

Aus der Klinik für Augenheilkunde
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. S. Grisanti

Analyse der Gefäßperfusion des hinteren Augenpols
mittels optischer Kohärenztomographie Angiographie:
Einfluss von Segmentierung und Tageszeit.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Fynn Sebastian Siegfried
aus Lübeck

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Mahdy Ranjbar
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Julia Welzel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2021
Zum Druck genehmigt: 29.01.2021

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe. Textabschnitte und Zitate, welche ich wörtlich oder inhaltlich übernommen habe, wurden von mir nach bestem Wissen und Gewissen als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt, diese Dissertation vorgelegt oder mich einem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck, den 11.01.2021

Fynn Sebastian Siegfried

Inhaltsverzeichnis

Versicherung an Eides statt	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Methoden	3
3 Publikationen	6
3.1 Publikation 1: Einfluss der Segmentierung auf die FAZ bei gesunden Probanden	6
3.1.1 Ergebnisse	7
3.1.2 Schlussfolgerung	7
3.2 Publikation 2: Einfluss der Tageszeit auf die Aderhautperfusion bei gesunden Probanden	8
3.2.1 Ergebnisse	8
3.2.2 Schlussfolgerung	11
3.3 Publikation 3: Einfluss der Tageszeit auf die Aderhautperfusion bei Probanden mit epiretinaler Gliose	12
3.3.1 Ergebnisse	12
3.3.2 Schlussfolgerung	13
4 Diskussion	14
5 Zusammenfassung und Ausblick	21
6 Anhang	22
7 Danksagungen	44
8 Lebenslauf	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Automatische und manuelle Segmentierungsgrenzen.	4
Abbildung 2: OCTA-Bilder vom jeweiligen Netzhautplexus	4
Abbildung 3: Tageszeitabhängige Schwankungen bei Gesunden.....	9
Abbildung 4: Geschlechtsspezifische tageszeitliche Schwankungen bei Gesunden.....	10
Abbildung 5: Altersabhängige tageszeitliche Schwankungen bei Gesunden	11
Abbildung 6: Tageszeitliche Schwankungen bei Probanden mit epiretinaler Gliose	13

Abkürzungsverzeichnis

B

BM Bruch's Membrane

BCVA Best-Corrected Visual Acuity

C

CCC Concordance Correlation
Coefficient

CCP Choriocapillaris Perfusion

CRT Central Retinal Thickness

D

DCP Deep Capillary Plexus

E

EDI-OCT Enhanced Depth Imaging
Optical Coherence Tomography

F

FA Fluorescence Angiography

FAZ Foveal Avascular Zone

G

GCL Ganglion Cell Layer

H

HLP Haller's Layer Perfusion

I

ILM Inner Limiting Membrane

IOP Intraocular Pressure

IPL Inner Plexiform Layer

L

LDF Laser Doppler Flowmetry

logMAR Logarithm of the Minimum
Angle of Resolution

LSFG Laser Speckle Flowgraphy

M

MAP Mean Arterial Pressure

O

OCTA Optical Coherence Tomography
Angiography

OPL Outer Plexiform Layer

S

SCP Superficial Capillary Plexus

SD-OCT Spectral Domain Optical
Coherence Tomography

SFCT Subfoveal Choroidal Thickness

SLP Sattler's Layer Perfusion

V

VEGF Vascular Endothelial Growth
Factor

1 Einleitung

Die Netzhaut (Retina) spielt eine entscheidende Rolle für das menschliche Sehen. Sie besteht aus zehn Schichten und ist Teil des zentralen Nervensystems. Die enthaltenen Photorezeptoren ermöglichen die Sinneswahrnehmung von Lichtreizen und die Fovea, mittig der Makula, ist wesentlich für das scharfe Sehen verantwortlich. Veränderungen in ihren Strukturen können zu erheblicher Beeinträchtigung des Sehvermögens führen. Ebenso wichtig ist die unter der Netzhaut liegende Aderhaut (Choroidea). Sie dient der Nährstoffversorgung der äußeren Netzhaut und hat zudem thermoregulatorische Eigenschaften. Für ihre Funktion ist eine reguläre Perfusion der Choroidea essenziell. Es ist also von erheblicher physiologischer und pathophysiologischer Relevanz, eine möglichst detailreiche und präzise Übersicht der genannten Strukturen zu erhalten, um frühzeitig Veränderungen und Erkrankungen zu diagnostizieren und damit langfristig ein intaktes, gesundes Sehen zu ermöglichen.

In einer alternden Bevölkerung ist es mit zunehmender Prävalenz von Augenerkrankungen von großer Wichtigkeit, schnellere und nichtinvasive Verfahren zur Diagnostik von Augenerkrankungen zu entwickeln. Die Basis dieser Arbeit stellt daher die klinische Diagnostik des hinteren Augenpols mittels Optischer Kohärenztomographie Angiographie (OCTA) dar. Dieses neue Verfahren ermöglicht eine nichtinvasive, in vivo Darstellung der retinalen sowie choroidalen Perfusion und ergänzt damit die zurzeit noch weit verbreitete, teils risikobehaftete, invasive Fluoreszenz-Angiographie (FA).

Die OCTA nutzt dazu die Interferenz, die bei der Überlagerung von Referenzlicht und rückgestreutem Licht in einem Interferometer entsteht, um das axiale Tiefenprofil der Netzhaut zu erhalten. Das Blut dient dabei als intrinsisches Kontrastmittel und ermöglicht das Reflexverhalten von Bewegungen in einer statischen Umgebung zu detektieren und zu analysieren, um anschließend ein dreidimensionales Modell der Gefäße zu rekonstruieren. Die Segmentierung der erfassten Volumenscans ermöglicht so eine exakte Lokalisation vaskulärer Veränderungen. Aus diesem Grund ist eine korrekte Segmentierung der Gefäßplexus der Netzhaut und der einzelnen Gefäßschichten der Aderhaut bei der Interpretation von OCTA-Untersuchungen von großer Bedeutung. Ebenso wichtig scheint die Tageszeit der Untersuchung zu sein. Nur durch eine einheitliche und korrekte Datenerhebung lassen sich Ergebnisse der OCTA-Analysen vergleichen und diese als Biomarker heranziehen.

In den drei vorliegenden Arbeiten wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf Ergebnisse der OCTA untersucht. Es erfolgte zum einen die Evaluierung der Segmentierung und zum anderen wurde die Chronobiologie der Perfusion bei gesunden sowie an Patienten mit epiretinaler Gliose (ERM) untersucht.

Die foveoläre avaskuläre Zone (FAZ) stellt bereits jetzt einen Biomarker dar. Größenveränderung der FAZ konnten in vorhergehenden Studien mit mikrovaskulären Veränderungen in Verbindung gebracht werden. So kann bei Diabetikern dieser Marker zur Beurteilung der Sehprognose herangezogen werden.

Nachweislich beeinflussen verschiedene Faktoren die Durchblutung der Aderhaut. Ein Zusammenhang bezüglich der Aderhautdicke sowie deren Perfusion bei Augenerkrankungen, wie zum Beispiel der diabetischen Retinopathie oder der altersabhängigen Makuladegeneration, wurde bereits von diversen Arbeitsgruppen belegt. Die subfoveale Aderhautdicke (SFCT) kann sogar als Prädiktor für den Therapieerfolg bei unterschiedlichen Augenerkrankungen herangezogen werden, weshalb sie immer mehr in den Fokus aktueller Forschungen gelangt. Die choroidalen Unterschichten (Choriokapillaris, Sattler- und Haller-Schicht) sind bislang noch wenig erforscht.

2 Methoden

Die Rekrutierung von Probanden für die Studie erfolgte an der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck, auf Grundlage des Ethikvotums 17-008. Alle Probanden wurden im Rahmen eines stationären Aufenthaltes in unserer Klinik untersucht. Für den Einschluss in die Studie durfte die Sphäre max. ± 3 Dioptrien und der Zylinder max. ± 1 Dioptrien betragen. Des Weiteren wurde bei den Probanden mit gesunden Augen ein Visus von mindestens 80% vorausgesetzt. In der Gliose-Gruppe wurden nur Augen mit idiopathischer symptomatischer Gliose eingeschlossen, welche bereits im Vorfeld klinisch sowie durch SD-OCT diagnostiziert waren. Jegliche andere Augen-, Herz- und Gefäßerkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus führten zum Ausschluss aus der Studie um mögliche Confounder zu minimieren.

Bei allen Probanden wurde im Rahmen der Basisuntersuchung der Blutdruck, die Refraktion, der Visus (BCVA) und der intraokuläre Druck (IOP) erhoben. Der Visus wurde in logMAR umgerechnet und aus den erhobenen Blutdruckwerten der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) ermittelt ($2/3$ diastolischer Druck plus $1/3$ systolischer Druck). Zudem wurde jedes Auge spaltlampenmikroskopisch und funduskopisch untersucht um Rückschlüsse auf etwaige andere Augenerkrankungen zu erhalten. Die SFCT wurde mit der EDI-OCT und die retinale sowie choroidale Perfusion mit der OCTA gemessen. Hierzu erfolgten vier über den Tag verteilte Untersuchungen am HS 100 (Canon, Tokyo, Japan) OCT/OCTA-Gerät, um ein Tagesprofil erstellen zu können. Die erste Untersuchung erfolgte am Tag der stationären Aufnahme um 12 Uhr, die zweite Messung um 16 Uhr, die dritte um 20 Uhr und die vierte am Folgetag um 7 Uhr morgens. Alle Aufnahmen wurden ohne vorherige medikamentöse Pupillenweitstellung durchgeführt.

Vom hinteren Augenpol wurden EDI-OCT Aufnahmen ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) und OCTA Aufnahmen ($3 \times 3 \text{ mm}^2$ und $5 \times 5 \text{ mm}^2$) gemacht. Nur Bilder mit guter Bildqualität ($> 7/10$) und ohne Bewegungsartefakte wurden zur Auswertung herangezogen, um eine standardisierte Analyse zu gewährleisten. Für die Vermessungen der FAZ wurden OCTA-Aufnahmen entweder automatisch vom integrierten Segmentierungsalgorithmus (AS) oder manuell (MS) nach den anatomischen Empfehlungen von Spaide und Curcio segmentiert (Abbildung 1).

	Reference	Vascular plexus	Slab boundary	Anatomic basis	Offset ^a (µm)
Automatically segmented (AS)	Angio eXpert V2.0	Superficial	Top	ILM	+50
			Bottom	GCL	
		Deep	Bottom	IPL	
			Bottom	OPL	
Manually segmented (MS)	Spaide and Curcio	Superficial	Top	ILM	-10
			Middle	IPL	
		Deep	Bottom	IPL	
			Top	OPL	

Abbildung 1: Automatische und manuelle Segmentierungsgrenzen: Offset gibt die Anzahl an Mikrometern unter (+) oder über (-) der anatomischen Struktur an.

Die im Programm hinterlegte Segmentierung des oberflächlichen Netzhautplexus (SCP) liegt zwischen der inneren Grenzmembran (ILM) und der Ganglienzellschicht (GCL) + 50 µm in der Tiefe. Die manuelle Segmentierung liegt zwischen der ILM und der inneren plexiformen Schicht (IPL). Die im Programm hinterlegte Begrenzung des tiefen Netzhautplexus (DCP) liegt zwischen der IPL und der äußeren plexiformen Schicht (OPL), die manuelle Begrenzung liegt zwischen der IPL -10 µm und der OPL +10 µm. Die Fläche der FAZ wurde ebenfalls manuell von zwei verblindeten Untersuchern mit Hilfe des im Programm integrierten Kalipars ausgemessen. Nachdem die gefäßfreie Fläche vollständig umrandet wurde, errechnete das Programm automatisch die Fläche in Quadratmillimetern (Abbildung 2).

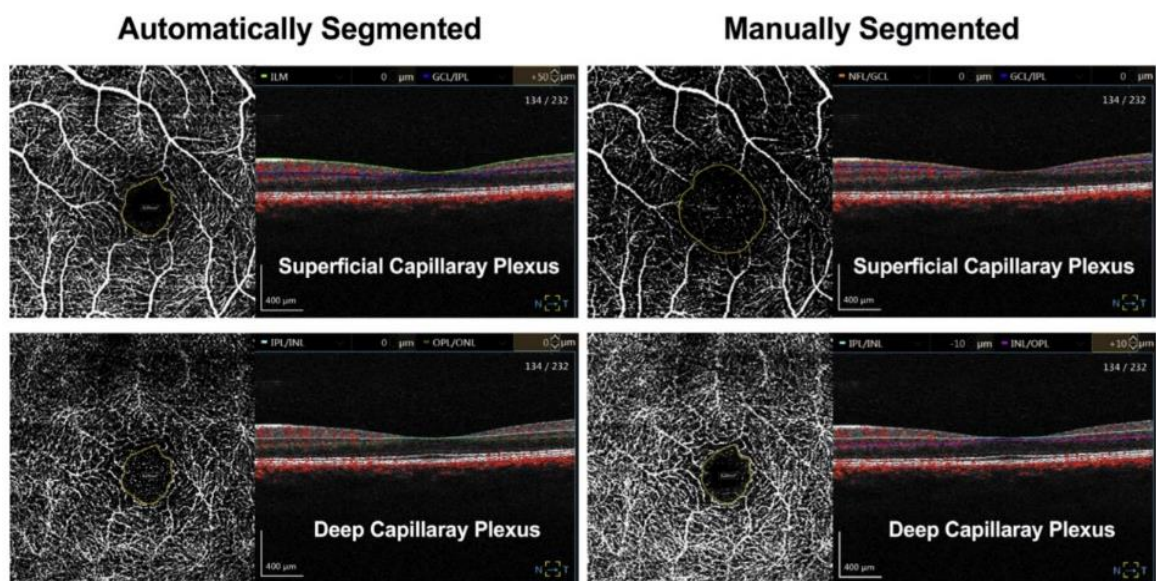


Abbildung 2: OCTA-Bilder vom jeweiligen Netzhautplexus basierend auf beschriebener Schichtsegmentierung

Die SFCT wurde auf Grundlage von EDI-OCT Bildern ebenfalls manuell vermessen, indem direkt unterhalb der Fovea die Strecke zwischen der Bruch-Membran (BM) und dem Skleralsporn gemessen wurde. Diese Auswertung erfolgte durch zwei verblindete Ärzte und der Mittelwert beider Ergebnisse wurde verwendet. Im Anschluss wurden die OCTA-Bilder der Netzhaut sowie der einzelnen Aderhautgewebe (Choriokapillaris, Sattler- und Haller-Schicht) in das Programm ImageJ (NIH, Version 1.48b, Bethesda, USA) exportiert und nach der Otsu Methode binarisiert, um den prozentualen Anteil von weißen und schwarzen Pixeln im jeweiligen Bild zu ermitteln. Die choriokapillare Perfusion (CCP) wird durch weiße Pixel, die Perfusion der Sattler-Schicht (SLP) und der Haller-Schicht (HLP) durch schwarze Pixel dargestellt. Das binarisierte Bild gibt somit indirekt die Gefäßdichte wieder.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS (Version 24.0, Chicago, IL, USA) und Prism GraphPad (Version 8.0, La Jolla, CA, USA). Wir untersuchten den Einfluss der Segmentierungen auf die Ausdehnung der FAZ in den beiden Gefäßplexus der Netzhaut, sowie dessen Abhängigkeit von Alter und Geschlecht in gesunden Probanden. Zudem wurde die Abhängigkeit der Aderhautperfusion von der Tageszeit in gesunden sowie an Gliose erkrankten Augen untersucht. Für alle Testverfahren galt das Signifikanzniveau von 5%.

3 Publikationen

1. Rommel F, Siegfried F, Kurz M, Brinkmann MP, Rothe M, Rudolf M, Grisanti S, Ranjbar M: *“Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults.” J Curr Ophthalmol. 2018 Jun;30(2): 156-60.*

2. Siegfried F, Rommel F, Rothe M, Brinkmann MP, Sochurek JAM, Freitag J, Grisanti S, Ranjbar M: *“Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography.” ACTA Ophthalmol. (2019) 97(8), e1062-e1068*

3. Rommel F, Siegfried F, Sochurek JAM, Rothe M, Brinkmann MP, Kurz M, Prasuhn M, Grisanti S, Ranjbar M: *“Mapping diurnal variations in choroidal sublayer perfusion in patients with idiopathic epiretinal membrane: an optical coherence tomography angiography study.” Int J Retina Vitreous (2019) 5:12.*

3.1 Publikation 1: Einfluss der Segmentierung auf die FAZ bei gesunden Probanden

Rommel F, Siegfried F, Kurz M, Brinkmann MP, Rothe M, Rudolf M, Grisanti S, Ranjbar M: *“Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults.” J Curr Ophthalmol. 2018 Jun;30(2): 156-60.*

Größenveränderungen der FAZ können auf Mikrozirkulationsstörungen in der Fovea hinweisen und so als Biomarker für ischämische Augenerkrankungen wie der diabetischen Retinopathie dienen. In dieser Publikation wurde der Einfluss unterschiedlicher Segmentierungen der einzelnen Netzhautschichten auf die Ausdehnung der FAZ untersucht.

3.1.1 Ergebnisse

Die FAZ des automatisch segmentierten DCP war signifikant größer als die des SCP ($p = 0,027$). Manuell segmentiert war die FAZ des SCP signifikant größer als die des DCP ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse der FAZ zeigten unter Berücksichtigung zweier, unabhängiger Vermessungen, dass die größte Übereinstimmung in dem automatisch segmentierten SCP und die niedrigste Übereinstimmung in dem manuell segmentierten SCP vorlag. Des Weiteren ergab die Analyse eine positive Korrelation der FAZ zwischen dem automatisch segmentierten DCP und SCP ($R = 0,88$; $p < 0,01$) sowie eine positive Korrelation zwischen dem manuell segmentierten DCP und SCP ($R = 0,61$; $p < 0,01$) des gleichen Auges.

Ebenfalls war eine positive Korrelation der FAZ zwischen den jeweiligen automatisch und manuell segmentierten SCP ($R = 0,63$; $p < 0,01$) und auch jeweils zwischen den automatisch und manuell segmentierten DCP ($R = 0,80$; $p < 0,01$) vorhanden. Im Hinblick auf die zentrale Netzhautdicke zeigten alle FAZ-Vermessungen eine signifikante negative Korrelation ($p < 0,01$).

Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine Zunahme der FAZ im manuell segmentierten ($R = 0,69$; $p = 0,04$) und im automatisch segmentierten ($R = 0,74$; $p = 0,03$) DCP mit steigendem Lebensalter. Geschlechtsdifferenzierend konnte bei Frauen unabhängig von der Segmentierung ($p < 0,01$) eine signifikant größere FAZ im oberflächlichen und im tiefen Plexus festgestellt werden.

3.1.2 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die korrekte anatomische Schichtsegmentation eine bedeutende Auswirkung auf die FAZ-Vermessung hat. Da kein einheitlicher, etablierter Bewertungsmaßstab existiert, ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Studien und Geräten nur begrenzt möglich. Um die Dimensionen der FAZ studienübergreifend zu vergleichen, ist zukünftig auf eine einheitliche Segmentierung zu achten.

3.2 Publikation 2: Einfluss der Tageszeit auf die Aderhautperfusion bei gesunden Probanden

Siegfried F, Rommel F, Rothe M, Brinkmann MP, Sochurek JAM, Freitag J, Grisanti S, Ranjbar M.: *“Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography.” ACTA Ophthalmol. (2019) 97(8), e1062-e1068*

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss der Tageszeit auf die physiologische Perfusion der einzelnen Aderhautschichten. Die nichtinvasive OCTA ermöglicht erstmals repetitive Perfusionsanalysen ohne Gefahr von Nebenwirkungen, sodass Patienten mit gesunden Augen wiederholt, zu unterschiedlichen Tageszeiten untersucht werden konnten, um signifikante Perfusionsschwankungen der Aderhaut zu detektieren.

3.2.1 Ergebnisse

Die Analyse zeigt signifikante tageszeitliche Veränderungen (Abbildung 3). Univariate Tests demonstrierten signifikante tageszeitabhängige Schwankungen im MAP ($p < 0,001$), der SFCT ($p < 0,001$) sowie der SLP ($p = 0,009$) und HLP ($p = 0,003$). Der höchste MAP wurde nachmittags gemessen ($99,91 \pm 7,44$ mmHg) und erreichte zur abendlichen Messung den niedrigsten Wert ($93,27 \pm 7,94$ mmHg). Die SFCT war morgens am dicksten ($348,18 \pm 78,71$ μm) und wurde gen Abend stetig dünner ($310,05 \pm 74,33$ μm). Die SLP und die HLP hatten jeweils den niedrigsten Wert morgens ($64,23 \pm 5,43$ %; $75,55 \pm 6,97$ %) und den höchsten Wert nachmittags ($66,08 \pm 5,64$ %; $77,35 \pm 6,06$ %). Die CCP und der IOP hingegen wiesen keine signifikanten Schwankungen über den Tag auf. Veränderungen des MAP führten zu signifikanten Veränderungen der HLP ($p = 0,047$). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem MAP und der SFCT sowie der CCP und der SLP nachgewiesen werden.

Betrachtet man beide Geschlechter getrennt, zeigte die Analyse sowohl für Männer als auch für Frauen tageszeitabhängige Schwankungen in dem MAP ($p = 0,001$), der SFCT ($p = 0,001$), der SLP ($p = 0,012$) und HLP ($p = 0,004$), aber nicht für die CCP und den IOP (Abbildung 4). Die durchschnittliche SFCT bei Frauen und Männern war ähnlich ($329,4 \pm 17,48$ μm vs. $325,1 \pm 15,47$ μm ; $p = 0,894$) und unterschied sich in ihrer tageszeitlichen Amplitude (40 μm vs. 37 μm ; $p = 0,252$) nicht signifikant voneinander. Es gab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen dem MAP bei Frauen und Männern

($95,81 \pm 2,76$ mmHg vs. $97,50 \pm 4,28$ mmHg; $p = 0,510$). Beide Gruppen zeigten ähnliche Schwankungen und keinen signifikanten Unterschied ($6,2$ mmHg vs. $7,6$ mmHg; $p = 0,463$).

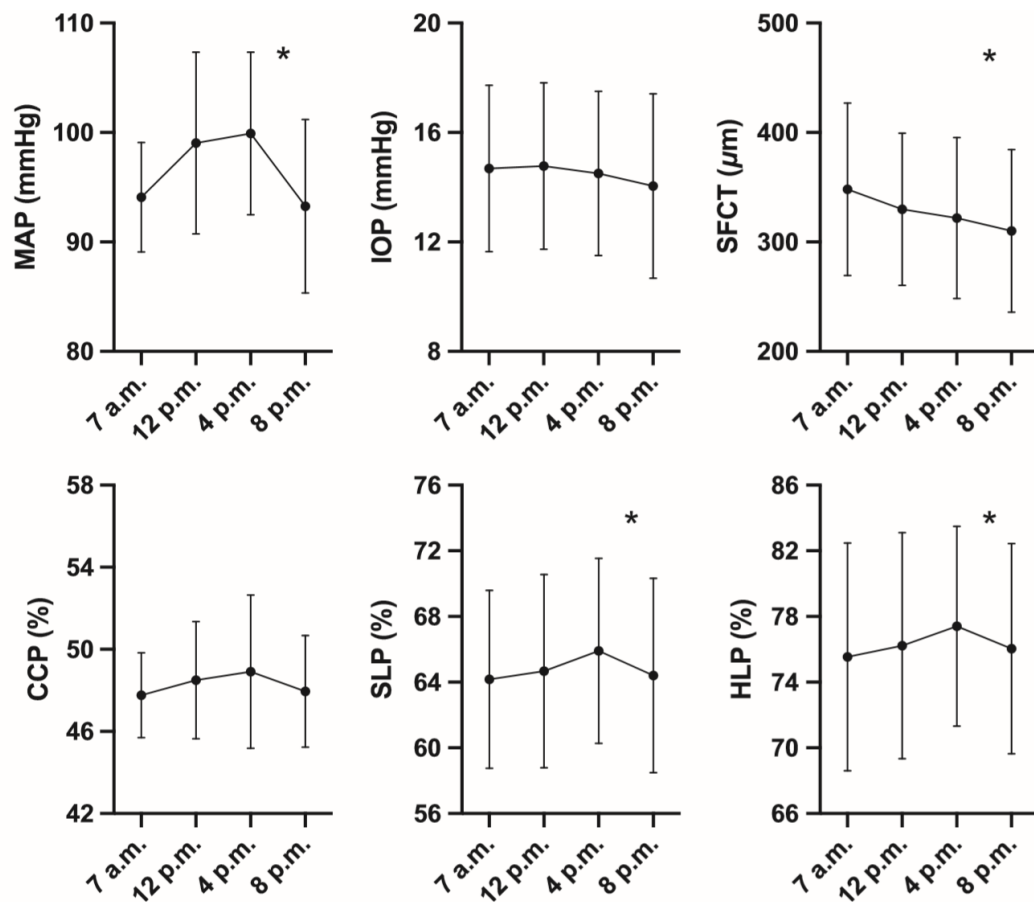


Abbildung 3: Tageszeitabhängige Schwankungen im mittleren arteriellen Druck (MAP), im intraokulären Druck (IOP), der Aderhautdicke (SFCT), der choriokapillären Perfusion (CCP) sowie der Perfusion von Sattler-Schicht (SLP) und Haller-Schicht (HLP). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Signifikante Schwankungen sind mit einem * markiert.

Die SLP zeigte ebenfalls keinen geschlechtsspezifischen signifikanten Unterschied ($64,67 \pm 0,09$ % vs. $64,95 \pm 0,07$ %; $p = 0,908$). Die tageszeitabhängigen Schwankungen waren vergleichbar und nicht signifikant verschieden ($2,2$ % vs. $1,5$ %; $p = 0,495$). Die HLP bei Frauen und Männern verhielt sich ähnlich zu der SLP ($75,50 \pm 0,9$ % vs. $77,28 \pm 0,6$ %; $p = 0,534$), sowie auch deren tageszeitabhängigen Schwankungen ($2,2$ % vs. $1,4$ %; $p = 0,658$). Beide wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

Teilt man die Probanden anhand ihres Alters in zwei Gruppen (< 60 Jahre und ≥ 60 Jahre) ein, konnte ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Tagesschwankungen festgestellt werden (Abbildung 5). Die Patientengruppe ≥ 60 Jahre verzeichnete geringere Schwankungen über den Tag als die jüngere Patientengruppe ($p = 0,001$).

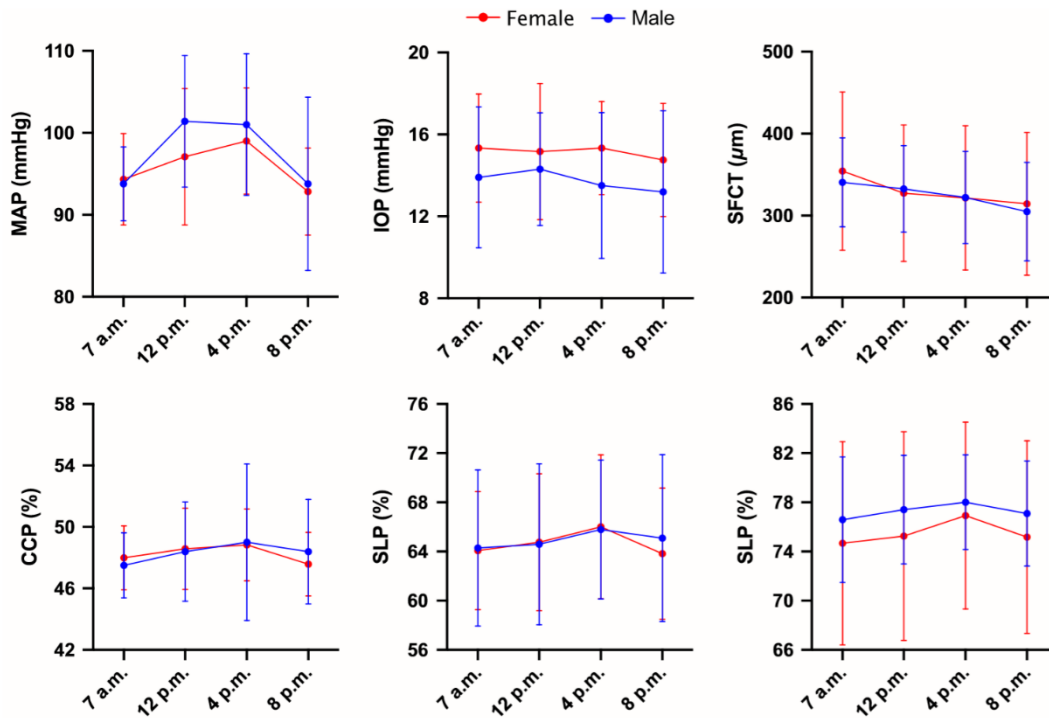


Abbildung 4: Geschlechtsspezifische tageszeitliche Schwankungen im mittleren arteriellen Druck (MAP), im intraokulären Druck (IOP), der Aderhautdicke (SFCT), der choriokapillären Perfusion (CCP), sowie der Perfusion von Sattler-Schicht (SLP) und Haller-Schicht (HLP). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Es gab keine signifikanten geschlechtsbezogenen Unterschiede.

Univariate Tests zeigten, dass die jüngere Gruppe signifikante tageszeitabhängige Veränderungen im MAP ($p = 0,030$), der SFCT ($p = 0,006$), SLP ($p = 0,025$) und HLP ($p = 0,034$) hatte. Die Patientengruppe ≥ 60 Jahre zeigte jedoch nur in dem MAP ($p = 0,001$) und der SFCT ($p = 0,003$) signifikante Schwankungen. Die durchschnittliche SFCT war bei den jüngeren Teilnehmern deutlich dicker ($380,00 \mu\text{m} \pm 16,89 \mu\text{m}$ vs. $275,00 \mu\text{m} \pm 15,45 \mu\text{m}$; $p < 0,001$), während die tageszeitabhängigen Schwankungen beider Altersgruppen ähnlich waren ($40 \mu\text{m}$ vs. $36 \mu\text{m}$; $p = 0,754$). Der durchschnittliche MAP war in beiden Gruppen vergleichbar und unterschied sich nicht signifikant ($95,36 \text{ mmHg} \pm 2,84 \text{ mmHg}$ vs. $97,80 \pm 4,67 \text{ mmHg}$; $p = 0,338$). Jedoch zeigte die Gruppe der älteren Probanden eine signifikant größere Schwankung (7 mmHg vs. 11 mmHg ; $p = 0,026$). Die jüngere Patientengruppe zeigte einen signifikant größeren Durchschnittswert in der HLP ($79,75 \pm 1,1 \%$ vs. $72,86 \pm 0,6 \%$; $p = 0,009$). In der SLP ($66,55 \pm 1,1 \%$ vs. $63,05 \pm 0,5 \%$; $p = 0,140$) und der CCP ($49,11 \pm 0,9 \%$ vs. $47,45 \pm 0,4 \%$; $p = 0,112$) waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen nachweisbar. Teilnehmer, die jünger als 60 Jahre alt waren, zeigten in der SLP und HLP signifikante tageszeitabhängige Schwankungen mit durchschnittlichen Amplituden von $2,5 \%$ und $2,2 \%$.

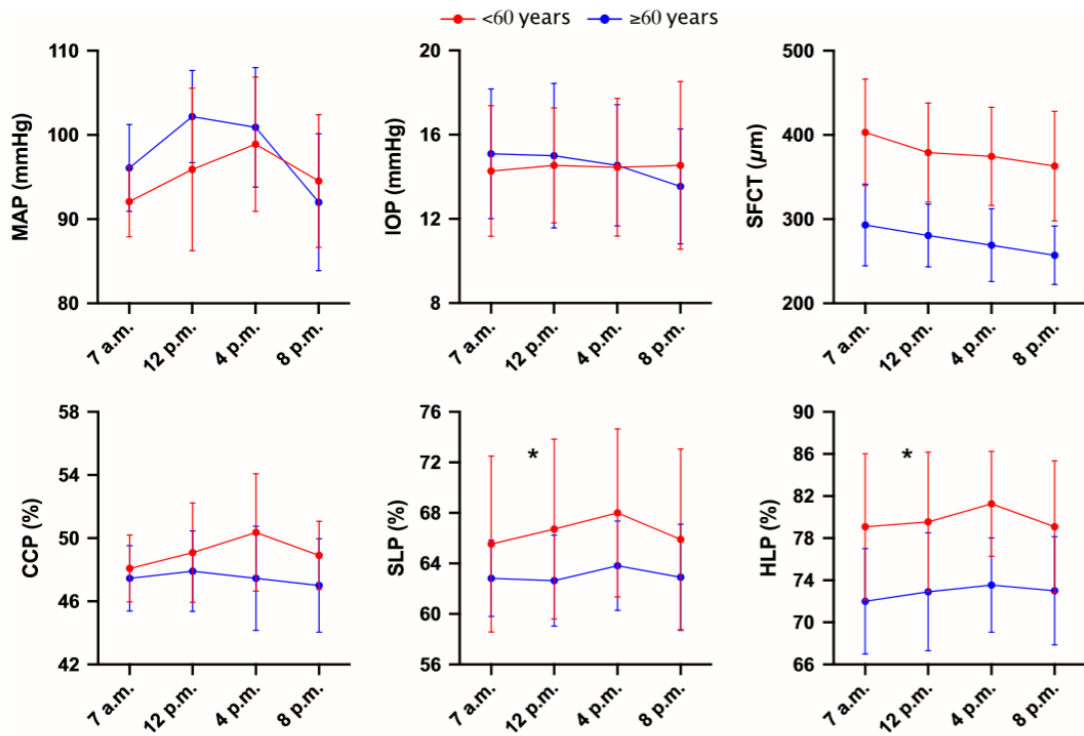


Abbildung 5: Altersabhängige tageszeitliche Schwankungen im mittleren arteriellen Druck (MAP), im intraokulären Druck (IOP), der Aderhautdicke (SFCT), der choriokapillären Perfusion (CCP), sowie der Perfusion von Sattler-Schicht (SLP) und Haller-Schicht (HLP). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Signifikante Schwankungen sind mit einem * markiert.

3.2.2 Schlussfolgerung

Die Studie bestätigt und erweitert vorhergehende Untersuchungen der choroidalen tageszeitabhängigen Veränderungen. Es konnten hier bedeutsame unterschiedliche tageszeitabhängige Veränderungen in der SFCT, der SLP und der HLP belegt werden. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen Männern und Frauen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings hat das Lebensalter einen signifikanten Einfluss auf die tageszeitabhängigen Schwankungen. Beim Vergleich von longitudinalen OCTA-Daten ist die Berücksichtigung der Tageszeit bei der Messung somit von großer Bedeutung.

3.3 Publikation 3: Einfluss der Tageszeit auf die Aderhautperfusion bei Probanden mit epiretinaler Gliose

Rommel F, Siegfried F, Sochurek JAM, Rothe M, Brinkmann MP, Kurz M, Prasuhn M, Grisanti S, Ranjbar M.: *“Mapping diurnal variations in choroidal sublayer perfusion in patients with idiopathic epiretinal membrane: an optical coherence tomography angiography study.” Int J Retina Vitreous (2019) 5:12.*

Nachdem wir bereits in gesunden Probanden signifikante physiologische Schwankungen der Aderhautdurchblutung im Tagesverlauf nachweisen konnten, fokussierte sich diese Arbeit auf Patienten mit einer Netzhauterkrankung, der epiretinalen Gliose.

3.3.1 Ergebnisse

Die Gesamtanalyse dieser Arbeit zeigte statistisch signifikante tageszeitabhängige Veränderungen (Abbildung 6). Die Einzelmesswertanalyse zeigte auffällige tageszeitabhängige Unterschiede in der SFCT ($p = 0,008$) und der HLP ($p = 0,001$). Die SFCT war morgens am dicksten ($269,76 \pm 86,73 \mu\text{m}$) und fiel dann nachmittags ab ($252,17 \pm 81,57 \mu\text{m}$), um zum Abend hin wieder leicht anzusteigen ($262,76 \pm 80,45 \mu\text{m}$). Die HLP zeigte eine ähnliche tageszeitliche Variation mit dem höchsten Wert am Morgen ($73,6 \pm 11,07 \%$), abfallend zum Nachmittag ($70,53 \pm 12,29 \%$) und dann marginal ansteigend am Abend ($71,17 \pm 12,59 \%$). MAP ($p = 0,416$), IOP ($p = 0,574$) sowie CCP ($p = 0,104$) und SLP ($p = 0,264$) zeigten keine signifikanten Schwankungen über den Tag.

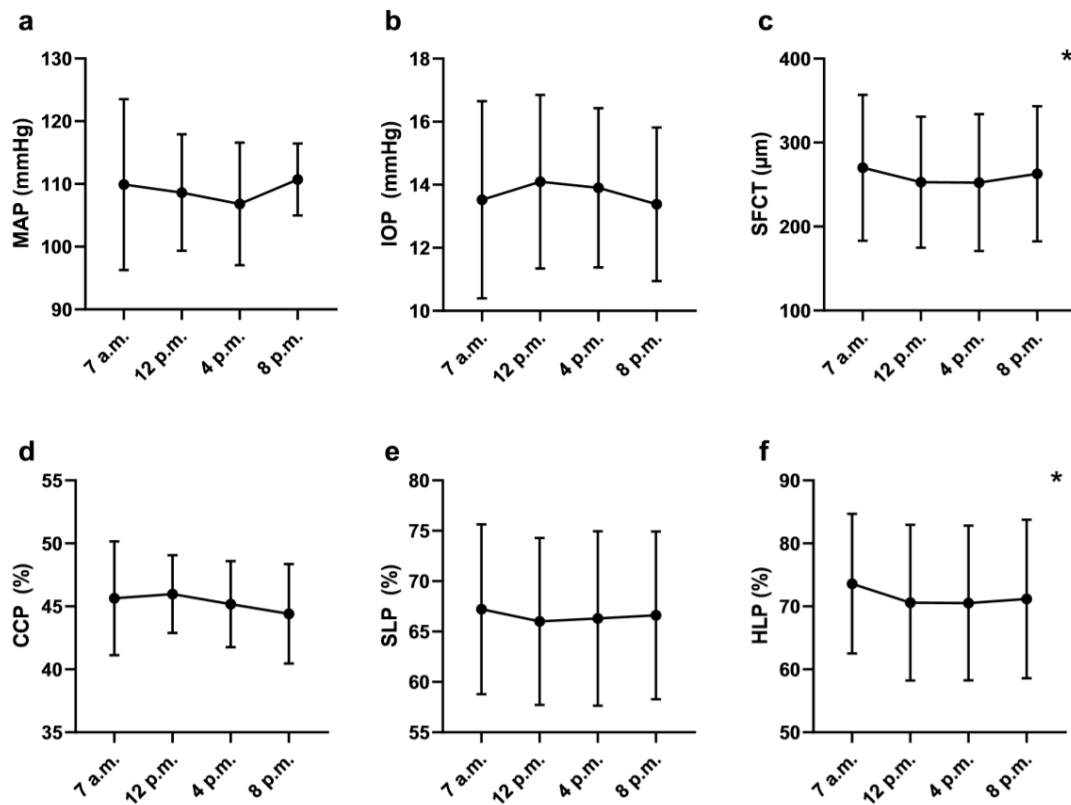


Abbildung 6: Tageszeitliche Schwankungen bei Patienten mit epiretinaler Gliose im mittleren arteriellen Druck (MAP), im intraokulären Druck (IOP), der Aderhautdicke (SFCT), der choriokapillären Perfusion (CCP), sowie der Perfusion von Sattler-Schicht (SLP) und Haller-Schicht (HLP). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Signifikante Schwankungen sind mit einem * markiert.

3.3.2 Schlussfolgerung

Die OCTA entwickelt sich zunehmend zu einem wichtigen nichtinvasiven Messinstrument für die Beurteilung des choroidalen Perfusionsstatus. Diese Studie konnte eine Veränderung der gewöhnlichen Tagesschwankungen in der SFCT und der choroidalen Perfusion feststellen, die unter Umständen pathophysiologischen Einfluss auf die Entwicklung einer epiretinalen Gliose haben.

4 Diskussion

In den drei vorliegenden Arbeiten wurden Untersuchungen des hinteren Augenabschnitts mittels OCTA präsentiert, deren Ergebnisse von signifikanter Bedeutung für die nichtinvasive Diagnostik sind.

In der Studie „*Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults*“ wurde die Segmentierung der Netzhautplexus und deren Auswirkung auf die FAZ bei gesunden Probanden untersucht. Viele der bereits publizierten OCTA-Studien über die FAZ, verwenden die herstellereigenen Standardeinstellungen für die Schichtsegmentierung im SCP und DCP. Diese entsprechen jedoch nicht unbedingt der korrekten anatomischen Lokalisierung der Gefäßplexus. Deshalb bestimmten wir die Größe der FAZ im SCP und DCP auf anatomisch-histologischer Basis.

Interessanterweise zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass die OCTA-vermessene FAZ im SCP kleiner als im DCP ist. Histologische Studien von Snodderly et al. zeigten jedoch, dass die Verästelungen des DCP weiter in die Mitte reichen als die des SCP. Demzufolge müsste die FAZ im SCP größer als im DCP sein. In unserer Studie konnte diese Beobachtung nach manueller Segmentierung bestätigt werden. Die mittlere Größe der FAZ nach Angaben unserer Grader reichte im SCP von $0,639 \pm 0,276 \text{ mm}^2$ (Grader 1) bis $0,697 \pm 0,277 \text{ mm}^2$ (Grader 2) und im DCP von $0,264 \pm 0,110 \text{ mm}^2$ (Grader 1) bis $0,306 \pm 0,117 \text{ mm}^2$ (Grader 2). Im SCP wichen die Ergebnisse der Grader weiter voneinander ab. Dieses könnte durch die Struktur und Form der inneren Netzhautschichten begründet sein, welche eine unscharfe Begrenzung der FAZ im SCP zur Folge hat und eine Vermessung erschwert. In naher Zukunft ist eine Grader-unabhängige automatische Beurteilung der FAZ notwendig, um die Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu verbessern.

Wie bereits von Linderman et al. beschrieben, konnten auch wir eine größere Fläche der FAZ bei Frauen nachweisen. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Shahlaee et al., was jedoch durch Altersunterschiede in den Kollektiven erklärt werden könnte. Diesbezüglich beobachteten wir eine Vergrößerung der FAZ innerhalb des DCP mit steigendem Alter. Die altersbedingte Vergrößerung der FAZ könnte auf atrophische und okklusive Veränderungen der Kapillaren zurückzuführen sein, was bereits von Lafe et al. und Tan et al. diskutiert wurde. Tick et al. fanden außerdem eine

bedeutsame inverse Korrelation zwischen der Größe der FAZ und der zentralen retinalen Dicke (CRT), in dem sie die FA und die OCT benutzten.

Es bleibt zu diskutieren, ob die gegenwärtige Aufteilung in zwei Plexus und deren derzeitige Nomenklatur reformiert werden sollte, da Campbell et al. und Garrity et al. sogar bis zu 4 Gefäßplexus in der Retina nachweisen konnten. Es wird aber auch, statt der Auftrennung in mehrere Plexus, die Evaluation der Gesamtnetzhaut, ähnlich der FA-Aufnahmen, diskutiert. Solange jedoch noch keine Leitlinie existiert, die eine einheitliche Untersuchung regelt, sollte nach der korrekten anatomischen Segmentierung vermessen werden.

In den beiden Studien „*Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography*“ und „*Mapping diurnal variations in choroidal sublayer perfusion in patients with idiopathic epiretinal membrane: an optical coherence tomography angiography study*“ zeigten sich signifikante tageszeitabhängige Veränderungen der choroidalen Perfusion und der SFCT bei gesunden sowie bei an epiretinaler Gliose erkrankten Probanden. Die Ergebnisse ähnelten denen vorheriger Studien, sodass Parallelen gezogen werden konnten. Jedoch muss die Altersstruktur - junge Probanden mit gesunden Augen und alte Probanden mit kranken Augen - in der weiteren Interpretation berücksichtigt werden.

Vorherige Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten tageszeitabhängige Unterschiede der choroidalen Perfusion und der SFCT bei Probanden ohne Augenkrankheiten. So konnten wir tageszeitabhängige Variationen in der SFCT, der SLP und der HLP belegen. Danach war die HLP und die SLP morgens niedriger und stieg während des Tages mit Spitzenwerten am Nachmittag an, um zum Abend hin wieder abzufallen. Die SFCT war morgens am dicksten und zeigte zum Abend hin einen kontinuierlichen Abfall.

Tan et al. fanden bereits bei Gesunden auffällige zirkadiane Unterschiede der SFCT mit der größten Dicke morgens und einem linearen Abfall zum Abend. Die mittlere tageszeitabhängige Schwankung der SFCT lag bei ihnen bei 30 µm. Unsere mittlere tageszeitabhängige Schwankung bei gesunden Probanden lag bei 40 µm. Da in beiden Studien die Probanden eine ähnliche Achsenlänge hatten ($23,9 \pm 1,33$ mm), könnte die Differenz der SFCT-Schwankung darauf zurückzuführen sein, dass die Probanden bei Tan et al. deutlich jünger waren ($30 \pm 4,6$ Jahre). Ein ähnliches Muster wurde auch von Usui et al. beobachtet. Früh am Morgen verzeichneten sie die dickste SFCT mit kontinuierlicher Abnahme zum Abend hin. Ihre mittlere tageszeitabhängige Schwankung lag bei 20 µm. Die

Forschungsgruppe um Usui et al. konnte, wie auch unsere Gruppe, keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem MAP und der SFCT feststellen.

Einige der oben genannten Studien versuchten Rückschlüsse auf den Status der choroidalen Perfusion zu ziehen. Sie vermuteten, dass die tageszeitabhängige Änderung der choroidalen Dicke mit den tageszeitbedingten Durchblutungsschwankungen korrelieren. Sie berücksichtigten dabei jedoch nicht den anatomischen Aufbau der Choroidea, die aus lumenalem und stromalem Gewebe besteht. Kinoshita et al. unterstrichen, dass diese tageszeitabhängigen Veränderungen in der SFCT den signifikanten Veränderungen des luminalen Gewebes im Verlauf des Tages zuzuschreiben sind, während die stromalen Gewebsparameter sich nicht auffallend veränderten. Weiterhin zeigte die Studie eine signifikante positive Korrelation zwischen dem MAP und dem luminalen choroidalen Gewebe.

Es existieren nur wenige Studien, die die choroidale Blutflussänderung im Tagesverlauf beschreiben. Während Polska et al. mittels „Laser Doppler Flowmetrie“ (LDF) keinerlei tageszeitabhängige Änderungen des choroidalen Blutflusses fanden, konnten Iwase et al. eine bedeutsame Schwankung mittels „Laser Speckle Flowgraphie“ (LSFG) verzeichnen. Die sich widersprechenden Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche technische Methoden zur Anwendung kamen. LSFG ist für das Verfolgen des Blutflusses über einen bestimmten Zeitraum besser geeignet als LDF. Bis jetzt sind Gabriel et al. die einzigen, die tageszeitabhängige Veränderungen in den choroidalen Unterschichten untersucht haben. Sie stellten morphologische Schwankungen der SL fest, jedoch nicht der HL. Die Dicke der CC wurde von ihnen allerdings nicht untersucht. Für ihre Auswertung verwendeten sie statische OCT-Bilder.

Sarwar et al. entdeckten in einer OCTA-Studie an gesunden Probanden tageszeitabhängige Veränderungen der CCP. Die Veränderungen der CCP korrelierten mit den Veränderungen der SFCT. Sie fanden eine bedeutende Abnahme der SFCT im Tagesverlauf und stellten einen ähnlichen signifikanten Abfall in der CCP fest. Allerdings zogen die Autoren ihre Schlussfolgerung nur aus zwei Messungen über den Tag - eine morgens und eine abends. Dadurch entgingen ihnen wesentliche Veränderungen zwischen den Messzeiten. Zudem untersuchten sie nicht die SLP und HLP. Unsere Teilnehmer hingegen zeigten im Gegensatz zu Sarwar et al. keine statistischen tageszeitabhängigen Schwankungen in der CCP über vier Messungen, trotz einer ähnlichen Amplitude von 1,2 %.

Während der MAP keinen Einfluss auf die SFCT hat, konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen MAP und HLP bei Gesunden nachweisen. Dies würde die Annahme

stützen, dass die choroidalen Gefäße zumindest in der HL nicht komplett autoreguliert sind. Ein möglicher Grund für das Fehlen signifikanter Ergebnisse in der CCP und SLP könnten die im Vergleich zur HL kleineren Blutgefäße sein. Veränderungen des Widerstands in diesen kleinen Gefäßen könnte die Angleichung des Perfusionsdrucks beschränken und somit eine Art autoregulierenden Prozess darstellen, der den Blutfluss konstant hält. In diesem Zusammenhang erwähnten Polska et al. eine myogene und neuronale Beteiligung bei der Autoregulation des choroidalen Blutflusses.

In unserer Studie „*Mapping diurnal variations in choroidal sublayer perfusion in patients with idiopathic epiretinal membrane*“ konnten ebenfalls tageszeitabhängige Veränderungen der SFCT festgestellt werden. Der Einfluss der epiretinalen Gliose auf die choroidale Dicke wurde von Michalewska et al. beschrieben. Diese konnten einen Abfall der SFCT drei Monate nach Vitrektomie mit Entfernung der Membran feststellen. Sie stellten auch die Hypothese auf, dass allgemeine vaskuläre Veränderungen und eine vergrößerte SFCT zur Bildung der Gliose beitragen könnten.

Unsere Studie unterstützt die These, dass die Gliose einen Einfluss auf die Schwankungen der SFCT hat, da die Ergebnisse von denen bei gesunden Probanden abwichen. Es scheint, als haben die durch die Membran erzeugten Zugkräfte nicht nur Einfluss auf die Retina, sondern auch auf die Choroidea. Die zuvor beschriebenen Schwankungen der CCP von Sarwar et al. wurden in unserer Studie mit vier Messungen über den Tag nicht bestätigt. Zusammenfassend kann aber von einem signifikanten Einfluss der Gliose auf den Blutfluss der CC ausgegangen werden.

Yu et al. unterstützen diese Behauptung, indem sie von einer reduzierten CCP bei an Gliose erkrankten Augen im Vergleich zu den nicht betroffenen Augen berichteten. Dies war jedoch nach der operativen Entfernung der Membran nicht reversibel. Von einer ähnlich verminderten CCP in Augen mit Gliose berichteten auch Chen et al., jedoch konnten auch sie keine bedeutende Veränderung nach der Operation verzeichnen. Die Autoren vermuteten unterschiedliche Gefäßverzerrungen in der Retina und der Aderhaut durch die von der Gliose hervorgerufenen Zugkräfte. Da sich die Gefäße im oberen und tiefen kapillaren Plexus gemäß der zentripetalen Kraft der Membran auszudehnen scheinen, könnte das die Mikroperfusion in der CC beeinflussen. Dieses wäre eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandenen tageszeitlichen Schwankungen der CCP. Es bleibt allerdings unklar, in welchem Ausmaß der von der Gliose ausgehende Zug die Mikroperfusion in der SL und der HL beeinflusst, da sich die Größe der Gefäße von CC nach HL erweitert.

Dies ist die erste Studie, die bedeutende tageszeitabhängige Veränderungen der HLP bei Menschen mit epiretinale Gliose aufzeigt. In der CCP und der SLP sind diese jedoch nicht nachweisbar. Da choroidale Gefäße nur zum Teil eine gewisse Autoregulierungskapazität zu haben scheinen, muss der Einfluss vom MAP berücksichtigt werden. Obgleich Straubhaar et al. keinen besonderen Einfluss des MAP auf den choroidalen Blutfluss mittels Doppler feststellen konnten, zeigten einige Untersuchungen die Abhängigkeit des choroidalen Blutflusses vom MAP und vom IOP. In unserer Studie konnten jedoch auch keine signifikanten tageszeitabhängigen Veränderungen des MAP und IOP beobachtet werden. Lee et al. zeigten geschlechtsspezifische Veränderungen in der SFCT während des Tages, die möglicherweise auf die vorhandenen Androgen- und Östrogenrezeptoren in der Aderhaut zurückzuführen sind. In unseren Studien, sowohl bei gesunden als auch bei an Gliose erkrankten Probanden, konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden. Da sich mit zunehmendem Alter der Hormonstatus ändert und unsere Probanden höheren Alters waren, könnte das eine Erklärung für unser Ergebnis sein. Außerdem unterliegen Kapillaren altersabhängigen morphologischen und funktionellen Veränderungen, die sich unter anderem in verminderter Gefäßdichte, kleinerem Durchmesser, Gefäßrigidität und eingeschränkter Autoregulation äußern. Dies kann zu geringeren tageszeitlichen Schwankungen des choroidalen Blutflusses mit zunehmendem Alter führen.

Diesen Erkenntnissen folgend konnte bei unseren gesunden Probanden eine altersabhängige Auswirkung auf die choroidale Durchblutung festgestellt werden, da die tageszeitlichen Abweichungen bei Teilnehmern ≥ 60 Jahre weniger ausgeprägt waren und die SFCT deutlich dünner war als bei den unter 60-Jährigen. Hirata et al. berichteten ebenfalls von einem Zusammenhang zwischen dem Alter und der Abnahme der SFCT. Sie postulierten atrophische Veränderungen bei zunehmendem Lebensalter. Während beide Altersgruppen deutliche tageszeitabhängige Schwankungen in der SFCT und dem MAP zeigten, hatten aber nur die < 60 Jahre alten Probanden deutliche Schwankungen in der SLP und der HLP. Diese Erkenntnis kann als negative Korrelation zwischen der Variabilität des choroidalen Blutflusses und dem Alter interpretiert werden. Mehr noch zeigte sich, dass die HLP bei jüngeren Teilnehmern deutlich größer war. Dieses steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dallinger et al., die nachwiesen, dass der okuläre Widerstand mit dem Alter zunimmt.

Eine andere Erklärung unserer altersabhängigen Beobachtungen könnte die Veränderung der äußeren Blut-Retina-Schranke sein, da Curcio et al. einen vermehrten Lipidgehalt in der Bruch-Membran (BM) bei älteren Menschen nachgewiesen haben. Die Verdickung der BM

behindert möglicherweise die Bewegung des Wassers und der wasserlöslichen Substanzen zwischen der Choroidea und der Retina. Weiter wird angenommen, dass durch zunehmendes Alter sowie Sauerstoffunterversorgung die trophischen Effekte des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), welches durch das retinale Pigment Epithel (RPE) freigesetzt wird, gestört werden. Demzufolge zeigten histologische Studien eine Reduktion des CC-Durchmessers und der choroidalen Dicke von der ersten bis zur zehnten Lebensdekade, während die Dicke der BM mit dem Alter zunahm. Letztlich könnte aber auch der systemische Wasserstatus Auswirkungen auf die choroidale Beschaffenheit haben, weil die Gesamtmenge des Körperwassers mit dem Alter abnimmt. Möglicherweise trägt dieses zu dem beobachteten Abfall der SFCT und der Aderhautdurchblutung im Alter bei.

In unserer Studie an Probanden mit ERM konnten jedoch keine auffälligen Unterschiede in der choroidalen Beschaffenheit zwischen Probanden unter 75 Jahren und darüber hinaus festgestellt werden, da sie beide signifikante tageszeitabhängige Schwankungen in der SFCT und der HLP zeigten. Grundlage dieser These könnte sein, dass die Gliose möglicherweise den natürlichen Alterungsprozess der Choroidea beeinflusst bzw. das Kollektiv mit Gliose generell älter war.

Betrachtet man alle drei Studien, müssen einige Untersuchungsmethoden kritisch hinterfragt werden. Die Untersuchung der Probanden erfolgte nur über den Tag und potentielle physiologische Veränderungen während der Nacht wurden nicht erfasst. Zudem wurden nur kleine Ausschnitte der Choroidea vermessen und Rückschlüsse auf die gesamte Fläche gezogen. Für die Bildanalyse wurde das Otsu-Verfahren verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass je nach Verfahren und Algorithmus andere Ergebnisse möglich sind. Bei Probanden mit epiretinale Gliose kommt es zudem häufig zu Segmentierungsfehlern durch die OCTA, da die Gliose fälschlicherweise als ILM interpretiert wird. Die OCTA-Daten sollten daher immer auf Plausibilität überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert werden, um Fehlern vorzubeugen. Die FAZ-Vermessung, insbesondere des SCP, war auf Grund der schwer erkennbaren Begrenzungen sehr subjektiv und könnte unter Berücksichtigung axialer Längsschnittdaten und Korrektur der Bilddaten optimiert werden. Zudem hat eine korrekte anatomische Schichtsegmentierung einen signifikanten Einfluss auf die Größe der FAZ. Segmentierungsgrenzen beinhalten demzufolge ein großes Fehlerpotential in der FAZ-Messung. Obgleich dieses für Längsschnittstudien einzelner Personen am selben Gerät wenig problematisch erscheint, können diese Fehler einen studienübergreifenden Vergleich behindern.

Unser Patientenkollektiv war zudem eher klein und feinspektiert. Besonders die alters- und geschlechtsspezifischen Ergebnisse müssen kritisch betrachtet werden, da ihre Fallzahlen gering sind.

5 Zusammenfassung und Ausblick


Die nichtinvasive OCTA ist bereits jetzt ein etabliertes Mittel der klinischen ophthalmologischen Diagnostik. Alle drei Arbeiten belegen die Wichtigkeit der OCTA als nichtinvasives diagnostisches Werkzeug, um den choroidalen und retinalen Perfusionsstatus darzustellen und zu quantifizieren.

Die korrekte anatomische Schichtsegmentierung hat einen signifikanten Einfluss auf die Größe der FAZ. Ein Nichteinhalten der Segmentierungsgrenzen kann Fehler der FAZ-Messungen zur Folge haben und einen studienübergreifenden Vergleich behindern.

Zudem muss aufgrund von signifikanten tageszeitlichen Schwankungen im choroidalen Blutfluss die Tageszeit bei den Untersuchungen vermerkt und beim Vergleich von Daten berücksichtigt werden.

Die epiretinale Gliose beeinflusst nicht nur die Funktion der Netzhaut sondern führt auch zu veränderten tageszeitlichen Schwankungen der Aderhautdurchblutung. In weiterführenden Studien sollte diese Beobachtung berücksichtigt werden, um den Einfluss der ERM und pathophysiologische Zusammenhänge zu untermauern. Um das volle Potential der OCTA ausschöpfen zu können und mit Hilfe von Biomarkern wie der FAZ, der SFCT und des Perfusionsstatus der Aderhaut Rückschlüsse auf Pathologien ziehen zu können, muss der Fokus auf internationaler Einheitlichkeit der Untersuchungsmethoden und Erhöhung der Datenlage liegen. Dieses wird nur durch eine Standardisierung der Anforderungen an die Hard- und Software gelingen, um zukünftig Daten global vergleichbar zu machen.

Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography

Fynn Siegfried,^{1,2,*} Felix Rommel,^{1,2,*} Matthias Rothe,^{1,2} Max P. Brinkmann,² Jan A. M. Sochurek,² Josephine Freitag,² Salvatore Grisanti¹ and Mahdy Ranjbar^{1,2} 

¹Department of Ophthalmology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

²Laboratory for Angiogenesis & Ocular Cell Transplantation, University of Lübeck, Lübeck, Germany

ABSTRACT.

Purpose: To investigate diurnal changes of choroidal sublayer perfusion in normal eyes and to identify influencing factors using optical coherence tomography angiography (OCTA).

Methods: A prospective study was conducted on healthy volunteers, each of whom underwent repeated measurements of subfoveal choroidal thickness (SFCT) via enhanced depth imaging (EDI) optical coherence tomography (OCT) as well as perfusion of choroidal vascular sublayers using OCTA at 7 a.m., 12 p.m., 4 p.m. and 8 p.m. Possible interactions between diurnal variations and other factors, such as mean arterial pressure (MAP), gender and age, were evaluated.

Results: A total of 22 eyes from 22 participants were analysed. Mean age of participants was 56 years. A significant pattern of diurnal variation was observed for SFCT ($p < 0.001$) as well as perfusion of Sattler's layer (SLP; $p = 0.009$) and Haller's layer (HLP; $p = 0.003$). SFCT demonstrated a linear decrease, being thicker in the morning (348 μm) and thinner in the evening (310 μm). Both, SLP and HLP showed a quadratic relation to time of day, increasing from morning (64% and 76%) to afternoon (66% and 77%), before decreasing again in the evening (64% and 76%). HLP changes were significantly associated with fluctuations of MAP ($B = 0.0007$; $CI\ 0.0001\text{--}0.0014$; $p = 0.047$). No significant differences with regard to gender were detectable. However, older participants (≥ 60 years) had fewer diurnal changes ($p = 0.042$).

Conclusion: Optical coherence tomography angiography-based analysis of choroidal sublayer perfusion demonstrated significant diurnal variations. Therefore, it is important to account for time of day, when comparing longitudinal OCTA data.

Key words: choriocapillaris – choroidal perfusion – diurnal variation – Haller's layer – optical coherence tomography angiography – Sattler's layer

Acta Ophthalmol.

© 2019 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation. Published by John Wiley & Sons Ltd

doi: 10.1111/aos.14140

Introduction

The choroid plays a significant role in the physiology of the eye and in the

pathogenesis of various ocular diseases (Kur et al. 2012). As a primarily vascular and cavernous structure, certain characteristics of the choroid, in

particular its thickness, have been challenging to study histologically (Campbell et al. 2014). The introduction of spectral-domain (SD) optical coherence tomography (OCT) and advances in OCT technology such as enhanced depth imaging (EDI) have allowed a more detailed evaluation of the choroid *in vivo* (Spaide et al. 2008). Imaging of the choroid has added significantly to our understanding of retinal pathophysiology, suggesting that metrics like subfoveal choroidal thickness (SFCT) could be important biomarkers (Laviers & Zambarakji 2014). The choroid was found to be thickened in diseases, such as central serous chorioretinopathy (CSC) or polypoidal choroidal vasculopathy (PCV), and thinned in both diabetic retinopathy (DR) and age-related macular degeneration (AMD) (Imamura et al. 2009; Chung et al. 2011; Esmaelpour et al. 2012). Furthermore, SFCT has been shown to be an indicator for treatment outcome in the above-mentioned diseases (Rayess et al. 2015, 2016; Shah et al. 2016; Ranjbar et al. 2018).

To explore the significance of the choroid and to utilize its characteristics as a reliable biomarker, normative values are needed. It has been suggested that choroidal metrics vary with age, refractive status, axial length (AL) and gender (Barteselli et al. 2012). Moreover, diurnal fluctuations have been discussed. In this regard, most studies reported the SFCT to be thicker in the morning and thinner in the evening, which supposedly correlated

with choroidal blood volume changes as a consequence of variation in blood pressure (BP) throughout the day (Tan et al. 2012; Usui et al. 2012; Lee et al. 2014). Gabriel et al. (2017) even analysed choroidal substructures and demonstrated that Sattler's layer (SL) alone is subject to diurnal fluctuation in thickness, but not Haller's layer (HL).

The recent development of OCT angiography (OCTA) enables the assessment of the choroid from a rather functional point of view. OCTA generates slab-segmented, high-quality, angiographic images, based on motion contrast of erythrocytes across a stationary background (Rommel et al. 2018). By now, various OCTA-based studies exist, which evaluate the microcirculation of the choriocapillaris (CC) in healthy and diseased subjects (Qu et al. 2017; de Carlo et al. 2018; Lauer- mann et al. 2018a).

While SFCT and CC perfusion (CCP) have become important foci in research, little is currently known about the characteristics of SL perfusion (SLP) and HL perfusion (HLP). Therefore, in this study we sought to investigate diurnal variation of chorioidal sublayer perfusion by OCTA.

Methods

Study population

This prospective study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval by the institutional review board (IRB) was given, and written informed consent was obtained from each subject before enrolment in the study. All participants underwent basic examination, which included BP, refraction, best-corrected visual acuity (BCVA) in Snellen, intraocular pressure (IOP), AL, slit-lamp biomicroscopy and macular EDI-OCT as well as OCTA. Only individuals with a BCVA of at least 20/25 and age-appropriate, normal ocular findings, without prior ophthalmic surgery, any history of ophthalmic or systemic disease were recruited. Furthermore, the maximum permissible spherical aberration was ± 3 dioptres.

Imaging protocol

All images were captured without prior pupil dilatation in each participant,

using the HS100 (Canon, Tokyo, Japan) OCT/OCTA device at 7 a.m., 12 p.m., 4 p.m. and 8 p.m. The HS100 uses a modified full-spectrum amplitude decorrelation algorithm (FSADA) to generate angiograms. At each time-point, multiple EDI-OCT ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) and OCTA ($3 \times 3 \text{ mm}^2$) volumetric scans of the posterior pole were obtained. Only OCTA scans with a signal strength ≥ 7 , centred on the fovea, and the absence of motion as well as projection artefacts were considered (Lauer- mann et al. 2018b; Spaide et al. 2018).

Subfoveal choroidal thickness was manually measured in EDI-OCT scans at a single point below the fovea, extending from the bottom of the hyperreflective layer corresponding to Bruch's membrane, to the hyperreflective layer at the sclera-choroidal junction, by at least two experienced examiners (FR, MRo and MPB), who were blinded to clinical information about the eyes. Care was taken and special attention was paid, to ensure that SFCT was measured at almost exactly the same location between time-points.

Optical coherence tomography angiography data were manually segmented according to previous protocols, to get $20 \mu\text{m}$ slabs of each choroidal sublayer (Esmacelpour et al. 2014; Gabriel et al. 2017; Nicolò et al. 2017) (Fig. 1). Each angiogram was then exported as an image into ImageJ (NIH, version 1.48b, Bethesda, USA) and binarized using the command path Image > Adjust > Threshold > Auto in order to calculate the percentage of black and white pixels. Binarization was done by the Otsu method, which is

an automatic threshold selection from grey-level histograms. It has been suggested that the percentage of white (CC) or black pixels (SL and HL) is an indirect measure of the choroidal vascular flow area (Nicolò et al. 2017). Therefore the white or black pixel value of the respective layer was calculated and divided by the whole scan area to determine CCP, SLP and HLP.

Statistical analysis

The data were analysed using IBM spss (version 24.0, Chicago, IL, USA) and Prism GraphPad (version 8.0, La Jolla, CA, USA). Snellen BCVA was converted to logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR). Mean arterial pressure (MAP) was calculated based on systolic and diastolic BP. The data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Diurnal changes in MAP, IOP, SFCT, CCP, SLP and HLP were evaluated using repeated measures multivariate analysis of variance (MANOVA). Subsequently, linear mixed effects modelling fit by restricted maximum likelihood was used to assess the significance of MAP fluctuations, in explaining diurnal variations in SFCT, CCP, SLP and HLP. Finally, a two-way mixed-model MANOVA was done to evaluate age-dependent as well as gender-dependent interactions. For both MANOVAS a Bonferroni correction was applied. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 22 healthy participants were recruited. Demographic and clinical data are reported in Table 1. Ten male

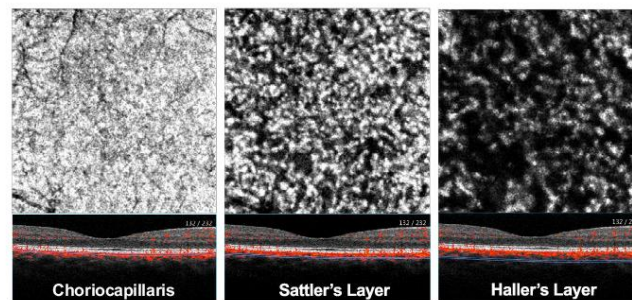


Fig. 1. Optical coherence tomography angiography (OCTA) generated en face angiograms of the choriocapillaris (CC), Sattler's layer (SL) and Haller's layer (HL) were acquired with the Canon HS100 device.

Table 1. Demographic and clinical data.

Parameters	Mean ± Standard deviation (range)
Age (years)	55.91 ± 14.84 (28–76)
Axial length (mm)	23.83 ± 1.38 (21.83–26.63)
Best-corrected visual acuity (logMAR)	0.04 ± 0.05 (0.00–0.10)

and 12 female subjects were included. Laterality was assigned by chance, resulting in 10 of the studied eyes being right and 12 being left.

Analysis showed statistically significant diurnal changes [F(18, 164.53) = 5.97, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.377$]. Univariate tests with Greenhouse–Geisser correction indicated significant diurnal variations for MAP [F(2.28, 47.94) = 9.69, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.316$], SFCT [F(1.80, 37.86) = 18.35, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.466$], SLP [F(2.27, 47.69) = 4.89, $p = 0.009$, partial $\eta^2 = 0.189$] and HLP [F(2.32, 48.70) = 6.12, $p = 0.003$, partial $\eta^2 = 0.226$]. MAP was the highest in the afternoon (99.91 ± 7.44 mmHg) and the lowest in the evening (93.27 ± 7.94 mmHg). SFCT was found to be the thickest in the

morning (348.18 ± 78.71 μm) and declined gradually until evening (310.05 ± 74.33 μm). SLP as well as HLP were the lowest in the morning (64.23 ± 5.43%; 75.55 ± 6.97%) and the highest in the afternoon (66.08 ± 5.64%; 77.35 ± 6.06%). CCP [F(2.05, 43.02) = 1.43, $p = 0.249$, partial $\eta^2 = 0.064$] and IOP [F(2.64, 55.49) = 0.851, $p = 0.460$, partial $\eta^2 = 0.039$] did not show significant diurnal fluctuations (Fig. 2).

Results of the mixed effect model with random effects (MAP and participants) in combination with interacting fixed effects (MAP), are reported in Table 2. This model demonstrated that changes in MAP were positively associated with changes in HLP ($p = 0.047$). However, SFCT, CCP as

well as SLP were not significantly associated with MAP in terms of diurnal variation.

Further analysis did not reveal any significant interaction between gender and time of day [F(18, 156.05) = 0.63, $p = 0.869$, partial $\eta^2 = 0.064$], as both men and women, showed significant diurnal changes [F(18, 156.05) = 5.88, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.386$]. Univariate analyses with Greenhouse–Geisser correction demonstrated significant diurnal fluctuations in both genders for MAP [F(2.22, 44.43) = 9.95, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.332$], SFCT [F(1.68, 33.68) = 18.31, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.478$], SLP [F(2.23, 44.55) = 4.65, $p = 0.012$, partial $\eta^2 = 0.189$] and HLP [F(2.31, 46.24) = 5.66, $p = 0.004$, partial $\eta^2 = 0.221$], but not for CCP [F(2.01, 40.27) = 1.39, $p = 0.260$, partial $\eta^2 = 0.065$] and IOP [F(2.63, 52.74) = 0.87, $p = 0.451$, partial $\eta^2 = 0.042$] (Fig. 3). Mean SFCT in female and male participants were comparable (329.4 ± 17.48 μm versus 325.1 ± 15.47 μm , $p = 0.894$) and the amplitudes of diurnal changes did not differ significantly either (40 versus 37 μm , $p = 0.252$). There was no significant difference in mean MAP between females and males (95.81 ± 2.76 mmHg versus 97.50 ± 4.28 mmHg, $p = 0.510$), with both groups showing similar mean diurnal amplitudes (6.2 mmHg versus 7.6 mmHg, $p = 0.463$). In addition, mean SLP did not demonstrate any significant gender-specific differences (64.67 ± 0.09% versus 64.95 ± 0.07%, $p = 0.908$), as diurnal amplitudes were comparable between groups (2.2% versus 1.5%, $p = 0.495$). Correspondingly, HLP was similar in female and male participants (75.50 ± 0.9% versus 77.28 ± 0.6%, $p = 0.534$), with diurnal amplitudes not being significantly different (2.2% versus 1.4%, $p = 0.658$).

Interestingly, a significant interaction between age (<60 years versus ≥60 years) and time of day was detectable [F(18, 156.05) = 3.52, $p = 0.042$, partial $\eta^2 = 0.206$]. The older group had a smaller effect size [F(18, 71.19) = 2.89, $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.404$] than the younger one [F(18, 71.19) = 4.03, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.485$], indicating less diurnal variations. Univariate tests with Greenhouse–Geisser correction revealed that while the younger group showed significant diurnal changes for MAP [F

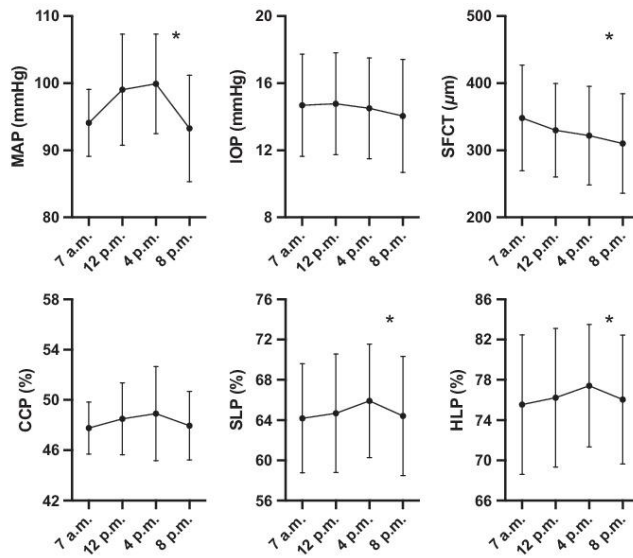


Fig. 2. Diurnal changes in mean arterial pressure (MAP), intraocular pressure (IOP), subfoveal choriocapillary thickness (SFCT), choriocapillaris perfusion (CCP), Sattler's layer perfusion (SLP) and Haller's layer perfusion (HLP). Data ($n = 22$) are illustrated as the mean ± standard deviation at four time-points during one day. Variables showing statistically significant diurnal changes are indicated with *.

Table 2. Estimated coefficients of the mixed effect model with regard to interaction of mean arterial pressure and various choroidal parameters.

Parameters	Estimate	Confidence interval (95%)	p value
Subfoveal choroidal thickness	-0.4245	-1.6295 to 0.7805	0.419
Choriocapillaris perfusion	0.0001	-0.0006 to 0.0007	0.800
Sattler's layer perfusion	0.0005	-0.0005 to 0.0014	0.290
Haller's layer perfusion	0.0007	0.0001 to 0.0014	0.047

(2.22, 22.20) = 3.97, $p = 0.030$, partial $\eta^2=0.284$], SFCT [F(1.39, 13.88) = 8.85, $p = 0.006$, partial $\eta^2=0.469$], SLP [F(1.87, 18.68) = 4.62, $p = 0.025$, partial $\eta^2 = 0.316$] and HLP [F(1.57, 15.72) = 4.59, $p = 0.034$, partial $\eta^2 = 0.314$], the older group only displayed significant diurnal fluctuations for MAP [F(2.29, 22.91) = 9.84, $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.496$] and SFCT [F(1.64, 16.39) = 9.44, $p = 0.003$, partial $\eta^2 = 0.486$] (Fig. 4). Mean SFCT was significantly higher in younger participants ($380.0 \pm 16.89 \mu\text{m}$ versus $275.0 \pm 15.45 \mu\text{m}$; $p < 0.001$), however the amplitudes of diurnal changes were similar (40 versus $36 \mu\text{m}$, $p = 0.754$). Mean MAP was comparable in both groups ($95.36 \pm 2.84 \text{ mmHg}$ versus $97.80 \pm 4.67 \text{ mmHg}$, $p = 0.338$). Still, the older participants demonstrated a significantly bigger mean diurnal amplitude (7 versus 11 mmHg , $p = 0.026$). The younger group had a significantly higher mean HLP ($79.75 \pm 1.1\%$ versus $72.86 \pm 0.6\%$, $p = 0.009$), but SLP ($66.55 \pm 1.1\%$ versus $63.05 \pm 0.5\%$, $p = 0.140$) and CCP ($49.11 \pm 0.9\%$ versus $47.45 \pm 0.4\%$, $p = 0.112$) were not significantly different. In participants <60 years of age SLP and HLP showed statistically significant diurnal variations, with mean diurnal amplitudes of 2.5% and 2.2%, respectively.

Discussion

This study confirms and expands previous research investigating the diurnal rhythms of choroidal metrics, as we have shown significant diurnal variations in SFCT, SLP and HLP. SLP and HLP were lower in the morning, increased during the day with peak values around the afternoon and then decreased in the evening. SFCT demonstrated a continuous decline, being the thickest in the morning and the thinnest in the evening.

Other investigators have previously described diurnal SFCT variation

(Chakraborty et al. 2011; Tan et al. 2012; Usui et al. 2012; Lee et al. 2014). Tan et al. (2012) reported a progressive decrease in SFCT from morning to evening, through different points of time with a mean diurnal amplitude of around $30 \mu\text{m}$. In our investigation, mean diurnal SFCT amplitude was around $40 \mu\text{m}$. Since mean AL in their participants ($23.9 \pm 1.33 \text{ mm}$) is comparable to ours, differences in SFCT amplitude could be due to the difference in age between the groups, as their subjects were considerably younger (30.0 ± 4.6 years) than ours. Usui et al. (2012) reported SFCT being the thickest in the early morning and continuously decreasing by early evening with a mean diurnal amplitude of around $20 \mu\text{m}$. Therefore, results of both studies are consistent with our findings regarding diurnal changes in SFCT. Moreover, similar to us, Usui et al. did not find any significant association between diurnal fluctuations of MAP and SFCT, which was also reported in several other studies (Li et al. 2011; Lee et al. 2014; Kinoshita et al. 2017).

To date, Gabriel et al. (2017) are the only ones who, in addition to total choroidal thickness, made the effort to evaluate diurnal changes in choroidal sublayer thickness and reported a significant fluctuation for SL, but not for HL, while diurnal variation of CC thickness was not examined. They used an automated blood vessel segmentation algorithm for segmentation and 3-dimensional visualization of choroidal vessels in OCT images. Since manual segmentation of the choroid is quite laborious and error-prone, we decided against it.

A lot of the above-mentioned studies tried to draw conclusions on the state of choroidal perfusion, based on morphological changes as they suggested that the diurnal variation in choroidal thickness could be related to diurnal circulatory fluctuations. However, this

does not take specific anatomical characteristics of the choroid into account, as it consists of luminal and stromal tissue. Kinoshita et al. (2017) highlighted that these diurnal changes in SFCT were attributed to significant variation of luminal tissue metrics during the day, while stromal tissue metrics did not change significantly. Furthermore, the same study reported a significant positive correlation between MAP and luminal tissue area.

At present, there are only few reports that directly evaluated diurnal choroidal blood flow variation. While Polska et al. (2004) did not find any significant diurnal changes in choroidal blood flow using laser Doppler flowmetry (LDF), Iwase et al. (2015) found significant fluctuation via laser speckle flowgraphy (LSFG). The contradictory results could be explained by the different technical methods, as LSFG is superior to LDF in following the blood flow at the same location over time (Sugiyama et al. 2010). However, the reported LSFG-measured diurnal pattern of choroidal blood flow differs slightly from our results, as it increased later in the day compared to OCTA-measured choroidal sublayer perfusion. This could be attributed to the significant age gap between both groups, with our participants being almost twice as old as theirs.

Interestingly, a recent study evaluated diurnal changes in CCP by OCTA and reported a significant correlation with changes in SFCT (Sarwar et al. 2018). The authors found a significant thinning of SFCT from morning to evening, and a similar significant decrease in CCP, concluding that SFCT is a strong determinant of choroidal blood flow. The mean diurnal amplitude of CCP was around 1.2%. However, the authors drew their conclusion based on the evaluation of only two measurements (morning versus evening) throughout the day. By doing so, they missed out on the blood flow's tend to increase between these time-points. Moreover, they did not evaluate SLP and HLP, while this study is the first to report on diurnal variations in all choroidal vascular sublayers simultaneously, using OCTA. Nevertheless, in contrast to Sarwar et al., our participants did not show any significant diurnal fluctuation in CCP over four time-points,

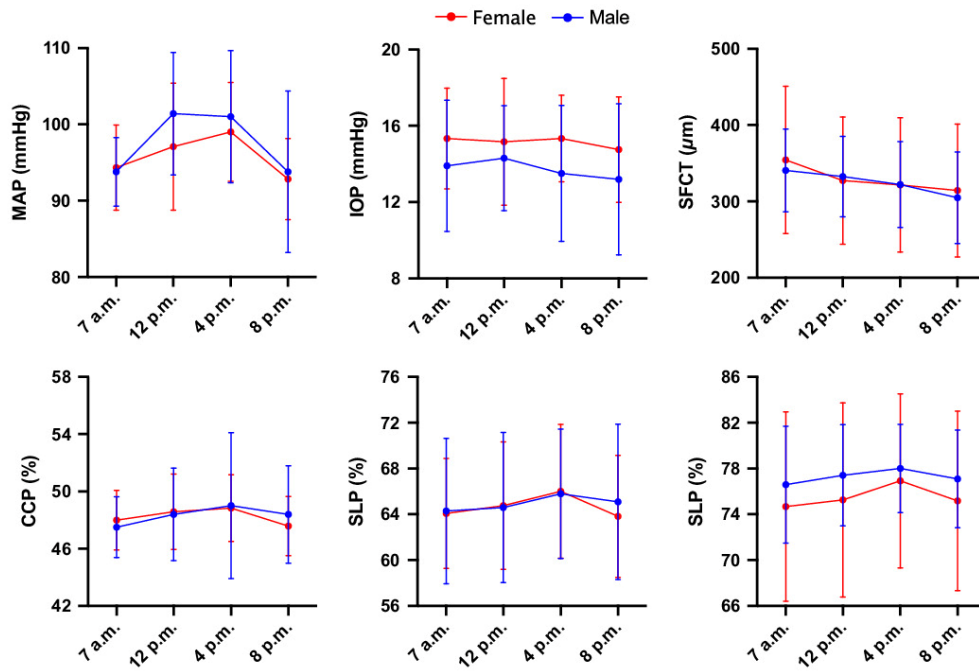


Fig. 3. Gender-dependent diurnal changes in mean arterial pressure (MAP), intraocular pressure (IOP), subfoveal choroidal thickness (SFCT), choriocapillaris perfusion (CCP), Sattler's layer perfusion (SLP) and Haller's layer perfusion (HLP) in male ($n = 10$) and female ($n = 12$) participants. Data are illustrated as the mean \pm standard deviation at four time-points during one day. No gender-specific statistically significant differences in diurnal changes were detectable.

despite having almost an identical mean diurnal amplitude of 1.2%.

While MAP was not associated with SFCT, we found a significant association between MAP and HLP. This would support the assumption that choroidal vessels, at least in HL, are poorly autoregulated (Usui et al. 2012). However, our data do not back a generalization for the whole choroid (Nickla & Wallman 2010; Zouache et al. 2016). The different diurnal patterns of CCP and SLP compared to MAP, could be due to the size of the vessels in both layers, as they are much smaller than in HL (Esmacelpour et al. 2014). Therefore, changes in resistance of these smaller vessels could restrict the reconciliation of perfusion pressure and represent some type of autoregulatory process to keep blood flow constant (Riva et al. 1997a). In this context, myogenic and/or a neuronal contribution to choroidal blood flow autoregulation have been proposed (Polska et al. 2007).

Changes in IOP could also influence choroidal metrics, but the data are still very ambiguous (Chakraborty et al. 2011; Usui et al. 2012; Lee et al. 2014). While these studies, in contrast to our data, revealed significant fluctuation in IOP over 24 hr, the variation during daytime might be much smaller compared to differences between day and night.

Previous studies also reported gender-dependent differences in SFCT and associated these differences with hormonal status, since androgen as well as estrogen receptors have been found in the choroid (Grieshaber et al. 2007; Li et al. 2011; Lee et al. 2014). In our study, we did not determine any significant differences between male and female participants with regard to absolute values, as well as mean diurnal amplitudes. Once again, this could be explained by the fact that our participants were much older, since the hormonal state, especially with regard to sex hormones, changes

significantly during ageing (Kwon et al. 2017; Gurvich et al. 2018).

Interestingly, our data suggest an effect of age on choroidal perfusion, since diurnal variations were less pronounced in participants ≥ 60 years. Hirata et al. (2011) reported a decrease in SFCT with age and associated this finding with atrophic changes. Matching these results, we found SFCT to be significantly thinner in older participants. While both age groups demonstrated significant diurnal variations in SFCT and MAP, only subjects < 60 years had significant fluctuations in SLP and HLP. This finding could be interpreted as a negative correlation between variability in choroidal blood flow and age. Capillaries are subject to age-dependent morphological and functional changes such as vascular stiffening, thickening of vessel walls, fibrosis as well as restricted autoregulation (Strait & Lakatta 2012). Especially the latter one might cause fewer diurnal fluctuation of choroidal blood

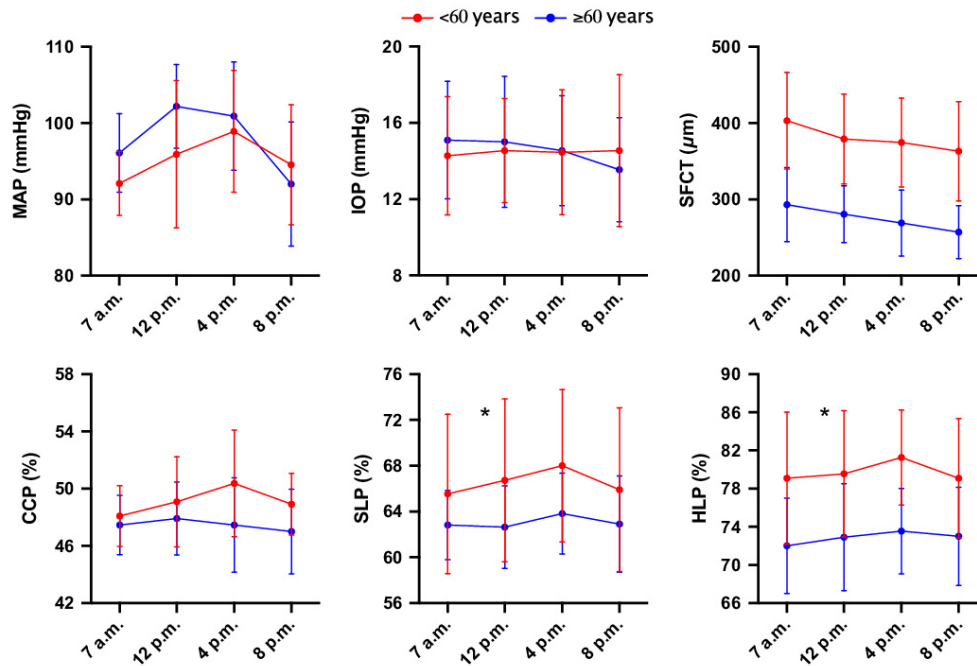


Fig. 4. Diurnal changes in mean arterial pressure (MAP), intraocular pressure (IOP), subfoveal choroidal thickness (SFCT), choriocapillaris perfusion (CCP), Sattler's layer perfusion (SLP) and Haller's layer perfusion (HLP) in participants <60 years ($n = 11$) and ≥ 60 years ($n = 11$). Data are illustrated as the mean \pm standard deviation at four time-points during one day. Variables showing age-specific statistically significant differences in diurnal changes are indicated with *.

flow. Moreover, HLP proved to be significantly higher in younger participants, which is consistent with the findings of others, who argued in favour of an increase in ocular vascular resistance with age (Dallinger et al. 1998). Another line of argumentation in explaining our age-dependent findings could involve changes in the outer blood-retinal barrier. An increased lipid content has been documented in Bruch's membrane (BM), especially in the macula, with ageing (Curcio et al. 2011; Han et al. 2007). This thickening of BM has been postulated to specifically impede the movement of water and water-soluble agents between the choroidal and retinal compartments (Moore et al. 1995). Moreover, it has been suggested that in hypoxic states and with ageing, the trophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) A, which is secreted by the retinal pigment epithelium (RPE), on the choroid and CC in particular are disturbed by a thickened BM (Rudolf

et al. 2019). Accordingly, histological studies demonstrated a decrease in CC diameter and choroidal thickness from the first to the tenth decade of life while the thickness of BM increases with age (Ramrattan et al. 1994). Finally, the systemic water status might impact choroidal metrics as the total amount of water in the body decreases with age, possibly contributing to the observed decreases in SFCT and sublayer perfusion with ageing (Mansouri et al. 2013; Hooper et al. 2014).

This study does have some limitations. First, we did not examine participants during night-time, while the choroidal perfusion state during midnight might provide some new information. Second, the scanned area of $3 \times 3 \text{ mm}^2$ was not enough to suggest global diurnal variation of the choroid. A wider range of the examination area may be more conclusive. Third, only healthy individuals were imaged and systemic factors such as state of hydration, as mentioned above, were not

recorded. Fourth, by using a single OCTA device our methodical approach is restricted, as perfusion values differ from device to device, depending on hardware, segmentation, as well as software algorithm and it remains to be tested whether our finding of diurnal changes in choroidal sublayer perfusion can be validated using various commercially available OCTA devices. Fifth, it should be noted that we only used the Otsu image processing algorithm and another algorithm might have led to a divergent outcome, as it has been shown that algorithms do have different discriminatory abilities (Rabiolo et al. 2018). Sixth and final, our study population was quite small and data analysis was mainly exploratory. Especially the results of the subgroup analyses on gender-specific and age-dependent differences should be considered with caution because they are based on an even smaller sample size. Nevertheless, strong significant diurnal variations were found. Further

studies with confirmatory analysis on a large number of subjects will be necessary to corroborate our findings.

In conclusion, OCTA is becoming a prominent non-invasive tool for imaging and quantifying the choroidal perfusion state. However, it is important to account for time of day, since there are significant diurnal changes in blood flow in some vascular sublayers of the choroid, which could be partially associated with diurnal fluctuations in MAP.

Acknowledgements

Ethical approval was given by the institutional review board at the University of Lübeck (vote referenced number 17-008). Written informed consent was obtained from each subject before enrolment in the study. Parts of the manuscript have been presented as a poster at the 2018 ARVO meeting in Honolulu, HI, USA. The authors like to thank Burkhard Zander (Eyeteq, Lübeck, Germany) and Ori Zahavi (Canon Europe, Amstelveen, Netherlands) for technical support regarding the OCTA device.

References

- Barteselli G, Chhablani J, El-Emam S et al. (2012): Choroidal volume variations with age, axial length, and sex in healthy subjects: a three-dimensional analysis. *Ophthalmology* **119**: 2572–2578.
- Campbell IC, Coudillier B & Ross Ethier C (2014): Biomechanics of the posterior eye: a critical role in health and disease. *J Biomech Eng* **136**: 021005.
- de Carlo TE, Kokame GT, Shantha JG, Lai JC & Wee R (2018): Spectral-domain optical coherence tomography angiography for the diagnosis and evaluation of polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmologica* **239**: 103–109.
- Chakraborty R, Read SA & Collins MJ (2011): Diurnal variations in axial length, choroidal thickness, intraocular pressure, and ocular biometrics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 5121–5129.
- Chung SE, Kang SW, Lee JH & Kim YT (2011): Choroidal thickness in polypoidal choroidal vasculopathy and exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **118**: 840–845.
- Curcio CA, Johnson M, Rudolf M & Huang J (2011): The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol* **95**: 1638–1645.
- Dallinger S, Findl O, Strenn K, Eichler HG, Wolz M & Schmetterer L (1998): Age dependence of choroidal blood flow. *J Am Geriatr Soc* **46**: 484–487.
- Esmaelpour M, Brunner S, Ansari-Shahrezaei S, Nemets P, Povazay B, Kajic V, Drexler W, Binder S (2012): Choroidal thinning in diabetes type 1 detected by 3-dimensional 1060 nm optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 6803–6809.
- Esmaelpour M, Kajic V, Zabihian B et al. (2014): Choroidal Haller's and Sattler's layer thickness measurement using 3-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *PLoS ONE* **9**: e99690.
- Gabriel M, Esmaelpour M, Shams-Mafi F, Herrmann B, Zabihian B, Drexler W, Binder S & Ansari-Shahrezaei S (2017): Mapping diurnal changes in choroidal, Haller's and Sattler's layer thickness using 3-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **255**: 1957–1963.
- Grieshaber MC, Staub J & Flammer J (2007): The potential role of testosterone in central serous chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol* **91**: 118–119.
- Gurvich C, Hoy K, Thomas N & Kulkarni J (2018): Sex differences and the influence of sex hormones on cognition through adulthood and the aging process. *Brain Sci* **8**: E163.
- Han M, Giese G, Schmitz-Valkenberg S, Bndewald-Wittich A, Holz FG, Yu J, Bille JF & Niemi MH (2007): Age-related structural abnormalities in the human retina-choroid complex revealed by two-photon excited autofluorescence imaging. *J Biomed Opt* **12**: 024012.
- Hiata M, Tsukikawa A, Matsumoto A, Hangai M, Ooto S, Yamashiro K, Akiba M & Yoshimura N (2011): Macular choroidal thickness and voluemin normal subjects measured by swept-source optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 4971–4978.
- Hooper L, Bunn D, Jimoh FO & Fairweather-Tait SJ (2014): Water-loss dehydration and aging. *Mech Ageing Dev* **136**: 50–58.
- Imamura Y, Fujiwara T, Margolis R & Spaide RF (2009): Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in central serous chorioretinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa)* **29**: 1469–1473.
- Iwase T, Yamamoto K, Ra E, Murotani K, Matsui S & Terasaki H (2015): Diurnal variations in blood flow at optic nerve head and choroid in healthy eyes: diurnal variations in blood flow. *Medicine (Baltimore)* **94**: e519.
- Kinoshita T, Mitamura Y, Shinomiya K et al. (2017): Diurnal variations in luminal and stromal areas of choroid in normal eyes. *Br J Ophthalmol* **101**: 360–364.
- Kur J, Newman EA & Chan-Ling T (2012): Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res* **31**: 377–406.
- Kwon HJ, Lee SM, Pak KY, Park SW, Lee JE & Byon IS (2017): Gender differences in the relationship between sex hormone deficiency and soft drusen. *Curr Eye Res* **42**: 1527–1536.
- Lauermann JL, Eter N & Alten F (2018a): Optical coherence tomography angiography offers new insights into choriocapillaris perfusion. *Ophthalmologica* **239**: 74–84.
- Lauermann JL, Woetzel AK, Treder M, Alnawaiseh M, Clemens CR, Eter N & Alten F (2018b): Prevalences of segmentation errors and motion artifacts in OCT-angiography differ among retinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **256**: 1807–1816.
- Laviers H & Zambarkaj H (2014): Enhanced depth imaging-OCT of the choroid: a review of the current literature. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **252**: 1871–1883.
- Lee SW, Yu S-Y, Seo KH, Kim ES & Kwak HW (2014): Diurnal variation in choroidal thickness in relation to sex, axial length, and baseline choroidal thickness in healthy Korean subjects. *Retina (Philadelphia, Pa)* **34**: 385–393.
- Li XQ, Larsen M & Munch IC (2011): Subfoveal choroidal thickness in relation to sex and axial length in 93 Danish university students. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 8438–8441.
- Mansouri K, Medeiros FA, Marchese N, Tatham AJ, Auerbach D & Weinreb RN (2013): Assessment of choroidal thickness and volume during the water drinking test by swept-source optical coherence tomography. *Ophthalmology* **120**: 2508–2516.
- Moore DJ, Hussain AA & Marshall J (1995): Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 1290–1297.
- Nickla DL & Wallman J (2010): The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* **29**: 144–168.
- Nicolò M, Rosa R, Musetti D, Musolino M, Sacchegiani M & Traverso CE (2017): Choroidal vascular flow area in central serous chorioretinopathy using swept-source optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**: 2002–2010.
- Polska E, Polak K, Luksch A, Fuchsjaeger-Mayrl G, Petternel V, Findl O & Schmetterer L (2004): Twelve hour reproducibility of choroidal blood flow parameters in healthy subjects. *Br J Ophthalmol* **88**: 533–537.
- Polska E, Simader C, Weigert G, Doelemeyer A, Kolodjaschna J, Scharmann O & Schmetterer L (2007): Regulation of choroidal blood flow during combined changes in intraocular pressure and arterial blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 3768–3774.
- Qu Y, Gong D, Yu W & Dong F (2017): Characteristics of the choriocapillaris layer in optical coherence tomography angiography of acute central serous chorioretinopathy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* **48**: 1000–1005.
- Rabiolo A, Gelormini F, Sacconi R et al. (2018): Comparison of methods to quantify macular and peripapillary vessel density in optical coherence tomography angiography. *PLoS ONE* **13**: e0205773.
- Ramrattan RS, van DER SCHAFT TL, Mooy CM, de BRUIN WC, Mulder PG & de JONG PT (1994): Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**: 2857–2864.
- Ranjbar M, Kurz M, Holzhey A, Rades D & Grisanti S (2018): Subfoveal choroidal thickness as a potential predictor of clinical response to stereotactic radiotherapy for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* **49**: 320–328.
- Rayess N, Rahimy E, Ying G-S, Bagheri N, Ho AC, Regillo CD, Vander JF & Hsu J (2015): Baseline choroidal thickness as a predictor for response to anti-vascular endothelial growth factor therapy in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* **159**: 85–91.
- Rayess N, Rahimy E, Ying G-S, Pelkianaki M, Franklin J, Regillo CD, Ho AC & Hsu J (2016): Baseline choroidal thickness as a predictor for treatment outcomes in central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* **171**: 47–52.
- Riva CE, Titz P, Hero M, Movaffaghy A & Petrig BL (1997a): Choroidal blood flow during isometric exercises. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**: 2338–2343.
- Riva CE, Titz P, Hero M & Petrig BL (1997b): Effect of acute decreases of perfusion pressure on choroidal blood flow in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**: 1752–1760.
- Rommel F, Siegfried F, Kurz M, Brinkmann MP, Rothe M, Rudolf M, Grisanti S & Ranjbar M (2018): Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults. *J Curr Ophthalmol* **30**: 156–160.
- Rudolf M, Curcio CA, Schlötter-Schrehardt U et al. (2019): Apolipoprotein A-I mimetic peptide L-4F removes Bruch's membrane lipids in aged nonhuman primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**: 461–472.
- Sarwar S, Hassan M, Soliman MK et al. (2018): Diurnal variation of choriocapillaris vessel flow density in normal subjects measured using optical coherence tomography angiography. *Int J Retina Vitreous* **4**: 37.
- Shah AR, Williams S, Bauml CR, Rosner B, Duker JS & Seddon JM (2016): Predictors of response to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **163**: 154–166.e8.
- Spaide RF, Koizumi H, Pozzoni MC & Pozzoni MC (2008): Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* **146**: 496–500.
- Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, Sadda SR & Staurenghi G (2018): Optical coherence tomography angiography. *Prog Retin Eye Res* **64**: 1–55.
- Strait JB & Lakatta EG (2012): Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin* **8**: 143–164.
- Sugiyama T, Araie M, Riva CE, Schmetterer L & Orgul S (2010): Use of laser speckle flowgraphy in ocular blood flow research. *Acta Ophthalmol* **88**: 723–729.
- Tan CS, Ouyang Y, Ruiz H & Sadda SR (2012): Diurnal variation of choroidal thickness in normal, healthy subjects measured by spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 261–266.
- Usui S, Ikuno Y, Akiba M, Maruko I, Sekiryu T, Nishida K & Iida T (2012): Circadian changes in subfoveal choroidal thickness and the relationship with circulatory factors in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 2300–2307.
- Zouache MA, Eames I, Klettner CA & Luthert PJ (2016): Form, shape and function: segmented blood flow in the choriocapillaris. *Sci Rep* **6**: 35754.

Received on December 1st, 2018.

Accepted on April 23rd, 2019.

Correspondence:

Mahdy Ranjbar, MD
Ratzburger Allee 160
23538 Lübeck
Germany
Tel: +49 451 500 43913
Fax: +49 451 500 43914
Email: eye.research101@gmail.com

FS and FR contributed equally and should be regarded as equivalent first authors.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Current Ophthalmology 30 (2018) 156–160

<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-current-ophthalmology>



Original research

Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults

Felix Rommel^{a,b,*}, Fynn Siegfried^b, Maximilian Kurz^{a,b}, Max Philipp Brinkmann^{a,b},
Matthias Rothe^{a,b}, Martin Rudolf^a, Salvatore Grisanti^a, Mahdy Ranjbar^{a,b}

^a Department of Ophthalmology, Augenlinik - Universität zu Lübeck, Germany

^b Laboratory for Angiogenesis & Ocular Cell Transplantation, Lübeck, Germany

Received 30 November 2017; revised 25 January 2018; accepted 3 February 2018

Available online 20 March 2018

Abstract

Purpose: To evaluate the impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone (FAZ) dimensions in the superficial capillary plexus (SCP) and deep capillary plexus (DCP) using optical coherence tomography angiography (OCTA).

Methods: Participants with healthy retinas were recruited, and 5×5 mm OCTA images were acquired using the Canon HS-100 Angio eXpert module. FAZ size was measured in automatically (AS, manufacturer-based) and manually (MS, anatomical-based) segmented OCTA slabs by two experienced graders. FAZ dimensions, inter-rater agreement, and correlation to demographic and retinal parameters were evaluated.

Results: A total of 38 eyes from 20 healthy adult subjects were included in this cross-sectional study. While in AS slabs, the FAZ in the SCP was smaller than in the DCP, in MS images, it was the opposite. MS had a relevant impact on inter-rater agreement of FAZ measurements in the SCP. The FAZ area in both plexus correlated inversely with the central retinal thickness (CRT), irrespective of the segmentation applied. Furthermore, an enlargement of FAZ size in the DCP with increasing age was found. Finally, the FAZ in female participants was significantly larger than in their male counterparts, regardless of the evaluated plexus and chosen segmentation.

Conclusions: Correct anatomical slab segmentation has a significant impact on FAZ size measurements. Not adjusting the segmentation boundaries represents a significant source of error for measuring FAZ area and confounds comparisons across studies as well as OCTA devices. Copyright © 2018, Iranian Society of Ophthalmology. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Foveal avascular zone; Optical coherence tomography; Optical coherence tomography angiography; Slab segmentation

Introduction

The foveal avascular zone (FAZ), the capillary-free area within the macula, plays an important role for central vision.¹ Changes in the FAZ size can indicate alterations of the microcirculation state of the fovea.² This biomarker might

even have prognostic significance as enlargement of the FAZ, which can be seen in ischemic diseases such as diabetic retinopathy or retinal vein occlusion, and has been shown to be associated with poor visual outcome.^{3–5} Therefore, the adequate and precise measurement of FAZ dimensions is of clinical interest.

During the last 50 years, fundus fluorescein angiography (FA) has been the most popular method to evaluate the retinal capillary perfusion and to obtain FAZ measurements.⁶ However, FA is an invasive operation and requires intravenous administration of the contrast agent fluorescein, for which adverse reactions have been reported. Hence, follow-up

Disclosure: No funding was received. The authors do not have any commercial or proprietary interests related to this work.

* Corresponding author: RatzeburgerAllee 160, 23538 Lübeck, Germany.

E-mail address: eye.research101@gmail.com (F. Rommel).

Peer review under responsibility of the Iranian Society of Ophthalmology.

<https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.02.001>

2452-2325/Copyright © 2018, Iranian Society of Ophthalmology. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

examinations to monitor and compare FAZ over time are difficult to obtain.

The introduction of optical coherence tomography (OCT) after the turn of the millennium has revolutionized retinal imaging.⁷ OCT has become an established non-invasive technique for providing rapidly performed, high-resolution, cross-sectional images of the posterior pole. As OCT devices became faster over time, it is now possible to create flow maps of the retinal microvasculature non-invasively by discrimination of static and non-static (erythrocyte motion) signals. This technological extension is known as OCT angiography (OCTA).⁸

By now, several devices are commercially available and have been evaluated for image quality, speed, and reproducibility, which are all important characteristics. Moreover, these devices have been assessed with regard to correct segmentation of the different capillary plexus within the retina.⁹ Herein, we investigated the impact of correct anatomical slab segmentation on FAZ dimensions in the superficial capillary plexus (SCP) as well as deep capillary plexus (DCP) in eyes of healthy adults.

Methods

A cross-sectional study was conducted during the period from March 2017 until May 2017 to measure the FAZ area in healthy adults. The setup of our study was in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval by the Institutional Review Board (IRB) at the University of Lübeck (vote reference number 17-008) was given. Informed consent was obtained individually by each participant. Ethnically, all participants were Caucasian and underwent a thorough ophthalmologic examination including best corrected visual acuity (BCVA) in Snellen, slit-lamp biomicroscopy, and OCTA.

Only healthy participants with a BCVA of at least 20/25 and age-appropriate, normal ocular findings without prior ophthalmic surgery were included in our study. Furthermore, the maximal permissible spherical and cylindrical aberration was ± 2 and ± 1 diopters (D), respectively.

OCTA was performed using the Canon HS-100 (Angio eXpert, OCTA Version 2.0, Tokyo, Japan) without prior pupil dilatation, and 5×5 mm macular scans of both eyes were acquired. The device functions at a rate of 70,000 A-scans per second and offers an axial optical resolution of 3 μm . The scanning laser ophthalmoscopy (SLO)-assisted tracking allows better image quality with reduced motion artifacts.

After acquisition, all images were automatically segmented (AS) according to the manufacturer's default settings as well as manually segmented (MS) according to the anatomical-based recommendations published by Spaide and Curcio in all B-scans (Table 1 and Fig. 1).⁹

The FAZ area was manually measured in mm^2 by two experienced graders (F.R. and M.K.) in every OCTA image (MS and AS) using the built-in measurement tool of the device. The outline of the innermost macular arcades was manually marked, and the integrated software automatically calculated the enclosed area. The graders were allowed to

Table 1
Automated and manual segmentation strategies including segmentation values.

	Reference	Vascular plexus	Slab boundary	Anatomic basis	Offset ^a (μm)
Automatically segmented (AS)	Angio eXpert V2.0	Superficial	Top	ILM	+50
			Bottom	GCL	
		Deep	Bottom	IPL	
Manually segmented (MS)	Spaide and Curcio	Superficial	Top	ILM	-10
			Middle	IPL	
		Deep	Bottom	IPL	
			Top	OPL	
				OPL	

GCL: Ganglion cell layer; ILM: Internal limiting membrane; IPL: Inner plexiform layer; OPL: Outer plexiform layer.

^a Offset is the number of μm below (+) or above (-) stated anatomic structure.

adjust the brightness and contrast of the images to optimize the measurements.

Data were analyzed using IBM SPSS (Version 24.0, Chicago, IL, USA). The Shapiro-Wilk test was used to check for normality of all obtained data. Inter-rater agreement between OCTA graders was evaluated using concordance correlation coefficient (CCC). Finally, we correlated the various FAZ measurements among each other as well as the foveal thickness by Spearman's correlation analysis. Age- and gender-specific differences were analyzed by linear regression and Mann-Whitney *U* test. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

A total of 38 eyes from 20 healthy adult subjects were included in this cross-sectional study. These eyes had no relevant artefacts for measurement of FAZ. However, two eyes had to be excluded due to motion artefacts which did not allow adequate measurement of the FAZ. Demographics as well as central retinal thickness (CRT) measurements are reported in Table 2.

FAZ measurements for the respective plexus and segmentation are listed in Table 3. Based on the Shapiro-Wilk test, our data did not show a normal distribution. Therefore, non-parametric analyses were performed.

In AS measurements, the FAZ in the deep plexus was significantly larger than in the superficial one ($P = 0.027$), whereas in MS measurements, it was the reverse ($P < 0.001$). While the FAZ in the superficial plexus was quantified significantly larger in MS measurements than in the AS ones ($P < 0.001$), the FAZ in the deep plexus was measured significantly smaller ($P = 0.010$).

Evaluating FAZ measurements of both graders with regard to inter-rater reliability by CCC analysis showed that the agreement was the highest for the AS measurements of the FAZ in the superficial plexus and the lowest for the MS measurements of the FAZ in the superficial plexus (Table 4).

Correlating the FAZ measurements among each other, we noted a very strong positive correlation between FAZ AS-Superficial and AS-Deep ($r = 0.88$; $P < 0.01$) as well as a

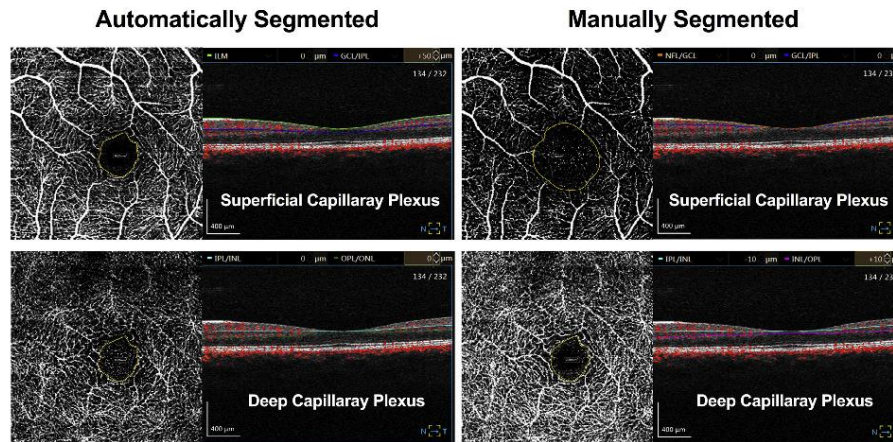


Fig. 1. Optical coherence tomography angiography (OCTA) images of the respective plexus based on the particular slab segmentation.

Table 2
Demographics and optical coherence tomography (OCT) measurements.

Parameter	Mean \pm SD	Median (Min; Max)
Age (years)	30.66 \pm 7.92	28.5 (23; 55)
Sex (F/M)	12 (60%)/8 (40%)	
Central Retinal Thickness (CRT) (μ m)	278 \pm 26	277 (246; 347)

F: Female; M: Male; SD: Standard deviation.

strong positive correlation between FAZ MS-Superficial and MS-Deep ($r = 0.61$; $P < 0.01$) in the same eye (Table 5).

Comparing values based on the slab segmentation, a strong positive correlation between FAZ AS-Superficial and MS-Superficial ($r = 0.63$; $P < 0.01$) as well as a very strong positive correlation between FAZ AS-Deep and MS-Deep ($r = 0.8$; $P < 0.01$) was found.

With regard to foveal thickness, all FAZ measurements showed a significant negative correlation (Table 6).

Age-dependent linear regression analysis revealed that the older the individual, the bigger the FAZ area (Table 7). However, only measurements of the deep retinal plexus showed a statistically significant correlation.

Gender-specific analysis showed that female individuals had a significantly greater FAZ than male individuals for both retinal plexus independent of the applied segmentation protocol (Table 8).

Discussion

Various studies have characterized the FAZ size and shape in healthy people using OCTA.^{10–13} All of these studies used the manufacturer's default settings for slab segmentation into SCP and DCP. However, Spaide and Curcio recently pointed out that the default settings of the commonly used OCTA manufacturers incorrectly segment the central macula of normal eyes.⁹ As a consequence, images of the SCP and DCP within the central macula are not accurately characterized. Furthermore, Ghasemi Falavarjani et al. also highlighted the relevance of slab segmentation on OCTA measurements.¹⁴ Therefore, we aimed at evaluating the impact of correct anatomical segmentation on findings of previous OCTA studies with regard to FAZ dimensions.

Interestingly, previous studies reported the FAZ in the SCP to be smaller than in the DCP. Yet, histological sections of

Table 3
Optical coherence tomography angiography (OCTA) foveal avascular zone (FAZ) dimensions.

FAZ superficial plexus (mm^2)	AS	MS	Wilcoxon signed rank test
Mean \pm SD	0.294 \pm 0.099	0.668 \pm 0.239	$P < 0.001$
Median (Min; Max)	0.275 (0.13; 0.53)	0.650 (0.25; 1.19)	
FAZ deep plexus (mm^2)	AS	MS	Wilcoxon signed rank test
Mean \pm SD	0.317 \pm 0.119	0.285 \pm 0.108	$P = 0.010$
Median (Min; Max)	0.313 (0.10; 0.53)	0.273 (0.08; 0.49)	
Wilcoxon signed rank test	$P = 0.027$	$P < 0.001$	

FAZ: Foveal avascular zone; AS: Automatically segmented; MS: Manually segmented.

Table 4
Inter-rater agreement as concordance correlation coefficient (CCC), Grader 1 vs. Grader 2.

FAZ		Grader 1	Grader 2	CCC	95% CI
AS	Superficial plexus (mm ²)	0.314 ± 0.110	0.274 ± 0.095	0.811	0.686 to 0.889
	Deep plexus (mm ²)	0.310 (0.08; 0.61)	0.255 (0.12; 0.49)	0.630	0.439 to 0.767
MS	Superficial plexus (mm ²)	0.354 ± 0.141	0.281 ± 0.113	0.483	0.204 to 0.689
	Deep plexus (mm ²)	0.340 (0.06; 0.68)	0.295 (0.08; 0.50)	0.732	0.557 to 0.844
		0.639 ± 0.276	0.697 ± 0.277		
		0.615 (0.15; 1.35)	0.660 (0.20; 1.37)		
		0.264 ± 0.110	0.306 ± 0.117		
		0.245 (0.06; 0.46)	0.300 (0.07; 0.55)		

FAZ: Foveal avascular zone; AS: Automatically segmented; MS: Manually segmented; CCC: Concordance correlation coefficient; CI: Confidence interval.

Table 5
Spearman correlation analysis of foveal avascular zone (FAZ) measurements in the same eye.

FAZ area measurements	FAZ area measurements	Correlation coefficient (P-value)
AS-Superficial	AS-Deep	0.88 (P < 0.01)
MS-Superficial	MS-Deep	0.61 (P < 0.01)
AS-Superficial	MS-Superficial	0.63 (P < 0.01)
AS-Deep	MS-Deep	0.80 (P < 0.01)

FAZ: Foveal avascular zone; AS: Automatically segmented; MS: Manually segmented.

Table 6
Spearman correlation analysis of foveal thickness and foveal avascular zone (FAZ) measurements in the same eye.

Foveal thickness correlated to	Correlation coefficient (P-value)
FAZ AS-Superficial	-0.822 (P < 0.01)
FAZ MS-Superficial	-0.585 (P < 0.01)
FAZ AS-Deep	-0.718 (P < 0.01)
FAZ MS-Deep	-0.791 (P < 0.01)

FAZ: Foveal avascular zone; AS: Automatically segmented; MS: Manually segmented.

Table 7
Age-dependent linear regression analysis.

FAZ area measurements	Regression coefficient (P-value)
AS-Superficial	0.297 (0.49)
MS-Superficial	0.207 (0.60)
AS-Deep	0.735 (0.03)
MS-Deep	0.693 (0.04)

FAZ: Foveal avascular zone; AS: Automatically segmented; MS: Manually segmented.

human and macaque eyes clearly indicate that the terminations of the DCP reach further into the center than those of the SCP.^{9,15} Therefore, the FAZ in the SCP should be larger than in the DCP as seen in our study after manual segmentation.

Our data suggests that the mean FAZ area ranges from 0.639 ± 0.276 mm² (Grader 1) to 0.697 ± 0.277 mm² (Grader 2) in the SCP and from 0.264 ± 0.110 mm² (Grader 1) to 0.306 ± 0.117 mm² (Grader 2) in the DCP. The CCC revealed that adjusting the slab segmentation according to correct anatomical boundaries resulted in more disagreement (0.811–0.483) between the two graders with regard to the

FAZ in the SCP. Based on the morphology and shape of inner retinal layers the borders of the FAZ in the SCP are not well defined. As the thickness of retinal layers containing the DCP is not as much affected by the existence of the foveal pit, the FAZ in the DCP can be measured more easily. Since the automated slab segmentation according to manufacturer's default settings considers varying amounts of the DCP to be within the SCP, the inter-rater agreement was much higher. In the future, a grader-independent, automatic deep learning based approach for quantification of the FAZ in anatomically segmented slabs might improve reliability.

As it has been reported previously by Linderman et al., we found larger FAZ dimensions in females, although this is in contrast to data from Shahlaee et al.^{11,16}

Similarly, our observation of an enlargement of the FAZ in the DCP with increasing age is in agreement with that of Iafe et al., but conflicts with the study of Tan et al.^{17,18} Age-related increase of the FAZ could be due to atrophic and occlusive changes in the macular capillaries. These differences could be due to different sex, age, and ethnical distribution.

Other studies have investigated the relationship of FAZ dimensions and foveal morphology. Tick et al. found a significant inverse correlation between FAZ dimensions and CRT using FA as well as OCT.¹ A similar correlation was found by Shahlaee et al. by OCTA.¹¹ The explanation is given through foveal development and the findings of Springer and Hendrickson, who suggested that the organization of foveal layers is influenced by FAZ size and intraocular pressure.^{19,20}

Still, it remains debatable whether the current OCTA nomenclature and grouping into two plexus should be reformed, as some recent studies revealed the presence of 2–4 distinct vascular plexuses in the retina, depending on location relative to the optic disc and fovea.^{21,22} Yet, others would recommend reporting a single FAZ using a full-thickness retinal slab, which will also be consistent with the original description of the FAZ on fluorescein angiogram, instead of separating individual capillary plexuses. However, until these considerations are incorporated into guidelines and taken into account by manufacturers, correct anatomical segmentation should be performed.

There are several important limitations to this study. The small number of patients and the narrow range of age are important limiting factors. Furthermore, manual measurement

Table 8
Gender-specific analysis.

FAZ (mm ²)	Female (23 eyes)		Male (15 eyes)		Mann-Whitney U Test
	Mean ± SD	Median (Min; Max)	Mean ± SD	Median (Min; Max)	
AS-Superficial	0.34 ± 0.09	0.33 (0.16; 0.53)	0.23 ± 0.06	0.23 (0.13; 0.33)	<i>P</i> < 0.01
MS-Superficial	0.75 ± 0.21	0.76 (0.38; 1.19)	0.54 ± 0.22	0.53 (0.25; 1.14)	<i>P</i> < 0.01
AS-Deep	0.37 ± 0.10	0.37 (0.20; 0.53)	0.24 ± 0.11	0.22 (0.10; 0.47)	<i>P</i> < 0.01
MS-Deep	0.33 ± 0.11	0.32 (0.08; 0.49)	0.22 ± 0.06	0.20 (0.14; 0.38)	<i>P</i> < 0.01

FAZ: Foveal avascular zone; As: Automatically segmented; MS: Manually segmented.

of the FAZ area might be subject to inter-grader variability, especially in the SCP because of poorly defined borders. Although not within the scope of the present study, accuracy of the FAZ measurements could have been optimized by taking axial length values into account and correcting image sizes.^{2,3}

In conclusion, we demonstrate that correct anatomical slab segmentation has a significant impact on FAZ size measurements. Not adjusting the segmentation boundaries represents a significant source of error for measuring FAZ area. While this may not be critical for longitudinal studies comparing multiple scans from one person, these errors limit the ability to compare or combine FAZ area measurements across studies and OCTA devices used.

Acknowledgement

The authors would like to thank “Eyeteq GmbH” for providing the “HS-100 OCT” device and “Canon Europe” for evaluating the “Angio eXpert” OCTA module.

References

1. Tick S, Rossant F, Ghorbel I, et al. Foveal shape and structure in a normal population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(8):5105–5110.
2. Tan PEZ, Yu PK, Balaratnasingam C, et al. Quantitative confocal imaging of the retinal microvasculature in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5728–5736.
3. Minnella AM, Savastano MC, Federici M, Falsini B, Caporossi A. Superficial and deep vascular structure of the retina in diabetic macular ischaemia: OCT angiography. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. September 2016. <https://doi.org/10.1111/aos.13099> [Epub ahead of print].
4. Casselholmde Salles M, Kvanta A, Amrén U, Epstein D. Optical coherence tomography angiography in central retinal vein occlusion: correlation between the foveal avascular zone and visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(9):OCT242-246.
5. Balaratnasingam C, Inoue M, Ahn S, et al. Visual acuity is correlated with the area of the foveal avascular zone in diabetic retinopathy and retinal vein occlusion. *Ophthalmology.* 2016;123(11):2352–2367.
6. Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation.* 1961;24:82–86.
7. Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, et al. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Opt Lett.* 1993;18(21):1864–1866.
8. Kashani AH, Chen CL, Gahm JK, et al. Optical coherence tomography angiography: a comprehensive review of current methods and clinical applications. *Prog Retin Eye Res.* 2017;60:66–100.
9. Spaide RF, Curcio CA. Evaluation of segmentation of the superficial and deep vascular layers of the retina by optical coherence tomography angiography instruments in normal eyes. *JAMA Ophthalmol.* 2017;135(3):259–262.
10. Hussain N, Hussain A. Diametric measurement of foveal avascular zone in healthy young adults using optical coherence tomography angiography. *Int J Retina Vitreol.* 2016;2:27.
11. Shahlaee A, Pefkianaki M, Hsu J, Ho AC. Measurement of foveal avascular zone dimensions and its reliability in healthy eyes using optical coherence tomography angiography. *Am J Ophthalmol.* 2016;161:50–55.e1.
12. Shiihara H, Otsuka H, Terasaki H, et al. Reproducibility and differences in area of foveal avascular zone measured by three different optical coherence tomographic angiography instruments. *Sci Rep.* 2017;7(1):9853.
13. Ghassemi F, Mirshahi R, Bazvand F, Fadakar K, Faghihi H, Sabour S. The quantitative measurements of foveal avascular zone using optical coherence tomography angiography in normal volunteers. *J Curr Ophthalmol.* 2017;29(4):293–299.
14. Ghasemi Falavarjani K, Al-Sheikh M, Akil H, Satta SR. Image artefacts in swept-source optical coherence tomography angiography. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(5):564–568.
15. Snodderly DM, Weinhaus RS, Choi JC. Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1992;12(4):1169–1193.
16. Linderman R, Salmon AE, Strampe M, Russillo M, Khan J, Carroll J. Assessing the accuracy of foveal avascular zone measurements using optical coherence tomography angiography: segmentation and scaling. *Transl Vis Sci Technol.* 2017;6(3):16.
17. Iafe NA, Phasukkijwatana N, Chen X, Sarraf D. Retinal capillary density and foveal avascular zone area are age-dependent: quantitative analysis using optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(13):5780–5787.
18. Tan CS, Lim LW, Chow VS, et al. Optical coherence tomography angiography evaluation of the parafoveal vasculature and its relationship with ocular factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(9):OCT224-234.
19. Springer AD, Hendrickson AE. Development of the primate area of high acuity. 1. Use of finite element analysis models to identify mechanical variables affecting pit formation. *Vis Neurosci.* 2004;21(1):53–62.
20. Springer AD, Hendrickson AE. Development of the primate area of high acuity. 2. Quantitative morphological changes associated with retinal and pars plana growth. *Vis Neurosci.* 2004;21(5):775–790.
21. Garrity ST, Iafe NA, Phasukkijwatana N, Chen X, Sarraf D. Quantitative analysis of three distinct retinal capillary plexuses in healthy eyes using optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(12):5548–5555.
22. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, et al. Detailed vascular anatomy of the human retina by projection-resolved optical coherence tomography angiography. *Sci Rep.* 2017;7:42201.
23. Sampson DM, Gong P, An D, et al. Axial length variation impacts on superficial retinal vessel density and foveal avascular zone area measurements using optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(7):3065–3072.

ORIGINAL ARTICLE

Open Access



Mapping diurnal variations in choroidal sublayer perfusion in patients with idiopathic epiretinal membrane: an optical coherence tomography angiography study

Felix Rommel^{1,2*} , Fynn Siegfried², Jan A. M. Sochurek², Matthias Rothe^{1,2}, Max P. Brinkmann², Maximilian Kurz^{1,2}, Michelle Prasuhn^{1,2}, Salvatore Grisanti¹ and Mahdy Ranjbar^{1,2}

Abstract

Background: Optical coherence tomography angiography (OCTA) is a non-invasive tool for imaging and quantifying the choroidal vasculature and perfusion state. In this index study, OCTA was used to investigate diurnal changes in choroidal sublayer perfusion in eyes with idiopathic epiretinal membrane (ERM) and to identify impacting factors.

Methods: A prospective study was conducted on volunteers with symptomatic ERM, each of whom underwent repeated measurements of subfoveal choroidal thickness (SFCT) using enhanced-depth imaging optical coherence tomography and perfusion of choroidal vascular sublayers using OCTA at 7 a.m., 12 p.m., 4 p.m., and 8 p.m. Possible interactions between diurnal variations and other factors, such as gender and age, were evaluated.

Results: A total of 21 eyes of 21 participants (mean age 72.43 ± 7.06 years) were analysed. A significant pattern of diurnal variation was observed for SFCT ($p = 0.008$) as well as perfusion of Haller's layer (HLP; $p = 0.001$). SFCT and HLP both demonstrated a quadratic relation to time of the day, decreasing from morning to afternoon, before increasing again in the evening. No significant differences with regard to gender or age were detectable.

Conclusion: OCTA-based analysis of choroidal sublayer perfusion demonstrated significant diurnal variations in patients with symptomatic ERM, which are quite different from changes reported in healthy eyes. Therefore, it is important to account for time of day, when comparing longitudinal OCTA data.

Keywords: OCTA, Choroidal perfusion, Choriocapillaris, Sattler's layer, Haller's layer, Diurnal variation, Epiretinal membrane

Introduction

The choroid plays an important role in the pathogenesis of various diseases in the eye. Changes in choroidal thickness and its amount of vascularization have been found in diseases like age-related macular degeneration, central serous chorioretinopathy or diabetic retinopathy [1, 2]. With the recent development of OCTA the vascular network of the choroid can be assessed in vivo and in real

time by creating slab-segmented angiograms [3]. Several OCTA-based studies already reported differences in choriocapillaris perfusion (CCP) in ocular diseases [4–7].

Diurnal variations have previously been shown for intraocular pressure (IOP), axial length (AL) and subfoveal choroidal thickness (SFCT). These studies reported a significantly thicker SFCT in the morning than in the evening [8, 9]. In choroidal substructure analysis, Gabriel et al. [10] demonstrated that Sattler's layer (SL), but not Haller's layer (HL) thickness is subject to diurnal changes. Recently the first OCTA-based study showed diurnal variation of CCP similar to subfoveal choroidal

*Correspondence: felixrommel@gmail.com

¹ Department of Ophthalmology, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

thickness, being higher in the morning and lower in the evening [11].

ERM is a common disease in elderly people leading to structural changes of the macular architecture causing variable loss of visual acuity and metamorphopsia [12]. The ERM forms along the surface of the internal limiting membrane (ILM), causing vertical traction with thickening of the macula, as well as tangential forces dragging the retina from its original position and displacing the vessels [13, 14]. Yu et al. [15] demonstrated reduced CCP in patients suffering from ERM using OCTA. Furthermore several OCT- and OCTA-based studies revealed significant changes in choroidal thickness as well as perfusion following vitrectomy with ERM-ILM peeling [7, 15–17].

While SFCT in general, and CCP have become important focus in research, little is known about characteristics of SL perfusion (SLP) and HL perfusion (HLP). In this study we aimed to evaluate diurnal variations of SFCT and choroidal sublayer perfusion in patients with ERM.

Methods

Participants for this prospective observational study were recruited from the Department of Ophthalmology at the University of Lübeck. The study was approved by the institutional review board and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects received detailed information about the study and written informed consent was obtained individually by each participant before enrolment. Only eyes with idiopathic, symptomatic ERM affecting the fovea as validated via SD-OCT and presence of metamorphopsia, which were scheduled for surgery on the next day were included. The contralateral eye was unaffected or did also present with ERM or was subject to ERM surgery in the past and did not undergo further investigation. Any other history of ocular or cardiovascular disease, antihypertensive drug use, as well as diabetes mellitus was defined as exclusion criteria. Ethnically all participants were Caucasian and they underwent a thorough examination including blood pressure (BP), refraction, best-corrected visual acuity (BCVA) in Snellen, IOP, AL, slit-lamp biomicroscopy, macular EDI-OCT as well as OCTA. The maximum permissible spherical and cylindrical aberration was ± 3 and ± 1 diopters respectively.

Imaging was performed on all subjects without prior pupil dilatation using the HS-100 (Canon, Tokyo, Japan) OCT/OCTA device at 7 a.m., 12 p.m., 4 p.m. and 8 p.m. by a single, trained operator. Each imaging session included EDI-OCT scans ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) and OCTA ($3 \times 3 \text{ mm}^2$) volumetric scans of the posterior pole. The HS-100 device works with a modified full-spectrum

amplitude decorrelation algorithm to generate flow maps. Only images of high quality without motion artifacts were accepted to guarantee standardized analysis.

SFCT was measured manually in EDI-OCT scans just below the fovea, extending perpendicularly from the hyperreflective Bruch's membrane layer to the inner scleral border. Manual measurements were performed by at least two experienced graders (FR, MRo and MPB) who were blinded to the clinical information of the examined eyes.

After acquisition, OCTA data were manually segmented in all B-scans to get 20 μm slabs of CC (Fig. 1a), SL (Fig. 1b) and HL (Fig. 1c) according to previous published protocols [10, 18, 19]. Each en face image was exported into ImageJ (NIH, Version 1.48b, Bethesda, USA) and binarized by the Otsu method, which is an automatic threshold selection from grey-level histograms, to determine the percentage of white and black pixels [20]. As suggested by Nicolò et al., CCP was calculated by scoring the percentage of white pixels, while for SLP and HLP the percentage of black pixels was taken into account [19].

Statistical analyses were performed using IBM SPSS (Version 24.0, Chicago, IL, USA) and Prism GraphPad (Version 8.0, La Jolla, CA, USA). BCVA measurements in decimal Snellen were converted to logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR). Mean arterial pressure (MAP) was calculated based on systolic and diastolic BP ($2/3$ diastolic BP + $1/3$ systolic BP). The Shapiro–Wilk test was used to check for normality of all obtained data. Diurnal changes in MAP, IOP, SFCT, CCP, SLP and HLP were evaluated using a repeated measures multivariate analysis of variance (MANOVA). A two-way mixed-model MANOVA was performed to investigate age- as well as gender-dependent interactions. For all tests values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

A total of 21 eyes of 21 patients with ERM were included in the analysis. Demographic and clinical data are reported in Table 1.

Overall analysis showed statistically significant diurnal changes [$F(18, 156.05) = 2.56, p = 0.001, \text{partial } \eta^2 = 0.216$]. Univariate analysis with Greenhouse–Geisser correction indicated significant diurnal variations for SFCT [$F(2.45, 48.91) = 4.79, p = 0.008, \text{partial } \eta^2 = 0.193$] and HLP [$F(1.98, 39.64) = 8.33, p = 0.001, \text{partial } \eta^2 = 0.294$]. SFCT was found to be the thickest in the morning ($269.76 \pm 86.73 \mu\text{m}$), declining until afternoon ($252.17 \pm 81.57 \mu\text{m}$) before increasing slightly in the evening again ($262.76 \pm 80.45 \mu\text{m}$) (Fig. 2c). HLP showed similar diurnal variation with the highest perfusion state in the morning ($73.6 \pm 11.07\%$), decreasing

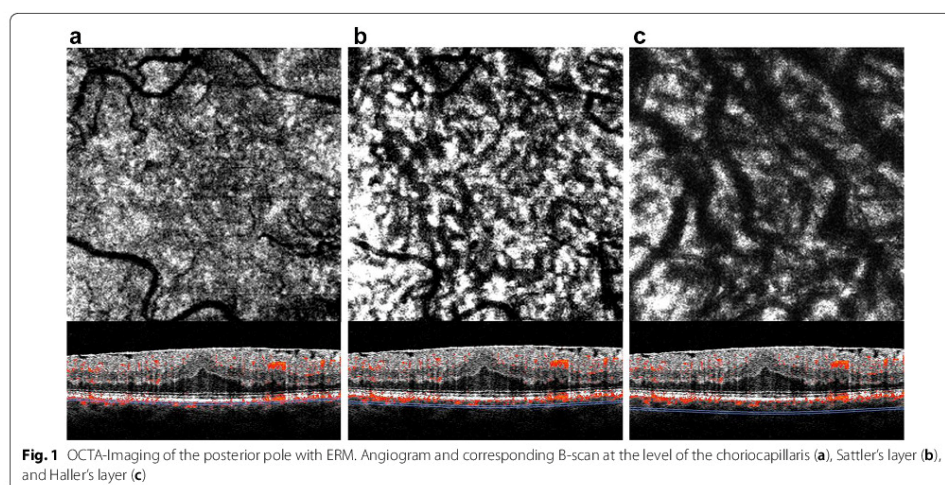


Fig. 1 OCTA-Imaging of the posterior pole with ERM. Angiogram and corresponding B-scan at the level of the choriocapillaris (a), Sattler's layer (b), and Haller's layer (c)

Table 1 Demographic and clinical data

Parameter	Mean ± SD	Median (min; max)
Age (years)	72.43 ± 7.06	74 (56; 86)
Sex (F/M)	13 (61.9%)/8 (38.1%)	
Axial length (mm)	23.75 ± 1.01	23.75 (21.9; 25.54)
BCVA (logMAR)	0.33 ± 0.21	0.3 (0.1; 1.0)

F female, M male, SD standard deviation, BCVA best-corrected visual acuity

until afternoon ($70.53 \pm 12.29\%$) and increasing marginally in the evening ($71.17 \pm 12.59\%$) (Fig. 2f). MAP [F(2.49, 49.80) = 0.94, $p = 0.416$, partial $\eta^2 = 0.045$], IOP [F(2.60, 52) = 0.64, $p = 0.574$, partial $\eta^2 = 0.031$] as well as CCP [F(2.38, 47.49) = 2.29, $p = 0.104$, partial $\eta^2 = 0.103$] and SLP [F(2.46, 49.21) = 1.37, $p = 0.264$, partial $\eta^2 = 0.064$] did not show significant diurnal fluctuations (Fig. 1a, b, d, e).

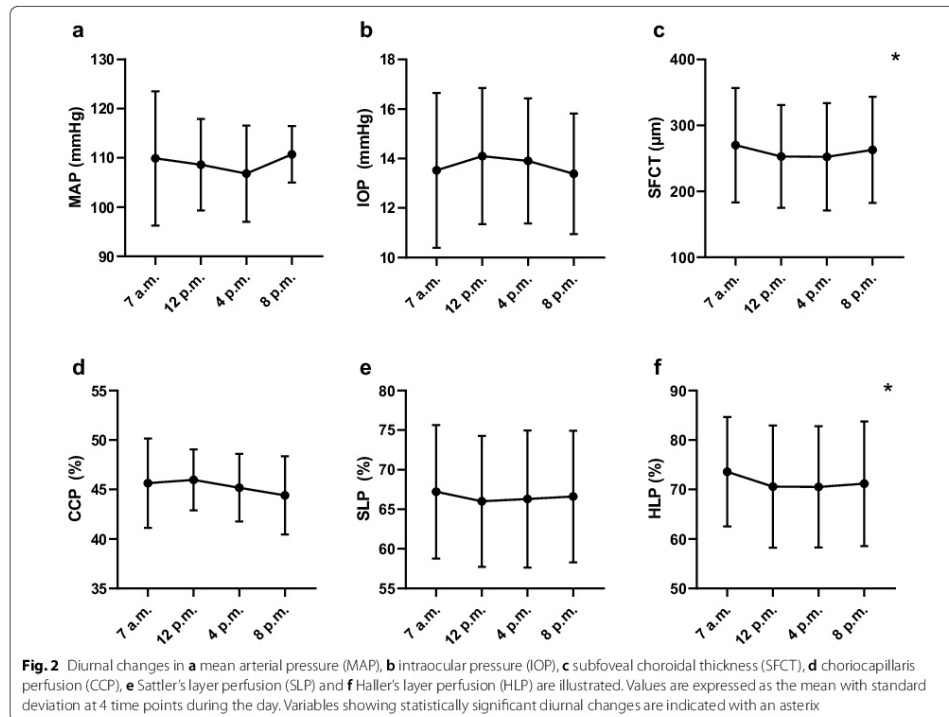
Mixed-model MANOVA did not reveal any significant interaction between gender and time of day as both genders showed significant diurnal changes in choroidal characteristics [F(18, 147.56) = 2.58, $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.227$]. Univariate analyses with Greenhouse–Geisser correction demonstrated significant diurnal fluctuations for SFCT [F(2.47, 46.89) = 3.85, $p = 0.021$, partial $\eta^2 = 0.169$] and HLP [F(2.03, 38.62) = 9.22, $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.327$] for both genders, but not for CCP [F(2.32, 44.11) = 2.26, $p = 0.109$, partial $\eta^2 = 0.106$] and SLP [F(2.39, 45.38) = 1.71, $p = 0.188$, partial $\eta^2 = 0.082$].

Further analysis did not reveal any significant interaction between age (≤ 75 years vs. >75 years) and time of the day as both age groups showed significant diurnal changes [F(18, 147.56) = 3.11, $p < 0.001$, partial $\eta^2 = 0.262$]. Univariate analyses with Greenhouse–Geisser correction demonstrated significant diurnal fluctuations for SFCT [F(2.58, 47.11) = 4.79, $p = 0.008$, partial $\eta^2 = 0.201$] and HLP [F(2.02, 38.34) = 8.79, $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.316$] for both age groups, but not for CCP [F(2.52, 47.95) = 2.62, $p = 0.071$, partial $\eta^2 = 0.121$] and SLP [F(2.44, 46.34) = 1.13, $p = 0.341$, partial $\eta^2 = 0.056$].

Discussion

This OCTA-based study demonstrated significant diurnal variations in SFCT and HLP in subjects with ERM. SFCT and HLP both showed a quadratic relation to time of the day, decreasing from morning to afternoon, before slightly increasing again in the evening. Previous investigations have shown diurnal variations in SFCT and choroidal perfusion in subjects without any ocular disease, but to our knowledge this is the first study demonstrating diurnal changes in choroidal metrics in eyes with ERM [8, 9, 21].

In healthy subjects a progressive decrease in SFCT during the day is reported. Tan et al. found significant circadian changes in SFCT with the highest thickness at 9 a.m., linear decreasing to the latest time point (5 p.m.) [9]. A similar pattern was observed by Usui et al. demonstrating a thinning of the SFCT during the day and a thickening in the night [21]. Our study also demonstrated



significant diurnal changes of SFCT in subjects with ERM with thinning during the day, but thickness increase from afternoon to evening.

The influence of ERM on choroidal thickness has been described by Michalewska et al., who demonstrated a decrease of SFCT 3 month after vitrectomy with ERM removal and ILM peeling [16]. They even hypothesized that generalized vascular changes and increased SFCT may contribute to the formation of ERMs. However the present study emphasized the influence of ERM on SFCT by changes on the usual diurnal pattern of SFCT. It seems likely that the anteroposterior and tangential forces due to ERM create retinal traction and distortion with choroidal involvement as well.

Recently Sarwar et al. [11] published the first study evaluating diurnal changes in CCP by using OCTA. They reported a significant decrease of vessel flow density in CC from 9 a.m. to 6 p.m. The change in CCP also correlated positively with change in SFCT. However, the authors drew their conclusion based on the evaluation of only two time points during the day. Thereby they

might have missed out on other changes of CC blood flow during the day. Furthermore they did not evaluate SLP and HLP, as, to the best of our knowledge, so far diurnal changes in choroidal sublayer perfusion have not been evaluated using OCTA. Nevertheless we did not observe diurnal variation in CCP over four time points. From this we conclude that ERM seems to have significant influence on the blood flow at least in CC. Yu et al. support these findings as they reported a reduced CCP in ERM eyes compared to the unaffected fellow eyes, which was reversible by surgery [15]. Likewise, Chen et al. [7] reported reduced CCP in ERM eyes, but without a significant increase after surgery. The authors assumed different vessel distortion in retina and choroid by ERM-associated traction. Vessels in the superficial and deep capillary plexus seem to expand due to the centripetal force of ERM, which may subsequently influence the microvasculature in CC. This would be a possible explanation for the suspended diurnal variation of CCP in ERM eyes. It remains unclear to what extent ERM-associated traction influences the microvasculature in SL and

HL, since the vessel size increases from CC to HL [18]. To the best of our knowledge this is the first study reporting significant diurnal changes of HLP in subjects with ERM, but not for CCP and SLP.

Since choroidal vessels seem to have some autoregulatory capacity, the influence of MAP must be taken into account [21]. While Straubhaar et al. did not report significant influence of MAP on the choroidal laser doppler flowmetry parameters, several reports demonstrated the dependence of choroidal blood flow on MAP and even IOP [22–24]. However, in the current study we did not observe significant diurnal changes neither in MAP, nor in IOP.

Previous studies also demonstrated gender-dependent differences in SFCT. This could be explained by the finding of androgen as well as estrogen receptors in the choroid [25, 26]. In our study we did not find any significant differences in choroidal metrics between female and male, as both genders equally showed significant diurnal changes in SFCT and HLP. This could be due to our older subjects (mean age: 72.43), as the hormonal status, especially with regards to sex hormones, changes during aging [27].

Capillaries are subject to age-related morphological and functional changes, such as decreasing vessel density and diameter as well as vascular stiffening and restricted autoregulation [28, 29]. All of these findings may lead to fewer diurnal fluctuation of choroidal blood flow with increasing age. However, in our study we couldn't demonstrate any significant differences in choroidal metrics between subjects ≤ 75 years and subjects above, as they both showed significant diurnal variation in SFCT and HLP. From this one could draw conclusion that ERM could possibly influence the natural aging process of the choroid. Though, because of the narrow range of age and the nature of this elderly population, differences between age groups were not to be expected.

The present study has some limitations. As we only examined participants during daytime from 7 a.m. to 8 p.m., we may have missed out on important information of the choroidal perfusion during the night. Furthermore, the manual measurement of SFCT may represent a potential bias. To reduce this possible confounding factor, all measurements were performed in a masked fashion by two experienced graders and the average values were used for statistical analysis. In addition, subjects with ERM are prone to segmentation errors in OCTA, as ERM is erroneously interpreted as ILM, which are typically more prevalent in cases with a distinct and hyper reflective ERM [30]. Prior to quantitative analysis of retinal vessels in subjects with ERM, the corresponding B-scans should be checked for plausibility and segmentation errors must be manually corrected to avoid incorrect

measurements. However, the high contrast of the retinal pigment epithelium (RPE) allows a robust segmentation, thus segmentation errors don't play a significant role in analyses of the choroid. By using a single OCTA device our methodical approach is restricted as perfusion values differ from device to device, depending on hardware, segmentation, as well as software algorithm and it remains to be tested whether our finding of diurnal changes in choroidal sublayer perfusion in patients with ERM can be validated using various commercially available OCTA devices. In addition it should be noted that we only used the Otsu image processing algorithm and another algorithm might have led to a divergent outcome as it has been shown that algorithms do have different discriminatory abilities [31]. Finally, the sample size may represent a potential limiting factor leading to a mainly exploratory data analysis. Nevertheless, strong significant diurnal variations were found. To corroborate our findings, further studies with a larger number of participants will be necessary.

Conclusion

In conclusion, OCTA is becoming an important non-invasive tool for imaging and quantifying the choroidal vasculature and perfusion state. It is important to account for time of the day, when comparing longitudinal OCTA data of patients with ERM. The present study indicates an influence of ERM on the choroid in terms of changes in the usual diurnal pattern of SFCT and choroidal perfusion. Further studies are needed to assess, whether this finding might prove any significance in the pathophysiology of ERMs.

Abbreviations

AL: axial length; BCVA: best-corrected visual acuity; BP: blood pressure; CC: choriocapillaris; CCP: choriocapillaris perfusion; EDI-OCT: enhanced-depth imaging optical coherence tomography; ERM: epiretinal membrane; HL: Haller's layer; HLP: Haller's layer perfusion; ILM: internal limiting membrane; IOP: intraocular pressure; MANOVA: multivariate analysis of variance; MAP: mean arterial pressure; OCTA: optical coherence tomography angiography; SFCT: subfoveal choroidal thickness; SL: Sattler's layer; SLP: Sattler's layer perfusion.

Authors' contributions

FR: Study concept and design, acquisition of data, data analysis and interpretation, manuscript drafting. FS: acquisition of data, data analysis. JAMS: data analysis. MRo: Acquisition of data, data analysis and interpretation. MPB: Acquisition of data, data analysis and interpretation. MK: Acquisition of data, data analysis. MP: Acquisition of data, data analysis. SG: Analysis and interpretation, manuscript revision and final approval. MR: Study concept and design, manuscript revision, final approval. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Ophthalmology, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany. ² Laboratory for Angiogenesis and Ocular Cell Transplantation, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany.

Acknowledgements

The authors like to thank Burkhard Zander (Eyeteq, Lübeck, Germany) and Ori Zahavi (Canon Europe, Amstelveen, Netherlands) for technical support regarding the OCTA device.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval was given by the institutional review board at the University of Lübeck (vote reference number 17-008). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each subject before enrolment.

Funding

There was no funding received for this study.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 28 December 2018 Accepted: 29 March 2019

Published online: 21 May 2019

References

- Chung SE, Kang SW, Lee JH, Kim YT. Choroidal thickness in polypoidal choroidal vasculopathy and exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2011;118(5):840–5.
- Esmaelpour M, Brunner S, Ansari-Shahrezaei S, Shahrezaei SA, Nemetz S, Povazay B, et al. Choroidal thinning in diabetes type 1 detected by 3-dimensional 1060 nm optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(11):6803–9.
- Rommel F, Siegfried F, Kurz M, Brinkmann MP, Rothe M, Rudolf M, et al. Impact of correct anatomical slab segmentation on foveal avascular zone measurements by optical coherence tomography angiography in healthy adults. *J Curr Ophthalmol*. 2018;30(2):156–60.
- Alten F, Heiduschka P, Clemens CR, Eter N. Exploring choriocapillaris under reticular pseudodrusen using OCT-Angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(11):2165–73.
- Lauermann JL, Eter N, Alten F. Optical coherence tomography angiography offers new insights into choriocapillaris perfusion. *Ophthalmologica*. 2018;239(2–3):74–84.
- Costanzo E, Cohen SY, Miere A, Querques G, Capuano V, Semoun O, et al. Optical coherence tomography angiography in central serous chorioretinopathy. *J Ophthalmol*. 2015;2015:134783.
- Chen H, Chi W, Cai X, Deng Y, Jiang X, Wei Y, et al. Macular microvasculature features before and after vitrectomy in idiopathic macular epiretinal membrane: an OCT angiography analysis. *Eye Lond Engl*. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0272-3>.
- Chakraborty R, Read SA, Collins MJ. Diurnal variations in axial length, choroidal thickness, intraocular pressure, and ocular biometrics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5121–9.
- Tan CS, Ouyang Y, Ruiz H, Satta SR. Diurnal variation of choroidal thickness in normal, healthy subjects measured by spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(1):261–6.
- Gabriel M, Esmaelpour M, Shams-Mafi F, Hermann B, Zabihian B, Drexler W, et al. Mapping diurnal changes in choroidal, Haller's and Sattler's layer thickness using 3-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255(10):1957–63.
- Sarwar S, Hassan M, Soliman MK, Halim MS, Sadiq MA, Afridi R, et al. Diurnal variation of choriocapillaris vessel flow density in normal subjects measured using optical coherence tomography angiography. *Int J Retina Vitr*. 2018;4:37.
- Compera D, Entchev E, Haritoglou C, Scheler R, Mayer WJ, Wolf A, et al. Lamellar hole-associated epiretinal proliferation in comparison to epiretinal membranes of macular pseudoholes. *Am J Ophthalmol*. 2015;160(2):373.e1–384.e1.
- Dell'omo R, Cifariello F, Dell'omo E, De Lena A, Di Iorio R, Filippelli M, et al. Influence of retinal vessel printings on metamorphopsia and retinal architectural abnormalities in eyes with idiopathic macular epiretinal membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7803–11.
- Nellis P, Alten F, Clemens CR, Heiduschka P, Eter N. Quantification of changes in foveal capillary architecture caused by idiopathic epiretinal membrane using OCT angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255(7):1319–24.
- Yu Y, Teng Y, Gao M, Liu X, Chen J, Liu W. Quantitative choriocapillaris perfusion before and after vitrectomy in idiopathic epiretinal membrane by optical coherence tomography angiography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2017;48(11):906–15.
- Michalewska Z, Michalewski J, Adelman RA, Zawislak E, Nawrocki J. Choroidal thickness measured with swept source optical coherence tomography before and after vitrectomy with internal limiting membrane peeling for idiopathic epiretinal membranes. *Retina*. 2015;35(3):487–91.
- Rizzo S, Savastano A, Finocchio L, Savastano MC, Khandelwal N, Agrawal R. Choroidal vascularity index changes after vitreomacular surgery. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 2018;96(8):e950–5.
- Esmaelpour M, Kajić V, Zabihian B, Othara R, Ansari-Shahrezaei S, Kellner L, et al. Choroidal Haller's and Sattler's layer thickness measurement using 3-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e99690.
- Nicolò M, Rosa R, Musetti D, Musolino M, Saccheggiani M, Traverso CE. Choroidal vascular flow area in central serous chorioretinopathy using swept-source optical coherence tomography angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(4):2002–10.
- Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1979;9(1):62–6.
- Usui S, Ikuno Y, Akiba M, Maruko I, Sekiryu T, Nishida K, et al. Circadian changes in subfoveal choroidal thickness and the relationship with circulatory factors in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):2300–7.
- Straubhaar M, Orgül S, Gugleta K, Schötzau A, Erb C, Flammer J. Choroidal laser Doppler flowmetry in healthy subjects. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(2):211–5.
- Riva CE, Titze P, Hero M, Movaffaghy A, Petrig BL. Choroidal blood flow during isometric exercises. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(11):2338–43.
- Polska E, Simader C, Weigert G, Doelmeier A, Kolodjaschna J, Scharmann O, et al. Regulation of choroidal blood flow during combined changes in intraocular pressure and arterial blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(8):3768–74.
- Grieshaber MC, Staub J-J, Flammer J. The potential role of testosterone in central serous chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(1):118–9.
- Lee SW, Yu S-Y, Seo KH, Kim ES, Kwak HW. Diurnal variation in choroidal thickness in relation to sex, axial length, and baseline choroidal thickness in healthy Korean subjects. *Retina*. 2014;34(2):385–93.
- Gurvich C, Hoy K, Thomas N, Kulkarni J. Sex differences and the influence of sex hormones on cognition through adulthood and the aging process. *Brain Sci*. 2018;8(9):163.
- Strait JB, Lakatta EG. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin*. 2012;8(1):143–64.
- Moreira-Neto CA, Moulton EM, Fujimoto JG, Waheed NK, Ferrara D. Choriocapillaris loss in advanced age-related macular degeneration. *J Ophthalmol*. 2018;2018:8125267.
- Lauermann JL, Woetzel AK, Treder M, Alnawaiseh M, Clemens CR, Eter N, et al. Prevalences of segmentation errors and motion artifacts in OCT-angiography differ among retinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018;256(10):1807–16.
- Rabiolo A, Gelormini F, Sacconi R, Cicinelli MV, Triolo G, Bettin P, et al. Comparison methods to quantify macular and peripapillary vessel density in optical coherence tomography angiography. *PLoS ONE*. 2018;13(10):e0205773.



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Ranjbar
Klinik für Augenheilkunde

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Grisanti, Direktor der Klinik für Augenheilkunde

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-008
Datum: 09. Februar 2017

Sitzung der Ethik-Kommission am 02. Februar 2017

Antragsteller: Herr Dr. Ranjbar

Titel: Darstellung von Gefäßen des Auges mittels optisch Kohärenztomographie-gestützter Angiographie


Sehr geehrter Herr Dr. Ranjbar,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.
Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de).
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

- Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
- Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
- Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
- Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
- Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
- Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
- Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

- Frau Martini (Caritas)
- Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
- Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
- Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
- Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
- Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)

Von: Jan Sochurek [jan.sochurek@mailbox.org]
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 11:21
An: Ranjbar, Mahdy
Betreff: Re: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Ich bestätige.

Von meinem Telefon gesendet

Am 28.05.2019 um 11:19 schrieb "Mahdy.Ranjbar@uksh.de" <Mahdy.Ranjbar@uksh.de>:

Liebe Ko-Autoren,

Für das anstehende Promotionsverfahren meines Doktoranden Fynn Siegfried müssten wir einmal bestätigen, dass er maßgeblich an der Durchführung der Studie, der Datensammlung und Auswertung sowie an der Verfassung des Artikels (Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography) beteiligt war. Seinem Beitrag hierfür entsprechend wurde er als Erstautor unseres gemeinsamen Artikels gelistet. Dazu würde ich Euch bitten auf diese E-Mail mit einem kurzen „ich bestätige“ zu antworten.

Mit Dank im Voraus

Mahdy

M Ranjbar MD
Deputy Director
Department of Ophthalmology
University of Lübeck

[Save the Date Logo]

[UKSH logo]

Von: Rommel, Felix
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 12:09
An: Ranjbar, Mahdy
Betreff: AW: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Ich bestätige.
VG

Dr. med. Felix Rommel
Klinik für Augenheilkunde
UKSH - Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Von: Ranjbar, Mahdy
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 11:19
An: Rommel, Felix; Rothe, Matthias; max.brinkmann@gmx.de; jan.sochurek@mailbox.org; Josephine.Freitag@stud.mh-hannover.de; Grisanti, Salvatore
Cc: Fynn.Siegfried@gmx.net
Betreff: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Liebe Ko-Autoren,

Für das anstehende Promotionsverfahren meines Doktoranden Fynn Siegfried müssten wir einmal bestätigen, dass er maßgeblich an der Durchführung der Studie, der Datensammlung und Auswertung sowie an der Verfassung des Artikels (Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography) beteiligt war. Seinem Beitrag hierfür entsprechend wurde er als Erstautor unseres gemeinsamen Artikels gelistet. Dazu würde ich Euch bitten auf diese E-Mail mit einem kurzen „ich bestätige“ zu antworten.

Mit Dank im Voraus

Mahdy

M Ranjbar MD
Deputy Director
Department of Ophthalmology
University of Lübeck
[UKSH logo]

Von: Rothe, Matthias
Gesendet: Sonntag, 2. Juni 2019 14:24
An: Ranjbar, Mahdy
Betreff: AW: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

ich bestätige

Von: Ranjbar, Mahdy
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 11:19
An: Rommel, Felix; Rothe, Matthias; max.brinkmann@gmx.de; jan.sochurek@mailbox.org; Josephine.Freitag@stud.mh-hannover.de; Grisanti, Salvatore
Cc: Fynn.Siegfried@gmx.net
Betreff: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Liebe Ko-Autoren,

Für das anstehende Promotionsverfahren meines Doktoranden Fynn Siegfried müssten wir einmal bestätigen, dass er maßgeblich an der Durchführung der Studie, der Datensammlung und Auswertung sowie an der Verfassung des Artikels (Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography) beteiligt war. Seinem Beitrag hierfür entsprechend wurde er als Erstautor unseres gemeinsamen Artikels gelistet. Dazu würde ich Euch bitten auf diese E-Mail mit einem kurzen „ich bestätige“ zu antworten.

Mit Dank im Voraus

Mahdy

M Ranjbar MD
Deputy Director
Department of Ophthalmology
University of Lübeck
[UKSH logo]

Von: Grisanti, Salvatore
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 17:55
An: Ranjbar, Mahdy
Betreff: AW: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Ich bestätige

Mit freundlichen Grüßen,

Prof. Dr. med. S. Grisanti

UK
SH

Prof. Dr. Salvatore Grisanti
Direktor / Professor and Chairman
Klinik für Augenheilkunde / Department of Ophthalmology
Universität zu Lübeck
UKSH – Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Tel: 0451 - 500 43900
Fax: 0451 - 500 43904

Von: Ranjbar, Mahdy
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 11:19
An: Rommel, Felix; Rothe, Matthias; max.brinkmann@gmx.de; jan.sochurek@mailbox.org; Josephine.Freitag@stud.mh-hannover.de; Grisanti, Salvatore
Cc: Fynn.Siegfried@gmx.net
Betreff: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Liebe Ko-Autoren,

Für das anstehende Promotionsverfahren meines Doktoranden Fynn Siegfried müssten wir einmal bestätigen, dass er maßgeblich an der Durchführung der Studie, der Datensammlung und Auswertung sowie an der Verfassung des Artikels (Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography) beteiligt war. Seinem Beitrag hierfür entsprechend wurde er als Erstautor unseres gemeinsamen Artikels gelistet. Dazu würde ich Euch bitten auf diese E-Mail mit einem kurzen „ich bestätige“ zu antworten.

Mit Dank im Voraus

Mahdy

Von: Max Brinkmann [max.brinkmann@gmx.de]
Gesendet: Dienstag, 28. Mai 2019 11:44
An: Ranjbar, Mahdy
Betreff: Re: Acta Artikel 2019 Promotionsverfahren

Ich bestätige!

Besten Gruß

Max Brinkmann

Am 28.05.2019 um 11:19 schrieb "Mahdy.Ranjbar@uksh.de" <Mahdy.Ranjbar@uksh.de>:

Liebe Ko-Autoren,

Für das anstehende Promotionsverfahren meines Doktoranden Fynn Siegfried müssten wir einmal bestätigen, dass er maßgeblich an der Durchführung der Studie, der Datensammlung und Auswertung sowie an der Verfassung des Artikels (Evaluating diurnal changes in choroidal sublayer perfusion using optical coherence tomography angiography) beteiligt war. Seinem Beitrag hierfür entsprechend wurde er als Erstautor unseres gemeinsamen Artikels gelistet. Dazu würde ich Euch bitten auf diese E-Mail mit einem kurzen „ich bestätige“ zu antworten.

Mit Dank im Voraus

Mahdy

M Ranjbar MD
Deputy Director
Department of Ophthalmology
University of Lübeck

[Save the Date Logo]

[UKSH logo]

7 Danksagungen

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck durchzuführen.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Mahdy Ranjbar für die Bereitstellung des Themas, die Einarbeitung in die OCTA, die Unterstützung bei der Arbeit, den Publikationen sowie für die Ratschläge und die Betreuung während der gesamten Zeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Felix Rommel für seine Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen, der Organisation der Studienpatienten sowie der fachlichen Hilfestellung.

Herzlichst möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern bedanken, da sie mich in jeder Hinsicht unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Fynn Sebastian Siegfried

30.05.1988

Lübeck



Ausbildung

- | | |
|-------------|--|
| 2007 | Abitur
<i>Geschwister-Prenski-Schule, Lübeck</i> |
| 2008 - 2011 | Ausbildung zum Rettungsassistenten
<i>Johanniter Unfall Hilfe, Lübeck</i> |
| 2014 - 2020 | Studium der Humanmedizin
<i>Universität zu Lübeck</i> |
| 2017 - 2020 | Doktorand an der Klinik für Augenheilkunde
<i>Universität zu Lübeck</i> |

Praktische Erfahrung

- | | |
|-------------|---|
| 2011 - 2014 | Hauptamtlicher Mitarbeiter im Rettungsdienst
<i>Johanniter Unfall Hilfe, Lübeck</i> |
| 2017 - 2019 | Famulaturen
<i>Internist (Praxis Dr. Daus, Lübeck)</i>
<i>Augenheilkunde (Universität zu Lübeck, Lübeck)</i>
<i>Geriatric (DRK Geriatric Krankenhaus, Lübeck)</i>
<i>Innere Medizin (Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster)</i> |
| 2019 - 2020 | Praktisches Jahr
<i>Chirurgie (DRK Krankenhaus, Grevesmühlen)</i>
<i>Innere Medizin (Sanaklinikum Lübeck, Lübeck)</i>
<i>Allgemeinmedizin (Praxis Dr. Tilse, Lübeck)</i> |