

# In vivo Bewertung der Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (FLIO) zur Erkennung von unterschweligen Laserspots auf der Netzhaut

Bozzini G.<sup>1</sup>, Sonntag S.R.<sup>1</sup>, Hamann M.<sup>1,2</sup>, Seifert E.<sup>3</sup>, Theisen-Kunde D.<sup>3</sup>, Brinkmann R.<sup>3,4</sup>, Grisanti S.<sup>1</sup>, Miura Y.<sup>1,3,4</sup>

1. Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland
2. Klinik für Augenheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland
3. Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH, Lübeck, Deutschland
4. Institut für Biomedizinische Optik, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland

Abstr.-ID: 598  
PSa03-10

## Hintergrund der Studie

FLIO ist ein neues nicht-invasives Bildgebungsverfahren, welches allerdings bisher noch nicht in den klinischen Alltag etabliert werden konnte, obwohl bereits mehrere Studien ihr hohes diagnostisches Potential zeigen.

In zwei eigenen Studien konnten wir zeigen, dass FLIO in der Lage ist, RPE-selektiven Laserschaden im Bereich des Laserherdes und die metabolischen Veränderungen in der Spotumgebung sowohl *ex vivo* (Hutfilz et al, TVST, 2019, s. QR-Code) als auch *in vivo* (Sonntag et al, Life, 2021, s. QR-Code) darzustellen.



Hutfilz et al



Sonntag et al

Auf Grund des zunehmenden Einsatzes von minimalinvasiven Laserverfahren für die Behandlung chorioretinaler Erkrankungen, könnte die FLIO daher als nicht-invasives empfindliches Monitoringinstrument nützlich sein.

Ziel dieser Studie war es, daher die Sensitivität von FLIO zur Erkennung von minimalinvasiven Laserspots (bis hin zur Photokoagulation) auf der Netzhaut mit anderen bildgebenden Verfahren *in vivo* zu vergleichen und somit den Weg zu ebnen, um FLIO zukünftig bei dieser Indikation in den klinischen Alltag zu integrieren.

## Fluoreszenzlebensdauer

### Fluoreszenzlebensdauer (FLD)

Die Zeitdauer, bis die Fluoreszenzintensität des angeregten Fluorophors auf  $1/e$  ( $\approx 36\%$ ) des Ausgangswertes abfällt ( $\tau \approx \text{ps}$ ns).

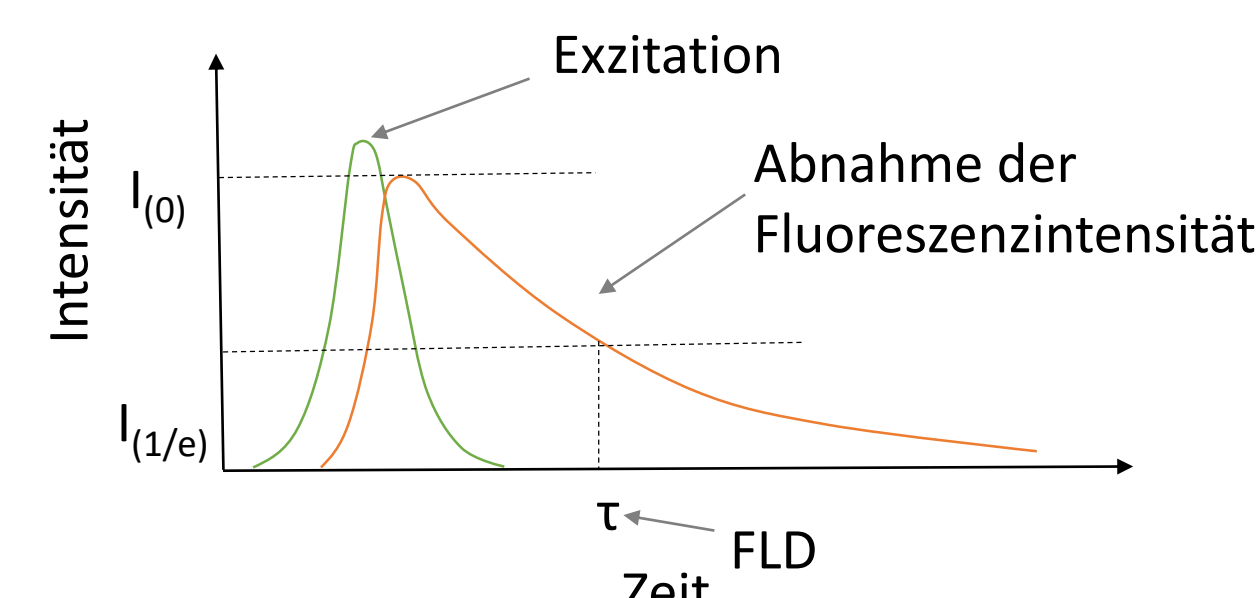


Fig. 1: Fluoreszenzlebensdauer

### Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy: FLIO)

- FLIO System (Heidelberg Engineering GmbH)
- Gepulster Anregungslaser (473 nm, 70 ps, 80 MHz)
- 2 Detektionskanäle
- Kurzer Spektralkanal (SSC): 498 - 560 nm
- Langer Spektralkanal (LSC): 560 - 720 nm
- FLD wird als Pseudofarbenbild dargestellt
- FLD-Messung und -Analyse wurden mit SPCM (basierend auf der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC)) bzw. SPCLmage (Becker und Hickl GmbH) durchgeführt.

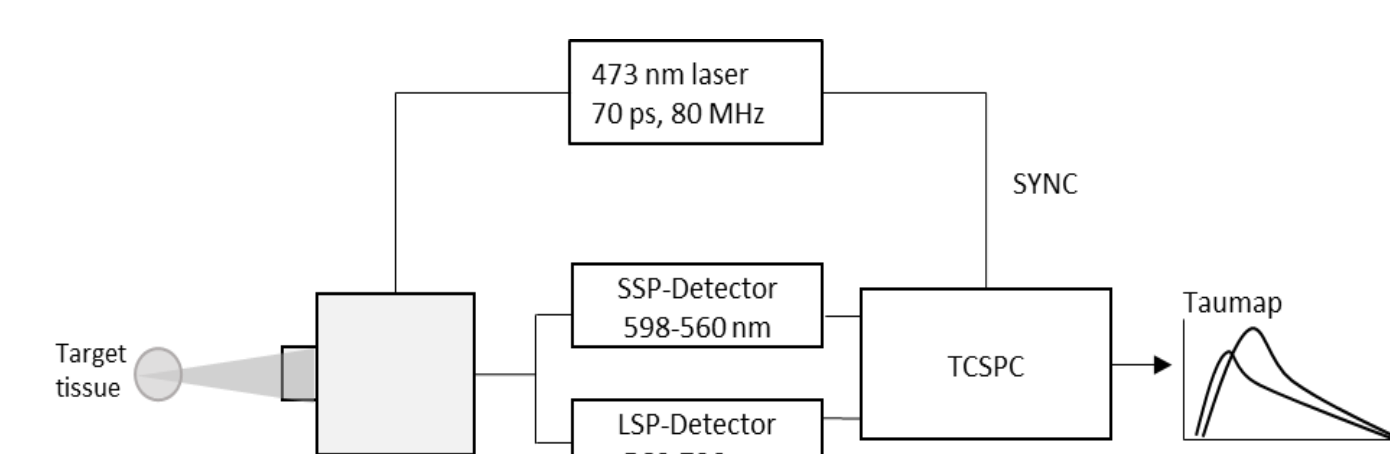


Fig. 2: Schematischer FLIO-Aufbau

## Material und Methoden

- Die Netzhaut von 11 Chinchilla-Bastard-Kaninchen (22 Augen) wurde *in vivo* mit einem Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 514 nm und einer maximalen Leistung von 11 W bei vier verschiedenen Pulsdauern (5,2, 12, 20, 50  $\mu$ s) bestrahlt.
- Die Herdgröße betrug 85  $\mu$ m.
- Die Pulsenergie wurde stetig erhöht, bis die zuvor ophthalmoskopisch unsichtbaren Laserherde sichtbar wurden
- Anschließend wurden die bestrahlten Stellen mit Fluoreszenzangiographie (FA), Fundus Autofluoreszenz (AF), optischer Kohärenztomographie (OCT), Fundusfoto (fundus color photography: FC) und FLIO untersucht
- Zwei unabhängige Untersucher beurteilten insgesamt 2290 Laserherde in den jeweils 6 Bildgebungsmodalitäten (bei FLIO zwei Kanäle) und klassifizierten sie dann als sichtbar, unsichtbar oder un beurteilbar.
- Für jede Pulsdauer und für jedes Bildgebungsverfahren wurde die Effektivdosis50 (ED50) der Pulsenergie (die Energie, mit der ein Laserherd mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% festgestellt wird) zur Sichtbarkeit bestimmt.
- Die Resultate wurden danach in das statistische Programm OriginLab® importiert, die Werte von ED50 für die 4 verschiedenen Pulsdauern wurden berechnet und so ergaben sich 551 Werte von ED50.
- Aufgrund der Abweichung der einzelnen Kaninchenaugen in den absoluten ED50-Werten mussten die Daten vor der statistischen Auswertung normalisiert werden. Hierfür wurde die Sichtbarkeit der Spaltlampen-Ophthalmoskopie bei jedem Kaninchen mit 100% festgesetzt

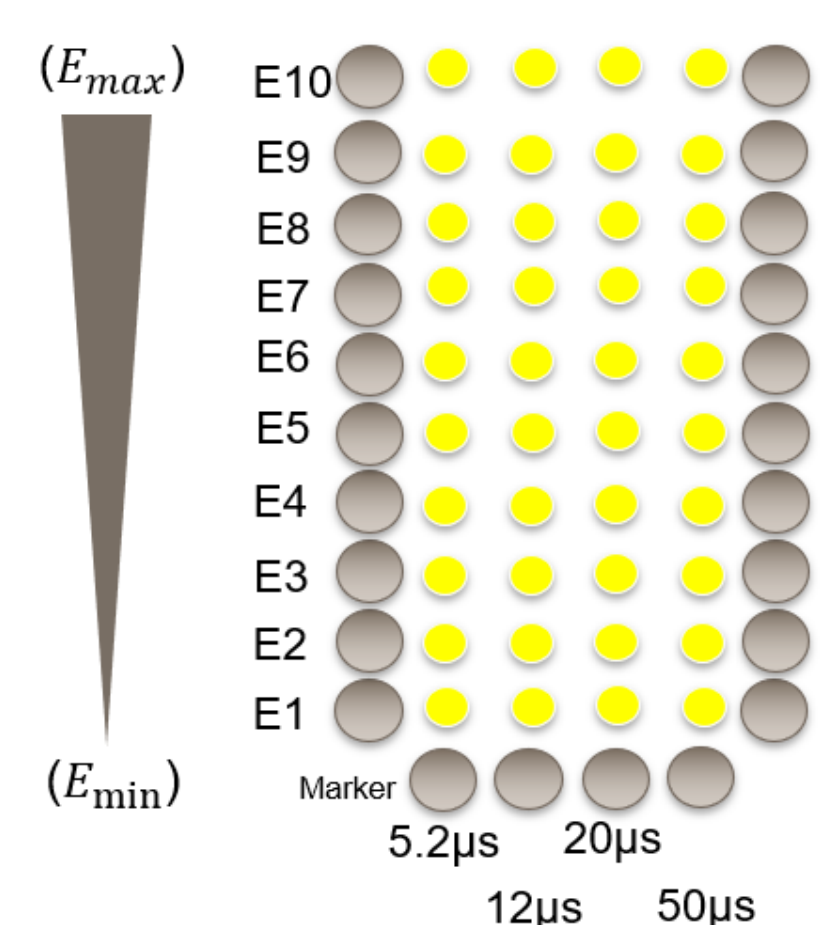


Fig. 3: schematische Darstellung des Laserpatterns

## Ergebnisse:

### Ergebnisse der multimodalen Bildgebung

Laserherde der Markerspots (Photokoagulation; blauer Pfeil) waren gut sichtbar in allen Bildgebungsmodalitäten, während eher RPE-selektiverer Schaden (z.B. Spot in orangemem Kasten) nicht in allen Bildgebungsmodalitäten zu erkennen war.

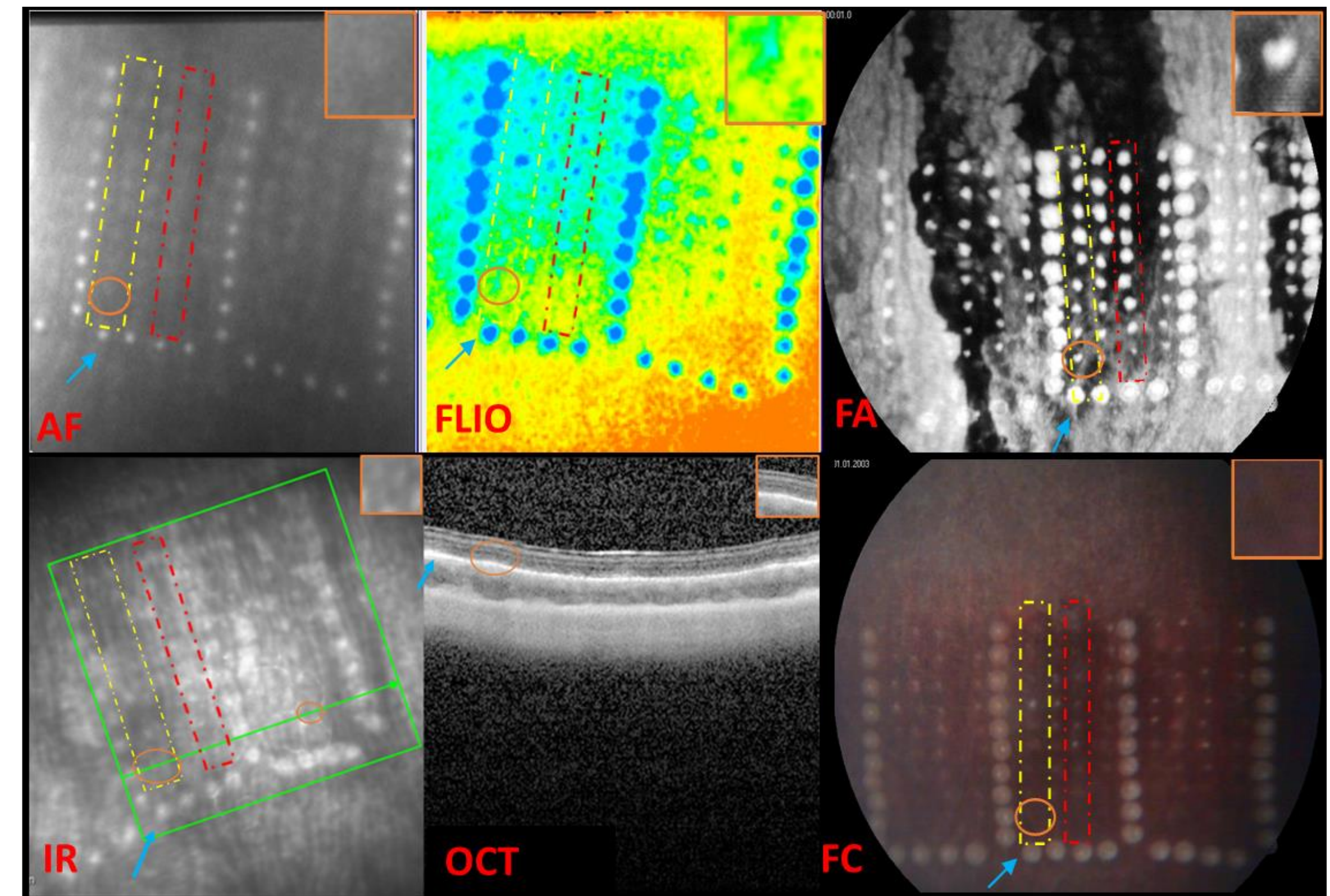


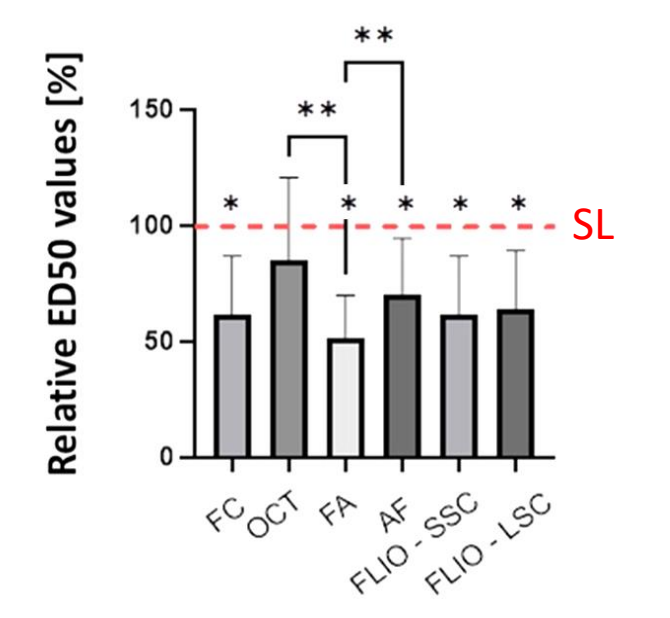
Fig. 4: Darstellung eines RPE-selektiven Spots (orangener Kasten), welcher nur in der FA und in der FLIO gut zu erkennen war. Das Infrarot-Bild (IR) dient hier zur Orientierung im OCT. Die von den gelben bzw. roten gestrichelten Linien umschlossenen Bereiche entsprechen in jeder Modalität dem gleichen bestrahlten Bereich.

### Statistische Auswertung

- Für alle Pulsdauern zeigte die FA den niedrigsten mittleren ED50-Energiewert (d.h. die höchste Empfindlichkeit) für die Sichtbarkeit der laserinduzierten Zellschäden.
- FLIO zeigte bei allen 4 Pulsdauern keine signifikanten Unterschiede zur FA, während andere Bildgebungsmodalitäten hier teils signifikant schlechter waren.
- Insbesondere scheint die FLIO daher der AF überlegen

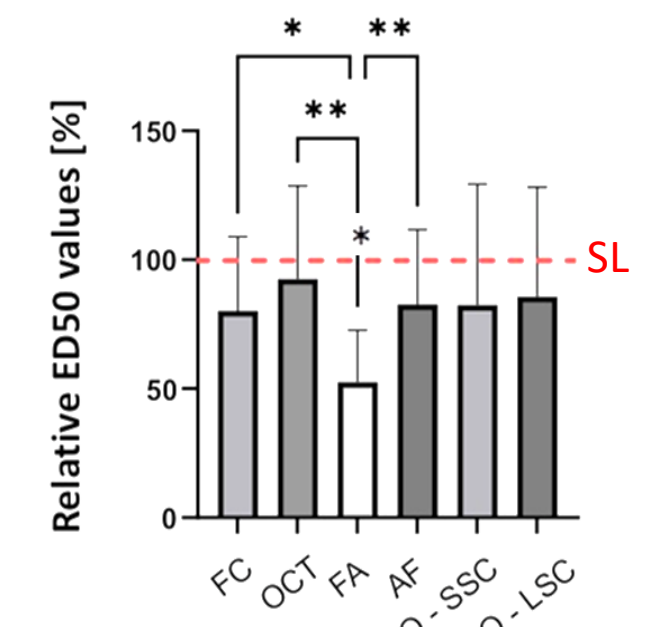
Absolute and relative ED50 values of the different imaging modalities at 5.2  $\mu$ s and the p-values of their comparison

	ED50 values [mean $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ J]	relativ [%]						
SL	98,41 $\pm$ 25,20	100 $\pm$ 0	<0,001	0,518	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
FC	81,36 $\pm$ 67,70	61,71 $\pm$ 25,26		0,259	0,121	0,753	>0,999	0,999
OCT	122,43 $\pm$ 119,28	84,90 $\pm$ 35,90			0,003	0,550	0,078	0,101
FA	63,64 $\pm$ 47,70	51,13 $\pm$ 18,96				0,001	0,269	0,052
AF	85,56 $\pm$ 78,96	70,61 $\pm$ 23,97					0,679	0,739
FLIO (SSC)	79,87 $\pm$ 70,77	61,65 $\pm$ 25,45						0,998
FLIO (LSC)	81,24 $\pm$ 70,49	63,64 $\pm$ 25,66						



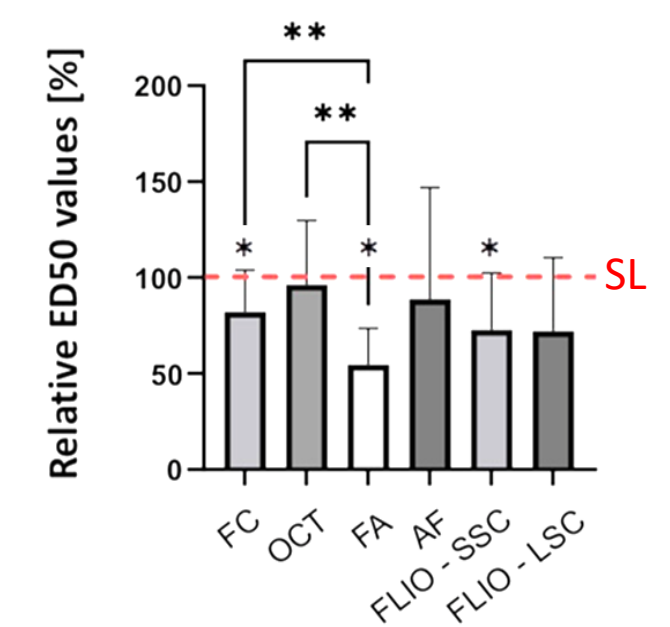
Absolute and relative ED50 values of the different imaging modalities at 12  $\mu$ s and the p-values of their comparison

	ED50 values [mean $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ J]	relativ [%]						
SL	98,41 $\pm$ 25,20	100 $\pm$ 0	0,106	0,972	<0,001	0,242	0,692	0,778
FC	78,53 $\pm$ 34,05	80,20 $\pm$ 28,74		0,323	0,013	>0,999	>0,999	0,998
OCT	90,20 $\pm$ 37,37	92,58 $\pm$ 36,06			0,001	0,942	0,982	0,998
FA	50,91 $\pm$ 22,06	52,53 $\pm$ 20,15				0,001	0,161	0,109
AF	82,40 $\pm$ 40,00	82,70 $\pm$ 29,02					>0,999	>0,999
FLIO (SSC)	82,21 $\pm$ 50,10	82,50 $\pm$ 46,82						0,999
FLIO (LSC)	82,43 $\pm$ 41,54	85,66 $\pm$ 42,47						



Absolute and relative ED50 values of the different imaging modalities at 20  $\mu$ s and the p-values of their comparison

	ED50 values [mean $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ J]	relativ [%]						
SL	134,88 $\pm$ 57,83	100 $\pm$ 0	0,030	0,999	<0,001	0,978	0,012	0,066
FC	104,58 $\pm$ 56,93	82,04 $\pm$ 21,94		0,256	0,003	0,998	0,937	0,953
OCT	122,32 $\pm$ 59,66	96,26 $\pm$ 33,55			0,002	0,989	0,256	0,411
FA	67,78 $\pm$ 29,14	54,54 $\pm$ 18,96				0,244	0,237	0,481
AF	110,46 $\pm$ 68,57	88,73 $\pm$ 58,27					0,780	0,984
FLIO (SSC)	92,49 $\pm$ 42,91	72,80 $\pm$ 29,67						>0,999
FLIO (LSC)	88,71 $\pm$ 41,61	72,12 $\pm$ 38,38						



Absolute and relative ED50 values of the different imaging modalities at 50  $\mu$ s and the p-values of their comparison

	ED50 values [mean $\pm$ SD]		FC	OCT	FA	AF	FLIO SSC	FLIO LSC
	absolut [ $\mu$ J]	relativ [%]						
SL	204,08 $\pm$ 125,22	100 $\pm$ 0	0,090	0,513	<0,001	0,112	<0,001	0,001
FC	139,19 $\pm$ 58,41	80,73 $\pm$ 37,20		>0,999	0,261	>0,999	>0,999	>0,999
OCT	165,78 $\pm$ 105,68	91,15 $\pm$ 46,37			0,040	>0,999	0,351	>0,999
FA	102,15 $\pm$ 36,13	60,34 $\pm$ 27,42				0,213	>0,999	>0,999
AF	157,07 $\pm$ 102,05	90,45 $\pm$ 79,60					>0,999	>0,999
FLIO (SSC)	120,69 $\pm$ 68,95	66,30 $\pm$ 24,92						>0,999
FLIO (LSC)	144,34 $\pm$ 108,85	80,98 $\pm$ 67,72						

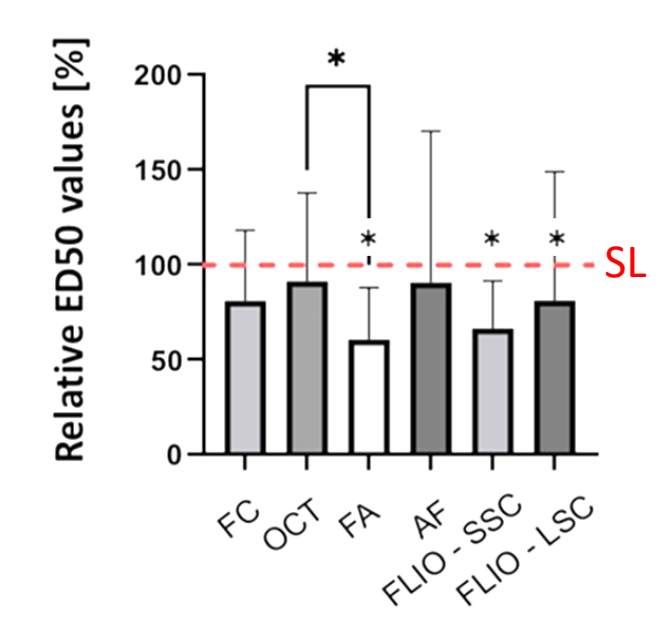


Fig. 5: Vergleich der ED50-Werte zwischen den Bildgebungsverfahren für die einzelne Pulsdauer (SL: Spaltlampe-Funduskopie, FC: Fundus Farbe Photographie, OCT: Optische Kohärenztomographie, FA: Fluoreszenzangiographie, AF: Autofluoreszenz, SSC: short spectral channel, LSC: long spectral channel)

## Schlussfolgerung

- FLIO zeigte eine sehr hohe Sensibilität bei der Erkennung von funduskopisch nicht sichtbaren minimalinvasiven Laserschäden
- FLIO ist hierbei der FA nicht signifikant unterlegen und scheint zudem der AF eher überlegen zu sein
- FLIO, als nicht-invasive Methode, hat insgesamt ein hohes Potential als Monitoring-Instrument bei der minimalinvasiven Lasertherapie, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass vorherige Studien (Hutfilz et al/Sonntag et al) zeigen konnten, dass FLIO auch Umgebungsreaktion auf minimalinvasive Lasertherapie darstellt