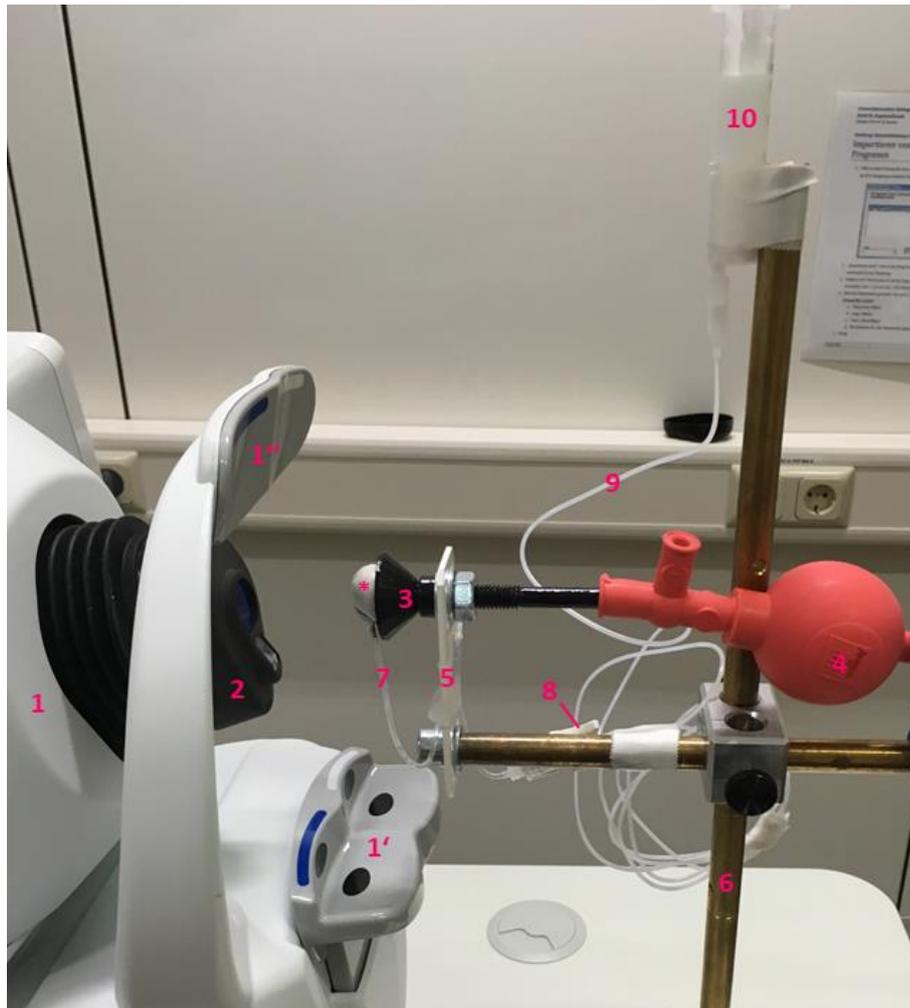


Abbildung 5: Versuchsaufbau für LE-Detektion im Schweineauge.

Das untersuchte Schweineauge wurde in der Versuchshalterung befestigt und vor dem verwendeten OCT-System positioniert. Durch den Pipettierball wurde ein Unterdruck erzeugt, welcher das Auge im Trichter hält. Über ein Infusionssystem kann die LE aus einer Spritze in die Vorderkammer infundiert werden.

1: Zeiss Cirrus HD-OCT-System (Modell 5000) mit **[1']** Kinnstütze und **[1'']** Kopfstütze, **2:** Vorderabschnittslinse, **3:** Haltevorrichtung, **4:** Pipettierball, **5:** Verbindungsplatte, **6:** Stativ, **7:** Vorderkammerinfusion, **8:** Dreiweghahn, **9:** Perfusorschlauch, **10:** Spritze mit Propofol, *****: Schweineauge.

(Abbildung in ähnlicher Form veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

Die LE wurde aus einer handelsüblichen Spritze (ohne Stempel) (10) über den angeschlossenen Perfusorschlauch (9) in die Vorderkammer des Auges infundiert. Dabei wurde die Infusionshöhe so gewählt, dass sich ein Infusionsdruck von ca. 13 – 15 cmH₂O, also ca. 10 mmHg ergeben hat. Bei Schweinen liegt der Augeninnendruck *in vivo* bei ca. 15 mmHg (Ruiz-Ederra et al. 2005). Damit wurde der Perfusionsdruck niedriger als der physiologische IOD gewählt, wobei berücksichtigt wurde, dass im experimentellen Setting aufgrund des nicht vorhandenen Blutdrucks der episklerale Venendruck als Gegendruck wegfällt. Der episklerale Venendruck wurde auf 5 mmHg abgeschätzt, sodass sich aus der Differenz vom *In-vivo*-IOD von 15 mmHg und dem episkleralen Venendruck von ca. 5 mmHg der gewählte *Ex-vivo*-Infusionsdruck von ca. 10 mmHg ergibt. Das Ziel ist es, auf diese Weise Druckartefakte durch einen unphysiologisch hohen Perfusionsdruck zu vermeiden. Der Perfusorschlauch wurde über einen Dreiwegehahn (8) mit der Vorderkammerinfusionskanüle (7) verbunden. Letztere musste zu Versuchsbeginn in die Vorderkammer eingebracht werden, wobei zum Einschneiden der Cornea ein angewinkeltes Cornea-Messer zum Einsatz kam. Bevor die LE infundiert wurde, konnte über den dritten Zugang des Dreiwegehahns das noch vorhandene physiologische Kammerwasser aus der Vorderkammer abgezogen werden. Dadurch wurde die Vermischung von Kammerwasser und Kontrastmittelflüssigkeit verringert und so die Konzentration der LE im Auginneren erhöht.

In Tabelle 1 sind verwendete Versuchsmaterialien, die im Textteil nicht näher beschrieben sind, aufgelistet und die Herstellerangaben aufgeführt.

Tabelle 1: Zusätzliches Versuchsequipment.

Material	Hersteller
3D-Drucker	MakerBot Replicator+ (MakerBot Industries, LLC, New York, USA)
Pipettierball	Rotilabo-Sicherheits-Pipettierball (125 mm) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Vorderkammer-Kanüle	CM Micro Etched (20 G) (Beaver-Visitec International Ltd, Abingdon, Großbritannien)
Perfusorschlauch	Original Perfusor Line (50 cm) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Cornea-Messer	Ophthalmic Knife MVR-Angle (20 G) (MANI, Inc., Tochigi, Japan)

2.3.3 Versuchsdurchführung

Zunächst mussten das OCT-Gerät eingeschaltet, die Vorderabschnittslinse aufgesetzt und die einzelnen Komponenten der Versuchsanordnung (ohne Auge) wie in Abbildung 5 aufgebaut werden. Dies schließt die Befüllung des Infusionsschlauches mit der LE und die Befestigung des Systems am Stativ sowie das Anschließen des Perfusorschlauches an den Dreiweghahn ein. Die Gewinnung der LE-basierten OCTA-Bilder lief dann nach einem festen Schema ab. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 chronologisch aufgeführt.

Tabelle 2: Vorbereitung einer Messung.

Nr.	Durchführungsschritt bei der Vorbereitung einer Messung
1.	Auftauen eines tiefgefrorenen enukleierten Schweineauges
2.	Präparative Entfernung von überschüssigem Binde- und Muskelgewebe ²³
3.	Einschneiden der Cornea mithilfe eines Cornea-Messers
4.	Einführen der Vorderkammer-Infusionskanüle in die Vorderkammer
5.	Verbinden des Vorderkammer-Infusionsschlauches mit dem Dreiweghahn
6.	Befestigung des Augapfels im Trichter der Halterung <ul style="list-style-type: none"> ▪ durch Erzeugung eines Unterdrucks mithilfe des Pipettierballs ▪ ggf. Stabilisierung durch Einspritzen von Flüssigkeit in die Vorderkammer²⁴
7.	Einstellen der Höhe und der Entfernung zum OCT-Gerät mithilfe des Stativmaterials

Tabelle 3: Messvorgang am Cirrus HD-OCT-System.

Nr.	Durchführungsschritt beim Messvorgang
1.	Öffnen des Angiographie-Modus in der Cirrus-OCT-Software
2.	Auswählen der Größe des Scanareals
3.	Einstellen des gewünschten darzustellenden Skleraabschnittes (limbusnah) (ggf. durch Nachjustierung von Höhe und Entfernung zum OCT)
4.	Abziehen des Kammerwassers über eine Spritze am freien Dreiweghahnzugang
5.	Infusion der LE durch passendes Öffnen des Dreiweghahns
6.	Warten bis zur vollständigen Perfusion von Vorderkammer und Abflusswegen
7.	Ausschalten der automatischen <i>Eye-Tracking</i> -Funktion ²⁵

²³ Dies sollte unter Schonung von Bindehaut, Cornea und Sklera geschehen, um das Auge unbeschädigt in die Halterung einzupassen.

²⁴ Infolge des einwirkenden Unterdrucks beim Ansaugen kann dem Auge Flüssigkeit entzogen werden. Durch Einspritzen von PBS-Lösung über den Dreiweghahn in die Vorderkammer wird das Auge wieder praller und formstabiler.

²⁵ Die *Eye-Tracking*-Funktion dient im klinischen Alltag der Reduktion von Artefakten durch kleinste Augenbewegungen des Patienten, ist aber bei statischen Versuchsbedingungen nicht sinnvoll einzusetzen.

Nr.	Durchführungsschritt beim Messvorgang
8.	Starten eines Scanvorgangs über den Aufnahme-Button (ggf. Wiederholung bei unzureichender Signalstärke (Zielwert: $\geq 5/10$))
9.	Abspeichern der Messung in der Aufnahme-Domäne
10.	Öffnen der Analyse-Domäne
11.	Anpassen der Segmentierungsgrenzen auf den maximalen Bereich ²⁶
12.	Nutzung von Schnittbildnavigatoren zur Markierung der horizontalen Scanachse
13.	Abspeichern der Änderungen in der Analyse-Domäne

Das ausgewählte Scanareal hat eine maximale Größe von $6 \times 6 \text{ mm}^2$ und umfasst dabei grob einen Quadranten eines Auges. Eine Scanarealgröße von $3 \times 3 \text{ mm}^2$ ist ebenfalls möglich.

Um mehrere Scans in einem Messvorgang zu erhalten, können Punkt 7 – 9 in der Aufnahme-Domäne in einer Schleife wiederholt werden, bevor die weitere Bearbeitung in der Analyse-Domäne stattfindet. Dabei benötigt ein einzelner Scanvorgang (vom Start eines Scans bis zum nächstmöglichen Start) mindestens 18 Sekunden. In den Experimenten wurde in frühen Perfusionsphasen mindestens ca. alle 30 Sekunden, in späteren Phasen in Zeitabständen von bis zu drei Minuten eine Aufnahme erzeugt.

Im Anschluss an den Messvorgang wurden die Daten als Stapel (engl.: *stack*) von Bildern aus der Analyse-Domäne im Dateiformat *audio video interleave* (AVI) exportiert. Da eine OCTA-Software genutzt wurde, die für Aufnahmen im hinteren Augenabschnitt konzipiert ist, konnte in der Analyse-Domäne vorab zwischen verschiedenen Einstellungen (z. B. „Retina“, „Choroidea“ u. a.) gewählt werden. Diese Einstellungen sind für die experimentelle Anwendung im Vorderabschnitt nicht sinnvoll. Zur Vereinheitlichung wurde stets die Einstellung „Retina“ ausgewählt. Entscheidend ist jedoch, dass die Anpassung der Segmentierungsgrenzen ohnehin nachträglich manuell erfolgte und wie in Punkt 11 (s. o.) auf den maximalen Bereich eingestellt wurde. Ein exportierter Rohdatensatz bestand schlussendlich aus der Kombination von einem angiographischen *En-face*-Übersichtsbild und einem *Stack* von horizontalen B-Bildern, was in Kapitel 3.2.1 weiterführend erläutert wird.

In ersten Experimenten in der frühen Phase des Promotionsprojektes wurde noch auf das Spectralis-Gerät zurückgegriffen, da ein OCTA-Modus für den Vorderabschnitt (wie später beim Zeiss-Modell) zunächst noch nicht verfügbar war. Eine von der Firma Heidelberg Engineering zur Verfügung gestellte Software hat jedoch den Export von unbearbeiteten OCT-

²⁶ In der Retina-Diagnostik ist die Auswahl einer bestimmten Netzhautschicht wünschenswert. Das Programm ermöglicht dafür die manuelle Festlegung von Segmentierungslinien. Hier ist dies nicht sinnvoll einsetzbar, weshalb die Grenzen auf maximale Werte gesetzt werden, sodass keine Schichtsegmentierung erfolgte.

Scans ermöglicht, sodass eine Entwicklung von eigenen Angiographie-Algorithmen basierend auf den OCT-Rohdaten angestrebt werden konnte. Der entwickelte Algorithmus zur Extraktion des intravasalen Flüssigkeitssignals, wird in Kapitel 3.1 separat beschrieben. Zum Export der Roh-Video-Daten als zeitaufgelöste Scans wurde eine spezielle Version der Software Heidelberg Eye Explorer (Heyex) verwendet. Über den gekoppelten Computer erfolgte der Datenexport ebenfalls als *Stack* im AVI-Format. Eine automatische *Eye-Tracking*-Funktion sowie die oben beschriebene Analyse-Domäne mit Segmentierungsgrenzen und Schnittbildnavigatoren wie in der Zeiss-Software lagen nicht vor, sodass Punkt 7 und Punkt 10 – 13 (s. o.) hier nicht durchzuführen waren. Vor Messbeginn wurde das passende Objektiv für Messungen im Vorderabschnitt ausgewählt, allerdings bestand als großer Unterschied hier nicht die Möglichkeit der Nutzung eines Angiographie-Modus für den Vorderabschnitt, wie es durch den Einsatz der externen Linse beim Zeiss-OCT-Gerät der Fall war.

2.3.4 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der gewonnenen Rohbilddaten erfolgte unter Verwendung der Software Fiji Image J (Schindelin et al. 2012). So wurden ausgewählte Software-Befehle in selbst erstellte Makros implementiert, um vor allem folgende Modifikationen umzusetzen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Softwaregestützte Modifikationen bei der Bildbearbeitung.

Nr.	Durchgeführte Modifikation
1.	Auswahl eines bestimmten Einzelbildes aus einem <i>Stack</i>
2.	Auswahl eines gewünschten Bildausschnittes
3.	Reduktion von Artefakten durch Registrierung mehrerer Bilder eines <i>Stack</i>
4.	Optimierung von Helligkeits- oder Kontrasteinstellungen
5.	Erzeugen eines Mittelwerts-/Standardabweichungsbildes mittels Z-Projektion
6.	Zusammenfügen mehrerer Bilder zu einem gemeinsamen <i>Stack</i>
7.	Visualisierung von Scanachsen zur Orientierung im Bild
8.	Rekonstruktion eines vertikalen B-Bildes aus Daten eines horizontalen B-Bildes
9.	Automatisierung von Bearbeitungsschritten für mehrere Bilder eines Ordners

Da der Prozess zur Erzeugung geeigneter Bilder aus den exportierten OCT-Rohdaten einen elementaren Bestandteil der Projektarbeit darstellt, ist die Bildbearbeitung im Detail im Ergebnisteil aufgeführt. So wird die konkrete Abfolge der einzelnen Bildbearbeitungsschritte als Arbeitsprozess (engl.: *workflow*) in Abbildung 7 und Abbildung 8 grafisch dargestellt und in den Kapiteln 3.1 und 3.2.1 näher erläutert.

2.4 Histologische Vergleichspräparate

Zusätzlich zu den beschriebenen Bildgebungsversuchen wurden histologische Vergleichspräparate erstellt. Dazu wurde in die Vorderkammer der enukleierten Schweineaugen 0,4-prozentige Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) gespritzt, sodass sich das Kammerwassersystem von der Vorderkammer bis in episklerale Venen mit der Flüssigkeit gefüllt und die Außenwände angefärbt hat. Danach wurden aus dem Gewebe am Übergang zwischen Cornea und Sklera keilförmige Präparate ausgeschnitten. Diese Stücke wurden einzeln in auf Glycerin basierendem Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Pijn, Niederlande) fixiert, schockgefroren und schließlich in Kryoschnitte mit einer Dicke von ca. 18 μm geschnitten. Die entstandenen histologischen Dünnschnitte wurden auf Objektträger (Menzel-Gläser SUPERFROST, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und anschließend mithilfe eines Leica S6D-Auflichtmikroskops (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und einer angeschlossenen Leica DFC420 C-Kamera (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf weißem Hintergrund abgelichtet. Die Fotografie erfolgte sequenziell, also in anatomischer Reihenfolge der Schnitte. Die Bildbearbeitung wurde unter Einsatz der Software Fiji Image J (Schindelin et al. 2012) durchgeführt. Das Trypanblau-Signal wurde extrahiert, indem nach Aufspaltung in RGB-Farben das blaue Signal vom roten subtrahiert wurde. Nach Helligkeitsnormierungen, Registrierung und Reduktion des Hintergrundrauschens mittels 3D-Median-Filter wurde zur 3D-Rekonstruktion des Gefäßsystems für einen *Stack* aus 23 Dünnschnitt-Bildern desselben Ursprungsausschnitts das *Volume Viewer Plugin* verwendet.

2.5 ICG-basierte Bildgebung des Kammerwasserabflusses

Darüber hinaus wurden Versuche mit dem fluoreszierenden Farbstoff Indocyaningrün (ICG) durchgeführt. Anders als bei der klassischen ICG-Angiographie²⁷ wurde bei den Vergleichsexperimenten der Farbstoff in die Vorderkammer injiziert. Dies erfolgte analog zu dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Ablauf, bei gleichem Setup und unter möglichst identischen Versuchsbedingungen an einem Scanning-Laser-Ophthalmoskop (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit einer 30°-Netzhaut-Optik. Es wurde die ICG-Lösung des Diagnostikums Verdye 5 mg/ml (Diagnostic Green GmbH, Aschheim-Dornach, Deutschland) verwendet. Das Fluoreszenzsignal liegt im Nahinfrarotbereich und wird vom Gerät registriert. Pro Region wurden neun Aufnahmen generiert und zeitlich gemittelt.

²⁷ Die ICG-Angiographie ist ein bildgebendes Verfahren zur Visualisierung von retinalen und choroidalen Blutgefäßen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff ICG als intravenöses Kontrastmittel genutzt.

3 Ergebnisse

Zur erfolgreichen Umsetzung des Projektvorhabens erfolgten Messungen mit dem Ziel, OCT-Aufnahmen zu erzeugen, in denen die LE im Kontrast zur Umgebung dargestellt werden können. Dabei wurde in der frühen Versuchsphase in Ermangelung einer Vorderabschnitt-OCTA-Einheit auf das Spectralis-Gerät zurückgegriffen. Mit einer vom Hersteller Heidelberg Engineering zur Verfügung gestellten Software wurden zeitaufgelöste OCT-Rohdaten erfasst, aus denen mithilfe selbstentwickelter Algorithmen die Angiographie-Daten extrahiert wurden, was im folgenden Kapitel 3.1 beschrieben wird. Im weiteren Verlauf wurde unserer Arbeitsgruppe von der Firma Zeiss für das Cirrus 5000-System ein Prototypen-Linsenset zur Verfügung gestellt, mit dem die im Gerät vorhandene OCTA-Funktion auch für Vorderabschnitt-Aufnahmen am Schweineauge nutzbar wurde. Diese technische Lösung war gegenüber der selbstentwickelten Datenanalyse deutlich sensitiver und weniger artefaktanfällig. Daher erfolgte während des laufenden Projekts ein Wechsel zur Zeiss-Technologie, mit welcher alle maßgeblichen Daten dieser Arbeit erhoben wurden. Da aber die Entwicklung eines eigenen Angiographie-Algorithmus ursprünglich einen Hauptteil des Projekts ausmachte und dieser fertiggestellt wurde, ist er im Kapitel 3.1 im Detail dargestellt, auch wenn er im späteren Teil der Arbeit nicht mehr zur Datenerhebung verwendet wurde.

Mit der Möglichkeit, die externe Vorderabschnittslinse und somit den Angiographie-Modus der Firma Zeiss zu nutzen, konnten die in Kapitel 3.2 beschriebenen LE-basierten OCTA-Aufnahmen am Cirrus HD-Modell generiert werden. In den Kapiteln 3.3 und 3.4 werden letztere mit Bildern aus der histologischen Präparation bzw. der ICG-Bildgebung verglichen. Eine Maßnahme zur Verbesserung der Bildqualität der LE-basierten OCTA-Bilder wird ergänzend in Kapitel 3.5 vorgestellt.

Begleitend ergab sich als große Herausforderung die Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaus, mit dem die Modellaugen *ex vivo* vor einem OCT-System positioniert und die Lipidemulsionen infundiert werden konnten. Der Prozess unterlag, insbesondere in der Anfangsphase, vielen Überlegungen und Veränderungen und repräsentiert in seiner endgültigen Version bereits ein Ergebnis dieser Promotionsarbeit.

3.1 LE-Detektion im Schweineauge am Spectralis-OCT-System

Enukleierte Schweineaugen wurden in der Versuchshalterung vor einem Spectralis-Gerät positioniert (vgl. Kapitel 2.2 und 2.3.2). Durch die Nutzung der speziellen Heyex-Software

wurde die Erzeugung von zeitaufgelösten Schnittbildern der limbusnahen Sklera ermöglicht. Die Rohbilddaten wurden exportiert und anschließend softwaregestützt bearbeitet.

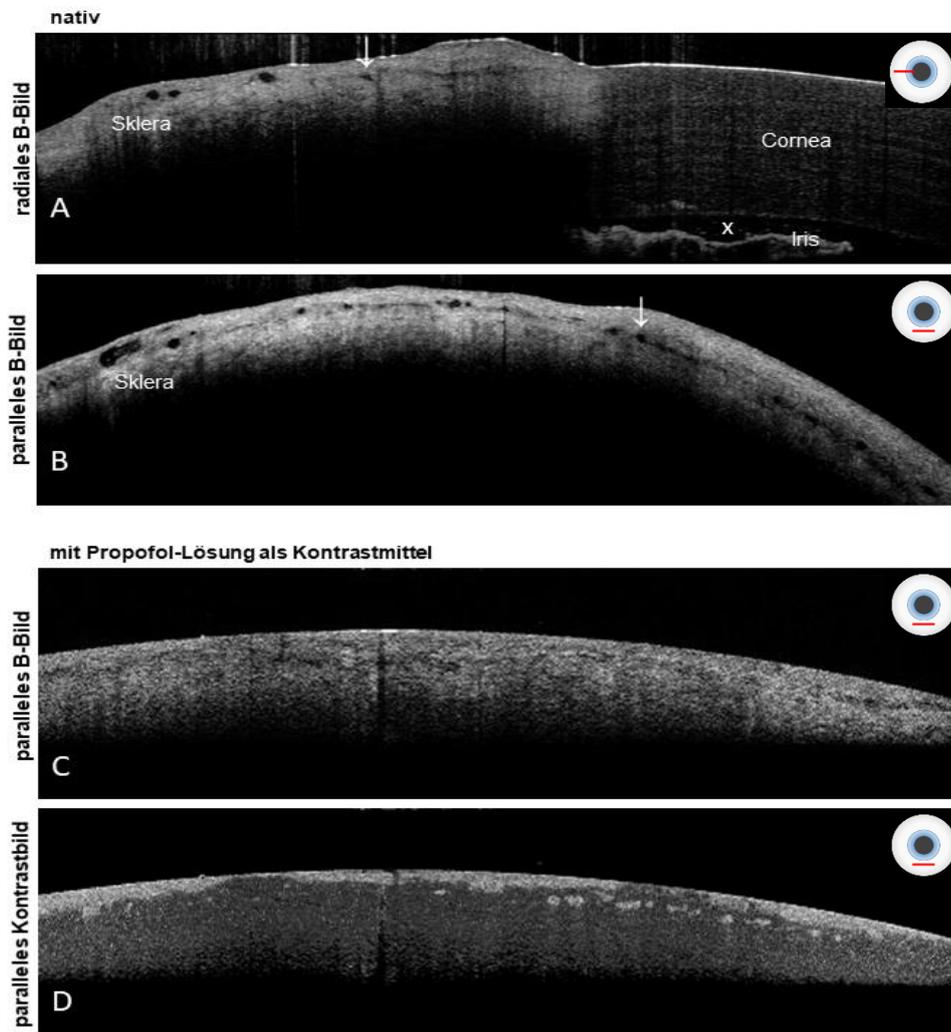


Abbildung 6: Detektion von Kammerwassergefäßen mittels OCT an Schweineäugen.

In den nativen Aufnahmen ohne Kontrastmittel (**A** – **B**) sind innerhalb der signalreichen Sklera einige Gefäße als kleine, signalarme Areale erkennbar (exemplarisch mit ↓ markiert). Dabei sind im radialen B-Scan (**A**) neben der Sklera auch Teile der Cornea, der Vorderkammer (mit x markiert) und der Iris am rechten Bildrand zu sehen, während im limbusparallelen B-Scan (**B**) nur Skleragewebe angeschnitten ist.

Nach Perfusion der Vorderkammer mit einer Propofol-Lösung füllen sich auch die intraskleralen Gefäße mit der LE (**C**). Diese sind in der statischen Kontrastmittel-Aufnahme deutlich schlechter zu identifizieren als im Nativbild. Durch eine zeitliche Fluktuation der LE in den Gefäßen lässt sich das Propofol-Signal jedoch aus einem *Stack* von Aufnahmen über die Zeit (**C**) durch Z-Projektion der Standardabweichung extrahieren und als heller Kontrast gegenüber dem Skleragewebe darstellen (**D**).

Die Aufnahmen **A** und **B** sowie **C** und **D** gehören jeweils zu demselben Auge. Zur Orientierung sind in je einem Augensymbol am Bildrand die ungefähren Scanpositionen durch rote Linien markiert.

Im Ergebnis entstanden die nativen Aufnahmen ohne Kontrastmittel aus Abbildung 6, in denen das Gewebe entweder radial mit Einbezug von Cornea und Iris (siehe Abbildung 6A) oder parallel zum *Limbus* innerhalb der Sklera (siehe Abbildung 6B) angeschnitten wurde.

In diesen Bildern lassen sich intrasklerale Gefäße als dunkle, d. h. signalarme Areale identifizieren. Nach Perfusion der Vorderkammer mit der Propofol-Lösung füllten sich auch die distalen Kammerwasserabflusswege und damit die intraskleralen Venen. Dies zeigt sich in den Aufnahmen daran, dass zuvor signalarme Areale nun signalreich erschienen und damit kaum von der umgebenden Sklera abzugrenzen waren (siehe Abbildung 6C, vgl. Abbildung 6B). Im zeitlichen Verlauf war erkennbar, dass die Signalintensität der LE in den Gefäßen stark fluktuierte. Sie besaß also im Bereich der Gefäße eine große Standardabweichung, während die Standardabweichung in der statischen Umgebung deutlich kleiner war (vgl. Kapitel 1.3.4).

Diese Eigenschaft wurde zur Erzeugung eines Kontrastbildes ausgenutzt (siehe Abbildung 6D). So wurde an jeder Pixelposition die Standardabweichung aus allen zeitlich aufeinanderfolgenden Bildern eines Stapels gebildet und grafisch dargestellt. In einem entstandenen Kontrastbild werden Areale mit großer Standardabweichung hell, Bereiche mit kleiner Standardabweichung dunkel wiedergegeben.

Schlussfolgernd lässt sich durch die gewonnenen Bilder in Abbildung 6 nachweisen, dass sich durch Verwendung von Propofol-Präparaten prinzipiell die intraskleralen Gefäße als Teil des Kammerwasserabflusssystem darstellen lassen. Es zeigt sich, dass LE auch innerhalb eines Gewebes ein zeitlich stark fluktuierendes OCT-Signal erzeugen, welches identifiziert und von der Umgebung abgegrenzt werden kann. Damit können LE wie Propofol-Lösungen auch in *Ex-vivo*-Experimenten grundsätzlich als OCT-Kontrastmittel fungieren. Im Nativbild sind die Gefäße leichter zu identifizieren. Durch den Kontrastmitteleinsatz und die anschließende Bildanalyse lassen sich die Gefäße jedoch extrahieren und deren Verlauf prinzipiell verfolgen.

Um die in Abbildung 6 gezeigten Bilder zu erzeugen, bedurfte es der nachträglichen Analyse der vom OCT-System generierten Rohbilddaten, was mithilfe der Fiji Image J-Software durchgeführt wurde. Die einzelnen Bearbeitungsschritte sind als Arbeitsprozess (engl.: *workflow*) in Abbildung 7 dargestellt. Als Ausgangspunkt diente jeweils ein zeitaufgelöster *Stack* im AVI-Format (siehe Abbildung 7A). Dass es sich um mehrere, zeitlich aufeinanderfolgende Bilder handelt, ist an der Fortschrittsleiste am unteren Bildrand zu erkennen. Zur zusätzlichen Veranschaulichung sind die Bilder eines *Stack* als Gruppe versetzt hintereinander angeordnet.

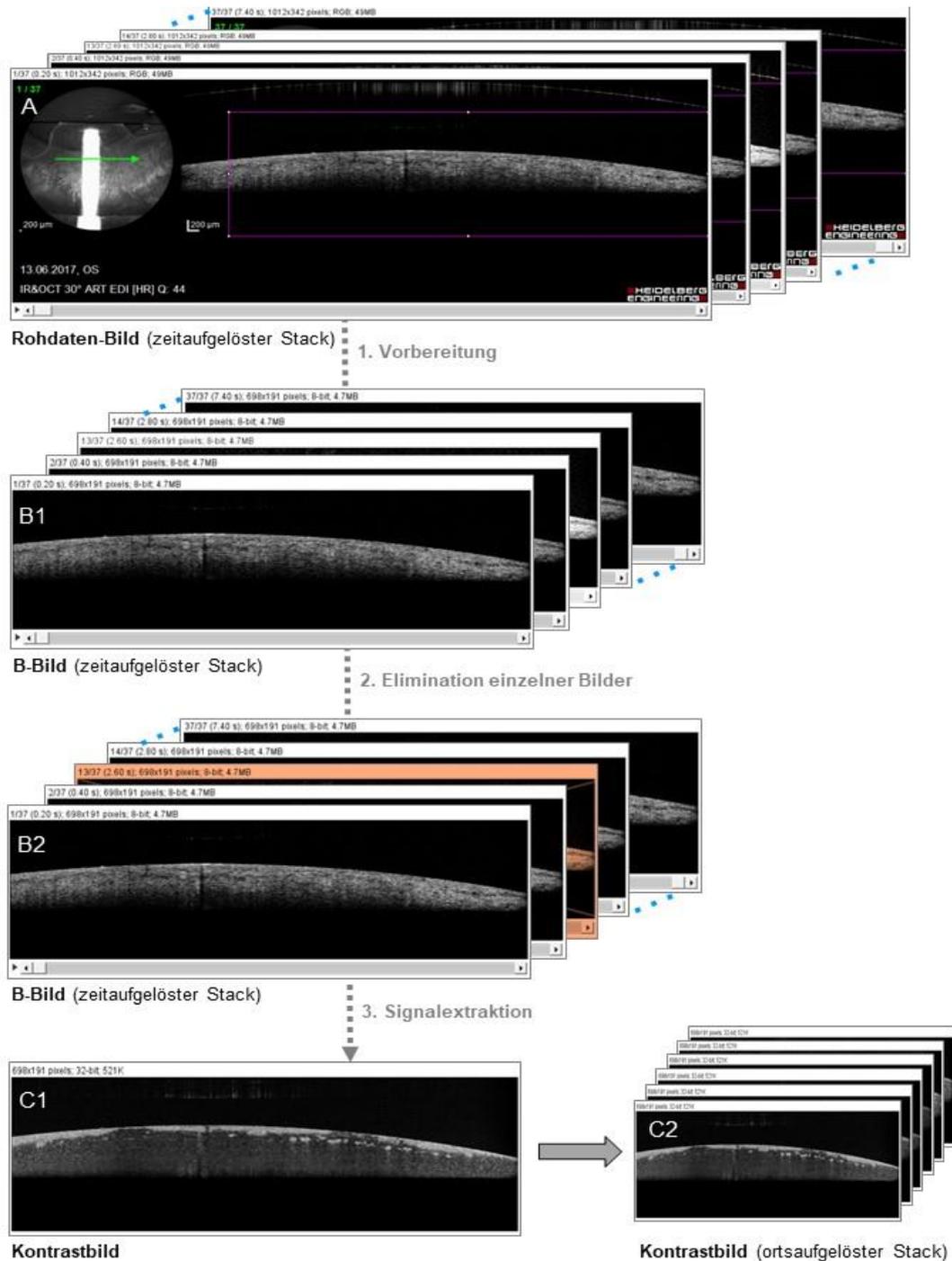


Abbildung 7: *Workflow* zur LE-Detektion am Spectralis-OCT-Gerät.

Der exportierte Rohdatensatz (A) ist ein zeitaufgelöster *Stack* aus Kombinationsbildern. Jedes Einzelbild zeigt die klassische OCT-Schichtaufnahme zu einem Zeitpunkt. Zusätzlich ist am linken Bildrand die Scanposition am Auge zu sehen. (1.) Zur Vorbereitung gehört das Festlegen des Bildtyps auf Graustufen (8-bit), die Auswahl des Bildausschnittes (durch magentafarbenes Rechteck angedeutet) und die Registrierung der Bildfolge zur Reduktion von Bewegungsartefakten. Nach Durchführung dieser Schritte entsteht der zeitaufgelöste *Stack* aus reinen B-Bildern (B1). (2.) Anschließend erfolgt die Elimination von sehr hellen (beispielhaft rötlich eingefärbt) oder sehr dunklen Bildern (B2). (3.) Die Extraktion des LE-Signals ist mittels Z-Projektion möglich. So wird die zeitliche Standardabweichung der B-Bilder als Kontrastbild grafisch dargestellt (C1). Wiederholt man diesen Vorgang für Rohdatensätze an aufeinanderfolgenden Scanpositionen, lässt sich durch Zusammenfügen ein ortsaufgelöster *Stack* aus Kontrastaufnahmen erzeugen (C2).

Ein Einzelbild eines Rohdaten-*Stack* ist eine Kombination aus einem klassischen OCT-Schnittbild und einem kreisrunden Foto am linken Bildrand, in dem ein Maßstab und die Scanposition am Auge gekennzeichnet sind. In der ersten Phase der Nachbearbeitung wurde das Bild auf konstant gesetzte Maße zugeschnitten (siehe rechteckige Markierung in Abbildung 7A und Abbildung 7B1) und der Bildtyp auf 8-bit-Graustufen festgelegt. Anschließend erfolgte durch Anwendung des Plug-ins *StackReg* die Registrierung des Bildstapels zum Ausgleich von vorliegenden Bewegungsartefakten, welche beispielsweise infolge räumlicher Schwingungen auftreten können. Das Zwischenergebnis ist durch Abbildung 7B1 repräsentiert. Aufgrund von starken Helligkeitsschwankungen innerhalb eines *Stack* erfolgte die Elimination einzelner sehr heller oder sehr dunkler Bilder. Hierzu wurde ein Macro konzipiert, mithilfe dessen alle Bilder entfernt werden, deren Gesamthelligkeit ein festgelegtes Minimum oder Maximum unter- bzw. überschreitet. Außerdem wurde durch das Macro automatisch die Bildhelligkeit aller Bilder normiert. Beispielhaft ist die Elimination eines sehr hellen B-Bildes dargestellt (vgl. Abbildung 7B1 und Abbildung 7B2).

Die eigentliche Darstellung des LE-Signals erfolgte durch die Bildung der Standardabweichung über alle Bilder eines *Stack* mittels Z-Projektion. Dadurch wird die LE als heller Bereich im Kontrast zur Umgebung und der Verlauf der Gefäße innerhalb der Sklera sichtbar (siehe Abbildung 7C1).

Die Schritte A – C1 können mit Durchrastern durch eine Probe für verschiedene Scanpositionen wiederholt werden. Die so entstehende Abfolge von Kontrastaufnahmen kann zu einem neuen Stapel von Bildern zusammengefügt werden, welcher dann orts aufgelöst ist (siehe Abbildung 7D). Im Anschluss ist dann erneut eine Registrierung des neuen *Stack* durchzuführen, um Bildbewegungen zu eliminieren.

Als Problem während der Messungen zeigte sich eine Leckage der Propofol-Flüssigkeit, wodurch sich ein störender Film an der Skleraoberfläche bildete. Außerdem traten neben zeitlichen Helligkeitsschwankungen innerhalb eines *Stack* auch Unterschiede in der Gesamthelligkeit zwischen verschiedenen Rohbildsequenzen auf.

3.2 LE-basierte OCTA am Cirrus HD-OCT-System

Aus den vorangegangenen Experimenten hat sich ergeben, dass LE wie Propofol-Mischungen *ex vivo* ein in der Intensität zeitlich variables Signal erzeugen, welches mittels Standardabweichung detektiert werden kann (vgl. Kapitel 1.3.4). Da ein ähnliches Grundprinzip auch in

der OCTA zur Identifizierung von Blutgefäßen zum Tragen kommt (vgl. Kapitel 1.2.3), schien es sinnvoll, direkt auf die OCTA-Technik zurückzugreifen. Diese ist bisher allerdings nicht für den vorderen Augenabschnitt etabliert, geschweige denn kommerziell verfügbar. Allerdings wurde von der Firma Zeiss ein Prototyp einer Linse zur Verfügung gestellt, die als Vorderabschnittsmodul für die OCTA dienen konnte. Damit waren die geplanten *Ex-vivo*-Versuche an enukleierten Schweineaugen unter Einsatz eines Zeiss Cirrus 5000-OCT-Gerätes realisierbar.

3.2.1 Bilderzeugung aus den OCTA-Rohbilddaten

Die mithilfe der Vorderabschnittslinse und der OCTA-Technik vom Gerät generierten Rohbilddaten wurden nachträglich mit der Fiji Image J-Software bearbeitet. So konnten die in den nachfolgenden Kapiteln gezeigten Bilder erzeugt werden, welche in ihrer Entstehung, Aufbereitung und Präsentation neuartig sind. Der Arbeitsprozess zur Gewinnung dieser gewünschten Bilder ist in Abbildung 8 veranschaulicht²⁸.

Ausgangspunkt hierfür war stets eine Kombination aus einem angiographischen 2D-Übersichtsbild und einem *Stack* von 175 horizontalen B-Scans, welche durch Rasterung durch das Scanareal entstanden (siehe Abbildung 8A) (vgl. Kapitel 1.2.1). Durch Festlegung einer bestimmten Scanposition, das heißt Auswahl einer der 175 Schichten, und durch nachträgliches Zuschneiden ergab sich sowohl aus dem zweidimensionalen Übersichtsbild das sog. *En-face*-Bild als auch aus dem *Stack* das jeweilige horizontale B-Bild (siehe Abbildung 8B1 – D1 bzw. Abbildung 8B2 – D2).

Zusätzlich konnte aus dem Rohdaten-*Stack* der 175 horizontalen B-Bilder durch *Reslicing* ein *Stack* aus 430 transversalen B-Bildern rekonstruiert werden (Abbildung 8B3 – C3). Durch Auswahl einer Scanschicht, Skalierung und Zuschneiden ergibt sich ein einzelnes transversales B-Bild (siehe Abbildung 8D3).

Die Schichtanzahl pro *Stack* steht in direktem Zusammenhang mit der Bildgröße der unskalierten Rohbilder. So hat ein *En-face*-Bild die Maße von 430x430 Pixel (175 Schichten), ein horizontales B-Bild von 430x284 Pixel und ein transversales B-Bild von 175x284 Pixel.

²⁸ Zur besseren Übersichtlichkeit ist ein *Stack* hier nur noch an der Fortschrittsleiste unterhalb des Bildes zu erkennen und nicht mehr zusätzlich durch eine Bildfolge visualisiert.

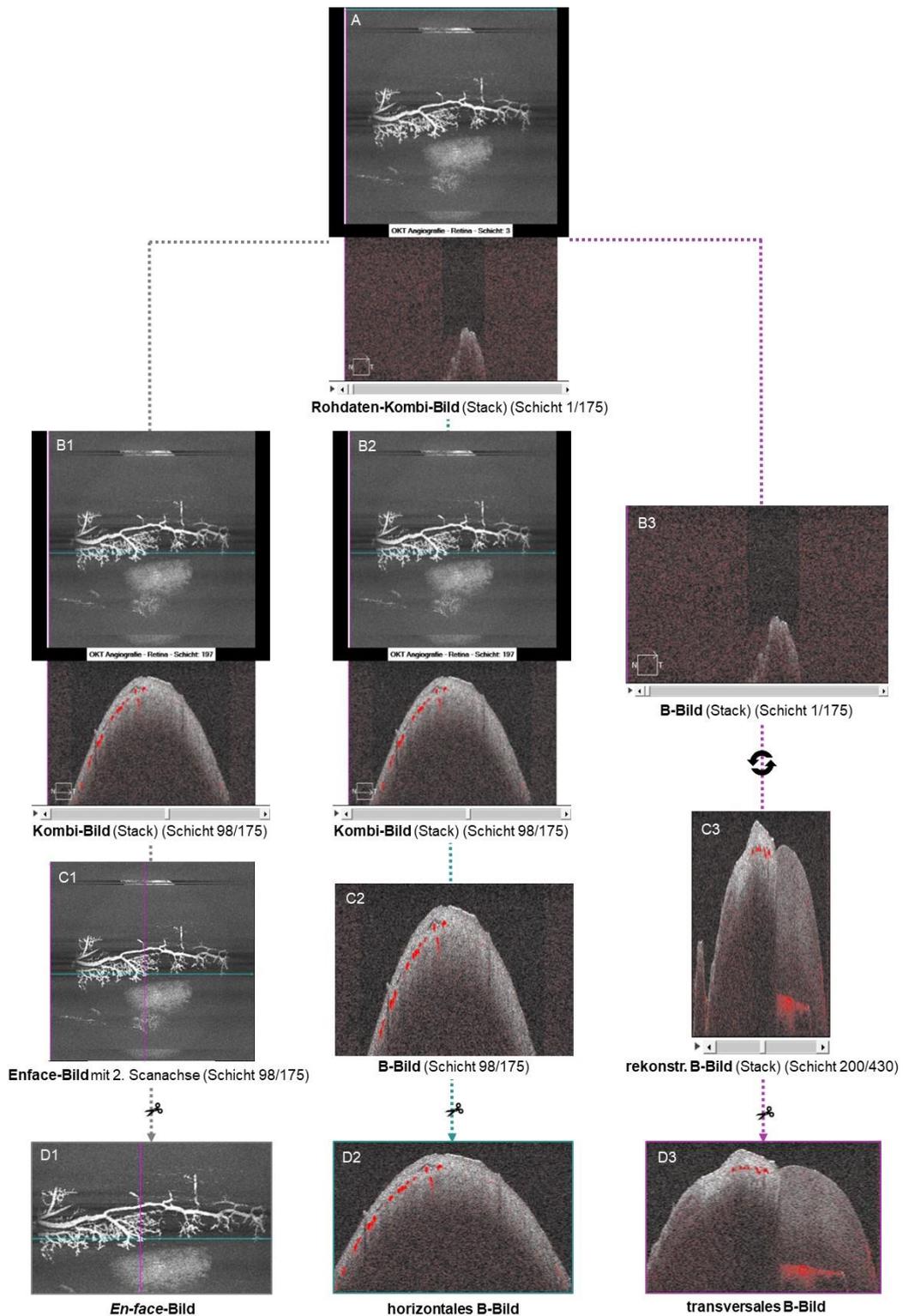


Abbildung 8: Workflow zur Bilderzeugung am Cirrus HD-OCT-Gerät.

Aus einem Ausgangsdatensatz (A) bestehend aus einer Übersichtsaufnahme und einem *Stack* von 175 horizontalen B-Bildern kann durch verschiedene Bearbeitungsschritte (wie B1, C1, B2, C2, B3, C3) zu jedem Scanvorgang je ein *En-face*-Bild (D1), ein paralleles B-Bild (D2) und ein radiales B-Bild (D3) gewonnen werden. Ein *Stack* und dessen Position ist durch die Fortschrittsleiste am unteren Bildrand gekennzeichnet.

Die *En-face*-Aufnahme visualisiert den Gefäßverlauf im Sinne einer Aufsicht auf das Scanareal in zwei Dimensionen. Dazu wird durch Orthogonalprojektion das LE-Signal aus allen drei Raumdimensionen in einer zweidimensionalen Ebene als heller Kontrast abgebildet. Jeder Rasterungsposition im *En-face*-Bild kann ein horizontaler B-Scan zugeordnet werden, was durch die türkisfarbene Linie gekennzeichnet ist. Die magentafarbene Linie wurde zur Markierung der korrespondierenden Lage eines transversalen B-Scans nachträglich eingezeichnet. Zur Bestimmung dieser Position in der *En-face*-Darstellung ist die Kenntnis der o. g. Bildmaße essenziell.

Die B-Bilder sind eine Überlagerung vom klassischen B-Scan der OCT in Graustufen mit dem LE-Signal, was in Analogie zu Abbildung 6 einer Kombination aus Abbildung 6C und Abbildung 6D entspricht. Das Kontrastmittelsignal wird hierzu mithilfe der OCTA-Algorithmen registriert und automatisch vom OCT-Gerät rot hervorgehoben. Somit liefern die B-Bilder nicht nur Informationen über die Gewebearchitektur in der Tiefe, sondern auch über die Anordnung der kontrastmittelgefüllten Strukturen. Die zwei verschiedenen B-Scans sind senkrecht zueinander orientiert. Das Bild entlang der horizontalen Achse entstand direkt, das Bild entlang der transversalen Achse musste rekonstruiert werden. In Abhängigkeit von der Lage des Scanareals am Auge liegt eine Achse annähernd limbusparallel, während die andere Achse eher radial (von der Pupille nach außen weg) verläuft und somit Sklera und Cornea in einer Ebene anschneidet. Im Folgenden wird deshalb stets die Bezeichnung paralleles oder radiales Bild verwendet.

3.2.2 Zeitaufgelöste LE-basierte OCTA

Für die folgenden Ergebnisse wurden enukleierte Schweineaugen nach dem in den Kapiteln 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Verfahren unter Einsatz eines Cirrus HD 5000-OCT-Modells untersucht und die Bilddaten wie vorab beschrieben bearbeitet. Die neu gewonnenen OCT-Aufnahmen aus Abbildung 9 bekräftigen die bereits in Kapitel 3.1 formulierte Annahme, dass die Darstellung von Kammerwassergefäßen durch den Einsatz von Propofol-Präparaten als OCT-Kontrastmittel auch *ex vivo* möglich ist. Es zeigt sich, dass der hierzu gewählte Versuchsaufbau geeignet ist. Zudem kann nachgewiesen werden, dass das fluktuierende Sig-

nal der LE unter Ausnutzung der OCTA-Technik extrahiert werden kann. Zu einem bestimmten Perfusionszeitpunkt t konnte ein *En-face*-Bild mit je zwei zugehörigen B-Scans gewonnen und so der Verlauf und die Tiefe der beteiligten Gefäße beurteilt werden.

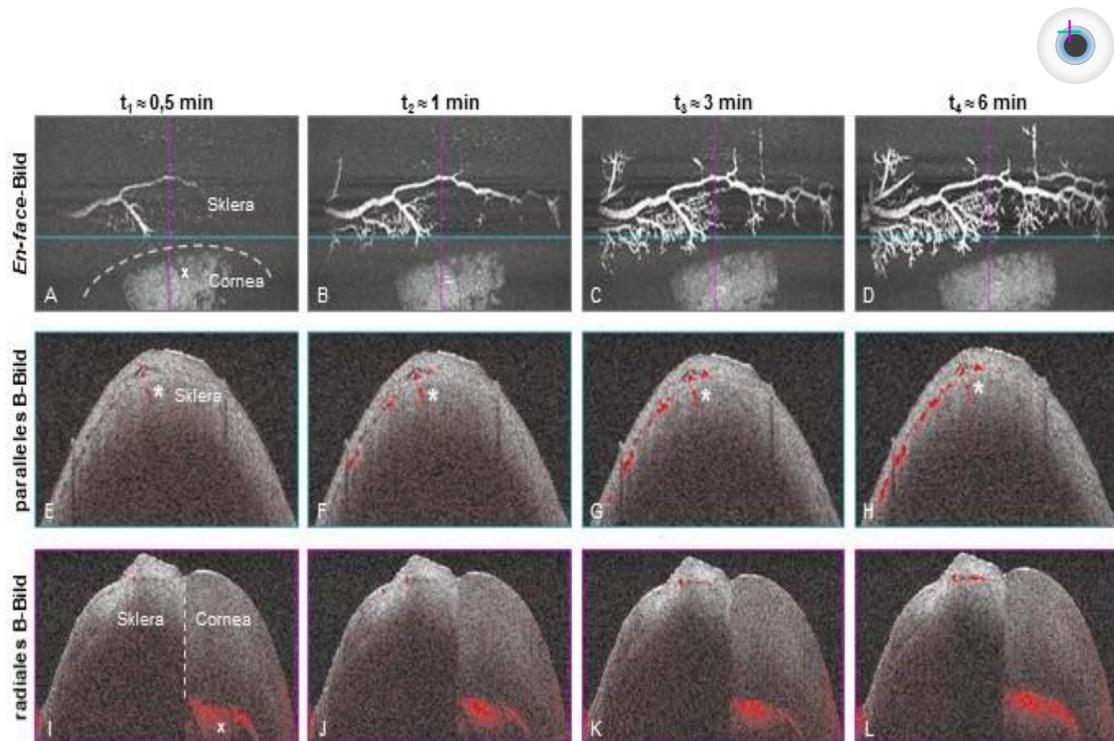


Abbildung 9: Zeitaufgelöste LE-basierte OCTA an Schweineaugen.

Der Einstrom der LE kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten $t_1 - t_4$ im Bereich des corneoskleralen Übergangs (als gestrichelte Linie markiert) bis in distale Regionen des Kammerwasserabflusses verfolgt werden. Dabei ist in den *En-face*-Darstellungen (**A – D**) das LE-Signal als heller Kontrast gegenüber der dunklen Umgebung zu erkennen. Die klassischen OCT-B-Scans (**E – L**) stellen das Gewebe als Schnittbilder in Graustufen dar und liefern die zugehörigen Tiefeninformationen. Die in den Gefäßen fluktuierende LE wird durch OCTA-Analyse detektiert (rot hervorgehoben). Die LE wurde vor Beginn der Aufnahmen in die Vorderkammer (in **A** und **I** exemplarisch mit **x** markiert) perfundiert. Über ein größeres Kammerwassergefäß (mit ***** markiert) drainiert sie in einen oberflächlichen intraskleralen Venenplexus.

Die Position der limbusparallelen B-Bilder (**E – H**) und radialen B-Bilder (**I – L**) wird als türkis- bzw. magentafarbene Linie in den *En-face*-Aufnahmen gekennzeichnet. Zur zusätzlichen Orientierung ist in einem Augensymbol am Bildrand die ungefähre Scanposition durch die zwei Scanachsen markiert.

(Abbildung in ähnlicher Form veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

Neben den Machbarkeitsnachweisen lieferten die Aufnahmen auch bereits Informationen über das untersuchte Kammerwassersystem an sich. So zeigte sich in den zeitaufgelösten Aufnahmen von Abbildung 9, dass im Schweineauge anscheinend einige wenige größere Kammerwassergefäße existieren, die aus der Tiefe kommen (in Abbildung 9E – H mit ***** markiert) und dann weiter in Gefäße innerhalb der Sklera drainieren. Da im Vorfeld nur die

Vorderkammer (in Abbildung 9A und Abbildung 9I mit x markiert) mit dem LE-Kontrastmittel befüllt wurde, müssen diese vereinzelt größeren Gefäße in irgendeiner Weise dem Kammerwinkel, also vermutlich dem *angular aqueous plexus* (vgl. Kapitel 1.1.4), entspringen.

Trotz der Nähe zur Vorderkammer konnte jedoch bisher nicht beobachtet werden, dass ein größeres Gefäß direkt aus dieser entspringt. Es wird unsererseits davon ausgegangen, dass in dieser Phase eine vollständigen Füllung des gesamten Abflusssystems vorlag. Von den einzelnen Gefäßen aus spannt sich schließlich ein feines juxtalimbales Gefäßnetzwerk auf (Abbildung 9H,L). An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Sklera und damit die darin liegenden Kammerwasserabflussstrukturen nicht vollständig beurteilt werden konnten, da die maximal erzielbare Scantiefe ungefähr eine halbe Skleradicke beträgt (siehe Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 12 und Abbildung 13.)

3.2.3 LE-basierte OCTA in späten Perfusionsphasen

In Abbildung 10 werden die Bilder von vier unterschiedlichen Schweineaugen jeweils in einer späten Perfusionsphase nach fünf bis sechs Minuten bei einem Perfusionsdruck von ca. 10 mmHg gegenübergestellt. Die gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Darstellung des Kammerwassersystems mit dem gewählten Versuchsverfahren reproduzierbar an verschiedenen Schweineaugen möglich ist und sich bei allen ein ähnliches Drainagenetzwerk identifizieren lässt.

Zum Kammerwasserabfluss beim Schwein lässt sich ergänzen, dass anscheinend alle Venen des Netzwerkes in derselben Skleratiefe liegen, also dem gleichen oberflächlichen Plexus angehören (siehe Abbildung 10E – L). Dies stellt einen anatomischen Unterschied zum menschlichen Auge dar, bei dem es sowohl einen tiefen als auch einen oberflächlichen venösen Plexus gibt (vgl. Kapitel 1.1.2). Zudem scheint das Netzwerk am corneoskleralen Übergang blind zu enden (siehe Abbildung 10A – D und Abbildung 10I – L bzw. Abbildung 9D und Abbildung 9L). Eine Verbindung zur Vorderkammer ist nicht erkennbar. Ob und wenn wohin die Gefäße des Netzwerkes noch weiter vordringen, bleibt unklar. Des Weiteren präsentiert sich das Gefäßnetzwerk teils dichter (siehe Abbildung 10C, G, K und Abbildung 10D, H, L) und teils weniger dicht verzweigt (siehe Abbildung 10A, E, I und Abbildung 10B, F, J). Diese Verteilungsmuster können entweder regional-segmental (vgl. Kapitel 1.3.2) oder schlicht interindividuell anatomisch verschieden sein.

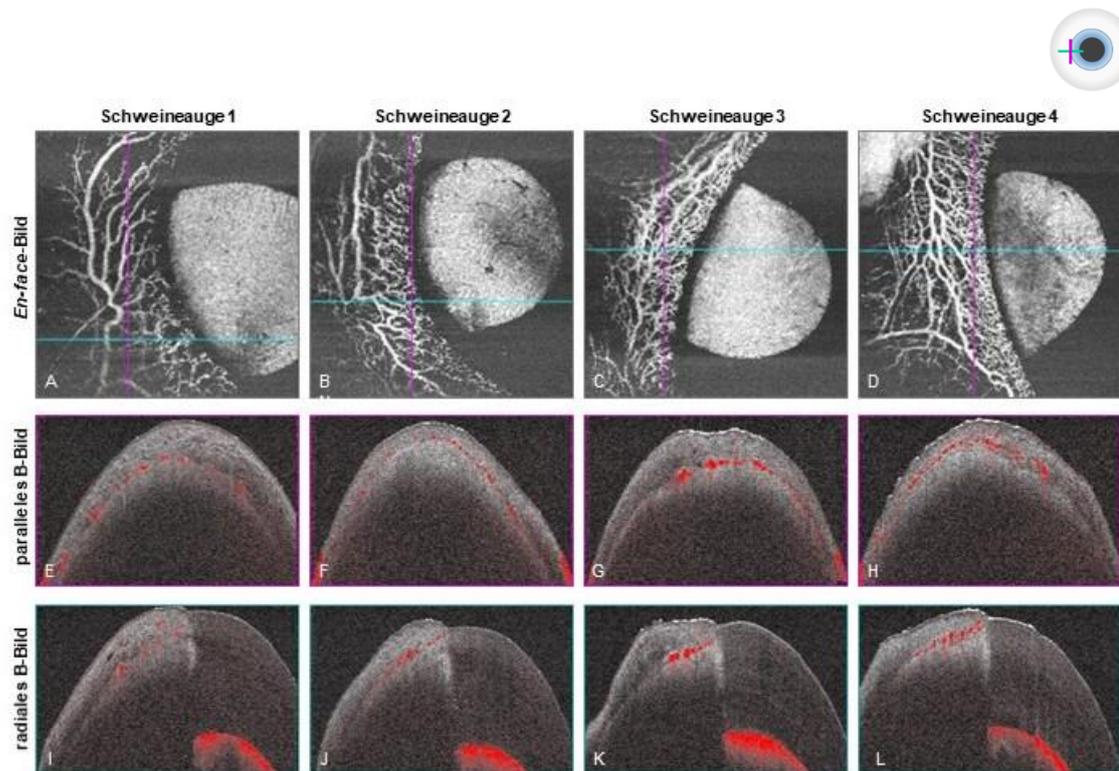


Abbildung 10: LE-basierte OCTA in späten Perfusionsphasen an Schweineaugen.

In den *En-face*-Darstellungen (A – D) lässt sich in vier verschiedenen Schweineaugen nach einer Perfusionszeit von 5 – 6 Minuten ein ähnliches Kammerwassernetzwerk erkennen. Die limbusparallelen (E – H) sowie radialen B-Bilder (I – L) zeigen, dass dessen Gefäße in einer Ebene in gleicher Tiefe innerhalb der Sklera liegen.

Die Position der limbusparallelen B-Bilder (E – H) und radialen B-Bilder (I – L) wird als magenta- bzw. türkisfarbene Linie in den *En-face*-Aufnahmen gekennzeichnet. Zur zusätzlichen Orientierung ist in einem Augensymbol am Bildrand die ungefähre Scanposition durch die zwei Scanachsen markiert.

(Abbildung in ähnlicher Form veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

3.3 Vergleich mit einem histologischen Sklerapräparat

Um die Schlussfolgerungen aus Abbildung 9 und Abbildung 10 über die bis dato unbekannt Details zur Anatomie der Kammerwassergefäße im Schweineauge zu überprüfen, schien es erstrebenswert, die Strukturen des Kammerwassersystems an histologischen Präparaten zu untersuchen. Deshalb wurde die Vorderkammer eines enukleierten Schweineauges mit Trypanblau gefüllt, um die Wände der kammerwasserführenden Strukturen bläulich anzufärben. Anschließend wurde das Skleragewebe nahe des *Limbus*, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, bearbeitet und in dünne Kryoschnitte im Mikrometerbereich zerteilt. Durch eine anschließende softwaregestützte Bildbearbeitung ergaben sich die Darstellungen in der folgenden Abbildung 11.

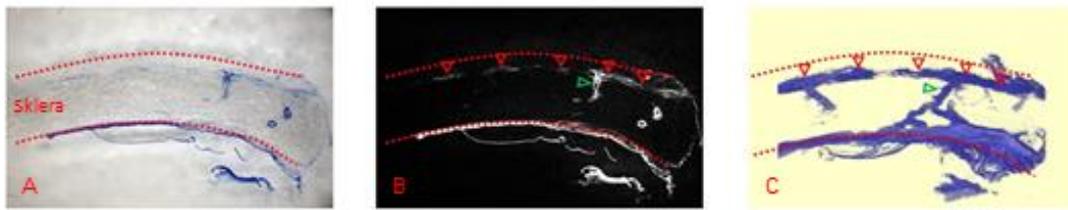


Abbildung 11: Darstellung des Kammerwassergefäßsystems im Sklerapreparat.

Alle Abbildungen (A – C) zeigen parallel zum *Limbus* angeschnittenes Skleragewebe nahe des corneoskleralen Übergangs nach Infusion von Trypanblau in die Vorderkammer eines enukleierten Schweineauges. In der nativen lichtmikroskopischen Aufnahme (A) des Kryoschnitts sind die Wandstrukturen der perfundierten Kammerwasserwege blau angefärbt sichtbar. Für die bearbeitete Aufnahme (B) wurde das lichtmikroskopische Blausignal extrahiert und hell abgebildet, wodurch sich die Gefäße eines oberflächlichen Venenplexus (mit roten ∇ markiert) stärker abzeichnen. Durch Überlagerung, d. h. genauer gesagt 3D-*Rendering*, des Trypanblau-Signals von 23 aufeinanderfolgenden Kryoschnitten ergibt sich die rekonstruierte Darstellung eines Volumens (C), analog zu einer Skleraschicht mit einer Dicke von ca. 400 µm. Die mit Trypanblau gefüllten Strukturen des Kammerwassersystems treten deutlich hervor. Es zeigen sich Gefäße (mit grünem ▷ markiert), die direkt aus der Vorderkammer bzw. dem Kammerwinkel entspringen und zum oberflächlichen Venenplexus ziehen.

Ergänzend sind die äußere Begrenzung und die an die Vorderkammer angrenzende innere Wand der Sklera gekennzeichnet (rote gepunktete Linie). Zur zusätzlichen Orientierung ist in einem Augensymbol am Bildrand die ungefähre Schnittposition durch eine rote Linie markiert.

(Abbildung veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

Die angefertigten histologischen Sklerapreparate lassen ebenfalls den Rückschluss zu, dass anscheinend lediglich ein oberflächlicher und nicht wie beim Menschen zusätzlich ein tiefer Venenplexus existiert. Außerdem finden sich wie auch in Abbildung 9 einzelne größere Kammervenen, die aus der Tiefe zum oberflächlichen Venengeflecht (in Abbildung 11 mit ∇ markiert) führen. Im Unterschied zu den vorherigen Aufnahmen lässt sich an den histologischen Präparaten ergänzend erkennen, dass diese einzelnen Gefäße direkt aus dem Kammerwinkel bzw. der Vorderkammer entspringen. So ist in dem durch 3D-*Rendering* rekonstruierten Volumen von Abbildung 11C deutlich eine durchgehende Gefäßverbindung (in Abbildung 11 mit ▷ markiert) zwischen der inneren, an die Vorderkammer angrenzende Sklera und dem Venenplexus zu erkennen. Dies ließ sich in den LE-basierten OCTA-Aufnahmen, vermutlich aufgrund der begrenzten Eindringtiefe, nicht darstellen. Allerdings imponieren der Venenplexus und die innere Begrenzung der Sklera im rekonstruierten Bild unscharf verdickt, was möglicherweise auf die Deformation des Gewebes bei der Herstellung der Kryoschnitte zurückzuführen ist. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das o. g. rekonstruierte Volumen einer Gewebeschicht mit einer Dicke von insgesamt fast 400 µm entspricht, da ein einzelner

Kryoschnitt ca. 18 μm dick ist und in das 3D-*Rendering* insgesamt 23 aufeinanderfolgende Kryoschnitte einbezogen wurden.

3.4 Vergleich mit ICG-basierter Bildgebung

Die Tatsache, dass das Gefäßnetzwerk blind zu enden scheint, ließ die Frage aufkommen, ob möglicherweise durch die Lipide in den LE-Tröpfchen zarte oder distale Anteile des Kammerwassersystems verstopft werden könnten, sodass sich ein nicht realitätsgetreues Abbild ergibt. Daher wurde die LE-basierte OCTA mit einer Bildgebungsmodalität verglichen, bei der anstelle eines fettigen Kontrastmittels, eine klare, monophasische Flüssigkeit zum Einsatz kommt. Dafür wurde eine Lösung aus Wasser und ICG, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, in die Vorderkammer injiziert. Analog zur LE füllten sich die Kammerwasserabflüsse auch mit dem ICG-Farbstoff, was mithilfe einer Kamera des Laser-Scanning-Ophthalmoskops sichtbar gemacht werden konnte.

Die ICG-basierte Bildgebung des Kammerwasserabflusses wurde unter möglichst identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Allerdings kamen Geräte unterschiedlicher Hersteller zum Einsatz (vgl. Kapitel 2.2 und 2.5) und die Experimente erfolgten an zwei verschiedenen Schweineaugen, d. h. an je einem für die ICG-basierte und einem für die LE-basierte Messung. Eine sequenzielle Darstellung desselben Auges wurde in Vorversuchen getestet, war aber wegen der Ansammlung von Kontrastmittel unter der Bindehaut nicht zufriedenstellend durchführbar.

Die LE-basierten OCTA-Bilder sind den ICG-Bildern in Abbildung 12 gegenübergestellt. Bei beiden Bildgebungsvarianten zeigt sich in späten Perfusionsphasen ein ähnliches Füllungsmuster in Form eines feinen juxtalimbalen, blind endenden Gefäßnetzwerkes (siehe Abbildung 12A1 und Abbildung 12B). Unter einem vergleichbaren Perfusionsdruck von ca. 10 mmHg ließen sich mit der ICG-Bildgebung keine kleineren Gefäße als mit der OCTA detektieren, weshalb aktuell nicht von einer Verstopfung durch die LE auszugehen ist.

Darüber hinaus lassen sich beim Vergleich der Bilder einige Vor- und Nachteile der beiden Verfahren identifizieren. Mittels ICG wurde beispielsweise ein Bild erzeugt, das vermeintlich plastischer wirkt (vgl. Abbildung 12B). Jedoch entstanden hier Störsignale durch die oberflächliche Konjunktiva (vgl. Abbildung 12B am linken Bildrand). Beachtenswert ist insbesondere, dass aus der fluoreszenzangiographischen Darstellung keinerlei Tiefeninformation gewonnen werden kann, welche im Falle der OCTA für den gesamten Datensatz gegeben ist (siehe Abbildung 12A2 – A3). Eine komplette 3D-Darstellung der Daten wurde allerdings

im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert. Die erreichbare Auflösung des OCTA-basierten Systems ist mindestens so gut wie die der ICG-basierten Technik.

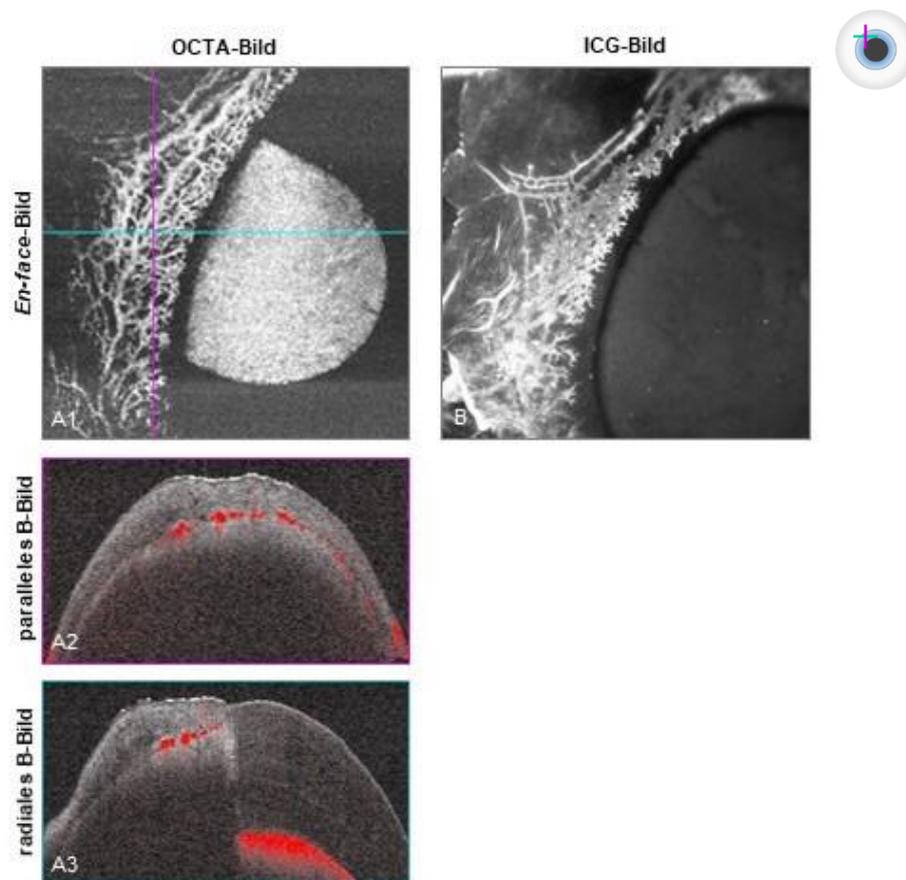


Abbildung 12: Vergleich von LE-basierter OCT- und ICG-basierter Angiographie.

Die OCTA-*En-face*-Aufnahme (A1) und das ICG-Fluoreszenzangiographie-Bild (B) zeigen unter dem gleichen Versuchsaufbau und den gleichen Versuchsbedingungen ein ähnliches Füllungsmuster an zwei verschiedenen Schweineaugen. In beiden Fällen ist ein feines juxtalimbales, blind endendes Gefäßnetzwerk zu erkennen. Durch das fluoreszenzangiographische Verfahren lassen sich keine kleineren Gefäße darstellen, allerdings fehlt hier jegliche Tiefeninformation, die im Falle der OCTA durch die B-Scans geliefert wird (A2 – A3).

Die Position des limbusparallelen B-Bildes (A2) und des radialen B-Bildes (A3) wird als magenta- bzw. türkisfarbene Linie in der *En-face*-Aufnahme gekennzeichnet. Zur zusätzlichen Orientierung ist in einem Augensymbol am Bildrand die ungefähre Scanposition durch die zwei Scanachsen markiert.

(Abbildung in ähnlicher Form veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

3.5 Einfluss von Bildbearbeitung auf die Bildqualität

Unabhängig von dem Vergleich mit anatomischen Präparaten oder anderen Bildgebungsverfahren erschien es sinnvoll, herauszufinden, wodurch und inwieweit sich die Qualität der LE-basierten OCTA-Aufnahmen verbessern lässt. Als ein erster Ansatz hierzu wurde das *Oversampling* untersucht. Das heißt, es wurden aus vier nacheinander aufgenommenen Bilddatensätzen sowohl für die *En-face*-Aufnahme als auch für die zugehörigen B-Bilder Mittelwertbilder generiert. Hauptlimitation dieser Technik ist aktuell, dass die vom System benötigte Zeit zur Erzeugung eines Einzelbildes (d. h. vom Start einer Aufnahme bis zu einem möglichen neuen Start) ungefähr 18 Sekunden beträgt. Damit ist die minimale Zeitspanne zur Akquirierung von insgesamt vier Bilddatensätzen mindestens 72 Sekunden lang. Dies beschränkt die Anwendung auf einen stabilen Versuchsaufbau, der nur *ex vivo* zu erreichen ist. Zudem muss die Füllung der Gefäße einen statischen Zustand erreicht haben. Daher wurden zur Mittelwertbildung stets Bilder später Perfusionsphasen ausgewählt, da sich in frühen Phasen des LE-Einstroms die Gefäßfüllung zeitlich noch stark ändert.

Für zwei verschiedene Schweineaugen wurde in Abbildung 13 jeweils eine der vier Einzelaufnahmen dem erzeugten Mittelwertbild gegenübergestellt. Im Vergleich zeigte sich eine deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. So erscheinen Sklera und Cornea weniger gekörnt und der gewebefreie Hintergrund homogener dunkel. Allerdings wirken die roten LE-Signale insgesamt weichgezeichnet, also weniger scharf als in den Einzelaufnahmen. Da in den Mittelwert-Aufnahmen die rote Granulierung, die die Einzelbilder veräuscht, jedoch deutlich vermindert ist, treten die Gefäßsignale trotzdem besser hervor.

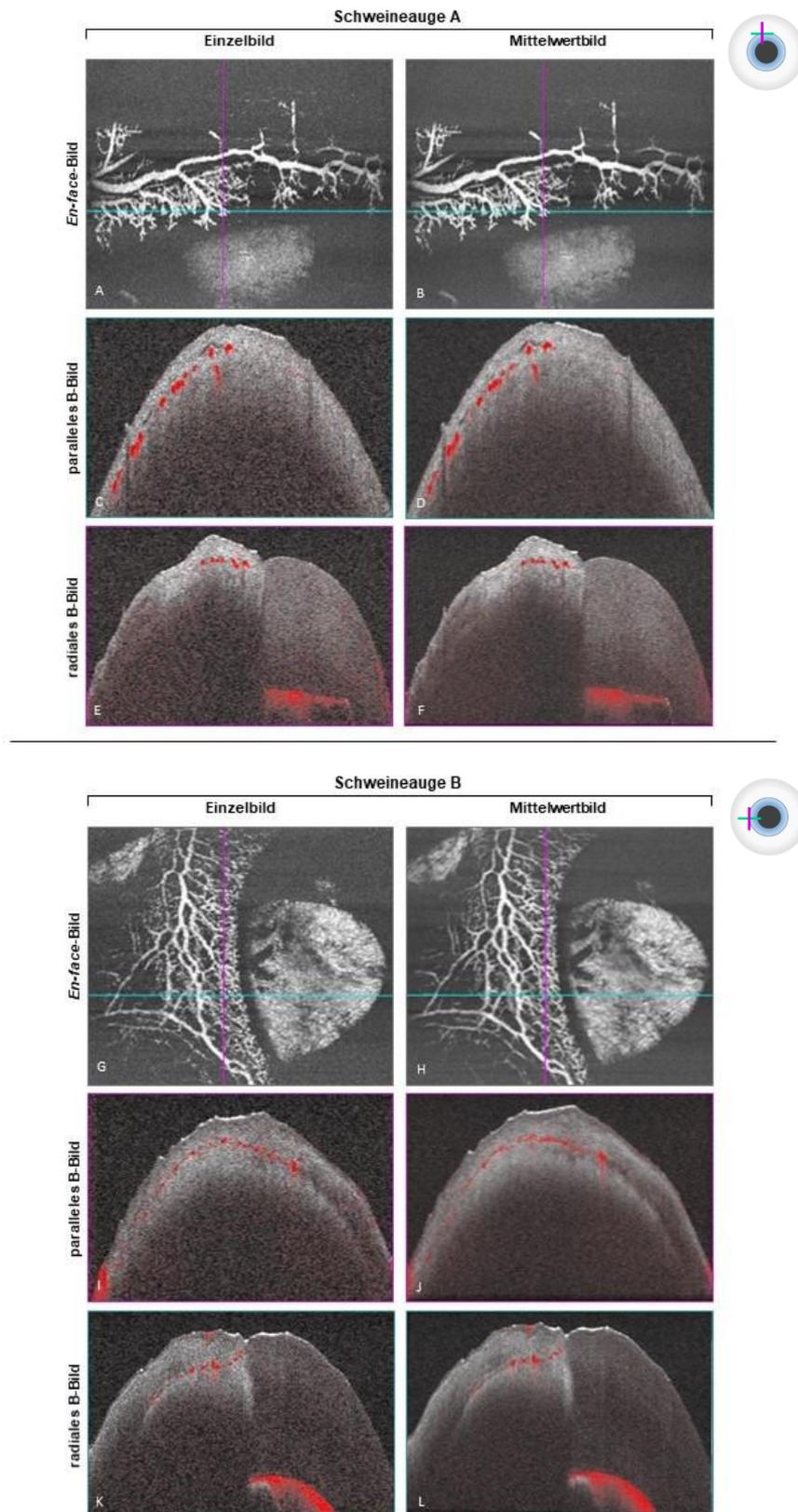


Abbildung 13: LE-basierte OCTA-Aufnahmen vor und nach Mittelwertbildung.

Bei zwei verschiedenen Schweineaugen A und B wurde aus je vier Einzelbildern in späten Perfusionsphasen ein zugehöriges Mittelwertbild generiert. Beim Vergleich von einem Einzelbild (**A, C, E** bzw. **G, I, K**) mit dem korrespondierenden Mittelwertbild (**B, D, F** bzw. **H, J, K**) wird eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch die Bildkorrektur deutlich.

(Abbildungen in ähnlicher Form veröffentlicht in: Gottschalk et al. (2019), Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0.)

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Versuchsmaterialien

Für die durchgeführten Versuche wurden Schweineaugen als Modellaugen ausgewählt. Wie in Kapitel 1.1.4 bereits erläutert, unterscheiden sich humane und vom Schwein stammende Augen hinsichtlich des Vorhandenseins eines Schlemm-Kanals, welcher bei Schweinen nicht in analoger Weise zu existieren scheint, sondern vielmehr durch den *aqueous angular plexus* repräsentiert wird (McMenamin und Steptoe 1991). Zudem ist bei Schweinen keine klare anatomische Verbindung zwischen dem Ziliarkörper und den Abflusswegen vorhanden, sondern der Ziliarkörper wie bei anderen (nicht zu den Primaten zählenden) Plazentatieren in zwei Anteile gespalten, sodass eine Ziliarkörperlücke entsteht (McMenamin und Steptoe 1991). Doch auch unter Berücksichtigung der anatomischen Heterogenitäten ist die Verwendung von Schweineaugen als Modell für menschliche Augen sinnvoll (Ruiz-Ederra et al. 2005). Beide weisen eine ähnliche Augapfelgröße und vergleichbare Vorderkammermaße auf (McMenamin und Steptoe 1991). Außerdem ist im Vergleich zu anderen Säugetieren die Kammerwinkelarchitektur bei Schweinen stärker trabekulär statt retikulär organisiert und damit dem menschlichen Trabekelmaschenwerk deutlich ähnlicher (McMenamin und Steptoe 1991). Darüber hinaus sind Schweineaugen preisgünstig, leicht erhältlich und derzeit ethisch wenig problematisch nutzbar. Unabhängig von der Wahl des Spenderlebewesens sind bei allen Modellaugen mögliche *post mortem* entstandene Strukturveränderungen zu bedenken, die beispielsweise durch die versiegtete Blutversorgung, den fehlenden Augeninnendruck, den anschließenden Transport oder die Tiefkühlung hervorgerufen worden sein können.

Das Promotionsprojekt basiert auf dem Einsatz der Optischen Kohärenztomographie. Von klinischer Relevanz ist, dass OCT-Geräte weit verbreitet sind, weshalb ihre Handhabung geläufig ist und keine zusätzlichen Anschaffungskosten entstehen. Der große Vorteil besteht vor allem in der Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellung durch den Erhalt der Tiefeninformation. Zu beachten ist jedoch, dass mit der Verwendung eines Kontrastmittels die Nichtinvasivität verloren geht. Darüber hinaus sind technische Limitationen des verwendeten OCT-Systems zu berücksichtigen. Das hauptsächlich genutzte Cirrus 5000-OCT-Modell hat nativ im Vorderabschnitt eine axiale Tiefenauflösung von 5 μm bei einer A-Scan-Tiefe zwischen 2,0 mm und 5,8 mm (siehe Tabelle A.1 im Anhang), wobei unter Verwendung des zur Verfügung gestellten Linsen-Prototyps zur Vorderabschnitt-OCTA keine Einbußen in der axialen Scantiefe beobachtet wurden. Die tatsächlich erzielbare Scantiefe wurde hauptsächlich durch die Eindringtiefe des Scanstrahls in die stark lichtstreuende Sklera bedingt.

Diese betrug ca. eine halbe Skleradicke (siehe Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 12 und Abbildung 13). Damit ist die Sklera nicht vollständig beurteilbar und beteiligte tiefliegende Kammerwasserabflussstrukturen wurden nicht abgebildet. Diesem Argument steht zumindest entgegen, dass sich sowohl in den ICG- als auch in den Histologie-Vergleichsbildern keine zusätzlichen Kammerwassergefäße gezeigt haben. Nachteilig ist zudem, dass die Datenerfassung, vor allem bei den OCT-Geräten des SD-Typs (vgl. Kapitel 1.2.2), zeitaufwendig und damit die zeitliche Auflösung vergleichsweise gering ist. Der Einsatz von schnelleren OCT-Geräten, zum Beispiel als SS-Variante, und Fortschritte in der Computer- und Bildverarbeitungstechnologie könnten diesen Aspekt verbessern.

Als Kontrastmittel für die OCT haben sich bereits seit einigen Jahren Goldnanostäbchen bewährt (Troutman et al. 2007; Wang et al. 2014; de la Zerda et al. 2015). Sie sind durch Kopplung an Proteine oder Antikörper als Target-Biomolekül nutzbar. Allerdings ist ihre Anschaffung sehr teuer und die mechanische Verlegung kleiner Gefäßlumina oder eine toxische Wirkung beim *In-vivo*-Einsatz sind zu berücksichtigen (Alkilany et al. 2012; Wan et al. 2015). Als günstigere und einfacher nutzbare Variante wurden für diese Versuche Lipidemulsionen, genauer gesagt Propofol-Präparate, eingesetzt. Prinzipiell wäre auch der Einsatz anderer fettiger Emulsionen wie freiverkäuflicher Milch denkbar. In vorangegangenen Experimenten hat sich der Vorteil der Propofol-Lösungen gegenüber Milch darin gezeigt, dass Propofol-Emulsionen die beste Kombination aus Signalstärke und Eindringtiefe aufwiesen (Gottschalk et al. 2019). Des Weiteren unterliegen die Propofol-Produkte als Medizinprodukt strengen Kontrollen, wodurch eine zeitlich konstante Zusammensetzung der Inhaltsstoffe gewährleistet ist, während Milch als biologisches Produkt von Faktoren wie Umwelteinflüssen, Fütterung, Haltung, Tiergesundheit o. Ä. abhängt und ein höheres allergisches Potential besitzt. Eine mögliche Okklusion der Kammerwasserstrukturen durch die enthaltenen Lipidtröpfchen hat sich in den durchgeführten ICG-Vergleichsexperimenten nicht bestätigt (vgl. Kapitel 3.4). Eine Verlegung scheint zudem unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass nach dynamischen Lichtstreuungsmessungen der Durchmesser der Propofol-Tröpfchen ca. 100 nm beträgt (Gottschalk et al. 2019) und damit die Gefäße des *aqueous angular plexus* mit 20 μm einen deutlich größeren Durchmesser aufweisen (McMenamin und Steptoe 1991). Allerdings sind bei der Anwendung am Auge eine Interaktion mit Wandstrukturen oder eine toxische Wirkung *in vivo* nicht auszuschließen. Dies betrifft vor allem das Trabekelmaschenwerk. Diesbezüglich sind weitere Studien nötig. Besonders zu berücksichtigen ist, dass die Propofol-Präparate als Narkotikum den Wirkstoff 2,6-Diisopropylphenol enthalten. Auch wenn Propofol eine hohe Plasma-Clearance aufweist, nach Konjugation und

Glucuronidierung renal ausgeschieden wird und in der geringen verwendeten Dosis von ca. 1 ml reiner Propofol-Lösung (10 mg/ml) nicht von einer anästhetischen Wirkung auszugehen ist, so ist aktuell der lokale sowie systemische Einfluss des narkotisierenden Wirkstoffs bei der Anwendung am Auge unklar. Diese Problematik ließe sich durch den Einsatz einer wirkstofffreien Trägersubstanz umgehen. Eine derartige Alternative könnte beispielsweise das Produkt Intralipid sein, welches ebenfalls auf Sojabohnenöl basiert und Triglyceride und Phospholipide enthält. Dieses wurde zur Kontrastverstärkung bei der Darstellung von Kapillarnetzwerken mittels OCT in Mäusegehirnen bereits angewendet (Pan et al. 2014). Außerdem wurde Intralipid zur quantitativen Analyse der Eindringtiefe und der Konzentrationsabhängigkeit des Streukoeffizienten in der OCT genutzt (Kodach et al. 2010). Darüber hinaus zeigen Propofol-Lösungen auch in 25- oder 50-prozentiger Verdünnung mit PBS ein zwar schwächeres, aber immer noch detektierbares Signal. Prinzipiell wäre also auch die Verwendung von Propofol-Produkten in deutlich geringerer Konzentration denkbar, wodurch eine anästhesierende Wirkung weiter vermindert werden würde. Hierzu fehlen bislang konkrete Studien mit Verdünnungsreihen.

4.2 Evaluation der Versuchsergebnisse

Zusammen betrachtet lässt sich sagen, dass das primäre Ziel dieser Promotionsarbeit erreicht werden konnte. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass Propofol-Präparate *ex vivo* als OCT-Kontrastmittel fungieren können. Dabei qualifizieren sich die Lipidlösungen als Kontrastmittel, weil sie erstens auch innerhalb von Gewebe eine starke Reflektivität aufweisen und zweitens ein zeitlich fluktuierendes Signal erzeugen, was sich bereits an frühen Experimenten am Spectralis-OCT-System zeigen ließ. Hierbei erwiesen sich neben einer Leckage allerdings starke Helligkeitsschwankungen (sowohl innerhalb eines *Stack* als auch zwischen verschiedenen Rohbildsequenzen) als problematisch. Die beobachtete zeitliche Fluktuation des Signals eröffnete jedoch die Option, das Kontrastmittel analog der OCTA-Technologie zu detektieren, was am Zeiss-OCT-Modell realisiert werden konnte. Diese als LE-basierte OCTA bezeichnete Bildgebungsmodalität wurde während dieser Promotion entwickelt und von unserer Arbeitsgruppe erstmalig beschrieben.

Da die LE-basierte Darstellung auf Algorithmen der OCTA zurückgreift, ist zu bedenken, inwiefern das detektierte LE-Signal flussabhängig war. Grundsätzlich ist klar, dass bei *Ex vivo*-Versuchen kein Blutfluss oder zirkulierender Kammerwasserstrom wie *in vivo* vorliegt. Allerdings handelt es sich auch nicht um ein völlig statisches System, da es beispielsweise aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der Fetttröpfchen eine Grunddynamik gibt.

Außerdem zeigt sich besonders in den zeitaufgelösten LE-basierten OCTA-Aufnahmen, dass sich die LE als Strom im Kammerwassersystem verteilt. Experimente, die gezielt die Flussabhängigkeit der Signalextraktion untersuchen, wurden bisher nicht durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass zur Signaldetektion auf die gerätinterne Software zurückgegriffen wird, dessen Technologie durch den Hersteller geschützt ist, und daher die zugrunde gelegten Analysemechanismen nicht im Detail bekannt oder gar modifizierbar sind.

Es kann als begleitender Erfolg gewertet werden, dass ein zur Fragestellung passender Versuchsaufbau entwickelt werden konnte, welcher reproduzierbare Messungen in praktikabler Durchführung ermöglichte. So konnten die Modellaugen weitestgehend unbeschädigt, unverformt sowie in idealer Ausrichtung positioniert und die LE beim gewünschten Druck und zum gewählten Zeitpunkt infundiert werden. Zielführend war dabei insbesondere die Idee, das Auge durch einen Unterdruck von hinten anzusaugen. Dies ließ sich durch die Kombination aus der mittels 3D-Druck hergestellten Halterung und dem aufgesetzten Pipettierball umsetzen. Allerdings wurde zur Vermeidung von unphysiologischen Druckartefakten ein relativ geringer Perfusionsdruck von ca. 10 mmHg gewählt und damit in Kauf genommen, dass manche intraskleralen Kammerwasservenven ggf. nicht perfundiert wurden. Außerdem fehlt aktuell die Möglichkeit am Modellauge 360°-Scans durchzuführen. Zwar ist die Haltevorrichtung prinzipiell drehbar konstruiert, da das Auge im Trichter aber leicht abgekippt ist, würde eine reine Rotation um die Längsachse der Halterung eine ungeeignete Messposition hervorrufen.

Neben den technischen Machbarkeitsnachweisen ist es durch den Einsatz von Lipidlösungen gelungen, einzelne Komponenten des Kammerwasserabflusssystem im Schweineauge darzustellen. Damit wurde ein weiteres Projektziel erreicht. Durch die Kombination aus *En-face*-Aufnahmen und B-Bildern konnte ein dreidimensionaler Eindruck vom Verlauf der beteiligten Abflussstrukturen gewonnen werden. Eine vollständige 3D-Darstellung des gesamten aufgenommenen Venennetzwerkes wurde technisch noch nicht realisiert, was bedeutet, dass vom aufgenommenen Datensatz aktuell nur ein Teil genutzt wird. Die gewonnenen Bilder, vor allem der frühen Einstromphase, ergaben signifikante Unterschiede gegenüber dem menschlichen Kammerwasserabflusssystem, insbesondere zeigte sich kein Schlemm-Kanal und keine äquivalenten Kollektorkanäle. Hingegen stellten sich einzelne größere Kammerwasservenven dar, welche das Kammerwasser primär ableiten, sowie ein dahinter liegendes verzweigtes juxtalimbales Netzwerk.

Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe war es bisher nicht möglich, den Weg des Kammerwassers nahtlos zu verfolgen und damit das komplette Drainagesystem abzubilden. So

war in den LE-basierten OCTA-Bildern keine Verbindung zur Vorderkammer erkennbar. Anhand der histologischen Vergleichspräparate lässt sich jedoch vermuten, dass große Kammerwasservenen im Bereich des Kammerwinkels entspringen und zum oberflächlichen Venengeflecht ziehen.

Außerdem bleibt unklar, wohin die Gefäße des juxtalimbale Plexus weiterführen. In den gewonnenen Aufnahmen schienen sie nahe des *Limbus* blind zu enden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sie in Wirklichkeit einen Blutgefäß-Plexus repräsentieren, welcher sich retrograd mit Kontrastmittel gefüllt hat. Dies stünde in Übereinstimmung mit bisherigen anatomischen Beschreibungen (McMenamin und Steptoe 1991). Da aber initial primär die Vorderkammer mit der LE befüllt wurde, müsste dennoch eine Verbindung zwischen der Vorderkammer und diesen Blutgefäßen bestehen.

Des Weiteren zeigte sich an den Modellaugen ein unterschiedlich dichtes Verteilungsmuster. Diese Unterschiede könnten schlicht interindividuell bedingt sein oder aber eine regional-segmentale Anordnung von Kammerwassergefäßen widerspiegeln. Ein sektoriell unterschiedlicher Kammerwasserabfluss hat sich sowohl bei nicht humanen als auch menschlichen Augen experimentell gezeigt (vgl. Kapitel 1.3.2) (Hann et al. 2011; Swaminathan et al. 2014; Huang et al. 2017). Außerdem wurden auch in Bezug auf den intraskleralen Venenplexus verschieden dichte Areale beschrieben (Kagemann et al. 2011).

Die aus den histologischen Präparaten entstandenen Abbildungen lieferten wertvolle Vergleichsinformationen. Wie bereits erwähnt, ließen sie Rückschlüsse auf eine Verbindung zwischen dem Kammerwinkel und den in der OCTA detektierten Venen zu. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die sehr feinen Kryoschnitte anfällig für Präparationsartefakte sind und dass *post mortem* entstandene Strukturveränderungen an den Schweineaugen nicht nur die OCTA-Bilder, sondern in gleicher Weise auch die histologischen Schnitte betreffen. Insgesamt sind die histologischen Bilder als eine erste Annäherung zu sehen, da für sichere Aussagen bislang reproduzierbare Ergebnisse fehlen. Dazu müssten die Kryoschnitte ergänzend an anderen Augen und weiteren Abschnitten entlang der Zirkumferenz des Auges durchgeführt werden.

Die durchgeführten ICG-Aufnahmen dienten unter anderem dazu, die neue Bildgebungsform mit bekannten Verfahren zu vergleichen. Auch wenn mittels ICG ein plastischer wirkendes Bild erzeugt wurde, so stellte sich neben den konjunktivalen Störsignalen als erheblicher Nachteil der ICG-Angiographie heraus, dass keine B-Scan-Analoga existieren und damit im Gegensatz zur OCT keine Tiefenzuordnung der Gefäße möglich war. Zum anderen sollte durch den ICG-Vergleich eine mögliche Verstopfung der Kammerwasservenen durch die

LE ausgeschlossen werden. Und in der Tat entstand auch bei der hydrophilen ICG-Lösung ein ähnliches Verteilungsmuster. Dennoch bleibt die Rolle des feinen intraskleralen Gefäßnetzwerkes und die Frage nach der möglichen retrograden Füllung von Blutgefäßen nicht geklärt. Unabhängig davon ist zu berücksichtigen, dass die beiden Verfahren an unterschiedlichen Augen getestet wurden. Ein direkter Vergleich, bei dem beide Lösungen aufeinanderfolgend am selben Auge injiziert wurden, konnte bisher u. a. aufgrund von intraluminalen Flüssigkeitsrückständen, oberflächlichen Lecks oder Veränderungen durch das Aufquellen des Gewebes nicht realisiert werden.

Durch das *Oversampling* bzw. die Mittelung korrespondierender Datenpunkte der LE-basierten OCTA-Aufnahmen konnte eine erhebliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erzielt werden, was ein gewünschter positiver Effekt der Mittelwertbildung war. Allerdings bringt dieser Vorgang nicht nur Vorteile mit sich. So resultiert aus der Mittelung von Datenpunkten beispielsweise eine höhere Anfälligkeit für Bewegungsartefakte. Außerdem verringert sich der Kontrastumfang, da sehr dunkle bzw. sehr helle Pixel des Ursprungsbildes durch den Bearbeitungsprozess wegfallen. Hinzu kommt, dass für die Mittelung eine längere Akquisitionszeit nötig ist. Daher konnte diese Methode auch nur in späten Perfusionsphasen genutzt werden, weil sich in der Frühphase das Verteilungsmuster zu stark ändert. Grundsätzlich ist anzumerken, dass im Rahmen dieses Projektes lediglich der Effekt der Mittelwertbildung untersucht wurde. Weitere Einflussfaktoren und Verbesserungsmöglichkeiten der Bildqualität bleiben zu analysieren.

4.3 Ausblick

In Zusammenschau der Ergebnisse und deren kritischer Begutachtung ergeben sich neue Fragestellungen für mögliche zukünftige Experimente.

Hinsichtlich der Lipidemulsionen könnten Versuche mit Verdünnungsreihen folgen, um den Einfluss der Propofol-Konzentration explizit zu untersuchen. Außerdem fehlen bislang Studien unter Verwendung einer wirkstofffreien Alternative wie Intralipid. Gleichzeitig bleibt zu klären, inwieweit durch die Propofol-Produkte überhaupt eine Interaktion mit Wandstrukturen oder eine toxische Wirkung des Wirkstoffs vorliegt. Auch *In-vitro*-Messungen zur quantitativen Analyse von Flussgeschwindigkeiten oder anderen physikalischen Eigenschaften der LE könnten eine umfassendere Charakterisierung der LE voranbringen. Hierzu ist die Verwendung von Röhrchen aus Glas oder transparentem Kunststoff denkbar, deren Maße denen der Kammerwassergefäße entsprechen.

Unter Beibehaltung des derzeitigen experimentellen Setups ist die Identifizierung weiterer Einflussfaktoren auf die Bildqualität wünschenswert. Dabei bleibt zu untersuchen, was vor und während der Messung zu beachten ist und wodurch das Bild im Nachhinein optimiert werden kann. Eine Anpassung des Versuchsaufbaus könnte auf die Durchführbarkeit von 360°-Scans, also Scans vollständig entlang der Zirkumferenz des Auges, abzielen. Zumindest das Abscannen aller vier Quadranten desselben Versuchsauges wäre wünschenswert, beispielsweise um die vorbeschriebenen segmentellen Unterschiede des Netzwerkes zu visualisieren (Swaminathan et al. 2014; Loewen et al. 2016; Huang et al. 2017).

Ein weiterreichendes Ziel stellt sicherlich die Ausweitung der *Ex-vivo*-Experimente auf andere Spezies dar. Ein nächster Schritt wäre die Verwendung von Primatenaugen, welche dem menschlichen Auge äußerst ähnlich sind. Sie könnten Klarheit darüber bringen, ob sich die bisher bekannten Kammerwasserabflussstrukturen auch mittels LE-basierter OCTA identifizieren lassen. Als Ziel der fernerer Zukunft könnten *Ex-vivo*-Studien an humanen Augen angestrebt werden. Optimalerweise ließen sich durch sie neue Erkenntnisse in der Grundlagenforschung gewinnen oder möglicherweise die Rolle des uveoskleralen und uveolymphatischen Weges ergründen (Bill 1965; Bill und Phillips 1971; Yücel et al. 2009).

Im Idealfall führt die LE-basierte OCTA-Technik langfristig zu einer *In-vivo*-Bildgebung. Durch diese ließe sich beispielsweise die Rolle des IOD untersuchen, *post mortem* verursachte Artefakte umgehen und ggf. klären, ob eine retrograde Füllung der Blutgefäße vorliegt. Noch relevanter wäre sicherlich die Möglichkeit der intraoperativen Anwendung. Da in vielen Fachdisziplinen die intraoperative Bildgebung immer populärer wird, ist es naheliegend, dass sich dieser Trend auch bei der OCTA durchsetzt. Dann wäre mithilfe der Vorderabschnittslinse automatisch auch die Möglichkeit zur intraoperativen LE-basierten OCTA gegeben. Eine *In-vivo*-Diagnostik könnte nützlich sein, um individuelle Abflussstörungen des Kammerwassers zu erkennen und damit Regionen zu identifizieren, in denen eine Beseitigung des Abflusshindernisses besonders vielversprechend ist. So könnte beispielsweise die gezielte Platzierung von Stents ermöglicht und die Effektivität der Trabekulotomie erhöht werden, wie es schon mittels *Aqueous angiography* gezeigt wurde (Huang et al. 2016). Folglich könnten die Glaukomchirurgie und damit therapeutische Maßnahmen für betroffene Patientinnen und Patienten effektiver werden.

5 Zusammenfassung

Das Glaukom zählt derzeit zu den häufigsten Ursachen von Erblindung in Deutschland und der Welt. Zugrunde liegt oft eine Verlegung des Kammerwinkels oder eine Abflussbehinderung im Trabekelmaschenwerk. Die Therapie hat vorrangig die Senkung des intraokularen Drucks zum Ziel. Dabei kommen verschiedene chirurgische Verfahren zum Einsatz, deren Erfolg zurzeit noch interindividuell sehr verschieden ist. Um Aufschluss über anatomische Details, pathophysiologische Einflussfaktoren und nicht zuletzt Hinweise auf die explizite Lokalisation von Abflussstörungen zu erhalten, ist eine Bildgebung des Kammerwasserabflusssystems wünschenswert. Möchte man dabei auf die Optische Kohärenztomographie (engl.: *optical coherence tomography* (OCT)) zugreifen, so erscheint aufgrund des monophasischen Charakters des Kammerwassers und der intraskleralen Lage der Gefäße der Einsatz eines Kontrastmittels zielführend. Diesbezüglich haben sich Lipidemulsionen als mögliche Kandidaten herausgestellt. In *In-vitro*-Versuchen zeigten Propofol-Lösungen die beste Kombination aus Eindringtiefe und Reflektivität sowie eine zeitliche Schwankung der Signalintensität.

Daran anknüpfend wurde im Rahmen dieses Promotionsprojektes in *Ex-vivo*-Experimenten analysiert, ob Propofol-Präparate als Kontrastmittel für die OCT taugen und inwieweit das Kammerwassernetzwerk eines Auges damit abgebildet werden kann. Hierzu wurden enukleierte Schweineaugen mit Propofol-Lösungen perfundiert, vor einem handelsüblichen OCT-Gerät positioniert und dann Lipidemulsion-basierte OCT-Aufnahmen erzeugt. Nachträglich erfolgte eine softwaregestützte Bearbeitung der Rohdaten. Zusätzlich wurden nach Perfusion mit Indocyaningrün fluoreszenzangiographische Vergleichsmessungen durchgeführt und histologische Präparate nach Färbung der Kammerwassergefäße mit Trypanblau angefertigt.

In den Experimenten zeigte sich, dass die Lipidemulsionen auch *ex vivo* ein starkes Signal erzeugen, welches aufgrund der zeitlichen Fluktuation mittels Standardabweichungsberechnungen von der Umgebung abgrenzbar ist. Durch Verwendung einer speziellen Vorderabschnittslinse konnte diese Eigenschaft genutzt werden, um das Signal mithilfe der OCT-Angiographie-Technik zu extrahieren. Es konnten zeitaufgelöst und reproduzierbar Aufnahmen gewonnen und somit ein neuartiges Verfahren zur Bildgebung des Kammerwassersystems vorgestellt werden. Aus jedem 3D-Datensatz ließen sich ein *En-face*-Übersichtsbild sowie B-Scans an frei wählbarer Lokalisation generieren. Folglich konnte eine dreidimensionale Darstellung mit Tiefenzuordnung realisiert werden. Durch die anschließende Bildbearbeitung im Sinne einer Mittelwertbildung war es möglich, das Signal-Rauschverhältnis und damit die Gesamtqualität eines Bildes erheblich zu verbessern.

Ferner ließen die Versuche Rückschlüsse über das Kammerwassersystem des Schweineauges zu. Im Vergleich zum Menschen zeigten sich signifikante anatomische Unterschiede. Insbesondere konnte beim Schweineauge kein tiefer, sondern nur ein oberflächlicher Venenplexus identifiziert werden. Dessen Gefäße schienen stets in derselben Skleratiefe zu liegen und sowohl in den Lipidemulsion-basierten OCT-Angiographie- als auch den Indocyaningrün-Messungen blind nahe des *Limbus* zu enden. Eine direkte Verbindung zwischen Vorderkammer und dem Venenplexus zeigte sich aufgrund der begrenzten Eindringtiefe nicht in den Lipidemulsion-basierten OCT-Angiographie-Aufnahmen, jedoch in den histologischen Vergleichspräparaten. Letztere bestätigten die Existenz einzelner größerer Kammerwasserven, die aus der Tiefe zum oberflächlichen Venengeflecht ziehen.

Im Hinblick auf die anatomischen Unterschiede bleibt zu diskutieren, ob dem menschlichen Auge ähnlichere Modellaugen, beispielsweise von Primaten, geeigneter wären. *Post mortem* entstandene Strukturveränderungen sind *ex vivo* grundsätzlich zu berücksichtigen. Weiterhin wäre, möglicherweise durch den Einsatz eines neueren OCT-Modells, eine Verbesserung der Eindringtiefe und der zeitlichen Auflösung wünschenswert. Außerdem sind bei der Auswahl der Versuchsmaterialien wirkstofffreie Lipidemulsionen anstelle der anästhetischen Propofol-Lösungen in Erwägung zu ziehen, um eine lokale oder systemische Interaktion sowie eine toxische Wirkung unwahrscheinlicher zu machen. Eine Okklusion der Gefäßlumina durch Bestandteile der Lipidemulsionen hat sich als nichtzutreffend herausgestellt, ist jedoch für beide Produktarten nicht sicher auszuschließen. Darüber hinaus ist zu klären, ob das visualisierte Venengeflecht nicht tatsächlich einen retrograd mit Kontrastmittel gefüllten Blutgefäß-Plexus repräsentiert und ob durch eine Veränderung des Perfusionsdrucks weitere, bisher nicht identifizierte Kammerwasserabflussstrukturen dargestellt werden können.

Für die Zukunft sind weiterführende *In-vitro*-Experimente zur Charakterisierung der Lipidemulsionen sowie Studien mit Verdünnungsreihen denkbar. Außerdem sind weitere Methoden zur Verbesserung der Bildqualität und zur Visualisierung der gesamten Zirkumferenz eines Modellauges zu entwickeln. Auf lange Sicht wäre die Etablierung der Lipidemulsion-basierten OCT-Angiographie als *In-vivo*-Bildgebung, insbesondere im Rahmen einer intraoperativen Anwendung, wünschenswert. Idealerweise könnten dadurch zukünftig sowohl das pathophysiologische Verständnis als auch durch gezielte chirurgische Interventionen die Therapie des Glaukoms und die Prognose betroffener Patientinnen und Patienten grundlegend verbessert werden.

6 Anhang

Tabelle A.1: Technische Daten des Spectralis-OCT- und Cirrus HD-OCT-Gerätes.

BASISDATEN	Spectralis-OCT	Cirrus HD-OCT
Hersteller	Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland	Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, USA
Modell	HRA+OCT	5000
Methodik	<i>spectral domain</i> (SD)	<i>spectral domain</i> (SD)
OCT-Lichtquelle	Superlumineszenzdiode (870 nm)	Superlumineszenzdiode (840 nm)
A-Scan-Frequenz	maximal 40.000 Hz (im Standard-Modus)	maximal 68.000 Hz
A-Scantiefe*	1,9 mm	<u>posterior</u> : 2,0 mm <u>anterior</u> : 2,0 – 5,8 mm**
axiale Auflösung*	3,9 – 7 µm**	<u>posterior</u> : 5 µm <u>anterior</u> : 5 µm
transversale Auflösung*	6 – 14 µm**	<u>posterior</u> : 15 µm <u>anterior</u> : <20 – <45 µm**
Zusatzfunktionen	ICG-Angiographie (Diodenlaser (790 nm)), Fluoreszenz-Angiographie (Festkörperlaser (488 nm)), Infrarot Reflexion, Blau-Reflexion, Blue Laser Autofluoreszenz, Multicolor	Fundusbilder (Linien-Scanning- Ophthalmoskop (750 nm)), Irisbilder (CCD-Kamera), OCT-Angiographie (mit der Zeiss AngioPlex-Einheit (3x3-, 6x6-Scan))
		* in Gewebe, ** je nach Modus

7 Literaturverzeichnis

- Adhi M, Duker JS (2013): Optical coherence tomography--current and future applications. *Curr Opin Ophthalmol* 24, 213–221
- Alkilany AM, Shatanawi A, Kurtz T, Caldwell RB, Caldwell RW (2012): Toxicity and cellular uptake of gold nanorods in vascular endothelium and smooth muscles of isolated rat blood vessel: Importance of surface modification. *Small* 8, 1270–1278
- Ascher KW (1942): Aqueous veins: II. Local pharmacologic effects on aqueous veins III. Glaucoma and aqueous veins. *Am J Ophthalmol* 25, 1301–1315
- Ashton N (1951): Anatomical study of Schlemm's canal and aqueous veins by means of neoprene casts - part I. *Br J Ophthalmol* 35, 291–303
- Ashton N (1952): Anatomical study of Schlemm's canal and aqueous veins by means of neoprene casts - part II. *Br J Ophthalmol* 36, 265–267
- Augustin AJ: *Augenheilkunde*. 3. Auflage; Springer, Berlin 2007
- Autodesk.Inc (2020): Autodesk Tinkercad | Create 3D digital designs with online CAD. <https://www.tinkercad.com>; abgerufen am 11.08.2020
- Battista SA, Lu Z, Hofmann S, Freddo T, Overby DR, Gong H (2008): Reduction of the available area for aqueous humor outflow and increase in meshwork herniations into collector channels following acute IOP elevation in bovine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 5346–5352
- Bentley MD, Hann CR, Fautsch MP (2016): Anatomical variation of human collector channel orifices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 1153–1159
- Bergua A: *Das menschliche Auge in Zahlen*. Springer, Berlin 2017
- Bezerra HG, Costa MA, Guagliumi G, Rollins AM, Simon DI (2009): Intracoronary optical coherence tomography: A comprehensive review clinical and research applications. *JACC Cardiovasc Interv* 2, 1035–1046
- Bill A (1965): The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 4, 911–919
- Bill A, Phillips CI (1971): Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Exp Eye Res* 12, 275–281
- Bill A, Mäepea O, Hamanaka T (1989): Aspekte der Kammerwasserdrainage über den Schlemmschen Kanal. *Klin Monbl Augenheilkd* 195, 277–280
- BVA, DOG (2006a): Leitlinien des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands e.V. und der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft e.V. Leitlinie Nr. 15 c - Detektion des primären Offenwinkelglaukoms (POWG): Glaukom-Screening von Risikogruppen, Glaukomverdacht, Glaukomdiagnose. <http://www.augeninfo.de/leit/leit.php>; abgerufen am 01.02.2020
- BVA, DOG (2006b): Leitlinien des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands e.V. und der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft e.V. Leitlinie Nr. 15a - Primäres chronisches Offenwinkelglaukom, Normaldruckglaukom und okuläre Hypertension. <http://www.augeninfo.de/leit/leit.php>; abgerufen am 01.02.2020

- Cairns JE (1968): Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol* 66, 673–679
- Carreon T, van der Merwe E, Fellman RL, Johnstone M, Bhattacharya SK (2017): Aqueous outflow - a continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog Retin Eye Res* 57, 108–133
- Cereda MG, Corvi F, Cozzi M, Pellegrini M, Staurenghi G (2019): Optical coherence tomography 2: Diagnostic tool to study peripheral vitreoretinal pathologies. *Retina* 39, 415–421
- Chinn SR, Swanson EA, Fujimoto JG (1997): Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source. *Opt Lett* 22, 340–342
- Choma M, Sarunic M, Yang C, Izatt J (2003): Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Opt Express* 11, 2183–2189
- Chow DR, de Oliveira PRC (Hrsg.): *OCT angiography*. Thieme Medical Publishers, New York 2018
- Coleman AL, Miglior S (2008): Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv Ophthalmol* 53, 3–10
- Davson H: *Physiology of the eye*. 5. Auflage; Pergamon Press, New York 1989
- de la Zerda A, Prabhulkar S, Perez VL, Ruggeri M, Paranjape AS, Habte F, Gambhir SS, Awdeh RM (2015): Optical coherence contrast imaging using gold nanorods in living mice eyes. *Clin Exp Ophthalmol* 43, 358–366
- Drexler W (2004): Ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 9, 47–74
- Dvorak-Theobald G (1934): Schlemm's canal: Its anastomoses and anatomic relations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 32, 574–595
- Dziennis S, Qin J, Shi L, Wang RK (2015): Macro-to-micro cortical vascular imaging underlies regional differences in ischemic brain. *Sci Rep* 5, 10051
- EGS (2017): *European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options* Supported by the EGS Foundation. *Br J Ophthalmol* 101, 130–195
- Fang PP, Harmening WM, Müller PL, Lindner M, Krohne TU, Holz FG (2016): Technische Grundlagen der OCT-Angiographie. *Ophthalmologie* 113, 6–13
- Fellman RL, Feuer WJ, Grover DS (2015): Episcleral venous fluid wave correlates with Trabectome outcomes: Intraoperative evaluation of the trabecular outflow pathway. *Ophthalmology* 122, 2385–2391.e1
- Fercher AF, Mengedoh K, Werner W (1988): Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Opt Lett* 13, 186–188
- Fernández-Barrientos Y, García-Feijoó J, Martínez-de-la-Casa JM, Pablo LE, Fernández-Pérez C, García Sánchez J (2010): Fluorophotometric study of the effect of the glaucoma trabecular microbypass stent on aqueous humor dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 3327–3332
- Gabelt BT, Kaufman PL (2005): Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 24, 612–637

- Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK (2010): Aqueous humor dynamics: A review. *Open Ophthalmol J* 4, 52–59
- Goldmann H (1946): Abfluss des Kammerwassers beim Menschen. *Ophthalmologica* 111, 146–152
- Goldmann H (1951): Abflussdruck, Minutenvolumen und Widerstand der Kammerwasserströmung des Menschen. *Doc Ophthalmol* 5–6, 278–356
- Gottschalk HM, Wecker T, Khattab MH, Fischer CV, Callizo J, Rehfeldt F, Lubjuhn R, Russmann C, Hoerauf H, van Oterendorp C (2019): Lipid emulsion-based OCT angiography for ex vivo imaging of the aqueous outflow tract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60, 397–406
- Grant WM (1963): Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes. *Arch Ophthalmol* 69, 783–801
- Grehn F: *Augenheilkunde*. 30. Auflage; Springer, Heidelberg 2008
- Griehaber MC, Pienaar A, Olivier J, Stegmann R (2009): Channelography: Imaging of the aqueous outflow pathway with flexible microcatheter and fluorescein in canaloplasty. *Klin Monbl Augenheilkd* 226, 245–248
- Griehaber MC, Pienaar A, Olivier J, Stegmann R (2010): Clinical evaluation of the aqueous outflow system in primary open-angle glaucoma for canaloplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1498–1504
- Hamanaka T, Bill A (1988): Effects of alpha-chymotrypsin on the outflow routes for aqueous humor. *Exp Eye Res* 46, 323–341
- Hann CR, Bentley MD, Vercnocke A, Ritman EL, Fautsch MP (2011): Imaging the human aqueous humor outflow pathway in human eyes by three dimensional micro-computed tomography (3D micro-CT). *Exp Eye Res* 92, 104–111
- Hariri S, Johnstone M, Jiang Y, Padilla S, Zhou Z, Reif R, Wang RK (2014): Platform to investigate aqueous outflow system structure and pressure-dependent motion using high-resolution spectral domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 19, 106013
- Heimann H, Kellner U (Hrsg.): *Atlas des Augenhintergrundes: Angiografie, OCT, Autofluoreszenz und Ultraschall*. Thieme, Stuttgart 2010
- Huang AS, Saraswathy S, Dastiridou A, Begian A, Mohindroo C, Tan JCH, Francis BA, Hinton DR, Weinreb RN (2016): Aqueous angiography-mediated guidance of trabecular bypass improves angiographic outflow in human enucleated eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 4558–4565
- Huang AS, Li M, Yang D, Wang H, Wang N, Weinreb RN (2017): Aqueous angiography in living nonhuman primates shows segmental, pulsatile, and dynamic angiographic aqueous humor outflow. *Ophthalmology* 124, 793–803
- Huang AS, Penteadó RC, Saha SK, Do JL, Ngai P, Hu Z, Weinreb RN (2018): Fluorescein aqueous angiography in live normal human eyes. *J Glaucoma* 27, 957–964
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG (1991): Optical coherence tomography. *Science* 254, 1178–1181

- Inomata H, Bill A, Smelser GK (1972): Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73, 760–789
- Johnson M (2006): „What controls aqueous humour outflow resistance?“ *Exp Eye Res* 82, 545–557
- Jordan JF, Wecker T, van Oterendorp C, Anton A, Reinhard T, Boehringer D, Neuburger M (2013): Trabectome surgery for primary and secondary open angle glaucomas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251, 2753–2760
- Kagemann L, Wollstein G, Ishikawa H, Sigal IA, Folio LS, Xu J, Gong H, Schuman JS (2011): 3D visualization of aqueous humor outflow structures in-situ in humans. *Exp Eye Res* 93, 308–315
- Kagemann L, Wollstein G, Ishikawa H, Nadler Z, Sigal IA, Folio LS, Schuman JS (2012): Visualization of the conventional outflow pathway in the living human eye. *Ophthalmology* 119, 1563–1568
- Kodach VM, Kalkman J, Faber DJ, van Leeuwen TG (2010): Quantitative comparison of the OCT imaging depth at 1300 nm and 1600 nm. *Biomed Opt Express* 1, 176–185
- Koop N, Brinkmann R, Lankenau E, Flache S, Engelhardt R, Birngruber R (1997): Optische Kohärenztomographie der Kornea und des vorderen Augenabschnitts. *Ophthalmologe* 94, 481–486
- Lang GK: Augenheilkunde. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Leber TKG (1873): Studien über den Flüssigkeitswechsel im Auge. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 19, 87–185
- Leitgeb R, Hitzenberger C, Fercher A (2003): Performance of Fourier domain vs. time domain optical coherence tomography. *Opt Express* 11, 889–894
- Leitgeb R, Drexler W, Unterhuber A, Hermann B, Bajraszewski T, Le T, Stingl A, Fercher A (2004): Ultrahigh resolution Fourier domain optical coherence tomography. *Opt Express* 12, 2156–2165
- Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E, Early Manifest Glaucoma Trial Group (2003): Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: The early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 121, 48–56
- Levin LA (Hrsg.): Adler's physiology of the eye. 11. Auflage; Saunders/Elsevier, Edinburgh 2011
- Lewis RA, von Wolff K, Tetz M, Korber N, Kearney JR, Shingleton B, Samuelson TW (2007): Canaloplasty: Circumferential viscodilation and tensioning of Schlemm's canal using a flexible microcatheter for the treatment of open-angle glaucoma in adults: Interim clinical study analysis. *J Cataract Refract Surg* 33, 1217–1226
- Li G, Farsiu S, Chiu SJ, Gonzalez P, Lütjen-Drecoll E, Overby DR, Stamer WD (2014): Pilocarpine-induced dilation of Schlemm's canal and prevention of lumen collapse at elevated intraocular pressures in living mice visualized by OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 3737–3746

- Li G, Mukherjee D, Navarro I, Ashpole NE, Sherwood JM, Chang J, Overby DR, Yuan F, Gonzalez P, Kopczynski CC, et al. (2016): Visualization of conventional outflow tissue responses to netarsudil in living mouse eyes. *Eur J Pharmacol* 787, 20–31
- Li P, Shen TT, Johnstone M, Wang RK (2013): Pulsatile motion of the trabecular meshwork in healthy human subjects quantified by phase-sensitive optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 4, 2051–2065
- Liu B, Brezinski ME (2007): Theoretical and practical considerations on detection performance of time domain, Fourier domain, and swept source optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 12, 044007
- Liu H, Fan S, Gulati V, Camras LJ, Zhan G, Ghate D, Camras CB, Toris CB (2011): Aqueous humor dynamics during the day and night in healthy mature volunteers. *Arch Ophthalmol* 129, 269–275
- Loewen RT, Brown EN, Roy P, Schuman JS, Sigal IA, Loewen NA (2016): Regionally discrete aqueous humor outflow quantification using fluorescein canalograms. *PLoS One* 11, e0151754
- Löning M, Lankenau E, Diddens H, Krokowski M, Diedrich K, Hüttmann G (2007): Optische Kohärenztomographie in der Gynäkologie. *Gynäkologe* 40, 343–348
- Mäepea O, Bill A (1992): Pressures in the juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal in monkeys. *Exp Eye Res* 54, 879–883
- Matlach J, Klink T (2015): Trabekulektomie versus Kanaloplastik. *Ophthalmologie* 112, 325–331
- McMenamin PG, Steptoe RJ (1991): Normal anatomy of the aqueous humour outflow system in the domestic pig eye. *J Anat* 178, 65–77
- Meschede D (Hrsg.): *Gerthsen Physik*. 24. Auflage; Springer, Berlin 2010
- Michelson AA, Morley EW (1887): On the relative motion of the earth and the luminiferous ether. *Am J Sci* s3-34, 333–345
- Moses RA (1979): Circumferential flow in Schlemm's canal. *Am J Ophthalmol* 88, 585–591
- Müller M, Dahmen G, Pörksen E, Geerling G, Laqua H, Ziegler A, Hoerauf H (2006): Anterior chamber angle measurement with optical coherence tomography: Intraobserver and interobserver variability. *J Cataract Refract Surg* 32, 1803–1808
- Napoli PE, Coronella F, Satta GM, Fossarello M (2014): A novel technique of contrast-enhanced optical coherence tomography imaging in evaluation of clearance of lipids in human tears. *PLoS One* 9, e109843
- Pan Y, You J, Volkow ND, Park K, Du C (2014): Ultrasensitive detection of 3D cerebral microvascular network dynamics in vivo. *Neuroimage* 103, 492–501
- Pascolini D, Mariotti SP (2012): Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 96, 614–618
- Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, Reichel E, Schuman JS, Duker JS, Izatt JA, Swanson EA, Fujimoto JG (1995): Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology* 102, 217–229

- Quigley HA (1993): Open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 328, 1097–1106
- Quigley HA (2011): Glaucoma. *Lancet* 377, 1367–1377
- Richard G, Soubrane G, Lieb WA: Fluorescein and ICG angiography. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 1998
- RKI (Hrsg.): Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. GBE-Themenheft Blindheit und Sehbehinderung, Berlin 2017;
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/blindheit.pdf?__blob=publicationFile; abgerufen am: 11.08.2020
- Rohen JW, van der Zypen E (1968): The phagocytic activity of the trabecularmeshwork endothelium. An electron-microscopic study of the vervet (*Cercopithecus aethiops*). *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 175, 143–160
- Rohen JW, Rentsch FJ (1968): Über den Bau des Schlemmschen Kanals und seiner Abflußwege beim Menschen. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 176, 309–329
- Rosenfeld PJ, Durbin MK, Roisman L, Zheng F, Miller A, Robbins G, Schaal KB, Gregori G (2016): ZEISS Angioplex™ spectral domain optical coherence tomography angiography: Technical aspects. *Dev Ophthalmol* 56, 18–29
- Rosenquist R, Epstein D, Melamed S, Johnson M, Grant WM (1989): Outflow resistance of enucleated human eyes at two different perfusion pressures and different extents of trabeculotomy. *Curr Eye Res* 8, 1233–1240
- Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbáchano E, Araiz J, Vecino E (2005): The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res* 81, 561–569
- Saraswathy S, Tan JCH, Yu F, Francis BA, Hinton DR, Weinreb RN, Huang AS (2016): Aqueous angiography: Real-time and physiologic aqueous humor outflow imaging. *PLoS One* 11, e0147176
- Sattler E, Kästle R, Welzel J (2013): Optical coherence tomography in dermatology. *J Biomed Opt* 18, 061224
- Schaudig U (2001): Optische Kohärenztomographie. *Ophthalmologie* 98, 26–34
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schlemm F: In: Rust JN (Hrsg.): Theoretisch-praktisches Handbuch der Chirurgie: Mit Einschluss der syphilitischen und Augen-Krankheiten. Band 3; Enslin, Berlin 1830
- Schlemm F (1831): Über einen kreisförmigen dünnhäutigen Kanal in der Verbindungstelle von Sclerotica und Cornea im menschlichen Auge. *Z Ges Ophthal* 1, 543–544
- Schroeder B, Hager A, Kutschan A, Wiegand W (2008): Bestimmung viskoelastischer Hornhauteigenschaften (korneale Hysterese) bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom. *Ophthalmologie* 105, 916–920

- Schuman JS, Chang W, Wang N, de Kater AW, Allingham RR (1999): Excimer laser effects on outflow facility and outflow pathway morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1676–1680
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Kopf, Hals und Neuroanatomie (Prometheus)*. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2018
- Skaat A, Rosman MS, Chien JL, Ghassibi MP, Liebmann JM, Ritch R, Park SC (2017): Microarchitecture of Schlemm canal before and after selective laser trabeculoplasty in enhanced depth imaging optical coherence tomography. *J Glaucoma* 26, 361–366
- Swaminathan SS, Oh D-J, Kang MH, Rhee DJ (2014): Aqueous outflow: Segmental and distal flow. *J Cataract Refract Surg* 40, 1263–1272
- Tamm ER (2009): The trabecular meshwork outflow pathways: Structural and functional aspects. *Exp Eye Res* 88, 648–655
- Tektas O-Y, Lütjen-Drecoll E (2009): Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res* 88, 769–775
- Tripathi RC: Comparative physiology and anatomy of the aqueous outflow pathway. In: Davson H, Graham LT (Hrsg.): *The eye*. Band 5; Academic Press, New York 1974
- Tripathi RC, Tripathi BJ (1972): The mechanism of aqueous outflow in lower mammals. *Exp Eye Res* 14, 73–79
- Troutman TS, Barton JK, Romanowski M (2007): Optical coherence tomography with plasmon resonant nanorods of gold. *Opt Lett* 32, 1438–1440
- Unger HH, Rohen J (1959): Studies on the histology of the inner wall of Schlemm's canal. *Am J Ophthalmol* 48, 204–210
- van Oterendorp C (2018): Bildgebung der intraskleralen Kammerwasserabflusswege – neue Einblicke für die Trabekelwerkschirurgie. *Klin Monbl Augenheilkd* 235, 309–314
- van Oterendorp C, Mans V, Fischer C, Khattab M, Wecker T (2016): 12% fat milk as OCT contrast agent for ex vivo imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 474–474
- Venkateswaran N, Galor A, Wang J, Karp CL (2018): Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: A review. *Eye Vis* 5, 13
- Wan J, Wang J-H, Liu T, Xie Z, Yu X-F, Li W (2015): Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. *Sci Rep* 5, 11398
- Wang B, Kagemann L, Schuman JS, Ishikawa H, Bilonick RA, Ling Y, Sigal IA, Nadler Z, Francis A, Sandrian MG, Wollstein G (2014): Gold nanorods as a contrast agent for Doppler optical coherence tomography. *PLoS One* 9, e90690
- Wang RK, Jacques SL, Ma Z, Hurst S, Hanson SR, Gruber A (2007): Three dimensional optical angiography. *Opt Express* 15, 4083–4097
- Wecker T, Anton A, Neuburger M, Jordan JF, van Oterendorp C (2017): Trabeculotomy opening size and IOP reduction after Trabectome® surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 255, 1643–1650

- Wecker T, van Oterendorp C, Reichardt W (2018a): Functional assessment of the aqueous humour distal outflow pathways in bovine eyes using time-of-flight magnetic resonance tomography. *Exp Eye Res* 166, 168–173
- Wecker T, van Oterendorp C, Reichardt W (2018b): Quantitative evaluation of an optimized time of flight magnetic resonance imaging procedure using a phantom setup to simulate aqueous humor flow. *Data Brief* 18, 585–589
- Welzel J (2001): Optical coherence tomography in dermatology: A review. *Skin Res Technol* 7, 1–9
- Wessing A: Fluoreszenzangiographie der Retina. Thieme, Stuttgart 1968
- Wirbelauer C, Scholz C, Hoerauf H, Bastian GO, Engelhardt R, Birngruber R, Laqua H (2001): Untersuchungen der Hornhaut mittels optischer Kohärenztomographie. *Ophthalmologie* 98, 151–156
- Yücel YH, Johnston MG, Ly T, Patel M, Drake B, Gümüş E, Fraenkl SA, Moore S, Tobbia D, Armstrong D, et al. (2009): Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: A novel „uveolymphatic“ outflow pathway. *Exp Eye Res* 89, 810–819
- Zagaynova E, Gladkova N, Shakhova N, Gelikonov G, Gelikonov V (2008): Endoscopic OCT with forward-looking probe: Clinical studies in urology and gastroenterology. *J Biophotonics* 1, 114–128
- Zhang A, Zhang Q, Chen C-L, Wang RK (2015): Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: A review and comparison. *J Biomed Opt* 20, 100901

Danksagung

Nach der Anfertigung meiner Dissertation bin ich voller Dankbarkeit für alle, die mich auf dem Weg dahin unterstützt haben. Mein Dank richtet sich zuerst an Herrn Prof. Dr. med. H. Hoerauf, der als Leiter der Klinik für Augenheilkunde der Universitätsklinik in Göttingen die Weichen für dieses Promotionsprojekt gestellt und die nötigen Rahmenbedingungen für einen reibungslosen Ablauf geschaffen hat. Zudem möchte ich meinem Ko-Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. W. Staab, für eine stets positive Haltung gegenüber meinen Projektideen und eine problemlose Begleitung meines Promotionsvorhabens danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. F. Rehfeldt aus dem Dritten Physikalischen Institut und Herrn Prof. Dr. T. Salditt samt Team des Instituts für Röntgenphysik der Universität Göttingen für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit sowie bei der Firma Carl Zeiss Meditec für die Bereitstellung der OCT-Ausstattung, die alle durch ihre Kooperation in erheblichem Maße zum Erfolg dieses Projektes beigetragen haben.

Außerdem möchte ich der gesamten Abteilung für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen und dabei insbesondere Frau C. Stanischa, Herrn M. Khattab und Frau S. Fischer danken, die mir in allen praktischen Fragen rund um die Laborarbeit, Bildverarbeitung und OCT-Anwendung hilfsbereite, verständnisvolle und herzliche Ansprechpartner/-innen waren. Gleichzeitig möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. N. Feltgen für die kompetente Beratung während der Teilnahme am OCTA-Symposium in Ulm bedanken.

Der größte Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. C. van Oterendorp, ohne den dieses Promotionsprojekt niemals möglich gewesen wäre. Ich bin überaus dankbar für die zugewandte Förderung, das umfangreiche Fachwissen, den ideenreichen Forschergeist und die große Zuverlässigkeit, die in der Summe eine Zusammenarbeit ermöglicht haben, die ich auf Augenhöhe erleben durfte und durch die mir die wissenschaftliche Arbeit trotz aller Anstrengungen viel Freude bereitet hat.