

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Grisanti

**Retinale Photoablation mit dem Erbium:YAG-Laser.
Eine in vitro Studie zur Abtragung der
Membrana limitans interna und
innerer Netzhautschichten.**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Alexandra Brix
aus Neumünster

Lübeck 2008

Für meine Eltern.

In tiefer Dankbarkeit und Liebe.

Ohne Euch wäre ich nicht, was ich jetzt bin.

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Hans Hoerauf

2. Berichtstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Universität-

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN	12
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1. Erbium:YAG-Laser	
3.1.1. Allgemeine Grundlagen	13
3.1.2. Laser-Spezifikationen und Fasermaterialien	16
3.2. Kavitationsblasen	17
3.3. Flüssige Perfluorkarbene (PFCL)	19
3.4. Vorversuche	20
3.4.1. Handgehaltene Applikation am Schweinebulbus	20
3.4.2. Mechanische Applikation am Schweinebulbus	22
3.4.3. Mechanische Applikation an der Bulbusstanze	23
3.5. Hauptversuch	25
3.5.1. Herstellung der Retinaorganexplantate	25
3.5.2. Erbium:YAG-Laserabtragung	27
3.5.2.1. <i>Low-OH-Quarzfaser</i>	27
3.5.2.1. <i>Saphirfaser</i>	27
3.5.3. Optische Kohärenztomographie (OCT)	27
3.5.3.1. <i>Grundlagen der OCT</i>	27
3.5.3.2. <i>OCT-Prototyp und Modifikation</i>	28
3.5.4. Histologische Aufarbeitung der Proben	30
4. ERGEBNISSE	31
4.1. unbehandeltes Retina-Organexplantat	31
4.1.1. OCT-Darstellung des Retina-Organexplantates	31
4.1.2. Lichtmikroskopische Darstellung des Retina-Organexplantates	31

4.2. Retinale Photoablation	32
4.2.1. Allgemeine Beobachtungen	32
4.2.2. Low-OH-Quarzfaser	33
4.2.2.1. Photoablation unter Luft	33
4.2.2.2. Photoablation unter PFCL	36
4.2.2.3. Ablationsübersicht Low-OH-Quarzfaser	42
4.2.3. Saphirfaser	43
4.2.3.1. Photoablation unter Luft	43
4.2.3.2. Photoablation unter PFCL	44
4.2.3.3. Ablationsübersicht Saphirfaser	51
5. DISKUSSION	52
5.1. Literaturvergleich mit anderen Studien	52
5.2. Beeinflussende Faktoren bei der Ablation der Membrana limitans interna mit dem Erbium:YAG-Laser	56
5.2.1. Vor- und Nachteile von Luft und PFCL als Ablationsmedium	56
5.2.2. Grundlagen, Einfluß und Vergleich beider Fasermaterialien	59
5.2.3. Einfluß von Pulsdauer und Pulswiederholungsrate	60
5.2.4. Eignung des Versuchsaufbaus/ Modells	61
5.3. Optische Kohärenztomographie	63
5.3.1. Korrelation von OCT und Histologie	63
5.3.2. Eignung des OCT zur Ablationskontrolle	65
6. ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK	67
7. LITERATURVERZEICHNIS	69
8. ANHANG	80
8.1. Danksagung	80
8.2. Selbstständigkeitserklärung	81
8.3. Lebenslauf	82
8.4. Publikationen und Vorträge	83

1. EINLEITUNG

Die Membrana limitans interna (ILM) ist die innerste Schicht der Netzhaut und grenzt diese zum Glaskörper hin ab (Abb.1). Sie ist die Basalmembran der Müllerschen-Stützzellen und geht anterior in die Basalmembran des nichtpigmentierten Ziliarepithels über. Die ILM ist aus Kollagen Typ I und Typ IV, aus den typischen Strukturproteinen Laminin und Fibronectin und aus Proteoglykanen aufgebaut. Sie ist azellulär, transparent und nur wenige Mikrometer dick.

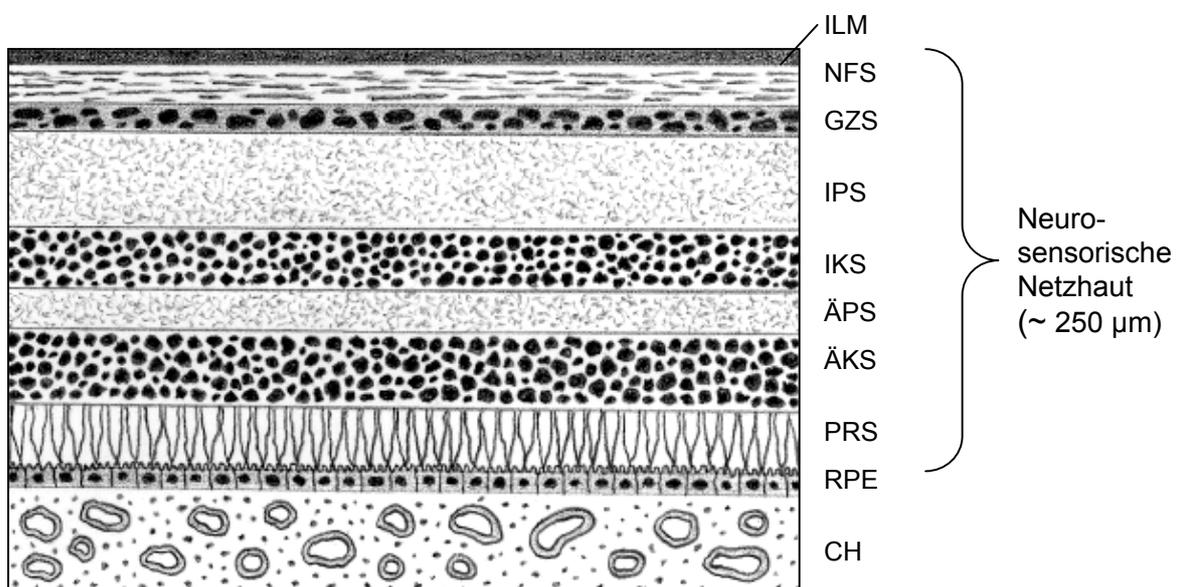


Abb. 1. Schematischer Aufbau der Netzhaut. (ILM= Membrana limitans interna; NFS= Nervenfaserschicht; GZS= Ganglienzellschicht; IPS= innere plexiforme Schicht; IKS= innere Körnerschicht; ÄPS= äußere plexiforme Schicht; ÄKS= äußere Körnerschicht; PRS= Photorezeptorschicht; RPE= Retinales Pigmentepithel; CH= Choroidea)

In den letzten Jahren hat sich die Entfernung der Membrana limitans interna zu einer etablierten Methode in der Makulachirurgie entwickelt. Verschiedene Studien weisen darauf hin, daß durch die Entfernung der Membrana limitans interna die primäre Verschußrate und der Visusgewinn bei Patienten mit einem Makulaloch deutlich erhöht werden kann [1, 10, 20, 53, 57, 58, 68]. Andere Untersuchungen zeigen einen positiven Einfluß der ILM-Entfernung auf die Resorption der intraretinalen Flüssigkeit bei Patienten mit diffusem diabetischen Makulaödem [3, 31, 83, 88].

Auch im Rahmen der chirurgischen Entfernung von epiretinalen Membranen scheint ein zusätzlich durchgeführtes ILM-Peeling das Risiko für Rezidive zu verringern [7].

Bisher lässt sich die Membrana limitans interna nur im Rahmen einer Vitrektomie mechanisch mittels kleiner Glaskörper-Häkchen und -Zangen entfernen. Eine 1999 unter vitreoretinalen Chirurgen im Rahmen der Vitreous Society gestellte Umfrage stuft die sogenannte ILM-Entfernung als schweres bzw. sehr schweres Verfahren mit langer Lernkurve ein [80]. Als Komplikationen der mechanischen ILM-Entfernung traten regelmäßig intraretinale Blutungen und Defekte in der tiefer gelegenen Nervenfaserschicht auf, welche zu zentralen Gesichtsfelddefekten führen können. So wiesen Haritoglou und Mitarbeiter nach Makulaloch-Chirurgie bei allen Patienten mikroperimetrisch parafoveale Skotome nach [35]. In einer jüngeren Fallstudie wurden nach unkomplizierter ILM-Entfernung im Zuge makulachirurgischer Verfahren sogar parazentrale Netzhautlöcher beobachtet [89].

Die chirurgische Technik der ILM-Entfernung wurde 2000 durch Kadonosono und Mitarbeiter durch die Einführung von Indocyaningrün (ICG) zur Anfärbung der ILM erheblich erleichtert [47]. ICG ist ein Vitalfarbstoff, der eine hohe Affinität zu extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen und Laminin aufweist, die Hauptbestandteil der ILM sind. Indocyaningrün ist damit in der Lage, die Membrana limitans interna selektiv anzufärben. In den folgenden Jahren wiesen jedoch mehrere Untersuchungen auf mögliche toxische Nebeneffekte der ICG-Anfärbung hin. In vitro Studien haben gezeigt, daß Indocyaningrün eine Apoptose von Zellen des Retinalen Pigmentepithels (RPE) induzieren kann [85] bzw. dosisabhängig das Wachstum von RPE-Zellen hemmt [42]. Ferner wurden Schädigungen von Müller-Zell-Fortsätzen beobachtet [73]. Gandorfer und Mitarbeiter vermuteten einen photodynamischen Effekt des Indocyaningrüns. Die von ihnen beobachteten Schäden waren abhängig von der verwandten Bestrahlungswellenlänge [30]. Auch klinische Studien weisen auf mögliche toxische Schäden des Indocyaningrüns hin: Ando und Mitarbeiter beobachteten nach ICG-gestütztem ILM-Peeling bei Patienten mit diabetischem Makulaödem in 46,7% der Fälle eine Papillenatrophie mit resultierendem Gesichtsfeldausfall vor allem im nasalen Quadranten [2]. Die Gruppe um Uemura und Kanda [94] wies nach ICG-assistiertem ILM-Peeling in 57% der Augen Gesichtsfelddefekte nach, auch hier vornehmlich im nasalen Bereich. In einer Folgestudie beobachteten Kanda, Uemura und Mitarbeiter abhängig von Konzentration und Expositionszeit Gesichtsfelddefekte [49].

Bereits eine 3-minütige Exposition der Netzhaut mit einer 0,5%igen ICG-Lösung führte in allen Augen zu postoperativen Gesichtsfeldausfällen. Wurde die 0,5%ige ICG-Lösung sofort ausgewaschen, wurden immerhin noch in 25% der Fälle Gesichtsfelddefekte nachgewiesen. In anderen Untersuchungen wurden postoperativ zirkuläre Atrophien des retinalen Pigmentepithels beobachtet [12, 23].

Anhand von Autofluoreszenz-Messungen wurde zudem eine Persistenz des Indocyaningrüns im Makulabereich von bis zu 7 bzw. 8 Monaten nachgewiesen [13, 72]. Diese lange Bindungszeit im Bereich des retinalen Pigmentepithels und der Nervenfaserschicht könnte prolongierte Gewebeschädigungen bedingen.

Ein anderer Farbstoff, der später als das ICG zur intravitrealen Anwendung eingeführt wurde, ist das Trypanblau. Trypanblau ist ein saurer, anionischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anion an Zellproteine bindet. Es färbt epiretinale Membranen stärker an als die ILM, ist wasserlöslicher als ICG und wird deshalb intraoperativ schneller ausgewaschen. Im Vergleich zu Indocyaningrün ist der Färbeeffekt weniger intensiv und nicht selektiv für die Membrana limitans interna. Auch bei Trypanblau wurden in experimentellen Studien zytotoxische Schädigungen des Retinalen Pigmentepithels nachgewiesen [46]. In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung zeigte sich nach Applikation von Trypanblau im Elektroretinogramm (ERG) eine signifikante Reduktion der B-Wellen [64].

Andere geeignete Vitalfarbstoffe sind zur Zeit in Erprobung. Vor kurzem wurde Brilliant Blue[®] zugelassen. Klinische Studien hierzu sind jedoch noch nicht produziert. Es besteht also nach wie vor der Bedarf für eine präzisere und unkomplizierte Form der Abtragung der Membrana limitans interna ohne Farbstoffeinsatz bei gleichzeitiger Schonung der tiefer liegenden Netzhautschichten. Als alternative Methode wurde daher die Laserabtragung in Betracht gezogen. Um eine definierte Abtragungstiefe von wenigen Mikrometern zu erreichen, darf das Laserlicht nur eine geringe optische Eindringtiefe aufweisen. Eine Wärmeleitung in die tiefer gelegenen Schichten sollte möglichst vermieden werden, um mögliche thermische Nekrosen auszuschließen. Sowohl Excimer-Laser als auch Infrarot-Laser erfüllen diese Voraussetzungen. Die optische Eindringtiefe (d) hängt vom Absorptionskoeffizient ($\mu\alpha$) ab, es gilt $d = 1 / \mu\alpha$. Der Absorptionskoeffizient des 193 nm ArF-Excimer-Lasers beträgt 40.000 cm^{-1} , die optische Eindringtiefe liegt damit bei $1/4 \text{ }\mu\text{m}$. Aufgrund dieser geringen optischen Eindringtiefe eignet sich der 193 nm ArF-Excimer-Laser besonders für eine oberflächliche Abtragung von Hornhautgewebe

und kommt weltweit im Rahmen der refraktiven Chirurgie zur Behandlung von Fehlsichtigkeit zum Einsatz [24, 26, 65, 87]. Nachteil des Excimer-Lasers ist jedoch die Größe des Gerätes, ein Einbau in kleine Handstücke ist nicht möglich. Für einen intraokularen Einsatz müsste das Laserlicht in sehr lange Fasern eingekoppelt werden, aufgrund der sehr geringen optischen Eindringtiefe wäre der Energieverlust durch Absorption dann jedoch zu hoch. Der Energieverlust durch Absorption könnte durch den Einsatz von Hohlleitern umgangen werden. Durch Hohlleiter wird durch das Prinzip der Totalreflexion eine Weiterleitung des Laserlichtes ohne signifikante Absorption ermöglicht. Ein intraokularer Einsatz von Hohlleitern ist aber problematisch: Hohlleiter mit größerem Durchmesser würden sich mit Flüssigkeit vollsaugen, die Verwendung von Hohlleitern mit sehr kleinem Durchmesser würde dies Problem zwar umgehen, für eine Flächenabtragung wären diese aber nicht geeignet.

Die Arbeitsgruppe um Lewis und Palanker versuchte, einen vitreoretinalen Einsatz durch die Entwicklung eines speziellen Applikators zu ermöglichen [38, 59, 76]. Der Applikator war jedoch relativ starr und unflexibel, überdies wurde als Zugang eine 1,5 mm große Sklerotomie benötigt, womit der Schnitt deutlich über dem durchschnittlichen Standard-Sklerotomie-Durchmesser von 0,9 mm liegt und mehr Komplikationen bedingen kann. Eine Gewebeabtragung wurde nur im direkten Kontakt-Verfahren und unter Luft durchgeführt. Zudem musste während der Abtragung ein kontinuierlicher Luftstrom auf die Retinaoberfläche geleitet werden, was klinisch nur schwer zu realisieren ist. Eine Reduktion des Luftstroms führte zu einer deutlichen bzw. vollständigen Abnahme der Ablationsrate. Alles in allem ist im routinemäßigen klinischen Einsatz eine gezielte Abtragung innerer Netzhautschichten mit dem Excimer-Laser nicht möglich. Lubatschowski et al. wiesen zudem nach 193nm-Excimer-Laser-Ablation eine laserinduzierte Emission einer Sekundärstrahlung im Bereich von 200-800 nm nach [62, 63]. Aufgrund der bekannten genetischen Aktivität von UV-Strahlung bei 240-280 nm könnten durch diese Sekundärstrahlung mutagene Schäden entstehen. Vor allem im Bereich von 248 nm hat das Laserlicht eine hohe optische Eindringtiefe und dringt bis auf die Ebene des Zellkerns durch ohne dabei die gesamte Zelle dabei zu zerstören. Die DNA im Zellkern wird geschädigt, die Zelle stirbt jedoch nicht ab, es entstehen Mutationen. Für die alternativen Excimer-Laser-Wellenlängen von 248 nm und 308 nm stehen zwar einfacher optische Lichtleiter zur Verfügung, in vitro Studien weisen jedoch ebenfalls auf eine cytotoxische und mutagene Wirkung dieser Laserstrahlung hin [32, 54, 82]. Ein weiterer Nachteil des Excimer-Lasers sind die hohen Anschaffungs- und Betriebskosten.

Alternative Laser für eine superfizielle Gewebeabtragung sind Infrarot-Laser. Infrarot-Laser wie der Nd:YAG, der CO₂, der Er:YSGG und der Er:YAG-Laser benutzen Wasser als Chromophor, welches Hauptbestandteil aller biologischen Gewebe ist. Ihre Ablation ist somit hauptsächlich abhängig von der Absorption der jeweiligen Wellenlänge in Wasser. Die Wellenlänge des Er:YAG-Lasers von 2,94 μm korrespondiert mit dem Absorptionsmaximum von Wasser im mittleren Infrarotbereich.

Der Absorptionskoeffizient des Er:YAG-Lasers beträgt 10.000 cm^{-1} , die optische Eindringtiefe in Wasser liegt damit bei $1\text{ }\mu\text{m}$ [34, 97,102, Abb.2].

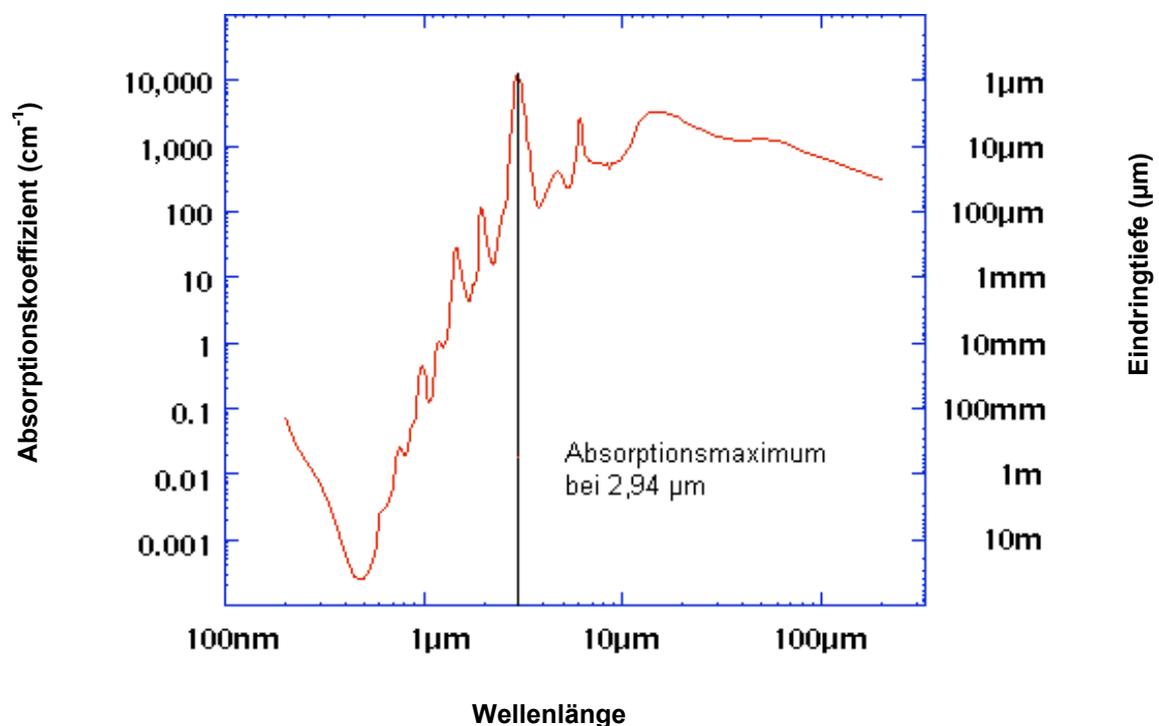


Abb. 2. Absorptionskoeffizienten von Wasser in Abhängigkeit der Wellenlänge und optische Eindringtiefe; aus Hale und Querry [32]

Im Vergleich zu anderen Infrarot-Lasern hat der Erbium:YAG-Laser die geringste optische Eindringtiefe, eine präzise Gewebeabtragung wird dadurch ermöglicht.

Das Erbium:YAG-Lasersystem wurde in unserer Studie in ein Handstück eingebaut und lieferte damit ein kompaktes, mobiles, kostengünstiges und einfach zu sterilisierendes Instrument.

Es liegen zahlreiche Studien zur Anwendung des Er:YAG-Lasers in der Ophthalmologie vor. Im Rahmen der Glaukomchirurgie wurde der Erbium:YAG-Laser zur Durchführung von Tiefen Sklerektomien eingesetzt [52, 96], zum Einsatz in der Hornhautchirurgie finden sich erste experimentelle Untersuchungen [91].

Der Erbium:YAG-Laser eignet sich überdies zur sicheren und effektiven Linsenentfernung [19, 40, 90, 95]. Auch im Bereich der vitreoretinalen Chirurgie wurden mehrere experimentelle und klinische Arbeiten publiziert: der Erbium:YAG-Laser zeigte sich dabei sowohl geeignet für die Entfernung des Glaskörpers [5, 51, 55, 56, 70, 77] als auch für eine Durchtrennung von Glaskörpersträngen [66].

D'Amico und Mitarbeiter erzeugten unter Luft am enukleierten Kaninchenauge Netzhautdefekte von 30 µm Tiefe bis hin zur kompletten Retinotomie [18]. In Folgestudien unternahm die gleiche Arbeitsgruppe ebenfalls unter Luft Durchtrennungen von Glaskörper,- sowie epi- und subretinalen Membranen [16, 17].

Brazitikos und Mitarbeiter berichteten über eine Inzision von Glaskörper- und epiretinalen Membranen am Kaninchenauge, ihre Versuche wurden aber nicht nur unter Luft, sondern auch unter Wasser und Perfluorkarbon (PFCL) durchgeführt [8]. In der Folge wurde von verschiedenen Autoren über erste retinale Abtragungsversuche an enukleierten Schweineaugen berichtet [9, 29, 99]. Eine gezielte Abtragung der Membrana limitans interna wurde jedoch von keiner der genannten Studiengruppen versucht.

2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN

Im Rahmen dieser experimentellen in vitro-Studie sollte an enukleierten Schweineaugen untersucht werden, ob sich der Erbium:YAG-Laser zur gezielten und sicheren Abtragung innerer Netzhautschichten, insbesondere der Membrana limitans interna, eignet.

- ◆ In Vorversuchen sollten durch mehrfache Modifikationen des Versuchsaufbaus zunächst die Voraussetzungen geschaffen werden, um einen realitätsnahen Versuchsaufbau für die optimale Untersuchung des Lasers zu gewährleisten und um andere Einflüsse auszuschließen.
- ◆ Zur Einkopplung des Erbium:YAG-Laserlichtes kamen 2 verschiedene Fasersysteme zur Anwendung: Low-OH-Quarz und Saphir. Durch Wechsel der Faser sollte herausgefunden werden, ob die Eigenschaften des Fasermaterials einen signifikanten Einfluß auf die Abtragungseigenschaften und -ergebnisse des Erbium:YAG-Lasers haben.
- ◆ Die Laserablation wurde vergleichend sowohl unter Luft, als auch unter flüssigem Perfluorkarbon vorgenommen. Es sollte hiermit untersucht werden, ob und inwieweit das umgebende Medium bei einer Laserablation die Abtragung verändert.
- ◆ Als Schnelltest zur sofortigen Beurteilung der behandelten Proben wurde der Prototyp eines spaltlampenadaptierten Optischen Kohärenztomographie-Gerätes eingesetzt. Durch Vergleich zwischen lichtmikroskopischer Aufnahme und OCT-Bild sollte herausgefunden werden, inwieweit sich die Optische Kohärenztomographie als bildgebendes Verfahren für eine Visualisierung der Abtragung innerer Netzhautschichten in vivo eignen würde.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Erbium:YAG-Laser

3.1.1. Allgemeine Grundlagen

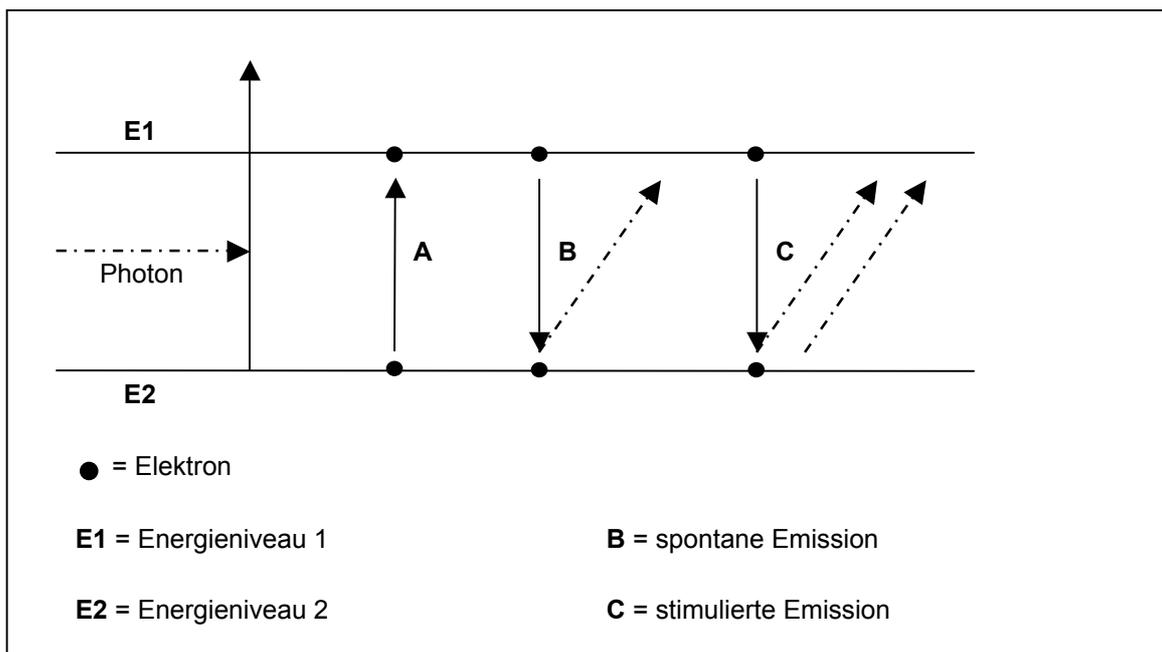


Abb. 3. spontane und stimulierte Emission

Das Grundprinzip aller Laser ist die stimulierte Emission.

Trifft ein Photon auf ein Elektron im Grundzustand E1, so geht dieses Elektron durch Einstrahlung des Photons in den angeregten Zustand E2 über (Abb. 3, A). Das angeregte Elektron im Zustand E2 fällt spontan wieder in den Grundzustand E1 zurück, hierbei kommt es zur Abstrahlung eines Photons (Abb. 3, B). Diesen Prozeß nennt man spontane Emission.

Trifft ein Photon nun aber auf ein Elektron im angeregten Zustand E2, so kommt es beim anschließenden spontanen Übergang in den Grundzustand zur Abstrahlung von 2 Photonen (Abb. 3, C). Dies bezeichnet man als stimulierte Emission. Das Photon wird durch stimulierte Emission also verdoppelt. Die entstehenden zwei Photonen haben dieselbe Wellenlänge, d.h. sie sind monochromatisch. Zudem schwingen sie in derselben Phase, sind damit zeitlich und räumlich zusammenhängend, d.h. sie sind kohärent.

Bei der stimulierten Emission ist nur dann ein Energiegewinn möglich, wenn sich mehr Elektronen im angeregten Energieniveau E2 als im Grundzustand E1 befinden. Laser bedienen sich zur Erlangung dieses Ziels eines zusätzlichen 3. bzw. 4. Energieniveaus (Abb.4.).

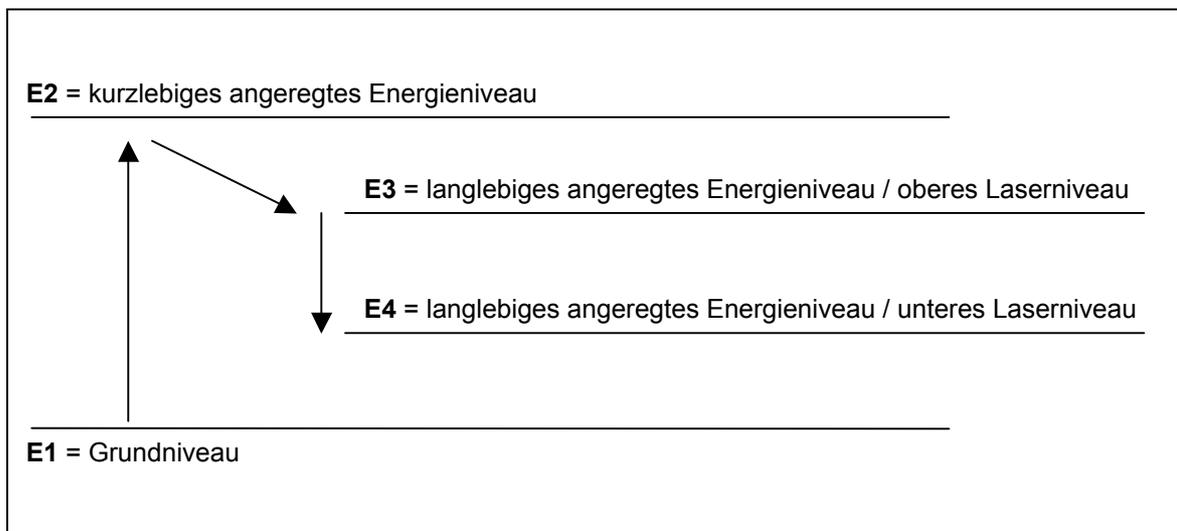


Abb. 4. Energieniveaus eines Lasers

Ziel aller Laser ist Inversion: Inversion ist gegeben, wenn die Besetzungsdichte der Elektronen im energetisch höher gelegenen Zustand E3 größer als im energetisch niedrig gelegenen Energiezustand E4 ist. Die für die Anhebung der Elektronen in die höheren Energieniveaus erforderliche Energie wird dem System durch eine Pumplampe zugeführt.

Ein Laser besteht aus einem aktiven Medium, das nach Energiezufuhr über eine optische Pumplampe das Licht in einem Resonator durch stimulierte Emission verstärkt. Der optische Resonator besteht aus zwei, einander gegenüberliegenden Spiegeln, die genau parallel in einer Achse ausgerichtet sind. Innerhalb des Resonators kann sich durch Reflexion eine stehende Lichtwelle aufbauen, die beim Durchgang durch das aktive Medium verstärkt wird. Durch Verwendung eines teilreflektierenden Spiegels wird an einem Ende ein kohärenter Laserstrahl ausgekoppelt (Abb.5).

Der in unserer Studie verwendete Erbium:YAG-Laser gehört zur Gruppe der Festkörperlaser. Das aktive Medium besteht aus Erbium-Ionen, die in einen Kristall als Trägermaterial eingebaut (dotiert) sind.

Erbium, ein Seltenenmetall mit der Wertigkeit 3+, gehört zu den Elementen der 3. Nebengruppe des Periodensystems. Als Kristall wird ein Granat, das $Y_3 Al_5 O_{12}$ (YAG = Yttrium Aluminium Garnet), benutzt [15, 21, 22, 50, 92].

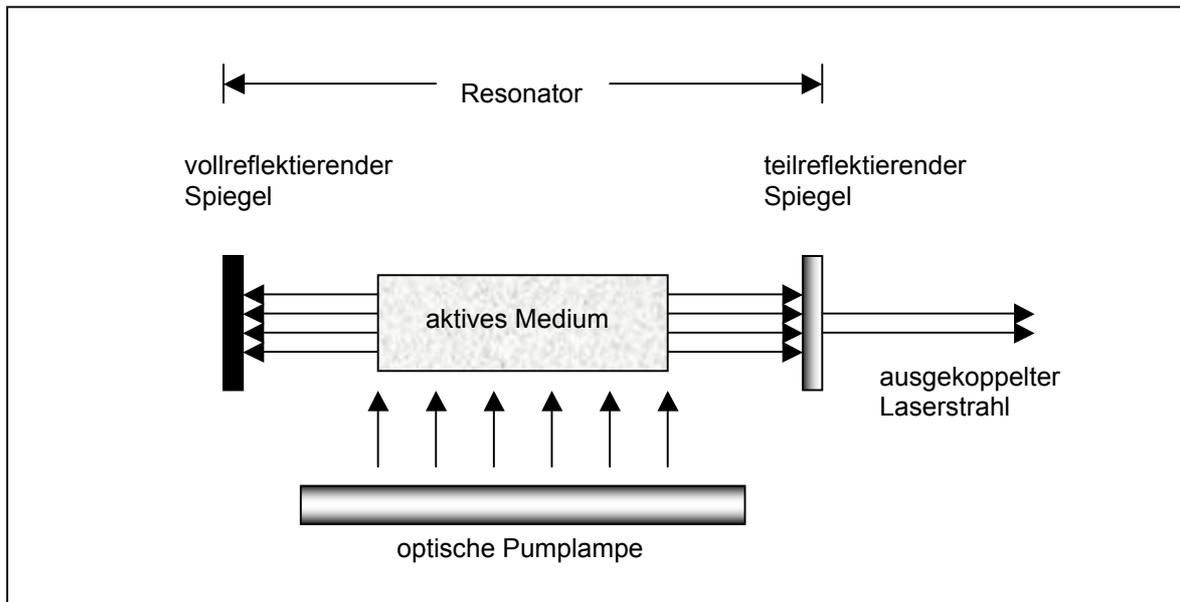


Abb. 5. Funktionsprinzip von Festkörperlasern, modifiziert nach Karamanolis [50]

Das Prinzip der Gewebeabtragung mit dem Erbium:YAG-Laser ist das der Photoablation [74]: hierbei handelt es sich um einen nicht-linearen Vorgang, maßgeblich dabei ist die pro Volumen und Zeit zugeführte Laserenergie. Nach Absorption der Laserstrahlung führt die Photonenenergie zu einer Anregung von H_2O -Molekülen. Aufgrund der sehr geringen thermischen Relaxationszeit von $< 1 \mu\text{sec}$. in Wasser, wird das bestrahlte Volumen schlagartig aufgeheizt und verdampft im Form einer Mikroexplosion (Abb. 6).

Diesen Prozeß bezeichnet man auch als photothermische Ablation. Die Abgabe von Wärme in das umliegende Gewebe kann vernachlässigt werden. Der Erbium:YAG-Laser ist deshalb besonders geeignet für oberflächliche Gewebeabtragungen.

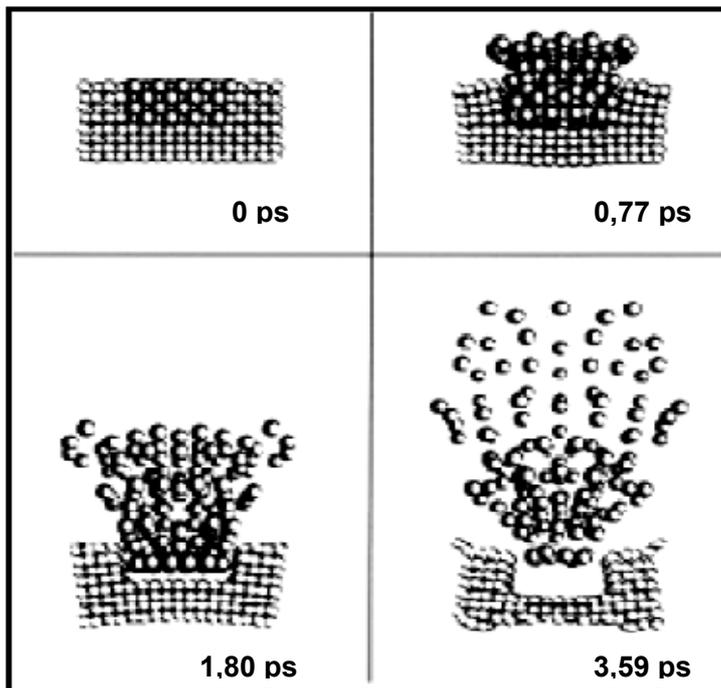


Abb. 6.
Computersimulation
eines Photoablations-
prozesses auf
molekularer Ebene
als Funktion der Zeit,
modifiziert aus
M.H. Niemz [74]

3.1.2. Laser-Spezifikationen und Fasermaterialien

Für die Versuche wurde ein freilaufender Erbium:YAG-Laser (Schwind, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von $2,94 \mu\text{m}$ verwendet, der direkt in ein Applikationshandstück eingebaut ist.

Anhand der Pulsdauer wird zwischen freilaufenden und gütegeschalteten Lasern unterschieden. Die Pulsdauer eines freilaufenden Lasers liegt $\geq 100 \mu\text{sec.}$, die Inversionsdauer entspricht hier der Pumplampen/ Blitzlampen-Dauer. Die Pulsdauer eines gütegeschalteten Lasers ist sehr viel kürzer und beträgt $< 100 \text{ nsec.}$ Ein Güteschalter, auch Q-switch genannt, ist ein optischer Baustein, der zur Erzeugung von Laserimpulsen hoher Intensität dient. Der teilreflektierende Spiegel innerhalb des Lasers wird durch den Güteschalter für einen definierten Zeitraum blockiert. Hierdurch tritt keine Laseraktivität ein, die Inversion wird maximal. Wird der Güteschalter dann aufgemacht, so wird die gesamte Inversion/ Energie in einem einzigen Puls abgeräumt. Die Intensität in einem gütegeschalteten Laser ist deshalb ca. 2000fach höher als beim freilaufenden Laser. Für eine sehr oberflächliche Gewebeabtragung scheint die Güteschaltung somit nicht geeignet zu sein, in unseren Versuchen wurde deshalb ein freilaufender Laser eingesetzt. Die Pulsdauer lag in allen Versuchsreihen bei $400 \mu\text{sec.}$

Fasermaterialien zur Einkopplung des Erbium:YAG-Laserlichtes sind Saphir, Zirkonium Fluorid, Germanium Oxid und Silizium/ Quarz (Tabelle 1).

Fasermaterial	Transmissionsrate bei 2,94 μm	Kurzzeitig möglicher Krümmungsradius	Toxizität
<i>Saphir</i>	65-80% pro m	8 cm	keine
<i>Zirkonium Fluorid</i>	90% pro m	2-4 cm	hoch
<i>Germanium Oxid</i>	70% pro m	1,5 cm	ja
<i>Silizium / Quarz</i>	60-70% pro cm	sehr brüchig	keine

Tab. 1. Fasermaterialien für Erbium:YAG-Laser, aus Neubaur et al. [75]

Saphir, Zirkonium Fluorid und Germanium Oxid haben mit 65-90% pro m eine sehr gute Transmissionsrate, Silizium bzw. Quarz hingegen weisen eine deutlich geringere Eignung auf. Für eine klinische Anwendung spielt vor allem auch eine mögliche Toxizität des Materials eine entscheidende Rolle: Saphir und Silizium/Quarz weisen hier im Gegensatz zu Zirkonium Fluorid und Germanium Oxid keinerlei toxische Effekte auf. Nachteil der Saphirfaser sind die höheren Herstellungskosten: aufgrund der Härte von Saphir ist ein Schleifen und Polieren des Faserendes nur mit Diamanttüchern möglich.

In den Vorversuchen sowie der ersten Versuchsreihe des Hauptversuchs wurde der Erbium:YAG-Laser in eine 10 cm lange Low-OH-Quarzfaser (Ceram Optec, Bonn, Deutschland) mit einem Kerndurchmesser von 400 μm eingekoppelt.

Die weiteren Versuche wurden mit einer 2 m langen Saphirfaser (Photran, Amherst, NH, USA) durchgeführt. Der Kerndurchmesser lag hier bei 425 μm .

Durch den Wechsel der Fasern sollte im Rahmen unserer Versuche herausgefunden werden, ob die Auswahl des Fasermaterials einen Einfluß auf die Abtragungseigenschaften des Erbium:YAG-Lasers hat und somit der finanzielle Aufwand bei Einsatz einer Saphirfaser notwendig ist.

3.2. Kavitationsblasen

Die Entstehung von Kavitationsblasen im wässrigen Medium spielt in der Laserchirurgie eine entscheidende Rolle und muß bei der Planung und Interpretation der Versuche berücksichtigt werden [27, 28, 44, 69]. Befindet sich das Faserende des Lasers nicht in direktem Kontakt mit dem zu behandelnden Gewebe, so wird die Laserenergie in der residuellen wässrigen Flüssigkeitsschicht zwischen Faser und Gewebe absorbiert. Die nur sehr geringe Wärmediffusion in Wasser führt dazu, daß die Laserenergie eine Umwandlung des Wassers in Wasserdampf bewirkt. Der entstehende Wasserdampf hat einen hohen Anfangsdruck und dehnt sich rotationssymmetrisch aus. Durch die so entstehende Strömung kommt es zur Ausbildung einer Kavitationsblase und Abstrahlung einer Stoßwelle. Die kinetische Energie der Strömung nimmt solange zu, bis sie mit dem umliegenden hydrostatischen Druck im Gleichgewicht steht. Aufgrund ihrer Massenträgheit setzt die Flüssigkeit ihre Bewegung aber noch fort, wenn das Gleichgewicht schon erreicht ist. Dadurch sinkt der Blaseninnendruck weiter ab und es kommt im folgenden zum Kollaps der Blase und zur Abstrahlung einer zweiten Stoßwelle. Die Kavitationsblase breitet sich somit zylindrisch in axialer Richtung aus, der Kollaps der Blase führt zum Aufbau einer starken Druckwelle.

Ein weiterer Mechanismus kann zusätzliche schädigende Nebeneffekte verursachen: da der Absorptionskoeffizient von Wasserdampf wesentlich geringer ist als der von Wasser, kann die Laserstrahlung innerhalb der Kavitationsblase eine Wegstrecke zurücklegen, die weit über ihrer Eindringtiefe in Wasser liegt. Dadurch können Laserspitzen durch die Blase hindurch fortgeleitet werden und zu Gewebeschäden am distalen Ende der Blase führen [60]. Die Dynamik der Kavitationsblase und die Stoßwellenabstrahlung können somit zu unerwünschten mechanischen Nebeneffekten führen, die die eigentliche Wirkung des Lasers auf das Gewebe verändern.

Nachdem anfängliche Abtragungsversuche unter Luft erfolgten, wurden die Proben in einer zweiten Versuchsreihe vor Applikation der Laserpulse mit einer 5 mm dicken Schicht von flüssigem Perfluorkarbon (PFCL) überschichtet; die Entstehung von Kavitationsblasen in wässrigem Medium sollte durch PFCL verhindert werden.

3.3. Flüssige Perfluorkarbone (PFCL)

Flüssige Perfluorkarbone sind synthetische gesättigte fluorinierte Kohlenverbindungen, die bereits seit längerem in der Glaskörper- und Netzhaut-Chirurgie als intraoperatives Hilfsmittel zur Anwendung kommen [6, 14, 25, 79]. Sie sind farblos, optisch klar und können aufgrund ihrer Stabilität im Körper nicht abgebaut werden. Die am häufigsten klinisch eingesetzten Vertreter sind das Perfluoroktan (PFO) und das Perfluorodekalin (PFD). Die physikochemischen Eigenschaften sind in Tab. 2 dargestellt.

	Wasser	Perfluoroktan	Perfluorodekalin
Molekulargewicht (g/mol)	18	438	462
Dichte (kg/l)	0,97	1,78	1,92
Oberflächenspannung (mN/m)	73	14	17,6
Brechungsindex	1,33	1,27	1,31

Tab. 2. physikochemische Eigenschaften verschiedener PFCL, aus Faude et al. [25]

Perfluorkarbone absorbieren keine Laserstrahlen [25]. Durch ihre hohe Transmissionsrate für Erbium:YAG-Laserlicht garantieren sie eine verlustfreie Übertragung der Laserenergie auf das abzutragende Gewebe [28].

Durch seine hohe Dichte im Vergleich zu Wasser (Tab. 1) sind PFCL in der Lage, auf der Retinaoberfläche verbliebene wässrige Flüssigkeitsreste zu verdrängen. Die Abtragungseffizienz bei gleicher Energiedosis wird unter PFCL erhöht. Überdies entstehen im Gegensatz zur Ablation unter Wasser bei der Verwendung von PFCL keine starken Druckwellen im Gewebe [28, 29]. Störende mechanische Nebeneffekte, die das Abtragungsergebnis negativ beeinflussen, können unter PFCL somit vermieden werden. In unseren Versuchsreihen wurde PFCL der Firma Bausch & Lomb Surgical (München) verwendet.

3.4. Vorversuche

Die im folgenden aufgeführten Vorversuche waren notwendig, um einen möglichst realitätsnahen Versuchsaufbau für den Hauptversuch zu entwickeln. Einzelne Schritte des Versuchsaufbaus wurden mehrfach überarbeitet und verbessert, um eine reproduzierbare und vergleichbare Methode zur optimalen Evaluation des Erbium:YAG-Lasers für die Abtragung innerer Netzhautschichten zu schaffen.

3.4.1. Handgehaltene Applikation am Schweinebulbus

Methode

Die Schweinebulbi wurden etwas unterhalb des Limbus mit dem Skalpell eröffnet und dann der Glaskörper vorsichtig herausgekippt. Makroskopisch auf der Netzhautoberfläche erkennbare Flüssigkeitsreste wurden vorsichtig mit einem Keiltupfer abgesaugt. Die Applikation der Laserpulse erfolgte handgehalten im Kontakt mit der Retinaoberfläche. Zwischen den großen Gefäßbögen wurde makulanah ein Bereich von etwa 3 mm Durchmesser mit einzelnen Laserherden behandelt. Der Bulbus wurde anschließend komplett in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Insgesamt wurden 5 Augen untersucht. Ein Auge wurde mit einer Energiedosis von 4,0 Joule/ cm² behandelt, 4 Augen mit 3,2 Joule/ cm².

Ergebnisse

Unter 4,0 Joule/ cm² fanden sich bis zur Ganglienzellschicht reichende Läsionen (Abb. 7, Pfeile), die Defekttiefe lag bei 44 µm. Eine Reduktion auf 3,2 Joule/ cm² führte wider Erwarten zu einer Gewebeablation bis in den Bereich der inneren Körnerschicht (Abb. 8, Pfeile), die Abtragungstiefe war 96-120 µm. In keinem Präparat wurden thermische Nekrosezonen gesehen. Ein weiteres Auge wurde mit einer Energiedosis von 1,2 Joule/ cm² behandelt, es konnten hier aber keinerlei Defekte nachgewiesen werden.

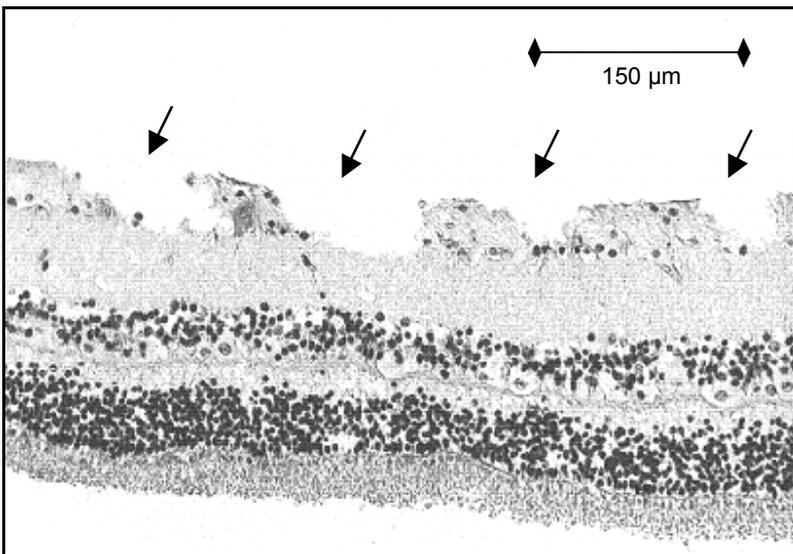


Abb. 7. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 4,0 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser, handgehalten, Schweinebulbus. Man sieht mehrere bis zur Ganglienzellschicht reichende Defekte (Pfeile).

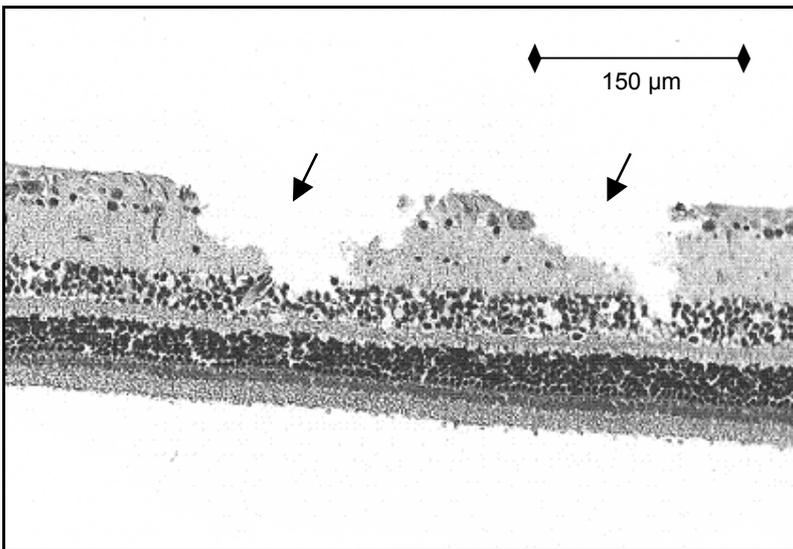


Abb. 8. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 3,2 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser, handgehalten, Schweinebulbus. Die Abtragung (Pfeile) erreicht die äußere Körnerschicht.

Schlussfolgerungen

In dieser Vorversuchsreihe waren vor allem die unterschiedlichen Abtragungstiefen auffällig. Im Gegensatz zu 4,0 Joule/ cm² zeigten sich unter 3,2 deutlich tiefere Läsionen. Diese Diskrepanz musste auf störende Nebeneffekte zurückgeführt werden: bei einer handgehaltenen Applikation der Laserpulse in Kontakt mit der Retinaoberfläche unter rein makroskopischer Kontrolle konnte der Abstand zur Retinaoberfläche nicht sicher abgeschätzt werden, unerwünschte mechanische Effekte konnten somit nicht sicher ausgeschlossen werden.

Ein Auftreten von Kavitationsblasen konnte zu zusätzlichen schädigenden Nebeneffekten führen. Weitere mögliche Ursachen liegen in der histologischen Beurteilung, da die Aufarbeitung der Proben zunächst dadurch erschwert war, daß der Schweinebulbus nach der Entwässerung und Paraffinierung sehr hart wurde und sich schwer schneiden ließ. Dadurch waren nicht alle Schnitte verwertbar.

Außerdem stellte sich heraus, daß der gelaserte Bereich im Verhältnis zum Gesamtpräparat zu klein war, um die einzeln gesetzten Laserherde bei komplett eingebettetem Bulbus sicher und einfach wieder aufzufinden. Reproduzierbare Ablationsergebnisse waren unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich.

3.4.2. Mechanische Applikation am Schweinebulbus

Methode

Zur Verbesserung der Abstandskontrolle wurde im folgenden der Erbium:YAG-Laser in eine Halterung eingespannt, die durch ein mechanisches Absenken der Laserhandstücks im 90°-Winkel zur Retinaoberfläche eine bessere Positionierung der Faser erlaubte (Abb. 8). Die Faser wurde damit möglichst dicht auf die Retina abgesenkt ohne jedoch direkten Kontakt zur Retinaoberfläche zu haben. Die Abstandskontrolle erfolgte rein visuell.

Die einzelnen Laserherde wurden in einer Linie zwischen den beiden großen Gefäßbögen gesetzt. Durch horizontale Verschiebung mit Hilfe einer Mikrometerschraube wurde eine annähernd 50%ige Überlappung der Herde erreicht. Die so produzierte Defektlinie sollte es ermöglichen, in der anschließenden histologischen Aufarbeitung in jedem Schnitt einen Defekt aufzufinden. Um Kavitationsblasen zu vermeiden, wurde der Bulbus mit PFCL aufgefüllt (Abb. 9).

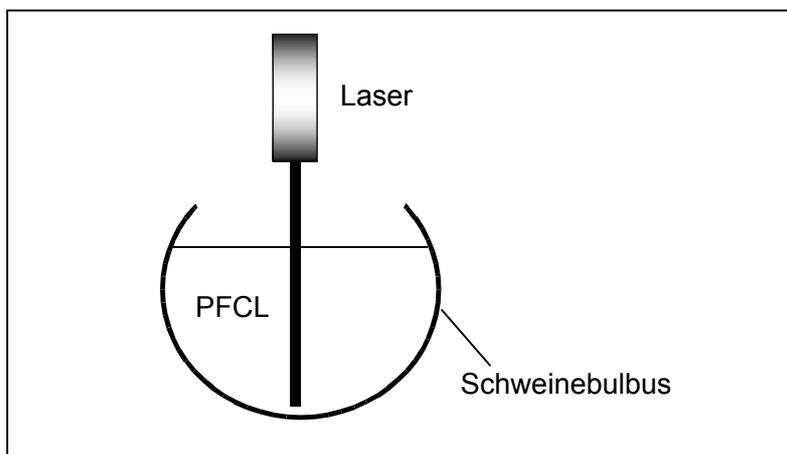


Abb. 9.
Mechanische
Applikation am
PFCL-gefüllten
Schweinebulbus

Erst nach der Laserbehandlung wurde aus dem Bereich zwischen den Gefäßbögen ein Bulbusstück ausgestanzt und nur dieses dann eingebettet und geschnitten.

Mit dem Ziel der selektiven Abtragung der Membrana limitans interna wurden insgesamt 5 Augen nur im niedrigen Dosisbereich behandelt: jeweils 2 Augen unter 2,0 Joule / cm² und 1,5 Joule / cm² sowie ein Auge unter 1,0 Joule / cm².

Ergebnisse

In allen 5 Präparaten ließen sich in der Lichtmikroskopie keine Defekte nachweisen.

Schlussfolgerungen

Da die Laserherde makroskopisch nicht sichtbar waren, konnte bei ungenügender visueller Kontrolle nicht sicher gewährleistet werden, ob mit der Stanze auch wirklich der gelaserte Bereich exzidiert wurde. Ferner lagen die gewählten Energiedosen möglicherweise unterhalb der Ablationsschwelle. Letztlich konnte bei eingeschränktem Einblick in den Bulbus der Abstand des Lasers zur Netzhautoberfläche nur schwer eingeschätzt werden. Der Versuchsaufbau musste im folgenden weiter überarbeitet werden.

3.4.3. Mechanische Applikation an der Bulbusstanze

Methode

Aus den Schweinebulbi wurde nun zuerst eine Stanze entnommen, welche dann behandelt wurde. Die übrige Versuchsdurchführung entsprach der unter 3.3.2. dargestellten Methode. Es wurde in aufsteigender Dosis mit 3,0 / 3,3 / 3,6 / 5,0 / 6,4 / 8,0 Joule/ cm² gelasert; pro Energiestufe wurde jeweils 1 Auge behandelt.

Ergebnisse

Histologisch waren im unteren Dosisbereich von 3,0 bis 3,6 Joule / cm² erneut keine Defekte nachweisbar.

Mit einer Dosis von 5,0 , 6,4 und 8,0 Joule / cm² ließ sich hingegen eine vollständige Durchtrennung der neurosensorischen Netzhaut erzeugen (Abb. 10), begleitend fanden sich thermische Nekrosen (Pfeil).

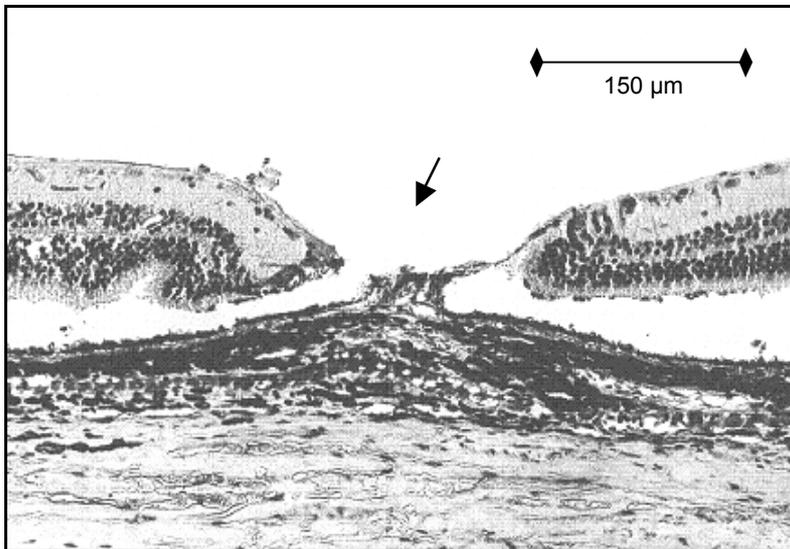


Abb. 10. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 6,4 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser, mechanische Applikation, Bulbusstanze. Die neurosensorische Retina ist vollständig durchtrennt.

Schlussfolgerungen

Trotz Verbesserung der Methode waren keine mittleren oder oberflächlichen Abtragungen möglich. Auffällig war das stark unterschiedliche Abtragungsergebnis zwischen 3,6 und 5,0 Joule / cm². Eine vergleichsweise nur geringe Erhöhung der Energiedosis führte hier zu einem deutlich unterschiedlichen Ablationsergebnis.

Ein weiterhin bestehendes Problem war eine immer noch unzureichende Kontrolle des Abstandes der Faser zur Retina.

Die Abstandskontrolle wurde deshalb durch Einbau eines Standmikroskops und Absenken der Faser mittels Mikrometerschrauben weiter verbessert (Abb. 11) und der Abstand von Faserspitze und Retina konnte so auf exakt 0,5 mm eingestellt werden. Der in Abb. 11 dargestellte Aufbau wurde für die Durchführung der Hauptversuche beibehalten.

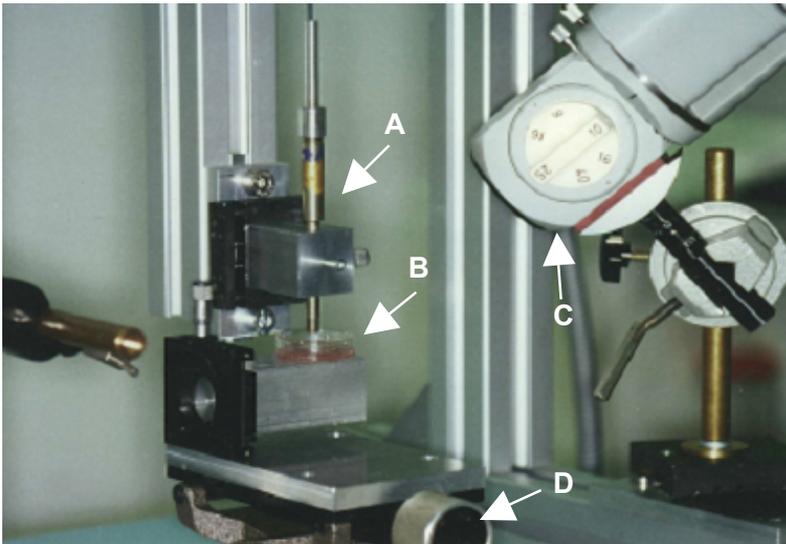


Abb. 11.

Versuchsaufbau

Erbium:YAG-Laser.

A= Faser

B= Retinaprobe

C= Standmikroskop

D= Mikrometerschraube

zur horizontalen

Verschiebung des

Objektisches

Für eine definierte Abstandseinstellung erschien die Oberfläche der Stanze aber immer noch zu unregelmäßig. Durch das Aufbringen der neurosensorischen Retina auf eine glatte Oberfläche (einen Filter) sollten im folgenden Unebenheiten reduziert werden. Im Kapitel 3.4. wird auf die Herstellung eines solchen Retinaorganexplantates im Detail eingegangen. Die Voraussetzung für eine möglichst realitätsnahe Versuchsdurchführung im Rahmen des Hauptversuchs war nun gegeben.

3.5. Hauptversuch

3.5.1. Herstellung der Retinaorganexplantate

Die Versuche wurden an frisch enukleierten Schweinebulbi aus dem Schlachthof (nicht älter als 4 h post-mortem) durchgeführt. Sofort nach der E nukleation wurden die Bulbi in sterile PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung, bestehend aus NaCl 137 mM / KCl 2,7 mM / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM / KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,3) gegeben und in einer Kühlbox in das Labor transportiert. Die Schweinebulbi wurden limbusnah aufgeschnitten, das Vordersegment und der Glaskörper entfernt.

Verbliebene Flüssigkeits- und Glaskörperreste wurden vorsichtig mittels eines Keiltupfers so vollständig wie möglich abgesaugt. Die folgende Herstellung des Retinaorganexplantates orientierte sich an der von Winkler und Mitarbeitern entwickelten Methode [100].

Im zentralen Netzhautbereich wurde ein kreisrundes Stück Retina mit 5 mm Durchmesser ausgestanzt (Biopsie-Stanzen, ultrascharf, 5 mm, REF 48-000.00, pfm: Produkte für die Medizin GmbH, Köln) und die neurosensorische Retina mit einer Pinzette vorsichtig vom Pigmentepithel abgehoben. Auf die Oberfläche eines Filters (Millicell-HA® culture plate inserts: 30 mm Durchmesser; Millipore Corporation, Bedford, U.S.A.) wurde ein Tropfen Wasser gesetzt und die abpräparierte Retina vorsichtig auf diesen gegeben. Durch die hohe Oberflächenspannung des Wassers entfaltete sich die Netzhaut auf dem Tropfen. Anschließend wurde der Wassertropfen vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die Netzhaut haftete nun auf der hydrophilen Filteroberfläche sehr plan und ohne erkennbare Unregelmäßigkeiten. Der Filter wurde zirkulär im Abstand von ca. 0,5 mm zur Retina ausgeschnitten und die Probe an einer Seite begradigt, um später eine Orientierungsfläche für das Setzen der Laserherde zu erhalten. Die vorbereitete Probe wurde dann auf den mit Wachs (Morsa Modellierwachs, 1 mm Dicke) ausgelegten Boden einer flachen Petrischale gelegt und der äußere Filterrand durch leichten Druck auf dem Wachs befestigt (Abb. 12).

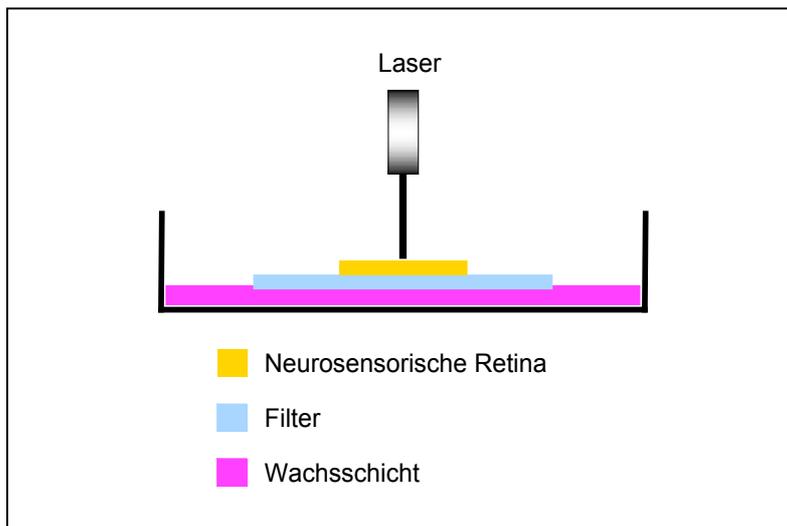


Abb. 12.
Versuchsaufbau
Erbium:YAG-Laser

3.5.2. Erbium:YAG-Laser-Abtragung

3.5.2.1. Low-OH-Quarzfaser

Die Retinaexplantate wurden mit einer Dosis von 5,0 / 3,0 und 2,0 Joule / cm² pro Puls bestrahlt. In einer ersten Versuchsreihe erfolgte die Abtragung unter Luft, in einer zweiten Reihe wurden die Proben vor der Applikation der Laserpulse mit einer 5 mm dicken Schicht von Perfluordekalin (ADATODECA, Bausch & Lomb Surgical, München) überschichtet. Unter Luft wurden insgesamt 6 Augen, unter Perfluordekalin 9 Augen behandelt.

3.5.2.2. Saphirfaser

Die Proben wurden mit einer Energiedosis 5,0 / 4,0 / 3,0 / 2,0 / 1,0 und 0,5 Joule / cm² bestrahlt. Unter Luft wurden stichprobenartig nur 2 Augen mit 5,0 und 1,0 Joule / cm² behandelt, alle weiteren Augen wurden dann vor der Laserbehandlung mit Perfluoroktalin (Perfluoroktan, ADATOOCTA, Bausch & Lomb Surgical, München) überschichtet. Unter Perfluoroktalin wurden insgesamt 12 Augen behandelt.

3.5.3. Optische Kohärenztomographie (OCT)

3.5.3.1: Grundlagen der OCT

Die optische Kohärenztomographie funktioniert ähnlich dem B-Scan der Ultraschalluntersuchung, nur daß hier anstatt akustischer Wellen die Interferenz von reflektiertem Licht gemessen wird. Grundlage der Messungen ist die Interferometrie mit kurzkohärentem Licht [36, 41, 43, 81, 86]. Ein teilreflektierender Spiegel spaltet dabei das Licht einer Superlumineszenzdiode in 2 Strahlen auf. Ein Strahl wird auf die zu untersuchende Probe geleitet, der zweite auf einen Referenzspiegel mit bekannter räumlicher Position. Der von der Probe reflektierte Strahl wird mit dem Referenzstrahl kombiniert und von einem Detektor aufgenommen (Abb. 13). Wenn die Wegstrecken, die der Referenzstrahl und der Probenstrahl zurücklegen, im Bereich einer Kohärenzlänge übereinstimmen, kommt es zur Interferenz.

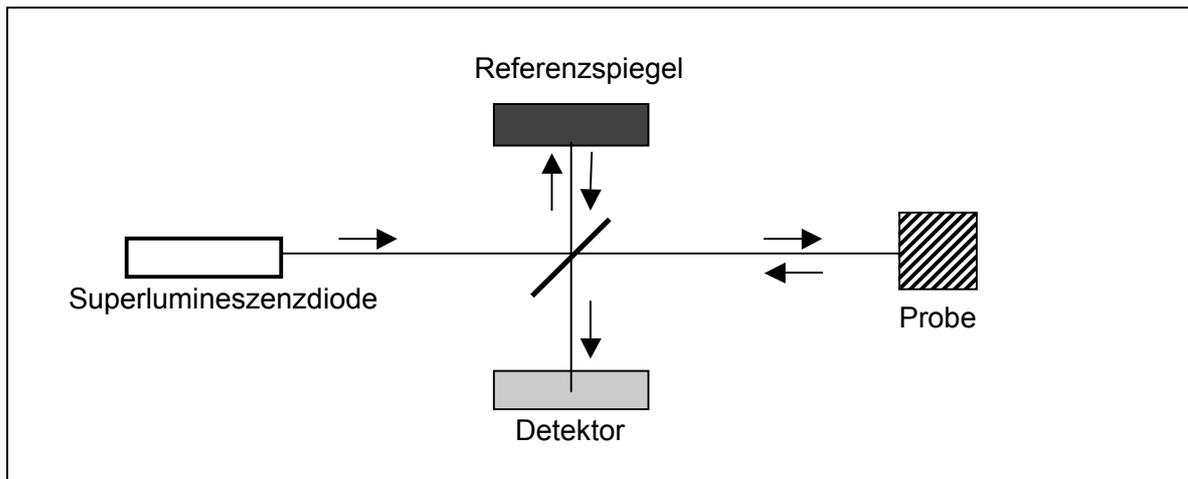


Abb. 13. schematische Darstellung eines Interferometers, aus Puliafito et al. [81]

Durch definierte Positionsveränderung des Referenzspiegels und daraus resultierender Zeitverzögerung des Referenzstrahls kann eine Tiefenabtastung der zu untersuchenden Probe erzielt werden. Durch Verarbeitung zahlreicher axialer Messungen in verschiedenen transversalen Positionen wird ein zweidimensionales Bild erzeugt.

Wird eine kontinuierliche kurzkohärente Lichtquelle verwendet, so hängt die Auflösung von der Kohärenzlänge der Lichtquelle ab und entspricht dem kleinsten Abstand, bei dem zwei Signale gerade noch getrennt voneinander differenzierbar sind. Die Darstellung der ermittelten Reflektions-Daten erfolgt graphisch mittels einer kodierten Farbskala [40]. Weiß bzw. rot-gefärbte Bereiche entsprechen einer hohen Reflektion, niedrig reflektierende Strukturen stellen sich blau bzw. schwarz dar.

3.5.3.2. OCT-Prototyp und Modifikation

Die Optische Kohärenztomographie (OCT) wurde im Hauptversuch direkt nach der Laserbehandlung als Schnelltest zur sofortigen Beurteilung der *in vitro* Proben eingesetzt. Mittlerweile sind mehrere OCT-Systeme kommerziell erhältlich.

Unsere Versuche wurden mit einem vom Institut für Biomedizinische Optik (BMO) und der Firma Schwind entwickelten spaltlampenadaptierten Prototyp durchgeführt, der sich sowohl zur Untersuchung des hinteren aber auch des vorderen Augensegments eignete. In unserer Studie wurde dieser Prototyp modifiziert. Der Meßstrahl wurde statt durch die Spaltlampe über einen Umlenkspiegel auf die zu untersuchende Probe geleitet (Abb.14).

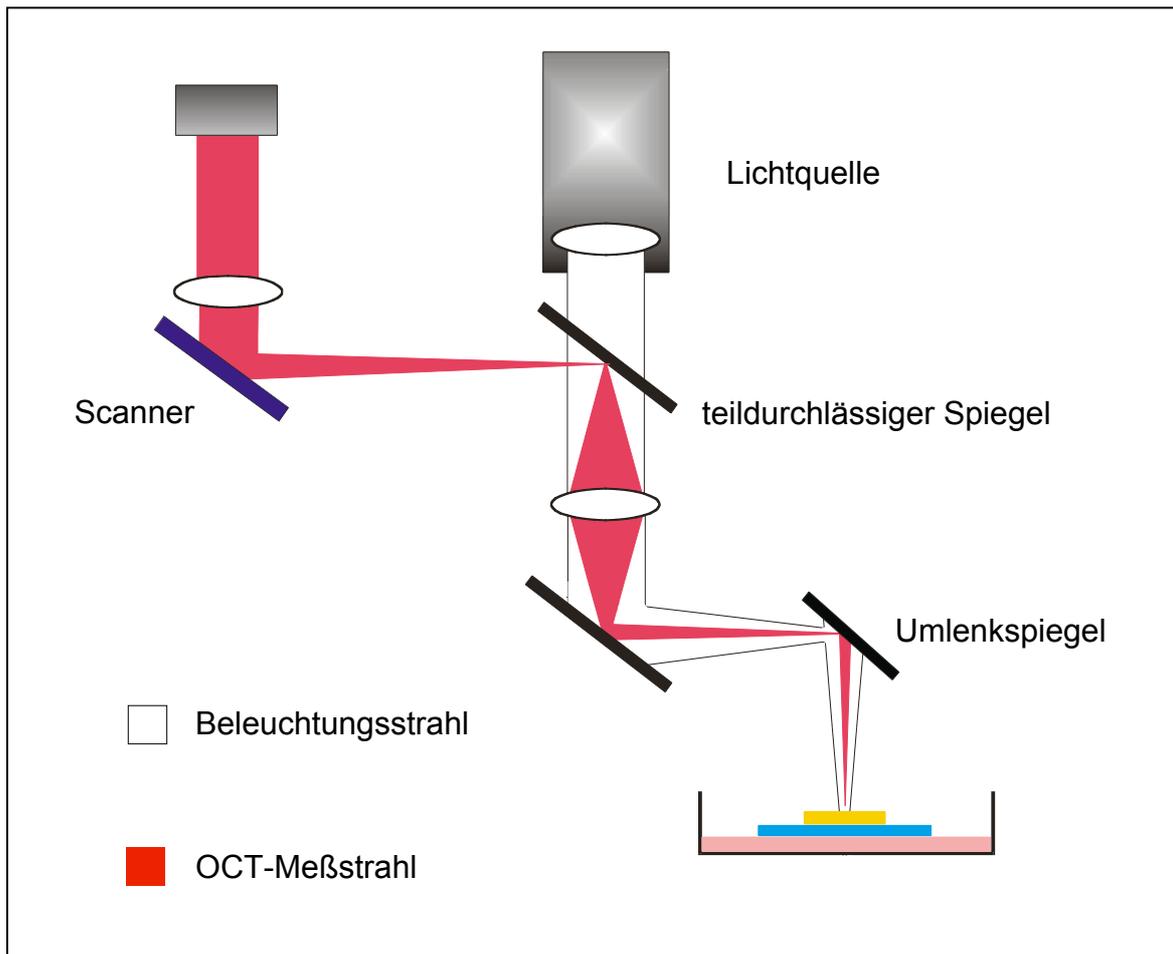


Abb. 14. Schema des modifizierten OCT-Prototyps

Als Lichtquelle diente eine Superlumineszenzdiode (SLD361, Superlum, Moskau, Rußland) mit einer Wellenlänge von 830 nm und einer Lichtleistung von $< 200 \mu\text{Watt}$. Die Kohärenzlänge und damit die axiale Auflösung lag bei $15 \mu\text{m}$, die laterale Auflösung betrug $20 \mu\text{m}$. Das Gerät erzeugte innerhalb von 2 Sek. aus 100 Tiefenabtastungen ein zweidimensionales Schnittbild des Netzhautpräparates mit variabler Scanlänge. Die behandelten Explantate wurden mit einer axialen Scanlänge von 1,15-2,08 mm bzw. mit einer lateralen Scanlänge von 0,609-3,65 mm vermessen. Aufgrund der mangelnden Differenzierbarkeit einzelner Netzhautschichten wurde in der OCT auf eine exakte Vermessung der Defekttiefe verzichtet und nur der Defektdurchmesser bestimmt.

3.5.4. Histologische Aufarbeitung der Proben

Nach den Messungen wurden die Proben in frisch angesetzte und filtrierte Bouin`sche Lösung (aus 15 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure, 5 ml Formalin 36%ig und 1 ml Eisessig 100 %ig) gegeben und über Nacht im Kühlschrank aufgehoben. Nach einer Fixationszeit von etwa 12 Stunden wurde die Bouin`sche Lösung abpipettiert und die Proben solange mit 70%igem Isopropylalkohol gespült, bis keine auffällige Gelbfärbung der Lösung mehr zu erkennen war. Daraufhin wurden die Präparate in aufsteigender Isopropylalkohol-Reihe entwässert und in Paraffin eingebettet (Tab. 3).

Fixierung:	Bouin`sche Lösung	über Nacht (ca. 12 Std.)
Vorbehandlung :	70 % Isopropylalkohol	mehrfaches Spülen
Entwässerung:	70 % Isopropylalkohol	3x wechseln à 20 Min.
	80 % Isopropylalkohol	20-30 Min.
	90 % Isopropylalkohol	30-45 Min.
	96 % Isopropylalkohol	30-60 Min.
	2x 100 % Isopropylalkohol	jeweils 30-60 Min.
	100 % Isopropylalkohol	über Nacht
	Isopropylalkohol/Paraplast 1:1	über Nacht
	3x Paraplast	jeweils 24-48 Std.
Einbetten in Paraffin		

Tab. 3. Paraffin-Einbettung

Von jeder Probe wurden mit dem Mikrotom mindestens 10 Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt (Leica Mikrotom RM2165, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) und in üblicher Weise mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot, Oberkochen, Deutschland) beurteilt, fotografiert (Kodak Ektachrome 64 T) und anschließend mit den OCT-Befunden verglichen. Die Vermessung der histologischen Schnitte erfolgte unter Verwendung eines 25er Planapo-Objektives in Kombination mit einem Mikrometer-Okular und einem Mikrometer-Objekträger (PZO Warschau). Bestimmt wurden jeweils Defekttiefe und Defektdurchmesser.

4 ERGEBNISSE

4.1. Unbehandeltes Retina-Organexplantat

4.1.1. OCT-Darstellung des Retina-Organexplantates

Abb.15 zeigt das OCT-Bild eines auf Filter und Wachsschicht liegenden unbehandelten Retinaorganexplantates. Die neurosensorische Retina kommt als obere hyperreflektive Schicht zur Darstellung. Innerhalb dieser sind keine Binnenstrukturen abgrenzbar. Die darunter liegende aufgelockert erscheinende Zwischenschicht stellt den vermutlich mit Flüssigkeit (Wasser) gefüllten Raum zwischen Netzhaut und Filter dar. Er ist von Präparat zu Präparat unterschiedlich dick. Der Millicell®-Filter und die Wachsschicht erscheinen als unterer dichter hyperreflektiver Komplex.

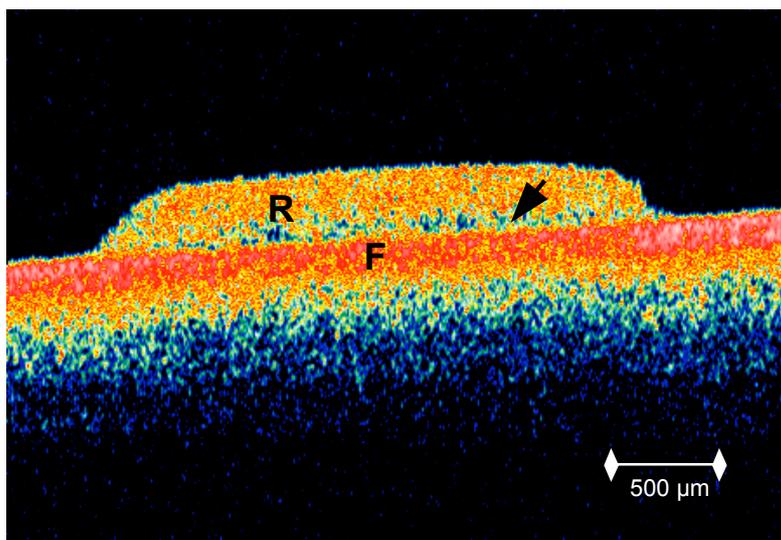


Abb.15. OCT-Aufnahme (Scanlänge 3,65 mm) eines unbehandelten Retinaorganexplantats
R= neurosensorische Retina
F= Filter/ Wachsschicht
↑= Flüssigkeitsschicht

4.1.2. Lichtmikroskopische Darstellung des Retina-Organexplantates

Abb. 16 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme (LM-Aufnahme) eines unbehandelten Retinaorgantransplantates. Die einzelnen hier erkennbaren Netzhautschichten sind, von innen nach außen, dem Weg des Lichtes entsprechend aufgelistet.

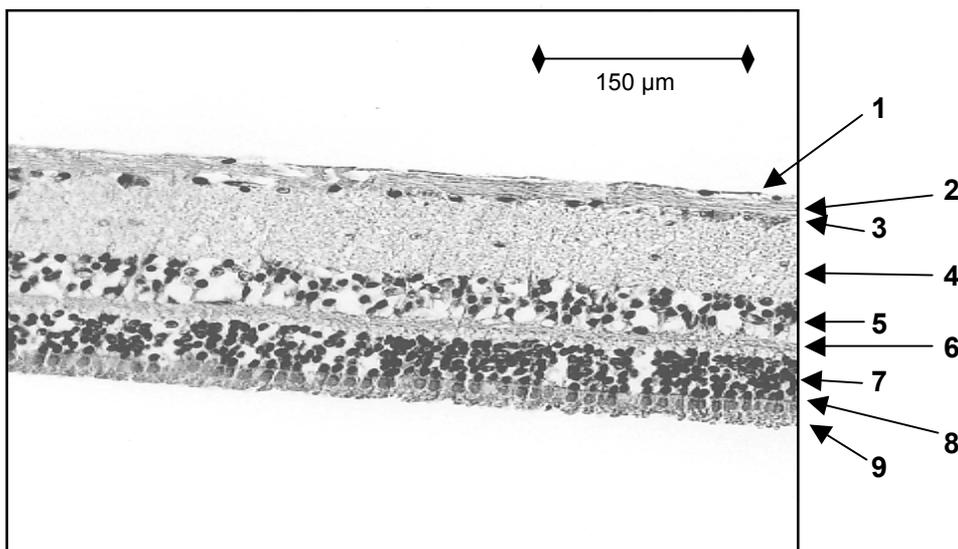


Abb. 16. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) eines unbehandelten Retinaorganexplantates

- 1 innere Grenzmembran (Membrana limitans interna)
- 2 Nervenfaserschicht
- 3 Ganglienzellschicht
- 4 innere plexiforme Schicht
- 5 innere Körnerschicht
- 6 äußere plexiforme Schicht
- 7 äußere Körnerschicht
- 8 äußere Grenzmembran (Membrana limitans externa)
- 9 Photorezeptorschicht (Schicht der Stäbchen und Zapfen)

4.2. Retinale Photoablation

4.2.1. Allgemeine Beobachtungen

Im Rahmen der Laserablation wurden unabhängig von der Art der verwendeten Faser folgende Beobachtungen gemacht: bereits makroskopisch ließen sich bei höheren Bestrahlungsdosen von 5,0 Joule/ cm² sowohl unter Luft als auch unter PFCL tiefe durchgreifende Netzhautdefekte erkennen.

Bei Bestrahlungsdosen von 3,0 bis 4,0 Joule/ cm² konnte man unter 10-facher Vergrößerung die überlappenden Laserherde als eine feine gräuliche Linie beobachten. Eine weitere Dosisreduktion unter 2,0 Joule/ cm² führte dazu, daß die Herde auch unter dem Operationsmikroskop nicht mehr erkennbar waren.

Speziell unter PFCL kam es während der Laserablation an der Spitze der Faser zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer feiner Bläschen, die langsam im PFCL nach oben stiegen. Die Anzahl dieser Bläschen sowie ihre Größe korrelierte mit der Intensität der Laserpulse. Im niedrigen Dosisbereich $\leq 2,0$ Joule/ cm² waren sie makroskopisch nicht mehr auszumachen. Die Ausbildung der Bläschen führte zu keiner erkennbaren Trübung des PFCL.

4.2.2. Low-OH-Quarzfaser

4.2.2.1. Photoablation unter Luft

Bei den mit einer Dosis von 5,0 Joule/ cm² bestrahlten Präparaten ließen sich in der Optischen Kohärenztomographie Defekte nachweisen, die durch die gesamte neurosensorische Netzhaut reichten (Abb. 17). Bei gleicher Bestrahlungsdosis fanden sich in der OCT jedoch auch Defekte mit nur mittlerer Ablationstiefe (Abb. 18). Der Defektdurchmesser lag bei 360-370 μ m.

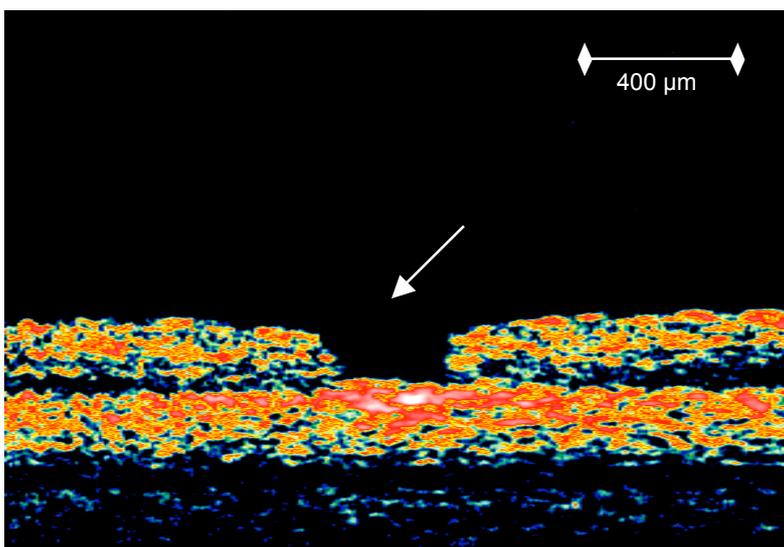


Abb.17. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) 5,0 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser. Man sieht einen durchgreifenden ausgestanzten Defekt (Pfeil) in der neurosensorischen Netzhaut.

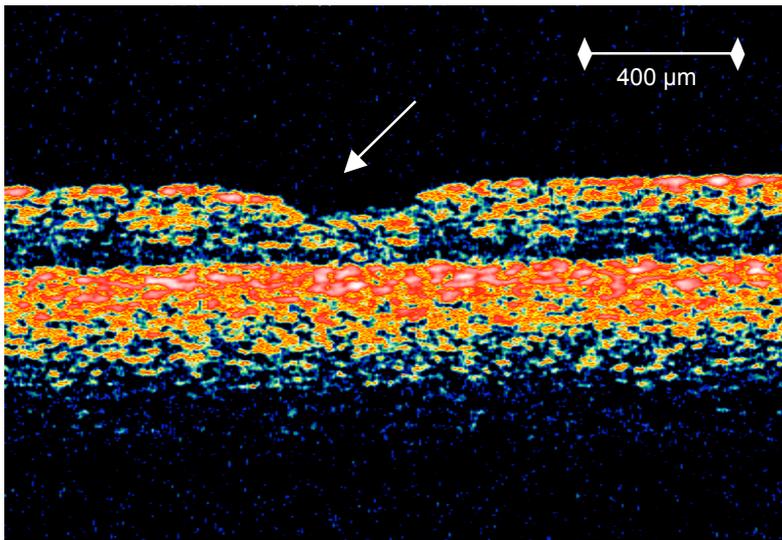


Abb.18. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) 5,0 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser. Die Gewebeabtragung (Pfeil) reicht nur bis in den mittleren Bereich der neurosensorischen Netzhaut.

Abb. 19 zeigt die zur Abb. 17 korrespondierende Histologie. Man sieht einen scharf begrenzten durchgreifenden Defekt. Die Defekttiefe betrug 148 µm. Im Randbereich erkannte man zudem eine schmale thermische Nekrosezone von bis zu 10 µm Dicke (Abb. 19). In einem anderen Präparat lag die Defekttiefe bei 132 µm, auch hier fanden sich an den Rändern thermische Nekrosen. Die Defekttiefen variierten also zwischen 132 und 148 µm, der Defektdurchmesser lag zwischen 380- 400 µm.

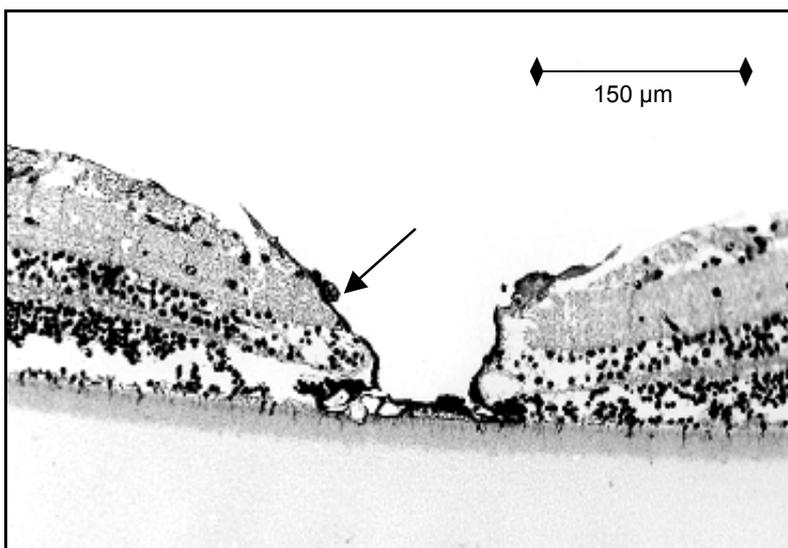


Abb. 19. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 5,0 J / cm² unter Luft, Low-OH-Quarzfaser. Es findet sich ein durchgreifender Defekt mit thermischen Nekrosezonen (Pfeil) im Randbereich.

Wurde die Bestrahlungsdosis auf $3,0 \text{ Joule/ cm}^2$ reduziert, waren die Effekte deutlich geringer und ließen sich der optischen Kohärenztomographie nur noch als $280 \mu\text{m}$ breite oberflächliche Reflektivitätsveränderungen nachweisen (Abb. 20).

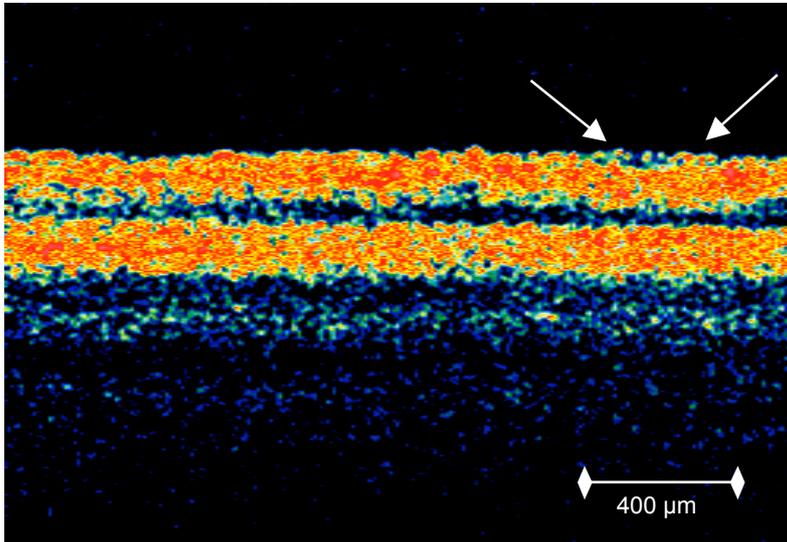


Abb. 20. OCT-Aufnahme (Scanlänge $2,08 \text{ mm}$) $3,0 \text{ J / cm}^2$ unter Luft, Low-OH-Quarzfaser. Erkennbar sind lediglich oberflächliche Reflektivitätsveränderungen (Pfeile).

Histologisch fanden sich unterschiedliche Schädigungen von $16- 48 \mu\text{m}$ Tiefe, der Defektdurchmesser lag zwischen $240-328 \mu\text{m}$. Abb. 21 zeigt einen bis zur Ganglienzellschicht reichenden Defekt mit oberflächlicher thermischer Nekrosezone. Die gesamte Netzhaut erschien im gelaserten Bereich leicht nach innen gewölbt und die Netzhaut etwas von der Unterlage abgehoben.

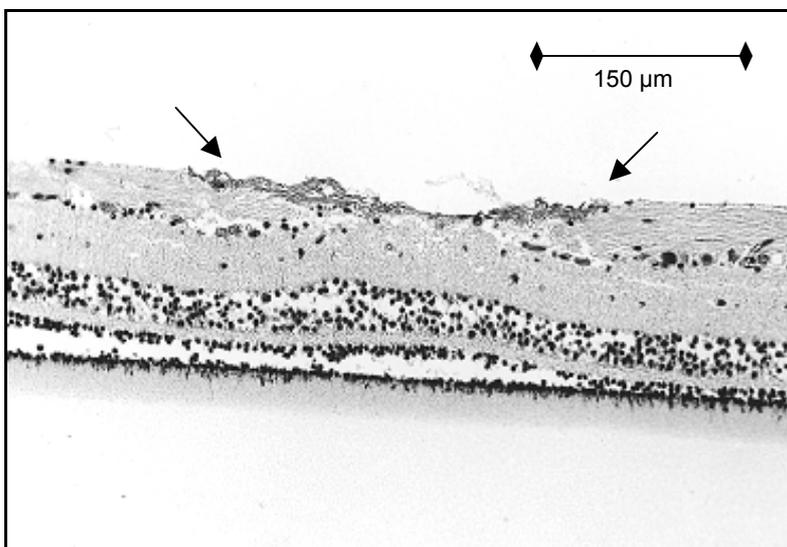


Abb. 21. LM-Aufnahme (Vergrößerung $125\times$, HE-gefärbt) $3,0 \text{ J / cm}^2$ unter Luft, Low-OH-Quarzfaser. Es zeigt sich ein bis zur Ganglienzellschicht reichender Defekt (Pfeile) mit thermischer Nekrosezone.

Bei Bestrahlungsdosen von 2,0 Joule/ cm² waren weder in der OCT noch histologisch Defekte nachweisbar.

In Tabelle 4 sind die mit der Low-OH-Quarzfaser unter Luft erzielten Abtragungstiefen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsenergiedosis aufgelistet.

<u>Energiedosis :</u>	<u>Abtragungstiefe:</u>
5,0 Joule / cm ²	148 µm
5,0 Joule / cm ²	132 µm
3,0 Joule / cm ²	24 µm, 36 µm, 48 µm
3,0 Joule / cm ²	16 µm
2,0 Joule / cm ²	0 µm
2,0 Joule / cm ²	0 µm

Tab. 4. Photoablation unter Luft, Low-OH-Quarzfaser

4.2.2.2. Photoablation unter flüssigem PFCL

Mit einer Bestrahlungsdosis von 5,0 Joule/ cm² ließ sich reproduzierbar ein durch die gesamte neurosensorische Netzhaut reichender Defekt erzeugen, der dem unter Luft sehr ähnelte (Abb. 22). Der Defektdurchmesser lag in der OCT oberflächlich bei 380 µm und am Grund des Defektes bei 190 µm. Histologisch fand sich auch hier ein durchgreifender, 160 µm tiefer, scharf begrenzter Schaden mit thermischer Nekrosezone von etwa 8 µm Dicke (Abb.23). Der Defektdurchmesser betrug lichtmikroskopisch in den oberen Netzhautschichten etwa 320 µm, abnehmend zu den tieferen Schichten hin bis auf 120 µm. Der Filter erschien zudem im Defektbereich zystisch aufgelockert, was ebenfalls auf eine thermische Lasereinwirkung zurückzuführen war.

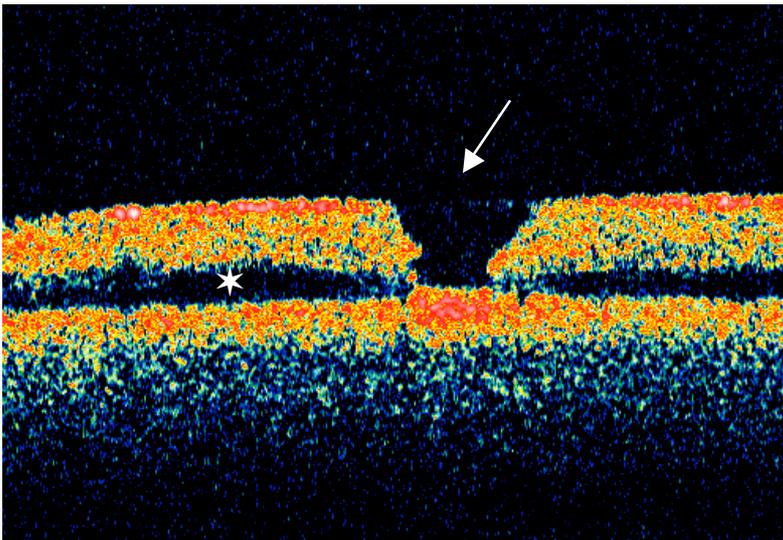


Abb. 22. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) 5,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Erkennbar ist ein durchgreifender Defekt (Pfeil), die neurosensorische Retina ist vom Filter durch eine Flüssigkeitsschicht (Sternchen) getrennt.

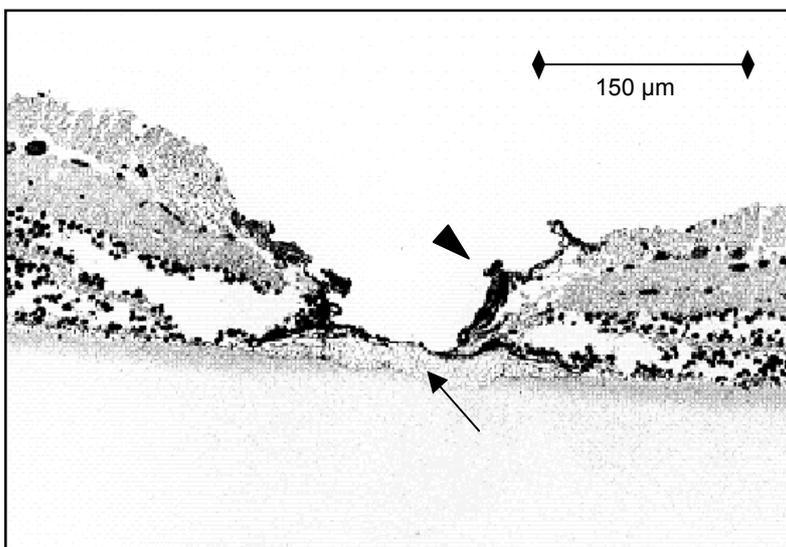


Abb. 23. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 5,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Es findet sich ein durchgreifender Defekt mit thermischer Nekrose (Pfeilspitze) und zystisch verändertem Filter (Pfeil).

Eine Dosisreduktion auf 3,0 Joule/ cm² führte zu unterschiedlichen Ablationsmustern. In den OCT-Aufnahmen sah man neben nur mittleren Schädigungstiefen (Abb. 24) auch fast durch die gesamte Netzhaut reichende Defekte (Abb. 25). Teilweise fand sich begleitend eine leichte Aufwölbung der neurosensorischen Netzhaut im Defektbereich (Abb. 24). Der anhand der OCT bestimmte Defektdurchmesser lag zwischen 300- 320 µm.

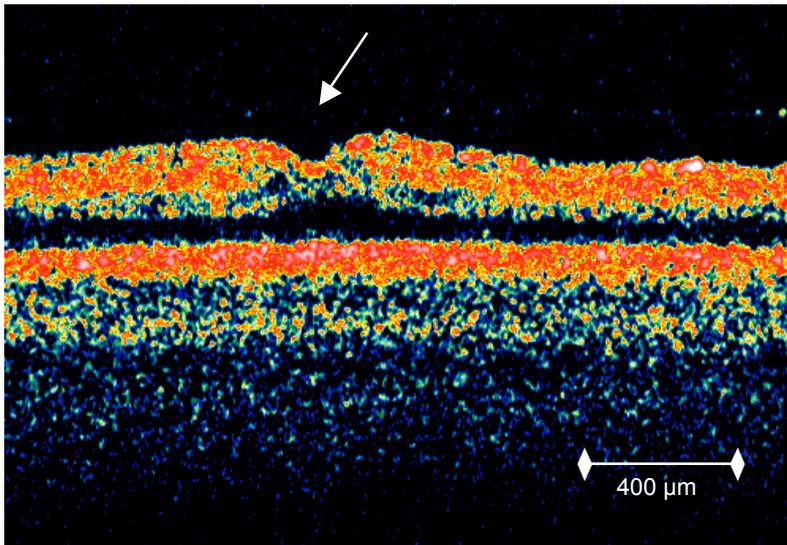


Abb. 24. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) 3,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Die Gewebeabtragung erreicht mittlere Tiefe, die neurosensorische Netzhaut ist im Defektbereich leicht nach oben gewölbt (Pfeil).

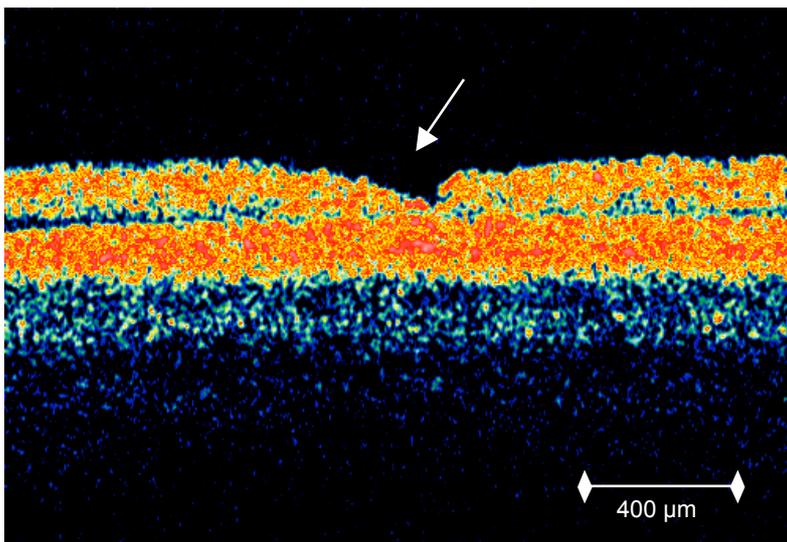


Abb. 25. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) 3,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Es zeigt sich ein keilförmig zulaufender, fast durch die gesamte neurosensorische Netzhaut reichender Defekt (Pfeil).

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen fanden sich entsprechend unterschiedliche Defekte, die von der oberen äußeren plexiformen Schicht (Abb. 26) bis hin zur Körnerschicht reichten (Abb. 27). Auch hier erschien die neurosensorische Netzhaut teilweise aufgewölbt. Die Defekttiefe schwankte zwischen 48-108 µm. In allen Schnitten fanden sich wiederum thermische Nekrosezonen von etwa 10-16 µm Dicke. Der Defektdurchmesser lag zwischen 400 und 480 µm.

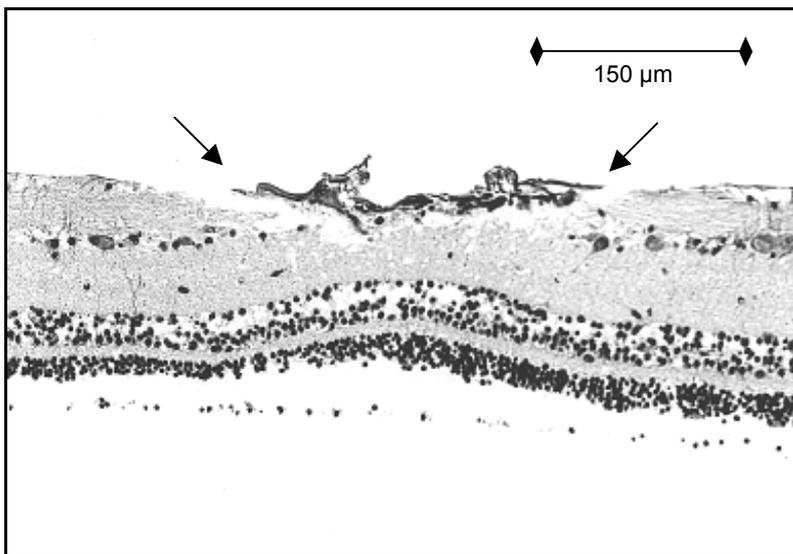


Abb. 26. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 3,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Man sieht einen bis in die obere plexiforme Schicht reichenden Defekt mit deutlicher thermischer Nekrose (Pfeile).

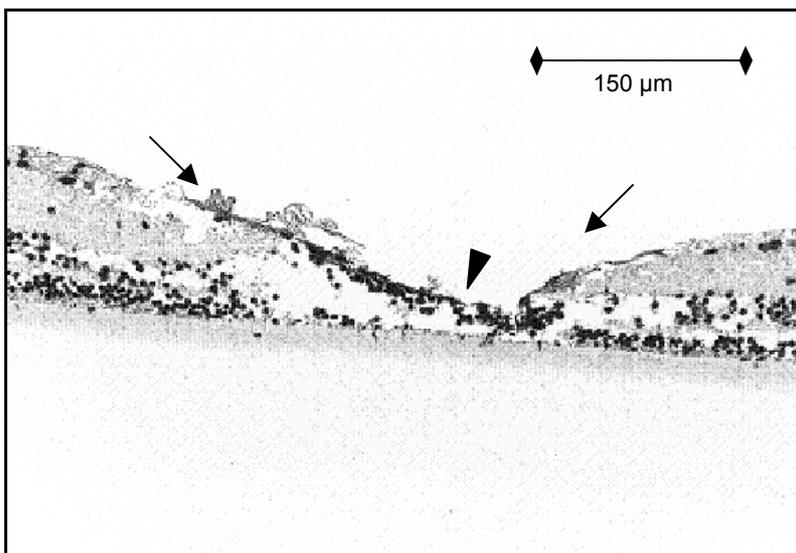


Abb. 27. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 3,0 J / cm² unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Erkennbar ist ein tiefer keilförmiger Defekt (Pfeile), die äußere Körnerschicht ist am Grund verdichtet sichtbar (Pfeilspitze)

Bei Bestrahlungswerten von 2,0 Joule/ cm² zeigte sich in der OCT eine punktuell schollige Unterbrechung der hyperreflektiven Netzhautoberfläche mit einem darunterliegenden, unregelmäßig dünnen hyporeflektivem Areal (Abb. 28). Der Durchmesser des Defektareals betrug in der OCT 360 µm.

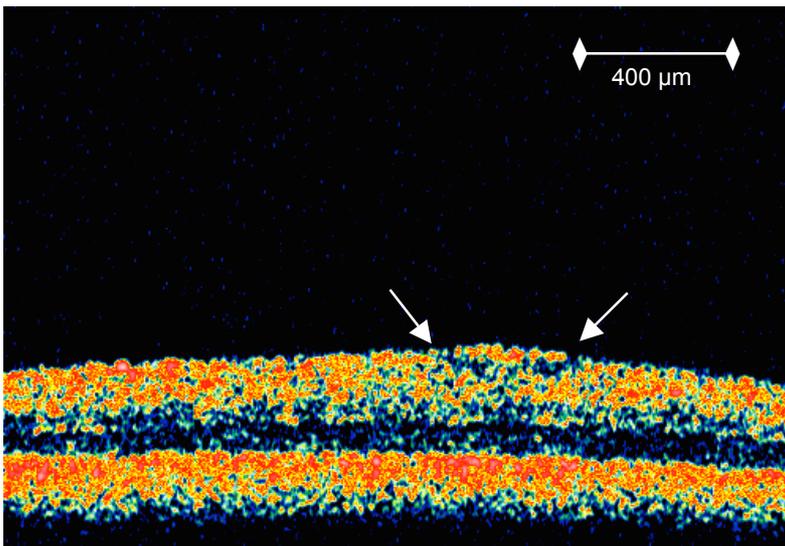


Abb. 28. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,08 mm) $2,0 \text{ J / cm}^2$ unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Es findet sich eine schollige Unterbrechung der Oberfläche (Pfeile) mit darunterliegendem hyporeflektivem Areal.

Histologisch fand sich eine schollig abgehobene thermische Nekrose von etwa $24 \mu\text{m}$ Dicke. Der bis in die Nervenfaserschicht und zentral knapp unter die Ganglienzellschicht reichende Defekt war insgesamt $32 \mu\text{m}$ tief, der Defektdurchmesser betrug $348 \mu\text{m}$ (Abb.29).

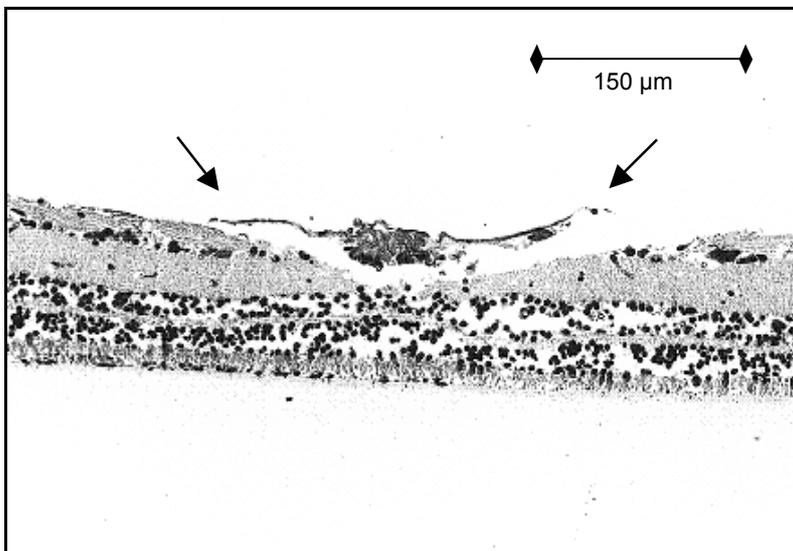


Abb. 29. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) $2,0 \text{ J / cm}^2$ unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser. Man findet einen bis knapp unter die Ganglienzellschicht reichenden Defekt mit scholliger thermischer Nekrose (Pfeile).

Die mit der Low-OH-Quarzfaser unter PFCL erzielten Abtragungstiefen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsenergie-dosis sind in Tabelle 5 dargestellt.

<u>Energiedosis :</u>	<u>Abtragungstiefe:</u>
5,0 Joule / cm ²	160 μm
5,0 Joule / cm ²	140 μm
5,0 Joule / cm ²	112 μm
3,0 Joule / cm ²	108 μm
3,0 Joule / cm ²	52 μm
3,0 Joule / cm ²	48 μm
2,0 Joule / cm ²	36 μm
2,0 Joule / cm ²	34 μm
2,0 Joule / cm ²	32 μm

Tab. 5. Photoablation unter PFCL, Low-OH-Quarzfaser

4.2.2.3. Ablationsübersicht Low-OH-Quarzfaser

Zusammenfassend sind in Abb. 30 die mit der Low-OH-Quarzfaser erzielten Abtragungstiefen bei unterschiedlicher Energiedosis unter Luft und unter PFCL graphisch dargestellt. Sowohl unter Luft als auch unter PFCL zeigen sich noch deutliche Schwankungen der Ablationstiefe, die beiden Medien unterscheiden sich hier kaum.

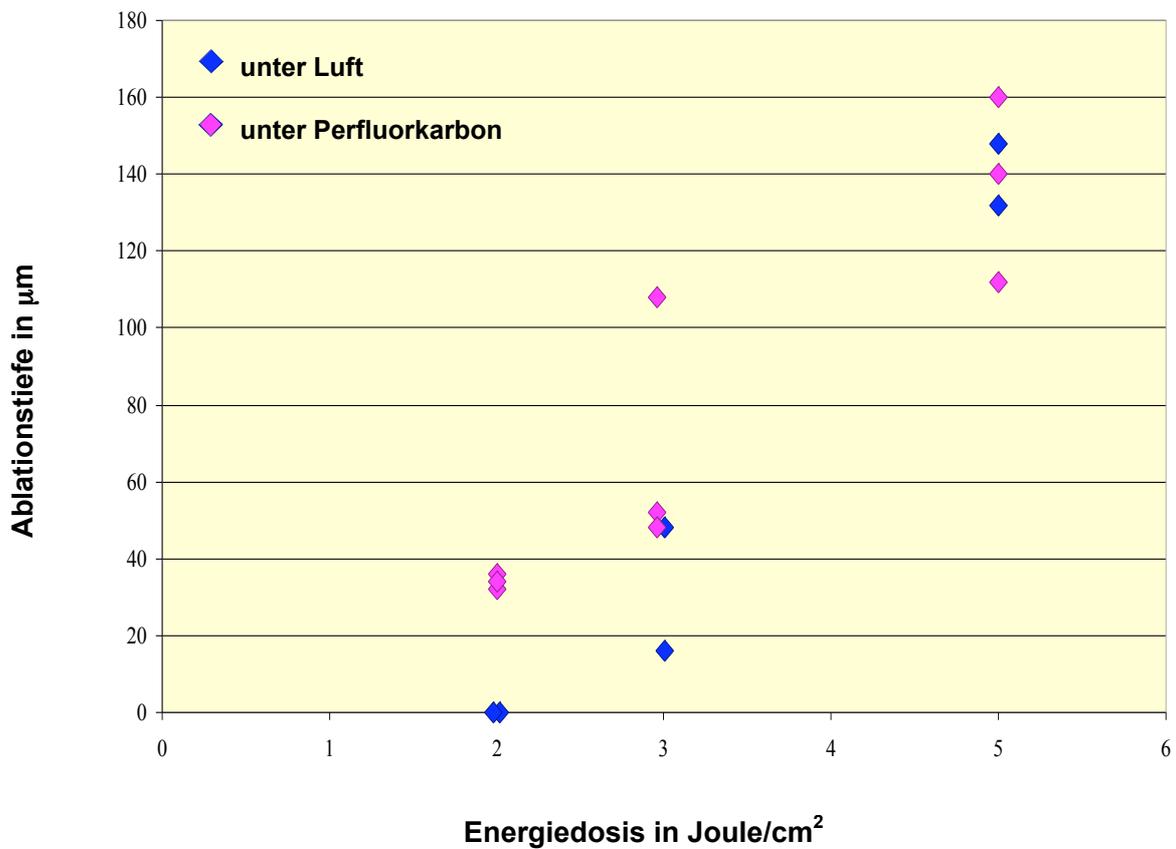


Abb. 30. Ablationsübersicht Low-OH-Quarzfaser

4.2.3. Saphirfaser

4.2.3.1. Photoablation unter Luft

Unter Luft wurden stichprobenartig 2 Augen behandelt. Bei dem mit einer Dosis von $5,0 \text{ J/cm}^2$ bestrahlten Präparat konnte in der OCT ein Defekt mittlerer Schädigungstiefe nachgewiesen werden (Abb. 31). Die Defekttiefe lag bei etwa einem Drittel der Retinadicke, der Durchmesser betrug $500\text{-}540 \mu\text{m}$. Histologisch zeigte sich die Netzhaut im Ablationsbereich deutlich gewölbt und von der Unterlage abgehoben (Abb. 32).

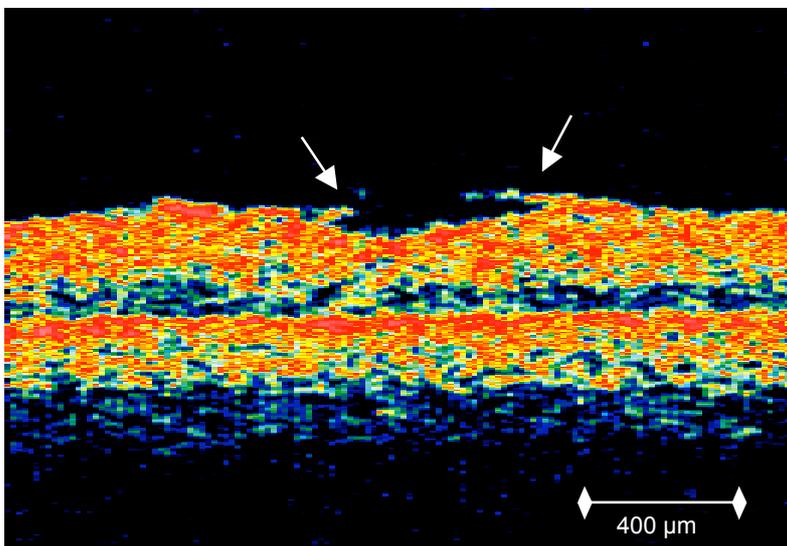


Abb. 31. OCT-Aufnahme (Scanlänge 2,05 mm) $5,0 \text{ J/cm}^2$ unter Luft, Saphir-Faser.

Man sieht einen Defekt mit mittlerer Schädigungstiefe (Pfeile), die Abtragung umfasst etwa ein Drittel der neurosensorischen Netzhaut.

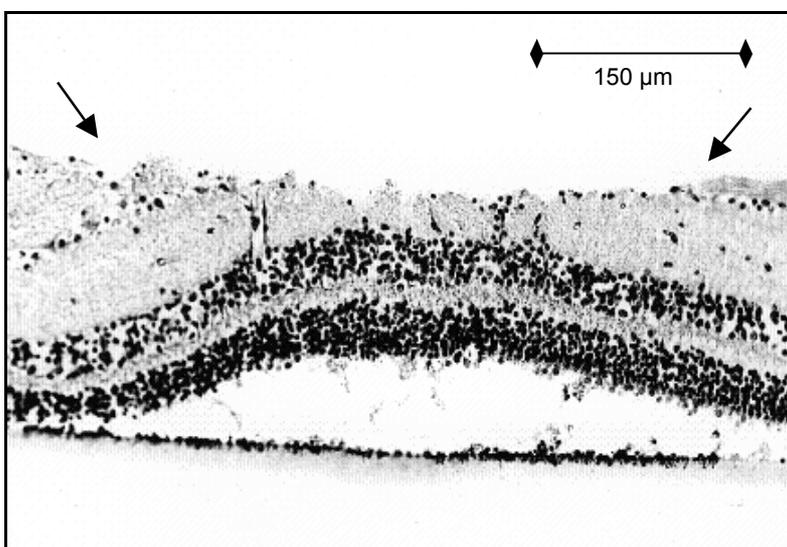


Abb. 32. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt)

$5,0 \text{ J/cm}^2$ unter Luft, Saphirfaser. Die Gewebeablation reicht bis zur inneren plexiformen Schicht (Pfeile), die Netzhaut ist insgesamt von der Unterlage abgehoben.

Die Gewebeabtragung unter $5,0 \text{ Joule/ cm}^2$ reichte bis zur inneren plexiformen Schicht, thermische Nekrosen wurden nicht gesehen. Die ausgemessene Defekttiefe betrug $48\text{-}68 \text{ }\mu\text{m}$, der Defektdurchmesser lag bei $480\text{-}520 \text{ }\mu\text{m}$.

Bei einem zweiten, mit einer Dosis von $1,0 \text{ Joule/ cm}^2$ bestrahlten Präparat, konnte weder in der optischen Kohärenztomographie noch histologisch ein Defekt nachgewiesen werden.

In Tabelle 6 sind die mit der Saphirfaser unter Luft erzielten Abtragungstiefen in Abhängigkeit von der Energiedosis aufgelistet.

<u>Energiedosis :</u>	<u>Abtragungstiefe:</u>
$5,0 \text{ Joule / cm}^2$	$48, 60, 68 \text{ }\mu\text{m}$
$1,0 \text{ Joule / cm}^2$	$0 \text{ }\mu\text{m}$

Tab. 6. Photoablation unter Luft, Saphirfaser

4.2.3.2. Photoablation unter PFCL

Bei einer Bestrahlungsdosis von $5,0 \text{ Joule/ cm}^2$ zeigte sich sowohl makroskopisch als auch in der optischen Kohärenztomographie eine vollständige Durchtrennung der Retina (Abb. 33).

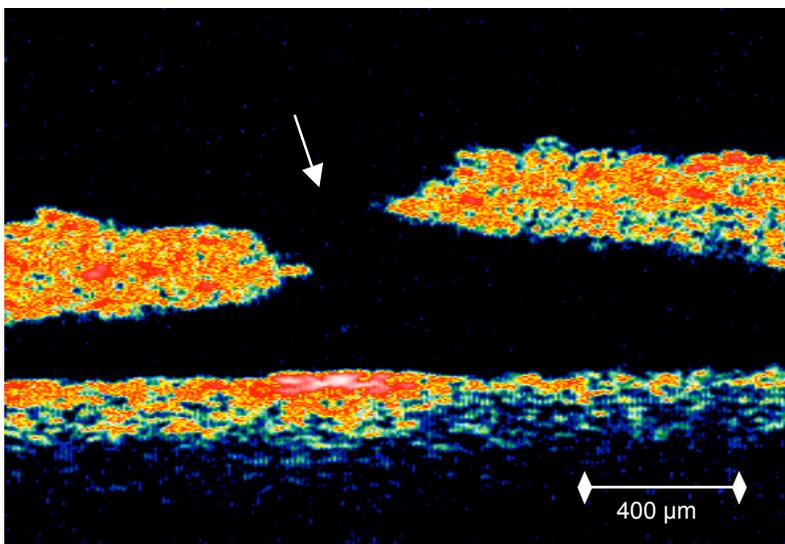


Abb. 33. OCT-Aufnahme (Scanlänge $2,05 \text{ mm}$) $5,0 \text{ J / cm}^2$ unter PFCL, Saphirfaser.

Es zeigt sich eine komplette Durchtrennung der neurosensorischen Netzhaut (Pfeil), die Netzhaut ist insgesamt vom Filter abgehoben.

Auf eine weitere histologische Aufarbeitung dieser Probe wurde aufgrund des eindeutigen Befundes verzichtet.

Eine Dosisreduktion auf $4,0 \text{ Joule/ cm}^2$ war im OCT als nur oberflächliche Schädigung mit Aufwölbung der Ränder nachweisbar (Abb. 34). Die Gewebeabtragung erfasste etwa ein Drittel der Gesamtdicke der neurosensorischen Retina, der im OCT bestimmte Defektdurchmesser lag bei $210 \mu\text{m}$.

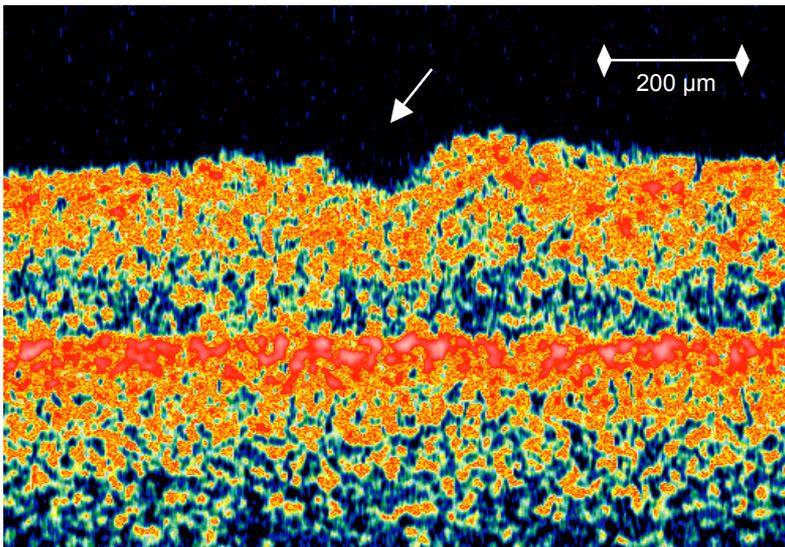


Abb. 34. OCT-Aufnahme (Scanlänge 1,15 mm) $4,0 \text{ J / cm}^2$ unter PCL, Saphirfaser. Der Defekt (Pfeil) weist leicht aufgewölbte Ränder auf, die Abtragungstiefe umfaßt etwa ein Drittel der neurosensorischen Netzhaut.

Die korrespondierende lichtmikroskopische Aufnahme zeigte einen bis in die innere plexiforme Schicht reichenden Defekt ohne thermische Nekrosen (Abb. 35). Im Zentrum erreichte dieser fast die Ebene der inneren Körnerschicht, im Randbereich flachte er etwas ab und ging hier nur bis zur Ganglienzellschicht. Die äußere plexiforme Schicht zeigte sich histologisch von der äußeren Körnerschicht abgehoben (Abb.35). Diese Abhebung war in der OCT nicht nachweisbar und stellt somit wohl ein präparationsbedingtes Artefakt dar. Die ermittelte Defekttiefe aller unter $4,0 \text{ Joule/ cm}^2$ behandelte Präparate lag zwischen 44 und $60 \mu\text{m}$, der Defektdurchmesser lag zwischen 400 und $416 \mu\text{m}$.

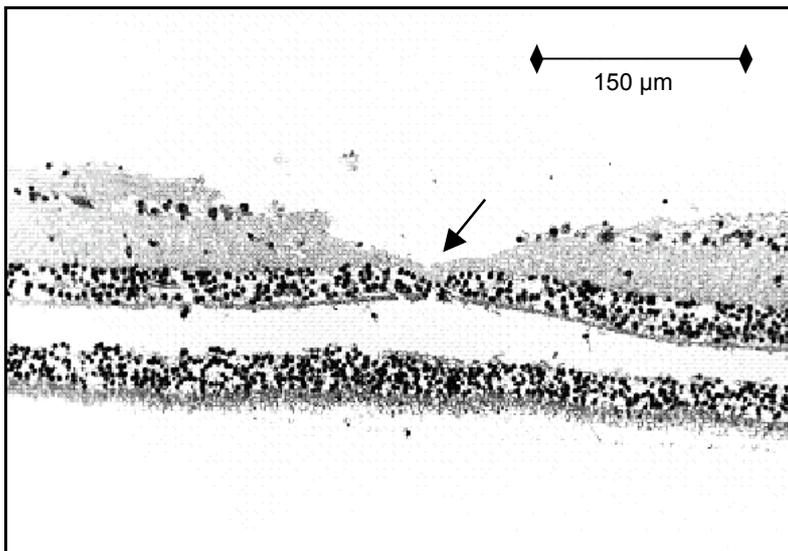


Abb. 35. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 4,0 J / cm² unter PFCL, Saphirfaser. Es findet sich ein zentral bis knapp an die innere Körnerschicht heranreichender Defekt (Pfeil), nach außen hin flacht er etwas ab.

Eine Bestrahlungsdosis von 3,0 Joule/ cm² verursachte in der optischen Kohärenztomographie eine nur sehr oberflächliche Läsion, der Randbereich erschien ebenfalls gering aufgeworfen, der Defektdurchmesser lag bei 300 µm (Abb. 36). Histologisch fand sich ein bis zur Ganglienzellschicht reichender Defekt (Abb. 37), auch hier zeigte sich die bereits unter 4,0 Joule/ cm² nachweisbare, wahrscheinlich präparationsbedingte Abhebung zwischen äußerer plexiformer Schicht und äußerer Körnerschicht. In einem anderen Präparat war die Schädigung ähnlich tief, hier sahen wir jedoch zusätzlich eine 8 µm dicke thermische Nekrosezone. Die Defekttiefe aller unter 3,0 Joule/ cm² bestrahlter Proben lag zwischen 52 und 56 µm, der Defektdurchmesser erreichte 400 bis 420 µm.

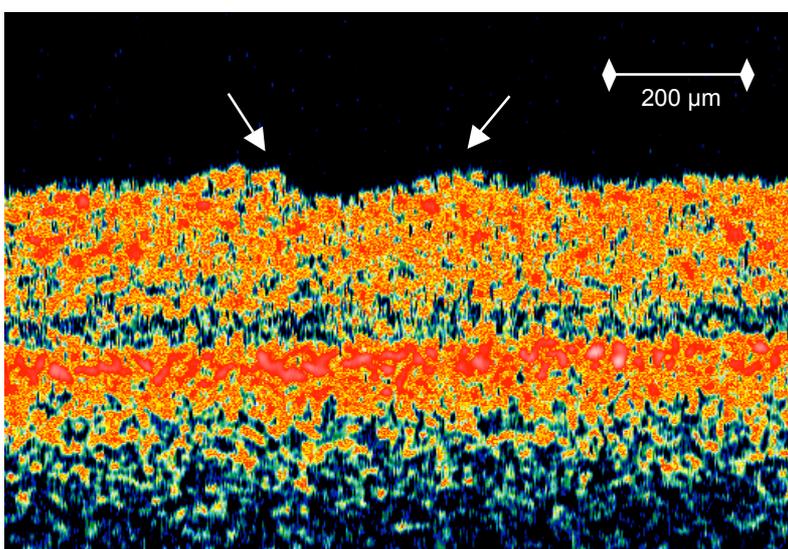


Abb. 36. OCT-Aufnahme (Scanlänge 1,15 mm) 3,0 J / cm² unter PFCL, Saphirfaser. Erkennbar ist ein sehr oberflächlicher Defekt mit gering aufgeworfenen Rändern (Pfeile).

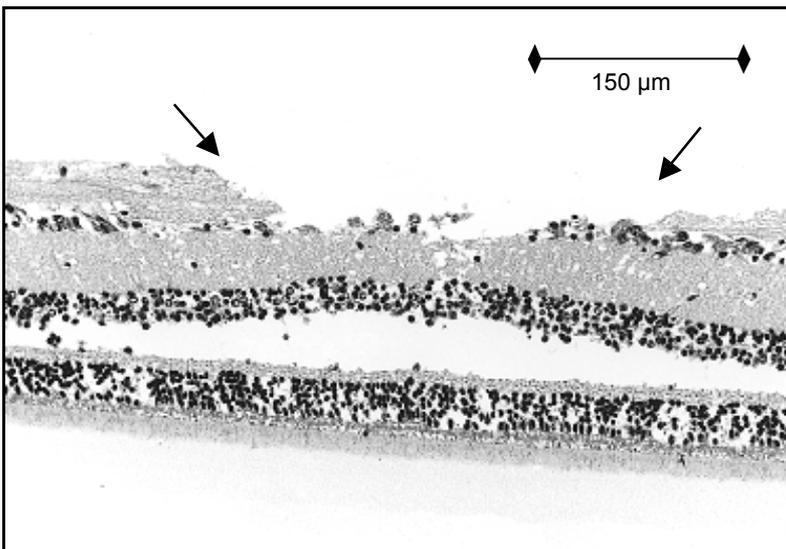


Abb. 37. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) 3,0 J / cm² unter PFCL, Saphirfaser. Die Gewebeablation (Pfeile) reicht bis zur Ebene der Ganglienzellschicht.

Eine weitere Dosisreduktion auf 2,0 Joule/ cm² ergab in der OCT einen nur sehr oberflächlichen Defekt. Auch hier sahen wir eine leichte Aufwerfung der Ränder, der Defektdurchmesser betrug 420 µm (Abb. 38).

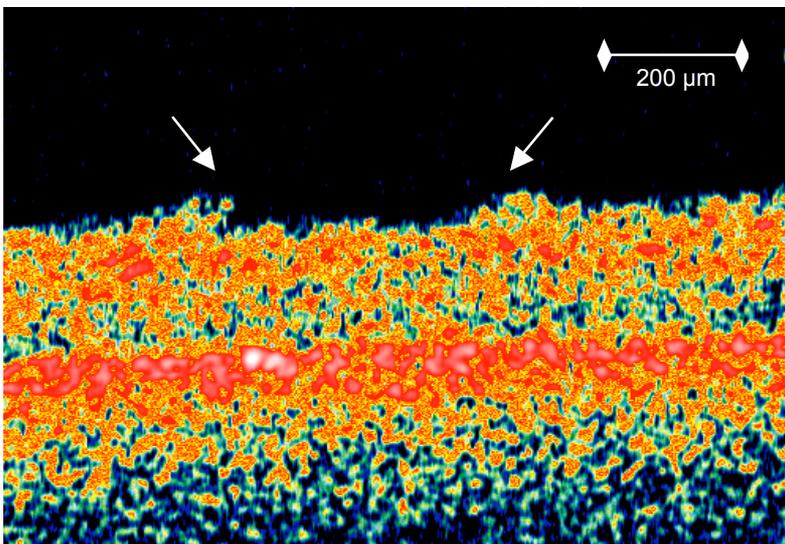


Abb. 38. OCT-Aufnahme (Scanlänge 1,15 mm) 2,0 J / cm² unter PFCL, Saphirfaser. Es findet sich ein sehr oberflächlicher Defekt mit gering aufgewölbten Rändern (Pfeile).

In der lichtmikroskopischen Aufnahme fanden sich korrespondierend ebenfalls nur sehr oberflächliche, bis in die obere Nervenfaserschicht reichende Läsionen (Abb. 39).

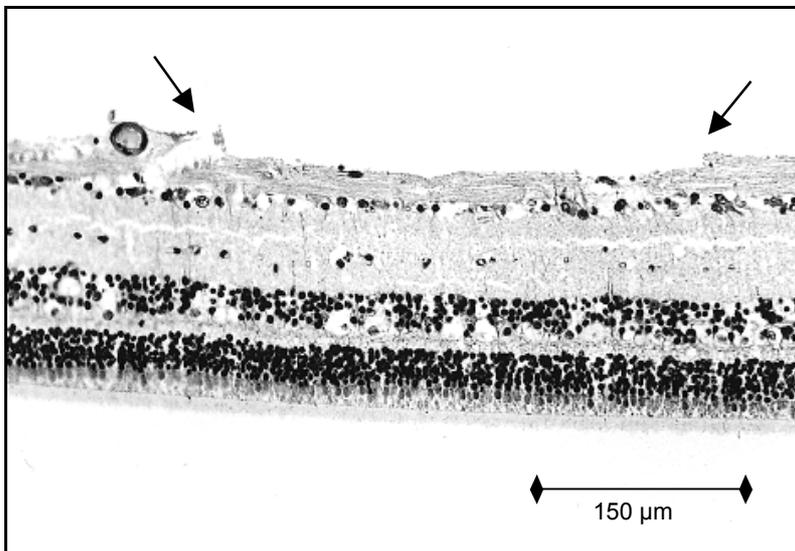


Abb. 39. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) $2,0 \text{ J} / \text{cm}^2$ unter PFCL, Saphirfaser. Nachweisbar ist ein sehr oberflächlicher, bis in die obere Nervenfaserschicht reichender Defekt (Pfeile).

In anderen mit der gleichen Energiedosis bestrahlten Präparaten war die Schädigung etwas tiefer und erreichte die Ganglienzellschicht (Abb. 40). Die gemessene Defekttiefe aller bei $2,0 \text{ Joule} / \text{cm}^2$ behandelten Proben schwankte zwischen 20 und $44 \mu\text{m}$, der Defektdurchmesser betrug $360\text{-}460 \mu\text{m}$. Bei allen diesen Präparaten wurden keine thermischen Nekrosen nachgewiesen.

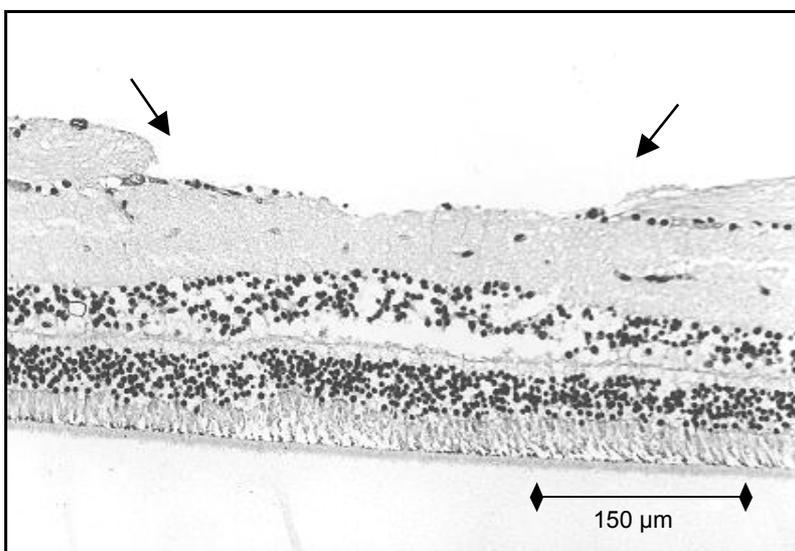


Abb. 40. LM-Aufnahme (Vergrößerung 125x, HE-gefärbt) $2,0 \text{ J} / \text{cm}^2$ unter PFCL, Saphirfaser. Man sieht eine bis zur Ganglienzellschicht reichende Gewebeabtragung (Pfeile) ohne thermische Nekrosen.

Mit einer Bestrahlungsdosis von $1,0 \text{ Joule/ cm}^2$ war der Nachweis eines Defektes in der optischen Kohärenztomographie deutlich erschwert, eine Läsion nur noch sehr flach zu erahnen (Abb. 41). In der lichtmikroskopischen Aufnahme fand sich eine nur oberflächliche Gewebeauflockerung (Abb. 42), die Schädigungstiefe lag bei etwa $12 \text{ }\mu\text{m}$.

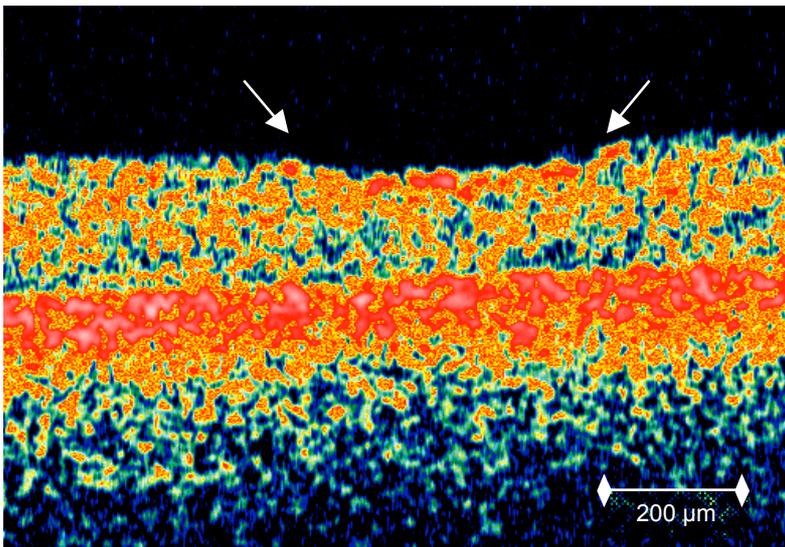


Abb. 41. OCT-Aufnahme (Scanlänge $1,15 \text{ mm}$) $2,0 \text{ J / cm}^2$ unter PFCL, Saphirfaser. Der nur sehr flache Defekt (Pfeile) ist anhand der geringen Reflektivitätsverdichtung der Oberfläche zu erahnen.

Auf eine genaue Vermessung des Defektdurchmessers wurde aufgrund der eingeschränkten Beurteilbarkeit verzichtet, er entspricht aber in etwa dem bei Behandlung mit $2,0$ oder $3,0 \text{ Joule/ cm}^2$.

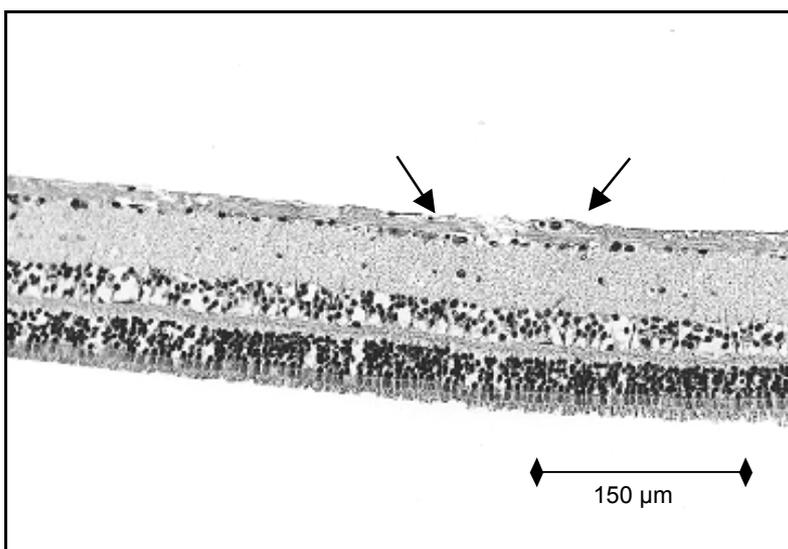


Abb. 42. LM-Aufnahme (Vergrößerung $125\times$, HE-gefärbt) $1,0 \text{ J / cm}^2$ unter PFCL, Saphirfaser. Erkennbar ist eine nur sehr oberflächliche Gewebeauflockerung (Pfeile).

Bei einer Dosisreduktion auf 0,5 Joule/ cm² konnte weder in der OCT noch in der Lichtmikroskopie ein Defekt nachgewiesen werden.

Die mit der Saphirfaser unter PFCL erzielten Abtragungstiefen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsenergiesdosis sind in Tabelle 7 dargestellt.

<u>Energiedosis :</u>	<u>Abtragungstiefe:</u>
5,0 Joule / cm ²	komplett (160 µm)
4,0 Joule / cm ²	40, 60 µm
4,0 Joule / cm ²	56 µm
3,0 Joule / cm ²	56 µm
3,0 Joule / cm ²	52, 56 µm
2,0 Joule / cm ²	28, 36, 40, 44 µm
2,0 Joule / cm ²	20, 28, 32 µm
2,0 Joule / cm ²	20, 24 µm
1,0 Joule / cm ²	12 µm
1,0 Joule / cm ²	0 µm
1,0 Joule / cm ²	0 µm
0,5 Joule / cm ²	0 µm

Tab. 7. Photoablation unter PFCL, Saphirfaser

4.2.3.3. Ablationsübersicht Saphirfaser

Die mit der Saphirfaser unter Luft und unter PFCL erzielten Abtragungstiefen in Abhängigkeit von der Energiedosis sind zusammenfassend in Abb. 43 dargestellt. Im Vergleich zur Low-OH-Quarzfaser ist das Abtragungsbild unter PFCL mit der Saphirfaser deutlich homogener, die Schwankungen der Ablationstiefe sind geringer. Eine Ablation im Bereich von 2-4 μm , die für eine selektive Entfernung der Membrana limitans interna nötig wäre, wurde jedoch nicht erreicht.

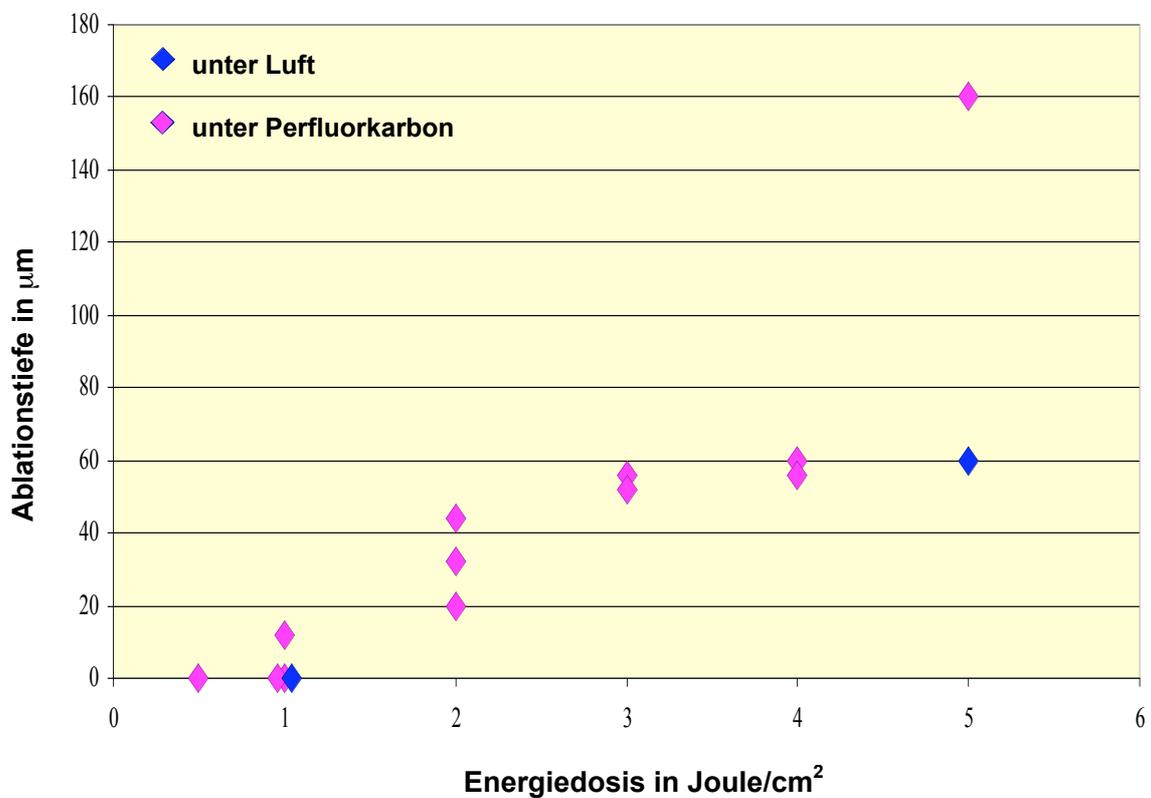


Abb. 43. Ablationsübersicht Saphirfaser

5. DISKUSSION

5.1. Literaturvergleich mit anderen Studien

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen zum möglichen Einsatz des Erbium:YAG-Lasers in der vitreoretinalen Chirurgie durchgeführt.

Peyman und Katoh sowie Tsubota unternahmen erste in vitro Experimente an der Retina sowie der Kornea, Iris und Linse [78, 93]. Sie haben vor allem tiefgreifende Defekte erzeugt und ihre Oberflächenstruktur rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

D'Amico und Mitarbeiter führten mit einem gepulsten Erbium:YAG-Laser an 8 Kaninchenaugen in vitro exemplarisch erste retinale Abtragungsversuche durch [18]. Das Laserlicht wurde dabei in eine Saphirfaser mit einem Faserdurchmesser von 375 μm eingekoppelt, die Pulsdauer betrug 300 μsec , die Energiedosis lag bei 0,91-3,9 Joule/cm^2 . Die Versuche wurden alle unter Luft, in einem Fall auch unter isotoner Kochsalzlösung durchgeführt. Unter Luft konnte bei einem Abstand der Faser zur Retina von 0,4 mm mit einem einzelnen Puls von 3,9 Joule/cm^2 eine vollständige Retinotomie erzeugt werden, umgebend fand sich eine thermische Koagulationsnekrose von 40 μm Breite. 20 Pulse von 2,6 Joule/cm^2 , ebenfalls im Abstand von 0,4 mm, führten zu einer gleich tiefen Schädigung, hier jedoch mit 50 μm breiter Koagulationszone. Im Vergleich wurden in unserer Studie mit einer Saphirfaser unter Luft bei einer Energiedosis von 5,0 Joule/cm^2 deutlich geringere Ablationstiefen erzielt, die Defekte reichten lediglich bis zur inneren plexiformen Schicht, die Defekttiefe lag bei 48-68 μm . Der in unserer Studie etwas höhere Abstand der Faser zur Retina erklärt nicht den Unterschied in der Defekttiefe, jedoch unterscheidet sich die Anatomie der Netzhaut des Kaninchenauges von der des Schweineauges erheblich. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist deshalb nicht möglich. Die Retinaanatomie des Schweineauges hingegen ist der des Menschen sehr viel ähnlicher. Unter isotoner Kochsalzlösung wurde von der Arbeitsgruppe von D'Amico im Kontakt-Verfahren bei 2,6 Joule/cm^2 eine vollständige Netzhaut-Durchtrennung erzielt, es zeigte sich jedoch eine deutlich größere thermische Nekrosezone von 1 mm. Wurde der Abstand der Faser zur Retinaoberfläche auf 3 mm erhöht, produzierte eine Energie von 2,6 Joule/cm^2 lediglich einen oberflächlichen Defekt von 30 μm Tiefe. Ebenfalls unter Luft bei einem Abstand von 0,4 mm konnten mit 0,91 Joule/cm^2 keinerlei Läsionen nachgewiesen werden, unter 1,3 Joule/cm^2 fanden sich 30 μm tiefe Defekte mit thermischer Nekrose von 20 μm .

Auch in unserer Studie führten wir die vor allem im Rahmen der Vorversuche stark differierenden Abtragungsergebnisse bzw. die mangelnde Abtragung trotz erhöhter Dosis auf relevante Variationen des Abstandes bzw. eine nur unzureichende Abstandskontrolle zurück.

Weitere Abtragungsversuche im niedrigen Dosisbereich wurden von D'Amico und Mitarbeitern nicht unternommen, ihre Studienbemühungen zielten vielmehr auf die Durchtrennung von Membranen bzw. auf die Durchführung einer Retinotomie hin.

Nach ihren oben genannten in vitro Versuchen am Kaninchenaugenmodell sammelte die Arbeitsgruppe um D'Amico im folgenden erste klinische Erfahrungen mit dem Einsatz des Erbium:YAG-Lasers in der vitreoretinalen Chirurgie [16, 17]. Zum Einsatz kam die bereits in der ersten Studie benutzte Saphirfaser, der Faserdurchmesser lag aber bei 100, 200 bzw. 365 μm , die Energiedosis pro Puls betrug 0,2-5,0 mJoule und die Repetitionsrate war 2-10 Hertz. Die Versuche wurden sowohl unter Flüssigkeit als auch unter Luft vorgenommen. Es gelang ihnen eine Durchtrennung von Glaskörpermembranen sowie epi- und subretinalen Membranen, Retinotomien und eine Abtragung von Linsenresten. Auch hintere Kapsulotomien und Iridektomien wurden durchgeführt. Eine selektive Abtragung innerer Netzhautschichten wurde von D'Amico und Mitarbeitern jedoch weiterhin nicht versucht.

Die Arbeitsgruppe um Brazitikos und Mitarbeitern führte an Kaninchenaugen mit dem Erbium:YAG-Laser ebenfalls erfolgreich eine Durchtrennung von Glaskörpermembranen, Retinotomien sowie eine Inzision und Abtragung von epiretinalen Membranen durch [8]. In ihrer Studie wurde eine hochtransmittierende Faser in ein Quarz- bzw. Saphir-Faserendstück mit einem Faserdurchmesser von 75-375 μm eingekoppelt, die Versuche wurden unter Wasser, unter Luft und unter Perfluoro-N-Oktan unternommen, die Energiedosis betrug 1,8-50 Joule/ cm^2 , die Pulswiederholungsrate lag bei 2-10 Hertz.

Bei einem Faserdurchmesser von 175 μm war eine Durchtrennung von Glaskörpermembranen im Kontaktverfahren bei 5,9-10 Joule/ cm^2 möglich. Bei einer Reduktion des Faserdurchmessers auf 75 μm mußten höhere Energien (6,8-50 Joule/ cm^2) zur Erzielung äquivalenter Effekte aufgebracht werden. Eine Inzision von epiretinalen Membranen im wässrigen Medium im Abstand von 0,5 mm erfolgte bei 2,9-8,3 Joule/ cm^2 . Unter Luft war damit eine epiretinale Membranentfernung mit 2,1-4,2 Joule/ cm^2 erfolgreich möglich. Im Vergleich dazu war unter Perfluoro-N-Oktan bei gleichem Faserdurchmesser und gleichem Abstand eine höhere Energiedosis zur Inzision epiretinaler Membranen notwendig, sie lag bei 2,5-10,4 Joule/ cm^2 .

Diese Beobachtung widerspricht unseren Daten: in unseren Untersuchungen war sowohl unter Perfluoroctan als auch unter Perfluordekalin im Vergleich zu Luft eine niedrigere Energiedosis zur Erzielung gleichtiefer Defekte ausreichend.

In einer Folgestudie an Schweineaugen untersuchten Brazitikos und Mitarbeiter den Einfluß der Pulswiederholungsrate bei der Durchführung von Retinotomien, Retinaablationen, hinteren Kapsulotomien, Linsenabtragungen und Iridektomien [9]. Der Erbium:YAG-Laser wurde in eine Quarzfaser mit einem Durchmesser von 100 bzw. 200 μm eingekoppelt, die Energiedosis lag bei 0,2-25 mJoule pro Puls.

Die Versuche wurden unter isotoner Kochsalzlösung durchgeführt. Im Vergleich zu einer Pulswiederholungsrate von 30 Hertz schien eine Pulsrate von 200 Hertz überlegen zu sein: die Abtragung war mit 200 Hertz effizienter und schneller möglich und die ablatierten Areale wiesen eine glattere Oberfläche auf. Brazitikos und Mitarbeiter unternahmen in dieser Studie zwar auch Abtragungsversuche an der Retina, diese wurden jedoch nur mit einer konstanten Energiedosis von 1,0 Joule pro Puls durchgeführt und erzielten eine Gewebeabtragung bis in den mittleren Bereich der Ganglienzellschicht. Eine superfizielle retinale Ablation wurde auch in dieser Studie nicht versucht.

Als Schlußfolgerung der o.g. Studien wäre einer Ablation unter Luft im Vergleich zur Abtragung unter wässriger Flüssigkeit der Vorzug zu geben. Unter Luft kam es vergleichsweise zu geringeren thermischen Nekrosen und weniger unerwünschten Koagulationseffekten, außerdem waren geringere Bestrahlungsenergien zur Erzielung gleichtiefer Inzisionen ausreichend.

Die Arbeitsgruppen um M. Frenz und Mitarbeitern unternahmen unter Perfluordekalin retinale Abtragungsversuche mit einem freilaufenden Erbium:YAG-Laser. Das Laserlicht wurde hierfür in eine Zirkonium-Fluorid-Faser mit Quarzfaserspitze eingekoppelt, der Faserdurchmesser lag bei 1000 μm .

Der Abstand von der Faserspitze zur Retina betrug 1,0 mm. Ziel ihrer ersten beiden Studien war zunächst die Abtragung von epiretinalen Membranen in vitro. Die Proben wurden hier mit einer Energiedosis von 1,0 / 3,0 / 5,0 und 10,0 Joule/ cm^2 behandelt. In ihrer ersten Studie wurde unter 1,0 Joule/ cm^2 eine Abtragungstiefe von 0-10 μm erzielt, bei 3,0 Joule/ cm^2 fanden sich 10-30 μm tiefe Defekte, bei 5,0 Joule/ cm^2 reichten die Schädigungen bis in eine Tiefe von 20-40 μm [29].

In eine Folgestudie waren die bei gleicher Energiedosis erzielten Ablationstiefen mit diesen Werten nicht exakt übereinstimmend, die Ablationstiefe war im Vergleich geringer [99]: unter 1,0 Joule/ cm² lag die Schädigung nun bei 0-6,9 µm, bei 3,0 Joule/ cm² betrug die Defekttiefe 2,9-16,9 µm und bei 5,0 Joule/ cm² wurde die Retina bis in einen Bereich von 12,8-25,6 µm abgetragen.

Im Vergleich zu diesen Studien differieren unsere eigenen Abtragungsergebnisse hier deutlich. Bei Verwendung der Low-OH-Quarzfaser wurden bei 3,0 Joule/ cm² 48-108 µm tiefe Defekte erzeugt, bei 5,0 Joule/ cm² lag die Schädigungstiefe bei 112-160 µm.

Bei Verwendung der Saphirfaser lagen die erzielten Defekttiefen nach wie vor deutlich über den in den Studien von Frenz und Mitarbeitern aufgelisteten Werten. In unserer Studie betrug die Ablationstiefe bei 1,0 Joule/ cm² 0-12 µm.

Bei 3,0 Joule/ cm² lag sie bei 52-56 µm und bei 5,0 Joule/ cm² wurde eine vollständige Retinotomie (entsprechend 160 µm Abtragungstiefe) erzielt. Erklärung für diese Unterschiede in der Ablationstiefe könnten erneut relevante Abstandsveränderungen sein. In unserer Studie war der Abstand der Faser zur Retina mit 0,5 mm nur halb so groß wie der Abstand in den Studien von Frenz und Mitarbeitern. Kommt es am Ende der Faserspitze zur Divergenz des Laserlichtstrahlenbündels, so wird hierdurch eine Art Kegelform beschrieben (Abb. 44). Die auf die Netzhaut einwirkende Energiedosis würde sich somit auf die Kreisfläche M am Ende des Kegels verteilen. Gemäß der bekannten Formel πr^2 würde eine Verdopplung des Abstandes h zu einer Verdopplung des Radius r und somit zu einer Vervierfachung der Kreisfläche M führen. Die pro Fläche ankommende Energiedosis würde sich demnach auf 1/4 reduzieren. Diese Berechnungen verdeutlichen, welchen hohen Einfluß Abstandsvariationen auf das Ablationsergebnis haben können.

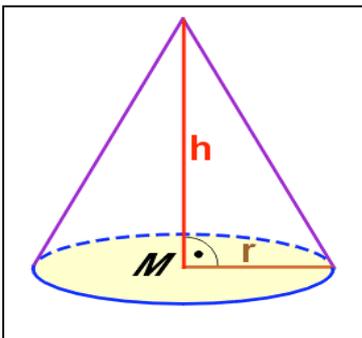


Abb. 44. Kegel und Kegelfläche

h= Höhe

r= Radius

M= Kreisfläche am Kegelse, entsprechend πr^2

5.2. Beeinflussende Faktoren bei der Ablation der Membrana limitans interna mit dem Erbium:YAG-Laser

Aufgrund seiner nur sehr geringen optischen Eindringtiefe scheint der Erbium:YAG-Laser optimal geeignet zu sein für eine selektive Abtragung innerer Netzhautschichten wie der Membrana limitans interna. Um das Ablationsergebnis störende mechanische Schäden zu vermeiden, ist eine Gewebeabtragung im non-Kontakt-Verfahren zu favorisieren. Damit die Laserenergie hierbei nicht schon vor Erreichen der Retinaoberfläche absorbiert wird und überdies ein möglichst homogenes und reproduzierbares Ablationsergebnis erzielt werden kann, müssen eine Vielzahl von Einflußfaktoren berücksichtigt werden. Hierzu gehören das umgebende Medium, die Wahl der Faser sowie der Versuchsaufbau selbst. Überdies muß geprüft werden, inwieweit sich die gewonnenen in vitro-Ergebnisse überhaupt auf einen intraoperativen Einsatz übertragen lassen.

5.2.1. Vor- und Nachteile von Luft und PFCL als Ablationsmedium

In unseren Versuchsreihen war eine Visualisierung der Abstandskontrolle von Faserspitze zu Retinaorganexplantat sowohl unter Luft als auch unter Perfluorkarbon problemlos möglich. Intraoperativ hingegen wäre der Einblick unter Luft deutlich schlechter und eine exakte Abstandskontrolle damit schwierig. Ursache hierfür sind die unterschiedlichen Brechungsindizes der Medien für sichtbares Licht (Tab.8).

Medium	Brechungsindex
Luft	1,00
Wasser	1,33
Hornhaut	1,38
Kammerwasser/ Glaskörper	1,34
Linse	1,35
Perfluoroktan	1,27
Perfluordekalin	1,31

Tab.8 Brechungsindizes verschiedener Medien für sichtbares Licht, aus Faude et al. [25]

Während Luft einen Brechungsindex von 1,0 hat, liegen die Brechungsindizes von Perfluoroktan und Perfluordekalin bei 1,27 bzw. 1,31 und ähneln damit stärker den Brechungsindizes der transparenten Medien des Auges [25]. Perfluorkarbonate erweisen sich damit im Vergleich zu Luft also als vorteilhafter, da sie eine bessere intraoperative Visualisierung und Kontrolle der Manipulationen erlauben.

Perfluorkarbonate besitzen eine um etwa 80-90% höhere Dichte als Wasser [25], sie können damit auf der Retina verbliebene wässrige Flüssigkeitsreste verdrängen und somit die Ausbildung von Kavitationsblasen in einer solchen residuellen wässrigen Schicht vermeiden.

Frenz und Mitarbeiter zeigten, daß die mit einem Erbium:YAG-Laser unter Perfluorkarbon erzeugten Blasen eine andere Dynamik aufweisen als die unter Wasser hervorgerufenen Kavitationsblasen [28, 29]. Im Gegensatz zur Laserbehandlung unter Wasser werden unter Perfluorkarbon Kavitationsblasen durch die Absorption der Laserenergie im Gewebe und dem resultierenden Materialausstoß hervorgerufen. Mit steigendem Volumen des ablatierten Gewebes steigt auch die Größe der erzeugten Blasen.

Blasenaufbau und anschließender Blasen kollaps geschehen dabei viel langsamer als in Wasser. Im Gegensatz zu Wasser entsteht beim Kollaps der Blase keine starke Druckwelle [28, 29]. Aufgrund dieses Verhaltens können durch die Verwendung von PFCL auf die Netzhaut einwirkende schädigende mechanische Nebeneffekte vermieden werden.

Überdies konnte im Vergleich zu den Ergebnissen unter Luft durch die Verwendung von Perfluorkarbon die Abtragungseffizienz bei gleicher Energiedosis signifikant erhöht werden. Perfluorkarbonate ermöglichen durch ihre hohe Transmissionsrate für das Erbium:YAG-Laserlicht eine verlustfreie Übertragung der Laserenergie auf das zu ablatierende Gewebe [28]. Unter PFCL konnten bei gleicher Energiedosis nicht nur tiefgreifendere Defekte erzeugt werden, die Schwankungsbreite der Defekttiefe war unter PFCL zudem deutlich geringer als unter Luft. Beispielsweise betrug die Defekttiefe bei Verwendung einer Low-OH-Faser und einer Energiedosis von 3,0 Joule/ cm² unter Luft 16-48 µm und unter PFCL 48-108 µm. Mit einer Energiedosis von 2,0 Joule/ cm² konnten hier unter Luft keinerlei Defekte nachgewiesen werden, unter PFCL hingegen lag die Ablationstiefe zwischen 32-36 µm. Vor allem für eine gezielte Ablation im niedrigen Dosisbereich zeigte sich die Verwendung von Luft als umgebendes Medium als nicht geeignet.

Die von Brazitikos und Mitarbeitern während der Laserbehandlung beobachtete zunehmende diffuse Eintrübung des Perfluorkarbons mit deutlicher Beeinträchtigung der Visualisierung [8] wurde in unserer Studie nicht gesehen. Es fanden sich im Rahmen unserer Versuche bei der Verwendung höherer Energiedosen $\geq 3,0 \text{ Joule/ cm}^2$ zwar vereinzelte, von der Faserspitze aus aufsteigende kleine Bläschen im PFCL, diese beeinträchtigten die Versuchsdurchführung aber in keiner Weise. Die Arbeitsgruppen von Jahnknecht und Mitarbeitern [45] sowie Wesendahl und Mitarbeitern [99] machten ähnliche Beobachtungen. Auch in ihren Studien wurden im Perfluorkarbon simultan zur Laserbehandlung an der Faserspitze auftretende Bläschenbildungen gesehen, auch hier kam es jedoch nicht zu einer dauerhaften Akkumulation der Bläschen mit Reduktion der Visualisierung.

In unseren Versuchen wurde jedoch nur eine solitäre Defektlinie erzeugt, im Rahmen der Makulachirurgie wird hingegen eine flächenhafte Membranabtragung im Makulabereich durchgeführt, hierfür wäre eine deutlich höhere Anzahl an Laserpulsen notwendig.

Vor einem klinischen Einsatz müßte deshalb erneut geklärt werden, ob eine Flächenabtragung möglicherweise doch zu einer gesteigerten Akkumulation von Bläschen im PFCL und damit zu einer Beeinträchtigung der Versuchsdurchführung führen könnte.

Mrochen und Mitarbeiter wiesen überdies auf Temperaturerhöhungen bei einem Einsatz des Erbium:YAG Lasers unter Perfluorkarbon hin [71]. Bei einer Erbium:YAG-Laser-Vitrektomie mit einer Laserenergie von 3-15 mJoule, einer Pulsdauer von 200 μs und einer kontinuierlichen Aspiration wurden unter Perfluorkarbon Temperaturerhöhungen von 33 K gemessen. Die maximale, direkt an der Aspirationsöffnung gemessene Temperatur lag unter PFCL bei 58°C. Unter Wasser hingegen lag die Temperaturerhöhung nur bei 2 K, die Maximaltemperatur betrug 23,5°C. Solche Temperaturerhöhungen unter PFCL könnten zu unerwünschten thermischen Schädigungen des umliegenden Gewebes führen und sie sind bei einer Anwendung des Erbium:YAG-Laser bei einer ILM-Abtragung zu berücksichtigen. Allerdings weisen unsere eigenen Ergebnisse nicht auf einen solchen Unterschied hin. Bei Verwendung einer Low-OH-Quarzfaser fanden sich sowohl unter Luft, als auch unter Perfluorkarbon thermische Nekrosen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Medien war diesbezüglich nicht erkennbar. Wurde das Laserlicht in eine Saphirfaser eingekoppelt, ließen sich unter PFCL keine auffälligen thermischen Nekrosen mehr nachweisen. Die Wahl des Fasermaterials scheint somit auf die Ausbildung von thermischen Nekrosen einen stärkeren Effekt zu haben als das umgebende Medium.

5.2.2. Grundlagen, Einfluß und Vergleich beider Fasermaterialien

Die Ausbreitung des Laserlichtes innerhalb einer optischen Faser erfolgt nach den Grundlagen der Wellenoptik. Basis einer Unterscheidung der in unserer Studie verwendeten Fasermaterialien ist die Kenntnis der Prinzipien von konstruktiver bzw. destruktiver Interferenz sowie der Modenmischung (mode scrambling):

aufgrund von Interferenzeffekten werden Wellen innerhalb der Faser nur dann weitergeleitet, wenn der Ausbreitungswinkel innerhalb der Faser dazu führt, daß die Welle nach zweifacher Reflexion wieder in Phase mit der einlaufenden Welle ist. Dies wird auch als konstruktive Interferenz bezeichnet.

Ist der Ausbreitungswinkel ein anderer, so kommt es aufgrund von destruktiver Interferenz zu einer Auslöschung der Welle. Die möglichen Winkel innerhalb einer Faser, die zur Ausbreitung des Laserlichtes führen, werden auch Faser-Moden genannt.

Wird eine Faser nun verlängert und gleichzeitig gebogen, so kommt es zu einer Durchmischung der Faser-Moden und zu einer Überkopplung der Moden ineinander, dem sogenannten mode scrambling.

Eine solche Modenmischung ermöglicht eine gleichmäßigere Intensitätsverteilung am Faserende. Sie ist jedoch nur möglich, wenn die Faser eine ausreichend hohe Transmissionsrate hat, um ohne relevanten Energieverlust möglichst lang gewählt werden zu können und wenn die Brüchigkeit der Faser eine Biegung zulässt. Im Gegensatz zur Low-OH-Quarzfaser hat die Saphirfaser eine etwa 100-fach höhere Transmissionsrate für das Erbium:YAG-Laserlicht [71], die Faserlänge kann deshalb ohne signifikanten Energieverlust deutlich höher gewählt werden. Die in unserer Studie verwendete Low-OH-Quarzfaser hatte eine Länge von 10 cm, die Saphirfaser hingegen war mit einer Länge von 2m im Vergleich 20mal länger. Durch die überdies geringere Brüchigkeit der Saphirfaser [71] war neben der Verlängerung der Faser auch eine Biegung möglich. Die Saphirfaser wurde in unseren Versuchen in Kreisform gekrümmt. Die durch die so erreichte Modenmischung verbesserte Intensitätsverteilung am Faserende führte bei Verwendung einer Saphirfaser zu vergleichsweise homogeneren Ablationsergebnissen als bei der Low-OH-Quarzfaser. Auch thermische Nekrosen, deren Entstehung möglicherweise durch eine irreguläre Intensitätsverteilung am Faserende begünstigt wird, wurden bei den Versuchen mit einer Saphirfaser nicht mehr gesehen. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, daß sich die Saphirfaser im Vergleich deutlich besser für eine gezielte retinale Oberflächenabtragung eignet als die Low-OH-Quarzfaser.

5.2.3. Einfluß von Pulsdauer und Pulswiederholungsrate

Neben der Wahl des Fasermaterials beeinflusst auch die Pulsdauer des Erbium:YAG-Lasers die Abtragungsergebnisse. Hill und Mitarbeiter untersuchten den Einfluß der Pulslänge bei der photothermischen Trabekelablation [39]. Sie wiesen bei Erhöhung der Pulslänge neben einer Vergrößerung des Ablationsareals auch einen ansteigenden thermischen Schaden nach. Bei einer Pulslänge von 50 μs lag das Ablationsareal bei 0-140 μm und die thermische Nekrose bei $\leq 10 \mu\text{m}$. Eine Erhöhung der Pulslänge auf 150 μs führte zu einer Ablation von 115-120 μm und einer gesteigerten thermischen Nekrose von 10-20 μm . Unter 250 μs lag die Abtragung bei 180-220 μm und die Nekrosezone war $\leq 50 \mu\text{m}$. Die Arbeitsgruppe um Walsh verglichen an Haut, Kornea, Aorta und Knochen die Ablationszonen eines freilaufenden Erbium:YAG-Lasers mit einer Pulsdauer von 200 μs mit einem gütegeschalteten Laser mit einer Pulsdauer von 90 ns [98]. Während bei 200 μs eine thermische Nekrosezone von 10-50 μm resultierte, wurden bei 90 ns deutlich geringere thermische Schäden von nur 5-10 μm beobachtet. Auch Ren und Mitarbeiter verglichen einen freilaufenden Erbium:YAG-Laser mit einer Pulsdauer von 200 μs mit einem gütegeschalteten Laser, hier mit einer Pulsdauer von 100 ns [84]. Mit der Güteschaltung konnten sie eine Reduktion der Schädigungszone von 14-18 μm auf 2-6 μm erzielen. Die Arbeitsgruppe von Kampmeier machte in vitro ähnliche Beobachtungen am Schweineauge [48]. Die thermischen Schäden eines freilaufenden Erbium:YAG-Lasers mit einer Pulsdauer von 50 μs lagen in ihrer Studie bei 10-25 μm . Bei einer Güteschaltung und einer Pulsdauer von 200 ns fanden sich nur 4,5-7,5 μm thermische Nekrosen, rasterelektronenmikroskopisch zeigten die Ablationsbereiche überdies im Vergleich eine homogenere und glattere Oberfläche. Der von Kampmeier und Mitarbeitern unternommene direkte Vergleich ihrer Untersuchungsergebnisse muß jedoch kritisch gesehen werden, da nicht nur die Pulsdauer verändert wurde, sondern auch die Pulswiederholungsrate in beiden Gruppen modifiziert wurde. Im Fall des freilaufenden Lasers lag die Pulswiederholungsrate bei 80 Hz und im Fall des gütegeschalteten Lasers bei 20 Hz. Nicht nur die Pulsdauer, sondern auch die Pulswiederholungsrate verändert das Abtragungsergebnis. Krause und Mitarbeiter wiesen bei Pulswiederholungsraten zwischen 10-200 Hz einen linearen Anstieg der Ablationsrate bei Erhöhung der Pulswiederholungsrate nach [55]. Allein die Reduktion der Pulswiederholungsrate des gütegeschalteten Lasers auf 1/4 kann somit in den Versuchen von Kampmeier und Mitarbeitern zur Verminderung der thermischen Nekrosezone geführt haben.

Insgesamt gesehen scheinen Pulsdauern im niedrigen Dosisbereich bzw. eine Güteschaltung sowie niedrige Pulswiederholungsraten zu einem homogeneren Abtragungsergebnis mit geringeren thermischen Nekrosen zu führen.

Bende und Mitarbeiter machten jedoch gegenteilige Beobachtungen. Sie untersuchten an Schweineaugen den Einfluß von Pulslängen zwischen 100 µs und 1300 µs auf die Photoablation von Kornea und Sklera [4]. Benutzt wurde auch hier ein freilaufender Erbium:YAG-Laser. Obwohl die Pulslänge in ihren Untersuchungen um mehr als eine Größenordnung variiert wurde, waren die erzielten Abtragungsraten sowie die thermischen Schädigungszonen quasi konstant.

5.2.4. Eignung des Versuchsaufbaus/ Modells

Trotz vergleichsweise homogenerer Ablation bei Verwendung einer Saphirfaser zeigten sich auch hier bei gleicher Bestrahlungsdosis variierende Defektmuster und Ablationstiefen. Auch innerhalb der gleichen Probe fanden sich von Puls zu Puls unterschiedliche Defekttiefen. Bei 2,0 Joule/ cm² lagen diese Schwankungen beispielsweise zwischen 28 und 44 µm. Auch die bereits aufgeführten Ergebnisse der anderen Studien zum Einsatz des Erbium:YAG-Lasers in der vitreoretinalen Chirurgie weisen eine deutliche Schwankungsbreite der Ablationstiefen auf. Solche starken Schwankungsbreiten machen eine gezielte Oberflächenabtragung so subtiler Strukturen wie der Membrana limitans interna, also in Bereichen von 2-4 µm, quasi unmöglich.

Mögliche Ursache der unterschiedlichen Abtragungstiefen können Variationen des Abstandes von Faserspitze und Retinaoberfläche sein.

Durch mehrfache Modifikation und Verbesserung des Versuchsaufbaus mit Aufbringung der Retina auf eine glatte Filteroberfläche und Absenken der Faserspitze mittels Mikrometerschrauben wurden in unseren Versuchen Abstandsvariationen zwar minimiert, vor allem unter klinischen Bedingungen, bei denen der Operateur ein Laserinstrument unter manueller Kontrolle führen müsste, könnten ablationsrelevante Schwankungen des Abstandes aber nur schwer ausgeschlossen werden.

Schwierigkeiten bei einer intraoperativen selektiven Laserablation der Membrana limitans interna mit dem Erbium:YAG-Laser ergeben sich auch aufgrund der möglichen individuellen Variabilität der ILM-Dicke. Heegaard zeigte, daß die Dicke der ILM von Erwachsenen im Bereich der Makula im Vergleich zur Äquatorialregion bzw. Ora serrata

deutlich höher ist, auch wies er Schwankungen in Abhängigkeit vom Lebensalter nach [37]. Die von ihm bestimmte ILM-Dicke im Makulabereich lag zwischen dem 20.-90. Lebensjahr bei 1,7 bis 4,0 μm . Matsunaga und Mitarbeiter wiesen eine signifikante Verdickung der ILM im Makulabereich bei Patienten mit diabetischem Makulaödem nach. Die mittlere ILM-Dicke war 4,8 \pm 1,6 μm , die ILM-Dicke der Kontrollgruppe betrug nur 1,8 \pm 0,6 μm [67]. Inwieweit andere Krankheiten einen Einfluß auf die Beschaffenheit und Dicke der ILM haben, ist noch nicht untersucht. Es stehen zudem aktuell keine Möglichkeiten zur Verfügung, prä- bzw. intraoperativ die genaue Dicke der Membrana limitans interna zu bestimmen. Die genannten möglichen Schwankungen der ILM-Dicke im Bereich von 1,7 bis 6,4 μm machen eine exakte Dosisfindung für ein selektives ILM-Peeling schwierig.

Hauptproblem ist auch die geringe optische Eindringtiefe des Erbium:YAG-Laserlichtes in Wasser, diese liegt nur bei etwa 1 μm [34, 97, 102].

Hierdurch wird zwar auf der einen Seite die Voraussetzung für eine nur oberflächliche Gewebeablation geschaffen, auf der anderen Seite können bereits sehr geringe auf der Netzhautoberfläche verbliebene residuelle Flüssigkeitsschichten bzw. Glaskörperreste zu einer deutlichen Abschwächung der Laserenergie und damit zu einer Reduktion der Ablationstiefe führen. Janknecht und Mitarbeiter bestätigen dies. Sie unternahmen in vivo mit dem Erbium:YAG-Laser ILM-Abtragsversuche an Schweineaugen unter Perfluorkarbon [43]. In den Augen, in denen histologisch noch Glaskörperreste auf der Netzhaut nachweisbar waren, war die ILM auch nach der Laserbehandlung noch vollständig intakt, es waren hier keinerlei Lasereffekte nachweisbar. Obwohl Perfluorkarbonate aufgrund ihrer hohen Dichte theoretisch in der Lage sein sollten, auf der Netzhaut verbliebene wässrige Flüssigkeits- bzw. Glaskörperreste zu verdrängen, war dies in ihren Versuchen somit nicht immer der Fall. Heegaard liefert eine mögliche Begründung dafür, daß selbst Perfluorkarbon die Glaskörperreste nicht vollständig zu verdrängen vermag. Er zeigte, daß Kollagenfilamente des Glaskörpers an der ILM inserieren [37]. Nach Glaskörperentfernung könnten einige solcher Filamente auf der Retinaoberfläche verbleiben und aufgrund ihrer Adhärenz mit der ILM auch durch Perfluorkarbonate nicht verdrängbar sein.

Eine möglichst vollständige hintere Glaskörperabhebung und Entfernung aller Glaskörperreste von der Netzhaut ist für ein erfolgreiches ILM-Peeling mit dem Erbium:YAG-Laser unabdingbar. Intraoperativ lässt sich dies allerdings bislang nicht sicher bestimmen.

In den Versuchen von Janknecht und Mitarbeitern wurde zwar in allen Fällen vom Operateur angenommen, daß die hintere Glaskörperabhebung vollständig durchgeführt wurde, in 4 von 9 Augen waren histologisch jedoch auf der Netzhaut haftende Glaskörperreste nachweisbar. Eine rein visuelle Kontrolle der Glaskörperabhebung und -entfernung durch den Operateur scheint somit nicht ausreichend zu sein. Möglicherweise könnte der Einsatz ultra-hochauflösender Optischer Kohärenztomographie-Geräte eine bessere Visualisierung von auf der Netzhaut verbliebenen Flüssigkeits- und Glaskörperresten ermöglichen und somit die Versuchsbedingungen verbessern.

5.3. Optische Kohärenztomographie

5.3.1. Korrelation von OCT und Histologie

Ein Hauptproblem im Rahmen einer selektiven Abtragung der Membrana limitans interna mit dem Erbium:YAG-Laser ist auch die fehlende visuelle Kontrolle der Ablation. Wurde mit einer höheren Energiedosis von 3,0-5,0 Joule/ cm² bestrahlt, so waren die Lasereffekte in 10-facher Vergrößerung noch als feine gräuliche Oberflächenverfärbung erkennbar. Im niedrigen Dosisbereich hingegen konnten in unseren Versuchen während der Laserbehandlung auch unter Vergrößerung makroskopisch keinerlei Veränderungen der Netzhautoberfläche wahrgenommen werden. Die in unserer Studie eingesetzte Optische Kohärenztomographie kann dieses Problem lösen.

Sie stellt eine einfach zu handhabende, nicht-invasive Methode zur Darstellung der Ablationstiefe dar. Sie ermöglicht eine Visualisierung der erzielten Abtragung unmittelbar nach der Laserbehandlung, eine direkte Ablationskontrolle wird somit möglich. In keiner Vergleichsstudie zur Anwendung des Erbium:YAG-Lasers bei der Abtragung innerer Netzhautschichten wie der Membrana limitans interna wurde eine Korrelation zwischen Optischer Kohärenztomographie und Lichtmikroskopie beschrieben. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die mittels Optischer Kohärenztomographie bestimmten Defektdurchmesser im mittleren und hohen Dosisbereich eine gute Korrelation zur Lichtmikroskopie aufweisen (Tabelle 9). Ausgenommen hiervon sind vor allem die unter 3,0 Joule/ cm² unter PFCL mit der Low-OH-Quarzfaser sowie die unter 4,0 Joule/ cm² unter PFCL mit der Saphirfaser bestimmten Defektdurchmesser, diese liegen in der OCT bei 300-320 µm bzw. bei 210 µm und in der Lichtmikroskopie bei 400-480 µm bzw. 400-416 µm.

	<i>Defektdurchmesser in der OCT</i>	<i>Defektdurchmesser in der Lichtmikroskopie</i>
<i>5,0 Joule / cm², Low-OH, Luft</i>	360- 370 µm	380- 400 µm
<i>3,0 Joule / cm², Low-OH, Luft</i>	280 µm	240- 328 µm
<i>5,0 Joule / cm², Low-OH, PFCL</i>	380 µm	320 µm
<i>3,0 Joule / cm², Low-OH, PFCL</i>	300- 320 µm	400- 480 µm
<i>2,0 Joule / cm², Low-OH, PFCL</i>	360 µm	348 µm
<i>5,0 Joule / cm², Saphir, PFCL</i>	500- 540 µm	480- 520 µm
<i>4,0 Joule / cm², Saphir, PFCL</i>	210 µm	400- 416 µm
<i>3,0 Joule / cm², Saphir, PFCL</i>	300 µm	400- 420 µm
<i>2,0 Joule / cm², Saphir, PFCL</i>	420 µm	360- 460 µm

Tab. 9. Defektdurchmesser im Vergleich zwischen OCT und Lichtmikroskopie

Die mittels OCT bestimmten Defektdurchmesser sind in diesen Proben im Vergleich zur lichtmikroskopischen Vermessung deutlich geringer. Eine Erklärung für diese Abweichungen könnte die in diesen Präparaten vorhandene Aufwölbung der neurosensorischen Netzhaut sein, in den anderen Präparaten ist diese nicht erkennbar. Diese Elevation scheint eine exakte Vermessung zu erschweren. Die Auflösungskraft unseres OCT-Gerätes liegt bei etwa 15 µm und ist damit zu gering für eine genaue Differenzierung einzelner Netzhautschichten.

Vor allem wenn die Ablation von einer Aufwölbung der neurosensorischen Netzhaut begleitet ist, kann aufgrund der mangelnden Differenzierung der Netzhautinnenstrukturen keine sichere Aussage über die Größe des Defektes gemacht werden. Die Aufwölbungen könnten histologische Artefakte sein, die durch präparationsbedingte Schrumpfungsprozesse entstanden sind. Andere mögliche Ursache der Elevation könnten auftretende Kräfte beim Kollaps einer Kavitationsblase sein. Brujan, Vogel und Mitarbeiter [11] untersuchten die Dynamik von laserinduzierten Kavitationsblasen an elastischen Grenzflächen anhand eines Polyacrylamidgels: wird die Kavitationsblase unmittelbar an der Oberfläche/ Grenzfläche des Polyacrylamidgels erzeugt, so wird die Grenzfläche nach anfänglicher Deformation zurückgezogen, übrig bleibt eine leichte Aufwölbung des Gels (Abb. 45, Pfeil).

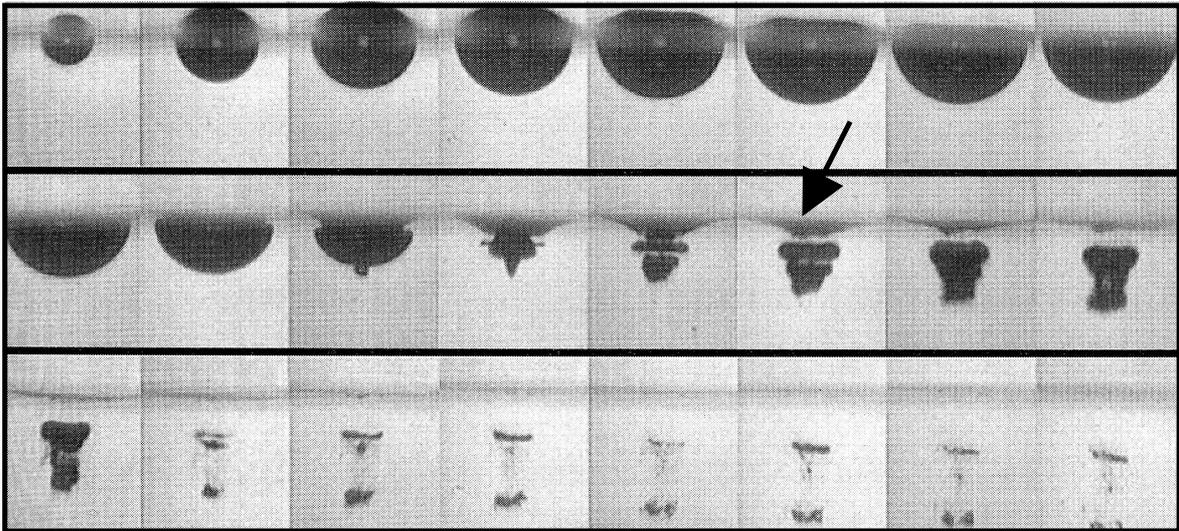


Abb.45. Interaktion einer laserinduzierten Kavitationsblase an einer elastischen Grenzfläche, aus Brujan, Vogel und Mitarbeitern [11]: nach dem Kollaps der Kavitationsblase kommt es zu einer leichten Aufwölbung des Polyacrylamidgels (Pfeil)

Diese vertikal gerichteten Traktionskräfte beim Kollaps der Kavitationsblase könnten somit Ursache der in unseren Versuchen zeitweise beobachteten Elevation der neurosensorischen Netzhaut sein. Möglicherweise treten diese Effekte unter klinischen Bedingungen nicht auf, da die Netzhaut in vivo fester am darunter liegenden Pigmentepithel haftet.

5.3.2. Eignung des OCT zur Ablationskontrolle

Die Auflösungsgrenze des in unserer Studie verwendeten OCT-Gerätes liegt bei etwa 15 μm . Eine Beurteilung und Darstellung von Ablationen sehr oberflächlicher Strukturen wie der Membrana limitans interna, also in einer Größenordnung von 2-6 μm , ist mit dem in unserer Studie eingesetzten OCT-Gerät deshalb nicht suffizient möglich. Als Schnelltest zur sofortigen Kontrolle von Abtragungen im Bereich $>15 \mu\text{m}$ scheint das verwendete OCT-Gerät aber geeignet zu sein.

Die Auflösungsgrenze der optischen Kohärenztomographie konnte in jüngster Zeit durch die Entwicklung neuer ultra-hochauflösender Geräte aber deutlich verbessert werden und liegt nun im Bereich von 2 μm [33, 53, 61, 101].

Mit diesen ultra-hochauflösenden Geräten können einzelne Netzhautschichten voneinander differenziert werden, hierdurch wird eine wesentlich exaktere Vermessung von Laserablationen möglich.

Mit der Optischen Kohärenztomographie steht somit ein vielversprechendes Instrument zur berührungsfreien intraoperativen Visualisierung einer Ablation innerer Netzhautschichten wie der Membrana limitans interna zur Verfügung. Durch den kombinierten Einsatz von Erbium:YAG-Laser und OCT könnten in Zukunft Versuche zur Abtragung und Inzision von okulärem Gewebe vereinfacht und besser kontrollierbar werden, die Sicherheit und Präzision einer intraoperativen Anwendung des Erbium:YAG-Lasers könnte so deutlich erhöht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Vergleich zur Low-OH-Quarzfaser ist die Saphirfaser besser geeignet für eine selektive Ablation innerer Netzhautschichten, ihr Abtragungsprofil ist homogener, es finden sich weniger thermische Nekrosen. Bei Verwendung einer Saphirfaser und einer Laserbehandlung unter Perfluorkarbon konnte mit dem Erbium:YAG-Laser unter $1,0 \text{ Joule/cm}^2$ eine oberflächliche Ablation bis in den Bereich der oberen Nervenfaserschicht erzielt werden, die Abtragungstiefe lag bei $12 \text{ }\mu\text{m}$, thermische Nekrosen wurden nicht gesehen. Eine Abtragung oberflächlicher Netzhautschichten mit dem Erbium:YAG-Laser ist also möglich, eine gezielte Ablation der nur etwa $2\text{-}6 \text{ }\mu\text{m}$ dicken Membrana limitans interna konnte in unserer Studie jedoch noch nicht erreicht werden.

Der Erbium:YAG-Laser eignet sich aber für eine traktionsfreie Durchtrennung der Retina. Diese wurde in unserer Studie mit einer Energiedosis von $5,0 \text{ Joule/cm}^2$ erreicht. Er könnte damit die im Rahmen der Makulatranslokationschirurgie notwendige periphere 360° -Retinotomie erleichtern und ggf. beschleunigen, da die Schnittführung mit dem Erbium:YAG-Laser im Vergleich zur mechanischen Durchtrennung mit Schere oder Okutom besser kontrollierbar wäre und die resultierenden Schnittkanten weniger irregulär wären. Weitere mögliche Anwendungsgebiete wären die Abtragung epiretinaler, anteriorer oder subretinaler Membranen.

Für eine gezielte Abtragung der Membrana limitans interna scheint, Bezug nehmend auf die Ergebnisse von Vergleichsstudien, ein gütegeschalteter Erbium:YAG-Laser mit einer niedrigen Pulsdauer von etwa 90 [98] bzw. 100 ns [84] bis $50 \text{ }\mu\text{s [39, 48]}$ und einer Wiederholungsrate von $\geq 200 \text{ Hertz [9]}$ die besten Voraussetzungen zu liefern. Auch eine Erhöhung des Faserdurchmessers scheint die Abtragungseffizienz zu steigern [8], unter Beibehaltung höchstmöglicher Homogenität und mit Reduktion thermischer Nekrosen. Die Ablation unter diesen Bedingungen scheint im Vergleich am homogensten und effizientesten zu sein und das Auftreten von thermische Nekrosen wird reduziert. Weitere Studien müssen zeigen, ob eine gezielte ILM-Abtragung bei Verwendung dieser Parameter möglich sein wird.

Ein weiter bestehendes Hauptproblem bei der gezielten Anwendung des Erbium:YAG-Lasers ist die fehlende genaue intraoperative Visualisierung der erzielten Abtragungstiefe. Die in unserer Studie eingesetzte Optische Kohärenztomographie schafft hier Abhilfe. Sie ist ein einfach zu handhabendes, nicht-invasives Verfahren zur Darstellung der Ablationstiefe. Im mittleren und hohen Dosisbereich zeigten unsere Untersuchungen eine gute Korrelation zwischen Optischer Kohärenztomographie und Lichtmikroskopie.

Die Auflösungskraft unseres Gerätes war mit etwa 15 μm jedoch noch zu gering für eine Darstellung sehr oberflächlicher Ablationen im Bereich von 2-6 μm .

Neue ultra-hochauflösende OCT-Geräte könnten aufgrund ihrer verbesserten Auflösung von 2 μm eine ausreichende intraoperative Visualisierung einer Ablation innerer Netzhautschichten wie der Membrana limitans interna ermöglichen [33, 53, 61, 101].

Versuche zur Abtragung und Inzision von okulärem Gewebe könnten in Zukunft durch den kombinierten Einsatz von Erbium:YAG-Laser und Optischer Kohärenztomographie vereinfacht und besser kontrollierbar werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Al-Abdulla NA, Thompson JT, Sjaarda RN (2004). Results of macular hole surgery with and without epiretinal dissection or internal limiting membrane removal. *Ophthalmology* 111(1): 142-149
2. Ando F, Yasui O, Hirose H, Ohba N (2004). Optic nerve atrophy after vitrectomy with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling in diffuse diabetic macular edema. Adverse effect of ICG-assisted ILM peeling. *Graefes Arch Clin Exp. Ophthalmol* 242(12): 995-999
3. Avci R, Kaderli B, Avci B, Simsek S, Baykara M, Kahveci Z, Gelisken O, Yucel AA (2004). Pars plana vitrectomy and removal of the internal limiting membrane in the treatment of chronic macular edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(10): 845-852
4. Bende T, Jean B, Matallana M, Seiler T, Steiner R (1993). Einfluß der Pulslänge des Er:YAG Lasers auf die Photoablation in okulärem Gewebe (Kornea und Sklera). *Klin Monatsbl Augenheilkd* 202: 52-55
5. Binder S, Stolba U, Kellner L, Krebs I (2000). Erbium:YAG laser vitrectomy: clinical results. *Am J Ophthalmol* 130(1): 82-86
6. Bourke RD, Cooling RJ (1995). Perfluorocarbon heavy liquids. *Aust N Z J Ophthalmol* 23(3): 165-171
7. Bovey EH, Uffer S, Achache F (2004). Surgery for epimacular membrane: impact of retinal internal limiting membrane removal on functional outcome. *Retina* 24(5): 728-735
8. Brazitikos PD, D'Amico DJ, Bernal MT, Walsh AW (1995). Erbium:YAG Laser Surgery of the Vitreous and Retina. *Ophthalmology* 102: 278-290
9. Brazitikos PD, D'Amico DJ, Bochow TW, Hmelar M, Marcellino GR, Stangos NT (1998). Experimental Ocular Surgery with a High-Repetition-Rate Erbium:YAG Laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1667-1675

10. Brooks HL Jr (2000). Macular hole surgery with and without internal limiting membrane peeling. *Ophthalmology* 107(10): 1939-1948, discussion 1948-1949
11. Brujan EA, Nahen K, Schmidt P, Vogel A (2001). Dynamics of laser-induced cavitation bubbles near an elastic boundary. *J. Fluid Mech.* 433: 251-281
12. Cheng SN, Yang TC, Ho JD, Hwang JF, Cheng CK (2005). Ocular toxicity of intravitreal indocyanine green. *J Ocul Pharmacol Ther.* 21(1): 85-93
13. Ciardella AP, Schiff W, Barile G, Vidne O, Sparrow J, Langton K, Chang S (2003). Persistent indocyanine green fluorescence after vitrectomy for macular hole. *Am J Ophthalmol* 136(1): 174-177
14. Crafoord S, Larsson J, Hansson LJ, Carlsson JO, Stenkula S (1995). The use of perfluorocarbon liquids in vitreoretinal surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 73(5): 442-445
15. Dändliker R (1989). *Laser-Kurzlehrgang*. AT, Aarau, Schweiz: 7; 37-44
16. D'Amico DJ, Blumenkranz MS, Lavin MJ, Quiroz-Mercado H, Pallikaris IG, Marcellino GR, Brooks GE (1996). Multicenter Clinical Experience Using an Erbium:YAG Laser for Vitreoretinal Surgery. *Ophthalmology* 103: 1575-1585
17. D'Amico DJ, Brazitikos PD, Marcellino GR, Finn SM, Hobart JL (1996). Initial Clinical Experience With an Erbium:YAG Laser for Vitreoretinal Surgery. *Am J Ophthalmol* 121: 414-425
18. D'Amico DJ, Moulton RS, Theodossiadis PG, Yarborough JM (1994). Erbium:YAG Laser Photothermal Retinal Ablation in Enucleated Rabbit Eyes. *Am J Ophthalmol* 117: 783-790
19. Duran S, Zato M (2001). Erbium:YAG laser emulsification of the cataractous lens. *J Cataract Refract Surg.* 27(7): 1025-1032
20. Eckhardt C, Eckhardt U (1997) Entfernung der Membrana limitans interna bei Makulalöchern. *Ophthalmologe* 94: 545-551

21. Eichler HJ, Eichler J (1995). Laser: High-Tech mit Licht. Springer, Heidelberg: 6-36; 202-213
22. Eichler J, Eichler HJ (1992). Laser: Grundlagen, Systeme, Anwendungen. Springer, Heidelberg: 49-54; 133-159
23. Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr, Aaberg TM Sr, Aaberg TM Jr, Martin DF, Sippy BD (2002). Retinal pigment epithelial changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 133(1): 89-94
24. Fagerholm P (2003). Phototherapeutic keratectomy: 12 years of experience. *Acta Ophthalmol Scand.* 81(1): 19-32
25. Faude F, Wolf S, Wiedemann P (2000). Flüssige Perfluorkarbone in der Glaskörper- und Netzhautchirurgie. *Ophthalmologe* 97: 652-661
26. Förster W, Atzler U, Ratkay I, Busse H (1997). Therapeutic use of the 193-nm excimer laser in corneal pathologies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 235(5):296-305.
27. Frenz M, Pratisto H, Ith M, Rink K, Delacrétaz G, Romano V, Salathé RP, Weber HP (1994). Transient Photoacoustic effects induced in liquids by pulsed Erbium laser. *Biomedical Optics, Laser-Tissue-Interaction V*, ed. Jacques SL and Katzir A., SPIE Bellingham 2134: 402-412
28. Frenz M, Pratisto H, Toth CA, Jansen D, Altermatt HJ, Welch AJ, Weber HP (1996). Perfluorcarbon compounds: transmitting liquids for infrared laser tissue ablation. *SPIE Proc Laser-Tissue-Interaction VII* 2681: 343-352
29. Frenz M, Weber M, Wesendahl T, Janknecht P (1998). Er:YAG laser ablation of epiretinal membranes in perfluorcarbon fluid filled eye-balls: a preliminary report. *SPIE Proc "Ophthalmic Technologies VIII"* 3246: 199-208
30. Gandorfer A, Haritoglou C, Gandorfer A, Kampik A (2003). Retinal damage from indocyanine green in experimental macular surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1): 316-323

31. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A (2000). Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane. *Retina* 20(2): 126-133
32. Green H, Boll J, Parrish JA, Kochevar IE, Oseroff AR (1987). Cytotoxicity and mutagenicity of low intensity, 248 and 193 nm excimer laser radiation in mammalian cells. *Cancer Res.* 47(2): 410-413
33. Grieve K, Paques M, Dubois A, Sahel J, Boccara C, Le Gargasson JF (2004). Ocular tissue imaging using ultrahigh-resolution, full-field optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(11): 4126-4131
34. Hale GM, Querry MR (1973). Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Appl Opt* 12: 555-563
35. Haritoglou C, Ehrt O, Gass CA, Kristin N, Kampik A (2001) Paracentral scotomata: a new finding after vitrectomy for idiopathic macular hole. *Br J Ophthalmol* 85(2): 231-233
36. Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, Puliafito JG (1995). Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol* 113(3): 325-332
37. Heegaard S (1997). Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.* 222: 1-31
38. Hemo I, Palanker D, Turovets I, Lewis A, Zauberman H (1997). Vitreoretinal Surgery Assisted by the 193-nm Excimer Laser. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 38(9): 1825-1829
39. Hill RA, Stern D, Lesiecki ML, Hsia J, Berns MW (1993). Effects of pulse width on erbium:YAG laser photothermal trabecular ablation (LTA). *Lasers Surg Med.* 13(4): 440-446
40. Höh H, Fischer E (2000). Pilot Study on Erbium Laser Phacoemulsification. *Ophthalmology* 107(6): 1053-1062
41. Hrynchak P, Simpson T (2000). Optical coherence tomography: an introduction to the technique and its use. *Optom Vis Sci* 77(7): 347-356

42. Hsu SL, Kao YH, Wu WC (2004). Effect of indocyanine green on the growth and viability of cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 20(4): 353-362
43. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al (1991). Optical coherence tomography. *Science* 254 (5035): 1178-1181
44. Ith M, Pratisto H, Altermatt HJ, Frenz M, Weber HP (1994). Dynamics of laser-induced channel formation in water and influence of pulse duration on the ablation of biotissue under water with pulsed Erbium laser radiation. *Appl Phys B* 59: 621-629
45. Janknecht P, Feltgen N, Wesendahl T, Wick J, Eissner B, Ott B, Staubach F, Frenz M (2001). Internal limiting membrane ablation in pig eyes with the Er:YAG laser under perfluorodecalin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239: 705-711
46. Jin Y, Uchida S, Yanagi Y, Aihara M, Araie M (2005). Neurotoxic effects of trypan blue on rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 81(4): 395-400
47. Kadonosono K, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Ohno S (2000). Staining of internal limiting membrane in macular hole surgery. *Arch Ophthalmol* 118(8): 1116-1118
48. Kampmeier J, Schäfer S, Lang GE, Lang GK (1999). Comparison of free-running vs. Q-switched Er:YAG laser photorefractive keratectomy (scanning mode) in swine eyes. *J Refract Surg* 15(5): 563-571
49. Kanda S, Uemura A, Yamashita T, Kita H, Yamakiri K, Sakamoto T (2004). Visual field defects after intravitreal administration of indocyanine green in macular hole surgery. *Arch Ophthalmol* 122(10): 1447-1451
50. Karamanolis S (1990). *Das ABC der Lasertechnik*. Elektra, München: 46-63
51. Kaskel S, Höh H (2001). Erbium:YAG laser vitrectomy. Initial clinical results. *Ophthalmologie* 98(1): 35-40

52. Klink T, Lieb W, Grehn F (2000). Erbium-YAG laser-assisted preparation of deep sclerectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 238(9): 792-796
53. Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS, Paunescu LA, Kowalevich AM, Hartl I, Drexler W, Wollstein G, Ishikawa H, Duker JS (2005). Comparison of ultrahigh- and standard-resolution optical coherence tomography for imaging macular pathology. *Ophthalmology* 112(11): 1922.e1-1922.e15
54. Kochevar IE (1989). Cytotoxicity and mutagenicity of excimer laser radiation. *Lasers Surg Med.* 9(5): 440-445
55. Krause MH, D'Amico DJ (2003). Ablation of vitreous tissue with a high repetition rate Erbium:YAG laser. *Eur J Ophthalmol* 13(5): 424-432
56. Krause M, Steeb D, Foth HJ, Weindler J, Ruprecht KW (1999) Ablation of Vitreous Tissue with Erbium:YAG Laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(6): 1025-1032
57. Kumagai K, Furukawa M, Ogino N, Uemura A, Demizu S, Larson E (2004). Vitreous surgery with and without internal limiting membrane peeling for macular hole repair. *Retina* 24(5): 721-727
58. Kwok AK, Lai TY, Yuen KS, Tam BS, Wong VW (2003). Macular hole surgery with or without indocyanine green stained internal limiting membrane peeling. *Clin Experiment Ophthalmol* 31(6): 470-475
59. Lewis A, Palanker D, Hemo I, Pe'er J, Zauberman H (1992). Microsurgery of the retina with a needle-guided 193 nm excimer laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33(8): 2377-2381
60. Lin CP, Stern D, Puliafito CA (1990). High-speed Photography of Er:YAG Laser Ablation in Fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2546-2550
61. Lim H, Jiang Y, Wang Y, Huang YC, Chen Z, Wise FW (2005). Ultrahigh-resolution optical coherence tomography with a fiber laser source at 1 microm. *Opt. Lett.* 30(10): 1171-1173

62. Lubatschowski H, Kermani O (1992). 193 nm Excimer laser photoablation of the cornea. Spectrum and transmission behavior of secondary irradiation. *Ophthalmologie* 89(2): 134-138
63. Lubatschowski H, Kermani O, Otten C, Haller A, Schmiedt KC, Ertmer W (1994). ArF-excimer laser-induced secondary radiation in photoablation of biological tissue. *Lasers Surg Med.* 14(2): 168-177
64. Luke C, Luke M, Dietlein TS, Hueber A, Jordan J, Sickel W, Kirchhof B (2005). Retinal tolerance to dyes. *Br J Ophthalmol.* 89(9): 1188-1191
65. Manche EE, Carr JD, Haw WW, Hersh PS (1998). Excimer laser refractive surgery. *West J Med.* 169(1): 30-38
66. Margolis TI, Farnath DA, Destro M, Puliafito CA (1989) Erbium-YAG Laser Surgery on Experimental Vitreous Membranes. *Arch Ophthalmol* 107(3): 424-428
67. Matsunaga N, Ozeki H, Hirabayashi Y, Shimada S, Ogura Y (2005). Histopathologic evaluation of the internal limiting membrane surgically excised from eyes with diabetic maculopathy. *Retina* 25(3): 311-316
68. Mester V, Kuhn F (2000). Internal limiting membrane removal in the management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 129(6): 769-777
69. Mohrenstecher D (1994). Untersuchung der Kavitationsblasendynamik zum Aufbau eines Detektionssystems für die IR-Lasersclerostomie. Diplomarbeit. Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH: 12-13
70. Mrochen M, Petersen H, Wüllner C, Seiler T (1998). Experimentelle Ergebnisse zur Erbium:YAG-Laservitrektomie. *Klin Mbl Augenheilkd* 212(1): 50-54
71. Mrochen M, Riedel P, Kempe A, Seiler T (2000). Erbium:YAG-Laser Vitrektomie. Temperaturmessungen in unterschiedlichen Austauschmedien. *Ophthalmologie* 97: 181-185

72. Nakamura H, Hayakawa K, Imaizumi A, Sakai M, Sawaguchi S (2005). Persistence of retinal indocyanine green dye following vitreous surgery. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 36(1): 37-45
73. Nakamura T, Murata T, Hisatomi T, Enaida H, Sassa Y, Ueno A, Sakamoto T, Ishibashi T (2003). Ultrastructure of the vitreoretinal interface following the removal of the internal limiting membrane using indocyanine green. *Curr Eye Res* 27(6): 395-399
74. Niemz MH (1996). *Laser-tissue interactions- Fundamentals and applications*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
75. Neubaur CC, Stevens G Jr (1999). Erbium:YAG laser cataract removal: role of fiber-optic delivery systems. *J Cataract Refract Surg* 25 (4): 514-520
76. Palanker D, Hemo I, Turovets I, Zauberman H, Fish G, Lewis A (1994). Vitreoretinal ablation with the 193-nm excimer laser in fluid media. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35(11): 3835-3840
77. Petersen H, Mrochen M, Seiler T (2000). Comparison of erbium:yttrium-aluminum-garnet-laser vitrectomy and mechanical vitrectomy: a clinical study. *Ophthalmology* 107(7): 1389-1392
78. Peyman GA, Kato N (1987). Effects of an erbium:YAG laser on ocular structures. *Int Ophthalmol* 10(4): 245-253
79. Peyman GA, Schulman JA, Sullivan B (1995). Perfluorocarbon liquids in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 39(5): 375-395
80. Pollack JS, Packo KH. The 1999 Vitreous Society preferences and trends (PAT) survey. The Vitreous Society Annual Meeting; Sept. 21-25, 1999; Rome, Italy.
81. Puliafito CA, Hee MR, Schuman JS, Fujimoto JG (1996). *Optical Coherence Tomography of Ocular Diseases*. SLACK Inc., Thorofare, NJ: 3-15; 369-374

82. Rasmussen RE, Hammer-Wilson M, Berns MW (1989). Mutation and sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary (CHO) cells by pulsed excimer laser radiation at 193 nm and 308 nm and continuous UV radiation at 254 nm. *Photochem Photobiol.* 49(4): 413-418
83. Recchia FM, Ruby AJ, Carvalho Recchia CA (2005). Pars plana vitrectomy with removal of the internal limiting membrane in the treatment of persistent diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 139(3): 447-454
84. Ren Q, Venugopalan V, Schomacker K, Deutsch TF, Flotte TJ, Puliafito CA, Birngruber R (1992). Mid-infrared laser ablation of the cornea: a comparative study. *Lasers Surg Med* 12(3): 274-281
85. Rezai KA, Farrokh-Siar L, Ernest JT, van Seventer GA (2004). Indocyanine green induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Ophthalmol* 137(5): 931-933
86. Schaudig U (2001). Optische Kohärenztomographie. *Ophthalmologe* 98: 26-34
87. Seiler T (1992). The Excimer Laser. An instrument for corneal surgery. *Ophthalmologe* 89(2): 128-133
88. Stefaniotou M, Aspiotis M, Kalogeropoulos C, Christodoulou A, Psylla M, Ioachim E, Alamanos I, Psilas K (2004). Vitrectomy results for diffuse diabetic macular edema with and without inner limiting membrane removal. *Eur J Ophthalmol* 14(2): 137-143
89. Steven P, Laqua H, Wong D, Hoerauf H (2006). Secondary paracentral retinal holes following internal limiting membrane removal. *Br J Ophthalmol.* 90(3): 293-295
90. Stevens G Jr, Long B, Hamann JM, Allen RC (1998). Erbium:YAG laser-assisted cataract surgery. *Ophthalmic Surg Lasers.* 29(3): 185-189

91. Stojkovic M, Seitz B, Langenbacher A, Viestenz A, Viestenz A, Hofmann-Rummelt C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Naumann GO (2004). Q-switched erbium:YAG laser corneal trephination: thermal damage in corneal stroma and cut regularity of nonmechanical Q-switched erbium:YAG laser corneal trephination for penetrating keratoplasty. *Cornea* 23(1): 50-60
92. Tradowsky K (1986). *Laser: Grundlagen, Technik, Basisanwendungen*. Kamprath-Reihe, Vogel, Würzburg: 25-27
93. Tsubota K (1990). Application of Erbium:YAG Laser in Ocular Ablation. *Ophthalmologica* 200(3): 117-122
94. Uemura A, Kanda S, Sakamoto Y, Kita H (2003). Visual field defects after uneventful vitrectomy for epiretinal membrane with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol.* 136(2): 252-257
95. Verges C, Llevat E (2003). Laser cataract surgery: technique and clinical results. *J Cataract Refract Surg.* 29(7): 1339-1345
96. Verges C, Llevat E, Bardavio J (2002). Laser-assisted deep sclerectomy. *J Cataract Refract Surg.* 28(5): 758-765
97. Vogel A, Venugopalan V (2003). Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev.* 103: 588-644
98. Walsh JT Jr, Flotte TJ, Deutsch TF (1989). Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. *Lasers Surg Med* 9(4): 314-326
99. Wesendahl T, Janknecht 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(2): 505-512

100. Winkler J, Hagelstein S, Rohde M, Laqua H (2002). Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. *Exp Eye Res.* 74(6): 777-788

101. Wojtkowski M, Srinivasan V, Fujimoto JG, Ko T, Schuman JS, Kowalczyk A, Duker JS (2005). Three-dimensional retinal imaging with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology* 112(19): 1734-1746

102. Zolotarev VM, Mikhailov BA, Alperovich LI, Popov SI (1969). Dispersion and absorption of liquid water in the infrared and radio regions of the spectrum. *Opt. Spectrosc.* 27: 430-432

8.1. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Laqua sowie Herrn Prof. Dr. R. Birngruber danke ich für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel durch die Klinik für Augenheilkunde und das Medizinische Laserzentrum der Universität zu Lübeck.

Herr Prof. Dr. A. Vogel und Herr G. Dröge haben mich stets in allen Fragen der Lasertechnik beraten und unterstützt und ihnen verdanke ich viele wertvolle Anregungen im Hinblick auf die Verbesserung von Material und Methodik. Herrn C. Scholz danke ich für die Betreuung bei der Vermessung der Histologien mittels Optischer Kohärenztomographie.

Frau Müller danke ich sehr für die Einarbeitung in die Techniken der histologischen Aufarbeitung der Proben und die beständige Hilfe während meiner Arbeiten im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt allen meinen Freunden für den stetigen Ansporn und die Hilfsbereitschaft.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. H. Hoerauf für die Überlassung des Themas und seine überaus großzügige Unterstützung. Die Zusammenarbeit mit ihm war immer ausgesprochen angenehm und mit seiner Hilfe haben dann doch noch "ein paar Kühe Schlittschuhlaufen gelernt"...

Durch ihn wurde auch mein Interesse an der Augenheilkunde geweckt und mein weiterer beruflicher Werdegang entscheidend geprägt.

8.2. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind. Die Herstellung der Proben und die Versuche wurden von mir selbst durchgeführt und ich habe alle histologischen Aufarbeitungen, von der Paraffin-Einbettung über die Anfertigung der Schnitte bis hin zur Färbung, eigenständig erstellt sowie die Histologien anschließend selbst vermessen und fotografiert.

Lübeck, den 28.05.2008

8.3. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Alexandra Brix

geboren am 10.08.1974 in Neumünster



Schulische Ausbildung:

1981-1985: Grundschule Wippendorfschule, Neumünster

1985-1994: Gymnasium Klaus-Groth-Schule, Neumünster

Studium:

WS 94/ 95: Immatrikulation an der Universität zu Lübeck

14.03.1997: Physikum

24.03.1998: 1. Staatsexamen

21.03.2000: 2. Staatsexamen

18.10.2002: 3. Staatsexamen

31.07.2003: Approbation als Ärztin

Nebentätigkeiten während des Studiums:

1996-1998: regelmäßige Tätigkeit als Extrawache der
DRK-Schwesternschaft im Universitätsklinikum Lübeck

WS 96/ 97: Anstellung als Assistentin im Präparierkurs Anatomie

1998- 2001: Anstellung in der Klinik für Augenheilkunde der Medizinischen
Universität zu Lübeck im Rahmen einer großen multizentrischen
Studie (SPR-Studie)

Facharztausbildung:

01.01.02- 30.06.03: Klinik für Augenheilkunde der Medizinischen Universität zu Lübeck

seit 01.08.2003: Augenklinik Universitätsallee Bremen

01.10.2008: Facharztprüfung

Lübeck, den 02.12.2008

8.4. PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

Publikationen:

Brix A, Vogel A, Winkler J, Dröge G, Birngruber R, Laqua H, Hoerauf H (2002).
Photoablation innerer Netzhautschichten mit dem Erbium:YAG-Laser in vitro. Focus MUL.
19(1): 35-41

Hoerauf H, Brix A, Scholz C, Winkler J, Dröge G, Birngruber R, Vogel A, Laqua H (2003).
Retinale Photoablation mit dem Erbium:YAG-Laser. Erste experimentelle Ergebnisse zur
traktionsfreien Gewebeabtragung. Der Ophthalmologe. 100(2): 115-121

Hoerauf H, Brix A, Winkler J, Dröge G, Birngruber R, Vogel A, Laqua H (2003).
Erbium:YAG-Laser - a tool for internal limiting membrane-removal? In: Ando F (ed)
Ophthalmologie im 21. Jahrhundert, Nagoya, Japan: 319-330

Hoerauf H, Brix A, Winkler J, Droege G, Winter C, Birngruber R, Laqua H, Vogel A (2006).
Photoablation of inner limiting membrane and inner retinal layers using the Erbium:YAG-
laser: An in vitro study. Lasers Surg Med. 38(1): 52-61

Vorträge:

49. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 08.-09.07.00 in Hamburg

99. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 29.09.-02.10.01 in Berlin