

Untersuchung der Augensicherheit durch Multi-Pulsbestrahlung für LiDAR- Anwendungen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

**DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN
(Dr.-Ing.)**

von der KIT-Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Scarlett Lipp

geb. in Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung:

05.07.2021

Hauptreferent:

Prof. Dr. rer. nat. W. Stork

Korreferent:

Prof. Dr. A. Herkommer

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Symbole	v
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	3
1.2 Stand der Technik	5
1.2.1 Bewertung von Multipulsbestrahlung	6
1.2.2 Pulsadditivität	10
1.2.3 Kritik am Stand der Technik	11
1.3 Ziele und Struktur der Arbeit	16
2 Grundlagen	23
2.1 Absorption von Licht	23
2.1.1 Schwingungsanregung	24
2.1.2 Anregung der Bindungselektronen	25
2.1.3 Wärmeleitung	25
2.1.4 Thermo-elastische Druckentstehung	27
2.1.5 Arrhenius-Aktivierungsenergie	28
2.1.6 Fluoreszenz	28
2.2 Zeitliche und räumliche Kohärenz	29
2.3 Strahlverlauf in Multimode-Fasern	31
2.3.1 Modenbegriff und Modenausbreitung	33
2.3.2 Anregung höherer Moden und Modenkopplung	35
3 Laser-Gewebe-Interaktionen	37
3.1 Anatomie und Histologie des menschlichen Auges	37
3.2 Retinale Schädigungsmechanismen	40
3.3 Ausarbeitung verschiedener Pulsinteraktionsmodelle	48
3.3.1 Kumulative Effekte	49

3.3.2	Wahrscheinlichkeitssumation	49
4	Methodischer und messtechnischer Ansatz	53
4.1	Nachweis von Mikroblasen	53
4.1.1	Opto-akustische Methoden	53
4.1.2	Optische Methoden	54
4.2	Modell zur Hintergrunderwärmung	55
4.3	Ansatz zur konstanten Energiedichte	56
4.3.1	Vorteil der konstanten Energiedichte	57
4.3.2	Ebenheitsfaktor des Strahlprofils	58
4.3.3	Flankensteilheit und Durchmesserdefinition	58
4.3.4	Modifikation der Strahldurchmischung	59
5	Experimenteller Aufbau des Schädigungsmessplatzes	63
5.1	Ex vivo RPE-Modell	64
5.1.1	Verwendbarkeit und Vorzüge von Explants	64
5.1.2	Gewebeproben verschiedener Tierarten	66
5.1.3	Probenpräparation	67
5.1.4	Vitalitätsprüfung	67
5.2	Entwicklung des Setups	70
5.2.1	Bestrahlungsaufbau	70
5.2.2	Strahlprofil und Fokuskontrolle	74
5.2.3	Methoden zur Detektion von Mikroblasenbildung	79
5.2.4	Integration des Temperiersystems	84
5.3	Schädigungsmessung an RPE-Explants	85
5.3.1	Vorgehensweise	85
5.3.2	Schadensdeklarierung	86
5.3.3	Auswertung über Probit-Analyse	87
6	Laser-induzierte Schädigungsschwellen	91
6.1	Ex vivo retinale Schädigungen durch Einzelpulse	91
6.1.1	Auswirkung von Intensitätsmodulationen	92
6.1.2	Räumliche Ausrichtung der Proben	94
6.1.3	Wirksamkeit der Fluoreszenzmittel	94
6.2	Laser-induzierte Schädigungsschwellen von Pulsfolgen	96
6.2.1	Einfluss des Befeuchtungsgrads	96

6.2.2	Messung bei Körpertemperatur	99
6.2.3	Erzeugte Datenbasis	103
6.2.4	Mikroblasenmessung	108
6.3	Simulationsergebnisse der Hintergrunderwärmung	113
7	Interpretation der Multipulsdaten	117
7.1	Analyse zur Diskrepanz vorhandener Schädigungsschwellen	117
7.1.1	Stahlprofilfluktuationen des Top Hat	118
7.1.2	Durchmesser-Definition	120
7.1.3	Spannweite der Messunsicherheit	121
7.2	Vergleich zu den Grenzwerten des Lasersicherheitsstandards	123
7.3	Anwendung der Pulsinteraktionsmodelle	126
7.3.1	Wahrscheinlichkeitssummutationsmodell	126
7.3.2	Kumulative Effekte	128
7.4	Indizien zur photo-chemischen Reaktion	129
7.4.1	Metabolische Aktivität	130
7.4.2	Vergleich zur Literatur	131
8	Zusammenfassung und Ausblick	135
A	Modell zur Beschreibung photo-chemischer Schädigung	139
	Literaturverzeichnis	143
	Eigene Veröffentlichungen	159
	Journalartikel	159
	Konferenzbeiträge	159

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

ABKÜRZUNGEN

AM	Acetoxymethylester
ANSI	American National Standard for Safe Use of Lasers
APD	Avalanche Photodiode
CCD	Charge-coupled device
CW	Dauerstrichbetrieb (engl. Continuous wave)
ED ₁₆	Effektive Dosis mit 16 %- Läsionswahrscheinlichkeit
ED ₅₀	Effektive Dosis mit 50 %- Läsionswahrscheinlichkeit
ED ₈₄	Effektive Dosis mit 84 %- Läsionswahrscheinlichkeit
FVM	Finite-Volumen-Methode
FWHM	Halbwertsbreite (engl. Full Width at Half Maximum)
GZS	Grenzwerte zugänglicher Strahlung
HBSS	Hank's Kochsalzlösung (engl. Hanks balanced saline solution)
He-Ne	Helium-Neon-Laser
ICNIRP	International commission on non-ionizing radiation protection
IMF	Intensitätsmodulationsfaktor
IQR	Interquartilbereich
IR	Infrarotes Licht
LiDAR	Light detection and ranging
LQ	Lichtquelle
MM	Multimode

MZB	Maximal zulässige Bestrahlungsstärke
NA	Numerische Apertur
NHP	Nicht-humane Primaten
NIR	Nah-Infrarotes Licht
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
OCT	Optische Kohärenz Tomographie (engl. Optical coherence tomography)
PI	Propidium-Iodid
PRF	Pulswiederholrate (engl. Pulse repetition frequency)
PSM	Wahrscheinlichkeitssummutationsmodell (engl. Probability summation model)
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RF	Reduktionsfaktor
RMS	Quadratisches Mittel (engl. Root mean square)
RPE	Retinales Pigmentepithel
SAE	Society of Automotive Engineers
SLM	Seibersdorf Laboratories Model
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (engl. Signal noise ratio)
ToF	Laufzeit (engl. Time of Flight)
UV	Ultraviolettes Licht
Vis	Sichtbares (engl. Visible)

KONSTANTEN

c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum: $299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$
h	Plank'sches Wirkungsquantum: $6,626 \cdot 10^{34}\text{ J}\cdot\text{s}$
π	Kreiszahl Pi: 3,14159...
R	Gaskonstante: $8,314\text{ kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
e	Eulersche Zahl: 2,7182...

LATEINISCHE SYMBOLE UND VARIABLEN

A	Bestrahlte Flächengröße in m^2
b	Dimensionslose Hilfsvariable in Dosis-Antwort-Kurve
C_i	Dimensionslose Korrekturfaktoren des Lasersicherheitsnorm
c	Lichtgeschwindigkeit in Luft in $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
c_p	Spezifische Wärmekapazität des Gewebes in $\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
D_{tot}	Absolute Energiedosis in $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$
D_f	Defokussierungsposition in μm
d, d_1, d_2	Distanz bzw. exemplarische Spaltabstände in mm
d_{Bieg}	Biegedurchmesser der Faser in cm
d_{H}	Breite des Hydrophon-Messkristalls in mm
E	Bestrahlungsstärke in $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$
E_A	Aktivierungsenergie in J
$E_{0,\text{abs,trans}}$	Auftreffender, absorbiertes bzw. transmittierter Anteil des Energieeintrag auf Gewebe in J
$E_{\text{kin}}, E_{\text{th}}$	Kinetische Energie bzw. thermische Energie in J
E_{phot}	Photonenenergie in eV
$f, \Delta f$	Frequenz und Frequenzbandbreite in s^{-1}
$H, H_{\text{max,mean}}$	Bestrahlung/ Exposition, maximal und Mittelwert in $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$
$I(z), I_0$	Intensität an der Stelle z und Ausgangsintensität in $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$
K	Stoffbezogenes Kompressionsmodul in $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$
k	Dimensionslose Geschwindigkeitskonstante von chemischen Reaktionen
$l_{t,r}$	Zeitliche und räumliche Kohärenzlänge in m
M	Anzahl geführter Moden
m	Dimensionslose Steigung einer linearen Funktion

N	Anzahl ausgesandter Pulse
n, n_1, n_2	Dimensionsloser Brechungsindex, im Kern bzw. im Mantel einer Stufenindex-Faser
$P, P(N)$	Dimensionslose Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses, in Abhängigkeit der Pulsanzahl
p_{Single}	Dimensionslose Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Pulses
$q(t, \vec{r})$	Wärmequelle, die sich radial in Richtung \vec{r} ausbreitet
R	Radius eines kugelförmigen Körpers in mm
r, \vec{r}	Radiale Ausbreitung in m, richtunggebender Vektor
r_k	Kreisförmiger Bereich innerhalb einer Stufenindex-Faser in mm
r_{Kern}	Kernradius der Faser in mm
r_T	Thermische Diffusionslänge in μm
T, T_0	Temperatur und Ausgangstemperatur des Gewebes in K
T_i	Wärmeleitungsfaktor aus DIN 60825-1:2015 in s
T_{tot}	Totale Emissionsdauer einer Bestrahlung in s
T_2	Zeitlicher Knickpunkt im Lasersicherheitsstandard
t	Belichtungsdauer, Einwirkdauer im Gewebe in s
V, V_0	Volumen und Initialvolumen in m^3
V_{Faser}	Anzahl möglich angeregter Moden
Z	Kollisionsrate zwischen Molekülen bzw. Atomen in s^{-1}
z	Position auf der optischen Achse in mm

GRIECHISCHE SYMBOLE UND VARIABLEN

α_{abs}	Absorptionskoeffizient in cm^{-1}
$\alpha_{\text{spat, min, max}}$	Scheinbare Winkelausdehnung im Raum, minimal bzw. maximal auf der Netzhaut in mrad
γ	Dimensionsloser Volumenausdehnungskoeffizient

η	Dimensionsloser Effizienzfaktor
$\theta_{a,c}$	Maximaler Akzeptanz- und Totalreflexionswinkel in mrad
$\bar{\theta}_c$	Maximal gebrochener Eintrittswinkel in mrad
κ	Wärmeleitfähigkeit in $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
λ	Wellenlänge der optischen Strahlung in nm
μ	Erwartungswert in Einheit der statistischen Größe
ξ	Dimensionslose Hilfsvariable eines Reparaturmoleküls
ρ	Dichte in $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
σ	Standardabweichung in Einheit der statistischen Größe
τ	Pulsdauer in ns
τ_0	Kohärenzzeit in s
τ_T	Thermische Ausbreitungszeit in s
Φ	Strahlungsfluss (radiometrisch) in W
Ψ	Neigungswinkel eines schiefen Strahlengangs in mrad
Ω	Dimensionsloses Integral zur Beschreibung des Eintretens einer Schädigung

1 EINLEITUNG

Die Vision des vollautonomen Fahrens begeistert nicht nur Ingenieure der Automobilbranche, sondern auch die heutige Gesellschaft, die sich von diesem Mobilitätskonzept mehr Sicherheit und Fahrkomfort verspricht. Unter dem Begriff des autonomen Fahrens werden selbstfahrende Fahrzeuge oder Transportsysteme bezeichnet, die einen ohne Eingriff des Fahrers fortbewegen. Die Society of Automotive Engineers (SAE) hat Entwicklungsstufen definiert, die von Stufe 0 (keine Automatisierung) bis zur Stufe 5 (fahrerloser Transport) aufsteigend eingeteilt sind [1, 2].

Neben den bereits etablierten Systemen wie Kamera, Radar und Ultraschall ist für die dritte Automatisierungsstufe die komplexe Technologie des Light detection and ranging (LiDAR) aufgrund seiner hohen Reichweite und Auflösung unverzichtbar [3]. Keine andere Technologie wird finanziell vergleichbar gefördert wie aus Berichten [4] der Aktiengesellschaft *IHS Markits* zur Evaluierung der Umfelderkennung von Fahrzeugensensoren hervorgeht. Diese Untersuchung gibt an, dass LiDAR -Sensoren bis 2026 fast 2,5 Milliarden Dollar einbringen werden [5]. Zudem wird erwartet, dass hochentwickelte Fahrerassistenzsysteme mit hoher Automatisierungsstufe die Nachfrage bis 2025 auf bis zu fünf Millionen mit LiDAR ausgerüstete Fahrzeuge steigern wird [4, 6]. Die Entwicklung des LiDAR Sensors gehört daher zu den Schlüsseltechnologien der Zukunft für das Mobilitätskonzept des autonomen Fahrens [6, 7]. Aktuelle wissenschaftliche Studien [3, 8–10] belegen zudem die wirtschaftliche Bedeutung dieses Sensors.

LiDAR ist ein optisches Messverfahren zur Ortung und Messung der Entfernung von Objekten im Raum, das im Automotive-Bereich vorwiegend auf dem Prinzip der Laufzeit (engl. Time of Flight) (ToF) basiert. Bei der ToF-Messung werden mehrere Laserimpulse in die Umgebung ausgesendet und an den sich im Raum befindlichen Objekten reflektiert. Durch das Gesetz der gleichförmigen Bewegung $d = c \cdot \Delta t / 2$ lässt sich die Distanz d zu einem Objekt über die

Laufzeitmessung Δt des reflektierten Signals anhand der Lichtgeschwindigkeit c des Laserlichts messen [11].

Die Reichweite des direkten ToF-Messprinzips ist direkt proportional zur emittierten Laserpulsenergie und wird entweder durch das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. Signal noise ratio) (SNR) am Detektor oder der Hintergrundstrahlung begrenzt. Üblicherweise werden leistungsstarke Nah-Infrarotes Licht (NIR)-Laserdioden verwendet, die hohe Pulsspitzenleistungen und kurze Laserpulse im Bereich weniger Mikrosekunden bieten. Dadurch ist einerseits eine bessere Auflösung der Umgebung gegenüber etablierter Systeme möglich, da das Umfeld öfters abgetastet wird, andererseits kann durch die stärkere Pulsspitzenleistung eine höhere Reichweite erzielt werden, da das zurück reflektierte Signal am Detektor eine Mindestschwelle übersteigen muss, um erfasst zu werden. Die hohe Energiedichte dieser Laserquellen kann jedoch für das menschliche Auge gefährlich sein. Daher muss die Energiedichte des Laserpulses begrenzt und nach der DIN EN 60825-1:2015 klassifiziert werden, um die Augensicherheit für andere Verkehrsbeteiligte zu gewährleisten [12].

Da die zugrundeliegende Technologie des LiDAR-Sensors auf Laser-Scanning oder Flash (Laserblitzen) basiert, sendet jedes Fahrzeug beispielsweise innerhalb einer Minute ca. 18 000 000 Laserpulse¹ (vgl. Velodyne [13]) aus. Unter Verwendung von NIR-Beleuchtung, die für das menschliche Auge nicht sichtbar ist, wird der biologische Schutzmechanismus des Lidschlussreflexes nicht ausgelöst. Die Strahlungsexposition des Lasers, die in das menschliche Auge gelangt, kann somit eine schädigende Wirkung haben, sofern die maximal zulässigen Bestrahlungsstärken (MZB) des Lasersicherheitsstandards überschritten werden.

Die zulässigen Grenzwerte des Lasersicherheitsstandards [14] wurden durch laser-induzierte Schädigungsexperimente an retinalem Gewebe von Nicht-humane Primaten (NHP) oder aus Schlachtabfällen-gewonnenen Explants von Rindern und Schweinen abgeleitet [15, 16]. Die dabei bestimmten Schädigungsgrenzwerte nach Laserexposition wurden anschließend durch die International commission on non-ionizing radiation protection (ICNIRP) bewertet und mit einem Sicherheitsfaktor versehen, der insbesondere die biologische inter- und intraindividuelle Variabilität sowie Messunsicherheiten bei der

¹ bei Normalbetrieb mit einem horizontalem Field of View von 360°

Dosimetrie berücksichtigen soll. Der Lasersicherheitsstandard definiert diese Expositionen als MZB, um Gefährdungen von Haut und Auge eines Menschen zu verhindern. Von produktspezifischer Seite, werden Lasergeräte durch die Grenzwerte zugänglicher Strahlung (GZS) beschränkt.

1.1 MOTIVATION

Durch verbesserte Messmethoden und neuartige Laseranwendungen mit Pulsdauern im Nanosekunden (ns) - bis Femtosekunden (fs) - Bereich, wird das Verständnis über Schädigungsschwellwerte und den zugrundeliegenden Mechanismen erweitert. Die MZB-Werte werden infolge dessen stetig an den Stand der Technik angepasst, sodass neue Schädigungsmessungen zu angepassten MZB-Werten führen können. Beispielsweise wurde in der von Zuchlich et al. [17] veröffentlichten Arbeit, ein Schädigungsgrenzwert (vgl. Abb. 1.1) im Abgleich mit der DIN EN 60825-1:2007 ermittelt, welcher keinen Sicherheitsabstand zum erlaubten MZB aufwies [18]. Als Konsequenz daraus, wurde in der Revision DIN EN 60825-1:2015 der MZB für - bezogen auf kleine Quellen und Einzelpulse im Pulsdauerzeitbereich von ns bis Sub- μ s - um einen Faktor von 2,5 herabgesetzt. Zudem wurde der Übergang des Pulsdauerzeitbereichs der Sub- μ s bis Sekunden, der ursprünglich über den Wärmeleitungs faktor T_i von 18 μ s definiert wurde, auf 5 μ s herabgesetzt [18]. Die Begründung für diese Änderung liegt in neuen Erkenntnissen zur Spotgrößenabhängigkeit und die damit verknüpfte Wärmeleitung im Gewebe nach einer Laserbestrahlung [19].

Die Konsequenz dieser Verschiebung des Wärmeleitungs faktors führt dazu, dass Laserprodukte mit Pulsen zwischen 5 μ s und 18 μ s ebenfalls eine Reduktion der emittierten Leistung um 2,5 zu berücksichtigen haben, obwohl ausreichend Sicherheitsabstand zur MZB in diesem Zeitbereich ermittelt worden war. Da die MZB für das Auge die direkte Grundlage für die zugängliche Emissionsgrenzwerte für die Laserproduktsicherheitsklassen Klasse 1, 1M, 2, 2M und 3R sind, führen alle Änderungen der MZB auch zu äquivalenten Änderungen der GZS-Werte und damit zur zulässigen Ausgangsleistungen für diese Klassen. Laser-Scannende Produkte, die somit vorher der Klasse 2 zugeordnet waren, sind somit teilweise in die Klasse 3R versetzt worden, die in Europa nicht als einfache Verbraucherprodukte auf dem Markt zugelassen ist [21].

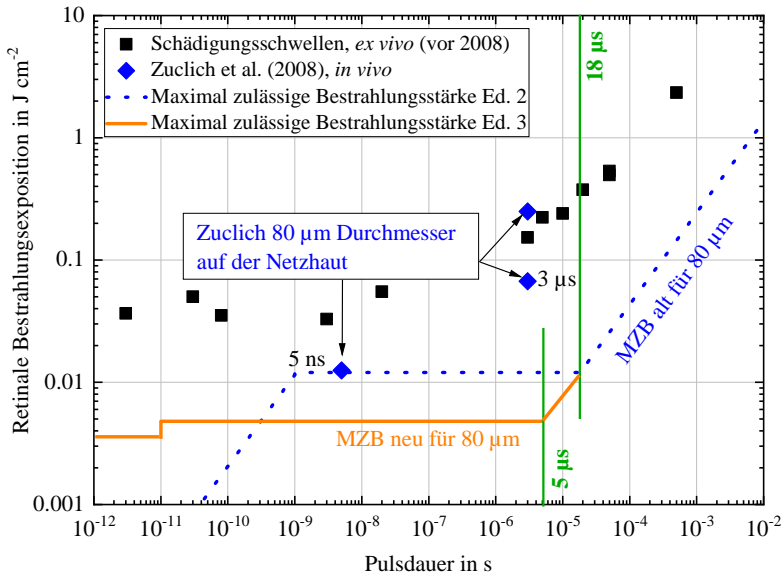


Abbildung 1.1: Vergleich der MZB beider Versionen des Lasersicherheitsstandards DIN EN 60825-1:2007 (Ed. 2) [20] (blau gestrichelt) und DIN EN 60825-1:2015 (Ed. 3) [14] (orange durchgezogen) bezogen auf einen Strahlungsdurchmesser von $80 \mu\text{m}$ auf der Netzhaut. Die Einzelpulsmessung von Zuclich et al. [17] (blaue Rauten) ergab im ns-Pulsdauerzeitbereich einen laser-induzierten Schädigungsschwellwert auf der MZB ohne Sicherheitsabstand. Vergleichbare Messungen an Explants (schwarze Quadrate) liegen aufgrund histologischer Unterschiede des bestrahlten Gewebes in der Regel um einen Faktor von 2-4 oberhalb der NHP-Messungen.

Einige Studien [21, 22] haben sich mit den Schwierigkeiten befasst, Produkte höherer Laserklassen dennoch als augensicher für Verbraucher auf den Markt zu bringen. Trotz technischer Analysen [23], die aus der Norm mit ausreichendem Sicherheitsabstand zur MZB abgeleitet worden sind, konnten die Hersteller dennoch keine Zulassungen für den Verbrauchermarkt erlangen.

Um einen wirtschaftlichen Schaden zu verhindern, indem durch neue Untersuchungen erneut eine Revision des Lasersicherheitsstandards ausgelöst wird, soll im Rahmen dieser Untersuchung die Augensicherheit von Mehrfachpulsen bezüglich einer Status quo unbekanntem Pulsadditivität bei ns-Pulsen für bislang nicht-überprüfte Emissionsdauern untersucht werden. Dazu wird Licht der Wellenlänge 532 nm appliziert, da die Norm für diesen

Bereich die größte Diskrepanz aufweist und Revisionen in der Regel die angrenzenden zulässigen Bestrahlungen anderer Wellenlängenbereiche (LiDAR: NIR/Infrarotes Licht (IR)) beeinflusst.

1.2 STAND DER TECHNIK

Basierend auf den Richtlinien des Lasersicherheitsstandards werden mithilfe der MZB zulässige Expositionen angegeben, die zu keinen beeinträchtigenden Effekten für Haut und Auge führen. Die Richtlinien werden von verschiedenen internationalen Experten im Rahmen der ICNIRP zusammengestellt, die eine jahrelange Expertise für Entwicklungsregularien oder Empfehlungen des Arbeitnehmerschutzes bezüglich optischer Strahlung nachweisen können. Die Expositionsgrenzwerte sind wellenlängenabhängig (180 nm bis 1000 μm) für verschiedene Emissionsdauern (100 fs bis 30 ks) definiert [14].

Die Expositionsgrenzwerte für Laserstrahlung werden je nach Emissionsdauer mit der Einheit einer Bestrahlungsstärke E ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) bzw. einer Bestrahlungsexposition H ($\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$) versehen. Die Bestrahlungsdauern wurden aufgrund des zugrundeliegenden beobachteten Schädigungsmechanismus in unterschiedliche Dauereinheiten gruppiert. Zu den Schädigungsmechanismen (vgl. Kap. 3.2) zählen: Photo-chemischer Effekt, thermische Wirkung, thermo-mechanischer Effekt und photo-mechanischer Effekt. Um biologische Parameter bzw. empirische Beobachtungen mit einzubringen und zu berücksichtigen, wurden zudem sieben in Tab. 1.1 zusammengefasste Korrekturfaktoren eingeführt, die die realen Schädigungsschwellen genauer beschreiben sollen. Außerdem wurden zeitliche Knickstellparameter eingeführt, um Augenbewegungen während längerer Expositionsdauern zu berücksichtigen [14].

Im Jahr 2015 wurde Edition 3 der DIN EN 60825-1 veröffentlicht und löste damit die bisher gültige Edition 2 ab. Eine wesentliche Änderung, die diese Version betrifft, lautet:

„Aktualisierung der zugänglichen Emissionsgrenzwerte für die Klassen 1, 1M, 2, 2M und 3R von gepulsten Quellen, insbesondere von gepulsten erweiterten Quellen, um die jüngste Revision der ICNIRP-Empfehlungen über Expositionsgrenzwerte widerzuspiegeln.“ [14]

Tabelle 1.1: Übersicht der Korrekturfaktoren für Bewertungen der MZB-Werte. In der Spalte Relevanz wird darauf hingewiesen, ob dieser Parameter im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird.

Parameter	Definition	Spektralbereich in nm	Relevanz
C_1	$5,6 \cdot 10^3 \cdot t^{0,25}$	180 bis 400	-
C_2	30	180 bis 302,5	-
	$10^{0,2 \cdot (\lambda - 295)}$	302,5 bis 3315	-
C_3	1	400 bis 450	-
	$10^{0,02 \cdot (\lambda - 450)}$	450 bis 600	+
C_4	$10^{0,002 \cdot (\lambda - 700)}$	700 bis 1050	-
	5	1050 bis 1400	-
C_5	1 *	180 bis 400 und 1400 bis 10^6	-
	$N^{-0,25}$ *	400 bis 1400	+
C_6	1	180 bis 400 und 1400 bis 10^6	-
	1 für $\alpha < \alpha_{\min}$	400 bis 1400	+
	α/α_{\min} für $\alpha_{\min} < \alpha < \alpha_{\max}$	400 bis 1400	+
	$\alpha_{\max}/\alpha_{\min}$ für $\alpha > \alpha_{\max}$	400 bis 1400	+
C_7	1	700 bis 1150	-
	$10^{0,018 \cdot (\lambda - 1150)}$	1150 bis 1200	-
	$8 + 10^{0,04 \cdot (\lambda - 1250)}$	1200 bis 1400	-

Anmerkungen: * nur bei kürzeren Pulsen als 0,25 s anwendbar, siehe 4.3 f) aus Norm.

$$\alpha_{\min} = 1,5 \text{ mrad}$$

$$\alpha_{\max} = 5 \text{ mrad} \quad \text{bei } t < 625 \mu\text{s}$$

$$= 200 \cdot t^{0,5} \text{ mrad} \quad \text{bei } 625 \mu\text{s} \leq t \leq 0,25 \text{ s}$$

$$= 100 \text{ mrad} \quad \text{bei } t > 0,25 \text{ s}$$

Diese Änderung ist hauptsächlich durch die bereits genannte Einzelpulsmessung von Zuclich et al. [17] ausgelöst worden. Zudem hat die Revision darüber hinaus die anliegenden Wellenlängenbereiche und Expositionszeiten (vgl. Abb. 1.1) angepasst.

1.2.1 BEWERTUNG VON MULTIPULSBESTRAHLUNG

Zum Umgang mit Multipuls-Bestrahlung wurden Korrekturfaktoren (siehe z.B. C_5 , vgl. Tab. 1.1) eingeführt, die auf biologische Wechselwirkungen von hintereinander auf bzw. ins Auge fallenden Laserpulse zurückzuführen sind, die

den zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus berücksichtigen sollen. So wurde beispielsweise im Pulsdauerzeitbereich von μs bis zu wenigen Sekunden ein thermisches Additivitätsverhalten [24] (vgl. Abb. 1.2) bezüglich der Pulsfrequenz (engl. Pulse repetition frequency) (PRF) im Gewebe beobachtet und als kumulativer Effekt identifiziert, was zu einer Absenkung der zulässigen Einzelpulsleistung einer Pulsfolge geführt hat.

Im Pulsdauerzeitbereich von ns, wurde ebenfalls eine Absenkung der Schädigungsgrenzwerte beobachtet [25, 26], welche jedoch nicht durch ein thermisches Modell [27, 28] beschreibbar sind, da hierbei thermo-mechanische Effekte [29–31] dominieren. Um dem ungeachtet eine sichere Absenkung der Einzelpulsleistung für kürzere Pulse zu gewährleisten, um einen Sicherheitsabstand sicherzustellen, wurde der Korrekturfaktor C_5 auch für den genannten Expositions-Zeitbereich übernommen [14, 20]. Dadurch ist ein Sicherheitsabstand bezüglich der experimentell bestimmten Schädigungsschwellen hergestellt, nicht aber nachvollzogen, welche Mechanismen im Gewebe zur Schädigung geführt haben. Aus diesem Grund ist auch die Definition des Korrekturfaktors C_5 unklar und unvollständig diskutiert. Dieser unvollständige Kenntnisstand zum Geschehen im retinalen Gewebe kann jedoch ausschlaggebende Konsequenzen auf die Norm haben.

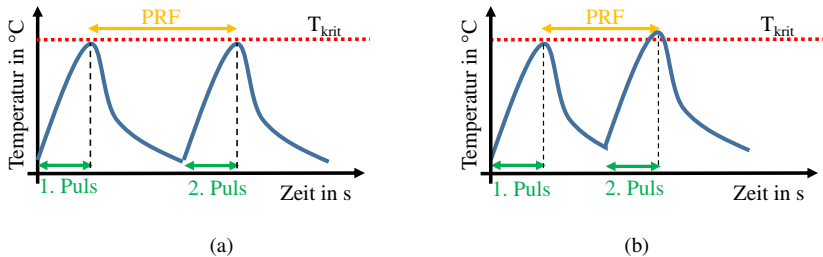


Abbildung 1.2: Thermisches Additivitätsverhalten. (a) Zwei zeitlich aufeinander applizierte Pulse erzeugen einen Temperaturanstieg im Gewebe. Die PRF ist so niedrig, dass die beiden Pulse sich bezüglich der Temperatur im Gewebe nicht beeinflussen. (b) Die PRF ist so hoch, dass der zweite Puls eintrifft, bevor das Gewebe seine ursprüngliche Ausgangstemperatur erreicht hat, wodurch die kritische schädigende Gewebetemperatur erreicht wird.

Bewertung im Lasersicherheitsstandard: Die Laserschutznorm DIN EN 60825-1 [14] fordert je nach Wellenlänge für die Bewertung von wiederholt gepulsten oder modulierten Lasern der Laserklasse 1 eine Prüfung hinsichtlich dreier Kriterien (vgl. Tabelle 4 aus Ref. [14]):

1. Einzelpuls-Kriterium: Die in die Pupille treffende Bestrahlung durch einen Einzelpuls einer Pulsfolge darf den GZS eines Einzelpulses nicht überschreiten. Die Berechnung (vgl. Gl. (1.1)) des GZS lässt sich aus dem Lasersicherheitsstandard [14] für die applizierte Einzelpulsdauer entnehmen. In dieser Untersuchung wird der GZS für die Parameter dieser Arbeit angenommen (Wellenlängenbereich von 400 nm bis 700 nm, Pulsdauern von 10^{-11} s bis $5 \cdot 10^{-6}$ s).

$$\text{GZS}_{\text{Einzelpuls}} = 7,7 \cdot 10^{-8} \cdot C_6 J \quad (1.1)$$

2. Mittleres-Leistungs-Kriterium: Die mittlere Leistung einer Pulsfolge in der Emissionsdauer T darf die Leistung, die der GZS (vgl. Gl. (1.2) und Gl. (1.3)) eines Einzelpulses der Dauer T entspricht, nicht überschreiten. Da in den Experimenten dieser Arbeit ein regelmäßiges Pulsmuster untersucht wird, reicht es aus, über die Zeitbasis von 100 s zu mitteln.

$$\text{GZS}_{\text{Pulsfolge, photo-chemisch}} = 3,9 \cdot 10^{-5} \cdot C_3 W \quad (1.2)$$

$$\text{GZS}_{\text{Pulsfolge, thermisch}} = 7 \cdot 10^{-4} \cdot C_6 \cdot T_2^{(-0,25)} W \quad (1.3)$$

3. Kriterium des reduzierten Pulses (C_5): Die Energie pro Puls darf den GZS (vgl. Gl. (1.4)) der Laserschutznorm für einen Einzelpuls multipliziert mit dem Korrekturfaktor C_5 nicht überschreiten. Die Bestimmung des jeweiligen C_5 hängt von der zu berücksichtigenden Zeitdauer (durch die Anzahl der Pulse und ihre zeitlichen Abstände zueinander) und dem Abbild des Laserstrahls auf der Netzhaut ab.

$$\text{GZS}_{\text{Pulsfolge}} = \text{GZS}_{\text{Einzelpuls}} \cdot C_5 \quad (1.4)$$

Der Wertebereich des C_5 hängt von der Anzahl an Pulsen nach Gl. (1.5) ab. Diese Definition ist gültig für Pulsdauern $t < T_i$.

$$\begin{aligned} C_5 &= 1 & N &\leq 600 \\ &= 5 \cdot N^{-0,25} \text{ (min. 0,4)} & N &> 600 \end{aligned} \quad (1.5)$$

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden auf Grenzwerte der Edition 2 ebenfalls verwiesen, da der Arbeitsschutz auf dieser in Deutschland derzeit beruht. Zudem wird untersucht, in wie weit die Änderungen zur Edition 3 gegenüber den Ergebnissen dieser Studie gerechtfertigt sind.

Unterteilung der Emissionsgruppen im Lasersicherheitsstandard Bei *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen [16,29,32–39] wurden die Laserschädigungsschwellen für einen Lasereinzelpuls (vgl. Abb. 1.3) bestimmt und mit einem thermischen Bulk-Modell verglichen. Es wurde festgestellt, dass für Expositionszeiten unterhalb von $50 \mu\text{s}$ das thermische Modell von den Ergebnissen der Laserschädigungsschwellen abweicht und schädigende thermo-mechanische Effekte dominieren. Der Übergangsbereich kann jedoch aufgrund der Spotgröße und der damit einhergehenden Wärmeflussverteilung variieren.

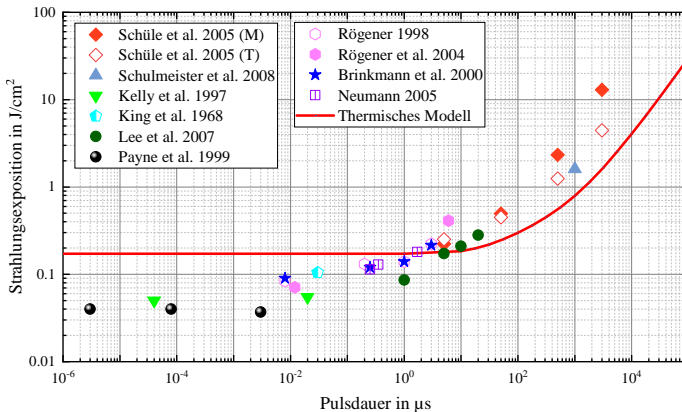


Abbildung 1.3: Laserschädigungsschwellen *ex vivo* [16, 29, 32–39]. In den Untersuchungen von Schüle et al. [32] wurden Zelltod und thermo-mechanische Erscheinungen unabhängig voneinander gemessen. Die rote Linie gibt die Vorhersage des Zelltods durch das thermische Modell an.

1.2.2 PULSADDITIVITÄT

Die additive Wirkung von wiederholten Pulsen oder Mehrfachexpositionen hängen vom Mechanismus der Gewebeschädigung ab.

Photo-chemisch: Photo-chemische Effekte sind von der gesamten kumulativen Dosis im absorbierenden Gewebe abhängig. Untersuchungen zu den wirksamen Wellenlängenbereichen, die photo-chemische Effekte hervorrufen, sind bislang kaum verfügbar. Bei länger andauernden wiederholten Expositionen ($t > 1$ s) reduzieren Verhaltensfaktoren wie Gewebebewegung und Aversionsreaktionen die Exposition an einer bestimmten Abbildungsstelle. Wiederholte oder intermittierende Expositionen sind weitgehend relevant für ultraviolette Bestrahlung, da schädigende photo-chemische Effekte und Reparaturprozesse konkurrieren [19].

Thermisch: Bei thermischen Verletzungen, wenn die Energie während der thermischen Einschusszeit (vgl. T_i) abgegeben wird, z.B. in einer Zeitspanne, in der während der Exposition keine signifikante Wärmeableitung stattfindet, bestimmt die kumulative Dosis auch die thermisch induzierte biologische Wirkung. Für wiederholte Pulsexpositionen, die länger als die thermische Einschusszeit dauern, sagen mathematische Modelle, die auf experimentelle biologische Wirkungsdaten basieren, additive Effekte voraus. Modellierungen zur Vorhersage thermischer Schäden sind bereits entwickelt, validiert und verifiziert worden [40–42].

Thermo-mechanisch / Photo-mechanisch: Bei kurzen Pulsen ($t > 10\mu\text{s}$), bei denen nicht-lineare Effekte dominieren, ist nur eine geringe Additivität durch beispielsweise der Hintergrunderwärmung des Gewebes zu erwarten [43]. Es gibt keine biologische Erklärung für eine Reduktion der notwendigen Einzelpulsenergie einer Pulsfolge, um eine Schädigung zu verursachen. In neueren Übersichtsarbeiten [25, 44, 45] der biologischen Datenbank für repetitive Pulse wurde gezeigt, dass ein Teil der scheinbaren Additivität auf die statistische Behandlung der Daten zurückzuführen ist. Daher wurden in den USA die Regeln zur Bestimmung der Expositionsgrenze für repetitive Pulsexpositionen in der Anwendernorm des American National Standard for Safe Use of Lasers (ANSI) vereinfacht. Dort wurde der Korrekturfaktor C_5 (in den USA als C_p bezeichnet) für Pulse kleiner T_i unabhängig zur Pulsanzahl auf einen Wert von 1 festgelegt.

1.2.3 KRITIK AM STAND DER TECHNIK

Die Betrachtung der Datenbasis verfügbarer Schädigungsmessungen zeigt eindeutig, dass diese als Grundlage für den Lasersicherheitsstandard gering sind und die GZS jederzeit durch neue Forschungsergebnisse angepasst werden. Die Bewertung der Augensicherheit für den Arbeitsbereich eines LiDAR stellt dabei eine besondere Herausforderung, dar, die in diesem Kapitel erläutert werden.

UNZUREICHENDE DATENBASIS

Die Datenlage bei ns-Pulsen ist gering und weist für den Arbeitsbereich eines LiDAR (kurze Pulse, NIR, kHz-PRF) keine adäquaten Daten auf, was auf die nicht-existente Verfügbarkeit eines Lasers auf dem kommerziellen Markt zurückzuführen ist, der den Anforderungen bezüglich Leistung und Laserstahleigenschaften für Schädigungsmessungen entspricht. Eine Anforderung betrifft eine hohe Einzelpulsleistung um bereits mit Einzelpulsen eine Schädigung zu erzeugen damit anschließend durch Absenkung der Einzelpulsenergie die Wirkung von Mehrfachpulsen untersucht werden kann. Da die kommerziell verfügbaren NIR-Laser niedrigere Energie emittieren, wurden die Laser nicht für diese Arbeit verwendet.

Es sind Untersuchungen bis 850 nm und ab 1064 nm verfügbar [46, 47], jedoch wird für den Wellenlängenbereich dazwischen nur interpoliert. In diesem Bereich sind keine großen Abweichungen zu erwarten, allerdings ist unklar, bis zu welchem Wellenlängenbereich photo-chemische Effekte wirksam sein können, weil diese bislang kaum erforscht wurden.

ZUVERLÄSSIGKEIT DER DATEN

Aus den verfügbaren Datensätzen geht hervor, dass im Bereich der ps-Pulse bis in den μ s-Bereich eine hohe Diskrepanz (bis zu einem Faktor von 4) bezüglich Schädigungsschwellen von NHP-Daten gegenüber Explant-Messungen besteht, die methodischen als auch messtechnischen Ursprungs sind. Weiterhin muss ergänzt werden, dass auch innerhalb der *in vivo* als auch *ex vivo* Messungen hohe Diskrepanzen bis zu einem Faktor von 3 vorliegen.

Die individuelle Handhabung verschiedener Forschungsgruppen zur messtechnischen Vorgehensweise wie die Wahl des Strahlprofils, der Strahlqualität, der Schadensidentifikationskriterien und des Algorithmus zur Bestimmung einer schädlichen Laserexposition führt neben unterschiedlichen messtechnischen Parametern wie die Pulsdauer, der PRF und der Wellenlänge zu den inkongruenten Ergebnissen.

Die Uneinheitlichkeit (vgl. Abb. 1.4) lässt sich im Wesentlichen zu folgenden Punkten zusammenfassen:

- Zur besseren Vergleichbarkeit der Schädigungsschwellen wird üblicherweise die Exposition H angegeben, die jedoch keine Kühlungseffekte (vor allem relevant bei Mehrfachpulsen) bei kleineren Spots berücksichtigt.
- Es erweisen sich dosimetrische Schwierigkeiten bei der Bestimmung laser-induzierter Schädigungsschwellen im *in vivo* Organismus. Daher sind die Messungen an NHP mit großen Messunsicherheiten versehen und mit Bedacht zu bewerten. Vor allem kleinere retinale Spots ($< 100\ \mu\text{m}$) sind mittels des Ophthalmoskops nur schwer erkennbar. Die Verwendung von Explants scheint daher aus messtechnischer Sicht zielführend zu sein.
- Es werden Gewebeproben verschiedener Säugetierarten verwendet. In der Regel werden Schweine-, Rinder- oder Kaninchen-Explants verwendet.
- Häufig gibt es eine Vorauswahl der Explant-Proben, was die biologische Variabilität begrenzt.
- Bei den Untersuchungen der Schädigungsschwellen an Explants wurden teilweise die Messergebnisse nach der Bestrahlung hinsichtlich des inhomogenen Strahlprofils korrigiert (um einen Faktor von bis zu 3,8 [32]). Die Vorgehensweise dieser Nachkorrektur greift auf theoretische hergeleitete Faktoren zurück und ist deshalb ebenfalls zu hinterfragen.

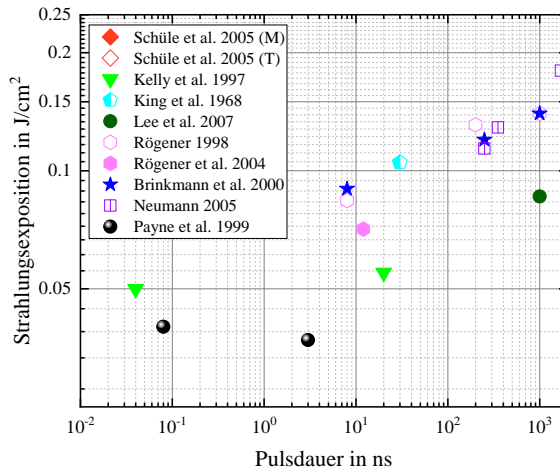


Abbildung 1.4: Übersicht vorhandener *ex vivo* Schädigungsexpositionen [29, 32–39] für Einzelpulse im ns-Bereich. Die Inkongruenz im sub-ns-Bereich nimmt einen Faktor von ca. 3 an.

DATENLAGE ZUR MULTIPULSAUSWIRKUNGEN

Untersuchungen zu Schädigungsschwellen von Multipulsbestrahlung sind in Abb. 1.5 und in Tab. 1.2 dargestellt, wobei zwei Kritikpunkte deutlich werden: Einerseits spiegelt sich hier die Uneinheitlichkeit der Daten erneut ab. Es sind keine einheitlichen Korrelationen zwischen Pulsdauer, Wellenlänge oder Durchmesser und dem Reduktionstrend erkennbar. Außerdem sind die messtechnischen Kontrollsysteme zur Bestimmung der Laserparameter in den älteren Messungen fraglich, da die für die Exposition H notwendigen Strahldurchmesser lediglich theoretisch abgeleitet wurden. Zudem hat sich die Technologie der Mess- und Lasergeräte in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert.

Dieser Mangel an vertrauenswürdigen Daten führt zu großer Ungewissheit, ob sich die im Lasersicherheitsstandard beschriebenen Korrekturfaktoren dazu eignen, den Verlauf der Schädigungsschwellen zu beschreiben. Insbesondere der Verlauf bei Applikation höherer Pulsanzahlen - wie bei den vom LiDAR ausgesandten Frames - sind zu hinterfragen, da eine Augensicherheit garantiert sein muss.

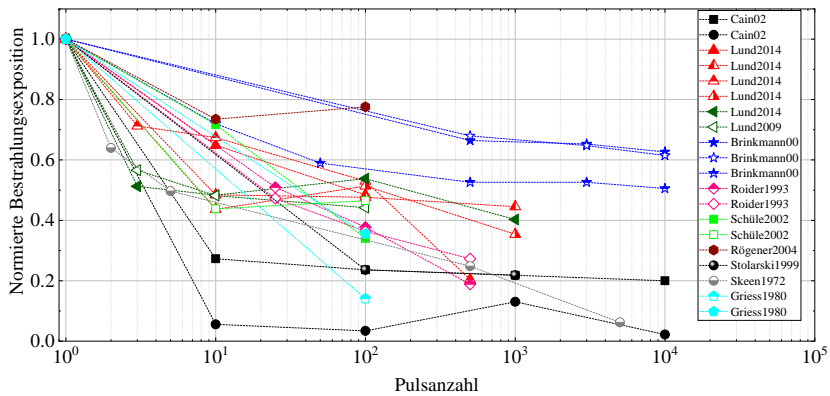


Abbildung 1.5: Darstellung verfügbarer, normierter *ex vivo* und *in vivo* Multipulsdaten im sichtbaren Bereich und für 1064 nm und Pulsdauerzeitbereiche von Sub-Pikosekunden bis Sub-Millisekunden. Insgesamt ist ein Abfall der Schädigungsschwellen mit zunehmender Pulsdauer erkennbar. Der Absenkungsgrad ist trotz Sortierung nach Pulsdauer, Pulswiederholrate oder Durchmesser nicht eindeutig erkennlich.

VERWENDUNG DES C_5 KRITERIUMS

Da die Umgebungsdetektion durch einen LiDAR darauf basiert, dass mehrfach sehr kurze Pulse (ns- bis μ s- Range) ausgesandt werden, müssen nach Normvorschrift auch die Korrekturfaktoren bezüglich wiederholender Pulse zur Bestimmung der GZS angewandt werden.

Wie in Abschnitt 1.2.1 erläutert, müssen Laserprodukte die GZSs für Multipulsbestrahlung nach drei Kriterien erfüllen. Der Korrekturfaktor des reduzierten Puls (C_5) ist aus empirischen Beobachtungen bei der Untersuchung von repetitiver Bestrahlung, die zu thermischen Schädigungen an der Netzhaut geführt haben, abgeleitet worden. Dieser Ansatz lässt sich auch mit den aktuellen Modellierungsmöglichkeiten (siehe Kap. 4.2) für Pulsbreiten im μ s- bis s-Bereich verifizieren und validieren. Der zugrundeliegende Schädigungsmechanismus gilt als verstanden und kann somit für thermische Schädigungen als Grundlage für die Vorhersage von Auswirkungen von Mehrfachpulsung verwendet werden.

Tabelle 1.2: Chronologische Übersicht zu Multipulsmessungen aus der Literatur. G ≡ Gaussprofil. T ≡ Top Hat. M ≡ Macula. P ≡ Paramacula. K ≡ Kollimierter Strahl. KA ≡ Kaninchen. E ≡ Explant.

Referenz	Wellenlänge in nm	Pulsdauer	Pulsanzahl	Strahlprofil	Gewebe	Evaluirungszeitpunkt in h	Spotgröße in μm	Puls wiederholrate in Hz
Skeen [48] '72	514,5	10 μs	Var ^a	G	NHP, M	1h	1,5 ^{b*}	Var ^a
Ebbers '73	k.A.	10 ns	1-20	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	10
Ebbers [49] '74	905	30 ns	k.A.	k.A.	NHP, P	k.A.	k.A.	40/10 ³
Gibbons [50] '74	514,5	40 μs	1-500	G	NHP, M	k.A.	k.A.	10 ² /10 ³
Stuck [47] '78	k.A.	270/730 ns	1-5000	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1-10 ³
Stuck [47] '78	k.A.	10/40 μs	1-3 · 10 ⁵	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1-10 ⁵
Hemstreet [46] '78	1064	270-770 ns	2-5 · 10 ⁴	G	NHP, M	1	1,47 [*]	10 ⁻¹ -10 ⁴
Griess [51] '80	532/1064	16 ns	1-10 ²	G	NHP, M, P	1/24	K, 900	10
Lund [52] '81	Var ^c	Var ^c	Var ^c	G	NHP, P	2	3 [*]	Var ^c
Roider [53] '93	514	5 μs	1-500	T	KA	2/24	110	500
Stolarski [54] '99	800	130 fs	1-10 ³	k.A.	NHP, P	1/24	k.A.	k.A.
Brinkmann [29] '00	527	0,25-3 μs	1-10 ⁴	T**	E	k.A.	47	500
Schüle [55,56] '02	527/532	8 ns-1,7 μs	1-10 ²	T**	KA	k.A.	116	10/100/500
Rögener [37] '04	532	6 μs	1-10 ²	T**	E	0,5	k.A.	500
Lund [25,57] '09/ '14	532	7 ns	1-10 ³	T	NHP, P	1/24	100/500	10
Lund [26] '14	532	100 μs	1-10 ³	T	NHP, P	1/24	100	50/10 ³
Diese Arbeit	532	1,8 ns	1-2 · 10 ⁴	T	E	0,25	319***	25

Anmerkungen:

* Korneal gemessener Spot

** Top Hat mit Intensitätsmodulationen

*** Kantenlänge, da quadratischer Spot

^a Variation zwischen 2 Hz (N = 1), 10 Hz (N = 5), 100 Hz (N = 50), 1 kHz (N = 500) und 10 kHz (N = 5000)

^b Strahldurchmesser in mm, ohne Angabe an welcher Stelle vermessen.

Indikation, dass auf kleiner Spot eingestellt wurde.

^c 532 nm, PRF 10 Hz, 140 ns für (N = 1, 10, 100); 850 nm, PRF 10 Hz, 180 ns für (N = 1, 10, 100, 1000); 860 nm, PRF 120 Hz, 500 ns für (N = 15 000-960 000)

Da bei thermo-mechanischer Schädigung ebenfalls eine Reduktion der Schädigungsschwellen beobachtet wurde, ist der für ursprünglich zur Beschreibung thermischer Schäden eingesetzte Korrekturfaktor (C_5) auch für die kürzeren Pulsdauern angewendet worden, ohne auf biologischen Modellen zu basieren.

Der empirisch ermittelte Reduktionsfaktor ist zudem limitiert durch die maximale Pulsanzahl, die experimentell für sowohl thermische als auch thermomechanische Einflüsse evaluiert wurde. Da durch diese Doppelverwendung keine bio-chemischen bzw. physikalischen Effekte berücksichtigt werden, ist es nicht möglich, Schädigungsschwellen für bislang nicht untersuchte höhere Pulsanzahlen bzw. längere Emissionsdauern zuverlässig vorherzusagen.

Wie in Kap. 1.2.2 beschrieben, wurde der verwandte Korrekturfaktor C_P bei der letzten Revision dahingegen so angepasst, dass keine Reduktion mit zunehmender Pulsanzahl stattfindet. Diese Umsetzung wird bis heute in Kommissionen wie der ICNIRP diskutiert. Es wird außerdem hinterfragt, ob der europäische Korrekturfaktor C_5 ebenfalls in dieser Weise angepasst werden soll.

PULSINTERAKTIONEN

Die Reduktion der Einzelpulsenergie einer Pulsfolge zur Erzeugung einer retinalen Schädigung weist auf mögliche Additivitätseffekte im bestrahlten Gewebe nach der Applikation von ns-Pulsen hin. Diese Effekte können nach dem Stand der Forschung weder erklärt noch modelliert werden. Der dominierende Schädigungsmechanismus ist nicht bekannt und wird auf Basis von teilweise uneinheitlichen Daten interpoliert. Aus dem bisherigen Stand der Technik lässt sich keine biologische oder physikalische Erklärung für eine Abhängigkeit zur Pulsanzahl finden. Zudem wird kritisiert, dass bislang die Schädigungsschwellen mit der Anzahl der Pulse vorrangig bewertet wird und nicht von den zeitlichen Pulsabständen. Zudem kann eine Hintergrunderwärmung des Gewebes bei Sequenzen über 1 kHz nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend von fehlenden Studien mit niedriger PRF, sind keine weiteren Interpretationen des dominanten Schädigungsvorgangs möglich, weswegen Schädigungsschwelle für hohe Pulsanzahlen wie in der LiDAR zu hinterfragen sind.

1.3 ZIELE UND STRUKTUR DER ARBEIT

Das Ziel dieser Dissertation besteht darin die Datenlage laser-induzierter Schädigung von Multipulsbestrahlung zu erweitern, um ein besseres Verständnis

des Schädigungsmechanismus zu erlangen. Dabei sollen auch die damit korrespondierende Pulsinteraktion und Pulsadditivität untersucht werden. Dieses Verständnis dient der Datenbasis für die Grenzwerte und der Definition des Reduktionsfaktors für Multipulsbestrahlung im Lasersicherheitsstandard für zukünftige Aufarbeitungen. Für die Umsetzung dieser Aufgabe wird eine Vorgehensweise ausgearbeitet und ein Setup zur Bestimmung von laser-induzierter Schädigung an retinalen Explants entwickelt. Diese Untersuchung soll einerseits gesundheitliche Schäden ausschließen und andererseits den daraus resultierenden wirtschaftlichen Schaden verhindern.

Aus dem vorgestellten Kapitel ergeben sich Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht und beantwortet werden sollen. Dabei werden Themenschwerpunkte behandelt, die für die Augensicherheit von laser-basierten Systemen aus Abschnitt 1.1 von Bedeutung sind. Für die Untersuchung der Augensicherheit basierend auf den Grenzwerten der Laserschutznormen ergeben sich folgende Fragestellungen.

- *Warum weisen die bislang verfügbaren Daten eine hohe Diskrepanz bezüglich der Schädigungsschwelle auf? Mit welchen Ansätzen lässt sich das vermeiden?*

Da die Grenzwerte des Lasersicherheitsstandards auf Schädigungsschwellen aus Experimenten an NHP und Explants abgeleitet wird, sind diese Daten wichtig. Die verfügbaren Daten zum Vergleich mit einem LiDAR-Expositionsmodell weisen eine Diskrepanz von bis zu einem Faktor von 4 auf. Im Rahmen dieser Arbeit werden die messtechnischen und methodischen Herangehensweisen untersucht und bewertet. Daraus abgeleitet, wird ein optischer Messplatz entwickelt, der die Dosimetrie-Kontrolle auf ein qualitativ hochwertiges Niveau bringt. Der optische Messplatz soll gegenüber dem Stand der Technik eine verbesserte Stahlprofildurchmischung aufweisen, neuartige Fluoreszenzmittel in Betrieb nehmen und durch Automatisierung einen hohen Durchsatz erlauben. Mithilfe dieses Messplatzes sollen dann zunächst Untersuchungen von einzelnen Pulsen durchgeführt werden, bei dem Stahlprofildurchmischungen aus dem Stand Technik und der Optimierung dieser Arbeit verglichen werden sollen. Diese Untersuchung soll eine mögliche Erklärung für die Uneinheitlichkeit der bisherigen Daten darbieten.

- *Sind die zulässigen Grenzwerte des Lasersicherheitsstandards beständig oder könnte durch neue Messergebnisse eine erneute Revision verursacht werden wenn die MZB zu nah an den erlaubten Bestrahlungen liegen? Wie sollte das Setup und die zu untersuchenden Parameter gewählt werden, um das LiDAR-Expositionsmuster abzubilden und die Augensicherheit zu gewährleisten?*

Revisionen werden üblicherweise durch Empfehlungen der ICNIRP ausgelöst. Diese Kommission überprüft die aktuellsten Forschungsarbeiten zu laser-induzierten retinalen Schädigungen. In der vorliegenden Arbeit werden mithilfe eines optischen Setups, retinale Gewebeproben mit Pulsfolgen bestrahlt, deren Pulsdauer vergleichbar mit der des LiDARs ist. Dabei wird ein Strahlprofil mit konstanter Energiedichte zur Bestimmung der schädigenden Exposition verwendet. Es wird in dieser Arbeit eine niedrigere PRF als beim LiDAR verwendet, um eine mögliche Hintergrunderwärmung zu verhindern, die die Schädigungsmechanismen beeinflussen kann. Primär sollen qualitativ hochwertige Schädigungsschwellen für bislang nicht untersuchte Emissionsdauern überprüft werden und anschließend mit den Grenzwerten des Lasersicherheitsstandards verglichen werden. Obwohl LiDAR-Systeme üblicherweise bei NIR-IR-Wellenlängen emittieren, wird in dieser Arbeit sichtbares Licht (532 nm) untersucht, da die Norm für diesen Wellenlängenbereich die größte Diskrepanz aufweist. Revisionen beeinflussen in der Regel die angrenzenden zulässigen Bestrahlungen anderer Wellenlängenbereiche zusätzlich, um dabei einen erhöhten Sicherheitsabstand einzuhalten.

- *Welche zugrundeliegenden Schädigungsmechanismen führen zur Schädigung der Netzhaut bei Einzelbelichtungen als auch bei Multipulsbelichtungen? Wie sehen die Wirkzusammenhänge bei längeren Emissionsdauern aus? Dominieren weiterhin die gleichen Mechanismen oder kommt es zu einem Wechsel?*

Nach bisherigem Stand der Forschung ist davon auszugehen, dass thermo-mechanische Schädigung durch Mikrokavitation im Gewebe verantwortlich für den Zelltod ist. Diese Beobachtung wurde jedoch nur für Einzelbelichtungen bestätigt. In dieser Arbeit werden Methoden und deren Effizienz aufgezeigt, die Mikrokavitation während der Bestrahlung aufzeigen können. Zudem ergibt sich aus weiteren Studien [58,59], dass photo-chemische Schädigungen durch lange Emissionen

nicht auszuschließen sind und sich zum primären Schädigungsmechanismus für lange Emissionen entwickeln können. Diese Effekte wirken zwar hauptsächlich für Ultraviolettes Licht (UV), allerdings ist unklar ab welchem Wellenlängenbereich dieser Mechanismus an dominanter Wirkung abnimmt. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse mit der Beschreibung von photo-chemischen Prozessen verglichen.

Anhand der Interpretation der Daten sollen Modellierungsansätze vorgestellt werden, die auf wirklichkeitsgetreuen neuen Daten basieren. Anhand dieser Arbeit sollen somit durch vertrauensvolle Schädigungsmessungen Haut- und Augengefährdungen durch schädliche Laserstrahlung vermieden werden.

- *Der Reduktionsfaktor zur Multipulsbestrahlung für kurze Pulse wird regelmäßig hinterfragt. Ist dieser Korrekturfaktor bezüglich eines vergleichbaren LiDAR-Expositionsmodells gerechtfertigt oder sollte er nach amerikanischen Vorbild ebenfalls vernachlässigt werden?*

Anhand der generierten Ergebnisse dieser Arbeit wird der Sicherheitsabstand zu den MZB des Lasersicherheitsstandards bestimmt. Daraus ableitend werden die Reduktions- und Sicherheitsfaktoren evaluiert.

- *Der histologische Aufbau des Auges eines NHP ist dem eines Menschen ähnlich. Warum werden dennoch Explants verwendet und wie vertrauenswürdig sind die generierten Daten?*

NHP weisen wie Menschen im Gegensatz zu den Explants eine Macula auf, die als die sensitivste Stelle in der Netzhaut gilt. Diese Sensitivität lässt sich mit Vergleichsstudien berechnen und anwenden. Da die Explants aus Schlachtabfällen gewonnen werden, ist deren Verfügbarkeit entschieden höher als die Anzahl der Augen von NHPs. Daher ist die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und somit Vertrauenswürdigkeit von Schädigungsschwellen durch Explants deutlich höher. Die histologischen Unterschiede zu NHP können durch einen Korrelationsfaktor von bisherigen Forschungsarbeiten berücksichtigt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, Tierversuche an NHP zu vermindern und die alternative Verwendung von Schlachtabfällen in Form von Explants zu erweitern. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit auch die Vorteile bei der Verwendung von Explants ausgearbeitet.

STRUKTUR DIESER ARBEIT

In Kapitel 1 wird die zugrundeliegende Motivation der Arbeit und der Stand der Technik vorgestellt.

In Kapitel 2 werden die zum Verständnis notwendigen physikalischen Prinzipien vorgestellt, um die Wirkprinzipien bei der Laser-Gewebe-Interaktion verständlich zu machen. Zudem wird auch das Prinzip der Energiedissipation beschrieben, um die Vorgänge nach der Exposition, die zu Zellschädigung führen können, vermittelbar zu machen.

In Kapitel 3 sind die Laser-Gewebe-Interaktionen mit der Netzhaut erläutert. Es werden die Schadensmechanismen herausgearbeitet sowie der Stand der Technik zu deren Beschreibung. Dabei liegt der Schwerpunkt auf Multipulsbestrahlung im Zusammenhang zum bisherigen Verständnis der Pulsadditivität.

Für die Durchführung der Schädigungsexperimente werden technische Messmethoden angewandt, die in Kapitel 4 erläutert werden. Dabei wird die Modendurchmischung zur Veränderung des Laserstahlprofils für Gewebeexposition, das Modell zur Untersuchung von Hintergrunderwärmung vorgestellt sowie verschiedene Methoden zur Detektion einer Mikroblasenbildung im Gewebe beschrieben und für die Verwendbarkeit dieser Arbeit evaluiert.

Die Konzeptionierung und Realisierung eines Messplatzes zur Untersuchung laser-induzierter retinaler Schädigungen an Explants und simultaner Messmethodik von letalen zellinternen Phasenwechseln wird in Kapitel 5 vorgestellt. Dabei wird ein Ansatz dargestellt, um die Modendurchmischung gegenüber dem Stand der Technik zu optimieren. Bezugnehmend auf die Laser-Gewebe-Interaktionen aus Kapitel 5, werden die Arbeitshypothesen zur Beschreibung von Pulsinteraktionen ausgearbeitet und demonstriert.

In Kapitel 6 wird die Durchführung von Schädigungsmessungen an Einzelpulsen und Multipulsen unter verschiedenen Messparameter (Modendurchmischungen verschiedener Qualität, verschiedene Befeuchtungsgrade und Temperaturvariationen) veranschaulicht. Zusätzlich werden Ansätze zur simultanen Begleitmessung der Mikroblasenbildung bei Einzelpuls-Untersuchungen entwickelt und vorgestellt.

Kapitel 7 befasst sich mit der Auswertung und Interpretation der Messergebnisse. Der Lasersicherheitsstandard wird für die generierten Daten angewandt,

um die Grenzwerte zu überprüfen. Des Weiteren wird untersucht, inwieweit Messunsicherheiten die Diskrepanz der verfügbaren Daten aus dem Stand der Technik erklären können. Zudem werden die Schädigungsschwellen hinsichtlich der erarbeiteten Pulsinteraktionsmodelle interpretiert, um ein besseres Verständnis der Pulsadditivität für Modellierungsansätze im ns-Pulsbereich abzuleiten.

Kapitel 8 fasst die aus dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zusammen und stellt einen Ausblick für zukünftige Arbeiten vor.

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- LiDAR-Systeme zählen zu den Schlüsseltechnologien für das autonome Fahren.
- Die Technik des LiDAR basiert auf emittierten Laserpulsen, deren Leistung entscheidend für die Reichweite sowie der Gewährleistung der Augensicherheit ist.
- Die zulässige Bestrahlung wird in der Lasersicherheitsnorm DIN EN 60825-1:2015 festgelegt, welche an neue Schädigungsmessungen und dem daraus gewonnenen Verständnis angepasst wird.
- Die Revision (2014) führte zur Senkung der zulässigen Bestrahlstärke, wodurch Produkte für Endverbraucher nicht auf den Markt gebracht werden konnten, da die neu eingestufte Laserklassifizierung in Europa nicht für die Consumer-Branche freigegeben ist.
- Der Schädigungsmechanismus von Sub- μ s-Multipulsen (vgl. LiDAR) gilt bislang als unvollständig verstanden und kaum untersucht.
- Zur Erweiterung der Datenlage für den Lasersicherheitsstandard wird im Rahmen dieser Arbeit die Multipulsbestrahlung an retinalem *ex vivo* Gewebe untersucht. Dazu wird Licht der Wellenlänge 532 nm appliziert, da die Norm für diesen Bereich die größte Diskrepanz aufweist und Revisionen in der Regel die angrenzenden zulässigen Bestrahlungen anderer Wellenlängenbereiche (LiDAR: NIR/IR) beeinflusst.

2 GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel werden die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen physikalischen Grundlagen vorgestellt. Da die Wechselwirkung zwischen Laserlicht und biologischem Material ausschlaggebend für den Apoptose-auslösenden Mechanismus ist, wird in Abschnitt 2.1 darauf eingegangen, wie das Licht im Gewebe absorbiert wird und zu einer Erwärmung durch Schwingungsanregung führt. Darauf aufbauend wird die Energiedissipation in Form von Wärmeausbreitung durch die Wärmeleitung beschrieben und weiterhin die Entstehung eines thermo-elastischen Drucks.

Da die Fluoreszenzanregung verschiedener Farbstoffe in der vorliegenden Arbeit für Vitalitätsassays genutzt wird, werden zudem das fundamentale Schema der fluoreszierenden Wirkung in Abschnitt 2.1.6 vorgestellt.

In Abschnitt 2.2 wird das Prinzip der Kohärenz vorgestellt, welches für die Strahldurchmischung in optischen Fasern zur Lichtführung genutzt wird. Daher wird in Kap.2.3 der grundlegende Aufbau des Lichtleiters vorgestellt und der Modenbegriff für die strahlen-optische und wellen-optische Beschreibung eingeführt.

2.1 ABSORPTION VON LICHT

Wenn Laserlicht auf Gewebe trifft, kann es neben Reflexion, Streuung und Transmission auch absorbiert werden. Bei der Absorption wird die Intensität einer einfallenden elektromagnetischen Welle beim Durchgang durch ein Medium abgeschwächt. Der Absorptionsgrad eines Mediums ist definiert als das Verhältnis von absorbiertener und einfallender Intensität. Die Absorption beruht auf einer teilweisen Umwandlung von Lichtenergie in Wärme-induzierten Bewegung oder bestimmte Schwingungen von Molekülen des absorbierenden Materials [31].

Die Fähigkeit eines Mediums, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren, hängt von der elektronischen Beschaffenheit seiner Atome und Molekülen, von der Wellenlänge der Strahlung, von der Dicke der absorbierenden Schicht und internen Parametern wie der Temperatur oder der Konzentration der absorbierenden Stoffe ab. Zur Beschreibung der Absorption wird üblicherweise auf das Lambert-Beersche-Gesetz verwiesen nach Gl. (2.1):

$$I(z) = I_0 \cdot \exp(-\alpha_{\text{abs}} \cdot z) \quad (2.1)$$

Dabei wird die lokale Intensität $I(z)$ an der Stelle z der optischen Achse, ausgehend von einer Eingangsintensität I_0 als Funktion über den Absorptionskoeffizienten des Materials α_{abs} beschrieben [31, 60].

2.1.1 SCHWINGUNGSANREGUNG

Durch Lichtabsorption und der damit einhergehenden Energiezufuhr, werden Moleküle durch Anregung der Elektronen in mechanische Schwingungen durch oszillatorische Bewegungen versetzt. Im Rahmen dieser Arbeit entsprechen Moleküle als Grundbausteine von bestrahltem Gewebe der Materie, die durch den Energieeintrag angeregt werden. Unter der Annahme, dass ein Molekül sich im Grundzustand S_0 befindet, kann dieses durch Absorption die Energie $E_{\text{phot}} = h \cdot f$ aufnehmen und in einen Zustand S_1 versetzen. Diese Zufuhr kann daraufhin in Bewegungsenergie (E_{kin}) überführt oder über spontane bzw. stimulierte Emission unter Abgabe eines Photons abgegeben werden (vgl. Kap. 2.1.6, Fluoreszenz). Die Zunahme der kinetischen Energie durch die Oszillationen können als Wärme interpretiert werden [61, 62].

Bezogen auf das Jabłoński-Diagramm (Veranschaulichung der Anregungszustände über Valenzelektronen-Übergänge, vgl. Abschnitt 2.1.6), treten unmittelbar nach der Absorption eines Photons mehrere Prozesse mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit auf. Der wahrscheinlichste ist die Relaxation auf das niedrigste Schwingungsenergieniveau des ersten angeregten Zustands ($S_1 = 0$). Dieser Prozess wird als interne Umwandlung oder Schwingungsrelaxation (Energieverlust bei fehlender Lichtemission) bezeichnet und benötigt im Allgemeinen wenige Pikosekunden. Dies erfolgt durch nichtlineare Kopplungen mit anderen Schwingungsfreiheitsgraden und führt durch den Übergang von lokalen zu globalen Schwingungen zu einer Temperaturerhöhung.

2.1.2 ANREGUNG DER BINDUNGSELEKTRONEN

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, lassen sich Schwingungen auf atomarer Ebene durch die Elektronenübergänge beschreiben. Aus makroskopischer Ebene können diese Schwingungen je nach Höhe des Energieeintrags auch die Bindungselektronen innerhalb eines Moleküls zum Oszillieren bringen. Durch Laserlicht können somit die Bindungselektronen einer chemischen Verbindung angeregt werden. Dies lässt sich durch ein Jabłoński-Diagramm (vgl. Abschnitt 2.1.6) und durch ein Molekülorbital-Energiediagramm darstellen. Orbitale beschreiben dabei die Elektronendichteverteilung durch eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit im molekularen Raum. Diese Molekülorbitale werden je nach der Bindungsart (z. B. Einfach- oder Doppelbindung) einzelner Atome im Molekül äquivalent als σ – bzw π -Orbital bezeichnet und können quantenmechanisch berechnet werden [60].

Durch die Absorption von Photonen mit der Energie E_{phot} wird eine Anregung zum Übergang der Valenzelektronen aus den Molekülorbitalen σ, π in ein sogenannten anti-bindendes Orbital σ^*, π^* . Diese Übergänge werden üblicherweise als Elektronenübergänge bezeichnet und werden über ein dem Übergang entsprechendes ΔE beschrieben, welches sich über die Wellenlänge und demnach der absorbierten Photonen ergibt [60].

2.1.3 WÄRMELEITUNG

Neben der klassischen direkten Wärmeleitung durch Atom- und Molekülschwingungen, kann Wärmeenergie auch über Konvektion sowie über thermische Strahlung transportiert werden¹. Im folgenden Abschnitt wird über die Wärmeleitungsgleichung beschrieben, wie der Energieeintrag eines Laserstrahls mit der Pulsdauer τ_{Laser} im umliegenden Gewebe durch Diffusion transportiert wird [63].

Die durch Schwingungsanregung induzierte Wärme kann durch die Wärmeleitungsgleichung nach Gl. (2.2) beschrieben werden. Dabei entspricht ρ der Dichte des Materials bzw. Gewebes, A der bestrahlten Fläche bezüglich der

¹ Die Abführung der Wärmeenergie über einen adjazenten Massestrom (z. B. über Blutgefäße) und thermische Strahlung wird im Folgenden aufgrund der Verwendung von Explants vernachlässigt.

radialen Ausbreitung r zum Zeitpunkt t , T der Gewebetemperatur, c_p der spezifischen Wärmekapazität des Gewebes und κ der Wärmeleitfähigkeit [63].

$$\frac{\partial T}{\partial t}(r, t) - \kappa \nabla^2 \cdot T(r, t) = \frac{A(r, t)}{\rho \cdot c_p} \quad (2.2)$$

Gleichung (2.2) wurde in den Arbeiten der letzten Jahrzehnte [64–66] vielfach untersucht und zur Beschreibung der Wärmeausbreitung im thermodynamischen Gleichgewicht unter Bezugnahme der Greenschen Funktion angepasst. Unter der Annahme eines kugelsymmetrischen Körpers ergibt sich durch den Term der rechten Seite aus Gl. (2.2) folgende Greensche Gleichung nach Gl. (2.3) zur Beschreibung der Diffusion:

$$g(r, t) = \frac{1}{\rho \cdot c_p \cdot (4 \cdot \pi \cdot \kappa \cdot t)^{3/2}} \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4 \cdot \kappa \cdot t}\right). \quad (2.3)$$

Dieser Ausdruck kann durch Faltung für die Beschreibung eines kugelsymmetrischen Körpers angepasst werden, wobei der Exponent maßgeblich die Wärmeausbreitung bezüglich der Zeit bestimmt. Für die weitere Diskussion von thermischen Ausgleichsprozessen in inhomogenen erwärmten Körpern wird daher lediglich dieser nach Gl. (2.4) betrachtet:

$$\tau_T = \frac{R^2}{4 \cdot \kappa} \quad (2.4)$$

wobei von einem Körperradius der Größe R und einer Wärmeleitfähigkeit κ ausgegangen wird. Als thermische Einschlusszeit wird die Zeitdauer bezeichnet, die das bestrahlte Areal benötigt, um thermische Ausgleichsprozesse mit der Umgebung durchzuführen. Karabutov et al. [67] definieren die thermische Einschlusszeit äquivalent zur Wärmeausbreitung für das umgebende Medium (aus Gl. (2.4) $\kappa \equiv \kappa_{\text{Cytoplasma}} \equiv \kappa_{\text{Wasser}}$) anstatt innerhalb des Körpers. Die Wärmeausbreitungszeit τ_T kann daher für Wärmeausbreitungen innerhalb des Körpers verwendet werden sowie durch die Definition von Karabutov et al. zur Beschreibung thermischer Dissipation an die Umgebung.

Für die vorliegende Arbeit ist daher die thermische Diffusionslänge nach Gl. (2.5)

$$r_T = \sqrt{4 \cdot \kappa \cdot \tau} \quad (2.5)$$

darüber entscheidend, ob die thermischen Einschlussbedingungen erfüllt sind. Bei Laserbestrahlung mit sehr kurzen Pulsdauern ($\tau_{\text{Laser}} \ll \tau_T$) findet vernachlässigbare Diffusion statt, was zur Deponierung der Energie im bestrahlten Areal führen kann.

2.1.4 THERMO-ELASTISCHE DRUCKENTSTEHUNG

Durch den Energieeintrag eines Lasers in Form von Wärme, dehnt sich ein Körper aus, was wiederum thermo-elastische Druckwellen auslöst. Basierend auf der Kontinuitätsgleichung und der Bewegungsgleichung lassen sich diese Wellen für die Druckausbreitung beschreiben [68]. Aufbauend auf der Annahme, dass der Energieeintrag eines Lasers E_0 mit der einfallenden Intensität absorbiert ($\equiv E_{\text{abs}}$) und transmittiert ($\equiv E_{\text{trans}}$) wird, (Streueffekte werden für die Berechnung vernachlässigt), ergibt sich der Zusammenhang nach Gl. (2.6):

$$E_{\text{abs}} = E_0 \cdot (1 - \exp(-\alpha_{\text{abs}} \cdot z)) \quad (2.6)$$

Durch Anwendung der Taylor-Entwicklung ergibt sich der vereinfachte Ausdruck nach Gl. (2.7):

$$E_{\text{abs}} \approx |E_0 \cdot \alpha_{\text{abs}} \cdot z| \quad (2.7)$$

Unter der Annahme, dass die strahlende Relaxation vernachlässigt wird und die komplette absorbierte Energie in thermische Energie umgesetzt wird, ergibt sich nach Gl. (2.8) folgender Zusammenhang:

$$E_{\text{abs}} = E_{\text{th}} = \Delta T \cdot C_p \cdot \rho \cdot V, \quad \text{mit } \Delta T \approx \frac{E_0 \cdot \alpha_{\text{abs}} \cdot z}{C_p \cdot \rho \cdot V} \quad (2.8)$$

Durch einen Volumenausdehnungskoeffizienten γ , der die Ausdehnung über einen Temperaturunterschied beschreibt, ergibt sich im adiabatischen System und einem temperaturunabhängigen Raumausdehnungskoeffizienten und einer Linearisierung durch Taylorentwicklung für kleine Temperaturänderungen Gl. (2.9):

$$\Delta V = \gamma V_0 \cdot \Delta T \quad (2.9)$$

Um nun einen Zusammenhang zu induzierten Druckwellen zu erstellen, wird das Kompressionsmodul K verwendet, welches in Flüssigkeiten durch die

Schallgeschwindigkeit in Flüssigkeiten durch $K = (c_{\text{H}_2\text{O}})^2 \cdot \rho$ definiert ist und folgende Umformung nach Gl. (2.10) erlaubt:

$$\Delta p = -c_{\text{H}_2\text{O}}^2 \cdot \rho \cdot \gamma \cdot \Delta T \approx -c_{\text{H}_2\text{O}}^2 \cdot \rho \cdot \gamma \cdot \frac{E_0 \cdot \alpha_{\text{abs}} \cdot z}{C_p \cdot \rho \cdot V} \quad (2.10)$$

Mit Gl. (2.10) kann nun der durch einen Laserpuls entstehende Druckunterschied im Gewebe berechnet werden. Aus die notwendige Sensitivität der zu verwendenden Messtechnik kann dadurch abgeschätzt werden.

2.1.5 ARRHENIUS-AKTIVIERUNGSENERGIE

Chemische Reaktionen bestehen im Wesentlichen aus Spalten oder Formieren von Verbindungen zwischen zellulären Reaktionspartnern. Nach der physikalischen Chemie, wird die Aktivierungsenergie E_A als die notwendige Energie interpretiert, die notwendig ist, um eine Umwandlung in einen aktiven Status auszulösen [60, 69]. Der Zusammenhang zwischen der Aktivierungsenergie und einer Temperatur T kann qualitativ durch die Arrhenius-Gleichung nach Gl. (2.11) beschrieben werden

$$E_A = -R \cdot T \cdot \ln \frac{k}{Z} \quad (2.11)$$

wobei k als Geschwindigkeitskonstante von chemischen Reaktionen angenommen wird, R die Gaskonstante beschreibt und Z für den Frequenzfaktor steht. Dieser Frequenzfaktor wiederum beschreibt die Kollisionsrate zwischen Molekülen oder einzelnen Atomen in einem bestimmten Volumen pro Zeiteinheit. Zahlreiche Experimente wurden zur Bestimmung dieses Werts für laser-induzierte Schädigungen durchgeführt, jedoch variiert dieser Faktor in der Literatur zwischen $10^{80}\text{s}^{-1} - 10^{120}\text{s}^{-1}$ [24, 69–71].

2.1.6 FLUORESZENZ

Die Emission von Licht durch ein elektronisch angeregtes Molekül oder Atom wird als Lumineszenz bezeichnet. Dabei wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Der grundlegende Unterschiede dieser beiden

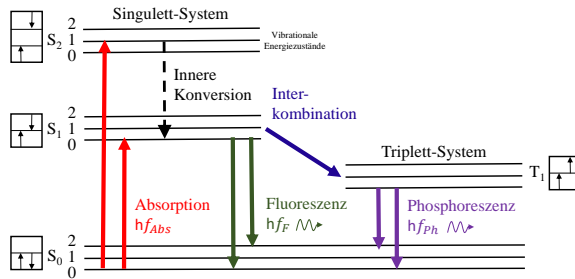


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Jablonski-Termschema zur Darstellung der Elektronenübergänge.

Strahlungsarten können im Jablonski-Termschema in Abb. 2.1 veranschaulicht werden.

Ein angeregtes Molekül existiert im niedrigsten angeregten Singulett-Zustand S_1 für Zeitbereiche in der Größenordnung von ns (die längste Zeitspanne im Fluoreszenzprozess um mehrere Größenordnungen), bevor es schließlich in den Grundzustand S_0 relaxiert. Wenn die Relaxation aus diesem langlebigen Zustand mit der Emission eines Photons einhergeht, wird der Prozess formal als Fluoreszenz bezeichnet. In diesem Fall behält das Elektron seinen Spin bei. Die Fluoreszenzbanden weisen einen sogenannten Stokes-Shift auf, welcher sich die bevorzugte Anregung in einem schwingungsangeregten Unterzustand des elektronisch angeregten S_1 -Zustandes begründen lässt. Die eng beieinanderliegenden Schwingungsenergieniveaus des Grundzustands, erzeugen, wenn sie mit normaler thermischer Bewegung gekoppelt sind, während der Emission einen weiten Bereich von Photonenenergien. Infolgedessen wird Fluoreszenz normalerweise nicht als scharfe Linie, sondern als Emissionsintensität über einen Wellenlängenbereich beobachtet [60].

2.2 ZEITLICHE UND RÄUMLICHE KOHÄRENZ

Kohärenz beschreibt die Fähigkeit einer elektromagnetischen Welle, aufgrund seiner Wellennatur Interferenzerscheinungen hervorzurufen, welche von der Phasenverschiebung der beteiligten Lichtwellen abhängt. Üblicherweise wird zwischen einer temporalen und räumlichen Kohärenz unterschieden.

Temporale Kohärenz liegt vor, wenn entlang der zeitlichen Achse eine feste Phasendifferenz besteht. Die räumliche Kohärenz dagegen, beschreibt die feste Phasendifferenz entlang einer räumlichen Achse.

ZEITLICHE KOHÄRENZ

Laserlicht ist eine Folge von harmonischen Wellenzügen endlicher Breite, die voneinander durch diskontinuierliche Phasenänderungen getrennt sind. Diese Phasenänderungen entstehen durch zufällig schwankende Emissionszeitpunkte der angeregten Atome. Für die elektromagnetische Welle von Laserstrahlung ist daher die mittlere Dauer des gleichbleibenden Wellenzugs, die Kohärenzzeit τ_0 charakteristisch. Die Länge eines kohärenten Pulses wird als Kohärenzlänge l_t bezeichnet und berechnet sich durch die folgenden Gleichungen (2.13) und (2.14). Die Kohärenzzeit τ_0 ist gegeben durch den Kehrwert der natürlichen Linienbreite bzw. der spektralen Frequenzbandbreite Δf nach Gl. (2.12),

$$\tau_0 = \frac{1}{\Delta f}. \quad (2.12)$$

Die Kohärenzlänge l_t , die das Licht innerhalb der Kohärenzzeit in einem Medium mit Brechungsindex n zurücklegt, ist gegeben durch Gl. (2.13)

$$l_t = c \cdot \tau_0 = \frac{c}{\Delta f \cdot n} \quad (2.13)$$

Aus diesem Grund nimmt die Kohärenzlänge mit steigender Frequenzbandbreite ab, weswegen Laser mit definierter Laserwellenlänge und geringer Bandbreite, Kohärenzlängen von mehreren hundert Metern aufweisen. Übertragen auf die Wellenlänge λ des Lasers ergibt sich die Beziehung nach Gl. (2.14)

$$l_t = \frac{\lambda^2}{\Delta \lambda}, \quad (2.14)$$

wodurch die Kohärenzlänge l_t nach dem Wiener-Chintschin-Theorem beschrieben wird. Dieses Theorem beschreibt, wie der Kohärenzgrad mit der normierten Fouriertransformation des Lichtspektrums zusammenhängt.

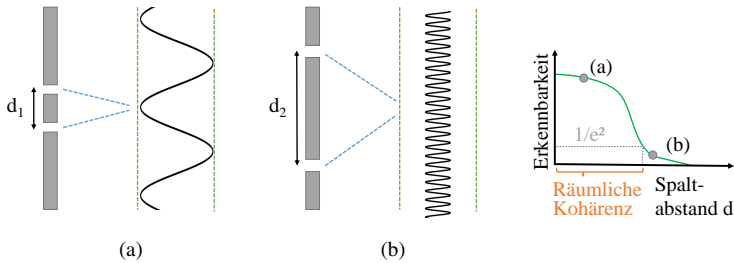


Abbildung 2.2: Räumliche Kohärenz in Zusammenhang mit einem Spaltabstand. (a) Ein kleiner Spalt d_1 verursacht hohe Modulationen. (b) Ein großer Spalt d_2 verursacht viele geringe Modulationen.

RÄUMLICHE KOHÄRENZ

Bei einer räumlichen Auftrennung der Wellen können diese durch die räumliche bzw. laterale Kohärenz miteinander interferieren.

$$l_r \approx \frac{\lambda}{\alpha_{\text{spat}}} \quad (2.15)$$

Dies lässt sich einfach durch einen Doppelspaltexperiment (vgl. Abb. 2.2) nachweisen, wobei der Abstand der Spalte ausschlaggebend für das Interferenzmuster ist. Üblicherweise wird l_r als die räumliche Kohärenz beschrieben, bei der die Interferenz bis zu ca. 87% ($1/e^2$) abnimmt. Zudem lässt sich Gl. (2.15) auch auf die Divergenz eines Lasers beziehen, wobei der Nenner, der vollen Divergenz entspricht.

2.3 STRAHLVERLAUF IN MULTIMODE-FASERN

Prinzipiell versteht man unter optischen Fasern eine spezielle Art von Wellenleitern zur Lichtführung durch das Prinzip der Totalreflexion. Üblicherweise geben die Brechungsindexprofile und die Bauform der Faser den möglichen Verlauf der Strahlen indirekt an. Die Eigenschaften einer Stufenindex-Faser hängen hauptsächlich von ihren Abmessungen, dem Kerndurchmesser r_{Kern} ,

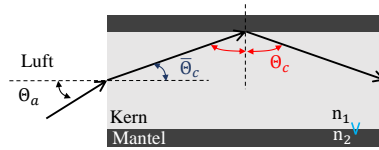


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Einkoppels in eine optische Faser, die unter Totalreflexion das Licht führt.

dem Biegeradius d_{Bieg} und den Brechzahlen des Kerns n_1 und des Mantels n_2 ab. Der maximale Winkel θ_a unter dem eine Faser das Licht durch Totalreflexion leiten kann, wird als Akzeptanzwinkel der Faser bezeichnet. Der Sinus dieses Winkels (vgl. Gl. (2.16)) wird bei der Charakterisierung einer Faser angegeben und wird als Numerische Apertur (NA) bezeichnet (siehe Abb. 2.3).

$$NA = n_0 \cdot \sin(\theta_a) = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}, \text{ mit } n_0 \approx 1, \text{ da in Luft} \quad (2.16)$$

In einer Stufenindex-Faser wird üblicherweise zwischen zwei unterschiedlichen Arten von Strahlwege (vgl. Abb. 2.4) innerhalb einer Faser unterschieden. Liegen die einfallenden Lichtstrahlen in einer Ebene, durch die die Faserachse verläuft, bilden sich Meridionalstrahlen aus.

In allen anderen Fällen entstehen schiefe Strahlen. Die Angabe der NA bezieht sich dabei stets auf die Meridionalstrahlen. Schiefe Strahlen bilden

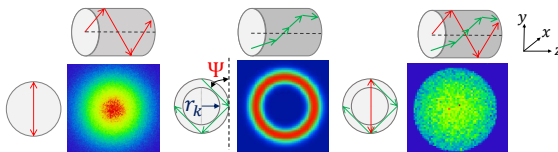


Abbildung 2.4: Strahlenausbreitung in einer Faser und Intensitätsprofil des Faserquerschnitts. Links: Meridionale Strahlen passieren nach jeder Reflexion die zentrale Achse der Faser. Mitte: Schräge Strahlen gehen nie durch die zentrale Achse der Faser und breiten sich auf einem schraubenförmigen Pfad entlang der Faser aus, der tangential zur inneren Brennlinie des Pfades mit Radius r_k ist. Rechts: Die Änderung der Eingangswinkel erlauben beide Ausbreitungsrichtungen und somit eine Mischung aus Meridionalstrahlen und schrägen Strahlen zur Top Hat Verteilung.

mit der Tangentialebene an der Kern-Mantel-Fläche den Winkel $\Psi < 90^\circ$ (vgl. Abb. 2.4). Sie kreuzen die Faserachse nie und breiten sich in schraubenförmigen Bahnen aus. Für Stufenindexprofilfasern entspricht die Projektion auf die Querschnittsfläche einem Polygonzug, so dass diese Strahlen einen kreisförmigen Bereich mit dem Radius r_k in der Nähe der Achse nicht durchqueren. Eine Verbindung aus beiden Fällen kann eine Top Hat Form am Faserende auslösen.

2.3.1 MODENBEGRIFF UND MODENAUSBREITUNG

Die Lichtführung innerhalb einer Faser kann außerdem über die Modentheorie beschrieben werden. Licht wird hierbei als elektromagnetische Welle behandelt und eine Mode als feste Feldverteilung der Wellen entlang der Ausbreitungsrichtung z innerhalb der Faser. Demnach können nur diskrete Wellen, beziehungsweise Moden, mit diskreter Ausbreitungsgeschwindigkeiten in der Faser geführt werden. Im Gegensatz zur Singlemode-Faser, werden bei Multimode (MM)-Fasern bedingt durch den größeren Kerndurchmesser mehrere und gleichzeitig höhere Moden (vgl. Abb. 2.5) angeregt.

Eine geführte transversale Mode besitzt eine feste Feldverteilung während der Propagation entlang einer Richtung z bei konstantem Brechungsindexprofil der Faser. Auf dem Weg durch die Faser verändert sich abhängig von der Propagationskonstante und dem zurückgelegten Weg z nur die Phase der sich ausbreitenden Wellenfront [72].

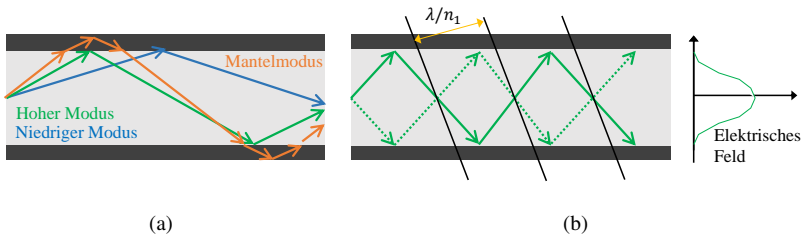


Abbildung 2.5: Strahlführung in einer MM-Faser. (a) Für verschiedene Modenarten. (b) Ausbildung der Modenstruktur in der Faser.

In MM-Fasern wird eine hohe Anzahl an Moden mit unterschiedlichem transversalem Intensitätsprofil und Propagationskonstanten geführt. Die Grundmode, die Mode niedrigster Ordnung, weist dabei ein gaußförmiges Intensitätsprofil auf [73]. Die höheren Moden treten weiter in den Mantel ein, während die Grundmode im Kern zentriert propagiert. Damit sich Licht in einer bestimmten Richtung ausbreiten kann, muss sich eine Welle mit ihrer eigenen reflektierten Welle konstruktiv überlagern (vgl. Abb. 2.5b), so dass nach zweifacher Reflexion die Phasenlage (Abstand dazwischen entspricht λ/n_1) erneut übereinstimmt [74]. Damit Strahlen konstruktiv interferieren, muss die Phasendifferenz somit ein Vielfaches von $2 \cdot \pi$ sein.

Das gesamte elektrische Feld am Ende der Faser und an jedem beliebigen Ort innerhalb der Faser ergibt sich aus der Superposition der unabhängig voneinander geführten Moden. An verschiedenen Stellen ergeben sich durch die relative Phase der einzelnen Moden Interferenzeffekte. Die Phasenänderung und somit die Interferenzeffekte sind abhängig von dem Propagationsfaktor und resultieren somit unter anderem aus den Einkoppelbedingungen, wie zum Beispiel der Biegung, der Streckung der Faser oder Temperaturveränderungen [72]. Die Anzahl der Moden wird durch den sogenannten V_{Faser} -Parameter begrenzt, welcher durch den Kernradius r_{Kern} und die NA der Faser gegeben ist und sich nach Gl. (2.17) zusammensetzt [72, 75]:

$$V_{\text{Faser}} = \frac{2 \cdot \pi \cdot r_{\text{Kern}}}{\lambda} \cdot \text{NA} = \frac{2 \cdot \pi \cdot r_{\text{Kern}}}{\lambda} \cdot \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.17)$$

Dieser Hilfsparameter V_{Faser} wird auch als normierte Frequenz bezeichnet und lässt sich veranschaulichen, da die Moden stehenden Wellen senkrecht zur Faserachse entsprechen. Bei größerem Kerndurchmesser können sich somit Moden höherer Ordnung bilden, die bei ausreichend hoher NA geführt werden können.

Eine Näherung zur Anzahl der geführten Moden M ergibt sich daher durch $M = V^2/2$. Für kürzere Wellenlängen folgt hieraus eine höhere Anzahl an möglich geführten Moden. Bei gegebenen Faserparametern (z.B. geringem Brechungsindexunterschied, hoher Wellenlänge, geringem Kernradius) kann die Faser für eine hohe Wellenlänge auch nur eine, die Grundmode, führen.

Bei der Lichtleitung durch MM-Fasern kommt es durch die Weglängendifferenz der verschiedenen Moden bei Einkopplung kohärenter Strahlung zu

Interferenz. Um ein möglichst homogenes Intensitätsprofil am Faserende zu erhalten, muss der Weglängenunterschied der miteinander interferierenden Moden über der Kohärenzlänge des Lasers liegen.

2.3.2 ANREGUNG HÖHERER MODEN UND MODENKOPPLUNG

Einhergehend mit der Anregung mehrerer und gleichzeitig höherer Moden in MM-Fasern ist eine Vergrößerung der Strahldivergenz am Faserausgang zu beobachten. Welche Moden in der Faser angeregt werden, hängt von den Lichtleiterbedingungen, wie beispielsweise der Einkoppel-NA sowie den Bedingungen innerhalb der Faser ab. Bei geringer Dejustierung am Fasereingang konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Modulation der Modenanregung vorherrscht. Eine schräge Einkopplung bewirkt die Anregung von sogenannten Ringmoden, einhergehend mit hohen Leistungsverlusten [76]. Abgesehen von Einkoppel-Bedingungen kann auch innerhalb der Faser die Modenausbreitung beeinflusst werden.

Modenkopplung entsteht beispielsweise bei der Biegung der Faser. Diese oder andere Einflüsse wie Temperaturveränderung oder Mikrobiegungen innerhalb der Faser verändern den Brechungsindexverlauf der Faser. Derartige Abweichungen von der optimalen Faser führen zu einer lokalen Änderung der Propagationskonstante. Wenn daraufhin mehrere Moden dieselbe Propagationskonstante besitzen, findet ein Energieaustausch innerhalb der Moden statt, die Moden koppeln miteinander [77]. Niedrige Moden können hierbei mit höheren oder sogar Mantelmoden gekoppelt werden.

Wenn mehr als eine Mode in einer Faser geführt werden, kann es zur sogenannten Modendispersion kommen. Die einzelnen Moden erreichen dann unterschiedlicher Phasengeschwindigkeiten der einzelnen Frequenzkomponenten zeitversetzt das Faserende. Die Dispersion führt somit zu einer Verbreiterung des Pulses, vor allem bei der Verwendung von besonders langen Fasern. Diesem Effekt wirkt jedoch die Modenkopplung entgegen, welche die Anzahl der geführten Moden durch Kopplung reduziert [72].

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Die Lichtabsorption kann zu molekularen Schwingungen führen, die makroskopisch als Wärme interpretiert werden können. Dauer und Energie des Laserpulses können zum thermischen oder akustischen Einschluss im Gewebe oder zum Anregen biochemischer Verbindungen führen. Der sich ausbildende Effekt bestimmt die Art der Schädigung in bestrahlten Zellen.
- Die Fluoreszenzanregung kann durch Lichtabsorption bewirkt werden, wodurch Vitalitätsassays für biologisches Material ermöglicht werden.
- Bei der Lichtleitung durch MM-Fasern kommt es durch die Weglängendifferenz der verschiedenen Moden bei Einkopplung kohärenter Strahlung zur Interferenz. Um ein möglichst homogenes Intensitätsprofil am Faserende zu erhalten, muss der Weglängenunterschied der miteinander interferierenden Moden über der Kohärenzlänge des Lasers liegen.

3 LASER-GEWEBE-INTERAKTIONEN

Laserstrahlung impliziert ein besonderes Gefahrenpotenzial für Augen und Haut im Vergleich zu nicht-kohärenter Strahlung. Durch die hohe Kollimation des Laserlichts, wird dieses durch die Optik des Augenapparates (vor allem Hornhaut und Linse) nahezu beugungsbegrenzt und mit einer sehr hohen Energiedichte (Steigerung bis ca. Faktor 100 000) auf die Netzhaut (Retina) abgebildet. Da Laser zudem monochromatisch sind, entfallen chromatische Aberrationen bei der Projizierung des Laserstrahls auf die Retina.

Laser können sehr hohe Leistungen emittieren, wodurch diese je nach Betrieb (gepulst oder im Dauerstrichbetrieb (engl. Continuous wave) (CW)-Betrieb) verschiedene biologische Wechselwirkungen im Gewebe verursachen, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden. Zur Vermeidung einer Verletzung von Augen und Haut sind im Lasersicherheitsstandard Grenzwerte für die Exposition in Form von GZS und MZB festgelegt.

In diesem Kapitel werden die anatomischen und histologischen Grundlagen eines menschlichen Auges vorgestellt um ein Verständnis für die von der Laserstrahlung betroffenen Zelltypen herzustellen. Dabei wird vertieft auf die Laser-Gewebe-Wechselwirkungen eingegangen um Konzepte zur Beschreibung des Schädigungsmechanismus bei Multipulsbestrahlung zu entwickeln und in diesem Kapitel vorzustellen.

3.1 ANATOMIE UND HISTOLOGIE DES MENSCHLICHEN AUGES

In Abb. 3.1 ist der anatomische Aufbau eines Auges dargestellt. Die äußerste Schicht des Auges besteht aus der Hornhaut (Kornea) und der Lederhaut (Sklera). Die mittlere Schicht besteht aus der Aderhaut (Choroidea), dem Ziliarkörper und der Iris. Die Retina bildet die innerste Schicht (grüner Rahmen in

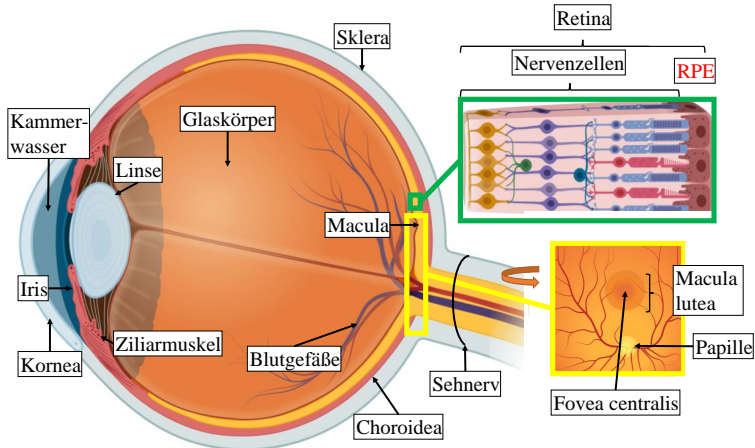


Abbildung 3.1: Anatomischer Aufbau des menschlichen Auges.

Abb. 3.1), die von der Choroidea und den retinalen Gefäßen über die Zwischenschicht des retinalen pigmentierten Epithels (RPE) mit Blut versorgt wird. Das Kammerwasser, der Glaskörper und die flexible Linse sind in diesen Schichten enthalten. Das Kammerwasser ist eine klare Flüssigkeit, die in der Vorderkammer, zwischen der Kornea und der Iris und im exponierten Bereich der Linse lokalisiert ist. Der Glaskörper besitzt eine gelartige Konsistenz mit deutlich größerem Volumen als das Kammerwasser, das den Raum zwischen der Linse und der Retina ausfüllt. Die Linse ist am Ziliarkörper durch das aus feinen, transparenten Zonulafasern bestehende Zentralband aufgehängt. Die Macula (gelber Rahmen in Abb. 3.1) ist ein ovaler, hoch pigmentierter gelber Fleck mit maximaler Sensitivität in der Nähe der Mitte der Retina [78].

In der ca. 0,4 mm-breiten Retina werden die Lichtreize zu Signalen verarbeitet, die anschließend an das Gehirn weitergeleitet werden. Lichtempfindliche Bauteile sind die Stäbchen, die skotopisches Sehen ermöglichen. Die Zapfen dagegen sind in der Lage das photopische Sehen zu realisieren. Es gibt drei Sorten von Zapfen mit Empfindlichkeitsmaxima im blauen, grünen und roten Spektralgebiet [78]. Zu den charakteristischen Stellen (gelber Rahmen in Abb. 3.1) der Retina gehören die *Macula lutea*, die wegen ihrer gelblichen Färbung so

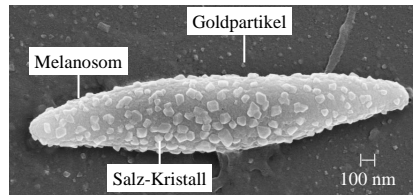


Abbildung 3.2: REM Aufnahme eines isolierten Melanosoms. Aus extrahierten RPE-Zellen wurden im Ultraschallbad aus HBSS einzelne Melanosome extrahiert. Anschließend wurden diese getrocknet und für die REM-Aufnahme mit Gold gesputtert. Durch die Verwendung von einfach destilliertem Wasser haben sich kleine Salzkristalle auf dem Zellorganell angehaftet.

genannt wird mit der *Fovea centralis* als Mittelpunkt und die Papille. Die *Fovea centralis* ist der zentrale Teil des gelben Flecks, die gleichzeitig die größte Konzentration an Zapfenzellen im Auge enthält und für zentrales, hochauflösendes Sehen verantwortlich ist. In der Papille dagegen treten der Sehnerv und die Blutadern aus dem Auge aus bzw. ein. An dieser Stelle befinden sich weder Zapfen noch Stäbchen, so dass dort kein Sehen möglich ist. Aus diesem Grund wird diese Stelle auch als der blinde Fleck bezeichnet. Darunter befinden sich mehrere Schichten von Nervenzellen (Ganglienzellen, Amakrinzellen, Bipolarzellen und Horizontalzellen), die die Signale der Photorezeptoren bereits verschalten und verarbeiten, bevor sie an das Gehirn weitergeleitet werden. Erst unterhalb dieser Schichten folgen die Stäbchen und Zapfen. In ihnen wird allerdings nur ein geringer Teil der einfallenden Strahlung absorbiert. Hinter dieser Schicht folgen schließlich das RPE und die Choroidea, welche die Retina mit Blut versorgt und auf der Sklera aufliegt. Das RPE ist etwa 10 μm dick und von Melanosomen (vgl. Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) Aufnahme in Abb. 3.2) durchsetzt [78, 79].

Das Epithel sitzt fest auf der Bruch-Membran, die als Grenzmembran zur Choroidea fungiert. Das RPE vermittelt den Stoffaustausch zwischen der Choriokapillaris und den Photorezeptorzellen und ist am Umsatz der Rezeptorfortsätze sowie an der Regeneration des Retinals¹ beteiligt. Das Pigment in Form von Melanin verringert Lichtreflexionen. Es schützt dadurch die Photorezeptoren

¹ In Verbindung mit Opsin entsteht dadurch Rhodopsin, wodurch die Signaltransduktionskaskade für „Sehen“ ermöglicht wird

vor Streulicht und hat somit Bedeutung für die Sehschärfe. Ca. 51 % der Strahlung wird vom RPE (bei 532 nm) absorbiert [80], der Rest wird in Sklera und Choroidea in Wärme umgesetzt. Da das Pigmentepithel zudem sehr dünn ist, wird die umgesetzte Energiedichte dort sehr hoch, was ein hohes Schadensrisiko impliziert [79].

Durch die hohen Absorptionseigenschaften und der resultierenden hohen Energiedichte in dieser Schicht, treten Zellschädigungen durch Laserstrahlung hier typischerweise als erstes auf. Daher wurde in bisherigen *ex vivo* Arbeiten zu retinalen Schädigungsmechanismen extrahiertes RPE verwendet. Auch in dieser Arbeit wird aus diesem Grund auf extrahiertes RPE zurückgegriffen.

3.2 RETINALE SCHÄDIGUNGSMECHANISMEN

Gesundheitliche Beeinträchtigungen durch Laserstrahlung sind im gesamten optischen Spektrum von 180 nm im UV bis im fernen IR möglich, aber das Risiko von Retinaverletzungen durch Strahlung im sichtbaren und nahen IR-Bereich (400 bis 1400 nm) ist von besonderer Bedeutung.

Die Schädigungsschwellen unterscheiden sich innerhalb des optischen Spektrums (vgl. Abb. 3.3) aufgrund der unterschiedlichen biologischen Wirkungen und der verschiedenen Strukturen des Auges, die potenziell gefährdet sind,

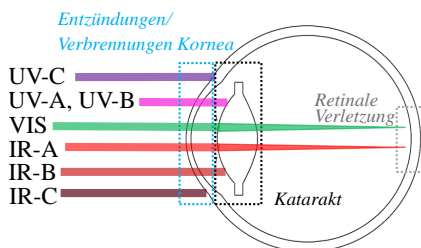


Abbildung 3.3: Eindringtiefe optischer Strahlung ins menschliche Auge. Vis- und IR-A-Strahlung werden auf die Netzhaut abgebildet und stellen somit ein besonders Gefahrenpotenzial für die Retina dar.

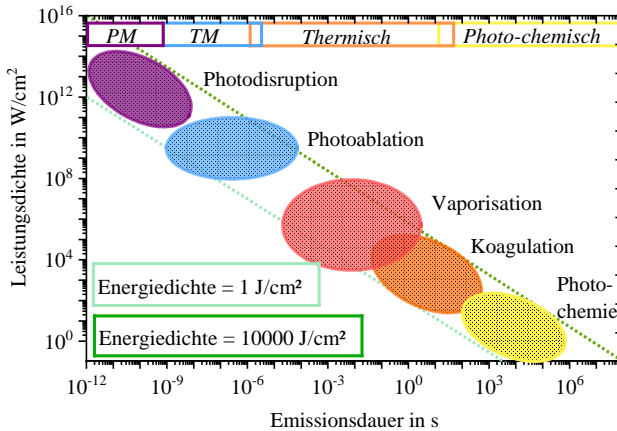


Abbildung 3.4: Schädigungsmechanismus bezüglich der Emissionsdauer und Leistungsdichte. PM \equiv Photo-mechanisch, TM \equiv Thermo-mechanisch.

enorm [31]. Die durch optische Strahlung induzierten biologischen Wirkungen sind im Wesentlichen sowohl für kohärente als auch für inkohärente Quellen für jede Wellenlänge, Expositionsort, -fläche und -dauer die gleichen. Biologische Wirkungen (vgl. Abb. 3.4) von Lasern sind das Ergebnis eines oder mehrerer konkurrierender biophysikalischer Wechselwirkungsmechanismen. Dabei wird zwischen photo-mechanisch, thermo-mechanisch, thermisch und photo-chemisch unterschieden, die je nach Spektralbereich, Bestrahlungsstärke und Expositionsdauer variieren.

PHOTO-MECHANISCH

Photo-mechanische Effekte treten auf, wenn Energie in die optische Zone in einem Puls (bei Leistungsdichten von $10^{12} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) deponiert wird und die Einwirkdauer kürzer ist als die akustische Einschusszeit ($\tau < 1 \text{ ns}$). Diese ist erforderlich, um die im Gewebe durch thermo-elastische Expansion erzeugte mechanische Spannung abzubauen. Dabei wird zwischen der klassischen Photodisruption, die im Gegensatz zur Ablation, bei höheren Bestrahlungsstärken und kürzeren Pulsdauern auftritt, unterschieden. Die lokale Temperatur in

der optischen Zone kann während der Laserbestrahlung 10 000 °C erreichen [43, 81, 82].

Schädigungsmechanismus Gewebeschäden resultieren aus mechanischen Druck- oder Zugkräften [83, 84]. Bei Bestrahlungsintensitäten oberhalb des Bereichs der thermo-mechanischen Schädigung und Pulsdauern unterhalb des ns-Regimes kann es zu einer Plasmaerzeugung durch Ionisation der Materie aufgrund der erhöhten Feldstärke im Gewebe kommen. Dabei handelt es sich um einen Lawineneffekt, der zu einer Energiedeposition im Bereich des Plasmas führt. Dadurch kann ein ideal definierter Schädigungsbereich durch Plasma-induzierte Ablation auch an Gewebestellen mit niedrigem Absorptionskoeffizient erzeugt werden. Zusätzlich kann sich abhängig von der deponierten Energie, ein Absorptionsplasma (freie Elektronen und Ionen) ausbilden, welches Schockwellen auslösen kann, die folglich zur Gewebeschädigung (Photodisruption) führen können [31, 85].

Modellierungsansatz Es wurden bisher Modelle [86, 87] entwickelt, die die Bestrahlungsstärkeschwellen für laser-induzierten Zerfall in verdichteten Medien, auch okulare und wässrige Medien, beschreiben. Diese Modelle sind eine Erweiterung des einfachen Ratengleichungsformalismus von Shen [88] für Kaskadenzerfall in Festkörpern. Multiphotonen-Effekte wurden in diesen Formalismus gekoppelt, indem die von Keldysh [89] entwickelte Theorie der Multiphotonen-Ionisation in konzentrierten Medien verwendet wurde. Eine allgemeine Beschreibung dieser Effekte wurde ausgearbeitet, konnte jedoch nicht in Relation zur Durchbruchschwelle gebracht werden. Unter der Annahme, dass lediglich ein Ionisationsmechanismus zur Ladungsträgerbildung beiträgt, konnte jedoch ein analytischer Ausdruck zur Beschreibung des optischen Durchbruchs zur applizierten Exposition entwickelt werden. Dieser Ansatz wurde für okulare Medien validiert [86, 87, 90].

THERMO-MECHANISCH

Bei einer Laserexposition mit Pulsdauern im ns- bis μs -Bereich und Bestrahlungsstärken von $10^8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ werden Mikrodampfblasen in RPE-Zellen durch

Verdampfung des Cytoplasma an der Melanosomoberfläche wegen der starken Absorption des Laserlichts generiert [29, 32, 33, 35, 37, 91, 92].

Schädigungsmechanismus Die Mikroblasenbildung ist ein Schadensmechanismus, der Aspekte des thermischen Einschlusses und des Spannungseinschlusses durch explosive Verdampfung kombiniert. Wenn der Temperaturanstieg während der Lasereinwirkung schnell genug ist, kommt es zu einem Phasenwechsel von Cytoplasma zu Dampf, der dann explosionsartig entweicht. Dieser Prozess wird als explosive Vaporisation bezeichnet und kann zu einer Gewebeerstörung führen, die der durch rein photo-mechanische Prozesse hervorgerufenen Schäden ähnlich ist. Die explosive Vaporisation wurde als Mechanismus für die RPE-Melanosomen-Photodisruption nach Exposition mit dem gepulsten Ausgang des Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG)-Lasers untersucht [93].

Bei transienten Mikrodampfblasen ist bis heute nicht geklärt durch welchen Mechanismus sie die Zellen schädigen. Bisherige Arbeiten [55, 92, 94] vermuten den Zelltod in der Volumenzunahme begründet. Es wurde dabei festgestellt, dass bei Pulsdauern unter $50 \mu\text{s}$ das Auftreten von Mikroblasen mit dem Zelltod einhergeht und die Schwelle zu deren Bildung dabei geringer ist. Das bedeutet, dass vor jedem Zelltod, eine Mikrodampfblase generiert wird, die dann zu einem kritischen Zustand führt, der eine Zellschädigung auslöst.

Modellierungsansatz Ein möglicher Modellierungsansatz basiert auf der Simulation des Temperaturverlaufs an der Melanosomoberfläche, an der sich die Mikroblasen bilden [30, 95, 96]. Dabei können die Melanosome dreidimensional modelliert werden unter der Annahme eines heterogen absorbierenden Körpers. Erste Arbeiten dazu, [97] simulierten die Temperatur an der Melanosomoberfläche unter der Annahme eines heterogenen Energieeintrags durch das Lambert-Beersche Gesetz in Kap. 2.1, Gl. (2.1) und eines homogenen Absorptionsverhaltens des Melanosoms durch den Absorptionskoeffizienten α . Darüber wird die Temperaturverteilung an der Oberfläche über die Wärmeleitungsgleichung berechnet, die zu einer lokalen Erhitzung führt und einen Phasenwechsel für die Mikroblasenbildung auslöst. Mittels der Wärmeleitungsgleichung (2.2) können durch räumliche und zeitliche Diskretisierungen, lineare Gleichungen zur Beschreibung der Temperatur für sämtliche Zeitschritte

mittels der Finite-Volumen-Methode (FVM) iterativ gelöst werden. Die konkreten thermischen Eigenschaften des Melanosoms, wie die Temperaturleitfähigkeit κ , die Dichte ρ des Zellorganells und der spezifischen Wärmekapazität c_p sind in Ref. [92] bestimmt worden. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich unter Bezugnahme von Gl. (2.2) mit Variationen der Form, Größe und der Orientierung eines Melanosoms. Unter der Annahme einer kritischen Oberflächentemperatur (ca. 150°C nach Ref. [92]) zur Entstehung von Mikroblasen wird diese Bedingung zum Zelltod für die Simulation gleichgesetzt. Bislang fehlen jedoch die Berücksichtigung optischer Streueffekte, die einen höheren Einfluss als die bislang bestimmten uneinheitlichen Absorptionskoeffizienten haben [98, 99]. Des Weiteren fehlt die genauere Diskretisierung des Melanosoms, das in der Realität aufgrund von Melaningranulae stark heterogen [29, 30, 96] absorbiert.

THERMISCH

Diese Art der Schädigung tritt bei Emissionsdauern ab ca. $50\ \mu\text{s}$ auf, da hierbei der Energieeintrag durch das Laserlicht in die Umgebung dissipiert. Bei der thermischen Schädigung von Gewebe liegt die Pulsdauer oberhalb der thermischen Relaxationszeit und kann angrenzende Bereiche ebenfalls schädigen. Der Skalierungsparameter für dieses zeitabhängige Problem ist die sogenannte thermische Relaxationszeit nach Hayes und Wolbarsht [100, 101]. Sie ergibt sich aus der Gleichsetzung der optischen Eindringtiefe L nach Gl. (2.5) als thermische Diffusionslänge.

Schädigungsmechanismus Durch die Absorption der Laserstrahlung im Gewebe wird Wärmeenergie erzeugt und die Gewebetemperatur erhöht sich. Biologisches Gewebe erleidet im Allgemeinen irreversible Schäden, wenn seine Temperatur um mehr als $10\ \text{K}$ über die Umgebungstemperatur erhöht wird. Nahe dieser Schwelle entwickelt sich die thermische Schädigung langsam und ist von der Dauer der thermischen Belastung abhängig. Die Schädigung akkumuliert sich kumulativ als Funktion der Temperatur und der Zeit, bis ein kritischer Grad der Schädigung erreicht ist. Dieser kumulative Schaden kann quantitativ als Schadensintegral ausgedrückt werden [102–104]. Je höher die Temperatur über die Schwelle steigt, desto schneller tritt die Schädigung ein.

Wenn der Temperaturanstieg gemäßigt ist, können sich thermische Schäden als denaturierte Proteine, Verlust der Tertiärstruktur von Makromolekülen oder Fluidisierung von Membranen manifestieren [105]. Diese Effekte können ausreichend sein, um einen verzögerten Zelltod zu verursachen. Einige Informationen über die Art und Weise des Zelltods wurden in einer Studie an kultivierten Zellen gewonnen, die thermischem Stress ausgesetzt waren [106]. In dieser wurde festgestellt, dass nach einem Temperaturanstieg auf 55°C bis 58°C, der Zelltod hauptsächlich durch Apoptose eintrat. Bei einer Erhöhung auf 60°C bis 68°C erhöhte sich die Anzahl der Zellen, die durch Apoptose oder durch Nekrose starben. Wenn der Temperaturanstieg jedoch 100°C erreicht, kommt es zum Sieden und Verdampfen von Gewebewasser, was zum Zelltod führt.

Modellierungsansatz Der Modellansatz einer thermischen Schädigung über das Schadensintegral wird schon seit 1970 verwendet, um thermische Verletzungen von Haut und Auge zu modellieren [107, 108]. Zudem half diese Modellierung auch dabei, das Verständnis von der Spotgrößenabhängigkeit als Funktion der Pulsdauer zu erweitern [16]. Durch diese Ergebnisse konnten die Expositionsgrenzen für gepulste ausgedehnte Quellen verändert werden [109].

Zur Vorhersage thermischer Schädigungsschwellen wurden bereits validierte Computermodelle entwickelt. Diese Modelle basieren auf der Berechnung des Temperaturverlaufs nach der Laserexposition und anschließender Integration des Arrhenius Integrals. Die kommerziell verfügbaren Modelle [24, 107] sind gegen die verfügbaren Einzelpulsschwellenwerte an NHP für einen Pulsdauerzeitbereich von 100 µs bis wenige Sekunden validiert. Dabei wird das Gewebe inkl. der enthaltenden Melanosome als Bulk-Modell (homogen absorbierendes Layer) angenommen. Für eine gegebene Laserexposition kann der Gewebetemperaturverlauf $T(t)$ durch Lösen der Wärmeleitungsgleichung numerisch berechnet werden. Anschließend kann das Schadensintegral ($\Omega \geq 1 \equiv$ Schaden), nach Gl. (3.1) berechnet werden.

$$\Omega = Z \int_0^\tau \exp\left(\frac{-E_A}{R \cdot T(t)}\right) dt \quad (3.1)$$

Dabei entspricht Z der Kollisionsfrequenz, E_A der Aktivierungsenergie und der Gaskonstante R . Unter der Verwendung der linearen Eigenschaften der Wärmeleitungsgleichung ($T = m \cdot E_{th} + T_0$) und einer Äquivalenzumformung für $\Omega = 1$, lässt sich ein Modell nach Gl. (3.2) für die schädigende Exposition $H_{krit,th}$ ($\equiv E_{th} \cdot \tau$) ableiten zu

$$H_{krit,th} = \left(\frac{E_A}{\ln(Z \cdot \tau) \cdot R} - T_0 \right) \cdot \frac{\tau}{m}. \quad (3.2)$$

PHOTO-CHEMISCH

Die photo-chemischen Effekte überwiegen im ultravioletten Spektralbereich (400 nm bis ca. 550 nm) und sind auch die Hauptart der retinalen Schädigung, die aus längerer Exposition (10 s oder mehr) mit kurzwelliger sichtbarer Strahlung (hauptsächlich blaues Licht) resultiert [59, 110, 111]. Die photo-chemische Ablation durch Interaktion zwischen UV-Photonen und Molekülen betrifft neben der Retina auch vor allem die vorderen Komponenten des Auges (vgl. Abb. 3.3) bei einer Beschädigung.

Üblicherweise werden bei dieser Wechselwirkungsart jedoch photo-oxidative Prozesse gemeint, bei denen der Energieeintrag durch Licht mit endogenen Chromophoren interagiert, die zu chemischen Veränderungen führen. Es gibt darüber hinaus sensibilisierende Wirkungen, wodurch die *photo-dynamische Therapie* [112] realisiert wurde, auf die jedoch im Weiteren nicht eingegangen wird.

Schädigungsmechanismus Bei photo-chemischen Effekten ist neben der Einwirkdauer auch vor allem die entsprechende Wellenlänge nach bisherigem Stand der Forschung verantwortlich für den Zellschaden. Es wird zwischen zwei wesentlichen Typen unterschieden:

1. Typ I: Tierstudien zeigten, dass fortgesetzte Expositionen tagelanger Exposition gegenüber einer hohen Lichtstärke zu einer retinalen Schädigung führt [113, 114]. Diese Art der Schädigung wurde mit einer direkten Schädigung der Photorezeptoren aufgrund des Ausbleichens der Photorezeptorpigmente in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass kurzwellige, sichtbare Strahlung die Alterung der Retina beschleunigt [85, 115].

2. Typ II: Die photo-chemische Schädigung hängt mit der Absorption von kurzwelligem Licht im Bereich von 400-520 nm durch das RPE und die Aderhaut zusammen [110, 111]. Dies wird üblicherweise als Blaulichtgefahr [116, 117] bezeichnet. Kleine Temperaturerhöhungen in der Retina (in der Größenordnung von 2-3 K) scheinen mit dem photo-chemischen Prozess synergistisch zu sein, so dass die Absorption durch Melanin über ein breites Wellenlängenband ebenfalls eine Rolle spielt, wenn auch eine nebensächliche [118].

Modellierungsansatz Durch empirische Beobachtungen wurde festgestellt, dass photo-chemische Schädigung über das Reziprozitätsgesetz beschrieben werden kann. Das bedeutet, dass die Photoreaktion eines Materials als Funktion des Strahlungsflusses variiert. Bunsen und Roscoe [119] führten die ersten Reziprozitätsgesetz-Experimente durch. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass alle photo-chemischen Reaktionsmechanismen nur von der absorbierten Gesamtenergie abhängen und statistisch unabhängig von den beiden Faktoren sind, die die absorbierte Gesamtenergie bestimmen, d. h. von der Strahlungsintensität I , und der Belichtungszeit t . Aus dem Reziprozitätsgesetz nach Gl. (3.3)

$$\int_0^{\tau} I dt = D_{\text{tot}} \quad (3.3)$$

geht hervor, dass lediglich die Dosis D_{tot} auf dem Gewebe die schädigende Wirkung ausübt. Das bedeutet, dass auch bei sehr kurzen Einwirkdauern photo-chemische Schädigungen eintreten, jedoch bei sehr hoher Intensität. Da die schädigende Exposition bei anderen Schädigungsmechanismen für diese Pulsdauern niedriger liegt, treten zwar photo-chemische Effekte auf, dominieren jedoch nicht, da andere Mechanismen beim Erreichen einer Mindestschwelle vorab greifen.

Erste Modellierungen hierfür wurden von Clark et al. [70] vorgestellt und basieren auf einigen empirisch ermittelten Parametern. Da das Reziprozitätsgesetz keine biologischen Wirkzusammenhänge wie Reparaturmechanismen berücksichtigt, wurde in seinem Modell über ein Zwei-Raten-Modell dieser Effekt durch empirische Daten implementiert (vgl. Anhang A).

3.3 AUSARBEITUNG VERSCHIEDENER PULSINTERAKTIONSMODELLE

Aus Kap. 1.2.1 geht hervor, dass eine Absenkung der Einzelpulsleistung von Pulsfolgen beobachtet wurde und im Lasersicherheitsstandard durch den Korrekturfaktor C_5 berücksichtigt wird. Die Begründung der Absenkung liegt im wirksamen Schädigungsmechanismus der Pulsfolge. So kann beispielsweise ein photo-chemischer Schaden durch Erreichen der schädigenden Dosis gemäß des Reziprozitätsgesetzes ausgelöst werden. Dabei wirkt die Dosis kumulativ über die entsprechende Einwirkdauer. Bei thermischen Schädigungen wurde die Pulsadditivität über das Arrhenius-Integral veranschaulicht und durch Experimente verifiziert und validiert. Bei photo-mechanischen Wirkungen, die aufgrund der ultra-kurzen Pulse ($\tau < 100$ ps) unterhalb der akustischen Einschusszeit liegen, bewirkt die Energiezufuhr unmittelbar eine Disruption und lässt somit keine Additivität zu.

Bei thermo-mechanischen Effekten ist nach heutigem Stand der Forschung unklar, welche Prozesse bei der Mikroblasenbildung in der RPE-Schicht zum Zelltod führen. Es wurde nachgewiesen, dass die Zellmembran zerstört wurde, jedoch nicht, auf welche Weise. So können mechanische Schockwellen, die Volumenzunahme, die schlagartige Druckänderung innerhalb einer RPE-Zelle, zytotoxische Reaktionen durch den Phasenwechsel oder den Energieeintrag in anderen Zellorganellen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist auch weiterhin unbekannt, wie sich eine Pulsadditivität für dieses Schädigungsregime entwickelt. Die Schädigungsschwellen von Mehrfachbestrahlung im thermo-mechanischen Pulsdauerzeitbereich zeigen, wie die durch thermisch-induzierten Schwellen, eine Reduktion an, was auf eine Interaktion im Gewebe hindeutet.

Da im Rahmen dieser Arbeit Schädigungsschwellen und -mechanismen von typischen LiDAR-Expositionen untersucht werden, ist die thermo-mechanische Schädigung (für Einzelpulse) aufgrund der emittierten Pulsdauern von besonderer Bedeutung. Daher wurden in Abb. 3.5 mögliche Pulsinteraktionshypothesen ausgearbeitet, die in den folgenden Unterkapiteln näher ausgeführt werden.

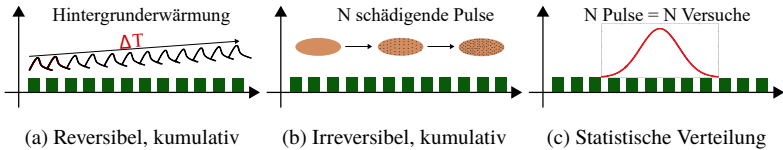


Abbildung 3.5: Wechselwirkungen während der Mehrfachpuls-Bestrahlung: (a) Reversibler Akkumulationseffekt, der während der Pulspause relaxiert (z. B. thermische Effekte durch die Hintergrundheizung). (b) Irreversibler Akkumulationseffekt, der während der Pulspause nicht relaxiert (z. B. stetige Veränderung der Melanosomoberfläche). (c) Statistisch unabhängiger Prozess (z. B. Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, eine kritische Mikroblase zu induzieren). Bei Prozess (a) würde die Anzahl der schädigenden Pulse durch große Pulspausen reduziert werden. Bei (b) und (c) wird die Gesamtzahl der Pulse dagegen nicht durch die Pulspause beeinflusst.

3.3.1 KUMULATIVE EFFEKTE

Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass das Gewebe durch die Exposition nachhaltig sensibilisiert wird. Die Bestrahlung wirkt also im Sinne einer Akkumulation auf das Gewebe, da der Einfluss durch die Häufigkeit des Auftretens (\equiv Pulse einer Pulsfolge) erhöht wird. Diese Akkumulationen können sowohl reversibel als auch nicht-reversibel sein. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Thesen ist die Annahme einer "Zurücksetzung" der Zellzustände im reversiblen Fall (siehe Abb. 3.5a). Unter der Annahme eines nicht-reversiblen Effekts (siehe Abb. 3.5b) lässt sich feststellen, dass selbst zeitliche Pausen zwischen den Impulsen nicht in der Lage sind, die Zelle in ihre Ausgangslage zurückzusetzen.

In Abb. 3.6 sind beispielhafte Pfade aufgetragen, die kumulativ auf reversible oder nicht-reversible Art zur Schädigung führen können. Die aufgelisteten Arbeitshypothesen dazu wurden in vorherigen Arbeiten aufgestellt [120–124].

3.3.2 WAHRSCHEINLICHKEITSSUMMATION

Das Wahrscheinlichkeitssummutationsmodell (engl. Probability summation model) (PSM) ist eine statistische Methode zur Beschreibung des Auftretens eines Ereignisses durch steigende Wahrscheinlichkeit (vgl. Abb. 3.5c). Das PSM

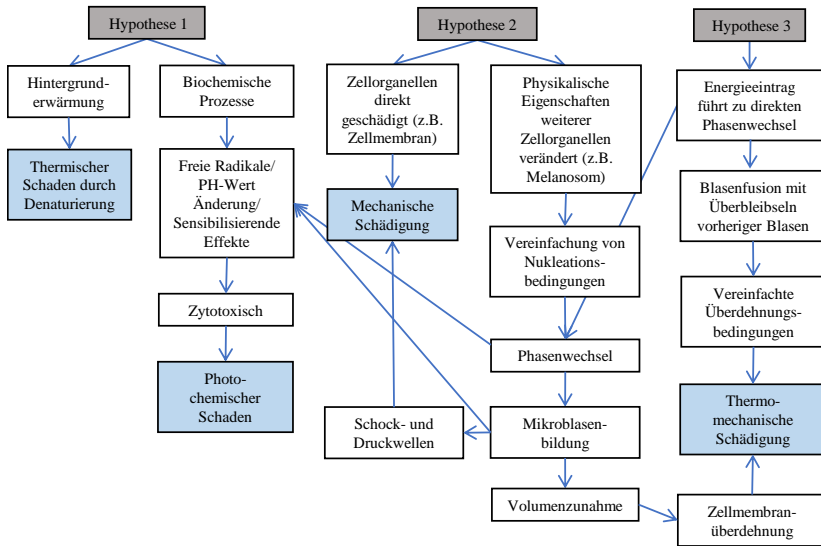


Abbildung 3.6: Wirkweisen des kumulativen Energieeintrags der zur Schädigung führen kann. Ausarbeitung möglicher schädigender Pfade, die zu verschiedenen Schädigungen führen können.

dient als methodischer Ansatz zur Vorhersage eines Schadens nach mehrfacher Laserbestrahlung mit niedrig dosierter Energie. Dieses Modell basiert auf der Probit-Analyse, die bereits in den 1970er Jahren von Finney [125] für Dosis-Wirkungs-Kurven in anderen Anwendungsbereichen eingeführt wurde. Später wurde das PSM von Menendez [126] für die Vorhersage von Laserstrahlungsschäden verwendet. Dieser Ansatz wird teilweise noch heute zur Vorhersage thermo-mechanischer Schäden verwendet und mit anderen etablierten Methoden wie dem C₅-Faktor aus der Lasersicherheitsnorm verglichen [70, 127].

Die PSM-Hypothese basiert auf der Annahme, dass die Reaktion auf eine beliebige Exposition einer Pulsfolge als ein von den vorherigen Pulsen unabhängiges Ereignis betrachtet werden kann (siehe Abb. 3.5c). Alle vorhergehenden Expositionen einer Impulsfolge haben keine Wirkung auf die Retina in Form einer Sensibilisierung oder Desensibilisierung.

Unter der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit P einer retinalen Reaktion auf jeden Einzelpuls p_{Single} einer Pulsfolge identisch ist, kann die Wahrscheinlichkeit $P(N)$, nach N Pulsen eine Retinareaktion zu induzieren, gemäß Gl. (3.4) [126, 127] berechnet werden:

$$P(N) = 1 - (1 - p_{\text{Single}})^N \quad (3.4)$$

Daraus folgt, dass die Exposition, die eine 50-% Verletzungswahrscheinlichkeit (ED_{50}) darstellt, einen Wert von $P(N) = 0.5$ ergibt. Die Antwortwahrscheinlichkeit für jeden Puls kann dann durch Lösen von Gl. (3.4) bestimmt werden für p_{Single} :

$$p_{\text{Single}} = 1 - (0,5)^{1/N} \quad (3.5)$$

Zur Bestimmung von p_{Single} wurde das von Lund [127] entwickelte *Probit-Fit* verwendet. Diese Analyse liefert eine Dosis-Wirkungs-Kurve (basierend auf der Annahme einer logarithmischen Normalverteilung), die durch den ED_{50} als Wendepunkt gekennzeichnet ist. Die resultierende Kurve gibt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Ereignisses (Schadens) mit steigender Energiedosis an. Das bedeutet, dass die aus Gl. (3.5) gesuchte Einzelwahrscheinlichkeit im *ProbitFit* eine Energiedosis angibt, bei der in der jeweiligen Wiederholungsbestrahlung ein Schaden auftritt.

Für eine Vorhersage des ED_{50} für $N = 10$ werden die Ergebnisse einer niedrigen Pulsfolge (z. B. $N = 1$ aus Ref. [128]): Für die Berechnung des ED_{50} nach Gl. (3.4) muss Gl. (3.5) für 10 Pulse gelöst werden, was zu einem $p_{\text{Single}} = 0,067$ führt. In Abb. 3.7 ist dieser Wahrscheinlichkeitspunkt grün markiert und gibt damit an, welche Dosis nach einer probabilistischen Summierung notwendig ist, um bei einer zehnfachen Bestrahlung einen Schaden zu erzeugen.

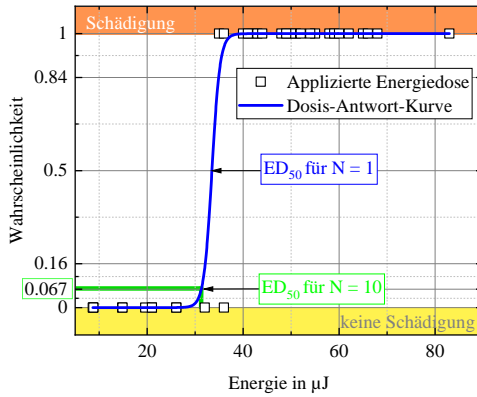


Abbildung 3.7: Dosis-Antwort-Kurve für die Auswertung einer Einzelexposition. Die Wahrscheinlichkeit p_{Single} von 0,067 ist schematisch grün markiert und gibt die probabilistische Summierung an, um eine Schädigung nach 10 Pulsen zu erzeugen.

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Das retinale Pigmentepithel (RPE) im Augenhintergrund stellt aufgrund der hohen Absorptionseigenschaften im Vis/IR-A- Spektralbereich die Lokalisation der größten Wechselwirkung dar.
- Je nach Expositionsdauer, Expositionsstärke und Wellenlänge wird zwischen vier schädigenden Wechselwirkungsmechanismen unterschieden: Photo-chemisch, thermisch, thermo-mechanisch und photo-mechanisch.
- Die Applikation von ns-Pulsen führt nach Stand der Forschung bei Einzelpulsen zu thermo-mechanischen Schädigungen im RPE.
- Nach Stand der Forschung wirkt die thermo-mechanische Mikroavitation nicht kumulativ, dennoch weist die reduzierte Schädigungsschwelle einzelner Pulse einer Pulsfolge auf eine Pulsinteraktion im Gewebe hin.
- Es wurden Arbeitshypothesen zur Beschreibung von Pulsinteraktionsmodellen im Gewebe ausgearbeitet. Die Konzeptvorstellungen basieren auf reversiblen, nicht-reversiblen und statistischen Prozessen bei einer Bestrahlung mit ns-Pulsen.

4 METHODISCHER UND MESSTECHNISCHER ANSATZ

In diesem Kapitel werden die optischen und akustischen Techniken zum Nachweis von Mikroblasen im Gewebe vorgestellt und bewertet. Daraus wird die in dieser Arbeit verwendete Technik abgeleitet. Des Weiteren werden die Thesen zur Simulation der Hintergrunderwärmung im RPE vorgestellt. Dieses Modell basiert auf dem Modellierungsansatz thermischer Schädigung. Abschließend werden die Kriterien zur Definition eines Top Hat Strahlprofils gemäß der DIN EN ISO 13694:2019 erläutert.

4.1 NACHWEIS VON MIKROBLASEN

Zur Detektion von Mikroblasenbildung in RPE-Gewebe wird zwischen optischen und opto-akustischen Techniken unterschieden. Im folgenden Abschnitt werden die methodischen Ansätze und deren Anwendbarkeit für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit dargestellt.

4.1.1 OPTO-AKUSTISCHE METHODEN

Ein Ansatz basiert auf der Auswertung von Druckwellen, die bei der Bildung von Mikroblasen emittiert werden. Dazu befindet sich die Probe in einem dichteren Medium wie Hank's Kochsalzlösung (engl. Hanks balanced saline solution) (HBSS). Dabei werden Gewebeeigenschaften wie die lokale Verteilung der Melanosome bei der Mikroblasenbildung während der Bestrahlung verändert. Dies führt zu minimalen Veränderungen der opto-akustischen Reaktion, die mit einem Hydrophon piezo-elektrisch gemessen werden kann. Für eine zuverlässige Detektion von Mikroblasen mit der aktuellen opto-akustischen Technik sind 30 Pulse mit identischer Einzelpulsenergie erforderlich [32, 129, 130].

4.1.2 OPTISCHE METHODEN

Reflexbasiert Eine transiente Reflexionserhöhung kann durch Mikroblasenbildung nachgewiesen werden, da an der Grenzfläche - der mit verdampften Cytoplasma gefüllten Blase - das Laserlicht eines zusätzlichen BeleuchtungsLasers aufgrund des Brechungsindexunterschieds zur Umgebung stärker reflektiert und zurückgestreut. Ohne Mikroblasenbildung bleiben die Streueigenschaften des Gewebes unverändert. Bilden sich jedoch Mikroblasen, so werden diese Eigenschaften durch die als Mie-Streuer wirkenden Mikroblasen selbst oder zufällige Verschiebungen im Gewebe induziert [35, 37, 129].

Schlierentechnik Diese Technik eignet sich zur Untersuchung in transparenten Medien und kann die Stoßwelle durch den Kollaps einer Kavitationsblase veranschaulichen. Die Stoßwelle führt hierbei zu einer lokalen Brechungsindexänderung, welche als Folge die optische Weglänge des Beleuchtungsstrahlengangs verändert. Das Licht erfährt an dieser Stelle eine Phasenverschiebung und wird abgelenkt. Das grundlegende Prinzip ist hierbei eine stroboskopartige Beleuchtung des Prozesses zu einem definierten Zeitpunkt mit Beleuchtungsdauern im ns-Regime und dessen jeweilige Aufnahme. Durch ein Aneinanderreihen der einzelnen Momentaufnahmen wird so eine Dynamik des gesamten Prozesses generiert [131].

Interferometrie Bei der Implementierung eines Michelson-Interferometers können Informationen über die Mikroblasendynamik gesammelt werden. Da sich die Blasengrenzfläche in Bewegung befindet, ändert sich die Wegdifferenz zwischen den Lichtstrahlen in Probe- und Referenzarm. Die daraus resultierende sich zeitlich verändernde Intensität wird mit einer Photodiode gemessen. Der Nachteil dieser Methodik liegt in der Komplexität des Aufbaus und vor allem der zusätzlichen permanenten Bestrahlung der Proben [132–134].

Blitzlichtaufbau Zur Beleuchtung des RPE wird eine Blitzlampe verwendet. Für die Aufnahmen wird eine CCD-Kamera verwendet, die mehrere Fotos während einer Exposition aufnimmt (davor, nach ca. 200 ns, nach ca. 1 s). Aufgrund des unbekanntens Auftretens einer Mikroblase, was dem Triggerzeitpunkt der Kamera entspricht, eignet sich dieser Ansatz nicht zur Untersuchung des Auftretens von Mikroblasen in Pulsfolgen [132].

Optische Kohärenztomographie Dieser Ansatz basiert auf der Auswertung der Mikroblasen-bedingten Gewebeverschiebung mittels der optischen

Kohärenztomographie (OCT). Da jedoch nur eine Tiefenebene betrachtet wird und die räumliche Auflösung begrenzt ist, ist die Sensitivität zum Nachweis von Mikroblasen gering. Da weder die Empfindlichkeit noch die Spezifität hoch ist [135] und die Multipulsaufnahme erschwert ist, eignet sich dieser Ansatz nicht für die Anwendung in dieser Arbeit.

Kombinationsmethodik In Tab. 4.1 sind die gängigen Detektionsmethoden für den Nachweis von Blasenbildung aufgelistet. Bei der Überprüfung auf die Anwendbarkeit in dieser Arbeit ergibt sich die Kombinationslösung aus einer opto-akustischen und reflexbasierten Methode. Sie vereint die Möglichkeiten zur Untersuchung von Einzel- und Multipulsen.

4.2 MODELL ZUR HINTERGRUNDERWÄRMUNG

Das in Kap. 3.2 vorgestellte Arrhenius-Integral bildet die Grundlage für die Modellbildung zur Beschreibung thermischer Schäden der Netzhaut. Gängige Modelle wie das Seibersdorf Laboratories Model (SLM) wurden gegen NHP-Daten validiert und sind in der Lage, die Schädigungsschwelle durch

Tabelle 4.1: Detektionsmethoden zur Mikroblasenmessung. ● ≡ sehr gut. ○ ≡ gut. Die Kombination aus dem reflexbasierten und der opto-akustischen Methode verbindet die meisten Vorteile.

Kriterium	Reflexbasiert	Schlieren	Interferometer	Blitzlicht	OCT	Hydrophon	Kombination
Einfachheit Aufbau	●			○		●	●
Kosten	●	○	●	○		○	●
Zusätzliche Bestrahlung						●	●
Anwendbarkeit Einzelpulsmessung	●	●	●	●	●		●
Eignung Multipulsmessung	●		●		●	●	●
Sensitivität	●	○	●	●	○	○	●
Integration im System						●	●
Datenauswertung	●	○		●		●	●
Anwendbarkeit bei Explants	●		●	●		●	●
Zeitliche Auflösung	●		●				●

Angabe eines ED_{50} (bezogen auf die totale intraokulare Energie) vorherzusagen [136, 137]. Das SLM ist ein zweidimensionales Modell zur Untersuchung von zirkulärsymmetrischen Bestrahlungsstärken, die eine retinale Schädigung verursachen. Der Ansatz dieses Modells besteht darin, eine radiale Wärmequelle $q(t, \vec{r})$ mit dem Bestrahlungsstärkeprofil innerhalb der retinalen Schichten für ein LeGrand Modell¹ zu simulieren. Die sich ergebende Wärmeübertragungsgleichung (angepasst aus Gl. (2.2)) wird numerisch gelöst und der Temperaturverlauf (linker Term aus Gl. (4.1)) kann verwendet werden, um die Arrhenius-Gleichung zu lösen.

$$\rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = k \cdot \Delta T + q(t, \vec{r}) \quad (4.1)$$

Die thermischen Eigenschaften des retinalen Gewebes (Dichte ρ , die Konduktivität k und die spezifische Wärme c_p) sind in Ref. [138] angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell verwendet, um den Einfluss der Hintergrunderwärmung durch Multipulsbestrahlung zu prüfen und zu evaluieren (vgl. Kap. 6.3).

4.3 ANSATZ ZUR KONSTANTEN ENERGIEDICHTE

Die Propagation einer TEM_{00} -Mode im freien Raum ist dadurch charakterisiert, dass zwar eine Variation des Strahldurchmessers, gegeben durch die Strahldivergenz, stattfindet, die Intensitätsverteilung jedoch gleich bleibt. Der Strahl behält somit seine Gaußförmige Form bei. Bei der Ausbreitung eines nicht-Gaußschen Strahls, wie zum Beispiel eines Top Hat Strahlprofils, kommt es zu einer zusätzlichen Veränderung des Intensitätsprofils im Raum, wodurch dieser nicht mehr an jeder Stelle homogen ist [139]. Aufgrund von Beugung ändert sich das Strahlprofil von einer homogenen Intensitätsverteilung über ein ringförmiges Profil mit Streifenmuster hin zu einer Airy-Scheibchen-Verteilung im Fernfeld.

Die Airy-Funktion resultiert also aus einer Fourier-Bessel Transformation eines ursprünglich kreisförmigen Profils mit uniformer Intensitätsverteilung. Zu

¹ Augenmodell für ein relaxiertes menschliches Auge, bestehend aus Kornea, Flüssigkeit, Linse und Glaskörper

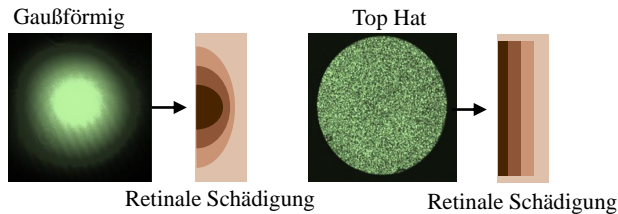


Abbildung 4.1: Strahlprofile und ihr Einfluss auf die interagierenden Gewebeschichten in der Querschnittsansicht dargestellt. Links: Gaußsche Verteilung auf dem Gewebe. Rechts: Bestrahlung mit konstanter Energiedichte in Bezug auf die Top Hat Verteilung. Fluktuationen im Top Hat Profil sind sichtbar und können durch Mischung der angeregten Moden variiert werden.

vernachlässigen ist der Abfall der Homogenität für große Strahldurchmesser und flachere Kanten, hierbei bleibt die Strahlform annähernd konstant. Um ein Top Hat Profil im Fernfeld seiner Entstehung beizubehalten, wird das Profil an der Stelle, an der dieses homogen ist, beispielsweise mit zwei Linsen abgebildet [140].

4.3.1 VORTEIL DER KONSTANTEN ENERGIEDICHTE

Um eine plane Schädigungsebene im bestrahlten Gewebe zu schaffen, wird üblicherweise die Top Hat Verteilung eingesetzt, da die konstante Energiedichte eine gleichmäßig Schädigung des RPE verursacht und dadurch weitere Informationen über den Schädigungsmechanismus gewonnen werden können (siehe Abb. 4.1).

Das Strahlprofil eines Top Hat Profils lässt sich nach DIN EN ISO 13694:2019 durch die Uniformität, die Strahlgleichförmigkeit, Plateaugleichförmigkeit und die Flankensteilheit beschreiben. In dieser Arbeit werden die Merkmale der Uniformität und der Flankensteilheit verwendet. Die Übrigen werden aufgrund ihrer geringeren Bedeutung in der Anwendung dieser Arbeit vernachlässigt.

4.3.2 EBENHEITSAKTOR DES STRAHLPROFILS

Der Ebenheitsfaktor beschreibt das Verhältnis der zu betrachtenden mittleren Energiedichte, zur maximalen Energiedichte. Bisher veröffentlichte Arbeiten [55, 56] führten daher den Intensitätsmodulationsfaktor (IMF) nach Gl. (4.2) ein, um das Verhältnis der Spitzenexposition H_{\max} zur gemittelten gemessenen Exposition H_{mean} zu beschreiben. Tabelle 4.2 fasst die verwendeten Methoden zur Realisierung eines Top Hats zusammen.

$$\text{IMF} = \frac{H_{\max}}{H_{\text{mean}}} \tag{4.2}$$

4.3.3 FLANKENSTEILHEIT UND DURCHMESSERDEFINITION

Ein idealer Top Hat (siehe Abb. 4.2a) hat eine ideale Flankensteilheit. Da ein realisierter Top Hat (siehe Abb. 4.2b) jedoch durch die Auswertung über eine Abbildung, optische Aberrationen des optischen Systems und der

Tabelle 4.2: Überblick über Top Hat Konfigurationen aus der Literatur für *in vivo*- und Ex-plantmessungen. In der vorliegenden Arbeit wird die Verwendung von Fasern in quadratischer Form vorgeschlagen, um die Kontrolle der Top Hat Verteilung auf den Proben zu vereinfachen. B ≡ Blende, F ≡ Faser, AP ≡ Augenposition, PP ≡ Probenposition, K ≡ Kaninchen, S ≡ Schwein.

Referenz	Methode	Strahlform	Durchmesser	IMF	Messpunkt	Kontrolle	Beachtung	Gewebe
[141]	B	○	1/e ²	k. A.	Theor. Abbildungsebene	k. A.	-	NHP
[26]	B	○	1/e	k. A.	1. Blende 2. AP	k. A.	-	NHP
[55]	F*	○	k. A.	1,18-3,8	Faserende	Spaltlampe	IMF · H _{mean}	K/S
[38]	F	○	k. A.	1,15**	1. Faserende 2. PP	Spaltlampe	k. A.	S
[29]	F	○	k. A.	<10%***	1. Faserende 2. PP	Spaltlampe	k. A.	S
Lipp	F*	□	1/e ²	max. 1,15	1. Faserende 2. PP 3. Theor.	Kamera	****	S

*Die Faserlänge wurde variiert. **keine Angabe in Veröffentlichung, jedoch aus einer Strahlprofilaufnahme abgeschätzt. ***Top Hat Schwankungen in %. ****Evaluiert in Kap. 6.1.1

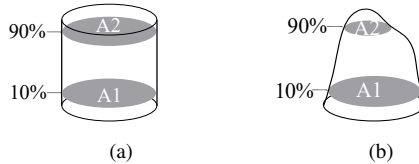
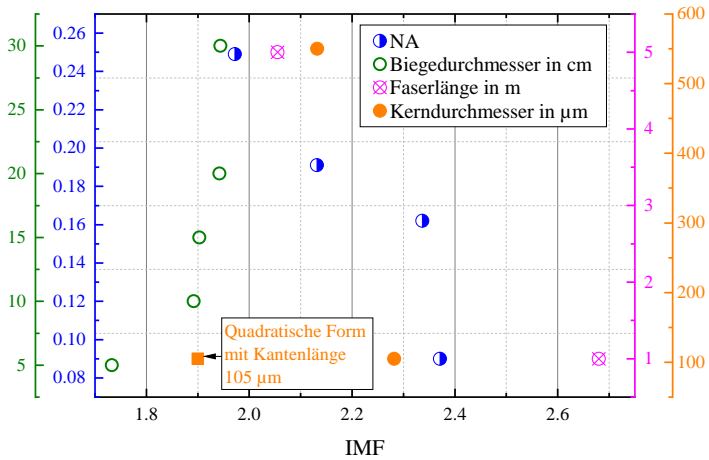


Abbildung 4.2: Veranschaulichung der Definition der Steilheit eines Strahlprofils nach DIN EN ISO 13694:2019 durch Berechnung der normierten Differenz zwischen zwei effektiven Bestrahlungsflächen mit Intensitätsniveaus über 10 % und 90 % der maximalen Intensität. Der Wertebereich W der Flankensteilheit beträgt $W = [0, 1]$. A_1 bzw. A_2 entsprechen 10% bzw. 90% der Spitzenintensität. Beide Bereiche werden auf A_1 normiert und die Differenz wird berechnet. (a) Beispiel für einen idealen Top Hat mit einer Flankensteilheit von Null, da $A_1 = A_2$. (b) Realistischer Strahl, wobei $A_1 > A_2$ und die Flankensteilheit einen Wert größer als Null haben wird.

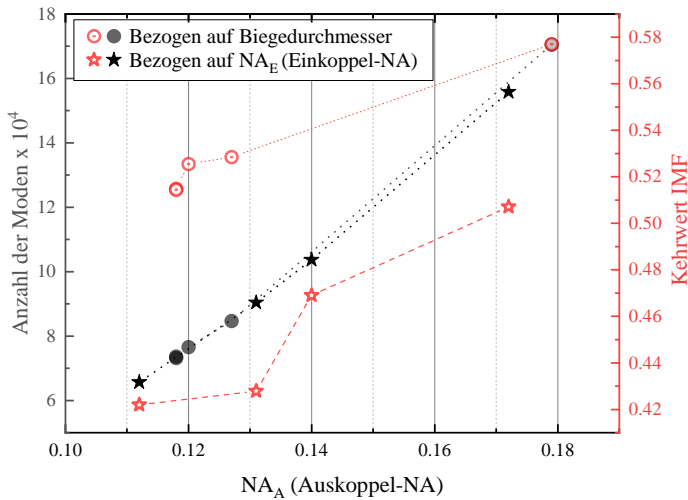
Pixeldiskretisierung begrenzt ist, wird die Flankensteilheit, Werte größer Null annehmen. Basierend auf den gebräuchlichen Durchmesserdefinitionen $1/e$, $1/e^2$ oder der vollen Breite bei halbem Maximum (FWHM) werden aufgrund nicht idealer Flankensteilheiten des retinalen Strahlprofils verschiedene Durchmesser und entsprechend unterschiedliche Expositionen H bestimmt, was zu Diskrepanzen bei der Bestimmung der Schädigungsexposition führt (vgl. Abb. 1.4).

4.3.4 MODIFIKATION DER STRALDURCHMISCHUNG

Aus Kap. 2.3 geht hervor, dass das Strahlprofil über die Modenanregung und der Überschreitung der Kohärenzlänge des Lasers durchmischt werden kann. In diesem Abschnitt wird daher aufgrund vereinfachter Justage ein frequenzstabilisierter Helium-Neon-Laser (He-Ne)-Laser verwendet, um die Einflüsse der Homogenisierung konkret zu untersuchen. Zudem soll durch Voruntersuchungen eine optische Faser für die Messungen in Kap. 5 ausgewählt werden, um ein bestmögliches Top Hat Strahlprofil auf den Proben zu erzeugen. Entscheidend für die Beurteilung des Top Hat Profils für diese Messungen ist vor allem der IMF des Spots (vgl. Abb. 4.3), welcher gegeben ist durch die Einkoppelbedingungen in die Faser, den Fasereigenschaften sowie der Kohärenzlänge des Lasers.



(a)



(b)

Abbildung 4.3: Untersuchung des IMF. (a) Einflussfaktoren auf den IMF. (b) Anzahl angeregter Moden exemplarisch für den Biegedurchmesser und Einkoppel-NA.

In Abb. 4.3a ist zu erkennen, dass jeweils ein großer Kerndurchmesser und eine lange Faser zur Reduzierung der Intensitätsmodulationen führen. Eine Vergrößerung des Kerndurchmessers geht nach Gl. (2.17) mit einer erhöhten Anzahl an geführten Moden einher. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Anzahl der Moden bei der Verwendung eines 550 μm - anstelle des 105 μm -Durchmessers um einen Faktor von ca. 27 erhöht. Ein vergleichbares Ergebnis wurde durch eine stärkere Verbiegung der Faser bewirkt. Die Biegung der Faser bewirkt eine Modulation des Öffnungswinkels am Faserausgang. Je stärker die Faser gebogen wird, desto größer wird die Ausgangs-NA, bis zu einer maximalen NA von 0,179 bei maximaler Biegung. Somit kann gezeigt werden, dass eine Veränderung der Faserkrümmung wiederum höhere Moden anregt. Begründet wird dieser Verlauf durch die in Unterabschnitt 2.3 dargestellte Modenkopplung. Die Veränderung des Brechungsindexverlaufs innerhalb der Faser führt zu Modulationen der Propagationskonstanten einzelner Moden. Diese koppeln daraufhin miteinander und niedrigere Moden werden zunehmend zu Moden höherer Ordnung.

Die geringsten Intensitätsmodulationen am Faserausgang konnten bei dem quadratisch geformten Faserkern festgestellt werden, hier begünstigt die Form zusätzliches Vermischen der geführten Moden. Weitere erhebliche Einflüsse auf die Homogenisierung ergeben sich durch die Länge und dem Kerndurchmesser einer Faser. Die Verringerung der Intensitätsmodulationen geht mit der Erhöhung der Eingangs- und somit auch der Ausgangs-NA einher. Hierbei werden direkt am Fasereingang durch den steileren eintreffenden Winkel zusätzlich höhere Moden angeregt. Insgesamt steigt dann die Anzahl der geführten Moden in Abhängigkeit der NA exponentiell an.

Die Ausgangs-NA (vgl. Abb. 4.3b) wird zur Evaluierung der Modulationen verwendet, da diese den tatsächlichen Verlauf der geführten Strahlen innerhalb der Faser realistischer darstellt, als die der Eingangs-NA. Dies ist auf Einkoppel-Verluste zurückzuführen. Mit zunehmender NA nimmt die Anzahl der geführten Moden innerhalb der Faser exponentiell zu. Ein ähnlicher Verlauf ergibt sich, wenn die Ausgangs-NA gegen den Kehrwert des IMF's aufgetragen wird (vgl. Abb. 4.3b). Somit verbessert sich einhergehend mit der Anregung einer Vielzahl an Moden der IMF am Faserausgang und das Profil wird homogener.

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Etablierte Methoden zur Mikroblasenmessung werden vorgestellt und auf die Anwendbarkeit in dieser Arbeit evaluiert. Die Kombination aus optoakustischer (Hydrophon) und optischer (reflexbasiert) Methoden erweist sich als kompatibel zur Mikroblasenerfassung.
- Die Hintergrunderwärmung im Augenmodell wird über das Seibersdorf Modell simuliert.
- Die Verwendung einer konstanten Energiedichte über ein Top Hat Strahlprofil stellt den Stand der Technik zur Schädigungsmessung dar. Eine Charakterisierung hinsichtlich der Fluktuationen über den IMF, Flankensteilheit und der Durchmesserdefinition ist vorteilhaft.
- Voruntersuchungen zur Auswahl der optischen Fasern ergeben, dass eine Quadratkernfaser am geeignetsten ist. Die Länge, eine hohe Einkoppel-NA, eine maximale Krümmung und der Kerndurchmesser steigern zudem maßgeblich die Effizienz der Homogenisierung.

5 EXPERIMENTELLER AUFBAU DES SCHÄDIGUNGSMESSPLATZES

Für die Bestimmung der laser-induzierten Schädigungsschwellen werden Explants von Schweineaugen verwendet. Die Explants bieten durch eine vereinfachte messtechnische Kontrolle und Dosimetrie einige Vorteile, die im folgenden Kapitel 5.1.1 erläutert werden. Hierzu wird die Präparation der Proben als auch das dazugehörige Auswerteverfahren zur Feststellung einer laser-induzierten Schädigung mittels Fluoreszenz-basierter Vitalitätsprüfung dargestellt.

In Abschnitt 5.2 wird der experimentelle Aufbau und die verwendeten Komponenten vorgestellt. Es werden das verwendete Lasersystem, die Energieerfassungsmethodik und dessen Strahlprofil beschrieben, das durch Modendurchmischung zu einem homogenisierten Strahlprofil führt. Die Gleichförmigkeit des Strahlprofils erlaubt Bestahlungsmessungen bei nahezu konstanter Energiedichte, die mit Intensitätsmodulationen beschreibbar sind. Anhand der Vorstellung aller Komponenten des Setups wird der Vorgang der Bestahlungsexperimente beschrieben. Das Setup wurde zusätzlich so modifiziert, dass das Auftreten einer thermo-mechanischen Mikrokavitation darüber hinaus gemessen werden kann. Abschließend wird das Vorgehen zur Schadensdeklarierung im Zusammenhang mit den Intensitätsmodulationen vorgestellt.

Die daraus resultierenden Binärdaten (Schaden/kein Schaden) werden mittels einer Wahrscheinlichkeitsfunktion eine Dosis-Antwort-Kurve analysiert. Der Wendepunkt dieser Sigmoidalfunktion gibt einen Wert an, bei der mit 50%-Wahrscheinlichkeit ein Ereignis als Antwort zu erwarten ist. In der vorliegenden Arbeit wird dieser auch ED_{50} -Wert genannt, und beschreibt die effektive Dosis, bei der mit 50%-Wahrscheinlichkeit eine Schädigung nach der Exposition auftritt.

5.1 EX VIVO RPE-MODELL

Im Rahmen dieser Arbeit werden Explants - aus Schlachtabfällen erwerbe- ne Tieraugen - verwendet. In den folgenden Kapiteln werden die Vorteile der Verwendung von Explants diskutiert. Im weiteren Schritt werden die Proben- präparationsschritte und die Vitalitätsprüfung vorgestellt.

5.1.1 VERWENDBARKEIT UND VORZÜGE VON EXPLANTS

Abbildung 5.1 zeigt einige der Herausforderungen bei der Bestimmung des abzubildenden Spotdurchmessers auf der Netzhaut, der Gewährleistung eines homogenen Strahlprofils und der Messung der Energie im *in vivo*-Auge. Die Bestimmung der tatsächlich absorbierten Dosis ist aufgrund der Streuung vor allem in den Netzhautschichten eine besondere Herausforderung. Die künstliche Befeuchtung der NHP-Augen¹ und nicht kompensierte Aberrationen des dilatierten Auges können zu einer Fokusverschiebung auf der Netzhaut führen, woraus eine hohe Unsicherheit der ermittelten Größen folgt. Darüber hinaus ist eine Netzhautveränderung (z.B. eine Schädigung), die sich auf einen Bereich von weniger als ca. 100 µm im Durchmesser beschränkt, nur bedingt mit einer Augenspiegelung nachweisbar. Das gilt nicht für stark überschwel- lige Expositionen, da hierbei eine eindeutige Markierung erzeugt wird. Bei der Untersuchung der Schädigungsschwelle, kann es jedoch zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Schädigungserkennung kommen [142].

Frühere Studien [16] haben gezeigt, dass aufgrund der vereinfachten Kontrolle der Messtechnik, Explants besonders für die Bestimmung von laser-induzierten Schädigungsmessungen nützlich sind. Das allgemeine Unsicherheitsniveau kann durch die Anzahl an verwendbaren Proben verschiedener Individuen besonders gering gehalten werden, sodass eine hohe Statistik über die Scha- densschwelle erstellt werden kann. Zudem ergibt sich durch die vereinfachte

¹ Die Versuchstiere werden vor den Experimenten auf eine normale Netzhaut und klare Augen- medien untersucht. Der Brechungsindexfehler muss < 0,5 Dpt aufweisen. Die Tiere werden für die Studien mit einer intramuskulären Injektion von Telazol sediert. Zur Reduktion von Augenbewegungen wird eine retrobulbäre Injektion von 4% Lidocain den Tieren verabreicht. Ein Lidspekulum hält das Auge zur Belichtung offen. Zur Reinheit und Vermeidung von Austrock- nung wird das Auge periodisch mit Kochsalzlösung gespült.

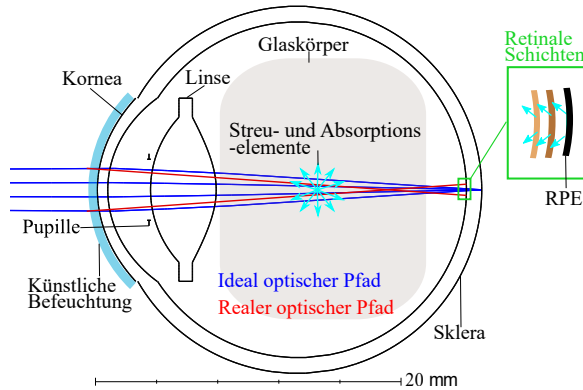


Abbildung 5.1: Herausforderungen einer *in vivo*-Messung: Idealer optischer Weg (blau), der durch streuende und absorbierende Komponenten (cyan) des Auges beeinflusst wird, insbesondere in den Netzhautschichten (grün), die zu einer veränderten Spotgröße und einem veränderten Strahlprofil führen. Auch der ED_{50} könnte aufgrund der streuenden und absorbierenden Komponenten des vorderen Teils des Auges und der Netzhautschichten niedriger sein. Gewöhnlich sind NHP-Augen künstlich befeuchtet und nicht kompensierten Aberrationen des dilatierten Auges eines anästhesierten NHP-Auges sind größer als vorhergesagt: Fokusverschiebung und Top Hat Abweichung (rot) könnten induziert werden. Da die Hauptbrechkraft im Auge durch die Hornhaut verursacht wird, wird zur Vereinfachung nur deren Brechung dargestellt. Die Brechkraft der Augenlinse und der Vorderkammer des Auges wurden zur vereinfachten Übersicht nicht aufgetragen.

Dosimetrie-Kontrolle gegenüber NHP eine genaue Evaluierung systematischer auftretender Fehler (Bestimmung Spotgröße, Strahlprofil, Energieerfassung), die über Fehlerfortpflanzung bewertet werden können. Ein weiterer Vorteil gegenüber der NHP-Messungen ergibt sich durch die allgemeine Nachkorrektur womit Transmissionen im Auge berücksichtigt werden. Da lediglich Energie, die auf die Kornea auftrifft, gemessen wird, müssen Korrekturfaktoren für Transmission und Streuung im Auge angenommen und angewandt werden, was zu einer weiteren Unsicherheit in der *in vivo* Untersuchung führt.

Explants erlauben jedoch keine Evaluierung nach 24 h. Diese, bei NHP übliche Langzeitbeobachtung, erlaubt es, physiologische Prozesse und ihre Auswirkungen auf den Schaden (inklusive Reparaturmechanismen) zu berücksichtigen.

5.1.2 GEWEBEPROBEN VERSCHIEDENER TIERARTEN

Als Explants werden üblicherweise sowohl Rinder- als auch Schweineaugen verwendet, obwohl sie im Vergleich zu menschlichen Augen oder NHP keine Macula aufweisen. Die Macula ist besonders empfindlich gegenüber hoch-energetischer Strahlung. Dennoch enthält die Schicht des RPE der Explants hauptsächlich Melanosomen, die im thermo-mechanischen Schädigungsregime durch Mikroblassenbildung (vgl. Kap. 3.2) auf ihrer Oberfläche für die Zellschädigung verantwortlich sein sollen. Brinkmann [29] berichtet, dass aufgrund verschiedener Melanosomgeometrien die Schädigungsschwelle in Rinderaugen um den Faktor 1,6 höher liegt als in Schweineaugen.

Im Allgemeinen sind die eingespannten Proben von Rinderaugen im Vergleich zu Schweineaugen, durch ein gleichmäßigeres Höhenprofil charakterisiert, was die korrekte Abbildung auf die Fokusebene der Probe vereinfacht. Rinderaugen haben jedoch ein äquatorial liegendes *tapitum lucidum*², das aufgrund seiner reduzierten Absorptionseigenschaften nicht für Schwellwertmessungen verwendet werden kann. Daher müssen höher pigmentierte polare Positionen verwendet werden, die bei der Präparation der Proben mit einem Mikroskop leicht unterschieden und ausgewählt werden können.

Insgesamt ergibt sich im Submikrosekunden-Pulsbereich ein Offset der Schädigungsschwelle gegenüber den *in vivo* Messungen. Dieser Offset ist jedoch bei Untersuchungen [16] ab 100 μ s nicht beobachtet worden: In diesem Pulsdauerzeitbereich stimmten die Schädigungsexpositionen mit den NHP-Messungen überein. Nach Stand der Forschung wird die Begründung dieser Auffälligkeit im Schädigungsmechanismus vermutet.

Aufgrund der höheren Verfügbarkeit vergleichbarer Daten mit Explants von Schweinen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Schweineaugen gearbeitet. Die Verfügbarkeit der Schweineaugen beträgt an einem Messtag mindestens 20 Augen verschiedener Individuen.

² im Auge u.a. vieler Plattwürmer (Plathelminthes), Gliederfüßer (Arthropoda) und einiger Wirbeltiere (Vertebrata) gelegene reflektierende Schicht, die meist aus Guaninkristallen besteht und beim Dämmerungssehen die Lichtausbeute erhöht. Bei den Wirbeltieren liegt sie hinter den lichtempfindlichen Strukturen fast immer in der Aderhaut.

5.1.3 PROBENPRÄPARATION

Die *ex vivo*-Proben wurden aus frischen Schweineaugen (vgl. Abb. 5.2a) gewonnen, die von einem örtlichen Schlachthof (Schlachthof Balingen, Deutschland) erworben wurden. Während des Transports wurden die ungeöffneten Augäpfel in einer dunklen und isolierten Kühlbox gelagert. Zur Probenvorbereitung (siehe Abb. 5.2) wurden die frischen Augen mit einer Hanks-balanced Kochsalzlösung (HBSS) gespült. Das umliegende Gewebe wurde entfernt (vgl. 5.2b) und der Bulbus mit einer Nadel geöffnet (siehe 5.2c). Der Bulbus wurde konzentrisch am Äquator durchtrennt (siehe 5.2d). Der vordere Teil des Auges und der Glaskörper wurden entfernt (vgl. 5.2e). Die sensorische Netzhaut wurde durch sanftes Zurückziehen oder Spülen mit HBSS entfernt, um das darunter liegende RPE in Form eines Kleeblatts freizulegen (siehe 5.2f). Die Sklera und die darunter liegende Aderhaut wurden nicht entfernt. Die schwarz pigmentierten Teile des Augenhintergrunds wurden in rechteckige Stücke geschnitten (vgl. 5.2g) und in Haltevorrichtungen eingespannt (siehe 5.2h) und in die HBSS bzw. in ein Nährmedium eingebracht.

5.1.4 VITALITÄTSPRÜFUNG

Die Untersuchung von Explants bietet aufgrund der direkten Exposition einen Vorteil gegenüber *in vivo*-Messungen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik. Zellschäden können durch eine Veränderung der Fluoreszenzerscheinungen eines Markers in einem Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie³ nachgewiesen werden. Für den Nachweis von vitalen und nicht-vitalen Zellen wurden zwei unterschiedlich wirksame fluoreszierende Substanzen verwendet. Calcein-Acetoxy-methylester (AM) wurde zum Nachweis vitaler Zellen und komplementär Propidium-Iodid (PI) zur Diagnose einer zerstörten Zellmembran verwendet.

Nach der Bestrahlung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Calcein-AM (Bestand 1 µg/µl) und PI (Bestand 1 mg/ml) hinzugezogen. HBSS wurde (a) mit Calcein-AM (1:200 bis 5 µM) und unabhängig davon (b) mit PI (1:100 bis 15 µM)

³ Bei *in vivo*-Untersuchungen ist das nur mit einem Ophthalmoskop möglich, wodurch aber Netzhautveränderungen mit kleinen retinalen Spots (< 100 µm) nur bedingt erkannt werden können.

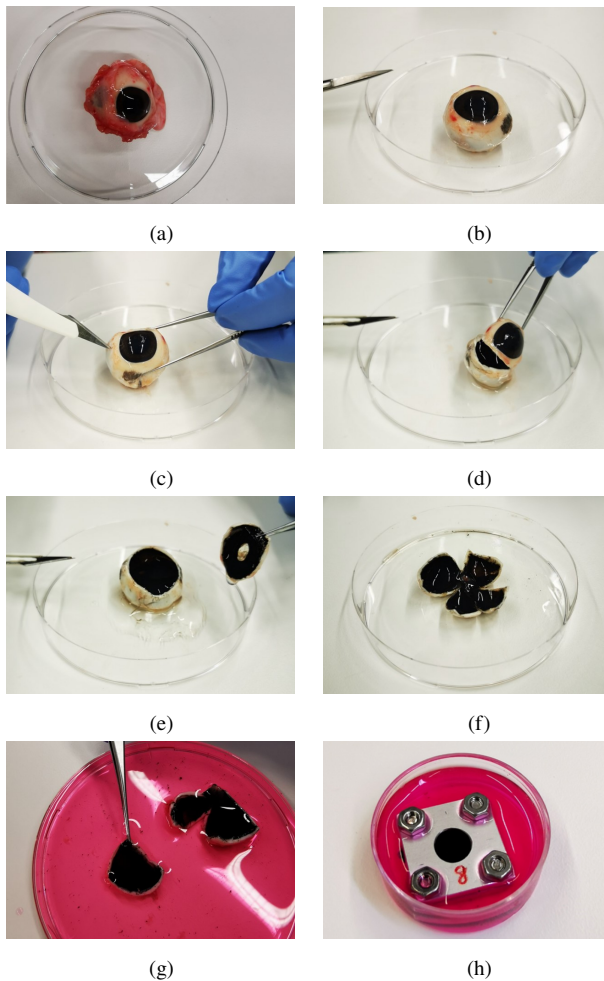


Abbildung 5.2: Probenvorbereitung von Schweineaugen: (a) Bulbus mit Bindehaut (b) Entfernung des umliegenden Gewebes (c) Öffnung des Bulbus mit Nadel und Skalpell (d) Äquatorialer Schnitt zur Komplettöffnung (e) Entfernung des vorderen Augenteils und des Glaskörpers (inkl. Linse) (f) Beschnitt zur Kleeblatt-Form (g) Beschnitt der Probenstücke in Medium (h) Haltekonstruktionen zum Abflachen der Probe.

gemischt und 20 Minuten lang inkubiert. Calcein-AM kann aufgrund seiner ionisch ungeladenen Struktur durch die Zellmembran diffundieren und wird in lebenden Zellen durch Esterasen zu Calcein umgewandelt. Dabei findet ein chemischer Spaltprozess der lipophilen Blockierungsgruppen statt und wandelt Calcein-AM in Calcein um, das durch blaues Licht angeregt werden kann (Anregungsmaximum bei 494 nm, Emission bei 517 nm) und unter dem Mikroskop hell erscheint. Nicht-vitale Zellen erscheinen dunkel [143]. Da die Umwandlung zu akkumuliertem Calcein nur dann stattfinden kann, wenn die Enzyme noch aktiv und nicht abgestorben sind, ist es so möglich, die Vitalität der noch intakten Zellen nachzuweisen.

PI hat die Eigenschaft als Marker für tote Zellen zu fungieren. Es bindet an jene Enzyme, die aktiv werden, sobald der Apoptoseprozess durch den Organismus eingeleitet wird. PI ist ein nicht-membrandurchlässiger Farbstoff, der nur in Zellen eindringt, deren Membran bereits geschädigt ist und somit über seine Eigenschaft als Nukleinsäure-Interkalator an den Zellkern bindet. PI hat ein Absorptionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm, wobei die Maxima rotverschoben (bis ca. 617 nm) sind [144]. So erscheinen Zellen mit geschädigter Zellmembran hell rot und Zellen mit intakter Zellmembran dunkel [145].

Die Bewertung von "Schädigung" bzw. "Keine Schädigung" wurde für jede exponierte Exposition mittels Fluoreszenz-Vitalitätsassays durchgeführt. Anhand der Orientierungslinien war es möglich, auszulesen, ob in einer Messreihe Schäden durch die Bestrahlung verursacht wurden. In Abb. 5.3 war der Nachweis von vitalen Zellen durch Calcein (vgl. Abb. 5.3a) und toten Zellen durch PI (vgl. Abb. 5.3b) sichtbar. Für die Auswertung wird der Energiewert des einzelnen Pulses für jede Exposition einer binären Antwort zugeordnet, die mit vital (0) oder nicht-vital (1) deklariert wurde. Die binären Daten wurden zur Berechnung von ED_{50} und 95 % Konfidenzintervallen mittels Probit-Analyse [125] verwendet (vgl. Kap. 5.3.3). Die Bestimmung der ED_{50} ist eine Methode zur statistischen Auswertung von Dosis-Antwort-Daten aus Experimenten zur Bestimmung von Schwellenwerten für Netzhautschäden durch Laserexposition. Dabei wird die Beziehung zwischen einem Stimulus in Form einer Dosis (Energie) und einer quantitativen Antwort (Schädigung) analysiert.

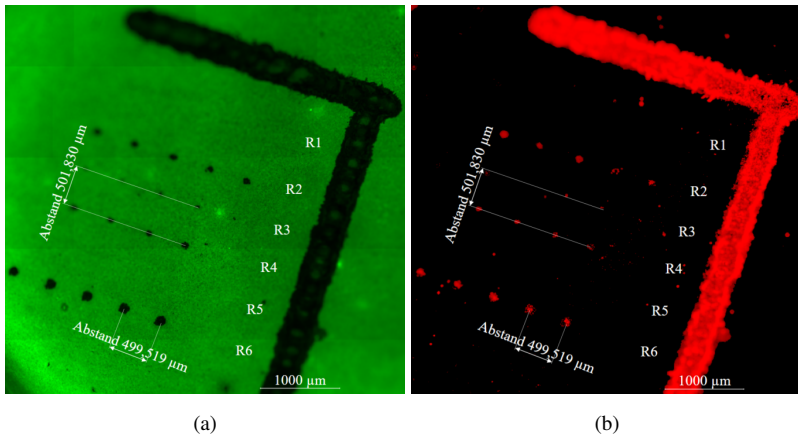


Abbildung 5.3: Fluoreszenz-Fähigkeit zur Schadensbestimmung mit Orientierungsstruktur: Konstante Energiedosis für jede Messreihe (a) Anregung von Calcein. Vitale Zellen fluoreszieren hell grün. Tote Zellen erscheinen dunkel. (b) Anregung von PI. Zellen mit geschädigter Zellmembran fluoreszieren. Intakte Zellmembranen bleiben dunkel.

5.2 ENTWICKLUNG DES SETUPS

5.2.1 BESTRAHLUNGS-AUFBAU

In Abb. 5.4a ist der Aufbau zur Bestimmung der laser-induzierten Schädigungsschwellwerte schematisch dargestellt. Der Laserstrahl wurde mittels zweier Spiegel (Thorlabs, NB1-K13, Deutschland) umgelenkt, wobei ein CW-Führungslaser über einen kippbaren Spiegel zusätzlich in den optischen Pfad eingebracht wurde. Über ein Teleskopsystem (Thorlabs, LA1805-A, LA1422-A, Deutschland) und eine plankonvexe Linse (Thorlabs, LA1540-A, Deutschland) wurde der Strahl in eine Quadratkernfaser (Thorlabs, FP150QMT, Deutschland) mit einer NA von 0,39 eingekoppelt (Faserende a). Durch die quadratische Form und die Länge wird ein Top Hat durch Modenmischung am distalen Faserende erzeugt. Die Quadratkernform hat den Vorteil, dass die Abbildung eines quadratisch geformten Strahlprofils (siehe Abb. 5.5), das auf die Ebene der Probenposition projiziert wird, mit der angeschlossenen Kamera (IDS, UI-1540SE-M-GL, 1280 x 1024 Pixel, Deutschland) hochpräzise

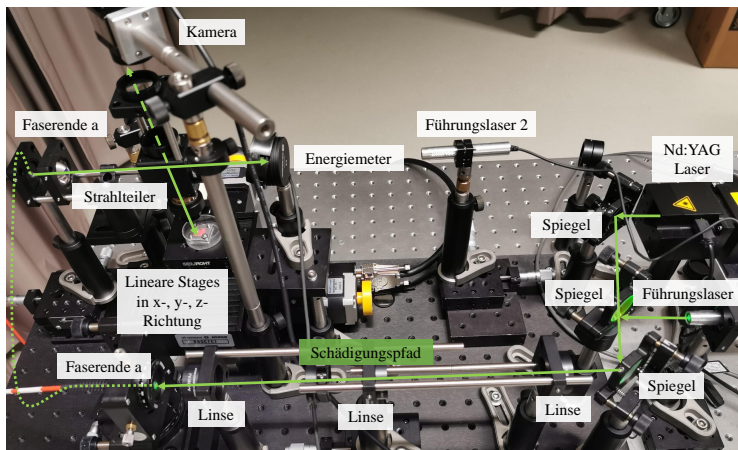
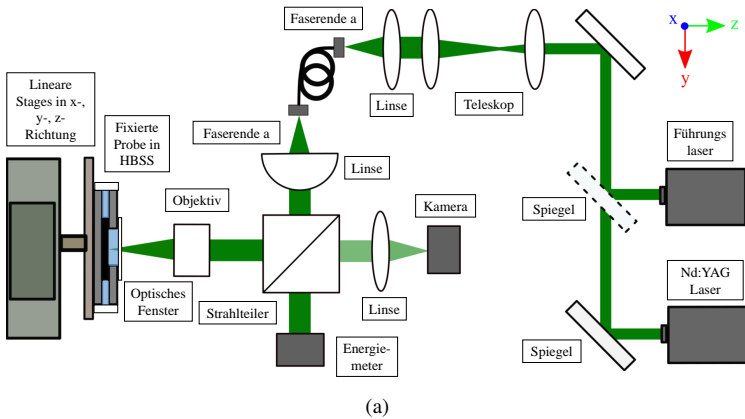


Abbildung 5.4: Darstellung des optischen Setups für die Bestimmung von laser-induzierten Schädigungsmessungen. Der gepulste Nd:YAG Laser wird zur Anregung der Modenmischung in eine MM-Faser eingekoppelt. Das quadratische Strahlprofil an der distalen Spitze der Faser wird auf die Proben abgebildet. Durch die Verwendung eines Strahlteilers kann die angelegte Energie während der Bestrahlung auf den Proben gemessen werden. Eine Kamera wird verwendet, um den Top Hat auf der Probe zu überprüfen und gegebenenfalls die Probe nachzujustieren, indem die quadratische Form des Bildes erkannt wird. (a) Schematisch. (b) Realisierung des Messplatzes.

gesteuert werden kann. Sowohl die Kamera als auch die Probenposition wurden mit Hilfe eines Justierlasers (Thorlabs, CPS532, Deutschland) nachjustiert. In der Abbildungsposition war somit das Top Hat Strahlprofil durch die quadratische Formerkennung gewährleistet. Die Abbildungsposition des Justierlasers hatte eine Abweichung von $\leq 2\%$ und wurde an dieser Stelle vernachlässigt. Anschließend wurde die Faserspitze mit einer Asphäre (Thorlabs, ACL3026U-A, Deutschland) und einem Objektiv (Thorlabs, LMH-5X-532, Deutschland) auf die Ebene der Probenposition abgebildet. Ein Strahlteiler (Thorlabs, BS013, Deutschland) wurde verwendet, um Teile des Strahls in ein Energiemessgerät (Coherent, LabMax-TOP, Modell Nr. 1104622, USA) abzulenken, um die Pulsenergie zu messen und die Anzahl der Pulse zu zählen.

Der Aufbau diente dazu, ein quadratisches Strahlprofil mit geringen Intensitätsmodulationen auf die RPE-Proben abzubilden. Im Experiment wurden die Proben mit Pulsfolgen von $N = 1, 10, 100, 1\,000, 10\,000$ und $20\,000$ bestrahlt, um die Schädigungsschwelle in Bezug auf den ED_{50} zu bestimmen. Die PRF wurde für jedes Experiment auf 25 Hz gesetzt, um eine Hintergrund-Erwärmung zu verhindern [146]. Die Raumtemperatur wurde auf 21°C eingestellt.

In einer weiteren Versuchsreihe [128] wurde der Einfluss von Luftkontakt und die Auswirkungen des oxidativen Stresses untersucht. Die Proben wurden dazu in ein Medium getaucht und befeuchtet, jedoch nicht vollständig⁴, so dass der bestrahlte Bereich auch mit Luft in Kontakt war.

Um zusätzlich die *in vivo* Körpertemperatur zu simulieren, wurden abschließend Untersuchungen zu Pulsfolgen im 38°C -HBSS-Bad durchgeführt. Diese Temperatur wurde bei NHP als durchschnittliche Kernkörpertemperatur bestimmt [16].

VERWENDETES LASERSYSTEM

Ein gütegeschalteter frequenzverdoppelter Nd:YAG (Crylas, FDSS 532-1000, Deutschland) erzeugte zeitliche Gauß-Pulse mit einem FWHM von $1,8\text{ ns}$ bei einer Wellenlänge von 532 nm . Darüber hinaus war die Langzeit-Pulsenergie-

⁴ Die Unterseite und die Flächen zwischen den metallischen Klemmvorrichtungen war völlig eingetaucht.

Stabilität (bezüglich 6 h) weniger als $\pm 5\%$ und die Puls-zu-Puls-Stabilität weniger als 5% root mean square (RMS). Die maximale Expositionszeit in den Experimenten für einen Spot betrug 800 s, wobei eine Abweichung von weniger als 3% bezüglich der Energie gemessen wurde. Des Weiteren konnte die Pulswiederholrate bis max. 80 Hz eingestellt werden, welche jedoch zur Vorbeugung der Hintergrunderwärmung und einer erhöhten Puls-zu-Puls-Stabilität nicht verwendet wurde.

Vor und nach den Experimenten wurde die Pulslänge mit einem Hochgeschwindigkeits-Freiraumdetektor (Thorlabs, DET025AL/M, Deutschland) an der Position der Probe gemessen. Der Detektor war an ein Oszilloskop (Teledyne LeCroy, Waverunner 6100A, 1 GHz, 10 GS/s) gekoppelt. Vor den Experimenten wurde ein BeamViewer (Coherent, LaserCam-HR II, USA) eingesetzt, um das räumliche Strahlprofil zu untersuchen (siehe Abschnitt 5.2.2).

ENERGIEERFASSUNG

Die auftreffende Energiedosis bei Explantmessungen kann mit Hilfe eines Strahlteilers, der vor der Probe eingesetzt wird, erfasst werden. Zur Kontrolle der Einstellung des Energiemessgeräts, sollte das Gerät sowohl an seiner Messposition als auch an der Probenposition positioniert werden, um das Teilungsverhältnis vor den Schädigungsmessungen zu verifizieren. Bei der Auswahl des richtigen Energiemessgeräts sollte berücksichtigt werden, dass die zeitliche Auflösung des Gerätes hoch genug ist, um sicherzustellen, dass die Energie jedes einzelnen Pulses ohne Mittelwertbildung über mehrere Impulse gemessen wird.

Die Kontrolle der abgestrahlten Energie von *in vivo*-Messungen stellt eine besondere messtechnische Herausforderung dar (vgl. Abb. 5.1). In den Berichten Zuchlich' und Lunds [25, 26, 141] wird festgestellt, dass ein Strahlteiler vor das Auge des Tieres gelegt wurde. Bei der Bestimmung der schädigenden Exposition müssen daher die Transmissionseigenschaften bis zur Netzhaut berücksichtigt werden, um anzugeben, wie viel Energie tatsächlich mit der Netzhaut interagiert. Gemäß Böttners Transmissionsmessungen [147] strahlt nur ein Teil des Laserlichts auf die Netzhaut, wobei die Menge der transmittierten Energie von der Wellenlänge abhängt. Unter der Annahme einer Primärschädigung

der Netzhaut wird die vor dem Primatenaugen detektierte Energie um deren Transmissionsfaktor korrigiert.

5.2.2 STRAHLPROFIL UND FOKUSKONTROLLE

Durch die Verwendung einer Glasfaser mit quadratischem Kern, wird die Modendurchmischung verstärkt angeregt und die Homogenität am distalen Ende erhöht. Eine Beispielaufnahme des quadratisch abgebildeten Endes an der Probenposition ist Abb. 5.5 zu entnehmen. In Abb. 5.5a ist die 2D-Ansicht ideal, um die quadratische Form zu erkennen. Dabei wurde die Kantenlänge durch das FWHM mit $319\ \mu\text{m} \pm 3\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Der Vorteil dieser Erscheinungsform liegt vor allem darin, dass durch simultane Aufnahme mit der Kamera gewährleistet wird, dass sich die Gewebeprobe in der Abbildungsposition des Faserendes befindet, in der die Homogenität maximal ist. Bei Fasern mit rundem Glasfaserkern ist die Unterscheidung zum gaußförmigen Profil durch die ohnehin kreisförmige Form erschwert. In Abb. 5.5b ist die 3D-Ansicht dargestellt, um das räumliche Profil zu veranschaulichen. Dabei sind auch kleine *Hot Spots* im Profil ersichtlich, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden. Im Rahmen dieser Untersuchung werden zwei quadratische Glasfasern verwendet, die sich lediglich in ihrer Länge (2 m und 20 m) unterscheiden und somit unterschiedliche Auswirkungen auf die Strahldurchmischung und den damit korrespondierenden Intensitätsmodulationen verursachen.

Wie in Abschnitt 2.1.3, Gl. 2.5 erwähnt, ist der thermische Einschluss gegeben bei $r_{\text{Diff}} \ll r_{\text{Spot}}$. Da verursacht durch die Intensitätsmodulationen keine homogene Intensitätsverteilung innerhalb des Spots entsteht, können einzelne Intensitätsspitzen unterschiedliche Temperaturen auf einzelnen RPE-Zellen verursachen. Eine Wärmediffusion wird jedoch nach Gl. (2.5) bei Pulsdauern von $\tau = 1,8\ \text{ns}$ ausgeschlossen. Hierbei ergibt sich für eine spezifische Wärmediffusivität von Melanin von $2,96 \cdot 10^{-7}\ \text{m}^2$ [148] eine Diffusionsdistanz von $r_{\text{Diff}} = 4,6 \cdot 10^{-2}\ \mu\text{m}$. Für den gesamten Spottedurchmesser ist der thermische Einschluss gegeben.

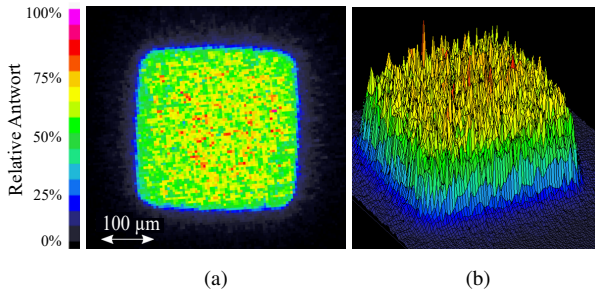


Abbildung 5.5: Gemessenes Top Hat Strahlprofil an der jeweiligen fokussierten Probenposition mit einem IMF von 1,78. (a) 2D-Ansicht mit quadratischer Form des Spots. Der FWHM einer Kantenlänge betrug $319\ \mu\text{m}$. (b) 3D-Ansicht mit Peaks, die die Intensitätsmodulationen anzeigen.

FOKUSKONTROLLE

Um einen Top Hat auf den Proben zu gewährleisten, muss die Glasfaserspitze scharf abgebildet werden, da sonst wieder eine Gaußsche Verteilung auftritt. In Abb. 5.6 ist die Zunahme der Gaußschen Verteilung mit zunehmender Defokussierung für Defokussierungspositionen (D_f) in $100\text{-}\mu\text{m}$ -Schritten relativ zur Fokusposition dargestellt. In grüner Farbe ist der für die Bestimmung von Intensitätsmodulationen notwendige asymmetrische Sigmoidalfit eingezeichnet. Da die biologischen Proben aufgrund ihrer natürlichen Eigenschaften und der Krümmung des Augapfels Unebenheiten aufweisen, werden die Proben für die Schädigungsexperimente möglichst gleichmäßig eingespannt. Gelegentliche Restkrümmungen von mehreren hundert Mikrometern können dennoch nicht vermieden werden. Diese Bestrahlungsspsots können anschließend nicht für die binäre Bewertung verwendet werden.

INTENSITÄTSMODULATIONEN

Für die Implementierung eines Top Hats wurde ein MM-Faseransatz ausgearbeitet und realisiert, um möglichst viel Laserenergie zu erhalten und eine Modenmischung anzuregen, die durch einen hohen Akzeptanzwinkel der Faser ($NA = 0,39$), ihre Krümmung und insbesondere ihre Länge [149, 150] beeinflusst werden kann. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen bezüglich

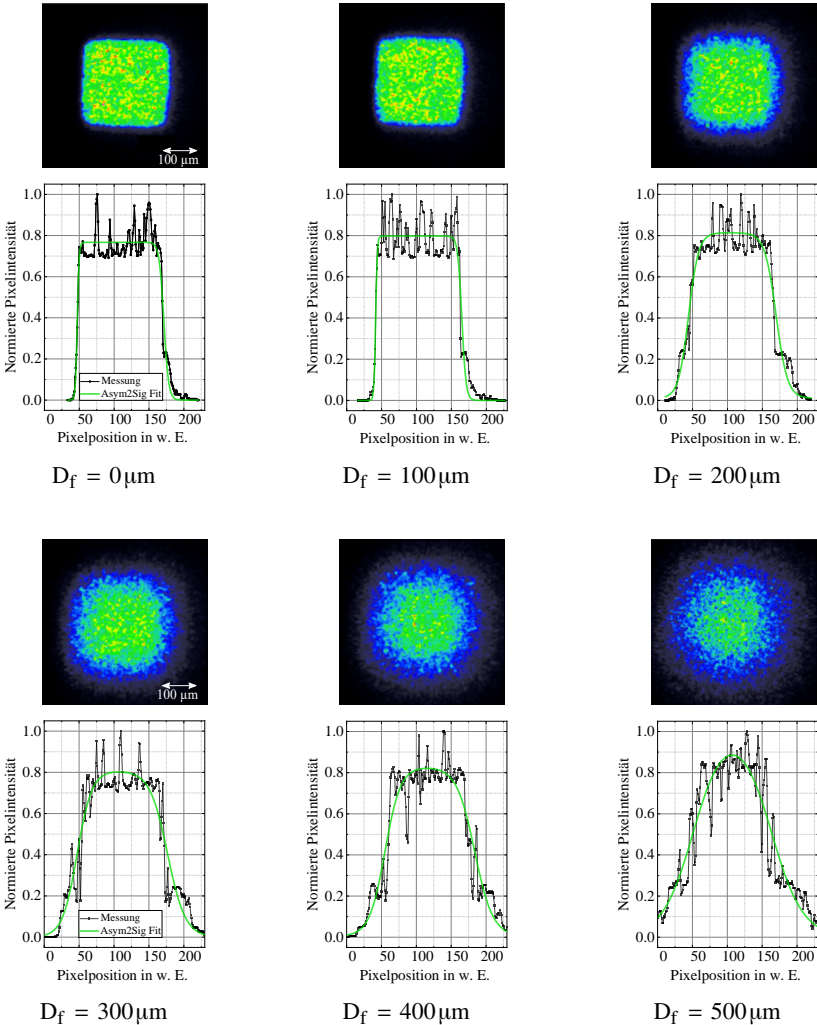


Abbildung 5.6: Strahlprofilaufnahmen an Probenpositionen mit zunehmenden Defokussierungspositionen. Gaußsche Verteilung mit zunehmender Verschiebungsposition. Die Pixelpositionen sind als willkürliche Einheiten und unabhängig voneinander zu betrachten, da die Daten auf dem Sensor aufgezeichnet wurden, der für die Einzelmessungen jeder Defokussierung D_f bewegt wurde.

der Schädigungsschwelle bei der Verwendung zwei identischer Fasern unterschiedlicher Länge (2 m bzw. 20 m) untersucht. Während beide Fasern an der Faserspitze und in der Fokusposition ein Top Hat Profil aufweisen, unterscheidet sich die Größe der Schwankungen zwischen den beiden Fasern aufgrund des Längenunterschieds, vgl. Abb. 5.7. Es ist deutlich sichtbar, dass die Stärke der Fluktuationen bei der 20 m-Faser (siehe Abb. 5.7a) im Vergleich zur 2 m-Faser (siehe Abb. 5.7b) viel geringer ist.

Die für beide Fasern definierten Intensitätsmodulationen wurden für 30 Querschnitte durch das quadratisch geformte Strahlprofil in der Fokusposition bestimmt. Für jeden Querschnitt wurde ein asymmetrischer sigmoidaler Fit (siehe grüne Linie in Abb. 5.7) durchgeführt. Anschließend wurden die Fits zur Bestimmung des gemittelten IMF-Niveaus verwendet. Die aus den Strahlprofilen ermittelten Modulationsfaktoren hatten Werte von $IMF_1 = 1,15$ für die 20 m-Faser und $IMF_2 = 1,78$ für die 2 m-Faser.

In Abb. 5.7c wurden die normalisierten Peaks zur Untersuchung der Fluktuationen (vgl. blauer Rahmen aus Abb. 5.7a) verwendet. Daher wurden nur die Daten der Pixel untersucht, bei denen die angepasste Intensität 90 % des Sättigungsgrades der Anpassung überschritt.

Abbildung. 5.7d stellt die Statistik über die Modulationen mit Fluktuationen von bis zu max. 10 % im 1,5 Interquartilbereich (IQR) dar. Die Box selbst ist durch die Quartile 25 % und 75 % definiert, die den Mittelwert zwischen der kleinsten (25 %) und der größten (75 %) Zahl (nicht das Minimum/Maximum) und den Median des Datensatzes angeben. Von oberhalb des oberen Quartils wird ein Abstand vom 1,5-fachen der IQR gemessen und ein sogenannter Whisker bis zum größten beobachteten Punkt aus dem Datensatz, der in diesen Abstand fällt, aufgezogen. Dasselbe Verfahren gilt für den unteren Whisker.

Unter der Annahme, dass die Peaks die Schädigung verursachen, muss die Größe des maximalen Intensitätswerts für die ED_{50} -Auswertung berücksichtigt werden, weshalb die relative Häufigkeit des Auftretens der Modulationen und ihre Intensität statistisch bestimmt werden. Da in früheren Berichten nicht erwähnt wurde, wie mit der Erscheinungscharakteristik der Fluktuationen umzugehen ist, wurde das Auftreten einzelner Intensitätsspitzenwerte, als Anzahl von Zählungen in Abhängigkeit vom Intensitätsniveau im gesamten Strahlfleck, untersucht.

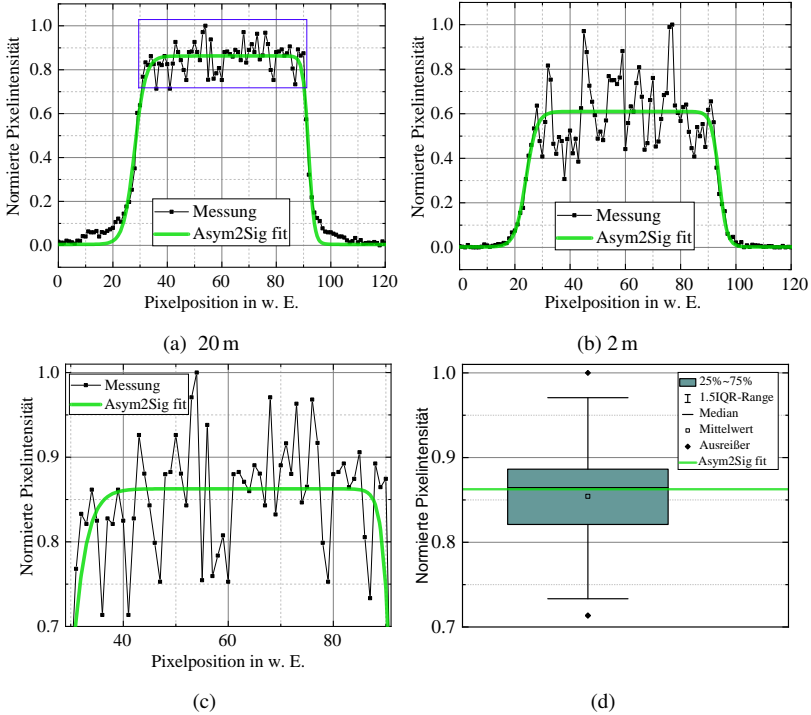


Abbildung 5.7: Normierte Intensitätsprofile zur Probenposition und exemplarische Untersuchung von Fluktuationen in einem Querschnitt des Strahlprofils. Die Daten wurden in eine asymmetrische sigmoide Funktion für eine Top Hat Approximation (grüne Linie) unter Berücksichtigung des Hintergrundrauschens gefittet. (a) $IMF_1 = 1,15 \pm 0,2$ (b) $IMF_2 = 1,78 \pm 0,2$ (c) Nahaufnahme des unter (a) gezeigten Intensitätsprofils in blauem Rahmen mit Schwerpunkt auf dem Plateau der Intensitätsverteilung. (d) Box-Whisker-Plot mit Informationen über die Ausreißer (einerseits der Messpunkt an den jeweiligen Rändern kurz vor der Sättigung), die Medianlinie, den Mittelwert, der mit dem Fit gut übereinstimmt.

Durch die Beschreibung des relativen Auftretens der Peaks oberhalb der Sättigungslinie der Anpassung (grüne Farbe in Abb. 5.7) ist es möglich, die Häufigkeit (ausgedrückt als Prozentsatz pro Fläche) zu berechnen, mit der die Peaks auftreten. Diese Statistik kann somit als minimale "Schwelle" aus Abb. 5.14b verwendet werden, um eine Fläche als beschädigt zu deklarieren.

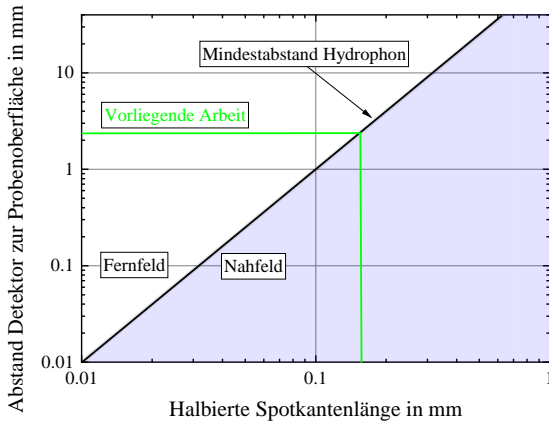
5.2.3 METHODEN ZUR DETEKTION VON MIKROBLASENBILDUNG

Der Nachweis einer Mikroblasenbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch zwei Methoden realisiert: Einerseits wurde ein Hydrophon eingesetzt, welches ca. 2,5 mm vor dem RPE ausgerichtet war, um die im Medium generierten Druckwellen zu erfassen (opto-akustische Methode nach Ref. [55]). Ein weiterer Ansatz zur Messung der Mikroblasenformation basiert auf der Reflexsignaländerung (optische Methode adaptiert nach Ref. [37]) bei zusätzlicher Bestrahlung der Probe.

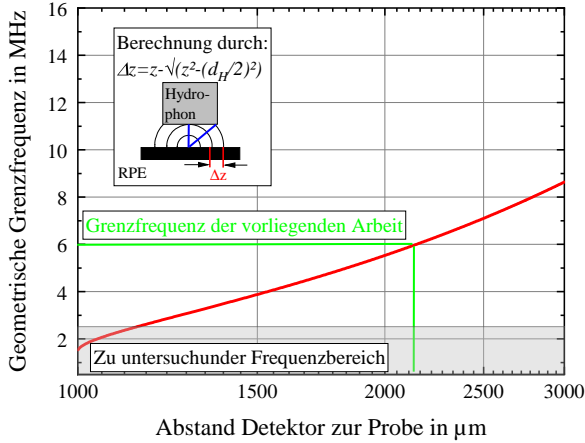
OPTO-AKUSTISCHE MESSUNG DER MIKROKAVITATION

Bei der Laserexposition werden in den RPE-Proben Druckwellen durch einerseits thermo-elastische Transienten und andererseits durch Mikroblasenbildung generiert. Diese Druckwellen wurden mit einem Hydrophon (Precision Acoustics, NH4000, UK) in Kombination mit einem Verstärker (Precision Acoustics, HA2, UK) aufgenommen und durch das Oszilloskop veranschaulicht und abgespeichert. Die Sensitivität des Hydrophons betrug um 1 MHz (Charakteristische Frequenz der Druckwellen [38, 55]) ca. 14 V/MPa.

Aus Abb. 5.8 ist zu entnehmen, dass nach Gusev et al. [151], die induzierten Druckwellen bei einem Spotradius von ca. 160 μm als Kugelwellen angenommen werden können, wenn der Mindestabstand r von ca. 2,2 mm eingehalten wird. Ab diesem Bereich ist von einem akustischen Fernfeld (vgl. Abb. 5.8a) auszugehen, wobei hier gilt, dass das Signal mit $1/r$ abnimmt. Die Breite des Piezokristalls bestimmt die Sensitivität, allerdings auch im gleichen Maß, die messbaren Frequenzen. Daher muss geprüft werden welche geometrischen Abmessungen (Breite halber Messkopf d_H) des Messbereichs die



(a)



(b)

Abbildung 5.8: Qualifikation und Auswahl eines passenden Hydrophons. (a) Abstand Hydrophon zur Probe für Kugelwellenannahme im Fernfeld. (b) Untersuchung der geometrischen Abmessungen des Hydrophons für messbare Frequenzen (bis zur messbaren Grenzfrequenz).

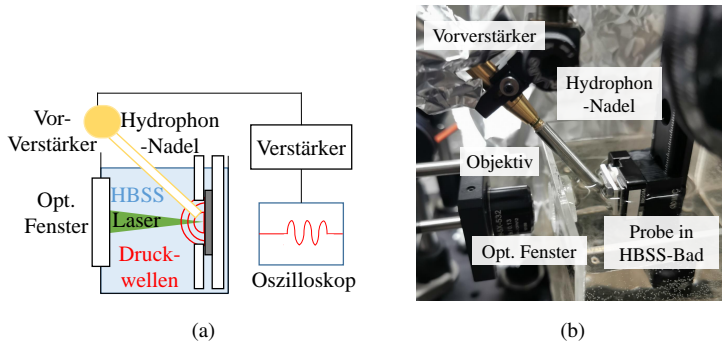


Abbildung 5.9: Implementierung des Hydrophonmesskopfs zur maximalen Sensitivität. Zu erwartender Messbereich aus Literatur liegt bei 1 MHz. (a) Schematisch. (b) Realisierter Einbau.

Empfangscharakteristik (Mindestabstand zwischen zwei Wellbergen Δz) der Mikroblasen (ca. 1 MHz) zulassen (vgl. Abb. 5.8b).

Um den geringen Abstand von 2,5 mm zwischen Probe und Hydrophon zu erreichen ohne den Strahlengang des Lasers zu beeinflussen, wurde das Hydrophon vertikal (vgl. Abb. 5.9b) ausgerichtet. Dabei wurde der Abstand nach dem besten Kompromiss zwischen ausreichender Signalstärke und Mindestabstand für die Fernfeldannahme gewählt und justiert. Der Messkopf wurde vor der Probe ausgerichtet und mit einem Vorverstärker verbunden, der an den Verstärker gekoppelt war. Der Ausrichtungswinkel (vgl. Abb. 5.9a) war durch den Laserstrahl nicht bei 0° möglich, weswegen das Hydrophon angewinkelt werden musste.

REFLEXBASIERTER NACHWEIS VON MIKROBLASEN

Um das Auftreten von Mikroblasen zu erfassen, wurde das Setup um eine neuartige reflexbasierte Detektionsmethode (vgl. Abb. 5.10a) erweitert. Hierfür wurde eine Laserdiode im CW-Betrieb verwendet, die die Probe neben dem Schädigungsexperiment zusätzlich im bestrahlten Areal beleuchtet. Die Expositionsgrenzwerte waren hier nach der DIN EN 60825-1:2015 niedrig gehalten (max. 4,5 mW), um keine Schädigung zu verursachen. Bei der Entstehung

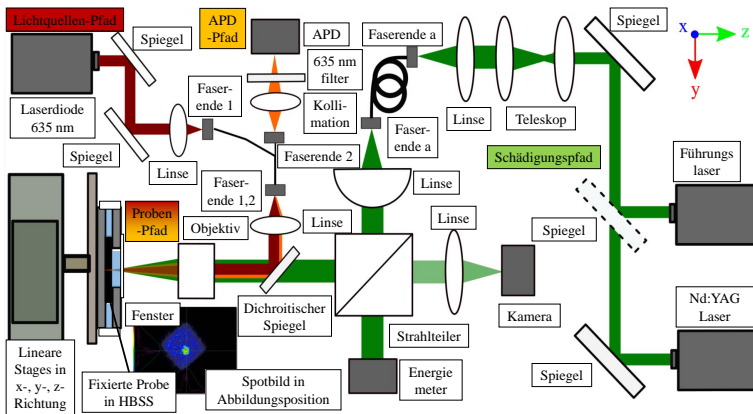
einer Mikroblase in der RPE-Zelle, wird der zurückgestreute Anteil durch Änderung des Brechungsindex im Phasenwechsel (flüssig zu gasförmig) kurzzeitig erhöht [37]. Dieses zurückgestreute Signal kann anschließend durch eine Avalanche Photodiode (APD)(Thorlabs, APD430A2(/M), Deutschland) detektiert werden.

Zur Realisierung dieses Ansatzes wurden drei Pfade in das bisherige Setup implementiert und über eine Y-Bundle-Glasfaser (Thorlabs, BFY50HS02, Deutschland) umgesetzt. Im Lichtquellen (LQ)-Pfad wird eine Laserdiode (Thorlabs, CPS635S, Deutschland) mit 635 nm Wellenlänge mithilfe zweier Spiegel und einer Linse in eines der Faserenden (Faserende 1) des Y-Bundles eingekoppelt. Der LQ-Pfad ist in den Abb. 5.10 und Abb. 5.11 jeweils mit dunkelroter Farbe gekennzeichnet. Eine konkrete Darstellung des LQ-Pfads ist zudem in Abb. 5.11a zu erkennen.

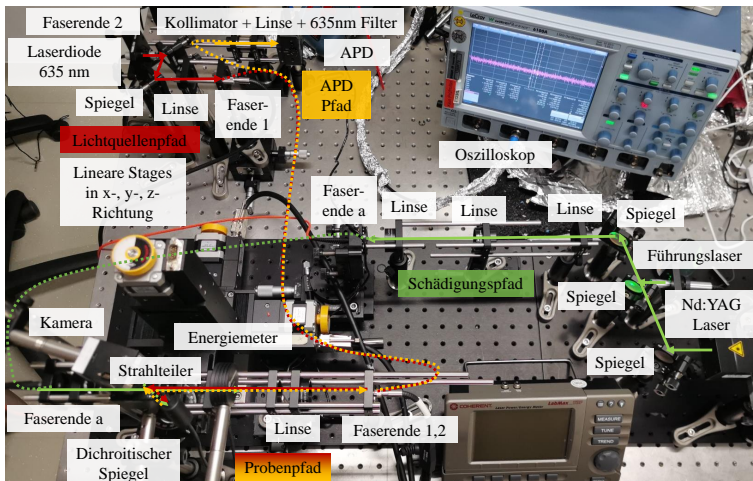
Der APD-Pfad (vgl. Abb. 5.11b) entspricht dem Empfangspfad des rückgestreuten Signals. Dabei wurde das zweite Faserende (Faserende 2) des Y-Bundle mittels eines Kollimators (Thorlabs, F810APC-635, Deutschland) und einer Linse auf die APD fokussiert. Nach der abzubildenden Linse wurde ein spektraler Filter (Thorlabs, FL635-10, Deutschland) angebracht, der lediglich das Licht der Bestrahlungsdioden transmittiert und Licht des grünen Lasers unterdrückt, um Schädigungen an der APD zu vermeiden.

Der Probenpfad (vgl. Abb. 5.11c) besteht aus zwei Kernfasern, die parallel angeordnet sind und in beiden Richtungen als optischer Pfad fungieren und als Bindeglied zwischen dem LQ-Pfad und dem APD-Pfad wirken. Der LQ-Pfad mündet am Faserende 1,2 (vgl. Abb. 5.10a) und wird über eine Linse konfokal auf der Probe abgebildet. Der Probenpfad wird kollinear zum Schädigungspfad über einen dichroitischen Spiegel (Thorlabs, DMSP605, Deutschland) integriert. Dieser lässt den Schädigungspfad fast vollständig transmittieren, während das rote Licht der Diode im selben Maß reflektiert wird. Durch eine Mikroblasenbildung und dem damit einhergehenden Phasenwechsel wird der Brechungsindex in der Mikroblasenlebensdauer erhöht und somit mehr Licht zurückgestreut. Dieses zurückgestreute Licht kann über den gleichen Weg wieder in das Faserende 1,2 eingekoppelt werden. Der Ausgang des zweiten Faserendes mündet im APD-Pfad.

In Abb. 5.10b ist der realisierte Aufbau zu erkennen. In grüner Farbe ist der Pfad zur Laserschädigungsuntersuchung eingezeichnet. Der LQ-Pfad, als auch



(a)



(b)

Abbildung 5.10: Messaufbau mit Nachweis von reflexbasierten Mikroblasen. Der Schädigungspfad (grün) wird zur Ausführung von laser-induzierter Schädigung verwendet. Der Lichtquellen-Pfad dient zur gleichzeitigen Bestrahlung der Probe mit 635 nm. Ein erhöhtes Reflexionssignal in einer Mikroblasenlebensdauer ist zu erfassen. Diese Rückkopplung wird über den Probenpfad (rot-gelb) dargestellt. Das zweite Faserende des Y-Bundle führt zu einer APD (gelb, APD-Pfad), die die Veränderung aufzeichnet. (a) Schematisch. (b) Realisierung.

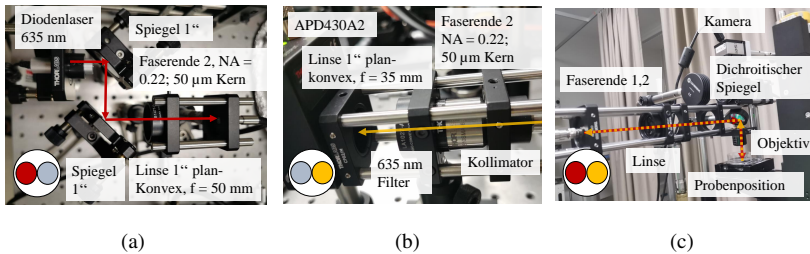


Abbildung 5.11: Komponenten zur Erweiterung der Mikroblassenmessung. (a) LQ-Pfad (rot). (b) APD-Pfad (gelb). (c) Probenpfad (rot und gelb).

der APD-Pfad, sind links oben zu erkennen. Da die einzelnen Pfade nur durch eine Draufsicht erkennbar sind, ist aus der fotografierten Perspektive die Probe nicht zu erkennen, weswegen Abb. 5.11c ergänzt wurde. Die ausgewerteten Signale der APD werden über ein Oszilloskop ausgelesen.

5.2.4 INTEGRATION DES TEMPERIERSYSTEMS

Um Temperatureinflüsse zu untersuchen, wurde das Setup um ein Temperierreglersystem (vgl. Abb. 5.12) erweitert. Hierfür wurde ein Temperiergerät (Jumo, LR316, Deutschland) mit einem Messfühler, der die Temperatur an einer Drahtspitze misst, verwendet. Im Rahmen dieser Experimente wurde zum Zwecke einer besseren Vergleichbarkeit mit NHP-Messungen ein Soll-Wert von 38°C gewählt. Durch periodisches Einschalten des Heizstabs wurde die Temperatur im HBSS-Bad konstant gehalten (vgl. Abb. 5.12a)). Die Abweichungen zur eingestellten Temperatur waren für die maximale Bestrahlungsdauer von 800 s weniger als 4%.

In Abb. 5.12b ist das implementierte HBSS-Becken im Aufbau dargestellt. Durch manuelle Vermischung war im gesamten Becken eine konstante Temperatur gegeben.

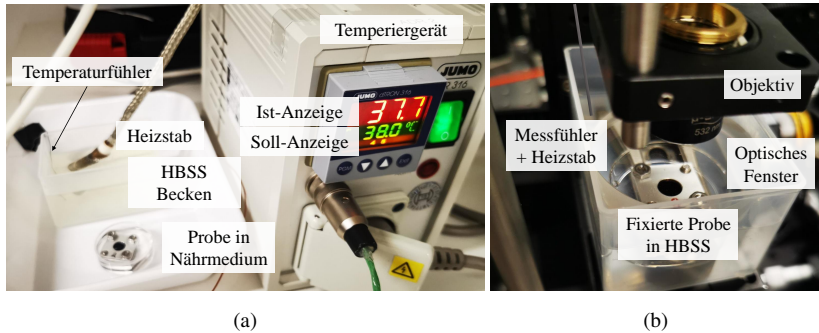


Abbildung 5.12: Temperiersystem. (a) Komponenten der Temperierung. Ein Messfühler aus Draht erfasst die Temperatur im HBSS-Becken, welche in der Ist-Anzeige dargestellt wird. Der Soll-Wert löst bei Abweichungen zum Ist-Wert den rampenartigen Heizvorgang im Heizstab aus. (b) Probe im temperierten HBSS-Becken.

5.3 SCHÄDIGUNGSMESSUNG AN RPE-EXPLANTS

In diesem Kapitel soll das in Abschnitt 5.2.1 vorgestellte optische Setup verwendet werden, um an Explants Laserschädigungsmessungen durchzuführen. Die Herangehensweise und die methodischen als auch analytischen Schritte zur Auswertung werden in diesem Kapitel vorgestellt.

5.3.1 VORGEHENSWEISE

Die präparierten RPE-Proben wurden in Klemmkonstruktionen gehalten, um die Proben zu fixieren und abzuflachen. Die Halter mit den Proben wurden anschließend in den optischen Aufbau gesetzt und für die Bestrahlung ausgerichtet. Zu diesem Zweck wurden zunächst eine vertikale und eine horizontale Linie zur Orientierung mit dem Nd:YAG Laser bei ca. 70 μJ Einzelpulsenergie erzeugt. In äquidistanten Abständen von jeweils 500 μm wurden einzelne Laserbelichtungen auf der Probe erzeugt. Jeweils eine Messreihe wurde mit einer konstanten Energiedosis bestrahlt und über das Energiemessgerät aufgezeichnet. Weitere Messreihen wurden in ihrer Energiedosis variiert. Dieses Verfahren wurde für alle Proben mit identischen Energiedosen wiederholt, um

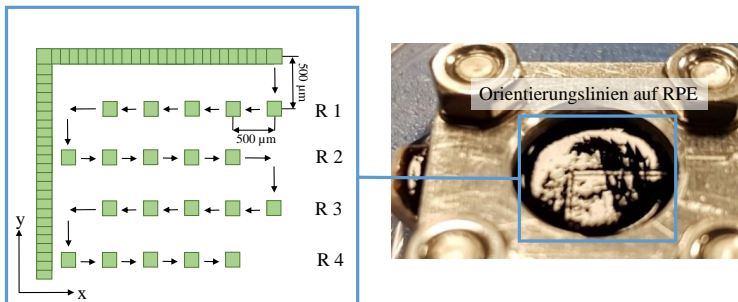


Abbildung 5.13: Schema und Durchführung des Bestrahlungsprozesses an einer Probe: Nach der Erzeugung der Orientierungslinien werden Messreihen (R1 bis R4) auf der Probe erzeugt. Die Bestrahlungen in einer Messreihe werden mit konstanter Energie der Pulse erzeugt. Auf der RPE-Probe sind die Orientierungslinien meist mit dem bloßen Auge sichtbar.

die Reproduzierbarkeit der nachweisbaren Schädigungsschwellen zu bestätigen und die biologische inter- und intraindividuelle Variabilität zu berücksichtigen.

Dabei wurden die Energiedosen zwischen den Messreihen alternierend in ihrer Stärke appliziert, um mögliche Defokussierungen zu berücksichtigen. Das bedeutet, dass nur Spots mit quadratischer Form auf der Probe gewertet wurden. Da auch keine Schädigung erkennbar ist, wenn das bestrahlte Areal nicht im Fokus ist, wurde die Stelle nur mit "kein Schaden" gewertet, wenn die benachbarten bestrahlten Areale die quadratische Form aufwiesen.

5.3.2 SCHADENSDEKLARIERUNG

Ex vivo Netzhautschäden können mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.14a). Lebensfähige Zellen erscheinen aufgrund der Anregung von Calcein (vgl. Kap. 5.1.4), das nur durch aktive Enzyme umgewandelt werden kann, hellgrün, während Zellen mit zerstörter Zellmembran dunkel erscheinen. Da faserbasierte Top Hat Messungen Intensitätsmodulationen enthalten, ist es schwierig, einen räumlich zusammenhängenden geschädigten Bereich zu definieren. Neumann [38] zeigte daher in seiner Arbeit, dass die Anzahl der geschädigten Zellen mit der applizierten Bestrahlung zunahm.

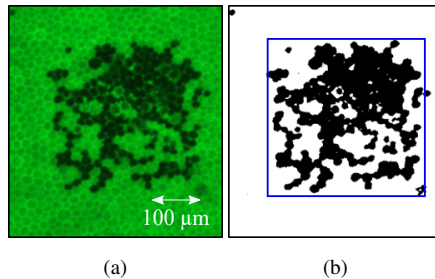


Abbildung 5.14: Bewertung von lebenden und geschädigten Zellen. (a) Vitale Zellen erscheinen durch Anregung des Calcein hellgrün. (b) Konvertiert in binäre Daten. Der blaue Rahmen zeigt den bestrahlten Bereich an.

Da diese zufälligen Schwankungen das Strahlprofil beeinflussen, wurde der prozentuale Anteil der geschädigten Fläche an der bestrahlten Fläche mit Hilfe von Bildverarbeitungswerkzeugen wie z.B. *Origin* in binäre Daten konvertiert (siehe Abb. 5.14b). Zur besseren Vergleichbarkeit mit verfügbaren Daten wurde zusätzlich die aus der Literatur [38, 152] bekannte Bewertungsmethode der "mindestens 3 verbundene Zellen" verwendet. Der bestrahlte Spot wurde als geschädigt bewertet sobald eines der beiden Kriterien erfüllt war.

5.3.3 AUSWERTUNG ÜBER PROBIT-ANALYSE

In retinalen Untersuchungen zur Schädigungsschwelle wird üblicherweise eine Dosis-Antwort-Kurve basierend auf den experimentellen Daten erstellt, um einerseits eine effektive Dosis zu bestimmen, bei der eine Einwirkung (Einzelpulsenergie) eine binäre Antwort (Kein Schaden/Schaden) erzeugt. Dabei wird in diesem Probitplot sehr häufig auf den Wendepunkt dieser mathematischen Funktion verwiesen, der die 50%-Wahrscheinlichkeit angibt, eine Antwort zu erzeugen. Dieser Wert wird demnach als Schwellwert bezeichnet und nicht als Grenzwert, da aufgrund systematischer Unsicherheiten und biologischer Variabilität auch Schädigungen unterhalb des ED_{50} detektiert wurden. Die Steigung der Dosis-Antwort-Kurve wird für gewöhnlich herangezogen, um neben biologischer Variabilität auch die experimentellen Unsicherheiten bei der Durchführung der Experimente zu bewerten. Die Techniken der Probit-Analyse stammen aus der Toxikologie und bestimmt naturgemäße Annahmen

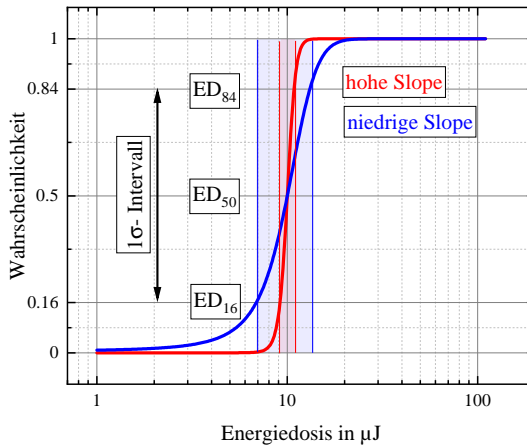


Abbildung 5.15: Beispiel zweier Dosis-Antwort-Kurven mit einer logarithmischen Normal-Verteilung mit identischem Erwartungswert $\mu = 1$ und einer niedrigen Standardabweichung 0,2 (rot, hohe Slope) und einer hohen Standardabweichungen 0,4 (blau, niedrige Slope). $ED_{50} = 10^{\mu} = 10 \mu\text{J}$ und $ED_{84}/ED_{50} = ED_{50}/ED_{16} = 10^{\sigma}$. Die grauen Linien kennzeichnen den 16%igen Pegel ($\mu - \sigma$), den 50%igen Pegel (μ) und den 84%igen Pegel ($\mu + \sigma$).

in Bezug auf die erwartete Verteilung der toxikologischen Schwellenwertdaten, bei denen jede Exposition als unabhängig angenommen wird [125]. Diese Technik wurde auf Lasersicherheitsstudien [126] übertragen.

Der von Finney [125] abgeleitete Auswertungsalgorithmus zur Bestimmung der effektiven Dosis ED_{50} basiert auf einer logarithmischen Dosis- Wahrscheinlichkeitsverteilung $f(x)$ nach Gl. (5.1). Die Normalverteilung mit dem Erwartungswert μ und der Standardabweichung σ hat die Form einer symmetrischen Glockenkurve für die akzeptablen Dosiswerte x .

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \int \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2\right) dx \quad (5.1)$$

Das Verhältnis ED_{84} zu ED_{50} (= Slope) b der Probit-Anpassung als Kehrwert der Standardabweichung σ wird üblicherweise als Schwellenwertmerkmal verwendet. Da eine Stufenfunktion bei der Schwellenwertbestimmung wünschenswert ist, aber nicht durch biologische inter- und intraindividuelle Variabilität

erreicht werden kann, wird der ED_{50} mit den 95 % Konfidenzgrenzen angegeben. Zur vereinfachten Darstellung sind diese Kurven nicht in Abb. 5.15 aufgetragen. Stattdessen wurde der Bereich farblich markiert, der im $1 \cdot \sigma$ -Intervall liegt, um die Messunsicherheit bezüglich der Schädigungsschwelle vereinfacht darzustellen. Der häufig verwendete Standard für die Analyse der Daten ist das Software-Tool *ProbitFit* [127], welches auf der statistischen Verteilungsfunktion basiert. Die Steigung kann durch eine hohe Anzahl von Stichproben, durch möglichst geringe Überlappung der Schadensschwellen durch Vorauswahl (völlig unbeschädigte und undurchsichtige Stichproben) und durch kleine Energieintervalle um den ED_{50} erhöht werden.

In vivo Messungen erlauben aus Tierschutzgründen keine hohe Anzahl von Expositionen, weshalb das Thema Unsicherheit vs. Variabilität *ex vivo* untersucht werden sollte. Für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit sowie der Genauigkeit der Schwellenwerte eignen sich daher Explants besonders.

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Es wurden Schweine-Explants als retinale Gewebeproben aufgrund vereinfachter dosimetrischer Kontrolle verwendet. Die Auswertung wurde durch Vitalitätsassays realisiert.
- Die Entwicklung eines Messplatzes (532 nm, Top Hat, 319 μ m Kantenlänge) und eines Verfahren zur Bestimmung von laser-induzierter Schädigung wurden vorgestellt.
- Untersuchungen von bislang unerforschten Pulsfolgen (bis $N = 20\,000$) für räumliche Strahlprofile unterschiedlicher Gleichförmigkeitsniveaus, Temperaturbedingungen und Befeuchtungsgraden wurden durchgeführt.
- Das Setup wurde um eine reflexbasierte und akustische Messung von Mikrokavitation erweitert.
- Die Vorgehensweise und Vorstellung einer erweiterten Schadensdetektionsmethode wurde etabliert.
- Die Schädigungsschwellen wurden über die Probit-Analyse ausgewertet. Die Methoden für eine hohe Qualität der Messungen wurden ausgearbeitet.

6 LASER-INDUZIERTE SCHÄDIGUNGSSCHWELLEN

In diesem Kapitel werden die laser-induzierten Schädigungsschwellen von Einzelpulsen und Multipulsen vorgestellt. Für die Bestimmung der Schwellwerte wurde der Messplatz aus Kap. 5 in Betrieb genommen und die in Kap. 5.3 erläuterte Vorgehensweise angewandt. Dabei wird untersucht, wie sich Intensitätsmodulationen im Top Hat Strahlprofil und die räumliche Ausrichtung der Proben auf die Schädigungsschwellen bei Einzelpulsen ausgewirkt haben. Zudem wird die Wirksamkeit der beiden verwendeten Fluoreszenzmittel evaluiert.

Des Weiteren wurden die *ex vivo* retinalen Schädigungsschwellen von mehreren Pulsfolgen bestimmt. Dabei wurden Pulszüge bis $N = 20\,000$ untersucht, da bislang keine veröffentlichten Forschungsarbeiten bis zu diesen Pulsanzahlen verfügbar sind. Zusätzlich wurden Messreihen unterschiedlicher Befeuchtungsgrade durchgeführt, da oxidativer Stress sich vor allem bei Explants stark ausprägen kann. Außerdem wurde eine Messung in einer HBSS-Umgebung von 38°C durchgeführt, um die Körpertemperatur nachzubilden. Zusätzlich werden die Möglichkeiten zur parallelen Messung von potenziell auftretenden Mikroblasen bewertet. Abschließend werden die Ergebnisse zur Simulation des thermischen Modells vorgestellt und mit den Schädigungsschwellen dieser Studie verglichen.

6.1 EX VIVO RETINALE SCHÄDIGUNGEN DURCH EINZELPULSE

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Schädigungsschwellen durch Einzelbelichtungen vorgestellt. Es wurden Messreihen für verschiedene Fluktuationen im Strahlprofil (vgl. Abb. 5.7) durchgeführt um deren Auswirkungen auf

die Schädigungsschwelle zu untersuchen und die Vorgehensweise der Detektionsmethode zu bewerten. Die Intensitätsmodulationen wirken sich maßgeblich auf die bestimmten ED_{50} aus, sowie auf die Bestrahlung angefeuchteter Proben als auch auf die Untersuchung vollständig getauchter Proben. Weiterhin werden Auffälligkeiten der Fluoreszenzbilder bezüglich der Probenausrichtung im Raum und den verwendeten Farbstoffen vorgestellt.

6.1.1 AUSWIRKUNG VON INTENSITÄTSMODULATIONEN

Aus Kap. 1.2.3, Abb. 1.4 geht hervor, dass die Schädigungsschwellen bei Einzelpulsen teilweise um einen Faktor von 3 bei *ex vivo* Messungen auseinanderliegen. Eine Begründung dafür liegt in den Intensitätsmodulationen und deren Berücksichtigung bei der Bestimmung der schädigenden Exposition. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Top Hat Strahlprofile untersucht, die sich lediglich hinsichtlich des IMF unterschieden haben. Die daraus resultierenden Schädigungsschwellen können einen Erklärungsansatz für die Inkongruenz bestehender Daten aus anderen veröffentlichten Studien darstellen. Die detaillierte Evaluierung der Strahlprofile ist Kap. 5.2.2 zu entnehmen.

Aus Tab. 6.1 wird ersichtlich, dass die Intensitätsmodulationen einen erheblichen Einfluss auf die Schädigungsschwelle haben. Die vermessenen Intensitätsmodulationen waren bei beiden Faserlängen vergleichbar hinsichtlich ihrer Größe im Strahlprofil ($FWHM < 4 \mu\text{m}$). Da die Modulationen in der kürzeren

Tabelle 6.1: ED_{50} gemessen für die Exposition mit einem $319 \mu\text{m}$ quadratischen Top Hat Strahlprofil von 1,8-ns-Pulslänge bei $\lambda = 532 \text{ nm}$ auf Schweine-RPE für zwei unterschiedliche Faserlängen (2 m und 20 m) und daraus resultierenden Modulationen. Die 95 % Konfidenzintervalle des ED_{50} konnten für diese Experimente nicht bestimmt werden, da die Überschneidung zu gering war. Intensitätsmodulationen wurden durch Multiplikation des ED_{50} mit dem IMF zur Berechnung der Exposition berücksichtigt. Die Proben wurden für die Bestrahlungsexperimente nur leicht mit HBSS befeuchtet. Die Slope wurde nach der *Army Slope* [127] berechnet und entspricht dem Verhältnis von ED_{84} zu ED_{50} .

Faserlänge	IMF	ED_{50}	Slope	#Auge/Expositionen	Exposition H	IMF-korrigierte H
m	-	μJ	-	-	mJ/cm^2	
20	$1,15 \pm 0,2$	$32,47 (-)$	1,01	7/218	$31,9 \pm 0,32$	$36,69 \pm 4,80$
2	$1,78 \pm 0,2$	$43,16 (-)$	1,01	5/128	$42,4 \pm 0,42$	$75,50 \pm 8,52$

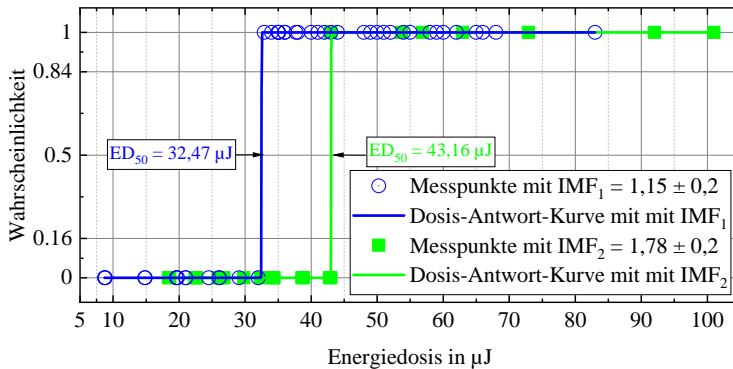


Abbildung 6.1: Dosis-Antwort-Kurven mit einer logarithmischen Normalverteilung. Die Wendepunkte der Dosis-Antwort-Kurven entsprechen dem jeweiligen ED_{50} und sind gekennzeichnet. (blau) Für den $IMF_1 = 1,15$, ergibt sich ein Erwartungswert von $\mu_1 = 1,53$ und eine Standardabweichung $\sigma_1 = 0,029$. (grün) Für den $IMF_2 = 1,78$ wurden ein Erwartungswert von $\mu_2 = 1,71$ und eine Standardabweichung von $\sigma_2 = 0,053$ berechnet.

Faser jedoch deutlich ausgeprägter waren und das Strahlprofil in Folge dessen inhomogener, schädigten lediglich die vereinzelt auftretenden Peaks die Schädigung auf dem RPE-Gewebe. Die aus der Literatur angewandte Methode der "3-Zellen-im-Verbund"-Bedingung konnte daher trotz Schädigung durch die Peaks in einigen Fällen nicht erfüllt werden, weswegen sich bei dieser Faserlänge ein höherer ED_{50} (Faktor 1,3) ergeben hat. Die vorherige Untersuchung des Strahlprofils nach relativem Auftreten der Intensitätsspitzen im gesamten bestrahlten Areal war nicht zielführend. Die Untersuchung zeigte, dass die Anzahl an Peaks höher war als die Anzahl tatsächlich geschädigter Zellen. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Größe der RPE-Zellen (bis zu $12 \mu\text{m}$) nicht mit der Größe der Peaks ($FWHM < 4 \mu\text{m}$) gleichzusetzen ist. Drei verbundene Zellen als geschädigt zu erkennen ist lediglich möglich, wenn ein solcher Peak auf drei angrenzenden Zellmembranen auftritt und alle drei beschädigt wurden.

Die Qualität der Messungen lässt sich wie in Kap. 5.3.3 beschrieben, durch die Probit-Analyse bewerten. Die resultierende Dosis-Antwort-Kurve der beiden Messungen (vgl. Abb. 6.1) zeigen einen ersichtlichen Übergang, der von "keine Schädigung" (vgl. Wahrscheinlichkeit = 0) zur "Schädigung" (vgl.

Wahrscheinlichkeit = 1) führt. Diese Kurven sind in blau für die lange Faser (20 m) und in grün für die kurze Faser (2 m) in Abb. 6.1 dargestellt.

6.1.2 RÄUMLICHE AUSRICHTUNG DER PROBEN

Bei der - für die Implementierung eines Hydrophons notwendigen vertikalen Ausrichtung der Proben - wurde ein Schliereneffekt (vgl. Abb. 6.2) in Richtung der Gewichtskraft beobachtet. Das bedeutet, dass im Fluoreszenzbild Streifen mit geschädigten Zellen in x- bzw. y-Richtung erkennbar waren. Das Muster der Schlieren war dabei nach jeder Exposition willkürlich und wies keine reproduzierbaren Merkmale auf.

Die Ursache dieses Effekts konnte nicht geklärt werden. Aus diesem Grund wurden lediglich die Experimente bei denen die Proben horizontal ausgerichtet waren, gewertet. Bei anderen veröffentlichten Studien [29, 32, 55] wurden die Experimente bei vertikaler Ausrichtung durchgeführt ohne Angaben zum Auftreten von Schliereneffekten.

6.1.3 WIRKSAMKEIT DER FLUORESZENZMITTEL

Bei Anregung des Calceins waren die Zellstrukturen in den Fluoreszenzbildern deutlich erkennbar. Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von Calcein-AM war die Unterscheidung zwischen Schattenauswürfen durch die mikroskopische Aufnahme, mangelhaften Bindungsprozessen und tatsächlich

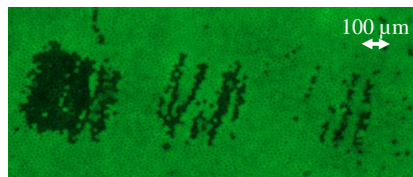


Abbildung 6.2: Fluoreszenzaufnahme der RPE-Probe mit drei bestrahlten Arealen mit nach rechts abnehmenden Einzelpulsenergien. Die geschädigten RPE-Zellen sind vertikal in Richtung der Gewichtskraft geschädigt und erscheinen verbunden. Dieser Effekt wurde bei den Einzel- als auch den Multipulsen bei vertikaler Ausrichtung bemerkt.

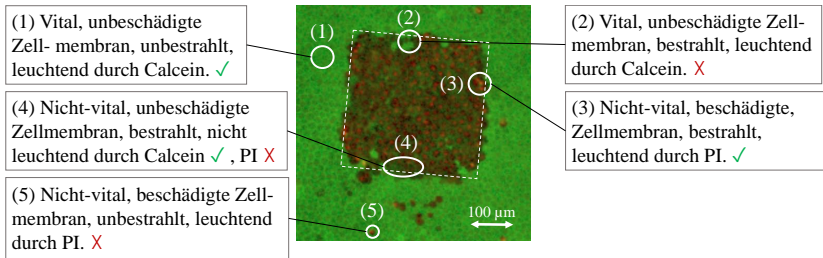


Abbildung 6.3: Fluoreszenzaufnahme des RPE mit beiden wirksamen Fluoreszenzmitteln.

beschädigten Zellen. Es wurde daher bei Unsicherheiten bei der Auswertung mit Calcein zusätzlich PI eingesetzt. Die Auswertung des durch PI angeregten Fluoreszenzbilds war jedoch problematisch, da die Anheftung des Fluoreszenzfarbstoffes an den Kern der gestörten Zellen begrenzt und von Probe zu Probe unterschiedlich stark ausgeprägt war. Gründe dafür könnten die individuellen Inkubationszeiten und die Konzentration der Lösung des PI gewesen sein. Aufgrund der begrenzten Lebenszeit der Explants konnten die Proben maximal 30 min mit den Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert werden. Untersuchungen mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen haben sich als zeitaufwendig erwiesen, da es sich nicht um eine planare Schicht der Probe handelt und daher der Fokus für jede bestrahlte Messreihe im *Zack-Modus*¹ für die jeweilige Anregungswellenlänge nachjustiert werden musste. Gleichzeitig muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Probe durch die lange Anregung nicht ausbleicht. Aus diesem Grund wurde die Auswertung durch PI nur angewandt, sofern Unsicherheiten bezüglich der Aufnahme durch Calcein entstanden.

In Abb. 6.3 ist eine beispielhafte Fluoreszenzaufnahme mit beiden angeregten Farbstoffen dargestellt. Grün leuchtende Zellen wurden durch Calcein als vitale Zellen deklariert, wohingegen rot leuchtende Zellkerne auf eine beschädigte Zellmembran hinweisen. In Abb. 6.3 sind bestrahlte (2,3,4) und unbestrahlte (1,5) Areale gekennzeichnet, die entweder grün durch Calcein (1,2), rot durch PI (3,5) oder weder noch (4) fluoreszieren. Daraus ergibt sich aus dem Fluoreszenzbild, beispielsweise für die Auswertung des Calceins richtig positive (1), richtig negative (4), falsch positive (2) als auch falsch negative (5) Ergebnisse.

¹ Tiefenscharfes Bild aus mehreren einzelnen Aufnahmen unterschiedlicher Fokusebenen

6.2 LASER-INDUZIERTE SCHÄDIGUNGSSCHWELLEN VON PULSFOLGEN

Für die Untersuchung der Pulsfolgen wurde aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 6.1.1 beschlossen, weitere Experimente mit der längeren Faser durchzuführen um Fluktuationen im Profil so gering wie möglich zu halten. Im Experiment wurden die Proben mit Pulsfolgen von $N = 1 - 20\,000$ bestrahlt, um die Schädigungsschwelle in Bezug auf den ED_{50} zu bestimmen. Die Pulsfrequenz wurde zur Vermeidung einer Hintergrunderwärmung für jedes Experiment auf 25 Hz festgelegt. Darauf aufbauend wurden verschiedene Befeuchtungsgrade (Benetzung und völlig getaucht) und Umgebungstemperaturen (21 °C und 38 °C) untersucht.

Um die $1,96 \cdot \sigma$ -Unsicherheiten zu quantifizieren, wurden die 95% Konfidenzintervalle ($1,96 \cdot \sigma$ -Intervall) in Klammern in Tab. 6.2 dargestellt. Zur Bestimmung der Unsicherheit im $1 \cdot \sigma$ -Intervall, wurden die ins Gewicht fallenden Größen des ED_{50} , Durchmesser und IMF mittels Fehlerfortpflanzung untersucht. Die $1 \cdot \sigma$ -Unsicherheit des ED_{50} kann durch die Slope angegeben werden. Die Slope b des *ProbitFit* und die Standardabweichung σ der logarithmisch normalen Dosis-Antwort-Wahrscheinlichkeitsverteilung sind durch $b = 1/\sigma$ [125, 127] miteinander verbunden. Der Durchmesser wurde mit einer Messunsicherheit von $319 \pm 3 \mu\text{m}$ bestimmt. Der IMF wurde mit einem Wert von $1,15 \pm 0,2$ bestimmt. Diese Größen wurden zur Berechnung der Exposition in Tab. 6.1 - Tab. 6.3 verwendet.

6.2.1 EINFLUSS DES BEFEUCHTUNGSGRADS

In dieser Versuchsreihe werden die Proben zwei unterschiedlichen Befeuchtungsgraden ausgesetzt sein:

1. Befeuchtet: Zur Untersuchung des oxidativen Stresses, wurden die Proben in einer Versuchsreihe nur mittels einer Pipette mit Tropfen benetzt. Die eingespannte Probe war bis zur Expositionsfläche in Medium getaucht. Die bestrahlte Fläche wurde mit HBSS befeuchtet.

2. Vollständig getaucht: Untersuchungen aus der Literatur geben an, dass die Proben vollständig getaucht sind, um oxidativen Stress zu mindern und um die Probe zu kühlen.

Die für die Explants erhaltenen Schwellenwerte sind in Tab. 6.2 aufgelistet. Der ED₅₀ wird als Energie pro Einzelpuls ausgedrückt. Die Tabelle enthält 95% Konfidenzgrenzen für die ED₅₀, die Slope *b* des *ProbitFit*, die Anzahl der untersuchten Tiere, die Anzahl der Gesamtexpositionen sowie die vom IMF-korrigierten Expositionen.

Befeuchtete Proben Aus den Ergebnissen (vgl. Abb. 6.4) geht hervor, dass die schadens-induzierte Einzelpulsenergie einer Pulsfolge mit zunehmender Anzahl der Pulse abnimmt. Da durch eine niedrige Slope eine Stufenfunktion approximiert wird, kann der Übergang zur Schädigung in dieser Versuchsreihe deutlich erkenntlich gemacht werden. Die höchste Slope wurde bei N = 20 000 berechnet und ist auf die hohe Anzahl der Augen verschiedener Individuen zurückzuführen. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass in dieser Versuchsreihe die biologische interindividuelle Variabilität besonders hoch war. Selbst ein

Tabelle 6.2: ED₅₀ gemessen für die Exposition mit einem 319µm quadratischem Top Hat von 1,8-ns-Pulsen bei λ = 532 nm für verschiedene Pulsfolgen mit HBSS-Benetzung. 95% Konfidenzintervalle auf dem ED₅₀ sind in Klammern angegeben. Ein '–' zeigt an, dass aus den Messdaten zu wenig Überlappungen erfasst wurden, um Konfidenzintervalle zu erhalten. Der IMF lag bei ca. 1,15 ± 0,2. F ≡ Befeuchtet. T ≡ Getaucht.

Art	Pulsfolge	ED ₅₀	Slope	#Augen/Proben/Schuss	H	IMF-korrigierte H
-	-	µJ	-	-	mJ/cm ²	mJ/cm ²
F	1	32,47 (26,95 - 35,4)	1,01	7/-/218	31,91 ± 0,32	36,69 ± 4,80
F	10	26,19 (24,45 - 27,63)	1,07	5/-/148	25,74 ± 1,80	29,59 ± 4,38
F	100	24,78 (-)	1,01	3/-/99	24,35 ± 0,24	28,00 ± 3,66
F	1 000	20,32 (-)	1,07	3/-/67	19,97 ± 1,40	22,96 ± 3,39
F	6 000	16,45 (-)	1,01	7/-/104	16,17 ± 0,16	18,59 ± 2,43
F	10 000	12,48 (-)	1,01	7/-/36	12,26 ± 0,12	14,1 ± 1,85
F	20 000	7,56 (-)	1,16	12/-/41	7,43 ± 1,19	8,54 ± 1,76
T	1	31,16 (30,48 - 31,96)	1,09	13/8/510	30,6 ± 2,76	35,2 ± 4,41
T	10	21,20 (-)	1,01	3/3/106	20,8 ± 0,21	23,9 ± 2,09
T	100	19,37 (-)	1,01	4/4/76	19,0 ± 0,19	27,9 ± 1,92
T	1 000	17,37 (15,93 - 18,40)	1,1	6/6/109	17,1 ± 1,71	21,9 ± 2,6
T	10 000	13,17 (11,61 - 14,58)	1,14	6/13/31	12,9 ± 1,81	14,9 ± 2,45
T	20 000	11,56 (-)	1,01	15/11/27	11,4 ± 0,11	13,1 ± 1,14

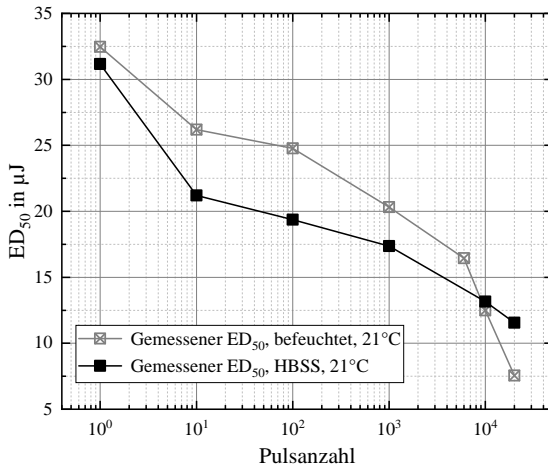


Abbildung 6.4: Untersuchung der experimentell bestimmten ED₅₀-Werte für verschiedene Befeuchtungsgrade. Abnahme der Einzelpulsdosis einer Pulsfolge mit zunehmender Pulsanzahl für befeuchtete Proben (graue gekreuzte Quadrate) und vollständig getauchte Proben (schwarze Quadrate). Im Bereich ab $N > 10\,000$ halbiert sich die für eine Schädigung notwendige Energie nahezu. Konfidenzintervalle sind mit Balken angegeben

Slope-Wert von 1,16 ist niedriger als die meisten aus der Literatur veröffentlichten Werte (*ex vivo*: bis 1,3. *In vivo*: bis 10).

Bei Pulszahlen über $N = 100$ war die Überlappung zwischen "Schädigung" und keiner "Schädigung" zu gering, so dass keine Konfidenzbereiche definiert werden konnten (vgl. Abb. 6.4), vor allem da die Anzahl der nutzbaren Expositionen für diese Pulsfolgen insgesamt gering war, weil die Lebensdauer der Explants aufgrund physiologischer und metabolischer Prozesse begrenzt war. Zusätzlich wurden die berechneten Expositionen aus Tab. 6.2 mit dem IMF korrigiert, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Spitzen in diesem Profil Schäden an der Probe verursachten. Wie aus früheren Forschungsarbeiten berichtet (siehe Abb. 1.5), nimmt die Schädigungsschwelle der Pulsfolgen für den einzelnen Puls ab, was auf eine Sensibilisierung im Gewebe hindeutet. Es ist hervorzuheben, dass die notwendige Einzelpulsenergie der Pulsfolge für hohe Pulsanzahlen nahezu halbiert wird.

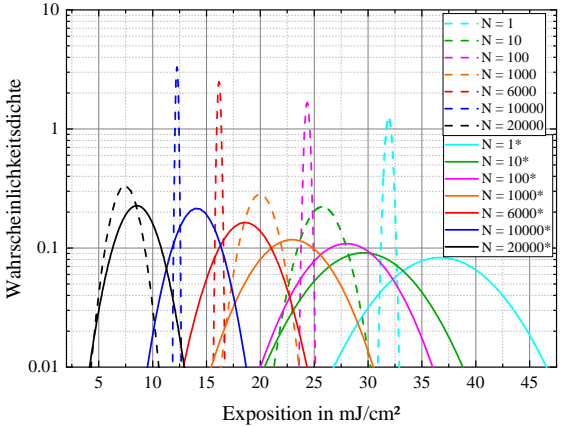
Vollständig getauchte Proben Die Ergebnisse aus Abb. 6.4 zeigen, dass die schädigungsauslösende Energie eines einzelnen Pulses einer Pulsfolge mit zunehmender Anzahl von Pulsen abnimmt. Die Slope b war in dieser Studie nie höher als 1,14, was auf einen deutlichen Übergang für die Schädigungsdefinition hinweist. Es ist außerdem hervorzuheben, dass trotz hoher Anzahl an Individuen und verwendeten Proben, die bestimmte Slope sehr gering ist. Das bedeutet, dass die biologische interindividuelle Variabilität in dieser Studie nicht maßgeblich für die Berechnung der Unsicherheit ist. Bei Pulsfolgen zwischen $N = 10$, $N = 100$ und $N = 20\,000$ war die Überlappung zwischen "Schädigung" und "keiner Schädigung" zu gering, so dass keine Konfidenzbereiche definiert werden konnten.

In Abb. 6.5 sind zudem die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der Ergebnisse für die befeuchteten Proben (siehe Abb. 6.5a) und für die für die getauchten Proben (siehe Abb. 6.5b) ohne IMF-Korrektur (gestrichelt) und mit IMF-Korrektur (durchgezogene) dargestellt. Die Dichtefunktionen waren dabei immer breiter bei der Berücksichtigung des IMF, da dieser ebenfalls mit einer Messunsicherheit von 0,2 (vgl. Abb. 5.7) behaftet war. Da der IMF eine Erhöhung der Exposition verursacht, wurde die totale Exposition nach Korrektur erhöht bzw. im Schaubild nach rechts verschoben.

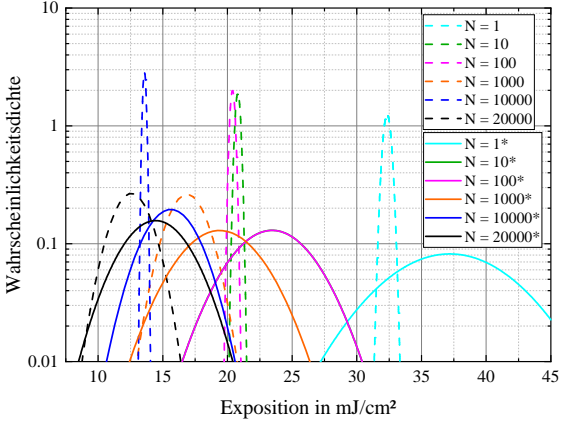
6.2.2 MESSUNG BEI KÖRPERTEMPERATUR

Da eine erhöhte Umgebungstemperatur die Bedingungen für thermo-kinetische Prozesse (vgl. Kap. 2.1.5) begünstigt, wurde die Versuchsreihe um Experimente bei 38 °C im HBSS-Bad erweitert. Die Ergebnisse sollen einerseits ein besseres Verständnis über die Initialbedingungen für Mikrobblasenbildung (vgl. Kap. 3.2) verschaffen und andererseits eine Veränderung der metabolischen Aktivitäten hervorheben. Ein erhöhter Stoffwechsel könnte ein Indiz auf photo-chemische Wirkweisen sein.

Die Experimente haben gezeigt, dass sich ein Nährmedium nicht für die Versuchsreihen mit vollständiger Befeuchtung eignet, da bei den Temperaturexperimenten die Ausbildung von Bakterien nicht ohne Antibiotika zu verhindern war. Die Nicht-Behandlung der entwickelten Bakterien erzeugte eine Trübung des Mediums was wiederum zur starken Streuung des Laserstrahls im Medium und auf der Probe führte. Weiterhin ist unklar, ob das Auftreten von Bakterien



(a)



(b)

Abbildung 6.5: Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für die untersuchten Pulsfolgen. Durchgezogene Linien entsprechen der IMF-korrigierten Exposition und sind in der Legende mit * gekennzeichnet. Gestrichelte Dichtefunktionen wurden nicht adaptiert. (a) Befeuchtet. (b) Vollständig getaucht.

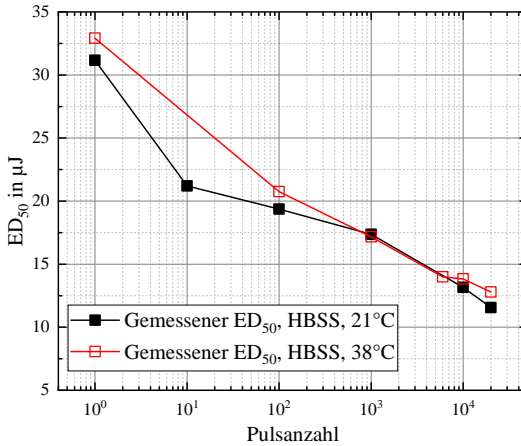
in den Medien die Schädigungsschwelle beeinflusst, weshalb keine weiteren Experimente mit Nährböden durchgeführt wurden.

Die Schädigungsschwellen aus der vorgestellten Versuchsreihe sind in Tab. 6.3 aufgelistet. Da der Schwerpunkt auf Mehrfachpulsung lag, wurde auf die Versuchsreihe von $N = 10$ verzichtet und stattdessen Messungen für $N = 6\,000$ durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in diesem Fall, die Schädigungsschwellen mit zunehmender Pulsfolge gesunken sind. Die ED_{50} -Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen zur Untersuchung im $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Becken. In diesem Experiment war die zu ermittelnde Slope bis auf die Untersuchung von $N = 1\,000$ und $N = 20\,000$ sehr niedrig. Da in diesen beiden Versuchsreihen nur jeweils drei Augen dreier Individuen untersucht wurden, jedoch die Probenanzahl sehr hoch war, ist das ein Hinweis auf eine hohe biologisch bedingte interindividuelle Variabilität.

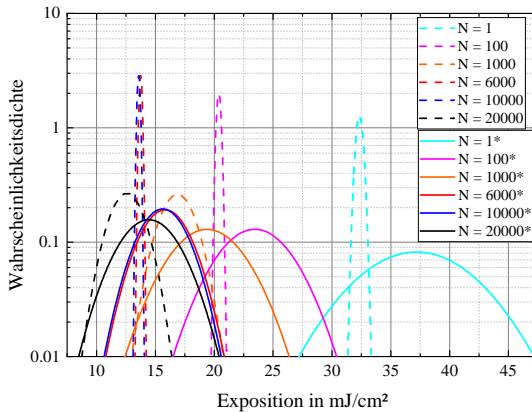
In Abb. 6.6 ist die Auswertung der Ergebnisse aus Tab. 6.3 dargestellt. Dabei ist die Abnahme der Einzelpulsenergie in Abb. 6.6a mit zunehmender Pulsanzahl angegeben. In dieser Messung war die Überschneidung zwischen "keiner Schädigung" zur "Schädigung" zu gering, weshalb keine Konfidenzbereiche für den ED_{50} -Bereich bestimmt werden konnten. In Abb. 6.6b sind die Dichtefunktionen erneut aufgetragen. Aus dieser Auswertung geht hervor, dass die Messunsicherheiten in dieser Versuchsreihe besonders gering waren im Vergleich zu den $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Messungen.

Tabelle 6.3: ED_{50} gemessen für die Exposition bei einer $319\text{ }\mu\text{m}$ quadratischen Top Hat mit 1,8-ns-dauernden Pulsen bei $\lambda = 532\text{ nm}$ im $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ -HBSS-Bad. 95% Konfidenzintervalle auf dem ED_{50} sind in Klammern angegeben. Ein '-' zeigt an, dass die Daten nicht ausreichen, um Konfidenzintervalle zu erhalten. Die Slope wird durch das Verhältnis von ED_{84} zu ED_{50} definiert. Der IMF betrug $1,15 \pm 0,2$.

Pulsfolge	ED_{50}	Slope	#Augen/Proben/Expositionen	Exposition H	IMF-korrigierte H
-	μJ	-	-	mJ/cm^2	mJ/cm^2
1	32,91 (-)	1,01	5/10/132	$32,34 \pm 0,32$	$37,19 \pm 4,87$
100	20,75 (-)	1,01	2/7/155	$20,39 \pm 0,20$	$23,45 \pm 3,07$
1 000	17,17 (-)	1,09	3/5/132	$16,87 \pm 1,52$	$19,40 \pm 3,08$
6 000	14 (-)	1,01	8/15/68	$13,75 \pm 0,14$	$15,82 \pm 2,07$
10 000	13,82 (-)	1,01	4/8/20	$13,58 \pm 0,14$	$15,62 \pm 2,04$
20 000	12,79 (-)	1,09	3/9/18	$12,57 \pm 1,49$	$14,45 \pm 2,54$



(a)



(b)

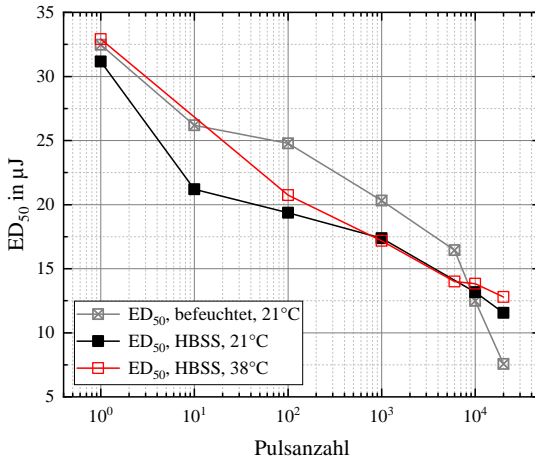
Abbildung 6.6: Untersuchung der experimentell bestimmten ED₅₀-Werte im 38°C-HBSS-Bad. (a) Schädigungsschwellen der Mehrfachpulsbestrahlung mit Spotkantenlänge $d=319\mu\text{m}$ und Pulsdauer von $\tau=1.8\text{ns}$ mit $\text{PRF}=25\text{Hz}$. Eine Abnahme der individuellen Pulsenergie einer Pulsfolge kann mit zunehmender Anzahl der Pulse beobachtet werden. (b) Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für die untersuchten Pulsfolgen. Durchgezogene Linien entsprechen der IMF-korrigierten Exposition und sind in der Legende mit * gekennzeichnet. Gestrichelte Dichtefunktionen wurden nicht adaptiert.

6.2.3 ERZEUGTE DATENBASIS

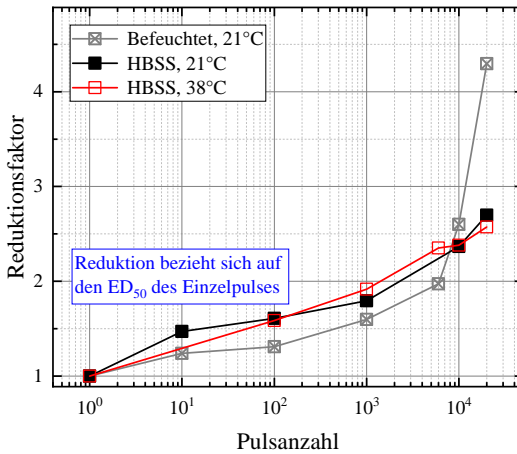
In Abb. 6.7 sind alle Schädigungsschwellen für die unterschiedlichen Befeuchtungsgrade bzw. Temperaturen dargestellt. Aus Abb. 6.7a ist zu entnehmen, dass die Einzelpulsenergie einer Pulsfolge mit der Pulsanzahl abnimmt. In der Untersuchung mit den befeuchteten Proben, war die Absenkung für die kürzeren Pulsfolgen ($N = 10, 100, 1000$) geringer als bei den Proben, die in HBSS völlig getaucht waren. Sofern thermische oder thermo-kinetische Prozesse involviert waren, könnte eine Begründung in der fehlenden Abkühlung durch HBSS liegen. Bei den hohen Pulsanzahlen hat möglicherweise das HBSS für lange Emissionsdauern kühlend auf die Halterung und Probe gewirkt. Die Schädigungsschwellenwerte bei der Körpertemperaturmessung, sind mit geringem Offset den Werten der $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Messung sehr ähnlich. Für $N < 100$ liegen die Werte max. 8% höher.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Mikrobblasenbildungsbedingungen nicht durch die Körpertemperatur vereinfacht wurden, sondern wahrscheinlich Reparaturmechanismen verstärkt ausgelöst worden. Dieser Offset ist ebenfalls bei den höheren Pulsfolgen erkennbar, wobei hier die Abweichung von 10% erneut auf Reparaturmechanismen [31, 153] zurückzuführen ist. Die Absenkung bei den befeuchteten Proben ist vermutlich auf oxidativen Stress zurückzuführen. Dieses Phänomen ist bereits aus weiteren Studien [154] für andere Zellen bekannt und daher nicht ungewöhnlich. Außerdem wurde beschlossen, die IMF-Korrektur nicht für die Bewertung mittels des Lasersicherheitsstands anzuwenden, da dieses Vorgehen nicht erläutert bzw. verlangt wird. Da andere Studien den IMF teilweise nachträglich mit dem ED_{50} verrechneten, wird zur besseren Vergleichbarkeit diese angepasste Exposition zusätzlich bei den Ergebnissen mit aufgeführt.

Die Reduktionen sind auf den ED_{50} des Einzelpulses bezogen und werden in Abb. 6.7b dargestellt. Die Reduktion ist für $N = 20000$ und Proben, die lediglich mit HBSS benetzt waren, besonders groß. Die Reduktion nimmt dabei einen Wert von ca. 4,3 an, während in den anderen beiden Versuchsreihen mit vollständigem Eintauchen die maximale Reduktion ca. 2,6 beträgt. Aus Abb. 6.7b wird ersichtlich, dass der absolute Reduktionstrend in allen drei Studien unterschiedlich, jedoch der relative Verlauf sehr ähnlich ist. Das wurde bei allen Pulsfolgen für $N \leq 6000$ beobachtet.



(a)



(b)

Abbildung 6.7: Untersuchung der experimentell bestimmten ED₅₀-Werte für alle Versuchsreihen. (a) Schädigungsschwellen der Mehrfachpulsbestrahlung mit Spotkantenlänge $d = 319 \mu\text{m}$ und Pulsdauer von $\tau = 1.8 \text{ ns}$ mit PRF = 25 Hz. Eine Abnahme der individuellen Pulsenergie einer Pulsfolge kann mit zunehmender Anzahl der Pulse beobachtet werden. (b) Reduktionsfaktor bezogen auf den Einzelpulsschädigungsschwellwert.

In Abb. 6.8 sind die Expositionen aus Tab. 6.1 – Tab. 6.3 über die applizierte Pulsanzahl dargestellt. Diese Veranschaulichung zeigt die Spannweite der Ergebnisse (siehe Tab. 6.4) auf und wird in Kap. 7 diskutiert. In Abb. 6.8 sind die Expositionen (Stern und Kreise) bei Befeuchtung mit 21 °C-Umgebungstemperatur dargestellt. Die ausgefüllten Symbole stellen dabei die Expositionen ohne IMF-Korrektur dar. Die offenen Symbole repräsentieren die Expositionen, die nachträglich um den IMF = 1,15 korrigiert wurden.

Das Ergebnis der Untersuchung der hohen (IMF = 1,78) Stahlprofilmodulationen (Stern) mit nachträglicher Korrektur (Stern*) betrug 75,5 mJ/cm² (vgl. Tab. 6.1), wodurch die Veranschaulichung der anderen Ergebnisse nicht linear aufgetragen werden konnte. Die schädigende Exposition in der Versuchsreihe zur leichten Befeuchtung sind ohne IMF-Korrektur (rote Kreise) und mit Korrektur (gelbe Kreise) dargestellt. Da der IMF einen Wert > 1 annimmt, werden die Expositionen mit Korrektur einen erhöhten Wert darstellen. Die Rauten aus Abb. 6.8 stellen die Ergebnisse zur Untersuchung bei Körpertemperatur dar (mit Korrektur in cyan, ohne in pink). Die Quadrate dagegen repräsentieren die Ergebnisse bei Raumtemperatur (mit Korrektur in schwarz, ohne in grün).

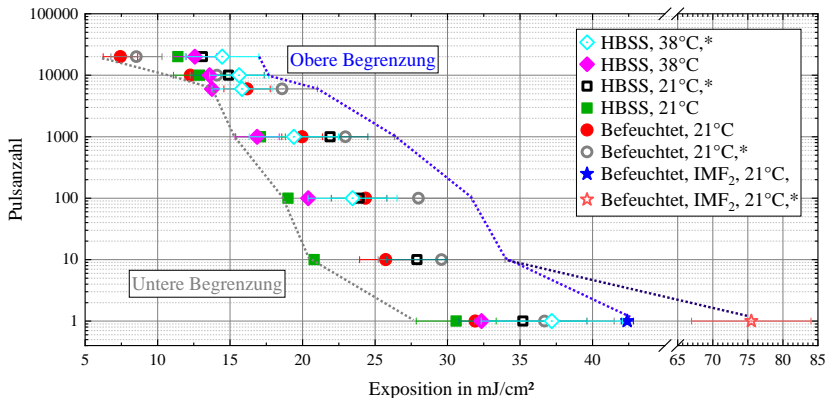


Abbildung 6.8: Veranschaulichung der ermittelten schädigenden Expositionen für die jeweiligen Pulsanzahlen. Ein * weist auf die nachträgliche IMF-Korrektur hin. Die aus allen Versuchsreihen niedrigste schädigende Exposition (grau gepunktet) und der höchste Wert (blau gepunktet) stellen die Begrenzungen der Spannweite dar.

Tabelle 6.4: Spannweite der Messergebnisse mit Minimal- und Maximalwerten für die Schädigungsexposition der Versuchsreihen für unterschiedliche Temperatur- und Befeuchtungsbedingungen. Ein * weist daraufhin, dass die Exposition um den IMF = 1,15 korrigiert wurden.

Pulsfolge	Spannweite	Unterer Begrenzung	Obere Begrenzung
1	2,7	HBSS, 21 °C	Befeuchtet, 21 °C, IMF hoch, *
10	1,6	HBSS, 21 °C	Befeuchtet, 21 °C, *
100	1,7	HBSS, 21 °C	Befeuchtet, 21 °C, *
1 000	1,7	HBSS, 38 °C	Befeuchtet, 21 °C, *
6 000	1,5	HBSS, 38 °C	Befeuchtet, 21 °C, *
10 000	1,6	HBSS, 21 °C	HBSS, 38 °C, *
20 000	2,8	Befeuchtet, 21 °C	HBSS, 38 °C, *

Aus Abb. 6.8 geht hervor, dass die Exposition zur Erzeugung einer Schädigung in HBSS für $N < 6\,000$ am niedrigsten ist. Die befeuchteten Proben benötigen den niedrigsten Energieeintrag zur Erzeugung einer Schädigung erst bei längeren Expositionszeiten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der oxidative Stress erst nach langen Expositionszeiten (ca. 600 s) dominiert, da die untere Begrenzung (vgl. Tab.6.4) durch diese Ergebnisse der befeuchteten Proben festgelegt wird. Eine mögliche Erklärung für die nicht im gleichen Maß gesenkten Ergebnisse der erwärmten Proben (vgl. Kap. 6.2.2), liegt in der möglichen Aktivierung von Reparaturmechanismen innerhalb der RPE-Zellen.

Die Messbreite ist in Tab. 6.4 zusammengefasst. Bei der Bestimmung wurden zusätzlich die Maxima bzw. Minima durch die Messunsicherheit in Form der Standardabweichung verwendet. Für die Berechnung der Messunsicherheit aus den Tab. 6.1 – Tab. 6.3 wurde die Messunsicherheit des IMF ($1,15 \pm 0,2$) für die Fehlerfortpflanzung berücksichtigt, weswegen dieser korrigierte Expositionswert immer die höher schädigende Exposition mit höherer Unsicherheit darstellt.

Für die Interpretation der Schädigungsschwellen gegenüber möglicher Interaktionen und dem Vergleich zu den MZB des Lasersicherheitsstandards, werden die Ergebnisse des nicht IMF-korrigierten 21 °C-HBSS-Bads verwendet, aufgrund folgender Begründungen:

1. Die Wärmekapazität der HBSS-Lösung ähnelt der des Glaskörpers [155]. Die Wärmetransportmechanismen sind durch die Verwendung der eingetauchten Proben vergleichbar mit den *in vivo* Umgebungsbedingungen.

2. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind restriktiver gegenüber den Resultaten mit gewärmten Proben. Die Schädigungsschwellen sind hierbei niedriger und die Statistik bzw. die Anzahl der untersuchten Individuen ist in dieser Messreihe höher gewesen, wodurch die Messunsicherheit geringer ist und Abweichungen auf die tatsächliche biologische Variabilität zurückzuführen ist.
3. Die Nicht-Korrektur des IMF führt zu restriktiveren Ergebnissen und die Schädigung basiert auf einem Strahlprofil mit konstanter Energiedichte. Intensitätsmodulationen werden bislang im Lasersicherheitsstandard nicht berücksichtigt. Aus der Untersuchung dieser Arbeit geht jedoch hervor, dass die schädigende Exposition bei Nicht-Berücksichtigung für die im Rahmen dieser Arbeit beispielhaften IMF (1,15 und 1,78) eine Abweichung von ca. 2,4 (vgl. Kap. 6.1.1) resultiert. Da der Umgang mit dem IMF fragwürdig ist und die Nach-Korrektur zu inkongruenten Ergebnissen geführt hat, wird der niedrigere IMF für die Auswertung aufgrund der gleichförmigen Energiedichte auf den Proben, verwendet.

Durch die erzeugte Datenbasis werden zum einen die wenig verfügbaren Daten um bislang unerforschte Pulsfolgen erweitert. In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem zum ersten Mal Untersuchungen zum Temperatureinfluss, dem Befeuchtungsgrad, den Auswirkungen der Intensitätsmodulationen und der methodischen Herangehensweise durch Explants durchgeführt. Darüber hinaus können die gewonnenen Daten hinsichtlich des dominanten Schädigungsmechanismus interpretiert werden. Dieses Verständnis kann für die Evaluierung der Pulsinteraktionsmodelle (vgl. Kap. 3.3) zur Analyse der Pulsadditivität genutzt werden. Die wesentlichen Kernaussagen der Versuchsreihen lauten im Folgenden:

- Für eine bessere Vergleichbarkeit und eine akkuratere Bestimmung der schädigenden Exposition, sollten die durch den Einsatz von fasern-induzierten Intensitätsmodulationen, einen Faktor von ca. 1,2 nicht übersteigen, da das Verständnis von induzierten Hotspots im Profil bislang nicht vollständig verstanden ist.
- Die Schädigungsschwellen in Form von ED_{50} -Werten sind in jedem Experiment zu Pulsfolgen gesunken. Eine mögliche Interaktion zwischen den Pulsen ist nicht auszuschließen.

- Nicht vollständiges Eintauchen der Proben führt zur Halbierung der notwendigen Dosis zur Erzeugung von Läsionen bei der Applikation hoher Pulsanzahlen.
- Die Untersuchung von Temperaturbedingungen erzeugte keine nennenswerte Änderung der Schädigungsschwellen. Die ED₅₀-Werte waren bei Körpertemperaturmessungen etwas höher, was aber auf aktivierte Reparaturmechanismen in der Zelle zurückzuführen ist.
- Die Proben sollten horizontal ausgerichtet sein, um Schliereffekte durch die Gewichtskraft zu vermeiden. Im *in vivo* Auge ist die Netzhaut auch vertikal gekrümmt ausgerichtet, allerdings werden durch den Glaskörper und dem Augeninnendruck die Schliereffekte unwirksam.

6.2.4 MIKROBLASENMESSUNG

Zur Detektion von Mikrokavitation in den RPE-Zellen wurden akustische und optische Messmethoden unabhängig voneinander eingesetzt. Die Ergebnisse der jeweiligen Anwendung werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

HYDROPHON

Diese Methode funktionierte bei vertikaler Ausrichtung der Proben, um den Hydrophonmesskopf an der Probe ausrichten zu können. Allerdings führte diese Ausrichtung wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben, aufgrund der Schlieren zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Bei einer horizontalen Bestrahlung hingegen, war das Hydrophon durch das optische Fenster nur in einem sehr hohen Winkel (ca. 60°) zum bestrahlten Areal ausrichtbar. Da die Sensitivität des Hydrophons stark winkelabhängig war, führte das zu ungenauen Messergebnissen mit niedriger Reproduzierbarkeit.

Es wurde beobachtet, dass sich bei der Bestrahlung von ns-Pulsen, die sogenannte thermo-elastische Transiente ausbildet, die ebenfalls ein Drucksignal bildet (vgl. Abb. 6.9). Das bedeutet, dass sich das Gewebe kurzzeitig schlagartig ausdehnt, dabei aber komplett in den Ausgangszustand einkehrt. Diese Bewegung jedoch löste am Hydrophon ein charakteristisches bipolares Signal aus, welches eine deutlich größere Amplitude aufwies, als die Druckwellen, die

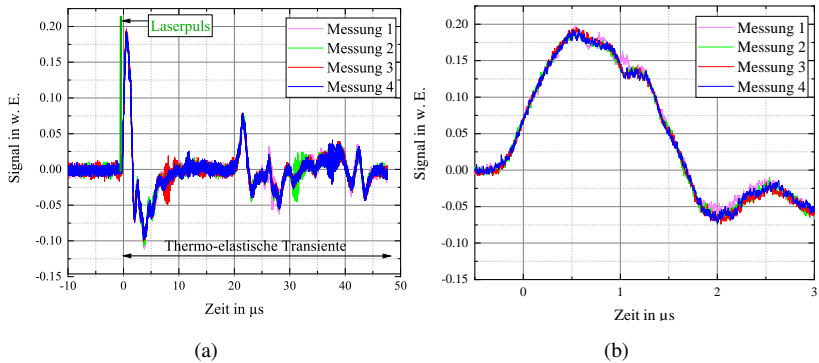


Abbildung 6.9: Thermo-elastische Transienten bei der Bestrahlung des RPE. (a) Signal am Hydrophon für vier aufeinanderfolgende identische Einzelpulse am gleichen bestrahlten Areal. Signal durch thermo-elastische Transiente induziert. (b) Vergrößerung der Amplitude durch die thermo-elastische Transiente. Messsignalstärke und -verlauf ist in allen vier Messungen nahezu identisch.

durch Mikroblasen induziert werden. Für jedes bestrahlte Areal ergab sich eine neue charakteristische Kurve. Dieses Signal war reproduzierbar bei gleichbleibender einwirkender Energiedosis. Bei höherer Energiedosis blieb der Verlauf der biphasischen Kurve ähnlich, lediglich die Signalstärke der Amplitude wurde größer. In den Arbeiten von Schüle [32, 55] ergaben sich ebenfalls diese Effekte, jedoch bei Pulslängen bis in den Sub- μs -Bereich, wodurch die Trennung der Druckwelle einer Mikroblase eindeutig zu unterscheiden war von der thermo-elastischen Transiente des Gewebes.

Um zu erkennen, ob im Messsignal des Hydrophons, Druckwellensignale von Mikroblasen enthalten sind, musste für jede applizierte Energiedosis die Signalstärke der thermo-elastischen Transiente berechnet werden, um diese vom detektierten Messsignal zu subtrahieren (vgl. Abb. 6.10). Hierfür wurden für mehrere Energiedosen das Messsignal erfasst und überprüft, ob der Anstieg der Amplitude linear war. Jede positive Abweichung dieser Modellierung, wurde dann als Mikroblasenerscheinung gewertet.

Da die Bestimmung der Signalstärke der thermo-elastischen Transiente notwendig war, mussten die Proben vorab mehrfach bei mehreren Dosen bestrahlt werden, wodurch ein metabolischer Stress auf die Zellen ausgelöst wurde. Da

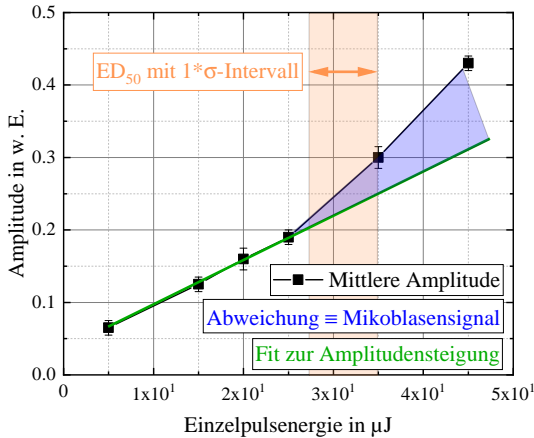


Abbildung 6.10: Gemessene Amplitude pro applizierte Einzelpulsenergie auf gleichbleibendem bestrahlten Areal. Die ersten vier Messpunkte weisen eine Linearität der thermo-elastischen Transiente mit der Energie auf. Interpolation dieser Linearität ist in grün eingezeichnet und beweist die Abweichung der applizierten Energie als Hinweis auf Mikrobblasenbildung. Eine Veränderung der thermo-elastischen Transiente und Amplitude ist nach Erreichen der Schädigungsschwelle jedoch nicht auszuschließen.

unklar ist, in welchem Maß sich dieser metabolische Einfluss auf die Schwelle auswirkt und thermische Prozesse begünstigt für die Schädigungsmechanismen, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

REFLEXBASIERTER NACHWEIS

Die Implementierung des Probenpfads über das Y-Bundle führte dazu, dass ein minimaler Spot (ca. $50 \mu\text{m}$) mit 635 nm im Abbildungsspot des Schädigungspfads positioniert war. Aus Berichten von Lee et al. [35] geht hervor, dass dieser Spot so klein wie möglich gehalten werden muss, um ein möglichst hohes SNR zu erhalten. Durch die Wieder-Einkopplung in das Y-Bundle des zurückgestreuten Lichts und der Verwendung von 1-Zoll-Komponenten, war die minimale Abbildungsgröße ca. $50 \mu\text{m}$. Das abzubildende Profil war durch das Y-Bundle ebenfalls ein Top Hat, jedoch mit starken Intensitätsmodulationen (IMF ca. 4).

Die Justage erfolgte zunächst mit einem BeamViewer an der Probenposition. Da die Proben jedoch in HBSS liegen, wurde über die Kamera, die kollinear zu beiden Pfaden ausgerichtet war, die Abbildung des Y-Bundle auf die quadratische Form ausgerichtet. Durch diese Anordnung war die Abbildung des Schädigungspfads und des Faserendes des Y-Bundle (Probenpfad) im Fokus abgebildet.

Durch den Einsatz des spektralen Filters wurden nur Änderungen des zurückgestreuten 635 nm-Lichts erfasst, während das Licht des Schädigungslasers geblockt wurde. Das Messsignal war bei Applikationen unterhalb des ED₅₀ nicht ausreichend gut zu erkennen. Das Ziel der Untersuchung war allerdings, unterschwellige Pulsenergien zu verwenden, sodass nur durch die Hintereinanderreihung von Einzelpulsen eine Schädigung entsteht. Somit war dieser Ansatz nicht zielführend. Auch die konstante Bestrahlung mit 635 nm hat möglicherweise das Gewebe stimuliert, was nicht auszuschließen war.

Es war auffällig, dass das APD-Signal weder reproduzierbar noch ausreichend sensitiv war. Das Signal wurde lediglich bei überschwelliger Bestrahlung ausgelöst, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wird. Eine Aufarbeitung der wesentlichen Fehlerquellen bzw. Problemstellungen ist der folgenden Auflistung zu entnehmen:

1. SNR zu niedrig. *Das Reflexionssignal der Mikroblasen war im Vergleich zum absoluten zurückgestreuten Licht zu gering.*

Diese Annahme scheint ein fundamentaler Grund gewesen zu sein. Aus den Arbeiten von Lee et al. [35] und Schüle [55] geht hervor, dass diese Methodik wenig sensitiv erscheint. Die Signalstärke ist vor allem im Schädigungsschwellwertbereich kaum auseinander zu halten gewesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass bei stark überschwelliger Bestrahlung das gesamte zurückgestreute Signal geringer wurde. Eine mögliche Begründung liegt in einer schädigenden Oberflächenstrukturänderung.

Maßnahme: Der Bestrahlungsspot wurde verkleinert, was im Rahmen dieser Arbeit bis zu den system-technischen mechanischen Grenzen verwirklicht wurde.

2. *Die faser-induzierten Fluktuationen im Abbildungsspot des Abtastlasers waren nicht auf der Melanosomoberfläche abgebildet. Das bedeutet,*

dass sich zwar möglicherweise Mikroblasen gebildet haben, jedoch kein Reflexionssignal ausgelöst wurde, weil diese benachbart zu den Peaks lagen und ein zu geringes Signal induziert haben.

Bezüglich der Vermeidung der IMF im Bestrahlungsspot gab es lediglich die Möglichkeit durch ideale Fokussierung in die Faser mittels hoher NA (Maximale NA betrug 0,22) eine hohe Modendurchmischung zu generieren. Da das Y-Bundle eine Länge von zwei Meter aufwies, war auch der minimale Krümmungsradius (19 mm) der Faser beschränkt. Die kommerzielle Verfügbarkeit vergleichbarer Fasern war nicht gegeben.

Maßnahme: Durch Drehen der Faser wurden die nahezu reproduzierbaren Hotspots zwar im Profil gedreht, jedoch war diese Drehung nicht reproduzierbar. Auch diese Maßnahme war nicht zuverlässig, da die Faser an jeder Probenposition vorab hätte gedreht werden müssen, um "Probeschüsse" zu applizieren. Solange kein Signal erfasst worden wäre, hätte die Faser jedes Mal gedreht werden müssen, bis bei einem der Probeschüsse ein Signal ausgelöst worden wäre. Dieser Test hätte jedoch das Gewebe zu sehr sensibilisiert.

3. *Optische Verluste bei der Rückkopplung in das Y-Bundle.*

Das Signal wird einerseits durch das Objektiv und Linse beschnitten und andererseits ergibt sich eine bei jedem Durchgang ein Verlust von ca 1 % durch den dichroitischen Spiegel. Die Einkopplung in den benachbarten Kanal des Y-Bundle verursacht Verluste, da dieser Kern einen Durchmesser von 50 µm hat. Die niedrige Einkoppel-NA von 0,22 beschränkt zudem höhere Einkoppelwinkel.

Maßnahme: Die optischen Verluste wurden durch Erweiterung des Setups um 1-Zoll-Komponenten (vorher 1/2-Zoll) erweitert. Da das Setup, jedoch für 532 nm ausgelegt (mit hoher Schädigungsgrenze) ist, konnte beispielsweise das Objektiv nicht ausgetauscht werden. Die Verfügbarkeit weiterer Y-Bundle war zudem beschränkt. Es wurden die Kombinationen aus kleineren Kerndurchmessern mit 80 µm Abstand und größeren Kerndurchmessern mit geringerem Abstand ausgetestet. Prinzipiell konnte mit Zweiterem ein höheres Signal detektiert werden, dafür jedoch nur ein größerer Spot auf die Probe abgebildet werden, was das SNR wiederum maßgeblich verringert hat.

4. *Der Bestrahlungslaser hatte eine zu geringe Ausgangsleistung.*

Durch einen leistungsstärkeren Laser wäre ein ausgeprägteres Ausgangssignal detektiert worden, jedoch war dieser einerseits für die Anforderungen dieser Arbeit (Strahldurchmesser $< 500 \mu\text{m}$, 635 nm, CW, geringe Divergenz) kommerziell nicht verfügbar und andererseits sollte die Probe nur minimal beleuchtet werden, um keine Erwärmung der Probe zu verursachen, die evtl. thermische Prozesse begünstigt.

Maßnahme: Nicht möglich, da sonst thermische Schädigungen nicht auszuschließen sind.

5. *Der Abtastlaser war im Schädigungsspot auf eine Position fokussiert an dem kein Melanosom eine Mikroblase ausbildete.*

Da die Hintergründe zur thermo-mechanischen Schädigung bislang unvollständig verstanden sind, ist unklar, wie viele Mikroblasen notwendig sind, um die Zelle letztlich zu schädigen. Es ist nicht auszuschließen, dass benachbarte Zellen, die durch Mikro kavitation geschädigt wurden, an benachbarte Zellen Botenstoffe aussenden. Daher ist es möglich, dass im bestrahlten Areal entweder Mikroblasen nicht verantwortlich für die Zellschädigung waren, sondern Botenstoffe oder photo-chemische Prozesse die Apoptose eingeleitet haben.

Maßnahme: Durch die Bestrahlung vieler Proben, ist dieser Punkt vermutlich auszuschließen, da die Statistik diesen Fall berücksichtigt haben sollte.

Aus diesen Gründen, scheint auch dieser Ansatz aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit und zu geringer Sensitivität für den Anwendungsparametersatz der vorliegenden Arbeit nicht geeignet zu sein.

6.3 SIMULATIONSERGEBNISSE DER HINTERGRUNDERWÄRMUNG

Nachdem im vorigen Abschnitt die laser-induzierten Schädigungsschwellen für Pulsfolgen vorgestellt wurden, wird das Ergebnis zur Simulation der Erwärmung durch die Multipulse bewertet. Da das eingestrahlte Licht hauptsächlich vom RPE absorbiert wird, wird dieses direkt erhitzt. Nach wenigen ms, kann sich jedoch eine Wärmeleitung einstellen, die wiederum indirekt zu

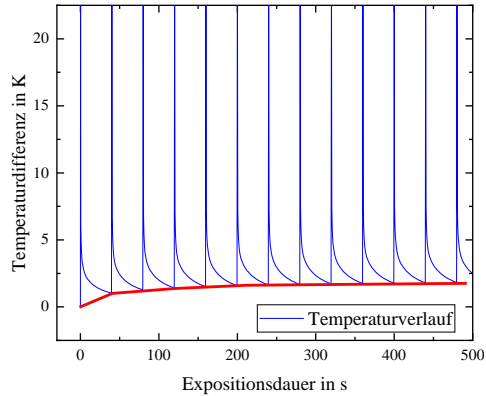
Schädigung weiterer retinalen Strukturen führen kann. Unter der Annahme, dass durch die Mehrfachbestrahlung eine Hintergrunderwärmung ausgelöst wird, müssen somit Temperaturerhöhungen und thermische Denaturierungsprozesse durch das SLM betrachtet werden.

Ein dreidimensionales Computermodell (vgl. Modellierungsansatz in Kap. 4.2) wird verwendet, um die Möglichkeit einer thermischen Schädigung der Netzhaut bei den Messungen dieser Studie für Pulsanzahlen größer oder gleich 1 000 abzuschätzen (siehe Abb. 6.11).

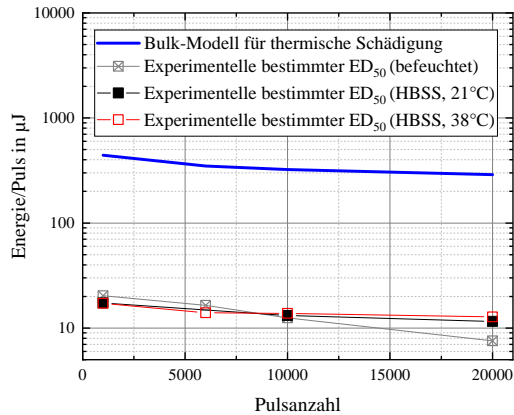
Das verwendete Computermodell von Seibersdorf SLM [136, 137] wurde gegen die experimentell ermittelten Schwellenwerte für NHPs validiert. Das Modell besteht aus drei Hauptkomponenten: In der ersten Komponente wird ein Augenmodell zur Bestimmung des Netzhautbildes verwendet. Dann wird aus dem Netzhautbild eine Wärmequelle in den Gewebeschichten definiert und mit Hilfe der Wärmeübertragungsgleichung der Temperaturverlauf in der RPE-Schicht mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode numerisch berechnet. Die Temperaturkurve wird in die Arrhenius-Gleichung (vgl. Kap. 2.1.5) eingesetzt, die zur Beschreibung von Denaturierungsprozessen in der Netzhaut verwendet wird [107, 108]. Eine detailliertere Beschreibung des Computermodells ist in Ref. [156] zu finden.

Da Explant-Messungen mit Pulslängen im ns-Regime durchgeführt worden sind, wurden einige Anpassungen des Modells vorgenommen: Es wird kein Augenmodell verwendet und das Netzhautbild wird anstelle einer runden Form, durch ein quadratisches Top Hat Bestrahlungsprofil mit einer Kantenlänge von $319\ \mu\text{m}$ definiert. Darüber hinaus wird das Temperaturprofil der Pulssequenz aus Abb. 6.11a berechnet. Dazu wird die Dirac-Deltafunktion zur Beschreibung eines einzelnen Pulses in der Wärmeübertragungsgleichung verwendet. Die Schwellenwerte für die thermische Schädigung werden unter der Annahme einer CW-Strahlung simuliert, da die Hintergrund-Erwärmung des Gewebes erforderlich ist. Die simulierten Schwellenwerte werden durch die Anzahl der Pulse geteilt, um den entsprechenden Schwellenwert für einen einzelnen Puls zu erhalten, siehe Abb. 6.11b.

Die Simulationen zeigen, dass die zur Induktion einer thermischen Schädigung erforderliche Energie immer noch höher (minimaler Faktor ca. 15) ist als die experimentell gemessenen Werte. Der Abgleich mit thermischer Schädigung zeigt zudem, dass diese Art der Schädigung auszuschließen ist



(a)



(b)

Abbildung 6.11: Vergleich der experimentellen Daten mit Bulk-Modell. (a) Temperaturprofil während der Bestrahlung von Netzhautgewebe für 1000 Pulse. Die Pulse führen zu einem kumulativen Temperaturanstieg (blau), aber nach kurzer Zeit geht die Temperatur in die Sättigung (rot) über. Dieses Verhalten wird auch bei längeren Pulsfolgen beobachtet. Die Ausgangstemperatur ist die Körpertemperatur von 310,5 K. Die Temperaturanstiege sind nur relativ zu betrachten. (b) Anwendung des Computermodells zur Vorhersage der retinalen thermischen Schädigung (blau). Die experimentellen Daten aus dieser Studie (schwarz) haben niedrigere Schädigungsschwellen, was darauf hinweist, dass keine thermische Schädigung erzeugt wurde.

(vgl. Abb. 6.11b). Die Simulation des Temperaturanstiegs im RPE-Gewebe weist eine insignifikante Temperaturerhöhung weniger Kelvin auf und deckt sich mit den Untersuchung von Mainster et al. [40]. Mainster et al. [40] definierten, dass additive Effekte erst ab PRF von wenigen kHz auftreten.

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Es wurden Schädigungsschwellen durch Angabe der ED₅₀ und Slope für Einzelpuls- und Multipulsmessungen bestimmt. Es wurde eine hohe Qualität der Messungen durch eine max. Slope von 1,2 erreicht.
- Der Einfluss von unerwünschten räumlichen Intensitätsmodulationen im Strahlprofil, oxidativem Stress, der Temperatur und der Ausrichtungsebene der Proben wurde untersucht. Es wurde dadurch eine Spannweite von 2,8 für die schädigende Exposition bestimmt.
- Das Fluoreszenzmittel Calcein-AM zeigte gegenüber PI eine höhere Wirksamkeit.
- In allen Versuchsreihen zu Befeuchtungsgraden und Temperatureinflüssen wurde eine Reduktion der Einzelpulsenergie gemessen. Die Versuchsreihe im 21 °C-HBSS-Bad wird für weitere Ausarbeitungen dieser Arbeit verwendet.
- Die Mikroblasendetektionsmethoden wurden evaluiert: Weder die akustische, noch die reflexbasierte Mikroblasendetektion ergeben reproduzierbare Ergebnisse aufgrund mangelnder Sensitivität bei unterschwelliger Bestrahlung und möglicher Beeinflussung des Gewebes durch den zusätzlichen Energieeintrag bei Multipulsuntersuchungen.
- Die Simulation des Temperaturanstiegs im RPE-Gewebe weist eine insignifikante Temperaturerhöhung auf. Der Abgleich mit thermischer Schädigung zeigt zudem, dass diese Art der Schädigung auszuschließen ist.

7 INTERPRETATION DER MULTIPULSDATEN

Die Ergebnisse der Schädigungsschwellen bei Einzel- als auch Multipuls-expositionen werden in diesem Kapitel hinsichtlich der bestehenden Abweichungen verfügbarer Daten interpretiert. Dazu werden die zur Unsicherheit beitragenden Faktoren wie der IMF, der Strahldurchmesser und der ED_{50} mittels Fehlerfortpflanzung untersucht, um die Inkongruenz bestehender Daten nachzuvollziehen und diskutieren zu können.

Des Weiteren wird detailliert auf den Vergleich zu den GZS- und den MZB-Werten des Lasersicherheitsstandards in Europa und den USA eingegangen. Da der C_5 -Faktor (in den USA nach ANSI C_P -Faktor) in den USA und Europa intensiv bezüglich seiner Gültigkeit diskutiert ist, befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem resultierenden Sicherheitsfaktor bei dessen Anwendung nach europäischer und amerikanischer Norm.

Abschließend wird der Verlauf der Reduktion der Schädigungsschwellen mit zunehmender Pulsanzahl hinsichtlich des wirkenden Schädigungsmechanismus bewertet. Die vorgestellten Pulsinteraktionsmodelle aus Abb. 3.5 werden den Messergebnissen gegenübergestellt und geprüft. Daraus ableitend werden die dominanten Schädigungsmechanismen erörtert.

7.1 ANALYSE ZUR DISKREPANZ VORHANDENER SCHÄDIGUNGSSCHWELLEN

Aus Kap. 1.2.3 geht hervor, dass der Umgang von Fluktuationen im Top Hat Strahlprofil eine messtechnische Herausforderung darstellt, da die aus der Literatur [32, 56] bekannte Nachkorrektur über den IMF zu inkongruenten Ergebnissen führt. Dadurch vergrößert sich die Spannweite der schädigenden

Exposition maßgeblich. In diesem Abschnitt wird untersucht, inwieweit sich die Uneinheitlichkeit der verfügbaren Daten (vgl. Abb. 1.4) durch die beobachteten Fluktuationen und damit zusammenhängenden Unsicherheiten erklären lassen. Weiterhin wird darauf eingegangen, welche Maßnahmen dazu beitragen die messtechnischen Unsicherheiten zu minimieren.

7.1.1 STAHLPROFILFLUKTUATIONEN DES TOP HAT

INTERPRETATION UND HANDHABUNG

Die bisher veröffentlichte Studien [32, 55, 56] verdeutlichten die Problemstellung von Intensitätsmodulationen, die bei der Verwendung von Fasern zur Strahldurchmischung auftreten. Schüle [55, 56] und die zugehörige Arbeitsgruppe korrigierten daher die ED_{50} -Werte in den veröffentlichten Arbeiten mit dem IMF. Der in Schüles Dissertation ermittelte IMF hat einen Wert von bis zu 3,8, was zu einer signifikanten Veränderung der Schwellwerte führte. Da bisher unklar ist, wie Fluktuationen zu berücksichtigen sind, sollte die Adaption der Daten durch IMF-Korrektur mit Vorsicht behandelt werden.

Die Untersuchung der zwei Fluktuationsprofile bezüglich ihrer Intensität, dem relativen Auftreten im Strahlprofil (vgl. Abb. 5.7) und der Nachkorrektur hat ergeben, dass die Schwellwerte in Bezug auf den ED_{50} -Wert um ca. 25 % für die zwei Glasfaserlängen voneinander abwichen. Die Korrektur der jeweiligen Expositionen führte nicht zu kongruenten oder zumindest vergleichbaren Ergebnissen. Durch den deutlichen Einfluss des IMF auf die Expositionen und dessen Handhabung, lässt sich erklären, warum die verfügbare Datenbasis nicht kongruent ist.

Folglich ist nicht klar, wie diese Modulationen tatsächlich berücksichtigt werden können. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei größeren Intensitätsschwankungen im Strahlprofil mehr Energie benötigt wird, um die Zellen zu schädigen, als ein Strahl mit einer weitestgehend gleichbleibenden Energiedichteverteilung. Diese Erklärung widerspricht der Beschreibung einer Zellschädigung durch einzelne Spitzen im Strahlprofil. Durch die Untersuchung vieler Proben unterschiedlicher Individuen, wurde die biologische Variabilität berücksichtigt. Die sich ergebende Diskrepanz lässt sich daher weder durch die

Streubreite der Melanisierungsgrade noch durch unterschiedliche messtechnische und methodischen Maßnahmen begründen.

Eine andere denkbare Hypothese wäre, dass interzelluläre Prozesse auf der Grundlage einer konstanten Energiedichte des bestrahlten Bereichs ausgelöst werden, da hierbei gleichzeitig mehrere benachbarte Zellen aktiviert werden. Da in dem Experiment dieser Arbeit ausschließlich die Fluktuationen variieren, aber unterschiedliche Schädigungsschwellen ermittelt wurden, führt dies zu der Schlussfolgerung, dass die Gefährdung auf doppelte Weise unterschätzt wurde. Einerseits wurde ein höherer Wert für den ED_{50} berechnet und andererseits wurde dieser Wert um den $IMF_2 = 1,78$ erhöht. Diese Unsicherheiten können für zukünftige Messungen nicht verhindert werden, weswegen die Intensitätsmodulationen minimal gehalten werden sollten.

VERMEIDUNGSMASSNAHMEN

Die Verwendung von leistungsstarken Lasern in Kombination mit einer Blende ist eine Methode zur Vermeidung der faser-induzierten Modulationen, da lediglich der mittlere Teil des Gauß-Strahls durch die Blende ausgeschnitten wird. Bei Lasern mit geringerer Leistung ist dies nicht möglich, da die verbleibende Einzelpulsenergie durch den Blendenbeschnitt nicht mehr für Zellschäden ausreicht. Beugungseffekte müssen bei besonders kleinen Durchmessern berücksichtigt werden und jedes zusätzliche optische Element induziert ohnehin Aberrationen im Strahlprofil.

Alternative Ansätze wie Mikrolinsenarrays oder optische Streuscheiben sind für eine homogene Ausleuchtung sinnvoll, für Abbildungsgrößen im unteren Mikrometerbereich ($< 100 \mu\text{m}$) jedoch ungeeignet, da die erforderlichen Strukturen in diesem Größenbereich nur unter hohen Aufwendungen und Technologien aus der Röntgen-, und extremer UV-Lithographie anzufertigen sind. Gezielte Modendurchmischung bei der Verwendung von Fasern ist eine einfache und kostengünstige Lösung für die Erzeugung von Top Hats, aber die ideale Homogenisierung des Strahlprofils wird in einer Faser immer begrenzt sein, insbesondere aufgrund von Energieverlusten, Impulsdispersion und optischen Aberrationen. Durch eine geeignete Parametrisierung des Einfallswinkels in die Faser, der Krümmung der Faser, des Kernprofils und vor allem ihrer Länge bewirken jedoch eine gute Durchmischung und halten

Tabelle 7.1: Einfluss der Durchmesserdefinition auf die Schädigungsexposition H : Üblich verwendete Definitionen ($1/e$, $1/e^2$ oder FWHM) führen zu unterschiedlichen Spotkantenlängen (Abweichungen ca. 8 %) und beeinflussen wiederum die Exposition H . Die Nachkorrektur durch den jeweiligen IMF führt zu erheblichen Abweichungen der Exposition.

Definition	Durchmesser	H_1	H mit IMF ₁	H_2	H mit IMF ₂
-	μm	mJ/cm^2	mJ/cm^2	mJ/cm^2	mJ/cm^2
FWHM	294 ± 3	36,05	41,45	49,93	88,88
$1/e$	301 ± 3	34,39	39,55	47,63	84,79
$1/e^2$	319 ± 3	30,62	35,21	42,41	75,49

die Intensitätsmodulationen so gering wie möglich. Der Übergang zwischen "Vital" und "Nicht-Vital" ist bei einem homogenen Profil deutlicher, da nicht die Spitzen entscheidend für die Schadensdeklaration ist. Bei einem gleichbleibenden Strahlprofil ist immer die komplette bestrahlte Fläche zu erkennen und nicht einzeln verbundene Zellen.

Darüber hinaus erscheint es für zukünftige Messungen sinnvoll, die Anzahl der Intensitätsspitzen zu gewichten, damit die Intensitätsmaxima einzelner Spitzen den IMF nicht zu stark beeinflussen. Auf diese Weise kann der IMF statistische Methoden aus ähnlichen Anwendungsbereichen zur Bestimmung von Fluktuationen wie der technischen Oberflächenanalyse nutzen, welche das arithmetische Mittel, die mittlere Fluktuation und den quadratischen Mittelwert der Fluktuationen als Rauigkeit berechnet.

7.1.2 DURCHMESSER-DEFINITION

Bei der Untersuchung der Fluktuationen wurde die Kontur des verwendeten Strahlprofils (siehe Abb. 5.5) aufgenommen und ein exemplarischer Schnitt erzeugt. Anhand von Abb. 7.1 kann die tatsächliche Kantensteilheit und deren Auswirkung auf die Durchmesserdefinition demonstriert werden. Dazu wurden die Messdaten eingelesen und durch das Hintergrundrauschen reduziert. Anschließend sind die Pixelintensitäten auf den maximalen Pixelwert normiert und an eine asymmetrische sigmoidale Funktion (grün) angepasst worden. Dabei wurden die gängigen Durchmesserdefinitionen aus Kap. 4.3.3 angewandt.

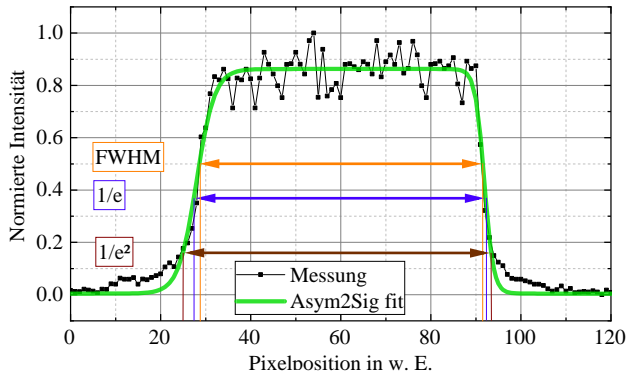


Abbildung 7.1: Querschnitt zur Analyse durch das Top Hat Strahlprofil: Messdaten mit asymmetrischer sigmodaler Anpassung (grün). Pfeillinien zeigen die Durchmesserdefinitionen für das FWHM (orange), das $1/e$ -Kriterium (blau) und das $1/e^2$ -Kriterium (braun).

Eine maximale Kantensteilheit führt trotz der gängigen Durchmesserdefinitionen zu identischen Durchmessern. Die realisierten Top Hats jedoch, ergeben Abweichungen hinsichtlich ihrer Durchmesser von bis zu 8 %. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Flankensteilheit: In Abb. 7.1 ist zu erkennen, dass die Definition eines Durchmessers entscheidend für die zu bestimmende Exposition ist. Daher sollte die Flankensteilheit so nah wie möglich bei Null liegen. Folglich weisen die berechneten Expositionen (vgl. Tab. 7.1) einen Schadensbereich von $30,62 \text{ mJ/cm}^2$ bis $41,45 \text{ mJ/cm}^2$ für den niedrigen IMF (inkl. Korrektur) und einen Bereich von $42,41 \text{ mJ/cm}^2$ bis $88,88 \text{ mJ/cm}^2$ für den höheren IMF (inkl. Korrektur) auf.

7.1.3 SPANNWEITE DER MESSUNSICHERHEIT

Die Ergebnisse der IMF-Variation bzw. -Berücksichtigung und den entsprechenden Durchmesserdefinitionen sind in Tab. 7.2 zusammengefasst. Die Fehlerfortpflanzung wurde hinsichtlich des Durchmessers, ED_{50} und IMF durchgeführt, um die Spannweite der Expositionen darzustellen, in der die wahre Schadensdosis liegt. Abhängig von der Wahl der Durchmesserdefinition und dessen Messung variierten die Expositionen für beide Schwankungsprofile um

Tabelle 7.2: Spannweite verfügbarer Daten zu Schädigungsschwellen. Expositionen für zwei verschiedene Fluktuationsprofile ($IMF_1 = 1,15 \pm 0,2$, $IMF_2 = 1,78 \pm 0,2$) und die üblicherweise verwendeten Durchmesserdefinitionen. Die Messung mit höheren Fluktuationen im Strahlprofil führte zu größeren Unsicherheiten. Durch Tab. 6.1 und Tab. 7.1 wurden die Schädigungsexpositionen bestimmt. Die letzten beiden Spalten beschreiben jeweils die berechnete Unstimmigkeit. Diskrepanz a^* beschreibt das Verhältnis zwischen der Exposition H_1 mit IMF_1 -Korrektur des restriktivsten Durchmessers zu H_2 mit IMF_2 -Korrektur für alle Durchmesser. Diskrepanz b^* entspricht dem Verhältnis zwischen der Exposition H_1 ohne IMF_1 -Korrektur des restriktivsten Durchmessers zu H_2 mit IMF_2 -Korrektur für alle Durchmesser.

Durchmesser	H_1	H_2	H_1 mit IMF_1	H_2 mit IMF_2	a^*	b^*
-	mJ/cm ²	mJ/cm ²	mJ/cm ²	mJ/cm ²	-	-
FWHM	36,05 ± 3,24	49,93 ± 0,49	41,45 ± 8,12	88,88 ± 10,02	2,5	2,9
1/e	34,39 ± 3,09	47,63 ± 0,47	39,55 ± 7,75	84,79 ± 9,56	2,4	2,8
1/e ²	30,62 ± 2,76	42,41 ± 0,42	35,2 ± 6,89	75,49 ± 8,51	2,1	2,5

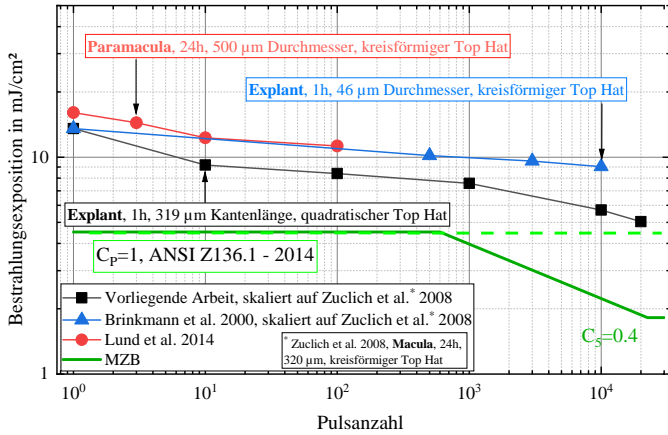
einen Faktor von fast 3. In den letzten beiden Spalten wurde die Diskrepanz zwischen den Expositionen H bezüglich des restriktivsten Durchmessers $1/e^2$ berechnet. Der Faktor a^* beschreibt das Verhältnis zwischen der Exposition H_1 mit IMF_1 -Korrektur des restriktivsten Durchmessers ($1/e^2$) und den IMF_2 -korrigierten Expositionen der jeweiligen Durchmesser. Der Faktor b^* beschreibt das Verhältnis zwischen der Exposition H_1 ohne IMF_1 -Korrektur des restriktivsten Durchmessers zu H_2 mit IMF_2 -Korrektur für alle Durchmesser. Die Übersicht verfügbarer Schädigungsexpositionen (vgl. Abb. 1.4) wies eine Diskrepanz von einem Faktor von ca. 3 auf und stimmt mit den Ergebnissen dieser Untersuchung (maximaler Diskrepanzfaktor ca. 3) überein.

Die methodischen Herausforderungen sowie messtechnische Unsicherheiten wie der Top Hat Qualitätssicherung sind eine mögliche Erklärung für das breite Spektrum der bestehenden Schädigungsschwellen. Um die maximale Kantensteilheit zu erreichen, sollte der Top Hat in der Abbildungsebene auf den Proben abgebildet werden, was durch die natürliche Unebenheit der biologischen Proben beschränkt ist.

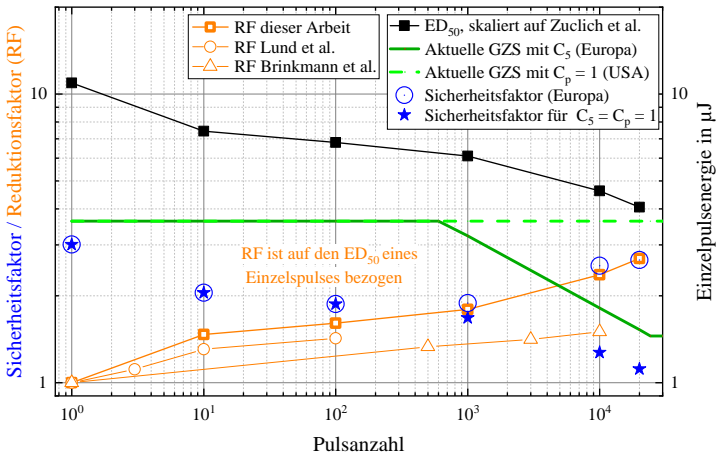
7.2 VERGLEICH ZU DEN GRENZWERTEN DES LASERSICHERHEITSSTANDARDS

Die gemessenen Schädigungsschwellen aus Kap. 6.2.3 werden relativ zu den MZB und den GZS der Lasersicherheitsnorm (DIN EN 60825-1, Ed. 3) unter Bezugnahme auf die drei in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Kriterien verglichen, um den Fall mit niedrigstem Sicherheitsabstand zu bestimmen. Aufgrund der niedrigen PRF (25 Hz) lag das zweite Kriterium (Mittleres Leistungskriterium) weit über dem Einzelpuls-Kriterium und dem des reduziertes Pulses. Aus diesem Grund wird in Abb. 7.2 lediglich das restriktivste Kriterium (reduzierter Puls) betrachtet. Da die Grenzwerte im Bereich der sichtbaren Strahlung für längere Expositionen (> 10 s) und somit photo-chemischer Schädigung einige Größenordnungen höher liegen, wurden diese zur vereinfachten Darstellung nicht in Abb. 7.2 implementiert.

In Abb. 7.2a werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den schädigenden Expositionen vergleichbarer Studien von Lund et al. [45] und Brinkmann et al. [29] bezüglich der Pulsanzahl dargestellt. Da die Untersuchungen dieser Studie und jene von Brinkmann et al. mit Explants durchgeführt wurden, sind die Bestrahlungsexpositionen auf die Einzelpulsexposition von Zuclich et al. [17] normiert worden. Zuclich et al. war bislang der einzige Forscher, der an Macula Gewebe mit Top Hat Strahlprofilen auf NHP die Versuchsreihen mit ns-Pulsen durchgeführt hat. Seine Studie war darauf konzentriert, den Diskrepanzfaktor zwischen Macula und Paramacula nach 24 h zu untersuchen, weswegen keine Pulsfolgen in seinen Studien untersucht wurden. Allerdings bietet sich seine Studie hervorragend als Skalierung an, da er 5 ns-Pulse bei 532 nm applizierte, sowohl Macula als auch Paramacula untersuchte und einer seiner untersuchten Durchmesser ($320 \mu\text{m}$) mit der Kantenlänge dieser Studie ($319 \mu\text{m}$) vergleichbar ist. Aus der ICNIRP geht jedoch hervor, dass für die Bestimmung der retinalen Schädigungsexposition im ns-Puls-Bereich der Durchmesser ($> 100 \mu\text{m}$) weitestgehend vernachlässigbar ist, da keine Wärme abgeführt werden kann. Da die Studie von Brinkmann et al. 250 ns-Pulse applizierte (thermo-mechanischer Schädigungsbereich, vgl. Kap. 3.2), war die resultierende Schädigungsexposition deutlich erhöht, weswegen diese Werte ebenfalls an die Studie von Zuclich et al. adaptiert wurde. Obwohl die Forschungsgruppe von Brinkmann et al. üblicherweise nachträglich die Expositionen um den



(a)



(b)

Abbildung 7.2: Untersuchung der ermittelten Schädigungsschwellen im Bezug zu den Grenzwerten des Lasersicherheitsstandards unter Auswahl des kritischsten Kriteriums nach Abschnitt 1.2.1. (a) Vergleich der MZB zu verfügbaren Datensätzen von Ref. [29, 45]. Explant-Daten wurden skaliert nach Ref. [17]. (b) Ausarbeitung des Reduktionsfaktors (RF) und des Sicherheitsfaktors zwischen Schädigungsschwellen und GZS.

IMF korrigiert [32, 55, 56], sind keine Angaben in der Veröffentlichung zu einer nachträglichen Korrektur beschrieben.

Auch die Ergebnisse der Studie von Lund et al. sind in Abb. 7.2a dargestellt, um NHP- Daten mit ns-Pulsen zu vergleichen. Die Studie beinhaltet die Untersuchung zweier Durchmesser (100 μm und 500 μm). Da Lund selbst die messtechnischen Herausforderungen der Detektion über das Ophthalmoskop nach 24 h bei dem kleineren Durchmesser bemängelt [157], wurde für die Auswertung lediglich die Expositionsergebnisse des größeren Durchmessers herangezogen, obwohl die maximale Pulsanzahl auf $N = 100$ beschränkt war. Der Versatz zu den Daten von Zuclich et al. lässt sich durch den histologischen Unterschied zwischen Paramacula und Macula erklären, da Lund et al. lediglich die weniger sensitive Paramacula untersuchte.

Aus Abb. 7.2b geht hervor, dass der relative Reduktionstrend der vorliegenden Arbeit mit dem von Lund et al. übereinstimmt. Aus der Studie von Brinkmann et al. geht jedoch hervor, dass die Absenkung auch bei höheren Pulsanzahlen relativ gering (max. RF ca. 1,5 bei $N = 10\,000$) bleibt, was auf die bessere Abkühlung einer kleineren bestrahlten Fläche (46 μm) zurückzuführen ist. Des Weiteren wurden, die durch den resultierenden Korrekturfaktor C_5 , angepassten GZS (grün) eingefügt. Dabei ist in dunkelgrün der Verlauf des in Europa gültigen C_5 (bzw. ehemaligen C_P in den USA) eingezeichnet. Zusätzlich ist in hellgrün der GZS nach aktuellem C_P in den USA aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass der Sicherheitsabstand zwischen den an Zuclich et al. skalierten Messwerten (ca. Faktor von 1,1) zu den erlaubten Expositionen gering ist. Aus den ICNIRP geht hervor, dass es keinen einheitlichen Sicherheitsabstand [15] gibt, allerdings sollte die Schädigungsschwelle keinesfalls auf den GZS oder den MZB liegen, da dadurch kein Sicherheitspuffer gewährleistet ist und gegebenenfalls Revisionen des Lasersicherheitsstandards (vgl. Kap. 1.1) ausgelöst werden. Der C_5 bzw. ehemaliger C_P wird auf minimal 0,4 der GZS des Einzelpulses beschränkt, wodurch ein Sicherheitsfaktor von weiterhin ca. 3 gewährleistet ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen vor allem die GZS bzw. MZB für hohe Pulsanzahlen ($N > 20\,000$) in Frage, da unklar ist, warum die Reduktion insbesondere für $N > 1\,000$ ansteigt. Aus Abb. 7.2b geht hervor (orangefarbene Rauten), dass der RF für $N > 1\,000$ stetig bis zu einem Faktor von fast 3 zunimmt. Die Begründung liegt vermutlich in einem Dominanzwechsel des zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus. Scheinbar werden bei längeren

Puls dauern andere Mechanismen aktiviert, die zum Zelltod führen. Es wurden daher zur genaueren Betrachtung die GZS gegenüber der ermittelten ED_{50} dieser Studie (schwarze Quadrate, skaliert zu Zuclich et al. Einzelpulsmessung) aufgetragen, um den Sicherheitsfaktor (blaue Symbole) zu bestimmen. Die unausgefüllten Kreise entsprechen dabei dem Sicherheitsfaktor des in Europa gültigen C_5 und des in den USA nicht mehr validen C_P . Der aktuelle C_P aus den USA ist mit Sternen dargestellt und zeigt auf, dass der Sicherheitsfaktor der Messwerte zu den GZS nahezu 1 wird.

7.3 ANWENDUNG DER PULSINTERAKTIONSMODELLE

7.3.1 WAHRSCHEINLICHKEITSSUMMATIONSMODELL

In Kap. 3.3.2 wird beschrieben, wie das PSM zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von laser-induzierten Schäden für Pulsfolgen angewendet werden kann. Daher wurden die gemessenen ED_{50} verwendet, um ein PSM für die jeweiligen Pulsfolgen abzuleiten. Anhand der Slope (vgl. Abb. 3.7) lässt sich die Absenkung des ED_{50} für höhere Pulsanzahlen vorhersagen. Dieses Modell kann weiterhin auch aus höheren Pulsanzahlen generiert werden und vorhersagen, wie die Schadensschwelle ED_{50} für darauffolgende Pulsfolgen abnimmt [158].

Aus Abb. 7.3 geht hervor, dass die Modelle nicht geeignet erscheinen, die jeweiligen ED_{50} der vorgestellten Arbeit ausreichend restriktiv zu beschreiben. Die Vorhersagen des PSM unterschätzen in jedem Fall das Risiko eines Schadens. Da der Verlauf des PSM auf der Slope der zugrundeliegenden Messung basiert, ist dies auch der Grund für die Abweichung von den Schädigungsschwellen der darauffolgenden Pulsfolge-Experimenten: Eine niedrige Slope zeigt wohl einen deutlichen Übergang zwischen der binären Antwort ("Schädigung" bzw. "keine Schädigung") an, beeinflusst dennoch auch den Verlauf der PSMs.

Die Verwendung des PSM auf die erzeugten Daten führt zu der Schlussfolgerung, dass die Beschreibung von Mehrfachimpulsdaten durch das PSM nicht angemessen ist, da die Modelle in jedem Fall die Gefährdung unterschätzt haben.

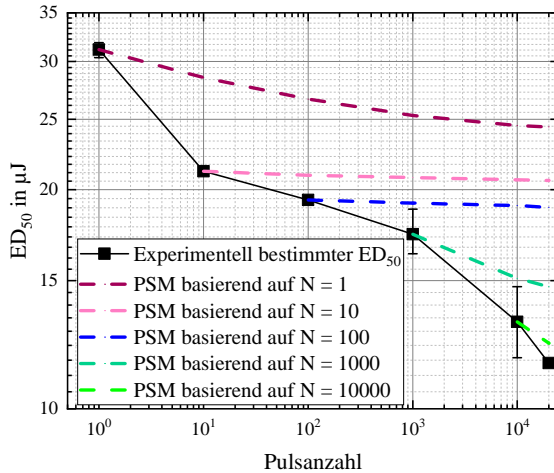


Abbildung 7.3: Schadensschwellen der Mehrfachpuls-Bestrahlung mit einer Spotkantenlänge $d = 319 \mu\text{m}$ und einer Pulsdauer von $\tau = 1.8 \text{ ns}$ mit $\text{PRF} = 25 \text{ Hz}$. Fehlerbalken zeigen die 95% Konfidenzgrenzen an. Mit zunehmender Anzahl der Pulse ist eine Abnahme der einzelnen Einzelpulsenergie einer Pulsfolge zu beobachten. Es wurden PSM-Modelle (gestrichelt) der einzelnen Mehrfachpuls-Schwellwerte generiert, die jedoch unabhängig vom Ausgangspunkt sind und die Reduktion in keinem Fall ausreichend restriktiv beschreiben können.

Eine weitere Schwierigkeit des PSMs liegt darin, dass die Durchführung von Schädigungsexperimenten notwendig ist, um eine Dosis-Antwort-Kurve zu entwickeln. Es können daher keine Vorhersagen zu beliebigen Pulsdauern, PRF oder Spotgrößen erarbeitet werden. Entgegen des aktuellen Stands der Technik nimmt das PSM keine Abhängigkeit zur PRF an. Diese Schwierigkeit ist auch eine der größten Schwächen des Modellansatzes, da der Verlauf und die Vorhersage auf der Qualität und der biologischen Variabilität einer gemessenen Exposition und ihrer Slope beruhen [44, 70, 158].

Es gibt Untersuchungen mit NHP zu Multipulsen [45, 126], die mit dem PSM gut beschrieben werden können, da die Slope dieser Messungen deutlich größer war aufgrund der *in vivo* Messunsicherheit (vgl. Kap. 5.1.1). Der Nachteil ist jedoch, dass die ermittelte Slope zu ausgeprägt von der Dosimetrie und maßgeblich von der Detektionsmethode abhängt.

Die Daten dieser Arbeit passen aufgrund einer zu stark gewichteten Abhängigkeit von der Slope nicht zu den Modellansätzen. Zur Vorhersage der Schädigungsschwellen sollten Untersuchungen des zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus durchgeführt werden. Auf Basis dieses Verständnisses können Beschreibungen (z.B. thermisch durch Arrhenius, vgl. Gl. (2.11)) zu den letalen Zellprozessen angefertigt werden, die nach den Ergebnissen dieses Abschnitts auf kumulative Prozesse hinweisen.

7.3.2 KUMULATIVE EFFEKTE

In diesem Abschnitt werden die möglichen kumulativen Effekte der Schädigungsmechanismen mit Ausnahme der photo-chemischen Prozesse hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit geprüft und diskutiert. Unter der Annahme einer stimulierenden Wirkung nach Abschnitt 7.3.2, sensibilisiert sich das Gewebe nach jedem Puls einer Pulsfolge. In Kap. 7.4 wird detailliert auf die Hinweise von photo-chemischen Effekten eingegangen.

Thermische Schädigung Die Simulation aus Kap. 7.3 zeigt eindeutig, dass die thermische Schädigung eine höhere Energiedosis bedarf. Des Weiteren hätte ein signifikanter Unterschied bei den Temperaturmessungen zu erkennen sein müssen. Da die Schädigungsschwellen aber weitestgehend einen vergleichbaren Verlauf hatten, ist die thermische Schädigung für die Ergebnisse dieser Arbeit auszuschließen.

Thermo-mechanische Schädigung Wie bereits Neumann [38] in seiner Dissertation herausstellte, ist die PRF dieser Arbeit zu niedrig, um von Überlagerungen erzeugter Mikroblasen auszugehen. Zusätzlich ergibt sich keinen wesentlichen Unterschied bei den Temperaturmessungen. Da die Nukleationsbedingungen maßgeblich von der Initialtemperatur des Gewebes abhängen, ist auch diese Art der Schädigung im Kontext dieser Arbeit für längere Emissionsdauern scheinbar auszuschließen.

Photo-mechanisch Aufgrund der zu niedrigen Energiedosis und der Länge des Pulses ist Photodisruption auszuschließen. Photo-ablative Effekte bei denen die Melanosomoberfläche dauerhaft schleichend beschädigt wird, können nicht ausgeschlossen werden, wobei der Abgleich mit der Literatur darauf hinweist, dass die Energiedosis auch für diesen Effekt deutlich unterschritten wird.

7.4 INDIZIEN ZUR PHOTO-CHEMISCHEN REAKTION

Die starke Reduktion (vgl. Abb. 7.2b) der Schädigungsschwellen (zwischen $N = 1\,000$ und $N = 20\,000$) weist auf einen weiteren Schädigungsmechanismus im Netzhautgewebe hin. Abbildung 7.4 zeigt, dass durch die hohe Anzahl von Pulsen (längere Emissionsdauer) eine Dosis erreicht wird, die zu einer Schädigung führt. Diese Schädigung kann durch photo-chemische Effekte beschrieben werden, da kritische Grenzdosen für diese Art der Schädigung charakteristisch (vgl. Reziprozitätsgesetz, Gl. (3.3)) sind [159, 160]. Photo-chemische Effekte treten typischerweise bei längeren Belichtungszeiten und kürzeren Wellenlängen des sichtbaren Spektrums auf [59, 114]. Dennoch ist bekannt, dass die subzellulären Reaktionen als Folge der photo-chemischen Reaktionen auch bei kürzeren Belichtungen auftreten, jedoch nicht als dominierender Schädigungsmechanismus [161].

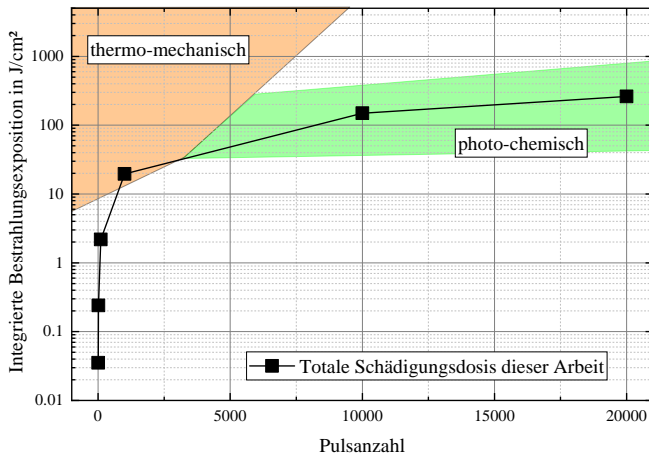


Abbildung 7.4: Photo-chemische Schäden treten ab einer Dosis von etwa $200 J/cm^2$ (grüne Linie) oder niedriger auf (unter Berücksichtigung der abnehmenden Steigung von $N = 1\,000$). Frühere Dosen, die den Schaden verursachten, basierten auf einem thermo-mechanischen Mechanismus und waren nicht photo-chemischen Ursprungs. Der weitere leichte Anstieg der effektiven Dosis für die Schädigung kann auf Reparaturmechanismen zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse aus Abb. 7.3 deuten darauf hin, dass bei den niedrigeren Pulsanzahlen in den Untersuchungen der photo-chemische Effekt wahrscheinlich nicht entscheidend für die Schädigung ist. Bei den kürzeren Emissionsdauern dominiert die thermo-mechanische Schädigung. Diese Vermutung lässt sich auch in einem Übergangsbereich (zwischen $N = 1\,000$ und $N = 10\,000$) beobachten, in dem die Schädigungsschwellen stärker abfallen als zuvor (vgl. RF ca. 2-3 in Abb. 7.2b). Dieser Übergang kann im Hinblick auf die höhere Dosis als photo-chemischer Effekt gemäß des Reziprozitätsgesetzes interpretiert werden. Nach der Laserschutznorm kann es ab dieser Gesamtexpositionszeit (400 s) sowohl zu thermischen als auch zu photo-chemischen Schäden kommen. Bei der Einzelpulsexposition oder niedrigen Pulsanzahlen wird erwartet, dass die thermo-mechanische oder thermische Schädigungsschwelle deutlich niedriger ist als die photo-chemische Schädigung. Höhere Pulsanzahlen benötigen daher weniger Einzelpulsenergie, da sie die identische kritische Dosis aufbringen müssen (unter Vernachlässigung zellinterner Reparaturmechanismen [162]), um oxidativen Stress in Form von photo-chemischen Schäden [114] auszulösen.

7.4.1 METABOLISCHE AKTIVITÄT

Die Verwendung der Explants hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Fluoreszenzbilder (siehe Abb. 7.5) indirekt Auskunft über die Stoffwechselaktivität der bestrahlten Zellen geben. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM konnte die erhöhte Stoffwechselaktivität in den bestrahlten Zellen nachgewiesen werden.

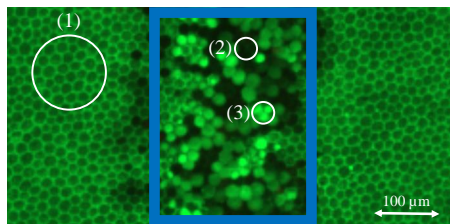


Abbildung 7.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Aktivierung und Anregung des umgewandelten Calceins. (1) Regelmäßig angeregte, vitale hexagonale RPE-Strukturen ohne Laserbestrahlung. (2) Zerstörte Zellmembranen durch Intensitätsmodulationsspitzen im Strahlprofil. (3) Zellen mit höherer Helligkeit durch erhöhte Stoffwechselaktivität.

Die bestrahlten Zellen waren unterhalb der Schädigungsschwelle angeregt, was sich durch einen helleren Farbton in der Fluoreszenzaufnahme bemerkbar macht. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass diese Zellen mehr Calcein-AM in Calcein umgewandelt haben. Dieses Verhalten deutet auf biochemische Prozesse hin, die die Theorie der entstehenden freien Radikale mit zytotoxischer Wirkung unterstützen.

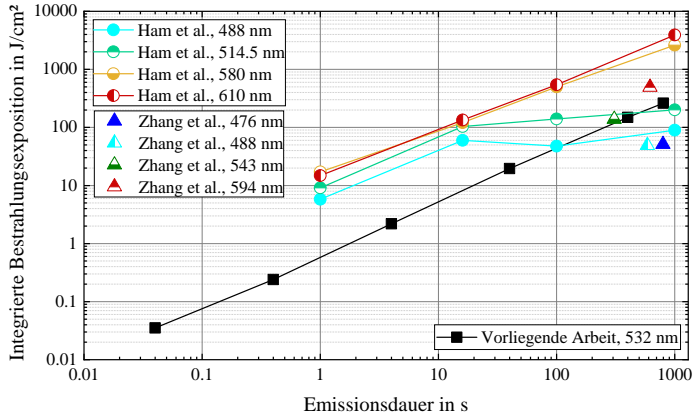
7.4.2 VERGLEICH ZUR LITERATUR

Die Studien von Ham et al. [59] untersuchten an NHP photo-chemische Schäden durch eine 488 nm-CW-Strahlung. Die Ergebnisse wurden nach 48 h ausgewertet. Ham et al. kamen zu dem Schluss, dass bei Expositionszeiten von mehr als 1 000 s die Schädigung offenbar photo-chemischen Ursprungs ist. Über das Reziprozitätsgesetz (vgl. 3.3) und dessen Anpassung an Reparaturmechanismen (siehe Anhang A) lässt sich erklären, dass ab einer zu bestimmenden Bestrahlungsdauer bei entsprechender Bestrahlung H eine totale Dosis erreicht wird, die zur Schädigung führt. Aus Abb. 7.4 ergibt sich diese Dosis im Bereich zwischen 40 s und 400 s.

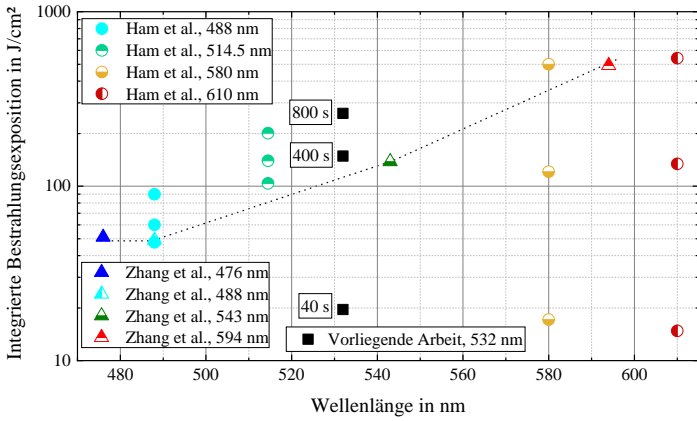
Die Beobachtung von photo-chemischen Effekten (siehe Abb. 7.6) durch RPE-Disruption wurde zusätzlich bereits *in vivo* bei NHP für verschiedene Wellenlängen beobachtet: In einer Studie von Zhang et al. [58] wurden die photo-chemischen Effekte als Primärschaden nachgewiesen. Sie nutzten CW-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 594 nm und ermittelten die ED_{50} -Werte zu $82 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, wobei die letale Dosis ED_{100} $140 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ betrug. Das Pulsmuster sowie die Spotgröße sind irrelevant für photo-chemische Effekte, wodurch die Daten besser verglichen werden können. Ihre schädigende Gesamtdosis ist konsistent zu den Daten dieser Arbeit (vgl. Abb. 7.6a).

Da die Proben dieser Arbeit jedoch bei kontrollierter Raumtemperatur in HBSS bestrahlt wurden, wäre eine größere Abweichung gegenüber der *in vivo* Messung zu erwarten gewesen. Es ist aber auch möglich, dass die photo-chemischen Prozesse erst dann ausgelöst werden, wenn die Körpertemperatur des NHP überschritten wird.

Abbildung 7.6 zeigt den Vergleich der gemessenen schädigenden Gesamtexposition dieser Arbeit mit den beiden veröffentlichten vergleichbaren Studien: In beiden Veröffentlichungen von Ham et al. und Zhang et al. ist eine Art



(a)



(b)

Abbildung 7.6: Vergleich der integrierten Schadensexpositionen mit weiteren Studien [58, 59] zu photo-chemischen Effekten. (a) Vergleich verschiedener Emissionsdauern. (b) Darstellung der Wellenlängenabhängigkeit.

”Sättigung” ab einer bestimmten Emissionsdauer (vgl. Abb. 7.6a) zu erkennen. Die Daten von Ham et al. zeigen diesen Übergangsbereich lediglich für die kürzeren Wellenlängen ab Emissionsdauern von > 10 s. Außerdem untersuchte er in seiner Studie die notwendige Schädigungsdosis für ausgewählte Bestrahlungszeiten für verschiedene Wellenlängen. Die Daten von Ham et al. für Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm zeigen eine ähnliche Sättigung wie in der vorgestellten Arbeit. Die längeren Wellenlängen hingegen, zeigen diese Sättigung nicht. Im Experiment dieser Studie kann der Übergang ab etwa 400 s (entspricht $N = 10\,000$) beobachtet werden. Bei längeren Emissionsdauern wurde minimal mehr Energie benötigt, um die Proben zu schädigen. Der Versatz kann durch zellinterne Reparaturprozesse erklärt werden. Aus der Arbeit von Ham et al. geht ein ähnlicher Verlauf (vgl. Abb. 7.6a für Emissionsdauern ab 10 s) der absoluten schädigenden Expositionsdosis hervor.

Die Studien von Zhang et al. und Ham et al. beweisen eine ähnliche Wellenlängenabhängigkeit für die notwendige schädigende Einwirkung. Die Ergebnisse von Zhang et al. bestätigen die Untersuchungen zur Wellenlängenabhängigkeit von Hams Studien. Zudem stimmt die schädigende Dosis beider Veröffentlichungen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Weiterhin unterstreicht Zhang et al. eine unterschätzte photo-chemische RPE-Schädigung für längere Wellenlängen. In Abb. 7.6b ist die Wellenlängenabhängigkeit im Vergleich zu den Werten von Zhang et al. eingezeichnet. Die Daten dieser Arbeit bekräftigen die Ergebnisse der Studie von Zhang et al. für verschiedene Wellenlängen. Bei längeren Pulsdauern ist die schädigende Dosis, aufgrund von Reparaturmechanismen, geringfügig höher.

Die photo-chemische Schädigung bestätigt sich neben der guten Übereinstimmung mit den Daten von Zhang et al. und Ham et al. durch deutliche Hinweise aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität, der Studie zum oxidativem Stress (vgl. Kap. 6.2.2) und der Übereinstimmung mit dem angepassten Reziprozitätsgesetz (vgl. Anhang A).

ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS

- Die Untersuchung der Uneinheitlichkeit verfügbarer laser-induzierter Schädigungsschwellen lässt sich größtenteils durch Fluktuationen des Strahlprofils erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte dadurch eine Diskrepanz von bis zu ca. 3 nachgewiesen werden.
- Der Vergleich der adaptierten ED_{50} -Werte mit den MZB ergibt in Europa einen Sicherheitsfaktor von minimal 2. Im Vergleich zu den MZB der USA ergibt sich aufgrund des revidierten C_P ein Sicherheitsfaktor von 1,1. Der Sicherheitsabstand bei höheren Pulsanzahlen ist sowohl in Europa als auch den USA fragwürdig.
- Der Vergleich mit Pulsinteraktionsmodellen weist deutlich auf einen kumulativen Effekt hin. Das PSM ist nicht geeignet, den Reduktionstrend zu beschreiben.
- Die Zunahme des Reduktionstrends bei Pulsanzahlen ($N > 1000$) deutet auf einen Dominanz-Wechsel des zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus hin.
- Es wurden erstmalig die Effekte einer photo-chemischen Schädigung an Explants beobachtet und Indizien dazu vorgestellt.
- Die eindeutigen Nachweise der erhöhten metabolischen Aktivität in den bestrahlten Zellen und der Vergleich verfügbarer Daten zu photo-chemischen Schädigungsuntersuchungen deuten auf bislang nicht bei ns-Pulsen berücksichtigte letale bio-chemische Prozesse hin.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde ein optischer Messaufbau zur Untersuchung der laser-induzierten Schädigung durch Multipulse an retinalen Explants entwickelt. Der Messaufbau wurde durch den Einsatz einer Quadratkernfaser und zusätzlicher Abbildungskontrolle gegenüber dem Stand der Technik erweitert. Damit konnte ein verbessertes Top Hat Strahlprofil mit niedrigen Fluktuationen (Faktor $\leq 1,15$, Literatur $\leq 3,8$) erzeugt werden. Die Entwicklung dieses Messplatzes ermöglichte die Etablierung eines Verfahrens zur Durchführung von Schädigungsexperimenten und die Erweiterung der bisher geringen Datenbasis von Schädigungsmessungen. Unter der Verwendung von speziellen Fluoreszenzfarbstoffen war es möglich, weitere Informationen über den Schädigungsmechanismus zu gewinnen. Die erzeugte Datenbasis konnte anschließend durch ausgearbeitete Pulsinteraktionsmodelle bezüglich des zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus bewertet und interpretiert werden.

Die Ausgangssituation von Schädigungsschwellen im ns-Bereich war durch eine geringe und uneinheitliche Datenlage gekennzeichnet, die jedoch als Grundlage für die MZB und GZS des Lasersicherheitsstandards DIN EN 60825-1:2015 dient. Der aktuelle Kenntnisstand über Schädigungsschwellen durch neue Forschungsergebnisse kann unter Berücksichtigung von einem Sicherheitsabstand zu Anpassungen der Grenzwerte durch die Empfehlungen der ICNIRP führen. Um die Zuverlässigkeit der aktuellen Expositionsgrenzwerte zu prüfen und als Konsequenz dessen, Revisionen der GZS für ns-gepulste Laserprodukte zu vermeiden, insbesondere für den LiDAR-Anwendungsfall, wurden Multipulse hinsichtlich der gültigen MZB bzw. den GZS in Europa und den USA untersucht.

In dieser Arbeit wurden erstmalig *ex vivo* Untersuchungen bis zu einer Pulsanzahl von $N = 20\,000$ im ns-Bereich sichtbarer Strahlung durchgeführt. Die Untersuchung dieses Spektralbereichs ist von großer Bedeutung, da diese als Datenbasis für Extrapolationen in Wellenlängenbereichen verwendet wird, in denen keine Schädigungsmessungen (z. B. 905 nm) durchgeführt werden können.

Weiterhin wurden diese Studien für unterschiedliche Temperaturen und verschiedene Stufen von oxidativem Stress durchgeführt, um die äußeren Einflüsse auf die Schädigungsschwellen bei Explants auszuarbeiten und zu evaluieren. Die erzeugte Datenbasis an Schädigungsschwellen konnte die resultierenden Sicherheitsabstände zu den GZS des Lasersicherheitsstandards klar darstellen und zeigten einen minimalen Faktor von 2. Die MZB der USA wiederum hatten aufgrund des für Multipulse revidierten Korrekturfaktors lediglich einen Sicherheitsabstand von 1,1 für die höchste Pulsanzahl der vorliegenden Arbeit. Diese deutliche Reduktion des Sicherheitsabstands lässt sich auf den Wechsel des zugrundeliegenden dominanten Schädigungsmechanismus zurückführen.

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Beschreibung der Wechselwirkungen im Gewebe ausgearbeiteten Pulsinteraktionsmodelle, die auf kumulativen Prozessen und statistischen Ereignissen basieren, konnten durch die erzeugte Datenbasis der Schädigungsexperimente geprüft und erweitert werden. Das in der Literatur beschriebene Wahrscheinlichkeitssummutationsmodell war in keiner Versuchsreihe ausreichend restriktiv, um die Schädigungsschwelle vorherzusagen noch den relativen Verlauf korrekt zu beschreiben. Stattdessen wurden zum ersten Mal bei Explants eindeutige Hinweise zu einer photo-chemischen Schädigung bei längeren Pulsdauern (ab ca. 400 s) vorgestellt und mit Beobachtungen aus der Literatur verglichen, die dieses Ergebnis unter Bezugnahme des Reziprozitätsgesetz bestätigten.

Synchronmessungen zum Schädigungsmechanismus Die stark abfallenden Schädigungsschwellen bei der hohen Anzahl von Pulsen lassen vermuten, dass entweder ein kumulativer mechanischer Vorgang ausgelöst oder photo-chemische Prozesse induziert werden. Um den dominanten Schädigungsmechanismus zu identifizieren, könnten zukünftige Experimente mit einer höheren Pulswiederholfrequenz (ca. 1 kHz) wiederholt werden. Eine Verkürzung der Zeitintervalle zwischen den Pulsen könnte Aufschluss geben, ob es sich um reversible oder nicht-reversible kumulative Effekte handelt. Der zugrundeliegende Schädigungsmechanismus könnte so möglicherweise besser verstanden werden. Zur weiteren Verifizierung der photo-chemischen Prozesse erscheint es sinnvoll, die Zellen mit Stressmarkern zu markieren, um zytotoxische Stresslevels für verschiedene Belichtungsdosen ermitteln zu können.

Konsequenz für den Lasersicherheitsstandard Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine eindeutige Reduktion des Sicherheitsabstands bei hohen Pulsanzahlen hin, da scheinbar photo-chemische Prozesse aktiviert werden. Da diese Prozesse jedoch charakteristisch für UV- bzw. Vis- Licht sind, stellt sich die Frage, ab welchem Wellenlängenbereich diese Vorgänge bei längeren Emissionsdauern nicht ausgelöst werden. Nach Stand der Forschung ist bekannt, dass bei 1064 nm keine photo-chemischen Prozessen beobachtet worden sind. Da jedoch die meisten LiDAR-Sensoren um 905 nm emittieren, ist unklar, ob diese Wellenlänge von getriggerten photo-chemischen Effekten affektiert ist. Zur Beantwortung dieser Frage sind kommerziell verfügbare Laserstrahlquellen notwendig, die wie ein LiDAR im Submikrosekundenbereich Pulse aussenden, die jedoch eine hohe Einzelpulsenergie von mindestens 1 mJ, einen niedrigen M^2 (< 2), geringe Divergenz (< 3 mrad) und vor allem eine hohe Puls-zu-Puls-Stabilität ($< 5\%$) aufweisen können.

Langzeitschädigungen In zukünftigen Studien sollte die Langzeitschädigung untersucht werden. RPE-Zellkulturen mit Primärzellen könnten verwendet werden, um sich dem Modell eines *in vivo* Organismus zu nähern. Interzelluläre Prozesse können über einen längeren Zeitraum beobachtet, verstanden und für eine Modellentwicklung genutzt werden.

A MODELL ZUR BESCHREIBUNG PHOTO-CHEMISCHER SCHÄDIGUNG

In diesem Abschnitt wird der Ansatz einer Modellierung zur Beschreibung photo-chemischer Schädigungen dargestellt. Erste Überlegungen zu dieser Darstellung basieren auf den Modellen zu thermischer Schädigung und Veröffentlichungen von Clark et. al [70].

ZWEI-PROZESS-RATENGLICHUNG

Dieser Modellansatz beruht auf der Annahme, dass sich im RPE-Gewebe eine Anzahl an Molekülen A befindet, die durch eine Laserbestrahlung temperatur-unabhängig aktiviert werden zu A*. Die Konzentration von A* ist entscheidend für das Eintreten einer photo-chemischen Schädigung. Da in lebendigen Organismen auch temperaturabhängige Reparaturprozesse aktiv sind, muss dies in der Betrachtung zum Auf- bzw. Abbau von A* berücksichtigt werden. Zur genaueren Erläuterung wird von einem von der Zelle bereitgestellten Molekül ξ ausgegangen, das zur Deaktivierung von A* bereitgestellt wird.

Für die genaue Beschreibung dieser beiden Prozesse bietet sich daher nach Gl. (A.1) ein Zwei-Prozess-Raten-Modell an, das die Erzeugnisrate von A* über die Zeit angibt. Der erste Term von Gl. (A.1) beschreibt die Photonendichte durch Φ ($\equiv H/(\tau \cdot h \cdot \nu)$) und den Effizienzfaktor η , der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass ein einfallendes Photon absorbiert wird und das aktivierte Molekül A* erzeugt. Der zweite Term von Gl. (A.1) beschreibt die Deaktivierungsrate von A* durch die Aktivierungsenergie E_A , die Kollisionsfrequenz Z mit der Reaktion zu ξ und A* zu A. R beschreibt die Gastkonstante und $T(t)$ drückt die Temperatur der Zelle zum Zeitpunkt t aus.

$$\frac{d[A^*]}{dt} = \eta \cdot \Phi \cdot [A] - Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot [\xi] \cdot [A^*] \quad (\text{A.1})$$

Unter der Annahme, dass die Moleküle A und ξ unbeschränkt vorhanden sind, lässt sich die Gleichung vereinfachen auf:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = \eta \cdot \Phi - Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot [A^*] \quad (\text{A.2})$$

Durch diese Annahme könnte die starke Temperaturabhängigkeit zur Beschreibung photo-chemischer Schäden erklärt werden, da beim Erreichen einer gewissen Temperatur, die Vernichtung von A^* überwiegt. Oberhalb einer bestimmten kritischen Temperatur wird der photo-chemische Schädigungsmechanismus vollständig negiert, so dass die Schadensschwelle durch thermische Schädigung bei Energien bestimmt wird, die viel höher sind als die Reziprozitätsenergie. Zudem werden ab dem Erreichen einer kritischen Temperatur erneut thermische Schäden dominant.

DEFINITION EINER PHOTO-CHEMISCHEN SCHÄDIGUNGSSCHWELLE

Um eine Relation zwischen den schädigenden aktivierten Molekülen A^* und der kritischen Exposition H herzustellen, muss der Bestand der Moleküle A^* durch Integration von Gl. (A.2) berechnet werden. Durch diese Berechnung kann der Bestand der Moleküle A^* zur Zeit t in eine Verknüpfung gebracht werden.

$$[A^*]_{\text{krit}} = \frac{\eta \cdot \Phi}{Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right)} \cdot (1 - \exp(-Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot \tau)) \quad (\text{A.3})$$

Dabei kann das Prinzip der Reziprozität angewandt werden: Hier bleibt die Strahlungsbelastung konstant, wenn die Belichtungsdauer variiert. Daraus folgt, dass mit zunehmender Emissionsdauer die einfallende Bestrahlungsstärke abnimmt, was wiederum bedeutet, dass die Belichtungstemperatur gesenkt wird. Die Reziprozität legt nahe, dass die Löschrage (vgl. zweiter Term aus Gl. (A.2)) bei niedrigen Temperaturanstiegen klein ist. Dadurch kann eine Hilfsvariable H_r (empirisch bestimmte Expositionsdosis aus den Ergebnis-

sen in Abb. 7.4 eingeführt werden um die Exposition durch Reziprozität zu bestimmen.

$$[A^*]_{\text{krit}} = \frac{\eta \cdot \Phi}{Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right)} \cdot \frac{H_r}{h \cdot \nu \cdot \tau} \cdot (1 - \exp(-Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot \tau)) \quad (\text{A.4})$$

Gl. (A.4) kann durch die Potenzreihenentwicklung und der Vernachlässigung höherer Ordnungen vereinfacht werden zu Gl. (A.5):

$$[A^*]_{\text{krit}} = \frac{\eta \cdot H_r}{h \cdot \nu} \quad (\text{A.5})$$

Diese Vereinfachung kann wiederum in Gl. (A.3) eingesetzt werden, unter der Annahme, dass $\Phi = H_{\text{krit}} / (h \cdot \nu \cdot \tau)$. Dadurch ergibt sich

$$H_{\text{krit}} = H_r \cdot \tau \cdot Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot (1 - \exp(-Z \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) \cdot \tau))^{-1} \quad (\text{A.6})$$

Die schädigende Dosis kann für gleichbleibende Temperaturen durch Gl. (A.6) bestimmt werden. Da aber vor allem bei längeren Expositionen die Erhöhung der Gewebetemperatur unvermeidbar wird, muss der Anstieg in die Gleichung berücksichtigt werden. Da ein gepulster Betrieb mit sehr kurzen Pulsen zu einzelnen Temperaturspitzen führt, kann die Wärmeleitungsgleichung nicht linearisiert angenommen werden, weswegen zukünftige Arbeiten sich auf der Modellierung der Temperaturverteilung konzentrieren könnten und diese in Gl. (A.6) integrieren können.

Diese Überlegungen können als Basis für zukünftige Modellbildungen dienen. Zudem sind weitere Untersuchungen des oxidativen Stresses durch äußere Einwirkungen wie Luftkontakt und Medium-Konzentration für eine weitere Modellbildung zu berücksichtigen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Jörn Ebborg. Sicherheit hoch drei: Bosch komplettiert Sensorportfolio für das automatisierte Fahren. <https://www.bosch-press.de/pressportal/de/de/sicherheit-hoch-drei-bosch-komplettiert-sensorportfolio-fuer-das-automatisierte-fahren-205440.html>, 02.01.2020. Abgerufen am 14. Oktober 2020.
- [2] Uwe Rudolph, Gerth und Voelzke. Welche Rolle spielt Lidar für autonomes Fahren? Und welche Radar und Kamera? ein Vergleich. <https://www.all-electronics.de/welche-rolle-spielt-lidar-fuer-autonomes-fahren-und-welche-radar-und-kamera-ein-vergleich>, 21.12.2017. Abgerufen am 18. Oktober 2020.
- [3] Ralph H Rasshofer and Klaus Gresser. Automotive Radar and Lidar Systems for Next Generation Driver Assistance Functions. *Advances in Radio Science*, 3, 2005.
- [4] Markit, IHS. Ihs markit. *CIPS UK manufacturing PMI*, 2018.
- [5] MarketResearchcom. Lidar Market Report: Trends, Forecast and Competitive Analysis.
- [6] Jens Hälker and Harald Barth. Lidar als Schlüsseltechnik für das automatisierte und autonome Fahren. *ATZ-Automobiltechnische Zeitschrift*, 120(3):70–73, 2018.
- [7] Peter Kellerhof. Technik soll Unfallzahlen im Straßenverkehr senken. <https://www.vdi-nachrichten.com/fokus/technik-so-11-unfallzahlen-im-strassenverkehr-senken/>, 14.11.2019. Abgerufen am 18. Oktober 2020.
- [8] Lino Figueiredo, Isabel Jesus, JA Tenreiro Machado, Jose Rui Ferreira, and JL Martins De Carvalho. Towards the development of intelligent transportation systems. In *ITSC 2001. 2001 IEEE Intelligent Transportation Systems. Proceedings (Cat. No. 01TH8585)*, pages 1206–1211. IEEE, 2001.

- [9] Andreas Herrmann. Lust auf Zukunft-eine neue Vision für die deutsche Automobilindustrie. *ATZextra*, 24(6):16–19, 2019.
- [10] E. Marti, M. A. de Miguel, F. Garcia, and J. Perez. A review of sensor technologies for perception in automated driving. *IEEE Intelligent Transportation Systems Magazine*, 11(4):94–108, 2019.
- [11] Heinrich Gotzig and Georg Otto Geduld. LiDAR-Sensorik. In *Handbuch Fahrerassistenzsysteme*, pages 317–334. Springer, 2015.
- [12] Roman Burkard, Reinhard Viga, Jennifer Ruskowski, and Anton Grabmaier. Eye safety considerations and performance comparison of flash- and MEMS-based LiDAR systems. In *Optics, Photonics and Digital Technologies for Imaging Applications VI*, volume 11353, page 1135314. International Society for Optics and Photonics, 2020.
- [13] Velodyne LiDAR. VLP-16 UserManual. <https://greenvalleyintl.com/wp-content/uploads/2019/02/Velodyne-LiDAR-VLP-16-User-Manual.pdf>. Abgerufen am 8. Dezember 2020.
- [14] IEC 60825-1. *Safety of laser products - Part 1: Equipment classification and requirements*. International Electrotechnical Commission, Geneva, 3. edition, 2014.
- [15] David H Sliney, John Mellerio, Veit-Peter Gabel, and Karl Schulmeister. What is the meaning of threshold in laser injury experiments? Implications for human exposure limits. *Health Physics*, 82(3):335–347, 2002.
- [16] Karl Schulmeister, Johannes Husinsky, Bernhard Seiser, Florian Edthofer, Beate Fekete, Letizia Farmer, and David J Lund. Ex vivo and computer model study on retinal thermal laser-induced damage in the visible wavelength range. *Journal of Biomedical Optics*, 13(5):054038, 2008.
- [17] JA Zuclich, PE Edsall, DJ Lund, BE Stuck, S Till, RC Hollins, PK Kennedy, and LN McLin. New data on the variation of laser induced retinal-damage threshold with retinal image size. *Journal of Laser Applications*, 20(2):83–88, 2008.
- [18] Karl Schulmeister. The new edition of the international laser product safety standard IEC 60825-1. *Seibersdorf Laboratory*, 43(50550):2882, 2017.
- [19] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection et al. ICNIRP Guidelines on Limits of Exposure to Laser Radiation of Wav-

- lengths between 180 nm and 1,000 μm . *Health physics*, 105(3):271–295, 2013.
- [20] IEC 60825-1. *Safety of laser products - Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide*. International Electrotechnical Commission, 2. edition, 2007.
- [21] Karl Schulmeister. Class 3R and the upcoming consumer laser safety standard in europe-A challenge! In *International Laser Safety Conference*, pages 238–247. Laser Institute of America, 2017.
- [22] Jan Daem, Annette Frederiksen, John O'Hagan, and Karl Schulmeister. Laser product safety standardization projects of cenelec tc 76. In *International Laser Safety Conference*, page 403. Laser Institute of America, 2019.
- [23] Gaël Pilard and Hendrik Specht. Investigation on continuously scanning laser systems classified 3R under the IEC 60825-1 edition 3.0 in consumer products. *International Laser Safety Conference*, 2019(1):501, 2019.
- [24] Karl Schulmeister and Mathieu Jean. Manifestation of the strong non-linearity of thermal injury. In *International Laser Safety Conference*, pages 201–204. LIA, 2011.
- [25] Brian J Lund, David J Lund, and Peter R Edsall. Damage threshold from large retinal spot size repetitive-pulse laser exposures. In *International Laser Safety Conference*, pages 84–87. LIA, 2009.
- [26] Brian J Lund, David J Lund, Peter R Edsall, and Victor D Gaines. Laser-induced retinal damage threshold for repetitive-pulse exposure to 100- μs pulses. *Journal of biomedical optics*, 19(10):105006, 2014.
- [27] R Birngruber, F Hillenkamp, and VP Gabel. Theroretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Physics Society*, 48:781–796, 1985.
- [28] Steven L Jacques. Ratio of entropy to enthalpy in thermal transitions in biological tissues. *Journal of biomedical optics*, 11(4):041108, 2006.
- [29] Ralf Brinkmann, Gereon Hüttmann, Jan Rögener, Johann Roider, Reginald Birngruber, and Charles P Lin. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 27(5):451–464, 2000.

- [30] Bernard S Gerstman, Charles R Thompson, Steven L Jacques, and Mark E Rogers. Laser induced bubble formation in the retina. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 18(1):10–21, 1996.
- [31] Markolf H Niemz. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [32] Georg Schüle, Marco Rumohr, Gereon Huettmann, and Ralf Brinkmann. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the microsecond-to-millisecond time regimen. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(2):714–719, 2005.
- [33] Michael William Kelly. *Intracellular cavitation as a mechanism of short-pulse laser injury to the retinal pigment epithelium*. PhD thesis, Tufts university, 1997.
- [34] Robert G King Jr and Walter J Geeraets. The effect of Q-switched ruby laser on retinal pigment epithelium in vitro. *Acta ophthalmologica*, 46(4):617–632, 1968.
- [35] Ho Lee, Clemens Alt, Costas M Pitsillides, and Charles P Lin. Optical detection of intracellular cavitation during selective laser targeting of the retinal pigment epithelium: dependence of cell death mechanism on pulse duration. *Journal of Biomedical Optics*, 12(6):064034, 2007.
- [36] J Rögner. Schadensmechanismus bei der Laserbestrahlung des retinalen Pigmentepithels mit Nano- und Mikrosekundenpulsen. *University of Hamburg, Diploma-work*, 1998.
- [37] Jan Rögner, Ralf Brinkmann, and Charles P Lin. Pump-probe detection of laser-induced microbubble formation in retinal pigment epithelium cells. *Journal of Biomedical Optics*, 9(2):367–372, 2004.
- [38] Jörg Neumann. Mikroskopische Untersuchungen zur laserinduzierten Blasenbildung und -dynamik an absorbierenden Mikropartikeln. *Institute of Biomedical Optics, Lübeck*, 2005.
- [39] Dale J Payne, Richard A Hopkins, Brent Eilert, Gary D Noojin, David J Stolarski, Robert J Thomas, Clarence P Cain, Gordon T Hengst, Paul K Kennedy, Thomas R Jost, et al. Comparative study of laser damage threshold energies in the artificial retina. *Journal of biomedical optics*, 4(3):337–345, 1999.

-
- [40] MA Mainster, TJ White, JH Tips, and PW Wilson. Retinal-temperature increases produced by intense light sources. *JOSA*, 60(2):264–270, 1970.
- [41] Karl Schulmeister, Bernhard Seiser, Florian Edthofer, Johannes Husinsky, and Letizia Farmer. Retinal thermal damage threshold studies for multiple pulses. In *Ophthalmic Technologies XVII*, volume 6426, page 642626. International Society for Optics and Photonics, 2007.
- [42] CD Clark III, WJ Marshall, and RJ Thomas. Theoretical analysis of multiple-pulse thermal damage thresholds of the retina. *Journal of Laser Applications*, 25(1):012005, 2013.
- [43] Clarence P Cain, Robert J Thomas, Gary D Noojin, David J Stolarski, Paul K Kennedy, Gavin D Buffington, and Benjamin A Rockwell. Sub-50-fs laser retinal damage thresholds in primate eyes with group velocity dispersion, self-focusing and low-density plasmas. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 243(2):101–112, 2005.
- [44] David H Sliney and David J Lund. Do we over-state the risk of multiple pulsed exposures? In *International Laser Safety Conference*, volume 2009, pages 93–98. LIA, 2009.
- [45] Brian J Lund, David J Lund, and Peter R Edsall. Damage threshold from large retinal spot size repetitive-pulse laser exposures. *Health physics*, 107(4):292–299, 2014.
- [46] HW Hemstreet Jr, JS Connolly, and DE Egbert. Ocular hazards of picosecond and repetitive-pulsed lasers. volume i. nd: Yag laser (1064 nm). Technical report, Technology Inc San Antonio Tex Life Sciences DIV, 1978.
- [47] Bruce E Stuck, David J Lund, and Edwin S Beatrice. Repetitive pulse laser data and permissible exposure limits. Technical report, Letterman Army Inst. of research San Francisco CA, 1978.
- [48] CH Skeen, WR Bruce, JH Tips Jr, MG Smith, and GG Garza. Ocular effects of repetitive laser pulses. Technical report, Technology INC San Antonio TX Life Sciences, DIV, 1972.
- [49] Robert W Ebbers. Retinal effects of a multiple-pulse laser. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 35(5):252–256, 1974.
- [50] William D Gibbons and David E Egbert. Ocular damage thresholds for repetitive pulsed argon laser exposure. Technical report, School of aerospace medicine Brooks AFB TEX, 1974.

- [51] Gary A Griess and Michael F Blankenstein. Multiple-pulse laser retinal damage thresholds. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 42(4):287–292, 1981.
- [52] David J Lund, Bruce E Stuck, and Edwin S Beatrice. Biological research in support of project miles. Technical report, Letterman Army Inst. of research San Francisco CA, 1981.
- [53] Johann Roider, Franz Hillenkamp, Thomas Flotte, and Reginald Birngruber. Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18):8643–8647, 1993.
- [54] David J Stolarski, Clarence P Cain, Cynthia A Toth, Gary D Noojin, and Benjamin A Rockwell. Multiple pulse thresholds in live eyes for ultrashort laser pulses in the near infrared. In *Laser-Tissue Interaction X: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*, volume 3601, pages 22–26. International Society for Optics and Photonics, 1999.
- [55] Georg Schüle. *Mechanismen und On-line Dosimetrie bei selektiver RPE Therapie*. Dissertation.de, 2003.
- [56] Carsten Framme, Georg Schuele, Johann Roider, Dietmar Kracht, Reginald Birngruber, and Ralf Brinkmann. Threshold determinations for selective retinal pigment epithelium damage with repetitive pulsed microsecond laser systems in rabbits. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*, 33(5):400–409, 2002.
- [57] Brian J Lund, David J Lund, and Peter R Edsall. Damage threshold from large retinal spot size repetitive-pulse laser exposures. *Health physics*, 107(4):292–299, 2014.
- [58] Jie Zhang, Ranjani Sabarinathan, Tracy Bubel, David R Williams, and Jennifer J Hunter. Spectral dependence of light exposure on retinal pigment epithelium (RPE) disruption in living primate retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12):2220–2220, 2016.
- [59] William T Ham, Harold A Mueller, John J Ruffolo, and AM Clarke. Sensitivity of the retina to radiation damage as a function of wavelength. *Photochemistry and photobiology*, 29(4):735–743, 1979.
- [60] Peter William Atkins and Julio De Paula. *Physikalische Chemie*. John Wiley & Sons, 2013.
- [61] Detlef Kamke and Wilhelm Walcher. Thermische Energie (Wärme). In *Physik für Mediziner*, pages 180–255. Springer, 1994.

- [62] Klaus Stierstadt. *Thermodynamik: von der Mikrophysik zur Makrophysik*. Springer-Verlag, 2010.
- [63] Horatio Scott Carslaw and John Conrad Jaeger. *Conduction of heat in solids*. Clarendon press, 1992.
- [64] Orla M Wilson, Xiaoyuan Hu, David G Cahill, and Paul V Braun. Colloidal metal particles as probes of nanoscale thermal transport in fluids. *Physical Review B*, 66(22):224301, 2002.
- [65] HS Carslaw. Jc jaeger. *Conduction of heat in solids*, 2, 1959.
- [66] Karl Schulmeister, Bruce E Stuck, David J Lund, and David H Sliney. Review of thresholds and recommendations for revised exposure limits for laser and optical radiation for thermally induced retinal injury. *Health Physics*, 100(2):210–220, 2011.
- [67] A Karabutov, NB Podymova, and VS Letokhov. Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media. *Applied Physics B*, 63(6):545–563, 1996.
- [68] Minghua Xu and Lihong V Wang. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of scientific instruments*, 77(4):041101, 2006.
- [69] M Menzinger and RL Wolfgang. Bedeutung und Anwendung der Arrhenius-Aktivierungsenergie. *Angewandte Chemie*, 81(12):446–452, 1969.
- [70] Clifton D Clark, Michael L Denton, and Robert J Thomas. Mathematical model that describes the transition from thermal to photochemical damage in retinal pigment epithelial cell culture. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):020504, 2011.
- [71] Ashley J Welch, Martin JC Van Gemert, et al. *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*, volume 2. Springer, 2011.
- [72] Rüdiger Paschotta et al. *Encyclopedia of laser physics and technology*, volume 1. Wiley Online Library, 2008.
- [73] Martin Löffler-Mang, Helmut Naumann, and Gottfried Schröder. *Handbuch Bauelemente der Optik: Grundlagen, Werkstoffe, Geräte, Messtechnik*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2020.
- [74] Frank Pedrotti, Leno Pedrotti, Werner Bausch, and Hartmut Schmidt. *Optik für Ingenieure*. Springer, 2005.
- [75] Heinz Haferkorn. *Optik: physikalisch-technische Grundlagen und Anwendungen*. John Wiley & Sons, 2008.

- [76] Andreas Rose, Kyle Johnston, Karl-Friedrich Klein, Brian Catanzaro, and Luis De Taboada. Mode field perturbations and numerical aperture broadening due to angular misalignment in multimode fiber coupling. In *Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications IX*, volume 7173, page 71730Y. International Society for Optics and Photonics, 2009.
- [77] Joseph M Kahn, Keang-Po Ho, and Mahdih Bagher Shemirani. Mode coupling effects in multi-mode fibers. In *Optical Fiber Communication Conference*, pages OW3D–3. Optical Society of America, 2012.
- [78] R Lüllmann-Rauch and E Asan. *Histologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage*. Auflage Thieme, Stuttgart, 2015.
- [79] Jens Huppelsberg and Kerstin Walter. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2013.
- [80] Ralf Brinkmann, Stefan Koinzer, Kerstin Schlott, Lars Ptaszynski, Marco Bever, Alexander Baade, Susanne Luft, Yoko Miura, Johann Roider, and Reginald Birngruber. Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *Journal of biomedical optics*, 17(6):061219, 2012.
- [81] David H Sliney and Stephen L Trokel. Investigational and research lasers. In *Medical Lasers and Their Safe Use*, pages 113–126. Springer, 1993.
- [82] William P Roach, Clarence Cain, Kurt Schuster, Kevin Stockton, David Stolarski, Robert Galloway, and Benjamin A Rockwell. Model predictions and measured skin damage thresholds for 1.54- μm laser pulses in porcine skin. In *Laser Interaction with Tissue and Cells XV*, volume 5319, pages 325–334. International Society for Optics and Photonics, 2004.
- [83] Steven L Jacques. Laser-tissue interactions. photochemical, photothermal, and photomechanical. *The Surgical clinics of North America*, 72(3):531–558, 1992.
- [84] Ernst Sutter, Paul Schreiber, and Günter Ott. *Handbuch Laser-Strahlenschutz: Grundlagen, Vorschriften, Schutzmaßnahmen*. Springer-Verlag, 2013.
- [85] Randolph D Glickman. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *International journal of toxicology*, 21(6):473–490, 2002.

- [86] Paul K Kennedy. A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media. i. theory. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 31(12):2241–2249, 1995.
- [87] Paul K Kennedy, Stephen A Boppart, Daniel X Hammer, Benjamin A Rockwell, Gary D Noojin, and WP Roach. A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media. ii. comparison to experiment. *IEEE Journal of quantum electronics*, 31(12):2250–2257, 1995.
- [88] Yuen-Ron Shen. The principles of nonlinear optics. *New York*, 1984.
- [89] LV Keldysh et al. Ionization in the field of a strong electromagnetic wave. *Sov. Phys. JETP*, 20(5):1307–1314, 1965.
- [90] Clarence P Cain, Robert J Thomas, Gary D Noojin, David J Stolarski, Paul K Kennedy, Gavin D Buffington, and Benjamin A Rockwell. Sub-50-fs laser retinal damage thresholds in primate eyes with group velocity dispersion, self-focusing and low-density plasmas. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 243(2):101–112, 2005.
- [91] Michael W Kelly and Charles P Lin. Microcavitation and cell injury in rpe cells following short-pulsed laser irradiation. In *Laser-Tissue Interaction VIII*, volume 2975, pages 174–179. International Society for Optics and Photonics, 1997.
- [92] Jörg Neumann and Ralf Brinkmann. Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *Journal of biomedical optics*, 10(2):024001, 2005.
- [93] Randolph D Glickman, Steven L Jacques, Jon A Schwartz, Tom Rodriguez, Kwok-Wai Lam, and Gwen Buhr. Photodisruption increases the free-radical reactivity of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. In *Laser-Tissue Interaction VII*, volume 2681, pages 460–467. International Society for Optics and Photonics, 1996.
- [94] Mathieu Jean, Sebastian Kotzur, Nico Heußner, Karl Schulmeister, and Annette Frederiksen. Computer modelling to support laser safety analysis of pulse trains with varying peak power and pulse duration. In *International Laser Safety Conference*, volume 2019, page 202. LIA, 2019.
- [95] WP Hansen and S Fine. Melanin granule models for pulsed laser induced retinal injury. *Applied Optics*, 7(1):155–159, 1968.

- [96] CR Thompson, BS Gerstman, SL Jacques, and ME Rogers. Melanin granule model for laser-induced thermal damage in the retina. *Bulletin of mathematical biology*, 58(3):513–553, 1996.
- [97] Markus Luecking, Ralf Brinkmann, Scarlett Ramos, Wilhelm Stork, and Nico Heussner. Capabilities and limitations of a new thermal finite volume model for the evaluation of laser-induced thermo-mechanical retinal damage. *Computers in Biology and Medicine*, page 103835, 2020.
- [98] Dhiraj K Sardar, Michael L Mayo, and Randolph D Glickman. Optical characterization of melanin. *Journal of biomedical optics*, 6(4):404–411, 2001.
- [99] Weiye Song, Lei Zhang, Steve Ness, and Ji Yi. Wavelength-dependent optical properties of melanosomes in retinal pigmented epithelium and their changes with melanin bleaching: a numerical study. *Biomedical optics express*, 8(9):3966–3980, 2017.
- [100] JR Hayes and Myron L Wolbarsht. Thermal model for retinal damage induced by pulsed lasers. *Aerospace Medicine*, 39(5):474–480, 1968.
- [101] Myron L Wolbarsht et al. *Laser applications in medicine and biology*, volume 1. Springer, 1971.
- [102] FC Henriques Jr. Studies of thermal injury; the predictability and the significance of thermally induced rate processes leading to irreversible epidermal injury. *Archives of pathology*, 43(5):489–502, 1947.
- [103] R Birngruber, VP Gabel, and F Hillenkamp. Experimental studies of laser thermal retinal injury. *Health Physics*, 44(5):519–531, 1983.
- [104] R Birngruber, F Hillenkamp, VP Gabel, et al. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys*, 48(6):781–796, 1985.
- [105] Sharon Thomsen. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser–tissue interactions. *Photochemistry and photobiology*, 53(6):825–835, 1991.
- [106] Natalia P Matylevitch, Steven T Schuschereba, Jennifer R Mata, George R Gilligan, David F Lawlor, Cleon W Goodwin, and Phillip D Bowman. Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury. *The American journal of pathology*, 153(2):567–577, 1998.

- [107] AN Takata, L Goldfinch, JK Hinds, LP Kuan, and N Thomopoulos. Thermal model of laser-induced eye damage. Technical report, IIT Research Inst Chicago IL Engineering DIV, 1974.
- [108] Ashley J Welch and Garrett D Polhamus. Measurement and prediction of thermal injury in the retina of the rhesus monkey. *IEEE transactions on biomedical engineering*, pages 633–644, 1984.
- [109] Karl Schulmeister, Bruce E Stuck, David J Lund, and David H Sliney. Review of thresholds and recommendations for revised exposure limits for laser and optical radiation for thermally induced retinal injury. *Health Physics*, 100(2):210–220, 2011.
- [110] David J Lund, Bruce E Stuck, and Peter Edsall. Retinal injury thresholds for blue wavelength lasers. *Health Physics*, 90(5):477–484, 2006.
- [111] William T Ham, Harold A Mueller, and David H Sliney. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. *Nature*, 260(5547):153–155, 1976.
- [112] Thomas J Dougherty. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 20(1):3–7, 2002.
- [113] Werner K Noell, Virgil S Walker, Bok Soon Kang, and Steven Berman. Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 5(5):450–473, 1966.
- [114] Malgorzata B Rozanowska. Light-induced damage to the retina: current understanding of the mechanisms and unresolved questions: a symposium-in-print. *Photochemistry and photobiology*, 88(6):1303–1308, 2012.
- [115] John Marshall. Radiation and the ageing eye. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 5(3):241–263, 1985.
- [116] John Mellerio. Principles and practice of ophthalmology. *Light Effects on the Retina*, 116:1–23, 1994.
- [117] DH Sliney and ML Wolbarsht. Safety with lasers and other optical sources. new york: 1980.
- [118] Skatskaia GK Chemnyĭ AB Pivovarov NN Komarova AA, Mozherenkov VP. Action of reflected laser radiation on the eye. *Vestn Oftalmol*, 1:46–50, 1978.
- [119] Robert Bunsen and Henry Roscoe. Photochemische untersuchungen. *Annalen der Physik*, 184(10):193–273, 1859.

- [120] Dariusz Leszczynski, Costas M Pitsillides, Riikka K Pastila, R Rox Anderson, and Charles P Lin. Laser-beam-triggered microcavitation: a novel method for selective cell destruction. *Radiation research*, 156(4):399–407, 2001.
- [121] Randolph D Glickman, Steven L Jacques, Jon A Schwartz, Tom Rodriguez, Kwok-Wai Lam, and Gwen Buhr. Photodisruption increases the free-radical reactivity of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. In *Laser-Tissue Interaction VII*, volume 2681, pages 460–467. International Society for Optics and Photonics, 1996.
- [122] Murtuza Lokhandwalla and Bradford Sturtevant. Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (swl): I. analysis of cell deformation due to swl flow-fields. *Physics in Medicine & Biology*, 46(2):413, 2001.
- [123] David Needham and Rashmi S Nunn. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical journal*, 58(4):997–1009, 1990.
- [124] Tadeusz Sarna. New trends in photobiology: properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 12(3):215–258, 1992.
- [125] David John Finney. *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University press, Cambridge, 1952.
- [126] Arthur R Menendez, Frank E Cheney, Joseph A Zuclich, and Phelps Crump. Probability-summation model of multiple laser-exposure effects. *Health physics*, 65(5):523–528, 1993.
- [127] Brian J Lund. The probitfit program to analyze data from laser damage threshold studies. Technical report, Northrop Grumman Corp. San Antonio TX information technology, 2006.
- [128] Scarlett Ramos, Wilhelm Stork, and Nico Heussner. Multiple-pulse damage thresholds on the retinal pigment epithelium layer using top hat profiles. In *Optical Interactions with Tissue and Cells XXXI*, volume 11238, page 112380D. International Society for Optics and Photonics, 2020.
- [129] Eric Seifert, Jan Tode, Amelie Pielen, Dirk Theisen-Kunde, Carsten Framme, Johann Roeder, Yoko Miura, Reginald Birngruber, and Ralf Brinkmann. Selective retina therapy: toward an optically controlled automatic dosing. *Journal of biomedical optics*, 23(11):115002, 2018.

- [130] Georg Schuele, Hanno Elsner, Carsten Framme, Johann Roider, Reginald Birngruber, and Ralf Brinkmann. Optoacoustic real-time dosimetry for selective retina treatment. *Journal of biomedical optics*, 10(6):064022, 2005.
- [131] Nadine Tinne. *Wechselwirkung fs-Laser-induzierter Kavitationsblasen bei der Gewebedissektion in der Ophthalmologie*. PhD thesis, Universität Hannover, 2014.
- [132] Andreas Fritz, Lars Ptaszynski, Hardo Stoehr, and Ralf Brinkmann. Dynamics of laser induced transient micro bubble clusters. In *European Conference on Biomedical Optics*, page 7373_0D. Optical Society of America, 2009.
- [133] Jörg Neumann and Ralf Brinkmann. Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *Journal of biomedical optics*, 11(4):041112, 2006.
- [134] Hardo Stoehr, Lars Ptaszynski, Andreas Fritz, and Ralf Brinkmann. Interferometric optical online dosimetry for selective retina treatment (srt). In *European Conference on Biomedical Optics*, page 6632_29. Optical Society of America, 2007.
- [135] Ginger M Pocock, Jeffrey W Oliver, Charles S Specht, J Scot Estep, Gary D Noojin, Kurt Schuster, and Benjamin A Rockwell. High-resolution in vivo imaging of regimes of laser damage to the primate retina. *Journal of ophthalmology*, 2014, 2014.
- [136] Mathieu Jean, Karl Schulmeister, EYK Ng, UR Acharya, A Campilho, and JS Suri. Modeling of laser-induced thermal damage to the retina and the cornea. *Image Analysis and Modeling in Ophthalmology*, page 265, 2014.
- [137] Mathieu Jean and Karl Schulmeister. Validation of a computer model to predict laser induced retinal injury thresholds. *Journal of Laser Applications*, 29(3):032004, 2017.
- [138] Sebastian Kotzur, Siegfried Wahl, and Annette Frederiksen. Simulation of laser induced retinal thermal injuries for non-uniform irradiance profiles and their evaluation according to the laser safety standard. In *Tissue Optics and Photonics*, volume 11363, page 1136314. International Society for Optics and Photonics, 2020.
- [139] Max Born and Emil Wolf. *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Elsevier, 2013.

- [140] Alexander Laskin, Peter Kaiser, Vadim Laskin, and Aleksei Ostrun. Laser beam shaping for biomedical microscopy techniques. In *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V*, volume 9887, page 98872E. International Society for Optics and Photonics, 2016.
- [141] Joseph A Zuclich, David J Lund, Peter R Edsall, Richard C Hollins, Peter Alan Smith, Bruce E Stuck, Leon N McLin, Paul K Kennedy, and Stephen Till. Variation of laser-induced retinal damage threshold with retinal image size. In *Laser-Induced Damage in Optical Materials: 1999*, volume 3902, pages 64–66. International Society for Optics and Photonics, 2000.
- [142] Brian Jason Lund, David J Lund, and Peter R Edsall. Laser-induced retinal damage threshold measurements with wavefront correction. *Journal of biomedical optics*, 13(6):064011, 2008.
- [143] Vanessa Neuhaus et al. Assessment of long-term cultivated human precision-cut lung slices as an ex vivo system for evaluation of chronic cytotoxicity and functionality. *Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)*, 12, 2017.
- [144] Judith Krawinkel. *Neuartige Ansätze für die laserbasierte Manipulation von Zellen mit Hilfe plasmoneninduzierter Effekte*. Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH and Springer Spektrum, Wiesbaden, 1. edition, 2017.
- [145] Wolfgang A Dengler, Julia Schulte, Dietmar P Berger, Roland Mertelsmann, and Heinz H Fiebig. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-cancer drugs*, 6(4):522–532, 1995.
- [146] Martin A Mainster. Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. In *Seminars in ophthalmology*, volume 14, pages 200–209. Taylor & Francis, 1999.
- [147] Edward A Böttner and J Reimer Wolter. Transmission of the ocular media. *Investigative ophthalmology & visual science*, 1(6):776–783, 1962.
- [148] Veit-Peter Gabel, Reginald Birngruber, and Franz Hillenkamp. Visible and near infrared light absorption in pigment epithelium and choroid. *Proc. 23rd Consilium Ophthalmologicum, Kyoto) Excerpta Medica*, pages 658–62, 1978.
- [149] Andrew G Hallam. *Mode control in multimode optical fibre and its applications*. PhD thesis, Aston University, 2007.

- [150] Marian Rabe, Hendrik Krüger, Eric Ebert, Nils Damaschke, and Hartmut Ewald. Mode filter for LED-based absorption spectroscopy. In *2016 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings*, pages 1–5. IEEE, 2016.
- [151] Vitalii E Gusev and Aleksandr A Karabutov. Laser optoacoustics. *STIA*, 93:16842, 1991.
- [152] Ralf Brinkmann, Norbert Koop, Mustafa Oezdemir, Clemens Alt, Georg Schuele, Charles P Lin, and Reginald Birngruber. Selective damage of pigmented cells by means of a rapidly scanned cw laser beam. In *Laser Tissue Interaction XIII: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*, volume 4617, pages 134–140. International Society for Optics and Photonics, 2002.
- [153] Ian Grierson, Paul Hiscott, Penny Hogg, Helen Robey, Ank Mazure, and Genevieve Larkin. Development, repair and regeneration of the retinal pigment epithelium. *Eye*, 8(2):255–262, 1994.
- [154] Lili Lu, Brain C Oveson, Young-Joon Jo, Thomas W Lauer, Shinichi Usui, Keiichi Komeima, Bing Xie, and Peter A Campochiaro. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4):715–724, 2009.
- [155] Arunn Narasimhan. *Heat and Mass Transfer Processes in the Eye*, pages 1–35. Springer International Publishing, Cham, 2017.
- [156] Sebastian Kotzur, Siegfried Wahl, and Annette Frederiksen. Simulation of laser induced retinal thermal injuries for non-uniform irradiance profiles and their evaluation according to the laser safety standard. In *Tissue Optics and Photonics*, volume 11363, pages 117 – 128. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2020.
- [157] David J Lund and David H Sliney. A new understanding of multiple-pulsed laser-induced retinal injury thresholds. *Health physics*, 106(4):505–515, 2014.
- [158] Clifton D Clark and Gavin D Buffington. On the probability summation model for laser-damage thresholds. *Journal of Biomedical Optics*, 21(1):015006, 2016.
- [159] David J Lund and Bruce E Stuck. Retinal injury thresholds for blue wavelength lasers. In *International Laser Safety Conference*, volume 2003, pages 50–56. Laser Institute of America, 2003.

- [160] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. IC-NIRP guidelines on limits of exposure to laser radiation of wavelengths between 180 nm and 1,000 μm . *Health physics*, 105(3):271–295, 2013.
- [161] David J Lund and Bruce E Stuck. Retinal injury thresholds for blue wavelength lasers. In *International Laser Safety Conference*, volume 2003, pages 50–56. Laser Institute of America, 2003.
- [162] GA Griess and MF Blankenstein. Additivity and repair of actinic retinal lesions. *Investigative ophthalmology & visual science*, 20(6):803–807, 1981.

EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

JOURNALARTIKEL

- Lipp, S., Kotzur, S., Elmlinger, P., & Stork, W. (2020). Multiple-pulse damage thresholds of retinal explants in the ns-time regime. *Biomed. Opt. Express* 11, 7299-7310
- Lücking, M., Brinkmann, R., Ramos, S., Stork, W., & Heussner, N. (2020). Capabilities and limitations of a new thermal finite volume model for the evaluation of laser-induced thermo-mechanical retinal damage. *Computers in Biology and Medicine*, 103835.

KONFERENZBEITRÄGE

- Ramos, S., Reh, M., Zeck, G., & Heussner, N. (2018, May). Evaluation of short pulse laser damage to the retinal pigment epithelium layer: a key point for the assessment of devices using the nanosecond regime. In *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI* (Vol. 10685, p. 106850H). International Society for Optics and Photonics.
- Ramos, S., Elmlinger, P., Stork, W., & Heussner, N. (2020, April). Influence of the beam profile on laser-induced thresholds using explants. In *Tissue Optics and Photonics* (Vol. 11363, p. 113631D). International Society for Optics and Photonics.
- Ramos, S., Stork, W., & Heussner, N. (2020, February). Multiple-pulse damage thresholds of retinal explants using top hat profiles. In *Optical Interactions with Tissue and Cells XXXI* (Vol. 11238, p. 112380D). International Society for Optics and Photonics.
- Heussner, N., Ramos, S., Lücking, M., Schwarz, C., & Frederiksen, A. (2019, March). Eye safety evaluation of laser systems based on damage calculations. In *International Laser Safety Conference* (Vol. 2019, No. 1, p. 204). Laser Institute of America.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stork, der diese Arbeit ermöglicht hat. Vielen Dank für das Interesse an meiner Arbeit und für die Möglichkeit eigene Ansätze mit viel Freiheitsgrad verfolgen zu können.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Alois Herkommer für die freundliche Übernahme des Korreferats und vor allem dafür, dass er mich durch spannende Vorlesungen bereits im Grundstudium für Optik begeistert hat.

Dank gilt zudem meinen Kollegen im Unternehmen, die mir den Arbeitsalltag sehr angenehm machten und in fachlichen Diskussionen stets gute Ideen einbrachten. Dabei möchte ich mich besonders bei meinen Betreuern Philipp und Nico bedanken für die interessanten Fachdiskussionen und euren stets hilfreichen Input.

Ich möchte mich zudem bei Dr. Karl Schulmeister für die zahlreichen Gespräche bedanken und den daraus resultierenden Impulsen für weitere Forschungsschwerpunkte.

Außerdem bedanke ich mich für die Unterstützung seitens der Augenklinik bei der Durchführung der Experimente und dem starken Durchhaltevermögen bei besonders langen Messtagen. Vielen Dank Sven, Agnes und Heidi für die angenehme Kooperation der letzten Jahre.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem meiner Mutter Cristina, die immer versucht hat mich positiv zu stimmen und mich stets moralisch unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich durch viel Zuspruch nie haben aufgeben lassen. Mein besonderer Dank gilt dabei Alice, die vor allem in der schwierigsten Phase immer für mich da war.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Ehemann Dennis, dessen tägliche Motivation und Unterstützung die Arbeit signifikant erleichtert haben. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast und mir stets ein Lächeln ins Gesicht gezaubert hast.