

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger

**Die Darstellung der Hornhaut des Auges mittels optischer  
Kohärenztomographie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Carolin Elhardt  
aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang J. Mayer
	Prof. Dr. med. Christos Haritoglou FEBO
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Bernhard Lachenmayr
	apl. Prof. Dr. med. Aljoscha S. Neubauer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Christian M. Wertheimer
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	12.05.2022



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



### Eidesstattliche Versicherung

Ich, Carolin Elhardt, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### **Die Darstellung der Hornhaut des Auges mittels optischer Kohärenztomographie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 20.05.2022

Carolin Elhardt

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Aufbau und Funktion der Hornhaut .....	6
1.2	Untersuchungsmethoden der Hornhaut .....	6
1.3	Hintergrund und Darstellung der Forschungsprojekte .....	9
1.3.1	“Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography” .....	10
1.3.2	“Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography” .....	12
2	Veröffentlichung I .....	14
3	Veröffentlichung II .....	15
4	Zusammenfassung .....	16
4.1	Summary .....	23
5	Darlegung des Eigenanteils an den Autorenschaften .....	29
6	Abkürzungsverzeichnis .....	31
7	Literaturverzeichnis .....	32
8	Danksagung .....	40
9	Publikationsliste .....	41

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Hornhaut

Die Hornhaut (Kornea) ist die klare Scheibe an der Vorderseite des Auges, welche aus fünf Schichten besteht.(1) Die äußerste Schicht der Hornhaut ist das Epithel, darunter liegen die Basalmembran (Bowman-Membran) und das derbe, kollagenhaltige Stroma.(1) Zum Auginnenen trennt die Descemet-Membran das Endothel vom Stroma.(1) Der horizontale Durchmesser der Hornhaut ist mit durchschnittlich 11,81 mm größer als der vertikale Durchmesser mit durchschnittlich 11,26 mm.(2) Die Hornhautdicke beträgt zentral durchschnittlich 550  $\mu\text{m}$ (3) und steigt Richtung Peripherie teils über 700  $\mu\text{m}$ (4) an. Die Transparenz der Hornhaut ermöglicht das Durchtreten von Lichtstrahlen in das Auge zur Netzhaut.(5) Zusätzlich bietet sie als oberflächliche Schicht Schutz vor schädlichen Einflüssen und Fremdkörpern.(6) Sie ist das am stärksten sensibel innervierte Organ des menschlichen Körpers, dessen Nervengeflecht einen reflexartigen Lidschlag und Tränenproduktion auslösen kann.(7) Wenn durch Erkrankungen die Intaktheit, Durchsichtigkeit oder Brechung verändert ist, kann dies mit teils erheblichen Einschränkungen der Sehfähigkeit, Störungen der Schutzfunktion und Schmerzen einher gehen.(8, 9) Aus diesem Grund ist eine Erhaltung der kornealen Gegebenheiten von hoher Priorität, welche durch angemessene und zielführende Diagnostik und Therapie mitbestimmt wird.

## 1.2 Untersuchungsmethoden der Hornhaut

Klinisch kann die Untersuchung der Hornhaut mittels Spaltlampe durchgeführt werden.(10) Ergänzend stehen bildgebende Verfahren zur Verfügung: Eine Tomographie kann mittels Scheimpflug-Prinzip durchgeführt werden.(11) Für eine genaue quantitative Untersuchung des Endothels kann die Spekularmikroskopie herangezogen werden.(12) Eine detaillierte, mikroskopische Ansicht der Hornhaut kann mittels in-vivo Konfokalmikroskopie (in-vivo confocal microscopy, IVCM) ermöglicht werden.(13, 14) Aufgrund ihrer hohen lateralen Auflösung knapp unter 1  $\mu\text{m}$  können mit ihrer Hilfe feinste Strukturen der Hornhaut, wie

einzelne Zellen oder korneale Nerven, dargestellt werden, welche nicht mittels Spaltlampe beurteilt werden können.(14, 15) Die Durchführung der IVCM ist jedoch durch technische Gegebenheiten limitiert: Die gängige IVCM hat einen begrenzten Bildausschnitt(16), sodass ein Zusammensetzen dieser einzelnen Ausschnitte nötig wird, wodurch sich der Zeitaufwand zur Aufnahme des finalen Bildes erhöht.(17) Darüber hinaus benötigt die IVCM für Aufnahmen einen Kontakt des Gerätes zur Augenoberfläche, welcher mittels Gels hergestellt wird.(18)

Als alternative bildgebende Methode steht die Optische Kohärenztomographie (optical coherence tomography, OCT) zur Verfügung(19), mit welcher die Hornhaut im Schnittbildverfahren dargestellt werden kann.(20) Die OCT beruht auf der Messung von Lichtreflektionen an Gewebe abhängig von dessen optischen Eigenschaften.(21) Aufgrund der sehr hohen Lichtgeschwindigkeit sind die Laufzeitunterschiede des vom Gewebe zurückgestreuten Lichts so gering, dass sie nicht direkt von Photodetektoren gemessen werden können; daher verwendet die OCT zur Messung der Unterschiede die Weißlicht-Interferometrie.(22, 23) Hierbei wird niedrig-kohärentes Breitbandlicht durch einen halbtransparenten Spiegel in zwei Teile aufgeteilt und in die beiden Arme eines Michelson-Interferometers gelenkt.(19) Im Probenarm wird der Lichtstrahl von Gewebe (zum Beispiel einer Hornhaut) zurückgestreut, im Referenzarm wird er von einem Spiegel reflektiert.(24) Durch den Breitbandlaser gibt es nur eine positive Interferenz, wenn die Weglänge des Lichts zur Probe identisch zu der des Referenzarms ist.(25) Die Länge des Referenzarms gibt eine Auskunft über die Tiefe der Reflektion im Gewebe.(25) Die vom Gewebe zurückgestreuten Lichtstrahlen interferieren durch den halbtransparenten Spiegel mit den ursprünglichen Lichtstrahlen aus dem Referenzarm.(25) Ein Detektor misst die Intensität des Interferenzsignals, mittels welcher Rückschlüsse auf reflektierende Schichten im Gewebe geschlossen werden können.(26) Damit kann jedoch nur ein Punkt im Gewebe aufgenommen werden.(23) Durch folgende verschiedene Methoden kann eine Tiefenaufnahme entlang der z-Achse erreicht werden. Durch mechanische Verlängerung oder Verkürzung des Referenzarms durch Bewegung des Spiegels im Referenzarm wird die Gewebeprobe im Tiefenprofil auf konstruktive Interferenz untersucht (Time-Domain OCT).(19) Diese Methode birgt jedoch auch Nachteile, da nur von gewissen Tiefenpunkten pro Spiegelposition und Zeit Daten gewonnen werden können und die technische Umsetzung der mechanischen Verschiebung des Spiegels in Hinblick auf die Anforderung einer schnellen Bildgebung sehr

zeitaufwendig ist und zu längeren Aufnahmezeiten führt.(23) Infolge der Erkenntnis, dass die Information über die Reflektivität des Tiefenprofils ebenfalls im Spektrum des Interferenzsignals zu finden ist, konnte auf die mechanische Verschiebung des Spiegels verzichtet werden und stattdessen das Spektrum des reflektierten Lichts analysiert werden (Fourier-Domain-OCT).(23) Im Gegensatz zum Time-Domain OCT kann mit Hilfe eines Spektrometers (Spectral Domain OCT) oder einer schnell durchstimmbaren, schmalbandigen Lichtquelle (Swept-Source OCT) durch Fourier-Transformation mittels Analyse der Interferenzsignale ein Tiefenprofil der Reflektivität erstellt werden.(25) Hierbei können von mehreren Tiefenpunkten zur gleichen Zeit Messungen gemacht werden, sodass eine vollständige Tiefeninformation zeitgleich generiert werden kann.(25) Diese Methode der Spectral domain OCT beziehungsweise Swept-Source OCT ist ein gängiges Verfahren für klinische Geräte.(27, 28) Entlang der Scan-Achse werden A-Scans aufgenommen; durch Scannen des Probenstrahls über die Probe, können mehrere A-Scans zu einem zwei-dimensionalen B-Scan(19) oder einem drei-dimensionalen C-Scan(28) vereint werden.(23) Die OCT überzeugt mit einem nicht-invasivem Verfahren ohne Kontakt zum Auge, einer Verwendung nicht-ionisierender Strahlung und einer kurzen Aufnahmedauer von Sekunden.(29) Kommerziell verfügbare OCT-Geräte haben nur eine Auflösung von mehreren Mikrometern und reichen somit beispielsweise nicht an die hohe Auflösung der IVCM heran.(24) Es wird jedoch intensiv an der Verbesserung der Auflösung der OCT-Geräte geforscht, wobei bereits Geräte wie die hochauflösende Fourier-domain OCT(30), die full-field (FF-) OCT(31), die ultra-high resolution (UHR-) OCT(32) und die micro- ( $\mu$ -) OCT(33) entwickelt wurden.

Die Optische Kohärenztomographie (OCT) hat sich bereits als bildgebendes Instrument in der Ophthalmologie etabliert.(24, 34) Insbesondere die schnelle und kontaktlose Aufnahme von Bildern ermöglicht eine praktikable Schnittbildgebung verschiedener Strukturen des Auges einschließlich der Hornhaut.(24) Die generierten Bilder der aktuell kommerziell erwerbbar Geräte können zur weiteren Analyse der Hornhaut verwendet werden, wie wir in unserer Studie „Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography“ zeigen konnten.(35) Für diverse spezifische Fragestellungen wird eine sehr hohe Auflösung im geringen Mikrometerbereich benötigt, welche derzeit mit den meisten klinisch verfügbaren OCT-Geräten nicht erreicht wird.(24)

Hierfür müssen Geräte verwendet werden, die diesen Anforderungen genügen, wie beispielsweise das micro-OCT in unserer Studie „Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography“.(36)

### 1.3 Hintergrund und Darstellung der Forschungsprojekte

Die eingereichte kumulative Doktorarbeit beinhaltet zwei publizierte Originalartikel, die eine morphologische, bildgebende Darstellung der Hornhaut mit speziellen, auf die Fragestellungen und Erkrankungen angepassten Analysemöglichkeiten untersuchen.(35, 36)

Die Arbeit “Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography” beschreibt die Entwicklung eines digitalen Bildverarbeitungsalgorithmus kornealer OCT-Bilder von Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie mittels kommerziell verfügbarem OCT. Dieser dient der Evaluierung und Bewertung der Krankheitsschwere anhand objektiver Kriterien. Die Studie „Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography” präsentiert die Untersuchung kornealer Nerven mittels des hochauflösenden  $\mu$ OCT und die Entwicklung einer Möglichkeit zur dreidimensionalen Verfolgung und Abbildung dieser Nerven, sowie die Verifizierung der Nerven mittels Immunhistochemie.

Bei dem ersten beschriebenen Projekt handelt es sich um eine Forschungskooperation der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Wellman Center for Photomedicine des Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School) in Boston. Das zweite Projekt ist eine Forschungskooperation der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, des Wellman Center for Photomedicine des Massachusetts General Hospital und des Instituts für Biomedizinische Optik an der Universität zu Lübeck.

### 1.3.1 “Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography”

Die Arbeit “Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography” befasst sich mit der OCT-Bildgebung der Fuchs-Endotheldystrophie.(35) Diese wird zu der Gruppe der 22 beschriebenen Hornhautdystrophien gezählt.(8) Um die Namensverwendung zu vereinheitlichen, wurde 2008 eine Klassifikation der Hornhautdystrophien anhand einer Zuordnung nach dem betroffenen Anteil der Hornhaut veröffentlicht(37), welche 2015 in ihrer zweiten Fassung erschien(8).

Die Fuchs-Endotheldystrophie gehört zu der Gruppe der endothelialen Hornhautdystrophien und zeichnet sich durch einen progredienten Endothelzellverlust aus.(38) Die Endothelzellen bilden mit ihrer hexagonalen Form die innerste Schicht der Hornhaut.(39) Sie sind zum Großteil für die Aufrechterhaltung der kornealen Transparenz verantwortlich, welche eines genau regulierten, verhältnismäßig dehydrierten Stadiums bedarf.(40) Zum einen bilden sie durch Tight-Junctions eine Barriere zum Kammerwasser, sodass der Wasserfluss in die Hornhaut zum Großteil verhindert wird.(41, 42) Zum anderen bauen sie mit Hilfe von  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasen und Carboanhydrasen einen osmotischen Gradienten auf, sodass Wasser aus der Hornhaut in das Kammerwasser fließt und auf diese Weise die Hornhaut entwässert wird.(43) Folglich beruht die Transparenz der Hornhaut auf einer Balance aus der Permeabilität des Endothels und der Dehydratation der Hornhaut durch endotheliale Pumpfunktion.(40) Ein Verlust der bei der Geburt bestehenden  $\sim 4000$  Zellen/ $\text{mm}^2$ (44) auf  $\sim 2300$  Zellen/ $\text{mm}^2$  im neunten Lebensjahrzent(45) ist ein natürlicher Alterungsprozess durch das Wachstum der Hornhaut(46) und durch die Apoptose beziehungsweise Nekrose der Zellen(47). Bei der Fuchs-Endotheldystrophie findet jedoch ein übermäßiger Endothelzellverlust mit Funktionsverlust des Endothels und kompensatorischer Ausbreitung der verbleibenden Zellen durch Vergrößerung (Polymegatismus) und Verformung (Pleomorphismus) statt.(48, 49) Des Weiteren zeigen sich sogenannte Guttae, welche unregelmäßige, unterschiedlich große, von Endothelzellen sezernierte Ablagerungen an der verdickten Descemet-Membran darstellen.(38, 49) Bei Voranschreiten der Erkrankung dekompensiert das Endothel, sodass die Zellen ihrer Funktion der Hornhaut-Entwässerung nicht mehr ausreichend nachkommen

können.(8) Hierdurch kann ein intraepitheliales und interepitheliales Ödem mit Mikrozysten und Blasen im Epithel entstehen,(38) welches als Bullöse Keratopathie bezeichnet wird.(8) Bei langjährigem Bestehen können sich aufgrund des Ödems sowohl eine subepitheliale Fibrose als auch eine Narbenbildung sowie eine periphere oberflächliche Neovaskularisation zeigen.(8) Im Vergleich zu teils symptomlosen Frühstadien mit Guttae oder leichtem Ödem, kann ein Voranschreiten mit verstärktem stromalen oder epithelialen Hornhautödem in einem reduzierten Visus resultieren.(8) Falls epitheliale Flüssigkeitsblasen aufbrechen, kann durch freiliegende Nervenendigungen(38) Schmerz verursacht werden und Photophobie sowie Epiphora bestehen.(8)

Die kornealen Veränderungen der Fuchs-Endotheldystrophie können mittels Spaltlampenuntersuchung erkannt werden.(48) Um die Krankheitsschwere zu objektivieren, können auch eine Pachymetrie, eine zentrale Hornhautdickenmessung und eine Endothelzellzahlmessung genutzt werden.(50) Die Endothelzellzahlmessung erweist sich jedoch selbst bei leichtem Hornhautödem als schwierig und inakkurat.(51) Kleinste morphologische Details der Erkrankung wie Guttae können dagegen beispielsweise mit Hilfe der IVCM aufgrund der guten Auflösung der Geräte bildlich sichtbar gemacht werden.(52) Die OCT kann als Messinstrument für die Hornhautdicke, zur Darstellung von Descemet-Membran- und Endothelveränderung oder als postoperative Bildgebung verwendet werden.(53-56) In unserer Studie haben wir eine Quantifizierungsmethode des Stromaödems anhand von OCT-Bildern von Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie entwickelt. Hierbei wird die optische Dichte des Stromas durch eine Analyse der Grauwerte des OCT-Bildes bestimmt. Grau-skalierte OCT-Bilder werden durch 256 verschiedene Graustufen dargestellt, wobei 0 den dunkelsten Ton und 255 den hellsten Ton abbildet. Da sich hierbei stark streuende Strukturen als hellere Grauwerte und weniger streuende Strukturen als dunklere Grauwerte darstellen, sollten sich trübere Strukturen, wie ein stromales Ödem, in helleren Grautönen präsentieren. Diese Hypothese haben wir in unserer Studie experimentell untersucht und an OCT-Bildern von Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie in einer Bildanalyse angewandt.

### 1.3.2 "Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography"

Die Arbeit „Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography“ beschäftigt sich mit der Darstellung kornealer Nerven mittels OCT.(36) Die Hornhaut-Nerven entspringen dem Nervus trigeminus und betreten als 20 µm dicke Nervenbündel die Hornhaut in der Peripherie am korneo-skleralen Limbus ungefähr 300 µm unterhalb der Hornhautoberfläche.(57) Innerhalb des ersten Millimeters nach dem Eintritt verlieren sie ihr Perineurium und ihre Myelinscheide, wodurch die Hornhauttransparenz erhalten bleibt.(58) Sie formen dort den mittleren stromalen Plexus, welcher sich in der Peripherie in der anterioren Hälfte und im Zentrum im anterioren Drittel der Hornhaut befindet.(57) Die Nerven zeigen eine hohe Verzweigungs- und Anastomosierungs-Rate; die meisten laufen zu einem weiteren sogenannten subepithelialen Plexus direkt unterhalb der Bowman-Membran zusammen.(57) Hier befinden sich zwei unterschiedlich geformte Nerven: Zum einen finden sich gerade oder leicht gekrümmte Nerven mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 4,09 µm, von denen die meisten durch die Bowman-Membran hindurchstoßen und den subbasalen Nervenplexus zwischen Bowman-Membran und Epithel formen.(57) Zum anderen gibt es geschlängelte Nerven mit einem Durchmesser von 0,24 – 3,28 µm, die hauptsächlich innerhalb des subepithelialen Plexus verbleiben und durch viele Anastomosen ein Maschenwerk bilden.(57) Der subbasale Plexus beinhaltet zahlreiche Nervenendigungen.(57) Mithilfe ihrer vielfältigen Rezeptoren können die kornealen Nerven auf thermische, chemische und mechanische Stimuli reagieren.(59, 60) Bei externer Bedrohung oder Stimulation lösen sie einen reflexartigen Lidschlag(61) und Tränenproduktion(62) aus. Zusätzlich sind sie für epitheliale Zellproliferation(63) und korneale Wundheilung(61, 64) verantwortlich.

Für die Darstellung von feinen kornealen Nerven bedarf es aufgrund ihrer geringen Größe(57) einer Bildgebungsmethode mit hoher Auflösung im einstelligen Mikrometerbereich. Mittels Konfokalmikroskopie-Bildgebung können beispielsweise die Nervenfaserdichte des subbasalen Plexus bestimmt und die Form, Anordnung und Verzweigungen der Nerven beschrieben werden.(65) Eine praktikablere Bildgebungsmethode stellt die kontaktlose OCT dar.(24) Seit einiger Zeit existieren hochauflösende OCT-Geräte, welche in Untersuchungen

korneale Nerven visualisieren konnten.(32, 66) Unsere Studie untersucht die Nervendarstellung mittels des hochauflösenden micro-OCTs. Diese ist ein neu entwickeltes, hochauflösendes Laborgerät auf Grundlage eines Spektral-domain OCTs, dessen Aufbau und hohe Auflösung bereits in anderen Studien präsentiert wurde.(67-69) Das micro-OCT verwendet eine Superkontinuum-Lichtquelle (NKT Photonics, Inc., Birkerød, Dänemark) mit einer gefilterten Wellenlänge von 650-950 nm. Es nimmt Volumendatensätze von 512 x 512 x 4096 Pixeln (entsprechend einem transversalen field of view von 1 x 1 mm) mittels einer eindimensionalen Linienkamera (Basler, Ahrensburg, Deutschland; 20 kHz; 8192 Pixel) innerhalb von 13 Sekunden auf. Bei einer Leistung von 20 mW an der Probe beträgt die Empfindlichkeit des Gerätes ~94 dB. Die axiale und transversale Auflösung beträgt im Gewebe ~1 µm beziehungsweise ~4µm.

## 2 Veröffentlichung I

### **Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography**

Christian M. Wertheimer, Carolin Elhardt, Andreas Wartak, Nikolaus Luft, Stefan Kassume, Martin Dirisamer, Jakob Siedlecki, Efstathios Vounotrypidis, Siegfried G. Priglinger, Wolfgang J. Mayer

European Journal of Ophthalmology

Angenommen zur Publikation am 3. Juli 2020

Publiziert am 22. Juli 2020

<https://doi.org/10.1177/1120672120944796>

### 3 Veröffentlichung II

#### **Stromal Nerve Imaging and Tracking Using Micro-Optical Coherence Tomography**

Carolin Elhardt, Christian M. Wertheimer, Andreas Wartak, Jie Zhao, Hui Min Leung, Stefan A. Kassumeh, Biwei Yin, Guillermo J. Tearney, Reginald Birngruber

Translational Vision Science and Technology

Angenommen zur Publikation am 12. Januar 2020

Publiziert am 15. April 2020

<https://doi.org/10.1167/tvst.9.5.6>

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei interessante neue Methoden zur Bildgebung der Hornhaut dargestellt, welche die klinische Anwendung der OCT erweitern und vielfältiger gestalten könnten. Da es sich um präklinische Studien und experimentelle Ergebnisse handelt, stehen noch zahlreiche Untersuchungen vor der Anwendung in der Klinik aus. Die Versuche hierfür sind geplant und werden teils schon durchgeführt. Sie zielen zumeist auf offene Fragen zu den Methoden, die präklinische und translationale Optimierung und die Vorbereitung auf klinische Erfahrungen ab. Die entwickelten Verfahren wurden von anderen Forschungsgruppen aufgegriffen und bereits weiterentwickelt.(70, 71) Dies deutet auf die hohe Relevanz des Themas hin.

In unserer Studie "Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography" präsentieren wir zusätzlich zu aktuell möglichen OCT-Messungen einer Hornhaut- und Descemet-Membran-Verdickung(53, 54) bei Hornhäuten mit Fuchs-Endotheldystrophie eine objektive Quantifizierung des stromalen Hornhautödems. Unsere Hypothese, dass sich trübe Strukturen, wie beispielsweise ein stromales Ödem, als hellere Grautöne darstellen, konnten wir experimentell bestärken. Hierzu wurde künstlich an enukleierten Hasenaugen mittels destillierten Wassers ein Hornhaut-Ödem induziert und die Augen mittels des Telesto-II Spectral-domain OCT im Zeitverlauf aufgenommen. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Dicke der Hornhaut und der optischen Dichte anhand der gemessenen Grauwerte im OCT-Bild im Zeitverlauf (siehe Abbildung 6 der Veröffentlichung I). Dies bekräftigte die Vermutung einer verstärkten optischen Dichte bei Schwellung der Hornhaut durch vermehrte Wasseraufnahme.

Um die Hornhaut-Veränderungen bei Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie zu untersuchen, wurden OCT-Bilder der Hornhäute von Patienten analysiert. Eingeschlossen wurden 48 Augen von 32 Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie und 33 Augen von 21 Patienten einer Kontrollgruppe ohne Hornhauterkrankung. Es wurden die Dicken der einzelnen Hornhautschichten gemessen. Weiterhin wurden optische Dichtemessungen vorgenommen, indem in einer definierten zentralen Stromaregion die Anzahl der Pixel

oberhalb eines bestimmten Grauwert-Schwellenwertes unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dicken gemessen wurden.

Die Messungen demonstrierten mehrere erkrankungstypische Merkmale bei den Patienten mit Hornhautdystrophie wie eine Verdickung der gesamten Hornhaut(53) und der Descemet-Membran(54). In fortgeschrittenem Stadium zeigten sich Mikrozysten und Bullae im Epithel und korneale Falten. Die Ergebnisse der optischen Dichtemessung zeigten korneale Veränderungen insbesondere im anterioren Stroma. Sowohl die größten mittleren Differenzen der optischen Dichten zwischen erkrankten Patienten und der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3 der Veröffentlichung I) als auch die höchsten Korrelationen zu anderen Erkrankungsmerkmalen (siehe Abbildung 4 der Veröffentlichung I) wurden bei hohen Schwellenwerten (220, 240) gefunden, sodass diese Schwellenwerte zur weiteren Analyse verwendet wurden. Wir konnten eine gute Korrelation zwischen den optischen Dichtemessungen und dem Visus zeigen (siehe Abbildung 4a und 5a der Veröffentlichung I): je höher die optische Dichte der Hornhaut desto schlechter war der Visus ( $r^2 = 0,17$ ).

Bemerkenswert war auch, dass in der Gruppe der Fuchs-Endotheldystrophie Patienten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Visus von Patienten mit Katarakt und solchen mit klarer Linse gefunden werden konnte ( $p = 0,98$ ). Im Vergleich hierzu zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Katarakt und solchen mit klarer Linse in der Kontrollgruppe ( $p = 0,002$ ).

In unserer Studie wurden korneale Veränderungen gefunden, welche besonders im anterioren Stroma lokalisiert sind. Dies ist der Bereich der Hornhaut, in dem sich bei Voranschreiten der Erkrankung Narbenbildung finden lässt.(48) Wie in IVCM Studien gezeigt wurde, können auch in frühen Stadien der Fuchs-Endotheldystrophie Veränderungen des anterioren Stromas wie beispielsweise Trübungen und erhöhte Aberrationen auftreten, selbst wenn noch keine Veränderungen in der Spaltlampenmikroskopie sichtbar sind.(72, 73) Mittels Schleimpflug-Bildgebung konnte eine vermehrte Rückstreuung sowohl der anterioren als auch der posterioren Cornea beobachtet werden.(74) Untersuchungen der Intensitäten der kornealen Schichten von IVCM-Bildern zeigten eine erhöhte Helligkeit im anterioren Stroma.(75) Wie in diesen Studien konnten auch wir eine Veränderung der anterioren Hornhaut feststellen, jedoch zeigte sich in unserer Studie keine Veränderung der posterioren

Hornhaut. Bei unseren Patienten zeigte sich der Einfluss einer Katarakt auf den Visus geringer als der Einfluss der Hornhauttrübung.

Man kann schlussfolgern, dass die Messergebnisse der optischen Dichte, welche wir mittels dieser Methode erhalten haben, gut mit anderen Erkrankungsparametern korrelieren. Demnach wäre sie geeignet, andere diagnostische Möglichkeiten bei Fuchs-Endotheldystrophie zu ergänzen, um eine genaue Diagnostik und einen geeigneten therapeutischen Ansatz festzulegen. Des Weiteren könnte sie als weiterer Parameter bei der Entscheidungsfindung für oder gegen eine operative Maßnahme, wie die Transplantationstechnik der „Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty“ (DMEK), angewendet werden. Durch ihre schnelle, kontaktlose Aufnahmemethodik wäre die OCT für diese Zwecke eine praktikable Bildgebungsmethode. Darüber hinaus würde eine Aufnahme der optischen Dichtemessung in die Gerätesoftware eine unkomplizierte Anwendung der Methode gewährleisten.

In unserer Studie „Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography“ präsentieren wir eine korneale Nervendarstellung mittels des hochauflösenden micro-OCT. Weiterhin entwickelten wir eine Möglichkeit zur dreidimensionalen Verfolgung und Abbildung dieser Nerven als Nervenskelett und verifizierten die Nerven mittels Immunhistochemie.

In experimenteller Arbeit haben wir mittels micro-OCT Bilder von Hornhäuten von Hasen aufgenommen und mit besonderem Augenmerk auf die kornealen Nerven ausgewertet. Die Bildgebung erfolgte mittels des oben beschriebenen hochauflösenden micro-OCT. Es gelang uns, Strukturen der Hornhaut in drei-dimensionalen Bildausschnitten auf einer Querschnittsfläche von 1 mm<sup>2</sup> ex-vivo darzustellen (siehe Abbildung 1 der Veröffentlichung II). Hierbei wurden insbesondere Nerven und Keratozyten identifiziert. Um mit Sicherheit Nerven von ebenfalls strangförmigen, in der Hornhaut vorhandenen Kollagenfasern abgrenzen zu können, haben wir uns zum einen auf die Einzigartigkeit der nervalen Verzweigungen(57) und zum anderen auf den Vergleich mit der  $\beta$ III-Tubulin Antikörper Nervenfärbung(76) berufen. Wir haben diese Nervenfärbung mittels  $\beta$ III-Tubulin Antikörper(76) an denselben Hornhäuten durchgeführt, welche wir zuvor mit der micro-OCT aufgenommen haben. Die Darstellung der gefärbten Hornhautnerven wurde mit einem

Konfokal-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Der Vergleich der Daten der micro-OCT mit der Fluoreszenzmikroskopie erbrachte eine eins-zu-eins Übereinstimmung der Strukturen, welche wir im micro-OCT für korneale Nerven hielten, mit den Strukturen, welche mittels Nervenfärbung identifiziert wurden (siehe Abbildung 2 der Veröffentlichung II). Demnach konnten wir mit hoher Sicherheit zeigen, dass das micro-OCT korneale Nerven darstellen kann.

Nach erfolgreicher Darstellung und Identifizierung der Nerven gelang es uns, diese in den dreidimensionalen OCT-Daten zu markieren. Dies wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ(77) mittels des halb-automatischen Tracking-Systems „Simple Neurite Tracer“(78) durchgeführt und führte zu der Entstehung eines dreidimensionalen Nerven-Skeletts (siehe Begleitmaterial der Veröffentlichung II).

Unser generiertes Nervenskelett ist im Einklang mit dem in der Literatur mittels anderer Bildgebungsmethoden ermittelten Aufbau der kornealen Nervenstrukturen(57, 65). Quantitative Auswertungen kornealer Nerven in IVCM-Bildern wurden in anderen Studien sowohl händisch als auch mittels entwickelter automatisierter Tools durchgeführt.(79-81) In unserer Studie wurde die Nerven aufgrund des Mangels an Kontrast der Nerven händisch verfolgt. Der Vergleich zwischen veröffentlichten Studien ist schwierig, da es bisher keine allgemein akzeptierte, einheitliche oder standardisierte Auswertung für die Quantifizierung und Beschreibung von Hornhautnerven gibt.(82) Abhängig von der Orientierung beziehungsweise der daraus resultierenden Sichtbarkeit der Stromalen Nerven in den einzelnen Bildern(82) und der Auflösung der verwendeten bildgebenden Geräte können sich gemessene Nervenlängen unterscheiden, sodass die gemessenen Längen variieren und nicht sicher mit der wahren in-vivo Nervenlänge übereinstimmen.(83) Um einen aussagekräftigen Vergleich von Messungen kornealer Nerven zu ermöglichen, wäre die Verwendung von einheitlichen Methoden anzustreben.(83) Zudem wäre eine zeitsparende Integration einer automatischen Analyse-Software in klinisch verfügbaren Geräten sinnvoll, um eine Anwendung dieser Methode in der Klinik zu vereinfachen.

Wie zuvor erwähnt, konnten bereits in anderen Studien vereinzelt Nerven mittels hochauflösenden OCTs dargestellt werden.(32, 66, 84) Shin et al. präsentierten eine Abbildung von Nerven eines 10 x 10 mm<sup>2</sup> großen kornealen Bereiches in-vivo mittels Fourier

domain OCT mit Kompensation von Bewegungsartefakten, konnten jedoch aufgrund ihrer langsamen Datenakquirierung und unzureichenden Auflösung nur kleine Nervenbereiche darstellen.(30) Auch Mazlin et al. gelang eine Darstellung kornealer Nerven in-vivo, wobei diese aufgrund ihrer limitierten axialen Auflösung und starken Oberflächen-Reflektionen eingeschränkt war.(85) Hosseinaee et al. präsentierten kürzlich eine Darstellung des subbasalen Nervenplexus mittels UHR SD-OCT und eine automatische Segmentierung der Nerven.(86) Der entwickelte Algorithmus konnte erfolgreich angewandt werden mit Ausnahme von Bereichen mit starken Bewegungsartefakten oder niedrigem Kontrast.(86) Bis heute wurde unseres Wissens nach jedoch noch keine Untersuchung publiziert, welche die Nervenverteilung, ein dreidimensionales Tracking und einen Vergleich mit einer Nervenfärbung durch Immunhistochemie anhand eines micro-OCTs wie in unserer Studie beschreibt.

Die Darstellung von kornealen Nerven ist von Interesse für verschiedene Fragestellungen. Sowohl erkrankungsbedingte als auch postoperative Zustände der Hornhautnerven können hiermit untersucht werden.(87-89) Vor allem für die periphere Neuropathie (PN) spielt dies eine große Rolle, bei der periphere Nerven nicht-traumatisch geschädigt werden.(90) Ursachen finden sich insbesondere im Diabetes mellitus und in hereditären, autoimmunen, infektiösen und entzündlichen Erkrankungen.(90) Beispielsweise beeinträchtigt die diabetische Neuropathie Patienten mit Diabetes mit einer Prävalenz von durchschnittlich 30%.(91) Die zahlreichen Ursachen und ihre Prävalenzen deuten auf die Relevanz einer praktikablen Nervenuntersuchung und Früherkennungsmethoden von nervaler Schädigung hin. Zusätzlich zu Nerven-Funktionstests kann eine Bildgebung aufschlussreiche Informationen über den Zustand der kornealen Nerven geben: Es zeigten sich in den Nervenuntersuchungen mittels IVCM bei Patienten mit Diabetes mellitus sowohl eine reduzierte Nervenfasernlänge(89, 92), -dichte(93), -breite(94) und Verzweigungsdichte(94) als auch eine verstärkte Schlingelung der Nerven(95). Die reduzierte Nervenfasernlänge stellte sich in Untersuchungen als überlegene Früherkennungsmethode im Vergleich zu weiteren sechs neuropathischen Tests(96) und als gute Methode, die Entwicklung der diabetischen PN vorauszusagen(97), heraus. Eine frühe Erkennung von Strukturveränderungen der Nerven kann durch eine frühzeitige Therapieanpassung die Prognose der Erkrankung verbessern.(98) Zusätzlich kann auch eine Verbesserung der glykämischen Kontrolle bei diabetischer PN

anhand einer strukturellen Erholung der Nerven erkannt werden.(99) Eine schnelle, nicht-invasive und leicht zugängliche Bildgebung, wie die Verwendung eines hochauflösenden micro-OCTs, könnte die Grundlage für ein regelmäßiges Monitoring der diabetischen Neuropathie am Auge werden. Auch bei anderen Erkrankungen spielt die Beschaffenheit der kornealen Nerven eine Rolle: Bei Patienten mit Zoster ophthalmicus konnte trotz einseitigem klinischem Befall mittels Bildgebung eine Verminderung der subbasalen Nerven an beiden Augen festgestellt werden.(100, 101) Auch postoperative Zustände beispielsweise nach refraktiven Eingriffen können zu Veränderungen der Hornhautnerven führen.(87, 102, 103) Des Weiteren kann auch die neurotrophe Keratopathie durch eine korneale Bildgebung genauer untersucht werden.(104) Sie ist gekennzeichnet durch Hornhautoberflächenveränderungen, persistierende Epitheldefekte oder Hornhautulzerationen im Rahmen einer Hornhautsensibilitätsstörung, verursacht durch eine gestörte Innervation durch den Nervus trigeminus.(88) Gründe hierfür finden sich in verschiedenen Ursachen wie Infektionen, Verätzungen, Verletzungen oder Operationen an der Hornhaut.(105) Es ist bekannt, dass die kornealen Nerven eine wichtige Rolle für die Empfindung(59, 60) der Hornhaut und die Tränenfilmproduktion(62) spielen. Diese spielen womöglich bei dem Syndrom des trockenen Auges eine Rolle, welches eine weit verbreitete Erkrankung darstellt.(83, 106) Es wurde in Studien sowohl eine Veränderung der nervalen Dichte plus vermehrte Schlängelung der Nerven bei diesen Patienten(107) als auch eine Veränderung der nervalen Schlängelung ohne Veränderung der Nervendichte(108) beschrieben.

Mittels Darstellung der Hornhautnerven können einzelne Erkrankungsdetails, Komplikationen und Nebenwirkungen abgebildet werden, die Auswirkungen auf das Hornhautnervengeflecht und die daraus resultierenden neuronalen Veränderungen gezeigt sowie der Verlauf eines Heilungsprozesses überwacht werden.(103) Eine einfach anzuwendende Routine-Bildgebung könnte sowohl für diagnostische und therapeutische Entscheidungen hilfreich sein als auch als Monitoring-Instrument und Untersuchungstool für die Nachsorge bei verschiedensten Erkrankungen angewendet werden.

Eine in-vivo Bildgebung von Hornhautnerven bringt mehrere Herausforderungen mit sich wie bereits in anderen Studien festgestellt wurde(30): Aufgrund des geringen Durchmessers der Nerven(57) muss ein hochauflösendes Verfahren verwendet werden. Weiterhin ist die

Bildauswertung auf eine scharfe Abbildung angewiesen, welche durch Bewegungsartefakte erschwert werden kann: Neben unwillkürlichen Bewegungen, Atmung und Herzschlag des Patienten(30) kann auch die okuläre Pulsamplitude, welche kleine Deformationen des Auges und des Korneoskleral-Komplexes verursacht,(109) eine Rolle spielen. Auch das Aufreißen des Tränenfilms und ein dadurch hervorgerufener Blinzelreflex des Patienten(110) kann die Bildqualität beeinträchtigen. Das micro-OCT erfüllt mit seinem kontaktlosen, nicht-invasiven, schnellen und hochauflösenden Verfahren viele Kriterien für eine in der Klinik regelmäßig anwendbare Untersuchung. Um eine in-vivo Bildgebung zu ermöglichen, müssten präzise Bewegungskorrekturen wie beziehungsweise Bildbearbeitungsalgorithmen angewandt werden(30) und die Aufnahmedauer auf eine Zeit herabgesetzt werden, welche unter der normalen Tränenfilmaufrisszeit von über 9 Sekunden(111) liegt. Falls ein größerer Bereich für eine aussagekräftige Einschätzung der kornealen Nerven notwendig ist, müsste der Aufnahmebereich erweitert werden, beispielsweise durch nacheinander folgende Messungen mit anschließendem Zusammenfügen der Bilder oder Mittelung der gemessenen Daten mehrerer Bereiche.

In beiden vorgelegten Studien dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Analysen von OCT-Daten einen großen Mehrwert für Diagnostik und gegebenenfalls Therapieentscheidungen für verschiedenste Erkrankungen liefern können.(35, 36) Die Untersuchung der Hornhaut in ihren Details mit Hilfe von OCT-Daten kann nicht nur für die Augenheilkunde, sondern aufgrund ihrer Aussagekraft über systemische Erkrankungen auch für weitere medizinische Fächer von Mehrwert sein.(96, 97) Weitere Forschung im Bereich der Hornhaut-Bildgebung mittels OCT ist notwendig, um deren Möglichkeiten verstärkt auszuschöpfen. Vermehrte software-integrierte Analysetools zur praktikablen Anwendung sowie die standardmäßige Einführung hochauflösender OCTs in der Klinik könnten eine Verbesserung der Behandlung von Patienten in Zukunft in Aussicht stellen.

## 4.1 Summary

In this work, two interesting new methods for corneal imaging were presented, which could expand and diversify the clinical application of OCT. Since these are preclinical studies and experimental results, many investigations are still pending before clinical application. Trials for this are planned and already partially performed. They mostly target open questions on methods, preclinical and translational optimization, and preparation for clinical experience. The developed methods have been taken up by other research groups and have already been further developed.(70, 71) This indicates the high relevance of the topic.

In our study "Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography" we present in addition to currently possible OCT measurements of corneal and Descemet's membrane thickening an objective quantification of corneal stromal edema in corneas with Fuchs endothelial dystrophy. We were able to experimentally confirm our hypothesis that opaque structures, such as stromal edema, appear as lighter shades of gray. For this purpose, corneal edema was artificially induced in enucleated rabbit eyes with distilled water and the eyes were imaged over time using Telesto-II spectral-domain OCT. A positive correlation between corneal thickness and optical density based on the measured gray levels in the OCT image over time was found (see Figure 6 of Publication I). This supported the assumption of increased optical density in the presence of corneal swelling due to increased water uptake.

To investigate corneal changes in patients with Fuchs endothelial dystrophy, OCT images of patients' corneas were analyzed. 48 eyes of 32 patients with mild to moderate Fuchs endothelial dystrophy and 33 eyes from a control group of 21 patients with no corneal disease were included. The thicknesses of the individual corneal layers were measured. Furthermore, optical density measurements were performed by measuring the number of pixels above a certain gray threshold in a defined central stromal region taking into account the different thicknesses.

The measurements demonstrated several disease-typical features in the patients with corneal dystrophy such as thickening of the entire cornea or Descemet's membrane.(53, 54) Advanced stages showed microcysts and bullae in the epithelium and corneal folds. The results of the

optical density measurement showed corneal changes, especially in the anterior stroma. Both the largest mean differences in optical densities between diseased patients and the control group (see Figure 3 of publication I) and the highest correlations with other disease characteristics (see Figure 4 of publication I) were found at high thresholds (220, 240), so that these were used for further analysis. We could show a good correlation between optical density measurements and visual acuity (see Figure 4a and 5a of publication I): the higher the corneal optical density the worse the visual acuity ( $r^2 = 0.17$ ).

It was also notable that in the group of Fuchs endothelial dystrophy patients no statistically significant difference could be found between the visual acuity of patients with cataract and those with clear lens ( $p = 0.98$ ). In contrast, there was a significant difference between patients with cataract and those with clear lens in the control group ( $p = 0.002$ ).

In our study, corneal changes were found which were localized in the anterior stroma. This is the area of the cornea where scarring can be found as the disease progresses.(48) As has been shown in IVCM studies, changes in the anterior stroma such as opacities and increased aberrations can also occur in early stages of Fuchs endothelial dystrophy, even when changes are not yet visible on slit lamp microscopy.(72, 73) Employing Schleimpflug imaging, increased backscattering of both the anterior and posterior corneas was observed.(74) Studies of the intensities of the corneal layers in IVCM images showed increased brightness in the anterior stroma.(75) Similarly to these studies, we were also able to detect a change in the anterior cornea, although we observed no change in the posterior cornea. In our patients, the effect of cataract on visual acuity was less than the effect of corneal opacity.

It can be concluded that the measurements of optical density that we obtained using this method correlate well with other disease parameters. Therefore, this method could complement other diagnostic options used for Fuchs endothelial dystrophy to ensure accurate diagnosis and to establish the appropriate therapeutic approach. Additionally, it could be used as another parameter in deciding for or against a surgical intervention, such as the transplantation technique "Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty" (DMEK). Due to its fast, contactless imaging methodology, OCT would be a viable imaging modality for this purpose. Furthermore, including optical density measurements in the instrument's software would ensure an uncomplicated application of the method.

In our study „Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography“, we present corneal nerve imaging employing the high resolution micro-OCT. Furthermore, we developed a method for three-dimensional tracking and depiction of these nerves as a nerve skeleton and verified these nerves using immunohistochemistry.

In experimental work, we acquired images of corneas from rabbits using micro-OCT and evaluated them with special attention to the corneal nerves. Imaging was performed using the high-resolution micro-OCT described above. We succeeded in visualizing structures of the cornea in three-dimensional image sections on a cross sectional area of 1 mm<sup>2</sup> ex-vivo (see Figure 1 of publication II). In particular, nerves and keratocytes were identified. In order to clearly differentiate between nerves and collagen fibers which are also present in the cornea as strand-like structures, we relied on the uniqueness of neural branching(57) and on comparison with the  $\beta$ III-tubulin antibody nerve staining(76). We performed this staining of the nerves using  $\beta$ III-tubulin antibody(76) on the same corneas that we had previously imaged with micro-OCT. Imaging of the stained corneal nerves was performed utilizing a confocal fluorescence microscope. Comparison of the micro-OCT data with fluorescence microscopy yielded a one-to-one conformity of the structures we considered to be corneal nerves in the micro-OCT images with the structures identified using neural staining (see Figure 2 of publication II). Therefore, we were able to demonstrate with a high degree of certainty that the micro-OCT can visualize corneal nerves.

After successful imaging and identification of the nerves, we were able to mark them in the three-dimensional OCT data. This was performed with the image processing program ImageJ(77) using the semi-automatic tracking system "Simple Neurite Tracer"(78) and resulted in the development of a three-dimensional nerve skeleton (see supplementary material of publication II).

Our generated nerve skeleton is in accordance with the structure of corneal nerves determined in the literature using other imaging methods(57, 65). Quantitative evaluations of corneal nerves in IVCM images in other studies have been performed both manually and using developed automated tools.(79-81) In our study, nerves were tracked manually due to the lack of contrast of the nerves. Comparison between published studies is difficult as there is as yet no widely accepted consistent or standardized evaluation for the quantification and

description of corneal nerves.(82) Depending on the orientation or resulting visibility of stromal nerves in the individual images(82) and the resolution of the imaging devices used, measured nerve lengths may differ, so that measured lengths vary and do not reliably correspond to the true in-vivo nerve length.(83) To establish a meaningful comparison of corneal nerve measurements, the use of a consistent methodology would be desirable.(83) In addition, time-saving integration of automated analysis software in clinically available devices would be useful to simplify the application of this methodology in the clinical setting.

As mentioned before, in other studies nerves could occasionally be visualized using high-resolution OCT.(32, 66, 84) Shin et al. presented the depiction of nerves of a 10 x 10 mm<sup>2</sup> corneal area in vivo using Fourier domain OCT with a compensation of motion artifacts, but were only able to visualize small nerve areas due to their slow data acquisition and insufficient resolution.(30) Mazlin et al. also succeeded in visualizing corneal nerves in-vivo, although this was limited due to their restricted axial resolution and strong surface reflections.(85) Hosseinaee et al. recently presented visualization of the subbasal nerve plexus using UHR SD-OCT and an automatic segmentation of the nerves.(86) The developed algorithm was successfully applied except for areas with strong motion artifacts or low contrast.(86) However, to our knowledge, no study has been published describing nerve distribution, three-dimensional tracking and comparison with nerve staining by immunohistochemistry using micro-OCT as in our study.

The visualization of corneal nerves is of interest for various reasons. Both disease-related and postoperative conditions of the corneal nerves can be studied with this technique.(87-89) This is especially important in peripheral neuropathy (PN), in which peripheral nerves are damaged non-traumatically.(90) Metabolic disorders such as diabetes mellitus are an important cause but also hereditary, autoimmune, infectious, and inflammatory diseases can be implicated. Diabetic neuropathy, for example, affects patients with diabetes with an average prevalence of 30%.(91) The numerous causes and their prevalence underline the relevance of a viable nerve examination and early detection methods of neuronal damage. In addition to nerve function tests, imaging can provide revealing information about the condition of corneal nerves: There was evidence of reduced nerve fiber length(89, 92), density(93), width(94), and branching density(94) as well as increased tortuosity of the nerves(95) in nerve examinations of patients with diabetes mellitus using IVCM. In studies, reduced nerve fiber length was

demonstrated to be a superior early detection method compared with other six neuropathic tests(96) and a good method to predict the development of diabetic PN(97). Early detection of structural changes in the nerves may improve the prognosis of the disease by early adjustment of therapy.(98) In addition, improvement in glycemic control in diabetic PN can also be detected in the structural recovery of the nerves.(99) Rapid, noninvasive, and easily accessible imaging, such as the use of a high-resolution micro-OCT, could become the basis for regular monitoring of diabetic neuropathy in the eye. The state of the corneal nerves also plays a role in other diseases: In patients with zoster ophthalmicus, a reduction of the subbasal nerves in both eyes could be detected by imaging despite only unilateral clinical involvement.(100, 101) Postoperative conditions, for example after refractive surgery, can also lead to changes in the corneal nerves.(87, 102, 103) Furthermore, neurotrophic keratopathy can also be investigated in more detail by corneal imaging.(104) It is characterized by changes in the corneal surface, persistent epithelial defects, or corneal ulcerations as part of a corneal sensitivity disorder caused by impaired innervation by the trigeminal nerve.(88) Reasons for it can be found in various causes such as infections, chemical burns, injuries, or corneal surgery.(105) It is known that the corneal nerves play an important role in corneal sensation(59, 60) and tear film production(62). They may play a role in dry eye syndrome, which is a common disease.(83, 106) Some studies of these patients have described both a change in nerve density and increased nerve tortuosity(107) while others have shown no change in nerve density and only a change in nerve tortuosity(108).

Corneal nerve imaging can map detailed disease processes, complications and side effects, showing the effects on the corneal nerve plexus and resulting neuronal changes, as well as monitoring the progression of healing.(103) Routine imaging that is easy to use could be helpful for making diagnostic and therapeutic decisions, as well as being used as a monitoring and examination tool for follow-up in various diseases.

In vivo imaging of corneal nerves brings along several challenges as has been noted in other studies(30): Due to the small diameter of the nerves(57) a high-resolution technique must be used. Furthermore, image analysis relies on sharp imaging, which can be complicated by motion artefacts: In addition to involuntary movements, respiration, and heartbeat of the patient(30), the ocular pulse amplitude, which produces small deformations of the eye and corneoscleral complex,(109) may also play a role. Tearing of the tear film and resulting

blinking reflex (110) may also impair the image quality. With its noncontact, noninvasive, rapid, and high-resolution technique, the micro-OCT meets many criteria for an examination-tool suitable for regular use in the clinic. To enable in vivo imaging, precise motion correction or image processing algorithms would have to be applied(30) and the acquisition time would have to be reduced to a time that is below the normal tear film breakup time of more than 9 seconds(111). If a larger area is necessary for a meaningful assessment of the corneal nerves, the acquisition area would have to be extended, for example by successive measurements with subsequent stitching of the images or averaging of the measured data of several areas.

In both studies presented in this work, it was shown that various analyses of OCT data can provide great added value for diagnostics and, as the circumstances require, therapy decisions for a wide variety of diseases.(35, 36) The detailed examination of the cornea using OCT data can be of added value not only for the field of ophthalmology, but also for other medical disciplines due to its informative value about systemic diseases.(96, 97) Further research in the field of corneal imaging using OCT is necessary in order to increasingly exploit its possibilities. Increased software-integrated analysis tools for practical use, as well as the standard implementation of high-resolution OCT in the clinic, could hold out the prospect of improved patient care in the future.

## 5 Darlegung des Eigenanteils an den Autorenschaften

### Veröffentlichung I

Meine Ko-Autorenschaft bei der Studie „Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography“ begründet sich folgendermaßen. Die Studie wurde teils an der Augenklinik der Universität München, teils am Wellman Center for Photomedicine in Boston (USA) durchgeführt. Aufbauend auf die Studienidee von meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang J. Mayer, eine OCT-Analyse der Hornhäute von Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie durchzuführen, wurde das Studiendesign von mir gemeinsam mit meinem Doktorarbeitsbetreuer PD Dr. Christian M. Wertheimer entworfen. Bei der Zusammentragung der OCT-Bilder der Patienten mit Fuchs-Endotheldystrophie und der Kontrollgruppe wurde ich von den anderen Ko-Autoren unterstützt. Die ergänzende Datensammlung, die Auswertung der OCT-Bilder, die statistische Auswertung sowie die Versuche des experimentellen Anteils des Papers wurden von mir durchgeführt. In Konsultation mit PD Dr. Wertheimer habe ich die gewonnenen Daten ausgewertet. Sowohl die Gestaltung des Manuskriptes als auch die Fertigung der Abbildungen wurden von PD Dr. Wertheimer und mir vorgenommen.

### Veröffentlichung II

Meine Erstautorenschaft in der Studie “Stromal nerve imaging and tracking using micro optical coherence tomography“ begründet sich folgendermaßen. Das Projekt wurde am Wellman Center for Photomedicine in Boston (USA) durchgeführt und stellte ein Kooperationsprojekt zweier Laborteams dar. Von deren Leitern und Letztautoren des Papers Prof. PhD Guillermo Tearney und Prof. Dr. phil. Nat. Dr. med. habil. Reginald Birngruber stammte die Projektidee, korneale Nerven mittels micro-OCT zu untersuchen. Prof. Tearney stellte freundlicherweise das verwendete micro-OCT zur Verfügung. Das Studienkonzept wurde von mir in Konsultation mit PD Dr. Christian M. Wertheimer, PhD Andreas Wartak und den Letztautoren entworfen. Die Versuche mittels OCT wurden von mir durchgeführt mit Unterstützung von den Postdoktoranden Andreas Wartak, Hui Min Leung und Biwei Yin bei der Bildgebung. Die Datenauswertung der OCT-Bilder und das anschließende Nerventracking

wurden auf meiner Idee beruhend von mir umgesetzt. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von mir unter Beratung der Leiterin der Pathologie PhD Jie Zhao durchgeführt, gegen Ende des Projektes unterstützt von Dr. Stefan A. Kassumeh. Von mir wurden sowohl die gewonnenen Daten in Rücksprache mit den Ko-Autoren ausgewertet als auch das Manuskript geschrieben und die konstruktiven Anmerkungen aller Ko-Autoren eingearbeitet.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AS-OCT	Vorderer-Augenabschnitts-OCT, anterior segment optical coherence tomography
BCVA	bestkorrigierte Sehschärfe, best corrected visual acuity
DMEK	Descemet's membrane endothelial keratoplasty
FCM	Fluoreszenz-Konfokalmikroskop, fluorescence confocal microscope
FECD	Fuchs-Endotheldystrophie, Fuchs endothelial corneal dystrophy
FF-OCT	Full-field OCT
FoV	Sichtfeld, field of view
IVCM	In-vivo Konfokalmikroskopie, in-vivo confocal microscopy
micro-OCT, $\mu$ OCT	micro Optische Kohärenztomographie, micro optical coherence tomography
mm	Millimeter
OCT	Optische Kohärenztomographie, optical coherence tomography
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, Phosphate-buffered saline
PN	Periphere Neuropathie, peripheral neuropathy
ROI	Interessierender Bereich, region of interest
$\mu$ m	Mikrometer

## 7 Literaturverzeichnis

1. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian journal of ophthalmology. 2018;66(2):190-4.
2. Augusteyn RC, Nankivil D, Mohamed A, Maceo B, Pierre F, Parel JM. Human ocular biometry. Experimental eye research. 2012;102:70-5.
3. Grehn F. Hornhaut. Augenheilkunde: Springer; 2019. p. 141-88.
4. Jonuscheit S, Doughty MJ, Martin R, Río-Cristóbal A, Cruikshank V, Lang S. Peripheral nasal-temporal corneal asymmetry in relation to corneal thickness: a Scheimpflug imaging study. Ophthalmic and Physiological Optics. 2015;35(1):45-51.
5. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Prog Retin Eye Res. 2015;49:1-16.
6. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. Journal of cataract and refractive surgery. 2011;37(3):588-98.
7. Murube J. Basal, reflex, and psycho-emotional tears. The ocular surface. 2009;7(2):60-6.
8. Weiss JS, Moller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivela T, et al. IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. Cornea. 2015;34(2):117-59.
9. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. The British journal of ophthalmology. 2012;96(5):614-8.
10. Martin R. Cornea and anterior eye assessment with slit lamp biomicroscopy, specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy. Indian journal of ophthalmology. 2018;66(2):195-201.
11. Cleymaet AM, Hess AM, Freeman KS. Comparison between Pentacam-HR and optical coherence tomography central corneal thickness measurements in healthy feline eyes. Vet Ophthalmol. 2016;19 Suppl 1:105-14.
12. Syed ZA, Tran JA, Jurkunas UV. Peripheral Endothelial Cell Count Is a Predictor of Disease Severity in Advanced Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. Cornea. 2017;36(10):1166-71.
13. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. The British journal of ophthalmology. 2003;87(2):225-36.
14. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. Clinical & experimental ophthalmology. 2009;37(1):100-17.
15. Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. Clinical ophthalmology (Auckland, NZ). 2008;2(2):435-45.
16. Niederer RL, McGhee CN. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. Prog Retin Eye Res. 2010;29(1):30-58.

17. Turuwhenua JT, Patel DV, McGhee CN. Fully automated montaging of laser scanning in vivo confocal microscopy images of the human corneal subbasal nerve plexus. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(4):2235-42.
18. Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18(5):553-628.
19. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5035):1178-81.
20. Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, Lin CP, Huang D, Schuman JS, et al. Micrometer-Scale Resolution Imaging of the Anterior Eye In Vivo With Optical Coherence Tomography. *Archives of Ophthalmology*. 1994;112(12):1584-9.
21. Katkar RA, Tadinada SA, Amaechi BT, Fried D. Optical Coherence Tomography. *Dent Clin North Am*. 2018;62(3):421-34.
22. Ramos JLB, Li Y, Huang D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography—a review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2009;37(1):81-9.
23. Aumann S, Donner S, Fischer J, Müller F. Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. In: Bille JF, editor. *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics*. Cham (CH): Springer Copyright 2019, The Author(s). 2019. p. 59-85.
24. Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, Chua J, Schmidl D, dos Santos VA, et al. Anterior segment optical coherence tomography. *Progress in retinal and eye research*. 2018;66:132-56.
25. Yaqoob Z, Wu J, Yang C. Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy. *Biotechniques*. 2005;39(6 Suppl):S6-13.
26. Sridhar MS, Martin R. Anterior segment optical coherence tomography for evaluation of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*. 2018;66(3):367-72.
27. Venkateswaran N, Galor A, Wang J, Karp CL. Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. *Eye and Vision*. 2018;5(1):13.
28. Ramos JL, Li Y, Huang D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography - a review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2009;37(1):81-9.
29. Eppig T, Gillner M, Langenbacher A, Seitz B, Viestenz A. [Contact free in-vivo imaging of cornea and anterior chamber of the human eye - a qualitative comparison of imaging techniques]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2011;228(12):1052-9.
30. Shin JG, Hwang HS, Eom TJ, Lee BH. In vivo three-dimensional imaging of human corneal nerves using Fourier-domain optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*. 2017;22(1):10501.

31. Dubois A, Vabre L, Boccara AC, Beaurepaire E. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Applied optics*. 2002;41(4):805-12.
32. Tan B, Hosseinaee Z, Han L, Kralj O, Sorbara L, Bizheva K. 250 kHz, 1.5 microm resolution SD-OCT for in-vivo cellular imaging of the human cornea. *Biomedical optics express*. 2018;9(12):6569-83.
33. Ang M, Konstantopoulos A, Goh G, Htoon HM, Seah X, Lwin NC, et al. Evaluation of a Micro-Optical Coherence Tomography for the Corneal Endothelium in an Animal Model. *Scientific reports*. 2016;6:29769.
34. Murthy RK, Haji S, Sambhav K, Grover S, Chalam KV. Clinical applications of spectral domain optical coherence tomography in retinal diseases. *Biomed J*. 2016;39(2):107-20.
35. Wertheimer CM, Elhardt C, Wartak A, Luft N, Kassumeh S, Dirisamer M, et al. Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography. *European Journal of Ophthalmology*. 2020:1120672120944796.
36. Elhardt C, Wertheimer CM, Wartak A, Zhao J, Leung HM, Kassumeh SA, et al. Stromal Nerve Imaging and Tracking Using Micro-Optical Coherence Tomography. *Translational Vision Science & Technology*. 2020;9(5):6-.
37. Weiss JS, Moller HU, Lisch W, Kinoshita S, Aldave AJ, Belin MW, et al. The IC3D classification of the corneal dystrophies. *Cornea*. 2008;27 Suppl 2:S1-83.
38. Bowling B. Kornea. *Kanski's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz*: Elsevier; 2017. p. 164-233.
39. Zheng T, Le Q, Hong J, Xu J. Comparison of human corneal cell density by age and corneal location: an in vivo confocal microscopy study. *BMC ophthalmology*. 2016;16(1):109.
40. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology*. 1985;92(6):759-63.
41. Hirsch M, Renard G, Faure J, Pouliquen Y. Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. *Experimental eye research*. 1976;23(4):385-97.
42. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Current eye research*. 1991;10(2):145-56.
43. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Experimental eye research*. 2012;95(1):2-7.
44. Elbaz U, Mireskandari K, Tehrani N, Shen C, Khan MS, Williams S, et al. Corneal Endothelial Cell Density in Children: Normative Data From Birth to 5 Years Old. *American journal of ophthalmology*. 2017;173:134-8.

45. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Current eye research*. 1985;4(6):671-8.
46. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1984;25(3):312-22.
47. Koh SW, Waschek JA. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(13):4085-92.
48. Adamis AP, Filatov V, Tripathi BJ. Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea. *Survey of ophthalmology*. 1993;38(2):149-68.
49. Son HS, Villarreal G, Jr., Meng H, Eberhart CG, Jun AS. On the origin of 'guttata'. *The British journal of ophthalmology*. 2014;98(9):1308-10.
50. Ayres BD, Kozak A, Patel AS, Feldmann BH, Bernfeld E, Woodward MA, et al. Fuchs' Endothelial Dystrophy 2020 [Available from: [https://eyewiki.aao.org/Fuchs%E2%80%99\\_Endothelial\\_Dystrophy](https://eyewiki.aao.org/Fuchs%E2%80%99_Endothelial_Dystrophy)].
51. Luft N, Hirschall N, Schuschitz S, Draschl P, Findl O. Comparison of 4 specular microscopes in healthy eyes and eyes with cornea guttata or corneal grafts. *Cornea*. 2015;34(4):381-6.
52. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy. *Cornea*. 1998;17(5):493-503.
53. Arnalich-Montiel F, Ortiz-Toquero S, Auladell C, Couceiro A. Accuracy of Corneal Thickness by Swept-Source Optical Coherence Tomography and Scheimpflug Camera in Virgin and Treated Fuchs Endothelial Dystrophy. *Cornea*. 2018;37(6):727-33.
54. Shousha MA, Perez VL, Wang J, Ide T, Jiao S, Chen Q, et al. Use of ultra-high-resolution optical coherence tomography to detect in vivo characteristics of Descemet's membrane in Fuchs' dystrophy. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1220-7.
55. Iovino C, Fossarello M, Giannaccare G, Pellegrini M, Braghiroli M, Demarinis G, et al. Corneal endothelium features in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy: A preliminary 3D anterior segment optical coherence tomography study. *PloS one*. 2018;13(11):e0207891.
56. Mencucci R, Favuzza E, Tartaro R, Busin M, Virgili G. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty in Fuchs' corneal endothelial dystrophy: anterior segment optical coherence tomography and in vivo confocal microscopy analysis. *BMC ophthalmology*. 2015;15:99.
57. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental eye research*. 2010;90(4):478-92.
58. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental eye research*. 2003;76(5):521-42.

59. Acosta MC, Tan ME, Belmonte C, Gallar J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(9):2063-7.
60. Tanelian DL, Beuerman RW. Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Experimental neurology*. 1984;84(1):165-78.
61. Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Experimental neurology*. 1980;69(1):196-201.
62. Mutch J. The lacrimation reflex. *The British journal of ophthalmology*. 1944;28(7):317.
63. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Experimental eye research*. 1994;59(5):597-605.
64. Araki K, Ohashi Y, Kinoshita S, Hayashi K, Kuwayama Y, Tano Y. Epithelial wound healing in the denervated cornea. *Current eye research*. 1994;13(3):203-11.
65. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*. 2001;20(4):374-84.
66. Chen S, Liu X, Wang N, Wang X, Xiong Q, Bo E, et al. Visualizing Micro-anatomical Structures of the Posterior Cornea with Micro-optical Coherence Tomography. *Scientific reports*. 2017;7(1):10752.
67. Liu L, Gardecki JA, Nadkarni SK, Toussaint JD, Yagi Y, Bouma BE, et al. Imaging the subcellular structure of human coronary atherosclerosis using micro-optical coherence tomography. *Nature medicine*. 2011;17(8):1010-4.
68. Yin B, Chu KK, Liang CP, Singh K, Reddy R, Tearney GJ.  $\mu$ OCT imaging using depth of focus extension by self-imaging wavefront division in a common-path fiber optic probe. *Optics express*. 2016;24(5):5555-64.
69. Yin B, Hyun C, Gardecki JA, Tearney GJ. Extended depth of focus for coherence-based cellular imaging. *Optica*. 2017;4(8):959-65.
70. Keidel L, Elhardt C, Hohenfellner K, Priglinger S, Schworm B, Wertheimer C, et al. Establishing an objective biomarker for corneal cystinosis using a threshold-based Spectral domain optical coherence tomography imaging algorithm. *Acta ophthalmologica*. 2020.
71. Wartak A, Schenk MS, Bühler V, Kassumeh SA, Birngruber R, Tearney GJ. Micro-optical coherence tomography for high-resolution morphologic imaging of cellular and nerval corneal microstructures. *Biomedical optics express*. 2020;11(10):5920-33.
72. Patel SV, McLaren JW. In vivo confocal microscopy of Fuchs endothelial dystrophy before and after endothelial keratoplasty. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(5):611-8.

73. Patel SV, Baratz KH, Maguire LJ, Hodge DO, McLaren JW. Anterior corneal aberrations after Descemet's stripping endothelial keratoplasty for Fuchs' endothelial dystrophy. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1522-9.
74. Wacker K, McLaren JW, Amin SR, Baratz KH, Patel SV. Corneal High-Order Aberrations and Backscatter in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Ophthalmology*. 2015;122(8):1645-52.
75. Baratz KH, McLaren JW, Maguire LJ, Patel SV. Corneal haze determined by confocal microscopy 2 years after Descemet stripping with endothelial keratoplasty for Fuchs corneal dystrophy. *Archives of ophthalmology*. 2012;130(7):868-74.
76. Jung Y, Ng JH, Keating CP, Senthil-Kumar P, Zhao J, Randolph MA, et al. Comprehensive evaluation of peripheral nerve regeneration in the acute healing phase using tissue clearing and optical microscopy in a rodent model. *PloS one*. 2014;9(4):e94054.
77. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
78. Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27(17):2453-4.
79. Sindt CW, Lay B, Bouchard H, Kern JR. Rapid image evaluation system for corneal in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2013;32(4):460-5.
80. Guimaraes P, Wigdahl J, Ruggeri A. A fast and efficient technique for the automatic tracing of corneal nerves in confocal microscopy. *Translational vision science & technology*. 2016;5(5).
81. Chin JY, Yang LWY, Ji AJS, Nubile M, Mastropasqua L, Allen JC, et al. Validation of the use of automated and manual quantitative analysis of corneal nerve plexus following refractive surgery. *Diagnostics*. 2020;10(7):493.
82. Patel DV, McGhee CN. Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: a review. *Survey of ophthalmology*. 2013;58(5):466-75.
83. Patel DV, McGhee CN. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review. *The British journal of ophthalmology*. 2009;93(7):853-60.
84. Chen Y-T, Tsai C-Y, Chiu Y-K, Hsu T-W, Chen LW, Chen W-L, et al. En face and cross-sectional corneal tomograms using sub-micron spatial resolution optical coherence tomography. *Scientific reports*. 2018;8(1):14349.
85. Mazlin V, Xiao P, Dalimier E, Grieve K, Irsch K, Sahel J-A, et al. In vivo high resolution human corneal imaging using full-field optical coherence tomography. *Biomedical optics express*. 2018;9(2):557-68.

86. Hosseinaee Z, Tan B, Kralj O, Han L, Wong A, Sorbara L, et al., editors. Fully automated corneal nerve segmentation algorithm for corneal nerves analysis from UHR-OCT images. *Ophthalmic Technologies XXIX*; 2019: International Society for Optics and Photonics.
87. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Corneal innervation and cellular changes after corneal transplantation: an in vivo confocal microscopy study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(2):621-6.
88. Messmer EM. [Clinical picture and diagnosis of neurotrophic keratopathy]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 2019;116(2):120-6.
89. Perkins BA, Lovblom LE, Bril V, Scarr D, Ostrovski I, Orszag A, et al. Corneal confocal microscopy for identification of diabetic sensorimotor polyneuropathy: a pooled multinational consortium study. *Diabetologia*. 2018;61(8):1856-61.
90. Martyn CN, Hughes RA. Epidemiology of peripheral neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997;62(4):310-8.
91. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*. 2012;11(6):521-34.
92. Hertz P, Bril V, Orszag A, Ahmed A, Ng E, Nwe P, et al. Reproducibility of in vivo corneal confocal microscopy as a novel screening test for early diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2011;28(10):1253-60.
93. Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, Müller LJ, Grönhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(10):2915-21.
94. Szalai E, Deák E, Módis L, Jr., Németh G, Berta A, Nagy A, et al. Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(3):853-8.
95. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(2):418-22.
96. Edwards K, Pritchard N, Dehghani C, Vagenas D, Russell A, Malik RA, et al. Corneal confocal microscopy best identifies the development and progression of neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2017;31(8):1325-7.
97. Pritchard N, Edwards K, Russell AW, Perkins BA, Malik RA, Efron N. Corneal confocal microscopy predicts 4-year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2015;38(4):671-5.

98. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr.* 2017;11 Suppl 1:S133-s9.
99. Jia X, Wang X, Wang X, Pan Q, Xian T, Yu X, et al. In Vivo Corneal Confocal Microscopy Detects Improvement of Corneal Nerve Parameters following Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res.* 2018;2018:8516276.
100. Cavalcanti BM, Cruzat A, Sahin A, Pavan-Langston D, Samayoa E, Hamrah P. In vivo confocal microscopy detects bilateral changes of corneal immune cells and nerves in unilateral herpes zoster ophthalmicus. *The ocular surface.* 2018;16(1):101-11.
101. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Prüss H, Zheng L, Shahatit BM, et al. Unilateral herpes zoster ophthalmicus results in bilateral corneal nerve alteration: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology.* 2013;120(1):40-7.
102. Mohamed-Noriega K, Riau AK, Lwin NC, Chaurasia SS, Tan DT, Mehta JS. Early corneal nerve damage and recovery following small incision lenticule extraction (SMILE) and laser in situ keratomileusis (LASIK). *Investigative ophthalmology & visual science.* 2014;55(3):1823-34.
103. Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2002;43(12):3660-4.
104. Fung SSM, Catapano J, Elbaz U, Zuker RM, Borschel GH, Ali A. In Vivo Confocal Microscopy Reveals Corneal Reinnervation After Treatment of Neurotrophic Keratopathy With Corneal Neurotization. *Cornea.* 2018;37(1):109-12.
105. Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye.* 2003;17(8):989-95.
106. Farrand KF, Fridman M, Stillman IO, Schaumberg DA. Prevalence of Diagnosed Dry Eye Disease in the United States Among Adults Aged 18 Years and Older. *American journal of ophthalmology.* 2017;182:90-8.
107. del Castillo JMBt, Wasfy MA, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2004;45(9):3030-5.
108. Zhang M, Chen J, Luo L, Xiao Q, Sun M, Liu Z. Altered corneal nerves in aqueous tear deficiency viewed by in vivo confocal microscopy. *Cornea.* 2005;24(7):818-24.
109. Perkins E. The ocular pulse. *Current eye research.* 1981;1(1):19-24.
110. Al-Abdulmunem M. Relation between tear breakup time and spontaneous blink rate. *International Contact Lens Clinic.* 1999;26(5):117-20.
111. Mengher LS, Pandher KS, Bron AJ. Non-invasive tear film break-up time: sensitivity and specificity. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1986;64(4):441-4.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Besonders möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Wolfgang Mayer und den Leitern der Forschungsteams Professor Dr. Dr. Reginald Birngruber und Professor Guillermo J. Tearney sowie dem Direktor der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München Professor Dr. Siegfried Priglinger danken, welche mir die Durchführung meiner Arbeit ermöglicht haben. Ein außerordentlicher Dank gebührt meinem Betreuer PD Dr. Christian Wertheimer für die hervorragende Betreuung, intensive Unterstützung und warmherzige Begleitung in jeder Phase dieser Arbeit. Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen aus der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München und dem Wellman Center for Photomedicine für die gute Zusammenarbeit und viele wertvolle Anregungen in angenehmer Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt während meines gesamten Studiums.

## 9 Publikationsliste

- **Corneal dystrophies in optical coherence tomography**  
Elhardt C, Priglinger SG, Karakolova Y, Mayer WJ, Wertheimer CM  
Der Ophthalmologe, 2018  
<https://doi.org/10.1007/s00347-018-0832-8>
- **Enhancing Rose Bengal-Photosensitized Protein Crosslinking in the Cornea**  
Wertheimer CM, Elhardt C, Kaminsky S, Pham L, Pei Q, Mendes B, Afshar S, Kochevar IE  
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2019  
<https://doi.org/10.1167/iovs.19-26604>
- **Development of a drug-eluting intraocular lens to deliver epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib for posterior capsule opacification prophylaxis**  
Kassumeh S, Kueres A, Hillenmayer A, von Studnitz A, Elhardt C, Ohlmann A, Priglinger SG, Wertheimer CM  
European Journal of Ophthalmology, 2019  
<https://doi.org/10.1177/1120672119891042>
- **Stromal nerve imaging and tracking using micro-optical coherence tomography**  
Elhardt C, Wertheimer CM, Wartak A, Zhao J, Leung HM, Kassumeh S, Yin B, Tearney GJ, Birngruber R  
Translational Vision Science and Technology, 2020  
<https://doi.org/10.1167/tvst.9.5.6>
- **Refractive Changes After Corneal Stromal Filler Injection for the Correction of Hyperopia**  
Wertheimer CM, Brandt K, Kaminsky S, Elhardt C, Kassumeh S, Pham L, Schulz-Hildebrandt H, Priglinger S, Anderson R, Birngruber R  
Translational Science 2020  
<https://doi.org/10.3928/1081597X-20200429-01>
- **Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography**

Wertheimer CM, Elhardt C, Wartak A, Luft N, Kassumeh S, Dirisamer M, Siedlecki J, Vounotrypidis E, Priglinger SG, Mayer WJ  
European Journal of Ophthalmology, 2020  
<https://doi.org/10.1177/1120672120944796>

- **Establishing an objective biomarker for corneal cystinosis using a threshold-based SD-OCT imaging algorithm**

Keidel L\*, Elhardt C\*, Hohenfellner K, Priglinger S, Schworm B, Wertheimer CM, Luft N\*\*, Priglinger C\*\* and the German Cystinosis Study Group  
\* geteilte Erstautoren; \*\* geteilte Letztautoren  
ACTA Ophthalmologica, 2020  
<https://doi.org/10.1111/aos.14569>

Vorträge / Poster

- **Description of Fuchs Endothelial dystrophy in HD optical coherence tomography with correlations to visual acuity**

Mayer WJ, Elhardt C, Siedlecki J, Priglinger SG, Wertheimer C,  
European Society of Cataract and Refractive Surgery, Lissabon, Portugal, 2017

- **Beschreibung der Fuchs Endothel-Dystrophie in der High Definition-Cornea OCT mit Korrelationen zur bestkorrigierten Sehschärfe**

Mayer WJ, Wertheimer CM, Elhardt C, Siedlecki J, Luft N, Dirisamer M, Priglinger SG  
Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Berlin, Deutschland, 2017

- **Corneal nerves in micro optical coherence tomography**

Elhardt C, Wertheimer CM, Leung HM, Sharma G, Singh K, Zhao J, Tearney GJ, Birngruber R  
European Society of Cataract and Refractive Surgery, Wien, Österreich, 2018

- **Enhancing Rose Bengal photosensitized protein crosslinking in cornea**

Wertheimer CM, Elhardt C, Kaminsky S, Afshar S, Kochevar I  
European Society of Cataract and Refractive Surgery, Wien, Österreich, 2018

- **Hornhautdystrophien in der Optischen Kohärenztomographie**  
Elhardt C, Priglinger SG, Karakolova Y, Mayer WJ, Wertheimer CM  
 Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bonn, Deutschland, 2018
- **Corneal nerves in micro optical coherence tomography**  
Elhardt C, Wertheimer CM, Leung HM, Sharma G., Singh K, Zhao J, Tearney GJ,  
 Birngruber R  
 Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bonn, Deutschland, 2018
- **Enhancing Rose Bengal photosensitized protein crosslinking in cornea**  
Wertheimer CM, Elhardt C, Kaminsky S, Afshar S, Kochevar I  
 Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bonn, Deutschland, 2018
- **Chirurgische Korrektur der Hyperopie durch Injektion von Füllermaterial in die Kornea**  
Wertheimer CM, Kaminsky S, Brandt K, Elhardt C, Fuchs C, Schulz-Hildebrandt H, Linh  
 Pham, Anderson R, Birngruber R  
 Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Berlin, Deutschland, 2019
- **Femtosecond laser assisted corneal stromal filler injection for the correction of hyperopia**  
Wertheimer CM, Kassumeh S, Brandt K, Elhardt C, Fuchs C, Schulz-Hildebrandt H, Pham  
 L, Anderson R, Birngruber R  
 SPIE, The international society for optics and photonics, San Francisco, Kalifornien, 2019
- **Femtosecond laser assisted corneal stromal filler injection for the correction of hyperopia**  
Wertheimer CM, Kaminsky S, Brandt K, Elhardt C, Fuchs C, Schulz-Hildebrandt H, Pham L,  
 Anderson R, Birngruber R  
 ESCRS, Paris, Frankreich, 2019
- **Investigating corneal nerve structures using micro optical coherence tomography**  
Wartak A, Elhardt C, Wertheimer CM, Zhao J, Leung HM, Yin B, Kassumeh S, Schenk MS,  
 Tearney GJ, Birngruber R  
 SPIE, The international society for optics and photonics, San Francisco, USA, 2020