

Selektive Retina-Therapie (SRT)

Ralf Brinkmann*, Reginald Birngruber

Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck und Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH,
Peter-Monnik-Weg 4, 23562 Lübeck

Eingegangen am 22. Mai 2006; akzeptiert am 6. November 2006

Zusammenfassung

Die am Medizinischen Laserzentrum Lübeck entwickelte selektive Retina-Therapie (SRT) wird zur Zeit als neue, schonende Laser-Behandlungsmethode für verschiedene Erkrankungen des Augenhintergrunds evaluiert, deren Ursachen einer Degradation des Retinalen Pigmentepithels (RPE) zugeschrieben werden. Mit der SRT lässt sich selektiv das RPE behandeln, ohne die angrenzende neurosensorische Netzhaut mit den Photorezeptoren und die unter dem RPE liegende Aderhaut (Chorioidea) zu beeinträchtigen. Die Therapie führt idealerweise zu einer Regeneration des RPEs und einem gesteigerten Metabolismus am chorio-retinalen Übergang. Im Gegensatz zur etablierten Laserphotokoagulation der Netzhaut, bei der in und um die bestrahlten Areale die Netzhaut komplett verödet wird, bleibt bei der SRT die Sehfähigkeit der Patienten in den bestrahlten Arealen erhalten. Der Artikel gibt einen Überblick über die Idee und die physikalischen Mechanismen selektiver RPE-Behandlung, die online Dosimetrie der optisch nicht sichtbaren Effekte und fasst die ersten klinischen Ergebnisse zusammen.

Schlüsselwörter: Selektive Zelleffekte, Optoakustik, Mikroblasen, Online-Dosimetrie, RPE, μ s-Laserpulse, Makulaödeme, RCS

Selective Retina Therapy (SRT)

Abstract

Selective Retina Therapy (SRT) is a new and very gentle laser method developed at the Medical Laser Center Lübeck. It is currently investigated clinically in order to treat retinal disorders associated with a decreased function of the retinal pigment epithelium (RPE). SRT is designed to selectively effect the RPE while sparing the neural retina and the photoreceptors as well as the chorioidea. Aim of the therapy is the rejuvenation of the RPE in the treated areas, which should ideally lead to a long term metabolic increase at the chorio-retinal junction. In contrast to conventional laser photocoagulation, which is associated with a complete thermal necrosis of the treated site, SRT completely retains full vision. This paper reviews the methods and mechanisms behind selective RPE effects and reports the first clinical results. An online dosimetry technique to visualize the ophthalmoscopically invisible effects is introduced.

Keywords: Selective cellular effects, optoacoustics, online dosimetry, RPE, μ s-laser pulses, macula oedema, RCS

Motivation

Die Photokoagulation der Netzhaut des Auges gilt als die erfolgreichste Anwendung des Lasers in der gesamten Medizin. Sie wird seit Anfang der 1970er Jahre nahezu unverändert durchgeführt und ist als Standardtherapie für verschiedenste Erkrankungen am Augenhintergrund eta-

bliert. Hierzu zählen u.a. die proliferative diabetische sowie andere proliferative Retinopathien, das Makulaödem verschiedener Ursachen, Gefäßneubildungen bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Netzhautablösungen und periphere Netzhautlöcher.

Zur Photokoagulation werden hauptsächlich im grünen Spektralbereich emittierende Laser verwendet, da hier die Absorption des stärksten Chromophors des Augenhintergrunds, des Melanins im retinalen Pigmentepithel (RPE) (Abb. 1, [1]), am höchsten ist [1,2]. Die im vorigen Jahrhundert meistens verwendeten Ar^+ -Laser mit der

* Tel.: 0451-500-6507.

E-mail: brinkmann@bmo.uni-luebeck.de (R. Brinkmann).

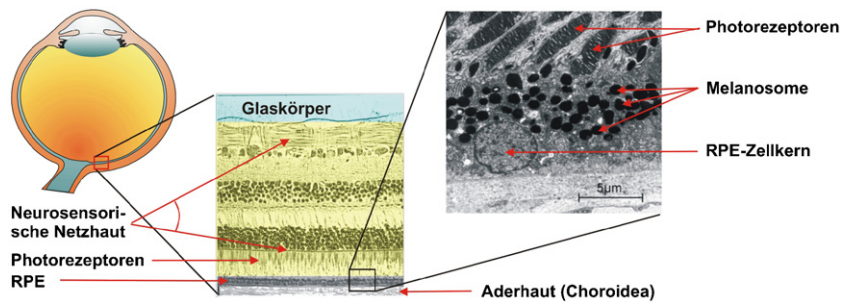


Abbildung 1. Querschnitt durch Auge und Augenhintergrund. Die eingerahmten Bereiche sind jeweils vergrößert dargestellt. Rechts wird die RPE-Zelle eines jungen Menschen in Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt.

Wellenlänge 514 nm werden jedoch zunehmend durch frequenzverdoppelte, Neodym-dotierte Festkörperlaser mit Wellenlängen um 532 nm ersetzt. Je nach Erkrankung erstreckt sich die Zahl der applizierten Laserherde von wenigen einzelnen in der Makula bis hin zu mehreren tausend bei panretinaler Photokoagulation, wobei Herddurchmesser typischerweise zwischen 50 µm (zentrale Makula) und 600 µm (Peripherie) gewählt werden. Die Laserleistungen liegen je nach Herdgröße im Bereich von 100 – 500 mW. Die Bestrahlungsdauer wird dabei mit 50 – 300 ms gewählt, da sich das Auge über längere Bestrahlungszeiten bewegt.

Die Laserleistung zur Photokoagulation wird individuell und intraindividuell, je nach Pigmentierung und Pathologie des zu bestrahlenden Areals, so dosiert, dass gräuliche bis weiße Läsionen entstehen. Diese resultieren aus der Denaturierung der Netzhaut mit einhergehender, deutlich verstärkter Lichtstreuung, die der behandelnde Arzt im Weißlicht seiner Laserspaltlampe klar erkennen kann (Abb. 2). Bei dieser klassischen Photokoagulation handelt es sich um einen rein thermischen Effekt [3,4]. Durch Wärmediffusion in die Umgebung, ausgehend vom RPE und von den Pigmenten in der Aderhaut, kommt es zur irreversiblen thermischen Zerstörung der äußeren und je nach Leistung auch der inneren Netzhaut und der unter dem RPE liegenden Aderhaut. Die Folgen der Photorezeptornekrose sind lokale Gesichtsfelddefekte bis hin zu starken Beeinträchtigungen der Seh- und Lesefähigkeit bei Koagulationen in der zentralen Makula. Bei zu weit ausgedehnter Koagulation kann es sogar zur Zerstörung größerer Nervenbahnen kommen, die in der inneren Netzhaut verlaufen, resultierend in einem noch deutlich vergrößerten Visusdefekt des gesamten nervlich versorgten Areals.

Die erzielbaren therapeutischen Wirkungen sind für die meisten Krankheitsbilder in zahlreichen klinischen multizentrischen Studien sehr gut untersucht und im Wesentli-

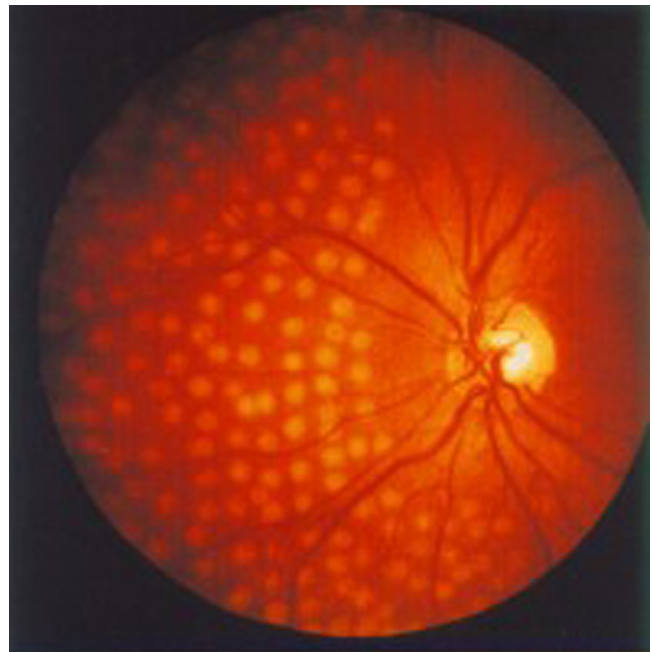


Abbildung 2. Panretinale Photokoagulation. Die Laserherde heben sich als helle Koagulationsareale vom Hintergrund ab.

chen bekannt. Die exakten biologischen Wirkmechanismen der Laserbehandlung hingegen sind noch weitgehend unklar und unterscheiden sich wahrscheinlich bei den einzelnen Erkrankungen. Gut bekannt ist lediglich die als Folge der thermischen Denaturierung initiierte Narbenbildung, derer man sich zur Behandlung von Netzhautlöchern und -ablösungen bedient. Die Wirkung der Laserbehandlung des diabetischen Makulaödems liegt vermutlich in der Verbesserung der Pumpfunktion des sich regenerierenden RPEs zur Verringerung der Flüssigkeitsansammlung [5]. Ödeme bedingt durch die

Retinopathia Centralis Serosa (RCS) werden vermutlich durch einen regenerativen Verschluss des pathologischen Quellpunkts der Leckage reduziert [6]. Der Wirkmechanismus zum Abbau der Ablagerungen an der Bruchschichten Membran, so genannter Drusen, als einer Vorstufe zur AMD wird im gesteigerten Gesamtmetabolismus als Folge der RPE-Regeneration diskutiert [7].

Falls diese Hypothesen zur wesentlichen Beteiligung des RPEs an zahlreichen Netzhauterkrankungen zutreffend sind, ist die Zerstörung der Photorezeptoren und der neuronalen Netzhaut mit der damit einhergehenden Entstehung von Gesichtsfelddefekten ein ungewollter und unnötiger Nebeneffekt der Photokoagulation. Basierend auf diesen Überlegungen wurde eine neue Methode vorgeschlagen, welche selektiv auf das retinale Pigmentepithel (RPE) zielt und dieses zur Regeneration anregt, jedoch alle angrenzenden Gewebe wie insbesondere die Photorezeptoren ausspart: die selektive Retina-Therapie (SRT) [8,9].

Retinales Pigmentepithel (RPE) und SRT

Das RPE ist eine stark pigmentierte, monozelluläre Schicht zwischen Aderhaut und Netzhaut am Hintergrund des Auges (Abb. 1), es ist u.a. für die Steuerung des retinalen Metabolismus sowie die Regulierung des Flüssigkeitsgehalts der Netzhaut verantwortlich. Ferner phagozytieren RPE-Zellen die durch den Sehvorgang in den Photorezeptoren anfallenden Membranscheibchen

der Photorezeptor-Außensegmente. Hierbei akkumulieren Stoffwechselprodukte im RPE, wie in Abbildung 3, [10], im Vergleich zu jungem RPE in Abbildung 1 [1], deutlich auszumachen ist. Die Lipofuscin-Ablagerungen sind Zeichen einer mit dem Alter zunehmenden metabolischen Störung des RPEs.

Ziel der SRT ist eine Anregung des Metabolismus und die Regeneration des RPEs in erkrankten Arealen, initiiert durch die der Behandlung folgenden biologischen Reaktion. In-vitro- und in-vivo Untersuchungen konnten zeigen, dass die durch die selektive Laserbehandlung verursachten lokalen RPE-Effekte benachbarte Pigmentepithelzellen zur Proliferation und Migration anregen. Dies führt zur Defektdeckung des behandelten Areals innerhalb von 1-2 Wochen nach Bestrahlung [8,9]. Es wird postuliert, dass diese Umbauvorgänge zu einer Neustrukturierung der Blut-Retina-Schranke sowie zu einer Verbesserung der metabolischen Funktion des retinalen Pigmentepithels beitragen [11]. Die sich regenerierenden RPE-Zellen bilden danach wieder eine funktionale und geschlossene Gewebestruktur aus (Abb. 4).

Selektive RPE – Erhitzung

Das Konzept der selektiven Schädigung von stark absorbierendem Gewebe eingebettet in schwächer absorbierende Strukturen wurde als „selektive Photothermolyse“ erstmals von Anderson und Parrish vorgestellt [12]. Zur selektiven Schädigung des RPEs [9] kann hierfür die

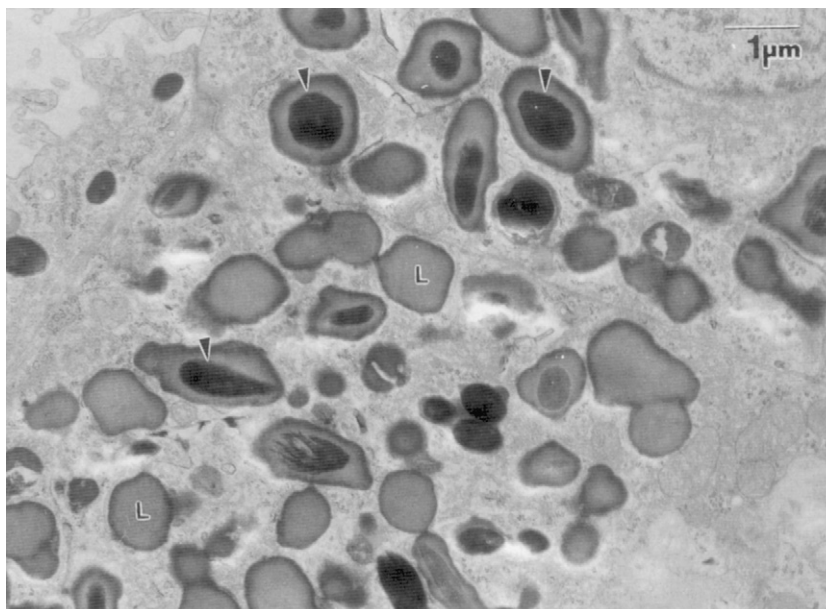


Abbildung 3. RPE eines 75-jährigen Menschen in Transmissionselektronenmikroskopie. Die schwarzen Bereiche sind Melanin-granula, die grauen Areale Lipofuscin und andere intrazelluläre Einlagerungen. Am oberen Bildrand rechts ist der Zellkern zu sehen. (aus Schrämeyer U, Heimann K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. Pigment. Cell. Res. 12:219-236, 1999, Blackwell-Verlag).

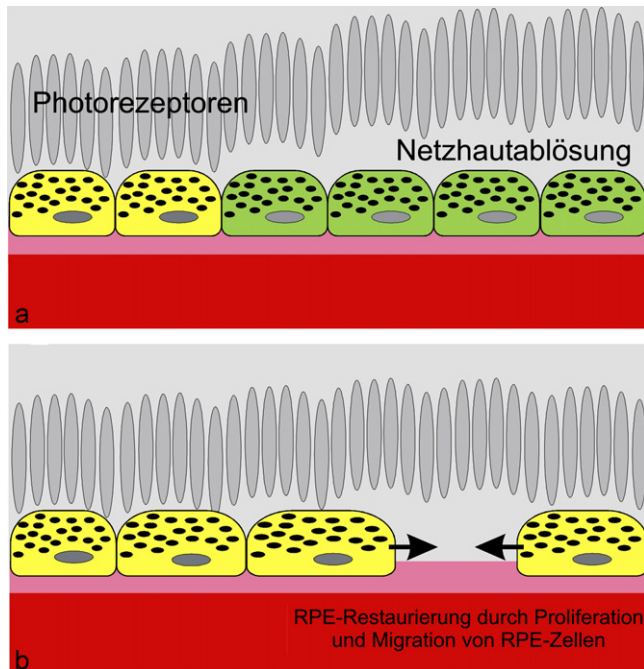


Abbildung 4. Skizze zur therapeutischen Wirkungsweise der SRT: Nach Bestrahlung der Zellen unterhalb der abgelösten Photorezeptoren (grün) werden diese abgebaut. Umliegende RPE Zellen restaurieren das Areal innerhalb weniger Tage vollständig, der Metabolismus erhöht sich, die Photorezeptoren bleiben unbeeinträchtigt.

intrinsische, extrem hohe Absorption der intrazellulären Melanosomen von ca. $0,8 \mu\text{m}^{-1}$ [13] ausgenutzt werden. Insgesamt werden von den 100-200, ca. $1 \mu\text{m}$ im Durchmesser großen Melaningranula einer RPE-Zelle ca. 50% des einfallenden Lichts im grünen Spektralbereich absorbiert [2]. Bei Applikation von Laser-Impulsdauern (in der Laserphysik auch kurz „Pulsdauer“ genannt) im 100-ms-Bereich wie bei der Photokoagulation, kommt es aufgrund der Wärmediffusion vom RPE aus einer ausgedehnten, sich über die gesamte Netz- und Aderhaut erstreckenden Temperaturerhöhung [14]. Reduziert man jedoch die Pulsdauer in den Bereich der thermischen Relaxationszeit des Gewebes oder darunter, so erhöht sich der räumliche und zeitliche Temperaturgradient und es bilden sich deutliche Temperaturspitzen an den Absorbieren aus [9]. Die thermische Relaxationszeit τ ist definiert als die Zeit, bis die zentrale Temperatur eines gleichmäßig instantan erhitzten, sphärischen Partikels des Radius r durch Wärmediffusion auf $1/e$ abgefallen ist: $\tau = r^2/4\kappa$ ist, κ bezeichnet die thermische Diffusivität. Bei $1 \mu\text{m}$ großen Partikeln beträgt sie ca. 420 ns (radiale Wärmeleitung). Für die Abschätzungen wurde die thermische Diffusivität von Wasser ($\kappa = 1,5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$) zugrunde gelegt. Betrachtet man das RPE als eine ca. $4 \mu\text{m}$ dicke, lateral ausgedehnte, homogene Absorbierschicht, so ergibt

sich eine thermische Relaxationszeit von ca. $64 \mu\text{s}$ (axiale Wärmeleitung).

Detaillierte Berechnungen zum Temperaturverlauf an der Netzhaut (Abb. 5) wurden mit einem granulären Modell der pigmentierten Schicht des RPEs durchgeführt, das auf einer analytischen Lösung der Wärmeleitungsgleichung basiert [9,15]. Im Modell wurden drei Lagen kugelförmiger Melaningranula mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ im Abstand von $1,5 \mu\text{m}$ ihrer Zentren auf einem regelmäßigen Gitter angeordnet. Bei einer Absorption von $0,8 \mu\text{m}^{-1}$ absorbieren die einzelnen Granula dabei 53%, die gesamte Schicht 56% der auf sie einfallenden Laserstrahlung. Die Temperaturverläufe wurden an verschiedenen Stellen an der Oberfläche, zwischen den Melaninpartikeln und außerhalb der RPE-Zelle für verschiedene auch experimentell verwendete Pulsdauern berechnet [16].

Die granuläre Struktur der Absorber führt für Pulsdauern $< 5 \mu\text{s}$ direkt an der Oberfläche der Melanosomen zu ausgeprägten Temperaturerhöhungen (Abb. 5 [16]), wie aus der thermischen Relaxationszeit der Mikroabsorber zu erwarten ist. Die Temperatur hängt jedoch stark von der Pulsdauer ab: Bei gleicher Bestrahlung sinkt die Maximaltemperatur bei Änderung der Pulsdauer von 10 ns ($\Delta T_{\text{max}} \approx 0,9 \text{ K}/(\text{mJ}/\text{cm}^2)$) auf $5 \mu\text{s}$ ($\Delta T_{\text{max}} \approx 0,35 \text{ K}/(\text{mJ}/\text{cm}^2)$) an der Oberfläche eines inneren Melanosoms auf ca. 40% ab. Bereits in der Mitte zwischen 8 Melanosomen ist der Unterschied der Spitzentemperaturen jedoch kaum noch auszumachen ($\Delta T_{\text{max}} \approx 0,29 \text{ K}/(\text{mJ}/\text{cm}^2)$), und in einem $2\text{-}\mu\text{m}$ -Abstand zur Granulaschicht sind die Temperaturverläufe für beide Pulsdauern quasi identisch ($\Delta T_{\text{max}} \approx 0,08 \text{ K}/(\text{mJ}/\text{cm}^2)$).

Betrachtet man Pulsdauern $> 50 \mu\text{s}$, so zeigen sich auch im Abstand von einigen Mikrometern geringere Spitzentemperaturen und die Temperatur zwischen den Melanosomen sinkt ($50 \mu\text{s}$: $\Delta T_{\text{max}} \approx 0,2 \text{ K}/(\text{mJ}/\text{cm}^2)$).

Aus den Abschätzungen lässt sich schlussfolgern: Ist es Ziel, die gesamten RPE-Zellen gleichmäßig zu erhitzen, ohne die Umgebung nennenswert zu erwärmen, so bieten sich Pulsdauern von ca. $5\text{-}30 \mu\text{s}$ an. Will man hingegen ausgeprägte Spitzentemperaturen an den Melanosomen erzeugen, sollten Pulsdauern $< 5 \mu\text{s}$ gewählt werden. Bei Pulsdauern $> 50 \mu\text{s}$ geht die zellulär begrenzte Temperaturerhöhung verloren.

Erste Experimente zu selektiven RPE-Effekten

Die ersten experimentellen Arbeiten zu selektiven RPE-Effekten wurden Anfang der 1990er Jahre von Roeder et al. durchgeführt [8,9], wobei eine rein thermische Denaturierung der Zellen postuliert wurde.

Die thermische Denaturierung von Proteinen und Gewebe lässt sich unter gewissen Bedingungen mit dem Schädigungsintegral nach Arrhenius annähern [3]. In die Denaturierungsraten geht die Temperatur exponentiell,

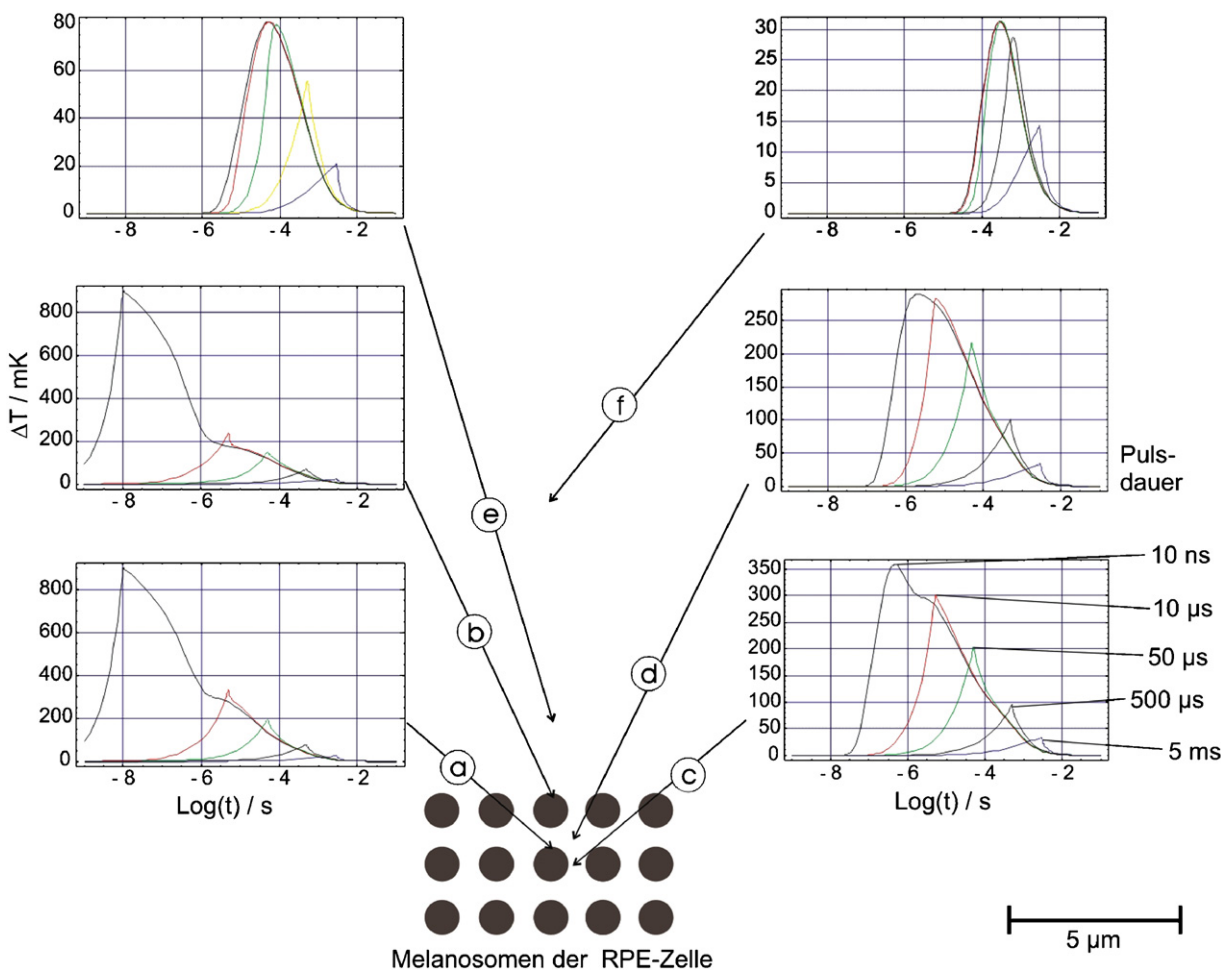


Abbildung 5. Berechnung der Temperaturverläufe bei Bestrahlung einer Schicht aus regelmäßig angeordneten Melanosomen in 3 Lagen mit Pulsen von jeweils 10 ns bis 5 ms, berechnet für eine Bestrahlung von 1 mJ/cm^2 . Die Orte, an denen die Temperaturen berechnet wurden, sind durch die Pfeilspitzen gekennzeichnet.

die Zeit näherungsweise linear ein. Zur thermischen Schädigung ist es demnach prinzipiell sinnvoll, hohe Spitzentemperaturen zu erzeugen, da diese exponentiell die Denaturierung beschleunigen. Um allerdings eine Maximaltemperatur (z.B. die Verdampfungsschwelle) nicht zu überschreiten, ist es zur Denaturierung sinnvoll, die Expositionsdauer bei erhöhter Temperatur zu verlängern. Da dieses aufgrund der Anforderungen an die Selektivität nur eingeschränkt möglich ist (s.o.), kann man sich gemäß der Theorie von Arrhenius die Additivität thermischer Denaturierung zu nutze machen und Pulse repetitiv applizieren. Um die Selektivität zu wahren, darf jedoch die mittlere Temperatur hierdurch nicht nennenswert ansteigen, was durch eine geeignet geringe Pulsfrequenz erreichbar ist, die eine ausreichende Abkühlung zwischen den Pulsen gestattet.

Entsprechend der Hypothese der thermischen Denaturierung wurden die ersten Experimente ausgelegt und Mikrosekundenpulse repetierend auf die Fundi von

Kaninchen in vivo appliziert. Aus Ermangelung geeignet gepulster Lasersysteme im μs -Zeitbereich wurden Pulse mit $5 \mu\text{s}$ Dauer mit einer Repetitionsrate von 500 Hz aus dem kontinuierlichen Strahl eines leistungsstarken Ar^+ -Lasers ausgekoppelt [8,9]. Trotz der damit nur geringen Pulsenergie im $10\text{-}\mu\text{J}$ -Bereich konnte mit diesen Parametern auf kleinen Spotdurchmessern eine auf das RPE beschränkte Zellschädigung histologisch nachgewiesen werden. Ferner wurde eine komplette RPE-Restaurierung im Heilverlauf innerhalb von zwei Wochen nach Bestrahlung beobachtet. Selektive RPE-Effekte wurden somit nachgewiesen, jedoch weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf eine klinische Anwendung nicht weiterverfolgt, da ein Bestrahlungs-Spotdurchmesser von $110 \mu\text{m}$ therapeutisch als zu klein erachtet wurde. Die für größere Herde notwendigen höheren Pulsenergien waren jedoch mit obiger Technik nicht erzielbar.

Um die Bestrahlungsschwellwerte (50%-ige Wahrscheinlichkeit [Effective dose ED_{50}]) für das Auftreten

von RPE-Schäden in Abhängigkeit von Pulsrepetitionsrate und -anzahl im Pulsdauerbereich einiger μs grundlegend untersuchen zu können und die Möglichkeit klinischer Erprobung zu eröffnen, wurde ein entsprechend geeignetes Lasersystem mit höheren Pulsenergien entwickelt [13]. Als Basis diente ein kontinuierlich bogenlampengepumpter, resonatorintern frequenzverdopplter Nd:YLF-Laser (Wellenlänge 527 nm). Durch Güteschaltung des Nd:YLF-Lasers werden typischerweise Pulsdauern von 200 ns bei Pulsenergien weniger mJ erzielt. Um die Pulsdauer und -form bei hoher Pulsenergie variieren zu können, wurde eine schnelle Elektronik zur Regelung der Güte des Laserresonators während der Pulsemission mittels einer Pockelszelle realisiert [17]. Über die Pockelszelle sind der Polarisationszustand und damit die Verluste der Lasermoden beeinflussbar, wozu jedoch Spannungen bis 1 kV mit Zeitkonstanten von ca. 10 ns geregelt werden müssen. Mit dieser Technik kann eine Pulsdauer von 200 ns (reine Güteschaltung) auf bis zu 5 μs bei gestreckt werden [13,17,18]. Mit einer geeigneten Regelung konnten nahezu beliebige Pulsformen erzeugt werden, für die Untersuchungen wurden μs -Pulsdauern konstanter Pulsleistung gewählt.

Als experimentelles Modell dienten Augen von Schlachthofschweinen, die direkt post mortem enukleiert wurden. Aus dem Augenhintergrund wurden ca. 0.5 cm^2 große RPE/Sklera-Proben extrahiert. RPE-Zellen überleben bis ca. 5 Stunden ohne Perfundierung und sind daher innerhalb dieser Zeitspanne ideale Proben. Die Zellpräparate wurden in einer Küvette platziert und mit dem Nd:YLF-Lasers bestrahlt. Nach Bestrahlung wurde das Vitalitätstest Calcein-AM (Molecular Probes Inc.) auf die Proben gegeben. Calcein-AM ist durch die Zellmembran permeabel und wird innerhalb der Zellen von Esterasen in Calcein umgewandelt, das im grünen Spektralbereich fluoresziert, wenn es im blauen angeregt wird. Metabolisch aktive Zellen fluoreszieren, während denaturierte oder an der Zellmembran geschädigte Zellen keine Fluoreszenz mehr zeigen, wie in Abbildung 6 exemplarisch gezeigt ist.

Nach Bestrahlung können die geschädigten im Fluoreszenzmikroskop dunkel erscheinenden Zellen quantitativ ausgewertet werden. Abbildung 7 [13] zeigt, dass die ED_{50} -Schwellbestrahlungen im untersuchten Bereich bei ca. $100\text{ mJ}/\text{cm}^2$ liegen und diese mit abnehmender Pulsdauer und zunehmender Pulsanzahl abnehmen. Ab einer Pulszahl von 100 wird eine nur noch insignifikante Abnahme des ED_{50} -Werts gefunden.

RPE-Schadensmechanismus

Zur Untersuchung des der Schädigung zugrunde liegenden Mechanismus wurden zunächst Abschätzungen mit der Arrhenius-Theorie unter Verwendung der berechne-

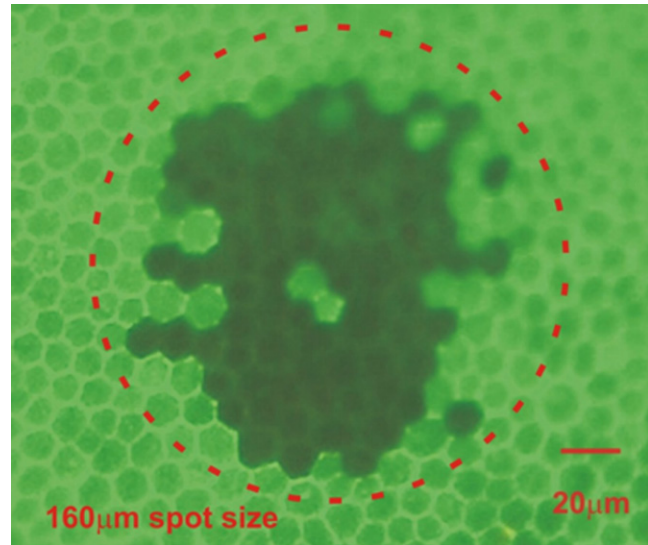


Abbildung 6. Muster hexagonaler RPE-Zellen in vitro. Metabolisch aktive Zellen erscheinen nach Zugabe des Vitalitätsmarkers Calcein-AM in der Fluoreszenzmikroskopie grün, geschädigte Zellen im Areal der Laserapplikation (Kreis) dunkel.

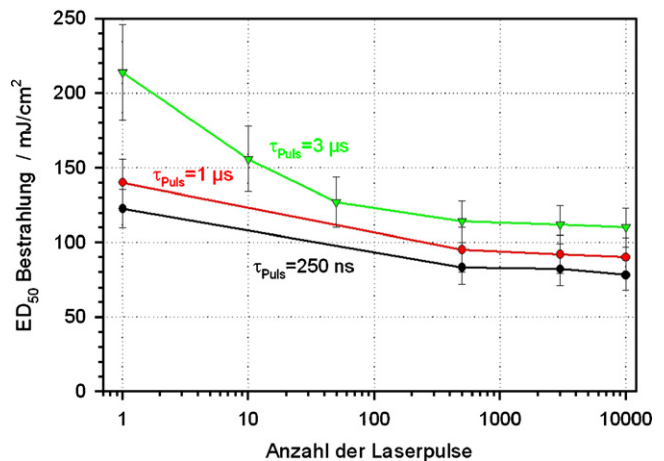


Abbildung 7. Bestrahlungsschwellwerte zur Zellschädigung bei unterschiedlichen Pulsdauern über der Anzahl der pro Herd gesetzten Expositionen auf einem Herddurchmesser von $50\text{ }\mu\text{m}$ mit einer Repetitionsrate von 500 Hz.

ten Temperaturverläufe mit den experimentell ermittelten Bestrahlungsschwellwerten vorgenommen. Für das Schadensintegral ergeben sich lediglich direkt an der Oberfläche der Melanosome [16] ausreichend hohe Werte zur Denaturierung. Die Berechnungen für andere Lokalisationen, z.B. zwischen den Melanosomen, ergeben aufgrund der gesunkenen Spitzentemperatur deutlich geringere Schadensintegrale. Die Abhängigkeit der experimentell beobachteten Schadensschwelle von der

Pulsdauer (Abb. 7 [16]) wird lediglich an der Oberfläche der Melanin granula durch die Arrhenius-Berechnungen recht gut wiedergegeben. Ferner widerspricht der nahezu konstante Schwellwert der Zellschädigung hin zu höheren Expositionszahlen der Theorie thermischer Schädigung, die eine stetig fallende Schwellbestrahlung mit ansteigender Expositionszahl postuliert.

Motiviert durch diese Befunde wurden weitere Möglichkeiten der Zellschädigung in Betracht gezogen. So besteht insbesondere an der Oberfläche der Melanosomen die Möglichkeit, dass die hohen Temperaturspitzen Mikroverdampfungen an den Melanin granula auslösen. Intrazelluläre Mikroblasen können die Zellen thermomechanisch durch kurzzeitige Vergrößerung ihres Volumens desintegrieren. Dieses konnte mit ns-Pulsdauern an melaninhaltigen Zellen von Lin et al. [19] photographisch dokumentiert werden.

Modellrechnungen zur notwendigen Bestrahlung der Erzeugung einer bestimmten Nukleationstemperatur an der Oberfläche eines Melanosoms postulieren eine fast lineare Zunahme der Bestrahlung mit zunehmender Pulsdauer von ns bis zu μs [13]. Ein solcher Zusammenhang wurde auch experimentell in Untersuchungen zur Blasenbildungsschwelle an Melanosomen gezeigt. Eine Auswertung der Ergebnisse ergibt dabei eine Verdampfungstemperatur von ca. 140°C [13,20]. Hohe Nukleationstemperaturen sind bei einem Teilchendurchmesser von $1\ \mu\text{m}$ zu erwarten, da zum Aufschwingen von Mikrodampfblasen neben der Verdampfungsenthalpie die Oberflächenspannung überwunden werden muss. Eine Zellschädigung durch intrazelluläre Mikrovaporisation würde demnach in gutem Einklang mit den experimentellen Schwellwerten zur Blasenbildung stehen [13].

Um den Schadensmechanismus in Abhängigkeit der Pulsdauer detaillierter untersuchen zu können, wurde die Nukleation bei RPE-Bestrahlung *in vitro* detektiert und anschließend mit Calcein-AM die Zellvitalität geprobt. Die Blasenbildung lässt sich sowohl akustisch als auch optisch detektieren. Beim ersten Verfahren werden die bei der Nukleation entstehen Druckwellen nachgewiesen [21], das zweite basiert auf der erhöhten Reflexion von Licht an der entstehenden Wasser-Wasserdampf-Grenzfläche [22]. Experimentell wurde mit Einzelpulsen verschiedener Pulsdauer sowohl reflektometrisch als auch optoakustisch deutlich Blasenbildung bei allen untersuchten Pulsdauern detektiert. Aus den gemessenen Daten wurden mittels Probit-Algorithmus [23] die ED_{50} -, ED_{15} - und ED_{85} -Schwellenwerte für Mikroblasenbildung und Zelltod bestimmt (Abb. 8 [24]).

Es zeigt sich, dass bei $5\ \mu\text{s}$ Pulsdauer ein Zellschaden bei allen RPE-Proben immer mit Bildung von Mikroblasen einhergeht. Lediglich bei insgesamt 12 der 480 applizierten $5\ \mu\text{s}$ Laserpulse konnte Mikroblasenbildung ohne RPE-Schädigung nachgewiesen werden [24]. Die Schwelle für den Verlust der RPE-Vitalität liegt um den Faktor 1,1

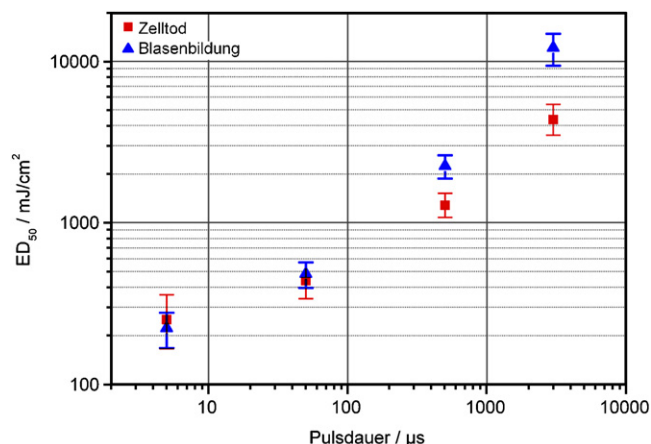


Abbildung 8. ED_{50} -Bestrahlungsschwellen für detektierte Blasenbildung und Zellschädigung bei verschiedenen Bestrahlungszeiten. Die Fehlerbalken geben die Breite der logarithmischen Normalverteilung (ED_{15} , ED_{85}) an. Lediglich bei $5\ \mu\text{s}$ Pulsdauer liegt die Blasenbildungsschwelle unterhalb der Schwelle für Zellschaden. Hier muss primär ein thermomechanischer Ursprung der Schädigung angenommen werden, während für Pulsdauern $> 50\ \mu\text{s}$ eine rein thermische Denaturierung an der ED_{50} -Schwelle wahrscheinlicher ist.

oberhalb der Schwelle für Mikroblasenbildung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass hier die Blasenbildung an den bis zu 200 Melanosomen pro Zelle zu einer kurzzeitigen Volumenvergrößerung führt, in Folge derer die Zellmembran stark geschädigt wird, da diese lediglich kleine Überdehnungen bis zu wenigen Prozent ausgleichen kann [25]. Dieses erklärt auch die selten beobachtete Blasenbildung ohne Zelltod.

Bei $50\ \mu\text{s}$ Pulsdauer wird bei der ED_{50} -Bestrahlung in 16% der Fälle Mikroblasenbildung nachgewiesen. An der Schwelle kommt es bei dieser Pulslänge somit vorherrschend (84%) zu einer RPE-Schädigung ohne Mikroblasenbildung. Bei $500\ \mu\text{s}$ und $3\ \text{ms}$ liegt die Schwelle für Blasenbildung mit dem Faktor 1,8 ($500\ \mu\text{s}$) und 2,8 ($3\ \text{ms}$) deutlich oberhalb der RPE-Schadensschwelle [24]. Hier ist damit primär von einem rein thermischen Schaden auszugehen, wie es für ähnliche Bestrahlungsdauern auch anderweitig nachgewiesen wurde [4].

Zusammenfassend zeigen die experimentellen Ergebnisse, dass für Einzelpulse von $5\ \mu\text{s}$ Pulsdauer immer intrazelluläre Mikroblasenbildung um die Melanosomen auftritt, wenn RPE-Zellen geschädigt werden. Da bei kürzeren Pulsdauern noch weniger Wärme während der Bestrahlung in das Zellplasma abgeführt wird, ist folglich auch bei Pulsen $< 5\ \mu\text{s}$ die Formation von Mikroblasen für den Zelltod verantwortlich.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass auch eine zelluläre Schädigung über Schockwellen oder Zugwellen in Erwägung gezogen werden muss, insbesondere wenn

die Pulsdauer in den Bereich der akustischen Einschusszeit kommt. Diese liegt bei den ca. $1\ \mu\text{m}$ großen Melanosomen allerdings unterhalb einer Nanosekunde und ist daher nur für entsprechend kurze Pulsdauern von Bedeutung. Letztlich sind auch phototoxische Schäden der Zelle durch beschädigte Melanosomen denkbar [26]. Zellschäden auf dieser Basis sind allerdings langfristige Effekte und bei den hier gefundenen, instantan auftretenden Schädigungen vermutlich auszuschließen.

Optimale Bestrahlung für die SRT

Zur Beurteilung der optimalen Bestrahlungsparameter, insbesondere auch der Pulsdauer, muss jedoch ein weiteres Faktum berücksichtigt werden: Selektivität und Sicherheit der Bestrahlung müssen auch bei Pulsenergien deutlich oberhalb des Bestrahlungsschwellwerts, der bisher diskutiert wurde, gegeben sein. Hierzu ist zu berücksichtigen, dass zum einen die Pigmentierung und damit Absorption der Strahlung intra- und interindividuell deutlich unterschiedlich ist. Zum anderen ist zwar die Pulsenergie vor dem Auge messbar, die Bestrahlung auf der Netzhaut aber nur abschätzbar, da die Transmissions-eigenschaften des Auges sich mit Alter, Pathologie und evtl. Linsentrübung (Katarakt) ändern. Die SRT muss bezüglich der Bestrahlung in einem so genannten „therapeutischen Fenster“ sicher sein, in dem garantiert keine anliegenden Gewebe beeinträchtigt werden.

Zunächst stellt sich die Frage welcher Schadensmechanismus für selektiv auf das RPE zu beschränkende Effekte geeignet ist. Rein thermische Effekte sind in der Regel bezüglich der Variation der Bestrahlung nicht selektiv, d.h. das thermisch denaturierte Volumen nimmt mit steigendem Wärmeeintrag graduell zu. Bei der thermomechanisch induzierten Zelldisruption auf der Basis intrazellulärer Mikroblasen stellt sich die Frage, ob die intrazelluläre Mikroblasenbildung anliegendes Gewebe beeinträchtigen kann. Prinzipiell sind zur primär mikroblaseninduzierten Zelldisruption Pulsdauern $\leq 5\ \mu\text{s}$ geeignet (Abb. 8). Auf Grund der Wärmeableitung steigt die Schwellbestrahlung zur Nukleation aber mit der Pulsdauer an. Bei einer Pulsdauer von $5\ \mu\text{s}$ liegt sie bei $250\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ und sinkt näherungsweise proportional zur Expositionsdauer auf $90\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ aufgrund des während der Bestrahlung reduzierten Wärmeabflusses (Daten für Schweine-RPE) [13]. Die dissipierte Energie trägt zur Blasenbildung jedoch nicht bei. Von diesem Standpunkt aus gesehen sollten Pulsdauern deutlich unterhalb der thermischen Relaxationszeit anzustreben sein, da hier die insgesamt eingebrachte Energie zur Nukleation am geringsten ist.

Bei der Vaporisation darf die Dynamik der schnellen, explosiven Verdampfung nicht außer Acht gelassen werden, die angrenzendes Gewebe mechanisch schädigen kann. Eine mögliche Disruption der Photorezeptoren

oder der Äderchen der Choroidea mit resultierenden Blutungen an der Netzhaut sind unbedingt zu vermeiden.

Da Melanosomen von Schweinen Rotationsellipsoiden mit Durchmessern von etwa $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ gleichen [27], werden Blasengrößen von wenigen Mikrometern erwartet. Dieser Bereich ist gerade noch mit mikroskopischen Verfahren zugänglich, so dass die Verdampfungsblasen mit Hilfe der Kurzzeitmikrophotographie sichtbar gemacht werden können. Um die entstehenden Blasen in ihrer Lebensdauer und Maximalgröße für verschiedene Pulsdauern zu erfassen, wurden Messungen mit Hilfe von Kurzzeitphotographie sowie -und Interferenzmessungen durchgeführt [27]. Für die Experimente wurde ein Modellsystem bestehend aus einer wässrigen Melanosomensuspension gewählt.

Zur Bestrahlung der Melanosomen wurde neben dem gütegeregelten Nd:YLF-Laser mit einstellbarer Pulsdauer (200 ns–5 μs bei 527 nm) ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (12 ns bei 532 nm) benutzt. Zur Mikrophotographie der Blasen mittels einer CCD-Kamera fand ein beliebig triggerbarer stickstofflaser-gepumpter Farbstofflaser (3 ns bei 470 nm) zur Beleuchtung Verwendung. Zusätzlich wurde die Strahlung eines Helium-Neon-Lasers in den Strahlengang gekoppelt. Die durch die Probe in eine Messapertur transmittierte Strahlung verringert sich beim Aufschwingen einer Blase (Abb. 9 [27]) aufgrund von Lichtbrechung an ihrer Grenzfläche. Auf diese Weise kann sowohl die Gesamtlebensdauer der Blase einfach detektiert als auch mittels parallel aufgenommener Photos ihre Größe zu beliebigen Zeitpunkten bestimmt werden (Abb. 10 [27]).

Zunächst konnte mit Hilfe einer interferometrischen Messmethode gezeigt werden, dass Blasenexpansion und -kollaps um ein isoliertes Melanosomen symmetrisch verlaufen, d.h. die Blase erreicht nach der halben Lebensdauer ihre maximale Ausdehnung [27]. Mit Hilfe von Kurzzeitphotographien zum Zeitpunkt der halben Lebensdauer kann nun die maximale Ausdehnung der Blase zu ihrer Lebensdauer in Beziehung gesetzt werden. Es ergibt sich für den maximalen Blasendurchmesser d_{max} (in μm) und die Blasenlebensdauer τ die proportionale Beziehung: $d_{\text{max}} = a \cdot \tau$ mit $a = 11\ \mu\text{m}/\mu\text{s}$.

Aus der Blasenlebensdauer, die mit Hilfe der Transmissionssignale gewonnen wird, kann so direkt auf die maximale Blasenausdehnung geschlossen werden. Typische Transmissionssignale für Bestrahlungen mit 12 ns und mit $1,8\ \mu\text{s}$ sind in Abbildung 9 dargestellt [27]. Es wird ersichtlich, dass sich die Blasendynamik für diese beiden Pulsdauern deutlich voneinander unterscheidet: Beins-Bestrahlung nimmt die Blasenlebensdauer (bzw. Blasen-größe) mit steigender Bestrahlung zu (Abb. 9, links). Werden Melanosomen mit Mikrosekundenpulsen bestrahlt, kommt es mit zunehmender Bestrahlung zu Blasenoszillation (Abb. 9 rechts). Die Lebensdauer und damit auch die Größe bleiben jedoch auf ca. $4\ \mu\text{m}$ beschränkt (Abb. 10 [27]).

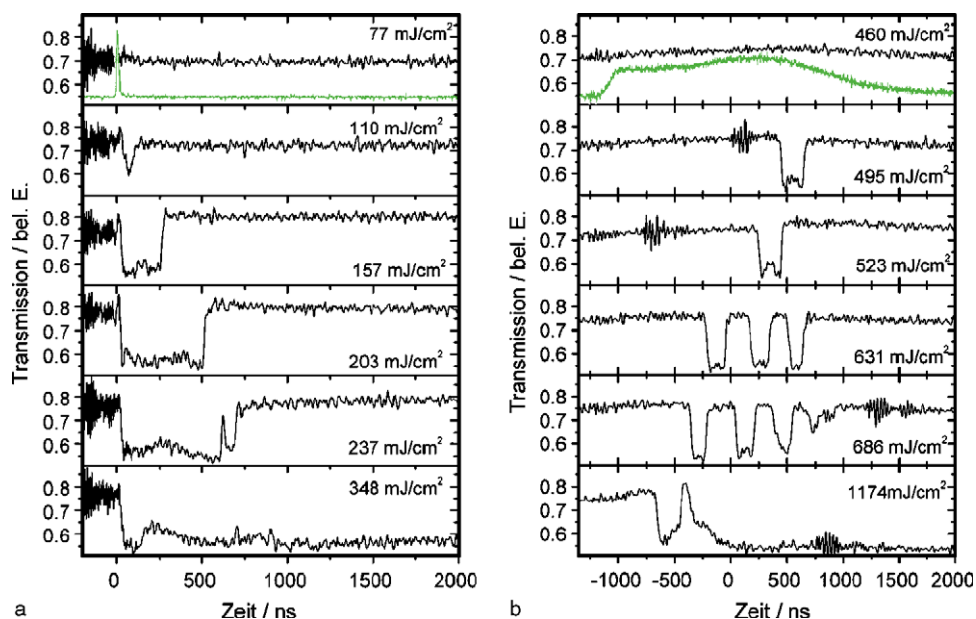


Abbildung 9. Messung zur Lebensdauer von Mikrodampfblasen um isolierte Melanosomen für Pulsdauern von 12 ns (links) und 1,8 µs (rechts), Laserphase jeweils grün dargestellt. Der Abfall des Messsignals indiziert die Existenz und demarkiert die Lebensdauer einer Blase.

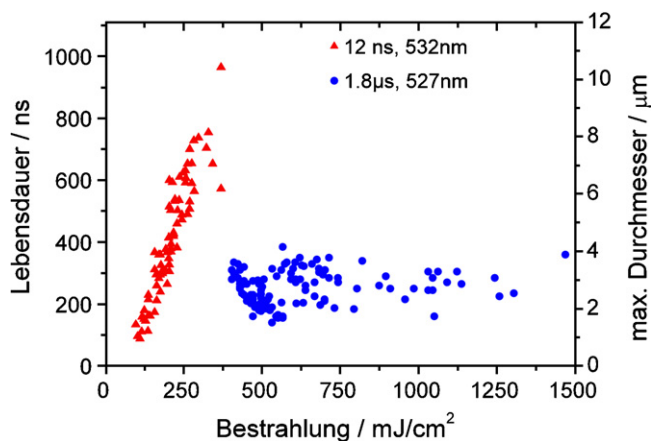


Abbildung 10. Abhängigkeit der Größe und -Lebensdauer von Mikrobblasen um einzelne Melanosomen in Suspension von der Bestrahlung für Pulsdauern von 12 ns und 1,8 µs oberhalb der Nukleationsschwelle.

Die Blasendynamik infolge von Mikrosekundenpulsen lässt sich qualitativ wie folgt erklären: Während der Erhitzung der Melanosomen durch die absorbierte Laserstrahlung findet nennenswerte Wärmeleitung in die Umgebung statt. Die Blasennukleationstemperatur hängt von der Oberflächenbeschaffenheit des Melanosoms ab und übersteigt im Allgemeinen die Gleichgewichtssiedetemperatur von 100 °C (s.o.), so dass das Melanosom von Wasser im metastabilen Zustand umgeben ist [20]. Ist das Melanosom durch die Laserstrahlung soweit erhitzt, dass

die Nukleationstemperatur von ca. 140 °C erreicht wird [13,20], so findet ausgehend von der Melanosomenoberfläche ein Phasenübergang statt, d.h. es bildet sich eine Dampfblase. Wächst die Blase aus dem Bereich des überhitzten Wassers heraus, kondensiert der in der Blase enthaltene Wasserdampf an ihrer Grenzfläche, während das Melanosom kurzzeitig thermisch isoliert ist. Der Dampfdruck im Blaseninneren nimmt ab, was letztlich zum Blasen kollaps führt. Mit zunehmender Bestrahlung verlagert sich der Nukleationszeitpunkt zum Beginn des Laserpulses, da bei höherem Energieeintrag die Nukleationstemperatur schneller erreicht wird. Ist der Laserpuls deutlich länger als die Blasenlebensdauer, kann der Nukleationsprozess erneut stattfinden, so dass es zu Blasenoszillationen kommt (Abb. 9, rechts). Mit Verschiebung des Nukleationszeitpunktes hin zum Pulsbeginn verringert sich die Dicke der erhitzten Wasserschicht um das Melanosom, was nach dem Modell zur Folge hat, dass die Lebensdauer der jeweils ersten Blase mit zunehmender Pulsenergie abnimmt. Dieser Effekt lässt sich auch am Experiment verifizieren und ist andeutungsweise in Abbildung 9 zu sehen.

Da für Nanosekundenbestrahlung während des Pulses jedoch kaum Wärme in die wässrige Umgebung abfließt, aber trotzdem Nukleation auch während des Pulses beobachtet wird [20], die deutlich größere Blasen als bei Mikrosekundenbestrahlung entstehenden lässt, muss ein anderer Prozess für die Blasendynamik bestimmend sein: Die Erhitzung von Melanosomen (und des umliegenden Wassers) in kurzen Zeiträumen führt zu einer schnellen

thermischen Ausdehnung, die das Entstehen einer thermoelastischen Druckwelle zur Folge hat. Die maximale Druckamplitude steigt hierbei mit kürzerer Pulsdauer. Sie ist, wie Abschätzungen zeigen, bei μs -Pulsen im Vergleich zu ns-Pulsen vernachlässigbar klein. Durch diesen zusätzlichen Druck überhitzt sich das Wasser stärker als bei μs -Strahlung, die Nukleationstemperatur steigt dadurch stark bis zum spinodalen Punkt an. Entsprechend explosiver ist die einsetzende Vaporisation. Die Blasenwandgeschwindigkeit steigt nahezu linear mit der Bestrahlung an, 4-fach oberhalb der Nukleationsschwelle wurden Geschwindigkeiten $> 40 \text{ m/s}$ bestimmt [28]. Dieses führt letztlich zu den großen, beobachteten Blasen. Zusätzlich sind die entstehenden Druckwellen immer bipolar, d. h. sie besitzen einen Zugwellenanteil, der die plötzliche Nukleation unterstützt. Abschätzungen zeigen jedoch, dass dieser Beitrag gegenüber der starken Überhitzung wohl nur eine kleinere Rolle spielt [28].

Im Hinblick auf die SRT und ein adäquates therapeutisches Fenster scheinen die hier vorgestellten Ergebnisse Mikrosekundenpulse gegenüber Nanosekundenpulsen zu favorisieren: Bei Mikrosekundenpulsen ist die maximale Blasengröße um ein Melanosom und damit der Schadensradius weitgehend unabhängig von der deponierten Energie, so dass die Wahrscheinlichkeit für ungewollte Schädigung der an das RPE angrenzenden Photorezeptoren auch bei hoher Dosierung der Laserstrahlung eher klein ist. Allerdings wird in diesen Experimenten das Zusammenwachsen von eng benachbarten Blasen, wie es in den dicht pigmentierten RPE-Zellen vorkommt (Abb. 1), nicht berücksichtigt. Dieses führt jedoch grundsätzlich bei allen Pulsdauern eher zu größeren Blasen. Weiterführende interferometrische Messungen an RPE-Präparaten zeigen das Zusammenwachsen solcher Blasen bei Pulsdauern von $1,7 \mu\text{s}$ ab etwas einem Faktor 4 oberhalb der Zellschädigungsschwellwertbestrahlung [29], gleiche Messungen für ns-Pulse stehen zur Zeit noch aus. Bezüglich der auf das bestrahlte Areal beschränkten Zellschädigung konnte gezeigt werden, dass erst ab einem Faktor > 3 (300 und 1700 ns) auch nicht bestrahlte RPE-Zellen geschädigt werden. Es ist somit davon auszugehen, dass die Mikroblasenbildung eine ausreichende Zellselektivität erzielt [29].

In-vivo-Untersuchungen

Zur Untersuchung der Beeinträchtigung der angrenzenden Netzhaut und der Photorezeptoren sind in-vitro-RPE-Präparate ungeeignet, da sich die neuronale Netzhaut bereits innerhalb einer Stunde post mortem vom RPE ablöst. Daher wurden einige Experimente am Kaninchenmodell durchgeführt. In vivo lassen sich RPE-Schäden durch Fluoreszenzangiographie (FLA) demarkieren, ein Standardverfahren zur Darstellung von Patho-

logien an der Netzhaut. Hierzu werden Farbstoffe wie z.B. Fluoreszein verwendet, das mit blauem Licht zu grüner Fluoreszenz angeregt werden kann. Zur Gefäßdarstellung (Angiographie) wird Fluoreszenzfarbstoff in die Blutbahn injiziert. Da das RPE mit seinen interzellulären Verbindungen (tight junctions) die Blut-Retina-Schranke darstellt und zudem stark pigmentiert ist, sind an gesunden Augen lediglich die Gefäße der Netzhaut, nicht jedoch die der Aderhaut in Fluoreszenz zu erkennen. Bei geschädigtem RPE oder tight junctions kann jedoch Fluoreszein durch diese Areale in die Netzhaut diffundieren. Kurz nach Injektion eines Fluoreszein-Bolus lassen sich dann am Gefäßsystem veränderte Areale am Augenhintergrund ebenso sichtbar machen wie die als hyperfluoreszierende Spots erscheinenden laserinduzierten Schäden am RPE.

Für verschiedene Bestrahlungsparameter wurden so die ED_{50} -Bestrahlungen für angiographisch sichtbare RPE-Leckage bestimmt. Ferner wurde die ED_{50} , bei der im Weißlicht erste sichtbare Veränderungen auftreten, als ophthalmoskopische Schwelle bestimmt, die, belegt durch vielfache histologische Untersuchungen, mit einer Koagulation der Photorezeptoren assoziiert werden kann. Der Quotient aus der 14%-igen Wahrscheinlichkeit der Erzeugung einer angiographisch sichtbaren zu der 86%-igen Wahrscheinlichkeit einer optisch sichtbaren Veränderung wurde als „therapeutisches Fenster“ definiert.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die Pulsdauer von $1,7 \mu\text{s}$, im Vergleich zu experimentell ebenfalls erprobten 200 ns zeigt Tabelle 1 [30]. Bei allen sechs untersuchten Parametern ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen angiographischer und ophthalmoskopischer Schwelle. Im Bereich des „therapeutisches Fensters“ sind die gesetzten RPE-Defekte damit optisch im Weißlicht nicht sichtbar. Generell wurde eine Abnahme beider ED_{50} -Werte mit geringerer Pulsdauer sowie mit einer Erhöhung der Pulsanzahl gefunden, abgesehen von den nicht signifikant höheren Werten bei $1,7 \mu\text{s}$ mit 100 Pulsen. Wie zuvor in vitro (Abb. 7) zeigt sich der positive additive Effekt repetitiv applizierter Pulse.

Tabelle 1
Vergleich der Schwellbestrahlungen für verschiedene Bestrahlungen [30].

Parameter	$\text{ED}_{50\text{opt}}$ (mJ/cm^2)	$\text{ED}_{50\text{ang}}$ (mJ/cm^2)	$\text{ED}_{50\text{opt}}/\text{ED}_{50\text{ang}}$	$\text{ED}_{14\text{opt}}/\text{ED}_{86\text{ang}}$
200 ns 1 Puls	355	127	2,8	1,1
200 ns 10 Puls	335	93	3,6	1,6
200 ns 100 Puls	250	44	5,7	2,8
$1,7 \mu\text{s}$ 1 Puls	461	292	1,6	0,6
$1,7 \mu\text{s}$ 10 Puls	312	127	2,5	1,0
$1,7 \mu\text{s}$ 100 Puls	356	135	2,6	1,6

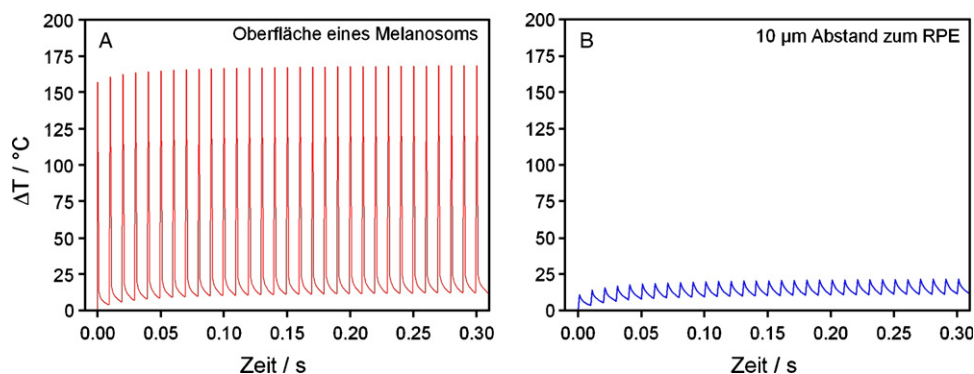


Abbildung 11. Berechneter Temperaturverlauf an der Oberfläche eines Melanosoms und in 10 µm Abstand bei repetierender Bestrahlung mit 100 Hz, einer Einzelpulsenergie von 200 µJ, Pulsdauer 1,7 µs, 200 µm Spotdurchmesser, wie es zur Zeit für die SRT verwendet wird. Bestrahlung: 637 mJ/cm².

Blutungen oder Rupturen an der Netzhaut wurden im gesamten untersuchten Bereich dabei nicht gefunden. Das größte therapeutische Fenster zeigt sich bei 200 ns mit applizierten 100 Pulsen. Ausreichend hohe Werte werden jedoch auch noch bei 10 Pulsen mit 200 ns und 100 Pulsen mit 1,7 µs erzielt (Tabelle 1). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das therapeutische Fenster bei 5-µs-Pulsen bereits deutlich kleiner ist [31]. Diese Ergebnisse zeigen damit einen für die SRT prinzipiell geeigneten Parameterbereich auf unter Voraussetzung der Übertragbarkeit dieser Werte auf den Menschen. Je kleiner das therapeutische Fenster ist, je näher muss dicht oberhalb der angiographischen Schwelle bestrahlt werden und umso wichtiger ist eine empfindliche Dosimetriekontrolle.

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen allerdings keine Schlüsse über mögliche mechanisch induzierte Schäden an den Photorezeptoren oder der neuralen Netzhaut zu, wie sie möglicherweise durch die Mikrovaporisation oberhalb der angiographischen Schwelle erzeugt werden können. Hierzu stehen detaillierte Untersuchungen noch aus. Ferner können die an jungen, gesunden Kaninchenaugen erzielten Ergebnisse wohl nur begrenzt auf pathologische, alterveränderte humane Augen übertragen werden. Für die ersten klinischen SRT-Studien wurde daher aus Sicherheitsaspekten die Pulsdauer von 1,7 µs gewählt. Weitere, bereits begonnene Studien werden zeigen ob kürzere Pulsdauern und andere Applikationsparameter jedoch möglicherweise besser für die SRT geeignet sind.

Abbildung 11 [32] zeigt hierzu exemplarisch den mit dem vorgestellten Modell berechneten Temperaturverlauf für die zur Zeit für die SRT verwendeten Parameter mit einer Pulsfrequenz von 100 Hz für einen Bestrahlungspottdurchmesser von 200 µm. Es wird deutlich, dass die Temperaturspitzen z.B. auf der Höhe der Außensegmente der Photorezeptoren in 10 µm Abstand zu den Absorbern deutlich abgenommen haben (Abb. 5) und es insbesondere zu keinem wesentlich erhöhten Basistemperaturanstieg kommt. Gegenüber der Photokoagulation, bei der ein

Areal von 200 µm im Durchmesser typischerweise mit ca. 200 mW bestrahlt, beträgt bei der SRT die applizierte mittlere Leistung lediglich 20 mW, entsprechend niedriger ist die mittlere Temperaturerhöhung. Der Anstieg um ca. 10 Grad für 300 ms reicht für eine Koagulation nicht aus.

Pilotstudie

Für eine erste klinische Pilotstudie wurden drei unterschiedliche Krankheitsbilder ausgewählt, bei denen eine RPE-Degradation wahrscheinlich ist (s. Motivation): die diabetische Makulopathie, die persistierende Retinopathie Centralis Serosa (RCS) sowie die Drusenmakulopathie als Vorstufe der altersbedingten Makuladegeneration (AMD).

Bis Ende 2002 wurden insgesamt ca. 130 Patienten mit dem oben beschriebenen Nd:YLF-Laser in Lübeck behandelt. Hierzu wurde für den Experimentallaser eine Ausnahmegenehmigung nach der damals geltenden Medizingeräteverordnung (MedGV) erteilt. Pro Bestrahlungsareal wurden 30-100 Laserpulse einer Pulsdauer von 1,7 µs bei konstanter Pulsleistung mit einer Pulsfrequenz von 100 oder 500 Hz appliziert. Die retinale Spotgröße betrug 160 µm [33,34].

Auf Grund der bereits am Kaninchen beobachteten Unsichtbarkeit der Laserherde im therapeutischen Fenster wurde folgende Dosierungsstrategie festgelegt: Zunächst werden Testpulse mit aufsteigender Pulsenergie am Gefäßbogen, der sich um die Makula zieht, appliziert. Hierauf erfolgt eine FLA um festzustellen, bei welcher Pulsenergie erstmals eine Leckage eintritt. Mit dieser Pulsenergie wird anschließend die eigentliche SRT-Behandlung im pathologischen Areal durchgeführt. Eine Stunde nach SRT erfolgt eine zweite FLA, um den selektiven RPE-Effekt im Behandlungsareal zu dokumentieren. Wird mittels SRT eine RPE-Läsion erzeugt, ist dies an einer punktförmigen Hyperfluoreszenz in der FLA zu

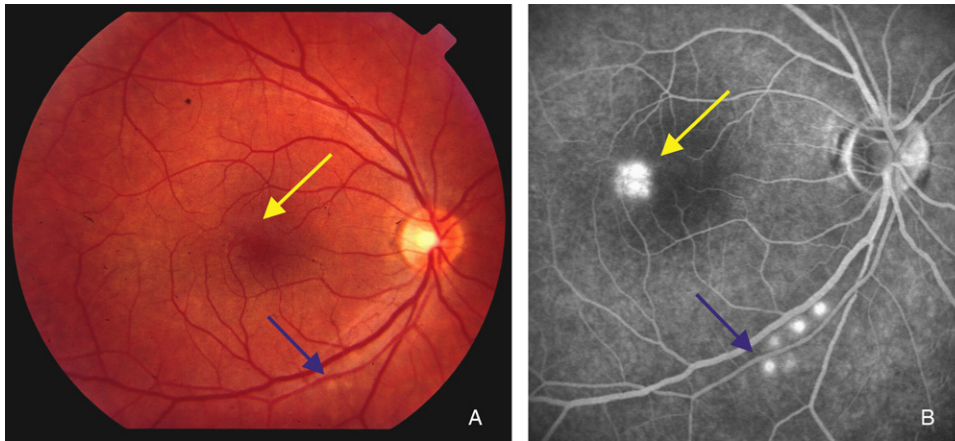


Abbildung 12. Fundusphotographie (A) und Fluoreszenzangiographie (B) eine Stunde nach SRT. Die hellen Punkte in B markieren die SRT-Laserherde in der Angiographie. Die Testläsionen zwischen den Gefäßen, die zur Dosimetrie vor der Behandlung gesetzt werden, zeigen bei höchster Pulsenergie (blaue Pfeile) erste Graufärbungen als Indiz einer Photokoagulation. Die Behandlungsherde (gelbe Pfeile) sind im Fundusbild nicht erkennbar.

erkennen. Werden keine Leckagen oder deutlich weniger als per Laser appliziert gefunden, so wird mit höherer Pulsenergie nachbehandelt.

Bereits die ersten Bestrahlungen am Patienten bestätigten die Ergebnisse am Kaninchen: Bei richtiger Dosierung sind optisch keine Koagulationen auszumachen, in der Fluoreszenzangiographie aber deutlich Leckagen zu erkennen, wie in Abbildung 12 (nach [35]) exemplarisch gezeigt ist. Die Spanne der beobachteten Schwellwertbestrahlungen zur RPE-Leckage liegen bei 350–650 mJ/cm² pro Puls (30 Pulse, 100 Hz) und damit deutlich über den am Kaninchen in vivo und an Schweine-RPE ex-vivo gemessenen [13]. Ursächlich hierfür sind vermutlich die geringere humane RPE-Absorption und die Strahlungstransmission durch das Auge, die mit dem Alter deutlich abnimmt. Mikroperimetrische Untersuchungen am Patienten zu verschiedenen Zeiten post SRT zeigten, dass es in den behandelten Arealen bei Pulsfolgeraten von 100 Hz zu keinerlei Sehausfällen (Skotomen) kommt [11]. Temperaturmessungen während der Bestrahlung und Rechnungen ergaben ferner eine auf lediglich 42 °C ansteigende Basistemperatur [36].

Therapeutisch konnte bei den Patienten mit diabetischer Makulopathie in ca. 50-60% der Behandlungen eine Reduktion des Makulaödems im Anschluss an die SRT erzielt werden, wobei geringe Makulaödeme besser auf die SRT ansprachen als Befunde mit ausgeprägten Arealen. Bei Drusenmakulopathie zeigte sich ein Rückgang der Drusen bei ca. 30% der Patienten. Eine sekundäre Einsprossung von Gefäßneubildungen, wie sie oft nach konventioneller Laserbehandlung gefunden wird, ist nach SRT nicht beobachtet worden. Die Patienten mit einer RCS reagierten am positivsten auf die SRT. Von insgesamt 11 behandelten Patienten zeigten 8 eine eindrucksvolle Reduktion der Ödeme bereits nach 3 Monaten.

3 Patienten wiesen nach drei Monaten noch eine Leckage am Quellpunkt auf, der durch Nachbehandlung jedoch ebenfalls inaktiv wurde. Parallel wurde ein Wiederanstieg des Visus beobachtet [33,34].

On-line-Dosimetrie

Eine wesentliche Einschränkung der SRT ist die Unsichtbarkeit der bestrahlten Areale für den behandelnden Arzt, was eine sichere Dosierung der Pulsenergie und exakte Platzierung der Herde zueinander deutlich erschwert [11]. Es besteht daher dringender Bedarf an einem nicht-invasiven On-line-Detektionsverfahren zum Monitoring der selektiven RPE-Effekte. Idealerweise sollte ein solches dem Ophthalmologen direkt während der Behandlung als Kontrolle dienen, da zum einen die RPE-Schädigungsschwellwerte sowohl intra- als auch interindividuell deutlich schwanken und zudem das therapeutische Fenster zwischen Unter- (kein Effekt) und Überdosierung (Koagulation und evtl. Disruption von Netz- und Aderhaut) begrenzt ist. Vergleichbar zur Tierstudie konnte in der klinischen Pilotstudie an den Testläsionen beobachtet werden, dass bei Pulsenergien von etwa 2-fach oberhalb der angiographischen Schwelle die ersten Graufärbungen auftreten, die auf Koagulation der Photorezeptoren hinweisen. Daher ist ein zuverlässiges Dosimetrieverfahren für die Sicherheit und Reproduzierbarkeit der Behandlung und die klinische Verbreitung der SRT unerlässlich.

Nachdem zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die selektiven RPE-Schäden bei μ s-Pulsdauern höchstwahrscheinlich auf mikroblasseninduzierter Zelldisruption basieren [13,21,35], ist es nahe liegend, die Formation von Mikroblassen als Erfolgskriterium zu untersuchen. Zur

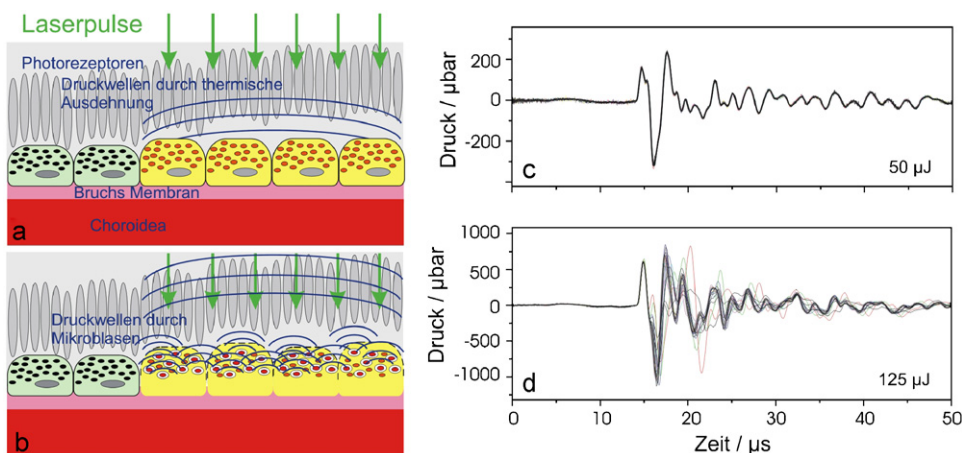


Abbildung 13. Links: Skizze zur Druckentstehung am RPE rechts: am Patienten gemessene Drucktransiente. Hier sind jeweils die Ultraschallwellen aller 30 Pulse pro Herd zeitrichtig überlagert dargestellt. A, B: Bestrahlung unterhalb der Nukleationsschwelle. Nur eine bipolare, thermoelastische Druckwelle ist messbar. C, D: Bestrahlung oberhalb der Nukleationsschwelle. Die erste Spitze der Transienten zeigt wiederum die thermoelastische Ausdehnung. Nach Überschreitung der Nukleationstemperatur kommt es zur Blasenbildung an den Melanosomen, die bei jedem Puls statistisch anders ausfällt.

Blasendetektion bieten sich, wie oben diskutiert, prinzipiell optische [22,27] und akustische Verfahren [21,35] an. Erste Abschätzungen zum Signal/Untergrund favorisierten ein akustisches Verfahren. Abbildung 13 (a, c) skizziert die Entstehung akustischer Transienten bei der SRT. Zunächst kommt es durch die Absorption der Strahlung zur Erhitzung der Melanosomen und in geringerem Maß auch der Umgebung. Dieses bewirkt eine thermoelastische Gewebeausdehnung mit der Emission einer Druckwelle [21]. Bei Überschreitung der Vaporisationstemperatur kommt es zur Mikroblassenbildung an den einzelnen Melanosomen mit der jeweiligen Emission individueller Druckwellen durch die Blasendynamik. Die Ultraschallwellen mit Frequenzen im Megahertzbereich durchqueren den Augapfel und können nichtinvasiv an der Hornhaut des Auges gemessen werden. Hierzu wurde in ein zur Behandlung ohnehin benötigtes Kontaktglas ein Ultraschallwandler integriert (Abb. 14 [37]). Die verstärkten Signale können dann mit einem Transientenrecorder oder einer entsprechenden Datenaufnahmekarte gemessen und per PC verrechnet werden.

Abbildung 13(b,d) [37] zeigt typische akustische Transienten einer Patientenbehandlung. Es wurden hier alle 30 Transienten eines Pulszugs zeitrichtig überlagert. In Abbildung 13(b) bei Bestrahlung unterhalb des Schwellwerts zur Blasenbildung sind typische thermoelastische bipolare Transienten detektierbar. Bei Bestrahlungen oberhalb der Nukleationsschwelle, Abbildung 13d, unterscheiden sich die Transienten nach dem ersten Peak des Signals, der bei allen Kurven gleich bleibt und wiederum auf die thermoelastische Expansion nach anfänglicher Erhitzung zurückzuführen ist. Die transienten Abweichungen basieren auf

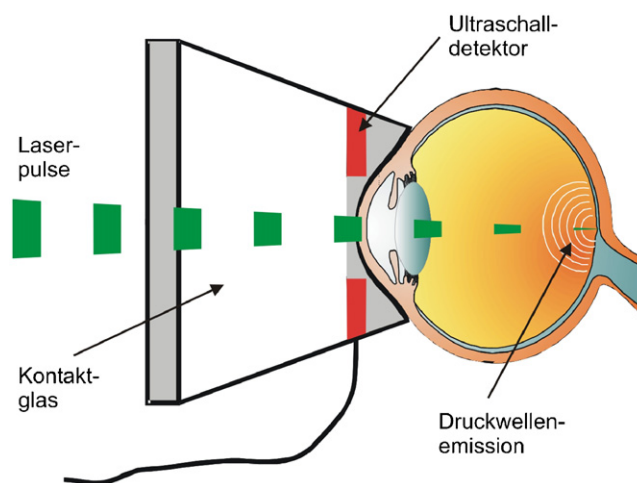


Abbildung 14. Kontaktglas mit integriertem Ultraschallaufnehmer.

der statistisch bei jedem Einzelpuls unterschiedlichen Mikroblassenbildung. Aus den Abweichungen wurde mit einem mathematischen Algorithmus ein sogenannter „optoakustischer“ Wert (OA-Wert) extrahiert [21,35], der ein Maß für die maximale Abweichung des Signals vom Mittelwert des Transienten darstellt. In in-vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren äußerst empfindlich ist und bereits die Schädigung einzelner Zellen eines großen Areals bei sehr schwelennaher Bestrahlung detektierbar macht [35].

Um die Korrelation des akustischen Werts zur bisher als Kriterium verwendeten Fluoreszenz-Leckage am RPE

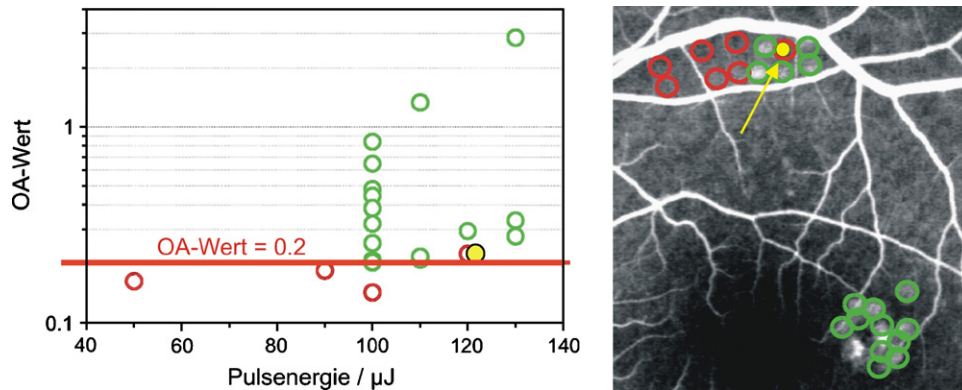


Abbildung 15. Vergleich zwischen angiographisch sichtbarer Fluoreszein-Leckage und optoakustischem Wert nach SRT am Beispiel eines RLS-Patienten. Legt man die Schwelle auf $OA = 0.2$, so ergibt sich in 22 von 23 Bestrahlungsorten eine richtige Korrelation. Grün: angiographisch sichtbar, rot: angiographisch nicht sichtbar. Der einzige falsch-positive Wert dicht oberhalb des Grenzwerts ist gelb bezeichnet.

zu zeigen, wurden an mehreren Patienten Herd für Herd OA-Werte und fluoreszenzangiographische Leckage verglichen, wie exemplarisch für einen Patienten gezeigt (Abb. 15 [35]). Legt man hier z.B. am Wert $OA = 0.2$ eine Grenze, so ergeben sich bei diesem RCS-Patienten eine richtige Detektion von 22 Herden (inkl. der Testläsionen am oberen Gefäßbogen) sowie eine falsch-positive Zuordnung. Aufgrund der erzielten hohen Korrelation beider Messverfahren wird in der zur Zeit laufenden Multicenter-Studie der OA-Wert dem Arzt on-line angezeigt, um ihm so ein Kriterium zur effektiven schwellnahen Dosimetrie während der Behandlung an die Hand zu geben.

In weiterführenden Untersuchungen wird zur Zeit eine optisch-interferometrische Detektion der Blasenakkumulation untersucht [22]. Hierzu wird die erhöhte Reflexion von Strahlung durch den Brechungsindexsprung an der Blasenrenzfläche genutzt, um deren relative Bewegung nachzuweisen. Die interferometrische Detektion der Blasenbewegung hat gegenüber der reinen Reflektometrie den Vorteil, die vielfach auftretenden Rückstreuungen im Auge und an der Netzhaut auszublenden. Ferner gestattet sie zeitaufgelöste Messungen zur Blasenwandgeschwindigkeit und Blasenlebensdauer sowie die Blasen-detektion unabhängig für jeden einzelnen Puls, was sämtlich mittels Optoakustik bisher nicht möglich ist. Experimentell konnte die Mikrovaporisation *in vitro* an RPE-Proben bereits mit einem Freistrahl-Interferometer nachgewiesen werden [22]. Ziel eines zur Zeit laufenden BMBF-Projekts ist die Realisierung eines kompakten, hochempfindlichen, aber störungsempfindlichen Faserinterferometers, das direkt an eine optische Behandlungsspaltlampe integriert werden kann. Eine funktionelle, störungsempfindliche und nicht-invasive On-line-Bestrahlungskontrolle ist zur Reproduzierbarkeit und Verbreitung der SRT außerhalb großer Universitätskliniken unabdingbar.

Multicenter-Studie

Um das Potenzial der SRT näher zu evaluieren, wird derzeit eine multizentrische Studie mit Zentren in London (St. Thomas Hospital), Lübeck (Universitätsaugenklinik) und Kiel als Studienzentrum (Universitätsaugenklinik) durchgeführt. Folgende Krankheitsbilder sind indiziert: die diabetische Makulopathie (DMP) als besonders relevant, da sie neben der AMD die häufigste Erblindungsursache darstellt. Hier wird ein Anstieg der Diabeteserkrankungen von geschätzten 110 Millionen im Jahr 1994 auf 220 Millionen im Jahr 2010 erwartet. Ferner wird das Makulaödem nach retinalem Venenastverschluss therapiert. Wenige Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) in den Subformen der geographischen Atrophie und okkulten choroidale Neovaskularisation (CNV) werden bei passender Indikation exemplarisch therapiert. Weiterhin werden, außerhalb der Studie, RCS-Patienten behandelt, da sich bei ihnen ein besonders hoher Therapieerfolg herauskristallisiert.

Für die Studie wurden mit Unterstützung des Studienponsors Lumenis drei SRT-Laser am Medizinischen Laserzentrum Lübeck hergestellt (SRT-Laser, MLL GmbH). Konzeptionell wurde dazu ein kontinuierlich diodengepumpter, gütegeschalteter Nd:YLF-Laser mit resonatorinterner Frequenzverdopplung entwickelt [38]. Zur zeitlichen Streckung der Laserpulse von 200 ns auf $1,7 \mu\text{s}$ wird der Effekt der Überkopplung der Konversionseffizienz bei der resonatorinternen Frequenzverdopplung ausgenutzt [38]. In der Studie werden pro Bestrahlungsareal auf einen retinalen Spotdurchmesser von $200 \mu\text{m}$ 30 Laserpulse mit einer Pulsfolgerate von 100 Hz als Burst appliziert.

Der Behandlungseffekt wird funktionell durch Visusprüfung, angiographisch und morphologisch (Netz-

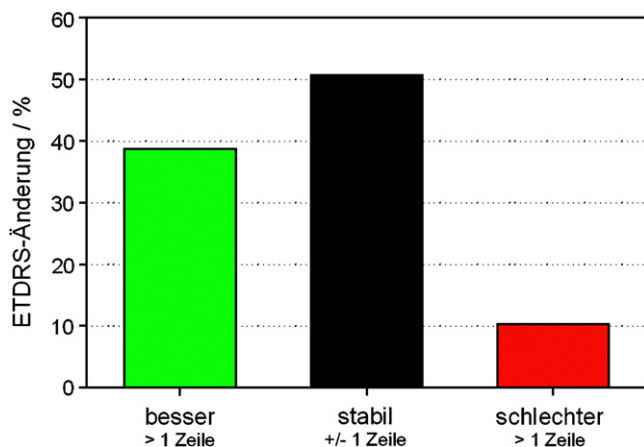


Abbildung 16. Visusauswertung anhand der ETDRS-Tafeln für 60 Patienten mit diabetischem Makulaödem 6 Monate nach SRT.

hautdickenmessung mittels optischer Kohärenztomographie [OCT]) bewertet. Verlaufskontrollen sind für die Patienten nach 3 und 6 Monaten vorgesehen. Das vorgestellte optoakustische Dosimetrieverfahren zur Bestimmung der Blasenbildungsschwelle wurde zur Erprobung in das System integriert. Dem behandelnden Arzt wird direkt nach jedem Burst der erzielte OA-Wert angezeigt [21]. Eine Stunde im Anschluss an die SRT-Behandlung erfolgen eine FLA und eine Indocyanin-Grün-Angiographie (ICGA), um den durch die SRT-Behandlung verursachten RPE Effekte nachzuweisen.

Die 60 DMP-Patienten wurden zur Bewertung der Visusentwicklung in drei Gruppen aufgeteilt, der Visus mit Hilfe der standardisierten ETDRS-Tafeln gewertet. Diese Tafeln bestehen aus jeweils 5 Buchstaben pro Zeile, wobei von Zeile zu Zeile die Größe der Buchstaben definiert abnimmt. Als Visusstabilisierung wurde die Sehstärke definiert, wenn der Visus innerhalb von ± 1 Zeile blieb, eine Visusverbesserung/–verschlechterung als Gewinn/Verlust der Sehkraft von > 1 Zeile.

Die Ergebnisse zeigen für die 60 behandelten Patienten einen Visusgewinn nach 6 Monaten in 38.7% der Fälle, eine Stabilisierung in 50.8% und einen Visusverlust in 10.5% der Patienten (Abb. 16) [39]. Mit der optischen Kohärenztomographie zeigt sich im Verlauf eine im Durchschnitt geringfügig abnehmende foveale Netzhautdicke von $350 \mu\text{m}$ auf $330 \mu\text{m}$ 6 Monate nach der Behandlung. Ferner konnte nach 6 Monaten konnte eine Reduktion der angiographisch sichtbaren Leckageaktivität in 24% der Patienten, eine Stabilisierung der Leckageaktivität in 38% und eine Zunahme der Leckageaktivität bei 38% der Patienten testiert werden [39].

Sowohl die funktionellen als auch morphologischen Ergebnisse bei den Patienten mit diabetischer Makulopathie

sind vielversprechend. Insbesondere scheinen Patienten mit früher foveanaher diabetischer Pathologie eine gute Indikation für die SRT zu sein, hier existieren auch keine anderen lasertherapeutischen Optionen.

Für Patienten mit persistierender RCS zeichnet sich bereits ab, dass diese von der SRT deutlich profitieren. Bei der jüngsten Behandlung von 27 Patienten mit mindestens 6 monatiger Visusreduktion wurde, bei 23 Patienten die subretinale Flüssigkeit komplett resorbiert, bei 4 Patienten wurde sie deutlich weniger [40]. Der Quellpunkt der Flüssigkeitsleckage im RPE war fluoreszenzangiographisch nachweislich innerhalb von 4 Wochen bei 26 Patienten geschlossen. Auch nach 3 Monaten war bei allen 16 weiterverfolgten Patienten keine subretinalen Ödeme mehr nachweisbar, der Visus stieg im Mittel innerhalb von 3 Monaten deutlich an [40]. Die Behandlung ist damit für RCS-Patienten außerordentlich erfolgreich und nebenwirkungsfrei. Gerade bei jüngeren Patienten kann so die einhergehende, äußerst störende Visusminderung sicher und ohne Gefahr von Gesichtsfeldeinbußen behandelt werden.

Ausblick

Das Potenzial der SRT wird sicher erst nach weiteren klinischen Studien besser determinierbar sein. Zurzeit sind weder die optimalen Bestrahlungsparameter noch die Behandlungsstrategie bezüglich der Applikationsgeometrie der Laserherde bekannt, die sich bisher nur an die konventionelle Behandlung anlehnen. Mit Blick auf die Applikationsmuster könnte eine scannend applizierte SRT eine Alternative zur gepulsten SRT darstellen. Hier wird ein kontinuierlicher Laserstrahl mit so hoher Geschwindigkeit über die Retina gescannt, dass jeder Punkt der Retina ebenfalls lediglich für Mikrosekunden bestrahlt wird. In vitro Ergebnisse zu einer scannenden zeigten die Machbarkeit der Technik [41] und eine selektive RPE-Leckage an Kaninchen für verschiedene Scanparameter ist demonstriert [42]. Die antizipierten und Vor- und Nachteile einer scannenden gegenüber einer gepulsten SRT sind ausführlich dargelegt [41].

Die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse bei Patienten mit verschiedenen Makulopathien zeigt, dass die SRT ein sicheres Laserverfahren für eine selektive RPE-Behandlung darstellt. Insbesondere aufgrund der scheinbar nebenwirkungsfreien Applikation ist die SRT auch im Frühstadium verschiedener Pathologien und in der zentralen Makula applizierbar, wo zurzeit keine andere konventionelle Behandlung indizierbar ist. Durch den Einsatz einer Online-Dosimetrie sollte die SRT auch für den klinischen Routinebetrieb praktikabel sein, da sie aufwändige Angiographien zur Demarkierung des Laser-effekts obsolet macht.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Roeder für die ersten experimentellen und klinischen Arbeiten zur SRT, Dr. Framme und Dr. Elsner für zahlreiche vorklinische und klinische Untersuchungen und Behandlungen sowie Dr. Kracht, Dr. Schüle und Dr. Neumann für grundlegende experimentelle Arbeiten zu Lasertechnik und Dosimetrie. Besonderer Dank gilt ferner dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Unterstützung des Vorhabens (13N7309 und 01EZ0408) sowie dem Studiensponsor Lumenis.

Literatur

- [1] Gabel VP. Die Lichtabsorption am Augenhintergrund. Habilitation. Ludwig Maximilians-Universität München, 1974.
- [2] Gabel VP, Birngruber R, Hillenkamp F. Visible and near infrared light absorption in pigment epithelium and choroids. Congress Series: XXIII Concilium Ophthalmologicum 1978;450:658–62.
- [3] Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys* 1985;48(6):781–96.
- [4] Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Experimental studies of laser thermal retinal injury. *Health Phys* 1983;44(5):519–31.
- [5] Bresnick G. Diabetic maculopathy: A critical review highlighting diffuse macular edema. *Ophthalmology* 1983;90:1301–17.
- [6] Greite JH, Birngruber R. Low intensity argon laser coagulation in central serous retinopathy (csr). *Ophthalmologica* 1975;171(3):214–43.
- [7] Figueroa M, Regueras A, Bertrand J, Aparicio M, Manrique M. Laser photocoagulation for macular soft drusen. *Retina* 1997;17(5):378–84.
- [8] Roeder J, Michaud NA, Flotte TJ, Birngruber R. Response of the Retinal Pigment Epithelium to Selective Photocoagulation. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1786–92.
- [9] Roeder J, Hillenkamp F, Flotte TJ, Birngruber R. Microphotocoagulation: Selective effects of repetitive short laser pulses. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:8463–647.
- [10] Schrärmeyer U, Heimann K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res* 1999;12:219–36.
- [11] Roeder J, Brinkmann R, Birngruber R. Selective retinal pigment epithelium laser treatment—Theoretical and clinical aspects. In: *Lasers in Ophthalmology—Basic, Diagnostic and surgical Aspects* (Eds. Fankhauser, Kwasniewska), 119–129. Kugler Publications, The Hague, 2003.
- [12] Anderson RR, Parrish JA. Selective Photothermolysis: Precise Microsurgery by Selective Absorption of Pulsed Laser Radiation. *Science* 1983;220:524–7.
- [13] Brinkmann R, Hüttmann G, Rögener J, Roeder J, Birngruber R, Lin CP. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers Surg Med* 2000;27(5):451–64.
- [14] Lorenz B, Birngruber R, Vogel A. [Quantification of the wavelength dependence of laser-induced choroid coagulation]. *Fortschr Ophthalmol* 1989;86(6):644–54.
- [15] Carslaw H S, Jaeger J C. Conduction of heat in solids. Oxford at the Clarendon Press, second edition, 1959.
- [16] Hüttmann G. Mechanismen der selektiven Schädigung des RPE: Modellrechnungen. Forschungs- und Entwicklungsbericht, Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH, <http://www.bmo.uni-luebeck.de/fbericht02.htm>, 2002.
- [17] Graemer H. Entwicklung einer Hochspannungsregelung im 10 ns Bereich zur Formung von Laserpulsen mittels elektrooptischer Modulation der Resonatorgüte. Diplomarbeit am Medizinischen Laserzentrum Lübeck, Fachbereich Elektrotechnik. Fachhochschule Lübeck, 2002.
- [18] Brinkmann R, Meyer W, Engelhardt R, Walling JC. Laser induced shockwave lithotripsy by use of an 1 μ s Alexandrite laser. *Proc SPIE* 1990;1200:67–74.
- [19] Lin CP, Kelly MW, Sibayan SAB, Latina MA, Anderson RR. Selective Cell Killing by Microparticle Absorption of Pulsed Laser Radiation. *IEEE J select Topics Quantum Electron* 1999;5(4):963–8.
- [20] Neumann J, Brinkmann R. Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *J Biomed Optics* 2005;10(2):024001.
- [21] Schüle G, Elsner H, Framme C, Roeder J, Birngruber R, Brinkmann R. Optoacoustic real-time dosimetry for selective retina treatment. *J Biomed Opt* 10(6):064022,1–11, 2005.
- [22] Neumann J, Brinkmann R. Cell disintegration by laser induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *J Biomed Opt* 11(4):041112, 1–11, 2006.
- [23] Finney D. Probit Analysis. 3. Edition. Cambridge University Press, 1971.
- [24] Schüle G, Rumohr M, Hüttmann G, Brinkmann R. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the μ s to ms time regimen. *Inv Ophthalmol & Vis Sci* 2005;46(2):714–9.
- [25] Needham D, Nunn RS. Elastic deformation and failure of liquid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal* 1990;58:997–1009.
- [26] Glickman RD. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *Int J Toxicol* 2002;21(6):473–90.
- [27] Neumann J. Mikroskopische Untersuchungen zur laser-induzierten Blasenbildung und -dynamik an absorbierenden Mikropartikeln. Dissertation, Universität zu Lübeck, 2005.
- [28] Neumann J, Brinkmann R. Nucleation and bubble expansion velocity around ns laser heated microabsorbers in water. *subm. to J Appl Phys*, 2006.
- [29] Neumann J, Brinkmann R. Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *J Biomed Opt* 11(4):041112, 1–11, 2006.
- [30] Framme C, Schüle G, Roeder J, Birngruber R, Brinkmann R. Influence of pulse duration and pulse number in selective RPE laser treatment. *Las Surg Med* 2004;34(3):206–15.
- [31] Framme C, Schüle G, Roeder J, Kracht D, Birngruber R, Brinkmann R. Threshold determinations for selective RPE damage with repetitive pulsed microsecond laser systems in rabbits. *Ophthalmic surg las* 2002;33(5):400–9.
- [32] Brinkmann R, Schüle G, Neumann J, Framme C, Porksen E, Elsner H, Theisen-Kunde D, Roeder J, Birngruber R. Selektive Retina-Therapie: Methodik, Technik und Online-Dosimetrie. *Ophthalmologie* 2006;103(10):839–49.
- [33] Roeder J, Wirbelauer C, Brinkmann R, Laqua H, Birngruber R. Variability of RPE reaction in two cases after selective RPE laser effects in prophylactic treatment of drusen. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:45–50.
- [34] Roeder J, Brinkmann R, Wirbelauer C, Laqua H, Birngruber R. Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000;84(1):40–7.
- [35] Schüle G. Mechanismen und On-line Dosimetrie bei selektiver RPE Therapie. Dissertation, Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH, Universität zu Lübeck, 2002.
- [36] Schüle G, Hüttmann G, Framme C, Roeder J, Brinkmann R. Non-invasive optoacoustic temperature determination at the fundus of the eye during laser irradiation. *J Biomedical Optics* 2004;9(1):173–9.

- [37] Schüle G, Hüttmann G, Brinkmann R. Noninvasive temperature measurements during laser irradiation of the retina with optoacoustic techniques 2002;4611:64–71.
- [38] Kracht D, Brinkmann R. Green Q-switched microsecond laser pulses by overcoupled intracavity second harmonic generation. Optics communication 2004;231:319–24.
- [39] Elsner H, Klatt C, Liew SH, Pörksen E, Bunse A, Rudolf M, Brinkmann R, Hamilton RP, Birngruber R, Laqua H, Roider J. Selektive Retina Therapie (SRT) bei Patienten mit diabetischer Makulopathie. Ophthalmologie 2006;103(10): 856–60.
- [40] Elsner H, Pörksen E, Klatt C, Bunse A, Theisen-Kunde D, Brinkmann R, et al. Selective Retina Therapy (SRT) in patients with central serous chorioretinopathy (CSC). Graefes Arch Ophthalmol, in print. on-line: DOI:10.1007/s00417-006-0368-5, 2006.
- [41] Brinkmann R, Koop N, Özdemir M, Alt C, Schüle G, Lin CP, et al. Targeting the Retinal Pigment Epithelium (RPE) by Means of a Rapidly Scanned Continuous Wave (CW) Laser Beam. Las Surg Med 2003;32(4):252–64.
- [42] Alt C, Framme C, Schnell S, Lee H, Brinkmann R, Lin CP. Selective targeting of the retinal pigment epithelium using an acousto-optic laser scanner. J Biomed Opt 2005;10(6):64014.

Available online at www.sciencedirect.com

