

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Berthold Seitz

**Kontaktfreier Abtrag und hochauflösende Bildgebung epiretinaler Membranen  
mit einem unverstärkten Femtosekundenlaser**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von  
Elena Khurieva-Sattler  
geb. am 26.03.1975 in Taschkent, Usbekistan

Die Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft

meiner Mutter gewidmet  
in Liebe und Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
<b>Zusammenfassung</b>	6
<b>Summary</b>	7
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Darstellung des bisherigen Wissensstandes	
1.1.1. Ultrastruktur und Topographie der epiretinalen Membranen	8
1.1.2. Diagnostik und klinische Stadien der epiretinalen Proliferationen	9
1.1.3. Chirurgische Entfernung der epiretinalen Membranen: Indikationen und Technik	11
1.1.4. Intraoperative Darstellung der Membranen	12
1.1.5. Komplikationen beim Anfärben der Membranen	14
1.1.6. Komplikationen der chirurgischen Entfernung der Membranen	15
1.2. Femtosekundenlaser als prospektiver Trend in der Augenheilkunde	
1.2.1 Geschichte und Anwendungsgebiete der Femtosekundenlaser in der Augenheilkunde	17
1.2.2 Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie und optische Schnitte	18
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>2. Material und Methodik</b>	
2.1. Material und Präparation	21
2.2. Physikalische Grundlagen für Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie	
2.2.1 Einphotonen Fluoreszenzanregung	22
2.2.2 Multiphotonen Fluoreszenzanregung	22
2.2.3 Autofluoreszenz	24
2.2.4 Second-harmonic-generation	24
2.3. Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskop	
2.3.1 Aufbau des Mikroskops	25
2.3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie	27

2.4. Gewebeabtrag	
2.4.1 Photodisruption	28
2.4.2 Abtragsparameter und Versuchsreihen	29
2.5. Fixierung, Histologie, Licht- und Elektronenmikroskopie	29
2.6. Statistische Analyse	30
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Bildgebung	
3.1.1. Transmissionsaufnahmen	31
3.1.2. Autofluoreszenzaufnahmen	31
3.1.3. Elektronenmikroskopie	33
3.2. Abtragsschwelle	
3.2.1 Versuchsreihen, Ergebnisse	35
3.3. Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanten Leistungsstufen	38
3.4. Auswirkungen unterschiedlicher Laserleistungen auf die Schnittbreite bei konstanten Abtragszeiten	44
3.5. Histologische Kontrolluntersuchungen	51
<b>4. Diskussion</b>	54
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	59
<b>6. Publikationen</b>	69
<b>7. Danksagung</b>	72
<b>8. Lebenslauf</b>	74

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ERM	epiretinale Membran
fs	Femtosekunden
FSL	Femtosekunden-Laser
GW	Gigawatt
Hz	Hertz
ILM	Membrana limitans interna
ICG	Indocyaningrün
I	Intensität
J	Joule
LASIK	Laser-in-situ-keratomileusis
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MHz	Megahertz
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
mW	Milliwatt
n	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NIR	Near Infrared
nJ	Nanojoule
OCT	Optische Kohärenztomographie
PMT	Photo Multiplier Tube
s	Sekunden
SHG	Second Harmonic Generation
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Ti:Sa	Titan:Saphir
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
W	Watt
µm	Mikrometer

## Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziel:** Die Anwendung der Femtosekundenlaser (FSL) mit niedrigen Pulsenergien (nJ- $\mu$ J) ist mittlerweile in der Hornhautchirurgie ein etabliertes Verfahren. Aber man weiß wenig über die Effekte des FSL-Lasers in der Netzhautchirurgie. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (MLSM) und FSL-Abtrag epiretinaler Membranen (ERM) untersucht.

**Methode:** Patienten mit ERM erhielten eine Pars plana Vitrektomie mit kombiniertem ILM-/ERM Peeling. Die entnommenen ERM wurden *in-vitro* mit einem unverstärkten Ti:Sapphir FSL einer Wellenlänge von 800 nm untersucht. Bei allen Membranen wurde MLSM durchgeführt und Gewebe innerhalb der ERM ohne Eröffnung der Membranoberfläche mit dem Laser entfernt. Die Gewebe wurden außerdem elektronenmikroskopisch untersucht. Zudem wurde die Retina zweier enukleierter Schweineaugen mit identischen Laserparametern behandelt, um eine mögliche Schädigung der Nervenfaserschicht festzustellen.

**Ergebnisse:** Mit MLSM durchgeführte optische Schnitte zeigten den zellulären Aufbau epiretinaler Membran in verschiedener Gewebetiefe. Die Laserenergie wurde stufenweise erhöht, bis mit MLSM ein Gewebeeffekt nachweisbar war. Dabei wurde Gewebe in Form von Linien über einen Teil der Gesamtdicke der Membran abgetragen. Präziser laserinduzierter Gewebeabtrag mit minimaler kollateraler Gewebeschädigung ließ sich durch MLSM sowie histologisch nachweisen. Netzhaut aus Schweineaugen wies bei vergleichbaren Laserparametern keine Schäden an der retinalen Nervenfaserschicht auf.

**Schlussfolgerungen:** Unverstärkte Nahinfrarot-FSL mit niedrigen Energien im nJ-Bereich eignen sich für den präzisen kontaktfreien Abtrag von ERM in zuvor festgelegten Zielgebieten. Hochauflösende MLSM gestattet die kontaktfreie funktionelle Bildgebung mit einer Auflösung im Mikrometerbereich innerhalb von Sekunden vor und nach dem Laserabtrag. Die Technik ermöglicht es, Zielgebiete zu definieren und das Voranschreiten des laserbedingten Gewebeabtrags zu kontrollieren. Die Kombination von Bildgebung und Abtrag macht die Laserscanningmikroskopie zu einer vielversprechenden minimal-invasiven Technik in der Netzhautchirurgie.

## Summary

**Objective:** Femtosecond lasers (FSL) with nJ -  $\mu$ J pulse energies are novel tools in corneal surgery, but little is known about the use of femtosecond pulses in retinal microsurgery. An experimental study investigated multiphoton laser scanning microscopy (MLSM) and laserablation of epiretinal membranes (ERM).

**Methods:** Patients with epiretinal membranes underwent pars plana vitrectomy with combined ILM-/ERM peeling. A non – amplified near infrared Ti:Sapphire FSL at 800 nm was used. In all epiretinal membranes, MLSM was performed. Without cutting of the surface, tissue within the epiretinal membranes was removed with the laser. Also, the tissues were investigated with electron microscopy. In addition, full-thickness retina of two enucleated porcine eyes was treated on the same laser parameters as epiretinal membranes to exclude nerve fiber layer damage.

**Results:** Optical sectioning with MLSM shows the cellular structure of epiretinal membranes in different depths of the tissue. To perform precise intratissue cuts, the laser power was increased gradually until an effect was detected. After treatment with the FSL, MLSM showed partial thickness line- or frame-pattern areas of ablated tissue. Precise laser induced tissue removal with minimal collateral tissue damages was shown with MLSM and ultrastructural examination. In contrast, no effect was detected in the retinal nerve fiber layer for the chosen laser parameters.

**Conclusions:** Non-amplified near infrared FSL at low nJ pulse energies can be applied for precise non-contact ablation of epiretinal membranes. High resolution MLSM offers non-contact functional imaging at micrometer resolution within seconds before and after laser ablation. The technique allows to predefine targets and to observe the progression of laser tissue removal. By combination of imaging and ablation, laser scanning microscopy is a promising tool for minimal invasive retinal microsurgery.

# 1. Einleitung

## 1.1. Darstellung des bisherigen Wissensstandes

### 1.1.1 Ultrastruktur und Topographie der epiretinalen Membranen

Die epiretinale Membran (ERM) ist eine epiretinale Proliferation, die fibrogliale Schichten auf der Oberfläche der Retina im Makulabereich formt [MESSNER et al. 1987]. Als Substrat für das Auftreten der epiretinalen Proliferation dient die Membrana limitans interna (ILM) [PARK et al. 2003]. Epiretinale Proliferationen wurden erstmals 1865 von Iwanoff beschrieben [IWANOFF 1865]. Unser heutiger Kenntnisstand wurde jedoch erst durch die Möglichkeiten der vitreoretinalen Chirurgie erreicht, die uns die histologische, ultrastrukturelle und immunozytochemische Aufarbeitung intraoperativ gewonnener Membranen erlauben.

Histologische Untersuchungen zeigen, dass die ERM Zellen gliösen und pigmentepithelialen Ursprungs sowie Fibroblasten, Makrophagen und Myofibroblasten enthält [GASS 1987; MESSNER et al. 1987; TRESE et al. 1983]. Die Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass ERM nicht stabile, sondern dynamische Strukturen sind, die ständig die Zell- und Matrix-Struktur verändern können [CLARKSON et al. 1992; HISKOTT et al. 1984; VINOIRES 1990].

Nach der Ursache werden primäre (idiopathische) ERM von sekundären ERM unterschieden [GASS 1987]: bei der idiopathischen ERM postuliert man eine gliale Proliferation der vitreoretinalen Verbindung nach hinterer Glaskörperabhebung. Es wird vermutet, dass bei der hinteren Glaskörperabhebung Glaskörperanteile an der Netzhaut adhären bleiben oder dass es zu einer Dehiszenz der Glaskörpergrenzmembran mit konsekutivem Wachstum von glialen Zellen auf der Netzhautoberfläche kommt. Es wird andererseits vermutet, dass durch die Ablösung des Glaskörpers ultrastrukturelle Defekte in der Membrana limitans interna entstehen, die eine Migration und Proliferation von Glia- und anderen Zellen der Netzhaut auf der Netzhautoberfläche ermöglichen [KAMPIK et al. 1981; WISE 1975]. Der Stimulus für die Migration und die Proliferation ist unklar. Immunozytochemisch ließen sich Interleukin 1 $\beta$  und 6, Insulin-Like Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, Tissue-Plasminogen Activator und Urokinase nachweisen [IMMONEN et al. 1996; LIMB et al. 1994 a-b; ULBIG et al. 1995; VINOIRES et al. 1995]. Letztlich führen die Proliferation dieser Zellen, ihre Metaplasie zu

Myofibroblasten und deren Kontraktion zu tangentialer Traktion an der vitreomakulären Grenzschicht [KAMPIK et al. 1980; KAMPIK et al. 1981]. Bei ausgedehnter ERM kann ein Pseudomakulaforamen mit veränderter Foveakonfiguration entstehen. Die Inzidenz idiopathischer ERM reicht von 2 % bei 50-jährigen bis 20 % bei 75-jährigen und zeigt damit eine deutliche Alterskorrelation [ROTH et al. 1971].

Bei der sekundären ERM handelt es sich um eine epiretinale Proliferation bei verschiedenen Augenkrankheiten, wie z. B. bei diabetischer Retinopathie, Fundus hypertonicus, Zentralvenenverschluss, Netzhautdystrophien, intraokularen Entzündungen (Retinitis, Uveitis), intraokularen Blutungen, intraokularen Tumoren, Netzhautenrissen und Netzhautablösung, nach Laserbehandlung, nach operativen Eingriffen, wie Kataraktoperation, Netzhautchirurgie oder nach perforierenden Augenverletzungen [GASS 1987; MARGHERIO et al. 1994; MICHELS et al. 1982].

### **1.1.2 Diagnostik und klinische Stadien der epiretinalen Membranen**

Die Diagnostik der ERM umfasst neben der binokularen Funduskopie in Mydriasis die Fluoreszenzangiographie und optische Kohärenztomographie (OCT). In der Biomikroskopie kann die Membran sowohl durch direkte Zeichen (Zellophanmakulopathie) als auch durch indirekte Zeichen (Makulapucker, Gefäßverziehung und retinale Distorsion) erkannt werden (**Abb. 1**) [GASS 1987]. Die Fluoreszenzangiographie vermag in erster Linie das Ausmaß und die Lokalisation einer Leckage darstellen (topographische Perfusionspathologie). Sie zeigt, inwieweit es zu einem sekundären zystoiden Makulaödem gekommen ist. Das OCT als tomographisches Verfahren erfasst präzise und objektiv das Ausmaß und die Lokalisation struktureller Veränderungen bei der Gliose (Strukturpathologie) [HASSENSTEIN et al. 2005]. Biomorphometrische Untersuchungen mit dem OCT bei Patienten mit ERM zeigen eine hochreflektive Membran, eine signifikant verdickte Fovea, einen Verlust der Foveavertiefung und intraretinales Zysten-vorkommen (**Abb. 2**). Die ERM ist als starre hochreflektive Membran epiretinal im OCT zu erkennen, wenn sie von der inneren Netzhautoberfläche fokal oder multifokal separiert ist. Ist die Membran vollständig adhärent, zeichnet sie sich durch eine höhere Reflektivität gegenüber der inneren Netzhautschicht. Die vollständig adhärente ERM ist häufiger als die fokal separierte [AZZOLINI et al. 1999; MASSIN et al. 2000; WILKINS et al. 1996]. In der Differenzierung von Pseudomakulaforamen bei ERM und durchgreifendem Makulaforamen

hat das OCT eine große Bedeutung. Es ist bei der Identifizierung vitreoretinaler Adhäsionen bei Makulaerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sensitiver als die Biomikroskopie (30% im OCT versus 8% in der Biomikroskopie [GALLEMORE et al. 2000]. Die Spezifität des OCT beträgt bei fovealer Dickenmessung 96% und die Sensitivität 89% [GOEBEL et al. 2000].

Je nach Ausprägung kann man verschiedene klinische Stadien der ERM unterscheiden [GASS 1987]:

Grad 0 (Zellophanmakulopathie) mit zellophanartigen Reflexen am hinteren Pol ohne sichtbare epiretinale Membran (ERM).

Grad 1 (faltige Zellophanmakulopathie) mit Fältelung der Membrana limitans interna und der inneren Netzhautschichten sowie Gefäßverziehung (Tortuositas).

Grad 2 („Makulapucker“) mit Graufärbung der Membran, ausgeprägter Gefäßverziehung und retinaler Distorsion, in 90% assoziiert mit hinterer Glaskörperabhebung (Abb.1).



Abb. 1. Klinisches Fundusbild mit epiretinale Membran, Faltung der Membrana limitans interna und Gefäßverziehung.

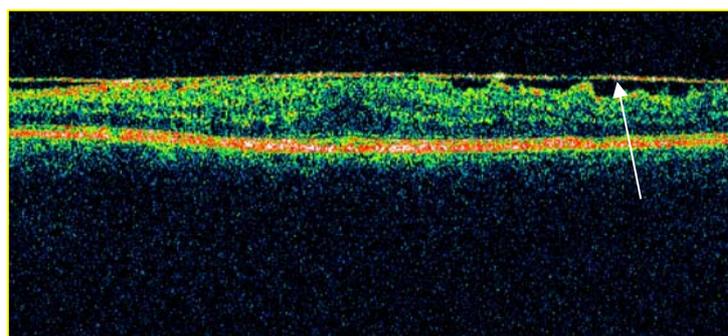


Abb. 2. OCT mit epiretinale Membran (Pfeile), diffuser Netzhautverdickung der Makula und Aufhebung der Foveavertiefung.

Das klinische Bild ist variabel und richtet sich nach dem Ausmaß der Veränderung. Die Mehrzahl epiretinaler Membranen wird als asymptomatischer Zufallsbefund entdeckt. Die Zellophanmakulopathie, die mit einer feinen Fältelung der Membrana limitans interna („surface wrinkling“) einhergehen kann, bedarf nur der Beobachtung mit vollständiger Untersuchung des Augenhintergrundes zum Ausschluß eines peripheren Netzhautrisses. Eine Therapie ist in diesem Stadium noch nicht erforderlich. Bei Zunahme der Kontraktion resultiert eine durchgreifende Netzhautfältelung, die vom Patienten als Metamorphopsien (Verzerrtsehen) wahrgenommen wird. Grund ist ein meist exzentrisch der Fovea gelegener „macular pucker“. In der Regel bemerken die Patienten eine über Monaten einsetzende Visusminderung und Metamorphopsien. In weniger als 1 % der Fälle löst sich eine ERM spontan von der Netzhaut [MICHELS et al. 1984].

### **1.1.3. Chirurgische Entfernung der epiretinalen Membranen: Indikationen und Technik**

Die Indikation zur Pars-Plana-Vitrektomie mit Membranentfernung wird gestellt, wenn Visusminderung und Metamorphopsien durch ERM verursacht werden. Die Entfernung der ERM bei der Makulatraktionschirurgie (Makulapucker-Chirurgie) verbessert das Sehvermögen und hat eine positive Auswirkung auf die Metamorphopsien (Verzerrtsehen) [KHOKHAR et al. 2003; MESSNER et al. 1987]. Eine Visusverbesserung um 2 Linien läßt sich in über 90 % der Fälle erreichen [MARGHERIO et al. 1985; MICHELS et al. 1981; MICHELS et al. 1984]. Es wurde festgestellt, dass die Entfernung der Membrana limitans interna (ILM) das Substrat für die Proliferationen entfernt und das erneute Auftreten von ERM nach der Operation und somit auch das Rezidiv der Erkrankung verhindert [PARK et al. 2003]. Aus diesem Grund werden ERM und ILM gemeinsam (en block) entfernt.

Die Pars-Plana-Vitrektomie ist ein mikrochirurgisches Verfahren bei dem zunächst das Glaskörpergel entfernt wird, um die erkrankte Netzhaut erreichen zu können. Die häufigsten Zugänge sind drei separate Inzisionen durch die Pars plana. Die Entfernung der ERM und ILM (Makulorhexis) geschieht klassischerweise durch mechanische Trennung der Membranen von der darunter liegenden Netzhaut. ILM und ERM können zusammen (en block) oder getrennt entfernt werden. Bei der Entfernung ERM mit ILM en block, nachdem der hintere Glaskörper entfernt

wurde, erfolgt die Entfernung der ERM sowie ILM durch eine umgebogene Nadel oder eine endgreifende intraokulare Pinzette [HARITOGLOU et al. 2001; MESTER et al. 2000; PARK et al. 1999; YOOH et al. 1996]. Die Entfernung sollte in der parafoveolaren Region begonnen werden, in einem Bereich, in dem die ILM dicker ist, und zwar temporal der Foveola [KARACORLU et al. 2003]. Zunächst wird ein kleiner Riss in der ILM erzeugt, dieser dann mit der Pinzette gefasst und kontinuierlich zirkulär über den hinteren Pol gezogen, ähnlich wie bei einer Kapsulorhexis in der Kataraktchirurgie [BURK et al. 2000]. Eine alternative Methode für die Entfernung der ERM ist die ERM-Viscodissection. Hier wird eine Injektion von Viscous Fluid (Healon oder Präparaten aus Methylcellulose) zwischen der ERM und der Retina durchgeführt, um die ERM von der darunter liegenden Netzhaut zu trennen [GRIGORIAN et al. 2003; McLEOD et al. 1988].

Um die Entfernung der ILM zu erleichtern, wurde die sogenannte FILMS-Technik (Fluidic Internal Limiting Membrane Separation) vorgeschlagen [MORRIS et al. 1998]. Dabei wird Hyaluronsäure unter die ILM injiziert.

#### **1.1.4. Intraoperative Darstellung der Membranen**

Intraoperativ verursacht die Transparenz und die geringe Dicke der Membranen technisch visuelle Schwierigkeiten während des Einschneidens und Fassens der Membranen, bei dem Aufsuchen des Randes des ursprünglichen Einschnittes, der Herstellung eines Flaps, sowie der Identifikation der Grenze zu noch nicht von der Netzhaut abgepeelten Membranen. Aus diesem Grund kann die Netzhaut während der Präparation verletzt werden [BURK et al. 2000; LI et al. 2003]. Im hinteren Augenabschnitt wurde Trypanblau anfänglich zur Anfärbung der ERM vorgestellt [FERON et al. 2002]. Trypanblau ist ein weit verbreiteter anionischer Farbstoff aus der Gruppe Azofarbstoffe. Trypanblau färbt selektiv die ERM, da es Bindungsaffinitäten zu einigen Elementen glialer Zellen der zellreichen ERM hat. Vor dem Hintergrund möglicher karzinogener und teratogener Eigenschaften im Tierexperiment [BRESSMAN et al. 1976] und fehlender Informationen über Langzeiteffekte am Menschen sollte die Konzentration bei ophthalmologischen Eingriffen so gering wie möglich gewählt werden [YETIK et al. 2002]. Im vorderen Augensegment wird Trypanblau im Rahmen der Kataraktchirurgie in Konzentrationen von 0,0125% bis 0,1% verwendet. Es erleichtert die Kapsulorhexis bei muren Katarakten,

indem es die Linsenkapsel färbt. Außerdem ermöglicht es die Beurteilung des Hornhautendothels der Spenderhornhaut vor Durchführung einer perforierenden Keratoplastik [GEORGIADIS et al. 1999; MELLES et al. 1999; YETIK et al. 2002]. Eine dosisabhängige Anfärbung der ERM wurde von Veckeneer et al. beschrieben [VECKENER et al. 2001]. Für die ERM-Anfärbung wird Trypanblau in der Regel in einer Konzentration von 0,15% benutzt.

Um die ILM-Entfernung zu vereinfachen, ist die intraoperative Anfärbung der Membran mit Indocyaningrün (ICG) zunächst in Experimenten [BURK et al. 2000], dann am Patienten durchgeführt worden [CHEUNG et al. 2002; DA MATA et al. 2001; GANDORFER et al. 2001 a]. Bei ICG handelt es sich um einen hydrophilen, anionischen Tricararbozyaninfarbstoff, der seit seiner Einführung 1956 für eine Reihe von diagnostischen Verfahren v.a. in der inneren Medizin angewandt wird. Im Gegensatz zur zellulären Affinität von Trypanblau färbt ICG selektiv die azelluläre ILM aufgrund der schnellen Bindung von ICG zu kollagenen Eiweißen. ERM werden mit ICG negativ dargestellt, da das hydrophile ICG die Zellmembran nicht leicht durchdringen kann [RODRIGUES et al. 2003].

Es wurde gezeigt, dass ICG in einer Konzentration von 5,0 mg/ml (kommerziell erhältliche Lösung) die ILM selektiv anfärbt [GANDORFER et al. 2001 a] und auf diese Weise die ILM-Entfernung sehr vereinfacht. Die Benutzung dieses Farbstoffs verbessert den Beginn des Peelens, da nach der Penetration der ILM mit der Nadel die darunter liegende Netzhaut differenziert werden kann. Der Rand der ILM kann leicht gesehen und mit der Pinzette gefasst werden. Der Kontrast zwischen der gefärbtem ILM und der nicht gefärbten Netzhaut ermöglicht dann eine kontinuierliche und kontrollierte Entfernung der ILM [BURG et al. 2000; LI et al. 2003].

### **„Double-staining-Technik“**

Die beschriebenen Färbereigenschaften von Trypanblau (färbt besonders ERM) und ICG (färbt selektiv die ILM, aber nicht ERM) ermöglichen in der Theorie ein zweistufiges operatives Vorgehen, um die ERM und die ILM vollständig zu entfernen und so ein optimales anatomisches und funktionelles Ergebnis zu erreichen. Zunächst kann zur besseren ERM-Darstellung Trypanblau in den luftgefüllten Bulbus eingebracht werden. Nach ERM-Entfernung wird der Vorgang mit ICG wiederholt. Dieses Verfahren wurde bereits beschrieben, muss aber in weiteren Studien hinsichtlich seiner Unbedenklichkeit evaluiert werden [STALMANS et al. 2003]. Zur

Zeit benutzen die meisten Operateure nur ICG zur Anfärbung der ILM, wobei die ERM mitentfernt werden sollte.

### **1.1.5. Komplikationen beim Anfärben der Membranen**

Trypanblau in einer Konzentration von 0,15% ist für vitreoretinale Eingriffe zugelassen [FERON et al. 2002]. Bisher gibt es auch in diesem Anwendungsgebiet keine Berichte über Komplikationen oder toxische Effekte des Farbstoffes, weder nach Anfärbung mit relativ niedrigen Konzentrationen von 0,06% noch bei Konzentrationen von 0,15% [FERON et al. 2002; HARITOGLOU et al. 2004 a-b; PERRIER et al. 2003]. Aber schon bei Konzentrationen von 0,2% zeigten sich im Tierexperiment an Kaninchen morphologische Veränderungen der äußeren Netzhautschichten mit einer Reduktion der Photorezeptoren und Verlust von Photorezeptor-Außensegmenten [VECKENER et al. 2001].

Auch die intraoperative Anwendung der ICG wird kontrovers diskutiert. Über schlechtere funktionelle Ergebnisse sowie Pigmentepithelatrophie nach ICG wurde berichtet [ENGELBRECHT et al. 2002; GANDORFER et al. 2001 b; SIPPU et al. 2001]. Die Elektronenmikroskopie von angefärbten Membranen zeigte nicht nur die ILM, sondern auch angelagerte Netzhautstrukturen. Bei allen Präparaten (10 von 10) zeigten sich Netzhautzellmembranen und in einigen Regionen sogar vollständige Fußplatten der Mueller'schen Zellen, die an der retinalen Seite der ILM adhären waren. Dies wurde als ein schädigender Effekt des ICG's gedeutet, da vorangegangene Studien bei Makulachirurgie ohne ICG die Entfernung einer reinen ILM ohne anhängende retinale Strukturen gezeigt hatten [MESSMER et al. 1998]. Da die Mueller-Zellen und besonders ihre Fußplattenmembranen beim Austausch von Stoffwechselprodukten der aktiven retinalen Neuronen mit dem Glaskörper beteiligt sind [NEWMAN et al. 1996], sollte der Verlust von Mueller-Zell-Endplatten Einfluss auf die retinale Funktion haben [WINTER et al. 2000; WOLF et al. 2004], selbst wenn sich die Zellmembran möglicherweise verschließt und die Zellen überleben [NEWMAN 1984].

Ebenso wurde festgestellt, dass der Gebrauch von ICG-Farbstoff eine vermehrte Aufnahme der Laserenergie während der Diodenlaserung (sofern eine Endolaserkoagulation erforderlich war) durch die oberflächlichen Lagen der Netzhaut verursacht und damit eine effektive intraokulare Laserbehandlung verhindert sowie zu anderen Nebenwirkungen führen kann [BENZ et al. 2003;

BLEM et al. 2002]. ICG ist ein Tricarbocyanin-Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum zwischen 790 nm and 815 nm (Maximum bei 805 nm) [WEISBECKER et al. 1999]. Wenn man ICG mit einem Licht von 808 nm (Diodenlaser) anregt, produziert ICG eine zytotoxische photothermische Reaktion, die auch benutzt werden kann, um vaskuläre Tumoren zu behandeln [CHEN et al. 1995]. Bei der ILM – Chirurgie absorbiert die mit ICG angefärbte Membran bei 810 nm die Laserenergie und verursacht einen intensiven oberflächlichen Laserherd anstelle des typischen tiefen Netzhautherdes. Daher sollte, wenn ICG und Infrarot-Fotokoagulation beim selben Patienten angezeigt sind, die Laserkoagulation vor der ICG-Applikation erfolgen [BENZ et al. 2003; BLEM et al. 2002].

Zusammenfassend können chemische Farbstoffe die Visualisierung der Membranen (ERM und ILM) bei der Präparation deutlich erleichtern und damit die Komplikationen reduzieren, die auf exzessive Manipulation auf der Netzhautoberfläche zurückgeführt werden. Die heute zur Verfügung stehenden Farbstoffe ICG und Trypanblau sind wegen möglicher toxischer Effekte nicht optimal. Daher sollten alternative Methoden für die Darstellung der Membranen entwickelt werden.

#### **1.1.6. Komplikationen der chirurgischen Entfernung der Membranen.**

Die mechanische Entfernung der Membranen (Peeling) besitzt Risiken. Besonders bei sehr adhärennten Membranen können feine Netzhautstrukturen zerstört werden. Zu den Komplikationen gehören z.B. Blutungen aus verletzten Gefäßen [KWOK et al. 2002; NAKATA et al. 2003; PARK et al. 1999] und Gesichtsfelddefekte aufgrund der Verletzung von Nervenfasern [HARITOGLOU et al. 2001; KARAKORLU et al. 2003; KIM et al. 2002]. Auch die Ruptur der Zysten und das Entstehen eines Makulalochs beim ILM-Peeling wurde beschrieben [YOON et al. 2003].

Wenn die Membranen gepeelt werden, sind meistens geringe oberflächliche intraretinale Blutungen zu sehen. Sie sind in der Regel selbstlimitierend, harmlos und verschwinden in der frühen postoperativen Phase [KWOK et al. 2002; PARK et al. 1999]. Allerdings kann die mechanische Traktion der ILM an den Netzhautgefäßen auch eine massive Netzhautblutung während der Operation verursachen. Nakata et al. (2003) beobachtete bei zwei Patienten mit

einem Makulaloch eine subretinale Blutung nach Entfernung der ILM, die auftrat, als die Ecke der gepeelten ILM eine Vene kreuzte [NAKATA et al. 2003]. Glaskörperblutungen können selbst noch nach der Operation auftreten, besonders bei Patienten mit hohem Blutdruck. Kwok et al. (2002) beschrieben zwei Patienten mit einer das Sehvermögen beeinträchtigenden Glaskörperblutung. Bei einem von ihnen entstand die Blutung spontan, beim anderen nach einem leichten Bulbustrauma [KWOK et al. 2002]. Die Autoren sind der Ansicht, dass die ILM-Entfernung bereits geschädigte Gefäße bei diesen Patienten beeinträchtigen könnte, so dass selbst ein leichtes Trauma eine signifikante Glaskörperblutung hervorrufen kann.

Karacorlu et al. (2003) beschrieben eine "iatrogene Punctata-Chorioretinopathie" als eine Komplikation des Peelings bei 15 Augen mit Makulaloch [KARACORLU et al. 2003]. Die Veränderung wurde als Ausdruck eines direkten mechanischen Traumas der Netzhaut interpretiert, das durch das Fassen der ILM mit der Pinzette entstanden sei. Diese kleinen, kaum sichtbaren chorioretinalen Läsionen in der Makularegion betrug zwischen 100 und 400 µm, variierten zwischen 8 und 15 an der Zahl und stimmten mit der Anzahl der Versuche, die ILM mit der Pinzette zu fassen, überein. Sie wurden in der Indocyaningrün-Angiographie entdeckt und führten nicht zu funktionellen Beeinträchtigungen des chirurgischen Ergebnisses.

Haritoglou et al. (2001) fand parazentral gelegene Skotome bei 59 (56,2%) der Patienten nach Peeling. 34 (57,6%) von diesen zeigten einen Nervenfasernbündeldefekt [HARITOGLOU et al. 2001]. Teile dieser Skotome beeinflussten das postoperative Sehvermögen oder hatten sich in Größe und Form während der postoperativen Phase verändert.

Bringmann et al. (1999) zeigten an intakten Augen Verstorbener, dass im Bereich der ILM-Entfernung viele Fußpunkte der Müller-Zellen und ihre inneren Ausläufer erhebliche Schwellungen und Zellschäden aufwiesen [BRINGMANN et al. 1999]. Die selektive Verzögerung der Erholung der multifokalen ERG-B-Welle 6 Monate nach der Chirurgie [TERASAKI et al. 2001] deutet ebenso auf eine Schädigung von retinalen Strukturen im Bereich der Makularegion hin [CHEUNG et al. 2002].

## **1.2. Femtosekundenlaser als prospektiver Trend in der Augenheilkunde**

### **1.2.1 Geschichte und Anwendungsgebiete der Femtosekundenlaser in der Augenheilkunde**

Die Probleme der mechanischen Entfernung von Membranen führen dazu, dass nach alternativen Techniken zum Schneiden von intraokularen Membranen gesucht wird. Die Entfernung der Membranen ohne Kontakt zur Netzhaut, wie es durch Laserlicht möglich sein könnte, sind hier besonders vielversprechend [JANKNECHT et al. 2001].

Die Entwicklung kurzer Laserpulse seit den 70er Jahren gestattet es heute, sehr rasch ablaufende Vorgänge innerhalb der Materie zu untersuchen oder sogar zu manipulieren [KELLER et al. 2003]. Die bei diesen sehr kurzen Laserpulsen entstehenden extrem hohen Lichtintensitäten ( $> 10^{12} \text{W/cm}^2$ ) können zur Bearbeitung/Zerstörung von Materialien genutzt werden [ELLSWORTH et al. 1993]. Heute lassen sich bereits chemische Reaktionen durch Femtosekundenlaserpulse kontrollieren oder Materialien (z.B. Metalle) und Gewebestrukturen (z.B. Hornhaut) mit ungeahnter Präzision bearbeiten oder schneiden. Der wesentliche Wechselwirkungsmechanismus der Femtosekundenlaserstrahlung mit biologischem Gewebe ist die sog. Photodisruption. Die möglichen Anwendungen von Femtosekundenlasern in der Ophthalmologie sind vielfältig. Basierend auf den unterschiedlichen Gewebeanforderungen, klinischen Problemen und Zielen der Behandlung lassen sich Behandlungen mit vergleichbaren anatomischen und optischen Grundvoraussetzungen definieren. Die Anwendungen der Photodisruption lassen sich in zwei Bereiche unterteilen:

- intraokular: Die Wechselwirkung findet typischerweise einige Millimeter tief im Gewebe statt.
- sub-surface: Die Wechselwirkung findet knapp unterhalb der Gewebeoberfläche (typischerweise einige 100  $\mu\text{m}$ ) statt [MROCHEN et al. 2006].

Bei der Lichtausbreitung und Fokussierung der Laserstrahlung spielen Streuprozesse eine wichtige Rolle. Da mit zunehmender Wellenlänge Streuprozesse seltener werden, muss die Laserwellenlänge an die jeweilige Aufgabe angepasst werden. So erfordert beispielsweise die Bearbeitung der stark streuenden Sklera eine größere Wellenlänge (1300 – 1700 nm) als die der fast transparenten Hornhaut, die in der Regel mit einer Wellenlänge von 1000 bis 1100 nm durchgeführt wird. Die Anwendung der Femtosekundenlaser (FSL) mit niedrigen Pulsenergien

(nJ- $\mu$ J) ist mittlerweile in der Hornhautchirurgie ein etabliertes Verfahren. Neben der Primäranwendung an der Hornhaut zur Erzeugung von Hornhautlentikeln (Flaps) in der refraktiven Chirurgie [KURTZ et al. 1998; LUBATSCHOWSKI et al. 2000; RATKAY-TRAUB et al. 2003; STONECIPHER et al. 2006] werden bereits unterschiedliche Applikationen in der Keratoplastik [SEITZ et al. 2003; SEITZ et al. 2005; SIKDER et al. 2006; TERRY et al. 2005], der Glaukomchirurgie [SACKS et al. 2003; SACKS et al. 2002; TOYRAN et al. 2005], der photodynamischen Therapie [SAWA et al. 2004] oder in der refraktiven Linsen Chirurgie [KRUEGER et al. 2005; RIPKEN et al. 2003] diskutiert oder bereits klinisch angewendet.

### 1.2.2 Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie und optische Schnitte

Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie (MLSM) basiert auf nichtlinearer Fluoreszenzanregung bei simultaner Absorption von zwei oder mehr Photonen des nahen Infrarotbereichs (NIR) (s. Kapitel **Methoden**). Diese Anregung ist nur bei hohen Photonendichten möglich, wie sie mit gepulsten Festkörperlaser mit Lichtintensitäten von  $\text{GW}/\text{cm}^2$  erreicht werden, wenn der Laserstrahl mit einem Objektiv von hoher numerischer Apertur auf ein Volumen von weniger als  $1 \mu\text{m}^3$  fokussiert wird [DENK et al. 1990]. Effekte wie „Photobleaching“ oder Gewebeschädigung sind außerhalb des Fokus vernachlässigbar. Selbst ohne Verwendung einer Lochblende ist es mit dem optischen System möglich, in einer gewissen Gewebetiefe ein Bild zu erstellen. Durch Abtasten der Probe mit einem bewegten Laserstrahl können größere Gewebebereiche auch dreidimensional erfasst werden.

Die o.g. Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie wird in Verbindung mit der „optischen Biopsie“ und „optischen Schnitten“ genutzt [KÖNIG et al. 2002]. Überschreitet nämlich die Intensität des Strahls einen Schwellenwert, geschieht im Fokus der optische Durchbruch, bei dem ein Mikroplasma entsteht, dessen Elektronen innerhalb von Picosekunden relaxieren und das Gewebe erhitzen. Dabei entsteht eine Schockwelle und in wässrigem Medium zusätzlich eine Kavitationsblase. Durch Aneinanderreihung von Kavitationsblasen sind äußerst präzise optische Schnitte in lebendem Gewebe möglich [KÖNIG et al. 1999; KÖNIG et al. 2000 a-b-c; KÖNIG et al. 2001; KÖNIG et al. 2002; KÖNIG et al. 2003; KÖNIG et al. 2004].

Klinische Studien wurden durchgeführt mit Laserpulsen im Nano-, Pico- und Femtosekundenbereich. Es hat sich gezeigt, dass fs-Laser präziser und gewebeschonender arbeiten als Pico- und Nanosekundenlaser. Durch die wesentlich niedrigere benötigte Energiedichte und die kürzere Expositionszeit ist die Reichweite der photodisruptiven Schockwelle und die Hitzeübertragung in umliegendes Gewebe wesentlich geringer [KURTZ et al. 1997; LUBATSCHOWSKI et al. 2000]. Mit verstärkten und unverstärkten FS-Laserpulsen konnten präzise intrastromale Hornhautschnitte in Augen getöteter Tiere sowie in menschlichen Augen durchgeführt werden [KÖNIG et al. 2002; KÖNIG et al. 2004; KURTZ et al. 1997; KURTZ et al. 1998; LUBATSCHOWSKI et al. 2000; NOACK et al. 1999; STERN et al. 2004].

Die Bildgebung der Zielgewebe *in-vivo* hat Konsequenzen für die Diagnostik von Erkrankungen. Die Kombination von Mikroskopie und optischen Schnitten im gleichen optischen System mit der gleichen Laserquelle bietet die Möglichkeit, in Geweben äußerst zeitnah Zielorte für Mikromanipulationen aufzusuchen, sie durchzuführen und zu kontrollieren. Erst durch eine solche Rückkopplung kann die hohe Präzision des Femtosekundenlaserstrahls therapeutisch vollständig ausgenutzt werden. So kann beispielsweise in der Netzhautchirurgie eine auf der Netzhaut befindliche Membran von wenigen Mikrometern Dicke als „Target“ festgelegt und während der Behandlung überwacht werden, um die Schädigung der benachbarten Netzhaut zu vermeiden. Mit den genannten Methoden besteht die Chance, grundlegende neue Verfahren und Verbesserungen auf mikrochirurgischem Gebiet zu entwickeln, die konkret die klinische Versorgung der Patienten verbessern.

### **1.3. Zielsetzung dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals die Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie und FSL-Abtrag epiretinaler Membranen *in-vitro* zu untersuchen:

1. Optimierung von Laserparametern mit dem Ziel, feine Schnitte mit geringer Schädigung von Nachbargewebe zu erzielen.
2. Schnelle und hochauflösende Bildgebung mit Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (MLSM) für Gewebediagnostik und Kontrolle des Laserabtrags.
3. Entwicklung eines „sehendes Laserskalpells“ mit deutlich höherer Auflösung der Bildgebung gegenüber herkömmlicher intraoperativer Stereomikroskopie sowie erheblich verbesserter Präzision des Gewebeabtrags gegenüber gegenwärtig überwiegend mechanischen Methoden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material und Präparation

An der Universitäts-Augenklinik Homburg sowie im Klinikum Offenburg erhielten 29 Patienten mit epiretinaler Membran eine Pars plana Vitrektomie mit kombiniertem ILM-/ERM Peeling ohne ICG-Anwendung (Details siehe Kapitel **Einleitung**). Im Rahmen des operativen Eingriffes wurden die epiretinalen Membranen von der Netzhaut im Makulabereich entfernt. Innerhalb von ca. 30 Minuten wurden die entnommenen Membranen unter einem Operationsmikroskop gewebe- und zellschonend präpariert. Anschließend wurden die Präparate in spezielle hermetische Gewebekammern (MiniCeM®, Miniaturized Cell Chamber for Microscopy and Micromanipulation, Jenlab GmbH, Jena, Deutschland) in BSS plus™ medium (Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland) eingelegt. Deckgläschen (Glasdicke 160 µm) verhinderten das Verrutschen der Proben. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in den hermetischen Gewebekammern bei einer Temperatur von 5<sup>0</sup>C aufbewahrt. Im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, wurde MLSM sowie Femtosekundenlaserabtragung an den Membranen durchgeführt. Die Zeit zwischen der chirurgischen Entfernung der Membranen und dem Laserabtrag betrug ca. 6-8 Stunden. 4 Membranen wurden 20±1 Stunden nach der Entfernung bearbeitet. Im Zentrum für Elektronenmikroskopie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes wurden alle Membranen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Retina zweier enukleierter Schweineaugen wurde mit identischen Laserparametern behandelt, um eine mögliche Schädigung der Nervenfaserschicht festzustellen. Vier frische enukleierte Schweineaugen wurden vom Schlachthof abgeholt und ins Labor gebracht. Die Augen wurden äquatorial eröffnet und die Netzhaut sorgfältig freipräpariert. Anschließend wurden die Netzhäute in die Gewebekammern in BSS plus™ medium eingelegt. Die Proben wurden in den Kammern bei einer Temperatur von 5<sup>0</sup> C aufbewahrt und ins Fraunhofer Institut transportiert. Die Zeit zwischen der Enukleation und dem Laserabtrag betrug ca. 5-7 Stunden. Alle Netzhäute wurden außerdem licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, wobei zwei der vier Netzhäute als Kontrolle dienten.

## **2.2. Physikalische Grundlagen für Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie**

### **2.2.1 Einphotonen Fluoreszenzanregung**

Fluoreszenz entsteht, wenn Elektronen der Fluoreszenz-Moleküle von einem höheren Energienniveau (angeregter Zustand) auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen. Um Fluoreszenz-Moleküle in den angeregten Zustand zu versetzen, bedarf es einer optischen Anregung. Getreu dem Gesetz zur Erhaltung der Energie ist der Betrag der absorbierten Energie immer größer als der Betrag der emittierten Energie.

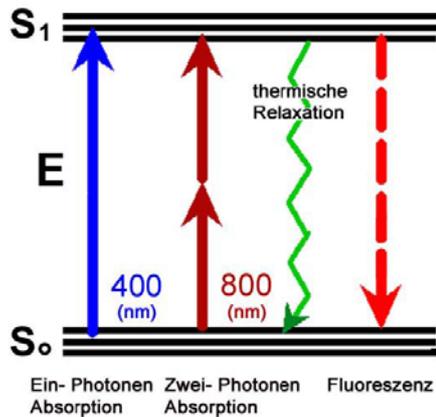
Bei der Einphotonen-Fluoreszenzmikroskopie entspricht die Wellenlänge des absorbierten Lichtes des angeregten Moleküls (i. d. R. von einem Laser) ihrer Anregungswellenlänge. Die Anregung eines Fluoreszenzmoleküls benötigt ein Photon mit einer hohen Photonenenergie. Die Energie/Wellenlänge der darauffolgenden emittierten Strahlung des Fluoreszenzmoleküls korreliert mit der Anregungsenergie/-wellenlänge.

Die Einphotonen-Absorption galt lange Zeit als einzige Möglichkeit, Elektronen auf ein höheres Energieniveau zu heben. Maria Göppert-Meyer diskutierte im Jahr 1931 erstmalig die Möglichkeit einer simultanen Absorption zweier energieärmer Photonen zur Erzeugung von Fluoreszenzen mit kürzerer Wellenlänge als die Wellenlänge, welche für die Anregung verwendet wurde [GÖPPERT-MAYER 1931].

### **2.2.2 Multiphotonen Fluoreszenzanregung**

1961 realisierten Kaiser und Garret eine Zwei-Photonen Emission [KAISER et al. 1961]. Die simultane Absorption zweier energieärmer Photonen kann nur bei einer ausreichenden Photonenflussdichte erreicht werden. Für eine Zwei-Photonenanregung bedarf es einer Photonenflussdichte von  $\Phi=10^{24}-10^{25}$  Photonen  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  [KÖNIG et al. 1999]. Diese hohe Anzahl Photonen pro Fläche und Zeit kann mit Objektiven hoher Numerischer Apertur und Laserstrahlen hoher Leistungsdichte erreicht werden.

In **Abbildung 1** wird der Unterschied zwischen Ein- und Zwei-Photonenanregung graphisch dargestellt.



**Abb. 1.** Simultane Absorption zweier energieärmer Photonen (zwei Pfeile 800 nm) oder die Absorption eines energiereichen Photons (ein Pfeil 400 nm) können Elektronen in einen angeregten Zustand versetzen ( $S_1$ ). Der Wechsel vom angeregten Zustand in den Ausgangszustand ( $S_0$ ) resultiert in thermischer Relaxation oder der gewünschten Fluoreszenz [KÖNIG et al. 2000 c].

Denk et al. gelang es 1990 erstmalig, Fluoreszenzen in lebenden Zellen basierend auf der Zweiphotonen-Anregung zu realisieren [DENK et al. 1990].

Bei der Multiphotonenmikroskopie werden anstatt eines Photons mit hoher Energie (kleine Wellenlänge) mehrere Photonen mit geringerer Energie (höhere Wellenlängen) absorbiert. Die Energie der emittierten Strahlung korreliert mit der Summe der Energien der absorbierten Photonen. Dies bedeutet, dass zwei (oder mehr) Photonen mit niedriger Energie (z.B. NIR-Bereich) einen Anregungszustand im Molekül hervorrufen, welchen normalerweise ein Photon mit höherer Energie (z.B. UV-Bereich) hervorrufen würde. Moleküle können mit NIR-Strahlen angeregt werden und daraufhin Strahlung im UV Bereich oder im sichtbaren Spektrum emittieren.

Dieses Phänomen ermöglicht es, mit NIR (near infrared) Femtosekunden-Lasersystemen sehr niedriger Leistungen lebende Substanzen zu untersuchen, ohne diese zu schädigen. Die benötigte Pulsenergie für die Bildgebung liegt im pJ-Bereich.

Die mit Hilfe von NIR-Laserstrahlen induzierte simultane Absorption mehrerer Photonen bringt gegenüber der Einphotonenabsorption viele Vorteile. Z.B. ist es möglich, durch Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur die für die Absorption notwendigen hohen Photonenflussdichten auf ein sehr kleines Anregungsvolumen zu begrenzen. Eine hohe Hintergrundfluoreszenz bedingt durch ein großes Anregungsvolumen ist bei der Multiphotonen-Mikroskopie soweit reduziert, dass gegenüber der herkömmlichen 3-dimensionalen Darstellung die dafür notwendige Lochblende entfernt werden konnte [KÖNIG et al. 1996 b]. Da die Anregung fast nur im Fokus erfolgt, ist das Ausbleichen außerhalb des Fokus zu vernachlässigen [XU et al. 1996]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines NIR-Lasers ist die Möglichkeit, im optischen Fenster zu arbeiten. Der Bereich, in dem die endogenen Absorber ein Minimum an Absorption besitzen, wird auch als optisches Fenster bezeichnet. Das optische Fenster erstreckt sich definitionsgemäß von 700 nm bis 1200 nm. Daraus resultiert eine hohe Eindringtiefe in biologischem Material. Das Arbeiten im NIR-Bereich zeichnet sich auch durch ein verringertes Schädigungspotential aus [XU et al. 1996]. Werden Wellenlängen im Bereich von 700 nm bis 1200 nm bei entsprechend niedrigen Leistungen eingesetzt, ist das Schädigungspotential so gering, dass dies eine Anwendung in der *in-vivo* Diagnostik erlaubt [KÖNIG et al. 2000 a-b; KÖNIG et al. 2001].

### **2.2.3 Autofluoreszenz**

Die Autofluoreszenz (Eigenfluoreszenz) von Stoffen ist durch die zuvor beschriebenen physikalischen Vorgänge bedingt. Nach Absorption der Laserstrahlung werden die Moleküle angeregt und emittieren daraufhin eine (nichtlineare) Strahlung, welche von Detektoren wahrgenommen und entsprechend kodiert wird, so dass ein digitales Bild erstellt werden kann. Durch entsprechende Filter und Strahlteiler wird die anregende Strahlung ausgeblendet, so dass ein relativ störungsfreies Bild erzeugt werden kann.

### **2.2.4 Second-Harmonic-Generation**

Ein weiterer (nichtlinearer) Zwei-Photonen-Effekt, welcher bei der Bildgebung genutzt wird, ist die Frequenzverdopplung (SHG – second-harmonic-generation). Hierbei beträgt die Wellenlänge

der emittierten Strahlung genau die Hälfte der absorbierten Strahlung. Die Bandbreite des Spektrums ist sehr gering und die emittierte Strahlung ist in dieselbe Richtung wie die zuvor absorbierte Strahlung gerichtet. SHG kommt bei nichtlinearen nicht zentrum-symmetrischen Materialien wie z.B. Kollagen vor.

## **2.3 Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskop**

### **2.3.1 Aufbau des Mikroskops**

Eine Weiterentwicklung des Laser-Scanning-Mikroskopes stellt das Multiphotonen-Mikroskop dar. Ein Multiphotonen-Mikroskop ist ein modifiziertes Laser-Scanning-Mikroskop mit der Möglichkeit der Multiphotonen-Anregung. Die Multiphotonen-Anregung wird mit Hilfe eines NIR-Lasers realisiert. Ein Multiphotonen-Mikroskop zeichnet sich durch ein sehr geringes Anregungsvolumen aus. Dadurch ist für die 3-dimensionale Darstellung die Verwendung einer Lochblende nicht notwendig.

Ein Titan:Saphir-Laser (Vitesse, Coherent) mit einer Wellenlänge von 800 nm, einer mittleren Ausgangsleistung von 1 Watt, einer Pulsdauer von 80 fs und einer Pulsfrequenz von 80 MHz wurde über einen Strahlenaufweiter in ein modifiziertes Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) eingekoppelt (**Tab. 1**). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mittels Baseport-Detektor [KÖNIG et al. 2000 b-c]. Die Modifikationen am LSM 410 wurden von der Arbeitsgruppe Lasermedizin des Fraunhofer Institutes für Biomedizinische Technik (IBMT, St. Ingbert, Saarland, Deutschland) durchgeführt.

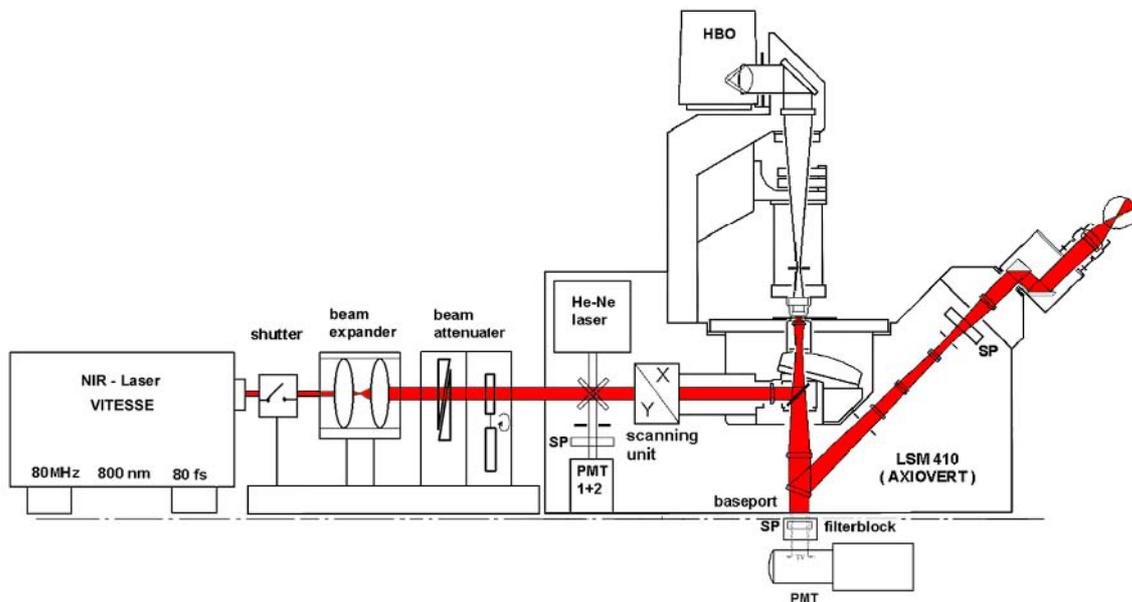
Es wurde ein 40er Immersionsölobjektiv (Zeiss Neofluar, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) mit einer 40-fachen Vergrößerung mit einer numerischen Apertur (NA) von 1,3 benutzt.

Es wurde ein Blaufilter (BG 39, Firma Schott, Jena) und Strahlteiler (E700SP, Chroma Technology, Brattleboro/VT, USA) sowie ein externer Photo Multiplier Tube (PMT) (R1527P, Hamamatsu Photonics, Japan) verwendet.

Durchschnittsleistung	> 200 mW	
Bandbreite	> 10 nm	FWHM, axiale Auflösung, Halbwertsbreite
Pulslänge	< 100 fs	
Wiederholungsrate	80 MHz	Nominale Wiederholungsrate +/- 0,8MHz
Wellenlänge	800 nm	Nominale Wiederholungsrate +/- 1 nm
Dauerhaftigkeit der Leistung	+/- 1 %	Messung über 2 h nach 15 min Anlaufzeit
Geräuschpegel	< 0,1 % rms	
Durchmesser des Strahls	1,25 mm	
Divergenz des Strahls	< 1,2 mrad	
M	< 1,2	
Polarisation	> 100:1, horizontal	

**Tab. 1:** Technische Daten des verwendeten Femtosekundenlasers (übernommen aus dem Datenblatt des Lasers, Vitesse 800, Coherent, Inc., Santa Clara, CA).

Der Grundaufbau dieses Multiphotonen-Mikroskops ist anhand nachfolgender Skizze dargestellt.



**Abb. 2.** Schematische Darstellung eines Multiphotonen-Laser-Scannig-Mikroskops [KÖNIG et al. 2000 c].

### 2.3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Probe wurde unter visueller Kontrolle in die Fokusebene gebracht. Es folgte ein elektronischer Abgleich des Kontrastes. Die Detektion des Transmissionsbildes bei einer Laserleistung von einem Milliwatt (mW) an der Probe ermöglichte die Zentrierung und die maximale elektronische Vergrößerung. Eine absolute Verdunklung des Laborraumes war Voraussetzung für die Detektion der Fluoreszenzsignale. Diese Maßnahmen waren notwendig, da der Photomultiplier eine außerordentlich hohe Empfindlichkeit besitzt und dadurch jede Photonenquelle, die nicht von der angeregten Fluoreszenz herrührte, einen Störeffekt verursachte.

Um die Fluoreszenzsignale zu visualisieren, wurde die minimale Leistung des Lasers auf maximal 5 mW erhöht. Es konnten 3 verschiedene Bilder unabhängig voneinander aufgenommen und in 3 verschiedenen Kanälen überlagert werden. So wurde z.B. das Transmissionsbild einer ERM mit dem dazugehörigen Fluoreszenzbild überlagert.

Die angefertigten digitalen Bilder wurden am Computer mit 512x512 Pixeln dargestellt. Dies entsprach einer Fläche von 320x320  $\mu\text{m}^2$  im Präparat.

Die Autofluoreszenzbilder wurden zur statistischen Auswertung zusätzlich mit einem höheren Zoomfaktor (Zoomfaktor 3) angefertigt (ebenfalls 512x512 Pixel). Hier entsprach die gescannte Fläche 106,5x106,5  $\mu\text{m}^2$ .

Die Scan-Zeit (Bildgenerierungszeit) wurde zwischen 1 Sekunde und 32 Sekunden variiert (für die Fläche von 512x512 Pixeln). Je länger die Zeit, desto höher ist die Qualität der gescannten Bilder. Die Autofluoreszenzbilder zur Auswertung der Schnittbreiten wurden stets mit einer Scan-Zeit von 32 Sekunden angefertigt.

## **2.4. Gewebeabtrag**

### **2.4.1. Photodisruption**

Die o.g. Femtosekundenlasermikroskopie wird in Verbindung mit der „optischen Biopsie“ und „optischer Ablation“ genutzt [KÖNIG et al. 2002]. Überschreitet die Intensität des Strahls einen Schwellenwert, geschieht im Fokus der optische Durchbruch, bei dem ein Mikroplasma entsteht, dessen Elektronen innerhalb von Picosekunden relaxieren und das Gewebe erhitzen. Dabei entsteht eine Schockwelle und in wässrigem Medium zusätzlich eine Kavitationsblase. Durch Aneinanderreihung von Kavitationsblasen sind äußerst präzise optische Schnitte und Ablationen in lebendem Gewebe möglich [KÖNIG et al. 2001; König et al. 2002; KÖNIG et al. 2003; KRAUSE et al. 2004]. Die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und optischen Schnitten durch das gleiche optische System und die gleiche Laserquelle bietet die Möglichkeit, in Geweben äußerst zeitnah Zielorte für Mikromanipulationen aufzusuchen, sie durchzuführen und zu kontrollieren.

Die Photodisruption [JUHASZ et al. 1996; MAINSTER et al. 1983; MROCHEN et al. 2006; VOGEL et al. 2003] ist der entscheidende Wechselwirkungsmechanismus bei der Anwendung von Femtosekundenlasern. Der Mechanismus der Photodisruption beginnt mit der Ausbildung eines laserinduzierten Plasmas. Solch ein Plasma entsteht durch stark fokussierte Laserstrahlung mit kurzer Lichtpulsdauer und ausreichender Energie, welche zu einem elektrischen Feld sehr hoher Intensität führt [ARNOLD et al. 2005]. Die hohen Feldstärken erzeugen freie Elektronen und Ionen, was man als Plasma bezeichnet. Das aufgeheizte sehr dichte laserinduzierte Plasma expandiert zunächst mit Überschallgeschwindigkeit und deformiert dabei das umliegende Gewebe [SCHAFFER et al. 2002]. Als Ergebnis der mechanischen Deformation des Gewebes folgt eine sphärische akustische Überschallwelle (Schockwelle), die sich in die umliegenden Bereiche ausbreitet. Sphärische Schockwellen verlieren schnell an Geschwindigkeit und Energie und breiten sich letztlich nur noch als akustische Wellen im Gewebe aus. Aufgrund der kurzen Lebensdauer des Plasmas ist dessen Expansion als adiabatisch (d. h. ohne Wärmeaustausch mit der Umgebung) anzusehen. Thermische Nebeneffekte sind minimiert oder werden völlig vermieden. Die Ionen, die sich im abkühlenden Plasma rekombinieren, formen eine Kavitationsblase, die im Wesentlichen aus Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Wasserdampf (CO<sub>2</sub>,

N<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O) besteht. Die spezifischen Eigenschaften der Photodisruption hängen von der Laserpulsdauer, der Laserpulsenergie und der Fokussierung ab. Die Photodisruption mit Femtosekundenlasern bietet somit die Möglichkeit, kleinere Laserpulsenergien einzusetzen und damit kleinere Bereiche der Photodisruption zu erzeugen (hohe Präzision bei Schneiden). Unnötige Schäden an umliegenden Gewebestrukturen können weitgehend vermieden werden (geringe kollaterale Schäden).

#### **2.4.2 Abtragsparameter und Versuchsreihen**

Es wurden unterschiedliche Versuchsreihen mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt:

- *Auswirkung unterschiedlicher Laserleistungen auf die Schnittbreite bei konstanter Abtragszeit*
- *Auswirkung unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanter Leistung*

Diese Versuchsreihen wurden mit unterschiedlichen Leistungen von 35 bis 80 mW durchgeführt. Die Expositionszeit wurde zwischen 0,125 ms und 1 s variiert. Es wurden konstante Geschwindigkeitsparameter verwendet (Verweildauer: 0,05195 ms pro  $\mu\text{m}$ , Wiederholrate: 64 Hz, Scangeschwindigkeit: 0,0192 m/s.). Die Schnittlänge betrug jeweils 512 Pixel (= 320  $\mu\text{m}$ ). Die Schnitte wurden intrastromal durchgeführt (Tiefe: 6-10  $\mu\text{m}$ ). Eine statistische Auswertung erfolgte bei Bildern, die nach den Laserschnitten mit einem höheren Zoom aufgenommen wurden (512 Pixel = 106,5  $\mu\text{m}$ ).

#### **2.5 Fixierung, Histologie, Licht- und Elektronenmikroskopie**

Sofort nach dem Laserabtrag wurden die Proben mit einer Fixierlösung (Phosphatpuffer nach Sörensen 0,06M, Paraformaldehyd 1% und Glutaraldehyd 1%) fixiert. Kontrollproben wurden direkt nach der chirurgischen Entfernung fixiert. Bis zur Einbettung wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt (1-2 Tage).

Im Zentrum für Elektronenmikroskopie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes wurden licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Einbettung erfolgte in Epon. Zur Stabilisierung wurde die Membran vor der eigentlichen Einbettung in Epon in 4% Agarose fixiert. Danach folgt eine Nachfixierung in 2% Osmiumtetroxid-Lösung für 1h. Nach kurzen Waschschritten mit Phosphatpuffer wurde über eine 50 - 100% Ethanolreihe und 100% Aceton entwässert. Die Infiltration mit dem Kunststoff erfolgte über eine aufsteigende Aceton-Epon-Mischung (2:1-1:1-1:2). Vor der 24h-Polymerisation bei 60° wurden die Proben bei 40° in reinem Epon inkubiert. Mit dem Ultramikrotom von Leica, UltracutR) wurden Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt (Licht- und Elektronenmikroskopie). Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat 2% und Bleicitrat nach Reynolds. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Tecnai 12 G<sup>2</sup> (Tecnai 12 G<sup>2</sup>, FEI Company Hillsboro, Oregon, USA) durchgeführt. Die Schweinenetzhaut (Kontrolle) wurde auch licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

## **2.6. Statistische Analyse**

Die Auswertung der Schnittbreiten erfolgte anhand der Autofluoreszenzbilder, die mit einem höheren Zoom angefertigt worden waren. Die Schnittlänge entsprach 106,5 µm (512 Pixel). Die Schnittbreite wurde jeweils an drei Stellen eines Schnittes ausgemessen (linker Rand, Mitte, rechter Rand). Der Abstand zwischen den Messpunkten betrug ca. 50 µm. Die Messungen wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms „Image J“ durchgeführt. Hierfür wurde ein stets gleichbleibender digitaler Zoomfaktor verwendet.

Bei der gemessenen Größe (Schnittbreite) handelt es sich um ein quantitatives Merkmal. Zur Beschreibung wurden statistische Maßzahlen wie Mittelwert, Standardabweichung, Varianz, und Median ermittelt. Microsoft Excel 2003 für Windows XP (Microsoft Office) wurde für die statistische Analyse angewendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Bildgebung

Mittels Halogenlampe des Mikroskops wurden ERM eingestellt. Danach wurde die Bildgebung durch Laserscanningmikroskopie angewendet. Das Grundprinzip wurde bereits in Kapitel 2.3 beschrieben. Die MLSM ermöglicht eine gute kontaktfreie Darstellung epiretinaler Membranen. Die Stellen der Probe waren von Interesse, welche eine hohe Anzahl an Zellen aufwiesen. Nach Fokussierung der oberflächlichen Gewebeschicht ( $z = 0$ ) wurde jeweils die Gewebetiefe bestimmt, so dass der Laserstrahl in tiefere Gewebeschichten fokussiert werden konnte. Angewendet wurden Transmissionsaufnahmen und Autofluoreszenzaufnahmen.

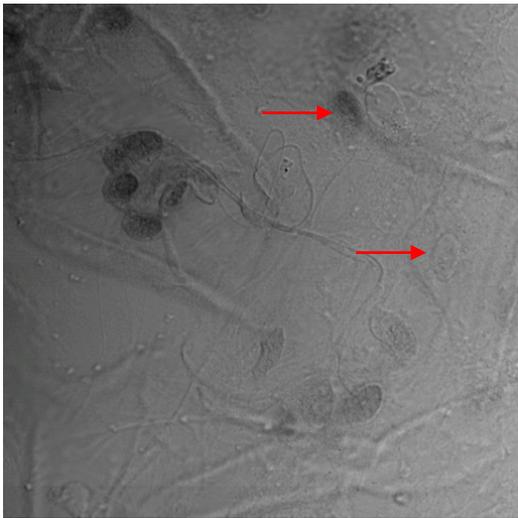
#### 3.1.1. Transmissionsaufnahmen

Der Transmissionsmodus ist aufgrund der schnellen Darstellungszeiten sehr hilfreich bei der Orientierung und beim Aufsuchen der zu untersuchenden Stellen im Präparat. Schon mit sehr geringer Leistung von 1 mW sowie mit kurzen Bildgenerierungszeiten von 1 s für eine Fläche von  $320 \times 320 \mu\text{m}^2$  sind Bilder hoher Qualität möglich. Im Transmissionsmodus lässt sich die Oberfläche der ERM mit den einzelnen Zellen sehr gut darstellen (**Abb 1a; 2a**). Aufgrund der schlechten Fokussierung in der Tiefe ist dieser Modus für die Darstellung der Laserschnitte jedoch kaum geeignet.

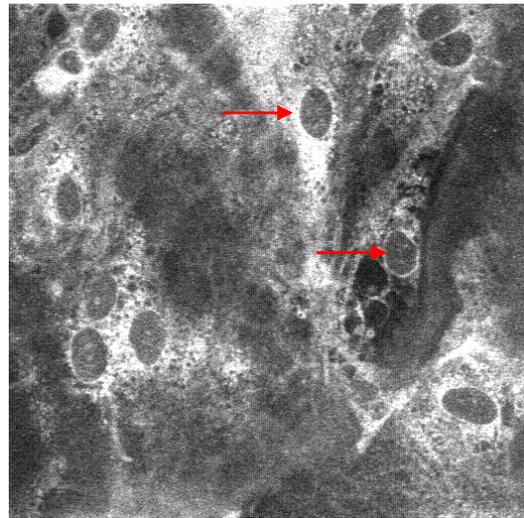
#### 3.1.2. Autofluoreszenzaufnahmen

Autofluoreszenzaufnahmen zeigten ebenso den zellulären Aufbau epiretinaler Membranen (**Abb. 1b; 2b**). Im Autofluoreszenzmodus ist es möglich, zielgenaue Aufnahmen von einer bestimmten Ebene anzufertigen. Über Filter und Strahlteiler wird gewährleistet, dass nur die emittierte Strahlung der untersuchten Ebene vom Detektor (PMT) aufgefangen und das Signal in ein digitales Bild umgewandelt wird. Stufenlos in jeder Tiefe konnten ERM-Schichten abgebildet werden (optische Tomographie). Zwischen den Zellen lagen in den Autofluoreszenzaufnahmen die Zonen höherer Fluoreszenz, die das Vorliegen von Kollagenfasern anzeigten. Autofluoreszenzaufnahmen gestatten die kontaktfreie funktionelle Bildgebung im fokussierten Bereich. Aufgrund der intrastromalen Lage der Laserschnitte eignet sich dieser Modus für die Darstellung und Auswertung von Laserschnitten besser als der Transmissionsmodus.

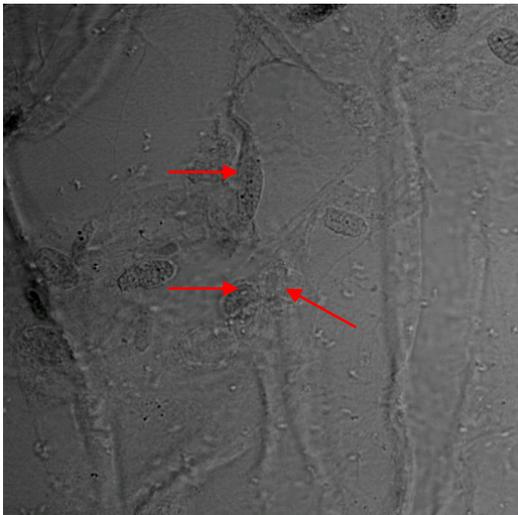
Sowohl im Transmissions- als auch im Autofluoreszenzmodus lag die zur Bildgebung erforderliche Leistung höchstens bei 5 mW.



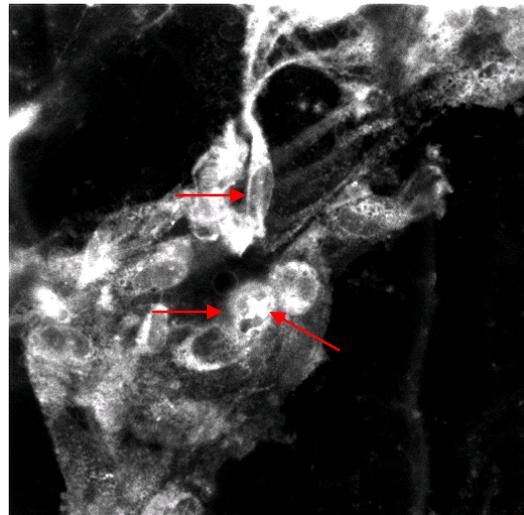
**Abb. 1a:** Transmissions-LSM  
Zellen der ERM (Pfeile) Laserleistung 1 mW



**Abb. 1b:** Fluoreszenz-LSM  
Zellen der ERM (Pfeile) Laserleistung 4 mW



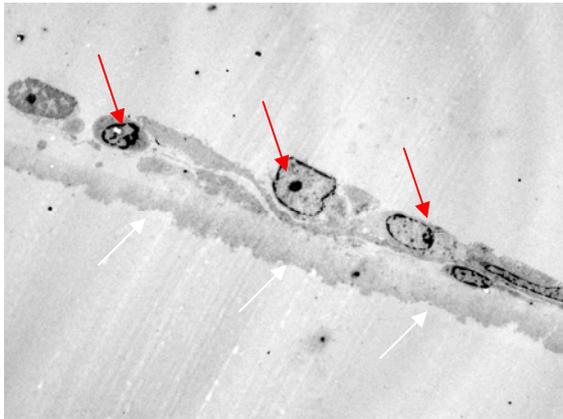
**Abb. 2a:** Transmissions-LSM  
Zellen der ERM (Pfeile), Laserleistung 1 mW



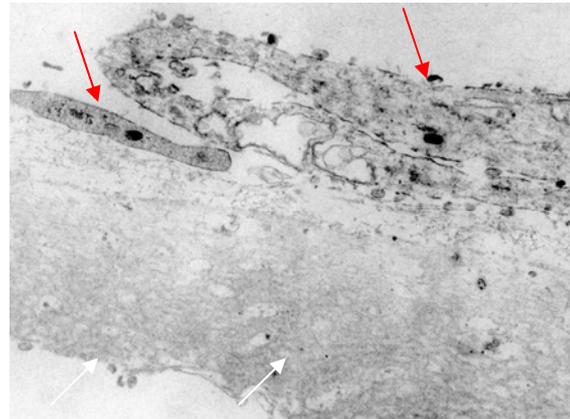
**Abb. 2b:** Fluoreszenz-LSM  
Zellen der ERM (Pfeile), Laserleistung 4 mW

### 3.1.3. Elektronenmikroskopie epiretinaler Membranen

Als Kontrolle wurden 3 mikrochirurgisch entfernte ERM elektronenmikroskopisch untersucht. Die Membranen enthalten Zellen glösen und pigmentepithelialen Ursprungs sowie Fibroblasten, Makrophagen und Myofibroblasten (Abb. 3; 4). Im frühen Stadium der ERM, wenn die klinischen Veränderungen geringer sind, bestehen die Membranen meistens aus Fibroblasten, retinalen Pigmentepithelzellen, Makrophagen und einigen Gliazellen. In Membranen sind Pigmentepithelzellen häufig zu finden mit folgenden typischen Charakteristika: große Kerne und mehrere Melanin-Granula im Zytoplasma (Abb. 5a; 5b). Die Fibroblasten, die in diesen Membranen gefunden wurden, sind hauptsächlich junge Fibroblasten mit ovalen Formen, größeren Kernen und fehlender Reife, aktiv Kollagenfasern zu synthetisieren.

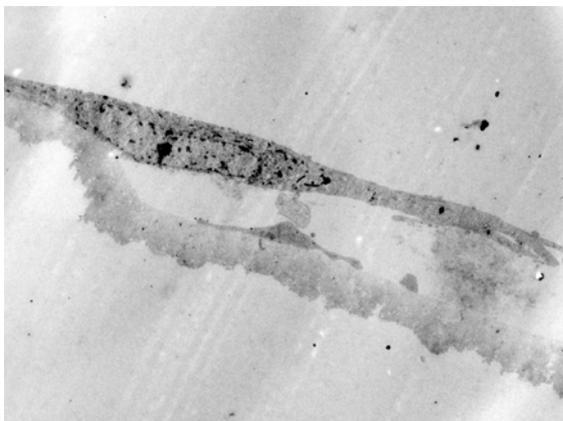


**Abb. 3** (x1900)

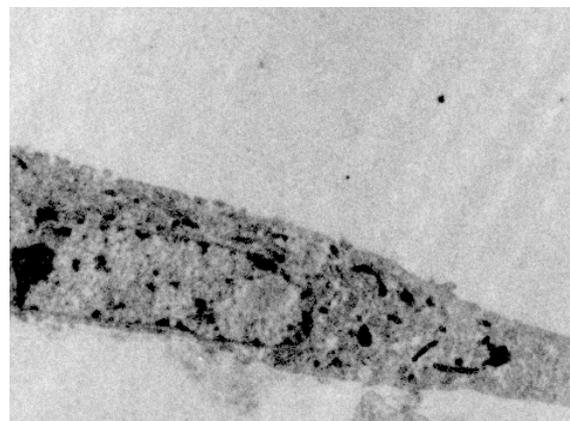


**Abb. 4** (x18500)

Elektronenmikroskopische Abbildungen einer ERM mit typischem zellulären Aufbau der Membran (rote Pfeilen). Die Membrana limitans interna zeigte sich dagegen als eine azelluläre Struktur (weiße Pfeilen).



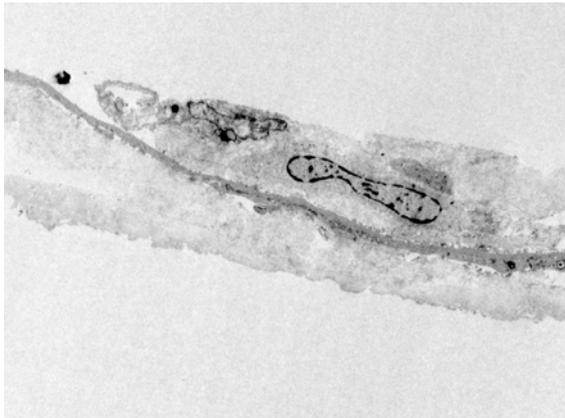
**Abb. 5a** (x2900)



**Abb. 5b** (x23000)

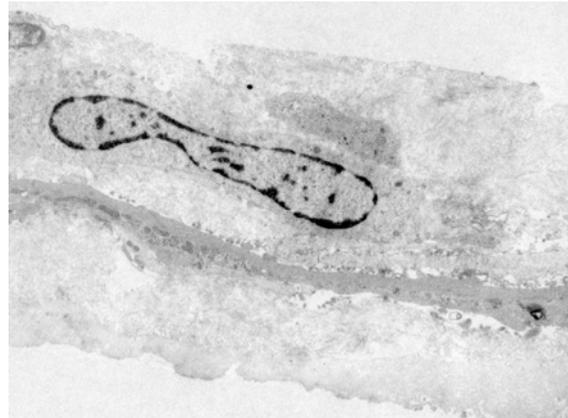
Elektronenmikroskopische Abbildung einer RPE-Zelle, mit typischen Melanin-Granula im Zytoplasma.

In den späteren Stadien enthalten die Membranen meistens vorwiegend spindelförmige Fibroblasten (Myofibroblasten), die einen lang gestreckten Zelleib und spindelförmige Zellkerne besitzen (**Abb. 6a; 6b**). Sie synthetisieren Kollagenfibrillen, Hyaluronan, Proteoglykane (**Abb. 7a; 7b**).



**Abb. 6a** (x2900)

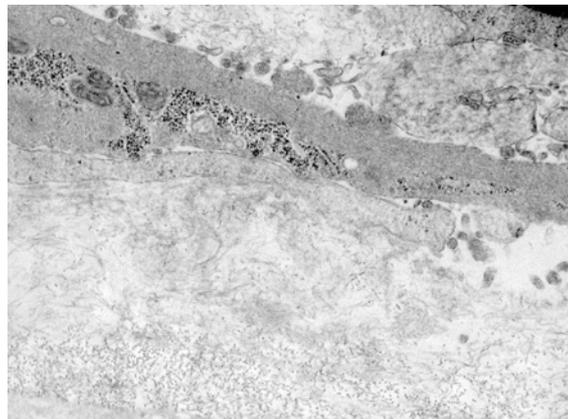
Elektronenmikroskopische Abbildung eines Myofibroblasten mit einem lang gestreckten Zelleib und mit typischen spindelförmigen Zellkernen.



**Abb. 6b** (x6800)



**Abb. 7a** (x23000)



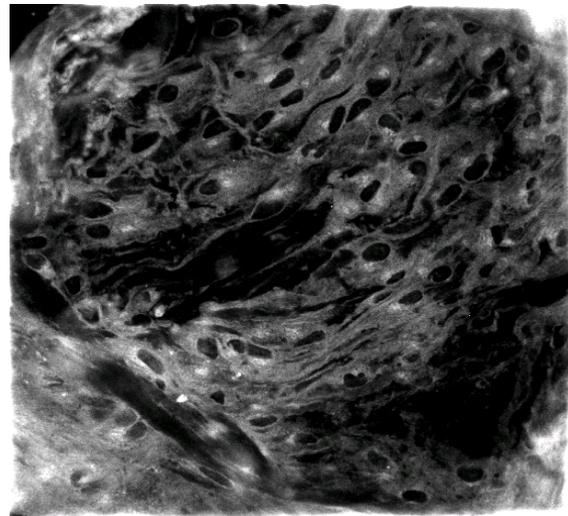
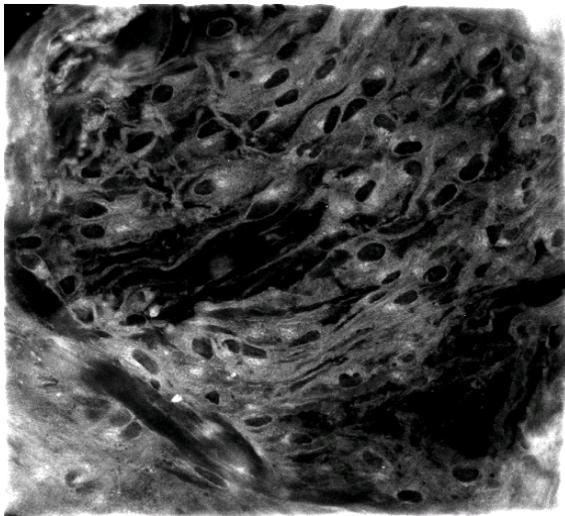
**Abb. 7b** (x23000)

Elektronenmikroskopische Abbildung der extrazellulären Matrix, in der zahlreiche Kollagenfasern und eine große Anzahl von Proteoglykan-Komplexen zu finden sind.

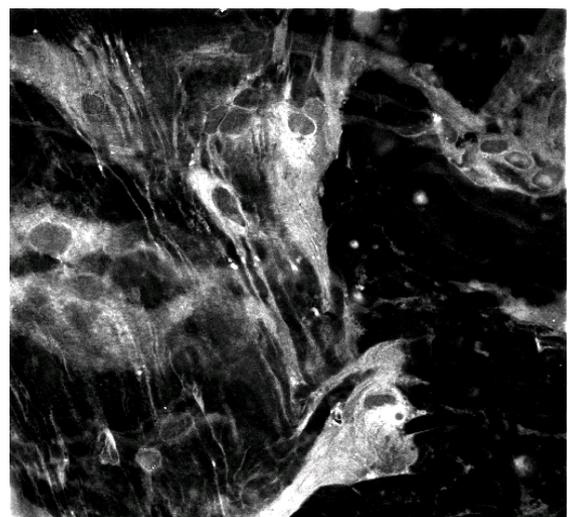
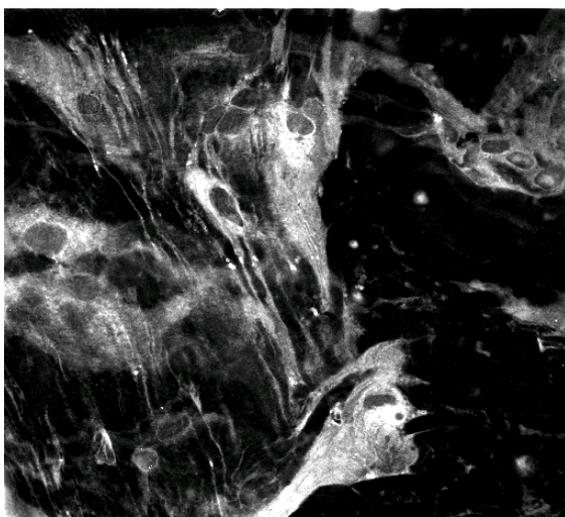
### 3.2 Abtragsschwelle

In einem line-scan wurde der Laserstrahl auf einer Linie über die Fokusebene geführt. Steuerbare Variablen waren die Länge der Linie, die Leistung der Laserstrahls, und die Expositionszeit. Die Länge der Linie betrug in unseren Versuchen 320  $\mu\text{m}$ .

Nachdem die ERM mit MLSM dargestellt worden war, konnte eine Linie mit dem Computermodul festgelegt werden. Auf dieser Linie wurde der Laserstrahl fokussiert und die Leistung wurde stufenweise erhöht, bis mit MLSM ein Gewebeeffekt nachweisbar war. Die Ausgangsleistung lag in unseren Versuchen bei 10 mW. **Bei 10, 15, 20, 25 mW in 1 s** ließ sich **kein laserinduzierter Gewebeabtrag** durch MLSM nachweisen (**Abb. 8b, 9b**).

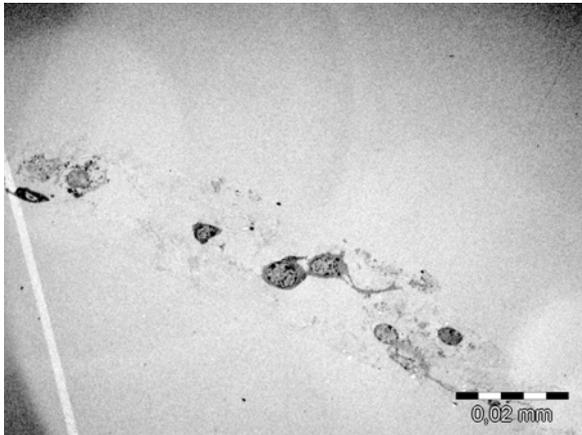


**Abb. 8a-8b:** Fluoreszenz-LSM von ERM vor (8a) und nach Laserbehandlung (8b). Leistung 15 mW, Expositionszeit 1 s. Intakte ERM, keine Laserabträge vorhanden.



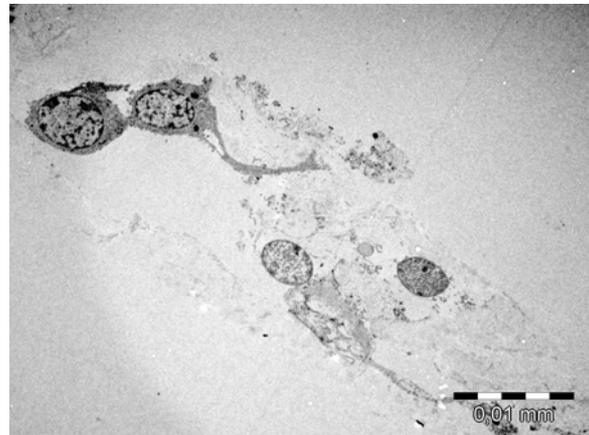
**Abb. 9a-9b:** Fluoreszenz-LSM von ERM vor (9a) und nach Laserbehandlung (9b). Leistung 20 mW, Expositionszeit 1 s. Intakte ERM, keine Laserabträge vorhanden.

Auch **elektronenmikroskopisch** waren bei 10, 15, 20, 25 mW in 1 s keine **laserinduzierte Gewebeerträge** nachzuweisen (Abb. 10a-10b; 11a-11b).

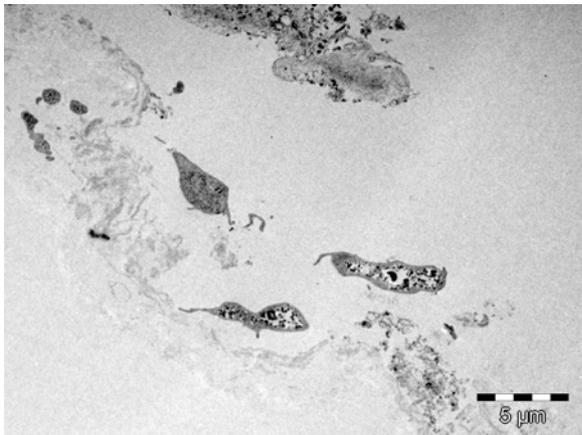


**Abb. 10a**

Elektronenmikroskopie von ERM nach Laserbehandlung. Leistung 15 mW, Expositionszeit 1 s.

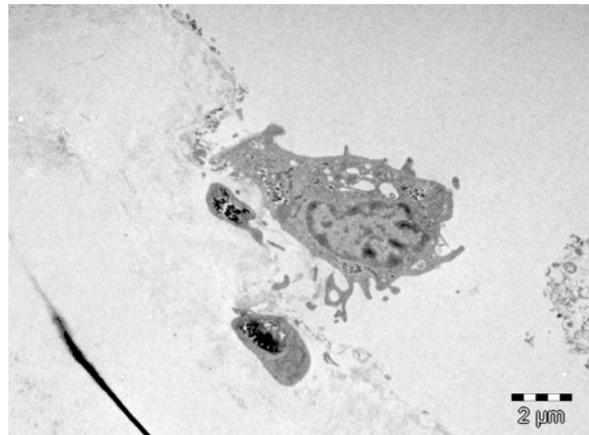


**Abb. 10b**



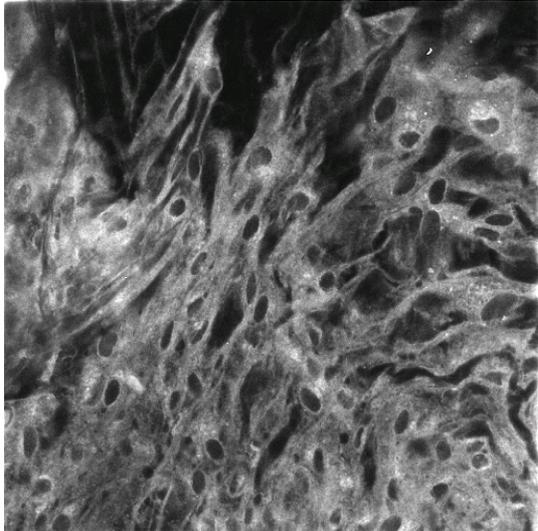
**Abb. 11a**

Elektronenmikroskopie von ERM nach Laserbehandlung. Leistung 20 mW, Expositionszeit 1 s.

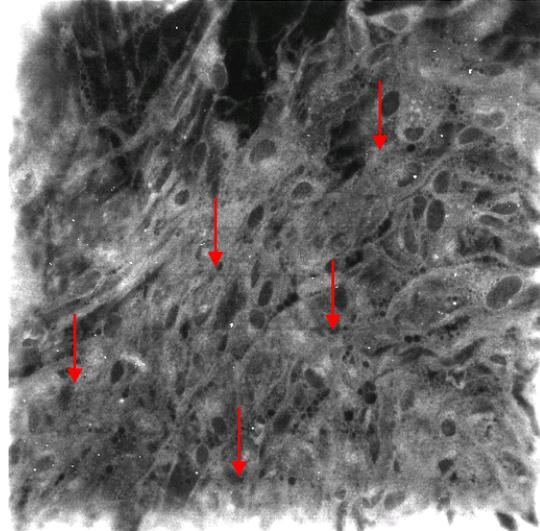


**Abb. 11b**

Die minimalen Laserparameter, bei denen Lasereffekte im Fluoreszenzbild sichtbar waren, betragen **30 mW in 1 s**. Dabei wurde Gewebe in Form von Linien über einen Teil der Gesamtdicke der Membran abgetragen (**Abb. 12b**).

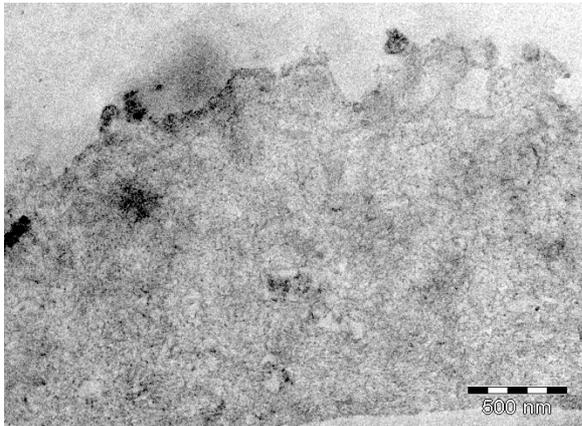


**Abb. 12a:** Fluoreszenz-LSM von ERM vor dem FSL-Abtrag



**Abb. 12b:** Fluoreszenz-LSM von ERM nach dem FSL-Abtrag (linienförmige Laserabträge, Pfeile)

Histologisch waren bei **30 mW in 1 s keine laserinduzierte Gewebeabträge** nachzuweisen (**Abb. 13a-13b**).



**Abb. 13a**

Elektronenmikroskopie von ERM nach Laserbehandlung. Leistung 30 mW, Expositionszeit 1 s.

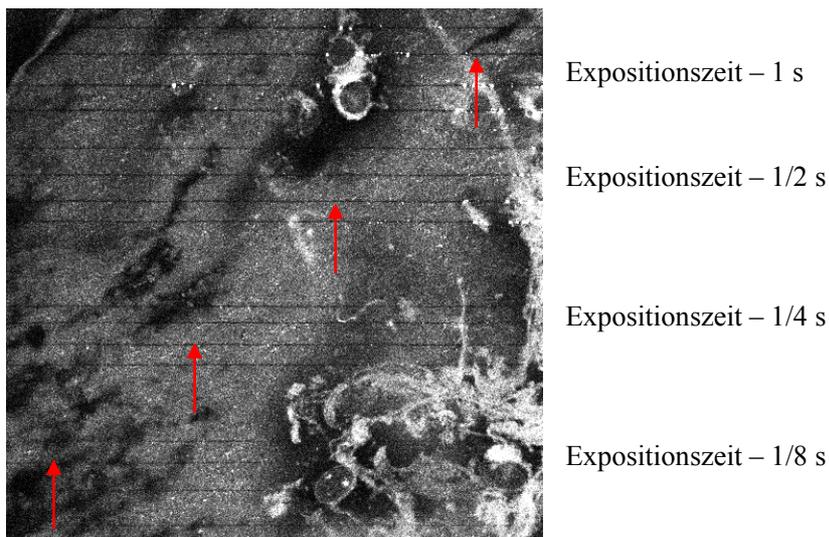


**Abb. 13b**

Die Fluoreszenzmikroskopie allein kann Photobleaching vom Gewebeabtrag nicht unterscheiden, weil in beiden Fällen keine Fluoreszenz mehr erfolgt [HEISTERKAMP et al. 2005]. Deswegen waren histologische Untersuchungen zur Kontrolle notwendig.

### 3.3 Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanten Leistungsstufen

Die Leistung wurde weiter stufenweise erhöht (niedrigste Leistung 40 mW; Leistungsstufen 10 mW) und bei konstanten Leistungsstufen wurden die Abtragszeiten variiert (von 1 s bis 1/8 s) (Tab. 2). Bei 40 mW waren FSL-Schnitte bei verschiedenen Expositionszeiten (1 s, 1/2 s, 1/4 s, 1/8 s) sichtbar. Hier kann man die Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanten Leistungsstufen beobachten (Abb. 14). Wird bei konstanter Laserleistung die Abtragszeit verringert, so werden auch die Schnittbreiten kleiner (Tab. 2.1-2.5; Abb. 15-19). Bei einer Expositionszeit von 1/8 s waren die Schnitte kaum noch durchgängig (Abb. 14).



**Abb. 14:** Fluoreszenz-LSM von nach dem FSL-Abtrag. Leistung 40 mW konstant, variable Expositionszeit (linienförmige Laserabträge, Pfeile)

**Tab. 2** stellt die Versuchsreihen und die verwendeten Parameter dar.

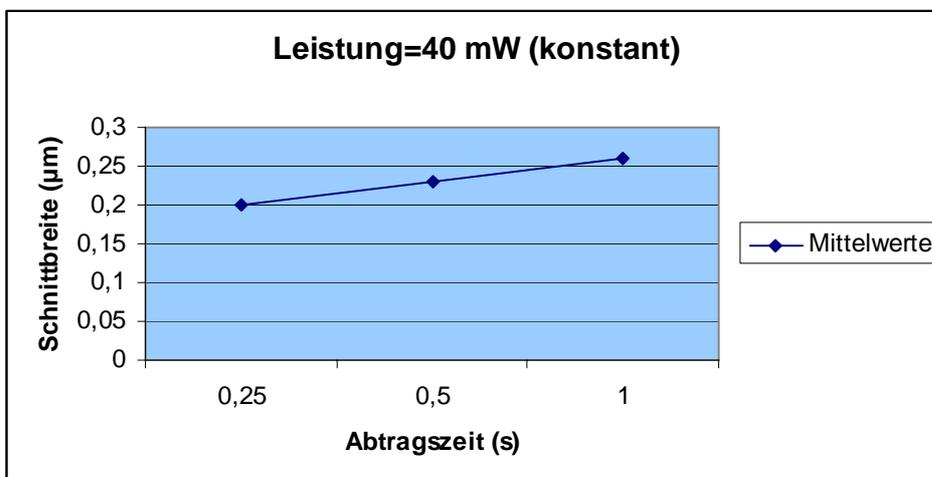
<b>I</b>		<b>II</b>		<b>III</b>		<b>IV</b>		<b>V</b>	
Leistung konstant (mW)	Abtragszeit (s)								
<b>40</b>	1	<b>50</b>	1	<b>60</b>	1	<b>70</b>	1	<b>80</b>	1
	1/2		1/2		1/2		1/2		
	1/4		1/4		1/4		1/4		
	1/8		1/8		1/8		1/8		

**Tab 2:** Übersicht über die Versuchsreihen. Konstante Abtragsleistungen bei unterschiedlichen Abtragszeiten.

### Versuchsreihe I:

Leistung konstant (mW)	Expositionszeit (s)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung	Varianz	Median
<b>40</b>	1	90	0,2600	0,0614	0,0037	0,282
	1/2	90	0,2317	0,0460	0,0021	0,245
	1/4	90	0,2087	0,0386	0,0015	0,208
	1/8	90	s.u. / n.a.	s.u. / n.a.	s.u. / n.a.	s.u. / n.a.

**Tab 2.1.** Ergebnisse der Versuchsreihe I, n=Anzahl Messwerte, s.u. / n.a. = sichtbar aber undeutlich/nicht auswertbar.

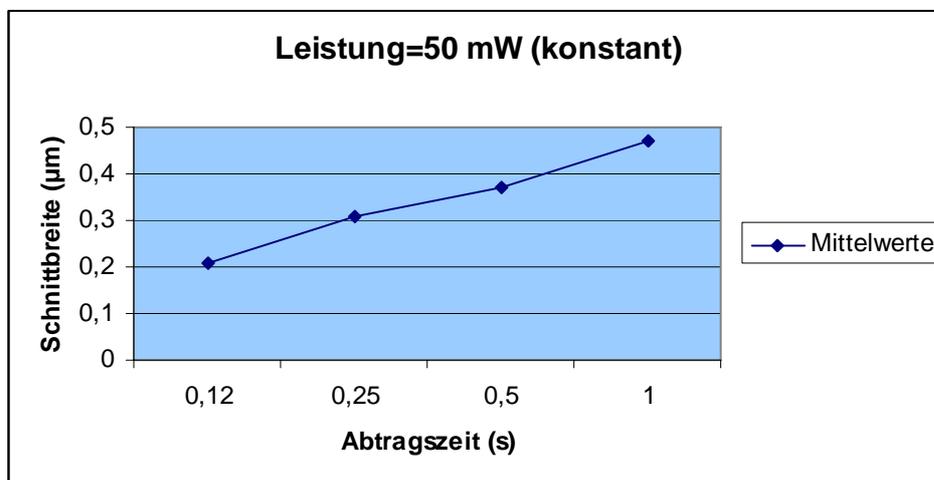


**Abb. 15:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe I, konstante Abtragsleistung.

## Versuchsreihe II:

Leistung konstant  (mW)	Expositionszeit  (s)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
<b>50</b>	1	90	0,4723	0,0937	0,0087	0,490
	1/2	90	0,3708	0,0615	0,0037	0,392
	1/4	90	0,3092	0,0506	0,0025	0,312
	1/8	90	0,2143	0,0380	0,0014	0,208

**Tab 2.2:** Ergebnisse der Versuchsreihe II, n=Anzahl Messwerte.

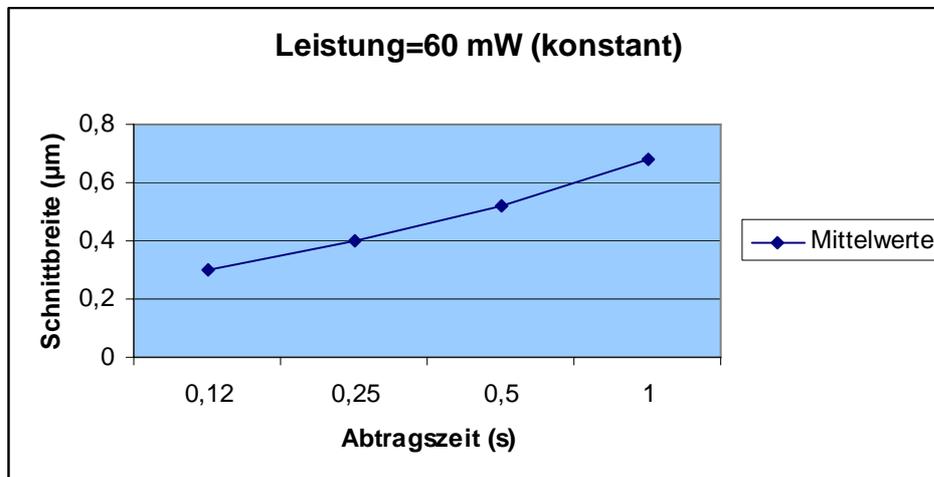


**Abb. 16:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II, konstante Abtragsleistung.

### Versuchsreihe III:

Leistung konstant (mW)	Expositionszeit (s)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
<b>60</b>	1	90	0,6828	0,1056	0,0111	0,698
	1/2	90	0,5203	0,0912	0,0083	0,542
	1/4	90	0,4029	0,0548	0,0020	0,416
	1/8	90	0,3051	0,0316	0,0010	0,312

**Tab 2.3:** Ergebnisse der Versuchsreihe III, n=Anzahl Messwerte.

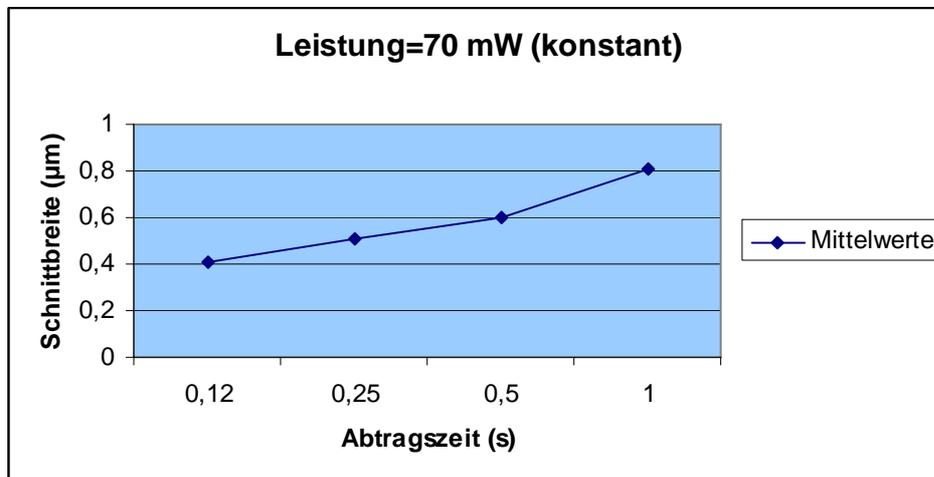


**Abb. 17:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe III, konstante Abtragsleistung.

### Versuchsreihe IV:

Leistung konstant (mW)	Expositionszeit (s)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
70	1	90	0,8011	0,1242	0,0154	0,832
	1/2	90	0,6036	0,0730	0,0053	0,598
	1/4	90	0,5099	0,0355	0,0012	0,498
	1/8	90	0,4100	0,0433	0,0018	0,416

**Tab 2.4:** Ergebnisse der Versuchsreihe IV, n=Anzahl Messwerte.

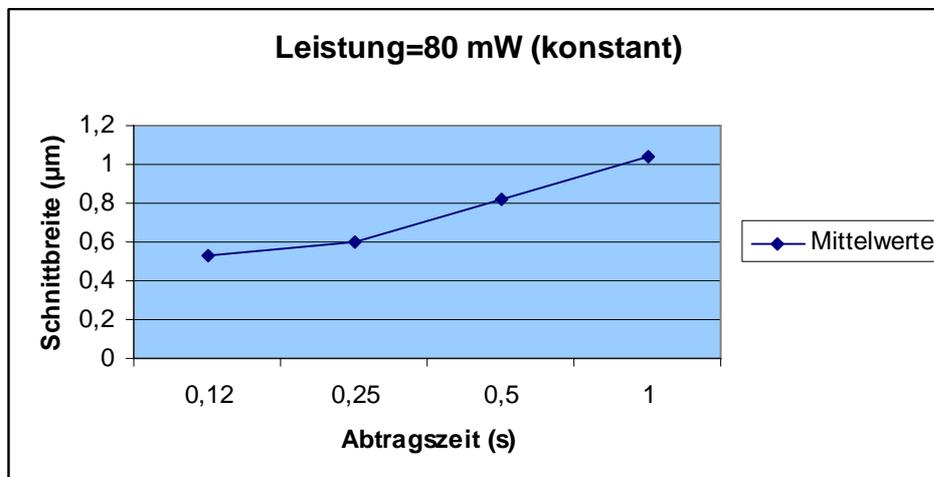


**Abb. 18:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe IV, konstante Abtragsleistung.

### Versuchsreihe V:

Leistung konstant (mW)	Expositionszeit (s)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
80	1	90	1,0415	0,1530	0,0134	1,015
	1/2	90	0,8123	0,0807	0,0065	0,832
	1/4	90	0,6015	0,0392	0,0015	0,598
	1/8	90	0,5372	0,0487	0,0023	0,524

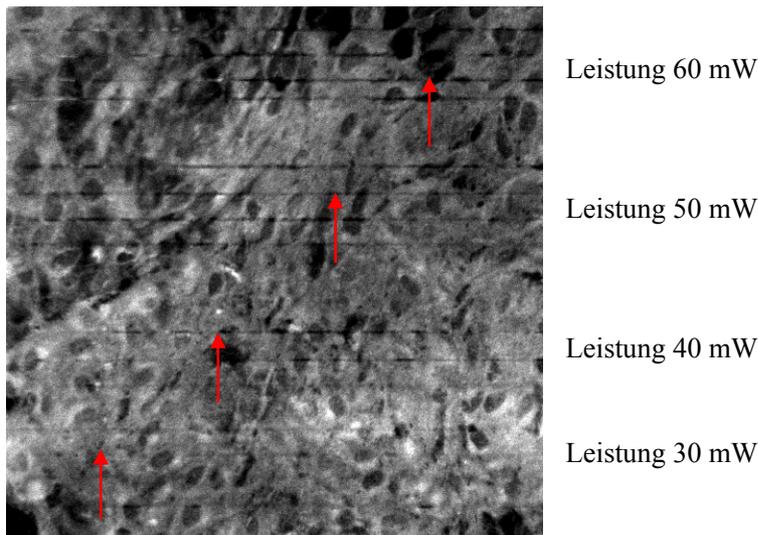
**Tab 2.5:** Ergebnisse der Versuchsreihe V, n=Anzahl Messwerte.



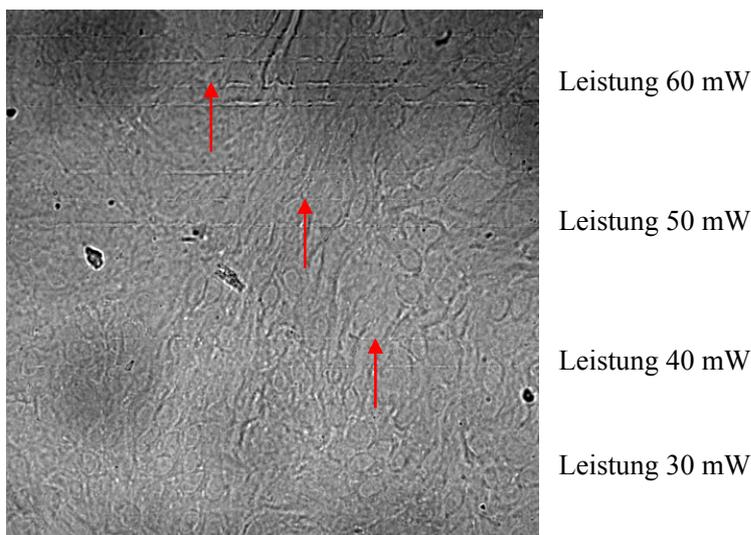
**Abb. 19:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe V, konstante Abtragsleistung.

### 3.4 Auswirkungen unterschiedlicher Laserleistungen auf die Schnittbreite bei konstanten Abtragszeiten

Bei konstanten Abtragszeiten wurde die Laserleistung variiert (40 bis 80 mW) (Abb. 20a; 20b, Tab. 3). Wird bei konstanter Abtragszeit die Leistung des Lasers erhöht, so wird auch die Schnittbreite größer. Die Versuche zeigten, dass eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Schnittbreite und der Leistung besteht (Tab. 3.1-3.4; Abb. 21-24).



**Abb. 20a:** Fluoreszenz-LSM nach dem FSL-Abtrag. Expositionszeit 1 s konstant, variable Leistung (linienförmige Laserabträge, Pfeile).



**Abb. 20b:** Transmissions-LSM nach dem FSL-Abtrag. Expositionszeit 1 s konstant, variable Leistung (linienförmige Laserabträge, Pfeile). Die Schnitte, die mit einer Leistung von weniger als 60 mW durchgeführt worden waren, sind nur noch sehr schwach erkennbar.

**Tab. 3.** stellt die Versuchsreihen und die verwendeten Parameter dar.

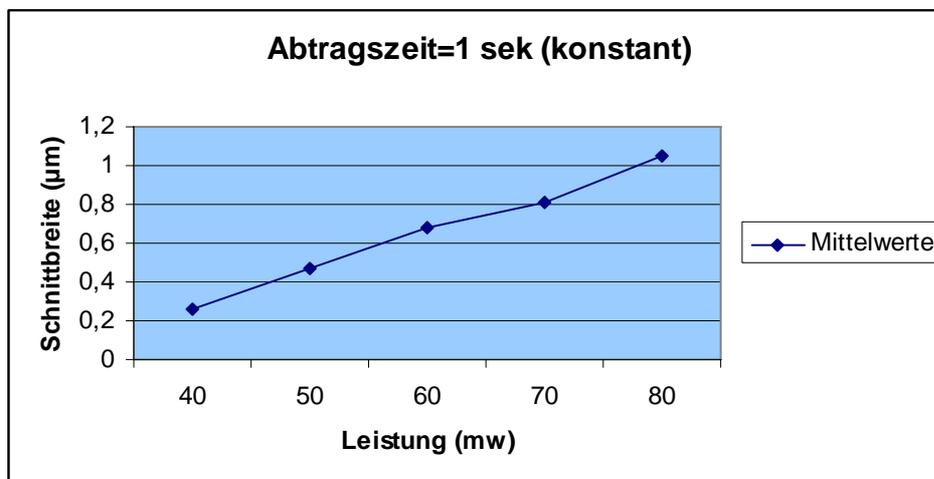
<b>I</b>		<b>II</b>		<b>III</b>		<b>IV</b>	
Abtragszeit konstant	Leistung						
(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)
<b>1</b>	40	<b>1/2</b>	40	<b>1/4</b>	40	<b>1/8</b>	40
	50		50		50		50
	60		60		60		60
	70		70		70		70
	80		80		80		80

**Tab 3:** Übersicht Versuchsreihen: konstante Abtragszeiten bei unterschiedlichen Abtragsleistungen.

**Versuchsreihe I:**

Expositionszeit konstant (s)	Leistung (mW)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung	Varianz	Median
<b>1</b>	40	90	0,2600	0,0614	0,0037	0,282
	50	90	0,4723	0,0937	0,0087	0,490
	60	90	0,6828	0,1056	0,0111	0,698
	70	90	0,8011	0,1242	0,0154	0,832
	80	90	1,0415	0,1530	0,0134	1,015

**Tab 3.1:** Ergebnisse der Versuchsreihe II, n=Anzahl Messwerte.

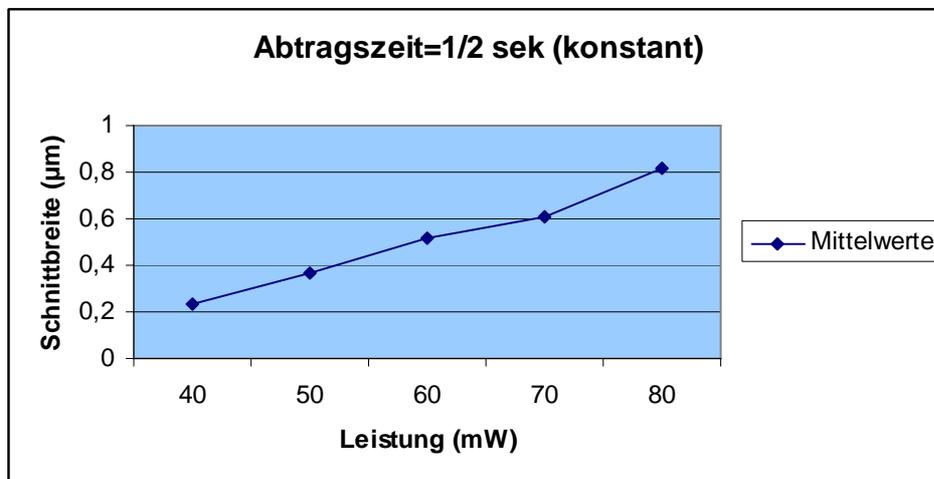


**Abb. 21:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe I, konstante Abtragszeit von 1 s.

## Versuchsreihe II:

Expositionszeit konstant  (s)	Leistung  (mW)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
1/2	40	90	0,2317	0,0460	0,0021	0,245
	50	90	0,3708	0,0615	0,0037	0,392
	60	90	0,5203	0,0912	0,0083	0,542
	70	90	0,6036	0,0738	0,0053	0,598
	80	90	0,8123	0,0807	0,0065	0,832

**Tab 3.2:** Ergebnisse der Versuchsreihe II, n=Anzahl Messwerte.

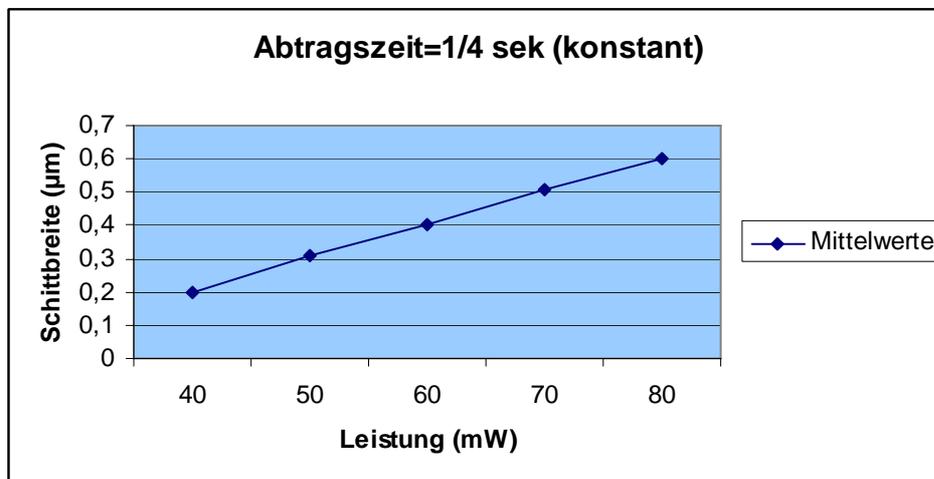


**Abb. 22:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II, konstante Abtragszeit von 1/2 s.

### Versuchsreihe III:

Expositionszeit konstant  (s)	Leistung  (mW)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
1/4	40	90	0,2087	0,0386	0,0015	0,208
	50	90	0,3092	0,0506	0,0025	0,312
	60	90	0,4029	0,0548	0,0020	0,416
	70	90	0,5099	0,0355	0,0012	0,498
	80	90	0,6015	0,0392	0,0015	0,598

**Tab 3.3:** Ergebnisse der Versuchsreihe III, n=Anzahl Messwerte.

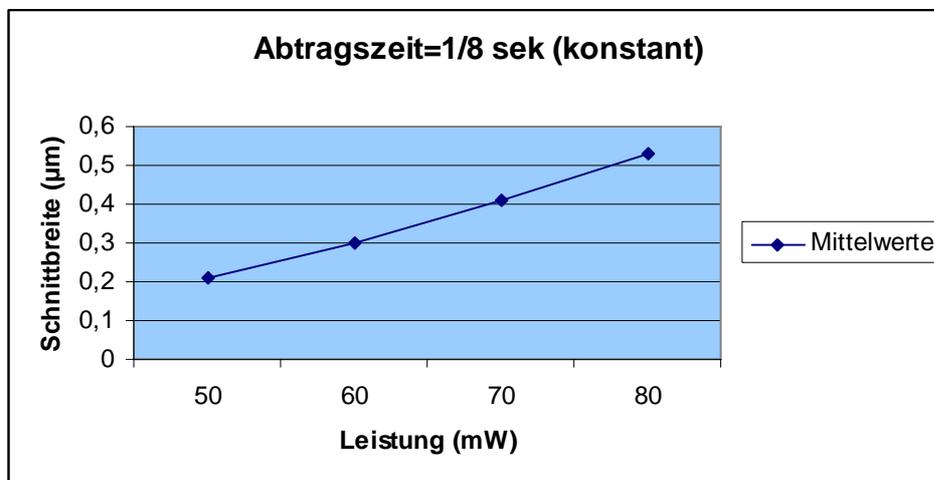


**Abb. 23:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe III, konstante Abtragszeit von 1/4 s.

### Versuchsreihe IV:

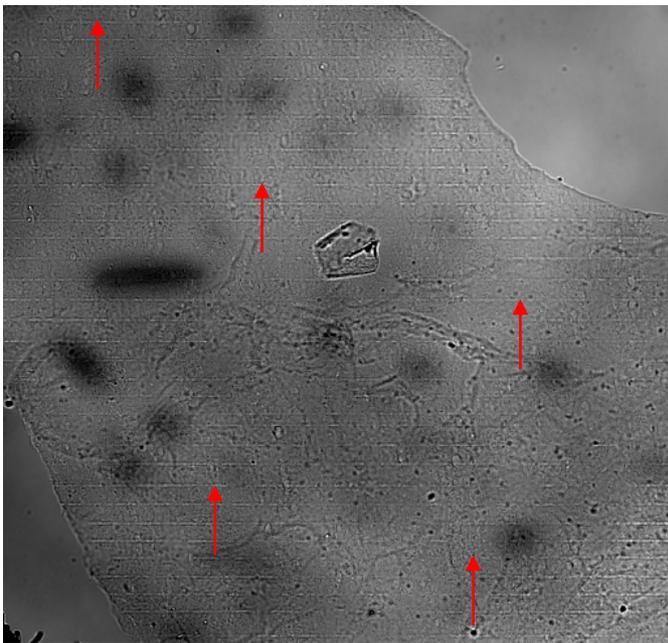
Expositionszeit konstant (s)	Leistung (mW)	n	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )			
			Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median
1/8	40	90	s.u. / n.a.	-	-	-
	50	90	0,2143	0,0380	0,0014	0,208
	60	90	0,3051	0,0316	0,0010	0,312
	70	90	0,4100	0,0433	0,0018	0,416
	80	90	0,5372	0,0487	0,0023	0,524

**Tab 3.4:** Ergebnisse der Versuchsreihe I, n=Anzahl Messwerte, s.u. / n.a. = sichtbar aber undeutlich/nicht auswertbar.



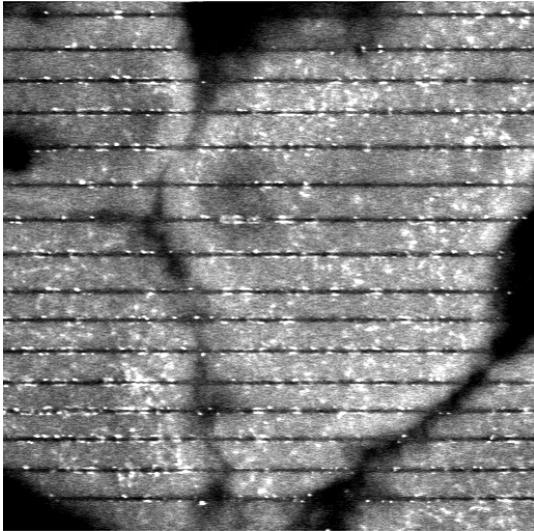
**Abb. 24:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe IV, konstante Abtragszeit von 1/8 s.

Für die Darstellung von Laserschnitten ist der Transmissionsmodus kaum geeignet, u.a. wegen der intrastromalen Lage der Laserschnitte, schlechter Fokussierung in der Tiefe und schlechter Kontrastierung der Schnittländer an sich. Nur Schnitte mit höheren Energiewerten waren deutlich erkennbar. Bei unseren Versuchen waren Schnitte, die mit einer mittleren Leistung von weniger als 60 mW durchgeführt worden waren, nur noch sehr schwach erkennbar und somit in diesem Darstellungsmodus nicht eindeutig auszuwerten. Ab 60 mW waren die Schnitte deutlich erkennbar (**Abb. 25**).

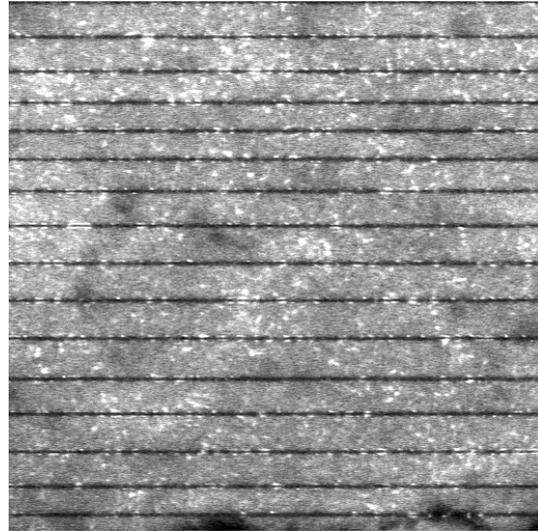


**Abb. 25:** Transmissions-LSM nach dem FSL-Abtrag (512/512 Pixel  $320/320 \mu\text{m}^2$ ) Leistung 60 mW, Expositionszeit 1 s (linienförmige Laserabträge, Pfeile).

In der Fluoreszenz-LSM ist die exakte Fokussierung der anregenden Strahlung des Lasers in der zu untersuchenden Ebene möglich. Wir erhielten somit vor und nach dem Laserabtrag nur von den Ebenen ein Bild, in denen auch der Laserstrahl beim Schneiden des Gewebes fokussiert war. Die Bereiche, in denen Laserabträge erfolgt waren, konnten keine Strahlung absorbieren oder emittieren, da dort kein Gewebe mehr vorhanden war. Die Auswertung der Schnittbreiten erfolgte anhand der Autofluoreszenzbilder, die mit einem höheren Zoom angefertigt worden waren (**Abb. 26a-b**). Die Schnittlänge entsprach  $106,5 \mu\text{m}$  (512 Pixel).

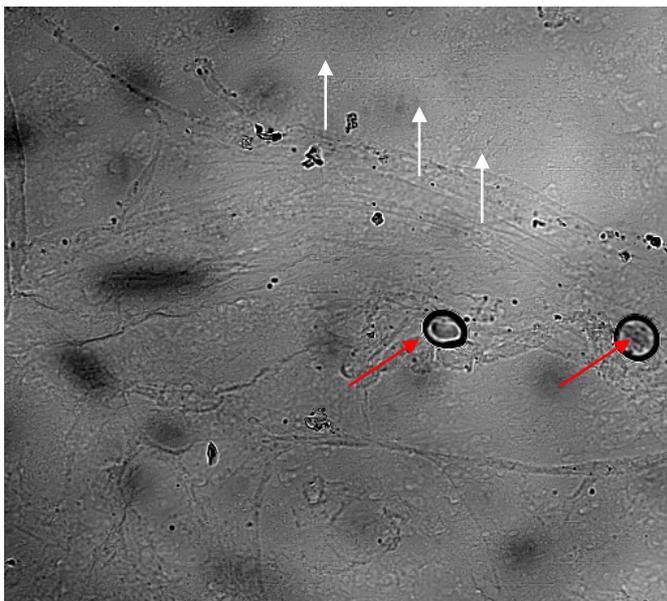


**Abb. 26 a:** Fluoreszenz-LSM nach dem FSL-Abtrag. Leistung 70 mW  
Expositionszeit 1/2 s  
(512/512 Pixel, 106,5/106,5  $\mu\text{m}^2$ ).



**Abb. 26 b:** Fluoreszenz-LSM nach dem FSL-Abtrag. Leistung 70 mW  
Expositionszeit 1/4 s  
(512/512 Pixel, 106,5/106,5  $\mu\text{m}^2$ ).

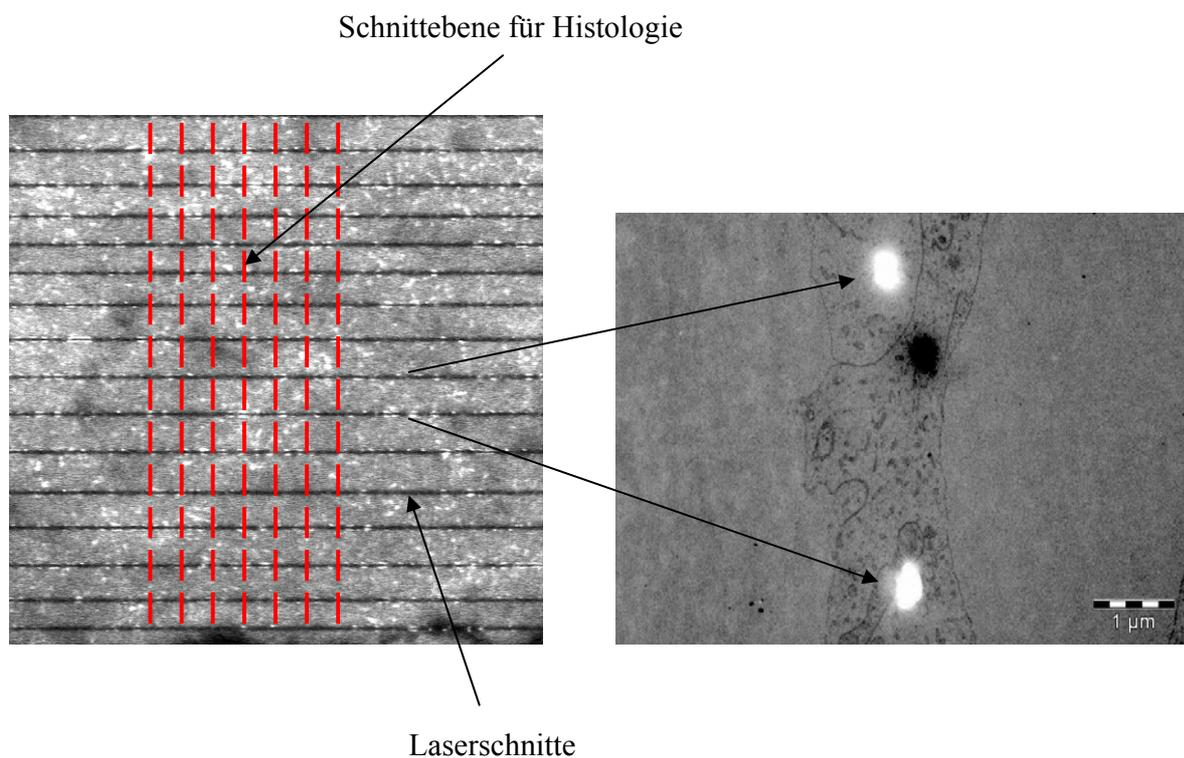
Unmittelbar nach der Durchführung der Laserschnitte waren in den Transmissionsaufnahmen entlang der Schnitte kleinere gasgefüllte Blasen zu erkennen (**Abb. 27**). Diese entstanden aufgrund der lokalen Hitzeeinwirkung und waren nach wenigen Sekunden nicht mehr sichtbar. Die Ausprägung dieser Blasen war sehr unterschiedlich und war u.a. auch davon abhängig, wie feucht die Probe und deren Umfeld war. Blasen waren bei unseren Versuchen schon ab 50 mW sichtbar.



**Abb. 27:** Transmissions-LSM nach dem FSL-Abtrag, Leistung 50 mW, Expositionszeit 1 s  
Linienförmige Laserabträge kaum erkennbar (weiße Pfeile), Blasen (rote Pfeile)  
(512/512 Pixel 320/320  $\mu\text{m}^2$ ).

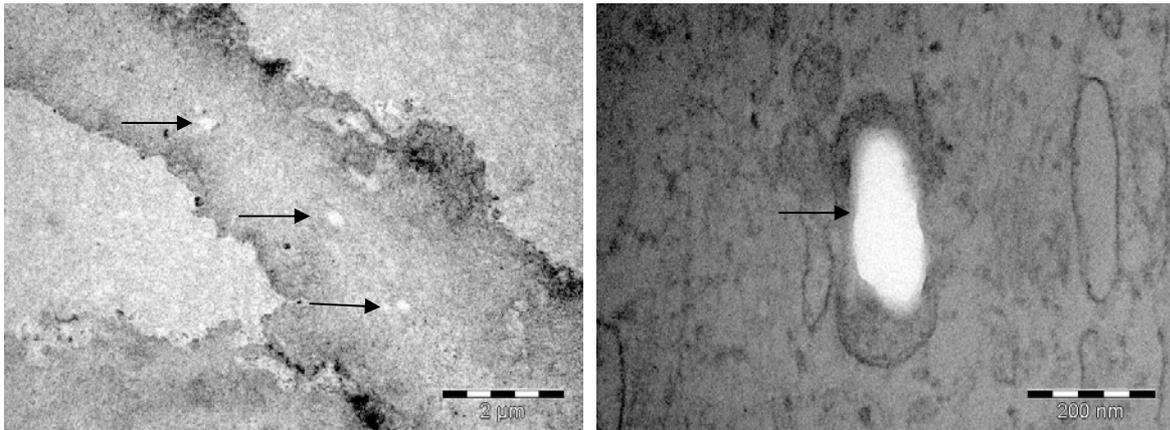
### 3.5 Histologische und ultrastrukturelle Kontrolluntersuchungen.

Aufgrund der Schnittrichtung bei der histologischen Aufarbeitung sehen wir in den elektronenmikroskopischen Bildern die Querschnitte der durchgeführten Laserabträge, wobei die Laserschnitte als Öffnungen erscheinen (**Abb. 28**).

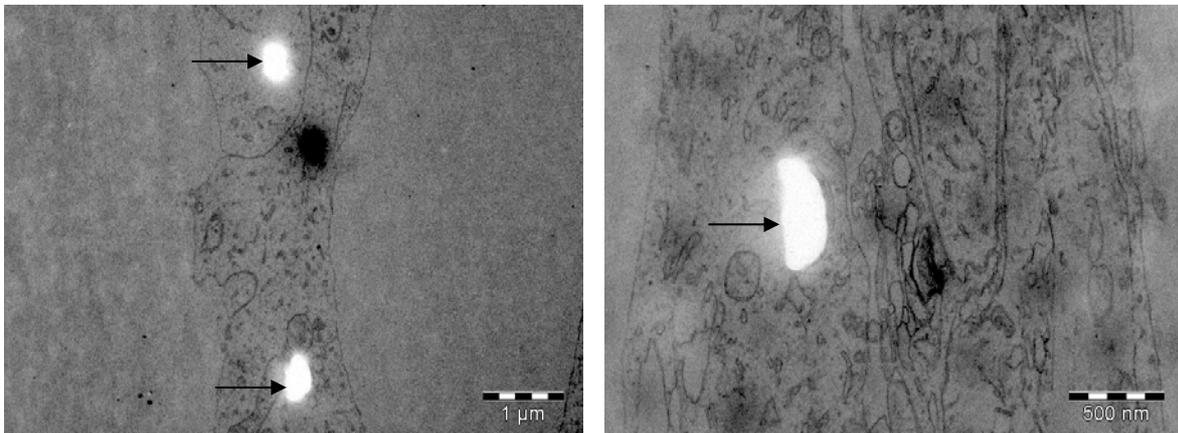


**Abb. 28:** Schnittrichtung des Lasers und histologische Aufarbeitung.

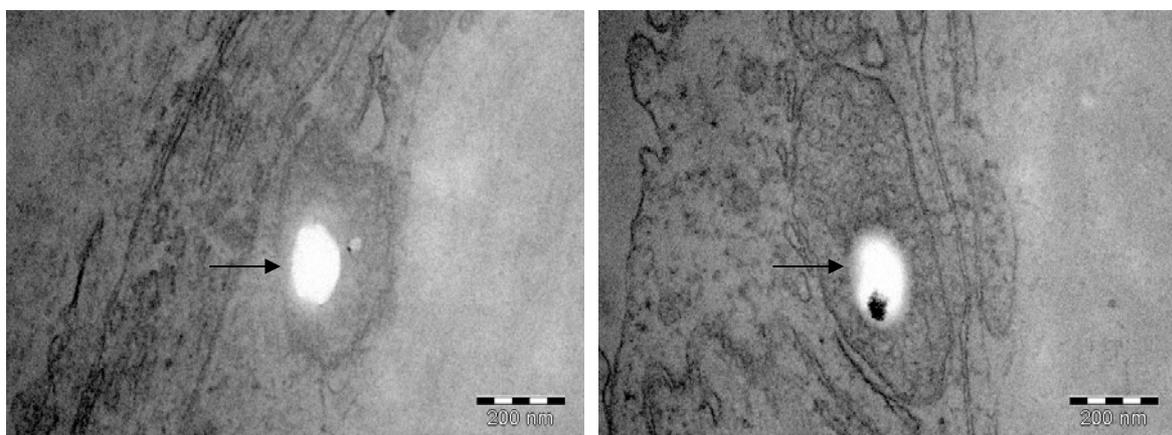
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die intrastromalen runden oder ovalen Laserschnitte (**Abb. 29-31**). Die Schnittbreiten in der Transmissionselektronenmikroskopie korrelierten sehr gut mit den ermittelten Schnittbreiten der Autofluoreszenzaufnahmen. Dies zeigt, dass sich Autofluoreszenzaufnahmen zur Auswertung der Schnittbreiten gut eignen. Die Schnittbreiten in der Transmissionselektronenmikroskopie waren deutlich kleiner als die Schnittbreiten in der Autofluoreszenzaufnahmen. Aufgrund der schlechten Fokussierung in der Tiefe bei der intrastromalen Lage der Laserschnitte ist dieser Modus für die Darstellung von Laserschnitten kaum geeignet.



**Abb. 29 (a-b):** Elektronenmikroskopische Abbildung einer ERM nach Laserbehandlung. Ovale Laserschnitte (Pfeile). Leistung 50 mW, Expositionszeit 1 s.

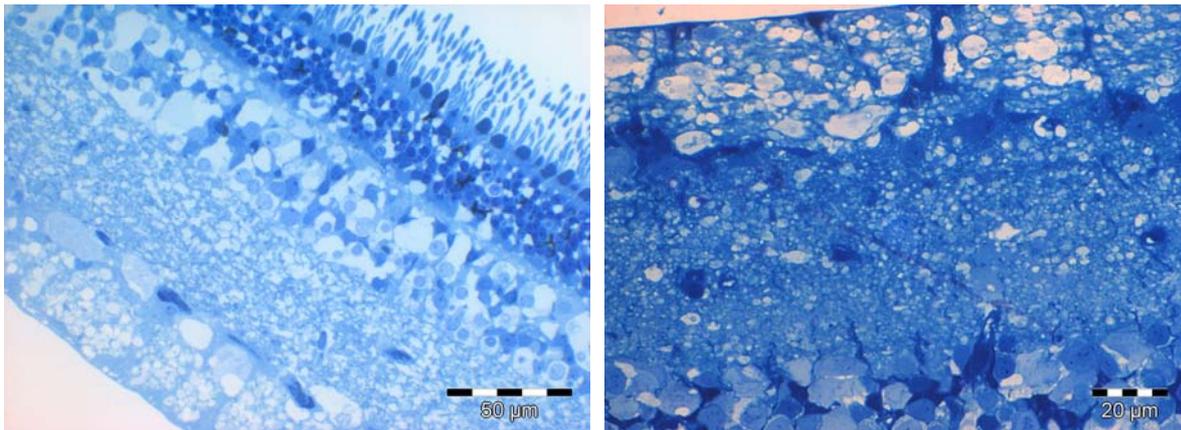


**Abb. 30 (a-b):** Elektronenmikroskopische Abbildung einer ERM nach Laserbehandlung. Ovale Laserschnitte (Pfeile). Leistung 60 mW, Expositionszeit 1 s.

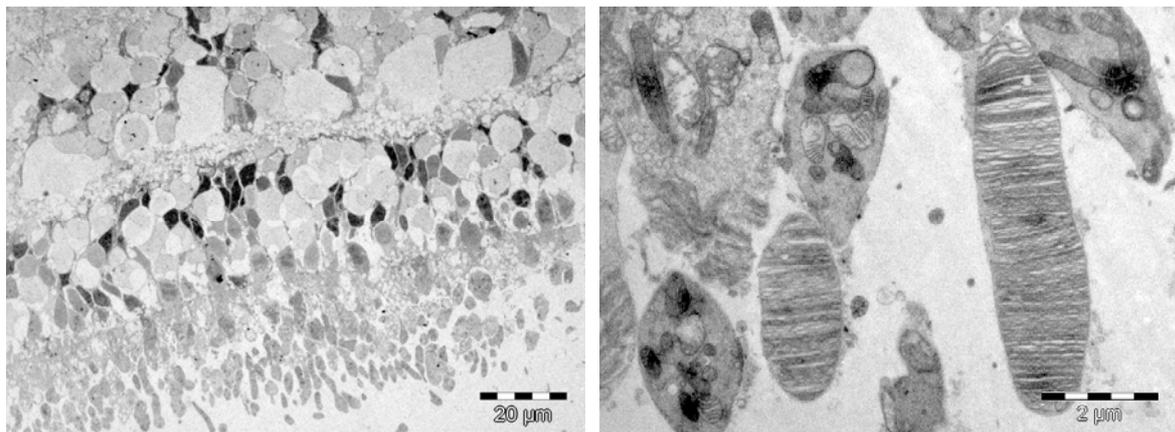


**Abb. 31 (a-b):** Elektronenmikroskopische Abbildung einer ERM nach Laserbehandlung. Ovale intrazelluläre Laserschnitte (Pfeile).

Die Retina zweier enukleierter Schweineaugen wurde mit identischen Laserparametern wie die ERM (40 mW in 1 s und 50 mW in 1 s) behandelt, um eine mögliche Schädigung der Nervenfaserschicht festzustellen. Die Netzhaut aus Schweineaugen wies bei vergleichbaren Laserparametern keine Schäden an der retinalen Nervenfaserschicht auf (**Abb. 32, 33**).



**Abb. 32 (a-b):** Netzhaut von Schweineaugen. Querschnitt. Lichtmikroskopie nach Laserbehandlung (Leistung 50 mW, Expositionszeit 1 s). Kein morphologischer Hinweis für kollaterale Schädigung von retinalem Gewebe.



**Abb. 33 (a-b):** Netzhaut von Schweineaugen. Querschnitt. Elektronenmikroskopie nach Laserbehandlung (Leistung 50 mW, Expositionszeit 1 s). Kein morphologischer Hinweis für kollaterale Schädigung von retinalem Gewebe.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert den ersten Beitrag, in dem die Kombination zweier wissenschaftlicher Methoden, die Multiphotonen-Mikroskopie und die kontaktfreie Chirurgie durch Femtosekundenlaser, für die Darstellung und den Abtrag epiretinaler Membranen angewendet wird. Die MLSM ermöglichte es, morphologische Veränderungen im retinalen Gewebe zu erkennen, ohne Biopsien zu entnehmen oder Netzhautstrukturen zu schädigen. Die MLSM erlaubt auf den Fokus begrenzte, kleine Anregungsvolumina. Aus der Verwendung eines sehr kleinen Anregungsvolumens, welches nur auf den Fokus begrenzt ist, resultiert die Eigenschaft, dass es außerhalb des Fokus zu keinen Destruktionen kommt [XU et al. 1996]. Subfemtoliter- Anregungsvolumen und das fast völlige Fehlen von endogenen Absorbern (siehe "optisches Fenster" in Kap 2.2.2) führen außerdem bei der Verwendung von NIR-Laserstrahlen zu stark reduzierten laserinduzierten Destruktionen von biologischem Material. So konnten NIR-Laseranwendungen für die *in-vivo* Fluoreszenzdiagnostik demonstriert werden [SQUIRELL et al. 1999].

Bei hohen Leistungsdichten ist jedoch eine Zellschädigung durch NIR-Strahlen möglich [KÖNIG et al. 1995; KÖNIG et al. 1996 a; LIANG et al. 1996]. Bei weiterer Erhöhung der Intensitäten kann durch simultane Absorption von zwei und mehr energiearmen Photonen ein optischer Durchbruch erzielt werden. Beim optischen Durchbruch ist der absorbierte Energiebetrag so hoch, dass intramolekulare Bindungen aufgebrochen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass mit dem gleichen Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, durch Erhöhung der Leistungsdichten ein durch den Laser kontaktfreies Schneiden von Chromosomen möglich ist [KÖNIG et al. 1999; KÖNIG et al. 2001].

Die Technologie erlaubt eine Fluoreszenzdarstellung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung und eine berührungsfreie Chirurgie im Nanometerbereich in Zellen und Geweben. Multiphoton-Laserscanning-Mikroskopie ermöglicht die Darstellung des Gewebes vor dem Eingriff und direkte Kontrolle nach dem Eingriff. Im Gegensatz zu anderen Lasertechniken läßt sich der FSL sehr zielgenau einsetzen. Kollateralschäden durch Selbstfokussiereffekte im Gewebe, große Kavitäten und destruktive Schockwellen lassen sich weitgehend vermeiden.

Seit den 80er Jahren versuchte man, unterschiedliche Lasertechniken in experimenteller Netzhautchirurgie einzusetzen. Erstmals nutzten Peyman et al. (1987) den Er:YAG-Laser mit 2,94  $\mu\text{m}$  in der experimentellen Retinachirurgie [PEYMAN et al. 1987]. Mit diesem System konnte die Retinotomie über die gesamte Dicke der Retina, sowohl im Experiment [BRAZITIKOS et al. 1995; ELLSWORTH et al. 1993] als auch klinisch [D'AMIGO et al. 1996 a-b] erfolgreich reproduziert werden. Auch die ERM, welche über die Oberfläche der Netzhaut erhaben ist, kann mit diesem Laser abgetragen werden. Verletzungen der Retina, wie kleine Einrisse, nicht-hämorrhagische Verbrennungen und leichte Hämorrhagien wurden bei dem Gebrauch des Er:YAG-Lasers bei 2,94  $\mu\text{m}$  an Kaninchen [BRAZITIKOS et al. 1995; D'AMIGO et al. 1994; MARGOLIS et al. 1989; TSUBOTA et al. 1990] und in menschlichen Augen [D'AMIGO et al. 1996 b] beobachtet.

D'Amico et al. führten 1994 die kontrollierte partielle Abtragung der Retinaoberfläche im enukleierten Kaninchenauge mit dem Er:YAG Laser bei 2,94  $\mu\text{m}$  durch [D'AMIGO et al. 1994]. Die Autoren benutzten sowohl kontaktfreie Verfahren in Luft als auch Verfahren mit Kontakt in flüssiger Umgebung. Obwohl in den histologischen Untersuchungen die Ränder von allen Abtragszonen eine Vermehrung von retinalem Gewebe zeigten, die durch das Ausschleudern von Material aus dem Zentrum der Abtragszone erklärt werden kann, weisen diese Untersuchungen auf die theoretische Möglichkeit für den Einsatz des Er:YAG Lasers zur Entfernung von EMM und ILM hin. Wesendahl T (2000) beschrieb eine ähnliche Technik in Schweineaugen unter Perfluordecalin [WESENDAL et al. 2000].

2001 veröffentlichten Janknecht et al. die ersten Ergebnisse der berührungsfreien ILM-Abtragung mit dem Er:YAG-Laser bei 2,94  $\mu\text{m}$  in Schweineaugen [JANKNECHT et al. 2001]. Die behandelten Teile der Netzhäute zeigten oft petechiale Blutungen, die denen ähneln, die man nach ERM-Peeling mit der Pinzette auf der menschlichen Retina findet. Größere Blutungen traten auf, wenn der Laser über ein großes Gefäß geführt wurde. Die Autoren hatten keinen objektiven Indikator für die Abtragungstiefe, ein Nachteil, der die Anwendung dieses Verfahrens einschränkte. Elektronenmikroskopische Präparate zeigten, dass in Teilen, in denen die ILM entweder entfernt oder abgelöst war, die Netzhaut dicker war als in angrenzenden Bereichen, in denen die Netzhaut nicht behandelt worden war. In der Nervenfaserschicht traten Vakuolen auf. Die äußeren retinalen Schichten zeigten keinerlei Schäden. Aus quantitativen Abtragsmessungen wurden höhere Pulsraten und Verbesserungen an Handstücken vorgeschlagen (69).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es mit dem Er:YAG Laser bei 2,94  $\mu\text{m}$  möglich ist, Membranen *in vivo* zu entfernen. Aber verschiedene Nebenwirkungen dieser Technik verlangten die weitere Suche nach einer Lasertechnik, die es erlaubt, Membranen noch exakter zu entfernen. Auch das Problem der intraoperativen Kontrolle der Entfernung bleibt sehr wichtig. In dieser Hinsicht erweckten NIR-FSL-Technologien großes Interesse [KÖNIG et al. 2000 a-b; KÖNIG et al. 2001; KÖNIG et al. 2002; NOACK et al. 1999; STERN et al. 2004].

Hochauflösende MLSM gestattet die kontaktfreie funktionelle Bildgebung mit einer Auflösung im Mikrometerbereich innerhalb von Sekunden vor und nach dem Laserabtrag. Diese direkte, extrem zeitnahe Kontrolle ist ein Vorteil gegenüber anderen Studien, bei denen nach Applikation der Laserpulse nur die histologische Nachuntersuchung zur Gewebebeurteilung möglich ist. Noch wichtiger ist die mikroskopische Voruntersuchung und Zielauswahl als Voraussetzung für den zielgerichteten mikroskopischen Abtrag *in-vivo*. Schnelle kontaktfreie Bildgebung müsste für die präzise Bearbeitung der ERM im klinischen Einsatz sehr vorteilhaft sein. Bei *in-vitro* Versuchen sind Transmissionsaufnahmen zur Orientierung an der Probe sehr hilfreich, weil dieser Modus, wie ein konventionelles Lichtmikroskop, eine Überlagerung aller Probenschichten darstellt. Für die Darstellung von Laserschnitten ist der Transmissionsmodus dagegen kaum geeignet, u.a. wegen der schlechten Fokussierung in der Tiefe und der schlechten Kontrastierung der Schnittländer an sich. In den Autofluoreszenzaufnahmen ist eine exakte Fokussierung der anregenden Strahlung des Lasers in der zu untersuchenden Ebene möglich. In diesem Modus lassen sich Zellen und Gewebsstrukturen in verschiedenen Schichten der Probe exakt darstellen und zuordnen. Sie eignen sich für die Darstellung und Auswertung der Laserschnitte. Daher kämen vor allem die Autofluoreszenzaufnahmen für die Bildgebung in Frage. Da die gemessenen Schnittbreiten denen histologischer Untersuchungen entsprachen, ist anzunehmen, dass die Effekte der Laserbestrahlung mit der MLSM auch quantitativ korrekt darstellbar sind.

Ab einer Leistung von 40 mW bei einer Expositionszeit von 1 s sind auswertbare Schnitte möglich. Die kleinste eindeutig messbare Schnittbreite in unserer Versuchsanordnung betrug ca. 0,2  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte, die kleiner als 0,2  $\mu\text{m}$  waren, wurden aufgrund der hohen Variabilität der Schnittbreite nicht ausgewertet. Die Versuche zeigten eine Abhängigkeit zwischen unterschiedlichen Abtragsparametern (Abtragsleistung, Abtragszeit) und den Schnittbreiten. Beim Vergleich der ermittelten Werte miteinander konnte man sehen, dass eine bestimmte

Schnittbreite mit unterschiedlichen Parametern erreicht werden kann. Beispielsweise kann eine bestimmte Schnittbreite mit einer hohen Leistung und geringen Expositionszeit oder mit einer geringeren Leistung und längerer Expositionszeit erreicht werden. Das bedeutet, dass man je nach gewünschter Schnittbreite bzw. Schnitttiefe eine möglichst geringe Energie zum Schneiden verwenden kann. Wichtig hierbei ist der Zeitfaktor. Eine akzeptable Zeit für das Schneiden des Gewebes ist von großer Bedeutung. Ziel ist es, das Gewebe schnellstmöglich mit der geringsten Energie präzise zu schneiden. Je geringer die Energie ist, desto geringer sind auch die möglichen Kollateralschäden.

Mit dem vorliegenden System ist bisher der klinische Nutzen noch eingeschränkt: Durch den extrem geringen Arbeitsabstand, den das Objektiv zur Probe haben muss, könnte bei dem vorliegenden Versuchsaufbau ein offener Zugang durchs Auge nicht vermieden werden, um das Objektiv vor der Netzhaut zu positionieren. Am Prinzip kann dennoch festgehalten werden, wenn in absehbarer Zeit dünnkalibrige flexible Fasern kommerziell erwerblich sein dürften, die durch kleine Skleraöffnungen (Sklerotomien), ähnlich einer konventionellen Vitrektomie, ins Auge eingeführt würden. Die Platzierung von fs-Laserpulsen mit Hilfe einer flexiblen Faser wurde experimentell bereits durchgeführt [KÖNIG et al. 2007]. Bei Verwendung einer flexiblen Faser bliebe der optische Apparat bis auf die Faser außerhalb des Auges, und nur diese müßte das Auge penetrieren, um zur Retina zu gelangen. Zwar würde das den operativen Zugang zur Retina nicht vermeiden, aber auf relativ kleine Zugangswege beschränken. Solche Zugangswege dürften denjenigen entsprechen, die bereits heute bei der konventionellen Pars-plana-Vitrektomie gewählt werden. Dadurch, dass Bildgebung und Laserabtrag über einen Strahlengang erfolgen, könnten solche endoskopischen Systeme ein breites Anwendungsspektrum ermöglichen.

Viele Laser-Systeme, die zur Zeit klinisch eingesetzt werden, ermöglichen dagegen keine zeitnahe Bildgebung. Somit besteht keine unmittelbare Kontrolle des Abtrags. Ein neuer Ansatz ist die Kombination der Laserapplikation mit zeitnaher hochauflösender Bildgebung in einem System. Ein solches System wäre klinisch sehr vorteilhaft. Die Bildgebung kann präoperativ zur Diagnostik und exakten Lokalisierung von Zielstrukturen eingesetzt werden. Perioperativ ist eine genaue Fokussierung des Laserstrahls im Zielgebiet möglich. Abtragsbereiche (Schnitte) sind in Autofluoreszenzaufnahmen genauestens darstellbar. Sowohl für Bildgebung als auch zum Gewebeabtrag kann das gleiche System benutzt werden, jedoch mit unterschiedlichen

Bestrahlungsstärken. Unverstärkte Femtosekundenlaser in Kombination mit Laser-Scanning-Mikroskopen kommen diesem Konzept in *in-vitro* schon sehr nahe. Experimentelle Studien wurden bereits durchgeführt und lieferten vielversprechende Ergebnisse [HILD et al. 2008; TOROPYGIN et al. 2008 a-b]. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die Kombination von Mikroskopie und optischer Ablation durch das gleiche optische System und die gleiche Laserquelle in der Zukunft in einem klinisch einsetzbaren Gerät vereint werden können.

### **Schlußfolgerungen und Zukunftsaussichten**

Die Bildgebung der Zielgewebe *in-vivo* hat Konsequenzen für die Diagnostik von Erkrankungen. Die Kombination von Mikroskopie und optischer Ablation im gleichen optischen System und die Verwendung der selben Laserquelle bietet die Möglichkeit, in Geweben äußerst zeitnah Zielorte für Mikromanipulationen aufzusuchen, sie durchzuführen und zu kontrollieren. Erst durch eine solche Rückkopplung kann die hohe Präzision des Femtosekundenlaserstrahls therapeutisch vollständig ausgenutzt werden. So kann beispielsweise in der Netzhautchirurgie eine epiretinale Membran von wenigen Mikrometern Dicke als „Target“ festgelegt und während der Behandlung überwacht werden, um die Schädigung der darunter liegenden Netzhaut zu vermeiden. Mit den genannten Methoden besteht die Chance, grundlegende neue Verfahren und Verbesserungen auf mikrochirurgischem Gebiet zu entwickeln, die konkret die klinische Versorgung der Patienten verbessern.

Die in dieser Arbeit ermittelten Parameter dienen als Grundlage für weiterführende *in-vivo* Versuche. Aufgrund der beobachteten linearen Abhängigkeiten, zwischen den Abtragsparametern und der Schnittbreiten, kann ein sicherer und kalkulierbarer Einsatz in nachfolgenden Versuchen erfolgen.

Das fast völlige Fehlen endogener Einphotonenabsorber in zellulären Bestandteilen prädestiniert die Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie für die *in-vivo* Anwendung. Es ist schon heute möglich, mikroskopische Bilder des Epithels einer vitalen Haut aufzunehmen. Weiterhin ist mit Hilfe eines Multiphotonen-Mikroskops das Zerschneiden von Chromosomen in einer intakten vitalen Zelle beschrieben worden [KÖNIG et al. 2002]. Im Zusammenhang mit der

Multiphotonen-Mikroskopie und den präzisen optischen Schnitten wird ein Tor aufgestoßen, welches die kontaktfreie Chirurgie in lebendem Gewebe ermöglichen könnte.

## 5. Literaturverzeichnis:

1. Arnold CL, Heisterkamp A, Ertmer W, Lubatschowski H (2005) Streak formation as a side effect of optical breakdown during processing the bulk of transparent Kerr media with ultra-short laser pulses. *Appl. Phys* 80:247-253
2. Azzolini C, Patelli F, Codenotti M, Pierro L, Brancato R (1999) Optical coherence tomography in idiopathic epiretinal macular membrane surgery. *Eur J Ophthalmol* 9:206-211
3. Benz MS, Smiddy WE (2003) Increased diode laser uptake in inner retinal layers after indocyanine green staining of the internal limiting membrane. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 34:64-67
4. Blem RI, Huynh PD, Thall EH (2002) Altered uptake of infrared diode laser by retina after intravitreal indocyanine green dye and internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 134:285-286
5. Brazitikos PD, D'Amico DJ, Bernal M-N, Walsh AW (1995) Erbium:YAG laser surgery of the vitreous and retina. *Ophthalmology* 102:278-290
6. Bressman PL, Seto F (1976) Neural abnormalities induced by selected chemical agents. *Proc Okla Acad Sci* 56:10-14
7. Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Faude F, Enzmann V, Wiedemann P, Reichelt W, Reichenbach A (1999) Human Mueller glial cells: altered potassium channel activity in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:3316-3323
8. Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH, Foster RE (2000) Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane. *Ophthalmology* 107:2010-2014
9. Chen WR, Adams RL, Heaton S, Dickey DT, Bartels KE, Nordquist RE (1995) Chromophore-enhanced laser-tumor tissue photothermal interaction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett* 88:15-19
10. Cheung BTO, Yuen CYF, Lam DSC (2002) ICG-assisted peeling of the retinal ILM [discussion]. *Ophthalmology* 109:1039-1040

11. Clarkson J, Green W, Massov D (1992) A histopathological review of 168 cases of preretinal membrane. *Am J Ophthalmol* 3:357-365
12. D'Amico DJ, Brazitikos PD, Marcellino GR, Finn SM, Hobart JL (1996 a) Initial clinical experience with an Erbium:YAG laser for vitreoretinal surgery. *Am J Ophthalmol* 121:414-425
13. D'Amico DJ, Blumenkranz MS, Lavin MJ, Quiroz-Mercado H, Pallikaris IG, Marcellino GR, Brooks GE (1996 b) Multicenter clinical experience using an Erbium:YAG laser for vitreoretinal surgery. *Ophthalmology* 103:1575-1585
14. D'Amico DJ, Moulton RS, Theodossiadis PG, Yarborough JM (1994) Erbium:YAG laser photothermal retinal ablation in enucleated rabbit eyes. *Am J Ophthalmol* 117:783-90
15. Da Mata AP, Burk SE, Riemann CD, Rosa RH, Snyder ME, Petersen MR, Foster RE (2001) Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane during vitrectomy surgery for macular hole repair. *Ophthalmology* 108:1187-1192
16. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73-6
17. Ellsworth LG, Kramer TR, Noecker RJ, Yarborough JM, Snyder RW (1993) Retinotomy using erbium:YAG laser equipped with a contact probe on human autopsy eyes. *ARVO Abstracts Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:961
18. Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P, Aaberg TM, Martin DF, Sippu BD (2002) Retinal pigment epithelium changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 133:89-94
19. Feron EJ, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel A, Melles GR, Stalmans P (2002) Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 120:141-144
20. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A (2001 a) Indocyanine green selectively stains the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol* 131:387-388
21. Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A (2001 b) Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol* 32:431-433
22. Gass JDM (1987) *Stereoscopic atlas of macular diseases. Diagnosis and treatment.* 3d ed St Louis, CV. Mosby
23. Gallemore R, Jumper J, McCuen B, Jaffe G, Postel E, Toth C (2000) Diagnosis of vitreoretinal adhesions in macular disease with optical coherence tomography. *Retina* 20:115-120

24. Georgiadis N, Kardasopoulos A, Bufidis T (1999) The evaluation of corneal graft tissue by the use of trypan blue. *Ophthalmologica* 213:8-11
25. Göppert-Mayer M (1931) Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9:273-295
26. Grigorian RA, Castellarin A, Fegan R, Seery S, Del Priore LV, Von Hagen S, Zarbin MA (2003) Epiretinal membrane removal in diabetic eyes: comparison of viscodissection with conventional methods of membrane peeling. *Br J Ophthalmol* 87:737-41
27. Goebel W, Kretzschmar-Gross T (2000) Retinal thickness in diabetic retinopathy: a study using optical coherence tomography. *Retina* 22:759-767
28. Haritoglou C, Gass CA, Schaumberger M, Ehrt O, Gandorfer A, Kampik A (2001) Macular changes after peeling of the internal limiting membrane in macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 132:363-368
29. Haritoglou C, Eibl K, Schaumberger M, Müller AJ, Priglinger S, Alge C, Kampik A (2004 a) Functional outcome after trypan blue-assisted vitrectomy for macular pucker: a prospective, randomized, comparative trial. *Am J Ophthalmol* 138:1-5
30. Haritoglou C, Gandorfer A, Schaumberger M, Priglinger SG, Müller AJ, Gass CA, Kampik A (2004 b) Trypan blue in macular pucker surgery: an evaluation of histology and functional outcome. *Retina* 24:582-590
31. Hassenstein A, Scholz F, Richard G (2005) OCT in epiretinal gliosis. *Ophthalmologie* 102:127-132
32. Heisterkamp A, Maxwell IZ, Mazur E, Underwood JM, Nickerson JA, Kumar S, Ingber DE (2005) Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Opt Express* 13:3690-3696
33. Hild M, Krause M, Riemann I, Mestres P, Toropygin S, Löw U, Brückner K, Seitz B, Jonescu-Cuyppers C, König K (2008) Femtosecond laser-assisted retinal imaging and ablation: experimental pilot study. *Curr Eye Res* 33:351-363
34. Hiscott P, Grierson I, McLeod D (1984) Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: An immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 68:695-698
35. Immonen I, Vaheri A, Tommila P, Siren V (1996) Plasminogen activation in epiretinal membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:664-669
36. Iwanoff A (1865) Beiträge zur normalen und pathologischen Anatomie des Auges. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 11:135-170
37. Janknecht P, Feltgen N, Wesendahl T, Wiek J, Eissner B, Ott B, Staubach F, Frenz M (2001) Internal limiting membrane ablation in pig eyes with the Er:YAG laser under perfluorodecalin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:705-711

38. Juhász T, Kastis G, Suárez C, Turi L, Bor Z, Bron WE (1996) Shock wave and cavitation bubble dynamics during photodisruption in ocular media and their dependence on the pulse duration. *SPIE Proceedings* 2681:428-436
39. Kampik A, Green W, Michels R, Nase PK (1980) Ultrastructural features of progressive idiopathic epiretinal membrane removed by vitreous surgery. *Am J Ophthalmol* 90:797-809
40. Kampik A, Kenyon K, Michels R, Green WR, de la Cruz ZC (1981) Epiretinal and vitreous membranes. Comparative study of 56 cases. *Arch. Ophthalmol* 99:1445-1454
41. Karacorlu M, Karacorlu S, Ozdemir H (2003) Iatrogenic punctate chorioretinopathy after internal limiting membrane removal. *Am J Ophthalmol* 135:178-182
42. Keller U (2003) Recent developments in compact ultrafast lasers. *Natur* 424:831-838
43. Kaiser W., Garrett M (1961) Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ . *Phys Rev Lett* 7:229-231
44. Khokhar AR, Rab KF, Akhtar HU (2003) Management of macular pucker. *J Coll Physicians Surg Pak* 13:701-703
45. Kim CY, Lee JH, Koh HJ, Lee SJ, Kwon OW (2002) Visual field defect caused by nerve fiber layer damage associated with an internal limiting lamina defect after uneventful epiretinal membrane surgery. *Am J Ophthalmol* 133:569-571
46. König K, Liang H, Berns MW, Tromberg BJ (1995) Cell damage by near-IR microbeams. *Nature* 377(6544):20-21
47. König K, Tadir Y, Patrizio P, Berns MW, Tromberger BJ (1996 a) Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa. *Human Reproduction* 11:2162-2164
48. König K, Simon U, Halbhuber K (1996 b) 3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope. *Cellular and Molecular Biology* 42(8):1181-1194
49. König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber K (1999) Intracellular nanosurgery with infrared femtosecond laser pulses. *Cellular and Molecular Biology* 45:195-201
50. König K (2000 a) Multiphoton microscopy in life science. *J Microsc* 200:83-104
51. König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber PJ (2000 b) Multiplex FISH and three-dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulses. *Histochemistry and Cell Biology* 114:337-345
52. König K, Göhlert A, Liehr T, Loncarevic IF, Riemann I (2000 c) Two-photon multicolor FISH: A versatile technique to detect specific sequences within single DNA molecules in cell and tissue. *Single Molecule* 1:41-51

53. König K, Riemann I, Fritzsche W (2001) Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. *Opt Lett* 26:819-821
54. König K, Krauss O, Riemann I (2002) Intratissue surgery with 80 MHz nanojoule femtosecond laser pulses in the near infrared. *Optics Express* 10:171-176
55. König K (2003) High-resolution multiphoton imaging and nanosurgery of the cornea using femtosecond laser pulses. In: Fankhauser F, Kwasniewska S, Editors. *Lasers in Ophthalmology*. The Hague: Kugler Publications
56. König K, Riemann I, Krause MHJ, Ruprecht KW (2004) Hochauflösende Multiphotonen - Tomographie und Nanochirurgie mittels Femtosekundenlaser. *Physikalische und biomedizinische Aspekte. Klin Monatsbl Augenheilkd* 221:13
57. König K, Ehlers A, Riemann I, Schenkl S, Buckle R, Kaatz M (2007) Clinical two-photon microendoscopy. *Microsc Res Tech* 70:398-402
58. Krause MHJ, Löw U, Mestres P, Huss C, Hild M, Riemann I, Ruprecht KW, Laue M, Jahn S, König K (2004) Experimentelle Hornhautchirurgie mit Femtosekunden-Laser. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 221:13
59. Krueger RR, Kuszak J, Lubatschowski H, Myers RI, Ripken T, Heisterkamp A (2005) First safety study of femtosecond laser photodisruption in animal lenses: tissue morphology and cataractogenesis. *J Cataract Refract Surg* 31:2386-2394
60. Kurtz RM, Liu X, Elner VM, Squier JA, Du DT, Mourou GA (1997) Photodisruption in the human cornea as a function of laser pulse width. *J Refract Surg* 13:653-658
61. Kurtz RM, Horvath C, Liu HH, Krueger RR, Juhasz T (1998) Optimal Laser Parameter for Intrastromal Corneal Surgery. *SPIE Proceedings* 3255:56-66
62. Kwok AK, Leung DY, Hon C, Lam DSC (2002) Vision threatening vitreous haemorrhage after internal limiting membrane peeling in macular surgeries. *Br J Ophthalmol* 86:1449-1450
63. Li K, Wong D, Hiscott P, Groenewald C, McGalliard J (2003) Trypan blue staining of internal limiting membrane and epiretinal membrane during vitrectomy: visual results and histopathological findings. *Br J Ophthalmol* 87:216-219
64. Liang H, Vu KT, Krishnan P, Trang T, Shin D, Kimel S, Bernset M (1996) Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. *Biophys J* 70:1529-33
65. Limb GA, Alam A, Earley O, Green W, Chignell AH, Dumonde DC (1994 a) Distribution of cytokine proteins within epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 13:791-798

66. Limb GA, Early O, Jones S, LeRoy F, Chignell AH, Dumonde DC (1994 b) Expression of mRNA coding for TNF alpha, IL-1 beta and IL-6 by cells infiltrating retinal membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:646-651
67. Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A, Hetzel U, Drommer W, Welling H, Ertmer W (2000) Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238:33-39
68. Margherio RR, Cox M, Trese M, Murphy PL, Johnson J, Minor LA (1985) Removal of epimacular membranes. *Ophthalmology* 92:1075-1083
69. Margherio RR (1994) Epiretinal macular membranes. In: principles and practice of ophthalmology. Edited by Berson EL, D'Amico DJ, Gradoudas ES, Schepens CL: WB Saunders Company 2:1288
70. Margolis TI, Farnath DA, Destro M, Puliafito CA (1989) Erbium:YAG laser surgery on experimental vitreous membranes. *Arch Ophthalmol* 107:424-428
71. Massin P, Allouch C, Haouchine B, Metge F, Paques M, Tangui L, Erginay A, Gaudric A (2000) Optical coherence tomography of idiopathic macular membranes before and after surgery. *Am J Ophthalmol* 130:732-739
72. McLeod D, James CR (1988) Viscodelamination at the vitreoretinal juncture in severe diabetic eye disease. *Br J Ophthalmol* 72:413-419
73. Mainster MA, Sliney DH, Belher CD (1983) Laser photodisruptors-damage mechanism, instrument design and safety. *Ophthalmology* 90:973-991
74. Messner LV, Messner S (1987) Idiopathic preretinal fibrosis with concurrent cystoid macular edema. *J Am Optom Assoc* 58:976-978
75. Messmer EM, Heidenkummer HP, Kampik A (1998) Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236:248-54
76. Melles GR, de Waard PW, Pameijer JH, Beekhuis WH (1999) Staining the lens capsule with trypan blue for visualizing capsulorrhexis in surgery of mature cataracts. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 215:342-344
77. Mester U, Kuhn F (2000) Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 129:769-777
78. Michels R (1981) Vitreous surgery for macular pucker. *Am J Ophthalmol* 92:628-639
79. Michels R (1982) A clinical and histopathologic study of epiretinal membranes affecting the macula and removed by vitreous surgery. *Trans Am Ophthalmol Soc* 80:580-656
80. Michels R (1984) Vitrectomy for macular pucker. *Ophthalmology* 91:1384-1388

81. Morris R, Kuhn F (1998) Surgical treatment of macular surface disorders In: Boyd B, ed. World Atlas Series of Ophthalmic Surgery, Vol. IV. Panama City. Highlights Ophthalmology 26:58-64
82. Mrochen M, Donges A, Korn G (2006) Femtosekundenlaser für die refractive Hornhautchirurgie. Ophthalmologe. 103:1005-1013
83. Nakata K, Ohji M, Ikuno Y, Kusaka S, Gomi F, Tano Y (2003) Sub-retinal hemorrhage during internal limiting membrane peeling for a macular hole. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 241:582-584
84. Newman EA, Reichenbach A (1996) The Mueller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci 19:307-312
85. Newman EA (1984) Regional specialization of retinal glial cell membrane. Nature 309:155-157
86. Noack J, Vogel A (1999) Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy densities. IEEE J Quantum Electron 35:1156-1167
87. Park DW, Sipperley JO, Sneed SR, Dugel PU, Jacobsen J (1999) Macular hole surgery with internal-limiting membrane peeling and intravitreal air. Ophthalmology 106:1392-1397
88. Park DW, Dugel PU, Garda J, Sipperley JO, Thach A, Sneed SR, Blaisdell J (2003) Macular pucker removal with and without internal limiting membrane peeling: pilot study. Ophthalmology 110:62-64
89. Perrier M, Sebag M (2003) Epiretinal membrane surgery assisted by trypan blue. Am J Ophthalmol 135:909-911
90. Peyman GA, Katoh N (1987) Effects of an Erbium:YAG laser on ocular structures. Int Ophthalmol 10:245-253
91. Ratkay-Traub I, Ferincz IE, Juhasz T, Kurtz RM, Krueger RR (2003) First clinical results with the femtosecond neodymiumglass laser in refractive surgery. J Refract. Surg 19:94-103
92. Ripken T, Heisterkamp A, Oberheide U, Ertmer W, Gerten G, Lubatschowski H (2003) First in-vivo studies of presbyopia treatment with ultrashort laserpulses. SPIE Proceedings 5142:137-145
93. Rodrigues EB, Meyer CH, Schmidt JC, Kroll P (2003) Trypan blue stains the epiretinal membrane but not the internal retinal membrane [discussion]. Br J Ophthalmol 87:1431-1432

94. Roth AM, Foos RY (1971) Surface wrinkling retinopathy in eyes enucleated at autopsy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75:1047-1058
95. Sacks ZS, Kurtz RM, Juhasz T, Mourau GA (2002) High precision subsurface photodisruption in human sclera. *Journal of Biomedical optics* 7:442-50
96. Sacks ZS, Kurtz RM, Juhasz T, Mourau GA (2003) Subsurface photodisruption in human sclera: wavelength dependence. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging* 34:104-13
97. Sawa M, Amazu K, Takahashi T (2004) Application of femtosecond ultrashort pulse laser to photodynamic therapy mediated by indocyanine green. *Br J Ophthalmol* 88:826-831
98. Schaffer CB, Nishiimura N, Gleser E (2002) Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds. *Optics Express* 10:196-203
99. Seitz B, Langenbacher A, Hofmann-Rummelt C, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GO (2003) Nonmechanical posterior lamellar keratoplasty using the femtosecond laser (femto-plak) for corneal endothelial decompensation. *Am J Ophthalmol* 136:769-772
100. Seitz B, Brünner H, Viestenz A, Hofmann-Rummelt C, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GO, Langenbacher A (2005) Inverse mushroom-shaped nonmechanical penetrating keratoplasty using a femtosecond laser. *Am J Ophthalmol* 139:941-944
101. Sikder S, Snyder RW (2006) Femosecond laser preparation of donor tissue from the endothelial side. *Cornea* 25:416-422
102. Sippu BD, Engelbrecht NE, Hubbart GB, Moriarty SE, Jiang S, Aaberg TM Jr, Aaberg TM Sr, Grossniklaus HE, Sternberg P (2001) ICG-effect on cultured human epithelial cells; implication for macular hole surgery. *Am J Ophtalmol* 132:433-435
103. Squirrell JM, Wokosin DL, White JG, Bavister BD (1999) Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature Biotechnology* 17
104. Stalmans P, Feron EJ, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel A, Melles GR, Veckeneer M (2003) Double-vital staining using trypan blue and indocyanine green in macular pucker surgery. *Br J Ophthalmol* 87:713-716
105. Stern D, Puliafito CA, Dobei ET, Reidy WT (2004) Corneal ablation by nanosecond, picosecond and femtosecond laser pulses at 532 nm and 625 nm. *Arch Ophthalmol* 107:587-592
106. Stonecipher K, Ignatio T, Stonecipher M (2006) Advances in refractive surgery: microkeratome and flap creation in relation to safety, efficacy, predictability, and biomechanical stability. *Curr Opin Ophthalmol* 17:368-372

107. Terasaki H, Miyake Y, Nomura R, Piao CH, Hori K, Niwa T, Kondo M (2001) Focal macular ERGs in eyes after removal of macular ILM during macular hole surgery. *Invest Ophthalmol* 42:229-234
108. Terry MA, Ousley PJ, Will B (2005) A practical femtosecond laser procedure for DLEK endothelial transplantation: cadaver eye histology and topography. *Cornea* 24:453-459
109. Trese M, Chandler DB, Machemer R (1983) Makular pucker. Ultrastruktur. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221:16-26
110. Tsubota K (1990) Application of erbium:YAG laser in ocular ablation. *Ophthalmologica* 200:117-122
111. Toropygin S, Krause, M, Riemann I, Hild M, Mestres P, Seitz B, Khurieva E, Ruprecht K, Löw U, Gatziofias Z, König K (2008 a) In vitro noncontact intravascular femtosecond laser surgery in models of branch retinal vein occlusion. *Curr Eye Res* 33:277-283
112. Toropygin S, Krause, M, Riemann I, Seitz B, Mestres P, Ruprecht K, König K (2008 b) In vitro femtosecond laser-assisted nanosurgery of porcine posterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 34:2128-2132
113. Toyran S, Liu Y, Singha S, Shan S, Cho MR, Gordon RJ, Edward DP (2005) Femtosecond laser photodisruption of human trabecular meshwork: an in vitro study. *Exp Eye Res* 81:298-305
114. Ulbig M, Wolfensberger T, Hiscott P, Ationu A, Carter ND, Gregor ZJ (1995) Insulin-like factor (IGF-1) receptor/binding protein in human diabetic epiretinal membranes. *Ger J Ophthalmol* 4:264-268
115. Veckener M, van Overdam K, Monzer J (2001) Ocular toxicity study of trypan blue applied in the vitreous cavity of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:698-704
116. Viores S (1990) Ultrastructural and immunohistochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia and fibroblasts in vitreous culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:2529-2545
117. Viores S, Henderer J, Mahlow J, Chiu C, Derevjanik NL, Larochelle W, Csaky C, Campochiaro PA (1995) Isoforms of platelet-derived growth factor and its receptors in epiretinal membranes: immunolocalization to retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res* 60:607-619
118. Vogel A, Venugopalan V (2003) Mechanism of pulsed laser ablation of biological tissue. *Chemical Reviews* 103:577-644
119. Weisbecker C, Fraunfelder F, Rhee D, Tipperman R (1999) Physicians' desk reference for ophthalmology. Montvale NJ Medical Economics 205-207

120. Wesendal T, Jankrecht P, Ott B, Frenz M (2000) Erbium:YAG laser ablation of retinal tissue under perfluorodecaline: determination of laser-tissue interaction in pig eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:505-512
121. Wilkins JR, Puliafito CA, Hee MR (1996) Characteristics of epiretinal membranes using optical coherence tomography. *Ophthalmology* 103:2142-2151
122. Wise G (1975) Clinical features of idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 79:349-357
123. Winter M, Eberhardt W, Scholz C, Reichenbach A (2000) Failure of potassium siphoning by Mueller cells: a new hypothesis of perfluorocarbon liquid-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol* 41:246-261
124. Wolf S, Schnurbusch U, Wiedemann P, Grosche J, Reichenbach A, Wolburg H (2004) Peeling of the basal membrane in the human retina. *Ophthalmology* 111:238-243
125. Xu C, Zipfel W, Shear J, Williams RM, Webb WW (1996) Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci* 93:10763-10768
126. Yetik H, Devranoglou K, Ozkan S (2002) Determining the lowest trypan blue concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 28:988-991
127. Yooh HS, Brooks HL, Capone A, L'Hernault NL, Grossniklaus HE (1996) Ultrastructural features of tissue removed during idiopathic macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 122:67-75
128. Yoon KC, Seo MC (2003) Macular hole after peeling of the internal limiting membrane in diabetic macular edema. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 34:478-479

## **Publikationsverzeichnis**

**Khurieva E**, Krause M, Riemann I, Mestres P, Hille K, Lang M, Brückner K, Seitz B, Toropygin S, Löw U, König K.

“Femtosecond laser scanning microscopy and surgery of epiretinal membranes”

Lasers in Manufacturing. 2007: 899-901.

Toropygin S, Krause M, Riemann I, Hild M, Mestres P, Seitz B, **Khurieva E**, Ruprecht KW, Löw U, Gatzioufas Z, König K.

“In vitro noncontact intravascular femtosecond laser surgery in models of branch retinal vein occlusion”

Curr Eye Res. 2008: 33:277-83.

### **Poster:**

**Khurieva E**, Krause M, Toropygin S, Löw U, Seitz B, Ruprecht KW, Hille K.

„Pars-plana-Vitrektomie mit ILM-Peeling versus intravitreale Triamcinoloninjektion bei diffusem diabetischem Makulaödem“

104. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),

Berlin, Germany, 21.-24.09.2006.

**Khurieva E**, Krause M, Hille K, Riemann I, Mestres P, Brückner K, Seitz B, Toropygin S, Löw U, König K.

„Femtosekunden-Laser-Scanning-Mikroskopie und Abtrag epiretinaler Membranen“

105. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),

Berlin, Germany, 17.-21.09.2007.

**Khurieva E**, Krause M, Riemann I, Mestres P, Seitz B, Löw U, Gatzioufas Z, Schafia A, König K.

„Experimentelle kontaktfreie Sheathotomie mit einem unverstärkten Femtosekundenlaser“

106. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),

Berlin, Germany, 17.-21.09.2008.

Löw U, König K, Toropygin S, Hild M, Riemann I, Akaya A, **Khurieva E**, Mestres P, Seitz B, Krause M.

„Non-contact ablation and high-resolution imaging of experimental retinal thrombi with a non-amplified fs-laser“

104. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),  
Berlin, Germany, 21.-24.09.2006.

Löw U, Gatziofas Z, **Khurieva E**, Jakob S, Schirra F, Seitz B.

„Spontaneous bilateral late-onset descemet's membrane detachment after cataract surgery“

106. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),  
Berlin, Germany, 17.-21.09.2008.

Gatziofas Z, Löw U, Schnaidt A, **Khurieva E**, Jakob S, Schirra F, Seitz B.

„Evidence of Oxidative Stress in Schnyder Corneal Dystrophy“

106. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG),  
Berlin, Germany, 17.-21.09.2008.

## **Vorträge:**

### **Khurieva E**

„Optische Kohärenztomographie bei Makulaerkrankungen“

53. Homburger Augenärztliche Fortbildung. Homburg/Saar, 13.12.2007

**Khurieva E**, Krause M, Hille K, Riemann I, Mestres P, Brückner K, Lang M, Seitz B, Löw U, König K.

„Femtosekunden-Laser-Scanning-Mikroskopie und Abtrag epiretinaler Membranen“

80. Versammlung der Vereinigung Rhein-Mainischer Augenärzte. Frankfurt, Oktober 2008

**Khurieva E**, Krause M, Riemann I, Mestres P, Hille K, Lang M, Brückner K, Seitz B, Toropygin S, Löw U, König K.

„Femtosecond laser scanning microscopy and surgery of epiretinal membranes“

Lasers in Manufacturing 2005, Munich, Germany, 21. Juni 2005.

Toropygin S, Krause M, Riemann I, Hild M, **Khurieva E**, Löw U, Mestres P, Seitz B, Ruprecht KW, König K.

“Femtosecond laser (FSL) surgery and scanning microscopy in branch retinal vein occlusion (BRVO): experimental pilot study”

European Association for Vision and Eye Research (EVER), 2006 Annual Meeting. Vilamoura, Portugal, 04.-07.10.2006. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84 (239 Suppl):145.

Krause M, **Khurieva E**, Löw U, Hild M, Huss C, Riemann I, Mestres P, Seitz B, Toropygin S, Hille K, König K.

“Femtosecond laser in vitreoretinal surgery”

Lecture. 105th DOG Congress. Berlin, Germany, 20.-23.09.2007.

Löw U, König K, Toropygin S, Hild M, Riemann I, **Khurieva E**, Mestres P, Krause M.

“Non-contact intravascular femtosecond laser (FSL) surgery and laser scanning microscopy in retinal vein occlusion: experimental pilot study”

11<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics.

Düsseldorf, Germany, 14.-16.05.2006.

## 7. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank **PD Dr. Matthias Krause** für die Überlassung des Themas, die vorbildliche Betreuung, seine Motivationskünste, die vielen Korrekturlesungen, die Akzeptanz meiner Orthographie und Grammatik und die geduldigen Erklärungen.

**Prof. Dr. Karsten König** danke ich für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der Laser und Mikroskope und für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung an meiner Arbeit.

**Prof. Dr. Berthold Seitz** möchte ich ganz besonders danken für seine stetige Unterstützung, die wertvollen Ratschläge, die unerschöpfliche Geduld, das in mich gesetzte Vertrauen und überhaupt - wäre ich ohne ihn nie soweit gekommen.

**Prof. Dr. Klaus W. Ruprecht**, ehem. Direktor der Universitäts-Augenklinik Homburg, bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung der Arbeit in der Anfangsphase.

**Prof. Dr. Pedro Mestres** danke ich sehr, für das Ermöglichen der histologischen Aufarbeitung und die hilfreichen Ratschläge.

**PD Dr. Konrad Hille, Dr. Martin Lang, Dr. Karin Brückner** bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, für die Bereitstellung der epiretinalen Membranen und ihre hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. So haben sie entscheidende Anteil daran, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form zum Abschluß gebracht werden konnte.

**Dr. Iris Riemann** danke ich für die Vermittlung der Arbeitstechniken. Bei auftretenden Fragen und Schwierigkeiten sowie bei der Darstellung der Ergebnissen konnte ich immer mit ihrer Unterstützung rechnen.

Dr. **Ursula Löw** danke ich für ihre immerwährende Unterstützung, die Korrekturlesungen und die geduldige Beantwortung all meiner Fragen in allen Phasen des Projektes.

**Gabi Kiefer** und **Birgit Leis** danke ich sehr für die Zusammenarbeit bei der histologischen Aufarbeitung und die angenehme Zeit miteinander.

Dr. **Asim Akkaya** danke ich für die hilfreiche Beratung in statistischen Fragen.

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie danken, die mir stets motivierend zur Seite steht. Besonders danken möchte ich meiner Mutter, die mein Medizinstudium und meine Arbeit durch ihre beständige Unterstützung überhaupt erst möglich gemacht hat. Meinem Ehemann, Michael Sattler, danke ich sehr für die stetige emotionale Unterstützung, Liebe und Geduld.

## 8. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN:

---

Name: Elena Khurieva  
Geburtsdatum: 26. März 1975  
Geburtsort : Taschkent Usbekistan

### SCHULAUSSBILDUNG:

---

1982-1992 : Mittelschule in Taschkent, Abschluss: Abitur (1992)

### UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG:

---

1992-2000 : Medizinstudium, Staatliche Medizinische Hochschule  
Taschkent (Uniklinik)  
06/2000 : Staatsexamen mit Note „gut“

### WEITERBILDUNG UND ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT:

---

2000-2002 : Weiterbildung zur Augenärztin an der Staatlichen  
Medizinischen Hochschule in Taschkent (Uniklinik)  
10/2002-5/2005 : Tätigkeit im therapeutisch-diagnostischen Zentrum  
„Sichat va Farogat“ in Taschkent  
06/2006 bis heute : Tätigkeit an der Universitäts-Augenklinik,  
Homburg/Saar

### STIPENDIEN, WISSENSCHAFTLICHE PREISE:

---

10/2006-07/2007 : Forschungsstipendium des Deutschen  
Akademischen Austauschdienstes (DAAD)  
10/2007-09/2009 : Forschungsstipendium der Deutschen  
Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG)  
DOG-Preisträgerin 2007

WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENARBEIT:

---

seit 06/2005 : Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik,  
Abteilung Lasermedizin, St. Ingbert

ZUSATZAUSBILDUNG:

---

06/2004 : Zentrale Mittelstufenprüfung mit der Note „gut“ Goethe-  
Institut Taschkent

09/2004-05/2005 Oberstufe, Goethe-Institut, Taschkent