



Optische-Kohärenztomographie-Angiographie (OCT-A) bei Ratten

Hintergrund

Innovative Weiterentwicklungen im Bereich der retinalen Bildgebung ermöglichen die Visualisierung des posterioren Pols des Auges in vivo mit einer zunehmend verbesserten Auflösung und höherem Kontrast. Mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO) und der optischen Kohärenztomographie (OCT) können retinale Strukturen nichtinvasiv und in vivo in Echtzeit dargestellt werden. Dabei nutzt die OCT, ähnlich dem Prinzip der Ultraschall Diagnostik, die Interferenz, die bei der Überlagerung von Referenzlicht und rückgestreutem Licht in einem Interferometer entsteht. Es werden nichtinvasive Schnittbilder und dreidimensionale Volumenaufnahmen der Retina und der Chorioidea erzeugt [7]. Für die Visualisierung der retinalen und chorioidalen Perfusion bedurfte es bislang der invasiven Fluoreszenzangiographie. Diese ermöglicht durch den intravenös applizierten Farbstoff die Gefäßdarstellung sowie Detektion weiterer gefäßassoziierter Phänomene, einschließlich Leckage aus hyperpermeablen Gefäßen sowie Staining- und Poolingphänomene. Technische Innovationen im Bereich der OCT-Systeme und die zunehmende Leistungsfähigkeit sowie Geschwindigkeit der Prozessoren erlauben seit Kurzem eine kontrastmittelfreie und OCT-basierte Darstellung der retinalen und chorioidalen Gefäße über das Verfahren der sogenannten OCT-Angiographie (OCT-A). Das Untersuchungsverfahren der OCT-A er-

möglicht die OCT-basierte in vivo Darstellung der retinalen und chorioidalen Gefäße durch den Vergleich von 2 oder mehrerer hintereinander aufgenommener B-Scans der gleichen Position. Über das unterschiedliche Reflexionsverhalten sich bewegendes Partikel (wie etwa Blut) in einer statischen Umgebung kann mithilfe softwarebasierter Bildverarbeitungsprogramme der Bewegungskontrast in den unterschiedlichen Aufnahmen ermittelt und dargestellt werden [7]. Es können so dreidimensionale und tiefenselektive Aufnahme der Gefäße erstellt werden. Derzeit sind erste OCT-A Geräte kommerziell für die Anwendung am menschlichen Auge erhältlich oder befinden sich kurz vor der Zulassung.

Die OCT-A, wie auch die konventionelle OCT und die cSLO, sind zwar (in der Regel) für den Menschen entwickelt worden, fanden in den letzten Jahren für spezielle wissenschaftliche Fragestellungen aber auch z. T. Anwendung bei der in vivo Bildgebung an Tieren, einschließlich Mäusen, Ratten und Kaninchen [3, 11, 14, 15, 18]. Im Fokus der in vivo Bildgebung bei Tieren stehen u. a. transgene Tierlinien oder induzierte Krankheitsmodelle [6, 9]. So konnte die retinale Zellapoptose in Echtzeit [17] sowie die laserinduzierte chorioidale Neovaskularisation (CNV) im Tiermodell untersucht werden [10]. Das Modell der laserinduzierten CNV bei Tieren wurde bereits zur Untersuchung von neuen Farbstoffformulierungen oder zum molekularen in vivo Imaging eingesetzt [12, 13]. Weitere Untersuchungen mit Tiermodellen im Bereich der in vivo Bildgebung durch innovative Kamerasysteme könnten zum grundlegenden Verständ-

nis der Krankheitsmechanismen von retinalen und chorioidalen Erkrankungen beitragen und der Evaluation neuer Behandlungsverfahren dienen. Gerade das Auge mit seinen einzigartigen optischen Eigenschaften und einfachem Zugang zu anatomischen Strukturen stellt ein vielversprechendes Organ zur in vivo Visualisierung von zellulären und molekularen Prozessen im Inneren des Körpers dar [16]. Kürzlich haben verschiedene Autoren anhand der nichtinvasiven Untersuchung der OCT-A das Gefäßnetzwerk bei unbehandelten Meerschweinchen und Ratten sowie Mäusen mit laserinduzierter chorioidaler Neovaskularisation beschrieben [2, 3, 11, 19].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Erprobung eines für das menschliche Auge entwickelten Prototypen zur OCT-A Bildgebung an Ratten und der direkte Vergleich zur konventionellen cSLO Fluoreszein-Angiographie (FAG).

Methoden

Tiere

Alle Versuche wurden an pigmentierten, männlichen Dark Agouti Ratten (ab ca. 200 g, von Janvier Labs, Rennes, Frankreich, $n = 3$) durchgeführt. Alle Handlungen wurden nach den Richtlinien der „Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ durchgeführt, sodass zu jeder Zeit ein sorgfältiger und tiergerechter Umgang gewährleistet war.

Die Versuchstiere wurden zu Beginn jeder Untersuchung durch eine dem Körpergewicht entsprechende Do-

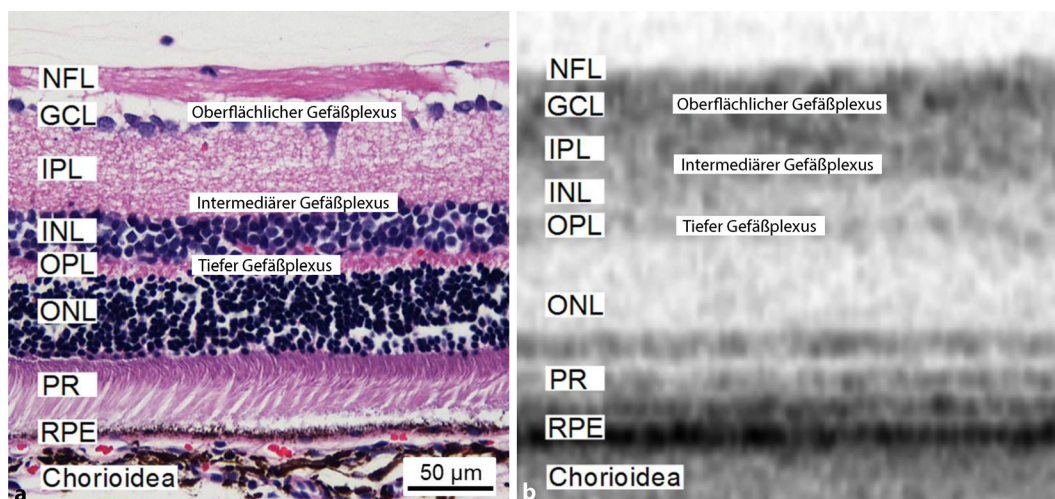


Abb. 1 ▲ Querschnitt (a) und OCT-Scan (b) durch die Rattenretina. In dem Hämalaun & Eosin gefärbten Querschnitt sind die einzelnen morphologischen Schichten des hinteren Augenabschnittes sowie die eingezeichneten retinalen Kapillarplexus zu erkennen. Die retinalen Blutgefäße in der Nervenfaserschicht bis zur inneren plexiformen Schicht formen den oberflächlichen vaskulären Plexus. Der intermediäre vaskuläre Plexus beschreibt die Blutgefäße der inneren plexiformen Schicht bis zur inneren Körnerschicht. Der tiefe vaskuläre Plexus reicht von der inneren Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht; *NFL* Nervenfaserschicht, *GCL* Ganglienzellschicht, *IPL* innere plexiforme Schicht, *INL* innere Körnerschicht, *OPL* äußere plexiforme Schicht, *ONL* äußere Körnerschicht, *PR* Fotorezeptoren, *RPE* retinales Pigmentepithelium

sis einer Anästhetikumstammlösung narkotisiert. Die Stammlösung aus Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Medetomidinhydrochlorid (0,5 mg/kg Körpergewicht) wurde intraperitoneal injiziert (Ketamin: Ketamin 10 %, WDT, Garbsen, Deutschland; Medetomidinhydrochlorid: Orion Pharma, Elanco Animal Health, Bad Homburg, Deutschland) [12]. Unmittelbar nach der Injektionsnarkose wurden die Pupillen beider Augen der Versuchstiere mit 0,5 % Tropicamid (Mydriaticum Stulln, Pharma Stulln, Stulln, Deutschland) Augentropfen dilatiert. Diese topische Anwendung wurde zu Beginn jedes Versuchs appliziert.

Die Narkose wurde nach Versuchsende mit einem Gemisch aus 20 % Atipamezolhydrochlorid (1 ml/kg, Antisedan, Orion Pharma, Elanco Animal Health, Bad Homburg, Deutschland) und destilliertem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) beendet. Bei Versuchsende wurde den Versuchstieren topisch Corneregel aufgetragen (Corneregel, Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland).

In vivo Imaging

Die in vivo Imaging Versuche wurden jeweils an einem OCT-A Prototyp (Spectralis Prototyp mit OCT-2 Modul, derzeit noch nicht kommerziell erhältlich) und einem cSLO (Heidelberg Retina Angiograph 2: HRA2) durchgeführt (beide: Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland). In einzelnen Fällen wurde probeweise die Reihenfolge der Untersuchungsmethode geändert. Die bildgebenden Systeme ermöglichen die genaue Aufnahme der verschiedenen Netzhautareale in Echtzeit. Während der in vivo Bildgebung wurden die narkotisierten Versuchstiere auf einer Plattform vor der Apertur der bildgebenden Geräte positioniert. Eine Heizmatte wurde zur Temperaturregulation eingesetzt (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) und der Kopf der Tiere mithilfe einer speziellen Bissklemme ausgerichtet [5, 12]. Die in vivo Aufnahmen wurden mit einer 55° Linse (Heidelberg Engineering GmbH) angefertigt, mit der ein größerer Bereich der Netzhaut erfasst werden kann. Die Adjustierung des Referenzarmes erfolgte im OCT-Prüfenster (OCT-debug window). Anhand einer Schiebescala wurde der Referenzarm entsprechend

der Länge des jeweiligen Rattenauges im Bereich zwischen 29.000 und 31.000 µm eingestellt.

Fluoreszein-Angiographie

Für die cSLO Aufnahmen wurden die Augen sukzessive im Nahinfrarotreflexionsmodus in einer standardisierten Messung im High-Resolution Modus untersucht. Für die blauen Autofluoreszenzaufnahmen (Anregung: 488 nm, Emission 500–700 nm) wurde die Laserintensität auf 100 % (ca. 2,7 mW) und die Detektorsensitivität auf 94 % gestellt, um anschließend aus einer Bildserie von 30 Einzelbildern ein gemitteltes Bild zu erfassen.

Nach der Leeruntersuchung der Augen mit dem cSLO erfolgte die Fluoreszenzangiographie mit Fluoreszein (Fluoreszein Alcon, Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland) [1]. Die 10 %ige Fluoreszeinlösung wurde zur Applikation 1:1 mit NaCl verdünnt (Dosierung: 50 mg/kgKG) und intravenös (0,2 ml) injiziert. Unmittelbar nach der Fluoreszeingabe wurde die topografische Verteilung in der Netzhaut mittels cSLO Bildgebung dokumentiert. Ein gemitteltes Bild aus 15 Einzelaufnahmen wurde automatisch durch die Software Heidelberg Eye Explorer (Version 1.9.10.0,

J. H. Meyer · P. P. Fang · T. U. Krohne · W. M. Harmening · F. G. Holz · S. Schmitz-Valckenberg

Optische-Kohärenztomographie-Angiographie (OCT-A) bei Ratten

Zusammenfassung

Hintergrund. Die optische Kohärenztomographie-Angiographie (OCT-A) ermöglicht die nichtinvasive dreidimensionale Darstellung von vaskulären Strukturen der Netzhaut und Aderhaut. In der vorliegenden Studie wurde die Anwendung der neuen bildgebenden Untersuchungsmethode an einem Tiermodell evaluiert.

Methoden. Pigmentierte Agouti Ratten wurden in vivo mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO) und OCT-A (Spectralis Prototyp, Heidelberg Engineering) – nach Anpassung des Referenzarmes – untersucht. Die OCT-A en-face Aufnahmen wurden mit konventionellen Fluoreszein-Angiographie (FAG) cSLO Aufnahmen verglichen. Die Augen wurden anschließend histologisch aufgearbeitet und die einzelnen Gefäßplexus zugeordnet.

Ergebnisse. Mit dem ursprünglich für das menschliche Auge entwickelten Imagingssystem gelingt nach geringfügigen Modifikationen die OCT-A Bildgebung auch an Nagetieren. Hochauflösende und kontrastreiche Aufnahmen ermöglichen bei Ratten mittels OCT-A die Unterscheidung der 3 retinalen Gefäßplexus sowie der inneren und der äußeren Chorioideaschichten. Im Vergleich zur FAG zeichnete sich die Gefäßdarstellung in der OCT-A durch eine höhere Auflösung sowie eine dreidimensionale, tiefenselektive Visualisierung v. a. von tieferen Schichten aus. Der Bildausschnitt der OCT-A ist allerdings momentan noch limitiert.

Diskussion. Mit der neuen bildgebenden OCT-A Untersuchungsmethode können vaskuläre retinale und chorioideale Veränderungen in vivo tiefenselektiv und nichtinvasiv,

ohne vorherige Farbstoffinjektion auch am Nagetier in hoher Auflösung visualisiert werden. Die OCT-A stellt damit eine Alternative zur invasiven FAG bei der Darstellung angiogenetischer Prozesse der Netzhaut dar und hat das Potenzial, die FAG in Zukunft in Teilen zu ersetzen. Speziell im Tiermodell ermöglicht die OCT-A die Untersuchung von retinalen und chorioidalen angiogenetischen Prozessen im natürlichen Verlauf und unter pharmakologischen Interventionen.

Schlüsselwörter

OCT-Angiographie · OCT-A · In vivo Bildgebung · Ratte · Fluoreszein-Angiographie

Optical coherence tomography angiography (OCT-A) in rats

Abstract

Purpose. Optical coherence tomography angiography (OCT-A) allows for the non-invasive, three-dimensional visualization of retinal and chorioidal vascular structures. In this study, this new imaging modality was evaluated in rats.

Methods. In vivo imaging in Dark Agouti rats was performed using confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO) and OCT-A (Spectralis prototype, Heidelberg Engineering) after adjusting the length of the reference arm. The OCT-A en-face images were compared to conventional fluorescein angiography cSLO images. The histological examination allowed for correlation of retinal and chorioidal plexus.

Results. While the diagnostic device was developed for use in humans, OCT-A and cSLO imaging can be applied in rodents after only minor hardware modifications. High-resolution and contrast-enhanced images enable a depth-selective visualization of the three retinal plexus and the inner and outer chorioidal vascular networks. In comparison to fluorescein angiography (FA), OCT-A is characterized by higher resolution and more accurate three-dimensional localization of vascular structures, particularly in deep layers. A current limitation includes the relatively small area imaged by OCT-A.

Discussion. The recently developed OCT-A imaging technology also allows for three-dimensional detection of retinal and chorioidal vascular changes in vivo without dye injection in rodents. OCT may potentially replace invasive FA for specific questions and will be useful in animal models for research of retinal and chorioidal angiogenic processes physiologically and during pharmacological interventions.

Keywords

OCT-angiography · OCT-A · In vivo imaging · Rat · Fluorescein angiography

2014) generiert und als Angiogramm gespeichert. Die Laserintensität betrug während der FAG 20 % und die Detektorsensitivität 51 %. Zu jedem Zeitpunkt wurden Angiogramme mit unterschiedlicher Fokusebene (+10, +8, +6, +2, -6 und -8 dpt) aufgenommen, um die unterschiedliche topografische Verteilung des Farbstoffes im Fundus zu dokumentieren. Um einer möglichen Kataraktbildung während der cSLO Aufnahmen vorzubeugen und die Bildqualität der Aufnahmen zu verbessern, wurde ca.

alle 1–2 min befeuchtende Augentropfen (Oculotect fluid 50 mg/ml, Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland) appliziert.

OCT-A

Für das in vivo Imaging mit dem OCT-A Prototyp wurden Kontaktlinsen für Ratten (Cantor & Nissel Ltd., Brackley, England) verwendet, um eine Kataraktbildung zu vermeiden sowie die Aufnahmequalität zu verbessern. Diese Kon-

taktlinsen wurden mit einem Tropfen Oculotect auf das Auge der Versuchstiere gebracht. Anschließend wurden unterschiedlich große Untersuchungsfelder (20° × 20°, 25° × 25° bzw. 25° × 55°) gewählt (je nach Größe: 350 bis 651 horizontale OCT-A Scans). Für jeden B-Scan wurden 25 Einzelbilder gemittelt. Alle Aufnahmen erfolgten im High-Resolution Modus. Zu jedem Zeitpunkt wurden OCT-A Aufnahmen mit der Fokusebene +17,25 dpt erstellt.

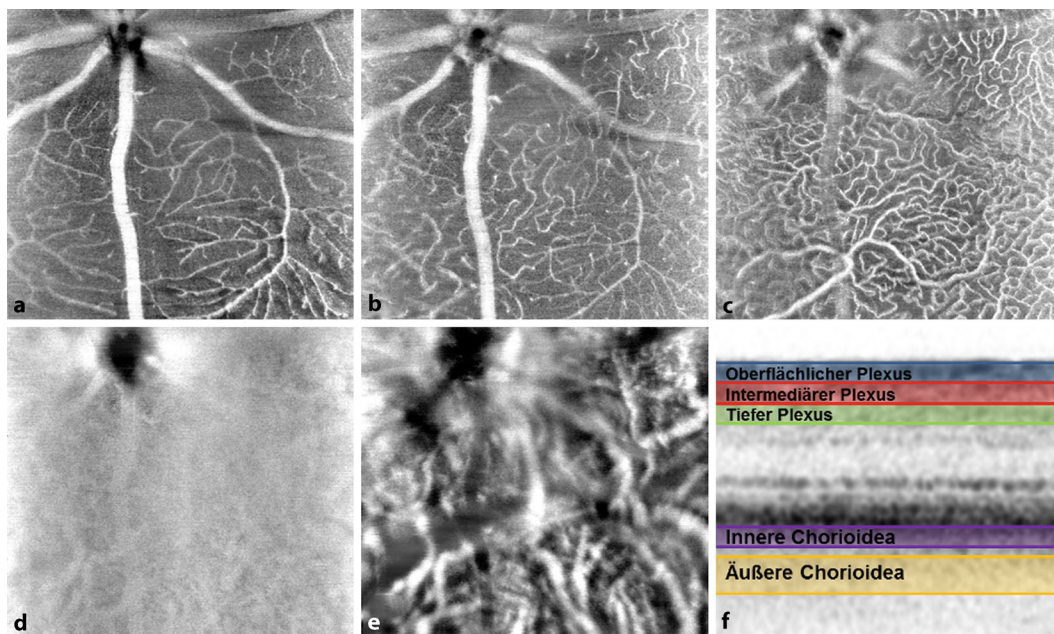


Abb. 2 ◀ Darstellung des oberflächlichen (a), des intermediären (b) und des tiefen (c) Kapillarplexus sowie der inneren (d) und der äußeren (e) Chorioidea der Ratte mittels transversaler OCT-A Analyse. Die OCT-A Segmentierung (f) visualisiert die semimanuell analysierten Ebenen. Der oberflächliche, intermediäre und tiefe Plexus sowie die innere Chorioidea wurden jeweils mit einer Schichtdicke von 30 µm segmentiert, die äußere Chorioidea mit 80 µm

Bildverarbeitung

Mittels Bildverarbeitungssoftware wurde die Verteilung der Pixelwerte innerhalb eines Bildes durch Veränderung der Helligkeit und des Kontrastes optimiert (Adobe Photoshop CS5, 64 Bit, Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Dank der konfokalen Optik ist es möglich, sektionelle Schnitte durch die Rattenetzhaut zu legen, wobei nach Abschätzung der typischen Refraktion des Rattenauges eine Veränderung von 1 dpt der konfokalen Optiken des cSLO einer Veränderung der Fokusebene von etwa 20 µm entspricht. Auch wenn die Tiefenauflösung des detektierten Signals eingeschränkt blieb, erlaubte dieses Vorgehen die Unterscheidung von Nervenfaserschicht sowie innerer und äußerer Netzhaut der Ratte im Reflektionsmodus [16].

Bei dem Verfahren der OCT-A wurde mittels integrierter Segmentierungssoftware im Anschluss an die Generierung der Aufnahmen sowohl die automatische als auch die manuelle Segmentierung verwendet. Für die Darstellung der Retina und Chorioidea der Ratte wurde die Segmentierung semimanuell durchgeführt. Obwohl für das humane Auge entwickelt, ermöglichen die automatischen Segmentierungsebenen (der Heidelberg Engineering Software, Version 6.0.204.5) auch die Anpassung an die ana-

tomische Kurvatur der Retina der Ratte. Zudem erfolgte die manuelle Verschiebung dieser Segmentierungsebene und des Segmentierungsbereiches zur selektiven Darstellung der einzelnen retinalen und chorioidalen Schichten. Für die Aufnahmen der retinalen Plexus sowie der inneren Chorioidea wurde ein Segmentierungsbereich von 30 µm und für die äußere Chorioidea von 80 µm verwendet. Die **Abb. 1** zeigt die nach der Literatur beschriebene Lokalisation der einzelnen retinalen Gefäßplexus in einem histologischen Querschnitt sowie in einem OCT-Scan des Rattenauges.

Histologische Untersuchungen

Nach der in vivo Bildgebung wurden die Ratten mit 100 % CO₂ euthanasiert, die Augen entnommen und über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Präparate wurden anschließend in 70 % Ethanol überführt, in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol (100 %) gereinigt. Nach der Paraffineinbettung wurden 5 µm dicke, serielle Querschnitte des Auges mit einem Rotationsmikrotom (Thermo Scientific Shandon Finesse 325 Mikrotom, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland) angefertigt. Die Querschnitte wurden mit Hämalaun

und Eosin (H&E) gefärbt und mit dem Lichtmikroskop untersucht (**Abb. 1a**).

Ergebnisse

In vivo Bildgebung mittels OCT-A

Mit dem ursprünglich für das menschliche Auge entwickelte Imagingssystem der OCT-A konnten hochauflösende und kontrastreiche Aufnahmen der zentralen und mittelperipheren Netzhaut generiert werden (**Abb. 2**). Unter Variation des vertikalen Segmentierungsbereiches waren oberflächlicher, intermediärer und tiefer retinaler Kapillarplexus sowie die innere und äußere Chorioidea darstellbar (**Abb. 2**).

In den Aufnahmen wurden deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen diesen einzelnen Gefäßschichten ersichtlich. Im Bereich der radiär zur bzw. von der Papille verlaufenden Stammgefäße waren deutlich einzelne Kapillaren des oberflächlichen Plexus abzugrenzen (**Abb. 2**). Bei Verschiebung der Segmentierung nach posterior waren Kapillaren des intermediären Plexus zu erkennen. Diese zeichneten sich durch ein dichteres Netz mit horizontalen und vertikalen Kapillaren aus, die aufgrund von Artefakten des oberflächlichen Plexus weniger deutlich zu differenzieren waren (**Abb. 2**). Im Bereich des tie-

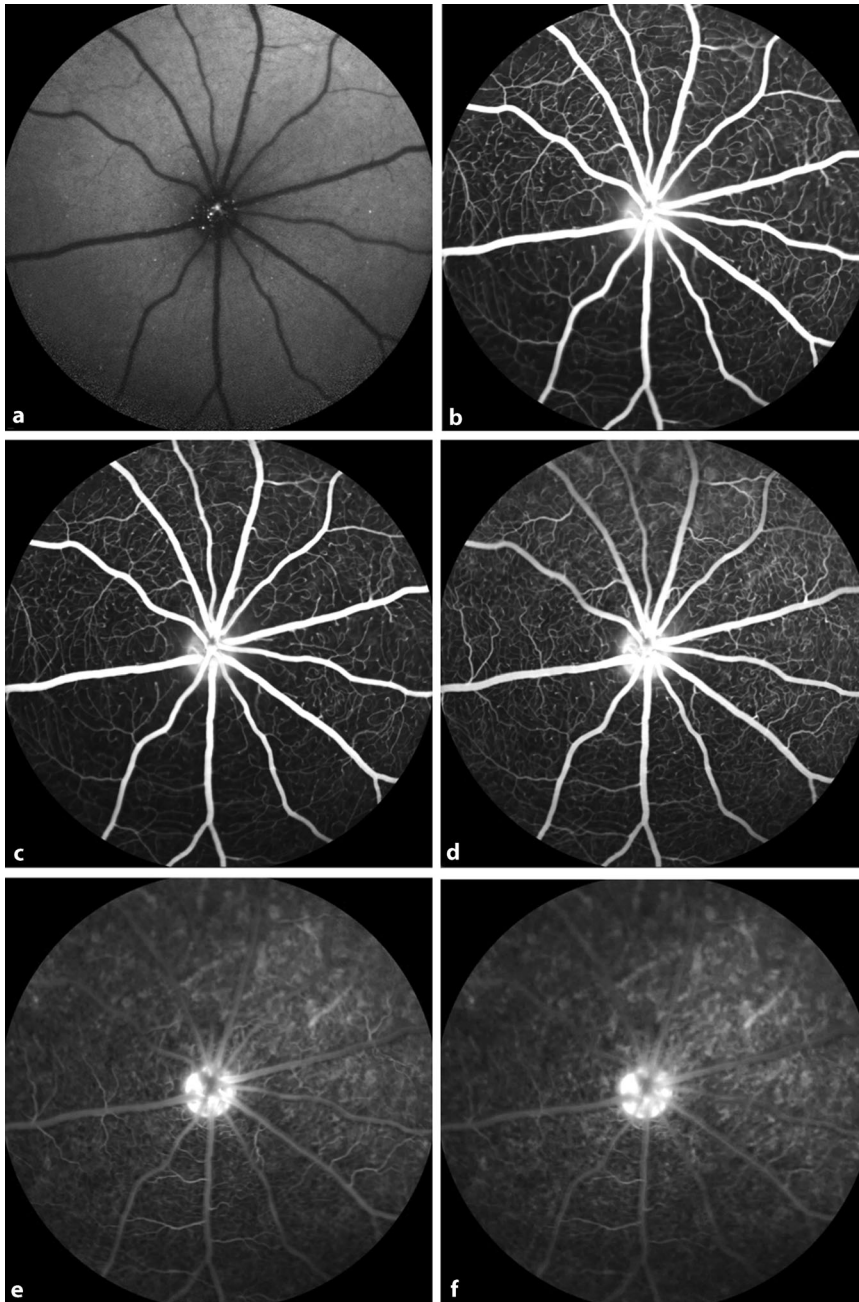


Abb. 3 ▲ Fluoreszein-Angiographie der Ratte (Aufnahmen anhand des konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskops) vor (a) und nach (b–f) der intravenösen Farbstoffapplikation. Die Aufnahmen wurden mittels unterschiedlicher Fokusebenen erstellt (a +8 Dioptrien, b +8 Dioptrien, c +6 Dioptrien, d +2 Dioptrien, e –6 Dioptrien, f –8 Dioptrien)

fen Plexus konnte ein noch dichteres Kapillarnetz detektiert werden. Auch hier erwiesen sich die einzelnen Kapillaren des tiefen Plexus als deutlich abgrenzbar, während die Kapillaren des oberen Plexus – bis auf die Projektionsartefakte der großen Stammgefäße – nicht mehr zu identifizieren waren (Abb. 2). Weiter nach posterior im Bereich der inneren Chorioidea zeigten

sich Aderhautgefäße schemenhaft. Tief in der Aderhaut – bei zunehmendem Verschwinden von Projektionsartefakten der retinalen Gefäße – konnten große Aderhautgefäße visualisiert werden. Diese zeigten sich als kaliberstarke, größtenteils parallel verlaufende Gefäße. Charakteristisch stellten sich die Aderhautgefäße durch ein verstärktes Signal im Vergleich zum Hintergrund

(„hell“) dar, während große Aderhautgefäße beim gesunden, humanen Auge in diesen Schichten üblicherweise ein verringertes Signal („dunkel“) zeigen [7]. Die mittlere Gesamtdauer einer Aufnahme mit einem Untersuchungsfeld von $25^\circ \times 25^\circ$ (651 B-Scans, inklusive Speicherzeit) lag bei diesem Prototypen Gerät bei ca. 9 min (ca. 5–6 min Aufnahmezeit und ca. 3 min Speicherung).

Fluoreszein-Angiographie mittels cSLO

Die cSLO-Bildgebung im Modus der FAG zeigte vor Farbstoffapplikation (Leer) das typische Autofluoreszenzbild mit leicht erhöhtem Hintergrundsignal im Bereich der Chorioidea, während das Signal im Bereich retinaler Gefäße und des Sehnervs stark verringert war (Abb. 3a). Nach der Farbstoffgabe konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich der retinalen Gefäße und des Sehnervenkopfes sowie ein schwächeres Hintergrundsignal im Sinne einer Anfärbung der Aderhaut (Abb. 3b–f) beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität nahm über den Beobachtungszeitraum von 10 min kontinuierlich ab. Durch die Wahl von unterschiedlichen Fokusebenen mittels der konfokalen Optiken („Tomographie“) wurden selektiv unterschiedliche Bereiche der Netzhaut und Chorioidea aufgenommen. Hierbei konnten verschiedene Ebenen von Kapillaren dargestellt werden und es gelang eine Zuordnung von kleineren Gefäßen in der Fokusebene der Stammgefäße. In tieferen Fokusebenen wurde eine Zunahme des Kapillarnetzes beobachtet, wobei die Abgrenzung von einzelnen Kapillaren zunehmend schwieriger wurde. Eine Unterscheidung zwischen innerer und äußerer Chorioidea war nur sehr grob möglich. Einzelne Aderhautgefäße waren nicht sicher darstellbar (Abb. 3). In allen Ebenen konnte das gesamte Scanfeld der 55° Linse mit einer Aufnahme erfasst werden.

Gegenüberstellung

Die OCT-A Aufnahmen zeigten im Vergleich zu den identischen Ausschnitten der FAG bei hoher Vergrößerung im Be-

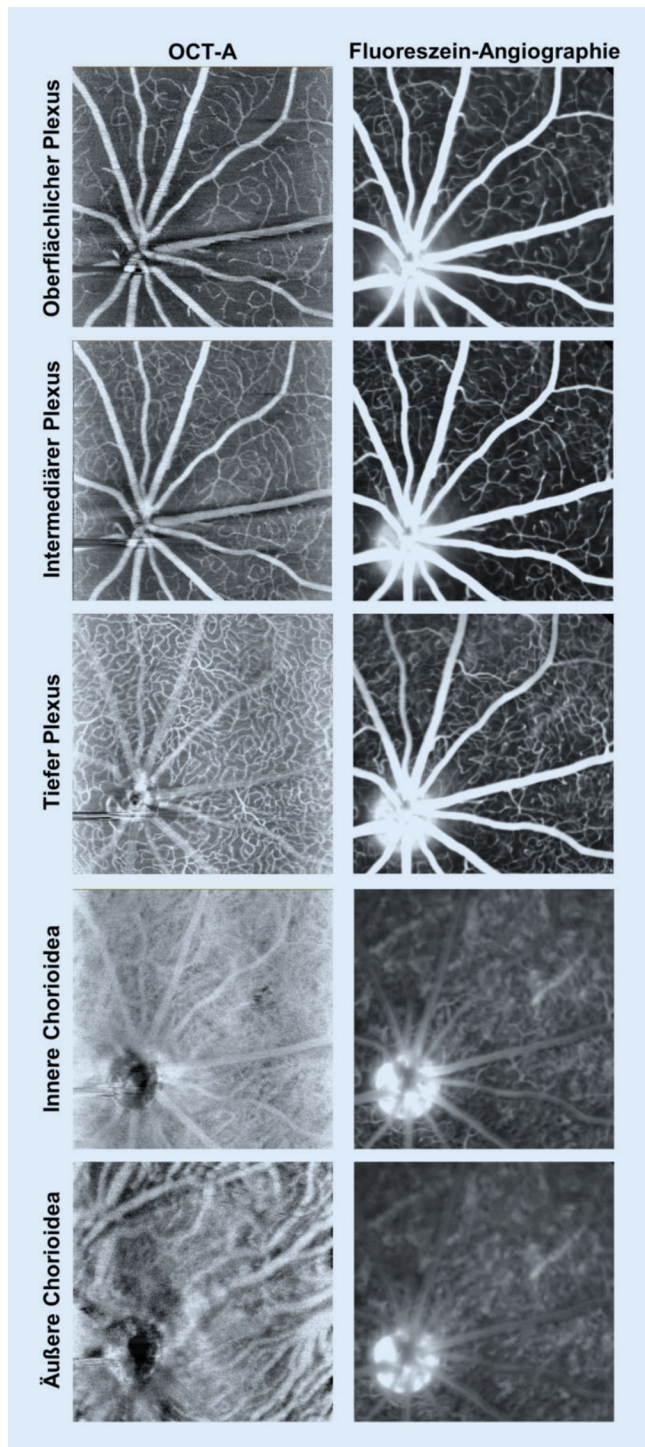


Abb. 4 ◀ Gegenüberstellung der Aufnahmen des hinteren Augenabschnittes zwischen OCT-A und Fluoreszein-Angiographie bei der Ratte. Generell sind einzelne Gefäße anhand der OCT-A besser abgrenzbar, insbesondere in dem tiefen Kapillarplexus, der inneren und äußeren Chorioidea. In den Aufnahmen der FAG sind Projektionsartefakte oberer oder tieferer Gefäße sowie Überstrahlungseffekte sichtbar

reich der 3 retinalen Plexus eine bessere Abgrenzbarkeit der einzelnen Kapillaren (▣ **Abb. 4**). Bei der FAG kam es zu Überbelichtungseffekten bei deutlichem Farbstoffaustritt vor allem im Bereich des Sehnervs. Insgesamt war die Darstellung von retinalen Kapillaren insbesondere im Bereich des tiefen Plexus in der OCT-A deutlich differenzierter

(▣ **Abb. 4**). Die FAG Aufnahmen waren hier durch Projektionsartefakte gekennzeichnet. Zudem zeigten sich auch Unterschiede im Bereich der Aderhaut: Insbesondere in der tiefen Aderhaut konnten mittels der OCT-A einzelne sowie größere Aderhautgefäße im Gegensatz zur FAG abgrenzt werden.

Diskussion

In dieser Studie konnte das neue, nichtinvasive Bildgebungsverfahren der OCT-A an Ratten untersucht und in vivo die retinalen und chorioidalen Strukturen visualisiert werden. Es zeigten sich mehrere Vorteile im Vergleich zur invasiven FAG, welche bislang den Goldstandard bei vaskulären retinalen und chorioidalen Erkrankungen darstellt.

Die in der Literatur beschriebenen 3 retinalen, vaskulären Plexus der Ratte – oberflächlicher, intermediärer und tiefer Plexus – konnten sowohl in der OCT-A als auch in der FAG dargestellt werden. Die beiden Untersuchungsmodalitäten unterschieden sich am deutlichsten in der Tiefenauflösung. Dies spiegelte sich insbesondere in der detailreicheren Darstellung des tiefen retinalen Kapillarplexus sowie der Darstellung der inneren und äußeren Chorioidea wider. Eine Visualisierung der Aderhaut zeigte sich in der konventionellen FAG erschwert, v. a. bedingt durch Leckage aus fenestrierten Gefäße der Choriokapillaris [4]. In den en-face OCT-A Aufnahmen konnten die 3 retinalen Kapillarplexus deutlich anhand des zugehörigen OCT B-Scans zugeordnet werden. Die innere Chorioidea stellte sich als die OCT-angiographisch wohl am wenigsten differenzierbare Gefäßschicht des hinteren Augenabschnittes dar. Insbesondere war hier auch keine klare Darstellung von einzelnen Gefäßen der Choriokapillaris möglich.

Die Zuordnung der 3 vaskulären Plexus in der FAG erwies sich – im Gegensatz zur OCT-A Bildgebung – als deutlich schwieriger, zumal der direkte Vergleich zu den OCT-B-Scans fehlte und die Bestimmung subjektiv anhand der Fokusebenen erfolgte. Insgesamt zeigten sich die Aufnahmen des Augenhintergrundes der Ratte mit der OCT-A nicht nur detailreicher, sondern ermöglichten auch eine präzisere Zuordnung der Plexus. Derzeit ist aber noch zu beachten, dass durch technische Limitierungen nur eine zentrale bis mittelperiphere Darstellbarkeit umschriebener Netzhautareale durch die OCT-A möglich ist.

Es konnte kein Unterschied in der Aufnahmequalität je nach Reihenfolge

der Untersuchungsverfahren festgestellt werden: Die intravenöse Farbstoffinjektion kann ohne Qualitäts- oder Kontrastverlust vor oder nach der OCT-A Bildgebung durchgeführt werden. Generell benötigt das Untersuchungsverfahren der OCT-A zur Visualisierung der Gefäßstrukturen im Auge keine vorherige Applikation von Farbstoffen wie Indocyaningrün oder Fluoreszein, was einen erheblichen Vorteil darstellt. Speziell im Tiermodell bedeutet der Verzicht auf die intravenöse Farbstoffapplikation eine projektionsartefaktärmere Aufnahmetechnik. Weiterhin ist eine klare Abgrenzung der großen Stammgefäße und des Sehnervs möglich, da diese Strukturen in der FAG typischerweise überstrahlt sind. Auch bleiben bei der Verwendung der OCT-A beide Fluoreszenzkanäle des cSLO-Systems unbenutzt, so dass – speziell im Tiermodell – theoretisch 2 weitere Marker zusätzlich zur selektiven Darstellung von Gefäßen mittels gleichzeitiger Anwendung der OCT-A Bildgebung möglich erscheinen. Dies könnte bei der Verwendung von Knock-in-/Knock-out-Tiermodellen und gleichzeitiger Applikation von exogenen Sonden vorteilhaft angewendet werden. Diese Form der molekularen Bildgebung könnte die Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Biomarkern unabhängig von bestehenden retinalen und chorioidalen Gefäßen ermöglichen.

Ein Nachteil der OCT-A – auch im Tiermodell – ist die fehlende Möglichkeit der Darstellung des Einstromverhaltens sowie von Pooling-, Staining- oder Leckagephänomenen, bedingt durch die nichtinvasive Methodik.

Insgesamt konnte in der Studie ein deutlicher Zeitunterschied für die vorgestellten Untersuchungsmethoden beobachtet werden. Für einen repräsentativen Versuchsdurchlauf wurde für die OCT-A eine mittlere Versuchsdauer für eine Aufnahme von ca. 9 min ermittelt, während für die FAG bei der Ratte nach der intravenösen Farbstoffapplikation pro Aufnahme in einer Ebene ca. 15 s (bei allen 5 Ebenen würde die Aufnahme unter 2 min liegen) benötigt wurden. Weiterhin müssen OCT-A Aufnahmen zur Visualisierung noch relativ zeitaufwendig prozessiert werden. Letztendlich ist auch

die wesentliche größere Datenmenge von OCT-A Aufnahmen zu beachten. Es ist damit zu rechnen, dass weitere Softwareentwicklungen und höhere Prozessorgeschwindigkeiten diese Teilschritte erheblich verkürzen werden.

Die vorliegende Untersuchung wurde an einem Prototyp-OCT-A Gerät durchgeführt. Inwieweit ähnliche Aufnahmen mit Geräten anderer Hersteller am Tierauge möglich und vergleichbar sind, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Für die Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Gerätetypen scheint u. a. auch die Verrechnung von Projektionsartefakten in tieferen Netzhautschichten relevant, die hier zu unterschiedlichen Signalstärken führen können. Die derzeitige Untersuchungsmethode ermöglicht die nichtinvasive in vivo Darstellung der retinalen und chorioidalen Gefäße anhand der detektierten Bewegungskontraste, nicht aber die direkte Quantifizierung des Blutflusses. Die Beobachtungen der vorliegenden Studie, insbesondere mit der tiefenselektiven Darstellung der unterschiedlichen Kapillarplexus und dichterem Netz von horizontalen und vertikalen Kapillaren in tieferen Schichten, ist mit der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Leahy et al. vereinbar [11]. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten zur OCT-A Bildgebung bei Nagetieren [3, 11, 19], erfolgte in der vorliegenden Studie ein direkter Vergleich zur FAG.

Mittels der dreidimensionalen, hochauflösenden Darstellung des Augenhintergrundes anhand der OCT-A Bildgebung kann potenziell eine präzise Zuordnung von verschiedenen Pathologien – insbesondere auch in den tiefen Netzhautschichten und der Aderhaut – erfolgen. Dies eröffnet für die Zukunft neue diagnostische Möglichkeiten [8], auch im Rahmen eines engmaschigen Monitorings und könnte somit direkten Einfluss auf zukünftige Therapieregime haben. Auch ist es denkbar, dass die Progression retinaler Krankheiten besser nachvollzogen und so möglicherweise die Diagnostik verfeinert oder individualisiert werden könnte. Die verfeinerte Darstellung der retinalen und chorioidalen Gefäße im Tiermodell anhand der OCT-A könnte neue Wege zur Untersuchung von grundlagenwissenschaftli-

chen Fragestellungen (bspw. anhand von Knock-out-/Knock-in-Modellen) sowie der Identifizierung von elementaren physiologischen und pathologischen Prozessen im Auge eröffnen.

Fazit für die Praxis

In der vorgestellten Studie konnte die in vivo Visualisierung der vaskulären Strukturen der Netz- und Aderhaut mittels der OCT-A an Ratten untersucht werden.

Die OCT-A ermöglicht:

- die einfache Anwendung,
- eine Angiographie ohne intravenöse Fluoreszenzfarbstoffinjektion,
- eine exakte, tiefensensitive Lokalisation von vaskulären Veränderungen,
- eine bessere Darstellbarkeit, insbesondere der tiefen retinalen Kapillaren sowie der Aderhaut,
- parallele Aufnahmen mittels Fluoreszenzkanälen der cSLO (wie der Autofluoreszenz- oder Nahinfrarot-autofluoreszenzmodus) für weitere Marker.

Gegenwärtig ist der Bildausschnitt der OCT-A noch limitiert und Phänomene wie Einstromverhalten, Pooling, Staining oder Leckage können nicht erfasst werden.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. S. Schmitz-Valckenberg

Universitäts-Augenklinik Bonn
Ernst-Abbe-Str. 2, 53127 Bonn, Deutschland
steffen.schmitz-valckenberg@ukb.uni-bonn.de

Danksagung. Die Autoren danken Claudine Strack für die exzellente wissenschaftliche und technische Unterstützung. Finanzielle Unterstützung (WMH) wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (HA5323/5-1) geleistet.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. J.H. Meyer, P.P. Fang, T. U. Krohne, W. M. Harmening, F. G. Holz und S. Schmitz-Valckenberg geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Die hier vorgestellte Netzhautbildgebung wurde mit einem Gerät der Firma Heidelberg Engineering GmbH durchgeführt. Das Gerät wurde von Heidelberg Engineering unentgeltlich der Universitäts-Augenklinik zur Verfügung gestellt. Heidelberg Engineering hatte

keinen Einfluss auf die Planung und Durchführung der hier vorgestellten Versuche.

Alle nationalen Richtlinien zur Haltung und zum Umgang mit Labortieren wurden eingehalten, und die notwendigen Zustimmungen der zuständigen Behörden liegen vor.

Literatur

1. Alcon PG (2009) Fachinformation Fluorescein Alcon 10 %
2. Alnawaiseh M, Rosentreter A, Hillmann A et al (2016) OCT angiography in the mouse: A novel evaluation method for vascular pathologies of the mouse retina. *Exp Eye Res* 145:417–423
3. Atzpödien E-A, Jacobsen B, Funk J et al (2015) Advanced clinical imaging and tissue-based Biomarkers of the eye for toxicology studies in Minipigs. *Toxicol Pathol* 44(3):1–16
4. Choi W, Mohler KJ, Potsaid B et al (2013) Choriocapillaris and Chorioidal microvasculature imaging with ultrahigh speed OCT angiography. *PLoS ONE* 8:e81499
5. Cunea A, Meyer J, Russmann C et al (2014) In vivo imaging with a fundus camera in a rat model of laser-induced chorioidal neovascularization. *Ophthalmologica* 231:117–123
6. Eter N, Engel DR, Meyer L et al (2008) In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3649–3658
7. Fang PP, Harmening WM, Müller PL et al (2015) Technical principles of OCT angiography. *Ophthalmologe* 18:18
8. Fang PP, Lindner M, Steinberg JS et al (2015) Clinical applications of OCT angiography. *Ophthalmologe* 22:22
9. Goody RJ, Hu W, Shafiee A et al (2011) Optimization of laser-induced chorioidal neovascularization in African green monkeys. *Exp Eye Res* 92:464–472
10. Lambert V, Lecomte J, Hansen S et al (2013) Laser-induced chorioidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* 8:2197–2211
11. Leahy C, Radhakrishnan H, Weiner G et al (2015) Mapping the 3D connectivity of the rat inner retinal vascular network using OCT angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:5785–5793
12. Meyer J, Cunea A, Sonntag-Bensch D et al (2014) In vivo imaging of a new indocyanine green micelle formulation in an animal model of laser-induced chorioidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(10):6204
13. Meyer JH, Cunea A, Licha K et al (2016) In vivo imaging of fluorescent probes linked to antibodies against human and rat vascular Endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:759–770
14. Paques M, Guyomard JL, Simonutti M et al (2007) Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2769–2774
15. Paques M, Simonutti M, Roux MJ et al (2006) High resolution fundus imaging by confocal scanning laser ophthalmoscopy in the mouse. *Vision Res* 46:1336–1345
16. Schmitz-Valckenberg S, Guo L, Cheung W et al (2010) In vivo imaging of retinal cell apoptosis following acute light exposure. *Ophthalmologe* 107:22–29
17. Schmitz-Valckenberg S, Guo L, Maass A et al (2008) Real-time in vivo imaging of retinal cell apoptosis after laser exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2773–2780
18. Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N et al (2005) In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res* 45:3512–3519
19. Srinivasan VJ, Radhakrishnan H (2013) Total average blood flow and angiography in the rat retina. *J Biomed Opt* 18:076025