

**Aus der Augenklinik (Direktor: Prof. Dr. med. Berthold Seitz),
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg / Saar**

**Bildgebung und Gewebeabtrag in der
Netzhaut
mit Femtosekundenlaser-Pulsen**

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

2007

vorgelegt von
Matthias Hild,
geb. am 09.06.1980 in Neunkirchen / Saar

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
	Warenzeichen	5
1	Zusammenfassung / Abstract	6
2	Einleitung	9
2.1	Lasereingriffe am Auge	9
2.2	Laser-Gewebe-Wechselwirkungen	10
2.3	Laser und Retina	11
2.4	Femtosekundenlaser	12
2.5	Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie	13
2.6	Mikrochirurgie mit fs-Lasern	15
2.7	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Laser- und Mikroskopaufbau	18
3.2	Präparation, Bestrahlung und Fixierung der Proben	20
3.3	Laserscanningmikroskopie	21
3.4	Reflektion, Transmission und Autofluoreszenz	22
3.5	Festlegung des Gewebeabtrags und anschließende Bildgebung	23
3.6	Berechnung von Distanzen und Volumina	23
3.7	Histologie und Elektronenmikroskopie	24
3.8	Untersuchung des Schwellenwerts für Lumineszenzen als Zeichen eines retinalen Schadens	25
4	Ergebnisse	27
4.1	Bildgebung in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht	27

4.2	Retinaler Gewebeabtrag mit fs-Pulsen	27
4.2.1	Laserscanning-Bildgebung nach Gewebeabtrag	27
4.2.2	Zeitliche Analyse des abnehmenden Blasendurchmessers und Analyse des Blasendurchmessers in Abhängigkeit von Bestrahlungszeit und Leistung	29
4.2.3	Läsionsbreite in Abhängigkeit von Leistung und Zeit	30
4.3	Histologie und Elektronenmikroskopie	30
4.4	Getrocknete Probe	32
4.5	Untersuchung des Schwellenwerts für Lumineszenzen als Zeichen eines retinalen Schadens	33
5	Diskussion	34
5.1	Bildgebung in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht	34
5.2	Retinaler Gewebeabtrag mit fs-Pulsen	36
5.3	Histologie und Elektronenmikroskopie	38
5.4	Getrocknete Probe	39
5.5	Schwellenwert für Lumineszenzen	40
5.6	Schlussfolgerungen	42
6	Tabellen	43
7	Abbildungen	53
8	Literaturverzeichnis	79
9	Veröffentlichungen	86
10	Danksagung	88
11	Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

fs	Femtosekunde (1×10^{-15} s)
EL50	effektive Leistung 50
Er:YAG	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat
GCL	Ganglionzellschicht (ganglion cell layer)
GW	Gigawatt (1×10^9 W)
HR-OCT	hochauflösende optische Kohärenztomografie
IPL	innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
LASIK	Laser-in situ-Keratomileusis
LSM	Laserscanningmikroskop(ie)
MLSM	Multiphotonen-Laserscanningmikroskop(ie)
n	Anzahl
NFL	Nervenfaserschicht (nerve fiber layer)
NIR	naher Infrarotbereich (Wellenlänge 700 nm bis 1200 nm)
P	Leistung
PMT	Lichtsignalverstärker (photomultiplier tube)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGB	rot-grün-blau
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TW	Terawatt (1×10^{12} W)
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
Nd:YVO ₄	Neodym:Yttrium-Orthovanadat
z	Gewebetiefe

Warenzeichen

Folgende in der vorliegenden Arbeit genannten Firmen und Produkte sind eingetragene Marken und Warenzeichen (®, ™):

Carl Zeiss, Chameleon, Coherent, D-MEM, FEI Tecnai, Femtocut, Fieldmaster, Gibco, GlutaMAX-II, JenLab, LSM 410, LSM 510, Melles Griot, Microsoft Excel, Microsoft Paint, MiniCEM, Neofluar, Vitesse.

1 Zusammenfassung

HINTERGRUND UND ZIEL: Unverstärkte Femtosekundenlaser mit Pulsenergien im nJ-Bereich bieten neue Perspektiven in der retinalen Mikrochirurgie. Gewebe wird mit äußerst hoher Präzision geschnitten, ohne die Gewebeoberfläche zu schädigen. Femtosekundenlaser können daneben auch in einem zerstörungsfreien Bildgebungsverfahren angewendet werden (optische Tomographie). Im Hinblick auf die zukünftige klinische Netzhautchirurgie wurde eine Methode erforscht, die eine Kombination von schnellem Netzhautabtrag und einer zeitnahen hochpräzisen Bildgebung mit identischen Lasersystemen darstellte.

MATERIALIEN UND METHODEN: Zwei unverstärkte nahe-Infrarot Titan:Saphir-Laser (80 MHz und 90 MHz) wurden verwendet, um Netzhautproben aus Schweineaugen bei 760 nm bzw. 800 nm Wellenlänge zu bestrahlen. Für intraretinale Gewebeabtragung und Bildgebung wurde der Laserstrahl in zwei Multiphotonen-Laserscanningmikroskope eingekoppelt. Zusätzlich wurden bestrahlte Gewebeproben lichtmikroskopisch, transmissions- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

ERGEBNISSE: Gewebeabtrag in der Nervenfaserschicht wurde bei Leistungen zwischen 80 mW und 195 mW erzielt. Kontrollbilder (Transmission, Reflektion, Autofluoreszenz) wurden innerhalb von Sekunden vor und nach dem Gewebeabtrag mit Leistungen unter 2 mW erstellt. Retinale Schädigung wurde oberhalb einer Pulsenergie von 0,16 nJ ermittelt. Die Laserscanning- und Elektronenmikroskopie zeigte beim laserinduzierten Gewebeabtrag nur geringe Kollateralschäden.

ZUSAMMENFASSUNG: Unverstärkte Femtosekundenlaser mit Pulsenergien im nJ-Bereich können zum präzisen Gewebeabtrag in Netzhautgewebe verwendet werden. Hochauflösende Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie ermöglicht zerstörungsfreie Bildgebung innerhalb von Sekunden vor und nach dem Gewebeabtrag. Die

Kombination von Bildgebung und Abtrag macht die Laserscanningmikroskopie zu einer vielversprechenden Anwendung für die retinale Mikrochirurgie. Die vorliegenden Ergebnisse tragen zur Entwicklung eines klinischen Systems bei, welches retinale Diagnostik und Chirurgie miteinander verbindet.

1 Abstract

RETINAL IMAGING AND ABLATION WITH FEMTOSECOND LASER PULSES

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Non-amplified femtosecond lasers with nJ pulse energies offer new perspectives for retinal microsurgery. Tissue is cut at extremely high precision and without manipulation of the tissue surface. Besides, femtosecond lasers can be used for non-contact imaging (optical sectioning). With respect to future clinical retinal surgery, the combination of fast retinal ablation and time-close imaging at high precision with identical laser devices was investigated.

MATERIALS AND METHODS: Two non-amplified near infrared Titanium:Sapphire lasers (80 MHz and 90 MHz) were used to irradiate retinal specimens of porcine eyes at 760 nm and 800 nm wavelength, respectively. The laser beam was coupled to two multiphoton laser scanning microscopes for intraretinal imaging and tissue ablation. In addition, irradiated tissue samples were subjected to light microscopy, transmission and scanning electron microscopy.

RESULTS: Ablation of the nerve fiber layer was performed at powers of 80 mW to 195 mW. Control images (transmission, reflection, autofluorescence) were acquired within seconds before and after ablation at powers below 2 mW. A retinal damage was found above a pulse energy of 0.16 nJ. Only minimal collateral tissue damage was shown with laser scanning and electron microscopy.

CONCLUSIONS: Non-amplified femtosecond laser pulses at nJ pulse energies can be applied for precise ablation of retinal tissue. High resolution multiphoton laser scanning microscopy offers non-contact imaging within seconds before and after ablation. By combination of imaging and ablation, laser scanning microscopy is a promising tool for retinal microsurgery. The results of this study contribute to the development of a clinical system which can combine retinal diagnostics and surgery.

2 Einleitung

2.1 Lasereingriffe am Auge

Die Ophthalmologie war die erste medizinische Fachrichtung, in der die Lasertechnologie zur Anwendung kam. Heute ist es schwierig geworden, das Ausmaß zu überblicken, in dem in diagnostischer und therapeutischer Absicht am Auge Laserstrahlung genutzt wird. Laser bieten hierbei eine Präzision, die anderen Technologien oft überlegen ist. Hunderttausende ophthalmologischer Patienten unterziehen sich jährlich in Deutschland einer Laserbehandlung. Abgesehen von Behandlungen der Netzhaut liegen die häufigsten Verwendungsmöglichkeiten in der Glaukom- und Hornhautchirurgie, beispielsweise im Laserabtrag von Hornhautgewebe zur Behandlung der Kurzsichtigkeit (LASIK). Lasertechnik ist in der Retinologie vor allem in der photodynamischen Therapie der altersbedingten Makuladegeneration und der Sekundärprävention von Netzhautablösungen und diabetischen Neovaskularisationen im Einsatz.

In der vitreoretinalen Chirurgie spielen Laser bisher eine sehr untergeordnete Rolle. Hochpräzise Eingriffe wie Retinotomien oder die Entfernung epiretinaler Membranen (macular puckers) werden mit „traditionellen“ Instrumenten wie Scheren, Pinzetten und Haken [BOPP 2005] im Rahmen einer Vitrektomie durchgeführt, bei der der Glaskörper entfernt wird. Die Genauigkeit des Eingriffs hängt neben der manuellen Fertigkeit des Chirurgen auch von der Größe und Ergonomie der Instrumente ab. Variable Schnitttiefen und -breiten, Glaskörperblutungen und traktionsbedingte Netzhautablösungen sind schwerwiegende und relativ häufige Komplikationen und Nachteile, welche die Sehstärke irreversibel vermindern können. Eine Unterstützung des Operateurs durch Laser könnte helfen, die Präzision zu verbessern und die Komplikationen zu verringern.

2.2 Laser-Gewebe-Wechselwirkungen

Jede Laserbestrahlung über einem spezifischen Schwellenwert kann einen Effekt in retinalem Gewebe auslösen. Die Absorption von Laserlicht wird im Auge im Wesentlichen durch Wasser, Strukturproteine und Pigmente bestimmt. Die Effekte werden durch Parameter des Laserstrahls definiert, wie Leistungsdichte (Intensität), Belichtungszeit (Pulslänge), Energiedichte, Pulsenergie und Wellenlänge; außerdem durch Eigenschaften des bestrahlten Gewebes, wie Absorptionskoeffizient und Wärmeleitfähigkeit (Konduktivität). *Photochemische Reaktionen* sind chemische Interaktionen zwischen Licht und Makromolekülen. Im Prozess des „*Photobleaching*“ können Photonen die Fluoreszenzfähigkeit von Fluorophoren verringern. Die *Photokoagulation* verursacht eine Zellnekrose durch irreversible thermische Denaturierung von Proteinen, wenn Licht lokale Gewebetemperaturen über ca. 330 K anhebt. Bei der *Photoablation* dagegen vermag UV-Bestrahlung genug Energie aufzubringen, um Molekularbindungen in organischen Verbindungen aufzutrennen. Gewebefragmente können damit ohne Nekrose gelöst werden [NIEMZ 2003]. Bei Lichtintensitäten im Bereich von GW-TW/cm² bestimmt der *optische Durchbruch (optical breakdown)* die Laser-Gewebe-Wechselwirkungen. Wenn der materialspezifische Schwellenwert der Intensität im Fokus überschritten wird, führt eine plötzliche Ionisierung des Gewebes (insbesondere des Gewebewassers) zu einem Mikroplasma mit thermischer Elektronenrelaxation [VOGEL et al. 2003]. Die rasche Plasmaexpansion mit GPa-Schockwellen zerreißt das Gewebe (*Photodisruption*). Die initial entstandenen Gasblasen verkleinern sich durch Plasmaabkühlung und Rückstellkräfte des umgebenden Gewebes. Optischer Durchbruch und Photodisruption sind Mittel, durch die Gewebe manipuliert werden kann. In wässrigen Medien (zu denen auch die Retina gehört) kann sich hierbei eine beständige Kavitationsblase bilden, die nicht vollständig kollabiert. Die Blasen bleiben unter bestimmten Umständen bestehen und können einen Schnitt bilden, wenn sie aneinander gereiht

werden [VOGEL et al. 1994].

2.3 Laser und Retina

Von Beginn an wurden die jeweils aktuellen Lasertechniken konsequent in der Retinologie angewendet: Bereits ein Jahr, nachdem der erste Laser vorgestellt worden war, wurde nach dem Prinzip der Photokoagulation mit einem Rubinlaser ein retinaler Tumor erfolgreich therapiert [KOESTER et al. 1962]. Das gleiche Vorgehen nutzten in den 1960er und 1970er Jahren Argonlaser [L'ESPERANCE 1969; COSCAS et al. 1977], auch für die Koagulation von diabetischen Retinopathien und Netzhautablösungen. Analog wird heute der frequenzgedoppelte Nd:YAG Laser verwendet [BANDELLO et al. 1996; DESMETTRE et al. 2006].

Retinaler Gewebeabtrag wurde zuerst im Kontext der Behandlung diabetischer Retinopathien diskutiert [FRANCOIS et al. 1975], obwohl erst der Erbiumlaser die kontrollierte Photoablation ermöglichte. Klinische Studien mit Erbium:YAG Lasern zeigten, dass der Abtrag von Netzhautgewebe mit dem Vorteil einer relativen Selektivität und kontinuierlichen Durchtrennungen („Schnitten“) im Gewebe möglich ist [D'AMICO et al. 1996]. Auch konnte man bereits in vitro bestimmte retinale Gewebeschichten mit hoher Präzision abtragen [HOERAUF et al. 2003]. Ein Abtrag unter 4 μm Größe wurde erzielt, jedoch mit thermischen Veränderungen in bis zu 70 μm Entfernung. Alternativ wurden Netzhautdissektionen mit dem Excimerlaser durchgeführt. Der Abtrag bedurfte jeweils einer zusätzlichen visuellen Kontrolle. Das jüngst vorgestellte pulsed electron avalanche knife, das mit einem dichten Elektronenfeld statt Laserphotonen arbeitet, könnte daneben noch einen völlig anderen Weg zur Dissektion möglich machen [PRIGLINGER et al. 2005]. Mit keiner der genannten Techniken war es jedoch möglich, Gewebe innerhalb einer morphologischen Netzhautschicht, zum Beispiel in der Nervenfaserschicht (NFL), abzutragen. Die Präzision war hierzu zu

gering bzw. der Kollateralschaden sehr hoch.

2.4 Femtosekundenlaser

Die neueste kommerzielle, für ophthalmologische Zwecke lieferbare Lasertechnologie ist der Femtosekundenlaser (fs-Laser), der sog. ultrakurze Pulse von 10^{-13} s bis 10^{-15} s Länge abgibt. Klinisch haben sich fs-Laser bereits in der refraktiven Chirurgie bewährt; sie zeichnen sich durch sehr hohe Präzision mit geringen Nebeneffekten aus [HEISTERKAMP et al. 2003]. 1999 wurde die erste „only-laser“-LASIK („femto-LASIK“) an einem Patienten durchgeführt. Bei dieser wurde der Hornhautflügel (Flap) als Zugang zum Hornhautstroma mit einem fs-Laser geschnitten [TOUBOUL et al. 2005]. Es wird diskutiert, ob dieses Verfahren dem mechanischen Zugang zum Hornhautstroma (Mikrokeratom) überlegen ist [LIM et al. 2006; RODRIGUEZ et al. 2007]. Der eigentliche Gewebeabtrag im Stroma geschieht durch den Excimerlaser. Ein weiterer experimenteller Ansatz untersucht, ob sich intrastromales Gewebe direkt, ohne Schneiden eines Flaps abtragen lässt. Ein solches Verfahren könnte mögliche Risiken minimieren, die beim Schneiden des Flaps auftreten, z.B. Perforation mit Flapverlust. Auch eine verbesserte Wundheilung ist vorstellbar. Diese Methode ist nicht in klinischer Routine, aber Gegenstand jüngerer Studien [HAN et al. 2004; KRAUSE et al. 2004; MELTENDORF et al. 2007]. Im Bereich der Retina werden fs-Laser schon zur Bildgebung mit hochauflösender optischer Kohärenztomographie (HR-OCT) eingesetzt [KO et al. 2004], während sie bisher noch nicht zum Gewebeabtrag oder zum Schneiden eingesetzt wurden. Mögliche Auswirkungen von fs-Lasern auf die menschliche Retina ließen sich bereits bei Unfällen in Wissenschaft, Industrie und militärischen Anwendungen beobachten (z.B. unbeabsichtigter Blick in Vermessungsgeräte) [COOPER et al. 2004]. Schwere Netzhautschäden wurden auch vereinzelt bei Patienten beobachtet, die sich einer femto-LASIK unterzogen hatten [PRINCIPE et al. 2004]. Systematische in vivo-

Studien über die Interaktion von fs-Pulsen mit der (Säugetier-) Retina sind bis heute jedoch selten [THOMAS et al. 2002; CAIN et al. 2005].

Die fs-Laser, die heute in der experimentellen und klinischen Ophthalmologie weitgehend angewendet werden, emittieren verstärkte Pulse mit Pulsenergien zwischen 100 nJ und 100 μ J. Unverstärkte fs-Laser mit einigen wenigen nJ Pulsenergie sind noch keine klinische Routine, sie stehen aber im Mittelpunkt der aktuellen Forschung [HILD et al. 2005; WANG et al. 2007].

2.5 Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie

Bevor ultrakurze Laserpulse ein Mittel medizinischer Anwendungen wurden, haben sie bereits eine wichtige Rolle in den „life sciences“ gefunden. Winfried Denk entwickelte mit der Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie (MLSM) die eigentliche Grundlage der vorliegenden Arbeit [DENK et al. 1990]. Er kombinierte die ursprünglich von Minsky entwickelte Form der Scanningmikroskopie, die konfokale Scanningmikroskopie [MINSKY 1988], mit der Multiphotonenanregung durch fs-Laser. Die Multiphotonenanregung macht sich das Konzept der späteren Nobelpreisträgerin Göppert-Meyer zu Nutze, dass die simultane Absorption (innerhalb 10^{-15} s) von zwei Photonen der doppelten Wellenlänge (bzw. halben Energie) ein Fluorophor in gleicher Weise zur Emission anregen kann wie ein einzelnes Photon der einfachen Wellenlänge (bzw. einfachen Energie) [GÖPPERT-MAYER 1931].

Die simultane Absorption von zwei Photonen wird mit steigender Photonenflussdichte wahrscheinlicher. Für die Multiphotonenanregung ist eine Photonenflussdichte von über 10^{24} Photonen/cm² notwendig; dies entspricht Leistungsdichten von GW/cm² [KÖNIG 2000]. Solche Leistungsdichten werden von fs-Lasern, die im nahen Infrarotbereich (NIR) von 700 nm bis 1200 nm emittieren, erreicht. Dieser Spektralbereich ist für

die Untersuchung an lebenden Geweben äußerst günstig. Zum einen reicht die Energie von NIR-Photonen nur im Fokus zur Emissionsanregung aus; so wird unter Schonung angrenzender Gewebereiche eine hohe räumliche Auflösung erzielt. Zum anderen sind biologische Gewebe gerade für diesen Spektralbereich äußerst transparent („optisches Fenster“). Die konfokale Laserscanningmikroskopie liefert Schnittbilder aus unterschiedlichen Gewebetiefen, auch von Proben, die für die „konventionelle“ Lichtmikroskopie zu dick sind. Der Fokus muss also nicht an der Oberfläche der Probe, sondern kann auch tiefer liegen. Der Laserstrahl wird durch die Objektivlinse beugungsbegrenzt in einem etwa $1 \mu\text{m}^3$ großen Volumen fokussiert und rasterförmig in einer Fokusebene über bzw. durch die Probe geführt (Rasterscanning). Die von der Probe emittierte Fluoreszenz und reflektiertes Laserlicht werden vom Objektiv wieder aufgenommen und mit Strahlaufteilern aufgetrennt. Licht von außerhalb des Fokus wird durch die Lochblende (Pinhole) eliminiert, das übrige wird von einem Photomultiplier (PMT) aufgenommen. Daraus berechnet ein Computermodul das Bild. Im Gegensatz zur konfokalen Laserscanningmikroskopie verzichtet die MLSM auf das Pinhole, da sich die Anregung ohnehin nur in einem räumlich begrenzten Fokus ereignet und kein Streulicht entsteht [DENK et al. 1990]. Trotz der hohen Photonenflussdichte überschreitet ein eventueller thermischer oder photochemischer Schaden die fokussierte Zielregion nicht, da Pulsenergien und Durchschnittsleistungen gering gehalten werden. Allerdings ist dafür das Photobleaching im Fokus wahrscheinlicher.

Durch die Abbildung einer Sequenz mehrerer Fokusebenen senkrecht zur optischen Achse erhält man eine „optische Tomographie“, deren einzelne Schnittbilder auch zu einem 3D-Bild, einer „virtuellen Biopsie“ berechnet werden können [STRAUB et al. 2000] [PADDOCK 2002]. Weder Färben noch Fixieren, noch eine andere Bearbeitung der Probe sind prinzipiell für diese Methode erforderlich. Mit diesen Eigenschaften bietet die MLSM weitgefächerte Diagnostikmöglichkeiten, z.B. in der Gendetektion [KÖNIG

et al. 2000] oder im Pharmakonscreening [STRACKE et al. 2006]. Klinisch wird in der Diagnostik dermalen Neoplasien getestet, wie die MLSM praktische Vorteile gegenüber der konventionellen Biopsiegewinnung mit Histologie haben könnte [KÖNIG et al. 2003].

NIR-Strahlung über bestimmten Schwellenwerten birgt die Gefahr, zum Zelltod zu führen [KÖNIG et al. 1995] oder in zelluläre Steuerungsmechanismen, z.B. zur Reproduktion [SQUIRRELL et al. 1999; OEHRING et al. 2000] und Apoptose [TIRLAPUR et al. 2001] einzugreifen. Gravierende Zellschäden an lebenden Geweben sind oberhalb einer Bestrahlung von 2,5 mW-10 mW zu erwarten [KÖNIG et al. 1997; TAN et al. 1999; HOPT et al. 2001]. In vivo-Untersuchungen dürfen daher diese Leistungen nicht überschreiten.

2.6 Mikrochirurgie mit fs-Lasern

Gewebeabtrag und Kavitationsblasenbildung, die einem optischen Durchbruch folgen, können als Mittel für die Mikrochirurgie genutzt werden. Bei ausreichend tiefer Fokussierung entstehen Läsionen, die komplett von Gewebe umgeben sind. Abhängig von der Strahlführung lassen sich unterschiedliche Geometrien herbeiführen, z.B. linien- und flächenförmige Läsionen („Schnitte“, „Dissektionen“). König et al. erreichten mit unverstärkten fs-Pulsen Schnittbreiten unter 100 nm in luftgetrockneten humanen Chromosomen und Schnittbreiten unter 200 nm in humanen Erythrozyten mit einem Mikroskopaufbau, der dem der vorliegenden Studie ähnlich war [KÖNIG et al. 1999; KÖNIG et al. 2001]. Die gewählten Wellenlängen lagen hier zwischen 760 nm und 840 nm. In der Cornea konnten in vitro Linien mit Breiten unter 1 µm geschnitten werden [KÖNIG 2003]. In diesen Studien wurden außerhalb des beabsichtigt abgetragenen Gewebes keine Kollateralschäden beobachtet. Der Übergang von der Zone des Abtrags zu intaktem Gewebe war stufenlos.

Bis heute werden in vivo-Schwellenwertexperimente mit Lasern im Auge durch Ophthalmoskopie, Fundusfotographie und -angiographie kontrolliert. Diese Verfahren können Läsionen der oben beschriebenen Experimente jedoch nur eingeschränkt beurteilen, da ihre Auflösung zu gering ist [CAIN et al. 2005]. In vitro dagegen ist die klassische Histologie bei der Darstellung kleinster Läsionen etabliert, kann aber in vivo, z.B. zur Verlaufskontrolle bei Tierversuchen, nicht eingesetzt werden. Mit MLSM hingegen lässt sich lebendes Gewebe unbeschadet untersuchen. Dies geschieht mit einer Auflösung, die auch Läsionen im Mikrometerbereich wiedergeben kann.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Schnittpräzision und die Möglichkeiten der Bildgebung, die fs-Laser bieten, sind auch für Anwendungen in der Retina von großem Interesse. Gegenstand der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der Interaktion von fs-Lasern mit retinalem Gewebe, und dabei die MLSM sowohl zur Bildgebung als auch zum Abtrag von Gewebe einzusetzen. In Hinblick auf klinische Anwendungen in der vitreoretinalen Chirurgie waren die Möglichkeiten der Bildgebung, Präzision des Gewebeabtrags und potentielle Gewebeschäden von Relevanz. Für die vorliegende Arbeit wurde ein in vitro-Netzhautmodell entwickelt. Netzhautgewebe sollte mittels der MLSM nicht nur manipuliert bzw. abgetragen werden, sondern mit der gleichen technischen Einrichtung auch davor und danach zeitnah abgebildet werden. Anlehnend an derzeitige Methoden der vitreoretinalen Chirurgie war das Ziel angestrebt, möglichst kleine Schnitte mit geringer Beteiligung des angrenzenden Gewebes durchzuführen. Die mit Laser bestrahlten Gewebeprobeen sollten histologisch und elektronenmikroskopisch kontrolliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Laser- und Mikroskopaufbau

Zwei Festkörper-Femtosekundenlaser, kommerziell erwerbliche „schlüsselfertige“ Systeme, und zwei Laserscanningmikroskope wurden als Laserscanningsysteme zur Mikroprozessierung genutzt. Die Systeme wurden vom Fraunhofer IBMT Institut für biomedizinische Technik, St. Ingbert, zur Verfügung gestellt.

Der Laserstrahl wurde von zwei kompakten Titan:Saphir-Laserquellen, Klasse IV-Laser nach DIN EN 60825-1, abgeleitet:

(A) *Chameleon* und

(B) *Vitesse* (Coherent, Santa Clara, CA, USA).

Es handelte sich um sogenannte unverstärkte fs-Laser mit Pulsenergien im nJ-Bereich. Die Strahleigenschaften ermöglichten die Anwendung der Multiphotonen-Laserscanningmikroskopie. Nach Strahlaufweitung im Verhältnis 1:3 durch ein galileisches Teleskop und Transmission durch einen Neutralstrahlaufteiler wurde der Laserstrahl ohne Pulskompression in ein modifiziertes, invertiertes konfokales Laserscanningmikroskop gekoppelt:

(A) *Femtocut* (JenLab, Jena - basierend auf Zeiss LSM 410 -) und

(B) *LSM 510* (Carl Zeiss, Jena).

Die Laserexpositionszeit von 0,125 s bis 4 s konnte durch einen Shutter Controller (Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) exakt vorbestimmt werden. Technische Informationen sind in den **Tabellen 1 - 3** dargestellt, der Strahlengang in **Abb. 1 und 2**. In den Mikroskopen lenkte ein Paar von

galvanometrischen Spiegeln den Laserstrahl in zweidimensionaler (x/y) Richtung ab, um punktförmige Bestrahlung (*spot scan*), linienförmige Bestrahlung (*line scan*) und quadratförmige Bestrahlung (*square scan*) zu ermöglichen.

Das *Femtocut* (**Abb. 3**) beinhaltete einen Detektor für NIR-Transmissionsmikroskopie und einen Lichtverstärker (PMT) mit justierbarem Pinhole als räumlichen Filter. Daneben konnten ein externer PMT und eine Rot-grün-blau-Kamera (RGB-Kamera) an die Basis des Mikroskops gekoppelt werden. Die Basis bot den Vorteil, Photonen mit hoher Effizienz ohne Verlust durch Pinhole und Scannereinheit zu detektieren. Der externe PMT wurde zur Autofluoreszenzbildgebung, die Kamera zur Aufzeichnung von Filmen im Transmissionsmodus angewendet. Die Reflektion wurde mit dem internen PMT gemessen. Die schnellste Bildgenerierungszeit betrug 2 Bilder/s, die maximale Bildgröße 512 x 512 Pixel, entsprechend 320 x 320 μm . Die Leistung am Objektiv wurde durch einen externen Strahlabschwächer bestimmt. Ein Computermodul ermöglichte die Steuerung der galvanometrischen Spiegel, Festlegung der Bestrahlungsmuster und Bildgenerierung.

Das *LSM 510* (**Abb. 4**) bestand aus dem Zeiss Axiovert 200 Laserscanningmikroskop und dem Zeiss META-Modul (Carl Zeiss, Jena). Das System verfügte über integrierte Shutter und Strahlabschwächer. Im META-Modul waren 4 PMTs zur Reflektions- und Fluoreszenzbildgebung und ein 32-Kanal-Spektraldetektor zur Spektralanalyse installiert. Die schnellste Bildgenerierungszeit betrug 5 Bilder/s, die maximale Bildgröße 512 x 512 Pixel, entsprechend 230 x 230 μm . Ein Computermodul ermöglichte die Steuerung der galvanometrischen Spiegel, die Festlegung von Bestrahlungsmuster, Bestrahlungsleistung und -zeit sowie die Bilderstellung und -weiterverarbeitung.

In beiden Mikroskopen wurde ein Zeiss Neofluar 40 x (Carl Zeiss, Jena)

Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,3 und einem Arbeitsabstand von 200 μm zur Fokussierung verwendet. Beide Mikroskope hatten einen Standardobjektivtisch mit Aufnahme für eine runde Zellkammer (MiniCEM, JenLab, Jena) und einen piezogesteuerten Feintrieb, der es ermöglichte, mit 40 nm-Schritten bis in 200 μm Probentiefe zu fokussieren. Mit dem Femtocut wurden Transmissions-, Reflektions- und Autofluoreszenzaufnahmen erstellt, mit dem LSM 510 Reflektions- und Autofluoreszenzaufnahmen. Die Mikroskope verfügten auch über die Möglichkeit zur konventionellen Lichtmikroskopie, z.B. bei der erstmaligen Grobeinstellung der Probe. Die Bildgenerierung begann mit einer selbstgesteuerten Kontrasteinstellung. Dann wurde die Fokusebene dargestellt (**Abb. 5**). Der Objektivtisch konnte während des Scannens in der horizontalen Ebene bewegt werden, sodass interessante Probengebiete schnell unter kontinuierlichem Laserscanning einer genaueren Untersuchung zugeführt werden konnten.

Die effektive Leistung am Objektiv wurde durch einen Leistungsmesser (Fieldmaster, Coherent, Carlsbad, CA, USA) unmittelbar vor jedem Versuch bestimmt. Die Strahlfokussierung am Objektiv wurde mit Hilfe von Latexkörperchen (6 μm) justiert. Die Pulslänge am Objektiv betrug 160 fs (Vitesse) bzw. 186 fs (Chameleon).

3.2 Präparation, Bestrahlung und Fixierung der Proben

Für die vorliegende Arbeit wurde ein *in vitro* Modell von isolierter neurosensorischer Schweineretina entwickelt. Unter allen Haustieren ist die Retina des Schweines in Größe und Physiologie der menschlichen am nächsten [ADAMS 1988]. Frisch enukleierte Schweineaugen von einem örtlichen Schlachthof wurden direkt nach der Schlachtung in gekühltem (278 K) Zellmedium (D-MEM[†], Gibco, Paisley, GB) aufbewahrt. Der Bulbus

[†] Dulbecco's Modified Eagle Medium, mit 4500 mg/l Glukose, 200mM GlutaMAX-II, ohne Pyruvat, pH = 6,96

wurde innerhalb einer Stunde nach E nukleation mit einer gebogenen Hornhautschere eröffnet, und der Glaskörper wurde vorsichtig mit einem Wattetupfer entfernt. Retinaprobe n wurden in einem Gebiet von maximal 4 Papillendurchmesser Abstand von der Papille mit einem 7,5 mm Hornhauttrepan vom Bulbus getrennt. Im Zellmedium wurde die Probe vom Rand her mit einer Pinzette vorsichtig abgelöst und mit der Nervenfaserschicht nach unten auf einem Glasobjektträger aufgebracht, der als Boden der MiniCEM Zellkammer fungierte. Die Zellkammer wurde luftdicht verschlossen, um das Verdunsten des Zellmediums bzw. Austrocknen der Probe zu verhindern. Die Retina haftete in der Zellkammer auf einem 2 µm bis 5 µm dünnen Film des Zellmediums. Die Zellkammer wurde zur Bestrahlung über dem Objektiv platziert. Unmittelbar nach Abschluss der Probenbestrahlung wurde bei Proben, die zur weiteren histologischen Untersuchung bestimmt waren, die Fixierung durchgeführt. Hierbei wurde gekühlte (278 K) klinische Fixierlösung[‡] (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Homburg) durch eine Kanüle in die Zellkammer gegeben, und anschließend die Probe in einem Glascontainer der Weiterbehandlung zugeführt. Die Bestrahlungszeit jeder Probe überschritt nicht 10 min, die gesamte Prozedur von der Bulbuseröffnung bis zur Fixierung dauerte nicht länger als 20 min.

3.3 Laserscanningmikroskopie

Mit der Lichtmikroskopfunktion der Laserscanningmikroskope wurde die retinale Nervenfaserschicht (NFL) eingestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Bildgebung durch Laserscanningmikroskopie angewendet. Das Grundprinzip wurde bereits in **Kapitel 2.5** beschrieben. Ein square scan mit Registrierung der folgenden Reflektion, Transmission oder Autofluoreszenz diente der Bilderstellung. Es waren die Stellen der Probe von Interesse, die eine hohe Dichte an Nervenfaserbündeln aufwiesen.

[‡] Klinische Fixierlösung, mit 1 % Glutaraldehyd, 1 % Formaldehyd, 0,1 % Pikrinsäure

Nach Fokussierung der oberflächlichen Gewebeschicht ($z = 0 \mu\text{m}$) konnte die Gewebetiefe jeweils bestimmt werden. Der Abstand zwischen Objektiv und Probe wurde danach in Mikrometerschritten verringert, d.h. der Strahl wurde in tiefere Gewebeschichten fokussiert.

3.4 Reflektion, Transmission und Autofluoreszenz

Die detailreichste Information zur Morphologie lieferten *Reflektionsaufnahmen* (reflektiertes Licht aus der Fokusebene), verglichen mit *Transmissionsaufnahmen* (Transmission durch die gesamte Probe) und *Autofluoreszenzaufnahmen* (Fluoreszenz von Zellkomponenten nach Laserbestrahlung ohne Zugabe eines Farbstoffes). Mit dem Femtocut konnten in allen Proben die Komponenten der äußeren Retina abgebildet werden, insbesondere Nervenfaserschicht (NFL, **Abb. 5**), Ganglionzellschicht (GCL, **Abb. 6**) und innere plexiforme Schicht (IPL, **Abb. 7**) mit Leistungen unter 2 mW und Bildgenerierungszeiten von 1 s für ein $320 \times 320 \mu\text{m}$ Bild (Pixelzeit $1,95 \mu\text{s}$). Bildgenerierungszeiten von 32 s (Pixelzeit $62,4 \mu\text{s}$) lieferten zwar eine höhere Auflösung, aber keine zusätzliche morphologische Information. Als Kompromiss zwischen Auflösung und schneller Bilderstellung wurde die Bildgenerierungszeit von 8 s (Pixelzeit $15,6 \mu\text{s}$) in der Routine verwendet. Der Transmissionsmodus wurde nur zur Bildgebung kurzzeitiger Effekte (s.u.) verwendet, weil dieser Modus, wie ein konventionelles Lichtmikroskop, eine Überlagerung aller Probenschichten darstellte. Entsprechend dem Vorgehen beim Femtocut wurde, mit Ausnahme der Transmission, die Bildgebung auch mit dem LSM 510 durchgeführt. Die Eigenschaften der Bildgebung entsprachen denen des Femtocut.

3.5 Festlegung des Gewebeabtrags und anschließende Bildgebung

In einem *line scan* wurde der Laserstrahl auf einer Linie über die Fokusebene geführt. Steuerbare Variablen waren die Länge der Linie, die Leistung des Laserstrahls, und die Bestrahlungszeit. Wenn nicht anders erwähnt, betrug die Länge der Linie 320 μm beim Femtocut und 230 μm beim LSM 510. Nachdem ein entsprechendes Gewebeareal dargestellt worden war, konnte eine Linie mit dem Computermodul festgelegt werden. Auf dieser Linie wurde der Laserstrahl „geparkt“, und die Leistung wurde angehoben. Oberhalb eines gewissen Leistungsniveaus, das oberhalb der Leistung für die Bildgebung lag, stellten sich Gewebeveränderungen ein, die anschließend laserscanningmikroskopisch mit dem *square scan* abgebildet werden konnten. Die manuelle Umstellung der Konfiguration für line scans und square scans am Femtocut nahm mindestens 4 s in Anspruch. Aus diesem Grund konnte das erste Bild 4 s nach einem vorausgegangenen line scan erstellt werden. Die Bildgenerierungszeit betrug dann mindestens 1 s.

3.6 Berechnung von Distanzen und Volumina

Alle Bilder des Femtocut wurden neben der Software des Steuerungsmoduls auch mit einem kommerziellen Grafikprogramm (Microsoft Paint) analysiert, das mit der gleichen räumlichen Auflösung das Bild wiedergab, wie es vom LSM erstellt wurde. Auf Ebene einzelner Pixel war bei bekannter Auflösung die Umrechnung in μm möglich. Die Methode wurde zur Berechnung von Blasenvolumina und Läsionsbreiten verwendet.

Zur Berechnung von Blasenvolumina wurden Transmissionsbilder, zur Berechnung von Läsionsbreiten wurden Reflektionsbilder erstellt. Um eine objektive Beurteilung zu erlauben, wurde die Analyse der Läsionen auf dem Bild nur in drei Sektoren von 30 μm Breite (48 Pixel) durchgeführt, die

gleichmäßig über das Bild verteilt waren und 28 % des Gesamtbildes bedeckten (**Abb. 8**). Die Sektoren verliefen senkrecht zu den Läsionen. In jedem Sektor wurde pro Läsion eine Position ausgemessen. Nur Läsionen in der NFL, die länger als 250 μm waren, wurden untersucht, wenn sie alle drei Sektoren passierten und eindeutig sich als Läsion gegenüber dem Gewebe abzeichneten. Die Sektoren wurden festen Messpositionen vorgezogen: Sie hatten den Vorteil, eine eindeutig ausmessbare Stelle zu finden. Da die Läsionen auch überbelichtete Lumineszenzen aufwiesen, die die Beurteilbarkeit einschränkten, hätte das Ausmessen vorher festgelegter Positionen dazu geführt, dass viele Läsionsbreiten nicht hätten ausgemessen werden können, wenn gerade eine Lumineszenz auf der Messposition gelegen hätte.

Die Variablen wurden als Mittelwert (\pm Standardabweichung) bestimmt. Für die statistischen Berechnungen wurde ein Computerprogramm verwendet (Microsoft Excel).

3.7 Histologie und Elektronenmikroskopie

Um Läsionen von line scans in einer folgenden histologischen und elektronenmikroskopischen Aufarbeitung sicher wiederzufinden, wurden am Rand der Probe große Markierungsläsionen mit dem Laser aufgebracht. Außerdem wurde zur Kontrolle eine Probe ohne line scans untersucht. Eine weitere Probe wurde vor der Bestrahlung getrocknet. Die Zellkammer blieb für zehn Minuten geöffnet, damit das Wasser verdunstete. Histologie und Elektronenmikroskopie wurden am Zentrum für Elektronenmikroskopie, Fachrichtung Anatomie, Universitätsklinikum des Saarlandes, durchgeführt.

Die fixierten Proben wurden in Epon für Semidünnschnitte (1 μm) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Richardsonblau angefärbt und mit einem Lichtmikroskop beurteilt. Für die

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnten von den gleichen Proben Ultradünnschnitte (70 nm) auf Kupfergrids gesammelt und bleikontrastiert werden. Diese wurden mit einem FEI Tecnai G2 12 Biotwin (FEI, Hillsboro, OR, USA) unter 100 kV Kathodenspannung untersucht und fotografiert.

Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden in 5 % Glutaraldehydpuffer nachfixiert, mit Osmiumtetroxid angefärbt, dehydriert, kritischer-Punkt-getrocknet und mit Platinsputtern beschichtet. Die Proben wurden mit einem FEI Tecnai XL30 ESEM FEG (FEI, Hillsboro, OR, USA) untersucht und fotografiert.

3.8 Untersuchung des Schwellenwerts für Lumineszenzen als Zeichen eines retinalen Schadens

In Vorversuchen des Autors konnten Gewebeveränderungen festgestellt werden, als die Proben mit einer Leistung bestrahlt wurden, die über dem Leistungsniveau der Bildgebung lag. Nach line scans, deren Leistung unterhalb der für den Gewebeabtrag lagen, aber oberhalb der für die Bildgebung, wurden im Autofluoreszenzmodus Lumineszenzen aufgezeichnet. Andere Untersuchungen [KÖNIG et al. 1996; KÖNIG 2003] beschreiben ein Auftreten von Lumineszenzen im Zusammenhang mit retinaler Schädigung. Daher wurde dieser Effekt mit dem LSM 510 verfolgt. Die Leistung für die Bildgebung betrug 2 mW. Die Proben wurden mit line scans (1 s, 230 µm) in einer Tiefe von 10 µm mit unterschiedlichen Leistungen bestrahlt.

Die Applikation der line scans begann auf einem Leistungsniveau, auf dem (nach Vorversuchen) die retinale Schädigung als sicher galt. Die Leistung wurde dann mit jeder Probe schrittweise verringert. Nach jedem line scan wurde mit einer Aufnahme im Autofluoreszenzmodus das Auftreten oder Fehlen von Lumineszenzen registriert (**Abb. 9**). Die Begriff „effektive

Leistung 50“ (EL50) wurde definiert als Leistung, bei der mindestens 50 % der line scans nachfolgend eine Lumineszenz zeigten.

4 Ergebnisse

4.1 Bildgebung in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht

In stufenlos jeder Tiefe bis $z = 80 \mu\text{m}$ konnte das untersuchte Gewebe abgebildet werden (optische Tomographie). Dies umfasste bei der Schweineretina NFL, GCL und IPL (**Abb. 5, 6 und 7**). Abbildungen der NFL zeigten helle Reflektionen von Nervenfaserbündeln mit einer Breite von $10 \mu\text{m}$ bis $40 \mu\text{m}$, die sich in ihrer Länge über den gesamten Bildausschnitt erstreckten. Diese wiesen in ihrem longitudinalen Verlauf Partitionen mit geringerer Reflektion auf, welche die feineren Unterteilungen der Faserbündel anzeigten. Zwischen den Faserbündeln, wo die Müllerzellfortsätze zu erwarten wären, indizierte ein sehr geringes Reflektionssignal die Abwesenheit von Gewebe (**Abb. 5**). Demgegenüber lag in den Autofluoreszenzaufnahmen zwischen den Nervenfaserbündeln die Zone höherer Fluoreszenz, die das Vorliegen von Gewebe dagegen anzeigte (**Abb. 10**). Die Räume zwischen den Bündeln enthielten auch Areale ohne Fluoreszenz. Die Nervenfaserbündel selbst emittierten geringe Fluoreszenz, verglichen mit dazwischen liegenden Räumen. Sowohl im Reflektions- als auch im Autofluoreszenzmodus war eine klare Abgrenzung der Nervenfaserbündel möglich. In allen Abbildungsmodi lag die zur Bildgebung erforderliche Leistung bei höchstens 2 mW.

4.2 Retinaler Gewebeabtrag mit fs-Pulsen

4.2.1 Laserscanning-Bildgebung nach Gewebeabtrag

Im *Transmissionsmodus* wurden temporäre Effekte dokumentiert. Die Transmissionsbilder zeigten 5 s nach einem line scan runde, vollständige Signalauslöschungen von unterschiedlicher Größe. Diese Signalauslöschungen zeigten Blasen an, die aus einem Medium

bestanden, dessen Dichte wesentlich geringer war, als die des Gewebes, also ein Gas(gemisch), an dessen Grenzlinie der Laserstrahl reflektiert wurde. Die Mittelpunkte dieser Blasen waren auf der gescannten Linie aufgereiht (**Abb. 11**). In drei Versuchen wurde die Blasenbildung auch mit der Kamera aufgezeichnet (**Abb. 12**). Dabei wurden Schockwellen sichtbar, die sich von den Blasen ausbreiteten. Diese Effekte wurden als kurzzeitig bezeichnet. Während der Blasendurchmesser abnahm, wurden im Gebiet der vorherigen Blasenausdehnung weitere Gewebeveränderungen sichtbar, nämlich Verdichtungen und Kavitationen (**Abb. 13**). Verdichtungen lagen halbmondförmig am Rand der Kavitationen und hatten Anschluss sowohl an unverändert erscheinendes Gewebe als auch an die Kavitationen. Die Kavitationen hatten größere Ausmaße als die Verdichtungen. Diese Effekte zeigten bei längerer Beobachtung (5 min) keine weitere Veränderung und ließen sich auch während der histologischen Aufarbeitung noch zuordnen. Sie wurden als bleibende Effekte bezeichnet.

Im Vergleich zu einem Bild, das vor der Applikation von line scans erstellt wurde, zeigten die *Reflektionsaufnahmen* nach line scans (5 s bis 5 min) linienförmige Veränderungen im Gewebe (Läsionen) entlang der gescannten Linien, welche als dunkle Streifen stark reduziert reflektierten (**Abb. 14**). Diese Läsionen selbst waren nur innerhalb der Nervenfaserbündel sichtbar. Sie waren von punktförmigen Lumineszenzen durchsetzt. Diese erschienen über den Verlauf der line scans gleichmäßig verteilt, auch außerhalb der Faserbündel. Gewebe, das unmittelbar an die Läsionen angrenzte, zeigte im Vergleich zu den Aufnahmen vor Durchführung der line scans keine Änderung der Signalintensität. Die Abbildung des gleichen Gewebeausschnitts in Transmission und Reflektion zeigte im Vergleich, dass die Positionen der beschriebenen „Verdichtungen“ in der Transmissionsaufnahme mit denen der Lumineszenzen in der Reflektionsaufnahme übereinstimmten (**Abb. 15**). Analog zur Reflektion zeigte die *Autofluoreszenz* eine kontinuierliche

Signalreduktion entlang der gescannten Linie mit zusätzlichen Lumineszenzen (**Abb. 16**). Das angrenzende Gewebe erschien in seiner Autofluoreszenz nicht verändert. Eine Reduktion der elektronischen Bildverstärkung zeigte, dass die Lumineszenzen den „Verdichtungen“ am Rand von Kavitationen entsprachen. Die Überlagerung von Bildern mit verschiedenen Aufnahmetechniken zeigten, dass von den Kavitationen selbst keine Fluoreszenz oder Reflektion ausging.

4.2.2 Zeitliche Analyse des abnehmenden Blasendurchmessers und Analyse des Blasendurchmessers in Abhängigkeit von Bestrahlungszeit und Leistung

Um die Abnahme der Blasengröße zu studieren, wurden 3 Proben mit line scans für 2 s ($n = 2$) und 5 s ($n = 6$) bei konstanter Leistung ($P = 90$ mW; Vitesse) in konstanter Tiefe ($z = 20$ μm) bestrahlt. Transmissionsaufnahmen (Bildgenerierungszeit 1 s) wurden 5 s, 10 s, 15 s und 20 s nach dem line scan durchgeführt (**Abb. 17**). Für diese line scans wurden relativ lange Bestrahlungszeiten gewählt, um große Blasen zu produzieren, die möglichst lange zu beobachten blieben. Von 60 Blasen, die 5 s nach den 5 s dauernden line scans registriert wurden, verblieben 19 (31,7 %) auch nach 20 s. Von 31 Blasen, die 5 s nach den 2 s dauernden line scans registriert wurden, verblieben nach 20 s noch 1 (3,2 %; **Tab. 4**). Die Blasenvolumina 5 s line scans wurden berechnet und für jeden line scan summiert (**Tab. 5**). Die Blasen, die hierbei noch nach 20 s nicht kollabiert waren ($n = 19$), zeigten im Verlauf (5 s bis 20 s nach Bestrahlung) eine Volumenreduktion um 82 % (**Tab. 6, Abb. 18**). Eine Probe wurde mit line scans ($n = 4$) mit konstanter Leistung ($P = 85$ mW; Vitesse) und unterschiedlichen Bestrahlungszeiten bestrahlt (**Tab. 7, Abb. 19**). Nach 5 s wurden beim 0,5 s line scan keine Blasen gefunden, die übrigen line scans zeigten jeweils 6 bis 8 Blasen, deren Volumen mit der verlängerten Bestrahlungszeit zunahm. Die Verlängerung der Bestrahlung um den Faktor 4 verursachte ein 19fach erhöhtes

Blasendurchschnittsvolumen.

Eine weitere Probe wurde analog mit line scans ($n = 4$) mit konstanter Bestrahlungszeit ($t = 5$ s; Vitesse) und unterschiedlichen Leistungen behandelt (**Tab. 8, Abb. 20**).

4.2.3 Läsionsbreite in Abhängigkeit von Leistung und Zeit

In 6 Proben wurden 409 line scans analysiert. Von 1229 Messpunkten konnten 1029 beurteilt werden (83,7 %). 5 Proben (Chameleon: $n = 3$, Vitesse: $n = 2$) wurden mit line scans mit konstanter Bestrahlungszeit (Chameleon: 1 s, Vitesse: 2 s) und unterschiedlichen Leistungen bestrahlt. Höhere Leistungen führten zu breiteren Läsionen (Chameleon: **Tab. 9, Abb. 21**; Vitesse: **Tab. 10, Abb. 22**). Eine mittlere geringste Breite von $3,6 (\pm 0,9)$ μm wurde mit dem Chameleon erzielt. Eine Probe wurde mit line scans mit konstanter Leistung (195 mW, Chameleon), aber unterschiedlichen Bestrahlungszeiten bestrahlt (**Tab. 11, Abb. 23**). Eine mittlere geringste Läsionsbreite von $2,8 (\pm 0,4)$ μm wurde hier erreicht.

4.3 Histologie und Elektronenmikroskopie

Zur späteren feingeweblichen Untersuchung wurden mit dem Femtocut 7 Proben mit line scans (Leistung 80 mW und 130 mW, Vitesse) bestrahlt. Die Gewebetiefe der Fokussierung lag zwischen 10 μm und 30 μm für die Histologie und TEM, und bei 2 μm für die REM. Alle Läsionen wurden vor der Fixierung auch laserscanningmikroskopisch abgebildet. 6 Proben wurden der Histologie und TEM, eine Probe wurde der REM zugeführt.

In der Lichtmikroskopie zeigten linienförmige Läsionen die Gebiete an, auf denen die line scans angewendet worden waren (**Abb. 24**). Diese Läsionen zeigten drei morphologische Veränderungen:

1. *Kavitationen* (Hohlräume).
2. die Kavitationen voneinander abgrenzende Gewebeveränderungen („*Brücken*“) mit einem Inhalt, der transparenter und homogener erschien als umliegendes Gewebe.
3. optisch dichtere Ränder der Kavitationen (*Verdichtungen*), sehr schmale ($< 1 \mu\text{m}$), aber dichte Bänder, die sich vom umliegenden Gewebe abgrenzten.

Direkt angrenzendes Gewebe außerhalb des linienförmigen Verlaufs erschien frei von mechanischer und thermischer Schädigung, zeigte allerdings hypoxiebedingte Artefakte.

12 line scans wurden detailliert in der TEM mit Vergrößerungen von 4200 x bis 68000 x untersucht. Bei niedrigen Vergrößerungen entsprach das Bild weitgehend der Lichtmikroskopie mit Kavitationen, homogenen Gewebeveränderungen und randständigen Verdichtungen (**Abb. 25**). Die Verdichtungen hatten eine Breite von $0,1 \mu\text{m}$ bis $0,4 \mu\text{m}$. Wenn sie an intaktes Gewebe angrenzten (laterale Begrenzung der Läsion), waren die Verdichtungen schmäler als im Übergang auf andere Gewebeveränderungen (**Abb. 26**). Regelmäßig waren die Ränder durchlaufend, wurden daneben aber auch durch zelluläres Material unterbrochen, das in die Kavitationen einbrach (**Abb. 26**). Im Bereich breiter Müller-Zellfortsätze fanden sich bevorzugt Gewebebrücken statt Kavitationen. Die Gewebebrücken zeigten einen abrupten Übergang zu intaktem Gewebe (**Abb. 27**). In ihrem Inneren fanden sich selbst bei 68000 x Vergrößerung keine zellulären Strukturen, wie z.B. Organellen. Länge und Breite der Kavitationen überstiegen die der Gewebebrücken. Zeichen intakten Gewebes wie Synapsen (**Abb. 28**), Organellen und Membranen wurden bereits im Abstand von $1 \mu\text{m}$ zur Läsion gefunden. Die geringste Läsionsbreite wurde mit $3,5 \mu\text{m}$ an einer Gewebebrücke gemessen und die schmalste Kavitationsbreite betrug $5,0 \mu\text{m}$, jeweils nach einem 1 s line scan mit 90 mW Leistung (*Vitesse*).

14 line scans wurden detailliert in der REM mit Vergrößerungen von 270 x bis 10800 x untersucht. Hier wurden Kavitationen und Säulen aus denaturiertem Material beobachtet (Durchmesser 1 μm bis 4 μm), die mit den Kavitationen und Gewebebrücken der TEM-Aufnahmen korrespondierten (**Abb. 29**). Aufgrund der oberflächennahen ($z = 2 \mu\text{m}$) Fokussierung wurde die Läsion auch an der Probenoberfläche sichtbar. Die Stelle des Abtrags erschien dann als Vertiefung („Graben“). Zusätzlich wurden Aggregationen (faden- und kugelförmig) von denaturierten Proteinen abgebildet. Diese ragten auch über die Öffnung der Läsion hinaus. Die geringste gefundene Läsionsbreite betrug 2,4 μm (**Abb. 30**).

Weder in der TEM noch in der REM wurden zwischen einzelnen Läsionen bzw. Proben Unterschiede in der Abtragsmorphologie gefunden.

Zur Kontrolle, ob bereits Leistungen auf dem Leistungsniveau der Bildgebung zu morphologisch darstellbaren Schäden der Retina führten, wurde auch eine Probe der TEM zugeführt, die für 32 s mit 3,6 mW bestrahlt wurde (square scan, Pixelzeit 122 μs). Die Probe wurde 30 s nach Bestrahlung fixiert. Die TEM zeigte gut erhaltene Zellstrukturen in allen Gewebeschichten, insbesondere der NFL, und keine morphologischen Schäden.

4.4 Getrocknete Probe

Die Probe wurde mit 1 s line scans ($P = 80 \text{ mW}$; Chameleon) bestrahlt. In der Reflektion und Autofluoreszenzbildgebung (**Abb. 31**) wurden ununterbrochen lumineszierende, im Durchmesser konsistente Läsionen abgebildet. Die TEM dieser Probe zeigte einen kontinuierlichen, sägezahnförmigen Abtrag ohne randständige Verdichtungen oder andere Formationen. Es gab keine Übergangszone zu intaktem Gewebe. Axone waren stattdessen präzise „durchgeschnitten“ (**Abb. 32**). Die geringste

Läsionsbreite betrug 0,8 μm .

4.5 Untersuchung des Schwellenwerts für Lumineszenzen als Zeichen eines retinalen Schadens

Mit dem Chameleon Laser wurden 21 Proben aus 12 Augen untersucht (46 line scans), und mit dem Vitesse Laser 12 Proben aus 3 Augen (55 line scans). Die line scans des Chameleon wurden mit 21 unterschiedlich hohen Leistungen von 4 mW bis 76 mW durchgeführt (**Tab. 12, Abb. 33**), die des Vitesse mit 12 unterschiedlich hohen Leistungen von 7 mW bis 60 mW (**Tab. 13, Abb. 34**).

Die höchsten Leistungen, bei denen nach Bestrahlung keine Lumineszenz auftrat, betragen 38 mW (Pulsenergie 0,42 nJ, Energiedichte 231 mJ/cm^2 ; Chameleon) bzw. 29 mW (Pulsenergie 0,38 nJ, Energiedichte 189 mJ/cm^2 ; Vitesse). Die niedrigsten Leistungen, bei denen nach Bestrahlung eine Lumineszenz auftrat, betragen 21 mW (Pulsenergie 0,23 nJ, Energiedichte 116 mJ/cm^2 ; Chameleon) und 12 mW (Pulsenergie 0,16 nJ, Energiedichte 78 mJ/cm^2 ; Vitesse). Die gefundenen EL50 betragen 25 mW (Pulsenergie 0,28 nJ, Energiedichte 138 mJ/cm^2 ; Chameleon) und 19 mW (Pulsenergie 0,25 nJ, Energiedichte 124 mJ/cm^2 ; Vitesse).

5 Diskussion

5.1 Bildgebung in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht

Die optische Tomographie durch Laserscanningmikroskopie ermöglichte, morphologische Veränderungen der inneren Retina zu erkennen, ohne Biopsien zu entnehmen oder auf eine andere Art Netzhautgewebe zu schädigen. Eine Fokussierung der Übergangszone zum Glaskörper wäre durch den Arbeitsabstand des Objektivs ebenfalls möglich; mit diesem Mittel ist also auch die Darstellung epiretinaler Membranen plausibel. Nach dem gleichen Prinzip könnten auch pathologische Veränderungen im Bereich der NFL, z.B. Tumoren oder die Rarefizierung von Nervenfasern beobachtet werden. Durch die hohe Auflösung des Mikroskops ist die Darstellung von retinalen benignen und malignen Erkrankungen ein potentielles Anwendungsgebiet, analog zur bereits in vivo angewendeten MLSM-Untersuchung von Hauttumoren [KÖNIG et al. 2003; LIN et al. 2007]. Die Auflösung von 0,625 μm liegt dabei noch unter der HR-OCT [CUCU et al. 2006] mit einer minimalen Auflösung über 3 μm . Mit dem vorliegenden System ist allerdings der klinische Nutzen eingeschränkt: Durch den extrem geringen Arbeitsabstand, den das Objektiv zur Probe halten muss, könnte bei dem vorliegenden Versuchsaufbau ein offener Zugang durchs Auge nicht vermieden werden, um das Objektiv vor der Netzhaut zu positionieren. Am Prinzip kann dennoch festgehalten werden, wenn in absehbarer Zeit dünnkalibrige flexible Fasern kommerziell erwerblich sein dürften, die durch kleine Skleraöffnungen (Sklerotomien), ähnlich einer konventionellen Vitrektomie, ins Auge eingeführt würden. Die Platzierung von fs-Laserpulsen mit Hilfe einer flexiblen Faser wurde experimentell bereits durchgeführt [KÖNIG et al. 2007]. Bei Verwendung einer flexiblen Faser bliebe der optische Apparat bis auf die Faser außerhalb des Auges, und nur diese müsste das Auge penetrieren, um zur Retina zu gelangen. Zwar würde das den

operativen Zugang zur Retina nicht vermeiden, aber auf relativ kleine Zugangswege beschränken. Solche Zugangswege dürften denjenigen entsprechen, die bereits heute bei der konventionellen Pars-plana-Vitrektomie gewählt werden.

König et al. fanden, dass Bestrahlungsleistungen über 6 mW die Klonierungsrate von Säugetierzellen bereits verringern, und noch höhere Leistungen zur Zellzerstörung führen können [KÖNIG et al. 1997]. Neben der Zellreproduktion wird häufig der zelluläre Ca^{2+} -Haushalt für die Schadensanalyse herangezogen. Dabei wird die unschädliche Obergrenze der Bildgebung bei 2,5 mW - 10 mW diskutiert [TAN et al. 1999; HOPT et al. 2001]. Bei der für diese Arbeit ausgeführten Probenbestrahlung mit 3,6 mW wurden keine strukturellen Veränderungen in der Elektronenmikroskopie erkannt. Da in der vorliegenden Studie die überwiegende Bestrahlungsleistung zur Bildgebung bei 2 mW lag, ist anzunehmen, dass die hier angewendete Bildgebung in ihrer Leistung ebenfalls als „sicher“ zu beurteilen war.

Der Transmissionsmodus hatte seinen experimentellen Zweck in der guten Abgrenzung der Gasblasen, durch die Überlagerung aller Probenschichten erfüllte er aber nicht die Anforderungen an die optische Tomographie. Für die Autofluoreszenz blieb der Nutzen in dieser Studie zwar auf die Detektion der Zellschädigung (Lumineszenzen) beschränkt. Allerdings liegt in ihr weiter der Vorteil der funktionellen in vivo-Bildgebung, die die Verteilung von Fluorophoren anzeigt. Funktionelle Veränderungen gehen morphologischen in den meisten pathologischen Prozessen voraus. Eine pathologisch veränderte Stoffwechselaktivität einer Gewebeschicht könnte somit anhand der Verteilung von Fluophoren zur Diagnostik retinaler Erkrankungen (sog. mapping) angewendet werden [SCHWEITZER et al. 2007].

Die Anwendung der MLSM in der Retina in vitro wurde kürzlich

beschrieben [WANG et al. 2006]. Die besondere Bedeutung der hier vorliegenden Arbeit jedoch liegt in der Kombination von Bildgebung und Laserabtrag mit identischen Lasersystemen. Dies wurde bereits für die Cornea gezeigt [KÖNIG 2003]. Es lag bisher aber keine Beschreibung eines analogen Vorgehens an der Retina vor.

5.2 Retinaler Gewebeabtrag mit fs-Pulsen

Die Laserscanningmikroskopie machte es möglich, innerhalb von Sekunden vor und nach dem Gewebeabtrag Abbildungen des betroffenen Areals zu erstellen. Diese direkte, extrem zeitnahe Kontrolle war ein Vorteil gegenüber anderen jüngeren Studien, bei denen nach Applikation der Laserpulse nur die histologische Nachuntersuchung zur Gewebebeurteilung blieb [HOERAUF et al. 2003; YU et al. 2006]. Noch wichtiger ist die mikroskopische Voruntersuchung und Zielauswahl als Voraussetzung für den zielgerichteten mikroskopischen Abtrag in vivo.

Die Fluoreszenzmikroskopie kann alleine Photobleaching nicht von Gewebeabtrag unterscheiden, weil in beiden Fällen keine Fluoreszenz mehr erfolgt [HEISTERKAMP et al. 2005]. Zur Kontrolle wäre eine Histologie notwendig, die auf lebendes Gewebe nicht angewendet werden kann. Gerade mit Blick auf die klinische Anwendung stellt die Laserscanningmikroskopie eine Alternative dar: In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Reflektion der Proben gemessen, die die tatsächliche Anwesenheit von Gewebe voraussetzt und somit mit Aufnahmen vor und nach dem Gewebeabtrag diesen verifizieren kann. Der linienförmige Gewebeabtrag nach line scans zeigte eine entsprechende Fluoreszenzreduktion, aber auch zusätzliche Lumineszenzen. Der Vergleich von verschiedenen Abbildungsmodi der Laserscanningmikroskopie und Elektronenmikroskopie zeigte außerdem, dass die Lumineszenzen vom Rand der Kavitationen stammten. Sie konnten damit eine Gewebeläsion anzeigen und ließen den Verlauf von

line scans erkennen. Diese Lumineszenzen waren nicht mit Plasmalumineszenzen gleichzusetzen, die bei der Plasmabildung beim optischen Durchbruch für die Dauer von Nanosekunden auftreten [FUJIMOTO et al. 1985].

Das morphologische Korrelat der Lumineszenzen waren die Verdichtungen am Rande der Kavitationen. Es ist anzunehmen, dass sich Materie aus einem Plasma nach dessen Abkühlung wieder organisierte [VOGEL 2003]. Dies ist zwar eine plausible Erklärung für die Entstehung der Gewebebrücken, in denen keine zelluläre Struktur mehr nachweisbar war, aber nicht für die starke Gewebeverdichtung, die in der Elektronenmikroskopie als elektronendicht imponierte. Zunächst ist eine mechanische Kompression des Gewebes durch expandierendes Gas anzunehmen [LOESEL et al. 1998]. Die Filmaufnahmen während der Bestrahlung und die Transmissionsaufnahmen danach dokumentierten die Blasenentstehung und ihre Verkleinerung. Die Transmissionsaufnahmen lassen annehmen, dass die Verdichtungen als Abformungen bei der Abnahme des Blasendurchmessers stehen blieben. Wie analog in der Anwendung von fs-Pulsen in der Hornhaut nachgewiesen wurde [LUBATSCHOWSKI et al. 2000], ist die Ursache ein thermischer Schaden durch das heiße Gas bzw. Plasma [SCHAFFER et al. 2002]. Dies erklärt auch das Auftreten der Proteindenaturierung an Läsionsrändern, die mit der REM nachgewiesen wurde.

Nicht die finale Läsionsbreite, sondern die maximale Ausbreitung der Kaviationsblasen stellte die größte Belastung des Gewebes dar. Da die Bildgebung erst 5 s nach Ende des line scans möglich war, müssen die maximalen Volumina initial noch höher sein. Das Gasvolumen nahm in den danach folgenden 5 s um 25 % bis 50 % ab. Es gab keinen morphologisch erkennbaren Schaden außerhalb der final bestehenden Kavitation. Demnach hatte der zunächst initial größere Blasendurchmesser wahrscheinlich nur wenig Einfluss auf das umliegende

Gewebe. Die vorliegenden Ergebnisse lassen eine positive Korrelation zwischen Bestrahlungsleistung, Bestrahlungszeit, Blasengröße und Läsionsbreite erkennen. Dies entspricht erwartungsgemäß anderen jüngeren Studien mit fs-Lasern am Auge [KRUEGER et al. 2005; GERTEN et al. 2007]. Unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen gab es jedoch zwischen einzelnen Proben große Unterschiede in der Blasengröße (**Tabelle 5**) und Läsionsbreite (**Tabelle 9**). Da sich die Arbeit, über die hier berichtet wird, auch als Pilotstudie verstand, waren die Probenzahlen der einzelnen Versuche klein. Damit konnten hier keine statistisch signifikanten Aussagen getroffen werden. Festzuhalten bleibt dennoch, dass die Präzision der verwendeten Systeme im Vergleich mit anderen aktuellen Studien (fs-Laser, Er:YAG-Laser) zum Netzhautabtrag hoch war [HOERAUF et al. 2006; YU et al. 2006] und die zum Abtrag notwendige Pulsenergie von 1 nJ relativ gering [HEISTERKAMP et al. 2005]. Der direkte Vergleich bleibt schwierig, da bisher keine weiteren Studien über den retinalen Abtrag mit unverstärkten fs-Lasern nach dem hier vorgestellten Prinzip in den einschlägigen Medien veröffentlicht wurden.

5.3 Histologie und Elektronenmikroskopie

Der Vergleich von Histologie und Elektronenmikroskopie mit der MLSM zeigte, dass die Effekte der Laserbestrahlung, wie Gewebebrücken, Verdichtungen und Kavitationen, im Gewebe prinzipiell mit der MLSM darstellbar waren. Kein zusätzlicher Effekt der Bestrahlung wurde in der Histologie nachgewiesen, der nicht auch in der MLSM abgebildet worden war. Histologie und Elektronenmikroskopie hatten gegenüber der MLSM den Nachteil, dass die Probe fixiert und geschnitten und damit abgetötet bzw. einem Organ (z.B. dem Auge) entnommen werden musste. Bei Größenangaben in der REM ist die Gewebeschrumpfung von ca. 25 % einzukalkulieren [GUSNARD et al. 1977].

Für die vorliegende Arbeit wurde die Histologie/Elektronenmikroskopie

durchgeführt, um die Ausmaße der Gewebeschädigung zu ermitteln. Die hypoxiebedingten Artefakte ließen sich durch die Art des Gewebemodells (in vitro mit Zeitverlust beim Probentransport) nicht gänzlich vermeiden.

Jenseits der Gewebebrücken und Kavitationen, die durch den line scan bedingt waren, wurde mit den eingesetzten Methoden kein weiterer Gewebeschaden ermittelt. Während in anderen Geweben ein line scan einen kontinuierlichen Abtrag verursacht, also einen durchgehenden „Schnitt“ [KÖNIG 2003], hatten die hier bestrahlten Proben Unterbrechungen durch Gewebebrücken. Eine derartige Konfiguration wurde auch für Hornhaut beschrieben [SEITZ et al. 2005]. Sofern der line scan zum Abtrag von pathologischem Gewebe dienen sollte, kann in gewisser Hinsicht dennoch von durchgehenden Läsionen gesprochen werden, weil die Gewebebrücken immer avitales Gewebe darstellten.

5.4 Getrocknete Probe

Vergleicht man die Ergebnisse der getrockneten Probe mit denen der Proben in Flüssigkeit, die mit den gleichen Parametern bestrahlt wurden, zeigen sich in der trockenen Probe eine bemerkenswerte Verringerung der Läsionsbreite und ein kontinuierlicher Gewebeabtrag, selbst bei einer gegenüber unfixierten und ungetrockneten Proben „niedrigen“ Leistung. In manchen Studien mit fs-Lasern wurden fixierte oder getrocknete Proben (Chromosomen, Endothelzellen) [KÖNIG et al. 2001; HEISTERKAMP et al. 2005] verwendet. Der Vergleich zwischen der getrockneten und den ungetrockneten Proben zeigt, dass Angaben von Läsionsgrößen und -charakteristiken unter Vorbehalt betrachtet werden sollten. Da okuläre Medien überwiegend Wasser enthalten, ist das Photodisruptionsverhalten ähnlich wie bei reinem Wasser [VOGEL et al. 2003]. Die Gewebereaktion ist durch das schnelle Verdampfen von Wasser mitbestimmt. Der Wasserverlust einer Probe durch Fixierung oder Trocknung verändert das Abtragsverhalten daher erheblich.

5.5 Schwellenwert für Lumineszenzen

Konventionelle Studien über retinale Schäden und ihre Schwellenwerte basieren auf ophthalmoskopischen oder histologischen Untersuchungen. Mikroskopisch kleine Läsionen werden dabei übersehen [CAIN et al. 1999; LUND et al. 2006; YU et al. 2006]. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten MLSM war die Erkennung mikroskopischer Schäden möglich. Der histologische/elektronenmikroskopische Beweis einer Photodisruption wurde für Bestrahlungen unter 80 mW (Vitesse) Leistung (Pulsenergie 1 nJ) nicht erbracht. Dies entspricht dem vierfachen des mit dem Vitesse ermittelten EL50-Werts von 19 mW. Bestrahlungsleistungen zwischen 10 mW und 20 mW erfüllen mit Leistungsdichten von 10^{11} W/cm² bereits die Bedingung für den optischen Durchbruch und die Photodisruption [KÖNIG 2000]. Die für die Lumineszenzen verantwortlich gemachten thermischen Schäden traten zusätzlich bei der Photodisruption auf und konnten zur Schadensdetektion genutzt werden. Elastische Kräfte des umgebenden Gewebes mögen eine Läsion wieder verschlossen haben, bevor sie mit MLSM aufgenommen werden konnte.

Fs-Laser sind in der Wissenschaft weit verbreitet. Gerade bei der Fluoreszenzmikroskopie und bei der Justierung des Strahlbaus wird mitunter auf Schutzbrillen verzichtet. Über entsprechende Unfälle wurde berichtet [HUANG et al. 2003; COOPER et al. 2004]. In der klinischen Anwendung ist ein Fall von Netzhautblutung nach einer femto-LASIK-Operation bekannt geworden [PRINCIPE et al. 2004]. Kenntnisse aus Schwellenwertexperimenten sind daher sehr wichtig für die Bewahrung der Anwender- und Patientensicherheit. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass bei fs-Lasern bereits extrem kurze Bestrahlungszeiten (s pro Scan, ms pro Pixel) bei niedrigen Leistungen unbeabsichtigt zu Netzhautschäden führen können. Es ist schwierig, diese Ergebnisse mit denen anderer Autoren zu vergleichen. Zum einen variieren Pulsenergie (nJ - µJ - mJ) und Anzahl der applizierten Pulse.

Zum anderen besteht das Modell für Schwellenwertexperimente gewöhnlich darin, die Netzhaut eines Tieres in vivo zu bestrahlen [ROACH et al. 1994; THOMAS et al. 2002; CAIN et al. 2005]. Dabei wird der Laserstrahl nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, direkt auf die Netzhaut gerichtet, sondern passiert verschiedene optische Medien (z.B. Hornhaut und Linse).

5.6 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit behandelt ein in vitro-Modell für intraretinalen Gewebeabtrag mit NIR fs-Pulsen. In μm -Dimensionen wurden schnittartige Läsionen innerhalb der retinalen Nervenfaserschicht erzeugt, ohne Gewebe an der Netzhautoberfläche zu beschädigen. Die Auswahl des Abtragareals und die sofortige Kontrolle eines erfolgreichen Abtrags wurde in einem zerstörungsfreien Bildgebungsverfahren durchgeführt. Schwellenwerte für eine retinale Schädigung durch fs-Pulse wurden ermittelt. Sowohl für Bildgebung als auch Gewebeabtrag wurden die gleichen optischen Systeme verwendet. Proben wurden histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Methode ist, verglichen mit früheren Lasern und mechanischen Anwendungen, in der Präzision von Gewebeabtrag und Bildauflösung überlegen. Das verwendete Modell ist durch die Verwendung isolierter Proben und der Anwendung des Laserstrahls unmittelbar am Gewebe zwar eine starke Vereinfachung gegenüber dem komplexen System Auge. Es dürfte aber von Nutzen sein bei der Entwicklung eines Lasersystems für fs-Laser, das auch im lebenden Auge die Laserpulse direkt in die Netzhaut fokussieren kann. Hierzu sind weitere Studien am in vivo-Modell erforderlich.

Zum ersten Mal überhaupt in der Retina ist es mit der vorliegenden Arbeit gelungen, ein Lasersystem mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung experimentell zur kombinierten Bildgebung und Gewebeabtragung anzuwenden. Damit stellt es einen wichtigen Schritt in die Zukunft der ophthalmochirurgischen Diagnostik und Therapie dar.

6 Tabellen

Tabelle 1

Technische Eigenschaften der Laserquellen.

	Chameleon	Vitesse
Pumpquelle	Nd:YVO ₄	Nd:YVO ₄
Oszillator	Titan:Saphir	Titan:Saphir
Ausgangsleistung	1 W	0,8 W
Pulswiederholungsrate	90 MHz	80 MHz
Wellenlänge	720-950 nm (durchstimmbar)	800 nm (stationär)
Pulslänge am Ausgang	< 140 fs	< 100 fs
Pulslänge mit 40x Objektiv	186 fs	160 fs
Polarisation	horizontal	horizontal
Strahldurchmesser	1,2 mm	1,25 mm
Strahlkonfiguration	TEM ₀₀ [†]	TEM ₀₀

Tabelle 2

Bestrahlungsparameter des Laserscanningmikroskops (gekoppelt an den Chameleon Laser), unter verschiedenen Leistungsniveaus.

Leistung	1 mW	4 mW	80 mW	150 mW	1 W
Pulsenergie	0,011 nJ	0,044 nJ	0,88 nJ	1,7 nJ	11 nJ
Energiedichte	5,5 mJ/cm ²	22 mJ/cm ²	440 mJ/cm ²	825 mJ/cm ²	5,5 J/cm ²
Intensität	56 GW/cm ²	224 GW/cm ²	4,5 TW/cm ²	8,4 TW/cm ²	56 TW/cm ²

[†] TEM₀₀: Die Strahlungsintensität nimmt vom Zentrum zur Peripherie des Laserstrahls im Sinne der Gaußschen Verteilung ab.

Tabelle 3

Bestrahlungsparameter des Laserscanningmikroskops (gekoppelt an den Vitesse Laser), unter verschiedenen Leistungsniveaus.

Leistung	1 mW	4 mW	20 mW	80 mW	200 mW
Pulsenergie	0,013 nJ	0,05 nJ	0,25 nJ	1 nJ	2,5 nJ
Energiedichte	6,5 mJ/cm ²	26 mJ/cm ²	130 mJ/cm ²	520 mJ/cm ²	1,3 J/cm ²
Intensität	62,5 GW/cm ²	250 GW/cm ²	1,25 TW/cm ²	5 TW/cm ²	12,5 TW/cm ²

Tabelle 4

Untersuchung der Blasen im Transmissionsmodus.

a) 5 s line scans					
Sekunden nach Ende des line scan (s)		5	10	15	20
Scan Nr.					
	1	12	12	9	4
	2	9	9	9	9
	3	7	3	1	0
	4	13	6	3	2
	5	9	9	5	3
	6	10	6	2	1
Summe		60	45	29	19
b) 2 s line scans					
Sekunden nach Ende des line scan (s)		5	10	15	20
Scan Nr.					
	1	18	13	3	0
	2	13	7	1	1
Summe		31	20	4	1

Anzahl der Blasen pro line scan nach line scans mit 90 mW Leistung und 5 s bzw. 2 s Bestrahlungszeit (s.a Kapitel 4.2.2).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Transmission

Bildgenerierungszeit: 1 s

Leistung: 0,8 mW

z: 15 µm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 5Abnahme des Blasenvolumens (μm^3) nach line scan (Fortsetzung auf nächster Seite).

Sekunden nach Ende des line scan (s)			5	10	15	20
Blase Nr.	Scan Nr.					
1	1		10163	7583	5024	2247
2	1		628	128	0	0
3	1		1023	221	3	0
4	1		170	1	0	0
5	1		1361	281	65	0
6	1		2247	1361	221	0
7	1		3451	1555	431	128
8	1		3118	1361	746	128
9	1		6475	4189	2247	1184
Gesamtvolumen/ line scan 1			28636	16880	8737	3687
10	2		3808	2516	1184	431
11	2		2247	1361	628	221
12	2		1997	1023	351	44
13	2		3451	2516	1361	524
14	2		1184	1023	281	44
15	2		44	0	0	0
16	2		2247	1361	628	221
17	2		1361	1023	1023	281
18	2		2516	1555	524	44
19	2		3118	1361	877	281
Gesamtvolumen/ line scan 2			21973	13739	6857	2091
20	3		877	0	0	0
21	3		746	128	0	0
22	3		1023	431	0	0
23	3		2516	1023	65	0
24	3		8	0	0	0
25	3		44	0	0	0
26	3		524	0	0	0
Gesamtvolumen/ line scan 3			5738	1582	65	0
27	4		16	0	0	0
28	4		877	281	0	0
29	4		3118	1767	877	65
30	4		3118	1767	746	128
31	4		16	0	0	0
32	4		351	28	0	0
33	4		3	0	0	0
34	4		93	0	0	0
35	4		93	0	0	0
36	4		221	0	0	0
37	4		746	128	0	0
38	4		1184	628	0	0
Gesamtvolumen/ line scan 4			9836	4599	1623	193
39	5		93	0	0	0
40	5		3808	3118	1997	628

Sekunden nach Ende des line scan (s)		5	10	15	20
Blase Nr.	Scan Nr.				
41	5	44	8	0	0
42	5	1	0	0	0
43	5	431	65	0	0
44	5	5964	5024	3808	1997
45	5	524	221	16	0
46	5	1184	431	128	0
47	5	8810	8181	6475	4189
48	5	351	65	0	0
Gesamtvolumen/ line scan 5		21210	17113	12424	1361
49	6	7014	4594	2806	1361
50	6	1767	746	0	0
51	6	93	0	0	0
52	6	281	0	0	0
53	6	1767	524	0	0
54	6	281	0	0	0
55	6	746	65	0	0
56	6	524	0	0	0
57	6	1023	44	0	0
Gesamtvolumen/ line scan 6		13496	5973	2806	1361

In 6 line scans (5 s, 90 mW) wurde das Volumen jeder Blase nach 5 s, 10 s, 15 s und 20 s durch Ausmessen des Blasendurchmessers berechnet (s.a. Kapitel 4.2.2). Die Volumina der Blasen jedes line scans wurden summiert.

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Transmission

Bildgenerierungszeit: 1 s

Leistung: 0,8 mW

z: 15 μm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 6

Volumen (μm^3) der Blasen, die länger als 20 s bestanden.

Sekunden nach Ende des line scan (s)		5	10	15	20
Blase Nr.	Scan Nr.				
1	1	10163	7583	5024	2247
7	1	3451	1555	431	128
8	1	3118	1361	746	128
9	1	6475	4189	2247	1184
10	2	3808	2516	1184	431
11	2	2247	1361	628	221
12	2	1997	1023	351	44
13	2	3451	2516	1361	524
14	2	1184	1023	281	44
16	2	2247	1361	628	221
17	2	1361	1023	1023	281
18	2	2516	1555	524	44
19	2	3118	1361	877	281
29	4	3118	1767	877	65
30	4	3118	1767	746	128
40	5	3808	3118	1997	628
44	5	5964	5024	3808	1997
47	5	8810	8181	6475	4189
49	6	7014	4594	2806	1361
Minimum Volumen (μm^3)		1361	1023	281	44
Maximum Volumen (μm^3)		10163	8181	6475	4189
Mittelwert Volumen (μm^3)		4051	2783	1685	745
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}^3$)		2419	2117	1671	1038

Bei Blasen, die sich bei line scans (5 s, 90 mW) entwickelten, und die mindestens 20 s bestanden, wurde die Volumenreduktion beobachtet (s.a. Kapitel 4.2.2 und **Abb. 18**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Transmission

Bildgenerierungszeit: 1 s

Leistung: 0,8 mW

z: 15 μm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 7

Blasenvolumen nach line scans mit unterschiedlicher Bestrahlungszeit (Vitesse).

Bestrahlungszeit (s)	0,5	1	2	4
Volumen (μm^3)	0	624	1023	4577
		221	524	4189
		221	1184	9471
		281	2527	7014
		93	1767	8181
		357	2806	882
			1376	
			882	
Mittelwert Volumen (μm^3)	0	300	1511	5719
Summe Volumen (μm^3)	0	1797	12089	34314
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}^3$)	0	165	751	2854

Blasen wurden 5 s nach line scans mit unterschiedlicher Bestrahlungszeit und konstanter Leistung (85 mW) dargestellt (s.a. Kapitel 4.2.2 und **Abb. 19**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Transmission

Bildgenerierungszeit: 1 s

Leistung: 0,8 mW

z: 15 μm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 8

Blasenvolumen nach line scans mit unterschiedlicher Leistung (Vitesse).

Leistung (mW)	66	74	83	90
Blase Volumen (μm^3)	3479	882	2527	5500
	435	1563	16	221
	45	357	755	624
	1563	5500	435	624
	172	2268	2806	4577
	1023	755	131	3105
	435	524	3479	131
	221	624	3479	1376
	1767	2268	1988	1988
			1563	221
				1023
Mittelwert Volumen (μm^3)	1016	1638	1718	1768
Summe Volumen (μm^3)	9140	14741	17179	19390
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}^3$)	1048	1527	1270	1770

Blasen wurden 5 s nach line scans mit unterschiedlicher Leistung und konstanter Bestrahlungszeit (5 s) dargestellt (s.a. **Kapitel 4.2.2** und **Abb. 20**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Transmission

Bildgenerierungszeit: 1 s

Leistung: 0,8 mW

z: 15 μm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 9

Läsionsbreite nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Leistung (Chameleon).

Probe 1					
Leistung (mW)	220	260	300		
Messpunkte	27	30	30		
gültige Messpunkte	23	26	25		
mittlere Breite (μm)	3,6	4,1	5,5		
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	0,9	0,8	1,6		
Probe 2					
Leistung (mW)	220	240	260	300	
Messpunkte	33	36	33	33	
gültige Messpunkte	25	31	27	25	
mittlere Breite (μm)	5,8	6,1	6,5	6,8	
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	1,3	1,1	1	1,1	
Probe 3					
Leistung (mW)	200	240	290	315	350
Messpunkte	147	159	75	135	57
gültige Messpunkte	116	136	50	122	35
mittlere Breite (μm)	4,7	5,8	6	7	8,1
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	1,1	1,2	1,4	1,4	1,8

Erfassung der Läsionsbreiten nach line scans (Bestrahlungszeit 1 s). Die Leistung der line scans variierte wie angezeigt. Läsionsbreite nach 1 min. (s.a. Kapitel 4.2.3 und Abb. 21).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Reflektion

Bildgenerierungszeit: 8 s

Leistung: 1 mW

z: 15 μm

Laser: Chameleon (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 10

Läsionsbreite nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Leistung (Vitesse).

Probe 4					
Leistung (mW)	55	60	69	75	80
Messpunkte	21	24	30	27	27
gültige Messpunkte	19	24	26	26	27
mittlere Breite (μm)	4,1	4,3	4,8	5	5,2
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	0,9	0,8	1,3	1,4	0,9
Probe 5					
Leistung (mW)	65	77	85	93	
Messpunkte	24	33	108	21	
gültige Messpunkte	22	31	103	16	
mittlere Breite (μm)	5,2	5,5	5,7	5,9	
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	1	1,1	1,1	1,1	

Erfassung der Läsionsbreiten nach line scans (Bestrahlungszeit 1 s). Die Leistung der line scans variierte wie angezeigt. Läsionsbreite nach 1 min. (s.a. Kapitel 4.2.3 und **Abb. 22**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Reflektion

Bildgenerierungszeit: 8 s

Leistung: 1 mW

z: 15 μm

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 11

Läsionsbreite nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten (Chameleon).

Bestrahlungszeit (s)	0,5	2	4
Messpunkte	27	60	30
gültige Messpunkte	23	48	21
Mittelwert (μm)	2,8	4,5	6,4
Standardabweichung ($\pm \mu\text{m}$)	0,4	1	1,3

Erfassung der Läsionsbreiten nach line scans (Leistung 195 mW). Die Bestrahlungszeit variierte wie angezeigt. Läsionsbreite nach 1 min. (s.a. Kapitel 4.2.3 und **Abb. 23**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: Femtocut

Abbildungsmodus: Reflektion

Bildgenerierungszeit: 8 s

Leistung: 1 mW

z: 15 μm

Laser: Chameleon (Wellenlänge: 800 nm)

Tabelle 12

Schwellenwert für Lumineszenz (Chameleon).

Leistung (mW)	keine	Lumineszenz
76	0	4
60	0	3
50	0	2
41	0	1
40	0	2
38	1	0
33	0	1
32	1	2
31	0	2
30	0	4
29	0	2
28	0	2
27	1	3
26	1	3
25	2	2
23	1	0
22	0	1
21	0	1
20	2	0
14	1	0
4	1	0

Die Daten zeigen, ob eine Lumineszenz nach Bestrahlung (1 s) mit der gegebenen Leistung auftrat („Lumineszenz“) oder nicht („keine“). 21 Proben aus 12 Augen wurden untersucht. Einige Leistungsniveaus wurden mehr als einmal untersucht (s.a. Kapitel 4.5 und **Abb. 33**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: LSM 510

Abbildungsmodus: Autofluoreszenz

Bildgenerierungszeit: 32 s

Leistung: 2 mW

z: 10 μm

Laser: Chameleon (Wellenlänge: 760 nm)

Tabelle 13

Schwellenwert für Lumineszenz (Vitesse).

Leistung (mW)	keine	Lumineszenz
60	0	3
52	0	1
45	0	2
37	0	2
33	0	2
29	1	7
25	1	1
24	5	6
19	2	3
14	7	2
12	2	1
7	7	0

Die Daten zeigen, ob eine Lumineszenz nach Bestrahlung (1 s) mit der gegebenen Leistung auftrat („Lumineszenz“) oder nicht („keine“). 12 Proben aus 3 Augen wurden untersucht. Einige Leistungsniveaus wurden mehr als einmal untersucht (s.a. Kapitel 4.5 und **Abb. 34**).

Parameter der Bildgebung:

Mikroskop: LSM 510

Abbildungsmodus: Autofluoreszenz

Bildgenerierungszeit: 32 s

Leistung: 2 mW

z: 10 μ m

Laser: Vitesse (Wellenlänge: 800 nm)

7 Abbildungen

Anmerkung:

Allen mittels Laserscanningmikroskopie erstellten Abbildungen sind die Bildgebungsparameter zugewiesen. „Leistung“ beschreibt die Laserleistung zur Bildgebung, „z“ die Fokustiefe im Gewebe.

Abb. 1

Strahlengang des Femtocut System, basierend auf Zeiss LSM 410, gekoppelt an eine externe Laserquelle (eigene Zeichnung für Lasers in Manufacturing, 2005).

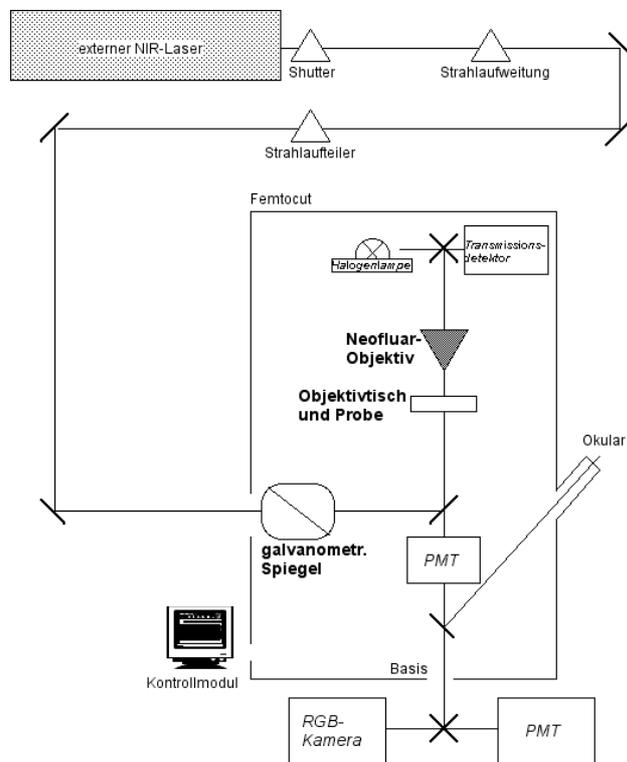


Abb. 2
Strahlengang des Zeiss LSM 510.

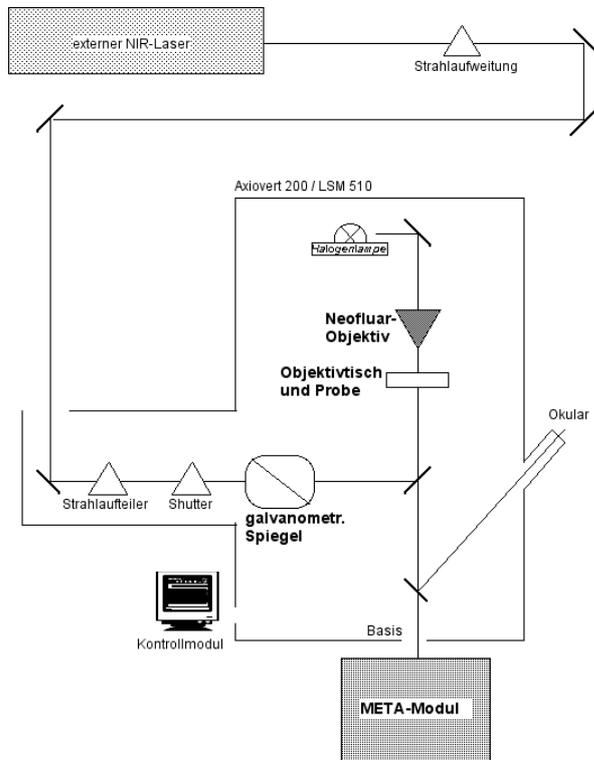


Abb. 3

Zeiss LSM 410/Femtocut mit Kontrollmodul (eigene Fotografie).

**Abb. 4**

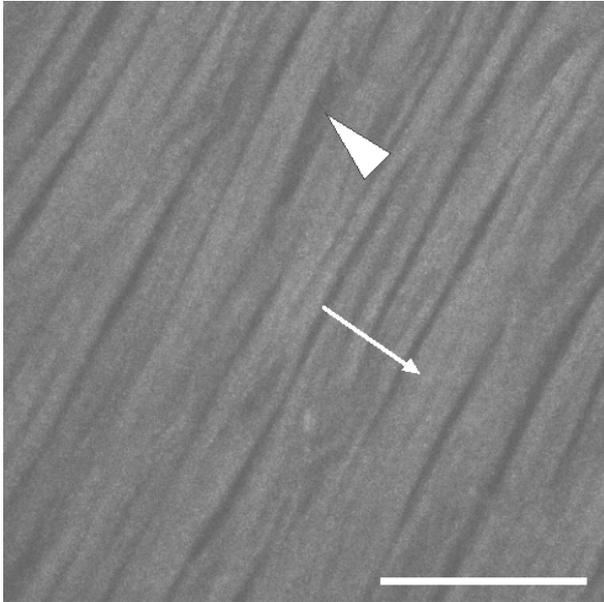
Zeiss LSM 510 mit META-Modul und Kontrollmodul (eigene Fotografie).



Abb. 5

Ein typisches Laserscanning-Bild der NFL zeigte die deutliche Reflektion der Nervenfaserbündel (Pfeil), während die Reflektion der Zwischenräume deutlich geringer war (Pfeilspitze).

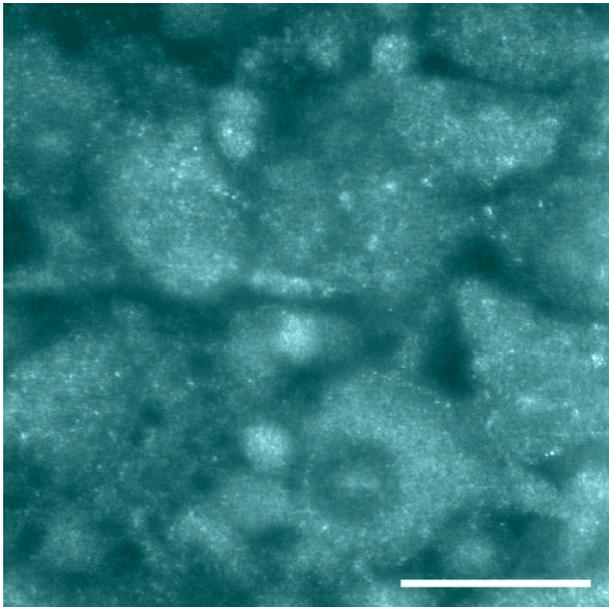
Maßstab = 50 µm.



Mikroskop:	LSM 510
Abbildungsmodus:	Reflektion
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	1,6 mW
z:	15 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge: 760 nm)

Abb. 6

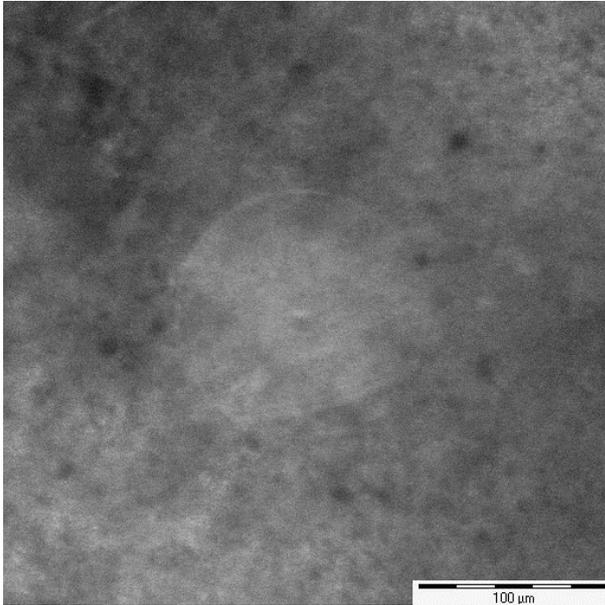
Die Morphologie der GCL wurde detailliert im Reflektionsmodus dargestellt.
Maßstab = 25 μm .



Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Reflektion
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	1,2 mW
z:	50 μm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge: 760 nm)

Abb. 7

Die Darstellung der inneren Zellschichten der Retina war möglich. Hier wurde die innere plexiforme Schicht (IPL) abgebildet. Zellkörper fehlten in dieser Schicht.
Maßstab = 100 µm.

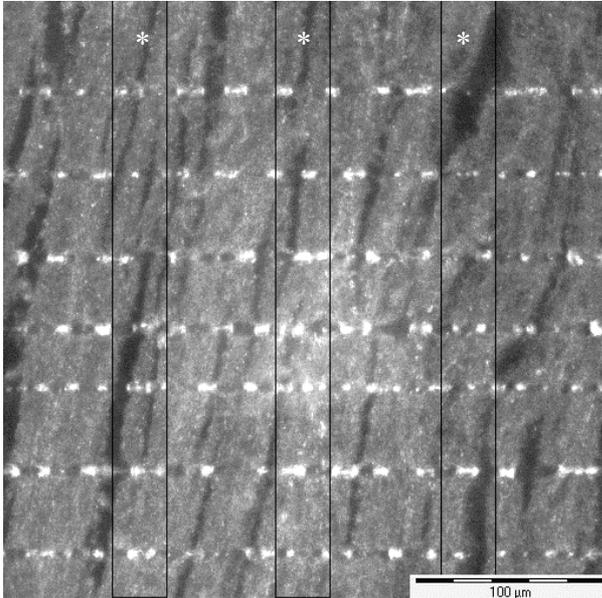


Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Reflektion
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	1,8 mW
z:	70 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge 760 nm)

Abb. 8

Die drei Sektoren (s. Asteriske) von 48 μm x 320 μm Fläche für die Berechnung der Läsionsbreiten.

Maßstab = 100 μm .

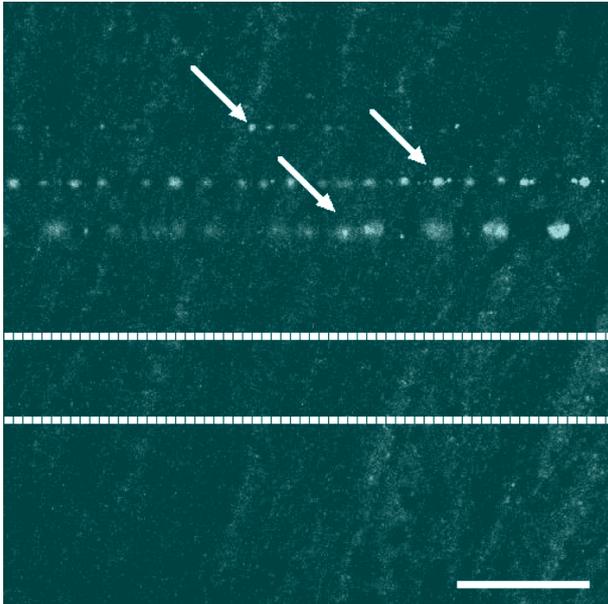


Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Reflektion
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	1 mW
z:	15 μm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 9

Im Autofluoreszenzmodus zeigten sich line scan-induzierte Lumineszenzen oberhalb eines Schwellenwerts (Pfeile), obwohl kein histologisch nachweisbarer Gewebeabtrag stattfand. Die weißen Linien zeigen, wo ebenfalls line scans appliziert wurden, jedoch keine Lumineszenz registriert wurde. Diese line scans lagen unter dem bezeichneten Schwellenwert.

Maßstab = 50 µm

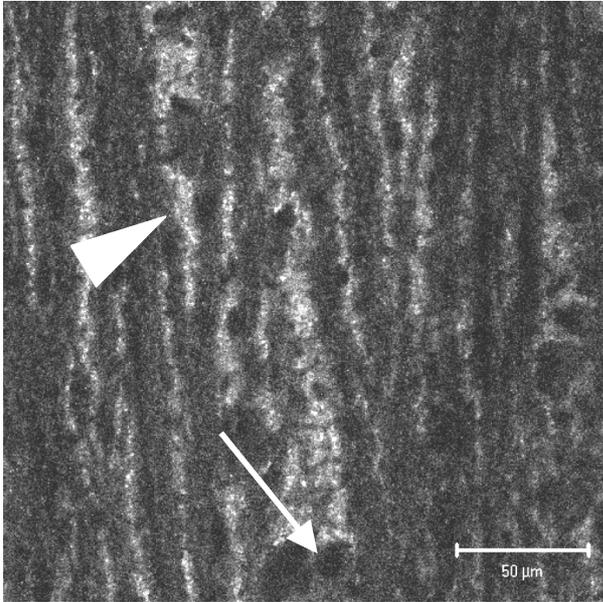


Mikroskop:	LSM 510
Abbildungsmodus:	Autofluoreszenz
Bildgenerierungszeit:	32 s
Leistung:	2 mW
z:	10 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge 760 nm)

Abb. 10

Die Autofluoreszenzaufnahme der NFL zeigte Räume zwischen den Nervenfaserbündeln, die eine starke Fluoreszenz (Pfeilspitze), aber auch nicht fluoreszierende Hohlräume (Pfeil; nach Wang et al. 2006 Kapillaren) aufwiesen.

Maßstab = 50 µm.

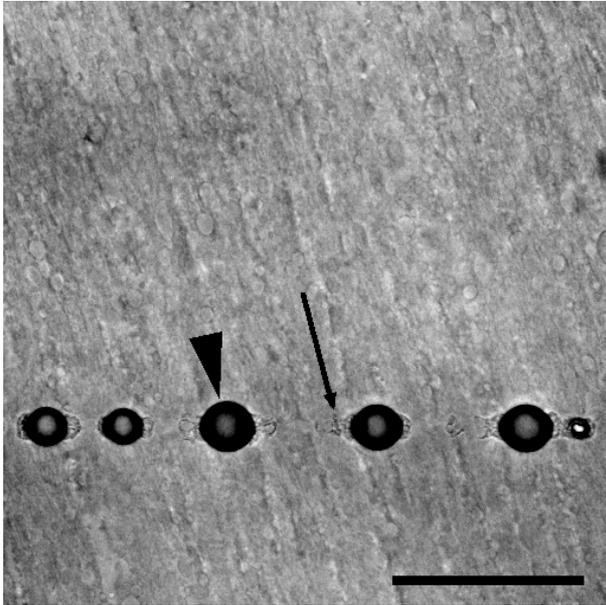


Mikroskop:	LSM 510
Abbildungsmodus:	Autofluoreszenz
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	2 mW
z:	10 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge 760 nm)

Abb. 11

5 s nach einem line scan (4 s, 85 mW) wurden verschiedene Reaktionen des Gewebes abgebildet. Blasen (Pfeilspitze) und Gewebeverdichtungen (Pfeil) lagen auf der zuvor bestrahlten Linie.

Maßstab = 100 µm.



Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Transmission
Bildgenerierungszeit:	1 s
Leistung:	0,8 mW
z:	15 µm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 12

Die Blasenbildung wurde mit der RGB-Kamera am Baseport des Femtocut als Digitalfilm aufgezeichnet.

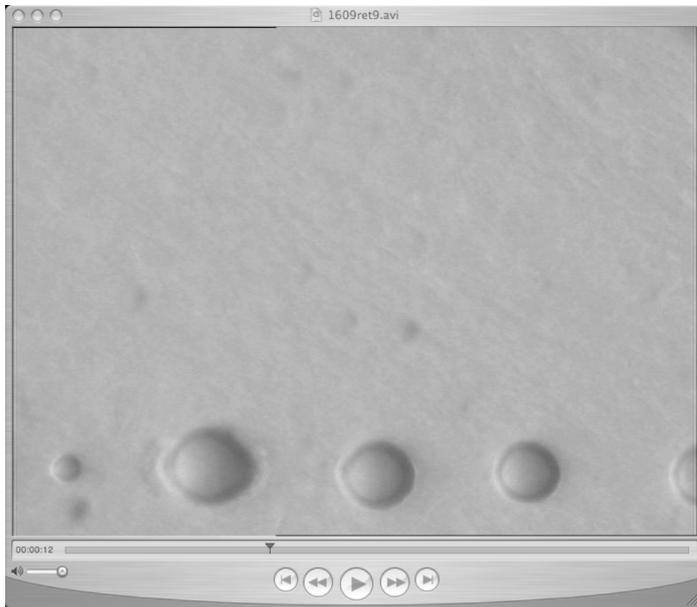


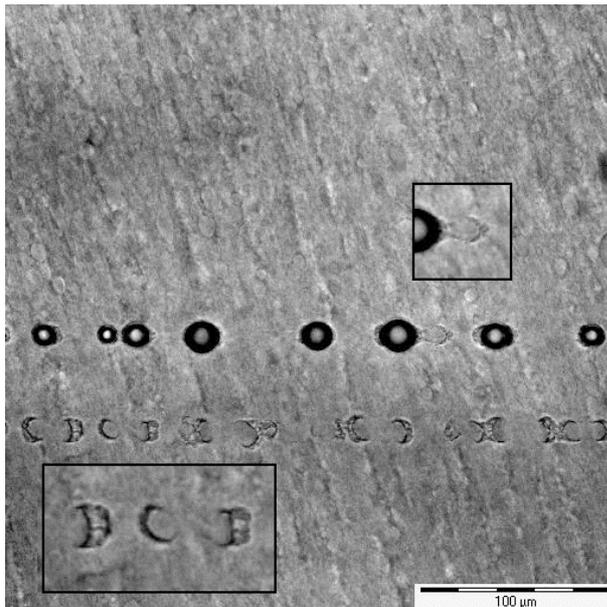
Abb. 13

Verdichtungen und Kavitationen blieben zurück, nachdem die Blasen sich zurückgebildet hatten. Der obere Bildeinsatz zeigt eine Stelle, an der die Blase kleiner wurde. Eine Kavitation mit randständiger Verdichtung blieb zurück. Der untere Bildeinsatz zeigt halbmondförmige Gewebeverdichtungen.

Bildeinsatzvergrößerung 1,5 x.

Die obere Läsion stammt von einem 2 s line scan mit 85 mW, appliziert 5 s, bevor dieses Bild aufgenommen wurde. Die untere Läsion stammt von einem 4 s line scan mit 85 mW, appliziert 30 s, bevor diese Bild aufgenommen wurde.

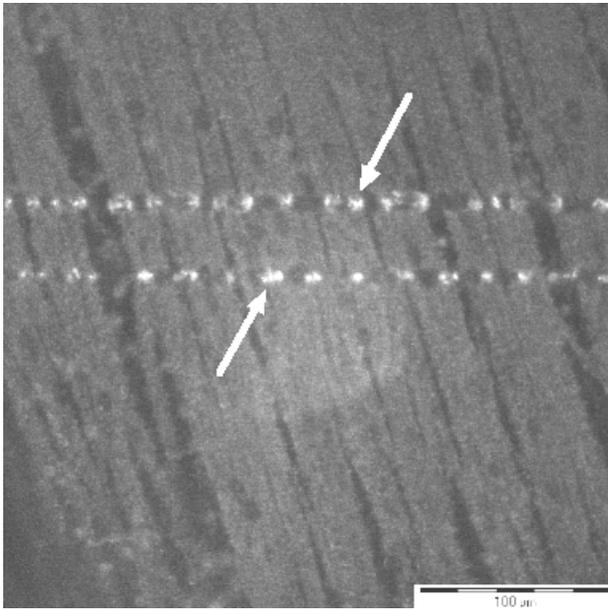
Maßstab = 100 µm.



Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Transmission
Bildgenerierungszeit:	1 s
Leistung:	1 mW
z:	20 µm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 14

1 min nach line scans von 2 s (obere Läsion) und 1 s Bestrahlungszeit (untere Läsion), Leistung 85 mW, wurden durchgehende Linien mit stark reduzierter Reflektion beobachtet. Zusätzliche Stellen mit starker Lumineszenz (Pfeile). Maßstab = 100 μm .

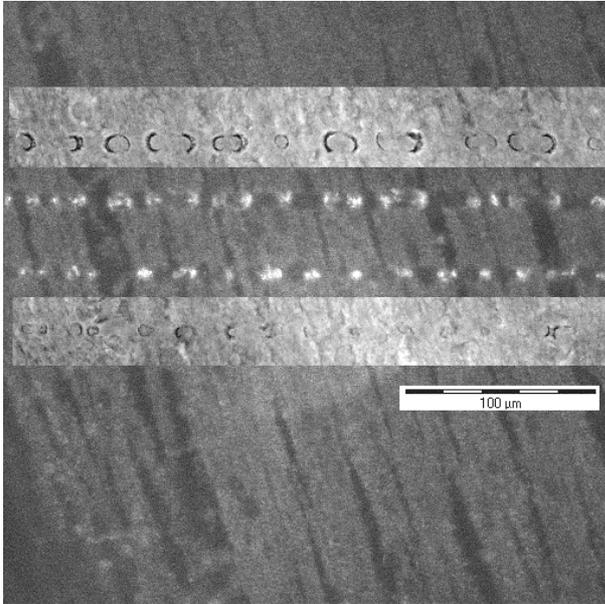


Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Reflektion
Bildgenerierungszeit:	1s
Leistung:	1 mW
z:	20 μm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 15

Das gleiche Präparat wurde zusätzlich im Transmissionsmodus abgebildet (Bildeinsätze). Im direkten Vergleich zeigt sich, dass die Lumineszenzen im Reflektionsmodus mit den Stellen der Gewebeverdichtung übereinstimmen.

Maßstab = 100 µm.

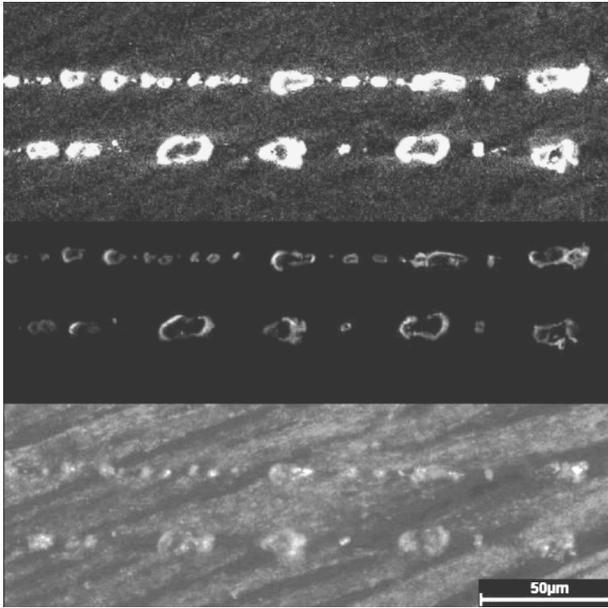


Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Reflektion/Transmission
Bildgenerierungszeit:	1 s
Leistung:	1 mW
z:	20 µm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 16

Zwei Läsionen nach line scans, dargestellt im Autofluoreszenzmodus (oberer und mittlerer Teil), und im Reflektionsmodus (unterer Teil). Die reduzierte Bildverstärkung (detector gain) in der mittleren Aufnahme zeigt deutlich, woher die Lumineszenzen stammen: vom Rand der Kavitationen.

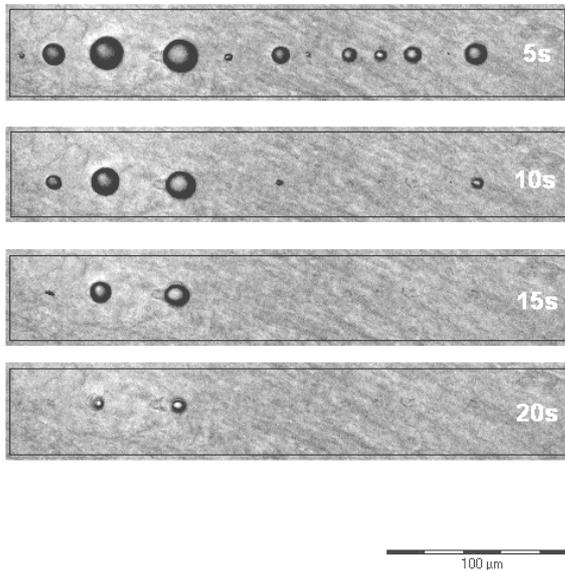
Maßstab = 50 µm.



Mikroskop:	LSM 510
Abbildungsmodus:	Reflektion/Autofluoreszenz
Bildgenerierungszeit:	1 s
Leistung:	10 mW
z:	20 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 17

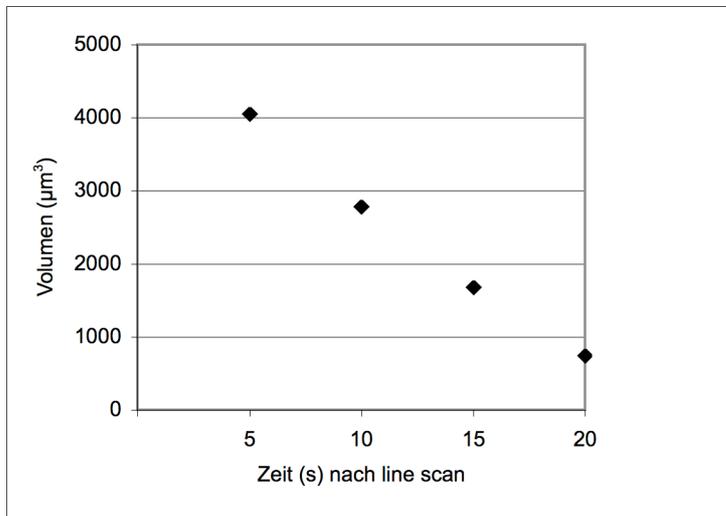
Die schnelle wiederholte Transmissionsaufnahme 5 s, 10 s, 15 s und 20 s nach einem line scan (5 s, 90 mW) dokumentierte die Blasenverkleinerung.
Maßstab = 100 µm.



Mikroskop:	Femtocut
Abbildungsmodus:	Transmission
Bildgenerierungszeit:	1 s
Leistung:	0,8 mW
z:	20 µm
Laser:	Vitesse (Wellenlänge 800 nm)

Abb. 18

Darstellung der Abnahme des Blasenvolumens nach line scans (s.a. Kapitel 4.2.2 und Tab. 6)

**Abb. 19**

Darstellung des Gesamtblasenvolumens pro line scan, in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit bei konstanter Bestrahlungsleistung (85 mW, Vitesse; s.a. Kapitel 4.2.2 und Tab. 7)

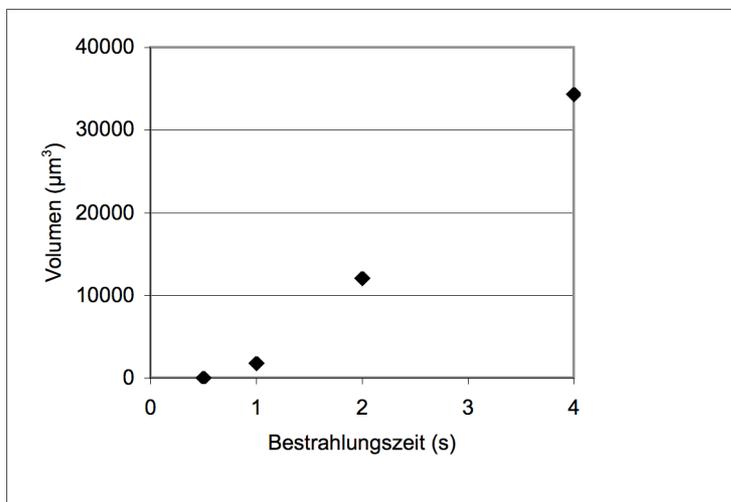
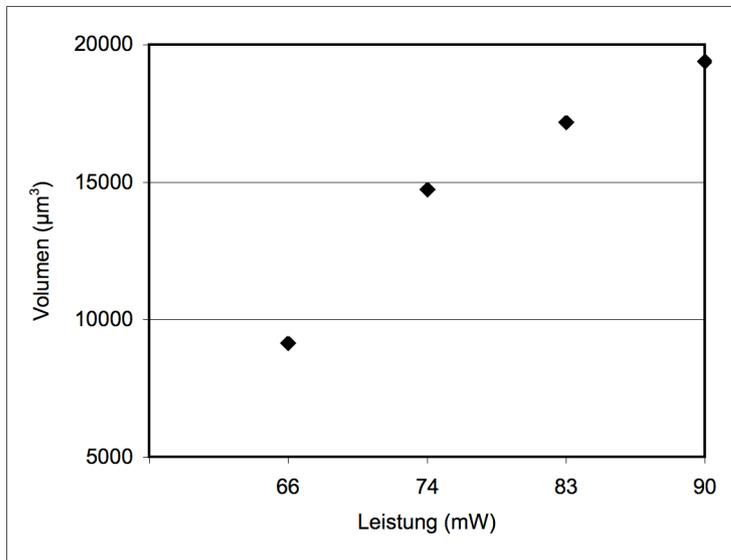


Abb. 20

Darstellung des Gesamtblasenvolumens pro line scan in Abhängigkeit von der Bestrahlungsleistung bei konstanter Bestrahlungszeit (5 s, Vitesse; s.a. Kapitel 4.2.2 und Tab. 8)

**Abb. 21**

Darstellung der Läsionsbreite in Abhängigkeit von der Bestrahlungsleistung bei konstanter Bestrahlungszeit (1 s, Chameleon; s.a. Kapitel 4.2.3 und Tab. 9)

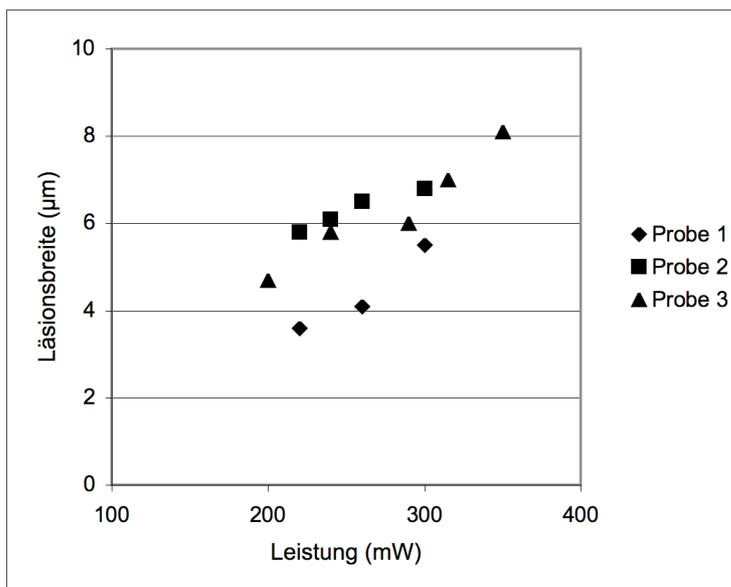
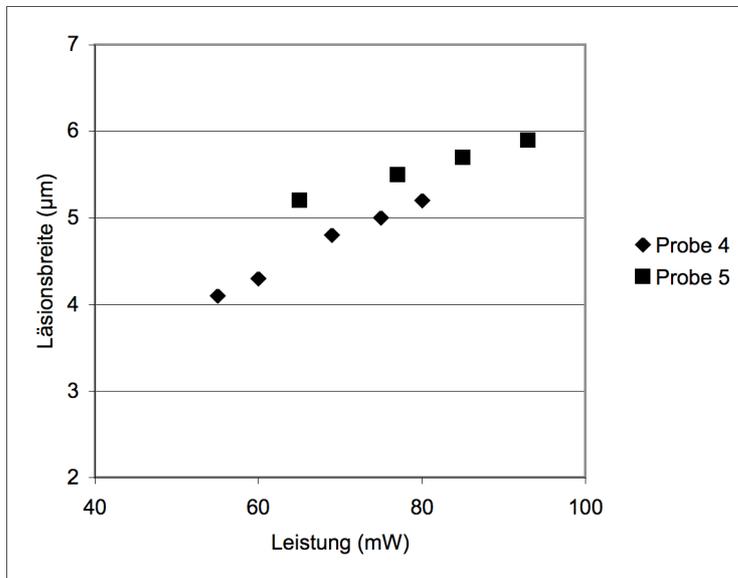


Abb. 22

Darstellung der Läsionsbreite in Abhängigkeit von der Bestrahlungsleistung bei konstanter Bestrahlungszeit (2 s, Vitesse; s.a. Kapitel 4.2.3 und Tab. 10)

**Abb. 23**

Darstellung der Läsionsbreite in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit bei konstanter Bestrahlungsleistung (195 mW, Chameleon; s.a. Kapitel 4.2.3 und Tab. 11)

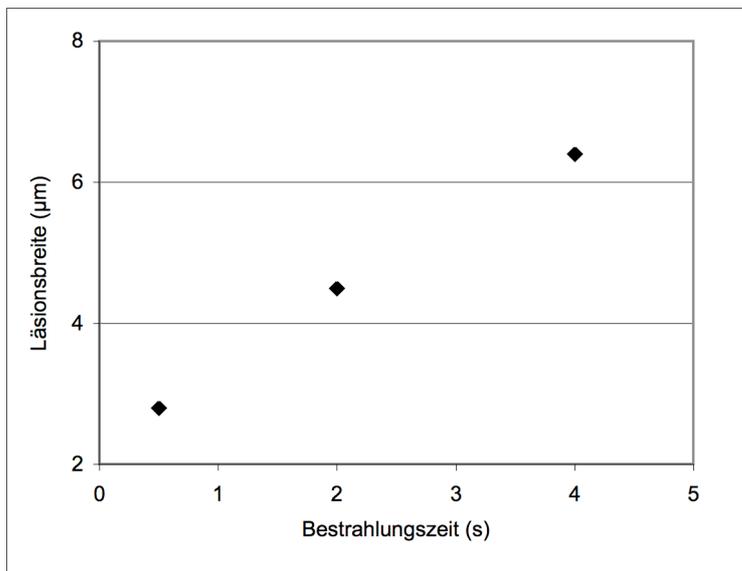
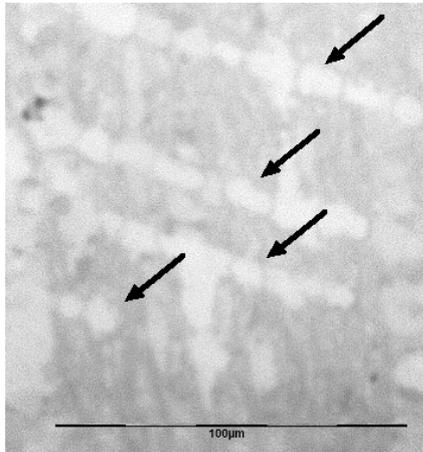


Abb. 24

Histologie (Richardson-Blau) einer Probe, die mit 1 s line scans (80 mW, Vitesse) bestrahlt wurde. Parallel angeordnete linienförmige Läsionen (Pfeile) zeigten unterschiedliche Effekte (Kavitationen mit dichten Rändern und dazwischen liegende „gebleicht“ (heller) erscheinende Gewebebrücken, im Gegensatz zum umliegenden Gewebe, welches unverändert erschien)

Maßstab = 100 µm.

**Abb. 25**

TEM der NFL nach zwei 1 s line scans (80 mW, Vitesse).

Nervenfaserbündel (nf) erschienen als breite, hellere Bänder, während die Müllerzell-Fortsätze (mc) schmäler und dunkler erschienen. Die Räume zwischen den Kavitationen erschienen teilweise als Brücken (b) zwischen zwei Kavitationen. Kavitationen traten häufiger in Nervenfaserbündeln auf als in Müllerzellen. Pfeil: Artefakt.

Maßstab = 50 µm.

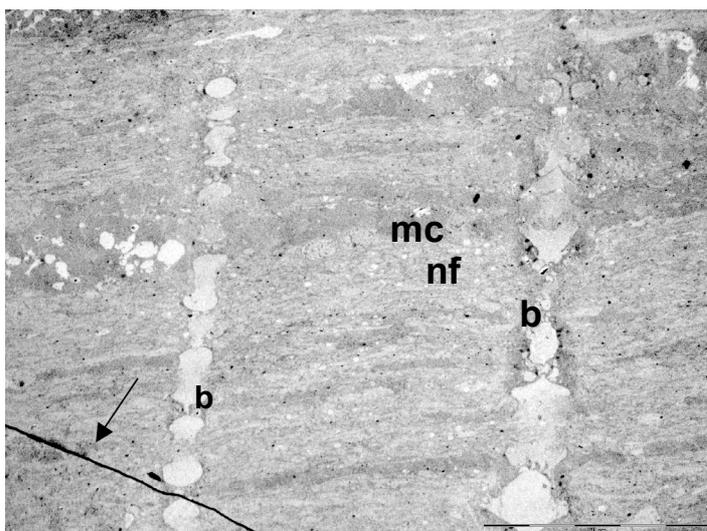
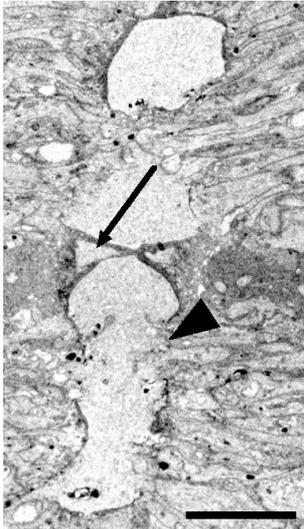


Abb. 26

Die TEM (80 mW, Vitesse) eines line scans zeigte den Einbruch von Zellmaterial in die Kavitation (Pfeilspitze). Die Unterbrechung zur darüber liegenden, angrenzenden Läsion war eine homogene „Brücke“ (Pfeil), begrenzt durch einen elektronendichten Rand. Der elektronendichte Rand setzte sich zu den Seitenrändern der Kavitation fort, hier war er schmaler.

Maßstab = 5 μm .

**Abb. 27**

TEM einer „Gewebebrücke“ (B), das Material zwischen zwei Kavitationen. Der Übergang seitlich zu intaktem Gewebe jenseits des line scans war abrupt (Pfeile). Die Brücke selbst zeigte keine intakten Zellstrukturen mehr.

Maßstab = 2 μm .

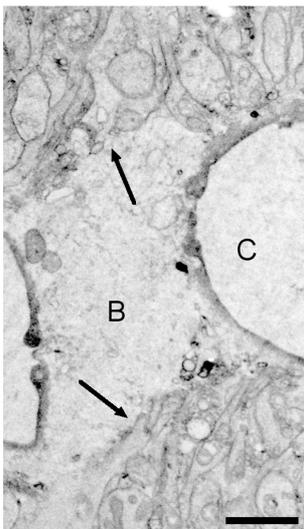
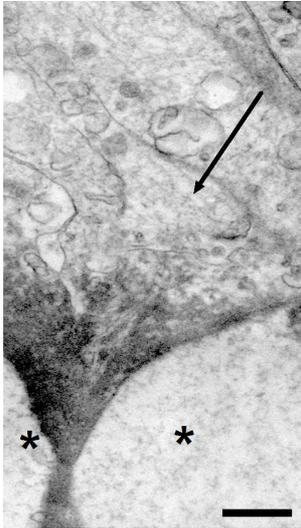


Abb. 28

TEM vom Rand einer Läsion (5 s, 130 mW, Vitesse) mit morphologisch intakter Synapse (Pfeil) in unmittelbarer Nähe zur Zone des Gewebeabtrags (Asteriske).
Maßstab = 1 μm .

**Abb. 29**

REM eines line scan (1 s, 90 mW, Vitesse) mit Fokus unter der Oberfläche der Probe ($z = 2 \mu\text{m}$). Die „Gewebebrücken“ waren hier als glatt begrenzte „Säulen“ (Pfeil) zu erkennen. Denaturierte Proteine aggregierten kugelförmig (Pfeilspitze). Glaspartikel des Objektträgers als Artefakt (Asterisk).
Maßstab = 5 μm .

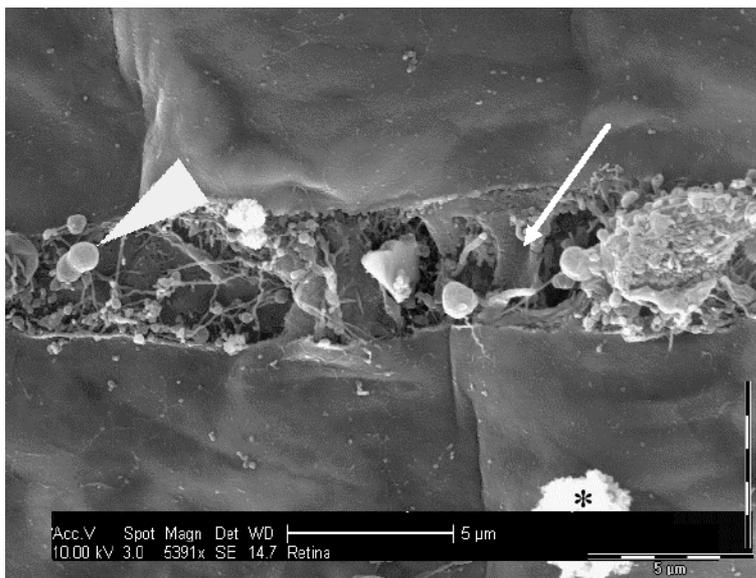


Abb. 30

REM eines line scan (1 s, 90 mW, Vitesse) mit Fokus unter der Oberfläche der Probe ($z = 2 \mu\text{m}$). In beide Richtungen verlief die Läsion tiefer ins Gewebe hinein, und eröffnete sich daher nur auf einer Länge von $10 \mu\text{m}$ an der Oberfläche. Denaturiertes Gewebe überragte das Lumen. Diese Kavitation hatte den geringsten in der Elektronenmikroskopie abgebildeten Durchmesser von $2,4 \mu\text{m}$.

Maßstab = $2 \mu\text{m}$.

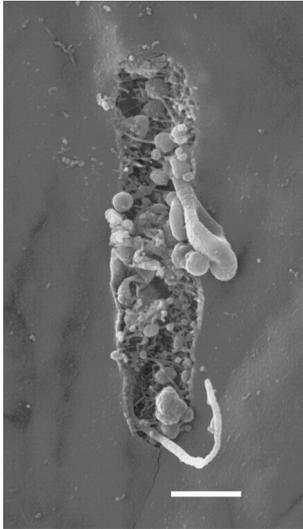
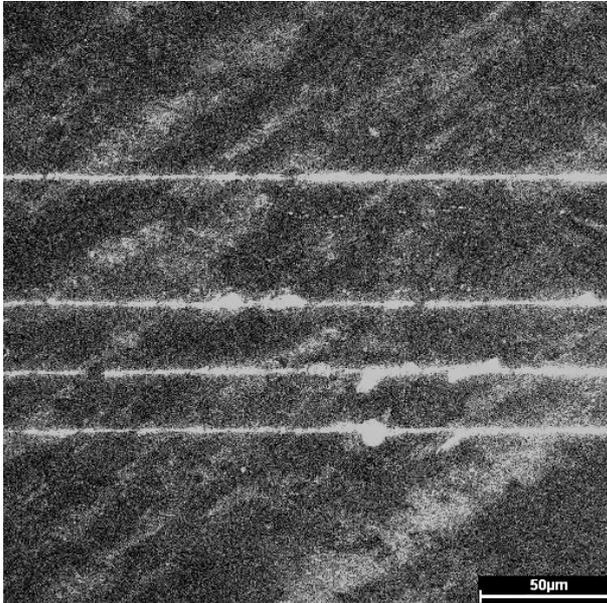


Abb. 31

In Präparaten mit vermindertem Gewebewassergehalt waren die Lumineszenzen durchgehend und relativ schmal.

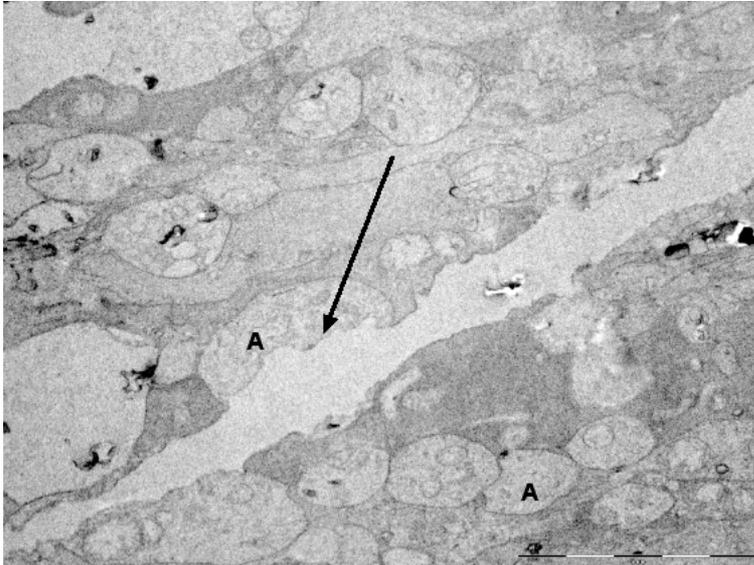
Maßstab = 50 µm.



Mikroskop:	LSM 510
Abbildungsmodus:	Autofluoreszenz
Bildgenerierungszeit:	8 s
Leistung:	4,4 mW
z:	10 µm
Laser:	Chameleon (Wellenlänge 760 nm)

Abb. 32

TEM einer Probe mit vermindertem Wassergehalt. Axone der NFL (A) waren präzise angeschnitten (Pfeil). Eine Übergangszone mit Gewebeverdichtung lag nicht vor.
Maßstab = 5 µm.



8 Literaturverzeichnis

1. Adams RJ (1988) Ophthalmic System. In: Swindle M, Adams RJ (eds) *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Diseases*. Baltimore, MD, 125-153
2. Bandello F, Brancato R, Lattanzio R, Trabucchi G, Azzolini C, Malegori A (1996) Double-frequency Nd:YAG laser vs. argon-green laser in the treatment of proliferative diabetic retinopathy: randomized study with long-term follow-up. *Lasers Surg Med* 19: 173-176
3. Bopp S (2005) Is There Room for Improvement in Pucker Surgery? In: Kirchhof B, Wong D (eds) *Vitreo-retinal Surgery*. Springer, Berlin, 37-62
4. Cain CP, Toth CA, Noojin GD, Carothers V, Stolarski DJ, Rockwell BA (1999) Thresholds for visible lesions in the primate eye produced by ultrashort near-infrared laser pulses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2343-2349
5. Cain CP, Thomas RJ, Noojin GD, Stolarski DJ, Kennedy PK, Buffington GD, Rockwell BA (2005) Sub-50-fs laser retinal damage thresholds in primate eyes with group velocity dispersion, self-focusing and low-density plasmas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243: 101-112
6. Cooper BA, Blinder KJ, Shah GK, Foster W, Leibole M (2004) Femtosecond laser-induced premacular hemorrhage. *Retina* 24: 812-814
7. Coscas G, Soubrane G, Quentel G (1977) Panretinal photocoagulation using an argon laser in diabetic retinopathy. Initial results with remission over 2 years. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 77: 89-92
8. Cucu RG, Podoleanu AG, Rogers JA, Pedro J, Rosen RB (2006) Combined confocal/en face T-scan-based ultrahigh-resolution optical coherence tomography in vivo retinal imaging. *Opt Lett* 31: 1684-1686
9. 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

10. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76
11. Desmettre TJ, Mordon SR, Buzawa DM, Mainster MA (2006) Micropulse and continuous wave diode retinal photocoagulation: visible and subvisible lesion parameters. *Br J Ophthalmol* 90: 709-712
12. Francois J, Cambie E, De Laey JJ (1975) Photocoagulation in diabetic retinopathy: focal treatment or partial retinal ablation? *Ann Ophthalmol* 7: 183-189
13. Fujimoto JG, Lin WZ, Ippen EP, Puliavito CA, Steinert RF (1985) Time-resolved studies of Nd:YAG laser-induced breakdown. Plasma formation, acoustic wave generation, and cavitation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1771-1777
14. Gerten G, Ripken T, Breitenfeld P, Krueger RR, Kermani O, Lubatschowski H, Oberheide U (2007) In vitro and in vivo investigations on the treatment of presbyopia using femtosecond lasers. *Ophthalmologe* 104: 40-46
15. Göppert-Mayer M (1931) Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annals of Physics* 9: 273-285
16. Gusnard D, Kirschner RH (1977) Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. *J Microsc* 110: 51-57
17. Han M, Zickler L, Giese G, Walter M, Loesel FH, Bille JF (2004) Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation. *J Biomed Opt* 9: 760-766
18. Heisterkamp A, Mamom T, Kermani O, Drommer W, Welling H, Ertmer W, Lubatschowski H (2003) Intrastromal refractive surgery with ultrashort laser pulses: in vivo study on the rabbit eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241: 511-517
19. Heisterkamp A, Maxwell IZ, Mazur E, Underwood JM, Nickerson JA, Kumar S, Ingber DE (2005) Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Opt Express* 13: 3690-3696
20. Hild M, Krause MH, Löw U, Ruprecht KW, Riemann I, König K (2005) Experimental intraretinal tissue ablation using femtosecond-laser pulses. In: Beyer E, Dausinger F, Ostendorf A, Otto A (eds) *Lasers in Manufacturing 2005*. AT-Fachverlag, Stuttgart, 495-496

21. Hoerauf H, Brix A, Scholz C, Winkler J, Droge G, Birngruber R, Vogel A, Laqua H (2003) Retinal photoablation with the Erbium:YAG laser. Initial experimental results for traction-free removal of tissue. *Ophthalmologe* 100: 115-121
22. 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: 52-61
23. Hopt A, Neher E (2001) Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J* 80: 2029-2036
24. Huang SJ, Gross NE, Costa DL, Yannuzzi LA (2003) Optical Coherence Tomography Findings in Photic Maculopathy. *Retina* 23: 863-866
25. Ko TH, Fujimoto JG, Duker JS, Paunescu LA, Drexler W, Baumal CR, Puliafito CA, Reichel E, Rogers AH, Schuman JS (2004) Comparison of ultrahigh- and standard-resolution optical coherence tomography for imaging macular hole pathology and repair. *Ophthalmology* 111: 2033-2043
26. Koester CJ, Snitzer E, Campbell CJ, Rittler MC (1962) Experimental Laser Retinal Photocoagulation. *Journal of the Optical Society of America* 52: 607
27. König K, Liang H, Berns MW, Tromberg BJ (1995) Cell damage by near-IR microbeams. *Nature* 377: 20-21
28. König K, So PT, Mantulin WW, Tromberg BJ, Gratton E (1996) Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J Microsc* 183 (Pt 3): 197-204
29. König K, So PTC, Mantulin WW, Gratton E (1997) Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes. *Optics Letters* 22: 135-136
30. König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber KJ (1999) Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45: 195-201
31. König K (2000) Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 200: 83-104

32. König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber KJ (2000) Multiplex FISH and three-dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulses. *Histochem Cell Biol* 114: 337-345
33. König K, Riemann I, Fritzsche W (2001) Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. *Optics Letters* 26: 819-821
34. König K (2003) High-resolution multiphoton imaging and nanosurgery of the cornea using femtosecond laser pulses. In: Fankhauser F, Kwasniewska S (eds) *Lasers in Ophthalmology - Basic, Diagnostic and Surgical Aspects*. Kugler Publications, Den Haag, 79-89
35. König K, Riemann I (2003) High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt* 8: 432-439
36. König K, Ehlers A, Riemann I, Schenkl S, Buckle R, Kaatz M (2007) Clinical two-photon microendoscopy. *Microsc Res Tech* 70: 398-402
37. Krause M, Löw U, Mestres P, Huss C, Hild M, Riemann I, Ruprecht K, Laue M, Jahn S, König K (2004) Experimentelle Hornhautchirurgie mit Femtosekunden-Lasern. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 221: S4
38. Krueger RR, Kuszak J, Lubatschowski H, Myers RI, Ripken T, Heisterkamp A (2005) First safety study of femtosecond laser photodisruption in animal lenses: tissue morphology and cataractogenesis. *J Cataract Refract Surg* 31: 2386-94
39. L'Esperance FA (1969) The treatment of ophthalmic vascular disease by argon laser photocoagulation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 73: 1077-1096
40. Lim T, Yang S, Kim M, Tchah H (2006) Comparison of the IntraLase femtosecond laser and mechanical microkeratome for laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 141: 833-839
41. Lin SJ, Jee SH, Dong CY (2007) Multiphoton microscopy: a new paradigm in dermatological imaging. *Eur J Dermatol* 17: 361-366
42. Loesel FH, Fischer JP, Götz MH, Horrath C, Juhasz T, Noack F, Suhm N, Bille JF (1998) Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses. *Appl Phys B* 66: 121-128

43. Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A, Hetzel U, Drommer W, Welling H, Ertmer W (2000) Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 33-39
44. Lund D, Stuck B, Edsall P (2006) Retinal injury thresholds for blue wavelength lasers. *Health Phys* 90: 477-484
45. Meltendorf C, Burbach GJ, Bühren J, Bug R, Ohrloff C, Deller T (2007) Corneal femtosecond laser keratotomy results in isolated stromal injury and favorable wound-healing response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2068-2075
46. Minsky M (1988) Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 10: 128-138
47. Niemz MH (2003) *Laser-tissue interactions*. Springer, Berlin
48. Oehring H, Riemann I, Fischer P, Halbhuber KJ, König K (2000) Ultrastructure and reproduction behaviour of single CHO-K1 cells exposed to near infrared femtosecond laser pulses. *Scanning* 22: 263-270
49. Paddock S (2002) Tech.Sight. Optical sectioning. Slices of life. *Science* 295: 1319-1321
50. Priglinger SG, Haritoglou C, Palanker DV, Alge CS, Gandorfer A, Kampik A (2005) Pulsed electron avalanche knife (PEAK-fc) for dissection of retinal tissue. *Arch Ophthalmol* 123: 1412-1418
51. Principe AH, Lin DY, Small KW, Aldave AJ (2004) Macular hemorrhage after laser in situ keratomileusis (LASIK) with femtosecond laser flap creation. *Am J Ophthalmol* 138: 657-659
52. Roach WP, Rogers ME, Rockwell BA, Boppart SA, Stein CD, Bramlette CM (1994) Ultrashort laser pulse effects in ocular and related media. *Aviat Space Environ Med* 65: A100-7
53. Rodriguez AE, Rodriguez-Prats JL, Hamdi IM, Galal A, Awadalla M, Alio JL (2007) Comparison of goblet cell density after femtosecond laser and mechanical microkeratome in LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2570-2575
54. Schaffer C, Nishimura N, Glezer E, Kim A, Mazur E (2002) Dynamics of femtosecond-laser induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds. *Opt Express* 10: 196-203

55. Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, Schweitzer F, Jentsch S, Birckner E, Becker W, Bergmann A (2007) Towards metabolic mapping of the human retina. *Microsc Res Tech* 70: 410-419
56. Seitz B, Brunner H, Viestenz A, Hofmann-Rummelt C, Schlotzer-Schrehardt U, Naumann GO, Langenbacher A (2005) Inverse mushroom-shaped nonmechanical penetrating keratoplasty using a femtosecond laser. *Am J Ophthalmol* 139: 941-944
57. Squirrell JM, Wokosin DL, White JG, Bavister BD (1999) Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature Biotechnol.* 17: 763-767
58. Stracke F, Weiss B, Lehr CM, König K, Schaefer UF, Schneider M (2006) Multiphoton Microscopy for the Investigation of Dermal Penetration of Nanoparticle-Borne Drugs. *J Invest Dermatol* 126: 2224-2233
59. Straub M, Lodemann P, Holroyd P, Jahn R, Hell SW (2000) Live cell imaging by multifocal multiphoton microscopy. *Eur J Cell Biol* 79: 726-734
60. Tan YP, Llano I, Hopt A, Wurriehausen F, Neher E (1999) Fast scanning and efficient photodetection in a simple two-photon microscope. *J Neurosci Methods* 92: 123-135
61. Thomas RJ, Noojin GD, Stolarski DJ, Hall RT, Cain CP, Toth CA, Rockwell BA (2002) A comparative study of retinal effects from continuous wave and femtosecond mode-locked lasers. *Lasers Surg Med* 31: 9-17
62. Tirlapur UK, König K, Peuckert C, Krieg R, Halbhuber KJ (2001) Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp Cell Res* 263: 88-97
63. Touboul D, Salin F, Mortemousque B, Chabassier P, Mottay E, Leger F, Colin J (2005) Advantages and disadvantages of the femtosecond laser microkeratome. *J Fr Ophtalmol* 28: 535-546
64. Vogel A, Busch S, Jungnickel K, Birngruber R (1994) Mechanisms of intraocular photodisruption with picosecond and nanosecond laser pulses. *Lasers Surg Med* 15: 32-43

65. Vogel A (2003) Mechanisms of short-pulsed plasma-mediated laser ablation and disruption. In: Fankhauser F, Kwasniewska S (eds) *Lasers in Ophthalmology - Basic, Diagnostic and Surgical Aspects*. Kugler Publications, Den Haag, 99-113
66. Vogel A, Venugopalan V (2003) Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev* 103: 577-644
67. Wang BG, König K, Riemann I, Krieg R, Halbhuber KJ (2006) Intraocular multiphoton microscopy with subcellular spatial resolution by infrared femtosecond lasers. *Histochem Cell Biol* 126: 507-515
68. Wang BG, Riemann I, Schubert H, Halbhuber KJ, König K (2007) In-vivo intratissue ablation by nanojoule near-infrared femtosecond laser pulses. *Cell Tissue Res* 328: 515-520
69. Yu P, Miller J, Cringle S, Yu D (2006) Experimental retinal ablation using a fourth-harmonic 266 nm laser coupled with an optical fiber probe. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1587-1593

9 Veröffentlichungen

zum Vortrag angenommen: M. Hild, H. Kaymak, B. Junker, U. Mester:
„Wie genau ist die natürliche Linse zentriert?“. Vereinigung Rhein-
Mainischer Augenärzte, Frankfurt, 27. Oktober 2007

zum Vortrag angenommen: M. Krause, E. Khurieva, U. Löw, M. Hild, C.
Huss, I. Riemann, P. Mestres, B. Seitz, S. Toropygin, K. Hille, K. König:
„Femtosekundenlaser in der vitreoretinalen Chirurgie“. 105. Jahrestagung
der DOG, Berlin, 20. September 2007

Vortrag: S. Toropygin, M. Krause, I. Riemann, M. Hild, E. Khurieva, U.
Löw, P. Mestres, B. Seitz, K. Ruprecht, K. König: „Femtosecond laser
(FSL) surgery and scanning microscopy in branch retinal vein occlusion
(BRVO): experimental pilot study“. EVER, Vilamoura, 6. Oktober 2006

Poster: M. Krause, I. Riemann, M. Hild, P. Mestres, B. Seitz, K. Ruprecht,
K. König: „Berührungsfreier intraretinaler Gewebeabtrag in-vitro mit nJ-fs-
Laserpulsen.“ 104. Jahrestagung der DOG, Berlin, 22. September 2006

Poster: L. Troeber, M. Krause, C. Huss, I. Riemann, B. Seitz, P. Mestres,
M. Hild, K. König: „Bildgebung mit Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) bei
kornealem intrastromalen Gewebeabtrag mit unverstärkten
Femtosekunden-Laserpulsen in-vitro“. 104. Jahrestagung der DOG, Berlin,
21. September 2006.

Poster: U. Löw, K. König, S. Toropygin, M. Hild, I. Riemann, A. Akaya, E.
Khurieva, P. Mestres, B. Seitz, M. Krause: „Kontaktfreier Abtrag und
hochauflösende Bildgebung experimenteller retinaler Thromben mit einem
unverstärkten fs-Laser“. 104. Jahrestagung der DOG, Berlin, 21.
September 2006.

Poster: U. Löw, K. König, S. Toropygin, M. Hild, I. Riemann, A. Akaya, E. Khurieva, P. Mestres, M. Krause: „Non-contact intravascular femtosecond laser FSL surgery and laser scanning microscopy in retinal vein occlusion: experimental pilot study“. 11th Meeting of the European Society of Neurosonology and Hemodynamics, Düsseldorf, 16. Mai 2006.

Vortrag: M. Krause, I. Riemann, C. Huss, M. Hild, U. Löw, K. Ruprecht, K. König: „Experimental ablation of corneal and retinal tissue with nJ femtosecond laser pulses“. 15th SOE Congress, Berlin, 26. September 2005.

Vortrag: M. Hild, M. Krause, I. Riemann, U. Löw, M. Laue, P. Mestres, K. Ruprecht, K. König: „Experimental Intraretinal Tissue Ablation Using fs-Laser Pulses“. Lasers in Manufacturing, World of Photonics Congress, München, 14. Juni 2005.

Zugleich in: Beyer E, Dausinger F, Ostendorf A, Otto A (eds) Lasers in Manufacturing 2005. AT-Fachverlag, Stuttgart (ISBN 3-00-016402-2).

Poster: M. Hild, U. Löw, M. Laue, P. Mestres, C. Huss, K. Ruprecht, M. Krause, I. Riemann, K. König: „Experimental retinal ablation and imaging with femtosecond laser pulses“. ARVO, Fort Lauderdale, 5. Mai 2005.

Poster: C. Huss, I. Riemann, K. König, M. Laue, P. Mestres, U. Löw, M. Hild, K. Ruprecht, M. Krause: „Experimental corneal imaging and intrastromal tissue ablation with femtosecond laser scanning microscopy“. ARVO, Fort Lauderdale, 3. Mai 2005.

Vortrag: M. Krause, U. Löw, P. Mestres, C. Huss, M. Hild, I. Riemann, K. Ruprecht, M. Laue, S. Jahn, K. König: „Experimentelle Hornhautchirurgie mit Femtosekundenlaser“. Vereinigung Rhein-Mainischer Augenärzte, Homburg, 6. November 2004.

10 Danksagung

Privatdozent Dr. Matthias Krause möchte ich danken für die Überlassung des Themas. Auch möchte ich mich bei Ihm sehr herzlich bedanken für seine stets hilfsbereite Art der Unterstützung und die ergiebige wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Karsten König gebührt mein Dank für die Bereitstellung der Laser und Mikroskope, und die Möglichkeit, an seinen fundamentalen Kenntnissen über die Laserscanningmikroskopie und Femtosekundenlaser Teil zu haben.

Herzlichen Dank an **Dr. Iris Riemann, Dipl.-Ing. Alexander Ehlers, Daniel Sauer** und **Dr. Frank Stracke** für die Vermittlung der Arbeitsmethoden in der Laserscanningmikroskopie. Sie waren für mich eine große Hilfe beim Aufbau, Justierung und Benutzung der Laser und Mikroskope.

Prof. Dr. Berthold Seitz, Direktor, und **Prof. em. Dr. Klaus W. Ruprecht**, ehemaliger Direktor der Universitäts-Augenklinik Homburg, sei gedankt für die freundliche Unterstützung des Femtosekundenprojekts sowie für fruchtbare Hinweise, Erörterungen und Diskussionen zu meiner Arbeit, ihrer Auswertung und Präsentation.

Bei **Prof. Dr. Dr. Pedro Mestres** möchte ich mich für die Unterstützung und für wertvolle Hinweise zur Elektronenmikroskopie bedanken.

Birgit Leis, Gabi Kiefer und **Norbert Pütz** sage ich Danke für ihre Assistenz bei der Histologie und Elektronenmikroskopie, sowie für die Hinweise zur Rasterelektronenmikroskopie.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Matthias Hild geb. am 09.06.1980 in Neunkirchen
evangelisch

Schulbildung

1986 – 1990 Bismarckschule, Friedrichsthal
1990 – 1999 Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen,
Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1999 – 2000 Wehrdienst als Sanitäter und Fallschirmjäger

Hochschulstudium

2000 – 2007 Medizinstudium, Universität des Saarlandes
2006 – 2007 Praktisches Jahr, Städtisches Klinikum Neunkirchen,
Wahlfach Anästhesie und Intensivmedizin
04/2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Ärztliche Tätigkeit

seit 06/2007 Assistenzarzt, Augenklinik der Knappschaft, Sulzbach

Wissenschaftliche Zusammenarbeit

seit 06/2004 Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik,
Abt. Lasermedizin, St. Ingbert
seit 07/2007 Universität Tübingen, Sektion für Neurobiologie des
Auges