

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. B. Seitz)

**Femtosekundenlaserabtrag und –bildung an der menschlichen vorderen  
Linsenkapsel in vitro**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

vorgelegt von  
Asim Akkaya  
geb. am 02.12.1982 in Wadern

meinen Eltern  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Zusammenfassung.....	6
1.1 Summary .....	8
2 Einleitung .....	10
2.1 Aufbau des menschlichen Auges .....	10
2.2 Die menschliche Linse .....	10
2.2.1 Aufbau der Linse.....	11
2.2.2 Physiologischer Alterungsprozess der Linse.....	11
2.3 Katarakt .....	12
2.3.1 Definition .....	12
2.3.2 Klassifizierung .....	12
2.4 Therapie der Katarakt.....	13
2.4.1 Historische Entwicklung der Kataraktchirurgie.....	13
2.4.2 Moderne Verfahren .....	14
2.4.2.1 Intrakapsuläre Kataraktextraktion .....	14
2.4.2.2 Extrakapsuläre Verfahren.....	15
2.4.3 Schwierigkeiten bei der Operation / Komplikationen.....	15
2.4.3.1 Kapsulorhexis / Eröffnung der vorderen Linsenkapsel.....	15
2.4.3.2 Kindliche Katarakt .....	16
2.4.3.3 Methoden zur Visualisierung der Kapsel.....	17
2.4.3.4 Kapselkontraktionssyndrom.....	18
2.4.3.5 Nachstar (Sekundärkatarakt) .....	19
2.4.4 Laser in der Augenheilkunde .....	20
2.4.4.1 Nd:YAG Laser .....	20
2.4.4.2 Femtosekundenlaser .....	21
2.5 Zielsetzung / Fragestellung dieser Arbeit.....	23
3 Material und Methodik.....	24
3.1 Materialgewinnung und Präparation .....	24
3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie .....	24
3.3 Multiphotonen-Imaging .....	27
3.3.1 Multiphotonen Effekte und Multiphotonen-Imaging.....	27
3.3.2 Autofluoreszenz .....	29
3.3.3 Second harmonic generation .....	29
3.3.4 Transmission und Reflektion .....	29
3.3.5 Für die Bildgebung verwendete Parameter .....	30
3.4 Gewebeabtrag.....	31
3.4.1 Photodisruption .....	31
3.4.2 Abtragsparameter .....	32
3.5 Versuchsreihen .....	35
3.6 Fixierung, Histologie und Elektronenmikroskopie .....	36
3.7 Auswertung, Statistik .....	37

---

4 Ergebnisse .....	38
4.1 Bildgebung .....	38
4.2 Auswirkung unterschiedlicher Geschwindigkeitsparameter auf die Schnittbreite bei konstanter Abtragsleistung und Abtragszeit .....	45
4.2.1 Versuchsreihen .....	45
4.2.2 Ergebnisse .....	46
4.3 Auswirkungen unterschiedlicher Laserleistungen auf die Schnittbreite bei konstanten Abtragszeiten.....	49
4.3.1 Versuchsreihen .....	49
4.3.2 Ergebnisse .....	50
4.4 Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanten Leistungsstufen.....	54
4.4.1 Versuchsreihen .....	54
4.4.2 Ergebnisse .....	55
5 Diskussion .....	60
5.1 Bildgebung und klinischer Einsatz.....	60
5.2 Die ermittelten Schnittbreiten bei unterschiedlichen Parametern .....	63
5.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	65
6 Literaturverzeichnis.....	67
7 Publikationen.....	72
8 Dank .....	73
9 Lebenslauf .....	74

**Abkürzungsverzeichnis**

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
as	Attosekunde ( $10^{-18}$ )
bzw.	beziehungsweise
E	Energie (pro Impuls)
F	Fluence, Energiedichte
f	Laserpulsrate (Frequenz)
fs	Femtosekunden ( $10^{-15}$ )
FS-Laser	Femtosekunden-Laser
GW	Gigawatt
Hz	Hertz
I	Intensität
i. d. R.	in der Regel
IBMT	(Fraunhofer) Institut für Biomedizinische Technik
ICCE	Intrakapsuläre Kataraktextraktion / Intracapsular Cataract Extraction
J	Joule
LASIK	laser-assisted in situ keratomileusis
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MHz	Megahertz
MICS	Micro Incision Cataract Surgery, bimanual microincision
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
MW	Megawatt ( $10^6$ )
mW	Milliwatt ( $10^{-3}$ )
n	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NAD(P)H	Nicotinamadenindinukleotid(phosphat)
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NIR	Near Infrared
nJ	Nanojoule ( $10^{-9}$ )
P	mittlere Leistung
PHAKO	Phakoemulsifikation
PMMA	Polymethylmetacrylate
PMT	Photo Multiplier Tube
s	Sekunden
SHG	Second Harmonic Generation
SICS	Small Incision Cataract Surgery, coaxial phacoemulsification
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Ti:Sa	Titanium:Saphir
TW	Terrawatt ( $10^{12}$ )
u	Schnittqualität: sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
$W_0$	Radius des Laserstrahls im Fokus
$\Delta t$	Pulsdauer
$\lambda$	Wellenlänge

# 1 Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Katarakt ist die häufigste Ursache für eine Beeinträchtigung der Sehleistung des menschlichen Auges. Die einzige effektive Therapie ist das operative Entfernen der getrübbten Linse. Das Eröffnen der Linsenkapsel ist mit verschiedenen intra- und postoperativen Risiken und Komplikationsmöglichkeiten behaftet (Auslaufen der Risskante, Zonulolyse, Nachstar). Viele Komplikationen ließen sich vermeiden, wenn man die Kapsulorhexis druckfrei und präziser ausführen könnte. Ein neuer Ansatz hierfür ist das Eröffnen der vorderen Linsenkapsel mit Hilfe des Lasers. In der vorliegenden Arbeit wurden Grundlagen für den intra- und postoperativen Einsatz des unverstärkten Femtosekundenlasers in der Kataraktchirurgie erforscht.

**Material und Methodik:** Im Rahmen dieses Projektes wurde die bei der Kapsulorhexis gewonnene vordere humane Linsenkapsel mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser in-vitro behandelt. Es wurden intrakapsuläre Schnitte mit unterschiedlichen Geschwindigkeitsparametern, Leistungsniveaus (mittlerer Leistung: 30 bis 100 mW) und Abtragszeiten (17 ms [1/60 s] bis 4 s) durchgeführt sowie Schnittbreiten bei den unterschiedlichen Parametern ermittelt und statistisch ausgewertet. Die Experimente sind mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser *Vitesse 800* (Vitesse, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) in Verbindung mit dem Laser-Scanning-Mikroskop *LSM 410* (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland, LSM 410, modifiziert) durchgeführt worden. Die Laser-Scanning-Mikroskopie (Multiphotonenmikroskopie) ermöglichte im gleichen Strahlengang die unmittelbare Bildgebung der Proben in verschiedenen Darstellungsmodi (Transmissions-/Reflektions- und Autofluoreszenzmodus). Die Auswertung der Schnittbreiten erfolgte anhand der Autofluoreszenzaufnahmen. Zusätzlich wurden einige Proben zur Kontrolle elektronenmikroskopisch (Transmissionselektronenmikroskopie, TEM) untersucht.

**Ergebnisse:** Es zeigte sich, dass mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser präzise Schnitte in der vorderen Linsenkapsel möglich sind. Sowohl in der Bildgebung mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM), als auch in den Kontrolluntersuchungen mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) waren keine größeren unerwünschten Nebeneffekte sichtbar. Wir ermittelten Schnittbreiten zwischen  $0,22 (\pm 0,038) \mu\text{m}$  bis  $1,49 (\pm 0,15) \mu\text{m}$ . Zwischen den Abtragsparametern und den ermittelten Schnittbreiten zeigte sich

nahezu eine lineare Abhängigkeit. Die Variation der Geschwindigkeitsparameter des Laserstrahls hat bei sonst konstanter Abtragszeit und Abtragsleistung Auswirkungen auf die Schnittbreite. Die hochauflösende zeitnahe Bildgebung (Multiphotonenmikroskopie) ermöglicht eine genaue Beurteilung des Gewebes. Es besteht eine gute Übereinstimmung zwischen den ermittelten Werten in Autofluoreszenzbildern und den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern.

**Schlussfolgerung:** Mit Hilfe des unverstärkten Femtosekundenlasers ist es möglich, die vordere humane Linsenkapsel präzise und druckfrei mit nur geringen destruktiven Nebeneffekten zu schneiden. Die Multiphotonenmikroskopie im gleichen Strahlengang erlaubt eine schnelle Bildgebung. Hiermit ist es möglich, den Laserstrahl exakt im Zielgebiet zu fokussieren und so umliegende Strukturen zu schonen. In-vivo Studien müssen zeigen, ob sich unverstärkte Femtosekundenlaser in Zukunft in der Kataraktchirurgie zur Vermeidung und Behandlung von Komplikationen einsetzen lassen.

## 1.1 Summary

### **Femtosecond laser-assisted imaging and surgery of the human anterior lens capsule.**

**Introduction:** Cataract is the most common cause for an impairment of the visual function of the human eye. Surgical removal of the opacified lens is the only effective therapy. The opening of the lens capsule has different intra- and postoperative risks and possibilities of complications (run out of the edge of the rhexis, zonulolysis, secondary cataract). Many complications could be avoided, if it would be possible to perform the capsulorhexis more precisely and pressure-free. A new approach is the laser-assisted opening of the anterior lens capsule. The goal of this thesis is to provide a data set as a basis for intra- and postoperative femtosecond laser application in cataract surgery.

**Material and methods:** Human anterior lens capsules obtained during capsulorhexis were treated with a non-amplified femtosecond laser in-vitro. Intracapsular incisions were made with different speed parameters of the laser beam, power levels (average power: 30 mW up to 100 mW) and ablation (irradiation) times (1/60 s up to 4 s). The width of the incisions at different parameters were measured and statistically evaluated. The experiments were performed with a non-amplified femtosecond laser (Vitesse 800, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) in connection with a laser-scanning-microscop (LSM 410, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany, LSM 410, modified). The laser-scanning-microscopy allowed imaging of the specimens in different imaging modes (transmission-, reflection- and autofluorescence mode) within the same optical path of the beam. Width measurements of the incisions was based on autofluorescence images. Additionally, some specimens were examined with electron microscopy (transmission electron microscopy).

**Results:** Precise incisions in the anterior lens capsule were possible with the non-amplified femtosecond laser. Imaging with laser scanning microscopy (LSM) and control investigations with electron microscopy did not show larger areas of collateral tissue damage. Widths of the incisions were between 0.22 ( $\pm$  0.038)  $\mu\text{m}$  up to 1.49 ( $\pm$  0.15)  $\mu\text{m}$ . An almost linear dependence between the ablation parameters and the width of the incisions was found. Variation of the speed parameters of the laser beam with otherwise constant ablation power and ablation time has an effect on the width of the cut. Fast high resolution imaging (multi-

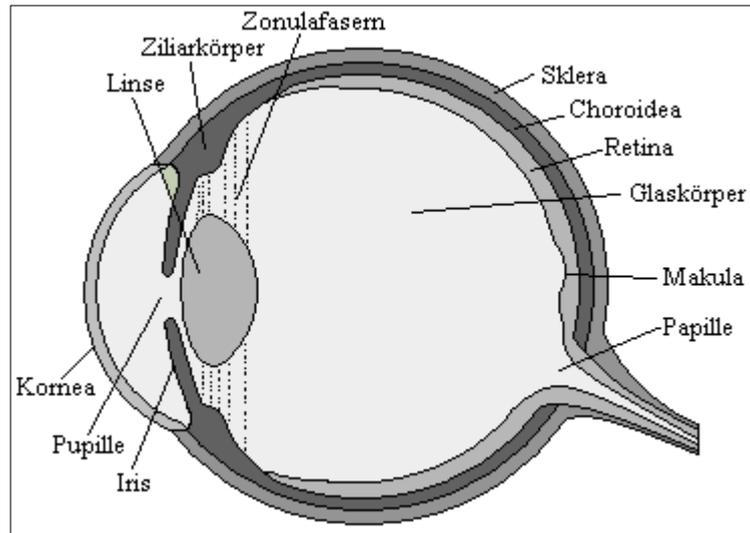
photon-imaging) allows a precise evaluation of tissue. A high correlation exists between the determined values in autofluorescence images and electron microscopic images.

**Conclusion:** It is possible to cut the human anterior lens capsule precisely and pressure-free with only small destructive side effects with the help of a non-amplified femtosecond laser. Multiphoton-microscopy using the same path of the laser beam allows fast imaging. Thereby it is possible to focus the laser beam exactly in the target area and to limit collateral damage in surrounding tissue. In-vivo studies are necessary to investigate whether non-amplified femtosecond lasers may help to avoid and treat complications in cataract surgery.

## 2 Einleitung

### 2.1 Aufbau des menschlichen Auges

Das menschliche Auge (Abb. 2.1) lässt sich in einen vorderen und hinteren Abschnitt unterteilen. Der vordere Abschnitt besteht aus der vorderen und hinteren Kammer. Die Vorderkammer erstreckt sich von der Kornea bis zur Iris. Als Hinterkammer bezeichnet man den Raum zwischen der Iris und der Linse. Die Linse ist über die Zonulafasern am Ziliarmuskel verankert. An ihre posteriore



**Abb. 2.1 Aufbau des menschlichen Auges, schemenhafte Darstellung.**

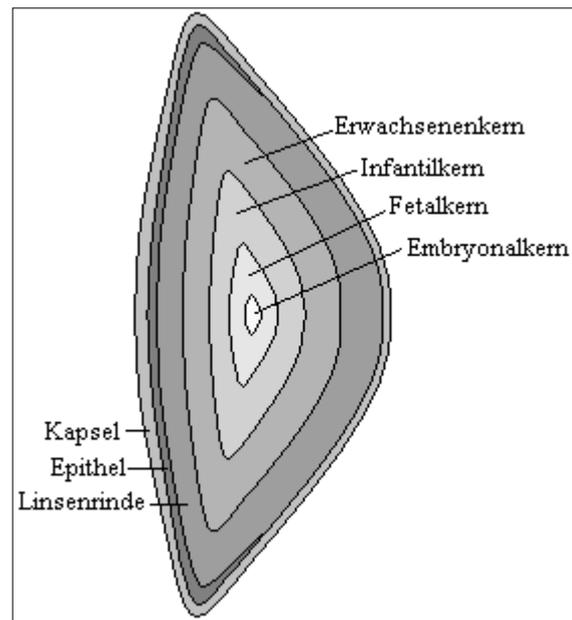
Fläche grenzt der Glaskörper. Am hinteren Pol befindet sich die Netzhaut (Retina), welche die Nervenfasern enthält. Die Aderhaut (Choroidea) enthält die Blutgefäße. Nervenfasern und Blutgefäße treten im Bereich der Papille in das Innere des Auges hinein bzw. verlassen diese. Die Sklera umhüllt nahezu fast das gesamte Auge und grenzt vorne an die Hornhaut (Kornea).

### 2.2 Die menschliche Linse

Die Linse liegt in der hinteren Augenkammer. An ihrem Äquator setzen die Zonulafasern an. Über diese Fasern ist die Linse mit dem Ziliarkörper verbunden (Abb. 2.1). Über diese Fasern werden die Bewegungen des Ziliarmuskels auf die Linse übertragen. Eine Kontraktion des Muskels führt zur Erschlaffung der Fasern, wodurch sich die elastische Linse stärker krümmen kann. Eine Erschlaffung des Muskels führt aufgrund des Muskelzuges zur Abflachung der Linse. Die vordere Fläche liegt hinter der Iris. Die hintere Fläche liegt der Fossa hyaloidea an. Die Linse ist ein Bestandteil des dioptrischen Apparates. Sie fokussiert das einfallende Licht auf der Netzhaut, so dass dort ein scharfes Bild abgebildet werden kann.

### 2.2.1 Aufbau der Linse

Die Linse ist ein kristallklarer, bikonvexer, avaskulärer, elastischer Körper (lens cristallina). Die hintere Fläche ist etwas stärker gekrümmt als die vordere Fläche (vgl. Abb. 2.2). Die Linsenkapsel, welche die Linse umschließt, ist aufgrund ihrer Elastizität für die Verformung bei der Akkomodation verantwortlich. Sie besteht v.a. aus Kollagen Typ IV. Im vorderen Bereich ist die Kapsel bis zu 40  $\mu\text{m}$  dick. Am hinteren Linsenpol findet man die dünnste Stelle mit einer Dicke von etwa 4  $\mu\text{m}$ . An der anterioren und äquatorialen Linsenkapsel ist ein einschichtiges Linsenepithel auf der inneren Seite der Kapsel



**Abb. 2.2 Querschnitt der menschlichen Linse, schematische Darstellung des Aufbaus.**

vorhanden. Die Zelldichte nimmt vom Zentrum zur Peripherie (zum Äquator hin) zu. Die posteriore Kapsel besitzt kein Epithel (Quelle: Augenheilkunde, 2004 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York)

### 2.2.2 Physiologischer Alterungsprozess der Linse

Während des Alterungsprozesses nimmt der Wassergehalt der Linse ab. Der Anteil an unlöslichen Linsenproteinen nimmt im Gegensatz zu. Dies führt zur allmählichen Sklerosierung der Linse. Daraus resultieren die Abnahme der Elastizität und der Verlust der Transparenz. Die Akkomodationsbreite nimmt kontinuierlich ab.

Die Linse differenziert sich aus einer azellulären hyalinen Kapsel mit einer Epithelzellschicht auf der Vorderseite und zentral liegenden Linsenfasern. Die primären Linsenfasern bilden den sogenannten Embryonalkern (primäre Linsenfaserdifferenzierung). Zellen im Äquatorbereich bilden neue Epithelzellen. Diese neu gebildeten Zellen wandern an die Oberfläche der Linse, differenzieren sich zu Fasern und „verdrängen“ die vorhandenen „alten“ Fasern zur Linsenmitte hin. Dabei verlieren sie ihre Organellen, wodurch die Transparenz der Linse gewährleistet wird. Neue Fasern bilden sich während des ganzen Lebens und lagern sich stets

subkapsulär ab. Auf diese Weise entwickeln sich im Laufe des Lebens die verschiedenen Kerne der Linse (siehe Abb. 2.2). Aufgrund der Linsenkapsel können die Zellen und neu gebildete Fasern das Gebiet der Linse nicht verlassen. Dies führt zu einer kontinuierlichen Verdichtung des Gewebes und zu einer Trübung der Linse. Die Trübung der Linse im hohen Alter ist deshalb als ein natürlicher Alterungsprozess anzusehen. Im Laufe des Lebens wächst die Linse und nimmt an Gewicht zu.

## **2.3 Katarakt**

### **2.3.1 Definition**

Von einer Katarakt spricht man, wenn eine Trübung der Linsensubstanz oder der Linsenkapsel vorliegt. Die Katarakt entwickelt sich gewöhnlich sehr langsam über einen längeren Zeitraum hinweg. Dies gilt auch für die altersbedingte Katarakt. Im Gegensatz hierzu gibt es auch Formen der Katarakt, bei denen es sehr rasch zu einer Trübung der Linse kommt (z.B. traumatisch bedingte Katarakt). Die Symptome wie z.B. das verschleierte Sehen, Visusminderung, veränderte Farbwahrnehmung werden von den Patienten individuell unterschiedlich stark wahrgenommen.

### **2.3.2 Klassifizierung**

Für die Entstehung der Katarakt gibt es sehr viele unterschiedliche Ursachen. Für die Klassifizierung der unterschiedlichen Formen gibt es mehrere Möglichkeiten. Man kann die Katarakte nach ihrem Reifestadium, ihrer Form, ihrem Entstehungszeitpunkt und Ursache einteilen. Viele Erkrankungen des Körpers, die primär nicht im Auge lokalisiert sind, begünstigen durch eine okuläre Beteiligung Veränderungen an der Linse und können somit auch zu einer Katarakt führen.

Die nachfolgende Tabelle (Tab 2.1) führt eine Auswahl an wichtigen Ursachen und Formen der Katarakt an:

Ursachen (Auswahl):
Angeborene Katarakte
Juvenile Katarakte
Senile Katarakte
Cataracta complicata; infolge intraokularer Erkrankungen wie z.B. Uveitis
Katarakte bei Allgemein-/ Stoffwechselerkrankungen, z.B. Galaktosämie, Diabetes mellitus, Morbus Wilson
Katarakte bei Syndromen, z.B. Morbus Down, Alport Syndrom
Traumatische Katarakte, z.B. perforierende Verletzungen, Kontusionen
Katarakte durch Medikamenteneinwirkung, z.B. Kortison, Anticholinesterasen
Weitere Ursachen: Siderose, Säure-/Laugenverletzungen, Strahlung, Elektrizität
Formen (Auswahl):
Cataracta corticalis
Cataracta nuclearis
Cataracta corticonuclearis
Cataracta coronaria
Cataracta matura
Cataracta hypermatura

**Tab. 2.1 Formen der Katarakt (Quelle: Checkliste Augenheilkunde, 2005 Georg Thieme Verlag, Stuttgart).**

## 2.4 Therapie der Katarakt

Eine kausale Therapie der Katarakt ist nicht möglich. Ansätze, den Stoffwechsel der Linsen medikamentös zu beeinflussen sind bislang erfolglos geblieben. Die einzige effektive Therapie der Katarakt ist die operative Therapie. Sie wird bei Patienten durchgeführt, die eine deutliche Einschränkung und Störung durch die Trübung haben.

### 2.4.1 Historische Entwicklung der Kataraktchirurgie

Alten Schriften kann man entnehmen, dass man sich schon vor Jahrtausenden mit der Therapie der Linsentrübung beschäftigt hat. Die sogenannte Starstichmethode wurde über 2000 Jahre bis in das 19. Jahrhundert angewendet. Hierbei wurde mit einer Nadel in das Auge gestochen und die getrübe Linse aus der optischen Achse in den hinteren Augenabschnitt

luxiert. J. Daviel (Jacobo Daviel, 1696-1762) ließ später nur den Linseninhalt nach unten in das Auge heraustreten. Die Linsenkapsel blieb hierbei erhalten. Die Hornhaut wurde mit einem 2/3-Schnitt kreisförmig nach unten hin eröffnet. Anschließend wurde die Linsenkapsel mit einer Nadel eröffnet und der Inhalt abgelassen (Davielscher Löffel). Dieses OP-Verfahren ist die erste extrakapsuläre Staroperation. Später wurde die Technik durch Johann Heinrich Jung (Jung-Stilling, 1740-1817) modifiziert. Der Hornhautschnitt in dieser Methode war deutlich kleiner. Er verlief halbkreisförmig im unteren Bereich der Hornhaut. Friedrich v. Jaeger entwickelte eine Technik, in der er die Hornhaut im oberen Bereich kreisförmig eröffnete (1840). A. v. Graefe führte die Operation mit der Technik des Starschnittes durch (1866). Dieser Schnitt verlief oberhalb der Hornhaut. Um in den Bereich der Linse zu gelangen wurde hierbei auch ein Teil der Regenbogenhaut entfernt.

## **2.4.2 Moderne Verfahren**

Erst in der Neuzeit wurden Verfahren zur kompletten Entfernung der Linse entwickelt. Aufgrund der fehlenden Linse musste die Brechkraft des Auges mit sehr starken Brillen ausgeglichen werden. Sir Herold Ridley implantierte 1949 die erste Kunstlinse zur Korrektur der Aphakie. Zu Beginn war diese Methode mit hohen Komplikationsraten verbunden. Über Jahrzehnte hinweg wurden verschiedene Operationsvarianten für das Ersetzen der getrübten Linse stetig weiterentwickelt. Die eingesetzten Kunstlinsen und die verwendeten Materialien wurden ebenfalls über die Jahre hinweg verbessert.

### **2.4.2.1 Intrakapsuläre Kataraktextraktion**

Bis vor etwa 20 Jahren war die Methode der intrakapsulären Kataraktextraktion (ICCE) die Methode der Wahl. Über einen größeren Schnitt in der Hornhaut wurde ein Kältestift in das Auge hineingeführt und damit die Linse angefroren. Die so verankerte Linse wurde zusammen mit der Linsenkapsel aus dem Auge entfernt. Heute wird dieses Verfahren nur noch selten angewendet, z.B. bei luxierten Linsen.

### **2.4.2.2 Extrakapsuläre Verfahren**

Das heutzutage angewendete Standard-Operationsverfahren ist die extrakapsuläre Kataraktextraktion. Zunächst wird die vordere Linsenkapsel kreisförmig eröffnet (Kapsulorhexis). Danach wird der Linsekern mit Hochfrequenzultraschall zertrümmert und dabei gleichzeitig abgesaugt (Phakoemulsifikation). Die hintere Linsenkapsel sowie die Zonulafasern bleiben bei diesem Verfahren erhalten (Kapselsack). Restliche Zellbestandteile im Kapselsack werden anschließend mit einem Saug-Spül-Ansatz gelöst und abgesaugt. Dann wird der leere Kapselsack poliert und die Kunstlinse implantiert. Während der Operation wird eine visköse Substanz in die Vorderkammer gegeben, um diese zu stabilisieren und die umliegenden Strukturen nicht zu verletzen.

Für das Verfahren der Phakoemulsifikation sind dank unterschiedlicher Inzisionstechniken und dem Einsatz von Faltlinsen nur sehr kleine (sklerokorneale oder korneale) Inzisionen notwendig (1,6-3 mm). Steve Shearing hat vor über 20 Jahren die Technik der Mikroinzision beschrieben<sup>50</sup>. Heute werden in einigen Zentren die SICS (Small Incision Cataract Surgery, coaxial phacoemulsification) und die MICS (Micro Incision Cataract Surgery, bimanual microincision) Technik angewendet. Die MICS erlaubt Schnitte unter 2 mm. Vor- und Nachteile beider Verfahren werden kontrovers diskutiert. Die MICS ist weniger traumatisch, u.a. ist der bei der Operation induzierte Astigmatismus geringer ausgeprägt<sup>3</sup>. Jedoch konnten signifikante peri- und postoperative Unterschiede in prospektiven Studien nicht nachgewiesen werden<sup>30</sup>.

### **2.4.3 Schwierigkeiten bei der Operation / Komplikationen**

Bei der Durchführung der Operation gibt es mehrere anspruchsvolle Schritte, die alle mit Risiken verbunden sind. Zudem gibt es eine Reihe von Komplikationen, die nach der Operation auftreten können.

#### **2.4.3.1 Kapsulorhexis / Eröffnung der vorderen Linsenkapsel**

Die Eröffnung der vorderen Linsenkapsel (Kapsulorhexis) ist einer der entscheidenden Schritte bei der Katarakt Operation. Neuhann und Gimbel entwickelten das Verfahren der kontinuierlichen kreisrunden Kapsulorhexis (ccc = continuous circular capsulorhexis)<sup>20, 21</sup>.

Mit einer Nadel oder Pinzette wird die vordere Linsenkapsel zunächst mittig, dann nach außen hin randparallel kreisförmig eingerissen, so dass eine kreisrunde Kapsulorhexis entsteht. Hettlich et al. untersuchten die Kapsel elektronenmikroskopisch und stellten fest, dass die Rhexis allein durch die ausgeübten Kräfte beeinflusst wird, nicht durch den strukturellen Aufbau der Kapsel. Die Rolle der Vorderkammertiefe wird in dieser Arbeit nochmals hervorgehoben. Je tiefer diese ist, desto sicherer und präziser lässt sich die Rhexis durchführen<sup>24</sup>.

Eine präzise und saubere Rhexis vermindert das Risiko von Spätkomplikationen wie z.B. das Kapselkontraktionssyndrom. Das Phänomen der Kapselkontraktion wird in einem gesonderten Kapitel näher erläutert, siehe hierfür Kap. 2.4.3.4.

Eine kontinuierliche kreisrunde Kapsulorhexis hat zur Folge, dass der leere Kapselsack, an welchem noch die Zonulafasern ansetzen, in der Regel während und nach der Operation erhalten werden kann. Hierdurch bleibt die natürliche Trennung des Auges in den vorderen und hinteren Augenabschnitt erhalten. Zudem wird eine stabile Fixiermöglichkeit für die Kunstlinse gewährleistet<sup>44</sup>.

Bei guten Sichtverhältnissen lässt sich die Kapsel gut von benachbarten Strukturen unterscheiden. Das Erkennen der Dicke und des Umfangs der Kapsel ist für eine erfolgreiche Kapsulorhexis unerlässlich. Hierbei spielt das regrediente Licht, welches vom Augenhintergrund zurückreflektiert wird, eine besondere Rolle bei der Orientierung. Folglich ist die Kapsulorhexis bei ungünstigen Sichtverhältnissen nur sehr schwer bzw. überhaupt nicht durchzuführen (siehe Kap. 2.4.3.3).

### **2.4.3.2 Kindliche Katarakt**

Das rechtzeitige Erkennen und die Therapie einer Katarakt bei Kindern ist für die Entwicklung der Sehkraft wegen der Amblyopiegefahr von enormer Bedeutung. Die Operation ist bei Kindern aufgrund anatomischer Verhältnisse erschwert. Das Risiko, benachbarte Strukturen zu verletzen, ist erhöht, ähnlich wie bei der flachen Vorderkammer eines Erwachsenen. Die Kapsel bei Kindern ist jedoch elastischer. Daher sind auch jegliche Manipulationen an der Kapsel schwerer als bei Erwachsenen. Die Größe der Rhexis ist schwerer steuerbar. Im Allgemeinen muss mehr Druck mit dem Instrument ausgeübt werden. Hierbei steigen das Risiko der Schädigung von Nachbargewebe und das Risiko der

Linsluxation. Entzündungsreaktionen und Trübungen der hinteren Linsenkapsel nach einer Operation sind bei Kindern häufiger zu beobachten<sup>46, 47</sup>.

### 2.4.3.3 Methoden zur Visualisierung der Kapsel

Eingeschränkte Sichtverhältnisse durch eine getrübe Hornhaut, Trübungen in der Vorderkammer, des Glaskörpers (fehlender Fundusreflex) oder starke Trübungen der Linse wie z. B. bei der maturen Katarakt erschweren die Operation. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Methoden zur Visualisierung der Linsenkapsel entwickelt.

Das Anfärben der Linsenkapsel ist eine weit verbreitete und sehr häufig genutzte Methode zur Visualisierung der vorderen Kapsel. Bevorzugt wird die Anfärbung der Kapsel mit Trypan-Blau. Indozyanin-Grün und Fluorescein sind Stoffe, die ebenfalls zur Markierung genutzt werden können. Histologische Untersuchungen haben ergeben, dass sich Trypan-Blau v.a. im Bereich der Basalmembran der angrenzenden Linsen-Epithelschicht anreichert (gute Abgrenzung). Die Linsenrinde wird dabei kaum angefärbt<sup>51</sup>. Im klinischen Einsatz erzielen Trypan-Blau und Indozyanin-Grün sowohl während der Operation als auch bei den postoperativen Verläufen nahezu gleiche Ergebnisse<sup>9</sup>.

Die Expositionszeit mit Trypan-Blau sollte so gering wie möglich gehalten werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Sättigung mit dem Farbstoff erst mehrere Stunden nach der Applikation einen Maximalwert erreicht. Dies trifft auch für Fluorescein zu. Im Gegensatz zu Fluorescein färbt sich die Kapsel mit Trypan-Blau deutlich schneller. Aufgrund der langen Halbwertszeiten und des Sättigungsverhaltens muss Fluorescein sehr sorgsam angewandt werden. Nach Trypan-Blau Injektionen sind Fälle von nicht-infektiösen Endophthalmitiden in der Literatur beschrieben worden<sup>62</sup>.

Die Toxizität von Farbstoffen gegenüber dem Hornhautendothel ist umstritten. Studien haben gezeigt, dass die Stoffe sicher angewendet werden können, sofern bestimmte Konzentrationen nicht überschritten werden<sup>28</sup>. In der Literatur finden sich jedoch auch zahlreiche Fälle, in denen die Toxizität von Farbstoffen und deren Auswirkungen beschrieben werden. Einige dieser Komplikationen sind auf die inadäquate Anwendung zurückzuführen. Viele resultieren auch daraus, dass der Farbstoff in manchen Fällen nicht restlos entfernt werden kann. Dies ist bedingt durch das Austreten der Flüssigkeit mit dem Farbstoff in Nachbargewebe, Speicherung des Farbstoffes dort, bzw. durch das Anheften an der eingesetzten Kunstlinse. Die Folge ist eine permanente Irritation des Gewebes und der umliegenden Strukturen.

Besonders das Hornhautendothel reagiert sehr empfindlich gegenüber diesen Stoffen, Ödeme und Trübungen mit daraus resultierenden Sehstörungen sind die Folgen. Die Therapie solcher Komplikationen ist schwierig<sup>7,52</sup>.

Tritt die Färbelösung in umliegende Strukturen ein (z.B. Glaskörper), sollten bestimmte Kunstlinsenmaterialien (z.B. Acryl) vermieden werden, da die Gefahr einer postoperativen Akkumulation in diesen Materialien besteht<sup>17</sup>.

Darüber hinaus bestehen noch weitere Möglichkeiten zur Visualisierung. U.a. sind Operationen mit Hilfe von grünem Licht oder mit Hilfe von modifizierten Operationsmikroskopen beschrieben. Es handeln sich hierbei teilweise um experimentelle Verfahren<sup>1,43</sup>.

#### **2.4.3.4 Kapselkontraktionssyndrom**

Das Kapselkontraktionssyndrom ist eine Komplikation, die nach der extrakapsulären Kataraktextraktion zu beobachten ist. Eine Verkleinerung des Durchmessers der durchgeführten Kapsulorhexis kommt stets vor, unabhängig von der ursprünglichen Kapsulorhexis.

Bei dem Kapselkontraktionssyndrom ist die Schrumpfung besonders stark ausgeprägt. Es kommt zu einer starken Kontraktion der kreisrunden Öffnung, wodurch der Durchmesser der Öffnung drastisch abnimmt. Zudem werden aufgrund der Kontraktion die Zonulafasern gedehnt. Es kann zusätzlich zu einer Veränderung der Lage der implantierten Linse kommen. Das weitere Voranschreiten der Kontraktion führt zu einer Verschlechterung der Sehleistung, v.a. durch die Linsendezentrierung. Die optische Achse des Auges kann auch bei ausgeprägten Fällen durch das Kapselmaterial selbst beeinträchtigt sein. Häufigstes Symptom ist v.a. eine Veränderung der Kontrastsensitivität, weniger der Sehschärfe<sup>23</sup>. Risikofaktoren für das Kapselkontraktionssyndrom sind ein fortgeschrittenes Alter, Uveitis, Schwäche der Zonulafasern sowie das Pseudoexfoliationssyndrom<sup>13,18</sup>.

Übriggebliebene Epithelzellen nach der Operation haben einen Einfluss auf die postoperativen Veränderungen der Kapsel. Je sorgfältiger die Entfernung der Zellen erfolgt, desto geringer ist auch die anschließende Schrumpfung. Eine geringere Schrumpfung erniedrigt das Risiko eines Kapselkontraktionssyndroms<sup>53</sup>.

Die Form der implantierten Linse hat nur einen geringen bis keinen Einfluss auf die Schrumpfung nach der Rhexis<sup>12</sup>. Dagegen spielt das Material der implantierten Kunstlinse bei der Entstehung des Syndroms eine entscheidende Rolle. In unterschiedlichen Studien konnte

gezeigt werden, dass bei bestimmten Materialien das Syndrom häufiger auftritt und die Kontraktionsraten höher sind. Cochener et al. haben in einer Studie die Kontraktionsraten nach der Implantation von Kunstlinsen aus Silikon und PMMA (Polymethylmetacrylate) miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass Schrumpfungen bei Kunstlinsen aus PMMA seltener und weniger stark ausgeprägt sind<sup>10</sup>. Bei dem Kapselkontraktionssyndrom ist v.a. in den ersten Monaten nach der Operation eine starke Schrumpfung zu beobachten. Danach schreitet der Prozess langsamer voran<sup>32</sup>. Das Kapselkontraktionssyndrom wird häufig mit dem Neodym-YAG-Laser behandelt. Auch invasiv chirurgische Maßnahmen können zur Therapie herangezogen werden<sup>4, 64</sup>.

#### **2.4.3.5 Nachstar (Sekundärkatarakt)**

Etwa 30 % aller Patienten entwickeln nach einer extrakapsulären Kataraktextraktion einen Nachstar. Dabei handelt es sich um eine Trübung der hinteren Linsenkapsel. Diese Trübung erfolgt durch regenerierende Prozesse und fibröse Gewebsneubildung, die von übriggebliebenen Epithelzellen ausgehen. Für die primäre Prävention ist deshalb das sorgfältige Entfernen von regenerationsfähigem Material bei der Operation von entscheidender Rolle. Das restlose Entfernen von Zellen ist jedoch sehr schwierig zu erzielen. V.a. die am Äquator liegenden Zellen sind bei der Operation nur schwer zu entfernen.

Typ und Material der eingesetzten Kunstlinse sowie der Durchmesser der Kapsulorhexis spielen für die Prävention ebenfalls eine wichtige Rolle<sup>26</sup>. Das Polieren der Kapsel, v.a. der hinteren Kapsel, sowie der anschließende Saug-Spül-Vorgang ist eine heutzutage routinemäßig durchgeführte Maßnahme zur Prävention des Nachstars. Fibrotische Umbauten lassen sich hierdurch reduzieren. Das Verfahren hat jedoch nur einen geringen Einfluss auf die regenerierende Komponente der Sekundärkatarakt<sup>45</sup>.

Durch die intraokuläre Injektion verschiedener Substanzen während der Operation lässt sich die Entwicklung des Nachstars ebenfalls beeinflussen. Neue Ansätze sind gentechnologische Manipulationen von regenerationsfähigen Zellen<sup>6</sup>. Es stehen viele Substanzen zur Verfügung, welche die Entstehung des Nachstars verzögern bzw. hemmen. Den Weg in den klinischen Alltag haben diese Substanzen jedoch wegen ihrer starken Nebenwirkungen nicht gefunden. Neu entwickelte Kapselspülsysteme ermöglichen einen begrenzt lokalen Einsatz dieser Substanzen. Es bedarf weiterer Forschung, um zu entscheiden, ob diese Verfahren in der Zukunft routinemäßig eingesetzt werden können. Auch Heparin ermöglicht eine effektive

Prävention. Tierversuche mit speziellen Applikationsverfahren lieferten erfolgsversprechende Ergebnisse<sup>63</sup>.

## 2.4.4 Laser in der Augenheilkunde

### 2.4.4.1 Nd:YAG Laser

Der Nd:YAG-(Neodym-YAG-) Laser ist einer der am häufigsten verwendeten Laser in der Augenheilkunde. Er kommt v.a. bei der Behandlung des Nachstars zum Einsatz. Bei dem Nd:YAG-Laser handelt es sich um einen Nanosekundenlaser, d.h. die Pulsdauer des Lasers (Impulsdauer) liegt im Bereich von Nanosekunden. Diese Laser benötigen für die Plasmabildung (laser induced optical breakdown / Photodisruption) im Gewebe Energien im Bereich von Millijoule. Diese relativ hohen Energien sind Voraussetzung für den Gewebeabtrag. Die Schädigungszone, bedingt durch thermische Effekte, reicht einige Millimeter in angrenzendes Gewebe. Sie ist abhängig von der Pulsleistung des Lasers, d.h. von der erreichten Pulsenergie pro Pulsdauer.

Picosekundenlaser (Pulsdauer im Bereich von Picosekunden) benötigen geringere Energien. Sie arbeiten im Mikrojoule Bereich. Die Schädigungszone beträgt im Gegensatz zu den Nanosekundenlasern nur wenige 100  $\mu\text{m}$ <sup>65</sup>.

Kurtz et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der Photodisruption und der Pulslänge des Lasers. Je kürzer die Pulslänge ist, desto präziser sind die Laserabträge<sup>42</sup>. Im nahen Infrarot-Bereich (NIR) arbeitende Femtosekundenlaser haben geringe Pulslängen. Sie ermöglichen eine gute optische Fokussierung und arbeiten sehr präzise.

Der Nd:YAG-Laser wird u.a. für die Behandlung des Nachstars eingesetzt. Das getrübbte Gewebe wird mit dem Laser von außen eröffnet und auf diese Weise aus der optischen Achse entfernt. Dadurch kommt es zum Visusanstieg. Die Nachstarbehandlung mit dem Nd:YAG-Laser gilt heute als effektive und sichere Methode<sup>48</sup>.

Auch das Kapselkontraktionssyndrom kann mit dem Nd:YAG-Laser behandelt werden. Mehrere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass sich das Kapselkontraktionssyndrom mit dem Nd:YAG-Laser sicher behandeln lässt<sup>8, 14</sup>. Trotz der Weiterentwicklung der Nd:YAG-Laser wird die Anwendung für die vordere Kapsulotomie kontrovers diskutiert.

Ungeachtet der weiten Verbreitung des Nd:YAG-Lasers können eine Reihe von Komplikationen auftreten. Wenn die hintere Kapsel bei der Nachstarbehandlung mit dem Laser entfernt wird, ist die Stabilität der eingesetzten Kunstlinse nicht mehr in dem Maße gewährleistet wie ursprünglich. Dies kann im weiteren Verlauf zu einer Linsenluxation führen<sup>16</sup>. Zudem wurden bei bestimmten Linsentypen Schäden an der Kunstlinse nach der Nachstarbehandlung durch die Laserstrahlen beobachtet<sup>19</sup>. Der Anstieg des intraokularen Druckes, ein akuter Glaukomanfall oder Entzündungsreaktionen im Auge nach der Laserbehandlung sind weitere Komplikationen, die auftreten können<sup>2, 5, 11, 27</sup>. Schädigungen an der Netzhaut (z.B. Ödeme) können ebenfalls nach einer Nd:YAG-Laser Behandlung auftreten. Die Inzidenz von Netzhautablösungen steigt ebenfalls an<sup>49</sup>.

In tierexperimentellen Studien wurde untersucht, inwiefern sich bei der vorderen Kapsulotomie mit dem Laser die Strahlen auf die Endothelzellen der Hornhaut auswirken. Es wurden Schäden an Endothelzellen und Änderungen an der Descemet Membran beobachtet<sup>56</sup>.

Diese Komplikationen sind auf die Eigenschaften und die Anwendungsweise des Lasers zurückzuführen. Die Fokussierung erfolgt mit Hilfe eines Zielstrahls. Die korrekte Anwendung erfordert Geschicklichkeit und Erfahrung. Ein weiterer Punkt ist die Präzision des Lasers. Nd:YAG-Laser erlauben nur eine geringe räumliche und zeitliche Fokussierung, d.h. der Laserstrahl besitzt einen relativ großen Durchmesser. Außerdem wird pro Flächeneinheit eine relativ hohe Energie abgegeben. Präzisionsverlust und schlechte Dosierbarkeit sind die Folgen.

#### **2.4.4.2 Femtosekundenlaser**

Verstärkte Femtosekundenlaser werden seit Jahren zur refraktiven Hornhautchirurgie eingesetzt (LASIK). Sie sind präziser als Nanosekunden- und Picosekundenlaser. Jedoch können auch Femtosekundenlaser Schäden verursachen, da bei Gasblasen mit Durchmessern über 12  $\mu\text{m}$  mechanische Folgewirkungen (z.B. Schockwellen) möglich sind<sup>29</sup>. Solche Effekte treten insbesondere bei verstärkten Femtosekundenlasern auf, die im Mikro- ( $\mu\text{J}$ ) bzw. im Millijoule (mJ) Bereich arbeiten.

Ein weiterer unerwünschter Effekt ist das nicht-lineare Selbst-Fokussierungsphänomen. Dies wurde u.a. bei der Anwendung an der Hornhaut beobachtet. Hierbei breitet sich der Laserstrahl unkontrolliert in das Innere des Auges aus. Dies geschieht besonders bei hohen

Pulsenergien und einer schlechten Fokussierung. Das Ausmaß dieser Effekte hängt linear von der Pulsenergie ab, d.h. höhere Pulsenergien haben ausgeprägtere unerwünschte und unkontrollierte Nebeneffekte.

Bei unverstärkten Femtosekundenlasern, die im Nano- (nJ) bzw. im sub-Nanojoule Bereich arbeiten, treten signifikante Nebenschäden seltener und in geringerem Maße auf. Unverstärkte Systeme, die im nahen Infrarotbereich (NIR) arbeiten, können Schnittbreiten unter 200 nm erreichen. König et al. haben nachgewiesen, dass mit solchen Lasersystemen gezielt einzelne Organellen inaktiviert bzw. ausgeschaltet werden können, ohne andere Strukturen oder die Zellmembran zu beeinträchtigen<sup>36, 35, 34</sup>. Durch eine präzise Bearbeitung der Zellmembran sind sogar optische Gentransfers möglich<sup>54</sup>.

In Kombination mit einem Laser-Scanning-Mikroskop ist mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser eine dreidimensionale und zerstörungsfreie in-vivo Bildgebung des Gewebes möglich. Die Bildgebung basiert wie auch die Mikro- und Nanochirurgie auf Multiphotoneneffekten. Mit den Strahlen des Femtosekundenlasers werden Moleküle wie z.B. NAD(P)H und Kollagen angeregt, die anschließende Autofluoreszenz detektiert und in ein digitales Bild umgewandelt<sup>33</sup> (siehe auch Kap. 3.3).

Neben der Bildgebung ist auch das Bearbeiten des Gewebes mit dem gleichen System im gleichen Strahlengang möglich. Durch die Fokussierung des Laserstrahls mit erhöhter Leistung im Gewebe können präzise intrastromale Abträge erzielt werden. In verschiedenen Experimenten wurden in der Hornhaut und in der Netzhaut Schnittbreiten unter 1 µm erzielt<sup>37, 41</sup>.

Die Fokussierung in der Tiefe und die Möglichkeit der intrastromalen Gewebeabtragung ermöglichen einen vielseitigen Einsatz von Femtosekundenlasern in Kombination mit der Laser-Scanning-Mikroskopie. Die zeitnahe in-vivo Bildgebung ist sehr vorteilhaft und ermöglicht sowohl vor, als nach den Eingriffen eine Beurteilung des Gewebes<sup>59, 60</sup>.

Das Besondere an den Systemen mit unverstärkten Femtosekundenlasern in Verbindung mit der Laser-Scanning-Mikroskopie ist die Vereinigung von Schneideinstrument und Bildgebung in einem Gerät. Bei dem Schneideinstrument handelt es sich um einen präzisen Laser mit nur geringen unerwünschten destruktiven Nebeneffekten. Die Bildgebung (Multiphotonen-Imaging, siehe Kap. 3.3) ermöglicht hochauflösende Bilder aus der fokussierten Ebene. Mit

zunehmend präziseren Möglichkeiten des Schneidens und der Bearbeitung des Gewebes, steigen die Anforderungen an die Bildgebung. Das Konzept des „Sehenden Laserskalpells“ ist vor diesem Hintergrund ein Gegenstand aktueller Forschung.

## **2.5 Zielsetzung / Fragestellung dieser Arbeit**

Die bei der Kapsulorhexis gewonnene menschliche vordere Linsenkapsel wurde mit einem unverstärkten Femtosekundenlaser behandelt (in-vitro). Ziel war es, geeignete Parameter für intra- (z.B. Kapsulorhexis) und postoperative (z.B. Behandlung der Kapselschrumpfung) Anwendungen des Femtosekundenlasers zu gewinnen.

Im Einzelnen wurden bei intrakapsulären Schnitten in der vorderen Linsenkapsel Laserleistung, Abtragszeit und Geschwindigkeitsparameter des Laserstrahls (Verweildauer, Wiederholrate, Scangeschwindigkeit) variiert, um die Präzision der Schnitte sowie kollaterale Gewebsschädigung zu untersuchen.

Gleichzeitig war in den Versuchsaufbau ein Laser-Scanning-Mikroskop integriert, das unter Beibehaltung des Strahlengangs und Ausnutzung von Multiphotoneneffekten eine zeitnahe und zerstörungsfreie Bildgebung des Zielgewebes (Linsenkapsel vor und nach Durchführung der Laserschnitte) ermöglichte. Die gewonnenen Bilder wurden mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Referenzmethode verglichen.

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Materialgewinnung und Präparation

Alle Experimente wurden an humanen vorderen Linsenkapseln durchgeführt. Die Kapseln wurden bei extrakapsulären Kataraktextraktionen mit Phakoemulsifikation (PHAKO) an der Universitätsaugenklinik Homburg/Saar (Saarland, Deutschland) gewonnen. Bei der PHAKO wird die vordere Linsenkapsel mit einer Nadel kreisförmig aufgerissen. Die so freiwerdende Kapsel wurde mittels Kapselpinzette aus dem Inneren des Auges entfernt und sofort danach in steriler BSS® Lösung (Alcon Pharma GmbH) aufbewahrt. Innerhalb von ca. 10 Minuten wurden die Kapseln unter einem Operationsmikroskop gewebe- und zellschonend präpariert. Mit einem Skalpell wurden glatte Ränder geschnitten. Diese dienten der Orientierung und dem späteren Wiederfinden der Abtragsstellen. Anschließend wurden die Präparate in spezielle Zellkammern (MiniCeM®, Miniaturized Cell chamber for Microscopy and Micromanipulation, Jenlab GmbH, Jena, Deutschland) eingelegt. Deckgläschen verhinderten das Verrutschen der Proben. Die Zellkammern wurden später in das Halterungssystem des modifizierten Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 410, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) eingespannt. So waren ein lichtmikroskopisches Betrachten der Proben, die Bildgebung mittels Autofluoreszenz, Reflektions- und Transmissionsaufnahmen sowie die Bestrahlung mit dem Laser für das Schneiden der Proben möglich.

### 3.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Experimente wurden mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser Vitesse 800 (Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Dies ist ein mode-locked Ti:Sa (Titanium:Saphir) diodengepumpter Oszillator Laser mit einer festen Wellenlänge von 800 nm (Abb. 3.1).

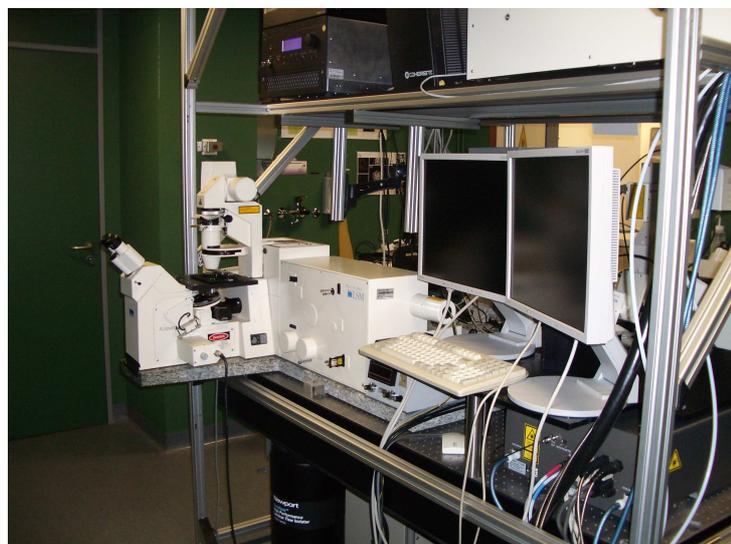


Abb. 3.1 Mikroskop (Axiovert 100), LSM 410, Lasereinheit.

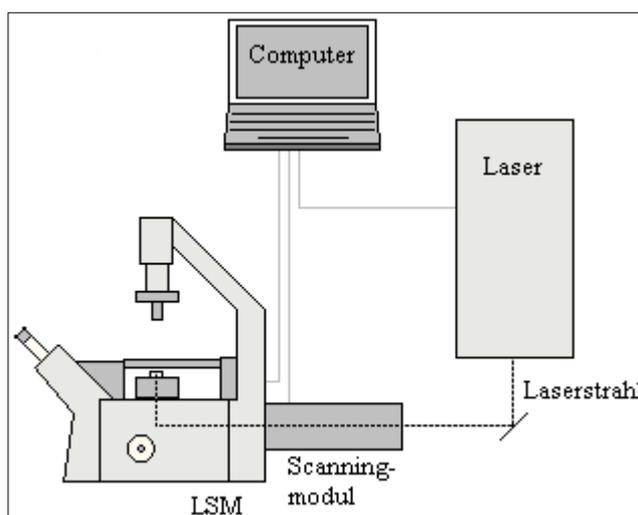
Nachfolgende Tabelle (Tab. 3.1) stellt die Spezifikationen des verwendeten Lasers dar:

Durchschnittsleistung	> 200 mW	
Bandbreite	> 10 nm	FWHM, axiale Auflösung, Halbwertsbreite
Pulslänge	< 100 fs	
Wiederholungsrate	80 MHz	Nominale Wiederholungsrate +/- 0,8MHz
Wellenlänge	800 nm	Nominale Wiederholungsrate +/- 1 nm
Dauerhaftigkeit der Leistung	+/- 1 %	Messung über 2 h nach 15 min Anlaufzeit
Durchmesser des Strahls	1,25 mm	
Divergenz des Strahls	< 1,2 mrad	
Polarisation	> 100:1, horizontal	

**Tab. 3.1 Spezifikationen des Femtosekundenlasers, Vitesse 800. Übernommen aus dem Datenblatt des Lasers, Vitesse 800, Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA.**

Der Laser war zusammen mit dem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) an ein modifiziertes Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410 angeschlossen (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Die Modifikationen am LSM 410 wurden von der Arbeitsgruppe Lasermedizin des Fraunhofer Institutes für Biomedizinische Technik (IBMT, St. Ingbert, Saarland, Deutschland) durchgeführt (Abb.3.2).

Es wurde ein 40er Immersionsöl-objektiv (Zeiss Neofluar, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) mit einer Numerischen Apertur (NA) von 1,3 benutzt. Die Proben wurde stets mit der gleichbleibenden Wellenlänge von 800 nm bestrahlt. Ein dichroitischer Strahlteiler (E700SP, Chroma Technology, Brattleboro/VT, USA) im Strahlengang diente zur Trennung von Fluoreszenzemissionen. Solche Strahlteiler reflektieren langwellige Strahlung



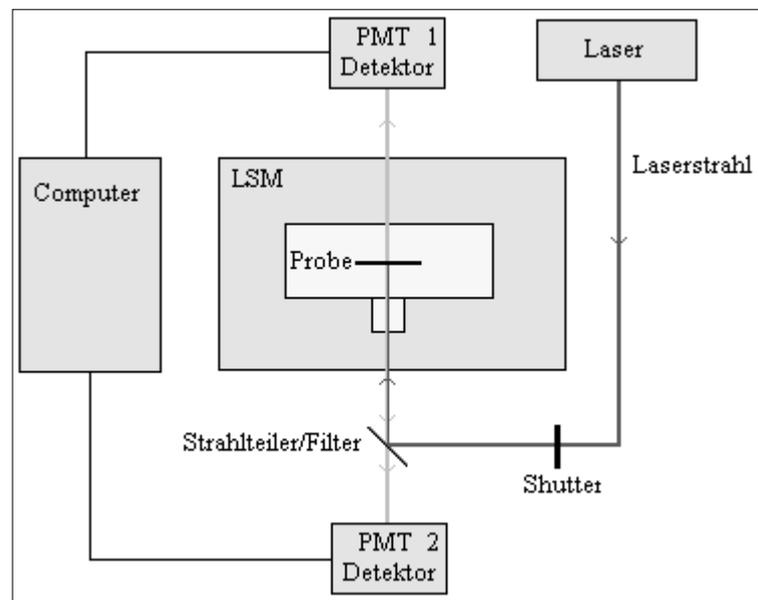
**Abb. 3.2 Mikroskop, LSM, Lasereinheit und Computer, schematische Darstellung.**

und erlauben die Transmission von kurzwelliger Strahlung. Die zu detektierenden Strahlen von der Probe werden durch den Strahlteiler transmittiert und gelangen zum Detektor. Als externer PMT (Photo Multiplier Tube) wurde der R1527P (Hamamatsu Photonics, Japan) verwendet. PMT`s sind Teilchendetektoren. Sie wandeln schwache Lichtsignale (Photonen) in elektrische Impulse um. Ein PMT besteht aus einer Photokathode, einer Anode und einer

Reihe dazwischengeschalteter Dynoden. Zwischen einzelnen Dynoden besteht eine aufsteigende Potenzialdifferenz. Treffen Photonen auf die Photokathode, so werden mittels Photoeffekt Elektronen aus der Kathode freigesetzt. Die Dynoden beschleunigen die Elektronen und fügen durch Sekundäremissionen ein Vielfaches an weiterer Elektronen hinzu (Sekundärelektronenvervielfacher). Je nach Anzahl der Dynodenstufen kann eine Verstärkung des Eingangssignals von bis zu  $10^9$  erreicht werden.

(Quelle: <http://www.electrontubes.com/pmt/understanding.html>).

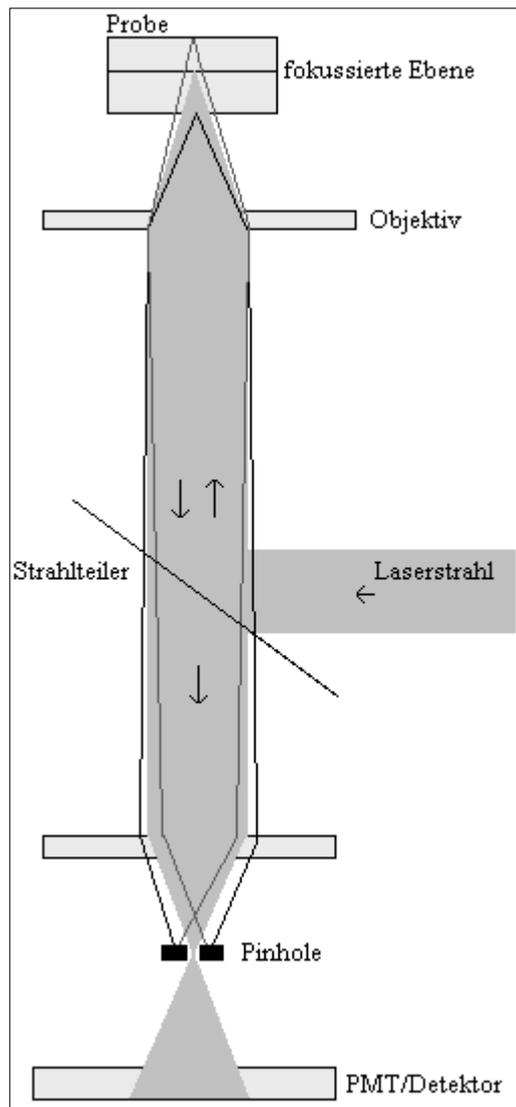
Abb. 3.3 zeigt schematisch unseren Versuchsaufbau und den Strahlengang zur Bildgebung und zum Laserabtrag. Der Laserstrahl wird über Spiegel und Strahlteiler zu der Probe im Laser-Scanning-Mikroskop geleitet. Im Transmissionsmodus wird der Detektor angesteuert, welcher sich im Strahlengang hinter der Probe befindet (Detektor 1). Dieser leitet dann die Signale an den Computer,



**Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, Strahlengang.**

welcher ein Bild erzeugt. Im Reflektionsmodus wird die Strahlung zurückreflektiert und von dem Detektor registriert, welcher sich vor der Probe befindet. Im Autofluoreszenzmodus wird die emittierte Strahlung über den Strahlteiler geleitet und vom PMT registriert.

Die Multiphotonenmikroskopie ermöglicht die exakte Fokussierung des Laserstrahls im Gewebe. Das im Gewebe angeregte Volumen ist aufgrund der Laserleistung und der Objektive mit hoher numerischer Apertur sehr gering. Dies ermöglicht im Gegensatz zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine pinhole-freie Bildgebung. In konfokalen Systemen wird das Pinhole zur Ausblendung fokusferner Strahlung benötigt (vgl. Abb. 3.4).



**Abb. 3.4 Konfokales Prinzip, Fokussierung des Laserstrahls und Ausblendung fokusferner Strahlung.** Entnommen aus der online Broschüre „Das konfokale Laser Scanning Mikroskop“, [www.zeiss.de/lsm](http://www.zeiss.de/lsm).

### 3.3 Multiphotonen-Imaging

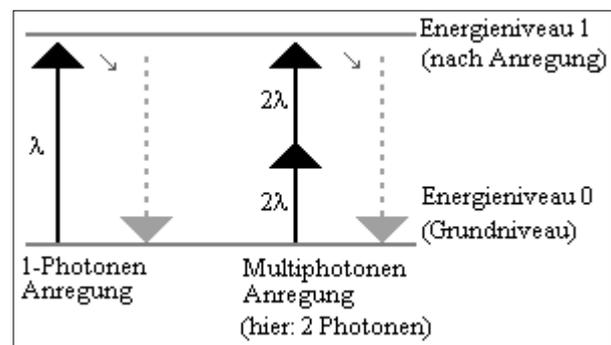
#### 3.3.1 Multiphotonen Effekte und Multiphotonen-Imaging

Die Fluoreszenzbildgebung basiert wie die Nano- und Mikrochirurgie mit dem Laser auf Multiphotoneneffekten, also durch Laser induzierte nichtlineare Effekte. Fluoreszenzmikroskopie wird durch Moleküle ermöglicht, die bei Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und anschließend ebenfalls ihrerseits Strahlung emittieren. Die emittierte Strahlung ist i. d. R. etwas langwelliger und somit energieärmer als die zuvor

absorbierte Strahlung (Stokesverschiebung). Bei der Ein-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie wird das Ziel-Molekül mit einem Photon (Ein-Photonen-Prinzip) angeregt, dessen Wellenlänge der Anregungswellenlänge des Ziel-Moleküls entspricht. Bei der Multiphotonenmikroskopie wird die Fähigkeit eines Moleküls ausgenutzt, mehrere Photonen gleichzeitig absorbieren zu können. Das Zielmolekül absorbiert gleichzeitig zwei (Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie) oder mehr Photonen und wird hierdurch angeregt.

Das Phänomen, das ein Molekül gleichzeitig 2 Photonen absorbieren kann (2-Photonen-Absorption) wurde erstmals von Maria Göppert-Mayer im Jahr 1931 beschrieben<sup>22</sup>. Die Absorption muss innerhalb eines kleinen Zeitfensters (100 as) erfolgen und bedarf hoher Photonenflussdichten ( $10^{24} - 10^{25}$  Photonen  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Laserintensitäten im Bereich von  $\text{MW}/\text{cm}^2$  und  $\text{GW}/\text{cm}^2$  werden benötigt. Gepulste Laser (<200 fs), die im NIR-Bereich arbeiten, besitzen diese Eigenschaften und ermöglichen die Multiphotonen-Bildgebung. Anstatt eines Photons mit hoher Energie (kleine Wellenlänge) werden mehrere Photonen mit geringerer Energie (höhere Wellenlängen) absorbiert. Die Energie der emittierten Strahlung korreliert mit der Summe der Energien der absorbierten Photonen (Abb. 3.5). Dies bedeutet, dass zwei (oder mehr) Photonen mit niedriger Energie (NIR-Bereich) einen Anregungszustand im Molekül hervorrufen, den normalerweise ein Photon mit höherer Energie (meist UV-Bereich) hervorrufen würde. Moleküle können mit NIR-Strahlen angeregt werden und daraufhin Strahlung im UV Bereich oder im hochfrequenten sichtbaren Spektrum emittieren. Dieses Phänomen ermöglicht es,

mit NIR (near infrared) Femtosekunden-Lasersystemen mit sehr niedrigen Leistungen lebende Substanzen zu untersuchen, ohne diese zu schädigen. Die benötigte Leistung des Lasers für die Bildgebung liegt im nJ-Bereich. Ein weiterer Vorteil ist die exakte Fokussierung im Gewebe. NIR-Laserstrahlung hat einen



**Abb. 3.5 Ein-Photonen und Multi-Photonen Anregung.**

geringen Absorptions- und Streukoeffizienten. Somit hat es eine höhere Eindringtiefe als UV- oder sichtbare Strahlung. Signale aus verschiedenen Tiefen können getrennt aufgezeichnet und zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion verwendet werden. Im Gegensatz zur Ein-Photonen-Mikroskopie treten außerhalb der Fokusebene keine bzw. im Vergleich nur sehr

geringe Photoschädigungen/Photobleaching (lichtinduzierte Schädigung, permanenter Verlust der Fluoreszenz durch die Bestrahlung) auf<sup>39, 58</sup>.

### **3.3.2 Autofluoreszenz**

Die Laserstrahlung wird durch die Moleküle der zu untersuchenden Probe absorbiert. Es handeln sich hierbei um die eigenen Moleküle der Probe, d.h. sie wurden nicht nachträglich in die Probe appliziert. Nach der Absorption emittieren die Moleküle ihrerseits eine (nichtlineare) Strahlung, welche von Detektoren wahrgenommen und entsprechend kodiert wird, so dass ein digitales Bild erstellt werden kann. Durch entsprechende Filter und Strahlteiler wird die anregende Strahlung ausgeblendet, so dass ein möglichst störungsfreies Bild erzeugt werden kann. Für die Autofluoreszenz eignen sich endogene Fluophore, beispielsweise NAD(P)H, Kollagen, Elastin, Keratin, Flavoproteine oder Chlorophyll.

### **3.3.3 Second harmonic generation**

Ein weiterer (nichtlinearer) Zwei-Photonen-Effekt, welcher bei der Bildgebung genutzt wird, ist die Frequenzverdopplung (SHG, second-harmonic-generation). Hierbei beträgt die Wellenlänge der emittierten Strahlung genau die Hälfte der absorbierten Strahlung. Die Bandbreite des Spektrums ist sehr gering und die emittierte Strahlung ist in die gleiche Richtung wie die zuvor absorbierte Strahlung gerichtet. SHG kommt bei nichtlinearen und nicht zentrum-symmetrischen Materialien wie z.B. Kollagen vor.

### **3.3.4 Transmission und Reflexion**

Trifft der Laserstrahl mit einer bestimmten Leistung auf eine (dielektrische) Grenzfläche, so wird der Strahl teilweise reflektiert und teilweise hindurchgelassen. Dementsprechend teilt sich auch die Leistung des einstrahlenden Strahls auf. Die Aufteilung in die jeweiligen Anteile (und Winkel) erfolgt nach den Fresnelschen Formeln und dem Brechungsgesetz. Die Fresnelschen Formeln beschreiben das Verhältnis des Reflektionsgrades bzw. Transmissionsgrades von elektromagnetischen Wellen an einer dielektrischen Grenzfläche<sup>15</sup>. Diese Strahlen können entsprechend mit einem PMT detektiert und in ein digitales Bild

umgewandelt werden. Für die Darstellung von Proben im Transmissions- und Reflektionsmodus wird nur eine geringe Laserleistung benötigt. Sie entspricht etwa 10 % der Leistung, die für die Autofluoreszenz benötigt wird. Transmissions- und Reflektionsaufnahmen wurden zur Orientierung und Kontrolle der Proben angefertigt.

### 3.3.5 Für die Bildgebung verwendete Parameter

Für das Multiphotonen-Imaging sind Laserintensitäten im Bereich von  $\text{MW}/\text{cm}^2$  und  $\text{GW}/\text{cm}^2$  notwendig. Der verwendete Femtosekundenlaser (Eigenschaften in Tab 3.1, Kap 3.2) bringt diese Intensität bei einer (mittleren) Leistung von unter 10 mW auf. Der Laser arbeitet mit einer Frequenz von 80 MHz. Die Pulsenergie (Energie pro Puls) entspricht dem Quotienten aus der verwendeten (mittleren) Leistung und der Frequenz. Wir verwendeten für die Autofluoreszenzdarstellung Leistungen zwischen 2,0 - 5,9 mW (Pulsenergie: 0,025 – 0,074 nJ). Transmissions- und Reflektionsaufnahmen wurden mit 0,9 - 2,5 mW (Pulsenergie: 0,011 – 0,031 nJ) angefertigt (Tab. 3.2).

	Leistung / Energie (mW / nJ)	Scan-Zeit, Bildgenerierungszeit (für die Fläche von 512 x 512 Pixeln) (s)
Transmission	0,9 - 2,5 / 0,011 - 0,031	1 - 32
Reflektion	0,9 - 2,5 / 0,011 - 0,031	1 - 32
Autofluoreszenz	2,0 - 5,9 / 0,025 - 0,074	1 - 32

**Tab. 3.2 Für die Bildgebung verwendete Parameter.**

Die angefertigten digitalen Bilder wurden am Computer mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln dargestellt. Dies entsprach einer Fläche von  $320 \mu\text{m} \times 320 \mu\text{m}$  im Präparat. Die Autofluoreszenzbilder wurden zur genaueren Auswertung zusätzlich mit einem höheren Zoomfaktor angefertigt (ebenfalls mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln). Hier entsprach die gescannte Fläche  $106,5 \mu\text{m} \times 106,5 \mu\text{m}$ . Die Scan-Zeit (Bildgenerierungszeit) wurde zwischen 1 Sekunde und 32 Sekunden variiert (für die Fläche von 512 x 512 Pixeln). Je länger die Zeit, desto höher ist die Qualität der gescannten Bilder. Die Autofluoreszenzbilder zur Auswertung der Schnittbreiten wurden stets mit einer konstanten Scan-Zeit von 32 Sekunden angefertigt (vgl. Tab. 3.2), um vergleichbare Bedingungen zu erhalten. Im

Transmissions- und Reflektionsmodus wurde mit geringeren Bildgenerierungszeiten gearbeitet (meist 8s).

### 3.4 Gewebeabtrag

Das Bearbeiten von Gewebe und dessen Bildgebung ist mit einem System im gleichen Strahlengang möglich. Der Wechsel von Laserabtrag zur Bildgebung ist dabei innerhalb weniger Sekunden möglich (vgl. Abb. 3.2, Kap 3.2).

#### 3.4.1 Photodisruption

Der Gewebeabtrag mit gepulsten Femtosekundenlasern im NIR Bereich beruht auf dem Phänomen der Photodisruption. Wenn die pro Fläche eingestrahlte Energie eine bestimmte Schwelle überschreitet (im Bereich von  $\text{TW}/\text{cm}^2$ ), kommt es zur Ionisation und Bildung von freien Elektronen, welche zur Plasmabildung führen (Laser induced optical breakdown). Das gebildete Plasma absorbiert weiterhin Energie. Es folgt eine rasche Expansion des vom Laser induzierten Plasmas mit starker Temperatur- und Druckerhöhung (im Bereich von Gigapascal). Kavitationsblasen werden gebildet und kollabieren anschließend. Daraufhin breiten sich destruktive Schockwellen aus<sup>57, 61</sup>.

Die Photodisruption verursacht auch außerhalb des bestrahlten Gebietes destruktive Schäden. Diese unerwünschten Nebeneffekte, die Bildung großer Kavitationsblasen sowie weitere Effekte wie die Selbstfokussierung, treten bei schlechter Fokussierung und hohen Pulsleistungen verstärkt auf. Es gibt eine lineare Abhängigkeit zwischen der Pulsenergie und der Selbstfokussierung sowie der photodisruptiven Effekte. Je geringer die Energie für das Auslösen von Multiphotoneneffekten und der Plasmabildung ist, desto geringer sind die destruktiven Effekte außerhalb der bestrahlten Region. Unverstärkte Femtosekundenlaser im NIR Bereich arbeiten mit geringer Leistung. Sie sind sehr präzise und haben wenig bis kaum unerwünschte destruktive Effekte (siehe Kap. 2.4.4.2).

### 3.4.2 Abtragsparameter

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3.3) zeigt eine Übersicht der verwendeten Abtragsleistungen/Energien:

Mittlere Leistung (P)	Energie pro Laserimpuls (E)	Energiedichte/Fluence (F)	Intensität (I)
mW	nJ	J/cm <sup>2</sup>	TW/cm <sup>2</sup>
100	1,25	1,037	10,037
90	1,125	0,933	9,333
80	1	0,830	8,296
70	0,875	0,726	7,259
60	0,75	0,622	6,222
50	0,625	0,518	5,185
45	0,563	0,466	4,666
40	0,5	0,415	4,148
35	0,438	0,363	3,629
30	0,375	0,311	3,111

**Tab. 3.3** Verwendete Abtragsparameter (Mittlerer Leistung, Energie/Impuls, Energiedichte, Intensität). Die Werte wurden auf die 3. Nachkommastelle gerundet.

Der Laser arbeitet mit einer Frequenz (f) von 80 MHz (= Laserpulsrate). Die mittlere Leistung (P) des Lasers wurde mit einem Messgerät ermittelt.

Die Energie pro Laserimpuls (E) lässt sich folgendermaßen berechnen:

mittlere Leistung P dividiert durch die Laserpulsrate f (=80 MHz)

$$E = \frac{P}{f}$$

Die Energiedichte (Fluence F), ist die Energie, die in einer bestimmten Zeit (Verweildauer des Laserstrahls) über eine bestimmte Fläche (Fokusgröße) abgegeben wird. Sie lässt sich nach der folgenden Formel berechnen:

$$F = \frac{P}{f \times \pi \times \frac{(2W_0)^2}{4}} \quad \text{oder} \quad F = \frac{E \times f}{f \times \pi \times \frac{(2W_0)^2}{4}}$$

$W_0$  ist der theoretische Radius des Laserstrahls im Fokus und lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$2W_0 = \frac{4 \times \lambda}{\pi} \times \frac{1}{2 \times NA}$$

Mit  $\lambda=800$  nm und  $NA=1,3$  ergibt sich für  $2W_0$  der Wert 0,392  $\mu\text{m}$ .

Die Intensität erhält man, indem man die Fluence (F, Energiedichte) durch die Pulsdauer  $\Delta t$  dividiert:

$$I = \frac{F}{\Delta t}$$

Die Berechnungen für die Intensität wurden mit der Pulsdauer von 100 fs durchgeführt.

Tab. 3.4 gibt eine Übersicht über die in den vorangegangenen Formeln verwendeten Parameter:

Parameter	Erklärung
E	Energie pro Laserimpuls, (J)
F	Energiedichte, Fluence, ( $J/cm^2$ )
f	Laserpulsrate, Frequenz (Hz)
I	Intensität, ( $W/cm^2$ )
NA	Numerische Apertur
P	Mittlere Leistung, (W)
$W_0$	Radius des Laserstrahls im Fokus
$\Delta t$	Pulsdauer, (fs)
$\lambda$	Wellenlänge, (nm)

**Tab. 3.4 Übersicht über die Einheiten und Abkürzungen.**

$W_0$  ist der theoretisch berechnete Durchmesser des Laserstrahls im Fokus. Chromatische und geometrische Aberrationen, die Laserqualität bzw. das Immersionsöl sind in dieser Formel nicht berücksichtigt. Experimentell sind der Fokus und die Pulsdauer größer als in den theoretischen Berechnungen.

Die Schnittlänge betrug jeweils 320  $\mu m$  (512 Pixel) und wurde intrakapsulär durchgeführt (Tiefe: 15-25 $\mu m$ ). Die Auswertung erfolgte bei Bildern, die nach den Laserschnitten mit einem höheren Zoom aufgenommen wurden (512 Pixel = 106,5  $\mu m$ ).

Die ermittelten Werte wurden auf die 3. Nachkommastelle gerundet. Die Abtragszeit wurde über einen externen Shutter im Strahlengang gesteuert.

Die folgende Tabelle (Tab. 3.5) zeigt die Zahlenwerte für die verwendeten Abtragszeiten (=Bestrahlungszeit) an, welche über den externen Shutter im Strahlengang eingestellt wurden:

Einstellung des Shutter (s)	Zahlenwert (s)
4	4
2	2
1	1
1/2	0,5
1/4	0,25
1/8	0,125
1/15	0,06667
1/30	0,03333
1/60	0,01667

**Tab. 3.5 Zahlenwerte des externen Shutter.**

Die Geschwindigkeitsparameter:

Über eine Zeiteinstellung in der Software des Computers kann geregelt werden, wie oft der Laserstrahl in einer bestimmten Zeit über eine Linie ( $320 \mu\text{m} = 512 \text{ Pixel}$ ) entlang fährt.

In den genannten Leistungsniveaus wurde jeweils diese Zeit variiert. Diese Zeit ist verknüpft mit der Verweildauer, der Scangeschwindigkeit und der Wiederholrate (Anzahl der Durchläufe des Laserstrahls über die Linie in einer bestimmten Zeit).

Beispiel für die Schaltung der Software:

Wird z.B. die Zeiteinstellung 1 s verwendet, so durchläuft der Laserstrahl in dieser Zeitspanne von 1 s 512-mal eine Linie ( $320 \mu\text{m} = 512 \text{ Pixel}$ ), und zwar 256-mal hin und 256-mal zurück.

Wird die Zeiteinstellung 2 s verwendet, so benötigt der Laser für 512 Durchläufe 2 s, usw.

Wir haben in der Software folgende Zeiteinstellungen für die Versuche verwendet: 1 s, 2 s, 4 s, 8 s, 16 s. Mit der jeweiligen Zeiteinstellung und der Abtragszeit (= Bestrahlungszeit = 1 s) lässt sich die Verweildauer, die Wiederholrate und die Scangeschwindigkeit berechnen.

Wird die Wiederholrate verkleinert, so wird die Verweildauer länger und die Scangeschwindigkeit langsamer. Die Scangeschwindigkeit beschreibt den Photoneneintrag in einem (ausgewählten) kurzen Zeitintervall. Die Wiederholrate beschreibt im Gegensatz einen wiederkehrenden Photoneneintrag. Diese Parameter haben jeweils unterschiedliche physikalische Auswirkungen.

Die Wiederholrate gibt die Anzahl der Durchläufe des Laserstrahls in 1 s an. Die Verweildauer gibt die Zeit an, die der Laserstrahl für eine Strecke von  $1 \mu\text{m}$  benötigt.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3.6) zeigt eine Übersicht der variierten Parameter:

Variierter Parameter in der Software, <b>Zeiteinstellung</b>	<b>Wiederholrate</b> Anzahl der Durchläufe des Laserstrahls in der Abtragszeit  im Versuch=1s	Für einen Durchlauf benötigte Zeit (über 512 Pixel = 320µm)	<b>Verweildauer</b>  Für <u>1 µm</u> benötigte Zeit	<b>Scangeschwindigkeit</b>
(s)	(Hz)	(ms)	(ms)	(m/s)
1	512	1,953	0,006	0,164
2	256	3,906	0,012	0,082
4	128	7,813	0,024	0,041
8	64	16,625	0,052	0,019
16	32	31,250	0,098	0,010

**Tab. 3.6 Übersicht: Zeiteinstellung in der Software, Wiederholrate, Verweildauer, Scangeschwindigkeit. Die Werte wurden auf die 3. Nachkommastelle gerundet.**

### 3.5 Versuchsreihen

Es wurden verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt:

- I. Auswirkungen unterschiedlicher Verweildauern (bzw. davon abhängig Scangeschwindigkeit und Wiederholrate) auf die Schnittbreite. Abtragsleistung und Abtragszeit sind konstant.
- II. Auswirkungen unterschiedlicher Abtragsleistungen auf die Schnittbreite. Verweildauer und Abtragszeit sind konstant.
- III. Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite. Verweildauer und Abtragsleistung sind konstant.

Die Versuchsreihe I wurde bei 3 unterschiedlichen Leistungsniveaus durchgeführt (mittlere Leistung: 50, 60 und 100 mW) und die Verweildauer jeweils in den Leistungsniveaus variiert. Die reine Abtragszeit betrug stets 1 s und wurde über einen externen Shutter im Strahlengang reguliert. Die Schnittlänge betrug stets 320 µm (= 512 Pixel).

Die Versuchsreihen II und III wurden mit unterschiedlichen Leistungen (mittlere Leistung) von 30 bis 100 mW durchgeführt. Die Abtragszeit (=Bestrahlungszeit) wurde mit einem externen Shutter im Strahlengang zwischen 1/60 s und 4 s variiert. In den Versuchsreihen II und III wurde die Verweildauer verwendet, bei denen in der Versuchsreihe I die größte Schnittbreite ermittelt wurde (Tab. 3.7). Dieser Wert wurde stets konstant gehalten:

Parameter in der Software für die Versuchsreihen 2 und 3  Zeiteinstellung der Software  (s)	Wiederholrate  Anzahl der Durchläufe des Strahls in 1 s (= Abtragszeit = Bestrahlungszeit)  (Hz)	Für einen Durchlauf benötigte Zeit (über 512 Pixel = 320µm)  (ms)	Verweildauer  Für 1 µm benötigte Zeit  (ms)	Scangeschwindigkeit  (m/s)
8	64	16,625	0,052	0,019

**Tab. 3.7 Geschwindigkeitsparameter (Wiederholrate, Verweildauer, Scangeschwindigkeit) für die Versuchsreihen II und III.**

Detaillierte Informationen zu diesen Parametern im Kapitel 3.4.2.

### 3.6 Fixierung, Histologie und Elektronenmikroskopie

Die Fixierung für das spätere Einbetten erfolgte durch Zusatz von Fixierlösung in die Zellkammern im direkten Anschluss an die Versuche.

Die Fixierlösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Phosphatpuffer nach Sörensen 0,06M

Paraformaldehyd 1%

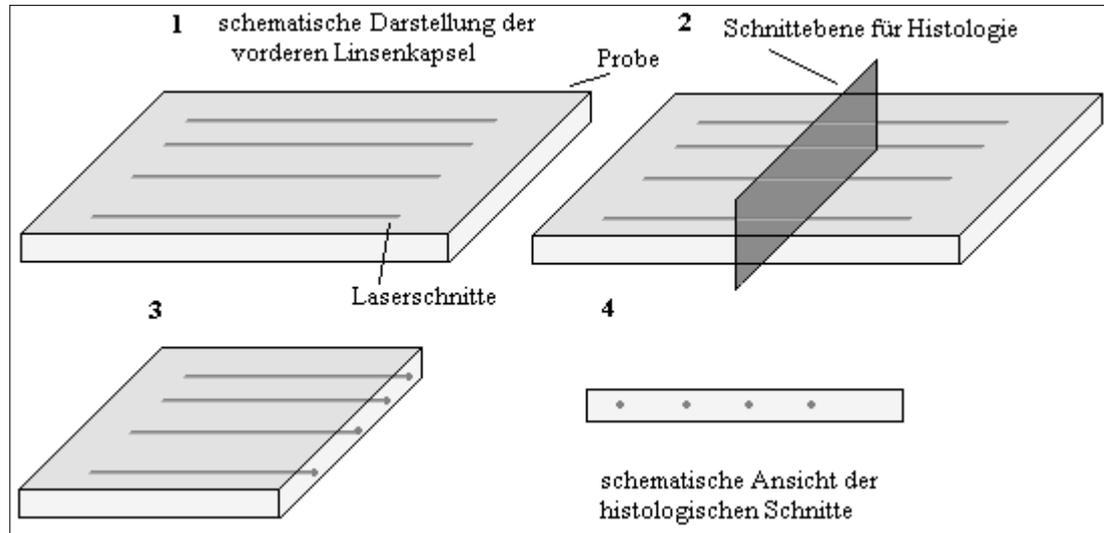
und Glutaraldehyd 1%

Der pH der Lösung lag bei 7.4.

Bis zur Einbettung wurden die Zellkammern mit der fixierten Probe im Kühlschrank aufbewahrt (1-2 Tage). Die Einbettung erfolgte in Epon. Aufgrund der Beschaffenheit der Kapsel wurde bei der Einbettung eine Agarose-Membran benutzt, anstatt wie üblich eine Zellsuspension. Mit dem Mikrotom wurden Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt (Licht- und Elektronenmikroskopie). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit

dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Tecnai 12 G<sup>2</sup> (Tecnai 12 G<sup>2</sup>, FEI Company Hillsboro, Oregon 97124, USA) durchgeführt.

Abb. 3.6 zeigt schematisch die histologische Schnittrichtung der Proben:



**Abb. 3.6 Schnittrichtung des Lasers und histologische Aufarbeitung.**

### 3.7 Auswertung, Statistik

Die Länge der durchgeführten Laserabträge betrug stets 320  $\mu\text{m}$ . Um jedoch eine präzisere Auswertung der Schnittbreiten zu erhalten, wurden nach den Laserabträgen zusätzlich Autofluoreszenzaufnahmen mit einem höheren Zoomfaktor angefertigt. Das mit dem höheren Zoomfaktor angefertigte Bild entsprach einer Fläche von 106,5  $\mu\text{m}$  x 106,5  $\mu\text{m}$ . Diese Fläche wurde ebenfalls mit 512 x 512 Pixeln dargestellt. Die Schnittbreite wurde jeweils an drei Stellen eines Schnittes ausgemessen (linker Rand, Mitte, rechter Rand). Der Abstand zwischen den Messpunkten betrug ca. 50  $\mu\text{m}$ . Die Messungen wurden mit Hilfe eines Grafikprogramms (Image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Hierfür wurde ein stets gleichbleibender digitaler Zoomfaktor verwendet. Bei der gemessenen Größe (Schnittbreite) handelt es sich um ein quantitatives Merkmal. Zur Beschreibung dieses Merkmals wurden statistische Maßzahlen wie Mittelwert, Varianz, Median, Standardabweichung und Standardfehler ermittelt.

## 4 Ergebnisse

Für die Auswertungen wurden 8 vordere humane Linsenkapseln untersucht.

### 4.1 Bildgebung

Transmissionsaufnahmen:

Für die Anfertigung von Transmissionsaufnahmen wurde nur eine sehr geringe Energie benötigt (vgl. Kap. 3.3). Dieser Modus war aufgrund der schnellen Darstellungszeiten sehr hilfreich bei der Orientierung und beim Aufsuchen von den zu untersuchenden Stellen im Präparat. Schon mit sehr kurzen Bildgenerierungszeiten (z.B. 1 s für eine Fläche von  $320\ \mu\text{m} \times 320\ \mu\text{m}$ ) waren Bilder hoher Qualität möglich.

Im Transmissionsmodus war die Oberfläche der vorderen Linsenkapsel mit den Epithelzellen bei oberflächlicher Fokussierung sehr gut darstellbar. Das Oberflächenrelief mit den einzelnen Zellen und den Zellkernen ließ sich präzise abbilden (vgl. Abb. 4.1). Für die Darstellung von Laserschnitten eignet sich dieser Modus jedoch kaum, u.a. wegen der intrakapsulären Lage der Laserschnitte, schlechter Fokussierung in der Tiefe und schlechter Kontrastierung der Schnittländer an sich. Nur Schnitte mit höheren Energiewerten waren deutlich erkennbar. Bei unseren Versuchen waren Schnitte, die mit einer mittleren Leistung von weniger als 80 mW durchgeführt worden waren, nur noch sehr schwach erkennbar, somit in diesem

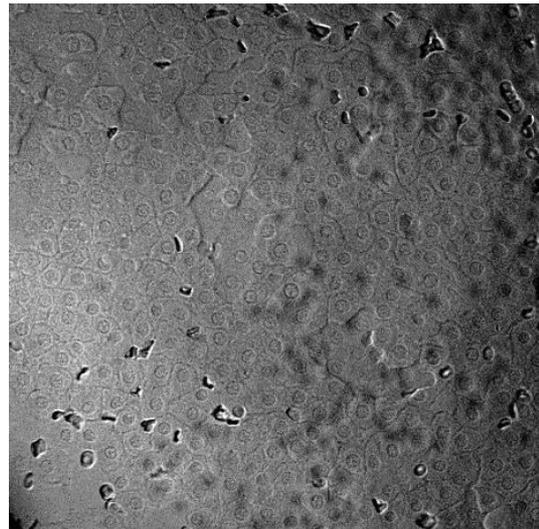


Abb. 4.1 Bildgröße:  $320\ \mu\text{m} \times 320\ \mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme der Kapseloberfläche. Epithelzellen und die Zellkerne sind deutlich erkennbar.

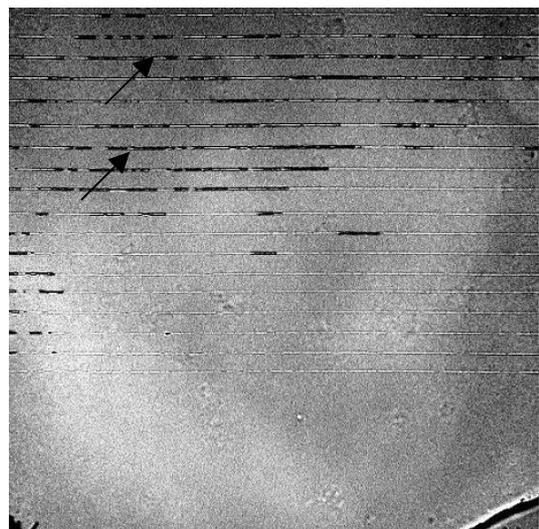


Abb. 4.2 Bildgröße:  $320\ \mu\text{m} \times 320\ \mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme nach Laserschnitten. Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 2 s. Hier sind entlang einiger Schnitte gasgefüllte Blasen (Pfeile) zu erkennen, die sich nach wenigen Sekunden auflösen.

Darstellungsmodus nicht eindeutig auszuwerten. Unmittelbar nach der Durchführung der Laserschnitte waren in den Transmissionsaufnahmen entlang der Schnitte kleinere gasgefüllte Blasen zu erkennen (vgl. Abb. 4.2). Diese entstanden aufgrund der lokalen Hitzeeinwirkung und waren nach wenigen Sekunden nicht mehr sichtbar. Die Ausprägung dieser Blasen war sehr unterschiedlich und ist u.a. auch davon abhängig, wie feucht die Probe und deren Umfeld sind. Sie waren nur bei höheren Leistungsniveaus deutlich erkennbar (größer 80 mW). Bei kleineren Leistungen war die Ausprägung viel geringer und die Lebensdauer kurz, so dass Aufzeichnungen schwierig waren.

Die mit dem Skalpell zur Orientierung der Proben markierten Ränder waren im Transmissionsmodus ebenso gut sichtbar wie die Ränder der Kapsulorhexis an sich (vgl. Abb. 4.1 bis 4.6).

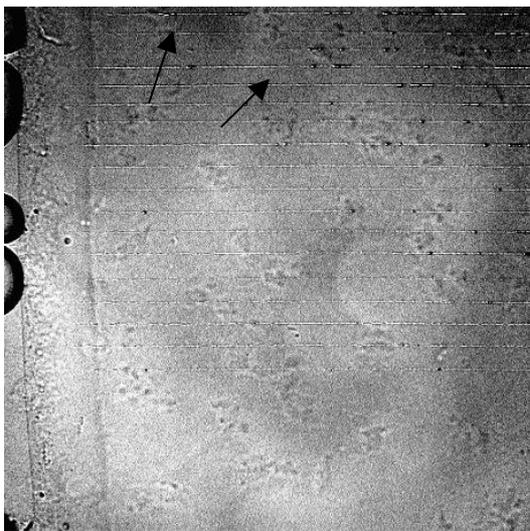


Abb. 4.3 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme nach Laserabträgen (Pfeile). Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 1 s.

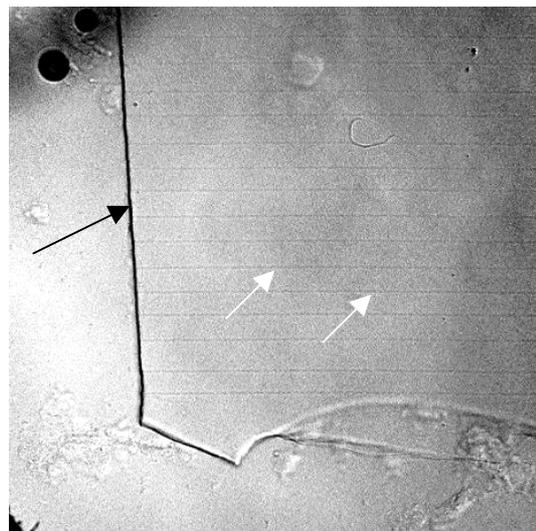


Abb. 4.4 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme. Links: mit dem Skalpell markierter Schnitttrand (schwarzer Pfeil).

Laserschnitte (weiße Pfeile), Abträge mit 100 mW, Abtragszeit 1 s.

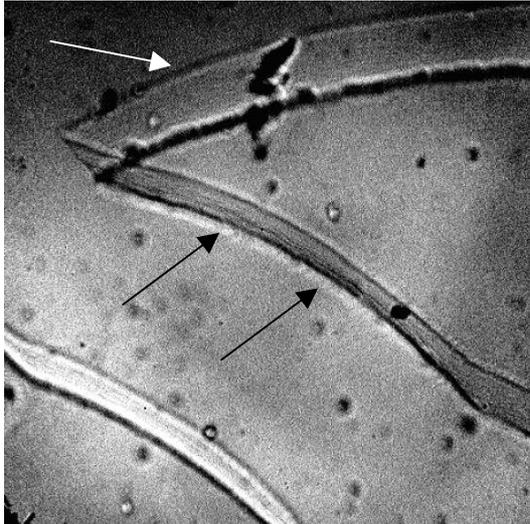


Abb. 4.5 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme. Darstellung der Kapsulorhexis, weißer Pfeil: Rand der kreisrunden Kapsulorhexis. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Markierung mit dem Skalpell, welche die kreisrunde Kapsulorhexis teilt.

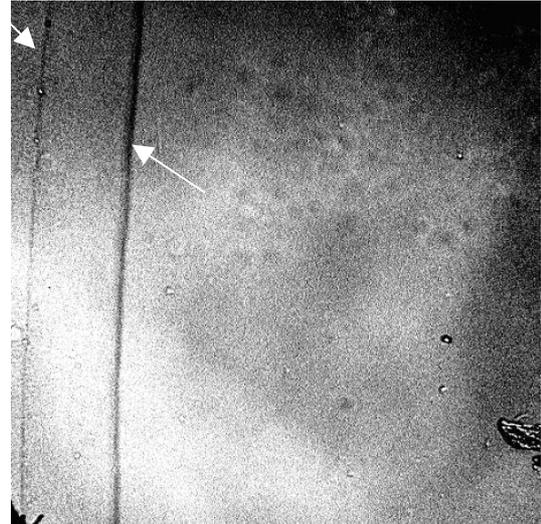


Abb. 4.6 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Transmissionsaufnahme. Rand der Kapsulorhexis (weiße Pfeile). Aufsicht. Der Rand erscheint aufgrund der Dreidimensionalität als Doppelstruktur (vgl. Abb. 4.5).

#### Autofluoreszenzaufnahmen:

Die Autofluoreszenzaufnahmen basieren auf Multiphotoneneffekten. Sie ermöglichen eine hochauflösende nicht-invasive Bildgebung im fokussierten Bereich. Die Laser-Scanning-Mikroskopie (vgl. Kap 3.2 und 3.3) gestattet die exakte Fokussierung der anregenden Strahlung des Lasers in der zu untersuchenden Ebene. Über Filter und Strahlteiler wird gewährleistet, dass nur die emittierte Strahlung der untersuchten Ebene vom Detektor (PMT) aufgefangen und das Signal in ein digitales Bild umgewandelt wird. In unserem Versuchsaufbau erhielten wir somit vor und nach dem Laserabtrag nur von den Ebenen ein Bild, in denen auch der Laserstrahl beim Schneiden des Gewebes fokussiert war. Die Bereiche, in denen Laserabträge erfolgt waren, konnten keine Strahlung absorbieren oder emittieren, da dort kein Gewebe mehr vorhanden war. Die Schnittländer nach Laserabtrag waren glatt. Die Aufnahmen vor und nach den Laserabträgen zeigten eine unveränderte Signalqualität des umliegenden Gewebes (vgl. Abb. 4.7 bis 4.10).

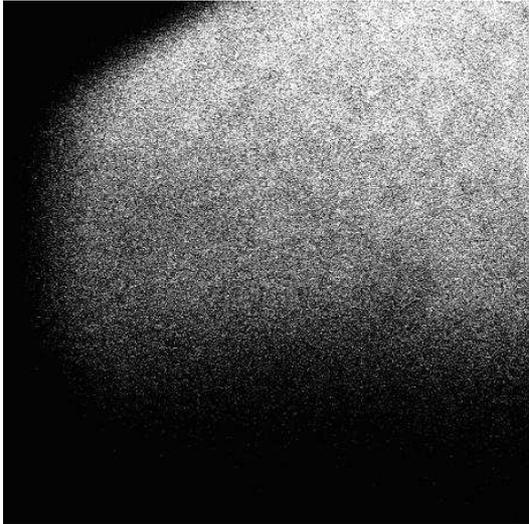


Abb. 4.7 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Autofluoreszenzaufnahme ohne Laserschnitte. Aufsicht auf die Kapsel. Hier ist die homogene Struktur der Linsenkapsel erkennbar. Keine Laserschnitte. Die schwarzen Areale entsprechen nicht ausgeleuchteten Bereichen (außerhalb des Fokus).

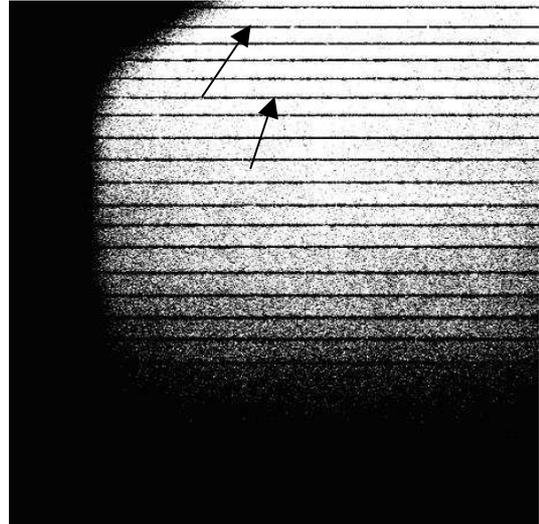


Abb. 4.8 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$

Autofluoreszenzaufnahme nach Laserabträgen. Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 1 s. Aufsicht auf die Kapsel. Mehrere Schnitte mit dem Laser (Pfeile) sind deutlich zu erkennen. Aufgrund des Gewebedefektes in den Bereichen der Schnitte, sind dort keine Zellen vorhanden, welche Strahlung emittieren könnten.



Abb. 4.9 Bildgröße: 106,5  $\mu\text{m}$  x 106,5  $\mu\text{m}$

Vergrößerte Aufnahme der Einstellung in Abb. 4.8, höherer Zoom.

Autofluoreszenzaufnahme nach Laserabträgen. Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 1 s.

Die Bildgebung mit einem höheren Zoom ermöglicht eine genauere Auswertung der Schnitte (Pfeile). Das den Laserschnitten umliegende Gewebe ist kaum irritiert.

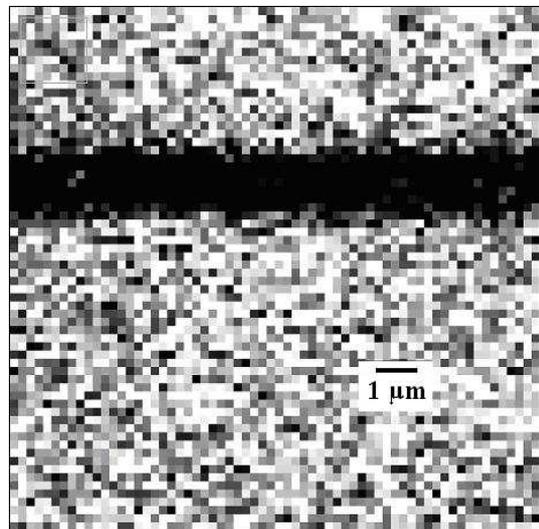


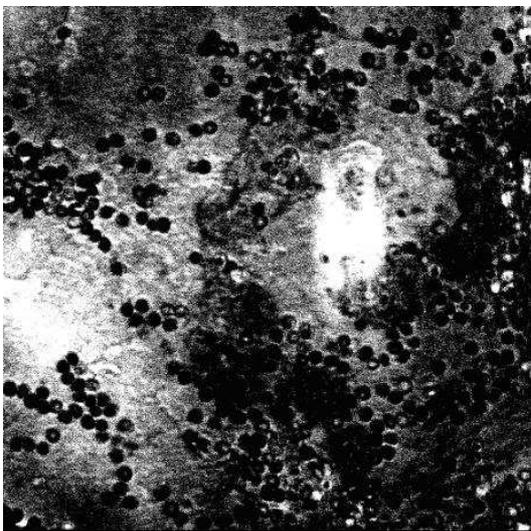
Abb. 4.10 Digitale Vergrößerung der Autofluoreszenzaufnahme.

Laserabtrag mit einer Abtragsleistung von 100 mW und einer Abtragszeit von 1 s.

Vgl. Abb. 4.8 und 4.9

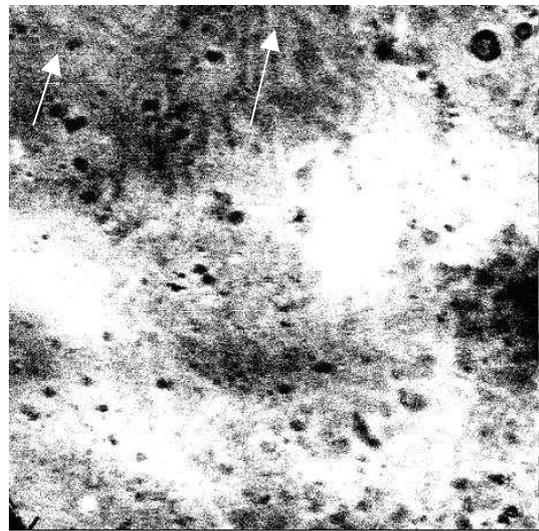
### Reflektionsaufnahmen:

Reflektionsaufnahmen können ebenfalls wie die Transmissionsaufnahmen zur Orientierung genutzt werden. Aufgrund der sehr geringen Energiewerte, die für die Bildgebung notwendig sind, ist dies ein sehr schonendes und sicheres Verfahren. Die Charakteristik der Strahlen (reflektierte Strahlung) lässt diese Methode v.a. für oberflächliche Aufnahmen geeignet erscheinen. Für die Auswertung von Laserschnitten sind die Aufnahmen ebenso wie die Transmissionsaufnahmen wenig geeignet. Die intrakapsulären Schnitte können nicht exakt in der Schnitt-Ebene fokussiert werden und stellen sich als schwache Linien dar (vgl. Abb. 4.11 und 4.12).



**Abb. 4.11 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$**

**Reflektionsaufnahme von der unbehandelten Kapsel. Dieser Aufnahme-modus eignet sich aufgrund des Strahlengangs v.a. für die Darstellung von oberflächlichen Strukturen.**



**Abb. 4.12 Bildgröße: 320  $\mu\text{m}$  x 320  $\mu\text{m}$**

**Reflektionsaufnahme nach Laserschnitten. Abtragsleistung 80 mW, Abtragszeit 1 s.**

**Die Laser-Schnitte sind trotz bestmöglicher Fokussierung nur sehr schwach darstellbar (Pfeile).**

### Histologische Kontrolluntersuchungen:

Aufgrund der Schnittrichtung bei der histologischen Aufarbeitung sahen wir in diesen Aufnahmen Querschnitte der durchgeführten Laserabträge (vgl. Kap. 3.6, Schnittrichtung).

In TEM-Aufnahmen konnten die intrakapsulären Laserschnitte dargestellt werden. Kollaterale Schäden waren kaum vorhanden. Die hier ermittelten Schnittbreiten korrelierten sehr gut mit den ermittelten Schnittbreiten der Autofluoreszenzbilder. Dies zeigt, dass sich Autofluoreszenzaufnahmen zur Auswertung der Schnittbreiten gut eignen (vgl. Abb. 4.13 bis 4.19).

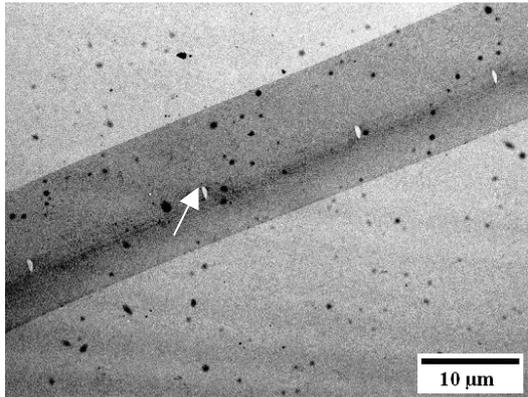


Abb. 4.13 TEM Aufnahme

Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 1 s. Übersichtsaufnahme. Die Schnitte (Pfeil) liegen intrakapsulär. Umliegendes Gewebe ist kaum irritiert.

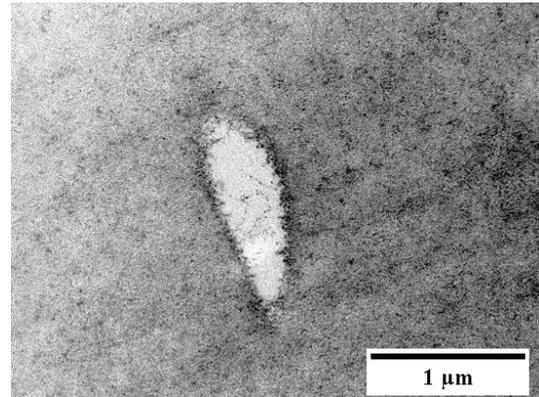


Abb. 4.14 TEM Aufnahme

Abtragsleistung 100 mW, Abtragszeit 1 s. Vergrößerte Aufnahme. Nur sehr geringe Irritationen bestehen im Umfeld des Schnittes (schwarzer Saum).

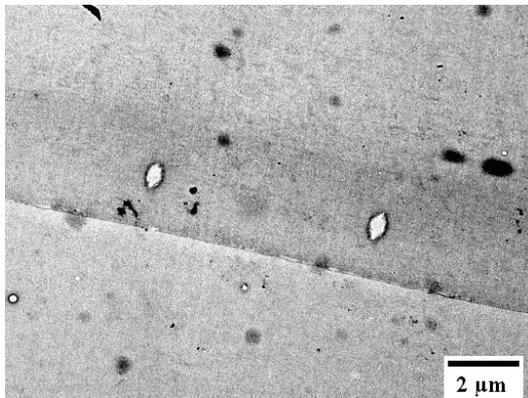


Abb. 4.15 TEM Aufnahme

Abtragsleistung 80 mW, Abtragszeit 1 s. Übersichtsaufnahme.

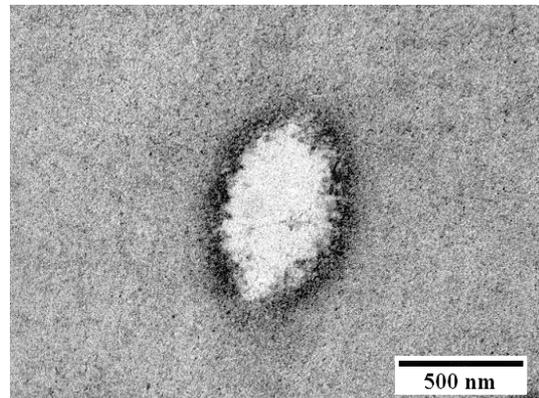


Abb. 4.16 TEM Aufnahme

Abtragsleistung 80 mW, Abtragszeit 1 s. Vergrößerte Aufnahme.

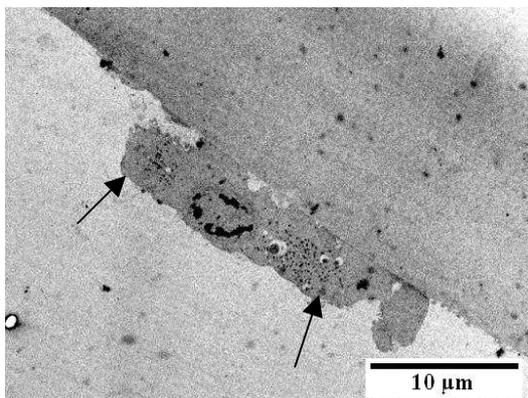


Abb. 4.17 TEM Aufnahme

Epithelzelle auf Linsenkapsel (Pfeile).

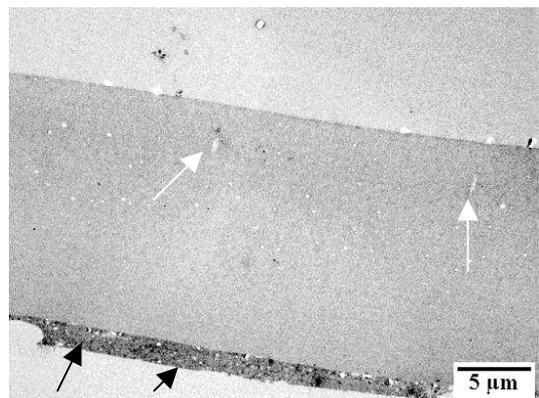
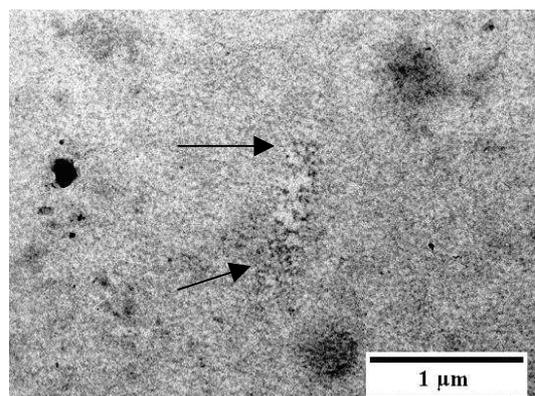


Abb. 4.18 TEM Aufnahme

Linsenkapsel. Aufgelagert ist eine Epithelzelle (schwarze Pfeile). Zusätzlich sind die intrakapsuläre Laserschnitte nach Laserbehandlung dargestellt (weiße Pfeile). Abtragsleistung 95 mW, Abtragszeit 1 s.



**Abb. 4.19 TEM Aufnahme**

**Abtragsleistung 60 mW, Abtragszeit 1 s.  
Die unscharfe Umrandung (Pfeile) beruht  
auf Schrumpfungsprozessen bei der  
histologischen Aufarbeitung und der  
Schnittrichtung.**

## 4.2 Auswirkung unterschiedlicher Geschwindigkeitsparameter auf die Schnittbreite bei konstanter Abtragsleistung und Abtragszeit

Die Auswirkungen unterschiedlicher Geschwindigkeitsparameter (Verweildauer, Scangeschwindigkeit und Wiederholrate) auf die Schnittbreiten wurden bei 3 Leistungsniveaus (100, 60 und 50 mW) untersucht. In jeder Versuchsreihe wurden die entsprechende mittlere Leistung und die Abtragszeit konstant gehalten. Die Abtragszeit betrug stets 1 s und wurde über einen externen Shutter im Strahlengang gesteuert.

### 4.2.1 Versuchsreihen

Tab. 4.1 gibt die variierten Parameter der 3 Versuchsreihen (I, II, III) wieder. Detaillierte Angaben zur Berechnung und Bedeutung dieser Parameter können Kapitel 3.4.2 entnommen werden.

	Mittlere Leistung (mW)	Abtragszeit (konstant) (s)	variierte Parameter		
			Wiederholrate (Hz)	Verweildauer (ms)	Scangeschwindigkeit (m/s)
I	100	1	512	0,006	0,164
			256	0,012	0,082
			128	0,024	0,041
			64	0,052	0,019
			32	0,098	0,010
II	60	1	512	0,006	0,164
			256	0,012	0,082
			128	0,024	0,041
			64	0,052	0,019
			32	0,098	0,010
III	50	1	512	0,006	0,164
			256	0,012	0,082
			128	0,024	0,041
			64	0,052	0,019
			32	0,098	0,010

**Tab. 4.1 Übersicht Versuchsreihen: Variation der Verweildauer/Wiederholrate/Scangeschwindigkeit bei konstanter Abtragsleistung und Abtragszeit. Die Werte wurden auf die 3. Nachkommastelle gerundet.**

## 4.2.2 Ergebnisse

Die folgenden Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4 sowie die Abb. 4.20, 4.21 und 4.22 geben die in den Versuchsreihen I bis III ermittelten Werte für die Schnittbreiten sowie die statistischen Maßzahlen wieder.

Ergebnisse der Versuchsreihe I:

Ergebnisse - Versuchsreihe I Mittlere Leistung 100 mW, Abtragszeit 1s								
Wiederhol- rate	Verweil- dauer	Scangeschwindig- keit	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
			Mittel- wert	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
(Hz)	(ms)	(m/s)	( $\mu\text{m}$ )					
512	0,006	0,164	1,161	0,074	0,005	1,196	84	0,008
256	0,012	0,082	1,197	0,051	0,003	1,196	93	0,005
128	0,024	0,041	1,293	0,062	0,004	1,300	93	0,006
64	0,052	0,019	1,373	0,060	0,003	1,378	93	0,006
32	0,098	0,010	1,337	0,086	0,007	1,352	87	0,009

Tab. 4.2 Ergebnisse der Versuchsreihe I, Werte auf 3. Nachkommastelle gerundet, n=Anzahl Messwerte.

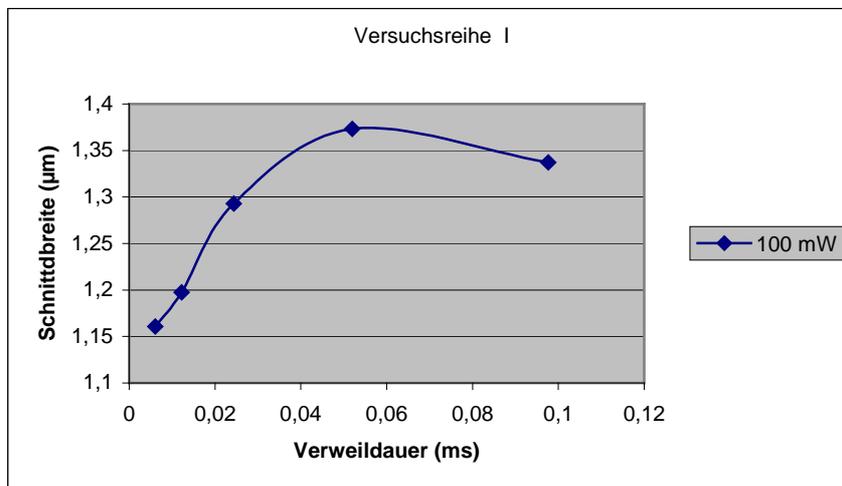


Abb. 4.20 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe I.

## Ergebnisse der Versuchsreihe II:

Ergebnisse - Versuchsreihe II								
Mittlere Leistung 60 mW, Abtragszeit 1s								
Wiederholrate	Verweildauer	Scangeschwindigkeit	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
			Mittelwert	Standardabweichung	Varianz	Median	n	Standardfehler
(Hz)	(ms)	(m/s)	( $\mu\text{m}$ )					
512	0,006	0,164	0,437	0,079	0,006	0,443	102	0,008
256	0,012	0,082	0,515	0,039	0,002	0,520	93	0,005
128	0,024	0,041	0,561	0,047	0,002	0,572	90	0,005
64	0,052	0,019	0,601	0,039	0,001	0,598	99	0,003
32	0,098	0,010	0,338	0,062	0,004	0,338	99	0,006

Tab. 4.3 Ergebnisse der Versuchsreihe II, Werte auf 3. Nachkommastelle gerundet, n=Anzahl Messwerte.

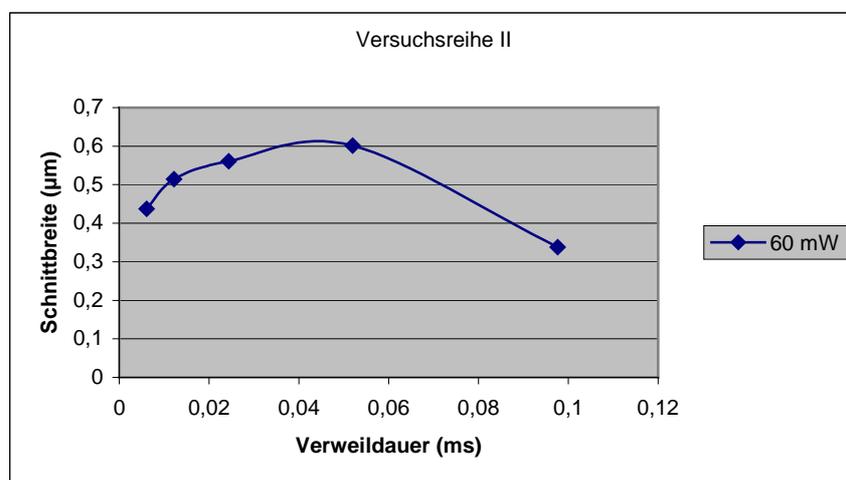
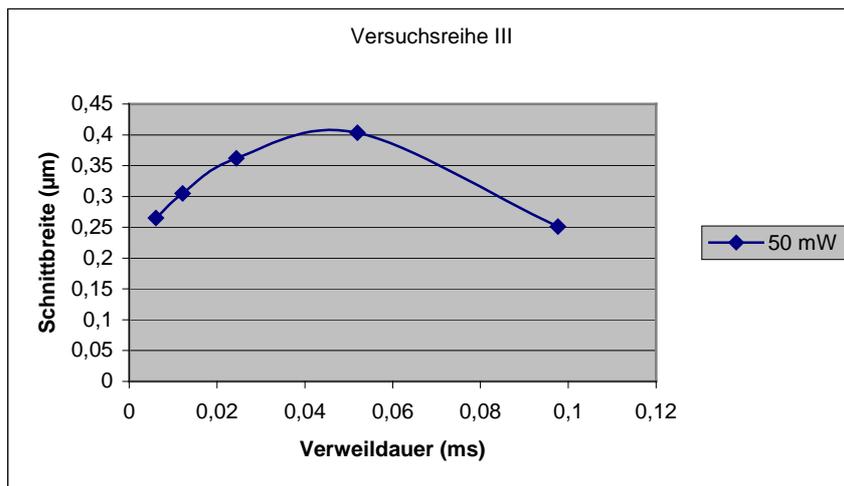


Abb. 4.21 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II.

## Ergebnisse der Versuchsreihe III:

Ergebnisse - Versuchsreihe III								
Mittlere Leistung 50 mW, Abtragszeit 1s								
Wiederholrate	Verweildauer	Scangeschwindigkeit	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
			Mittelwert	Standardabweichung	Varianz	Median	n	Standardfehler
(Hz)	(ms)	(m/s)	( $\mu\text{m}$ )					
512	0,006	0,164	0,265	0,041	0,002	0,260	87	0,004
256	0,012	0,082	0,305	0,040	0,002	0,312	99	0,004
128	0,024	0,041	0,362	0,049	0,002	0,364	105	0,005
64	0,052	0,019	0,403	0,044	0,002	0,416	96	0,005
32	0,098	0,010	0,251	0,042	0,002	0,235	96	0,004

Tab. 4.4 Ergebnisse der Versuchsreihe III, Werte auf 3. Nachkommastelle gerundet, n=Anzahl Messwerte.



**Abb. 4.22 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe III.**

Die vorangehenden Versuche ergaben, dass bei gleichbleibender Abtragszeit und Abtragsleistung das Variieren der Geschwindigkeitsparameter Auswirkungen auf die ermittelten Schnittbreiten hat. Die größte Schnittbreite haben wir in allen getesteten Leistungsstufen bei einer Verweildauer von 0,052 ms pro  $\mu\text{m}$ , einer Wiederholrate von 64 Hz und einer Scangeschwindigkeit von 0,019 m/s ermittelt. Mit dieser Einstellung schneidet der Laser am effektivsten.

### 4.3 Auswirkungen unterschiedlicher Laserleistungen auf die Schnittbreite bei konstanten Abtragszeiten

Bei konstanten Abtragszeiten wurde die Laserleistung variiert (30 bis 100 mW). Es wurden die Geschwindigkeitsparameter verwendet, bei dem der Laser die vordere Linsenkapsel am effektivsten schneidet (Verweildauer: 0,052 ms pro  $\mu\text{m}$ , Wiederholrate: 64 Hz, Scangeschwindigkeit: 0,019 m/s, vgl. Kap. 3.4.2 und Kap. 4.2). Die Geschwindigkeitsparameter wurden in dieser Versuchsreihe stets konstant gehalten.

#### 4.3.1 Versuchsreihen

Die Parameter und die Versuchsreihen (I bis V) sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 4.5) dargestellt.

I		II		III		IV		V	
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)								
1	100	1/2	100	1/4	100	1/8	100	1/60	100
	90		60		60		90		90
	80		50		50		80		80
	70		45		45		70		70
	60		40		40		60		60
	50						50		50
	45						45		45
	40						40		40
	35								
	30								

Tab. 4.5 Übersicht Versuchsreihen: konstante Abtragszeiten bei unterschiedlichen Abtragsleistungen.

### 4.3.2 Ergebnisse

Ergebnisse der Versuchsreihe I:

Versuchsreihe I								
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )						
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler	
1	100	1,373	0,059	0,003	1,378	93	0,006	
	90	1,199	0,092	0,008	1,196	93	0,010	
	80	0,991	0,077	0,006	0,988	90	0,008	
	70	0,770	0,078	0,006	0,780	90	0,008	
	60	0,601	0,039	0,002	0,598	99	0,004	
	50	0,403	0,044	0,002	0,416	96	0,005	
	45	0,306	0,037	0,001	0,312	96	0,004	
	40	0,216	0,038	0,001	0,208	102	0,004	
	35	u						
	30	u						

Tab. 4.6 Ergebnisse der Versuchsreihe I, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

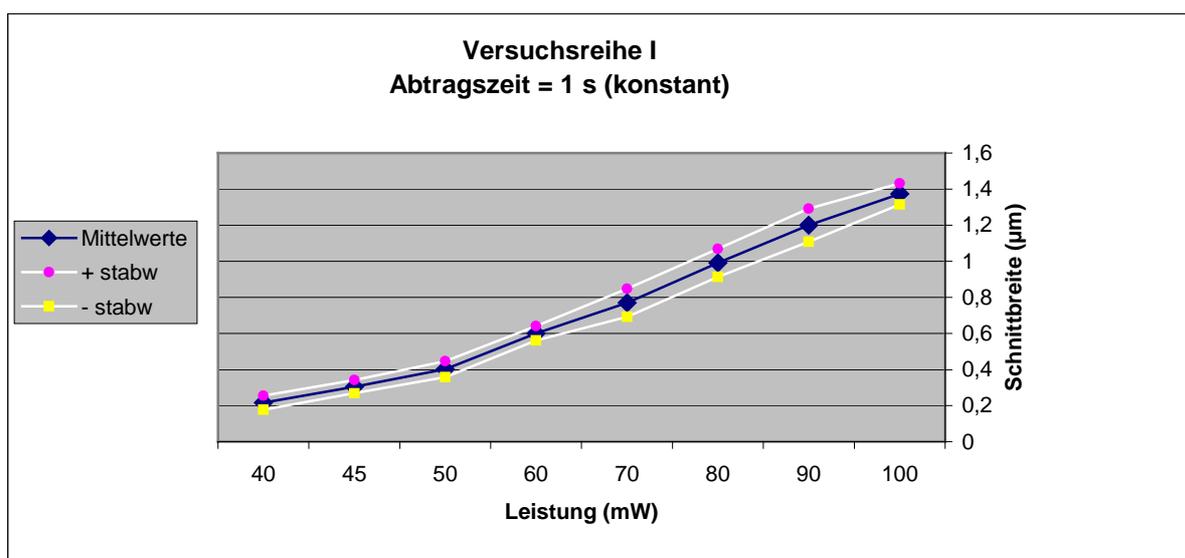


Abb. 4.23 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe I, konstante Abtragszeit.

Wird bei konstanter Abtragszeit die Leistung des Lasers erhöht, so wird auch die Schnittbreite größer. Der Grafik in Abb. 4.23 lässt sich entnehmen, dass für die verwendeten Leistungen eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Schnittbreite und der Leistung bestand.

Bei Leistungswerten kleiner als 40 mW (Abtragszeit = 1 s), waren die Schnittbreiten kleiner als 0,2  $\mu\text{m}$ . Zudem waren die Schnitte in den Autofluoreszenzbildern nicht ganz durchgängig. Diese Schnitte wurden nicht ausgewertet.

## Ergebnisse der Versuchsreihe II:

Versuchsreihe II							
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung	Varianz	Median	n	Standardfehler
1/2	100	1,201	0,102	0,010	1,196	105	0,010
	60	0,486	0,049	0,002	0,494	99	0,005
	50	0,232	0,030	0,001	0,234	90	0,003
	45	< 0,2					
	40	u					

Tab. 4.7 Ergebnisse der Versuchsreihe II, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

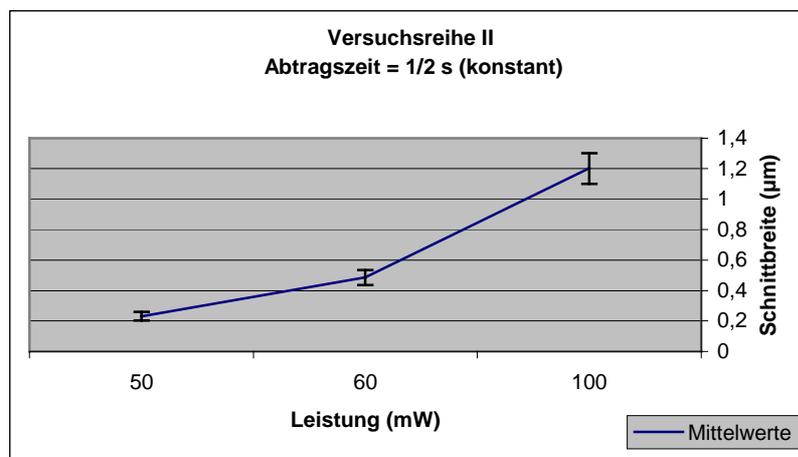


Abb. 4.24 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II, konstante Abtragszeit.

Bei der Versuchsreihe II (Abtragszeit = 1/2 s) wurden die Schnitte, die mit einer Leistung von weniger als 50 mW durchgeführt worden sind, nicht ausgewertet. Diese hatten eine kleinere Schnittbreite als 0,2  $\mu\text{m}$  und waren teilweise nicht ganz durchgängig. Die Schnittbreiten wurden bei Verringerung der Leistungswerte kleiner.

## Ergebnisse der Versuchsreihe III:

Versuchsreihe III							
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung	Varianz	Median	n	Standardfehler
1/4	100	1,080	0,080	0,006	1,066	93	0,008
	60	0,398	0,042	0,002	0,390	108	0,004
	50	< 0,2					
	45	u					
	40	u					

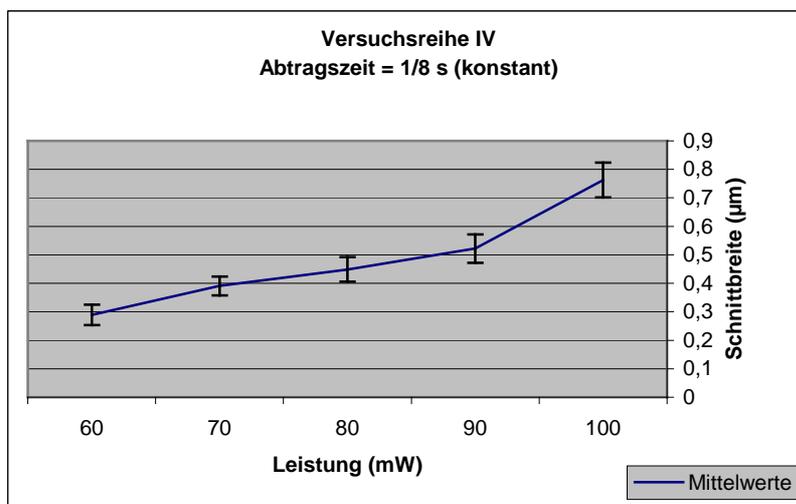
Tab. 4.8 Ergebnisse der Versuchsreihe III, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

Bei der einer konstanten Abtragszeit von  $1/4$  s kann als unterer Grenzwert für die Leistung, bei der noch qualitativ gute Schnitte zu beobachten sind, der Leistungsbereich von 50 bis 60 mW angegeben werden. Die ermittelten Werte bestätigen die Abhängigkeit, die auch in den vorangehenden Versuchsreihen beobachtet worden ist.

Ergebnisse der Versuchsreihe IV:

Versuchsreihe IV							
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
1/8	100	0,763	0,061	0,004	0,754	141	0,005
	90	0,522	0,050	0,002	0,520	90	0,005
	80	0,449	0,043	0,002	0,442	120	0,004
	70	0,391	0,033	0,001	0,390	99	0,003
	60	0,289	0,036	0,001	0,286	90	0,004
	50	< 0,2					
	45	u					
	40	u					

**Tab. 4.9** Ergebnisse der Versuchsreihe IV, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.



**Abb. 4.25** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe IV, konstante Abtragszeit.

Auch mit einer konstanten Abtragszeit von  $1/8$  s werden die Schlussfolgerungen der vorangehenden Versuche bestätigt.

## Ergebnisse der Versuchsreihe V:

Versuchsreihe V							
Abtragszeit konstant (s)	Leistung (mW)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung	Varianz	Median	n	Standardfehler
1/60	100	0,326	0,058	0,003	0,338	138	0,005
	90	0,275	0,040	0,002	0,261	90	0,004
	80	0,239	0,034	0,001	0,234	120	0,003
	70	0,216	0,032	0,001	0,208	99	0,003
	60	< 0,2					
	50	u					
	45	u					
40	kaum Effekt						

Tab. 4.10 Ergebnisse der Versuchsreihe V, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

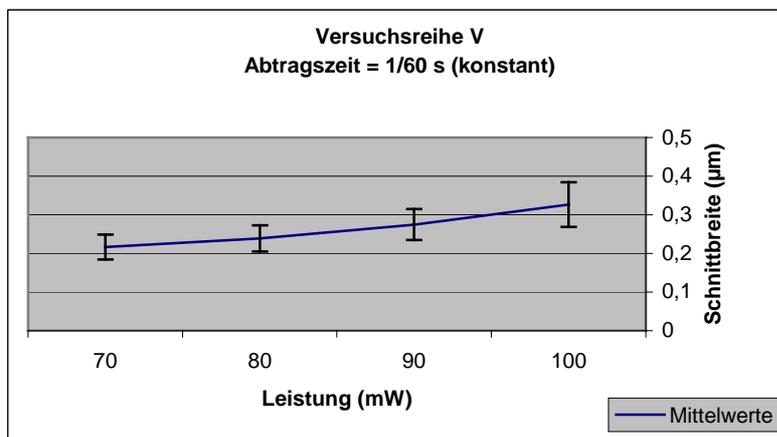


Abb. 4.26 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe V, konstante Abtragszeit.

Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuchsreihen. Bei einer konstanten Abtragszeit besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der ermittelten Schnittbreite und der Leistungsstufe.

#### 4.4 Auswirkungen unterschiedlicher Abtragszeiten auf die Schnittbreite bei konstanten Leistungsstufen

Bei konstanten Leistungsstufen wurden die Abtragszeiten variiert (1/60 s [16 ms] bis 4 s). Es wurden die Geschwindigkeitsparameter verwendet, bei dem der Laser die vordere Linsenkapsel am effektivsten schneidet (Verweildauer: 0,052 ms pro  $\mu\text{m}$ , Wiederholrate: 64 Hz, Scangeschwindigkeit: 0,019 m/s, vgl. Kap 3.4.2 und Kap. 4.2). Die Geschwindigkeitsparameter wurden in dieser Versuchsreihe stets konstant gehalten.

##### 4.4.1 Versuchsreihen

Nachfolgende Tabelle stellt die Versuchsreihen dar, in denen die Abtragszeiten variiert worden sind.

Tab. 4.11 stellt die Versuchsreihen (I – VIII) und die verwendeten Parameter dar.

I		II		III		IV	
Leistung konstant	Abtragszeit						
(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)
100	4	90	1	80	1	70	1
	2		1/8		1/8		1/8
	1		1/60		1/60		1/60
	1/2						
	1/4						
	1/8						
	1/15						
	1/30						
	1/60						
V		VI		VII		VIII	
Leistung konstant	Abtragszeit						
(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)	(mW)	(s)
60	1	50	1	45	1	40	1
	1/2		1/2		1/2		1/2
	1/4		1/4		1/4		1/4
	1/8		1/8		1/8		1/8
	1/60		1/60		1/60		1/60

Tab. 4.11 Übersicht Versuchsreihen, konstante Abtragsleistungen bei unterschiedlichen Abtragszeiten.

#### 4.4.2 Ergebnisse

Nachfolgende Grafiken und Tabellen stellen die Ergebnisse der Versuchsreihen dar, in den die Abtragszeit variiert worden ist. Die Abtragsleistung blieb konstant.

Ergebnisse der Versuchsreihe I:

Versuchsreihe I							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
100	4	1,485	0,148	0,022	1,508	90	0,016
	2	1,424	0,080	0,006	1,430	111	0,008
	1	1,373	0,059	0,003	1,378	93	0,006
	1/2	1,201	0,102	0,010	1,196	105	0,010
	1/4	1,080	0,080	0,006	1,066	93	0,008
	1/8	0,763	0,061	0,004	0,754	141	0,005
	1/15	0,619	0,066	0,004	0,624	123	0,006
	1/30	0,491	0,046	0,002	0,494	129	0,004
	1/60	0,326	0,058	0,003	0,338	138	0,005

Tab. 4.12 Ergebnisse der Versuchsreihe I,  $u$  = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle,  $n$ =Anzahl Messwerte.

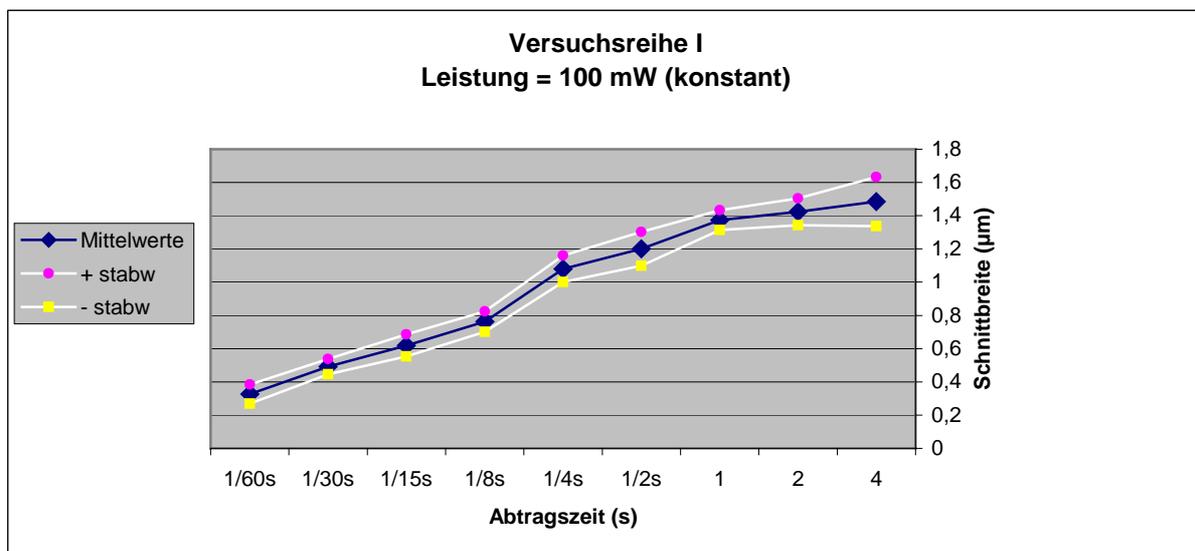


Abb. 4.27 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe I, konstante Abtragsleistung.

Bei konstanter Abtragsleistung wird die Schnittbreite bei länger werdenden Abtragszeiten größer. Der Kurvenverlauf in der Grafik stellt einen nahezu linearen Verlauf (Abhängigkeit) dar.

## Ergebnisse der Versuchsreihe II:

Versuchsreihe II							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
90	1	1,199	0,092	0,008	1,196	93	0,010
	1/8	0,522	0,050	0,002	0,520	90	0,005
	1/60	0,275	0,040	0,002	0,261	90	0,004

Tab. 4.13 Ergebnisse der Versuchsreihe II, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

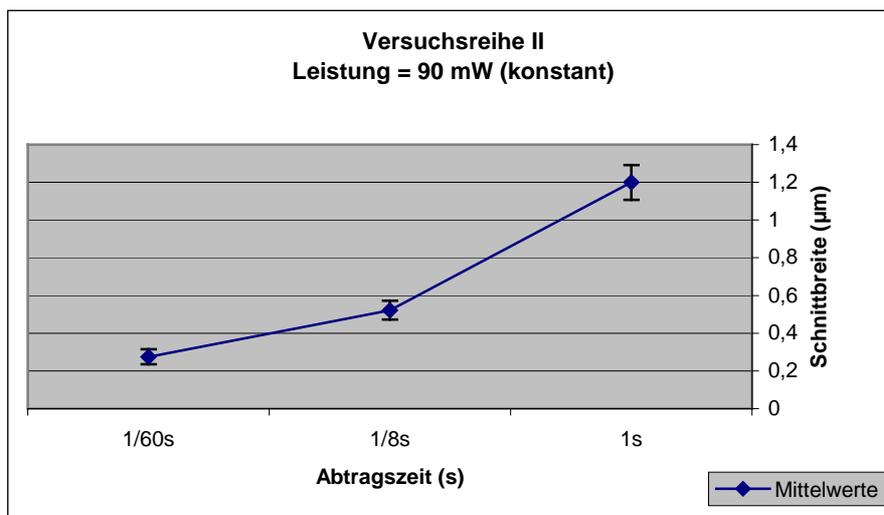


Abb. 4.28 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe II, konstante Abtragsleistung.

Auch mit einer konstanten Leistung von 90 mW ist zu erkennen, dass eine Verlängerung der Abtragszeit zu größeren Schnitten führt.

## Ergebnisse der Versuchsreihe III:

Versuchsreihe III							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
80	1	0,991	0,077	0,006	0,988	90	0,008
	1/8	0,449	0,043	0,002	0,442	120	0,004
	1/60	0,239	0,034	0,001	0,234	120	0,003

Tab. 4.14 Ergebnisse der Versuchsreihe III, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

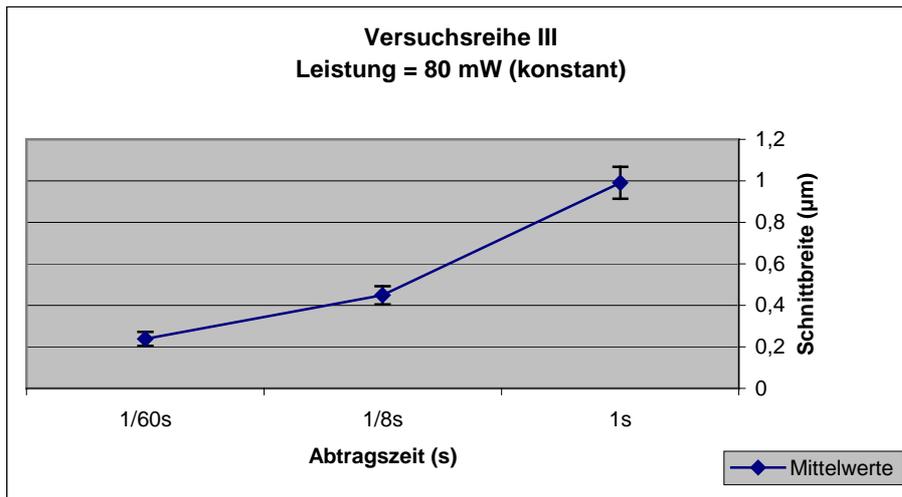


Abb. 4.29 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe III, konstante Abtragsleistung.

Ergebnisse der Versuchsreihe IV:

Versuchsreihe IV							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite (µm)					
		Mittelwert (µm)	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
70	1	0,770	0,078	0,006	0,780	90	0,008
	1/8	0,391	0,033	0,001	0,390	99	0,003
	1/60	0,216	0,032	0,001	0,208	99	0,003

Tab. 4.15 Ergebnisse der Versuchsreihe IV, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

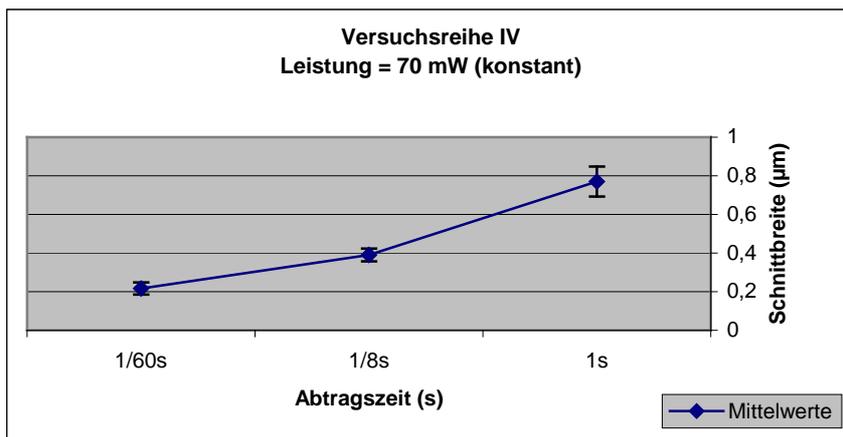


Abb. 4.30 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe IV, konstante Abtragsleistung.

## Ergebnisse der Versuchsreihe V:

Versuchsreihe V							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
60	1	0,601	0,039	0,002	0,598	99	0,004
	1/2	0,486	0,049	0,002	0,494	99	0,005
	1/4	0,398	0,042	0,002	0,390	108	0,004
	1/8	0,290	0,036	0,001	0,286	90	0,004
	1/60	< 0,2					

Tab. 4.16 Ergebnisse der Versuchsreihe V, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

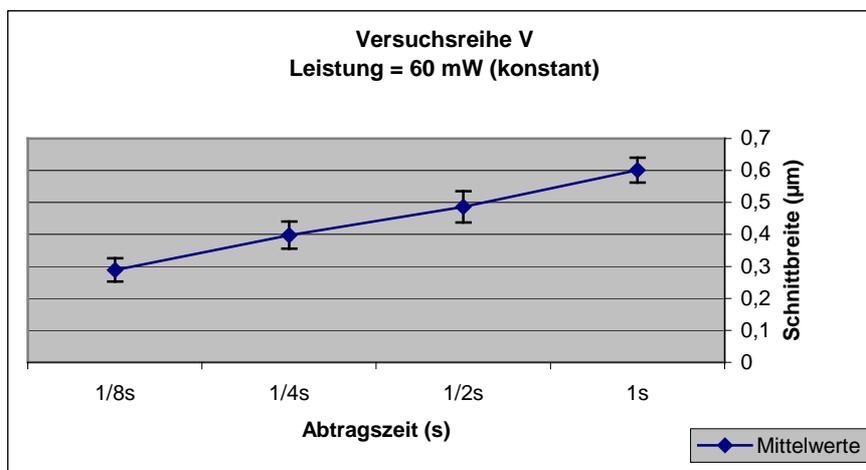


Abb. 4.31 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Versuchsreihe V, konstante Abtragsleistung.

## Ergebnisse der Versuchsreihe VI:

Versuchsreihe VI							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
50	1	0,403	0,044	0,002	0,416	96	0,005
	1/2	0,232	0,030	0,001	0,234	90	0,003
	1/4	< 0,2					
	1/8	< 0,2					
	1/60	u					

Tab. 4.17 Ergebnisse der Versuchsreihe VI, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

## Ergebnisse der Versuchsreihe VII:

Versuchsreihe VII							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
45	1	0,306	0,037	0,001	0,312	96	0,004
	1/2	< 0,2					
	1/4	u					
	1/8	u					
	1/60	u					

**Tab. 4.18** Ergebnisse der Versuchsreihe VII, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

## Ergebnisse der Versuchsreihe VIII:

Versuchsreihe VIII							
Leistung konstant (mW)	Abtrags- zeit (s)	Schnittbreite ( $\mu\text{m}$ )					
		Mittelwert ( $\mu\text{m}$ )	Standard- abweichung	Varianz	Median	n	Standard- fehler
40	1	0,216	0,038	0,001	0,208	102	0,004
	1/2	u					
	1/4	u					
	1/8	u					
	1/60	u					

**Tab. 4.19** Ergebnisse der Versuchsreihe VIII, u = sichtbar, jedoch undeutlich und nicht auswertbar, Werte gerundet auf 3. Nachkommastelle, n=Anzahl Messwerte.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigen, dass bei jeder Leistungsstufe eine Verlängerung der Abtragszeit zu einer Vergrößerung der Schnittbreite führt. Es besteht eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Abtragszeit und der Schnittbreite.

In unserer Versuchsanordnung betrug die kleinste messbare Schnittbreite ca.  $0,2 \mu\text{m}$ . Dieser Wert ist mit verschiedenen Laserparametern erzielbar. Bei einer Leistung von  $40 \text{ mW}$  benötigt man für die kleinste messbare Schnittbreite eine Abtragszeit von  $1 \text{ s}$ . Bei einer Leistung zwischen  $45$  und  $50 \text{ mW}$  benötigt man hierfür  $1/2 \text{ s}$ . Bei einer Leistung von  $60 \text{ mW}$  benötigt man für die kleinste Schnittbreite eine Abtragszeit zwischen  $1/4$  und  $1/8 \text{ s}$  und mit  $70 \text{ mW}$  eine Abtragszeit von  $1/60 \text{ s}$ .

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich unverstärkte Femtosekundenlaser in Kombination mit der Laser-Scanning-Mikroskopie für das Darstellen und Bearbeiten der vorderen humanen Linsenkapsel eignen. Ziel war es, Grundlagen für einen klinischen Einsatz dieses Verfahrens zu schaffen. Klinische Einsatzgebiete sind denkbar bei der Kapsulorhexis und der Behandlung von postoperativen Komplikationen, wie z.B. der Kapselschrumpfung. Bei erschwerten Operationsbedingungen könnte man mit Hilfe dieses Verfahrens die vordere Linsenkapsel druck- und kontaktfrei schneiden. Ein solches Verfahren gewinnt dann weitere Attraktivität, wenn der Femtosekundenlaser auch bei der Phakoemulsifikation selbst anstelle des Ultraschalls zum Einsatz kommt.

### 5.1 Bildgebung und klinischer Einsatz

In Kombination mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (Multiphotonenmikroskopie) war eine schnelle, nicht-invasive und hochauflösende Bildgebung des Gewebes möglich. Histologische Untersuchungen haben ergeben, dass eine gute Korrelation zwischen den in Autofluoreszenzaufnahmen ermittelten Schnittbreiten und denen in TEM-Aufnahmen besteht. Die Multiphotonenmikroskopie ermöglicht das zielgenaue Wiederfinden von Strukturen in der zu untersuchenden Probe. Ähnliche Bildgebungssysteme werden heutzutage in der Dermatologie schon teilweise klinisch eingesetzt bzw. befinden sich noch in der Erprobungsphase<sup>38</sup>.

Die unmittelbare Bildgebung müsste für die präzise Bearbeitung der vorderen Linsenkapsel im klinischen Einsatz sehr vorteilhaft sein. V.a. Autofluoreszenz- und Reflektionsaufnahmen kämen für die Bildgebung in Frage. Im klinischen Einsatz wären reine Autofluoreszenzaufnahmen ausreichend. In diesem Modus lassen sich Zellen und Gewebsstrukturen exakt darstellen<sup>58</sup>. Zusätzliche Filtersysteme oder Detektoren für Reflektionsaufnahmen wären somit nicht notwendig. Bei in-vitro Versuchen sind Transmissions- und Reflektionsaufnahmen zur Orientierung an der Probe sehr hilfreich. Aus technischen Gründen wären Transmissionsaufnahmen in in-vivo Versuchen nicht realisierbar (Detektor hinter der zu behandelnden Probe, siehe Kap 3.3 und 3.4).

Ohne endoskopische Systeme ist allerdings nur ein oberflächlicher Einsatz dieser Anwendung möglich. Die im Versuchsaufbau verwendeten Systeme ermöglichen die sichere exakte Fokussierung des Strahls in einer geringen Distanz (ca. 200  $\mu\text{m}$ ). Mit anderen Objektiven ist es möglich, in größeren Distanzen zu fokussieren. Beispielsweise können bei der Verwendung eines 20er Objektivs (statt eines 40er wie im Versuchsaufbau) Strukturen abgebildet werden, die in deutlich mehr als einem Zentimeter in der Tiefe liegen. Jedoch geht hierbei die Zielgenauigkeit bei den Laserschnitten verloren und die Wahrscheinlichkeit einer Schädigung von Nachbargewebe nimmt aufgrund der ungünstigeren Energieverteilung zu. Außerdem wären hierfür andere Laserparameter (höhere Energiewerte für die Tiefe) notwendig. Es wird deshalb aktuell an endoskopischen Systemen geforscht, welche den Einsatz in tiefer gelegenen und anatomisch schwer erreichbaren Strukturen ermöglichen sollen<sup>40</sup>. Dadurch, dass Bildgebung und Laserabtrag über einen Strahlengang erfolgen, könnten solche endoskopischen Systeme ein breites Anwendungsspektrum ermöglichen.

Laser-Systeme, welche heutzutage zur Behandlung von Gewebe eingesetzt werden (z.B. verstärkte Femtosekundenlaser, Excimer Laser), ermöglichen dagegen keine zeitnahe Bildgebung. Somit besteht keine unmittelbare Kontrolle des Gewebes. Bisher erfolgt die unmittelbare Bildgebung mit Stereomikroskopen (Operationsmikroskop, Spaltlampe) mit begrenzter Auflösung. Nicht exakt abgrenzbare Strukturen müssen mit Hilfstechniken dargestellt werden, beispielsweise durch Färbeverfahren. Bei der Anwendung von Laserapplikationen müssen heutzutage bei der Fokussierung im Gewebe möglichst genaue Algorithmen eingehalten werden, z.B. bei der YAG-Kapsulotomie der hinteren Linsenkapsel beim Nachstar. Hier erfolgt die Laserapplikation an der Spaltlampe. Die hintere Linsenkapsel wird mit einem Zielstrahl fokussiert. Aufgrund der Ungenauigkeit muss darauf geachtet werden, dass der Abstand nicht variiert wird, da sonst Nachbarstrukturen beschädigt werden können.

Ein neuer Ansatz ist die Laserapplikation mit zeitnahe hochauflösender Bildgebung in einem System. Solch ein System bietet mehrere Vorteile. Die Bildgebung kann präoperativ zur Diagnostik und exakten Lokalisierung von Zielstrukturen eingesetzt werden. Perioperativ ist eine genaue Fokussierung des Laserstrahls im Zielgebiet möglich. Sowohl während als auch nach der Operation erlaubt die Bildgebung ein unmittelbares Feedback. Schnitte bzw. Abtragsränder sind in Autofluoreszenzaufnahmen genauestens darstellbar.

Seit Jahren verfügt man mit dem Laser über ein Schneideinstrument. Dieser wurde kontinuierlich weiterentwickelt, um den hohen Anforderungen an die Präzision gerecht zu werden. Mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie kann nun auch die zeitnahe Bildgebung zur weiteren Präzision der Instrumente und Verfahren beitragen. Die Anpassung der Sensorik (Bildgebung) an die steigende Präzision des Effektors (Schneideinstrument) ist ein wichtiger Schritt, um den Effektor zielführend einsetzen zu können. Seit längerem wird an dem Konzept des „Sehenden Laser-Skalpells“ geforscht. Unverstärkte Femtosekundenlaser in Kombination mit Laser-Scanning-Mikroskopen kommen diesem Konzept in in-vitro schon sehr nahe. Experimentelle Studien an der Hornhaut und der Netzhaut lieferten vielversprechende Ergebnisse<sup>25</sup>. Die Präzision der Systeme ermöglicht sogar eine intravasale Chirurgie in der Netzhaut. Die zuvor in die venösen Gefäße der Netzhaut eingebrachten Materialien wie Fäden und menschliche Haare, konnten in experimentellen Studien ohne eine Schädigung der Gefäßwand kontaktfrei mit dem Laser im Gefäßlumen geschnitten werden<sup>55</sup>. In diesen in-vitro Experimenten an der Hornhaut und Netzhaut wurden ebenfalls eine Bildgebung mittels Multiphotonenmikroskopie durchgeführt<sup>37, 41, 58, 59, 60</sup>. Auch diese Experimente zeigen, dass sich die Multiphotonenmikroskopie für die Darstellung des Gewebes und der Laserabträge sehr gut eignet.

Der Einsatz des Lasers in der Kataraktchirurgie ist grundsätzlich seit langem von wissenschaftlicher Interesse. Mit dem Nd:YAG-Laser wurde intensiv an der vorderen Laser-Kapsulotomie geforscht. Aufgrund der hohen Energie (im Bereich von mJ, Wellenlänge: 1064 nm) des Nd:YAG-Laser findet eine „Aufsprengung“ der vorderen Linsenkapsel statt. Somit ist es nicht möglich, mit dem Nd:YAG-Laser eine stabile und saubere Risskante zu erzielen. Zudem können starke destruktive Nebeneffekte auftreten. Hierbei wurden Schäden an Endothelzellen der Kornea und Änderungen an der Descemet Membran beobachtet<sup>56</sup>.

Mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser wäre im Gegensatz zum Nd:YAG-Laser ein präzises, zielgenaues Ausschneiden der vorderen Linsenkapsel möglich. Zudem sind hierbei aufgrund der geringen Energiewerte keine nennenswerten destruktiven Nebeneffekte zu erwarten. Die Gefahr des Einreißen der vorderen Linsenkapsel mit der Fortführung des Risses in die hintere Kapsel (Ruptur der hinteren Linsenkapsel) ist aufgrund der präzisen Schnittkante bei unverstärkten Femtosekundenlasern sehr gering. Die geringen Energiewerte bei unverstärkten Femtosekundenlasern und die exakte Fokussierung des Laserstrahls, u.a. mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie, lassen keine Schäden an Nachbarstrukturen, wie

z.B. am Hornhautendothel, erwarten. Die Gefahr der Defokussierung des Laserstrahls ist aufgrund hoher Zielgenauigkeit sehr gering („Sehendes Laserskalpell“).

Weitere Forschungsprojekte werden untersuchen, ob Bildgebung und Schneideinstrument in der Zukunft in einem klinisch einsetzbaren Gerät vereint werden können. Die Bildgebung mittels Multiphotonenmikroskopie könnte außerdem auch als diagnostisches Hilfsmittel allein wertvolle Informationen zur Verfügung stellen.

Die in dieser Arbeit ausgearbeiteten Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere in-vivo Experimente an der vorderen humanen Linsenkapsel. Bei in-vivo Experimenten müssten insbesondere Faserendoskope und Objektive geringerer numerischer Apertur zur Überwindung größerer Distanzen evaluiert werden.

## 5.2 Die ermittelten Schnittbreiten bei unterschiedlichen Parametern

Die Variation der Geschwindigkeitsparameter des Laserstrahls, bei sonst konstanter Abtragszeit und Abtragsleistung, hat Auswirkungen auf die Schnittbreite. Der Geschwindigkeitsparameter des Laserstrahls lässt sich über die Software des Computers regulieren. Dieser Parameter gibt an, wie schnell und wie oft der Laserstrahl über eine Linie mit einer bestimmten Länge (Pixelanzahl) in einer definierten Zeit entlang fährt. Das Verhalten des Laserstrahls mit dem jeweiligen Geschwindigkeitsparameter kann mit den Maßzahlen Scangeschwindigkeit, Verweildauer und Wiederholrate beschrieben werden. Die Scangeschwindigkeit haben wir in der Einheit  $m/s$ , die Verweildauer für die Strecke von einem Mikrometer in der Einheit  $ms$  und die Wiederholrate in der Einheit  $Hz$  angegeben. Je höher die Scangeschwindigkeit ist, desto schneller ist auch die Wiederholrate des Laserstrahls. Die Verweildauer pro Mikrometer nimmt dabei ab. Die Scangeschwindigkeit und die Verweildauer beschreiben den Photoneneintrag über eine Strecke in einem kurzen Zeitintervall, die Wiederholrate beschreibt einen wiederkehrenden Photoneneintrag. Der Photoneneintrag über eine Strecke in einem kurzen Zeitintervall und ein wiederkehrender Photoneneintrag über eine Strecke haben jeweils unterschiedliche physikalische Auswirkungen, u.a. auf das Aufheizen des Gewebes und die Plasmabildung. Der Gewebsabtrag beruht auf dem Phänomen der Photodisruption (vgl. Kap 3.4). Die Bestrahlung des Gewebes führt zur Ionisation und Bildung von freien Elektronen. Dies führt zur Plasmabildung (Laser induced optical breakdown). Das Plasma absorbiert weiterhin Energie und expandiert mit begleitender Druck- und Temperaturerhöhung.

Wir haben in unseren Versuchen die Geschwindigkeitsparameter über die Software schrittweise verändert. Die Verlängerung der Verweildauer, mit daraus resultierender Verlangsamung der Scangeschwindigkeit und Verringerung der Wiederholrate, hat bis zu einem bestimmten Wert zur Vergrößerung der Schnittbreiten geführt. Bei weiterer Verlängerung der Verweildauer über diesen Wert hinaus, mit wiederum daraus resultierender weiterer Verlangsamung der Scangeschwindigkeit und Verringerung der Wiederholrate, wurden die Schnittbreiten kleiner. Diese Ergebnisse sind mit den genannten physikalischen Eigenschaften zu erklären. Eine reine Verlängerung der Verweildauer, somit auch die Vermehrung des Photoneneintrags über eine Strecke, führt nämlich ab einem gewissen Punkt zur Verkleinerung der Schnittbreiten. Das zeigt, dass für die Plasmabildung ein wiederkehrender Photoneneintrag auch von großer Bedeutung ist. Die Frequenz des wiederkehrenden Photoneneintrags (Wiederholrate), wurde bei einer höher werdenden Verweildauer verkleinert. Folglich trafen auch weniger Laserimpulse auf das Gewebe und die Schnittbreiten wurden kleiner. Mit den von uns ermittelten Geschwindigkeitsparametern schneidet der Laser die vordere Linsenkapsel am effektivsten. Dieses Ergebnis wurde auch bei Wiederholung der Versuche bei unterschiedlichen Leistungsniveaus bestätigt.

In den Versuchsreihen, in denen wir die Abtragsleistung und die Abtragszeit variiert haben, sahen wir eine lineare Abhängigkeit zwischen der ermittelten Schnittbreite und der Abtragsleistung bzw. der Abtragszeit. Vergleicht man die ermittelten Werte miteinander, so kann man sehen, dass eine bestimmte Schnittbreite mit unterschiedlichen Parametern erreicht werden kann. Beispielsweise kann man eine bestimmte Schnittbreite mit einer hohen Leistung und geringen Abtragszeit oder mit einer geringeren Leistung mit längerer Abtragszeit erreichen. Das bedeutet, dass man je nach zu erzielender Schnittbreite bzw. Schnitttiefe eine möglichst geringe Energie zum Schneiden verwenden kann. Wichtig hierbei ist der Zeitfaktor. Eine akzeptable Zeit für das Schneiden des Gewebes ist von großer Bedeutung. Ziel ist es, das Gewebe schnellstmöglich mit der geringsten Energie präzise zu schneiden. Je geringer die Energie ist, desto geringer sind auch die möglichen kollateralen Schäden.

Die kleinste eindeutig messbare Schnittbreite in unserer Versuchsanordnung betrug ca. 0,2  $\mu\text{m}$ . Kleinere Werte wurden aufgrund der hohen Ungenauigkeit nicht ausgewertet. Folgende Werte wurden als untere Grenzparameter ermittelt, d.h. mit diesen wurden noch eindeutig auswertbare Schnitte erzielt:

Mittlere Leistung (mW)	Abtragszeit (s)
40	1
45 bis 50	1/2
60	1/4 (1/8)
70	1/60

**Tab. 5.1 Untere Grenzparameter.** Die angegebenen Grenzwerte sind mit den Geschwindigkeitsparametern erzielt, bei denen der Laser die vordere Linsenkapsel am effektivsten schneidet (Verweildauer: 0,052 ms pro  $\mu\text{m}$ , Wiederholrate: 64 Hz, Scangeschwindigkeit: 0,019 m/s, vgl. Kap 4.2).

Wie lange das kreisrunde Eröffnen der vorderen Linsenkapsel mit dem hier verwendeten System dauern würde, soll anhand folgender Beispielsrechnung erläutert werden:

Möchte man eine Öffnung mit einem Durchmesser von 6 mm durchführen, so beträgt der Umfang 18,8 mm.

Mit der Abtragsleistung von 100 mW haben wir bei einer Abtragszeit von 1/60 s eine Schnittbreite von 0,326  $\mu\text{m}$  (Mittelwert) ermittelt (Schnittbreite = Schnitttiefe). Hierbei wurde eine Strecke von 320  $\mu\text{m}$  für 1/60 s bestrahlt. Bestrahlt man, mit dem gleichen Verhältnis von Strecke zur Abtragszeit, die Strecke von 18,8 mm (Umfang), so würde man hierfür ca. 0,98 s benötigen. Wenn die Kapsel eine Dicke von 40  $\mu\text{m}$  hätte, bräuchte man für das Ausschneiden ca. 120 s.

Bei dieser theoretischen Berechnung wurde angenommen, dass der Laser die Kapsel schichtweise schneidet. In entsprechenden Versuchen müsste evaluiert werden, welche Auswirkungen dies auf das Gewebe hätte. Es müsste überprüft werden, ob ein spiralförmiger Verlauf des Laserstrahls beim Schneidevorgang effektiver wäre.

Es müsste auch überprüft werden, ob die hier in den Versuchen ermittelten Geschwindigkeitsparameter, bei längeren Abtragsstrecken technisch umgesetzt werden können.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In den unterschiedlichen Versuchsreihen wurde gezeigt, dass mit dem unverstärkten Femtosekundenlaser ein präzises Schneiden der vorderen Linsenkapsel möglich ist. In Kombination mit einem Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht die Multiphotonenmikroskopie eine hochauflösende kontrastreiche Bildgebung. Dies ermöglicht ein zielgenaues Einsetzen des Lasers. Die unmittelbare Bildgebung ermöglicht eine sofortige Beurteilung des Gewebes sowohl vor, als auch nach den Laserabträgen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Parameter dienen als Grundlage für weiterführende Experimente, insbesondere in vivo Versuche. Aufgrund der beobachteten linearen Abhängigkeiten, zwischen den Abtragsparametern und der Schnittbreiten, kann ein sicherer und kalkulierbarer Einsatz in nachfolgenden Versuchen erfolgen.

Die Kombination von Schneidewerkzeug und Bildgebung in einem Instrument ermöglicht eine vielseitige, präzise und sichere Anwendung. Das „Sehende Laserskalpell“ ist ein Konzept, das in vielen Fachbereichen neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie ermöglichen würde<sup>31</sup>.

In der Kataraktchirurgie könnten durch eine erhöhte Präzision viele Komplikationen wie z.B. die Entwicklung des Nachstars oder operative Komplikationen wie z.B. Linsenluxationen reduziert bzw. vermieden werden (vgl. Kap. 2.4.3).

## 6 Literaturverzeichnis

- 1) Akin T, Aykan U, Karadayi K, Aydin A, Yildiz T F, Bilge A H (2007): Capsulorhexis in white cataract using a green-light endoillumination probe. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 38:520-522
- 2) Alimanović-Halilović E (2004): Complications in anterior eye segment after Nd-YAG laser capsulotomy. *Med Arh* 58:157-159
- 3) Alió J, Rodríguez-Prats J L, Galal A, Ramzy M (2005): Outcomes of microincision cataract surgery versus coaxial phacoemulsification. *Ophthalmology* 112:1997-2003
- 4) Amat D E, Moreno A C, Casanovas J M, Matamala A R, Tortajada J G (2002): Surgical management of the capsular contraction syndrome. *Arch Soc Esp Oftalmol* 77:377-380
- 5) Arya S K, Sonika, Kochhar S, Kumar S, Kang M, Sood S (2004): Malignant glaucoma as a complication of Nd:YAG laser posterior capsulotomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 35:248-250
- 6) Auffarth G U, Rabsilber T M, Reuland A J (2005): New methods for the prevention of posterior capsule opacification. *Ophthalmologie* 102:579-586
- 7) Brouzas D, Droutsas D, Charakidas A, Malias I, Georgiadou E, Apostolopoulos M, Moschos M (2006): Severe toxic effect of methylene blue 1% on iris epithelium and corneal endothelium. *Cornea* 25:470-471
- 8) Chéour M, Mghaieth K, Bouladi M, Hasnaoui W, Mrabet I, Kraiem A (2007): Nd:Yag laser treatment of anterior capsule contraction syndrome after phacoemulsification. *J Fr Ophtalmol* 30:903-907
- 9) Chung C F, Liang C C, Lai J S M, Lo E S F, Lam D S C (2005): Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. *J Cataract Refract Surg* 31:938-942
- 10) Cochener B, Jacq P L, Colin J (1999): Capsule contraction after continuous curvilinear capsulorhexis: poly(methyl methacrylate) versus silicone intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 25:1362-1369
- 11) Colakoglu A, Kucukakyuz N, Topcuoglu I E, Akar S (2007): Intraocular pressure rise and recurrence of capsular block syndrome after neodymium:YAG laser anterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 33:1344-1346
- 12) Corydon C, Lindholt M, Knudsen E B, Graakjaer J, Corydon T J, Dam-Johansen M (2007): Capsulorhexis contraction after cataract surgery: comparison of sharp anterior

- edge and modified anterior edge acrylic intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 33:796-799
- 13) Davison J A (1933): Capsule contraction syndrome. *J Cataract Refract Surg* 19:582-589
- 14) Deokule S P, Mukherjee S S, Chew C K S (2006): Neodymium:YAG laser anterior capsulotomy for capsular contraction syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 37:99-105
- 15) Eichler H J, Kronfeldt H D, Sahm J (2006): *Das Neue Physikalische Grundpraktikum. Zweite, erweiterte und aktualisierte Auflage.* Springer Berlin Heidelberg
- 16) Framme C, Hoerauf H, Roider J, Laqua H (1998): Delayed intraocular lens dislocation after neodymium:YAG capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 24:1541-1543
- 17) Fritz W L (2002): Digital image analysis of trypan blue and fluorescein staining of anterior lens capsules and intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 28:1034-1038
- 18) Gallagher S P, Pavilack M A (1999): Risk factors for anterior capsule contraction syndrome with polypropylene or poly(methyl methacrylate) haptics. *J Cataract Refract Surg* 25:1356-1361
- 19) Gamidov A A, Sosnovskiĭ V V, Boev V I, Buzykanova M A (2006): Study of risk factors of laser irradiation-induced intraocular lens damage. *Vestn Oftalmol* 122:28-31
- 20) Gimbel H V, Neuhann T (1990): Development, advantages, and methods of the continuous circular capsulorhexis technique. *J Cataract Refract Surg* 16:31-37
- 21) Gimbel H V (2007): The history of the capsulorhexis technique. *Cataract and Refractive Surgery Today*, October 2007, 39-41
- 22) Göppert-Mayer M (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9:273-295
- 23) Hayashi K, Hayashi H (2007): Effect of anterior capsule contraction on visual function after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 33:1936-1940
- 24) Hettlich H J, El-Hifnawi E S (1997): Scanning electron microscopy studies of the human lens capsule after capsulorhexis. *Ophthalmologie* 94:300-302
- 25) Hild M, Krause M, Riemann I, Mestres P, Toropygin S, Löw U, Brückner K, Seitz B, Jonescu-Cuypers C, König K (2008): Femtosecond Laser-Assisted Retinal Imaging and Ablation: Experimental Pilot Study. *Curr Eye Res* 33: 351-363
- 26) Hollick E J, Spalton D J, Meacock W R (1999): The effect of capsulorhexis size on posterior capsular opacification: one-year results of a randomized prospective trial. *Am J Ophthalmol* 128:271-279

- 27) Holweger R R, Marefat B (1997): Intraocular pressure change after neodymium:YAG capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 23:115-121
- 28) Jacobs D S, Cox T A, Wagoner M D, Ariyasu R G, Karp C L (2006): Capsule staining as an adjunct to cataract surgery: a report from the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 113:707-713
- 29) Juhasz T, Kastis G A, Suárez C, Bor Z, Bron W E (1996): Time-resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water. *Lasers Surg Med* 19:23-31
- 30) Kahraman G, Amon M, Franz C, Prinz A, Abela-Formanek C (2007): Intraindividual comparison of surgical trauma after bimanual microincision and conventional small-incision coaxial phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 33:618-622
- 31) Kermani O, Fabian W, Lubatschowski H (2008): Real-time optical coherence tomography-guided femtosecond laser sub-bowman keratomileusis on human donor eyes. *Am J Ophthalmol* doi:10.1016/j.ajo.2008.03.003
- 32) Kimura W, Yamanishi S, Kimura T, Sawada T, Ohte A (1998): Measuring the anterior capsule opening after cataract surgery to assess capsule shrinkage. *J Cataract Refract Surg* 24:1235-1238
- 33) König K, So P T, Mantulin W W, Tromberg B J, Gratton E (1996): Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J Microsc* 183:197-204
- 34) König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber K J (1999): Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses. *Cell Mol Biol* 45:195-201
- 35) König K (2000): Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 200:83-104
- 36) König K, Riemann I, Fritzsche W (2001): Nanodissection of human chromosomes with near infrared femtosecond laser pulses. *Opt Lett* 26:819-821
- 37) König K, Krauss O, Riemann I (2002): Intratissue surgery with 80 MHz nanojoule femtosecond laser pulses in the near infrared. *Optics Express* 10:171-176
- 38) König K, Riemann I (2003): High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt* 8:432-439
- 39) König K (2003) High resolution multiphoton imaging and nanosurgery of the cornea using femtosecond laser pulses lasers in ophthalmology. In: Fankhauser F, Kwasniewska S (eds) *Lasers in Ophthalmology - Basic, Diagnostic and Surgical Aspects*. Kugler Publications, The Hague, pp 79-89

- 40) König K, Ehlers A, Riemann I, Schenkl S, Bückle R, Kaatz M (2007): Clinical two-photon microendoscopy. *Microsc Res Tech* 70:398-402
- 41) Krause M H J, Löw U, Mestres P, Huss C, Hild M, Riemann I, Ruprecht K W, Laue M, Jahn S, König K (2004): Experimentelle Hornhautchirurgie mit Femtosekunden-Laser. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2004:221(4 suppl):p13
- 42) Kurtz R M, Liu X, Elnor V M, Squier J A, Du D Mourou G A (1997): Photodisruption in the human cornea as a function of laser pulse width. *J Refract Surg* 13:653-658
- 43) Lee J, Choi H Y, Oum B S, Lee J S (2007): Capsulorhexis assisted by slit illuminator for white cataract without a red reflex. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 38:349-352
- 44) Liu Y, Li S (1995): Continuous circular capsulorhexis in extracapsular cataract extraction. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 31:437-439
- 45) Menapace R, Wirtitsch M, Findl O, Buehl W, Kriechbaum K, Sacu S (2005): Effect of anterior capsule polishing on posterior capsule opacification and neodymium:YAG capsulotomy rates: three-year randomized trial. *J Cataract Refract Surg* 31:2067-2075
- 46) Pavlović S (2000): Cataract surgery in children. *Med Pregl.* 53:257-261
- 47) Petric I, Loncar V L (2004): Surgical technique and postoperative complications in pediatric cataract surgery: retrospective analysis of 21 cases. *Croat Med J* 45:287-291
- 48) Polak M, Zarnowski T, Zagórski Z (2002): Results of Nd:YAG laser capsulotomy in posterior capsule opacification. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 57:357-363
- 49) Ranta P, Tommila P, Immonen I, Summanen P, Kivelä T (2000): Retinal breaks before and after neodymium:YAG posterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 26:1190-1197
- 50) Shearing S P, Relyea R L, Loaiza A, Shearing R L (1985): Routine phacoemulsification through a one-millimeter non-sutured incision. *Cataract* 2:6-10
- 51) Singh A J, Sarodia U A, Brown L, Jagjivan R, Sampath R (2003): A histological analysis of lens capsules stained with trypan blue for capsulorhexis in phacoemulsification cataract surgery. *Eye* 17:567-570
- 52) Stevens S, Werner L, Mamalis N (2007): Corneal edema and permanent blue discoloration of a silicone intraocular lens by methylene blue. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 38:136-141
- 53) Tadros A, Bhatt U K, Karim M N A, Zaheer A, Thomas P W (2005): Removal of lens epithelial cells and the effect on capsulorhexis size. *J Cataract Refract Surg* 31:1569-1574
- 54) Tirlapur U K, König K (2002): Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* 418:290-291

- 55) Toropygin S, Krause, M, Riemann I, Hild M, Mestres P, Seitz B, Khurieva E, Ruprecht K W, Löw U, Gatziofias Z, König K (2008): In vitro noncontact intravascular femtosecond laser surgery in models of branch retinal vein occlusion. *Curr Eye Res* 33:277-283
- 56) Vaikoussis E, Bisogiannis Z, Margaritis L (1993): Corneal endothelial damage after Nd:YAG laser anterior capsulotomy. An experimental study on rabbits. *Doc Ophthalmol* 83:279-286
- 57) Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G (2005): Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B: Laser and Optics*. Springer Berlin / Heidelberg 81:1015-1047
- 58) Wang B G, Koenig K, Riemann I, Krieg R, Halbhuber K J (2006): Intraocular multiphoton microscopy with subcellular spatial resolution by infrared femtosecond lasers. *Histochem Cell Biol* 126: 507-515
- 59) Wang B G, Riemann I, Schubert H, Halbhuber K J, Koenig K (2007): In-vivo intratissue ablation by nanojoule near-infrared femtosecond laser pulses. *Cell Tissue Res* 328:515-520
- 60) Wang B G, Riemann I, Schubert H, Schweitzer D, König K, Halbhuber K J (2007): Multiphoton microscopy for monitoring intratissue femtosecond laser surgery effects. *Lasers Surg Med* 39:527-533
- 61) Weikert M P, Bottros A (2006) The Femtosecond Laser: a New Tool for Refractive and Corneal Surgery. In: Kohnen T, Koch D D (eds) *Essentials in Ophthalmology - Cataract and Refractive Surgery*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 83-100
- 62) Wu L, Velasquez R, Montoya O (2008): Non-infectious endophthalmitis associated with trypan blue use in cataract surgery. *Int Ophthalmol* 28:89-93
- 63) Xie L, Sun J, Yao Z (2003): Heparin drug delivery system for prevention of posterior capsular opacification in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241:309-313
- 64) Yeh P C, Goins K M, Lai W W (2002): Managing anterior capsule contraction by mechanical widening with vitrector-cut capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 28:217-220
- 65) Zysset B, Fujimoto J G, Puliafito C A, Birngruber R, Deutsch T F (1989): Picosecond optical breakdown: tissue effects and reduction of collateral damage. *Lasers Surg Med* 9:193-204

## 7 Publikationen

Poster:

Akkaya A, Krause M, Riemann I, Toropygin S, Troeber L, Löw U, Mestres P, Seitz B, König K (2008), Femtosekundenlaserabtrag und –bildung an menschlicher Linsenkapsel in-vitro. 21. Kongress der deutschen Ophthalmochirurgen (DOC), Nürnberg, 2008

zum Vortrag angenommen:

Toropygin S, Krause M, Riemann I, Akkaya A, Seitz B, Mestres P, König K, Experimental femtosecond laser-assisted nanosurgery of the anterior lens capsule. 26. Congress of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), Berlin, 2008

## 8 Dank

**PD Dr. Matthias Krause** möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die konsequente Unterstützung und Motivierung in allen Phasen des Projektes danken. Er brachte mich dem wissenschaftlichen Arbeiten näher, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

**Dr. Iris Riemann** hat mich beim Erlernen der Arbeitstechniken, der Projektplanung und Durchführung stets unterstützt. Für Ihr großes Engagement danke ich Ihr herzlich.

**Dr. Sergej Toropygin** danke ich, dass er seine Erfahrungen in diesem Arbeitsgebiet mit mir uneingeschränkt geteilt hat. Seine Hilfe ermöglichte ein zielgerichtetes und effektives Arbeiten.

**Dr. Ronan Le Harzic, Daniel Sauer und allen Mitarbeitern** der Arbeitsgruppe Lasermedizin des IBMT danke ich für die Hinweise und Hilfe bei der Handhabung des Laser-Scanning-Mikroskops und des Femtosekundenlasers.

**Prof. Dr. Berthold Seitz** danke ich herzlich für die stetige Unterstützung, die hilfreichen Ratschläge und Korrekturen.

**Prof. Dr. Karsten König** danke ich für die Bereitstellung der Laser und Mikroskope, sowie für die Unterstützung bei der Durchführung des Projektes.

**Prof. Dr. Dr. Pedro Mestres** danke ich, für das Ermöglichen der histologischen Aufarbeitung und die hilfreichen Ratschläge.

**Gabi Kiefer, Birgit Leis und Norbert Pütz** danke ich für die Zusammenarbeit bei der histologischen Aufarbeitung.

**Meiner Familie** danke ich für die beständige Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Asim Akkaya
Geburtsdatum	02.12.1982
Geburtsort	Wadern
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1989-1993	Grundschule Schmelz
1993-2002	Johannes Kepler Gymnasium Lebach Abschluss: Abitur (2002)

### Hochschulbildung

seit 10/2002	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes Physikum: Herbst 2004 (erstes Staatsexamen)
08/2007 – 08/2008	Praktisches Jahr, Universitätsklinikum des Saarlandes