

Aus dem
Department für Augenheilkunde Tübingen
Forschungsinstitut für Augenheilkunde

**Normwerte Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Antworten in
der Chromatischen Pupillencampimetrie für das
Erwachsenenalter**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Jendritza, Ricarda Berenike

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Kelbsch
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schaeffel

Tag der Disputation: 29.04.2025

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	12
1.1 Einführung in die Chromatische Pupillencampimetrie (CPC).....	12
1.1.1 Geschichte der Pupillographie und Entwicklung der Pupillencampimetrie	13
1.2 Aktueller Forschungsstand und klinische Anwendung der CPC	16
1.2.1 CPC bei hereditären retinalen Dystrophien	17
1.2.2 CPC bei Erkrankungen der Makula	18
1.2.3 CPC in der Erforschung der Seh- und Pupillenbahn.....	18
1.2.4 CPC bei hereditären Optikusneuropathien	19
1.3 Pupillenlichtreaktion (PLR)	19
1.3.1 Afferenz der PLR	20
1.3.2 Efferenz der PLR	22
1.3.3 Retrogenikuläre und kortikale Beteiligung an der PLR	22
1.3.4 Vegetative und medikamentöse Auswirkungen auf die Pupille	23
1.4 Forschungsziel	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Studiendesign und Studienkollektiv.....	25
2.2 Chromatische Pupillencampimetrie	26
2.2.1 Geräteaufbau der CPC.....	27
2.2.2 Software der CPC.....	28
2.2.3 Photopische CPC (photCPC).....	28

2.2.4 Skotopische CPC (scotCPC)	31
2.3 Datensichtung	31
2.4 Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Studienkollektiv	35
3.2 Kenngrößen der PLR	36
3.2.1 Baseline	36
3.2.2 Latenzzeit.....	37
3.2.3 Absolute maximale Konstriktionsamplitude (absMCA)	41
3.2.4 Relative maximale Konstriktionsamplitude (relMCA)	45
3.2.5 Pupillary function volume und Steilheitsgrad des Hill of Vision	50
3.3 Einflussparameter auf die PLR.....	51
3.3.1 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die relMCA	52
3.3.2 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die Latenzzeit.....	54
3.3.3 Vergleich der Effekteinflüsse zwischen photCPC und scotCPC.....	56
3.4 Parameter ohne Einfluss auf die PLR	56
3.5 Test-Retest Reliabilität.....	56
3.6 Normdatenbank für die CPC	57
4. Diskussion	59
4.1 Veränderung des Pupillendurchmessers mit zunehmendem Alter	59
4.2 Auswirkung von überschwelliger Stimulation und retinalen Kompensationsmechanismen auf die Darstellung von Alterungsprozessen der Netzhaut in der CPC	60
4.3 Darstellung der retinalen Verteilungsmuster von Zapfen und Stäbchen in der CPC und Einfluss der Stimulusexzentrität auf die PLR	61
4.4 Unabhängigkeit der PLR von Irisfarbe und Geschlecht; morphologisch- funktionelle Diskrepanz zwischen Netzhautschichten und PLR.....	63

4.5 Klinisch nicht relevante Einflussfaktoren auf Zapfen- und Stäbchen-spezifische Antworten in der CPC	63
4.5.1 Stimulationsort im Gesichtsfeld.....	64
4.5.2 Jahres- und Tageszeit der Messung	64
4.6 Test-Retest Reliabilität für reIMCA und Latenzzeit.....	65
4.7 Normdaten Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Antworten in der CPC...	66
4.8 Schlussfolgerung.....	66
4.9 Limitationen	66
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Erklärungen zum Eigenanteil	77
8. Veröffentlichungen	79
Danksagung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Messvorrichtung der Chromatischen Pupillencampimetrie	27
Abbildung 2: Stimulationscharakteristika und Pupillogramme	30
Abbildung 3: Aufteilung der Studienteilnehmenden nach Altersgruppe	35
Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung des <i>Baseline</i> -Pupillendurchmessers.....	36
Abbildung 5: <i>Baseline</i> -Pupillendurchmesser mit zunehmendem Alter	37
Abbildung 6: Mittelwerte des relativen Pupillendurchmessers; <i>Hill of Vision</i>	50
Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung des <i>pupillary function volume</i> und Steilheitsgrades des <i>Hill of Vision</i>	51
Abbildung 8: Statistisch signifikante Beeinflussung der relMCA.....	53
Abbildung 9: Statistisch signifikante Beeinflussung der Latenzzeit	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der Studienteilnehmenden und Messzeitpunkte.....	35
Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der Latenzzeit nach Exzentrizität	38
Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der absMCA nach Exzentrizität	42
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der relMCA nach Exzentrizität	46
Tabelle 5: Normdaten für relMCA nach Exzentriziät, <i>pupillary function volume</i> und Steilheitsgrad des <i>Hill of Vision</i> in photCPC und scotCPC	57
Tabelle 6: Normdaten für die Latenzzeit in photCPC und scotCPC nach Exzentrizität und Alter <60/ ≥60 Jahre in der scotCPC	58

Abkürzungsverzeichnis

ABCA4	ATP binding cassette subfamily A member 4, ATP-bindende Kasette Unterfamilie A Mitglied 4
absMCA	absolute maximal constriction amplitude, absolute maximale Konstriktionsamplitude
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
BCVA	best corrected visual acuity, Sehschärfe bei bestmöglicher Korrektur
BEST1	Bestrophin 1
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cd	Candela
CGL	Corpus geniculatum laterale
cm	Zentimeter
CNGA3	cyclic nucleotide-gated channel alpha-3, zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal Alpha-3
CPC	Chromatische Pupillencampimetrie
CRB1	crumbs cell polarity complex component 1
deg, °	Grad
d.h.	das heißt
FWHM	full width at half maximum, volle Halbwertsbreite
GCL	ganglion cell layer, Ganglienzellschicht
GF	Gesichtsfeld
Hz	Hertz

ICC	intraclass correlation coefficient, Intraklassen-Korrelationskoeffizient
ID	Identifikationsnummer der Studienteilnehmenden
ipRGCs	intrinsic photosensitive retinal ganglion cells, intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen
KI	Konfidenzintervall
mfERG	multifokale Elektroretinographie
m ²	Quadratmeter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
mW	Milliwatt
n	Stichprobengröße
n.a.	not applicable, nicht anwendbar
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenztomographie
OLED	organic light emitting diode, organische Leuchtdiode
OPN	olivary pretectal nucleus, Nucleus pretectalis olivaris
ORL	outer retinal layer, äußere Netzhautschicht
p	Signifikanzwert
photCPC	photopische Chromatische Pupillencampimetrie
PIPR	post illumination pupil response, Post-Beleuchtungspupillenantwort
PLR	Pupillenlichtreaktion

reIMCA	relative maximal constriction amplitude, relative maximale Konstriktionsamplitude
RGCs	retinal ganglion cells, retinale Ganglienzellen
RNFL	retinal nerve fibre layer, retinale Nervenfaserschicht
RP	Retinitis pigmentosa
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kilodalton protein, retinales Pigmentepithel-spezifisches 65-Kilodalton-Protein
s	Sekunde
scotCPC	skotopische (scotopic) Chromatische Pupillencampimetrie
SD	Standardabweichung
u.a.	unter anderem
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

1.1 Einführung in die Chromatische Pupillencampimetrie (CPC)

Die Chromatische Pupillencampimetrie (CPC) ermöglicht durch retinotopie Stimulation die objektive Funktionsprüfung des Fotorezeptorsystems der Netzhaut anhand der Pupillenlichtreaktion (PLR) auf fokale Lichtreize. Die Methode bietet die Möglichkeit, unter Verwendung neuartiger Technik zur PLR-Messung die Funktionsweise der Netzhaut und der Sehbahn zu analysieren (Kelbsch et al., 2019a). Daher gewinnt die CPC in der Erforschung von Erkrankungen der Pupillen- und Sehbahn sowie der Netzhaut zunehmend an Bedeutung. Ebenso kann die Wirksamkeit neuartiger Therapien für Netzhauterkrankungen auf funktioneller Ebene untersucht werden (siehe Kapitel 1.2 Aktueller Forschungsstand und klinische Anwendung der CPC).

Bislang ist die klassische Perimetrie der klinische Goldstandard zur Beurteilung der Funktion der Fotorezeptoren und der nachgeschalteten Sehbahn im Rahmen von Gesichtsfelddefekten. Die hierbei wichtige subjektive Wahrnehmung und konzentrierte Mitarbeit der Patient:innen ist in der CPC weitgehend nicht relevant. Da die PLR unwillkürlich abläuft und in der CPC mit einer Infrarotkamera messbar ist, steht eine die Patient:innen wenig beanspruchende und kontaktlose Untersuchungsmethode zur Verfügung (Stingl et al., 2018). Auf einem Flachbildschirm (Pupillenperimetrie: Halbkugel) werden in ca. 40 cm Entfernung zum Auge definierte, farbige Stimuli an verschiedenen Lokalisationen im Gesichtsfeld (GF) präsentiert und mit einer Infrarotkamera die PLR aufgenommen. Eine spezielle Software erkennt die Pupille und kann den Pupillendurchmesser kontinuierlich aufzeichnen. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.2 Chromatische Pupillencampimetrie. Mithilfe eines Algorithmus zur Blickrichtungsanalyse (*gaze-tracking*) und gegebenenfalls

Anpassung der Stimulusposition bei abweichender Blickrichtung während der Messung kann selbst bei starker Beeinträchtigung des Sehens und Fixationsschwierigkeiten eine valide retinotopie Stimulation (Stingl et al., 2018) erreicht werden. Dies ist ebenfalls ein Vorteil gegenüber der multifokalen Elektroretinographie (mfERG), die zur Prüfung der fokalen Zapfenfunktion angewandt wird (Hood et al., 2003). Mithilfe der CPC kann selbst bei fortgeschrittener Netzhautdegeneration die Funktion der Netzhaut beurteilt werden. Hier ist eine differenzierte Untersuchung der verbliebenen Netzhautfunktion mit konventionellen ophthalmologischen Untersuchungsmethoden oft nicht möglich oder nicht verwertbar.

Mithilfe unterschiedlicher, spezifischer Messprotokolle können mit der CPC selektiv Zapfen und Stäbchen (Kelbsch et al., 2019a, Stingl et al., 2021) an definierten Orten der Netzhaut, z.B. in der Fovea oder verteilt in den vier Quadranten bis 30° Exzentrizität, stimuliert werden. Zur Erforschung der Melanopsin sensitiven intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglienzellen (ipRGCs) wurden Ganzfeld-Stimuli mit entsprechenden Stimuluseigenschaften eingesetzt (Kelbsch et al., 2016). Auch spezifische Fragestellungen zum Einfluss zentraler und peripherer Stimulation sowie Summationseffekten auf die PLR (Sonntag et al., 2022) und das Verhalten der Pupille während anhaltender Lichtexposition (Ausprägung des *Escape*-Phänomen) (Kelbsch et al., 2023a) können mit speziell hierfür angepassten Messprotokollen untersucht werden. Aus der resultierenden PLR können bestimmte Kenngrößen als Biomarker zur Charakterisierung der lokalen Netzhautfunktion definiert werden.

1.1.1 Geschichte der Pupillographie und Entwicklung der Pupillencampimetrie

1888 beschrieben Hermann Cohn und Claude Du Bois-Reymond erstmals Fotografien mit einem sehr kurzen Magnesiumblitz, mit dem die Pupille weitestgehend dilatiert fotografiert werden konnte. Bis zu dieser Zeit konnte die Pupille lediglich unter Lichteinfall und dadurch bedingter Miosis betrachtet

werden. Später wurde der Magnesiumblitz durch mechanisch oder elektrisch hervorgerufene Lichtblitze ersetzt (Loewenfeld, 1993b, S. 847).

Das erste Gerät, um kontinuierlich die PLR mithilfe eines photosensitiven Papierstreifens aufzuzeichnen, wurde 1885 von L. Bellarminoff erfunden. Die Methode besaß allerdings noch einige Nachteile in Bezug auf Augenbewegungen und die Auswertung der Messergebnisse. 1905 zeichnete Karl Weiler mit einer an sein Pupillenmessgerät angebrachten Kamera erstmals bewegte Bilder der Pupille auf, sodass die zeitliche Komponente von Veränderungen des Pupillendurchmessers erfasst werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt war noch sehr viel Licht für die Aufnahmen notwendig, sodass die PLR aufgrund der bereits bestehenden Pupillenverengung kaum aufgezeichnet werden konnte. In den 1920er Jahren verwendete Otto Löwenstein daher dunkle Glasfilter vor der Lichtquelle, die eine ausreichende Helligkeit für die Fotografie ermöglichten, jedoch eine weitestgehende Dilatation und Reagibilität der Pupille zuließen (Loewenfeld, 1993b, S. 853-864).

In den 1930er Jahren konnte erstmals Infrarotlicht sichtbar gemacht werden und Infrarotfilme wurden entwickelt. Dadurch war eine Beobachtung der Pupille möglich, obwohl sich die Person in vollständiger Dunkelheit befand. Infrarotlicht wird vom Irispigment sehr gut reflektiert, wodurch in der Abbildung ein guter Kontrast zwischen Pupille und Iris entsteht. Auch bei blauen Augen ist mit Infrarotlicht aufgrund des physiologischen Ektropiums des hinteren Pigmentepithels eine genaue Abgrenzung der Pupille von der Iris möglich (Loewenfeld, 1993b, S. 847-850).

1945-1947 wurde unter der Leitung von Irene Loewenfeld ein mechanisch-elektrisches Messgerät entwickelt, mit dem automatisiert der Pupillendurchmesser gemessen werden konnte und ein händisches Ausmessen auf Filmen nicht mehr notwendig war. Dennoch war die Methode weiterhin sehr zeitaufwändig und wurde schließlich 1957 durch ein vollelektrisches Gerät ersetzt. Bereits 1941 wurde von der Arbeitsgruppe um Hedwig und Karl Matthes das erste photometrische Gerät gebaut, mit dem die PLR aufgezeichnet werden konnte. Mit einem Fotoelement konnte das von der Iris reflektierte Infrarotlicht

aufgenommen und der entstehende Strom mithilfe eines Galvanometers aufgezeichnet werden. Da sich die Messvorrichtung direkt vor dem Auge befand, an dem die pupillometrische Messung vorgenommen werden sollte, wurde das Partnerauge belichtet und die konsensuelle Lichtreaktion gemessen. Das System war sehr gut geeignet für Messungen im zeitlichen Verlauf, ein Nachteil bestand jedoch in der räumlichen Messgenauigkeit. Auch der unterschiedliche Grad der Infrarotlichtreflexion je nach Stärke der Irispigmentierung kam hier zum Tragen und führte zu deutlich höheren Signalen bei der Pupillenkonstriktion in dunklen Augen (Loewenfeld, 1993b, S. 866-871).

Daher wurde in den Jahren 1954-1957 unter der Leitung von Otto Löwenstein und Irene Loewenfeld der Flying Spot Scanner entwickelt. Unter Verwendung eines Rasters von schmalen, an der Iris reflektierten Infrarotlichtstrahlen konnte elektronisch der Abschnitt mit der längsten Dunkelphase entsprechend des größten Pupillendurchmessers ausgewertet werden (Loewenfeld, 1993b, S. 875).

In den 1960er Jahren wurden schließlich TV-Scanverfahren entwickelt, die auf einem ähnlichen Prinzip wie der Flying Spot Scanner beruhten, mit denen der Pupillendurchmesser jedoch digital bestimmt werden konnte. Hierdurch wurde es möglich, die erhobenen Daten mit verschiedenen Programmen und Softwares online einzusehen, zu verarbeiten und mit anderen Datensätzen zu vergleichen. In den 1970er Jahren kamen erstmals TV-Pupillenperimeter mit Infrarotlicht zur Anwendung (Loewenfeld, 1993b, S. 887-894).

Mit der technischen Weiterentwicklung hielt die Pupillographie über die Augenheilkunde hinaus Einzug in viele verschiedene Forschungsbereiche. So öffneten sich neue Möglichkeiten der Schlafforschung mit der Aufzeichnung und Auswertung von Schläfrigkeitwellen, charakteristischen Veränderungen der spontanen Pupillenoszillationen, im Pupillographischen Schläfrigkeitstest (Wilhelm et al., 1996). Auch in der Psychologie und Psychiatrie wird die Aufzeichnung der autonom gesteuerten Veränderungen der Pupillenweite häufig zur Visualisierung emotionaler Prozesse genutzt, beispielsweise bei Depression (Stone et al., 2016). Die Analyse der post-illumination pupil response (PIPR) als

Marker für die Aktivität der ipRGCs (Gamlin et al., 2007) mithilfe der Chromatischen Pupillographie konnte anhand der reduzierten PIPR bei blauen Stimuli eine Schädigung der ipRGCs bei fortgeschrittenem Glaukom (Feigl et al., 2011) und auch in frühen Glaukomstadien (Adhikari et al., 2016) nachweisen. Die verringerte maximale Konstriktionsamplitude der PLR gab zusätzlich Hinweise auf eine beeinträchtigte neuronale Verschaltung zwischen den retinalen Fotorezeptoren und nachgeschalteten Ganglienzellen bei Glaukom (Kelbsch et al., 2016). In der Diagnostik funktioneller Gesichtsfeldausfälle sind die Pupillenperimetrie (Rajan et al., 2002) und multifokale Pupillenkampimetrie (Skorkovska et al., 2009a) wertvolle Methoden zur objektiven Einordnung des Krankheitsbildes.

Bei der Pupillenperimetrie werden Lichtreize in einer Halbkugel präsentiert, während die Patient:innen einen Punkt im Zentrum der Halbkugel fixieren und die PLR aufgezeichnet wird. Somit können bei veränderter PLR an bestimmten Lokalisationen Gesichtsfeldausfälle detektiert werden (Kardon et al., 1991). Ein Pupillencampimeter setzt sich aus einem Flachbildschirm zur Stimuluspräsentation und einer Infrarotkamera zur kontinuierlichen Aufnahme der Pupillenweite und der PLR zusammen (Schmid et al., 2000). Auf dem Bildschirm können sowohl Ganzfeld- als auch fokale Stimuli (Multifokale Pupillencampimetrie) sowie weiße oder farbige Stimuli (Chromatische Pupillencampimetrie) gezeigt werden.

1.2 Aktueller Forschungsstand und klinische Anwendung der CPC

Die CPC ist eine gut etablierte Methode und findet breite Anwendung in der klinischen Forschung unter anderem zu hereditären Netzhautdystrophien, Pathologien im Bereich der Sehbahn, der Physiologie der Pupille, sowie altersbedingter Makuladegeneration (AMD).

1.2.1 CPC bei hereditären retinalen Dystrophien

Mit der Auswertung der reduzierten Pupillenantworten in der Chromatischen Pupillometrie (rote und blaue Stimuli) (Skaat et al., 2013, Chibel et al., 2016) konnte bereits die Dysfunktion der Fotorezeptoren bei Patient:innen mit Retinitis pigmentosa (RP), einer erblichen Netzhautdegeneration, objektiviert werden. Vorangegangene Studien zeigten zudem den Nutzen der PLR bei chromatischer Ganzfeldstimulation für die Quantifizierung der verbliebenen Fotorezeptorfunktion bei Patient:innen mit *CNGA3*-assoziierter Achromatopsie, einer erblichen Farbsehschwäche aufgrund einer Zapfendysfunktion (Lisowska et al., 2017). Bei fortgeschrittener RP konnte trotz erloschenem Elektroretinogramm die stark reduzierte, jedoch noch vorhandene Fotorezeptorfunktion nachgewiesen werden (Kardon et al., 2011). Die Analyse der PIPR gab hierbei Hinweise auf die erhaltene und enthemmte Funktion der ipRGCs bei fortgeschrittener RP (Kelbsch et al., 2017a). Auch erkrankungsspezifisch bei RP aufgrund einer *RPE65*-Mutation (Lorenz et al., 2012) oder *CRB1*-Mutation (Stingl et al., 2019), konnte die Funktionsfähigkeit der Fotorezeptoren mithilfe der PLR spezifisch ausgewertet werden. Die CPC ermöglicht es sogar, den Therapieeffekt der subretinal applizierten Gentherapie Voretigene neparvovec (Luxturna®) auf die fokale Zapfen- und Stäbchenfunktion bei Patient:innen mit frühkindlicher Netzhautdystrophie aufgrund einer biallelischen Mutation im *RPE65*-Gen zu quantifizieren (Stingl et al., 2022b). Durch die Ergänzung sinusoidaler transkornealer Elektrostimulation kann die CPC zur objektiven Messung weiterer neurophysiologischer Aspekte der Netzhautfunktion verwendet werden. Hierbei können durch sinusoidale transkorneale Stimulation sinusoidale Pupillenantworten gemessen werden (Kelbsch et al., 2018). Zur Erforschung der residualen neuronalen Funktion bei Netzhautdegenerationen konnten Protokolle zur zellspezifischen transkornealen Elektrostimulation entwickelt (Jung et al., 2022) und in einem Patientenkollektiv mit Achromatopsie validiert und weiterentwickelt werden (Jung et al., 2023).

1.2.2 CPC bei Erkrankungen der Makula

Bei Patient:innen mit Morbus Best, einer erblich bedingten Makuladegeneration durch Mutation im *BEST1*-Gen, konnte mithilfe der Chromatischen Pupillometrie eine beeinträchtigte Funktion der retinalen Fotorezeptoren nachgewiesen werden (Ben Ner et al., 2019). Die CPC bietet aufgrund der retinotopen und Fotorezeptor-spezifischen Stimulation die Möglichkeit zur lokalen Bestimmung der Netzhautfunktion. Bei Patient:innen mit Morbus Stargardt, einer hereditären Makuladystrophie aufgrund von biallelischen Mutationen im *ABCA4*-Gen, konnte mit der CPC der Verlust des zentralen Sehvermögens mit einer reduzierten Zapfenfunktion in der Makula korreliert werden. Die Stäbchenfunktion war hierbei erhalten, wies jedoch Veränderungen in der Signalweiterleitung auf (Stingl et al., 2022a). Bei exsudativer AMD, einer Form der AMD mit Gefäßveränderungen und Ansammlung von Flüssigkeit im Bereich der Makula, zeigten bisherige Studien eine veränderte PLR (Sabeti et al., 2013) sowie Verbesserungen der Reaktionsdynamik bei multifokaler Pupillographie nach intravitrealer Applikation von Ranibizumab (Sabeti et al., 2012). Mithilfe der CPC konnte die beeinträchtigte Zapfenfunktion in der Fovea bei AMD nachgewiesen werden und aufgrund der Latenzdynamik eine Unterscheidung nach Krankheitsaktivität der AMD erfolgen (Kelbsch et al., 2020).

1.2.3 CPC in der Erforschung der Seh- und Pupillenbahn

Mit der Pupillenkampimetrie konnten unter Verwendung weißer Stimuli bereits Gesichtsfelddefekte aufgrund von Pathologien entlang der Sehbahn objektiviert (Schmid et al., 2005) und die retrogenikuläre Pupillenbahn weiter erforscht werden (Skorkovska et al., 2009b). Mithilfe spezifischer Eigenschaften von Ganzfeldstimuli konnten mit der chromatischen Pupillographie weitere Hinweise für das Vorhandensein einer okzipitalen – zusätzlich zu einer subkortikalen Pupillenbahn – erbracht werden (Maeda et al., 2017). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die subkortikale Pupillenbahn trotz Läsionen im dorsalen Mittelhirn weiterhin an der Signalverarbeitung der PLR beteiligt bleibt (Kelbsch et al., 2017b). Die CPC kann darüber hinaus den Einfluss prä- und postchiasmaler

Läsionen der Sehbahn auf die PLR untersuchen und anhand der PLR nicht betroffene Gesichtsfeldareale abgrenzen (Kelbsch et al., 2022).

1.2.4 CPC bei hereditären Optikusneuropathien

Bei Patient:innen mit mild bis moderat ausgeprägter Leberscher hereditärer Optikusneuropathie und Autosomal-dominanter Optikusatrophie mit deutlich reduziertem Visus und zentralen Skotomen konnten mit chromatischer Ganzfeld-Stimulation erhaltene Pupillenantworten auf Zapfen-, Stäbchen- und ipRGC-spezifische Reize nachgewiesen werden (Kawasaki et al., 2014). Hier ist noch weitere pupillographische Forschung zur Funktion der Fotorezeptoren und der Pupillenbahn bei hereditären Optikusneuropathien notwendig.

Die CPC und vergleichbare chromatische Pupillometer besitzen einen hohen Stellenwert für die Erforschung und als diagnostische Methode verschiedenster ophthalmologischer Erkrankungen. Sie stellen komplementäre objektive diagnostische Mittel zur morphologischen retinalen Bildgebung sowie zur elektrophysiologischen und psychophysischen Testung dar, um die lokale Netzhautfunktion sowohl im natürlichen Krankheitsverlauf als auch unter Therapie zu erfassen.

1.3 Pupillenlichtreaktion (PLR)

Die Pupille ermöglicht als Öffnung im Zentrum der Iris den Lichteinfall ins Auge. Physiologisch sind die Pupillen rund (Loewenfeld, 1993a, S. 3) und gleich weit (isokor) mit einem Durchmesser von 3-5 mm. Geringe Anisokorien sind ebenfalls physiologisch und häufig bei gesunden Personen zu finden. Diese geringen Unterschiede in der Pupillenweite können auch lediglich temporär bestehen (Lam et al., 1987). Die Weite der Pupille – und damit die ins Auge eintreffende Lichtmenge – wird durch die Umgebungshelligkeit und die Aktivität des sympathischen bzw. parasympathischen Nervensystems reguliert (siehe Kapitel 1.3.4 Vegetative und medikamentöse Auswirkungen auf die Pupille). Zusätzlich

kommt es während des Akkommodationsvorgangs zur Pupillenverengung, wodurch die Tiefenschärfe erhöht wird (Loewenfeld, 1993a, S. 295). Bei Dunkelheit kommt es zur Weitstellung der Pupille (Mydriasis) mit einem Pupillendurchmesser bis zu 8-8,5 mm (Loewenfeld, 1993a, S. 283) und bei Helligkeit zur Engstellung der Pupille (Miosis) mit einer Verringerung des Pupillendurchmessers auf ca. 2 mm (Mathot, 2018).

Der Pupillendurchmesser nimmt mit zunehmendem Alter ab, während andere Eigenschaften wie das Geschlecht, die Irisfarbe oder die Refraktion keinen Einfluss auf den durchschnittlichen Pupillendurchmesser haben. Unter Gleichaltrigen besteht eine hohe interindividuelle Variabilität der Pupillenweite, die mit zunehmendem Lichteinfall ins Auge abnimmt (Winn et al., 1994).

Die unwillkürliche Verengung der Pupille auf einen Lichtreiz hin, bezeichnet als Pupillenlichtreaktion, besteht aus einem afferenten und einem efferenten Reflexbogen. Die Latenzzeit, die vom Beginn des Lichtreizes zum Durchlaufen dieser Pupillenbahn bis zum Beginn der Pupillenkonstriktion benötigt wird, ist von einigen Faktoren abhängig. Unter anderem sind hier der vorwiegend stimulierte Fotorezeptortyp und der Stimulationsort im Gesichtsfeld (Kelbsch et al., 2019a), sowie die Stimulusintensität und -fläche (Cibis et al., 1977) entscheidend. Je nach Stimulationscharakteristika kann eine Latenzzeit zwischen 220-500 ms ermittelt werden (Ellis, 1981).

1.3.1 Afferenz der PLR

Der Signalweg der PLR beginnt an den retinalen photosensitiven Zapfen, Stäbchen und ipRGCs. Unter photopischen Bedingungen sind für das Sehen und für die PLR die Signale der Zapfen ausschlaggebend. Den Zapfen dienen als Photopigment drei verschiedene Opsine mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima. Daher werden drei Zapfen-Typen klassifiziert: Blau-/K-Zapfen mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm, Grün-/M-Zapfen mit einem Absorptionsmaximum bei 530 nm und Rot-/L-Zapfen mit einem Absorptionsmaximum bei 560 nm. Unter skotopischen Bedingungen wird die

Lichtwahrnehmung und die PLR vorrangig von den Stäbchen mit einem Absorptionsmaximum um 500 nm vermittelt (Bowmaker and Dartnall, 1980).

IpRGCs machen ca. 0,2 % der retinalen Ganglienzellen (RGCs) aus (Dacey et al., 2005) und haben aufgrund der Expression von Melanopsin intrinsisch photosensitive Eigenschaften (Provencio et al., 2000). Zusätzlich erhalten sie über einen extrinsischen Signalweg Informationen von Zapfen und Stäbchen. Die Informationen aus dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg (Absorptionsmaximum bei 482 nm) werden unter anderem zum Nucleus pretectalis olivaris (OPN) weitergeleitet (Dacey et al., 2005). Somit sind ipRGCs wesentlich an der PLR beteiligt und ermöglichen den Erhalt der PLR selbst bei Verlust von Zapfen und Stäbchen (Lucas et al., 2001). Der Melanopsin-vermittelte Signalinput der ipRGCs ist verantwortlich für die PIPR, die teilweise aufrecht erhaltene Pupillenkonstriktion nach dem Ende des Stimulus, insbesondere nach hellen, blauen Stimuli (Gamlin et al., 2007). Des Weiteren sind ipRGCs über Projektionen zum Nucleus suprachiasmaticus für den Erhalt des zirkadianen Rhythmus' verantwortlich (Hattar et al., 2002). Über Projektionen zum Corpus geniculatum laterale (CGL) haben ipRGCs zusätzlich Einfluss auf die bewusste Sehwahrnehmung (Brown et al., 2010).

Das Signal der Zapfen und Stäbchen wird über Bipolarzellen (Boycott and Kolb, 1973), mit zusätzlicher Verschaltung des Stäbchen- mit dem Zapfensignalweg unter anderem über *Gap Junctions* (Kolb, 1977) und All-Amakrinzellen (Famiglietti and Kolb, 1975), zu den RGCs weitergeleitet (Dowling and Boycott, 1966). Die Axone der RGCs bilden den Nervus opticus (Goldberg and Coulombre, 1972), der sich im Verlauf mit dem Sehnerv der Gegenseite zum Chiasma opticum vereinigt und nach Kreuzung der nasalen Anteile in den beiden Tractus optici weiter verläuft (Jain et al., 2015). Ein Teil dieser Axone zweigt vor Erreichen des CGL von der Sehbahn ab und verläuft über den Colliculus superior (Perry and Cowey, 1984) zum OPN des dorsalen Mittelhirns. Hier erfolgt die Umschaltung auf Neurone, deren Axone zum ipsi- und kontralateralen Nucleus Edinger-Westphal (Gamlin and Clarke, 1995), einer parasymphatischen Kerngruppe dorsal des Nucleus oculomotorius (Horn et al., 2008), ziehen. Dies

ist die Grundlage der konsensuellen Lichtreaktion und der Isokorie beider Pupillen.

1.3.2 Efferenz der PLR

Die präganglionären, parasymphatischen Axone aus dem Nucleus Edinger-Westphal ziehen im Nervus oculomotorius zum Ganglion ciliare (May et al., 2020), in dem sie auf postganglionäre parasymphatische Neurone umgeschaltet werden. Deren Axone laufen als Nervi ciliares breves zum Musculus sphincter pupillae, durch dessen Tonuserhöhung die Konstriktion der Pupille bewirkt wird (Loewenfeld, 1993a, S. 264-273).

Die Pupillendilatation erfolgt über Nervenfasern aus dem Hypothalamus, die zum Centrum ciliospinale im Nucleus intermediolateralis im oberen Thorakalmark (C8-Th2) ziehen. Hier erfolgt die Umschaltung auf sympathische Neurone, deren präganglionäre Fasern entlang des Grenzstrangs zum Ganglion cervicale superius verlaufen. Von dort projizieren postganglionäre sympathische Nervenfasern zum Ganglion ciliare, durchlaufen dieses ohne Umschaltung und ziehen schließlich in den Nervi ciliares longi zum Musculus dilatator pupillae (Szabadi, 2018).

1.3.3 Retrogenikuläre und kortikale Beteiligung an der PLR

Mehrere Fallberichte zur beeinträchtigten Pupillenreaktion unter anderem bei parietooccipitalen oder temporalen Verletzungen (Harms, 1949), sowie Ischämien im Stromgebiet der Arteria cerebri posterior (Alexandridis et al., 1979), erbrachten starke Evidenz für das zusätzliche Vorliegen retrogenikulärer und kortikaler Strukturen, die an der PLR beteiligt sind. Dies konnte mithilfe neuerer pupillographischer Studien bestätigt werden, wie in Kapitel 1.2.3 CPC in der Erforschung der Seh- und Pupillenbahn beschrieben.

1.3.4 Vegetative und medikamentöse Auswirkungen auf die Pupille

Abgesehen von verschiedenen organischen Ursachen, die Veränderungen der Pupillenweite oder Störungen im Bereich der afferenten oder efferenten Pupillenbahn hervorrufen, haben zusätzlich die Aktivität des autonomen Nervensystems sowie einige Medikamente Einfluss auf die Pupille.

Während der Pupillendurchmesser mit zunehmender Schläfrigkeit sinkt und es zum Auftreten Schläfrigkeits-induzierter Oszillationen kommt (Wilhelm et al., 1998), führen verstärkte Aufmerksamkeit und kognitive Anstrengung (Hess and Polt, 1964), unerwartete Reize (Friedman et al., 1973), sowie Schmerzen (Tassorelli et al., 1995) durch verstärkte Sympathikusaktivität zur Pupillenerweiterung. Strukturelle Veränderungen sympathischer Nervenendigungen im Musculus dilatator pupillae (Ishikawa et al., 1985) im Rahmen einer diabetischen autonomen Neuropathie bewirken umgekehrt eine Verringerung des Pupillendurchmessers (Smith et al., 1978).

Medikamente, die inhibierend oder stimulierend an Rezeptoren der sympathischen oder parasympathischen Anteile des autonomen Nervensystems wirken, beeinflussen ebenfalls die Pupillenweite und die PLR. Eine Miosis wird durch Parasympathomimetika, z.B. bei topischer Applikation von Pilocarpin, und Sympatholytika wie beispielsweise Opiate (McKay and Larson, 2021) sowie Antihistaminika bedingt. Eine Weitstellung der Pupille erfolgt durch topische Medikamente wie das parasympatholytisch wirkende Tropicamid und systemische Medikamente wie bestimmte Antidepressiva (Bitsios et al., 1999), Parkinson-Medikamente und die sympathomimetische Wirkung von Psychostimulantien. Das Rauchen von Kokain (Jenkins et al., 2002) und die orale Einnahme von Cannabis (Newmeyer et al., 2017) bewirken ebenfalls eine Mydriasis. Eine Übersicht über den Einfluss verschiedener Medikamentenklassen mit Beispielen geben die „Standards in pupillography“ (Kelbsch et al., 2019b).

Mithilfe pupillographischer Methoden kann sowohl die medikamentenbedingte Änderung der Pupillenweite quantifiziert als auch die Wirkung auf das autonome Nervensystem bestimmt werden. Einflüsse auf den Parasympathikus spiegeln

sich vorwiegend in der Latenzzeit der PLR wider, das Ausmaß der Sympathikusaktivität in der Geschwindigkeit der Pupillendilatation (Wilhelm and Wilhelm, 2003).

1.4 Forschungsziel

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, epidemiologische und ophthalmologische Daten eines großen Kollektivs gesunder Personen zusammenzutragen, um den Einfluss personenbezogener Charakteristika und struktureller Eigenschaften des Auges, wie z.B. Irisfarbe oder Beschaffenheit der Netzhaut, auf die PLR zu bestimmen. Ausgehend hiervon sollte unter Berücksichtigung der relevanten Einflussfaktoren eine Normdatendatenbank für die PLR bei Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Stimulation in der CPC erstellt werden. Normdaten sind essenziell für die valide und vergleichbare Beurteilung der CPC-Befunde von Patient:innen im klinischen Alltag und ermöglichen die Etablierung von Kenngrößen der PLR als Biomarker für die lokale Netzhautfunktion.

Teile dieser Dissertationsschrift wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

2. Material und Methoden

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

2.1 Studiendesign und Studienkollektiv

Alle Studienteilnehmenden erhielten ausführliche Informationen über die Studie und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme und pseudonymisierten Verarbeitung der erhobenen Daten. Die Studie folgte den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt (775/2016B02 Amendment 2).

Es wurden 150 Freiwillige (94 Frauen) im Alter von 18 bis 79 Jahren (Median = 46 Jahre) in die Studie aufgenommen und in fünf etwa gleich große Altersgruppen eingeteilt: 18 bis 29 Jahre, 30 bis 39 Jahre, 40 bis 49 Jahre, 50 bis 59 Jahre und 60 bis 79 Jahre. Der Messzeitpunkt wurde nach Tageszeit in die Kategorien „Vormittag“ von 8 bis 12 Uhr und „Nachmittag“ von 12 bis 18 Uhr sowie nach Jahreszeit in „Sommer“ von April bis September und „Winter“ von Oktober bis März eingeteilt. Die Rekrutierung der Studienteilnehmenden erfolgte unter den Mitarbeitenden und im Umfeld des Departments für Augenheilkunde in Tübingen sowie der Eberhard Karls Universität Tübingen.

In der neuroophthalmologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik Tübingen erfolgte eine ausführliche Anamnese und augenärztliche Screening-Untersuchung. Die Untersuchung beinhaltete die Bestimmung der Refraktion, sowie der Sehschärfe (best corrected visual acuity, BCVA), eine optische Kohärenztomographie (OCT; Spectralis-OCT, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit Volumenaufnahme der Makularegion und Vermessung der peripapillären retinalen Nervenfaserschichtdicke (retinal nerve fibre layer, RNFL), den Swinging-Flashlight Test, sowie eine Spaltlampenuntersuchung und Funduskopie.

Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme waren ein Refraktionsfehler von mehr als ± 3 Dioptrien in Sphäre, Zylinder oder im sphärischen Äquivalent, eine BCVA geringer als 0,8, das Vorliegen einer Rotschwäche oder Rotblindheit, sowie Trübungen der optischen Medien z.B. durch fortgeschrittene Katarakt oder Hornhauttrübungen, Netzhauterkrankungen, Pupillenstörungen oder Erkrankungen des Sehnervs, z.B. bei Glaukom, sowie Diabetes mellitus mit krankheitsbedingten ophthalmologischen Veränderungen und/oder Vorliegen einer Polyneuropathie. Bei systemischer Einnahme von Medikamenten mit potenziellem Einfluss auf die Pupillenreaktion, wie u.a. Anticholinergika, Dopaminagonisten, trizyklische Antidepressiva, Antipsychotika und Antihistaminika (Kelbsch et al., 2019b), war ebenfalls keine Studienteilnahme möglich.

Nach klinischer Beurteilung wurde ein Auge bestimmt, das keine Ausschlusskriterien aufwies. Waren beide Augen gleichermaßen für die Studie geeignet, wurde randomisiert ein Auge ausgewählt, sodass annähernd die gleiche Gesamtzahl an rechten und linken Augen in der Studienkohorte vertreten war. Anschließend erfolgte am gewählten Auge eine 30° statische, schwellennah-überschwellige Gesichtsfelduntersuchung (Octopus 900, Haag-Streit International, Wedel, Deutschland). Bei Studieneignung folgte anschließend die CPC am Studienauge.

2.2 Chromatische Pupillencampimetrie

Hardware und Java™-basierte Software der CPC zur Aufnahme und Echtzeitberechnung des Pupillendurchmessers wurden am Department für Augenheilkunde in Tübingen entwickelt (Stingl et al., 2018) und in der dieser Studie zugrundeliegenden Version erstmals 2019 vorgestellt (Kelbsch et al., 2019a). In weiteren vorangegangenen Studien wurden die nachfolgend aufgeführten Stimulusprotokolle validiert (Kelbsch et al., 2020, Kelbsch et al., 2022, Stingl et al., 2022a, Stingl et al., 2022b). Für die vorliegende Studie wurden geringfügige Anpassungen vorgenommen. Das photopische Protokoll enthielt eine höhere Anzahl an Stimuluswiederholungen pro Lokalisation, um die

Messgenauigkeit zu optimieren, sowie eine geringere Stimulusdauer und Anzahl an Stimuluspositionen zur Verkürzung der Messdauer. Im photopischen und skotopischen Protokoll wurde die Latenzzeitberechnung optimiert. Genauere Erläuterungen hierzu finden sich in Kapitel 2.3 Datensichtung.

2.2.1 Geräteaufbau der CPC

Die Messungen fanden in einem dunklen, stillen Raum im Forschungsinstitut für Augenheilkunde des Departments für Augenheilkunde Tübingen statt. Auf einem höhenverstellbaren Tisch befand sich ein 55-Inch OLED-Monitor (LG OLED 55C7V; LG Electronics, Seoul, Südkorea; UHD 3840 x 2160 Pixel), vor dessen Unterrand eine Infrarotkamera (DMK23UV024, The Imaging Source GmbH; 50 mm TV Linse 1:1,8; zeitliche Auflösung 10 ms) befestigt war. Eine Kinn- und Stirnstütze war in 40 cm Entfernung senkrecht zur Mitte des Monitors positioniert. Die Infrarotkamera konnte horizontal nach rechts und links verschoben werden, um das Studienauge zentriert abzubilden. Das nicht untersuchte Auge wurde mit einer Augenklappe abgedeckt. Der Untersucher-Arbeitsplatz mit einem abgeschirmten Monitor befand sich seitlich der Messvorrichtung und ermöglichte eine kontinuierliche Überwachung von Infrarotbild, Blickposition, *gaze-tracking*, sowie Live-Aufzeichnung des Pupillogramms zur Qualitätssicherung (Kelbsch et al., 2019a) (*Abbildung 1*).

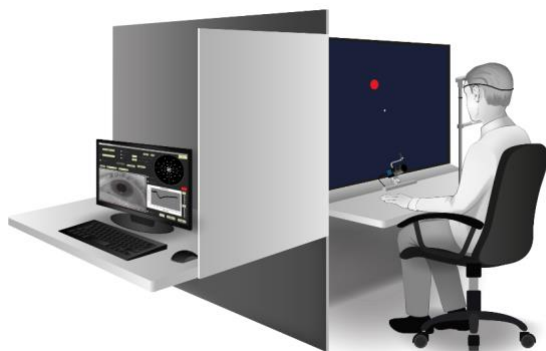


Abbildung 1: Messvorrichtung der Chromatischen Pupillencampimetrie. OLED-Monitor und Infrarotkamera in 40 cm Entfernung zum Studienaue, das kontralaterale Auge mit einer Augenklappe abgedeckt. Seitlich davon der abgeschirmte Untersucher-Arbeitsplatz zur Steuerung der Untersuchung.

2.2.2 Software der CPC

Mithilfe des intern entwickelten Algorithmus der Java™-basierten Software konnte die Pupille vom Bildhintergrund des Infrarotbildes differenziert, die Pupillenmitte bestimmt und der Pupillendurchmesser in Echtzeit berechnet werden. Im Zentrum des OLED-Monitors wurde ein schwacher Fixationspunkt (Radius 1° , Intensität $0,01 \text{ cd/m}^2$) präsentiert, der während der gesamten Messung fixiert werden sollte. Zunächst erfolgte die individuelle Einstellung der Tischhöhe, Kinn- und Stirnstütze und Ausrichtung der Infrarotkamera, sodass das Auge vollständig und zentriert von der Infrarotkamera erfasst, die Pupille möglichst konstant von der Software erkannt und ein eindeutiger, möglichst stabiler erster Purkinje-Reflex abgebildet werden konnte. Das *gaze-tracking* wurde anhand der Präsentation jeweils eines Lichtreizes in jedem Quadranten des Monitors, der von den Teilnehmenden für eine kurze Zeit fixiert werden sollte, individuell kalibriert. Anhand der Position der Pupillenmitte und des ersten Purkinje-Reflexes konnte mithilfe einer Transformationsmatrix die Blickrichtung einer Position auf dem Bildschirm zugeordnet werden. Das *gaze-tracking* ermöglichte die retinotopie Stimulation durch automatische Anpassung der Stimulusposition bei abweichender Fixation 10 ms vor Stimuluspräsentation, z.B. aufgrund kurzzeitig verringerter Konzentration auf den Fixationspunkt. Da die Erfassung der Blickrichtung von der zeitlichen Auflösung der Infrarotkamera abhängt, konnten in dieser Studie Blickrichtungsänderungen ab 10 ms Dauer berücksichtigt werden. Bei sehr starker Blickabweichung, sodass sich die berechnete Stimulusposition außerhalb des OLED-Monitors befand, wurde der jeweilige Stimulus zu einem späteren Zeitpunkt der Messung automatisch wiederholt (Stingl et al., 2018).

2.2.3 Photopische CPC (photCPC)

Das Messprotokoll der photopischen CPC (photCPC) beinhaltete einen schwach blau erleuchteten Hintergrund (Intensität $0,01 \text{ cd/m}^2$; Wellenlänge $460 \pm 30 \text{ nm}$ full width at half maximum [FWHM]; $\cong 2,1 \times 10^{-8} \text{ W}$) zur Normalisierung des Pupillendurchmessers mit einer gewissen Sättigung der Stäbchen bei möglichst

geringer Pupillenkonstriktion (Kelbsch et al., 2019a). Die Adaptationszeit an die Hintergrundhelligkeit während der Kalibrierung betrug etwa 2 Minuten.

Für eine möglichst selektive Stimulation der L-Zapfen wurden rote Stimuli (Radius 3° , Wellenlänge 620 ± 30 nm FWHM, Intensität 60 cd/m^2 , Leuchtdichte $8,2 \times 10^{-4} \text{ W/m}^2$, maximale Intensität $0,0148 \text{ mW/m}^2$; *Abbildung 2 oben links*) in zufälliger Reihenfolge an 33 Stimuluslokalisationen à vier Wiederholungen, konzentrisch um den Fixationspunkt angeordnet (0° , 3° , 6° , 12° , 20° , 30° Exzentrizität), präsentiert. Bei 3° und 6° Exzentrizität bestanden jeweils 4 Stimulationsorte, bei 12° , 20° und 30° Exzentrizität jeweils 8 Stimulationsorte (*Abbildung 2 Mitte links*). Die Stimulusdauer betrug 200 ms mit einem Interstimulusintervall vom Ende des Stimulus bis zum Beginn des nächsten Stimulus von 3,5 s. In den 500 ms vor Beginn eines Stimulus wurde der *Baseline*-Pupillendurchmesser ermittelt. Die Gesamtdauer eines Pupillogramms der photCPC betrug 3,7 s (500 ms *Baseline* + 200 ms Stimulus + 3 s Poststimulusintervall). Zusätzlich zu den vier protokollgemäßen Stimuluswiederholungen wurde ein Stimulus im Verlauf der Messung automatisch wiederholt, wenn der Pupillendurchmesser nach der PLR nicht mindestens 90% des vorangegangenen *Baseline*-Pupillendurchmessers erreichte. Ebenfalls wurde der Stimulus automatisch wiederholt, wenn länger als 300 ms in einem Zeitfenster von 1,5 s ab Beginn des Stimulus kein Pupillensignal detektiert werden konnte, z.B. aufgrund von starkem Blinzeln. Im Verlauf der Messung wurde im Fixationspunkt der Anteil der bereits verstrichenen Zeit an der Gesamtzeit der Messung als Tortendiagramm in etwas geringerer Helligkeit dargestellt. So erhielten die Studienteilnehmenden Rückmeldung zum Messfortschritt. Die Gesamtzeit der photCPC betrug ca. 8 Minuten ohne zusätzliche Stimuluswiederholungen bis zu maximal 15 Minuten bei schwierigeren Messbedingungen.

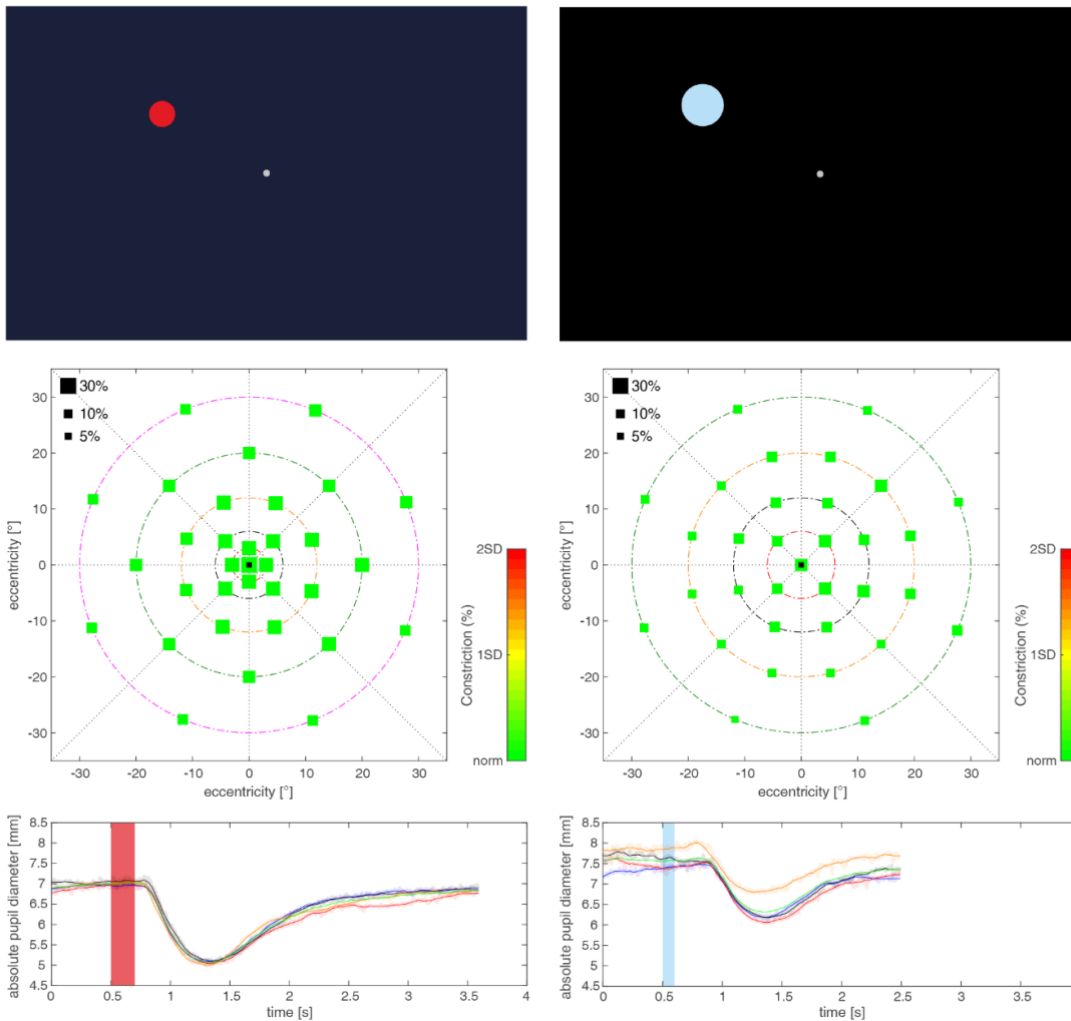


Abbildung 2 oben: Darstellung von Hintergrundbeleuchtung, Fixationspunkt und Stimuluseigenschaften anhand eines exemplarischen Stimulus während photCPC (linke Spalte) und scotCPC (rechte Spalte). Mitte: Koordinatensystem in MATLAB mit den 33 Stimuluslokalisationen, ID31, rechtes Auge. Die Größe der Quadrate zeigt die relMCA [%], die Farbe zeigt die Abweichung der relMCA vom Mittelwert der Studienkohorte (grün = Norm, gelb = -1 SD, rot: -2 SD). Unten: absoluter Pupillendurchmesser [mm] nach Zeit [s] für die vier Wiederholungen (orange, schwarz, rot und blau; grün = Mittelwert) des zentralen Stimulus (▪ im Koordinatensystem). Die Stimulusdauer ist durch den roten (0,5 - 0,7 s) und blauen (0,5 - 0,6 s) Balken gekennzeichnet. Abbildung 1 aus (Jendritza et al., 2024).

photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, ID = Identifikationsnummer der Studienteilnehmenden, relMCA = relative maximale Kontraktionsamplitude

2.2.4 Skotopische CPC (scotCPC)

In Vorbereitung auf die skotopische CPC (scotCPC) erfolgte eine 20-minütige Dunkeladaptation mit ausgeschaltetem OLED-Monitor und durch einen Rotfilter abgedecktem Monitor am Untersucher-Arbeitsplatz. Die Messvorrichtung sollte während der Dunkeladaptation nicht verstellt werden, um eine erneute Kalibrierung zu vermeiden. In der scotCPC wurden auf einem schwarzen Hintergrund der Fixationspunkt und schwache blaue Stimuli (Radius 5° , Wellenlänge 460 ± 30 nm FWHM, Intensität $0,01$ cd/m², Leuchtdichte $2,7 \times 10^{-5}$ W/m², maximale Intensität $7,52 \times 10^{-4}$ mW/m²; *Abbildung 2 oben rechts*) präsentiert. Das Protokoll beinhaltete ebenfalls 33 Stimuluslokalisationen à vier Wiederholungen, die im Vergleich zur photCPC in leicht veränderter Anordnung konzentrisch um den Fixationspunkt positioniert waren (0° , 6° , 12° , 20° , 30° Exzentrizität). In der scotCPC bestanden bei 6° Exzentrizität 4 Stimulationsorte, bei 12° und 30° Exzentrizität jeweils 8 Stimulationsorte und bei 20° Exzentrizität 12 Stimulationsorte (*Abbildung 2 Mitte rechts*), entsprechend der höchsten Stäbchendichte in der Netzhaut (Lee et al., 2019). Die Stimulusdauer betrug 100 ms mit einem Interstimulusintervall von 2,5 s. Daraus resultierte die Dauer eines Pupillogramms von 2,6 s (500 ms *Baseline* + 100 ms Stimulus + 2 s Poststimulusintervall) und eine Gesamtdauer der scotCPC von ungefähr 6 bis 10 Minuten.

2.3 Datensichtung

Der während der PLR aufgezeichnete Pupillendurchmesser wurde mithilfe eines intern entwickelten Skripts in MATLAB R2020b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) graphisch dargestellt, durch lineare Interpolation Artefakt-bereinigt, sowie analysiert. Für die Auswertung der Daten wurde der Mittelwert der PLR-Kurven der vier Stimuluswiederholungen an jeder der 33 Lokalisationen beurteilt (*Abbildung 2 unten*). Bei 150 Teilnehmenden ergab sich damit für die photCPC und scotCPC jeweils eine Gesamtzahl von $n = 150 \times 33 = 4950$ betrachteten Mittelwerten. Jeder Datensatz wurde auf ein regelrechtes gemitteltes Pupillogramm an jeder Stimuluslokalisation hin überprüft, einzelne Kurven mit Blinzelartefakten wurden manuell angepasst (Kelbsch et al., 2019a). Bei einem

Anstieg der *Baseline* $\geq 0,2$ mm über 500 ms wurde die *Baseline* auf den Pupillendurchmesser bei 0,46 s begründet. Lag ein steiler Anstieg oder Abfall der *Baseline* lediglich in den ersten Millisekunden der Aufzeichnung vor, wurde der Beginn der Kurve an den danach folgenden Anteil der *Baseline* angepasst. Eindeutig fehlerhafte Messungen wurden aus der Wertung genommen. Ein nahezu gleichbleibender Pupillendurchmesser während und nach der Stimuluspräsentation wurde im Sinne einer nicht ausgelösten PLR in der Wertung belassen.

Betrachtet wurden als Kennwerte der PLR die *Baseline* (mm) als durchschnittlicher Pupillendurchmesser während der 500 ms vor Stimuluspräsentation, sowie die Latenzzeit (ms) als Zeit vom Beginn der Stimuluspräsentation bis zum Beginn der Pupillenkonstriktion. Letztere wurde als Schnittpunkt eines Geradenfit durch die *Baseline* im Prästimulus-Intervall mit einem Geradenfit durch den Kurvenabschnitt mit abfallendem Pupillendurchmesser definiert. Der Geradenfit wurde anhand von 15 Datenpunkten durch den Kurvenabschnitt der Pupillenkonstriktion gelegt. Aus Plausibilitätsgründen wurde für die Latenzzeit ein Intervall von 150-700 ms voreingestellt und berechnete Latenzzeiten außerhalb dieses Intervalls automatisch aus der Wertung genommen. In vorangegangenen Studien wurde der Beginn der Pupillenkonstriktion als Schnittpunkt zwischen dem *Baseline*-Mittelwert (ohne Geradenfit) und einem Geradenfit durch den abfallenden Teil des Pupillogramms definiert, der 20 Datenpunkte enthielt. Eine Reduktion der Datenpunkte für den Geradenfit erwies sich in der Vorauswertung zur aktuellen Studie als robuster, insbesondere bei niedrigen Konstriktionsamplituden und Datensätzen mit ausgeprägtem Rauschen.

Ein weiterer Kennwert der PLR war die absolute maximale Konstriktionsamplitude (absolute maximal constriction amplitude, absMCA, mm) als Differenz zwischen *Baseline* und geringstem Pupillendurchmesser bei maximaler Pupillenkonstriktion. AbsMCA-Werte $< 0,05$ mm wurden als Rauschen deklariert und automatisch aus der Wertung genommen. Die relative maximale Konstriktionsamplitude (relative maximal constriction amplitude, relMCA, %) ist definiert als Quotient aus absMCA und *Baseline* eines Pupillogramms gemäß der

„Standards in pupillography“ (Kelbsch et al., 2019a). Kurven mit Amplituden oder Latenzzeiten im Grenzbereich (Amplitude = 0,05-0,1 mm, 200 ms > Latenzzeit > 500 ms) wurden erneut graphisch dargestellt, auf Plausibilität geprüft und bei eindeutig fehlerhafter Messung aus der Wertung genommen. Der *Hill of Vision* als dreidimensionale, topographische Darstellung der relMCA-Gesamtmittelwerte über allen Stimuluslokalisationen innerhalb des getesteten 30°-Gesichtsfeldes dient der kompakten Visualisierung der Konstriktionsamplitude der PLR. Dies ist besonders hilfreich zum Vergleich bestimmter ophthalmologischer Krankheitsbilder mit Einfluss auf die Konstriktionsamplitude der Pupillenantworten. Ergänzend wurden das *pupillary function volume* ((deg)²%, funktioneller, dreidimensionaler Summenwert aller relMCAs innerhalb von 30° Exzentrizität, ermöglicht den prägnanten Vergleich von Zapfen- und Stäbchenfunktion zwischen verschiedenen Studien) und der Steilheitsgrad (°) *des Hill of Vision* von 30° Exzentrizität zum Zentrum berechnet. Ein im Vergleich zum Normkollektiv niedriger Steilheitsgrad bei flacherem *Hill of Vision* weist auf die Lokalisation der Fotorezeptordysfunktion im Zentrum hin (Kelbsch et al., 2020), ein hoher Steilheitsgrad bei spitz zulaufendem *Hill of Vision* auf ein Funktionsdefizit in der Netzhautperipherie.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der PLR und der klinischen Daten der Studienteilnehmenden erfolgte mit einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ in JMP 16.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Alle Stimuluseigenschaften und klinische Daten mit potenziell statistisch signifikantem und klinisch relevantem Einfluss auf relMCA und Latenzzeit in photCPC und scotCPC (Exzentrizität, Stimulusposition im temporalen/nasalen GF, superioren/inferioren GF, Tages- und Jahreszeit der Messung, Altersgruppe, Irisfarbe und Geschlecht) wurden mit linear mixed-effects Modellen ausgewertet. Für die Einteilung in temporales und nasales bzw. superiores und inferiores GF wurden auf der Mittellinie zwischen den jeweiligen Gesichtsfeldhälften liegende Stimuli als „Mittellinie“ kategorisiert und für den Vergleich der GF nicht berücksichtigt. Alle Parameter ohne statistisch signifikanten Einfluss auf relMCA oder Latenzzeit wurden aus dem

entsprechenden linear mixed-effects Modell für die weiterführenden Analysen entfernt. Die übrigen Parameter wurden zusätzlich miteinander verbunden, sofern methodisch erlaubt, und mit Post-hoc Tukey-Tests analysiert. Die linear mixed-effects Modelle sowie die anschließend angewandten Post-hoc Tukey-Tests wurden verwendet, um multiples Testen zu berücksichtigen. Aufgrund geringer Abweichung von der Normalverteilung bei 30° Exzentrizität wurden die relMCA Originaldaten für die Berechnung der Normintervalle der relMCA pro Exzentrizität logarithmiert. Die berechneten Normintervalle wurden anschließend in lineare Daten zurücktransformiert.

Ein Zusammenhang zwischen dem *pupillary function volume* innerhalb von 0°-6° Exzentrizität und den OCT-Daten (RNFL, Makulavolumen, Volumen der Ganglienzellschicht (ganglion cell layer, GCL) und der äußeren Netzhautschicht (outer retinal layer, ORL); automatische Schichtdickenberechnung mit einem Kreisdurchmesser von 3,45 mm) wurde mithilfe einer multivariaten Korrelationsanalyse geprüft.

Zur Bestimmung der Test-Retest-Reliabilität wurden die CPC-Messungen bei 12 Teilnehmenden zweimal innerhalb von drei Monaten durchgeführt und der Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) sowie Bland-Altman Plots berechnet.

Sofern nicht anders angegeben, sind die nachfolgenden Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) der Originaldaten dargestellt. In den Abbildungen zeigen rote Diagramme die Ergebnisse der photCPC und hellblaue Diagramme die Ergebnisse der scotCPC.

3. Ergebnisse

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

3.1 Studienkollektiv

Tabelle 1 zeigt die demographischen Daten der 150 Studienteilnehmenden, sowie die Häufigkeit des gewählten Studienauges und der verschiedenen Messzeitpunkte. In *Abbildung 3* ist die gleichmäßige Verteilung der Teilnehmenden auf die fünf Altersgruppen mit Angabe der Gruppengröße dargestellt.

Tabelle 1: Charakteristika der Studienteilnehmenden und Messzeitpunkte. n = 150; 150 Teilnehmende

n = Stichprobengröße, w = weiblich, m = männlich, R = rechtes Auge, L = linkes Auge

Gesamt	Alter (Median)	Geschlecht		Studienauge		Messzeitpunkt			
						Tageszeit		Jahreszeit	
150	18-79 Jahre (46 Jahre)	w	94	R	78	Vormittag	56	Sommer	76
		m	56	L	72	Nachmittag	94	Winter	74

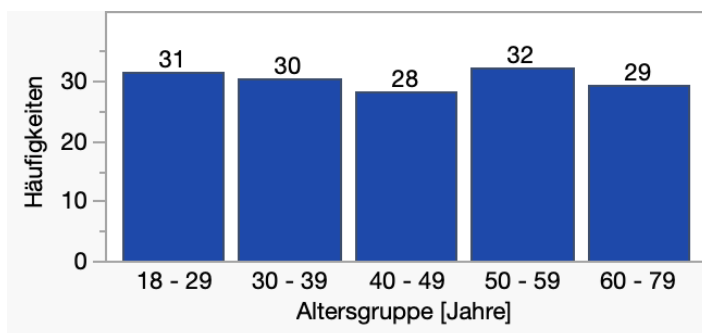


Abbildung 3: Aufteilung der Studienteilnehmenden nach Altersgruppe mit Angabe der Gruppengröße. n = 150; 150 Teilnehmende.

n = Stichprobengröße

3.2 Kenngrößen der PLR

3.2.1 Baseline

Der durchschnittliche *Baseline*-Pupillendurchmesser betrug in der photCPC $5,59 \pm 1,05$ mm und war somit kleiner als unter skotopischen Bedingungen mit einer *Baseline* von $6,29 \pm 0,98$ mm (*Abbildung 4*). Aufgrund der Histogramme kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden.

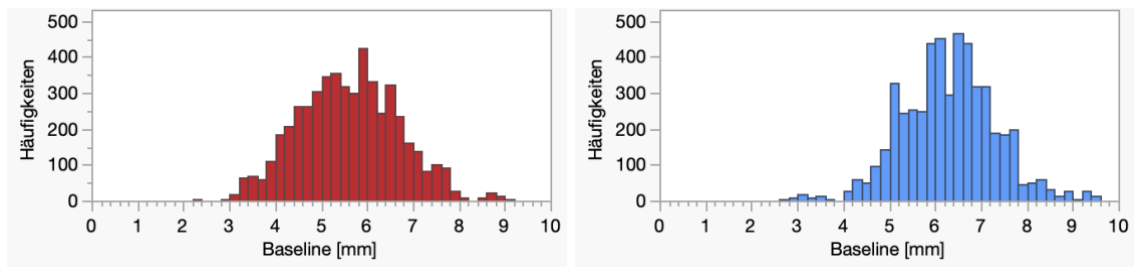


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung des Baseline-Pupillendurchmessers [mm] in photCPC (rot) und scotCPC (blau). n = 4950; 150 Teilnehmende.

photCPC/scotCPC = *photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie*, *n* = Stichprobengröße

Sowohl in der photCPC als auch in der scotCPC zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme des *Baseline*-Pupillendurchmessers mit zunehmendem Alter. Der Effekteinfluss der Altersgruppe auf die *Baseline* in photCPC und scotCPC betrug jeweils $p < 0,0001$. Eine statistisch signifikante Verringerung der *Baseline* von einer Altersgruppe zur nächstälteren bestand zwischen der Altersgruppe 30 bis 39 Jahre und 40 bis 49 Jahre mit einer Differenz im linear mixed-effects Modell von 1,04 mm in der photCPC ($p = 0,0002$) und 0,79 mm in der scotCPC ($p = 0,0029$), sowie zwischen der Altersgruppe 50 bis 59 Jahre und 60 bis 79 Jahre mit einer Differenz von 0,66 mm in der photCPC ($p = 0,0358$) und 0,69 mm in der scotCPC ($p = 0,0098$). Interessanterweise war die *Baseline* der Altersgruppe 40 bis 49 Jahre niedriger als die *Baseline* der Altersgruppe 50 bis 59 Jahre. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Der *Baseline*-Pupillendurchmesser der ältesten Altersgruppe von 60 bis 79 Jahren war in der photCPC um 1,45 mm kleiner als in der jüngsten Altersgruppe von 18

bis 29 Jahren ($p < 0,0001$), in der scotCPC um 1,53 mm ($p < 0,0001$) (Abbildung 5).

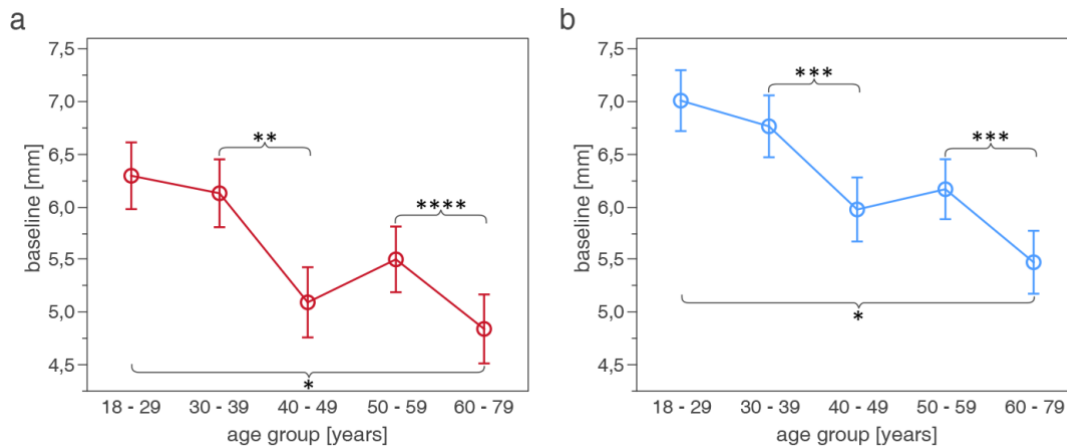


Abbildung 5: Signifikante Abnahme des Baseline-Pupillendurchmessers [MW \pm KI, mm] mit zunehmendem Alter [Jahre] in photCPC (a) und scotCPC (b). $n = 4950$; 150 Teilnehmende. * $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,05$. Abbildung 2 aus (Jendritza et al., 2024).

photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall, n = Stichprobengröße

3.2.2 Latenzzeit

Die Häufigkeitsverteilung der Latenzzeit der Pupillenkonstriktion mit Angabe von MW \pm SD in photCPC und scotCPC ist in *Tabelle 2* nach Exzentrizität dargestellt. Aufgrund der Histogramme kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden.

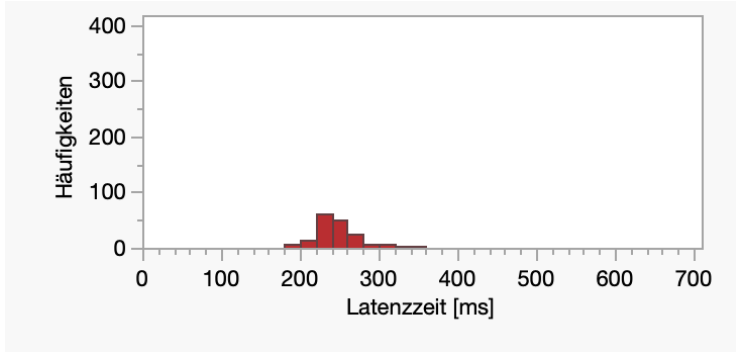
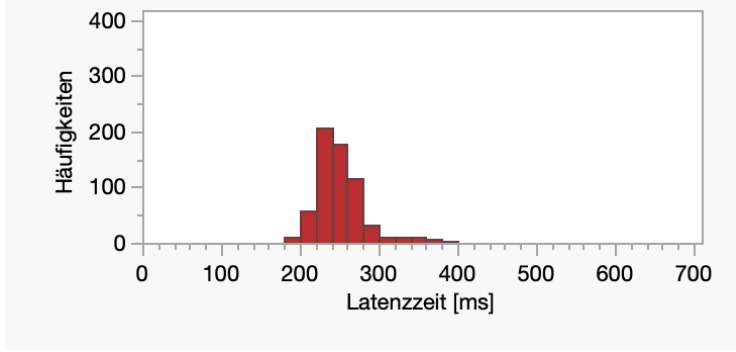
Die Latenzzeit war in der scotCPC mit einem Gesamtmittelwert von 320 ± 32 ms länger als in der photCPC mit einem Gesamtmittelwert von 259 ± 35 ms. Je weiter peripher der Stimulationsort lag, desto länger wurde die Latenzzeit der Pupillenkonstriktion. In der photCPC betrug die Latenzzeit bei zentralem Stimulus 244 ± 25 ms und stieg kontinuierlich auf 278 ± 43 ms nach den 30° -Stimuli. Unter skotopischen Messbedingungen war die Latenzzeit insgesamt länger mit 310 ± 26 ms nach dem zentralen Stimulus und 329 ± 36 ms nach den 30° -Stimuli. Auf

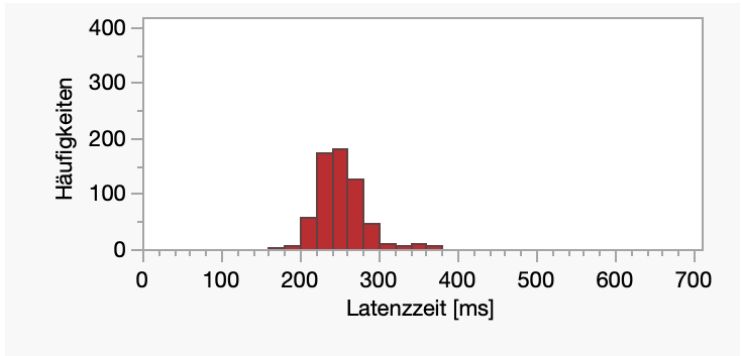
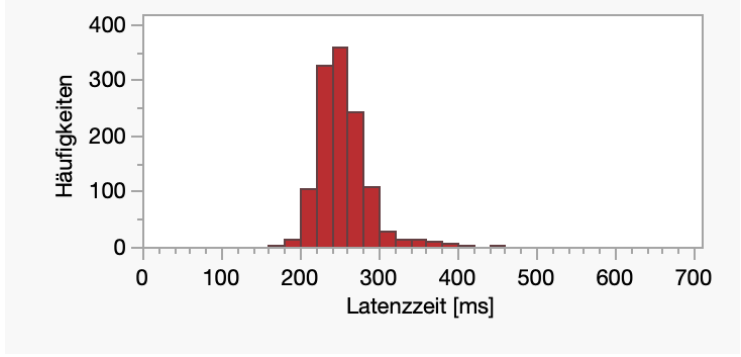
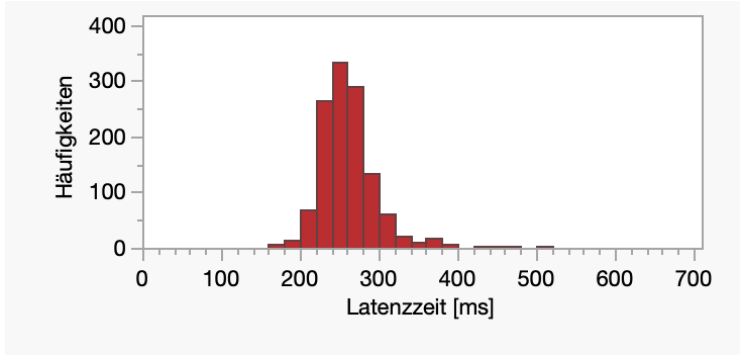
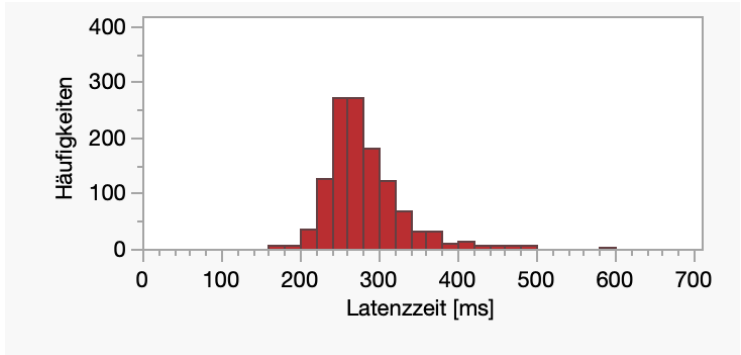
den Zusammenhang zwischen Exzentrizität und Latenzzeit wird in Kapitel 3.3.2 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die Latenzzeit erneut eingegangen.

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der Latenzzeit [ms] nach Exzentrizität (0°-30°) in photCPC (a) und scotCPC (b) mit Angabe von MW ± SD [ms] der Latenzzeit. $n_{photCPC} = 4901$, $n_{scotCPC} = 4915$; 150 Teilnehmende

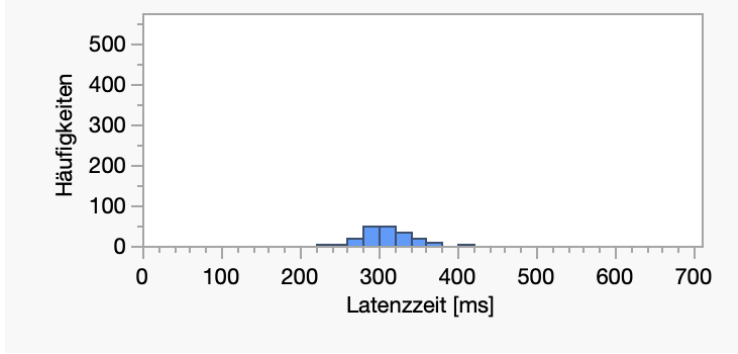
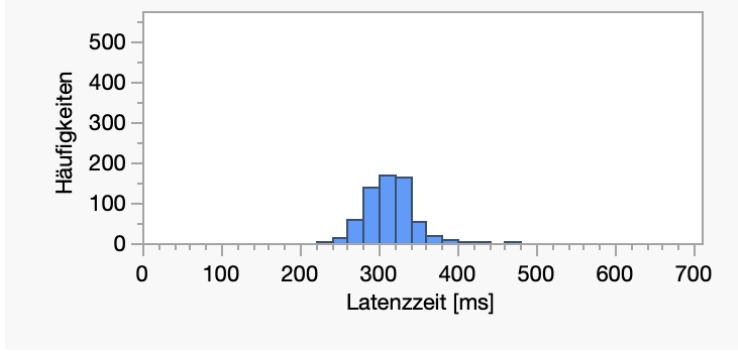
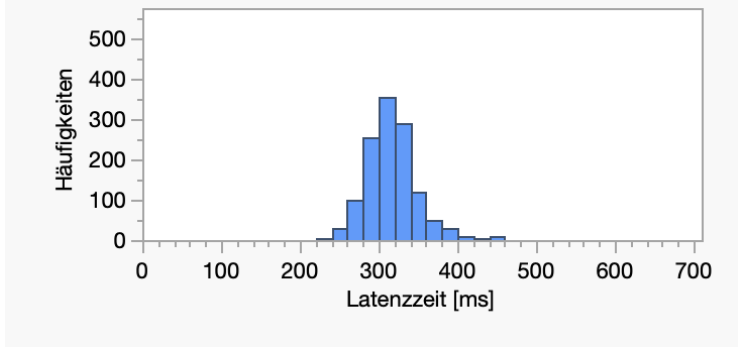
photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Stichprobengröße

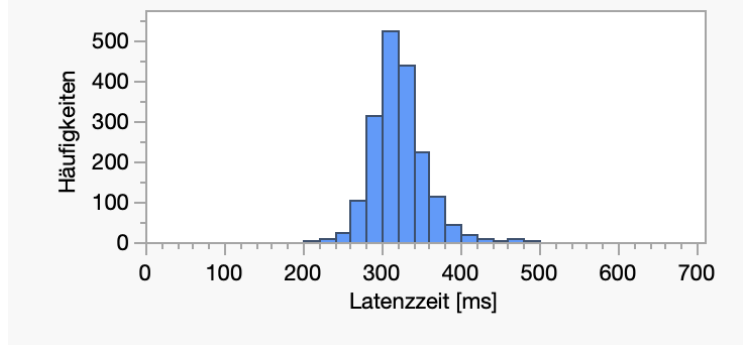
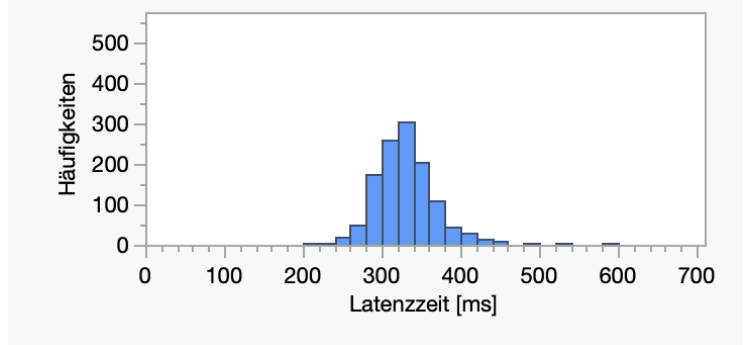
(a)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung Latenzzeit photCPC	MW ± SD [ms]
0°	 <p>n = 150</p>	244 ± 25
3°	 <p>n = 600</p>	248 ± 27

<p>6°</p>	 <p>n = 600</p>	<p>251 ± 28</p>
<p>12°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>252 ± 59</p>
<p>20°</p>	 <p>n = 1196</p>	<p>259 ± 34</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1155</p>	<p>278 ± 43</p>

(b)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung Latenzzeit scotCPC	MW ± SD [ms]
0°	 <p>n = 150</p>	310 ± 26
6°	 <p>n = 599</p>	312 ± 28
12°	 <p>n = 1198</p>	315 ± 29

<p>20°</p>	 <p>n = 1790</p>	<p>321 ± 31</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1178</p>	<p>329 ± 36</p>

3.2.3 Absolute maximale Konstriktionsamplitude (absMCA)

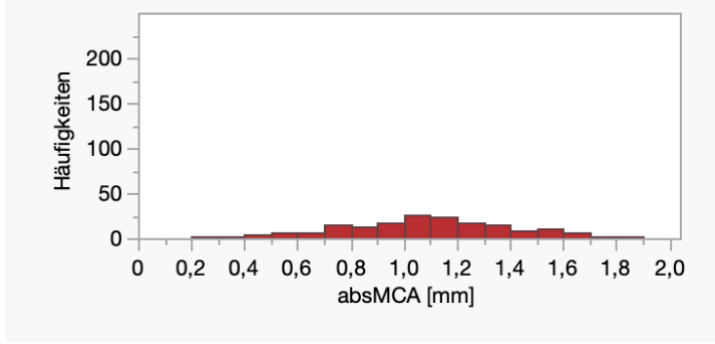
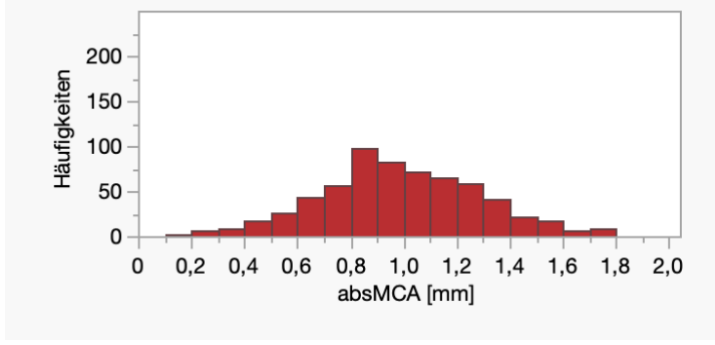
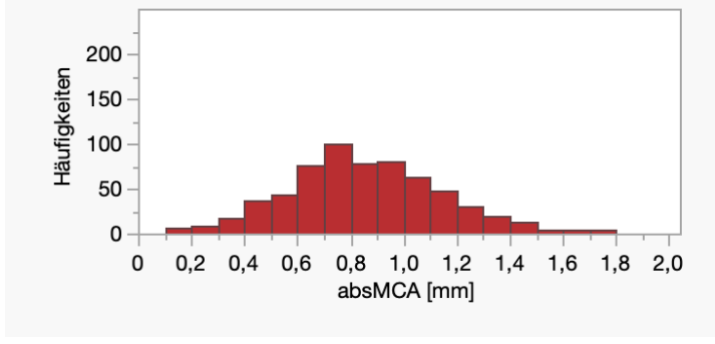
Die Häufigkeitsverteilung der absMCA mit MW ± SD in photCPC und scotCPC ist in *Tabelle 3* nach Exzentrizität dargestellt. Mit Ausnahme der absMCA bei 30° Exzentrizität mit leichter Rechtsschiefe, da physiologisch keine negativen Werte möglich sind, kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden.

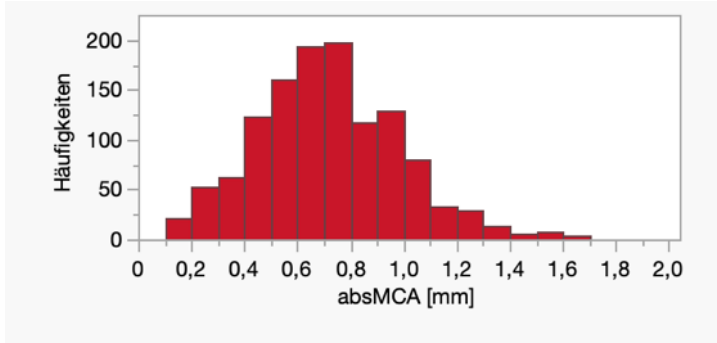
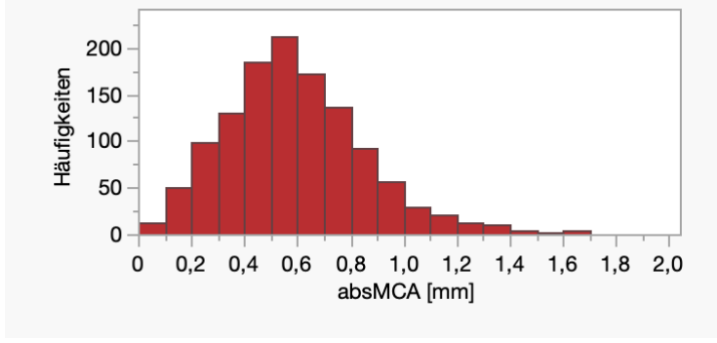
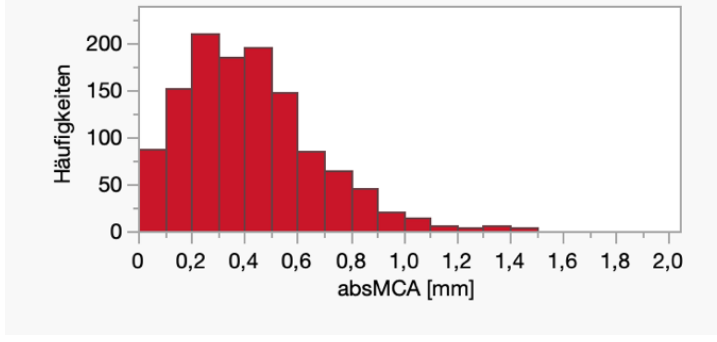
Die absMCA war in der photCPC mit einem Gesamtmittelwert von $0,67 \pm 0,33$ mm höher als in der scotCPC mit einem Gesamtmittelwert von $0,58 \pm 0,27$ mm. Insbesondere im Zentrum war die absMCA unter photopischen Bedingungen mit $1,09 \pm 0,31$ mm höher als unter skotopischen Verhältnissen mit $0,86 \pm 0,27$ mm. Mit zunehmender Exzentrizität der Stimuli zeigte sich in der photCPC eine ausgeprägtere Reduktion der absMCA als in der scotCPC, sodass in der Peripherie bei 30° in der photCPC mit $0,41 \pm 0,24$ mm und in der scotCPC mit $0,44 \pm 0,25$ mm vergleichbare absMCAs vorlagen. Das Alter hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die absMCA.

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der absMCA [mm] nach Exzentrizität (0°-30°) in photCPC (a) und scotCPC (b) mit Angabe von MW ± SD [mm] der absMCA. $n_{\text{photCPC}} = 4950$, $n_{\text{scotCPC}} = 4950$; 150 Teilnehmende

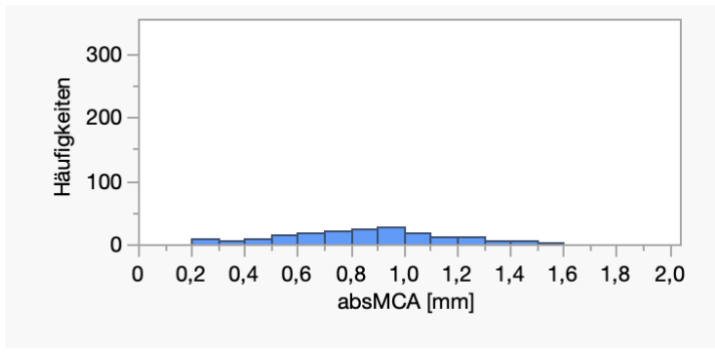
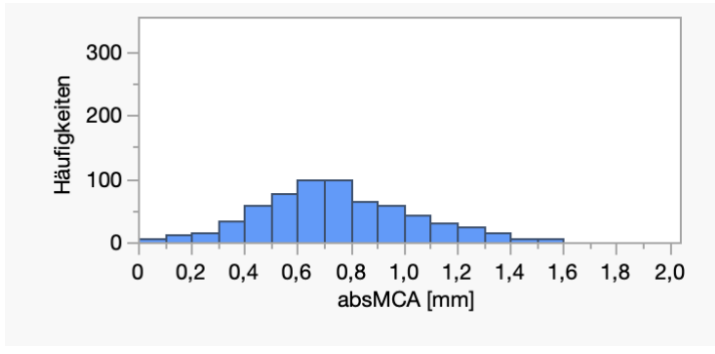
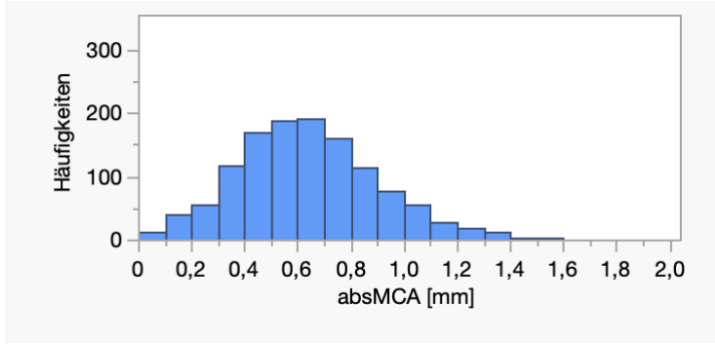
absMCA = absolute maximale Konstriktionsamplitude, photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Stichprobengröße

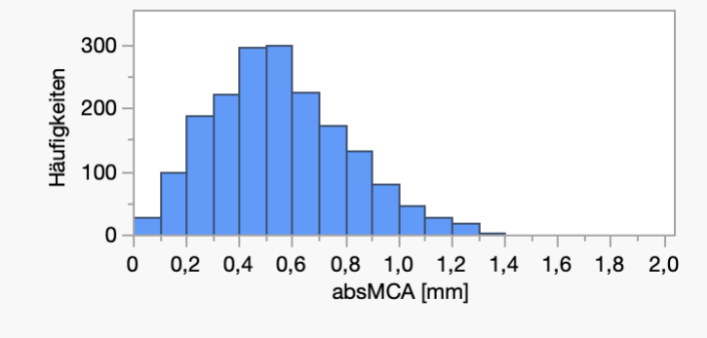
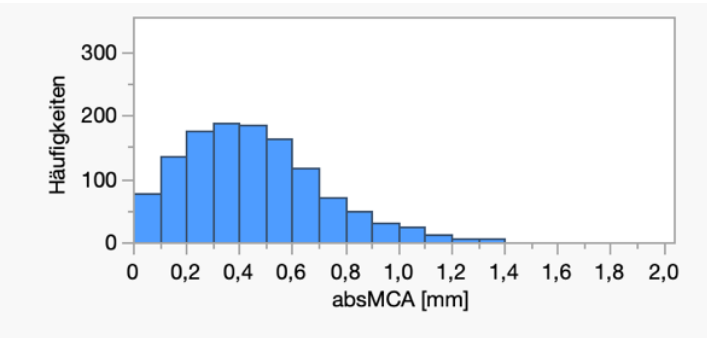
(a)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung absMCA photCPC	MW ± SD [mm]
0°	 <p>n = 150</p>	1,09 ± 0,31
3°	 <p>n = 600</p>	0,99 ± 0,29
6°	 <p>n = 600</p>	0,85 ± 0,27

<p>12°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>0,71 ± 0,26</p>
<p>20°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>0,58 ± 0,25</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>0,41 ± 0,24</p>

(b)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung absMCA scotCPC	MW ± SD [mm]
0°	 <p>n = 150</p>	0,86 ± 0,27
6°	 <p>n = 600</p>	0,74 ± 0,27
12°	 <p>n = 1200</p>	0,63 ± 0,25

<p>20°</p>	 <p>n = 1800</p>	<p>0,55 ± 0,25</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>0,44 ± 0,25</p>

3.2.4 Relative maximale Konstriktionsamplitude (relMCA)

Die Häufigkeitsverteilung, sowie MW ± SD der relMCA in photCPC und scotCPC sind in *Tabelle 4* ebenfalls nach Exzentrizität aufgestellt. Mit Ausnahme der relMCA bei 30° Exzentrizität kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden.

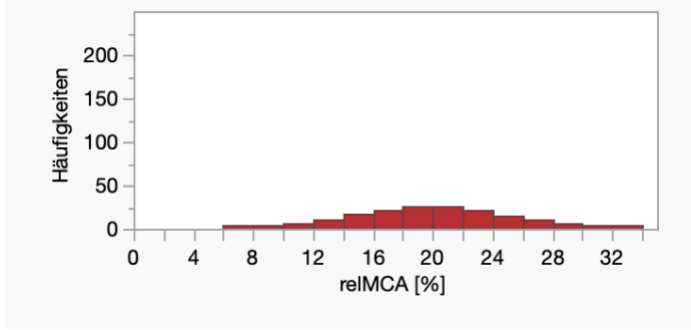
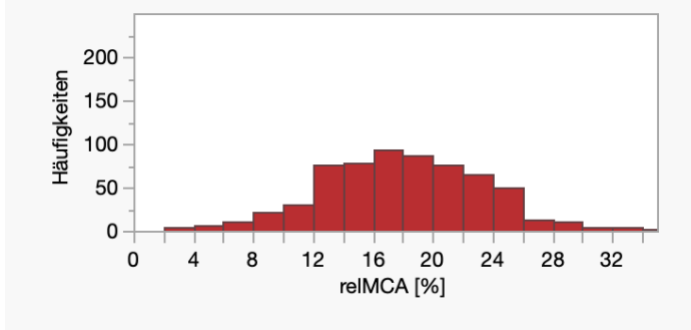
Die relMCA war unter photopischen Bedingungen mit einem Gesamtmittelwert von $12,24 \pm 5,97\%$ höher als unter skotopischen Verhältnissen mit einem Gesamtmittelwert von $9,38 \pm 4,62\%$. Entsprechend der absMCA zeigte sich in der photCPC eine hohe relMCA im Zentrum mit $19,79 \pm 5,23\%$ im Vergleich zur scotCPC mit $13,87 \pm 4,69\%$, mit stärkerer Reduktion in der photCPC je weiter peripher der Stimulus präsentiert wurde. Die Mittelwerte der relMCA bei 30° Exzentrizität unterschieden sich daher nur geringfügig zwischen der photCPC mit $7,61 \pm 4,58\%$ und der scotCPC mit $7,26 \pm 4,18\%$ (*Abbildung 6a*). Auf die Reduktion der relMCA mit Zunahme der Exzentrizität wird in Kapitel 3.3.1 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die relMCA erneut eingegangen. Da

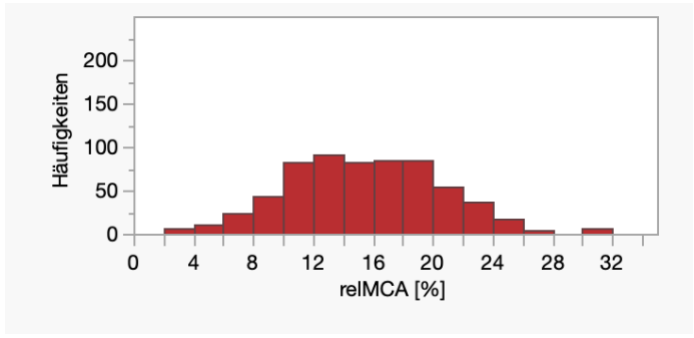
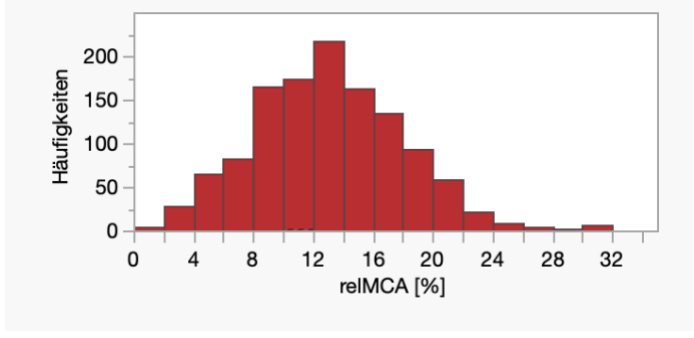
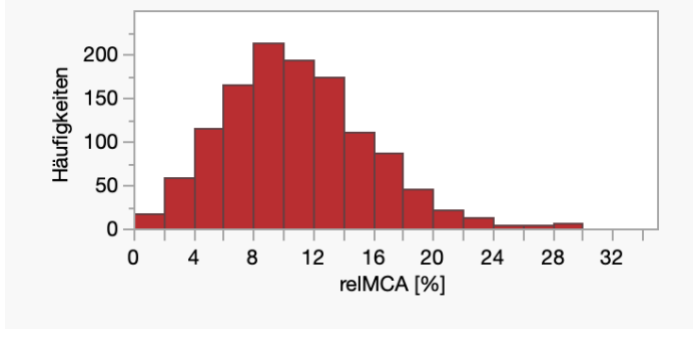
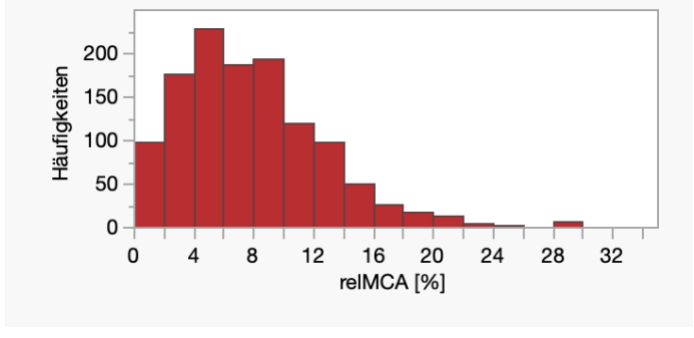
die absolute Amplitude der PLR (absMCA) abhängig vom *Baseline*-Pupillendurchmesser ist, wurden nachfolgend die relativen Konstriktionswerte in % (relMCA) für die weiteren Analysen verwendet.

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der relMCA [%] nach Exzentrizität (0°-30°) in photCPC (a) und scotCPC (b) mit Angabe von MW ± SD [%] der relMCA. n_{photCPC} = 4949, n_{scotCPC} = 4948; 150 Teilnehmende

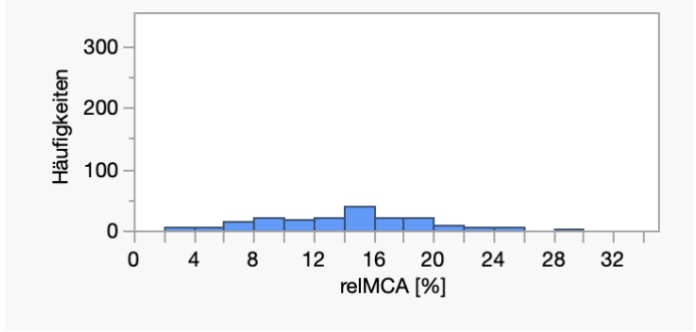
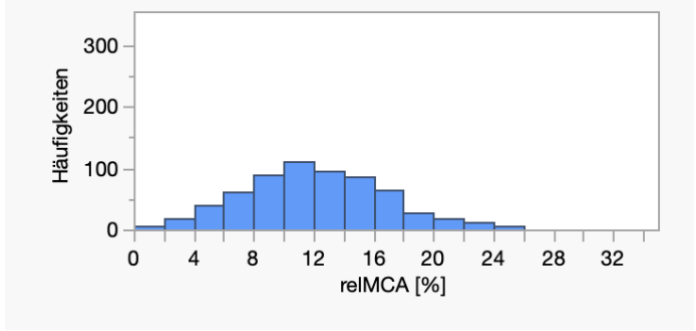
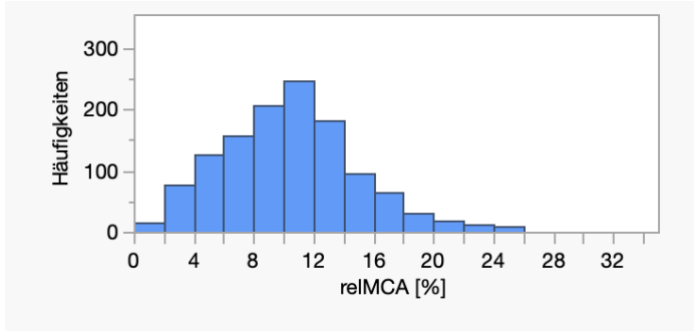
relMCA = relative maximale Konstriktionsamplitude, photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Stichprobengröße

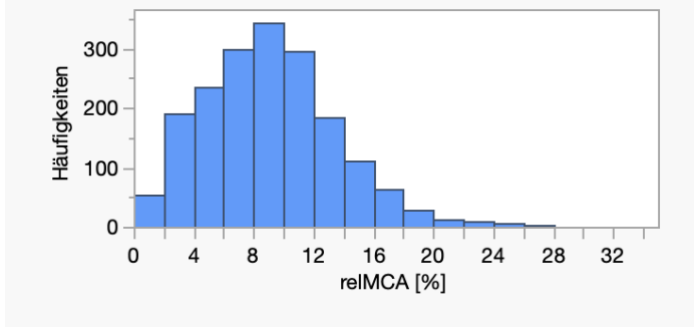
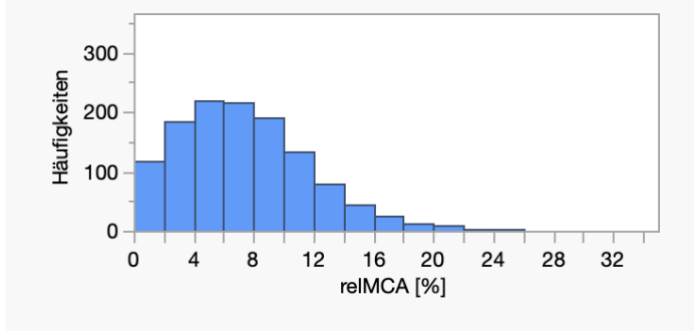
(a)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung relMCA photCPC	MW ± SD [%]
0°	 <p>n = 150</p>	19,79 ± 5,23
3°	 <p>n = 600</p>	17,96 ± 5,11

<p>6°</p>	 <p>n = 600</p>	<p>15,45 ± 4,89</p>
<p>12°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>12,96 ± 4,78</p>
<p>20°</p>	 <p>n = 1200</p>	<p>10,74 ± 4,70</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1199</p>	<p>7,61 ± 4,58</p>

(b)

Exzentrizität	Häufigkeitsverteilung relMCA scotCPC	MW \pm SD [%]
0°	 <p>n = 150</p>	13,87 \pm 4,69
6°	 <p>n = 599</p>	12,04 \pm 4,55
12°	 <p>n = 1200</p>	10,27 \pm 4,35

<p>20°</p>	 <p>n = 1800</p>	<p>8,93 ± 4,22</p>
<p>30°</p>	 <p>n = 1199</p>	<p>7,26 ± 4,18</p>

In *Abbildung 6a* sind die Gesamtmittelwerte des relativen Pupillendurchmessers nach Exzentrizität für alle Messungen der photCPC und scotCPC abgebildet. Die Grafik zeigt die abnehmende relMCA mit zunehmender Exzentrizität des Stimulus. Ebenso wird die höhere relMCA von 19,79% in der photCPC im Zentrum bei 0° im Vergleich zur scotCPC mit 13,87% veranschaulicht.

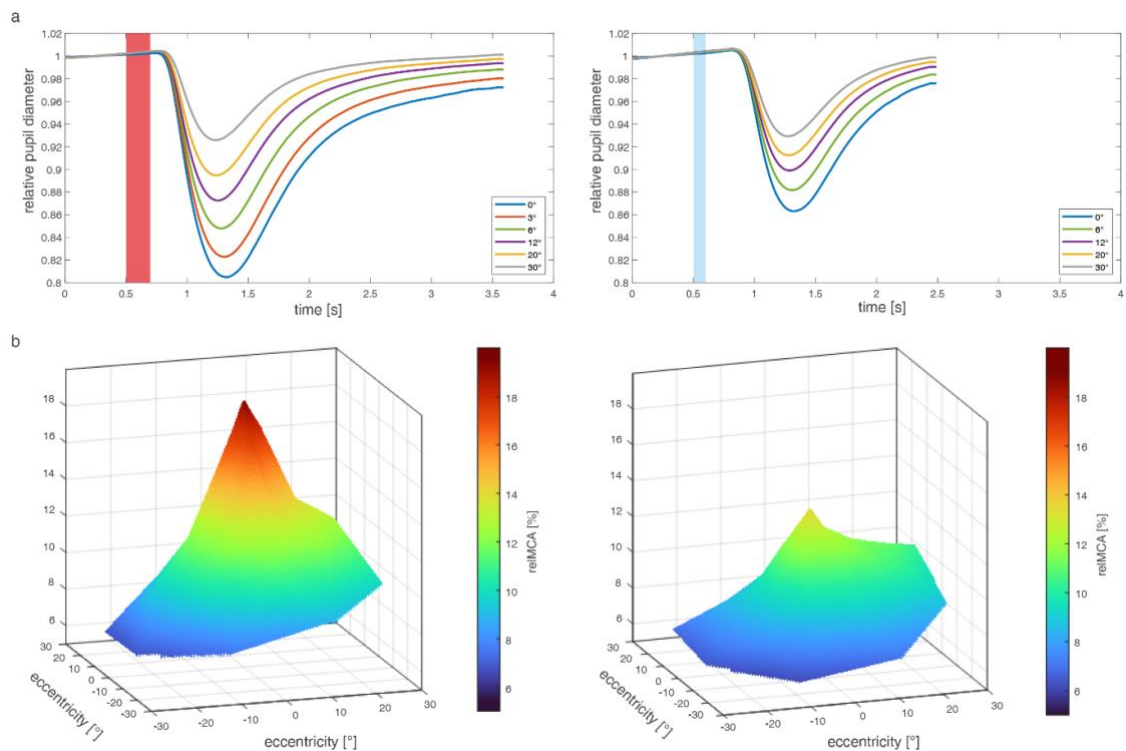


Abbildung 6: (a) Mittelwerte des relativen Pupillendurchmessers normiert an der Baseline ($n = 4950$; 150 Teilnehmende) über die Zeitspanne eines Pupillogramms mit Reduktion des Pupillendurchmessers mit zunehmender Stimulusexzentrizität in photCPC (linke Spalte) und scotCPC (rechte Spalte). Erkennbar ist die höhere relMCA im Zentrum bei 0° (blaue Linie) in der photCPC mit vergleichbaren relMCAs bei 30° Exzentrizität in photCPC und scotCPC (graue Linie). (b) Höheres pupillary function volume und größerer Steilheitsgrad des Hill of Vision in der photCPC im Vergleich zur scotCPC. Hill of Vision = topographische Darstellung der relMCA-Gesamtmittelwerte (z-Achse) nach Exzentrizität (x- und y-Achse). Für diese Abbildung wurden die Daten aller linken Augen zu rechten Augen gespiegelt. Abbildung 3 aus (Jendritza et al., 2024).

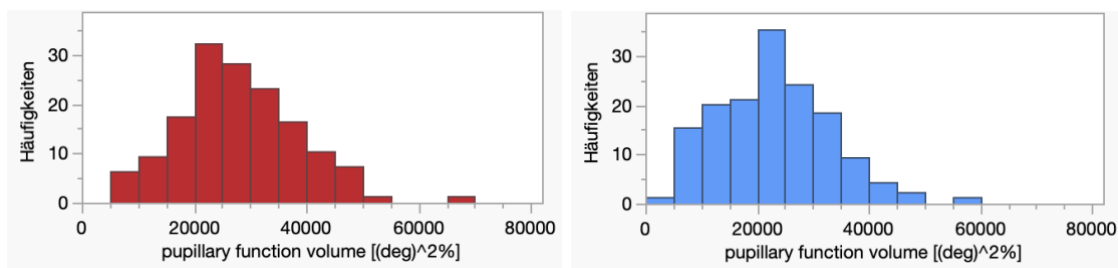
photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, relMCA = relative maximal constriction amplitude, n = Stichprobengröße

3.2.5 Pupillary function volume und Steilheitsgrad des Hill of Vision

Die Häufigkeitsverteilungen des pupillary function volume und Steilheitsgrades des Hill of Vision der photCPC und scotCPC sind in Abbildung 7 dargestellt. Das pupillary function volume war mit 27.581 ± 10.399 (deg)²% in der photCPC höher

als in der scotCPC mit $22.961 \pm 9.689 \text{ (deg)}^2\%$. Der *Hill of Vision* zeigte in der photCPC einen Steilheitsgrad von $21,22 \pm 5,48^\circ$ und in der scotCPC von $12,15 \pm 4,16^\circ$ gemessen von 30° Exzentrizität zum Zentrum. Somit waren *pupillary function volume* und Steilheitsgrad des *Hill of Vision* in der photCPC, entsprechend der höheren relMCAs im Zentrum, höher als in der scotCPC (Abbildung 6b).

(a)



(b)

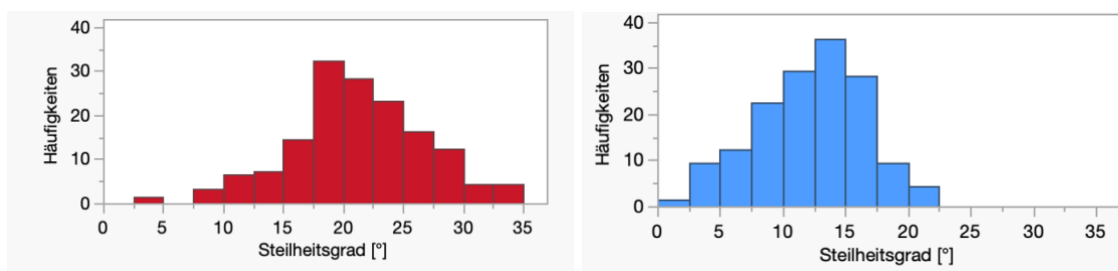


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung des pupillary function volume [(deg)²%] (a) und Steilheitsgrades [°] (b) des Hill of Vision in photCPC (linke Spalte) und scotCPC (rechte Spalte). $n = 150$; 150 Teilnehmende.

photCPC/scotCPC = *photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie*, $n = \text{Stichprobengröße}$

3.3 Einflussparameter auf die PLR

Im Folgenden werden die Parameter, die einen statistisch signifikanten Effekt auf die PLR aufwiesen, vorgestellt und der jeweilige Effekteinfluss erläutert. Die Ergebnisse sind dem linear mixed-effects Modell entnommen und beruhen demnach auf einer Modellrechnung ausgehend von den Originaldaten. Klinisch relevante, statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die PLR werden im Rahmen der Normdaten (Kapitel 3.6 Normdatenbank für die CPC) mit

entsprechendem Normintervall ausgehend von den erhobenen Originaldaten dargestellt.

3.3.1 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die relMCA

In der photCPC wurde die relMCA statistisch signifikant durch die Exzentrizität des Stimulus (Effekt der Exzentrizität auf die relMCA: $p < 0,0001$), sowie die Position des Stimulus im temporalen vs. nasalen ($p < 0,0001$) und superioren vs. inferioren GF ($p < 0,0001$) beeinflusst.

Mit zunehmender Exzentrizität des Stimulus wurde die relMCA statistisch signifikant geringer (Differenz zwischen nebeneinanderliegenden Exzentrizitäten: 1,59-3,02%, p-Wert im Post-hoc Tukey-Test jeweils $p < 0,0001$; *Abbildung 8a*). Die Differenz zwischen der relMCA im Zentrum und bei 30° Exzentrizität betrug 11,71% ($p < 0,0001$).

Bei Stimuli im temporalen GF war die relMCA um 1,65% geringfügig höher als im nasalen GF ($p < 0,0001$) und bei Stimuli im inferioren GF um 0,38% minimal höher als im superioren GF ($p < 0,0001$).

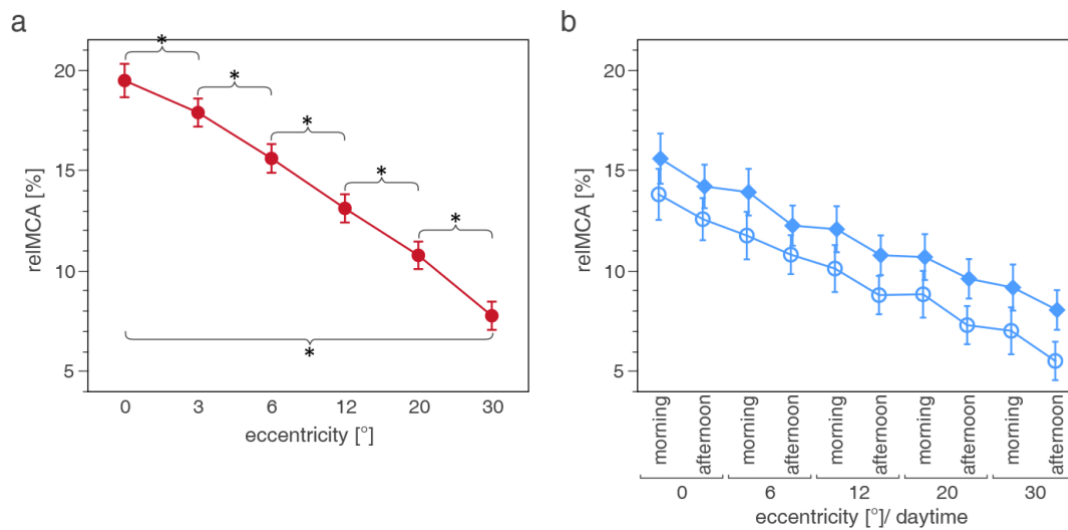


Abbildung 8: (a) PhotCPC: statistisch signifikante Beeinflussung der relMCA [MW \pm KI, %] durch die Exzentrizität [°]. $n_{\text{photCPC}} = 4949$; 150 Teilnehmende. * $p < 0,0001$. (b) ScotCPC: statistischer Einfluss von Exzentrizität [°], Jahreszeit [\circ Sommer, \blacklozenge Winter] und Tageszeit [Vormittag/Nachmittag] auf die relMCA [MW \pm KI, %]. Aus Übersichtlichkeitsgründen keine Markierung der statistisch signifikanten Reduktion der relMCA mit Zunahme der Exzentrizität bei Messungen zur gleichen Tages- und Jahreszeit (jeweils $p < 0,0001$). $n_{\text{scotCPC}} = 4948$; 150 Teilnehmende. Die Grafiken wurden dem linear mixed-effects Modell entnommen. Abbildung 4 aus (Jendritza et al., 2024).

photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, relMCA = relative maximale Konstriktionsamplitude, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall, n = Stichprobengröße

In der scotCPC zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt der Exzentrizität ($p < 0,0001$), Jahreszeit ($p = 0,0013$) und Tageszeit ($p = 0,0365$), sowie der Position des Stimulus im temporalen vs. nasalen ($p < 0,0001$) und superioren vs. inferioren GF ($p < 0,0001$) auf die relMCA.

Mit zunehmender Exzentrizität der Stimuli wurde die relMCA bei Messungen zur gleichen Tages- und Jahreszeit statistisch signifikant geringer (Differenz zwischen nebeneinanderliegenden Exzentrizitäten: 1,17-2,04%, jeweils $p < 0,0001$, z.B. 12° , Winter, Vormittag $>$ 20° , Winter, Vormittag; Abbildung 8b). Die Mittelwerte der relMCA waren im Winter jeweils höher als im Sommer und bei Messungen am Vormittag höher als am Nachmittag. Bei direktem Vergleich der

Tages- bzw. Jahreszeiten pro Exzentrizität zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede (z.B. 6°, Sommer, *Vormittag* > 6°, Sommer, *Nachmittag* bzw. 6°, *Winter*, *Nachmittag* > 6°, *Sommer*, *Nachmittag*, beides jedoch nicht statistisch signifikant). Der Mittelwert der reIMCA an einer bestimmten Exzentrizität war im Winter, trotz der abnehmenden reIMCA mit zunehmender Exzentrizität, nicht statistisch signifikant kleiner als der Mittelwert der reIMCA eines zentral davon gelegenen Stimulus im Sommer zur jeweils gleichen Tageszeit (z.B. 0°, *Sommer*, *Nachmittag* und 6°, *Winter*, *Nachmittag*). Zusätzlich war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der reIMCA an einer bestimmten Exzentrizität am *Nachmittag* und der weiter peripher gelegenen Exzentrizität am *Vormittag* (in der jeweils gleichen Jahreszeit) festzustellen.

Wie in der photCPC war die reIMCA in der scotCPC bei Stimuli im temporalen GF etwas höher als im nasalen GF (Differenz: 1,46%, $p < 0,0001$). Im Gegensatz zur photCPC war in der scotCPC die reIMCA bei Stimuli im superioren GF minimal höher als im inferioren GF (Differenz: 0,45%, $p < 0,0001$).

Die Altersgruppe hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die reIMCA unter photopischen oder skotopischen Bedingungen.

3.3.2 Statistisch signifikante Einflussfaktoren auf die Latenzzeit

Die Latenzzeit der PLR wurde in der photCPC statistisch signifikant durch die Exzentrizität des Stimulus ($p < 0,0001$; *Abbildung 9a*) und die Präsentation des Stimulus im temporalen vs. nasalen GF ($p < 0,0001$) beeinflusst.

Mit zunehmender Exzentrizität der Stimuli stieg die Latenzzeit an. Eine statistisch signifikante Verlängerung der Latenzzeit von einer Exzentrizität zur nächst peripher gelegenen zeigte sich zwischen 12° und 20° (Differenz: 7 ms, $p < 0,0001$) sowie 20° und 30° (Differenz: 19 ms, $p < 0,0001$). Die Differenz zwischen der Latenzzeit bei zentralen und peripheren Stimuli bei 30° betrug 35 ms ($p < 0,0001$).

Die Latenzzeit war im nasalen GF um 13 ms geringfügig länger als im temporalen GF ($p < 0,0001$).

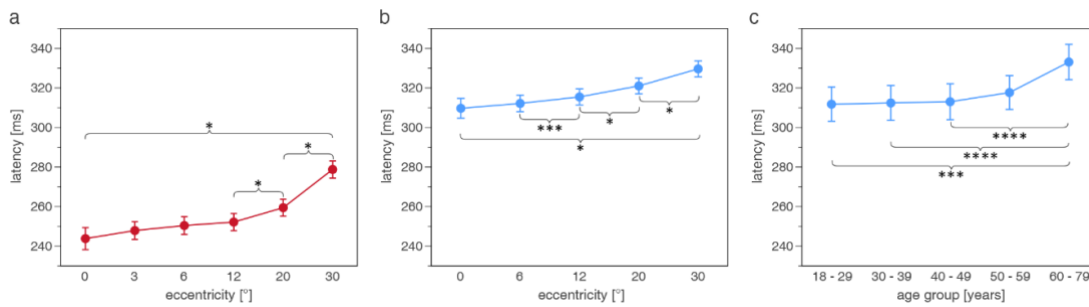


Abbildung 9: (a) PhotCPC: statistisch signifikante Beeinflussung der Latenzzeit [MW \pm KI, ms] durch die Exzentrizität [°]. $n_{photCPC} = 4901$; 150 Teilnehmende. (b) ScotCPC: statistisch signifikanter Effekt der Exzentrizität [°] und (c) Altersgruppe [Jahre] auf die Latenzzeit [MW \pm KI, ms]. $n_{scotCPC} = 4915$; 150 Teilnehmende. * $p < 0,0001$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,05$. Die Grafiken wurden dem linear mixed-effects Modell entnommen. Abbildung 5 aus (Jendritza et al., 2024).

photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall, n = Stichprobengröße

In der scotCPC hatte die Exzentrizität der Stimuli ($p < 0,0001$; Abbildung 9b) und die Altersgruppe der Studienteilnehmenden ($p = 0,0043$; Abbildung 9c) einen statistisch signifikanten Effekt auf die Latenzzeit der PLR.

Die Latenzzeit stieg wie in der photCPC mit zunehmender Exzentrizität der Stimuli an. Statistisch signifikant höhere Latenzzeiten zwischen zwei nebeneinander liegenden Exzentrizitäten zeigten sich zwischen 6° und 12° (Differenz: 3 ms, $p = 0,0066$), 12° und 20° (Differenz: 6 ms, $p < 0,0001$) sowie 20° und 30° (Differenz: 9 ms, $p < 0,0001$). Bei den 30°-Stimuli war die Latenzzeit um 20 ms länger als bei den zentralen Stimuli ($p < 0,0001$).

Die Latenzzeit der Altersgruppen 18 bis 29 Jahre, 30 bis 39 Jahre und 40 bis 49 Jahre war vergleichbar (Differenz: 1 ms). Zwischen der Altersgruppe 18 bis 29 Jahre, respektive 30 bis 39 Jahre und 40 bis 49 Jahre, und der Altersgruppe 60 bis 79 Jahre stieg die Latenzzeit in der scotCPC statistisch signifikant mit einer Differenz von 21 ms, respektive 21 ms und 20 ms (jeweils $p = 0,0078$, $p = 0,0118$, $p = 0,0186$).

3.3.3 Vergleich der Effekteinflüsse zwischen photCPC und scotCPC

Sowohl in der photCPC als auch in der scotCPC zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der relMCA mit zunehmender Exzentrizität des Stimulus. Unter beiden Messbedingungen war die relMCA bei Stimuli im temporalen GF statistisch signifikant höher als im nasalen GF. In der photCPC war die relMCA bei Stimuli in der inferioren Gesichtsfeldhälfte höher als bei Stimuli im superioren GF, während es in der scotCPC umgekehrt der Fall war. Unter beiden Messbedingungen zeigte sich ein Anstieg der Latenzzeit mit zunehmender Exzentrizität.

3.4 Parameter ohne Einfluss auf die PLR

Die Irisfarbe und das Geschlecht der Studienteilnehmenden hatten weder unter photopischen noch unter skotopischen Messbedingungen einen statistisch signifikanten Einfluss auf relMCA oder Latenzzeit der PLR. Zwischen dem *pupillary function volume* und den OCT Daten RNFL, Makulavolumen, GCL-Volumen und ORL-Volumen zeigte sich keine relevante Korrelation. Lediglich bei Zapfen-spezifischer Stimulation war eine statistisch signifikante, jedoch schwache Korrelation von 0,25 zwischen RNFL und *pupillary function volume* zwischen 0° und 6° ($p = 0,0024$) festzustellen.

3.5 Test-Retest Reliabilität

Für die relMCA fand sich eine exzellente Test-Retest Reliabilität sowohl bei den photopischen Messprotokollen (ICC = 0,92, Bland-Altman = 0,92, mittlere Differenz der relMCA zwischen den zwei Messungen: 0,72%, 95% Konfidenzintervall der Limits of Agreement [LOA] = -4,87 - 6,30%) als auch bei den skotopischen Messprotokollen (ICC = 0,86, Bland-Altman = 0,87, mittlere Differenz = 0,94%, LOA = -4,43 - 6,32%). Die Test-Retest Reliabilität der Latenzzeit war moderat bis schlecht (photCPC ICC = 0,53, Bland-Altman = 0,54, mittlere Differenz = 5 ms, LOA = -48 - 59 ms; scotCPC ICC = 0,25, Bland-Altman = 0,25, mittlere Differenz = 2 ms, LOA = -58 - 63 ms).

3.6 Normdatenbank für die CPC

Auf Grundlage der beschriebenen Ergebnisse wurde eine Normdatenbank für die photCPC und scotCPC erstellt. Diese beinhaltet die relMCA (Tabelle 5) und Latenzzeit (Tabelle 6) der PLR, aufgeteilt nach Exzentrizität, sowie das *pupillary function volume* und den Steilheitsgrad des *Hill of Vision* (Tabelle 5). Die Normdaten der Latenzzeit unter skotopischen Bedingungen sind zusätzlich nach dem Alter <60 Jahren und ≥60 Jahren aufgeteilt.

Tabelle 5: Normdaten für relMCA [%] nach Exzentrizität, pupillary function volume [(deg)²%] und Steilheitsgrad des Hill of Vision [°] in photCPC und scotCPC mit Mittelwert und 95% Normintervall. Tabelle 1 aus (Jendritza et al., 2024)

relMCA = relative maximale Konstriktionsamplitude, photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie

	relMCA [%] photCPC		relMCA [%] scotCPC	
Exzentrizität	Mittelwert	95% Normintervall	Mittelwert	95% Normintervall
0°	19,02	10,65 - 33,96	12.96	5.98 - 28.09
3°	17,15	9,12 - 32,25	n.a.	n.a.
6°	14,56	7,10 - 29,86	11.05	4.61 - 26.46
12°	11,95	5,12 - 27,91	9.19	3.34 - 25.28
20°	9,52	3,19 - 28,39	7.78	2.49 - 24.31
30°	6,08	1,30 - 28,46	5.83	1.27 - 26.81
<i>Pupillary function volume [(deg)²%]</i>				
	27.581	7.199 - 47.963	22.961	3.971 - 41.951
<i>Steilheitsgrad [°]</i>				
	21,22	10,26 - 32,18	12,15	3,83 - 20,47

Tabelle 6: Normdaten für die Latenzzeit [ms] in photCPC und scotCPC nach Exzentrizität und Alter <60/≥60 Jahre in der scotCPC mit Mittelwert und 95% Normintervall. Tabelle 2 aus (Jendritza et al., 2024)

photCPC/scotCPC = photopische/skotopische Chromatische Pupillencampimetrie

Exzentrizität	Latenzzeit [ms] photCPC		Latenzzeit [ms] scotCPC			
	Mittelwert	95% Normintervall	Mittelwert		95% Normintervall	
			<60 J	≥60 J	<60 J	≥60 J
0°	244	196 - 291	306	324	258 - 354	274 - 374
3°	248	195 - 300	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6°	250	196 - 305	308	328	258 - 358	273 - 383
12°	252	195 - 309	312	331	258 - 365	272 - 390
20°	259	193 - 325	317	337	259 - 375	272 - 402
30°	278	189 - 366	326	342	259 - 392	262 - 421

4. Diskussion

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die CPC erstmals in einer großen Studienkohorte von 150 gesunden Teilnehmenden durchgeführt. Ziel dieser Studie war es, Einflussfaktoren auf die PLR zu untersuchen und mit der Einführung einer Normdatenbank weitere Qualitätskriterien für die inzwischen häufig eingesetzte Methode aufzustellen. Die CPC dient der objektiven Messung der Zapfen- und Stäbchenfunktion als Ergebnisparameter in Gentherapiestudien (Stingl et al., 2022b), bei Beobachtungen des natürlichen Krankheitsverlaufs von Netzhautdegenerationen (Stingl et al., 2022a, Kelbsch et al., 2020) und der Erforschung der Pupillenbahn (Kelbsch et al., 2022). Für die Auswertung und Vergleichbarkeit der CPC-Ergebnisse im klinischen Alltag ist eine Normdatenbank mit relevanten Einflussgrößen auf die PLR essenziell. Aber auch für die gesamte Pupillenforschung sind Normwerte der PLR im Sinne der „Standards in Pupillography“ (Kelbsch et al., 2019b) wesentlich für den wissenschaftlichen Austausch und valide Forschungsergebnisse.

4.1 Veränderung des Pupillendurchmessers mit zunehmendem Alter

In Übereinstimmung mit früheren Studien, die unter schwacher Beleuchtung eine durchschnittliche Abnahme der Pupillenweite von ca. 0,04 mm pro Jahr feststellten (Winn et al., 1994, Heine et al., 2013), zeigte sich im vorliegenden Studienkollektiv eine Verringerung des *Baseline*-Pupillendurchmessers von der jüngsten zur ältesten Altersgruppe von 1,45 mm unter photopischen Bedingungen und 1,53 mm unter skotopischen Bedingungen. Dass mit der CPC diese erwartbaren Ergebnisse wiedergegeben werden können, zeigt die Validität und Präzision der Methode. Es dient zudem als Nachweis für eine zuverlässige Auswertung der PLR und möglicher Einflussfaktoren mit der CPC. Weiterhin wird

mit diesem Teilergebnis hervorgehoben, dass die Normierung der Konstriktionsamplitude der PLR auf den *Baseline*-Pupillendurchmesser von großer Bedeutung für die einheitliche Evaluation der Pupillenantworten ist.

4.2 Auswirkung von überschwelliger Stimulation und retinalen Kompensationsmechanismen auf die Darstellung von Alterungsprozessen der Netzhaut in der CPC

Trotz Normierung der PLR-Daten auf den *Baseline*-Pupillendurchmesser zeigte sich in einzelnen Studien ein statistisch signifikanter Effekt des Alters auf die PLR bei hohen Leuchtdichten (Sharma et al., 2016, Rukmini et al., 2017). Allerdings fand sich ebenso eine altersunabhängige Erhaltung der Zapfen- und Stäbchenvermittelten transienten PLR und maximalen relativen Konstriktionsamplitude sowie der PIPR durch ipRGCs (Kankipati et al., 2010) in weiteren Studien (Adhikari et al., 2015). Mögliche Gründe für diese widersprüchlichen Forschungsergebnisse sind unterschiedliche Stimuluseigenschaften und Stimulationsprotokolle (Eto and Higuchi, 2023), sowie verschiedene Arten der Alterskategorisierung. In der vorliegenden Studie zeigte sich weder auf absMCA und relMCA in beiden Messprotokollen noch auf die Latenzzeit unter photopischen Bedingungen ein statistisch signifikanter Effekt der Altersgruppe. Die Latenzzeit in der scotCPC war jedoch interessanterweise in der ältesten Altersgruppe von 60 bis 79 Jahren etwa 20 ms länger als in der jüngsten Altersgruppe von 18 bis 29 Jahren. Besonders für Stäbchen konnte eine Verringerung der Anzahl und Sensitivität der Fotorezeptoren mit zunehmendem Alter gezeigt werden (Curcio et al., 1993). Dieser Alterungsprozess spiegelte sich allerdings nicht in der Konstriktionsamplitude der PLR in der CPC wider, weshalb in der Normdatenbank für die relMCA keine altersspezifischen Werte verwendet werden müssen. In einer vorangegangenen Studie zur Funktionsfähigkeit der Stäbchen (Stingl et al., 2021) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Ausmaß der PLR durch überschwellige Stimulation in der CPC nicht mit der Netzhautsensitivität, gemessen mit der Dunkeladaptierten chromatischen Perimetrie, korreliert. Dies bekräftigt den ergänzenden Nutzen beider Methoden in der Funktionsdiagnostik der Stäbchen. Gerade aufgrund der überschwelligen

Stimulation dient die CPC bei gesunden Personen der Bestimmung des Verteilungsmusters der funktionsfähigen Fotorezeptoren und der Funktionstüchtigkeit des nachgeschalteten neuronalen Netzwerks. Die CPC wurde hingegen nicht zur Schwellenbestimmung der Sensitivität der einzelnen Fotorezeptoren konzipiert. Stimuli mit höherer Lichtintensität lösen physiologischerweise stärker ausgeprägte Pupillenantworten aus, was jedoch nicht der Schwellenbestimmung dient, sondern die Sensitivität der Netzhaut und des nachfolgenden neuronalen Systems wiedergibt. Die CPC eignet sich hervorragend dafür, Veränderungen der PLR aufgrund verschiedenster Erkrankungen von Fotorezeptordysfunktionen in RP (Kelbsch et al., 2023b), AMD (Kelbsch et al., 2020) oder erblich bedingten Makuladystrophien (Stingl et al., 2022a) bis hin zu halbseitigen Gesichtsfeldausfällen bei okzipitaler Ischämie (Maeda et al., 2017) zu detektieren. Sogar die Auswirkungen von retinaler Gentherapie (Stingl et al., 2022b) und Unterschiede in der Ausprägung der Fotorezeptordysfunktion bei unterschiedlichen Genotypen der RP können mithilfe der CPC objektiv erfasst werden (Kelbsch et al., 2023b). Dennoch bleibt es Gegenstand weiterer Forschung, bis zu welchem Ausmaß mit der CPC der alterungsbedingte Verlust einer bestimmten Anzahl an Zellen in der gesunden Netzhaut trotz möglicher retinaler Kompensationsmechanismen detektiert werden kann. Eine geringe Reduktion der Fotorezeptorsensitivität wird möglicherweise nicht erkannt werden. Gründe hierfür sind die überschwellige Stimulation in der CPC, wie in der gesamten Pupillenforschung, und die interindividuelle Variabilität der PLR. Zusätzlich muss der Einfluss von Summation (Volbrecht et al., 2000) und Konvergenz einer Vielzahl von Fotorezeptoren auf eine deutlich geringere Anzahl an ipRGCs beachtet werden (Lee et al., 2019). Daher erscheint die kombinierte Analyse von relMCA und Latenzzeit in Patientendaten vorteilhaft.

4.3 Darstellung der retinalen Verteilungsmuster von Zapfen und Stäbchen in der CPC und Einfluss der Stimulusexzentrizität auf die PLR

Die beiden in dieser Studie verwendeten Stimulationsprotokolle erwiesen sich als geeignet für die spezifische und retinotopie Evaluation von vorwiegend entweder

der Zapfen- oder der Stäbchenfunktion. Wie im *Hill of Vision* graphisch dargestellt, kann das Verteilungsmuster der funktionsfähigen retinalen Fotorezeptoren anhand der relMCA analysiert werden. In der photCPC zeigte sich hierbei ein hoher Scheitelwert an der Position des zentralen Stimulus in Korrelation mit der hohen Zapfendichte in der Fovea einer gesunden menschlichen Netzhaut (Legras et al., 2018, Curcio et al., 1990). Die kleine zentrale Spitze der relMCA in der scotCPC kann durch ein räumliches Filtermodell erklärt werden, das die Stimulusgröße beinhaltet und das hügelartige Verteilungsmuster der Stäbchenantworten in die ringförmige Verteilung der Stäbchendichte innerhalb der Netzhaut umwandelt (Stingl et al., 2021). Die höchste Stäbchendichte befindet sich in einer Distanz von 15° bis 20° von der Makula, während die Dichte der Stäbchen-Bipolaren bei 7° bis 15° am höchsten ist und die All-Amakrinzellen das Maximum ihrer Verteilungsdichte bei 2° bis 7° erreichen (Lee et al., 2019). Diese unterschiedliche Verteilung führt zu sich ändernden Summationseffekten von der zentralen zur peripheren Netzhaut innerhalb des Signalwegs der Stäbchen. Ein weiterer Faktor, der zu höheren zentralen Stäbchenantworten in der CPC führt, ist die geringere räumliche Auflösung aufgrund der relativ großen Stimuli im scotCPC-Messprotokoll. Dies trägt dazu bei, dass der zentrale Stimulus auch den parazentralen Bereich bis 5° abdeckt.

Die Exzentrizität der Stimuli hatte von der Vielzahl an betrachteten epidemiologischen und ophthalmologischen Daten den größten Einfluss auf die relMCA und die Latenzzeit der PLR im photopischen und skotopischen Messprotokoll. Dies ist übereinstimmend mit vorangegangenen Studien zur CPC (Kelbsch et al., 2019a), Pupillenperimetrie (Kardon et al., 1991) und Pupillenkampimetrie (Schmid et al., 2000) bei gesunden Personen. Mögliche Gründe für den starken Einfluss der Exzentrizität auf die PLR sind die Verteilung der Fotorezeptoren innerhalb der Netzhaut, wie bereits ausgeführt, sowie die sinkende Ganglienzelldichte in der Netzhautperipherie (Curcio and Allen, 1990) und die folglich geringere Aktivierung des Signalwegs der Pupillenbahn (Hu et al., 2020).

4.4 Unabhängigkeit der PLR von Irisfarbe und Geschlecht; morphologisch-funktionelle Diskrepanz zwischen Netzhautschichten und PLR

In Anbetracht der großen Stichprobe von 150 Personen in der vorliegenden Studie kann konstatiert werden, dass die PLR unabhängig von Irisfarbe und Geschlecht ist. Bestätigend können vorangegangene Studien herangezogen werden, in denen die Irisfarbe die relative Konstriktionsamplitude ebenfalls nicht statistisch signifikant beeinflusste (Munch et al., 2016) und das Geschlecht sowohl auf die Konstriktionsamplitude als auch auf die Latenzzeit keinen statistisch signifikanten Effekt hatte (Aderman et al., 2024).

Zwischen den erhobenen OCT-Daten und dem *pupillary function volume* besteht keine relevante Korrelation in den CPC-Messungen des Normkollektivs. Hierdurch wird deutlich, dass das morphologische Volumen einzelner Netzhautschichten in der gesunden menschlichen Netzhaut keinen direkten Einfluss auf das Ausmaß der Konstriktionsamplitude der PLR hat. Dies entspricht der morphologisch-funktionellen Diskrepanz, die in Netzhautdegenerationen sowohl bei *RPE65*-assoziiertes RP (Maguire et al., 2021) als auch bei weiteren häufigen Genotypen der RP (Kelbsch et al., 2023b) beobachtet werden konnte.

4.5 Klinisch nicht relevante Einflussfaktoren auf Zapfen- und Stäbchen-spezifische Antworten in der CPC

Der Stimulationsort im GF, die Jahreszeit und die Tageszeit der Messung hatten unter bestimmten Stimulusbedingungen einen statistisch signifikanten Effekt auf die relMCA und die Latenzzeit, der jedoch als nicht klinisch relevant beurteilt wurde. Die gemessenen Unterschiede waren in diesen Fällen sehr gering, möglicherweise durch methodische Gegebenheiten beeinflusst oder zeigten bei weitergehender Analyse keine statistisch signifikanten Effekte. Dennoch werden diese Effekte im Folgenden zu wissenschaftlichen Zwecken und der Vollständigkeit halber kurz diskutiert.

4.5.1 Stimulationsort im Gesichtsfeld

Unter photopischen und skotopischen Bedingungen führten Stimuli in der temporalen Gesichtsfeldhälfte zu einer leicht höheren relMCA und in der photCPC zusätzlich zu etwas kürzeren Latenzzeiten im Vergleich zur Stimulation in der nasalen Gesichtsfeldhälfte. Hierbei stellt die Kopfpositionierung der Teilnehmenden mittig vor dem Monitor und damit die etwas temporal gelegene Position des untersuchten Auges eine Einschränkung für die Verwertbarkeit temporal-nasaler Vergleiche in der Auswertung der CPC dar. Die Daten des temporalen Gesichtsfeldes könnten hierdurch möglicherweise diskret verstärkt werden. Allerdings konnte auch in perimetrischen Untersuchungen eine höhere Sensitivität der temporalen Gesichtsfeldhälfte gezeigt werden (Fahle and Schmid, 1988), sodass neben dem methodischen Einfluss in der CPC ein tatsächlicher Effekt nicht ausgeschlossen ist.

Die relMCA war in der photCPC im inferioren GF etwas höher als im superioren GF, während es in der scotCPC umgekehrt der Fall war. Ähnlich zu den Ergebnissen der scotCPC wurde in einer vorangegangenen Studie mit anderen Stimulationscharakteristika festgestellt, dass das temporal superiore GF die höchste Sensitivität aufweist (Schmid et al., 2004). Die untere Gesichtsfeldhälfte hingegen zeigte sich besonders sensitiv für Aktivitäten unter photopischen Bedingungen mit Zapfenbeteiligung, speziell die Stimulusdiskrimination und gerade die Farbdiskrimination (Levine and McAnany, 2005). Dennoch sind die gemessenen Unterschiede in der vorliegenden Studie so gering und nahe an der Grenze des Präzisions- und Auflösungsvermögens der Methode, dass sie für die klinische Auswertung der PLR als vernachlässigbar betrachtet werden können.

4.5.2 Jahres- und Tageszeit der Messung

Allein die relMCA in der scotCPC wurde durch die Jahres- und Tageszeit der Messung beeinflusst. Es zeigten sich höhere Mittelwerte der relMCA im Winter und bei Messungen am Vormittag. Die Unterschiede zwischen Messungen im Sommer vs. Winter respektive am Vormittag vs. Nachmittag waren in einigen Vergleichen deutlich ausgeprägt. Beim Vergleich an den einzelnen

Exzentrizitäten waren die Differenzen jedoch nicht statistisch signifikant und wurden daher nicht weiter untersucht. In einer früheren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die ipRGC-vermittelten Pupillenantworten im Winter höher sind, während die PLR durch Zapfen- und Stäbchen-spezifische Reize unabhängig von der Jahreszeit ist (Munch et al., 2017). Ebenfalls wurde festgestellt, dass sich die durch ipRGCs beeinflusste PIPR im Tagesverlauf statistisch signifikant verändert. Diese Änderungen traten in Korrelation mit den zirkadianen Änderungen des Melatoninspiegels auf, der gegen 21:30 Uhr sein Maximum erreicht. Auch hier änderten sich die Zapfenantworten im Tagesverlauf nicht statistisch signifikant (Munch et al., 2012).

4.6 Test-Retest-Reliabilität für relMCA und Latenzzeit

Für die relMCA konnte in der vorliegenden Studie eine exzellente Test-Retest-Reliabilität gezeigt werden. Dies bestätigt die Eignung der relMCA als robusten Biomarker in der klinischen Anwendung der CPC. Die Test-Retest-Reliabilität der Latenzzeit war moderat bei Zapfen-spezifischer Stimulation und relativ schwach bei Stäbchen-spezifischer Stimulation, obwohl die mittleren Differenzen zwischen den beiden Messungen nur minimal und methodisch nahe der maximalen Auflösungsgrenze lagen. Es bestand jedoch eine erhebliche Streuung der Differenzen einzelner Messungen, vor allem bei gering ausgeprägten Pupillenantworten. Zwei Aspekte können zur Erklärung hierfür herangezogen werden: die höhere intraindividuelle Variabilität der Latenzzeit (Bergamin and Kardon, 2003) sowie kleine Ungenauigkeiten in der Latenzzeit-Berechnung, da diese deutlich anspruchsvoller ist als die Berechnung der relMCA, vor allem bei geringen Konstriktionsamplituden. Die in dieser Studie verwendete Analysemethode der Latenzzeit erwies sich bereits als robuster als die bislang angewandten Analyse, wie in Kapitel 2.3 Datensichtung erläutert. Eine weitere Analysemethode ist die Auswertung der Latenzzeiten pro Exzentrizität, d.h. gemittelt für alle Stimulationsorte derselben Exzentrizität. Diese Analyse ist für PLR-Kurven im Normbereich äquivalent zur hier verwendeten Methode, könnte allerdings in der Auswertung anspruchsvoller Daten vorteilhaft sein. Die Entwicklung und Erprobung weiterer Strategien zur Auswertung der Latenzzeit

sind wichtig, um in verschiedenen Patient:innenkollektiven die Latenzzeit der PLR möglichst präzise analysieren zu können.

4.7 Normdaten Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Antworten in der CPC

Die große Studienkohorte mit resultierendem aussagekräftigen Datensatz ermöglichte die Erstellung einer Normdatenbank für die photopische und skotopische CPC. Für diese Messprotokolle dient die relMCA als sehr robuster Ausleseparameter und die Latenzzeit als valide Messgröße für die zeitliche Dynamik der PLR in der Beurteilung der Funktionsfähigkeit von Zapfen und Stäbchen (Kardon et al., 2009) sowie der Pupillenbahn. Mithilfe der Normdatenbank wird eine klinische Einordnung der CPC-Ergebnisse von Patient:innen und darüber hinaus die Vergleichbarkeit verschiedener Studienergebnisse möglich. Sehr anschauliche Vergleichsparameter für die Zapfen- und Stäbchenfunktion innerhalb von 30° Exzentrizität sind zusätzlich das *pupillary function volume* und der Steilheitsgrad des *Hill of Vision*.

4.8 Schlussfolgerung

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt die vorliegende Studie die Robustheit der CPC und validiert damit relMCA und Latenzzeit der PLR als geeignete Ausleseparameter zur objektiven Funktionsdiagnostik der Netzhaut und der Pupillenbahn. Die vorgestellte Normdatenbank mit Berücksichtigung der Stimulusexzentrizität als den relevanten Einflussfaktor auf die PLR ermöglicht die einfach anwendbare Klassifikation der CPC-Ergebnisse von Patient:innen im klinischen Alltag. Hiermit wurde eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von relMCA und Latenzzeit der PLR als Biomarker für die lokale Netzhautfunktion geschaffen.

4.9 Limitationen

Trotz der großen Anzahl an Studienteilnehmenden war in der Evaluation der relMCA eine hohe Variabilität festzustellen, besonders an den peripheren

Stimuluspositionen. Gerade in der Peripherie sind jedoch aussagekräftige Normintervalle elementar, besonders für die Auswertung der Funktion der Fotorezeptoren bei Patient:innen mit RP. Seit dem Beginn der klinischen Pupillenforschung wurde eine hohe interindividuelle Variabilität der PLR-Parameter beschrieben. Da andere Faktoren ausgeschlossen werden konnten, scheint diese natürliche Variabilität den Hauptgrund für die weiten Standardabweichungen in der vorliegenden Forschungsarbeit darzustellen. Dadurch wird die Interpretation einer einzelnen, isoliert betrachteten CPC-Messung in einzelnen Patient:innen eingeschränkt. In Kombination mit anderen Biomarkern ist der diagnostische Wert der CPC jedoch äußerst hoch. Ebenso in der Verlaufsbeurteilung einzelner Patient:innen über die Zeit. In der klinischen Praxis ist die intraindividuelle Variabilität deutlich wichtiger als die interindividuelle Variabilität: Die Verlaufsbeobachtung der Progression verschiedener Erkrankungen oder der Einsatz als funktioneller Biomarker in klinischen Interventionsstudien werden die primären Anwendungsbereiche der CPC sein.

5. Zusammenfassung

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

Das Ziel dieser klinischen Arbeit war die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Pupillenlichtreaktion (PLR) als Biomarker für die lokale Netzhautfunktion. Mithilfe der Aufarbeitung epidemiologischer Daten eines großen Normkollektivs konnte eine Normdatenbank für die Auswertung der Chromatischen Pupillencampimetrie (CPC) erstellt werden.

Von 150 gesunden Teilnehmenden (94 Frauen) im Alter von 18 bis 79 Jahren (Median = 46 Jahre) wurden demographische Daten und ophthalmologische Befunde erhoben. Anschließend erfolgte die Messung von Zapfen- und Stäbchen-spezifischen Pupillenantworten in entsprechenden CPC-Protokollen. Zur Bestimmung der Einflussfaktoren auf die PLR wurden linear mixed-effects Modelle angewendet. Ebenfalls wurden die Daten der durchgeführten Optischen Kohärenztomographie (OCT) mit dem *pupillary function volume*, einem funktionellen Summenwert der topographischen, dreidimensionalen Darstellung aller relativen maximalen Konstriktionsamplituden (relMCA) der PLR, korreliert.

Die relMCA sowie die Latenzzeit der PLR wurden bei L-Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Stimulation statistisch signifikant durch die Stimulusexzentrität beeinflusst (jeweils $p < 0,0001$). Die Irisfarbe und das Geschlecht der Teilnehmenden hatten keine Auswirkung auf die relMCA oder die Latenzzeit. Ein sehr geringer Effekt bestand unter einzelnen Stimulusbedingungen durch den Ort der Stimulation im Gesichtsfeld, die Jahreszeit und die Tageszeit der Messung. Das Alter der Teilnehmenden hatte unter skotopischen Bedingungen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Latenzzeit mit Verlängerung der Latenzzeit ab dem Alter von 60 Jahren. Der *Baseline*-Pupillendurchmesser sank unter photopischen und skotopischen Bedingungen statistisch signifikant mit

zunehmendem Alter (jeweils $p < 0,0001$). Zwischen dem *pupillary function volume* und den OCT-Daten bestand keine relevante Korrelation.

In der vorliegenden Forschungsarbeit zur PLR in einem Normkollektiv konnte gezeigt werden, dass die Stimulusexzentrität bei L-Zapfen- und Stäbchen-spezifischer Stimulation den relevanten Einflussfaktor auf die relMCA und die Latenzzeit der PLR darstellt. Die Latenzzeit wird zusätzlich durch das Alter beeinflusst und ist ab einem Alter von 60 Jahren unter skotopischen Bedingungen verlängert. In Anbetracht der großen Studienkohorte konnte eine repräsentative Normdatenbank für relMCA und Latenzzeit als valide Kenngrößen für Zapfen- und Stäbchen-spezifische Pupillenantworten etabliert werden. Für die CPC stellt dies eine weitere Validierung der PLR als Biomarker für die lokale Netzhautfunktion dar.

6. Literaturverzeichnis

- Aderman MJ, Meister MR, Roach MH, et al. Normative Values for Pupillary Light Reflex Metrics Among Healthy Service Academy Cadets. *Mil Med.* Jul 3 2024;189(7-8):1593-1602. doi:10.1093/milmed/usad271
- Adhikari P, Pearson CA, Anderson AM, Zele AJ, Feigl B. Effect of Age and Refractive Error on the Melanopsin Mediated Post-Illumination Pupil Response (PIPR). *Sci Rep.* Dec 1 2015;5:17610. doi:10.1038/srep17610
- Adhikari P, Zele AJ, Thomas R, Feigl B. Quadrant Field Pupillometry Detects Melanopsin Dysfunction in Glaucoma Suspects and Early Glaucoma. *Sci Rep.* Sep 13 2016;6:33373. doi:10.1038/srep33373
- Alexandridis E, Krastel H, Reuther R. Disturbances of the pupil reflex associated with lesions of the upper visual pathway. *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie.* 1979;209:199-208.
- Ben Ner D, Sher I, Hamburg A, et al. Chromatic pupilloperimetry for objective diagnosis of Best vitelliform macular dystrophy. *Clin Ophthalmol.* 2019;13:465-475. doi:10.2147/OPHTH.S191486
- Bergamin O, Kardon RH. Latency of the pupil light reflex: sample rate, stimulus intensity, and variation in normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Apr 2003;44(4):1546-54. doi:10.1167/iovs.02-0468
- Bitsios P, Szabadi E, Bradshaw CM. Comparison of the effects of venlafaxine, paroxetine and desipramine on the pupillary light reflex in man. *Psychopharmacology (Berl).* Apr 1999;143(3):286-92. doi:10.1007/s002130050949
- Bowmaker JK, Dartnall HJ. Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J Physiol.* Jan 1980;298:501-11. doi:10.1113/jphysiol.1980.sp013097
- Boycott BB, Kolb H. The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat. *J Comp Neurol.* Mar 1 1973;148(1):91-114. doi:10.1002/cne.901480106
- Brown TM, Gias C, Hatori M, et al. Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* Dec 7 2010;8(12):e1000558. doi:10.1371/journal.pbio.1000558
- Chibel R, Sher I, Ben Ner D, et al. Chromatic Multifocal Pupillometer for Objective Perimetry and Diagnosis of Patients with Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology.* Sep 2016;123(9):1898-911. doi:10.1016/j.ophtha.2016.05.038
- Cibis GW, Campos EC, Aulhorn E. Pupillomotor latent period. *Vision Res.* 1977;17(6):737-8. doi:10.1016/s0042-6989(77)80012-6
- Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol.* Oct 1 1990;300(1):5-25. doi:10.1002/cne.903000103
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol.* Feb 22 1990;292(4):497-523. doi:10.1002/cne.902920402
- Curcio CA, Millican CL, Allen KA, Kalina RE. Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov 1993;34(12):3278-96.
- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature.* Feb 17 2005;433(7027):749-54. doi:10.1038/nature03387

- Dowling JE, Boycott BB. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* Nov 15 1966;166(1002):80-111. doi:10.1098/rspb.1966.0086
- Ellis CJ. The pupillary light reflex in normal subjects. *Br J Ophthalmol.* Nov 1981;65(11):754-9. doi:10.1136/bjo.65.11.754
- Eto T, Higuchi S. Review on age-related differences in non-visual effects of light: melatonin suppression, circadian phase shift and pupillary light reflex in children to older adults. *J Physiol Anthropol.* Jun 24 2023;42(1):11. doi:10.1186/s40101-023-00328-1
- Fahle M, Schmid M. Naso-temporal asymmetry of visual perception and of the visual cortex. *Vision Res.* 1988;28(2):293-300. doi:10.1016/0042-6989(88)90157-5
- Famiglietti EV, Jr., Kolb H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* Feb 7 1975;84(2):293-300. doi:10.1016/0006-8993(75)90983-x
- Feigl B, Mattes D, Thomas R, Zele AJ. Intrinsically photosensitive (melanopsin) retinal ganglion cell function in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jun 21 2011;52(7):4362-7. doi:10.1167/iovs.10-7069
- Friedman D, Hakerem G, Sutton S, Fleiss JL. Effect of stimulus uncertainty on the pupillary dilation response and the vertex evoked potential. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* May 1973;34(5):475-84. doi:10.1016/0013-4694(73)90065-5
- Gamlin PD, Clarke RJ. The pupillary light reflex pathway of the primate. *J Am Optom Assoc.* Jul 1995;66(7):415-8.
- Gamlin PD, McDougal DH, Pokorny J, Smith VC, Yau KW, Dacey DM. Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Res.* Mar 2007;47(7):946-54. doi:10.1016/j.visres.2006.12.015
- Goldberg S, Coulombre AJ. Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study. *J Comp Neurol.* Dec 1972;146(4):507-18. doi:10.1002/cne.901460406
- Harms H. Grundlagen, methodik und bedeutung der pupillenperimetrie für die physiologie und pathologie des sehorgans. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie.* 1949;149:1-68.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* Feb 8 2002;295(5557):1065-70. doi:10.1126/science.1069609
- Heine C, Yazdani F, Wilhelm H. [Pupillary diameter in every day situations]. *Klin Monbl Augenheilkd.* Nov 2013;230(11):1114-8. Pupillenweite in Alltagssituationen. doi:10.1055/s-0033-1350927
- Hess EH, Polt JM. Pupil Size in Relation to Mental Activity during Simple Problem-Solving. *Science.* Mar 13 1964;143(3611):1190-2. doi:10.1126/science.143.3611.1190
- Hood DC, Odel JG, Chen CS, Winn BJ. The multifocal electroretinogram. *J Neuroophthalmol.* Sep 2003;23(3):225-35. doi:10.1097/00041327-200309000-00008
- Horn AK, Eberhorn A, Hartig W, Ardeleanu P, Messoudi A, Buttner-Ennever JA. Periocular motor cell groups in monkey and man defined by their

- histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol.* Mar 20 2008;507(3):1317-35. doi:10.1002/cne.21598
- Hu X, Hisakata R, Kaneko H. Effects of stimulus size, eccentricity, luminance, and attention on pupillary light response examined by concentric stimulus. *Vision Res.* May 2020;170:35-45. doi:10.1016/j.visres.2020.03.008
- Ishikawa S, Bensaoula T, Uga S, Mukuno K. Electron-microscopic study of iris nerves and muscles in diabetes. *Ophthalmologica.* 1985;191(3):172-83. doi:10.1159/000309582
- Jain NS, Jain SV, Wang X, et al. Visualization of Nerve Fiber Orientations in the Human Optic Chiasm Using Photomicrographic Image Analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Oct 2015;56(11):6734-9. doi:10.1167/iovs.15-17443
- Jendritzka R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3
- Jenkins AJ, Keenan RM, Henningfield JE, Cone EJ. Correlation between pharmacological effects and plasma cocaine concentrations after smoked administration. *J Anal Toxicol.* Oct 2002;26(7):382-92. doi:10.1093/jat/26.7.382
- Jung R, Kelbsch C, Wilhelm H, et al. Cell-specific electrical stimulation of human retinal neurons assessed by pupillary response dynamics in vivo. *Exp Eye Res.* Sep 2022;222:109185. doi:10.1016/j.exer.2022.109185
- Jung R, Kempf M, Pohl L, et al. Frequency-dependent retinal responsiveness to sinusoidal electrical stimulation in achromatopsia. *Exp Eye Res.* Jan 2023;226:109349. doi:10.1016/j.exer.2022.109349
- Kankipati L, Girkin CA, Gamlin PD. Post-illumination pupil response in subjects without ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* May 2010;51(5):2764-9. doi:10.1167/iovs.09-4717
- Kardon R, Anderson SC, Damarjian TG, Grace EM, Stone E, Kawasaki A. Chromatic pupil responses: preferential activation of the melanopsin-mediated versus outer photoreceptor-mediated pupil light reflex. *Ophthalmology.* Aug 2009;116(8):1564-73. doi:10.1016/j.ophtha.2009.02.007
- Kardon R, Anderson SC, Damarjian TG, Grace EM, Stone E, Kawasaki A. Chromatic pupillometry in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmology.* Feb 2011;118(2):376-81. doi:10.1016/j.ophtha.2010.06.033
- Kardon RH, Kirkali PA, Thompson HS. Automated pupil perimetry. Pupil field mapping in patients and normal subjects. *Ophthalmology.* Apr 1991;98(4):485-95; discussion 495-6. doi:10.1016/s0161-6420(91)32267-x
- Kawasaki A, Collomb S, Leon L, Munch M. Pupil responses derived from outer and inner retinal photoreception are normal in patients with hereditary optic neuropathy. *Exp Eye Res.* Mar 2014;120:161-6. doi:10.1016/j.exer.2013.11.005

- Kelbsch C, Maeda F, Strasser T, et al. Pupillary responses driven by ipRGCs and classical photoreceptors are impaired in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jul 2016;254(7):1361-70. doi:10.1007/s00417-016-3351-9
- Kelbsch C, Maeda F, Lisowska J, et al. Analysis of retinal function using chromatic pupillography in retinitis pigmentosa and the relationship to electrically evoked phosphene thresholds. *Acta Ophthalmol*. Jun 2017a;95(4):e261-e269. doi:10.1111/aos.13259
- Kelbsch C, Jalligampala A, Strasser T, et al. Phosphene perception and pupillary responses to sinusoidal electrostimulation - For an objective measurement of retinal function. *Exp Eye Res*. Nov 2018;176:210-218. doi:10.1016/j.exer.2018.07.010
- Kelbsch C, Stingl K, Kempf M, et al. Objective Measurement of Local Rod and Cone Function Using Gaze-Controlled Chromatic Pupil Campimetry in Healthy Subjects. *Transl Vis Sci Technol*. Nov 2019a;8(6):19. doi:10.1167/tvst.8.6.19
- Kelbsch C, Strasser T, Chen Y, et al. Standards in Pupillography. *Front Neurol*. 2019b;10:129. doi:10.3389/fneur.2019.00129
- Kelbsch C, Lange J, Wilhelm H, et al. Chromatic Pupil Campimetry Reveals Functional Defects in Exudative Age-Related Macular Degeneration with Differences Related to Disease Activity. *Transl Vis Sci Technol*. May 2020;9(6):5. doi:10.1167/tvst.9.6.5
- Kelbsch C, Stingl K, Jung R, et al. How lesions at different locations along the visual pathway influence pupillary reactions to chromatic stimuli. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. May 2022;260(5):1675-1685. doi:10.1007/s00417-021-05513-5
- Kelbsch C, Jendritza R, Strasser T, et al. Central retina plays a decisive role in the suppression of pupillary escape. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jun 2023a;261(6):1713-1722. doi:10.1007/s00417-022-05959-1
- Kelbsch C, Kempf M, Jung R, et al. Rod and Cone Function Measured Objectively by Chromatic Pupil Campimetry Show a Different Preservation Between Distinct Genotypes in Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1 2023b;64(11):18. doi:10.1167/iovs.64.11.18
- Kelbsch CB, Maeda F, Strasser T, Peters TM, Wilhelm BJC, Wilhelm HM. Color Pupillography in Dorsal Midbrain Syndrome. *J Neuroophthalmol*. Sep 2017b;37(3):247-252. doi:10.1097/WNO.0000000000000527
- Kolb H. The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J Neurocytol*. Apr 1977;6(2):131-53. doi:10.1007/BF01261502
- Lam BL, Thompson HS, Corbett JJ. The prevalence of simple anisocoria. *Am J Ophthalmol*. Jul 15 1987;104(1):69-73. doi:10.1016/0002-9394(87)90296-0
- Lee SCS, Martin PR, Grunert U. Topography of Neurons in the Rod Pathway of Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 1 2019;60(8):2848-2859. doi:10.1167/iovs.19-27217
- Legras R, Gaudric A, Woog K. Distribution of cone density, spacing and arrangement in adult healthy retinas with adaptive optics flood illumination. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191141. doi:10.1371/journal.pone.0191141

- Levine MW, McAnany JJ. The relative capabilities of the upper and lower visual hemifields. *Vision Res.* Oct 2005;45(21):2820-30. doi:10.1016/j.visres.2005.04.001
- Lisowska J, Lisowski L, Kelbsch C, et al. Development of a Chromatic Pupillography Protocol for the First Gene Therapy Trial in Patients With CNGA3-Linked Achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Feb 1 2017;58(2):1274-1282. doi:10.1167/iovs.16-20505
- Loewenfeld IE. *The Pupil. Anatomy, physiology and clinical applications.* Wayne State University Press. Volume I,1.; 1993a.
- Loewenfeld IE. *The Pupil. Anatomy, physiology and clinical applications.* Wayne State University Press. Volume I,2.; 1993b.
- Lorenz B, Strohmayer E, Zahn S, et al. Chromatic pupillometry dissects function of the three different light-sensitive retinal cell populations in RPE65 deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Aug 17 2012;53(9):5641-52. doi:10.1167/iovs.12-9974
- Lucas RJ, Douglas RH, Foster RG. Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci.* Jun 2001;4(6):621-6. doi:10.1038/88443
- Maeda F, Kelbsch C, Strasser T, et al. Chromatic pupillography in hemianopia patients with homonymous visual field defects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Sep 2017;255(9):1837-1842. doi:10.1007/s00417-017-3721-y
- Maguire AM, Bennett J, Aleman EM, Leroy BP, Aleman TS. Clinical Perspective: Treating RPE65-Associated Retinal Dystrophy. *Mol Ther.* Feb 3 2021;29(2):442-463. doi:10.1016/j.ymthe.2020.11.029
- Mathot S. Pupillometry: Psychology, Physiology, and Function. *J Cogn.* Feb 21 2018;1(1):16. doi:10.5334/joc.18
- May PJ, Sun W, Wright NF, Erichsen JT. Pupillary light reflex circuits in the macaque monkey: the preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Brain Struct Funct.* Jan 2020;225(1):403-425. doi:10.1007/s00429-019-02000-w
- McKay RE, Larson MD. Detection of opioid effect with pupillometry. *Auton Neurosci.* Nov 2021;235:102869. doi:10.1016/j.autneu.2021.102869
- Munch M, Leon L, Crippa SV, Kawasaki A. Circadian and wake-dependent effects on the pupil light reflex in response to narrow-bandwidth light pulses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul 3 2012;53(8):4546-55. doi:10.1167/iovs.12-9494
- Munch M, Kourti P, Brouzas D, Kawasaki A. Variation in the pupil light reflex between winter and summer seasons. *Acta Ophthalmol.* May 2016;94(3):e244-6. doi:10.1111/aos.12966
- Munch M, Ladaïque M, Roemer S, Hashemi K, Kawasaki A. Melanopsin-Mediated Acute Light Responses Measured in Winter and in Summer: Seasonal Variations in Adults with and without Cataracts. *Front Neurol.* 2017;8:464. doi:10.3389/fneur.2017.00464
- Newmeyer MN, Swortwood MJ, Taylor ME, Abulseoud OA, Woodward TH, Huestis MA. Evaluation of divided attention psychophysical task performance and effects on pupil sizes following smoked, vaporized and

- oral cannabis administration. *J Appl Toxicol*. Aug 2017;37(8):922-932. doi:10.1002/jat.3440
- Perry VH, Cowey A. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*. Aug 1984;12(4):1125-37. doi:10.1016/0306-4522(84)90007-1
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. Jan 15 2000;20(2):600-5.
- Rajan MS, Bremner FD, Riordan-Eva P. Pupil perimetry in the diagnosis of functional visual field loss. *J R Soc Med*. Oct 2002;95(10):498-500. doi:10.1177/014107680209501005
- Rukmini AV, Milea D, Aung T, Gooley JJ. Pupillary responses to short-wavelength light are preserved in aging. *Sci Rep*. Mar 7 2017;7:43832. doi:10.1038/srep43832
- Sabeti F, Maddess T, Essex RW, James AC. Multifocal pupillography identifies ranibizumab-induced changes in retinal function for exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan 25 2012;53(1):253-60. doi:10.1167/iovs.11-8004
- Sabeti F, James AC, Essex RW, Maddess T. Multifocal pupillography identifies retinal dysfunction in early age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jul 2013;251(7):1707-16. doi:10.1007/s00417-013-2273-z
- Schmid R, Wilhelm B, Wilhelm H. Pupillomotor campimetry in normals. *Neuroophthalmology*. 2000;23(1):7-13.
- Schmid R, Ceurremans P, Luedtke H, Wilhelm BJ, Wilhelm HM. Effect of age on the pupillomotor field. *J Neuroophthalmol*. Sep 2004;24(3):228-34. doi:10.1097/00041327-200409000-00010
- Schmid R, Luedtke H, Wilhelm BJ, Wilhelm H. Pupil campimetry in patients with visual field loss. *Eur J Neurol*. Aug 2005;12(8):602-8. doi:10.1111/j.1468-1331.2005.01048.x
- Sharma S, Baskaran M, Rukmini AV, et al. Factors influencing the pupillary light reflex in healthy individuals. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jul 2016;254(7):1353-9. doi:10.1007/s00417-016-3311-4
- Skaat A, Sher I, Kolker A, et al. Pupillometer-based objective chromatic perimetry in normal eyes and patients with retinal photoreceptor dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Apr 17 2013;54(4):2761-70. doi:10.1167/iovs.12-11127
- Skorkovska K, Ludtke H, Wilhelm H, Wilhelm B. Pupil campimetry in patients with retinitis pigmentosa and functional visual field loss. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jun 2009a;247(6):847-53. doi:10.1007/s00417-008-1015-0
- Skorkovska K, Wilhelm H, Ludtke H, Wilhelm B. How sensitive is pupil campimetry in hemifield loss? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jul 2009b;247(7):947-53. doi:10.1007/s00417-009-1040-7
- Smith SE, Smith SA, Brown PM, Fox C, Sonksen PH. Pupillary signs in diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J*. Sep 30 1978;2(6142):924-7. doi:10.1136/bmj.2.6142.924
- Sonntag A, Kelbsch C, Jung R, et al. Effect of central and peripheral cone- and rod-specific stimulation on the pupillary light reflex. *Int Ophthalmol*. May 2022;42(5):1427-1436. doi:10.1007/s10792-021-02132-1

- Stingl K, Peters T, Strasser T, et al. Pupillographic campimetry: an objective method to measure the visual field. *Biomed Tech (Berl)*. Nov 27 2018;63(6):729-734. doi:10.1515/bmt-2017-0029
- Stingl K, Stingl K, Nowomiejska K, et al. Clinical Protocols for the Evaluation of Rod Function. *Ophthalmologica*. 2021;244(5):396-407. doi:10.1159/000510888
- Stingl K, Hoyng C, Kempf M, et al. Evaluation of Local Rod and Cone Function in Stargardt Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 2 2022a;63(3):6. doi:10.1167/iovs.63.3.6
- Stingl K, Kempf M, Bartz-Schmidt KU, et al. Spatial and temporal resolution of the photoreceptors rescue dynamics after treatment with voretigene neparvovec. *Br J Ophthalmol*. Jun 2022b;106(6):831-838. doi:10.1136/bjophthalmol-2020-318286
- Stingl KT, Kuehlewein L, Weisschuh N, et al. Chromatic Full-Field Stimulus Threshold and Pupillography as Functional Markers for Late-Stage, Early-Onset Retinitis Pigmentosa Caused by CRB1 Mutations. *Transl Vis Sci Technol*. Nov 2019;8(6):45. doi:10.1167/tvst.8.6.45
- Stone LB, Silk JS, Siegle GJ, et al. Depressed Adolescents' Pupillary Response to Peer Acceptance and Rejection: The Role of Rumination. *Child Psychiatry Hum Dev*. Jun 2016;47(3):397-406. doi:10.1007/s10578-015-0574-7
- Szabadi E. Functional Organization of the Sympathetic Pathways Controlling the Pupil: Light-Inhibited and Light-Stimulated Pathways. *Front Neurol*. 2018;9:1069. doi:10.3389/fneur.2018.01069
- Tassorelli C, Micieli G, Osipova V, Rossi F, Nappi G. Pupillary and cardiovascular responses to the cold-pressor test. *J Auton Nerv Syst*. Oct 5 1995;55(1-2):45-9. doi:10.1016/0165-1838(95)00026-t
- Volbrecht VJ, Shrago EE, Scheffrin BE, Werner JS. Spatial summation in human cone mechanisms from 0 degrees to 20 degrees in the superior retina. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. Mar 2000;17(3):641-50. doi:10.1364/josaa.17.000641
- Wilhelm B, Wilhelm H, Ludtke H, Adler M, Streicher P. [Pupillography for objective vigilance assessment. Methodological problems and possible solutions]. *Ophthalmologe*. Aug 1996;93(4):446-50. Pupillographie zur objektiven Vigilanzprüfung. Methodische Probleme und Lösungsansätze.
- Wilhelm B, Wilhelm H, Lüdtkke H, Streicher P, Adler M. Pupillographic assessment of sleepiness in sleep-deprived healthy subjects. *Sleep*. 1998;21(3):258-265.
- Wilhelm H, Wilhelm B. Clinical applications of pupillography. *J Neuroophthalmol*. Mar 2003;23(1):42-9. doi:10.1097/00041327-200303000-00010
- Winn B, Whitaker D, Elliott DB, Phillips NJ. Factors affecting light-adapted pupil size in normal human subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 1994;35(3):1132-7.

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde der Universität Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Carina Kelbsch, Leiterin der neuroophthalmologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik Tübingen, durchgeführt.

Die Erstellung des Studienkonzepts erfolgte durch Prof. Dr. med. Barbara Wilhelm, stellvertretende Leiterin des Studienzentrums der Universitäts-Augenklinik Tübingen, Prof. Dr. med. Helmut Wilhelm, Oberarzt der neuroophthalmologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik Tübingen, PD Dr. rer. nat. Krunoslav Stingl, Leiter der Forschungsgruppe Retinale Funktionsdiagnostik der Universitäts-Augenklinik Tübingen, und PD Dr. med. Carina Kelbsch.

Die Rekrutierung der Teilnehmenden erfolgte durch mich, Ricarda Jendritza.

Die technischen, ophthalmologischen Untersuchungen (Bestimmung der Refraktion, der Sehschärfe, Durchführung der Optischen Kohärenztomographie und der Perimetrie) der Studienteilnehmenden wurden von mir vorgenommen. Die ausführliche ärztliche Anamnese, den Swinging-Flashlight Test, die Spaltlampenuntersuchung sowie die Funduskopie führten PD Dr. med. Carina Kelbsch, Dr. med. Felix Tonagel, Leiter der neuroophthalmologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik Tübingen, und Dr. med. Paul Richter, Facharzt in oberärztlicher Funktion in der neuroophthalmologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik Tübingen, durch. Alle CPC-Messungen der Studienteilnehmenden erfolgten durch mich. Eine technische Einarbeitung in die CPC-Untersuchungsmethode erhielt ich durch Melanie Kempf, Saskia Ott, Ronja Jung (wissenschaftliche Mitarbeiterinnen der Forschungsgruppe Retinale Funktionsdiagnostik der Universitäts-Augenklinik Tübingen) und PD Dr. rer. nat. Krunoslav Stingl.

Die Datenanalyse und -auswertung erfolgte durch mich. Bezüglich der für die Auswertungen notwendigen Einstellungen in den entsprechenden MATLAB-Skripten unterstützten mich Ronja Jung und PD Dr. rer. nat. Krunoslav Stingl. Für die richtige Auswahl und Anwendung der Methoden der statistischen Auswertung

erhielt ich Unterstützung durch Dr. sc. hum. Torsten Straßer, Nachwuchsforschungsgruppenleiter des Applied Vision Research Lab und Mitglied der Arbeitsgruppe Pupillenforschung. Ebenso fand eine Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen statt. PD Dr. med. Carina Kelbsch beriet mich bezüglich aller durchzuführenden Teilaspekte der Datenauswertung und wir besprachen die Ergebnisse und deren klinische und wissenschaftliche Relevanz. Alle in der nachfolgend genannten Veröffentlichung aufgelisteten Autor:innen trugen zur Interpretation der Daten bei.

Nach Besprechung der enthaltenen Bildaspekte mit mir wurden die Abbildungen 1 und 2 (obere Zeile) von Irena Stingl, Grafikerin der Universitäts-Augenklinik Tübingen, erstellt. Die Abbildungen 2 (Mitte und untere Zeile), 5, 6, 8 und 9 wurden von Irena Stingl auf Grundlage der von mir erstellten einzelnen Grafiken zusammengefügt. Die Erstellung der übrigen Abbildungen und Tabellen erfolgte durch mich.

Die gleichen, oben genannten Anteile gelten für die Publikation „Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3“. Das Manuskript zur Publikation wurde durch mich erstellt und von allen Autor:innen geprüft und genehmigt.

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde von mir, Ricarda Jendritza, eigenständig und ohne Verwendung anderer als der oben genannten Quellen angefertigt.

Tübingen, den 27.10.2024

Ricarda Jendritza

8. Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert in: Jendritza R, Stingl K, Strasser T, et al. Influencing Factors on Pupillary Light Responses as a Biomarker for Local Retinal Function in a Large Normative Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci. Jun 3 2024;65(6):3. doi:10.1167/iovs.65.6.3.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Carina Kelbsch, die mir in allen Phasen dieses Projekts mit großem Engagement zur Seite stand, stets für Fragen und Projektbesprechungen offen war und mir eine außergewöhnlich herzliche und fachlich herausragende Betreuung dieses Projekts ermöglichte.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Barbara Wilhelm für die Unterstützung durch ihre wertvolle Expertise und Erfahrung auf dem Gebiet der Pupillenforschung und ihre wertschätzende Art, mich in meiner Arbeit zu fördern. Herrn Prof. Dr. med. Helmut Wilhelm danke ich für das Teilen seiner Expertise auf dem Gebiet der Neuroophthalmologie und Pupillenforschung im Verlauf dieses Projekts.

Ein großer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. sc. hum. Torsten Straßer für die immense Unterstützung in allen statistischen Fragen, die kurzfristigen Antworten und die ausführlichen Erklärungen zu unseren statistischen Modellen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Krunoslav Stingl danke ich für die gute Einführung in das Projekt und die Methode der CPC, sowie die Unterstützung bei der Analyse der Daten durch sein Wissen auf dem Gebiet der Neurophysiologie.

Ebenfalls möchte ich mich bei Ronja Jung bedanken, die mich in allen Fragen und Ergänzungen zu unseren MATLAB-Skripten unterstützt hat, sowie Melanie Kempf und Saskia Ott für die gute Einarbeitung in den technischen Ablauf der CPC-Messungen.

Herrn Dr. med. Felix Tonagel und Dr. med. Paul Richter danke ich für die Untersuchung der Studienteilnehmenden, die sie ganz selbstverständlich zusätzlich in ihren klinischen Alltag eingeschoben haben. Bei Frau Funda Vuranok und Elisabeth Spanidou-Nestler bedanke ich mich für die sehr nette Unterstützung bei der Anmeldung der Studienteilnehmenden und bei allen Mitarbeitenden der Universitäts-Augenklinik Tübingen, in deren Abteilungen ich die Voruntersuchung der Studienteilnehmenden durchführen konnte.

Ich danke der Egon Schumacher-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts.

Weiterhin danke ich dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen für die statistische Beratung und Frau Irena Stingl für ihre grafische Unterstützung.

Ich danke allen Probandinnen und Probanden für ihre Teilnahme an der Studie, durch die die Durchführung dieser Arbeit erst möglich geworden ist.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mich von Beginn an auf dem Weg zur Promotion unterstützt, motiviert und ermutigt haben.