

**Änderung der retinalen Autofluoreszenzlebensdauern im zeitlichen  
Verlauf der altersbedingten Makuladegeneration**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Linda-Sophia Schwanengel  
geboren am 03.07.1995 in Mühlhausen/Thüringen

**Gutachter**

- 1. Frau PD Dr. Regine Augsten, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Herr Prof. Dr. Michael Börsch, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Herr PD Dr. Thomas Ach, Universitätsklinikum Bonn**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.02.2024**

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....                                    | 4  |
| <i>1 Zusammenfassung</i> .....  | 5  |
| <i>2 Einleitung</i> .....   | 7  |
| <i>2.1 Altersbedingte Makuladegeneration</i> .....                    | 7  |
| <i>2.2 Fluoreszenz und FLIO</i> .....                                 | 12 |
| <i>2.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz</i> .....                         | 12 |
| <i>2.2.2 Fundusautofluoreszenz</i> .....                              | 14 |
| <i>2.2.3 Fluoreszenz Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)</i> ..... | 15 |
| <i>3 Zielstellung</i> .....   | 17 |
| <i>4 Publierte Originalarbeit</i> .....                               | 18 |
| <i>5 Diskussion</i> .....   | 32 |
| <i>6 Schlussfolgerungen</i> .....                                     | 38 |
| <i>7 Literatur- und Quellenverzeichnis</i> .....                      | 39 |
| <i>Anhang</i> .....   | 49 |
| <i>Publikationsliste</i> .....  | 49 |
| <i>Danksagung</i> .....   | 50 |
| <i>Ehrenwörtliche Erklärung</i> .....                                 | 51 |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| AMD           | Altersbedingte Makuladegeneration   |
| $T_m$         | amplitudengewichtetes Mittel $Tau_{Mean}$   |
| CNV           | chorioidale Neovaskularisation  |
| FAF           | Fundusautofluoreszenz   |
| FAG           | Fluoreszenzangiografie  |
| FLIO          | Fluoreszenz Lifetime Imaging Ophthalmoscopy   |
| GA            | geographische Atrophie  |
| HRF           | hyperreflective foci (signalstarke Punkte im OCT)   |
| iRORA/ cRORA  | incomplete/complete RPE and outer retinal atrophy<br>(inkomplette/komplette Atrophie des Pigmentepithels und der<br>äußeren Retina) |
| IVOM          | intravitreale operative Medikamentenapplikation   |
| LSC           | long spectral channel (langwelliger Kanal) in ps (Picosekunde)  |
| MHz           | Mega-Hertz  |
| $\mu\text{m}$ | Mikrometer  |
| nm            | Nanometer   |
| NEM           | Nahrungsergänzungsmittel  |
| OCT           | optische Kohärenztomographie  |
| PEW           | peak-emission-wavelength (Wellenlänge am Emissionsgipfel) in<br>nm (Nanometer)  |
| ps            | Picosekunde   |
| $\text{mm}^2$ | Quadratmillimeter   |
| RPE           | retinales Pigmentepithel  |
| SSC           | short spectral channel (kurzwelliger Kanal) in ps (Picosekunde)   |
| TCSPC         | time-correlated single-photon-counting (zeit-abhängige Zählung<br>einzelner Photonen)   |
| VEGF          | Vascular-Endothelial-Growth-Factor (Gefäßwachstumsfaktor)   |

## 1 Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine komplexe, multifaktorielle, degenerative Erkrankung im Bereich der äußeren Netzhautschichten und des retinalen Pigmentepithels. Sie ist die häufigste Ursache für eine erhebliche Minderung des zentralen Sehvermögens in den westlichen Industrienationen (Leitlinie Nr. 21 AMD, DOG und BVA 2015). Ein bekannter Risikofaktor für die Progression der AMD sind Drusen, Ablagerungen zwischen der Bruch'schen Membran und dem retinalen Pigmentepithel (RPE). Sie gehen mit nachteiligen Effekten für die Versorgung der Retina einher und können auch einer chorioidalen Neovaskularisationen (CNV) und einer inkompletten oder kompletten Atrophie des Pigmentepithels und der äußeren Retina (iRORA und cRORA) vorausgehen (Spaide et al. 2003). Die Zusammensetzung der Ablagerungen wurde bereits intensiv studiert, über den Anteil der Drusen an der Fundusautofluoreszenz (FAF) wird noch debattiert. Mit der Technik der Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO) können die Lebensdauern der FAF und die Wellenlänge am Emissionsgipfel (= peak-emission-wavelength, PEW) bestimmt werden. Wir wissen heute, dass die FAF-Lebensdauern von Patienten mit AMD länger sind als in gesunden, altersgleichen Kontrollgruppen und mit RPE-Hyperpigmentierungen assoziierte Drusen eine längere Lebensdauer haben, als solche mit noch intaktem RPE (Sauer et al. 2018, Dysli et al. 2016). Um den Einfluss der Drusen sowie den Status des darüber liegenden RPEs auf die Progression der AMD zu untersuchen, wurde eine Follow-up-Studie von AMD-Patienten bis zu 6 Jahre nach Erstuntersuchung durchgeführt. 40 Augen von 38 Patienten (Alter:  $75,1 \pm 7,1$  Jahre) mit intermediärer AMD konnten in die Studie eingeschlossen werden, davon hatten 26 Patienten eine Folgeuntersuchung nach 12 bis 36 Monaten und 10 Patienten nach 37 bis 72 Monaten. Die Lebensdauern der FAF und die PEW wurden durch FLIO gemessen. Durch die Auswertung von Farbfundusfotographien und optischen

Kohärenztomographien (OCT) wurde das Stadium der AMD erhoben und die Drusen wurden hinsichtlich der Veränderungen des darüberliegenden RPE in drei Gruppen eingeteilt: Drusen ohne RPE-Hyperpigmentierung, fragliche oder schwache RPE-Hyperpigmentierung und deutliche RPE-Hyperpigmentierung. Unter den 210 hyperautofluoreszenten Drusen in der Erstuntersuchung, hatten solche mit RPE-Hyperpigmentierung längere Lebensdauern und kürzere PEW als Drusen ohne RPE-Hyperpigmentierung. Drusen ohne RPE-Pigmentierung hatten bei Erstuntersuchung kürzere Lebensdauern und PEW als das benachbarte RPE (alle  $p < 0.001$ ), aber die Lebensdauern nahmen zu und die PEW verkürzte sich im Verlauf. Die Retina von Augen mit fortschreitender AMD hatte signifikant längere FAF-Lebensdauern bei Erstuntersuchung als solche mit stabiler AMD ( $282 \pm 102$  ps vs.  $245 \pm 98$  ps,  $p < 0.001$  für den kurzwelligen FLIO-Kanal bzw.  $365 \pm 44$  ps vs.  $336 \pm 48$  ps,  $p = 0.025$  für den langwelligen FLIO-Kanal). Sowohl die Lebensdauern und die PEW der Drusen, als auch die des angrenzenden RPEs ändern sich also mit Fortschreiten der AMD unterschiedlich. Dieser Unterschied könnte eher eine Veränderung des RPE widerspiegeln als die Autofluoreszenz des Druseninhalts abbilden. Dennoch können lange Lebensdauern zusammen mit kurzer PEW als Risikomarker für ein Fortschreiten der AMD berücksichtigt werden und mittels FLIO erkannt werden bevor es zu makroskopischen Veränderungen kommt. Eine solche Früherkennung wird zukünftig noch an Bedeutung gewinnen, wenn sich die Therapiemöglichkeiten der trockenen AMD erweitern.

## 2 Einleitung

### 2.1 Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration ist eine degenerative Erkrankung der Makula lutea. In den westlichen Industrienationen ist es die häufigste Erblindungsursache bei über 65-Jährigen (Klein et al. 2010). Sowohl genetische Prädisposition als auch Umweltfaktoren, wie z.B. Rauchen, spielen eine Rolle in der Pathogenese (Gehrs et al. 2006, Houston et al. 2001). Auch kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle Hypertonie oder Arteriosklerose sind Risikofaktoren für die Entwicklung einer AMD (Rastogi et al. 2016). Doch es gibt auch protektive Faktoren: In der Coimbra-Studie zeigte sich, dass bei Patienten, die mit hoher genetischer Wahrscheinlichkeit an einer AMD erkranken, das Einhalten einer mediterranen Diät das Risiko um den Faktor 1,8 reduzieren konnte (Barreto et al. 2022). Des Weiteren scheinen regelmäßige Bewegung und die erhöhte Zufuhr von Ballaststoffen, Zeaxanthin, Lutein, Vitamin-C, -D und -E, Betacarotin, Zink sowie Koffein einen protektiven Effekt zu haben (Raimundo et al. 2018, Weikel et al. 2012). Auch das regelmäßige Verzehren von Fisch und anderen Omega-3-Fettsäure-haltigen Lebensmitteln hat einen schützenden Einfluss (Merle et al. 2014). Die Makula ist als Ort des schärfsten Sehens (Abb.1) essenziell für alle Tätigkeiten für die eine hohe Bildauflösung notwendig ist, wie z.B. beim Lesen oder beim Erkennen von Gesichtern. Sie erbringt im Lauf des Lebens ständige Höchstleistungen, die auch mit einem hohen Stoffwechsel in der Netzhautmitte einhergehen. Das darunterliegende RPE ist entscheidend für den Abbau von Substraten und Nebenprodukten des Sehzyklus, wie z.B. Lipofuscin und somit verantwortlich für den Erhalt der Fotorezeptorschicht. Kann das RPE seine Aufgabe mit zunehmendem Alter nicht mehr erfüllen, kommt es im Frühstadium der AMD zu Ablagerungen dieser Stoffe zwischen Bruch 'scher Membran und retinalem Pigmentepithel - sogenannten Drusen.

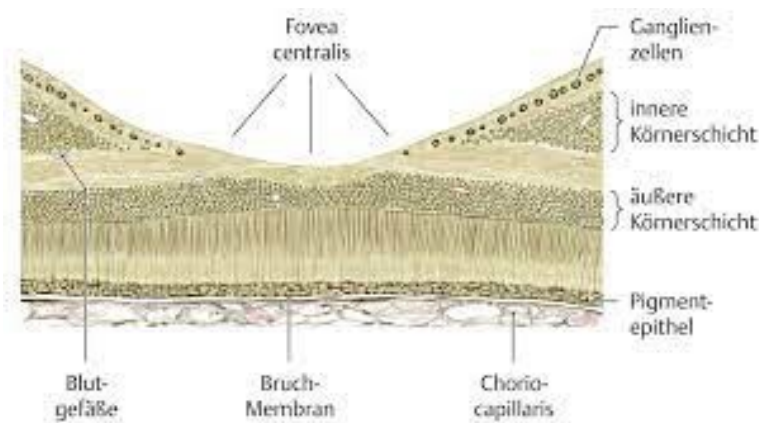


Abbildung 1: Aufbau der Makula lutea der Retina

Die Makula mit der Fovea centralis ist als Ort des schärfsten Sehens prädisponiert dafür, da dort die höchste Fotorezeptordichte ist und besonders viele Abbauprodukte anfallen. Die Drusen gehen mit nachteiligen Effekten für die Versorgung der Retina einher, wie einer erhöhten Diffusionsbarriere für Sauerstoff und Nährstoffe, einer Ansammlung von Komplement-Faktoren und Einleitung einer Entzündungsreaktion, sowie Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies und führen so zu einer irreversiblen Schädigung der äußeren Netzhautschichten und des retinalen Pigmentepithels (Cankova et al. 2011, Johnson et al. 2001, Nozaki et al. 2006).

Die AMD kann klinisch in vier Stadien (Abb.2) eingeteilt werden (Davis et al. 2005), wovon das erste Stadium durch normale Alterserscheinungen und kleine Drusen ( $<63 \mu\text{m}$ ) gekennzeichnet ist. Im zweiten AMD-Stadium finden sich bereits mittelgroße Drusen ( $\geq 63 \mu\text{m}$  bis  $\leq 124 \mu\text{m}$ ) und im dritten kommen dann noch größere Drusen ( $\geq 125 \mu\text{m}$ ) und Pigmentepithelveränderungen hinzu. Das vierte oder späte Stadium der AMD führt zu einem starken Verlust an Sehfähigkeit, entweder durch die Entwicklung einer geographischen Atrophie (GA) mit Untergang des RPE und der äußeren Netzhautschichten inklusive der Fotorezeptorschicht oder durch den Übergang in eine exsudative Form der AMD, bei der es durch Ausschüttung von Gefäßwachstumsfaktoren (vascular – endothelial – growth - factor = VEGF) zu



chorioidalen Neovaskularisationen kommt. Diese neuen Gefäße sollen die Versorgung der Netzhaut verbessern, sie sind aber sehr fragil und ihre Gefäßwände sehr permeabel, so dass es zu retinalen Blutungen, Abhebungen des RPE und zu einem Ödem kommen kann, wodurch weitere Schäden an der Netzhaut entstehen. Dadurch wird die retinale Versorgung noch schlechter und mehr VEGF werden ausgeschüttet.

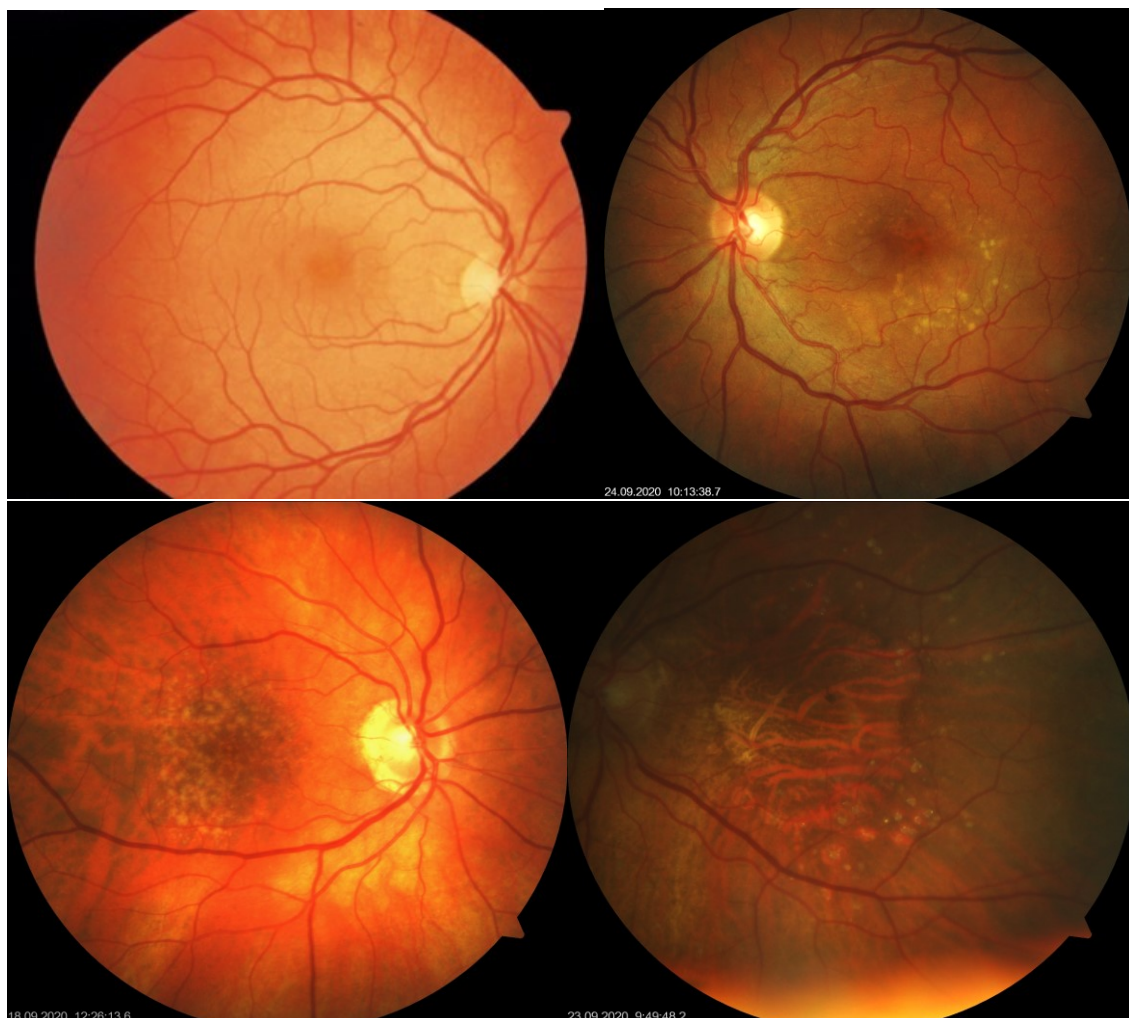


Abbildung 2: oben links: gesunde Netzhaut; oben rechts: 2. AMD-Stadium mit kleinen und mittelgroßen Drusen; unten links: 3. AMD-Stadium mit größeren Drusen und Pigmentepithelveränderungen; unten rechts: große geographische Atrophie zentral mit sichtbaren Gefäßen der Aderhaut

Die Spätform der AMD wird somit in zwei Verlaufsformen unterteilt – die trockene bzw. non-exsudative und die feuchte bzw. exsudative oder neovaskuläre AMD. Letztere geht mit einem schnellen und schweren Sehverlust einher. Für diese feuchte Form der AMD existiert bereits eine wirksame Therapie – die Injektion von VEGF-Hemmern mittels intravitrealer operative Medikamentenapplikation (IVOM) (Joussen et al. 2009), die den Teufelskreis der Neovaskularisation unterbrechen und die feuchte AMD wieder in eine trockene Form überführen sollen. Das Ziel dieser Therapie ist dabei nicht die Heilung der AMD, sondern ein möglichst langer Erhalt der Sehkraft. Die Therapie der trockenen AMD bestand bisher vor allem in der Gabe von Nahrungsergänzungsmitteln (NEM), welche z.B. Lutein und Zeaxanthin, sowie Omega-3 Fettsäuren und Antioxidantien wie Vitamin-C und -E enthalten. Deren positiver Effekt wirkt sich aber eher in frühen Stadien aus und kann die Progression verlangsamen (Csader et al. 2022), auf bereits entstandene Schäden des RPE oder Atrophien und Narben haben sie jedoch keinen Einfluss. Viele Studien bezüglich der NEM bei AMD konnten allerdings nur einen kleinen bzw. gar keinen Effekt zeigen und negative Folgen einer zu hohen Zufuhr auch nicht ausschließen (Evans et al. 2017). Ein grundsätzlich gesunder Lebensstil mit viel Bewegung und einer mediterranen Ernährung konnte das Risiko der AMD jedoch nachweislich reduzieren (Goodman et al. 2012). Viele andere Therapieansätze werden aktuell erforscht (Cabral de Guimaraes et al. 2020), so könnte auch eine Gentherapie zukünftig sowohl in frühen Stadien ansetzen und die Inflammation an der Retina begrenzen, als auch bei der feuchten AMD die Neovaskularisation stoppen (Rakoczi et al. 2015, De Oliveira Dias et al. 2012). Die Inflammation über das Komplement-System kann auch durch Antikörper limitiert werden, verschiedene Wirkstoffe wurden bereits untersucht wie z.B. Eculizumab (Yehoshua et al. 2013) oder Sirolimus (Wong et al. 2013) und konnten die Progression verlangsamen, aber die Atrophie bei der trockenen AMD nicht verkleinern. Die IVOM

von Komplement-C3-Hemmer Pegcetacoplan (Liao et al. 2020) und Komplement-C5-Hemmer Avacincaptad Pegol (Jaffe et al. 2020) konnten die Zunahme der GA deutlich verlangsamen. Eine Zulassung für Avacincaptad Pegol ist 2023 geplant und Pegcetacoplan wurde bereits in Amerika zur Behandlung der GA zugelassen (FDA, 2023). In präklinischen Studien konnte auch ein positiver Effekt von neuroprotektiven Substanzen nachgewiesen werden, z.B. wird bei einem Brimonidin-Implantat ebenfalls das Wachstum der GA signifikant reduziert (Freeman et al. 2019). Andere invasive Therapieansätze versuchen das geschädigte RPE zu ersetzen und zeigen gute Langzeitergebnisse bezüglich der Sehkraft, z.B. die operative Translokation der Makula (Chen et al. 2010), die autologe RPE-Transplantation inklusive der Choroidea (Oshima et al. 2017), oder die Injektion von gesunden RPE-Zellen bzw. Stammzellen (Schwartz et al. 2012, Mandai et al. 2017). All diese operativen und invasiven Verfahren konnten sich bisher, aufgrund der Risiken und Schwierigkeiten, die bei der Operation und Implantation, sowie bei der Gewinnung der Transplantate bzw. Zellen auftreten können, noch nicht in der klinischen Nutzung durchsetzen (Alexander et al. 2015). Des Weiteren wird das Einsetzen von bionischen Netzhautchips unter der Makula in der laufenden PRIMAVera-Studie untersucht.

Bei Fortschreiten der AMD entsteht im Endstadium bei der trockenen Form eine große geographische Atrophie und bei der exsudativen Form eine disziforme Narbe im Zentrum des Sehens. Dadurch kommt es zur dauerhaften Minderung des zentralen Sehvermögens mit erheblichen Einschränkungen im Alltag der Betroffenen. 50 % der schweren Sehbeeinträchtigungen und Erblindungen in Deutschland werden heute durch die AMD verursacht (Finger et al. 2011). Aktuelle Prognosen für Europa zeigen, dass durch das zunehmende Altern der Bevölkerung die Zahl der Erkrankten mit AMD bis 2050 noch um 15% steigen wird (Li QW et al. 2020).

## 2.2 Fluoreszenz und FLIO

### 2.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist definiert als die Eigenschaft fester, flüssiger oder gasförmiger Stoffe, bei Anregung durch Bestrahlung eine Strahlungsenergie zu absorbieren und in Form von elektromagnetischer Strahlung gleicher oder längerer Wellenlänge wieder abzugeben. Die physikalischen Grundlagen dafür sind im Perrin-Jablonski-Diagramm schematisch dargestellt (Abb.3). Es zeigt, dass sich die Elektronen auf verschiedenen Energieniveaus befinden können, wobei  $S_0$  der unangeregte Grundzustand ist.  $S_1$  und  $S_2$  sind Anregungsniveaus und haben zudem andere Vibrations- und Rotationseigenschaften als der Grundzustand.

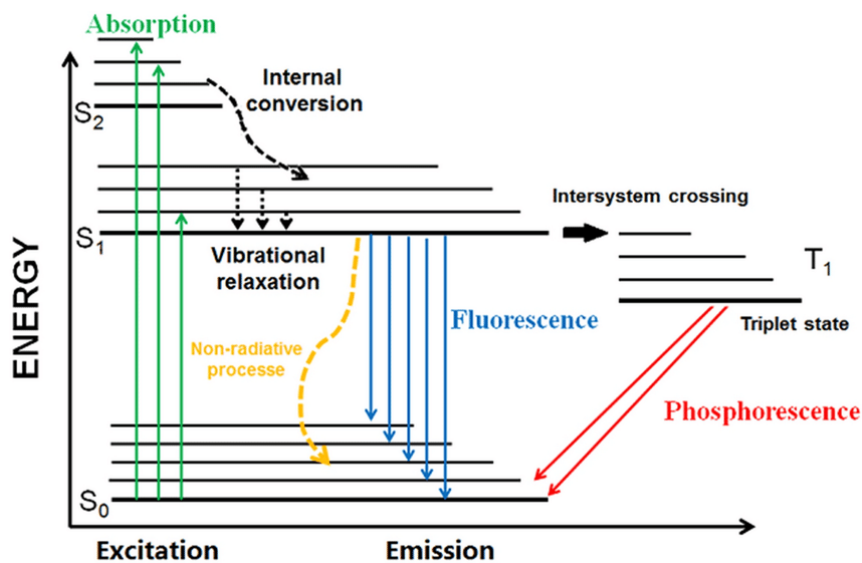


Abbildung 3: Perrin-Jablonski-Diagramm

Damit überhaupt Fluoreszenz entsteht, braucht es eine anregende elektromagnetische Strahlung von außen. Für eine ausreichende Anregung muss die Energie dieser Strahlung mindestens so groß wie die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und einem elektronisch angeregtem Zustand sein. Da diese Energieniveaus spezifisch für die Struktur der Moleküle sind, werden unterschiedliche Wellenlängen zur Anregung verschiedener Stoffe benötigt. Wenn nun ein Photon der

elektromagnetischen Strahlung mit der richtigen Energie auf ein Elektron der anzuregenden Substanz im Grundzustand trifft, absorbiert das Elektron die eingebrachte Energie und kann dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Dort wechselt es dann bei der inneren Umwandlung ohne Strahlung abzugeben in den niedrigsten angeregten Zustand dieses Energielevels. Da in der Natur der Zustand der niedrigen Energie bevorzugt wird, geht das Elektron nach einer gewissen Zeit wieder in den Grundzustand über, wobei Photonen mit einer Wellenlänge abgegeben werden können, die der Energiedifferenz zwischen den beiden Energieniveaus entspricht. Wenn dieser strahlende Übergang in ca.  $10^{-8}$  Sekunden stattfindet, so nennt man dies Fluoreszenz und die Zeit, die in diesem angeregten Zustand verbracht wurde nennt man Fluoreszenzlebensdauer. Die emittierte Strahlung hat meist eine längere Wellenlänge als die Anregungsstrahlung und somit eine niedrigere Energie. Dabei handelt es sich um die sogenannte Stokes-Verschiebung. Ein Grund dafür ist, dass das Elektron unabhängig von der Wellenlänge der anregenden Strahlung immer in den niedrigsten angeregten Zustand eines Energielevels wechselt (Kasha-Dogma) und dadurch die Energiedifferenz bei der Rückkehr in den Grundzustand kleiner ist als bei der Anregung. Außerdem gehen die Elektronen bei der Rückkehr in den Grundzustand gerne in dessen höchsten Vibrationszustand über, wodurch die Energie der emittierten Strahlung weiter abnimmt. Die Fluoreszenzlebensdauer, also wie lange ein angeregtes Elektron in einem höheren Energieniveau bleibt bevor es wieder in den Grundzustand wechselt, ist abhängig von den Eigenschaften des angeregten Stoffes und nicht jeder hat die Eigenschaften zur Fluoreszenz. Substanzen die dies können, nennt man Fluorophore und sie haben eine eigene charakteristische Fluoreszenzlebensdauer. Diese Lebensdauer gilt als unabhängig von variablen Faktoren wie der Fluorophorkonzentration und damit der Fluoreszenzintensität.

## 2.2.2 Fundusautofluoreszenz

Bei biologischen Geweben bezeichnet man die Lichtemission nach Anregung von außen als Autofluoreszenz. Auch in der menschlichen Retina sind verschiedene Fluorophore enthalten, von denen vor allem das Lipofuscin eine wichtige Rolle spielt, da es den größten Teil der retinalen Autofluoreszenz verursacht (Delori et al. 1995). Andere Fluorophore der Netzhaut sind z.B. retinale Carotinoide der Makula wie Lutein und Zeaxanthin (Ermakov et al. 2005) oder Reduktionsäquivalente wie NADH und FADH, abhängig vom Redoxzustand der Zellen (Chorvat et al. 2009, König et al. 1994). Während des Sehzyklus werden laufend Fotorezeptoraußensegmente vom RPE phagozytiert, abgebaut und die Metabolite über die Aderhaut in den Blutkreislauf abgeben. Erfolgt diese Entsorgung nicht mehr vollständig, z.B. durch das Hindernis einer verdickten Bruch'schen Membran, lagern sich diese Substanzen, u.a. Lipofuscin, mit der Zeit vermehrt im RPE ein (Greenberg et al. 2015), wodurch es dort zu toxischen Zellschäden kommen kann (Sparrow et al. 2012). Da einige dieser Metabolite Fluorophore sind, können Aufnahmen der Fundusautofluoreszenz wichtige



Abb. 4: links FAF einer gesunde Netzhaut; rechts FAF bei trockener AMD (3. AMD-Stadium)

Rückschlüsse auf die Integrität der Netzhaut und des RPEs geben. Dabei wird mit einer Wellenlänge zwischen 480 bis 500 nm angeregt und dann mit einer Kamera mehrere Bilder aufgezeichnet.

Da es sich um eine nicht-invasive Untersuchung handelt, eignen sich FAF-Aufnahmen sowohl als Früherkennungsmethode, als auch zur Verlaufskontrolle. Bei einer gesunden Netzhaut zeigt der gesamte hintere Pol eine homogene Autofluoreszenz außer im Bereich der Makula, wo es durch Absorption zu einem verminderten hypofluoreszenten Signal kommt (Abb.4). Hypofluoreszenz entsteht auch durch eine niedrigere anregende Strahlung oder durch Blockade einer normalen Fluoreszenz, wie z.B. bei retinalen Blutungen. Bei der AMD sehen wir zentral ein schwächeres Signal als bei der gesunden Netzhaut als Zeichen der beginnenden RPE-Atrophie, sowie hyperfluoreszente Punkte, an welchen es zu Ablagerungen von Fluorophoren gekommen ist (Abb.4). Das Lipofuscin überstrahlt mit seiner sehr hohen Intensität alles andere (Delori et al. 1995), so dass sich mit der FAF nicht feststellen lässt, welche anderen Substanzen in diesen Ablagerungen noch enthalten sein könnten.

### **2.2.3 Fluoreszenz Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)**

Bei der FLIO werden nicht nur einfache FAF-Aufnahmen gemacht, sondern die Lebenszeiten der Fluorophore gemessen, welche wie bereits beschrieben, unabhängig von der Anregungsintensität, sowie auch spezifisch für jedes Fluorophor und die Einbettungsmatrix der fluoreszenten Moleküle sind. Da die Retina viele verschiedene Fluorophore enthält, können Änderungen dieser Lebenszeiten Informationen zu diesen Substanzen und deren Umgebung liefern (Schweizer et al. 2007). Um die Fluoreszenzlebensdauern zu erfassen, wurde ein zeitauflösendes FAF-System mit einem Laser-Scan-Ophthalmoskop kombiniert (Schweizer et al. 2002), wodurch die FLIO entstand. Die retinale Bestrahlungsstärke des FLIO entspricht

internationalen Sicherheitsstandards und schließt Schäden an der Netzhaut durch die Untersuchung aus (Sauer et al. 2015). Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des FLIO. Wie in Sauer et al. beschrieben, wird zur Anregung der retinalen Autofluoreszenz von einem 473nm Pulsdiodenlaser ein 89 ps langes Signal mit einer Wiederholfrequenz von 80 MHz abgegeben (Sauer et al. 2018). Ein Infrarot-Laser wird zum Eye-Tracking genutzt, um die Augenbewegungen und mögliche Unruhen in der Fixation auszugleichen. Auf der Netzhaut wird ein 30°x 30° großes Feld untersucht, was einer Größe von ca. 9 x 9 mm<sup>2</sup> entspricht. Das dabei entstandene Bild besteht aus 256 x 256 Pixeln was einer räumlichen Auflösung von 35 µm bei Emmetropie entspricht.

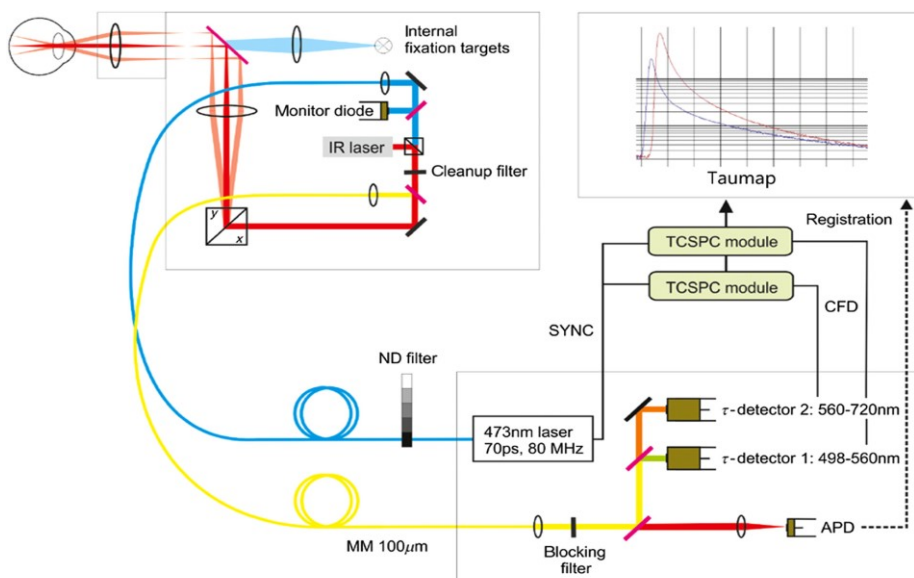


Abb.5: Schematische Darstellung des FLIO

Die nach der kurzen Anregung entstehenden Photonen werden von der Retina abgegeben und dann detektiert nach dem Prinzip des time-correlated single-photon-counting (TCSPC). Das heißt der Detektor erfasst jedes Fluoreszenz-Photon einzeln, misst seinen zeitlichen Abstand zum Anregungsimpuls und ordnet es auch räumlich zu. Außerdem werden im FLIO zwei Detektoren genutzt, die die Photonen abhängig



von ihrer Wellenlänge erfassen. Der eine misst den kurzwelligen Kanal (short spectral channel – SSC) mit 498 – 560 nm, wo mehrere retinale Fluorophore Photonen emittieren. Der andere Detektor untersucht den langwelligen Kanal (long spectral channel – LSC) mit 560 – 720 nm, wo vor allem das Lipofuscin einen hohen Anteil an der Fluoreszenzemission hat (Schweitzer et al. 2007). Es entstehen über die Aufnahmezeit Histogramme, die den Zeitverlauf der Autofluoreszenz darstellen. Die weitere Verarbeitung der Daten kann mit verschiedenen Software-Produkten erfolgen, z.B. der SPCImage 6.0 Anwendung. Die Photonen-Histogramme werden durch Reihen von Exponentialfunktionen unter Bestimmung von Zerfallszeitkonstanten und Amplituden approximiert. Für weitere Analysen wird das amplitudengewichtete Mittel  $T_m$  der einzelnen Zeitkonstanten herangezogen. Diese werde in einem farb-codierten Bild so dargestellt, dass kurze Lebensdauern rot und lange Lebensdauern blau erscheinen. Zusätzlich kann die Wellenlänge am Emissionsgipfel (= peak-emission-wavelength, PEW) aus dem Verhältnis der gezählten Photonen im SSC und LSC bestimmt werden.

### **3 Zielstellung**


Die AMD ist eine der häufigsten Ursachen für schwere Sehbeeinträchtigung und Erblindung. Während die exsudative Form durch die VEGF-Inhibitoren bereits gut behandelbar ist, sind Therapien für die trockene AMD noch nicht etabliert. In zahlreichen Studien wurden und werden verschiedene Ansätze von Nahrungsergänzungsmitteln (NEM), Immunmodulatoren, Gentherapie bis zu operativen Verfahren wie der RPE-Transplantation untersucht. Besser wäre es allerdings, wenn die Therapien für die Spätstadien der AMD nicht mehr nötig wären, weil die Netzhauterkrankung frühzeitig erkannt und behandelt werden kann, wodurch auch weniger Sehbeeinträchtigungen entstehen würden. In frühen und mittleren

Stadien scheinen NEM einen schützenden Effekt auf die Retina zu haben (Gorusupudi et al. 2017, Bernstein et al. 2016) und die Suche nach präventiven und kurativen Behandlungsoptionen wird weiter fortgeführt. Die Diagnose der AMD erfolgt klinisch durch den Nachweis von Drusen und Pigmentepithelveränderungen in der Funduskopie, in der OCT, in Autofluoreszenzaufnahmen oder der Fluoreszenzangiografie (FAG), aber bisher fehlen Früherkennungsuntersuchungen, mit welchen sich die Progressionswahrscheinlichkeit der AMD voraussagen lässt. Hier könnte die FLIO als sehr sensitive Untersuchungsmethode die Möglichkeiten der Früherkennung ergänzen, da schon kleinste pathologische Veränderungen der Netzhaut erfasst werden und die AMD somit schon in einem sehr frühen Stadium nachweisbar machen. In wie weit sich die Prognose mittels FLIO voraussagen lässt wird aktuell diskutiert. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Ergebnisse der FLIO-Messungen besser zu verstehen und einzuordnen, aber auch die Frage beantworten, ob sie einen Rückschluss auf die Progressionswahrscheinlichkeit erlauben.

#### **4 Publierte Originalarbeit**

Schwanengel LS, Weber S, Simon R, Lehmann T, Augsten R, Meller D, Hammer M. 2023. Changes in drusen-associated autofluorescence over time observed by fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*, 101, e154–e166

# Changes in drusen-associated autofluorescence over time observed by fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in age-related macular degeneration

Linda-Sophia Schwanengel<sup>1</sup> | Sebastian Weber<sup>1</sup> | Rowena Simon<sup>1</sup> | Thomas Lehmann<sup>2</sup> | Regine Augsten<sup>1</sup> | Daniel Meller<sup>1</sup> | Martin Hammer<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital Jena, Jena, Germany

<sup>2</sup>Institute for Medical Statistics, Informatics, and Data Sciences, University Hospital Jena, Jena, Germany

<sup>3</sup>Center for Medical Optics and Photonics, University of Jena, Jena, Germany

## Correspondence

Martin Hammer, Department of Ophthalmology, University Hospital Jena, Am Klinikum 1, CE Jena 07747, Germany. Email: [martin.hammer@med.uni-jena.de](mailto:martin.hammer@med.uni-jena.de)

## Abstract

**Purpose:** To observe fundus autofluorescence (FAF) lifetimes and peak emission wavelength (PEW) of drusen with respect to the pathology of the overlying RPE in the follow-up of AMD-patients.

**Methods:** Forty eyes of 38 patients (age:  $75.1 \pm 7.1$  years) with intermediate AMD were included. FAF lifetimes and PEW were recorded by fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO). Twenty-six eyes had a follow-up investigation between months 12 and 36, and 10 at months 37–72. AMD progression was retrieved from color fundus photography (CFP) and OCT. Drusen were classified with respect to changes in the overlying RPE into groups no, questionable or faint, and apparent hyperpigmentation based on CFP.

**Results:** Among the 210 hyperautofluorescent drusen found at baseline, those with hyperpigmentation had longer lifetimes and shorter PEW than those without. Drusen without hyperpigmentation had shorter lifetimes and PEW than neighboring RPE (all  $p < 0.001$ ) at baseline, but drusen lifetimes increased, and PEW shortened further over follow-up. Eyes, showing AMD progression, had significantly longer FAF lifetimes at baseline than non-progressing eyes:  $282 \pm 102$  ps versus  $245 \pm 98$  ps,  $p < 0.001$  and  $365 \pm 44$  ps vs.  $336 \pm 48$  ps,  $p = 0.025$  for short and long wavelength FLIO channel, respectively.

**Conclusions:** Depending on hyperpigmentation properties, drusen show lifetimes and PEW different from that of adjacent RPE which change over the natural history of AMD. This difference and change, however, might reflect progressive dysmorphia of the RPE rather than representing fluorescence of drusen material itself. Nevertheless, the observed FAF changes could make FLIO a useful tool for the early detection of AMD progression risk.

## KEY WORDS

Age-related macular degeneration, drusen, fluorescence lifetime, fluorescence spectra, fundus autofluorescence, retinal pigment epithelium

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Acta Ophthalmologica* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation.

## 1 | INTRODUCTION

Soft drusen, lipid-rich deposits found between the retinal pigment epithelium (RPE) basal lamina and inner collagenous layer of Bruch's membrane (Curcio et al., 2011), are a known risk factor for the progression of age-related macular degeneration (AMD) (Ferris et al., 2005; Ferris et al., 2013; Gass, 1973). Adverse effects of drusen comprise an increased diffusion barrier for oxygen and metabolites (Cankova et al., 2011; Linsenmeier & Zhang, 2017) delivered from the choroid to the retinal pigment epithelium (RPE) and the retina, the accumulation of complement components and induction of inflammation and neovascularization (Fett et al., 2012; Johnson et al., 2001; Nozaki et al., 2006), and oxidative damage due to oxidized proteins (Crabb et al., 2002; Spaide et al., 2003). Thus, drusen may precede macular or choroidal neovascularization (CNV) (Curcio, 2018; Spaide et al., 2003; Wang & Hartnett, 2016) and incomplete or complete RPE and outer retinal atrophy (iRORA and cRORA, respectively). (Guymer et al., 2020; Sadda et al., 2018) While the protein (Crabb et al., 2002; Schütt et al., 2002; Umeda et al., 2005) and lipid composition (Curcio et al., 2001; Curcio et al., 2010; Curcio et al., 2011; Sarks et al., 1988; Wang et al., 2009) of drusen and RPE was studied extensively, there is still a debate on the contribution of drusen to fundus autofluorescence (FAF). While histologic studies show a weak autofluorescence of drusen with short emission wavelength (Hammer et al., 2008; Marmorstein et al., 2002; Tong et al., 2016) and long FAF lifetimes in fluorescence lifetime microscopy (Schultz et al., 2020), drusen can be either hypo-, iso, or hyperautofluorescent in vivo (Flores et al., 2021; Gobel et al., 2016). This can be associated with disruption of the integrity of the external limiting membrane, ellipsoid zone, and RPE–Bruch's membrane complex and may indicate the risk for AMD progression (Flores et al., 2021). Furthermore, the status of the overlying RPE is important. It can vary from pathologic activation over clumping, stacking and intraretinal migration to depigmentation and atrophy, and these changes can be observed by FLIO (Hammer et al., 2021).

The new technique of fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO) (Dysli, Fink, et al., 2017; Dysli, Wolf, et al., 2017; Sauer et al., 2021; Sauer, Andersen, et al., 2018; Sauer, Gensure, et al., 2018; Schweitzer et al., 2007) allows the characterization of FAF by its fluorescence lifetime and peak emission wavelength (PEW) of the fluorescence spectrum in vivo (Schultz, Hasan, Curcio, et al., 2021; Schultz, Hasan, Schwanengel, & Hammer, 2021; Schultz, Klemm, Meller, & Hammer, 2021). While the fluorescence emission of soft drusen generally appears green-shifted compared to that of neighboring RPE (Hammer et al., 2020), the findings on lifetime are controversial. (Dysli, Fink, et al., 2017; Dysli, Wolf, et al., 2017; Hammer et al., 2020; Sauer, Andersen, et al., 2018; Sauer, Gensure, et al., 2018) In this study, we investigated FAF lifetimes as well as PEW for drusen in relation to the status of the overlying RPE as well as the change of these parameters over an up to 6 years follow-up in AMD patients.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Subjects and Procedures

Forty eyes of 38 patients (mean age:  $75.1 \pm 7.1$  years), recruited from the outpatient Clinic of Ophthalmology of the University Hospital Jena, with intermediate AMD were included in this prospective study consecutively (see Table 1 for demographics). Patients with exudative AMD or GA at baseline were excluded. Further exclusion criteria were vascular occlusion, diabetic retinopathy, macular telangiectasia type 2, and hereditary retinal dystrophies. Also patients with cataract (advanced cataract or higher stage), precluding retinal imaging with sufficient quality, were excluded. Follow-up investigations were performed over up to 72 months. For quantitative analysis, the results were grouped into two follow-up intervals: follow-up 1 (13–36 months) and follow-up 2 (37–72 months). The latest investigation was used if a patient had more than one investigation within one follow-up interval.

The study was approved by the local ethics committee of the University Hospital Jena and it adhered to the tenets of the declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent prior to study inclusion and underwent a full ophthalmologic examination including best corrected visual acuity, OCT (Cirrus-OCT, Carl-Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) and color fundus photography (Visucam, Carl-Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). Pupils were dilated using Tropicamide (Mydraticum Stulln, Pharma Stulln GmbH, Nabburg, Germany) and Phenylephrinhydrochloride (Neosynephrin-POS 5%, Ursapharm GmbH, Saarbrücken, Germany). After pupil dilation, patients received FLIO imaging. No sodium fluorescein was administered to the cornea or by intra-venous injection prior to the FLIO investigation. An experienced ophthalmologist (SW) graded AMD severity based on CFP according to the AREDS classification scheme (Davis et al., 2005). Furthermore, AMD

**TABLE 1** Patient demographics, AMD progression, and drusen count. Twenty-six patients had a follow-up 1, ten patients had a follow-up 2, seven patients were seen in both follow-up intervals

|   | Baseline       | Follow-up 1<br>(13–36 months) | Follow-up 2<br>(37–72 months) |
|---|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>N</i> (patients)                     | 38 (100%)      | 26 (68%)                      | 10 (26%)                      |
| Female                                  | 22 (58%)       | 14 (54%)                      | 6 (60%)                       |
| Male                                    | 16 (42%)       | 12 (46%)                      | 4 (40%)                       |
| Age (years, mean $\pm$ SD)              | 75.1 $\pm$ 7.1 | 75.8 $\pm$ 6.5                | 73.8 $\pm$ 8.0                |
| <i>N</i> (eyes)                         | 40 (100%)      | 27 (68%)                      | 10 (25%)                      |
| Eyes progressed to MNV                  |                | 4 (15%)                       | 6 (60%)                       |
| Eyes progressed to cRORA                |                | 0                             | 3 (30%)                       |
| Drusen                                  | <i>N</i>       | <i>N</i>                      | <i>N</i>                      |
| Total                                   | 210            | 57                            | 24                            |
| No hyperpigmentation                    | 149 (71%)      | 39 (69%)                      | 13 (54%)                      |
| Questionable or faint hyperpigmentation | 33 (16%)       | 15 (26%)                      | 7 (29%)                       |
| Hyperpigmentation                       | 28 (13%)       | 3 (5%)                        | 4 (17%)                       |

progression was considered upon appearance of CNV or cRORA in follow-up investigations. The mean values of lifetimes and PEW for drusen in progressing and non-progressing eyes were compared.

## 2.2 | FLIO Imaging and Data Analysis

Basic principles and laser safety of FLIO are described elsewhere (Dysli et al., 2014; Sauer et al., 2015; Schweitzer et al., 2007). FLIO image capturing is based on a picosecond laser diode coupled with a laser scanning ophthalmoscope (Spectralis, Heidelberg Engineering), exciting retinal autofluorescence at 473 nm with a repetition rate of 80 MHz. Fluorescence photons were detected by time-correlated single photon counting (SPC-150, Becker & Hickl GmbH) in a short-wavelength (SSC: 498–560 nm) and a long-wavelength spectral channel (LSC: 560–720 nm). FLIO provides 30-degree field images with a frame rate of nine frames per second and a resolution of 256 x 256 pixels. Photon histograms over time, describing the autofluorescence decay, were least-square fitted with a series of three exponential functions using the software SPCImage 6.0 (Becker & Hickl GmbH). The amplitude-weighted mean decay time  $\tau_m$  was used for further analysis. The resulting image is color-coded, depicting short lifetimes in red and long lifetimes in blue color. In addition, the peak emission wavelength (PEW) of the fluorescence was determined from the ratio of photon counts (autofluorescence intensity) in SSC and LSC as described by Schultz et al. (Schultz, Hasan, Curcio, et al., 2021; Schultz, Hasan, Schwanengel, & Hammer, 2021; Schultz, Klemm, Meller, & Hammer, 2021)

Areas, which were hyperautofluorescent in FLIO and confirmed as drusen in CFP by their appearance as yellow-white moundlike elevations, and as focal detachments of the RPE from Bruch's membrane in OCT (Spaide & Curcio, 2010), were considered hyperautofluorescent drusen. They were manually segmented as regions of interest (ROI) using the software FLIMX, which is documented and freely available for download under an open-source Berkeley Software Distribution (BSD) license (<http://www.flimx.de>) (Klemm et al., 2015). Hyperfluorescence was assumed if the fluorescence intensity, defined by the average fluorescence photon count at the location of the druse (ROI), was higher than that of its environment in SSC. Non-hyperautofluorescent drusen were not included since they (i) are known to be indifferent in fluorescence lifetime (Hammer et al., 2018) and (ii) cannot be segmented in FAF images with certainty. Mean FAF lifetimes and PEW per pixel were averaged over all pixels of the ROI as well as the environment of the ROI, a 105- $\mu$ m-wide area which was 35  $\mu$ m distant to the ROI. The difference between the measures at the ROI and in the environment was calculated and denoted as the contrast of the respective parameters. Hyperautofluorescent drusen in FAF with confirmed RPE elevations in OCT, were classified with respect to changes in the overlying RPE based on CFP into three groups: no hyperpigmentation, questionable or faint hyperpigmentation, and apparent hyperpigmentation. All drusen segmentation and classification as well as AMD

grading was done by a retina specialist (SW). Only drusen with no hyperpigmentation in CFP or hyperreflective foci (HRF) in OCT at baseline were analysed in the follow-up investigations, again considering three groups: drusen that remained without overlying hyperpigmentation/HRF, drusen developing faint or questionable hyperpigmentation/HRF, and drusen developing apparent hyperpigmentation/HRF.

## 2.3 | Statistics

SPSS 27.0 (IBM, SPSS Inc.) was used for statistical analysis. Normal distribution of data was checked by the Kolmogorov-Smirnov test. MANOVA was used to test whether the combination of the fluorescence parameters  $\tau_m$  in SSC,  $\tau_m$  in LSC, and PEW can discriminate drusen with no, questionable or faint, and apparent hyperpigmentation at baseline. An ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test conducted as post hoc analysis was performed to compare the mean values of drusen groups. The two-sided Wilcoxon test was used to check for differences in drusen groups at baseline and the respective follow-up, and median and interquartile range (IQR) were provided for both time points. A two-sided Mann-Whitney *U*-test was used to compare drusen with no hyperpigmentation and faint/questionable hyperpigmentation. The significance level was set at 0.05.

## 3 | RESULTS

We analyzed 210 individual drusen in 40 eyes at baseline; subsets of these drusen were investigated at follow-up as well (Table 1). Looking at the contrasts of all drusen (difference of the measures of drusen ROI vs. 105- $\mu$ m-wide area 35  $\mu$ m distant to the ROI),  $\tau_m$  in SSC ( $-7.3 \pm 18.8$  ps,  $p < 0.001$ ), but not LSC, and PEW ( $-1.4 \pm 4.9$  nm,  $p < 0.001$ ) were reduced in drusen. We found that drusen with no hyperpigmentation ( $n = 149$ ) had shorter  $\tau_m$  (SSC as well as LSC) and PEW than their environment ( $p \leq 0.001$  for all comparisons). In drusen with faint or questionable hyperpigmentation ( $n = 33$ ), drusen lifetime was shorter in SSC only ( $p = 0.002$ ), and in drusen with apparent hyperpigmentation ( $n = 28$ ), there was no contrast in  $\tau_m$ , but the PEW was significantly shorter ( $p = 0.002$ ). The Mean values are given in Table 2 along with the respective standard deviations and confidence intervals as well as *p*-values for a post-hoc group comparison. Combining measures of FAF can enhance the discrimination of drusen categories. The combination of  $\tau_m$  for both spectral channels and PEW is significantly different for drusen with no, questionable or faint, and apparent hyperpigmentation (Pillai's trace:  $p < 0.001$  in MANOVA). This also holds for the contrasts (Pillai's trace:  $p < 0.001$ ). An ANOVA for drusen showed significant differences between the mean values of PEW ( $p = 0.005$ ) and  $\tau_m$  in SSC ( $p = 0.004$ ) as well as for the contrasts of PEW ( $p = 0.001$ ),  $\tau_m$  in SSC ( $p < 0.001$ ), and  $\tau_m$  in LSC ( $p < 0.001$ , Figure 1). The drusen had an average size of  $0.27 \pm 0.15$  mm<sup>2</sup>. Neither lifetimes nor PEW correlated with drusen size.

TABLE 2 Mean value±SD (confidence interval (cv)) of PEW and  $\tau_m$  in SSC as well as LSC are given for drusen with no, faint or questionable, and apparent hyperpigmentation (groups)

|  |  | N   | No hyperpigmentations<br>mean±SD (95% CI) | Faint or questionable<br>hyperpigmentations<br>mean±SD (95% CI) | Hyperpigmentations<br>mean±SD (95% CI) |
|--|--|-----|---|---|--|
| PEW drusen                                 | No hyperpigmentations                    | 149 | 601 ± 15 nm<br>(599 to 604) nm            | $p = 0.177$   | $p = \mathbf{0.009}$                   |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | 596 ± 9 nm<br>(593 to 599) nm                                   | $p = 0.965$                            |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | 592 ± 16 nm<br>(586 to 598) nm         |
| Difference PEW<br>drusen–vicinity          | No hyperpigmentations                    | 149 | -1.3 ± 4.5 nm<br>(-0.5 to -2.0) nm        | $p = 0.337$   | $p = \mathbf{0.008}$                   |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | 0.2 ± 4.5 nm<br>(-1.4 to 1.8) nm                                | $p = \mathbf{0.001}$                   |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | -4.3 ± 6.6 nm<br>(-6.8 to -1.7) nm     |
| $\tau_m$ SSC drusen                        | No hyperpigmentations                    | 149 | 275 ± 57 ps<br>(265 to 284) ps            | $p = 0.519$   | $p = \mathbf{0.004}$                   |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | 290 ± 43 ps<br>(275 to 306) ps                                  | $p = 0.348$                            |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | 315 ± 87 ps<br>(281 to 348) ps         |
| Difference $\tau_m$ SSC<br>drusen–vicinity | No hyperpigmentations                    | 149 | -9.6 ± 13.4 ps<br>(-11.7 to -7.4) ps      | $p = 1.0$   | $p < \mathbf{0.001}$                   |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | -8.7 ± 14.6 ps<br>(-13.9 to -3.6) ps                            | $p = \mathbf{0.004}$                   |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | 6.4 ± 36.2 ps<br>(-7.7 to 20.4) ps     |
| $\tau_m$ LSC druse±n                       | No hyperpigmentations                    | 149 | 343 ± 31 ps<br>(338 to 348) ps            | $p = 0.192$   | $p = 1.0$                              |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | 356 ± 30 ps<br>(345 to 366) ps                                  | $p = 0.213$                            |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | 336 ± 55 ps<br>(318 to 361) ps         |
| Difference $\tau_m$ LSC<br>drusen–vicinity | No hyperpigmentations                    | 149 | -3.2 ± 5.9 ps<br>(-4.2 to -2.2) ps        | $p = 0.831$   | $p < \mathbf{0.001}$                   |
|  | Faint or questionable hyperpigmentations | 33  |   | -1.1 ± 6.4 ps<br>(-3.4 to 1.1) ps                               | $p = \mathbf{0.001}$                   |
|  | Hyperpigmentations                       | 28  |   |   | 8.2 ± 22.6 ps<br>(-0.5 to 17.0) ps     |

Note:  $p$ -Values describe differences (bold if significant) between the groups in an ANOVA with Bonferroni post-hoc test. Mean values and comparisons are shown for the differences of  $\tau_m$  and PEW between the drusen and their vicinity (105- $\mu$ m-wide area at 5  $\mu$ m distance) as well.

Twenty-six patients had a follow-up after 13–36 months and 10 patients had a follow-up after 37–72 months, seven patients were seen in both follow-up intervals. Over the follow-up period, drusen with no hyperpigmentation at baseline tended to increase in lifetime and to decrease in PEW. The median and interquartile range of PEW and  $\tau_m$  for drusen developing no, faint or questionable, and apparent hyperpigmentation along with the change of contrasts are shown in Table 3 (baseline vs. follow-up 1) and Table 4 (baseline vs. follow-up 2). Measures at baseline are different for the two follow-up intervals because drusen, having follow-up 1 or 2, were not necessarily the same. Firstly, not all patients at follow-up 2 were seen at follow-up 1 as well and vice versa and secondly, some of the drusen regressed over follow up as confirmed by FAF, CFP, and OCT. The Wilcoxon test was used to compare time points as not all of the variables were normally distributed. For drusen not developing

hyperpigmentation,  $p$ -values show significantly shorter emission wavelength and longer lifetimes in both spectral channels at both follow-up intervals (except for  $\tau_m$  in SSC, which is non-significant at follow-up 2) compared to baseline. Changes for drusen developing questionable or faint hyperpigmentation were not significant at follow-up 1. However, these drusen already had shorter PEW and longer  $\tau_m$  at baseline than the drusen that did not develop hyperpigmentation (PEW: 595 (23) nm vs. 615 (34) nm,  $p = 0.004$ ; SSC: 259 (90) ps vs. 238 (111) ps,  $p = 0.033$ ; LSC: 370 (88) ps vs. 328 (42) ps,  $p = 0.009$ ). At follow-up 2, those drusen showed significantly shorter PEW and longer  $\tau_m$  in LSC (Table 4). For drusen developing apparent hyperpigmentation, no statistical analysis was performed because of the insufficient numbers ( $N = 3$  and 4 in follow-up 1 and 2, respectively). However, a shift towards shorter wavelengths (hypsochromic shift) as well as lengthening of lifetimes is highly suggested at

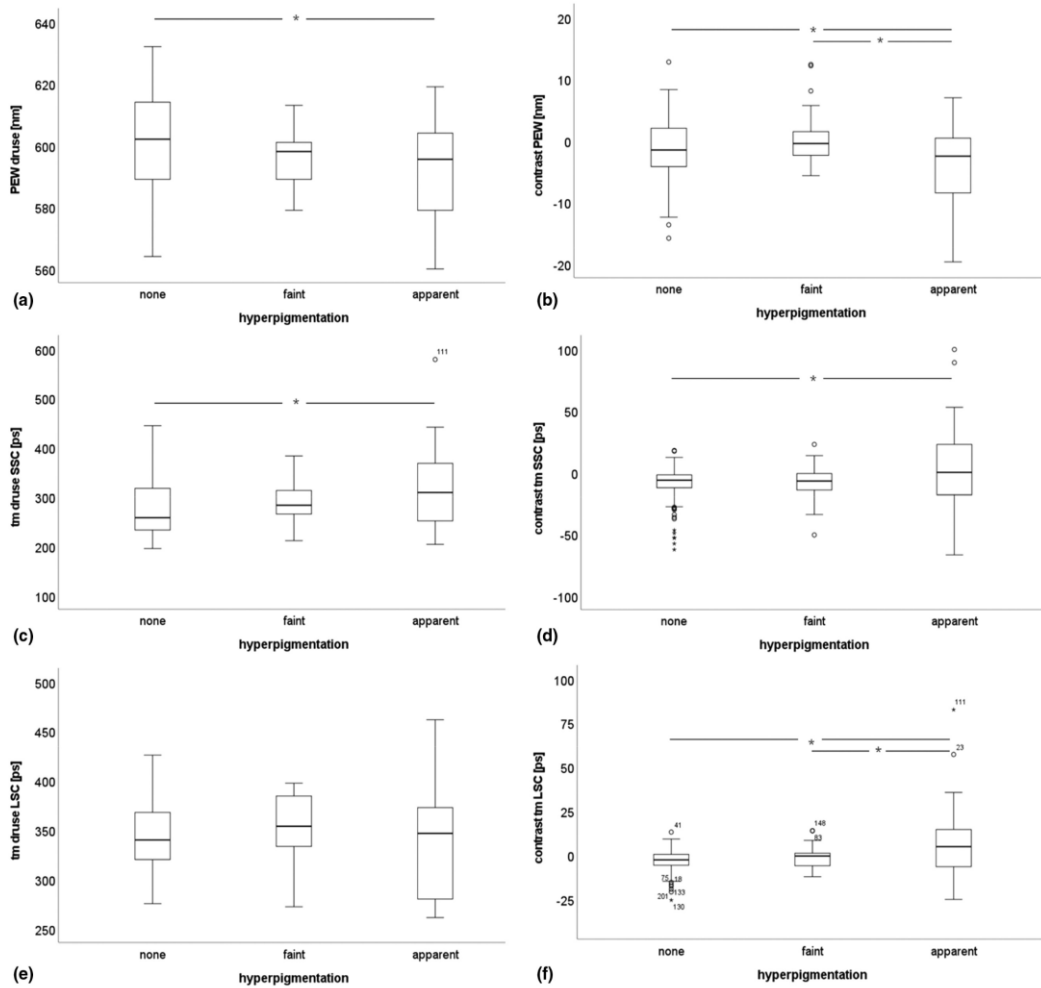


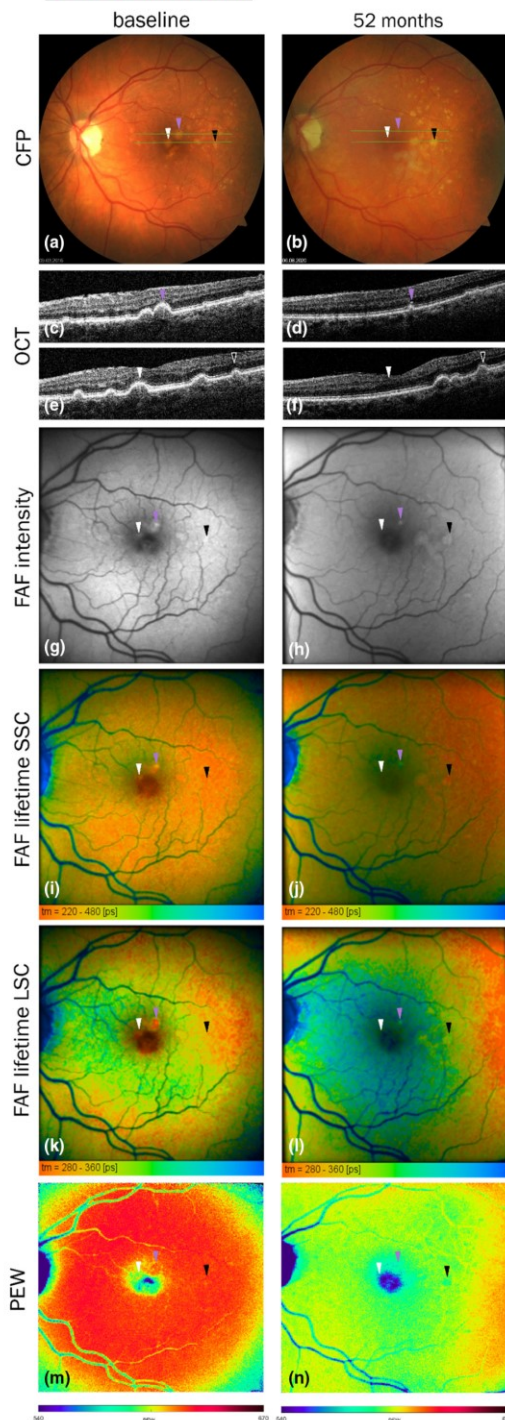
FIGURE 1 Boxplots of PEW (a) and  $\tau_m$  (c, e) for drusen (left) with no ( $n = 149$ ), questionable or faint ( $n = 33$ ), and apparent hyperpigmentation ( $n = 28$ ) as well their contrasts (right, b, d, f) at baseline.

TABLE 3 Median (interquartile range) of PEW as well as  $\tau_m$  for drusen with no hyperpigmentation at baseline and no, faint or questionable, and apparent hyperpigmentation at follow-up 1 (13–36 months) along with the change of contrasts, i.e. the difference between the measure at the druse minus that in the environment

|              |  | <i>N</i> | baseline     | Follow-up 1         |                  |                       |                  |
|--------------|--|----------|--------------|---------------------|------------------|-----------------------|------------------|
|              |  |          | Mean         | Mean                | <i>p</i> -Values | Change of contrast    | <i>p</i> -Values |
| PEW          | No hyperpigmentations                    | 39       | 615 (34) nm  | <b>596 (15) nm</b>  | < 0.001          | 0.6 (4.3) nm          | 0.853            |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 15       | 595 (23) nm  | 597 (24) nm         | 0.650            | <b>2.9 (4.2) nm</b>   | <b>0.023</b>     |
|              | Hyperpigmentations                       | 3        | 603 nm       | 588 nm              |                  | −1.2 nm               |                  |
| $\tau_m$ SSC | No hyperpigmentations                    | 39       | 238 (111) ps | <b>264 (148) ps</b> | < 0.001          | <b>−2.2 (10.5) ps</b> | <b>0.009</b>     |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 15       | 259 (90) ps  | 256 (18) ps         | 0.394            | −0.7 (16.8) ps        | 0.418            |
|              | Hyperpigmentations                       | 3        | 228 ps       | 348 ps              |                  | 36.0 ps               |                  |
| $\tau_m$ LSC | No hyperpigmentations                    | 39       | 328 (42) ps  | <b>349 (40) ps</b>  | < 0.001          | <b>−1.3 (8.4) ps</b>  | <b>0.021</b>     |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 15       | 370 (88) ps  | 383 (65) ps         | 0.733            | −1.4 (8.8) ps         | 0.406            |
|              | Hyperpigmentations                       | 3        | 309 ps       | 455 ps              |                  | 67.4 ps               |                  |

both follow-up intervals (Tables 3,4). Changes in the contrasts for PEW and  $\tau_m$  were partly significant, however the changes were small, and positive as well as negative

changes occurred. Only upon the development of apparent hyperpigmentation, a massive increase of the lifetime contrasts, i.e. lengthening of drusen  $\tau_m$  greatly exceeding



that in the drusen environment, was seen (Tables 3,4). But again, no statistical analysis could be performed.

However, drusen may experience different fates with respect to morphology as well as fluorescence properties. Figure 2 shows one druse that collapsed at follow-up with no sign of RPE deterioration (panels b, f) and no

**FIGURE 2** Multimodal imaging of a 72-year-old patient at baseline (panels a, c, e, g, i, k, and m, AREDS grade 7) and 52 months later (panels b, d, f, h, j, l, and n, AREDS grade 7). (a, b) CFP; (c–f) OCT at the green lines in (a) and (b); (g, h) FAF intensity images (LSC); (i, j) FLIO mean lifetimes in SSC (220–480 ps); (k, l) FLIO mean lifetimes in LSC (280–360 ps); (m, n) PEW (540–670 nm). Drusen with different fates are seen. Light purple arrowhead: Druse with short lifetime and indifferent PEW at baseline, which collapsed over follow-up leaving ectopic RPE (hyperreflective foci in OCT). The lifetime changed from short to long and the PEW decreased. White arrowhead: hyperautofluorescent druse with short lifetime and PEW, which disappeared over the follow-up not leaving RPE distortion. Black arrowhead: A druse growing over the follow-up with remaining short lifetime and decreasing PEW.

change in fluorescence properties (except disappearance of hyperfluorescence, panels g through n, white arrowhead). We found one druse growing over the follow-up (panels a, b, e, and f, black arrowhead) with remaining short lifetime (panels i through l) but decreasing PEW (panels m, n). Another druse (pink arrowhead) was collapsing over follow-up but left HRF in the retina (panel d). This lesion, supposed to be RPE cells, detached from Bruch's membrane and migrated into the retina, shows lengthening of lifetimes as well as hypsochromic shift of the PEW.

Grading our patients according to the AREDS scale (Davis et al., 2005), ranging from 0 (no AMD) to 8, our patients had AMD-grades between 5 and 7 (mean:  $6.3 \pm 0.8$ ) at baseline. At follow-up 1, out of 26 patients, four patients progressed to neovascular AMD (CNV) and at follow-up 2, another two patients out of ten showed CNV (six patients in total). None of the patients with drusen showed progression to a higher stage of non-exudative or non-atrophic AMD; however, three patients developed cRORA at follow-up 2. Three (33.3%) of the progressing patients had apparent hyperpigmentation on top of drusen at baseline. Two (9.5%) of the non-progressing patients had apparent and four (19%) had faint or questionable hyperpigmentation. Considering only drusen with no hyperpigmentation at baseline, their baseline lifetimes were longer and PEW shorter for progressing vs. non-progressing eyes (Table 5, Figure 3). No difference was found if all drusen for these patients were taken into account, as the lifetimes and PEW are already different between drusen with and without hyperpigmentation.

Hypopigmented drusen were found occasionally. In Figure 4, lesions are marked in an 81-year-old female patient representing different stages of drusen hypopigmentation and subsequent clearance of drusen material upon RPE atrophy: lesion #1 is a hyperautofluorescent druse already showing longer lifetimes than its neighborhood. Lesions #2 to #6 are hypofluorescent, however drusen are still present in the OCT, whereas lesions #7 to #9 show beginning RPE atrophy (#7 iRORA, #8 and #9 cRORA) and the absence of drusen. An OCT scan, taken 18 months prior to the present investigation showing #8 as cRORA, shows the presence of sub-RPE material although the RPE already was gone (OCT 8a, same for lesion #7, OCT not shown). The fluorescence lifetimes and PEW of the lesions are given in the table in Figure 4. Lifetimes increased with increasing severity of RPE damage with mean values of  $455 \pm 55$  ps and  $468 \pm 26$  ps



**TABLE 4** Median (interquartile range) of PEW as well as  $\tau_m$  for drusen with no hyperpigmentation at baseline and no, faint or questionable, and apparent hyperpigmentation at follow-up 2 (37–72 months) along with the change of contrasts, i.e. the difference between the measure at the druse minus that in the environment

|              |  | <i>N</i> | baseline     | Follow-up 2        |                  | change of contrast  | <i>p</i> -Values |
|--------------|--|----------|--------------|--------------------|------------------|---------------------|------------------|
|              |  |          | mean         | mean               | <i>p</i> -Values |                     |                  |
| PEW          | No hyperpigmentations                    | 13       | 624 (8) nm   | <b>601 (20) nm</b> | <b>0.001</b>     | <b>1.3 (6.0) nm</b> | <b>0.005</b>     |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 7        | 615 (50)     | <b>597 (85) nm</b> | <b>0.018</b>     | <b>0.9 (6.0) nm</b> | <b>0.028</b>     |
|              | Hyperpigmentations                       | 4        | 606 (52) nm  | 589 (18) nm        |                  | −6.4 (8.4) nm       |                  |
| $\tau_m$ SSC | No hyperpigmentations                    | 13       | 238 (49) ps  | 256 (32) ps        | 0.152            | 0.7 (14.3) ps       | 0.507            |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 7        | 240 (154) ps | 270 (120) ps       | 0.394            | 1.5 (6.8) ps        | 0.612            |
|              | Hyperpigmentations                       | 4        | 225 (49) ps  | 346 (71) ps        | 0.237            | 65.0 (60.3) ps      |                  |
| $\tau_m$ LSC | No hyperpigmentations                    | 13       | 320 (18)     | <b>341 (22) ps</b> | <b>0.046</b>     | 1.6 (7.0) ps        | 0.972            |
|              | Faint or questionable hyperpigmentations | 7        | 330 (69) ps  | <b>376 (64) ps</b> | <b>0.028</b>     | −0.9 (9.2) ps       | 1.0              |
|              | Hyperpigmentations                       | 4        | 324 (19) ps  | 461 (87) ps        |                  | 79.8 (70.7) ps      |                  |

in hypofluorescent drusen (lesions #2 through #6) and  $546 \pm 156$  ps and  $526 \pm 94$  ps in the absence of drusen (lesions #7 through #9) in SSC and LSC, respectively. Likewise, PEW decreased from  $554 \pm 8$  nm in hypofluorescent drusen to  $532 \pm 13$  nm in the absence of drusen.

Hyperautofluorescent drusen in a 64-year-old patient with long FAF lifetimes were associated with a hypopigmentation of the RPE, indicated by hypertransmission of the OCT laser into the choroid (Figure 5). The finding of hypopigmentation along with hyperfluorescence at short wavelength and with lifetimes longer than the drusen neighborhood remained stable over 55 months of follow-up. No signs of RPE atrophy or migration were found, however, AMD progressed to macular neovascularization in this case.

Figure 6 shows a 68-year-old patient progressing to cRORA 52 months later. OCT shows atrophy with remaining basal-laminar deposits (red arrowhead in Figure 6b) and descend of the external limiting membrane (light blue arrowhead). While hyperpigmentations in CFP, associated with HRF in OCT (white arrowheads), have long FAF lifetimes, drusen with no apparent alteration in RPE have rather short lifetimes, but changed to long lifetimes as RPE began to degrade and drusen collapsed at follow-up (black arrowheads). Hypo-FAF in follow-up (Figure 6h), indicating RPE atrophy, is associated with long lifetimes (Figure 6j,k) and short PEW (Figure 6m) at baseline.

#### 4 | DISCUSSION

In a recent paper, Flores et al. found 35% of soft or cuticular drusen to be hyperautofluorescent and 5% to be hypoautofluorescent (Flores et al., 2021). At these drusen, disruption of the integrity of the external limiting membrane, ellipsoid zone, and RPE–Bruch's membrane complex were found much more frequently than atop isofluorescent drusen, indicating the risk for AMD progression. This was one reason to focus on hyperautofluorescent drusen in the current study. The other one

was our interest in the change of fluorescence properties, which is best seen in the case of hyperfluorescence, i.e. the gain of fluorescence signal. In addition to the lipofuscin fluorescence of the RPE surrounding the drusen, signal can increase by changes in RPE shape (rounding, stacking), loss of masking by outer segments (Chen et al., 2020, 2020; Chen et al., 2021; Rudolf et al., 2013) as well as the mix or concentration of fluorophores. Whereas hyperfluorescence of drusen was reported to be correlated to their size (Landa et al., 2012), we could not find an association of FAF lifetime or PEW with the size of drusen which reached the state of hyperfluorescence.

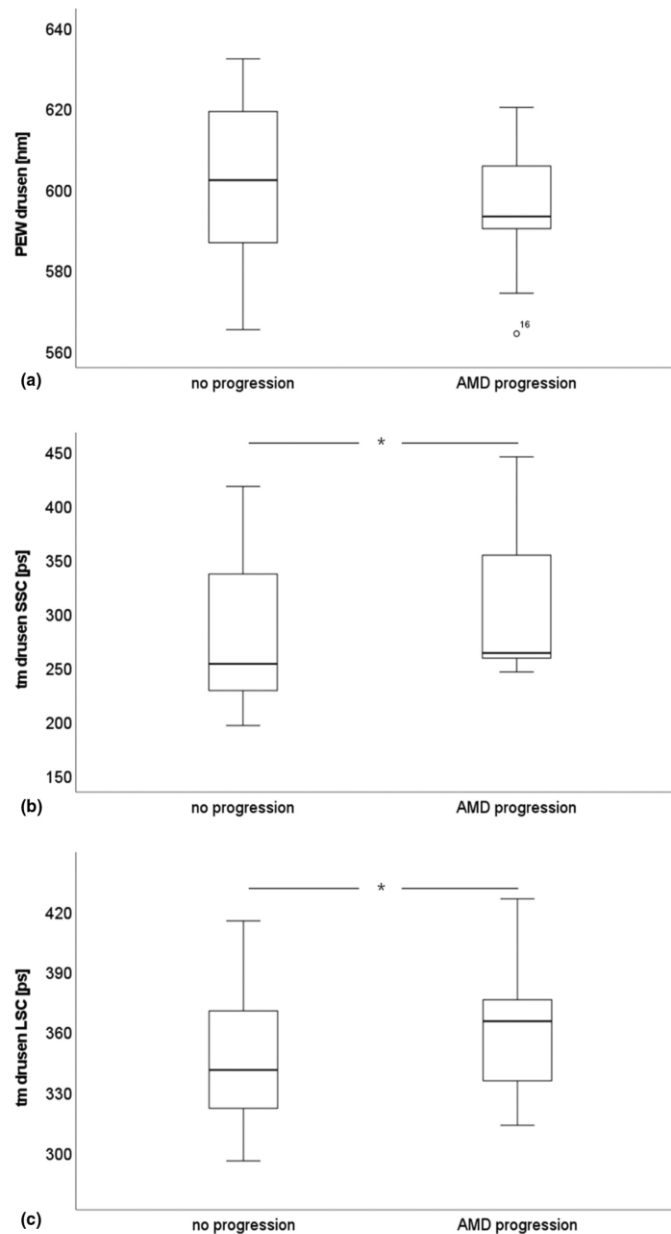
FAF of drusen was first described by Delori et al. (Delori et al., 2000) They found that drusen often have a hypofluorescent core and a hyperfluorescent ring. Recently, Chen et al. proposed four stages of drusen FAF from the clinicopathologic correlation in one patient (Chen et al., 2021). Drusen, visible in CFP, start at isofluorescence and progress to uniform hyperautofluorescence (stage 2), possibly due to shortening or a loss of photoreceptor outer segments atop the druse. In stage 3, the hypofluorescent core, surrounded by a hyperfluorescent ring, appears as a sign of beginning RPE atrophy, which progresses to iRORA or cRORA in stage 4. In our investigation, we neglected isofluorescent stage 1 drusen as stated above. We did not see stage 3 drusen in our study. The reason, probably, is the low resolution of FLIO. For the sake of a sufficient time resolution, the fluorescence photons have to be distributed over 1024 time channels. This precludes high spatial resolution in a clinical setting. Thus, the size of FLIO pixels is  $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ , possibly too large to resolve the hypofluorescent core. Thus, most of our drusen were stage 2. Occasionally, we saw hypofluorescent drusen (stage 4). Hypofluorescence was due to RPE alteration, seen in OCT, but also seen by increasing lifetimes and decreasing PEW with the severity of RPE damage (Figure 4). However, hypofluorescent drusen are rather seldom as, obviously, drusen material is cleared after RPE atrophy. Stage 4 drusen often appear refractile in CFP and contain calcific nodules composed of hydroxyapatite (HAP), seen as hyporeflexive cores inside the drusen in

**TABLE 5** Median and interquartile range (IQR) of PEW as well as  $\tau_m$  at baseline for drusen with no hyperpigmentation in eyes with and without progression of AMD to CNV or cRORA along with  $p$ -values from Man-Whitney  $U$ -test (significant differences bold)

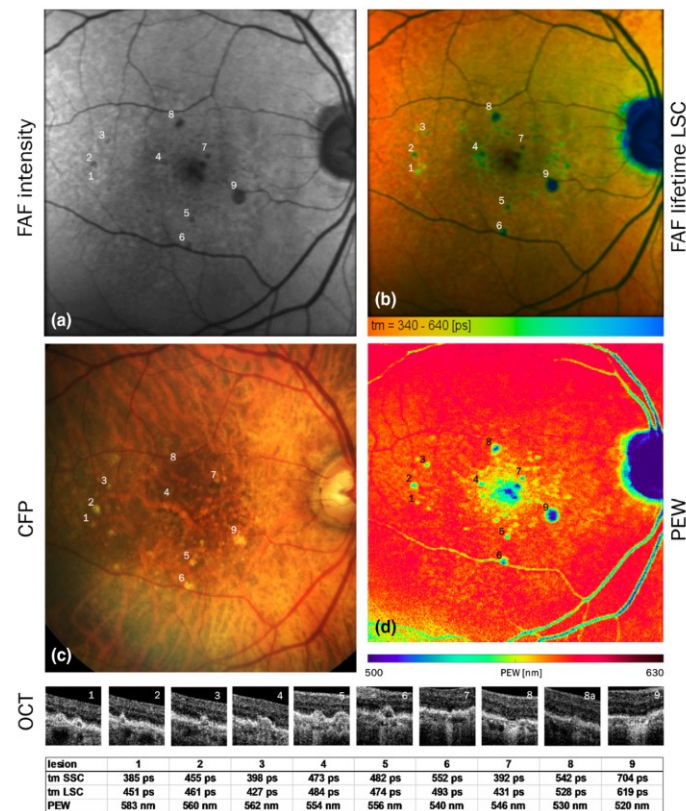
|                           | AMD progression  | no progression  | $p$               |
|---------------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| $N$ (drusen)              | 28               | 59              |                   |
| Median PEW (IQR)          | 593 (22)         | 601 (34)        | 0.08              |
| Median $\tau_m$ SSC (IQR) | <b>282 (102)</b> | <b>245 (98)</b> | <b>&lt; 0.001</b> |
| Median $\tau_m$ LSC (IQR) | <b>365 (44)</b>  | <b>336 (48)</b> | <b>0.025</b>      |

OCT (Tan et al., 2018; Thompson et al., 2015), which may remain on Bruch's membrane after resorption of the lipid drusen components (Chen et al., 2021). These could contribute to long FAF lifetimes in atrophic areas, as HAP in teeth shows long-living fluorescence (SSC: 1950 ps, LSC: 1560 ps, unpublished data from our lab).

There is a debate in literature whether soft drusen in AMD are discernible by their lifetime in FLIO: Whereas Dysli et al. found no contrast in lifetimes for soft drusen (Dysli, Fink, et al., 2017; Dysli, Wolf, et al., 2017), Sauer et al. found longer lifetimes for soft drusen than



**FIGURE 3** Boxplots of baseline PEW (a) and  $\tau_m$  (b, c) for drusen with no hyperpigmentation in eyes with and without progression to exudative AMD ( $n$  (drusen) = 28 and 59, respectively).

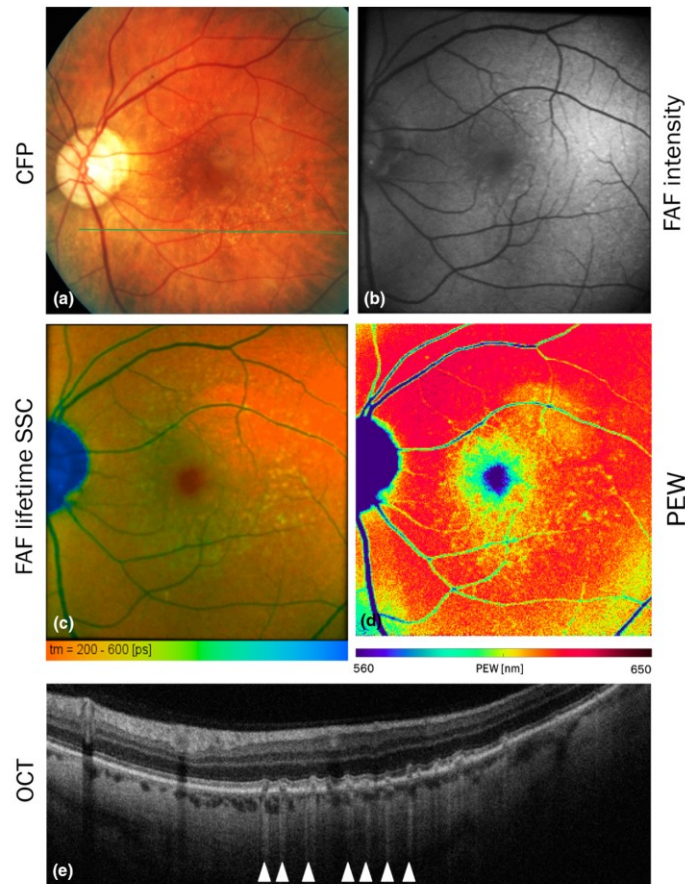


**FIGURE 4** Multimodal imaging of a 81-year-old patient (AREDS grade 6) with hyper- and hypofluorescent lesions. Panels: FAF (a), FLIO in LSC (b, 340–640 ps), CFP (c), and PEW (d, 500–630 nm). Below, all lesions are shown in OCT (#8a shows lesion #8 18 months earlier) and the lifetimes and PEW, measured at the lesions, are given in the table. Lesion #1: hyperautofluorescent druse with long lifetimes. Lesions #2 through #6: hypofluorescent drusen. Lesion #7: iRORA. Lesions #8 and #9: cRORA. The hyporeflective cores inside drusen 1, 2, and 6 indicate calcification.

for adjacent RPE Sauer, Andersen, et al., 2018, Sauer, Gensure, et al., 2018. In an earlier study, we reported no lifetime contrast on average over all soft drusen, but longer lifetimes for clearly hyperautofluorescent drusen (Hammer et al., 2020). By meticulously classifying the drusen without, with, and with questionable/faint deterioration of overlying RPE, seen as hyperpigmentation in CFP or HRF in OCT, we showed that drusen, for which we did not see RPE change in OCT or CFP, have significantly shorter lifetimes as well as PEW than surrounding RPE, i.e. negative contrasts. Only if the RPE over the drusen shows hyperpigmentation in CFP or RPE stacking or HRF in OCT, lifetimes increase. The lifetime contrasts are positive and significantly higher than for drusen with intact RPE. The short lifetime of clinical drusen is in contradiction with our findings in histology, where we found considerably longer lifetimes for drusen than for RPE in both spectral channels (Schultz et al., 2020). However, in histology we measured cross sections of the fundus, whereas in vivo we look en face to the drusen through the highly fluorescent RPE. In this geometry, with drusen covered by RPE, the weak drusen fluorescence might not be seen well and differences in lifetime and PEW might rather reflect changes in the RPE itself. This is further underscored by the small

contrasts of drusen in lifetime and PEW. In this context, shorter lifetimes at the location of drusen would make sense and could be explained by dysmorphia of the RPE. In an earlier clinical study, we found that lifetimes of dysmorphic RPE shorten in early stages, before they increase when the cells undergo apoptosis or detach from Bruch's membrane and migrate into the retina (Hammer et al., 2021).

Nevertheless, focally prolonged lifetimes at drusen might be a risk indicator for subsequent AMD progression (Figure 3). However, lifetimes are generally longer at the posterior pole of eyes with progressing than with non-progressing AMD (Schultz, Hasan, Curcio, et al., 2021; Schultz, Hasan, Schwanengel, & Hammer, 2021; Schultz, Klemm, Meller, & Hammer, 2021). Thus, it cannot be said distinctively, whether these long lifetimes are related to drusen or indicate a change in the RPE. The gradual increase of lifetimes and decrease of PEW, associated with advancing RPE deterioration (Figure 4), also suggests that change of RPE fluorophores or their intracellular embedding matrix (viscosity, polarity, pH) is the underlying mechanism of the change of fluorescence properties. This is in agreement with Chen et al., who concluded from clinicopathologic comparison in early AMD that drusen visibility in FAF imaging depends



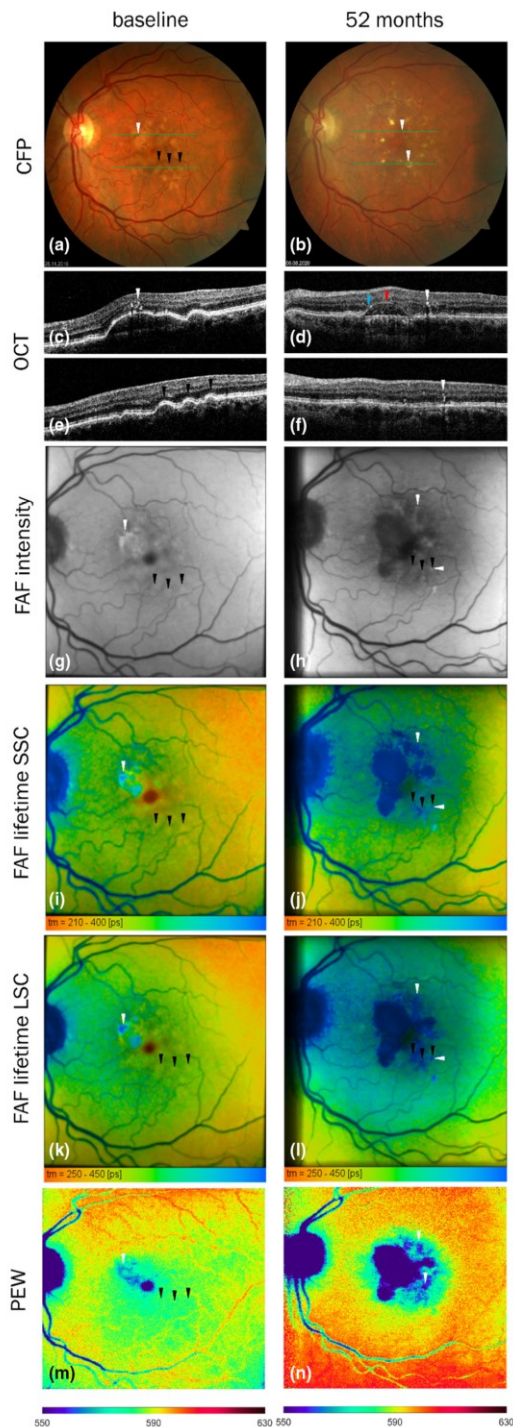
**FIGURE 5** Multimodal imaging of a 64-year-old patient (AREDS grade 6) with hyperautofluorescent drusen (a: CFP, b: FAF SSC) showing longer FAF lifetimes than their neighborhood in SSC (c: FLIO SSC 200–600 ps), hypsochromic shift of the PEW (560–650 nm) (d) and hypertransmission of the laser into the choroid in OCT (white arrowheads in e).

on associated RPE changes (Chen et al., 2020, 2020). Thus, the FAF lifetime and PEW changes, reported here, most likely reflect progressive dysmorphia of RPE as shown in Figures 4,5 (Gambriel et al., 2019; Hammer et al., 2021), associated with lipofuscin redistribution or loss (Ach et al., 2015). This results in changes of FAF (Tong et al., 2016) and could make FLIO a useful tool for the early detection of eyes at risk for AMD progression.

Shortening or complete absence of photoreceptor outer segments over drusen could contribute to hyperfluorescence (Chen et al., 2021; Freund et al., 2013). This concept is in agreement with a hypsochromic shift of the PEW as photopigments in rods and cones could have a filter effect by absorbing short-wavelength light from the fluorescence emission. However, it does not explain the change in FAF lifetimes. This suggests an alteration of the fluorophore composition or a change of the intracellular milieu in dysmorphic RPE cells. Furthermore, a contribution of fluorophores in the drusen themselves cannot be ruled out. These would explain longer lifetimes in the drusen, as seen in histology (Schultz et al., 2020) as well as in vivo in drusen, remaining in zones of RPE atrophy (Schultz, Hasan, Curcio, et al., 2021; Schultz, Hasan, Schwanengel, & Hammer, 2021; Schultz, Klemm,

Meller, & Hammer, 2021), but not the shorter lifetimes found here in most of the drusen with still intact RPE. Questioning the drusen content itself as source of FAF is also in agreement with the lack of a correlation of drusen volume and FAF intensity in quantitative FAF imaging in patients with early and intermediate AMD (Reiter et al., 2019).

Drusen, not developing hyperpigmentation, decreased their PEW and increased their lifetimes in both spectral channels significantly within 3 years of follow-up (follow-up 1, Table 3). No significant changes were observed for drusen developing faint or questionable hyperpigmentation. The reason might be that they already had RPE changes at baseline, which were invisible at CFP or OCT. This is suggested by the longer lifetimes and shorter PEW these drusen show already at baseline compared to drusen not developing hyperpigmentation (Table 3). Over a longer follow-up (Table 4), both, drusen developing no and faint hyperpigmentation, increase in lifetime (significantly in LSC) and decrease in PEW. Drusen developing apparent hyperpigmentation, showed a considerable increase in lifetime and a decrease in PEW in both follow-ups, although this was not testable statistically due to the low number of those drusen.



**FIGURE 6** Multimodal imaging of a 68-year-old patient at baseline (panels a, c, e, g, i, k, and m, AREDS grade 7) and 52 months later (panels b, d, f, h, j, l, and n, AREDS grade 9). (a, b) CFP; (c–f) OCT at the green lines in (a, b); (g, h) FAF intensity images (LSC); (i, j) FLIO mean lifetimes in SSC (210–400 ps); (k, l) FLIO mean lifetimes in LSC (250–450 ps); (m, n) PEW (550–630 nm). cRORA developed at follow-up, persisting BLamD (red arrowhead) and descend of the external limiting membrane (light blue arrowhead) is seen in OCT. At baseline, ectopic RPE (migrated into the retina as seen by HRF in OCT) on top of a drusenoid PED is hyperautofluorescent with long lifetimes and short PEW (white arrowheads). Hyperautofluorescent drusen still show lifetimes shorter than their neighborhood at baseline (black arrowheads). At follow-up, the drusen are no longer discernible by lifetime or PEW unless detachment and migration of RPE occurred (white arrowhead). Persistent BLamD outlasts the RPE and is still visible although the RPE has died/migrated off the top of the PED (red arrowhead).

of FAF lifetimes and PEW often precedes the finding of ectopic RPE inside the retina as described by Cao et al. (Cao et al., 2021), and the subsequent formation of atrophy (Figure 6). But RPE changes, indicated by hypertransmission in OCT as well as alteration of FAF properties, also can stay stable over years (patient shown in Figure 5).

A strength of the current study is the use of multimodal imaging, comprising CFP, OCT, FAF, and FLIO, providing lifetime as well as PEW information, in a cohort of AMD patients followed over up to 6 years. A general limitation is the lacking depth resolution of FLIO which precludes a separation of fluorescence coming from RPE, retina, drusen or deeper structures such as Bruch's membrane and choroid. Therefore, we have to extrapolate the contribution of individual structures from measured lifetimes and PEW in comparison with ex vivo data. This makes the presented discussion of fluorescence contributions of drusen and RPE a plausible explanation of our data, but not a proof of the origin of the fluorescence. A further limitation is the low number of subjects. Due to the high age of the patients, there was a considerable drop out from the follow-up investigations. Another limitation is the restriction to large soft drusen, which was necessary because of the low spatial resolution of FLIO. On the other hand, this focuses our investigation on those drusen, which are associated with a high risk of disease progression (Wang et al., 2007). As non-hyperautofluorescent drusen were excluded, we cannot say anything about their fluorescence lifetimes and PEW, nor about their possible predictive value with respect to disease progression. However, a previous study showed no difference of lifetimes for non-hyperautofluorescent drusen and RPE (Hammer et al., 2018). Furthermore, the limited quality of the OCT, providing five HD-scans only at the baseline investigations, has to be mentioned. Finally, it should be mentioned that we pooled data from phacic and pseudophacic eyes as we didn't find a significant difference in lifetimes or PEW in AMD patients for these both conditions (Hammer et al., 2020).

In conclusion, we showed that hyperautofluorescent drusen differ from adjacent RPE in FAF lifetimes as well as PEW, and an increase of lifetimes as well as a hypsochromic spectra shift of FAF occurred over up to 6 years of follow-up. Several lines of evidence, however,

Although a lengthening of lifetimes and a hypsochromic shift of the PEW at the sites of drusen over time seems to be the rule, drusen also can change PEW but not lifetime. They also can disappear completely without affecting the RPE (Figure 2) in contrast to the described collapse of drusen after the departure of cells correlating to HRF (Balaratnasingam et al., 2016). The change

indicate that these alterations rather indicate changes in the highly fluorescent RPE than in the drusen themselves. RPE alterations on top of drusen are indicators of AMD progression. These can be observed in CFP and OCT. However, molecular changes affecting tissue fluorescence properties might precede morphologic alterations seen with CFP and OCT. The prolongation of FAF lifetimes along with the shortening of PEW may provide additional diagnostic information enabling the detection of patients at risk

## ACKNOWLEDGEMENT

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## ORCID

Martin Hammer  <https://orcid.org/0000-0001-9674-8096>

## REFERENCES

- Ach, T., Tolstik, E., Messinger, J.D., Zarubina, A.V., Heintzmann, R. & Curcio, C.A. (2015) Lipofuscin redistribution and loss accompanied by cytoskeletal stress in retinal pigment epithelium of eyes with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56, 3242–3252.
- Balaratnasingam, C., Yannuzzi, L.A., Curcio, C.A., Morgan, W.H., Querques, G., Capuano, V. et al. (2016) Associations between retinal pigment epithelium and drusen volume changes during the lifecycle of large drusenoid pigment epithelial detachments. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 5479–5489.
- Cankova, Z., Huang, J.D., Kruth, H.S. & Johnson, M. (2011) Passage of low-density lipoproteins through Bruch's membrane and chorioid. *Experimental Eye Research*, 93, 947–955.
- Cao, D., Leong, B., Messinger, J.D., Kar, D., Ach, T., Yannuzzi, L.A. et al. (2021) Hyperreflective Foci, Optical Coherence Tomography Progression Indicators in Age-Related Macular Degeneration, Include Transdifferentiated Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62, 34.
- Chen, L., Messinger, J., Ferrara, D., Freund, K.B. & Curcio, C. (2020) Fundus autofluorescence in neovascular age-related macular degeneration, a clinicopathologic correlation relevant to macular atrophy. *Ophthalmology Retina*, 5, 1085–1096.
- Chen, L., Messinger, J.D., Sloan, K.R., Wong, J., Roorda, A., Duncan, J.L. et al. (2020) Abundance and multimodal visibility of soft drusen in early age-related macular degeneration: A Clinicopathologic Correlation. *Retina*, 40, 1644–1648.
- Chen, L., Messinger, J.D., Ferrara, D., Freund, K.B. & Curcio, C.A. (2021) Stages of Drusen-Associated Atrophy in Age-Related Macular Degeneration Visible via Histologically Validated Fundus Autofluorescence. *Ophthalmology: Retina*, 5, 730–742.
- Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H. et al. (2002) Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 14682–14687.
- Curcio, C.A. (2018) Soft drusen in age-related macular degeneration: biology and targeting via the oil spill strategies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59, AMD160–AMD181.
- Curcio, C.A., Millican, C.L., Bailey, T. & Kruth, H.S. (2001) Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 265–274.
- Curcio, C.A., Johnson, M., Huang, J.D. & Rudolf, M. (2010) Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *Journal of Lipid Research*, 51, 451–467.
- Curcio, C.A., Johnson, M., Rudolf, M. & Huang, J.-D. (2011) The oil spill in ageing Bruch membrane. *The British Journal of Ophthalmology*, 95, 1638–1645.
- Davis, M.D., Gangnon, R.E., Lee, L.Y., Hubbard, L.D., Klein, B.E., Klein, R. et al. (2005) The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Archives of Ophthalmology*, 123, 1484–1498.
- Delori, F.C., Fleckner, M.R., Goger, D.G., Weiter, J.J. & Dorey, C.K. (2000) Autofluorescence distribution associated with drusen in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 496–504.
- Dysli, C., Queller, G., Abegg, M., Menke, M.N., Wolf-Schnurrbusch, U., Kowal, J. et al. (2014) Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55, 2106–2113.
- Dysli, C., Fink, R., Wolf, S. & Zinkernagel, M.S. (2017) Fluorescence Lifetimes of Drusen in Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58, 4856–4862.
- Dysli, C., Wolf, S., Berezin, M.Y., Sauer, L., Hammer, M. & Zinkernagel, M.S. (2017) Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 60, 120–143.
- Ferris, F.L., 3rd, Wilkinson, C.P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K. et al. (2013) Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 120, 844–851.
- Ferris, F.L., Davis, M.D., Clemons, T.E., Lee, L.Y., Chew, E.Y. & Lindblad, A.S. (2005) A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Archives of Ophthalmology*, 123, 1570–1574.
- Fett, A.L., Hermann, M.M., Muether, P.S., Kirchhof, B. & Fauser, S. (2012) Immunohistochemical localization of complement regulatory proteins in the human retina. *Histology and Histopathology*, 27, 357–364.
- Flores, R., Carneiro, A., Serra, J., Gouveia, N., Pereira, T., Mendes, J.M. et al. (2021) Correlation Study between Drusen Morphology and Fundus Autofluorescence. *Retina*, 41, 555–562.
- Freund, K.B., Mrejen, S., Jung, J., Yannuzzi, L.A. & Boon, C.J. (2013) Increased fundus autofluorescence related to outer retinal disruption. *JAMA ophthalmology*, 131, 1645–1649.
- Gambriel, J.A., Sloan, K.R., Swain, T.A., Huisingh, C., Zarubina, A.V., Messinger, J.D. et al. (2019) Quantifying Retinal Pigment Epithelium Dysmorphia and Loss of Histologic Autofluorescence in Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60, 2481–2493.
- Gass, J.D. (1973) Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 90, 206–217.
- Gobel, A.P., Fleckenstein, M., Heeren, T.F., Holz, F.G. & Schmitz-Valckenberg, S. (2016) In-vivo mapping of drusen by fundus autofluorescence and spectral-domain optical coherence tomography imaging. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254, 59–67.
- Guymier, R.H., Rosenfeld, P.J., Curcio, C.A., Holz, F.G., Staurengi, G., Freund, K.B. et al. (2020) Incomplete Retinal Pigment Epithelial and Outer Retinal Atrophy in Age-Related Macular Degeneration: Classification of Atrophy Meeting Report 4. *Ophthalmology*, 127, 394–409.
- Hammer, M., Konigsdorffer, E., Liebermann, C., Framme, C., Schuch, G., Schweitzer, D. et al. (2008) Ocular fundus autofluorescence observations at different wavelengths in patients with age-related macular degeneration and diabetic retinopathy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246, 105–114.
- Hammer, M., Zweifel, L., Kreilkamp, L., Schultz, R., Sauer, L., Augsten, R. et al. (2018) Spectral and lifetime characteristics of drusen autofluorescence in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59, 3243–3243.
- Hammer, M., Schultz, R., Hasan, S., Sauer, L., Klemm, M., Kreilkamp, L. et al. (2020) Fundus Autofluorescence Lifetimes and Spectral Features of Soft Drusen and Hyperpigmentation in Age-Related Macular Degeneration. *Translational Vision Science & Technology*, 9, 20.
- Hammer, M., Jakob-Girbig, J., Schwanengel, L., Curcio, C.A., Hasan, S., Meller, D. et al. (2021) Progressive Dysmorphia of Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration Investigated by Fluorescence Lifetime Imaging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62, 2.
- Johnson, L.V., Leitner, W.P., Staples, M.K. & Anderson, D.H. (2001) Complement activation and inflammatory processes in Drusen

- formation and age related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 73, 887–896.
- Klemm, M., Schweitzer, D., Peters, S., Sauer, L., Hammer, M. & Haueisen, J. (2015) FLIMX: A Software Package to Determine and Analyze the Fluorescence Lifetime in Time-Resolved Fluorescence Data from the Human Eye. *PLoS One*, 10, e0131640.
- Landa, G., Rosen, R.B., Pilavas, J. & Garcia, P.M. (2012) Drusen characteristics revealed by spectral-domain optical coherence tomography and their corresponding fundus autofluorescence appearance in dry age-related macular degeneration. *Ophthalmic Research*, 47, 81–86.
- Linsenmeier, R.A. & Zhang, H.F. (2017) Retinal oxygen: from animals to humans. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 115–151.
- Marmorstein, A.D., Marmorstein, L.Y., Sakaguchi, H. & Hollyfield, J.G. (2002) Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 2435–2441.
- Nozaki, M., Raisler, B.J., Sakurai, E., Sarma, J.V., Barnum, S.R., Lambris, J.D. et al. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2328–2333.
- Reiter, G.S., Told, R., Schlanitz, F.G., Bogunovic, H., Baumann, L., Sacu, S. et al. (2019) Impact of Drusen Volume on Quantitative Fundus Autofluorescence in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60, 1937–1942.
- Rudolf, M., Vogt, S.D., Curcio, C.A., Huisinck, C., McGwin, G., Jr., Wagner, A. et al. (2013) Histologic basis of variations in retinal pigment epithelium autofluorescence in eyes with geographic atrophy. *Ophthalmology*, 120, 821–828.
- Sadda, S.R., Guymier, R., Holz, F.G., Schmitz-Valckenberg, S., Curcio, C.A., Bird, A.C. et al. (2018) Consensus Definition for Atrophy Associated with Age-Related Macular Degeneration on OCT: Classification of Atrophy Report 3. *Ophthalmology*, 125, 537–548.
- Sarks, J.P., Sarks, S.H. & Killingsworth, M.C. (1988) Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (London, England)*, 2(Pt 5), 552–577.
- Sauer, L., Schweitzer, D., Ramm, L., Augsten, R., Hammer, M. & Peters, S. (2015) Impact of Macular Pigment on Fundus Autofluorescence Lifetimes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56, 4668–4679.
- Sauer, L., Andersen, K.M., Dysli, C., Zinkernagel, M.S., Bernstein, P.S. & Hammer, M. (2018) Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 23, 1–20.
- Sauer, L., Gensure, R.H., Andersen, K.M., Kreilkamp, L., Hageman, G.S., Hammer, M. et al. (2018b) Patterns of fundus autofluorescence lifetimes in eyes of individuals with nonexudative age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59, AMD65–AMD77.
- Sauer, L., Vitale, A.S., Modersitzki, N.K. & Bernstein, P.S. (2021) Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy: autofluorescence imaging and beyond. *Eye (London, England)*, 35, 93–109.
- Schultz, R., Gamage, K.C.L.K., Messinger, J.D., Curcio, C.A. & Hammer, M. (2020) Fluorescence Lifetimes and Spectra of RPE and Sub-RPE Deposits in Histology of Control and AMD Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61, 9.
- Schultz, R., Hasan, S., Curcio, C.A., Smith, R.T., Meller, D. & Hammer, M. (2021) Spectral and lifetime resolution of fundus autofluorescence in advanced age-related macular degeneration revealing different signal sources. *Acta Ophthalmologica*, 100, e841–e846.
- Schultz, R., Hasan, S., Schwanengel, L.S. & Hammer, M. (2021) Fluorescence lifetimes increase over time in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*, 99, e970–e972.
- Schultz, R., Klemm, M., Meller, D. & Hammer, M. (2021) Spectral calibration of fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Acta Ophthalmologica*, 100, e612–e613.
- Schütt, F., Ueberle, B., Schnölzer, M., Holz, F.G. & Kopitz, J. (2002) Proteome analysis of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS Letters*, 528, 217–221.
- Schweitzer, D., Schenke, S., Hammer, M., Schweitzer, F., Jentsch, S., Birkner, E. et al. (2007) Towards metabolic mapping of the human retina. *Microscopy Research and Technique*, 70, 410–419.
- Spaide, R.F. & Curcio, C.A. (2010) Drusen Characterization with Multimodal Imaging. *Retina*, 30, 1441–1454.
- Spaide, R.F., Armstrong, D. & Browne, R. (2003) Continuing medical education review: choroidal neovascularization in age-related macular degeneration—what is the cause? *Retina*, 23, 595–614.
- Tan, A.C.S., Pilgrim, M.G., Fearn, S., Bertazzo, S., Tsolaki, E., Morrell, A.P. et al. (2018) Calcified nodules in retinal drusen are associated with disease progression in age-related macular degeneration. *Science Translational Medicine*, 10, 10.
- Thompson, R.B., Reffatto, V., Bundy, J.G., Kortvely, E., Flinn, J.M., Lanzirrotti, A. et al. (2015) Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 1565–1570.
- Tong, Y., Ben Ami, T., Hong, S., Heintzmann, R., Gerig, G., Ablonczy, Z. et al. (2016) Hyperspectral Autofluorescence Imaging of Drusen and Retinal Pigment Epithelium in Donor Eyes with Age-Related Macular Degeneration. *Retina*, 36(Suppl 1), S127–S136.
- Umeda, S., Suzuki, M.T., Okamoto, H., Ono, F., Mizota, A., Terao, K. et al. (2005) Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *The FASEB Journal*, 19, 1683–1685.
- Wang, H. & Hartnett, M.E. (2016) Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD. *Molecular Vision*, 22, 189–202.
- Wang, J.J., Rochtchina, E., Lee, A.J., Chia, E.M., Smith, W., Cumming, R.G. et al. (2007) Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 114, 92–98.
- Wang, L., Li, C.M., Rudolf, M., Belyaeva, O.V., Chung, B.H., Messinger, J.D. et al. (2009) Lipoprotein particles of intraocular origin in human Bruch membrane: an unusual lipid profile. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 870–877.

**How to cite this article:** Schwanengel, L.-S., Weber, S., Simon, R., Lehmann, T., Augsten, R. & Meller, D. et al. (2022) Changes in drusen-associated autofluorescence over time observed by fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*, 00, 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1111/aos.15238>

## 5 Diskussion

Während beschrieben ist, dass die Größe der Drusen mit ihrer Hyperautofluoreszenz korreliert (Landa et al. 2012), konnte in der aktuellen Studie kein Zusammenhang zwischen den FAF-Lebensdauern, der PEW und der Größe der hyperautofluoreszenten Drusen nachgewiesen werden. Die FAF von Drusen wurde erstmals von Delori et al. (Delori et al. 2000) beschrieben und sie fanden heraus, dass Drusen häufig einen hypoautofluoreszenten Kern haben und von einem hyperautofluoreszenten Ring umgeben sind. Vor kurzem wurden dann von Chen et al. (Chen et al. 2021) 4 Stadien der Drusen-FAF vorgeschlagen: Im Farbfundusfoto sichtbare Drusen beginnen mit einer Isoautofluoreszenz (Drusen-Stadium 1), die im Verlauf durch Rückgang oder Verlust der äußeren Fotorezeptorschicht oberhalb der Druse zu einer Hyperautofluoreszenz wird (Drusen-Stadium 2). In Drusen-Stadium 3 erscheint dann der von Delori beschriebene hypoautofluoreszente Kern mit dem umgebenden hyperautofluoreszenten Ring als Zeichen der beginnenden Atrophie des RPEs, welche dann als iRORA oder cRORA fortschreitet. Drusen im Stadium 4 erscheinen im Farbfundusfoto oft aufgebrochen und enthalten kalzifizierte Anteile aus Hydroxylapatit, welche sich im OCT als hyporeflektive Kerne in den Drusen darstellen (Tan et al. 2018, Thompson et al. 2015) und nach der Resorption der lipidhaltigen Anteile in der Bruch-Membran verbleiben (Chen et al. 2021). Die isoautofluoreszenten Drusen im Stadium 1 wurden in dieser Follow-up-Studie ausgeschlossen, da weiche Drusen zu 35% als hyperautofluoreszent und nur 5% als hypoautofluoreszent beschrieben waren und häufiger mit einer Störung der Integrität der Membrana limitans externa, der Ellipsoiden Zone und des Komplexes von RPE und Bruch'scher Membran einher gingen, als die isoautofluoreszenten Drusen. Dies könnte ein Risiko für eine Progression der AMD anzeigen und war ein Grund sich auf die Drusen mit veränderter Autofluoreszenz zu konzentrieren. Die andere Intention war das Interesse daran, wie



sich die Fluoreszenz im Verlauf verändert und dies lässt sich am besten im Fall der hyperautofluoreszenten Drusen und ihrer Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachten. Dieses Signal kann zusätzlich zum Lipofuscin im umgebenden RPE auch durch RPE-Formveränderungen, Verlust maskierender Photorezeptoraußensegmente (Rudolf et al. 2013, Chen et al. 2020, Chen et al. 2021), oder auch durch eine veränderte Zusammensetzung der Fluorophore gesteigert werden. Drusen-Stadium 3 wurde nicht gefunden und der wahrscheinlichste Grund dafür ist die niedrige Auflösung des FLIO. Für eine ausreichende zeitliche Auflösung müssen die Fluoreszenzphotonen auf 1024 Zeitkanäle aufgeteilt werden, was angesichts des schwachen Autofluoreszenzsignals und der Beschränkung der Untersuchungszeit des Auges auf wenige Minuten eine niedrige räumliche Auflösung bedingt, die möglicherweise den hypoautofluoreszenten Kern nicht abbilden kann. Die meisten der untersuchten Drusen befanden sich im zweiten und nur wenige im vierten Drusen-Stadium. Die Hypofluoreszenz ist vor allem auf RPE-Veränderungen zurückzuführen, die insbesondere bei schweren RPE-Schäden mit steigender Lebensdauer und sinkender PEWs einhergehen. Hypoautofluoreszente Drusen scheinen seltener zu sein, da das Drusenmaterial nach der RPE-Atrophie resorbiert wird.

In der Literatur gibt es eine Debatte darüber, ob weiche Drusen bei AMD anhand ihrer Lebenszeit in der FLIO erkennbar sind. Während Dysli et al. keinen Unterschied feststellte (Dysli und Fink et al. 2017, Dysli und Wolf et al. 2017), fand Sauer längere Lebensdauern der weichen Drusen gegenüber dem umgebenden RPE (Sauer und Andersen et al. 2018, Sauer und Gensure et al. 2018). In einer anderen Studie wurde kein Unterschied der Lebensdauer im Durchschnitt aller Drusen festgestellt, aber es konnten längere Lebensdauern für deutlich hyperautofluoreszenten Drusen nachgewiesen werden (Hammer et al. 2020). Bei sorgfältiger Sortierung der Drusen in

ohne, mit und mit fraglicher Hyperpigmentation im Farbfundusfoto oder OCT, konnte gezeigt werden, dass Drusen ohne Veränderung des darüberliegenden RPEs signifikant kürzere Lebensdauern und PEWs haben als das umgebende RPE. Nur wenn das RPE über der Druse hyperpigmentiert im Farbfundusfoto ist oder im OCT mit hyperreflective foci (HRF) auftrat, stieg die Lebensdauer und dieser Unterschied war deutlicher und signifikant höher als für Drusen mit intaktem RPE.

Die kurze Lebensdauer der Drusen in klinischen Untersuchungen steht im Widerspruch zu histologischen Befunden, wo wesentlich längere Lebensdauern für Drusen als für das umgebende RPE in beiden Spektralkanälen gefunden wurden. Während aber in der Histologie Querschnitte des Fundus untersucht werden, erhalten wir in der klinischen FLIO-Untersuchung ein en-face-Bild, in dem wir die Drusen nur durch das stark fluoreszente RPE hindurch betrachten können. Dadurch könnte die schwache Fluoreszenz der Drusen weniger gut sichtbar sein und Unterschiede der Lebensdauern und der PEW könnten eher auf Veränderungen des RPE hinweisen. In diesem Zusammenhang würden kürzere Lebensdauern der Drusen einen Sinn ergeben und durch Veränderungen des RPE erklärt werden. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass sich in frühen Stadien pathologischer RPE-Veränderungen die Lebensdauern verkürzen, bevor sie durch Zelluntergang oder durch Ablösungen einzelner Zellen oder von Zellverbände von der Bruch-Membran und deren Wanderung in die Retina ansteigen (Hammer et al. 2021).

Auch wenn noch nicht sicher gesagt werden kann, ob diese langen Lebenszeiten mit den Drusen oder den Veränderungen des RPEs zusammenhängen, können fokal verlängerte Lebensdauern der Drusen ein Risikoindikator für die folgende Progression der AMD sein. Der Anstieg der Lebensdauern und der Abfall der PEW an den Lokalisationen der Drusen geht einher mit im OCT zu beobachtenden RPE-Läsionen

(Verdickung, Verklumpung oder Migration der Zellen in die Retina). Diese können Veränderungen der zellulären Fluorophorzusammensetzung oder des intrazellulären Milieus im RPE bedingen, wie z.B. der Viskosität, der Polarität oder des pH-Werts, die der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften zugrunde liegen könnten. Dies stimmt damit überein, dass bei frühen AMD-Stadien die Sichtbarkeit der Drusen in FAF-Aufnahmen abhängig ist vom gleichzeitigen Vorliegen von RPE-Irregularitäten. (Chen et al. 2020). Daher werden die dargestellten Veränderungen der FAF-Lebensdauern und der PEW am ehesten den fortschreitenden Umbau des RPEs bzw. die Umverteilung oder den Verlust von Lipofuscin widerspiegeln (Gambriel et al. 2019, Hammer et al. 2021, Ach et al. 2015, Tong et al. 2016) und könnten FLIO zu einem nützlichen Instrument für die Früherkennung von Augen mit hohem Risiko für eine AMD-Progression machen.

Die Verkürzung oder komplette Abwesenheit der äußeren Fotorezeptorsegmente über Drusen könnte zur Hyperautofluoreszenz beitragen (Chen et al. 2021, Freund et al. 2013). Dieses Konzept stimmt mit dem hypsochromen Effekt auf die PEW überein, bei dem Fotopigmente in den Stäbchen und Zapfen einen Filtereffekt auf das kurzwellige Licht der Fluoreszenzstrahlung haben und dieses absorbieren. Der hypsochromen Effekt wird auch Blauverschiebung genannt und bezeichnet die Verschiebung des Absorptionsspektrums eines Stoffs in den kurzwelligeren, energiereicheren Bereich des elektromagnetischen Spektrums.

Dies erklärt aber nicht die Veränderungen der FAF-Lebenszeiten. Diese legen nahe, dass es sich eher um eine Änderung der Fluorophorzusammensetzung oder des intrazellulären Milieus in umgebauten RPE-Zellen handelt. Weiterhin kann ein Beitrag der Fluorophore in Drusen zur Gesamtfluoreszenz nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte, analog zu histologischen Befunden, die längeren Lebensdauern der Drusen

erklären (Schultz et al. 2020, Schultz et al. 2021, Schultz et al. 2021, Schultz et al. 2021), aber nicht die kürzeren Lebenszeiten die hier bei Drusen mit noch intaktem RPE gefunden wurden. Den Druseninhalt als eigentliche Quelle der FAF zu hinterfragen, stimmt damit überein, dass es einen Mangel an Korrelation zwischen dem Drusenvolumen und der FAF-Intensität in quantitativen FAF-Bildgebungen bei Patienten mit früher oder intermediärer AMD gibt (Reiter et al. 2019).

Drusen, die keine Hyperpigmentierung entwickeln, verringern ihre PEW und verlängern ihre Lebensdauer in beiden Spektralkanälen innerhalb der 3 Jahre des Follow-up (Follow-up Gruppe1). Keine signifikanten Änderungen wurden für Drusen mit zarter oder fraglicher Hyperpigmentierung gefunden. Der Grund dafür könnte sein, dass bei ihnen bereits RPE-Veränderungen bei der Baseline-Untersuchung vorlagen, welche aber weder im Farbfundusfoto noch in der OCT sichtbar waren. Dies wird auch durch die längere Lebenszeit und kürzere PEW dieser Drusen untermauert, wenn man sie zur Baseline mit Drusen ohne Hyperpigmentierungsentwicklung vergleicht. Über eine längere Follow-up-Zeit nehmen sowohl für die Drusen ohne als auch für die mit zarter oder fraglicher Hyperpigmentierung, die Lebensdauer - im langwelligen Kanal sogar signifikant - zu und die PEW ab. Drusen die eine sichtbare Hyperpigmentierung entwickelt haben, zeigten eine beachtliche Zunahme der Lebenszeiten und eine Abnahme der PEW in beiden Follow-up-Gruppen, auch wenn dies leider nicht statistisch untersuchbar war durch die geringe Anzahl dieser Drusenart.

Drusen können auch vollständig verschwinden, ohne das RPE zu beeinträchtigen, im Gegensatz zu dem beschriebenen Kollaps der Drusen nach der intraretinalen Migration, welche mit den HRF korrelieren (Balaratnasingam et al. 2016). Die Veränderung der FAF-Lebenszeiten und der PEW geht oft dem Fund von ektopischen

RPE in der Retina oder der Atrophie voraus (Cao et al. 2021). Die RPE-Irregularitäten können aber auch über Jahre stabil bleiben.

Eine Stärke der aktuellen Arbeit ist die Nutzung von multimodaler Bildgebung, die Farbfundusfotos, Fundusautofluoreszenzaufnahmen, optische Kohärenztomographie und FLIO umfasst und in einer Kohorte von Patienten mit trockener AMD in einem Zeitraum von über 6 Jahren erhoben wurde. Eine generelle Begrenzung ist der Mangel an Tiefenauflösung im FLIO, welche eine Trennung der Fluoreszenz von RPE, Drusen, Retina, Bruch'scher Membran und der Choroidea nicht erlaubt. Daher musste der Anteil der individuellen Strukturen an den gemessenen Lebensdauern und PEWs mit ex-vivo-Daten verglichen und extrapoliert werden. Dies macht die Erklärung für die Daten bezüglich des Fluoreszenzanteils der Drusen und des RPEs plausibel, ist aber kein Beweis für den Ursprung der Fluoreszenz. Eine weitere Einschränkung ist die geringe Studienpopulation. Allein schon das hohe Alter der Probanden war ein beträchtlicher Grund für das Ausscheiden vieler Baseline-Teilnehmer. Des Weiteren konnten durch die geringe räumliche Auflösung des FLIO nur große weiche Drusen untersucht werden, auf der anderen Seite lag so der Focus auf diesen Drusen, welche mit einem hohen Risiko für das Fortschreiten der AMD assoziiert sind (Wange et al. 2007). Da die Drusen ohne Hyperfluoreszenz ausgeschlossen wurden, kann hier nichts über deren Lebenszeiten, PEWs oder ihren möglichen Einfluss auf die Progredienz der AMD gesagt werden, aber eine frühere Studie zeigte keinen Unterschied der Lebenszeiten zwischen Drusen ohne Hyperfluoreszenz und der des RPEs (Hammer et al. 2018). Außerdem war es ein Problem, dass zur Baseline nur OCT-Aufnahmen mit 5 Rasterlinien (HD-5-Line-Scan) gemacht wurden und diese von geringer Qualität waren. Es wurden Daten von phaken und pseudophaken Augen gepoolt, da sich kein signifikanter Unterschied in den Lebensdauern und der PEW der

beiden Gruppen zeigte (Hammer et al. 2020). Augen mit fortgeschrittener Katarakt wurden ausgeschlossen, da die Aufnahmequalität zu schlecht war.

## **6 Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend zeigte sich, dass hyperautofluoreszente Drusen sich sowohl in den FAF – Lebenszeiten, als auch in den PEWs von dem umgebenden RPE unterscheiden und eine Zunahme der Lebensdauer sowie eine hypsochrome Verschiebung der FAF über den Beobachtungszeitraum stattfand. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass dies eher Änderungen des hoch fluoreszenten RPE zeigt, als auf Fluorophore in den Drusen zurückzuführen ist. RPE-Irregularitäten über den Drusen könnten somit ein Indikator für die Progression der AMD sein und sie sind mittels Funduskopie, Farbfundusfotographie und OCT diagnostizierbar. Molekulare Veränderungen im RPE können aber die Fluoreszenz beeinflussen und morphologisch sichtbaren Befunden vorausgehen. Hier würden längere Lebenszeiten und kürzere PEWs im FLIO zusätzliche diagnostische Informationen zur Früherkennung von Patienten mit hohem Progressionsrisiko liefern, was zukünftig an Bedeutung gewinnen wird, wenn neue Therapieoptionen zur Verlangsamung der AMD-Progression verfügbar werden. Die FLIO mag für die breite klinische Nutzung noch nicht ausgelegt sein, aber sollte sich der prognostische Zusatznutzen als hilfreich erweisen, könnte sich dies ändern.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Alexander P, Thomson HA, Luff AJ, Lotery AJ. 2015. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects. *Eye*. 2015; 29(8):992–1002.

Barreto P, Farinha C, Coimbra R, Luz Cachulo M, Barbosa Melo J, Carreira I, Hoyng C, Cunha-Vaz J, Silva R. 2022. Association of genetics and the adherence to the Mediterranean diet: the risk for age-related macular degeneration. *EURETINA Abstracts 2022 Hamburg*.

Bernstein PS, Li B, Vachali PP, Goruspudi A, Shyam R, Henriksen BS. 2016. Lutein, zeaxanthin and meso-zeaxanthin: the basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Prog Retin Eye Res*. 2016; 50:34–66.

Cabral de Guimaraes TA, Daich Varela M, Georgiou M, Michaelides M. 2022. Treatments for dry age-related macular degeneration: therapeutic avenues, clinical trials and future directions. *Br J Ophthalmol*. 2022 Mar; 106(3):297-304. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-318452. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33741584; PMCID: PMC8867261.

Cankova Z, Huang JD, Kruth HS, Johnson M. 2011. Passage of low-density lipoproteins through Bruch's membrane and choroid. *Exp Eye Res* 2011; 93:947-955.

Chen FK, Patel PJ, Uppal GS, Tufail A, Coffey PJ, Da Cruz L. 2010. Long-term outcomes following full macular translocation surgery in neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2010; 94(10):1337–1343.

Chorvat D, Chorvatova A. 2009. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys. Lett*. 2009; 6(3), 175–193.

Csader S, Korhonen S, Kaarniranta K, Schwab U. 2022. The Effect of Dietary Supplementations on Delaying the Progression of Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022 Oct 13; 14(20):4273. doi: 10.3390/nu14204273. PMID: 36296956; PMCID: PMC9610847.

Davis MD, Gangnon RE, Lee LY, Hubbard LD, Klein BEK, Klein R, Ferris FL, Bressler SB, Milton RC. 2005. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123(11):1484–1498.

Delori FC, Dorey CK, Staurenghi G, Arend O, Goger DG, Weiter JJ. 1995. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995; 36:718-29.

Deng Y, Qiao L, Du M, Qu C, Wan L, Li J, Huang L. 2021. Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis*. 2021 Feb 27; 9(1):62-79. doi: 10.1016/j.gendis.2021.02.009. PMID: 35005108; PMCID: PMC8720701.

De Oliveira Dias JR, Rodrigues EB, Maia M, Magalhães O Jr, Penha FM, Farah ME. 2011. Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(12):1631–1637.

Dysli C, Wolf S, Zinkernagel MS. 2016. Autofluorescence Lifetimes in Geographic Atrophy in Patients With Age-Related Macular Degeneration. *Invest OphthalmolVis Sci* 2016; 57:2479-2487.

Ermakov IV, Ermakova MR, Gellermann W. 2005. Simple Raman instrument for in vivo detection of macular pigments. *Appl. Spectrosc*. 2005; 9(7), 861–867.



Evans JR, Lawrenson JG. 2017. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jul 31; 7(7):CD000254. doi: 10.1002/14651858.CD000254.pub4. PMID: 28756618; PMCID: PMC6483465.

FDA – U.S. Food and Drug Administration, New Drug Application Approval, NDA 217171, Silver Springs 17.02.2023

Finger RP, Fimmers R, Holz FG, Scholl HPN. 2011. Incidence of blindness and severe visual impairment in Germany: projections for 2030. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 52(7): 4381–4389.

Freeman WR. 2019. Brimonidine drug delivery system for geographic atrophy. An implant with potential to slow lesion growth. *Retinal Physician Vol 16 (Nov/Dec 2019):* 42,43,51.

Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS. 2006. Age related macular degeneration—emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med.* 2006; 38:450–471.

Gorusupudi A, Nelson K, Bernstein PS. 2017. The Age-Related Eye Disease 2 Study: micronutrients in the treatment of macular degeneration. *Adv Nutr.* 2017; 8:40–53.

Greenberg JP, Duncker T, Woods RL, Smith RT, Sparrow JR, Delori FC. 2013. Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013; 54:5684-93.

Guymer RH, Rosenfeld PJ, Curcio CA, Holz FG, Staurenghi G, Freund KB, Schmitz-Valckenberg S, Sparrow J, Spaide RF, Tufail A, Chakravarthy U, Jaffe GJ, Csaky K, Sarraf D, Monés JM, Tadayoni R, Grunwald J, Bottoni F, Liakopoulos S, Pauleikhoff D, Pagliarini S, Chew EY, Viola F, Fleckenstein M, Blodi BA, Lim TH, Chong V, Lutty J, Bird AC, Sadda SR. 2020. Incomplete Retinal Pigment Epithelial and Outer Retinal

Atrophy in Age-Related Macular Degeneration: Classification of Atrophy Meeting Report 4. *Ophthalmology* 2020; 127:394-409.

Houston T. 2001. Smoking and age-related macular degeneration. *Am Fam Phys*. 2001; 63(2):826.

Jaffe GJ, Westby K, Csaky KG, Monés J, Pearlman JA, Patel SS, Joondeph BC, Randolph J, Masonson H, Rezaei KA. 2021. C5 Inhibitor Avacincaptad Pegol for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Pivotal Phase 2/3 Trial. *Ophthalmology*. 2021 Apr; 128(4):576-586. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.08.027. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32882310.

Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH. 2001. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2001; 73:887-896.

Joussen AM, Bornfeld N. 2009. The treatment of wet age-related macular degeneration. *Deutsches Ärzteblatt Int*. 2009 May; 106(18):312-7. doi: 10.3238/arztebl.2009.0312. Epub 2009 May 1. PMID: 19547647; PMCID: PMC2689592.

Kasha M. 1950. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*. Band 9, Nr. 0, Cambridge: RSC Publishing.

Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Nieto FJ, Huang GH, Pankow JS, Klein BEK. 2010. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128:750–758.

Lakowicz J. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Publishers.

Koenig K, Schneckenburger H. 1994. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J. Fluoresc.* 4(1), 17–40.

Leitlinie Nr. 21 Altersbedingte Makuladegeneration AMD, BVA und DOG 2015.

Liao DS, Grossi FV, El Mehdi D, Gerber MR, Brown DM, Heier JS, Wykoff CC, Singerman LJ, Abraham P, Grassmann F, Nuernberg P, Weber BHF, Deschatelets P, Kim RY, Chung CY, Ribeiro RM, Hamdani M, Rosenfeld PJ, Boyer DS, Slakter JS, Francois CG. 2020. Complement C3 Inhibitor Pegcetacoplan for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Phase 2 Trial. *Ophthalmology.* 2020 Feb; 127(2):186-195. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.07.011. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31474439.

Li QW, Welchowski T, Schmid M, Mauschitz MM, Holz FG, Finger RP. 2020. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systemic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2020; 104:1077-84.

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. 2017. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16; 376(11):1038-1046. doi: 10.1056/NEJMoa1608368. PMID: 28296613.

Merle BM, Benlian P, Puche N, Bassols A, Delcourt C, Souied EH. 2014. Nutritional AMD Treatment 2 Study Group. Circulating omega-3 Fatty acids and neovascular age-

related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Mar 28; 55(3):2010-9. doi: 10.1167/iovs.14-13916. PMID: 24557349.

Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. 2006. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14; 103(7):2328-33. doi: 10.1073/pnas.0408835103. Epub 2006 Feb 1. PMID: 16452172; PMCID: PMC1413680.

Oshima H, Iwase T, Ishikawa K, Yamamoto K, Terasaki H. 2017. Long-term results after limited macular translocation surgery for wet age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2017 May 23; 12(5):e0177241. doi: 10.1371/journal.pone.0177241. PMID: 28542257; PMCID: PMC5441587.

PRIMAvera-Study, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04676854, Pixium Vision SA.

Pschyrembel, Medizinische Fachredaktion Pschyrembel. 2020. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 268. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter Verlag.

Raimundo M, Mira F, Cachulo MDL, Barreto P, Ribeiro L, Farinha C, Laíns I, Nunes S, Alves D, Figueira J, Merle BM, Delcourt C, Santos L, Silva R. 2018. Adherence to a Mediterranean diet, lifestyle and age-related macular degeneration: the Coimbra Eye Study - report 3. *Acta Ophthalmol.* 2018 Dec; 96(8):e926-e932. doi: 10.1111/aos.13775. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30218481.

Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, Wikstrom ME, French MA, Pierce CM, Schwartz SD, Blumenkranz MS, Chalberg TW, Degli-Esposti MA, Constable IJ. 2015. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet.* 2015 Dec 12; 386(10011):2395-403. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00345-1. Epub 2015 Sep 30. PMID: 26431823.

Rastogi N, Smith RT. 2016. Association of age-related macular degeneration and reticular macular disease with cardiovascular disease. *Surv Ophthalmol.* 2016; 61(4):422–433.

Sauer L, Andersen KM, Dysli C, Zinkernagel MS, Bernstein PS, Hammer M. 2018. Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *J. Biomed. Opt.* 23(9) 091415 (4 September 2018); doi.org/10.1117/1.JBO.23.9.091415.

Sauer L, Gensure RH, Andersen KM, Kreilkamp L, Hageman GS, Hammer M, Bernstein PS. 2018. Patterns of Fundus Autofluorescence Lifetimes In Eyes of Individuals With Nonexudative Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Mar 20; 59(4):AMD65-AMD77. doi: 10.1167/iovs.17-23764. PMID: 30025104; PMCID: PMC6009207.

Sauer L, Schweitzer D, Ramm L, Augsten R, Hammer M, Peters S. 2015. Impact of Macular Pigment on Fundus Autofluorescence Lifetimes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Jul; 56(8):4668-79. doi: 10.1167/iovs.14-15335. PMID: 26207302.

Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. 2012. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet.* 2012 Feb 25; 379(9817):713-20. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22281388.

Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Anders R. 2002. Time-correlated measurement of autofluorescence. A method to detect metabolic changes in the fundus. *Ophthalmologe.* 2002 Oct; 99(10):774-9. German. doi: 10.1007/s00347-002-0656-3. PMID: 12376853.

Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, Schweitzer F, Jentsch S, Birckner E, Becker W, Bergmann A. 2007. Towards metabolic mapping of the human retina. *Microsc Res Tech*. 2007 May; 70(5):410-9. doi: 10.1002/jemt.20427. PMID: 17393496.

Schultz R, Gamage KCLK, Messinger JD, Curcio CA, Hammer M. 2020. Fluorescence Lifetimes and Spectra of RPE and Sub-RPE Deposits in Histology of Control and AMD Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61, 9.

Schultz R, Hasan S, Curcio CA, Smith RT, Meller D, Hammer M. 2021. Spectral and lifetime resolution of fundus autofluorescence in advanced age-related macular degeneration revealing different signal sources. *Acta Ophthalmologica*, 100, e841–e846.

Schultz R, Hasan S, Schwanengel LS, Hammer M. 2021. Fluorescence lifetimes increase over time in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*, 99, e970– e972.

Schultz R, Klemm M, Meller D, Hammer M. 2021. Spectral calibration of fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Acta Ophthalmologica*, 100, e612– e613.

Spaide RF, Armstrong D, Browne R. 2003. Continuing medical education review: choroidal neovascularization in age-related macular degeneration--what is the cause?. *Retina* 2003;23:595-614.

Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, Blonska A, Ghosh SK, Ueda K, Zhou J. 2012. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2012 Mar; 31(2):121-35. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.12.001. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22209824; PMCID: PMC3288746.

Stokes GG. 1852. XXX. On the change of refrangibility of light. *Phil. Trans. R. Soc*; 142:463–562. doi: org/10.1098/rstl.1852.0022.

Weikel KA, Chiu CJ, Taylor A. 2012. Nutritional modulation of age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med.* 2012;33(4):318–375.

Wong WT, Dresner S, Forooghian F, Glaser T, Doss L, Zhou M, Cunningham D, Shimel K, Harrington M, Hammel K, Cukras CA, Ferris FL, Chew EY. 2013. Treatment of geographic atrophy with subconjunctival sirolimus: results of a phase I/II clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Apr 26; 54(4):2941-50. doi: 10.1167/iovs.13-11650. PMID: 23548622; PMCID: PMC3638660.

Yehoshua Z, de Amorim Garcia Filho CA, Nunes RP, Gregori G, Penha FM, Moshfeghi AA, Zhang K, Sadda S, Feuer W, Rosenfeld PJ. 2014. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology.* 2014 Mar; 121(3):693-701. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.09.044. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24289920; PMCID: PMC4015213.

### **Bildquellen:**

Abb. 1: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2006. Prometheus, Lern-Atlas der Anatomie, Kopf und Neuroanatomie, Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.

Abb. 2: gesunde Netzhaut oben links: Grehn F. 2012. Augenheilkunde. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. doi.org/10.1007/978-3-642-11333-8\_14, all. Die 3 weiteren Fundusfotos wurden erhoben im Rahmen der Follow-up-Studie 2020. Schwanengel LS. Universitätsklinikum Jena.

Abb. 3: Schweizer T, Kubach H, Koch T. 2021. Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems. *Automotive and Engine Technology* 2021. 6. 1-13. 10.1007/s41104-021-00092-3.

Abb. 4: linke Abb. FAF der gesunden Netzhaut: Kellner U, Heimann H, Wachtlin J, Lommatzsch AP. 2010. *Atlas des Augenhintergrundes*, Stuttgart, New York: Thieme-Verlag. doi: 10.1055/b-0034-40447. Rechte Abb. FAF bei trockener AMD erhoben im Rahmen der Follow-up-Studie 2018, Schröder R. Universitätsklinikum Jena.

Abb. 5: Sauer L, Andersen KM, Dysli C, Zinkernagel MS, Bernstein PS, Hammer M. 2018. Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *J. Biomed. Opt.* 23(9) 091415 (4 September 2018); doi.org/10.1117/1.JBO.23.9.091415.



## Anhang

### Publikationsliste

Hammer M, Jakob-Girbig J, Schwanengel L, Curcio CA, Hasan S, Meller D, Schultz R. 2021. Progressive Dysmorphia of Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration Investigated by Fluorescence Lifetime Imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2021 Sep 2;62(12):2. doi: 10.1167/iovs.62.12.2. PMID: 34491262; PMCID: PMC8431975.

Schultz R, Hasan S, Schwanengel LS, Hammer M. 2021. Fluorescence lifetimes increase over time in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2021 Sep; 99(6):e970-e972. doi: 10.1111/aos.14694. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33342081.

Schultz R, Schwanengel L, Klemm M, Meller D, Hammer M. 2021. Spectral fundus autofluorescence peak emission wavelength in ageing and AMD. *Acta Ophthalmol.* 2022 Sep; 100(6):e1223-e1231. doi: 10.1111/aos.15070. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34850573.

Weber S, Simon R, Schwanengel LS, Curcio CA, Augsten R, Meller D, Hammer M. Fluorescence Lifetime and Spectral Characteristics of Subretinal Drusenoid Deposits and Their Predictive Value for Progression of Age-Related Macular Degeneration. 2022. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022 Dec 1; 63(13):23. doi: 10.1167/iovs.63.13.23. PMID: 36580310; PMCID: PMC9804024.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Dr. Martin Hammer. Bei allen Schritten - von der Auswahl und Eingrenzung des Themas, über die Einarbeitung in die Methoden, die Auswertung der Daten, das Verfassen der Publikation, bis hin zur Fertigstellung dieser Schrift - war er für mich hilfsbereiter Mentor und Richtungsgeber. Seine Motivation und Unterstützung haben mich ermutigt diese Arbeit zu schreiben.

Außerdem danke ich Sebastian Weber für seine Unterstützung bei der Verarbeitung und Auswertung der Daten.

Ein großer Dank geht auch an Ralf Schröder für seine Hilfe bei den Aufnahmen des Augenhintergrunds und der Suche nach Voraufnahmen, sowie an das gesamte Mitarbeiter-Team der Ambulanz für Augenheilkunde am Uniklinikum Jena für ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Frau PD. Dr. Regine Augsten für die Ermöglichung dieser Arbeit und für Ihre freundliche Unterstützung bei Fragestellungen jeglicher Art.

Auch meiner Familie, meinem Verlobtem, meinen Freunden und meinen Kollegen danke ich für die Unterstützung und Motivation. Ein besonderer Dank geht hier nochmal an meine Mutter für das häufige Korrekturlesen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Diese Dissertation habe ich selbst angefertigt. Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung wurden nicht übernommen und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen wurden in der Arbeit angegeben.

Mein Betreuer Dr. rer. nat. M. Hammer hat mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Anfertigung des Manuskriptes unterstützt.

Mein Kollege Sebastian Weber half mir bei der Befundung der Farbfundusfotos und Klassifizierung in die AMD-Stadien, sowie bei der Bearbeitung der Daten mittels FlimX-Software.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte erhielten weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Dissertation wurde vorher noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche Arbeit, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche bzw. eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 25.02.2024

Ort, Datum

Linda-Sophia Schwanengel