

# **Evaluation der farbkodierten Fundusautofluoreszenz zur Diagnostik von Uveitis posterior**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Nicholas Rudolf Merten**

aus Bergisch Gladbach

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Maximilian W. M. Wintergerst
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schildberg

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.09.2024

Aus der Augenklinik  
Direktor: Prof. Dr. med. Frank G. Holz

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>	6
1.1 Einleitung	6
1.2 Material und Methoden	7
1.2.1 Studienteilnehmer	7
1.2.2 Bildakquisition	8
1.2.3 Datenanalyse	9
1.2.4 Statistische Analyse	10
1.3 Ergebnisse	10
1.3.1 Charakteristik der Studienpopulation	10
1.3.2 Qualitative Analyse der farbkodierten Fundusautofluoreszenz und Korrelation mit OCT-Bildern	11
1.3.3 Quantitative Analyse der farbkodierten Fundusautofluoreszenz	12
1.4 Diskussion	13
1.5 Zusammenfassung	16
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	17
<b>2. Veröffentlichung</b>	21
Abstract	21
Background	21
Experimental design	22
Results	22

Discussion	26
References	27
Supplement	30
<b>3. Danksagung</b>	<b>37</b>
<b>4. Lebenslauf</b>	<b>38</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGE	fortgeschrittene Verzuckerungs-Endprodukte
ANOVA	Varianzanalyse
APMPPE	Akute posteriore multifokale plakoide Pigmentepithelopathie
CFP	Farb-Fundusfotographie
Color - FAF	Farbkodierte Fundusautofluoreszenz
FAF	Fundusautofluoreszenz
GEFC	Grün – emittierende Fluoreszenz Komponenten
MCP	Multifokale Chorioiditis mit Panuveitis
MNV	Makuläre Neovaskularisation
OCT	Optische Kohärenztomographie
PIC	Punktförmige innere Choroidopathie
POHS	Presumed – ocular – histoplasmosis - Syndrom
QE	Quantenwirkungsgrad
REFC	Rot - emittierende Fluoreszenz Komponenten
RPE	Retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung
SUN	Standardisierte-Uveitis-Nomenklatur
VA	Sehschärfe

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Die Uveitis posterior ist eine entzündliche Erkrankung der Regenbogenhaut des Auges, die sich auf die Regenbogenhaut beschränken, aber auch anatomisch benachbarte Gewebe, wie den Glaskörper oder die Netzhaut, betreffen kann (Miserocchi et al., 2013). Die Uveitis posterior beinhaltet ein weites Spektrum sehr heterogener Uvea Entzündungen, die je nach Entität akute oder chronische Krankheitsverläufe zeigen können. Bis zu 10 % aller Sehbehinderungen weltweit werden durch verschiedene Uveitisformen verursacht (Suttorp-Schulten und Rothova, 1996; Dick et al., 2018; Wintergerst et al., 2021). Unter allen Formen zeigt die Uveitis posterior eine besonders schlechte Prognose, die häufig eine immunsuppressive Therapie notwendig macht (Thng et al., 2023).

Obwohl die Uveitis posterior solch einen relevanten Einfluss auf die Sehfähigkeit hat, sind die posterioren Uveitiden bis heute eine noch nicht gänzlich verstandene Gruppe von Erkrankungen. Oftmals sind die verschiedenen Subtypen der Uveitis posterior einander so ähnlich, dass die Differentialdiagnose schwerfällt (Durrani und Foster, 2012; Holz et al., 2015; Pichi et al., 2018; Cicinelli et al., 2023). Es mangelt an verlässlichen Biomarkern, die die Differentialdiagnostik erleichtern und eine zielgenaue Therapie der zugrundeliegenden Uveitis-posterior-Unterform ermöglicht (Denniston et al., 2017; Wintergerst et al., 2021). In den vergangenen Jahren haben sich durch den technischen Fortschritt neuartige Bildgebungen in der Diagnostik von Netzhauterkrankungen entwickelt (Agarwal et al., 2023). Mittlerweile ist die Fundusautofluoreszenz (FAF) eine aus der ophthalmologischen Diagnostik nicht mehr wegzudenkende Bildgebung, welche die Autofluoreszenz Eigenschaften von körpereigenen Fluorophoren nutzt um Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der verschiedenen Netzhautschichten zuzulassen (Durrani und Foster, 2012; Hashimoto und Kishi, 2015; Holz et al., 2015). So können beispielsweise bei bestimmten Uveitis-Entitäten inflammatorisch aktive Bereiche der Netzhaut anhand der Intensität des Autofluoreszenzsignals von inaktiven Bereichen unterschieden werden, da sich inaktive Bereiche hypoautofluoreszent und aktive Bereiche

hyperautofluoreszent zum umgebenden Gewebe darstellen (Haen und Spaide, 2008; Koizumi et al., 2008).

Vor diesem Hintergrund ist es interessant die Autofluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Uveitis-posterior-Subgruppen zu untersuchen und deren Abhängigkeit von der inflammatorischen Aktivität zu bestimmen.

Mithilfe einer neuartigen konfokalen laserbasierten Netzhautbildgebung mit einer Exzitationswellenlänge von 450 nm ist es möglich, die Autofluoreszenzsignale der Netz- und Aderhaut in einen langwelligen (560-700 nm) und einen kurzwelligen (500-560 nm) Teil aufzuspalten und diese Anteile getrennt zu messen (Borrelli et al., 2018b; Turski et al., 2020; Müller et al., 2020). Bei dieser farbkodierten Fundusautofluoreszenz (Color-FAF) spiegelt der kurzwellige Anteil die grünlich emittierenden Fluoreszenzkomponenten (green emission fluorescent components; GEFC) wider, der langwellige Anteil die rötlich emittierenden Fluoreszenzkomponenten (red emission fluorescent components; REFC) (Borrelli et al., 2018a; Dysli et al., 2019).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Color-FAF als neuartiges Bildgebungsverfahren bei Patienten mit Uveitis posterior genutzt und deren Eignung als differentialdiagnostischer Biomarker untersucht.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Studienteilnehmer

Zur Evaluation der farbkodierten Fundusautofluoreszenz wurden Patienten aus der Uveitis-Sprechstunde und anderen Sprechstunden der Universitäts-Augenklinik Bonn eingeschlossen. Alle Studienteilnehmer wiesen die Diagnosekriterien der Uveitis posterior auf, welche durch die SUN Arbeitsgruppe definiert wurden (Jabs et al., 2005). Eingeschlossen wurden Aufnahmen, die im Zeitraum von Oktober 2017 bis März 2021 entstanden sind. Diese Studie beinhaltet Augen mit akuter posteriorer multifokaler plakoider Pigmentepithelopathie (APMPPE), Sarkoidose mit nicht-pigmentierten Läsionen, punktförmiger innerer Choroidopathie (PIC), Birdshot-Chorioretinopathie, okulärer Toxoplasmose, multifokaler Chorioiditis mit Panuveitis (MCP), presumed-ocular-

histoplasmosis-Syndrom (POHS) und serpiginöser Choroiditis. Alle Uveitis-posterior-Entitäten mit einer Subgruppengröße von weniger als 5 Augen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Außerdem wurden alle Aufnahmen mit schlechter Bildqualität, starker Glaskörpertrübung und fortgeschrittener Katarakt ausgeschlossen, ebenso wie alle idiopathischen Formen der Uveitis und Aufnahmen mit begleitenden Netzhauterkrankungen, die nicht typischerweise zusammen mit der Uveitis posterior auftreten. Alle Untersuchungen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) durchgeführt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Uni Bonn genehmigt (No. 548/20). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Probanden nach ausführlicher Aufklärung eingeholt.

### 1.2.2 Bildakquisition

Bei allen Studienteilnehmern wurde eine Pupillendilatation mit Augentropfen aus 0,5 % Tropicamid und 2,5 % Phenylephrin durchgeführt. Es folgten Bildaufnahmen des Augenhintergrundes mittels Farb-Fundusfotographie (CFP, 440-650 nm), Fundusautofluoreszenz mit blauem Exzitationslicht (440-475 nm mit einem Peak bei 450 nm) und Exzitationslicht aus dem infraroten Wellenlängenbereich (825–870 nm). Alle Aufnahmen erfolgten mit dem Eidon TrueColor Confocal Scanner, hergestellt von CenterVue im Auftrag der Firma iCare (Padua, Italien), mit einem Bildausschnitt von 60° × 55° und einer Bildauflösung von 3680 × 3288 Pixel. Zur Korrelation der Fundusfotographien mit dünnenschichtigen Netzhautaufnahmen mit guter Tiefenauflösung wurden Aufnahmen mittels optischer Kohärenztomographie (enhanced depth imaging SD-OCT, Spectralis HRA + OCT) der Firma Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt mit einer Bildauflösung von 496 Pixeln pro A-Scan und 768 Pixel pro B-Scan bei mindestens 60 B-Scans und einem Fundusausschnitt von 30° und 55°. Bei Verfügbarkeit von mehreren Aufnahmen wurde die Aufnahme mit der besten Bildqualität zur Analyse herangezogen. Nach den Bildaufnahmen wurden alle Studienteilnehmer von Augenärzten der Universitäts-Augenklinik untersucht und die während der Untersuchung erhobenen klinischen Daten aus der Patientenakte für die Auswertung im Rahmen dieser Studie genutzt. Die Eidon Fundusautofluoreszenz-Aufnahmen wurden als graustufen-kodierte Fundusautofluoreszenz Bilder und als



farbkodierte Fundusautofluoreszenz Bilder (Detektionsbandbreite: 500-750 nm) zur weiteren Analyse exportiert. Die Color-FAF Bilder wurden durch den Scanner erzeugt unter Nutzung eines Sperrfilters mit einer Grenze bei 500 nm und Auftrennung des detektierten Signals in seine GEFC- und REFC-Anteile.

### 1.2.3 Datenanalyse

In dieser Studie wurden sowohl inflammatorisch aktive als auch inaktive Augen eingeschlossen. Zur Einschätzung des Einflusses der Entzündungsaktivität auf das GEFC/REFC-Verhältnis wurde die inflammatorische Aktivität bei APMPPE, PIC, okulärer Toxoplasmose, MCP, POHS und serpiginöser Choroiditis auf Läsionsebene und bei Birdshot-Chorioretinopathie und okulärer Sarkoidose auf Augenebene klassifiziert. Chorioretinale Läsionen bei okulärer Sarkoidose und bei Birdshot-Chorioretinopathie wurden abweichend von den anderen Subgruppen auf Augenebene klassifiziert, da die Einteilung nach Entzündungsaktivität bei diesen beiden Entitäten auf Kriterien beruht, die nicht auf Läsionsebene, sondern auf Augenebene bestimmt werden. Die Tabelle 1 des Supplements auf Seite 31 verdeutlicht die verschiedenen Kriterien der angewendeten Entzündungsklassifikation. Für die Klassifizierung der Entzündungsaktivität war die Zusammenschau aller klinischen Daten maßgeblich. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; verfügbar unter: "<https://imagej.nih.gov/ij/>") (Schneider et al., 2012). Für die quantitative Analyse nutzten wir die „Split Channels“ Funktion um die GEFC- und REFC-Signale des grauskalierten Color-FAF Bildes zu trennen. In die quantitative Analyse wurden alle Uveitis-posterior-Entitäten eingeschlossen, die über alle Augen verteilt eine Anzahl von mindestens 100 Läsionen aufwiesen. Subgruppen mit weniger Läsionen wurden ausschließlich in der qualitativen Analyse berücksichtigt. In der quantitativen Analyse wurde die Intensität des Autofluoreszenzsignals von jeder chorioretinalen Läsion manuell mit ImageJ gemessen und das Verhältnis der Intensitäten des Autofluoreszenzsignals aus GEFC und REFC für jede Läsion gebildet. Für die qualitative Analyse wurden die Color-FAF Bilddateien in die Analysesoftware „FAF Color Segmentation Tool“ der Firma CenterVue (Padua, Italien) importiert. Mithilfe dieser Analysesoftware analysierten wir welche Wellenlängen typisch für bestimmte Strukturen

im Color-FAF Bild sind, wie es schon in Vorgängerstudien demonstriert wurde (Dysli et al., 2019; Turski et al., 2020). Zur Visualisierung der vorwiegend emittierten Wellenlängen des untersuchten Fundusausschnittes generiert die Analysesoftware ein Intensität-normiertes Color-FAF Bild. Die Farbe jedes Pixels des Intensität-normierten Color-FAF Bildes wird aus den Intensitäten der GEFC und REFC-Signale berechnet. Die Intensität des GEFC- beziehungsweise REFC-Signals beruht auf der Verteilung der emittierten Wellenlängen pro Pixel und dem Quantenwirkungsgrad der jeweiligen Wellenlänge. Die Abbildung 1 auf Seite 23 zeigt die Quantenwirkungsgrade der verschiedenen Wellenlängen. Das Intensität-normierte Color-FAF Bild wird schließlich mithilfe einer experimentell ermittelten Exponentialfunktion aus empirischen Daten von Fluorophoren mit bekannten Emissionsspektren generiert.

#### 1.2.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die Programmiersprache „R“ genutzt (R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 3.4.1, R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016). Zur Analyse des GEFC/REFC-Verhältnisses der verschiedenen Uveitis-Subtypen wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Aufgrund der gruppierten Datenstruktur mit Messwiederholungen am selben Auge führten wir eine multivariable Regressionsanalyse durch um den Einfluss des Linsenstatus und der inflammatorischen Aktivität der einzelnen Läsionen auf das GEFC/REFC-Verhältnis zu untersuchen.

### 1.3 Ergebnisse

#### 1.3.1 Charakteristik der Studienpopulation

Nach sorgfältiger Sichtung aller Bildaufnahmen wurden in dieser Studie 76 Augen von 45 Studienteilnehmern eingeschlossen. Zuvor wurden vier Augen von zwei Patienten ausgeschlossen, da diese neben einer Uveitis posterior funduskopisch auch Merkmale einer altersbedingten Makuladegeneration aufwiesen. Schlechte Bildaufnahmequalität führte bei vier Augen von drei Probanden zu einem Ausschluss aus der Studie. Im Übrigen

lagen keine höhergradige Linsentrübung oder anderweitige Ausschlusskriterien bei den anderen Teilnehmern vor. Die Klassifizierung der Entzündungsaktivität ergab bei Sarkoidose drei inflammatorisch aktive Augen mit 22 aktiven Läsionen bei insgesamt 13 Augen, bei der Birdshot-Chorioretinopathie waren es zwei aktiv entzündete Augen mit 23 aktiven Läsionen bei insgesamt neun Augen. Inflammatorisch aktiv zeigten sich bei APMPPE zwei von 22 Augen mit insgesamt 29 aktiven Läsionen, bei PIC war es ein Auge von zwölf aktiv entzündet bei elf inflammatorisch aktiven Läsionen. Bei der Toxoplasmose Chorioretinitis zeigten sich zwei von acht Augen inflammatorisch aktiv (2 Läsionen), bei der serpiginösen Choroiditis waren vier von fünf Augen entzündlich aktiv (10 Läsionen). MCP und POHS zeigten keine Anzeichen für inflammatorisch aktive Läsionen. Ergänzende Informationen zur Studienpopulation finden sich in Tabelle 1 auf Seite 23.

### 1.3.2 Qualitative Analyse der farbkodierten Fundusautofluoreszenz und Korrelation mit OCT-Bildern

Um den Nutzen der farbkodierten Fundusautofluoreszenz zu untersuchen, verglichen wir die Color-FAF-Aufnahmen mit den grauskalierten Fundusautofluoreszenz Bildern, den CFP-Bildern, den Intensitäts-normierten Fundusautofluoreszenz Bildern und den Schnittbildaufnahmen der OCT. Die diskreten chorioretinalen Läsionen in der CFP bei Birdshot-Chorioretinopathie zeigten sich ebenfalls nur schwach oder gar nicht in den Color-FAF-Aufnahmen. Anders war dies bei den Läsionen der Augen mit okulärer Sarkoidose. Diese ließen sich in der CFP und den Fundusautofluoreszenz-Aufnahmen deutlich besser abgrenzen. In den grauskalierten Fundusautofluoreszenz- und Color-FAF-Aufnahmen zeigte sich eine Hyperautofluoreszenz der Läsionen, die sich im Intensitäts-normierten Color-FAF Bild dem vorwiegend kurzwelligeren, grünen Wellenlängenspektrum zuordnen ließ. Bei Korrelation der Läsionsbereiche von Sarkoidose und Birdshot mit den Schnittbildern der OCT kam bei Sarkoidose unabhängig von der Entzündungsaktivität eine choroidale Atrophie zur Darstellung, welche bei Birdshot weder bei inflammatorisch aktiven noch bei inaktiven Läsionen nachzuweisen war.

Die bei APMPPE typischerweise schwer abzugrenzenden Läsionen in der CFP waren in den Fundusautofluoreszenz-Aufnahmen eindeutig zu erkennen. Im Intensitäts-normierten Color-FAF Bild zeigten die Läsionen eine schwache, überwiegend grünliche Färbung. Bei PIC zeigten sich die Läsionen in allen Aufnahmen als klar abgrenzbar, im Intensitäts-normierten Color-FAF Bild war eine klare Dominanz des kurzwelligen, grünen Emissionsspektrums zu beobachten. Korrelierend mit der OCT zeigte sich bei APMPPE bei den Fundusläsionen ein intaktes RPE (in 19 von 22 Augen, bei drei Augen zeigte sich eine RPE-Atrophie) und Bruch-Membran bei Unterbrechung der ellipsoiden Zone und der Interdigitationszone, bei PIC kam eine vollständige Störung der äußeren retinalen Schichten in allen zwölf untersuchten Augen zur Darstellung. Eine Zusammenschau der Untersuchungsbefunde in der Color-FAF mit Korrelation der zugehörigen OCT-Schnittbilder findet sich in den Abbildungen 1 und 2 des Supplements auf Seite 32 und 33.

In der qualitativen Analyse untersuchten wir welche anatomischen Fundusstrukturen bevorzugt in welchem Wellenlängenspektrum emittieren und wie sich die chorioretinalen Läsionen je nach Uveitis-posterior-Entität im Intensitäts-normierten Color-FAF Bild verhalten. Es zeigte sich, dass die retinalen Gefäße überwiegend im roten Wellenlängenbereich emittieren, wohingegen die RPE-Atrophie und der Sehnervenkopf sich vorwiegend im grünen, kurzwelligeren Wellenlängenspektrum bewegen. Pigmentierungen von retinalen Läsionen, in 20 Augen von 14 Teilnehmern präsent, erschienen rötlich im Intensitäts-normierten Color-FAF Bild. Makuläre Neovaskularisationen (MNV) dagegen schienen eher im grünlich emittierenden Wellenlängenbereich zu liegen (vgl. Abbildung 3 auf Seite 25).

### 1.3.3 Quantitative Analyse der farbkodierten Fundusautofluoreszenz

Für die quantitative Auswertung verglichen wir die errechneten Verhältnisse der Signalintensitäten von GEFC zu REFC. Dazu wurden die Mittelwerte der GEFC/REFC-Verhältnisse für alle Uveitis-posterior-Entitäten mit mehr als 100 Läsionen berechnet und verglichen. Zu diesen Uveitis-Subgruppen zählten die okuläre Sarkoidose mit 124 Läsionen, die Birdshot-Chorioretinopathie mit 151, sowie PIC mit 129 Läsionen und

APMPPE mit 338 Läsionen. Der Mittelwert des GEFC/REFC-Verhältnisses der Sarkoidose Augen betrug  $0,92 (\pm 0,11)$ , bei Birdshot-Chorioretinopathie  $0,82 (\pm 0,10)$ , bei APMPPE  $0,86 (\pm 0,10)$  und bei PIC waren es  $1,09 (\pm 0,19)$ . Zur visuellen Darstellung der mittleren GEFC/REFC-Verhältnisse fertigten wir ein Boxplot Diagramm an (vgl. Abbildung 4 auf Seite 25). Die beobachteten Unterschiede wurden mittels Varianzanalyse mit Messwiederholungen auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Für die vier Uveitis-Subgruppen Sarkoidose, Birdshot-Chorioretinopathie, APMPPE und PIC zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Diese Signifikanz hielt auch einer multivariablen Regressionsanalyse zur Korrektur des Einflusses von Linsenstatus und inflammatorischer Aktivität auf das GEFC/REFC-Verhältnis stand. Lediglich zwischen Birdshot-Chorioretinopathie und APMPPE konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden ( $p = 0,07$ ). Weder der Linsenstatus ( $p = 0,98$ ) noch die Entzündungsaktivität ( $p = 0,33$ ) zeigten einen statistisch signifikanten Effekt auf die beobachteten Signifikanzen. Eine Übersicht über die Ergebnisse der multivariablen Regressionsanalyse findet sich in Tabelle 2 des Supplements auf Seite 34. Die Tabelle 3 des Supplements auf Seite 35 fasst die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse zusammen.

#### 1.4 Diskussion

Die farbkodierte Fundusautofluoreszenz wird bislang im klinischen Alltag kaum genutzt. Bisher sind Anwendungsmöglichkeiten bei verschiedenen retinalen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der altersbedingten Makuladegeneration, der diabetischen Retinopathie oder des Morbus Stargardt beschrieben worden (Borrelli et al., 2018a; Dysli et al., 2019; Vujosevic et al., 2020). Es gibt aktuell zum Beispiel Ansätze, die mittels farbkodierter Fundusautofluoreszenz zwischen aktiven und inaktiven MNVs bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration differenzieren (Vujosevic et al., 2021).

Bei der derzeit viel genutzten konventionellen Fundusautofluoreszenz werden verschiedene Exzitationswellenlängen genutzt um Autofluoreszenzaufnahmen des langwelligen (Exzitationswellenlänge: 785 nm) bzw. kurzwelligen (Exzitationswellenlänge: 488 nm) Emissionsspektrums zu generieren (Schmitz-Valckenberg et al., 2008; Lee et al.,

2014). Bei Uveitis posterior hat sich gezeigt, dass die inflammatorische Aktivität der Läsion mit der Intensität des Autofluoreszenzsignals korreliert (Seidensticker et al., 2011; Reznicek et al., 2014).

Der entscheidende Unterschied zwischen der konventionellen Fundusautofluoreszenz und der farbkodierten Fundusautofluoreszenz ergibt sich aus der Wellenlänge, die bei der Exzitation genutzt wird. Bei Color-FAF-Aufnahmen liegt diese bei 450 nm und ist somit kurzwelliger als die Exzitationswellenlänge der konventionellen FAF-Aufnahmen. Dadurch wird ein unterschiedliches Spektrum an Fluorophoren angeregt als bei der konventionellen FAF. Die Aufnahmetechnik der Color-FAF-Aufnahmen und entsprechende Nachbearbeitung erlaubt es das Autofluoreszenzsignal anhand der Wellenlängen in einen kurzwelligen und langwelligen Teil aufzuspalten. Der kurzwelligere Teil (GEFC) setzt sich vermutlich vor allem aus den endogenen Fluorophoren Kollagen und Elastin zusammen, welche sich vorwiegend im subchoroidalen Gewebe befinden, sowie in der Tenon-Kapsel und der Sklera (Coudrillier et al., 2015; Park et al., 2016). Advanced glycation end-products (AGEs) und Flavin-Adenin-Dinukleotide tragen darüber hinaus wahrscheinlich zum GEFC-Signal bei (Schweitzer et al., 2007; Borrelli et al., 2018a). Der langwelligere Teil (REFC) basiert vermutlich vor allem auf dem Autofluoreszenzsignal von Lipofuszin aus dem RPE (Keilhauer und Delori, 2006; Dysli et al., 2019).

In den bisher mit Color-FAF-Aufnahmen durchgeführten Studien konnten diverse funduskopisch sichtbare Strukturen identifiziert werden, die entweder ein stärkeres GEFC- oder REFC-Signal in den Color-FAF-Aufnahmen zeigten. Zu den Hauptquellen des kurzwelligeren GEFC-Signals gehörten hierbei Strukturen ohne darunterliegendes funktionales RPE wie zB. retinale Narben, RPE-Atrophien oder der Sehnervenpapille (Borrelli et al., 2018a; Dysli et al., 2019; Turski et al., 2020). Retinale Gefäße dagegen zeigten in den Color-FAF-Aufnahmen vorwiegend ein intensiveres REFC-Signal (Borrelli et al., 2018a; Dysli et al., 2019). Im Rahmen unserer Studie konnten wir zusätzliche Quellen der Signale identifizieren: Pigmentierungen von retinalen Narben zeigten ein intensives REFC-Signal, wohingegen MNVs ein stärkeres GEFC-Signal emittierten.

In der quantitativen Analyse der Color-FAF verglichen wir jeweils zwei Uveitis-posterior-Entitäten, die sich funduskopisch ähneln und teilweise schwierig voneinander zu unterscheiden sein können: beim Vergleich von Augen mit Birdshot-Chorioretinopathie und okulärer Sarkoidose fiel bei teils ähnlicher funduskopischer Präsentation auf, dass die Sarkoidose-Läsionen in der Color-FAF deutlich grünlicher erschienen als die chorioretinalen Läsionen bei Birdshot. Dieser visuelle Eindruck bestätigte sich beim Vergleich des mittleren GEFC/REFC-Verhältnisses für diese beiden Gruppen (Birdshot: 0,82; Sarkoidose: 0,92). Bei gleichzeitiger Betrachtung der OCT-Aufnahmen fiel auf, dass bei den grünlicher erscheinenden Sarkoidose-Läsionen eine deutlich stärkere choroidale Atrophie als bei den Birdshot-Läsionen vorlag. Eine mögliche Hypothese hierfür könnte sein, dass durch die choroidale Atrophie der Anteil von Fluorophoren des subchoroidalen Bindegewebes am gesamten Autofluoreszenzsignal erhöht ist und es somit zu einer Verschiebung des GEFC/REFC-Verhältnisses in Richtung des kurzwelligeren Wellenlängenspektrums kommt.

Bei den anderen beiden verglichenen Uveitis-posterior-Subgruppen handelte es sich um PIC und APMPPE. Auch hier zeigte sich, dass in der Color-FAF-Aufnahme die Läsionen beider Entitäten im Durchschnitt verschiedene GEFC/REFC-Verhältnisse aufwiesen. Die deutlich grünlicher erscheinenden PIC-Läsionen hatten mit einem GEFC/REFC-Verhältnis von 1,09 ein eher zum kurzwelligeren Wellenlängenspektrum verschobenes Signal als die APMPPE-Läsionen mit einem GEFC/REFC-Verhältnis von 0,86. In den OCT-Bildern zeigte sich bei den PIC-Läsionen eine Unterbrechung des RPEs und der Bruch-Membran. Bei APMPPE waren sowohl das RPE als auch die Bruch-Membran intakt, bei den äußeren retinalen Schichten zeigten sich jedoch Unregelmäßigkeiten. Dieser Befund könnte die zuvor aufgestellte Hypothese bestärken, dass Fluorophore aus dem subchoroidalen Bindegewebe einen Einfluss auf die Verschiebung der Autofluoreszenz in Richtung des kurzwelligeren Wellenlängenspektrums haben und somit in der Color-FAF grünlicher erscheinen. Weiterhin könnte der Verlust des RPEs und somit die Reduktion der Lipofuszindichte im Bereich der PIC-Läsionen zu einer Abschwächung des REFC-Signales führen und somit relativ gesehen ebenso zu einer Verschiebung des GEFC/REFC-Verhältnisses beitragen.

Es wird vermutet, dass AGEs bei vielen entzündlichen Netzhauterkrankungen eine Rolle spielen und im Krankheitsverlauf vermehrt anfallen (Borrelli et al., 2018a; Khanam et al., 2024). Die Color-FAF wurde bereits bei anderen Krankheitsbildern wie zum Beispiel der altersbedingten Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie untersucht und es wird vermutet, dass die AGEs bei diesen Netzhauterkrankungen für einen Teil des GEFC-Signals verantwortlich sein könnten (Borrelli et al., 2018a; Vujosevic et al., 2020; Vujosevic et al., 2021). Auch bei Uveitis könnte dies der Fall sein: Dong et al. haben gezeigt, dass Patienten mit Uveitis posterior verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Serumlevel von AGEs aufwiesen (Dong et al., 2014). Außerdem konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass AGEs bei Mäusen mit einer induzierten endogenen humanen Uveitis in der Netzhaut akkumulierten. Sollten AGEs tatsächlich bei den humanen Uveitis-posterior-Entitäten eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie spielen, könnten diese die Befunde der Color-FAF-Aufnahmen unserer Studie miterklären und bei der Deutung helfen. Da in den Color-FAF-Aufnahmen der vier Uveitis-Subgruppen PIC, APMPE, Birdshot-Chorioretinopathie und Sarkoidose die Uveitis-posterior-Läsionen mit verschiedenen starken Grünfärbungen einhergingen, könnte es sein, dass AGEs bei verschiedenen Uveitisformen in jeweils unterschiedlichem Ausmaß akkumulieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind histopathologische Untersuchungen nötig.

Die Stärken der Studie sind die strengen Einschlusskriterien für mögliche Probanden, sowie die einfache Durchführbarkeit der Color-FAF-Aufnahmen im klinischen Alltag. Mithilfe der Color-FAF-Aufnahmen konnten wir einen neuartigen Biomarker für die bildgebende Diagnostik bei posterioren Uveitiden etablieren, nämlich das Verhältnis der Intensitäten von GEFC und REFC. Um diesen Biomarker zu validieren, müssen jedoch noch longitudinale Untersuchungen mit einer größeren Teilnehmendenzahl durchgeführt werden, um die prädiktive Aussagekraft für zukünftige Krankheitsverläufe zu bestimmen.

## 1.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation untersuchten wir zum ersten Mal die farbkodierte Fundusautofluoreszenz hinsichtlich ihres differentialdiagnostischen Nutzens bei Uveitis



posterior. Wir etablierten einen neuen Biomarker auf der Grundlage von Fundusaufnahmen mittels farbkodierter Fundusautofluoreszenz, das GEFC/REFC-Verhältnis, das einen potentiellen Nutzen zur Differenzierung von verschiedenen, funduskopisch schwierig zu unterscheidenden Entitäten der Uveitis posterior zeigt. Weitere Untersuchungen sind nötig um das Potenzial des GEFC/REFC-Verhältnisses in Bezug auf das Monitoring der Entzündungsaktivität und potentiell folgenden Therapiemaßnahmen zu bestimmen. Des Weiteren haben wir mittels der farbkodierten Fundusautofluoreszenz Hypothesen über die Herkunft des GEFC- und REFC-Signals bei Patienten mit Uveitis posterior aufgestellt. Histopathologische und weitere klinische Untersuchungen sind nötig, um unsere Theorien zu bestätigen.

#### 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Agarwal A, Pichi F, Invernizzi A, Grewal DS, Singh RB, Upadhyay A. Stepwise approach for fundus imaging in the diagnosis and management of posterior uveitis. *Survey of ophthalmology* 2023; 68: 446–480

Borrelli E, Lei J, Balasubramanian S, Uji A, Cozzi M, Sarao V, Lanzetta P, Staurenghi G, Sadda SR. Green emission fluorophores in eyes with atrophic age-related macular degeneration: a colour fundus autofluorescence pilot study. *The British journal of ophthalmology* 2018a; 102: 827–832

Borrelli E, Nittala MG, Abdelfattah NS, Lei J, Hariri AH, Shi Y, Fan W, Cozzi M, Sarao V, Lanzetta P, Staurenghi G, Sadda SR. Comparison of short-wavelength blue-light autofluorescence and conventional blue-light autofluorescence in geographic atrophy. *The British journal of ophthalmology* 2018b; 103: 610–616

Cicinelli MV, Ramtohl P, Marchese A, Bandello F, Bailey Freund K, Miserocchi E, Jampol LM. Latest advances in white spot syndromes: New findings and interpretations. *Progress in retinal and eye research* 2023; 97: 101207

Coudrillier B, Pijanka J, Jefferys J, Sorensen T, Quigley HA, Boote C, Nguyen TD. Collagen structure and mechanical properties of the human sclera: analysis for the effects of age. *Journal of Biomechanical Engineering* 2015; 137: 41006

Denniston AK, Keane PA, Srivastava SK. Biomarkers and Surrogate Endpoints in Uveitis: The Impact of Quantitative Imaging. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017; 58: BIO131-BIO140

Dick AD, Rosenbaum JT, Al-Dhibi HA, Belfort R, Brézin AP, Chee SP, Davis JL, Ramanan AV, Sonoda K-H, Carreño E, Nascimento H, Salah S, Salek S, Siak J, Steeples L. Guidance on Noncorticosteroid Systemic Immunomodulatory Therapy in Noninfectious Uveitis: Fundamentals Of Care for UveitiS (FOCUS) Initiative. *Ophthalmology* 2018; 125: 757–773

Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Lennikov A, Kitamura M, Mizuuchi K, Kanda A, Noda K, Namba K, Yamagishi S-I, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-product formation. *Journal of leukocyte biology* 2014; 96: 1077–1085

Durrani K, Foster CS. Fundus autofluorescence imaging in posterior uveitis. *Seminars in ophthalmology* 2012; 27: 228–235

Dysli C, Müller PL, Birtel J, Holz FG, Herrmann P. Spectrally Resolved Fundus Autofluorescence in ABCA4-Related Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2019; 60: 274–281

Haen SP, Spaide RF. Fundus autofluorescence in multifocal choroiditis and panuveitis. *American journal of ophthalmology* 2008; 145: 847–853

Hashimoto H, Kishi S. Ultra-wide-field fundus autofluorescence in multiple evanescent white dot syndrome. *American journal of ophthalmology* 2015; 159: 698–706

Holz FG, Steinberg JS, Göbel A, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S. Fundus autofluorescence imaging in dry AMD: 2014 Jules Gonin lecture of the Retina Research Foundation. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2015; 253: 7–16

Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *American journal of ophthalmology* 2005; 140: 509–516

- Keilhauer CN, Delori FC. Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006; 47: 3556–3564
- Khanam A, Alouffi S, Alyahyawi AR, Husain A, Khan S, Alharazi T, Akasha R, Khan H, Shahab U, Ahmad S. Generation of autoantibodies against glycated fibrinogen: Role in diabetic nephropathy and retinopathy. *Analytical biochemistry* 2024; 685: 115393
- Koizumi H, Pozzoni MC, Spaide RF. Fundus autofluorescence in birdshot chorioretinopathy. *Ophthalmology* 2008; 115: e15-20
- Lee CS, Lee AY, Forooghian F, Bergstrom CS, Yan J, Yeh S. Fundus autofluorescence features in the inflammatory maculopathies. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 2014; 8: 2001–2012
- Miserocchi E, Fogliato G, Modorati G, Bandello F. Review on the worldwide epidemiology of uveitis. *European journal of ophthalmology* 2013; 23: 705–717
- Müller PL, Dysli C, Hess K, Holz FG, Herrmann P. Spectral fundus autofluorescence excitation and emission in ABCA4-related retinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2020; 40: 2332–2342
- Park CY, Marando CM, Liao JA, Lee JK, Kwon J, Chuck RS. Details of the Collagen and Elastin Architecture in the Human Limbal Conjunctiva, Tenon's Capsule and Sclera Revealed by Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2016; 57: 5602–5610
- Pichi F, Abboud EB, Ghazi NG, Khan AO. Fundus autofluorescence imaging in hereditary retinal diseases. *Acta ophthalmologica* 2018; 96: e549-e561
- Reznicek L, Seidensticker F, Stumpf C, Kampik A, Thureau S, Kernt M, Neubauer A. Systematic analysis of wide-field fundus autofluorescence (FAF) imaging in posterior uveitis. *Current eye research* 2014; 39: 164–171
- Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Bird AC, Spaide RF. Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2008; 28: 385–409
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 2012; 9: 671–675

Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, Schweitzer F, Jentsch S, Birckner E, Becker W, Bergmann A. Towards metabolic mapping of the human retina. *Microscopy research and technique* 2007; 70: 410–419

Seidensticker F, Neubauer AS, Wasfy T, Stumpf C, Thureau SR, Kampik A, Kernt M. Wide-field fundus autofluorescence corresponds to visual fields in chorioretinitis patients. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 2011; 5: 1667–1671

Suttorp-Schulten MS, Rothova A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. *The British journal of ophthalmology* 1996; 80: 844–848

Thng ZX, Bromeo AJ, Mohammadi SS, Khatri A, Tran ANT, Akhavanrezayat A, T T Than N, Nguyen KS, Yoo W-S, Mobasserian A, Or CCM, Nguyen QD. Recent advances in uveitis therapy: focus on selected phase 2 and 3 clinical trials. *Expert opinion on emerging drugs* 2023; 28: 297–309

Turski CA, Holz FG, Brinkmann CK. Inter-Device Comparison of Blue-Light Autofluorescence in Optic Disc Drusen. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 2020; 243: 110–119

Vujosevic S, Toma C, Nucci P, Brambilla M, Cillà S de. Quantitative Color Fundus Autofluorescence in Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of clinical medicine* 2020; 10


Vujosevic S, Toma C, Sarao V, Veritti D, Brambilla M, Muraca A, Cillà S de, Villani E, Nucci P, Lanzetta P. Color Fundus Autofluorescence to Determine Activity of Macular Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Translational vision science & technology* 2021; 10: 33

Wintergerst MWM, Liu X, Terheyden JH, Pohlmann D, Li JQ, Montesano G, Ometto G, Holz FG, Crabb DP, Pleyer U, Heinz C, Denniston AK, Finger RP. Structural Endpoints and Outcome Measures in Uveitis. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 2021; 244: 465–479



OPEN

# Spectrally resolved autofluorescence imaging in posterior uveitis

Maximilian W. M. Wintergerst<sup>1,6</sup>, Nicholas R. Merten<sup>1,6</sup>, Moritz Berger<sup>2</sup>, Chantal Dysli<sup>3</sup>, Jan H. Terheyden<sup>1</sup>, Enea Poletti<sup>4</sup>, Frank G. Holz<sup>1</sup>, Valentin S. Schäfer<sup>5</sup>, Matthias Schmid<sup>2</sup>, Thomas Ach<sup>1</sup> & Robert P. Finger<sup>1</sup>

Clinical discrimination of posterior uveitis entities remains a challenge. This exploratory, cross-sectional study investigated the green (GEFC) and red emission fluorescent components (REFC) of retinal and choroidal lesions in posterior uveitis to facilitate discrimination of the different entities. Eyes were imaged by color fundus photography, spectrally resolved fundus autofluorescence (Color-FAF) and optical coherence tomography. Retinal/choroidal lesions' intensities of GEFC (500–560 nm) and REFC (560–700 nm) were determined, and intensity-normalized Color-FAF images were compared for birdshot chorioretinopathy, ocular sarcoidosis, acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE), and punctate inner choroidopathy (PIC). Multivariable regression analyses were performed to reveal possible confounders. 76 eyes of 45 patients were included with a total of 845 lesions. Mean GEFC/REFC ratios were  $0.82 \pm 0.10$ ,  $0.92 \pm 0.11$ ,  $0.86 \pm 0.10$ , and  $1.09 \pm 0.19$  for birdshot chorioretinopathy, sarcoidosis, APMPPE, and PIC lesions, respectively, and were significantly different in repeated measures ANOVA ( $p < 0.0001$ ). Non-pigmented retinal/choroidal lesions, macular neovascularizations, and fundus areas of choroidal thinning featured predominantly GEFC, and pigmented retinal lesions predominantly REFC. Color-FAF imaging revealed involvement of both, short- and long-wavelength emission fluorophores in posterior uveitis. The GEFC/REFC ratio of retinal and choroidal lesions was significantly different between distinct subgroups. Hence, this novel imaging biomarker could aid diagnosis and differentiation of posterior uveitis entities.

Posterior uveitis is considered an orphan disease and encompasses a heterogeneous group of diseases, many of which are not completely understood, and their clinical discrimination and management remains a challenge<sup>1</sup>. Therefore, it is crucial to explore novel diagnostic methods to increase our understanding and facilitate discrimination of the different entities. Fundus autofluorescence (FAF) is a non-invasive imaging technique that is widely used for detection and monitoring of retinal diseases<sup>2–5</sup>. FAF uses the fluorescence properties of intrinsic fluorophores in order to assess metabolism and vitality of the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor layers. Previous studies have shown that inflammatory activity can be associated with the appearance of retinal and choroidal lesions on FAF: in several uveitis entities, active retinal lesions are hyperautofluorescent, whereas inactive lesions are hypoautofluorescent<sup>6,7</sup>.

A novel confocal 450 nm excitation wavelength blue-light FAF device has been introduced recently, which, in contrast to the established FAF modalities, allows for spectrally resolved FAF (Color-FAF) detection and stratification of green (GEFC, 500–560 nm) and red emission fluorescent components (REFC, 560–700 nm). The benefit of this novel FAF technique in terms of novel insights into pathogenesis and providing a marker for disease progression has already been demonstrated in other retinal diseases<sup>8–12</sup> and it might also allow additional insights into retinal and choroidal lesions in posterior uveitis.

The aim of this exploratory study was to evaluate Color-FAF imaging as diagnostic imaging biomarker in different posterior uveitis entities.

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany. <sup>2</sup>Department of Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, University of Bonn/University Hospital Bonn, Bonn, Germany. <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland. <sup>4</sup>CenterVue, Padua, Italy. <sup>5</sup>Clinic of Internal Medicine III, Oncology, Hematology, Rheumatology, and Clinical Immunology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany. <sup>6</sup>These authors contributed equally: Maximilian W. M. Wintergerst and Nicholas R. Merten. ✉email: maximilian.wintergerst@ukbonn.de

## Methods

**Participants.** This retrospective study included patients from uveitis and other outpatient clinics at the University Hospital Bonn, Department of Ophthalmology, Germany, with posterior uveitis in agreement with the diagnostic criteria of the SUN working group<sup>13,14</sup>. It enrolled acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE), ocular sarcoidosis mimicking birdshot chorioretinopathy in terms of non-pigmented bright lesions, punctate inner choroidopathy (PIC), birdshot chorioretinopathy, toxoplasmosis chorioretinitis, multifocal choroiditis and panuveitis (MCP), presumed ocular histoplasmosis syndrome (POHS), or serpiginous choroiditis. Patients were included from October 2017 until March 2021. The study was conducted in adherence to the Declaration of Helsinki. Ethical approval was obtained from the ethics committee of the University of Bonn (approval ID 548/20). Informed consent is waived by the ethics committee of the University of Bonn. Exclusion criteria were idiopathic forms of posterior uveitis, reduced image quality (blurred image or shadowing), significant vitreous opacities, advanced cataract, inability to perform the examination, or any other retinal disease except for the stigmata of posterior uveitis. Subgroups of posterior uveitis entities with less than 5 eyes were not included in this study.

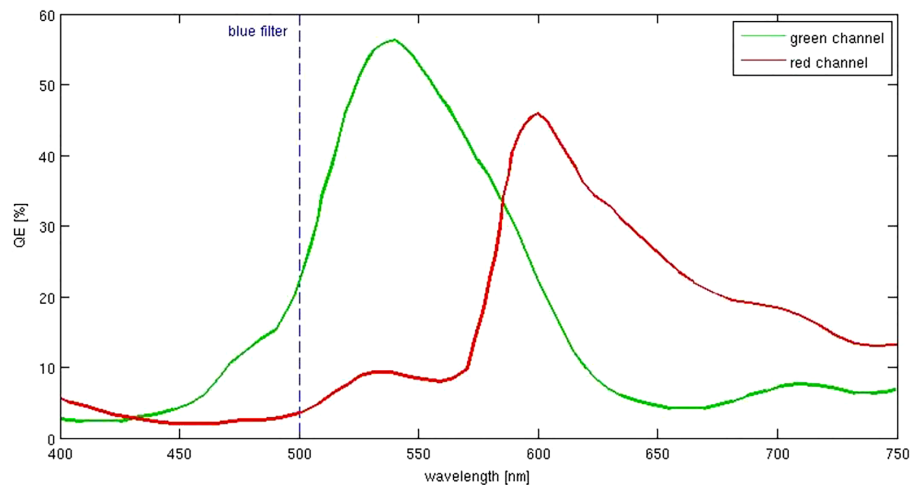
**Image acquisition.** All patients underwent pupil dilatation (using 0.5% tropicamide, 2.5% phenylephrine), were examined by an ophthalmologist and imaged by color-fundus photography (CFP, 440–650 nm), FAF with blue excitation light (440–475 nm with a peak at 450 nm) and infrared reflectance (825–870 nm, 60° × 55°, image resolution 3680 × 3288 pixel, Eidon TrueColor Confocal Scanner, CenterVue, Padua, Italy), and enhanced depth spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT, 30° and 55°, at least 40 automatic real-time tracking repetitions, at least 60 B scans, image resolution 496 pixels per A-Scans and 768 A-Scans per B-Scan, Spectralis HRA + OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Clinical data were obtained from the medical charts. Eidon FAF images were exported as grayscale and Color-FAF images (detection range 500–750 nm). Color-FAF images were generated by the use of a barrier filter with a cut-off at 500 nm and by the device by separating GEFC and REFC. If multiple images were available, images with the best image quality were selected for analyses.

**Data analyses.** Inflammatory activity was defined on an eye-level in birdshot chorioretinopathy and ocular sarcoidosis and on a lesion-level in APMPPE, PIC, Toxoplasmosis chorioretinitis, MCP, POHS, and serpiginous choroiditis (inflammatory activity grading available in Supplementary Table S1)<sup>15–23</sup>. In general, the synopsis of all clinical findings was determinant for the definition of inflammatory activity. Both, inflammatory active and inactive eyes were included in this exploratory study. Image processing for quantitative analysis was performed with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; available at (<https://imagej.nih.gov/ij/>))<sup>24</sup> using the “Split Channels” function for separation of GEFC and REFC channels. The autofluorescence intensity of every retinal and choroidal lesion in the Color-FAF image was manually measured separately for GEFC and REFC channel using ImageJ and the Color-FAF characteristics of each lesion were determined by calculating the GEFC/REFC ratio for all entities with at least 100 lesions. Subgroups with less than 100 lesions were only included in the qualitative analyses. Color-FAF images were imported into the analysis software “FAF Color Segmentation Tool” (CenterVue, Padova, Italy) for analysis of the predominant wavelength component of the Color-FAF, as described in previous studies<sup>9,10</sup>. Using this software, an intensity-normalized Color-FAF image was generated for illustration of differences in FAF emission wavelength. The color of each pixel of the intensity-normalized Color-FAF image was derived from the main emitted wavelength of the pixel by the following technique: each pixel of the original image data had a specific intensity in the REFC and the GEFC channel. The intensity of a pixel in the REFC and GEFC channel was dependent on the contribution of emitted wavelengths by the pixel and their quantum efficiency (Fig. 1). The resulting color of the pixel was calculated from the relationship between the distribution of intensities in REFC and GEFC. Using a fitted exponential function based on empirical data of fluorophores with known emission spectra, the intensity-normalized Color-FAF image was generated.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using R (R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 3.4.1, R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016). Repeated measures ANOVA was used for the comparison of the ratios of GEFC/REFC in different posterior uveitis entities. Furthermore, multivariable regression analysis, using mixed models to account for the clustered structure of the data (large number of lesions and repeated measures within one eye), was performed to determine the influence of lens status and inflammatory activity on the GEFC/REFC ratio.

## Results

**Demographics and clinical characteristics.** A total of 76 eyes of 45 patients was included in the study. Four eyes of 3 patients were excluded due to reduced Color-FAF image quality and 4 eyes of 2 patients because of coincident age-related macular degeneration. Characteristics of the patients and uveitis entities are provided in Table 1. There were no relevant lens opacities present in any of the included phakic eyes. Three out of 13 eyes with ocular sarcoidosis (22 lesions), 2 out of 9 eyes with birdshot chorioretinopathy (23 lesions), 2 out of 22 eyes with APMPPE (29 lesions), 1 out of 12 eyes with PIC (11 lesions), 2 out of 8 eyes with toxoplasmosis (2 lesions), and 4 out of 5 eyes with serpiginous choroiditis (10 lesions) showed clinically active inflammation at the time of imaging. In the included eyes with MCP and POHS there were no active lesions present.

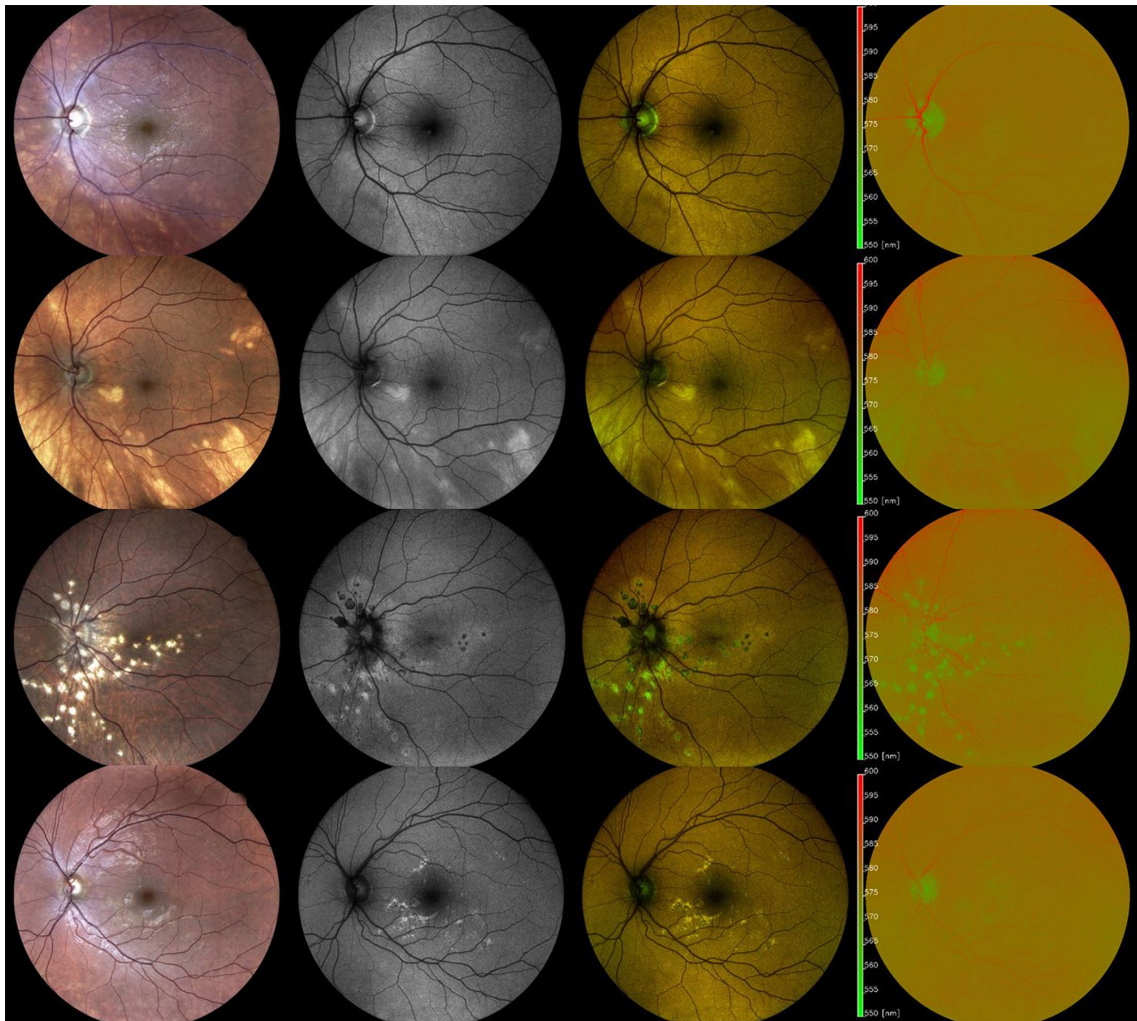


**Figure 1.** Eidon Autofluorescence sensor quantum efficiency. Each wavelength from 500 to 750 nm contributes to both, green and red channels with different efficiencies. The single-color component (red or green) of a pixel has to be interpreted as the total contribution of all wavelengths collected by the sensor after they are multiplied by their respective quantum efficiency (QE). The dashed line illustrates the barrier filter with the cut-off at 500 nm.

	Mean $\pm$ SD (Range) or N (%)
Age (years)	48 $\pm$ 17 (17–81)
Sex (male)	36 (46%)
Lens status (phakic)	61 (78%)
VA (logMAR)	0.26 $\pm$ 0.41 (0.0–1.7)
Duration of uveitis (months)	72 $\pm$ 86 (0–329)
<b>Posterior uveitis entities (eyes (lesions))</b>	
APMPPE	22 (338)
Ocular sarcoidosis	13 (124)
PIC	12 (129)
Birdshot chorioretinopathy	9 (151)
Toxoplasmosis chorioretinitis	8 (14)
MCP & POHS	7 (74)
Serpiginous choroiditis	5 (15)

**Table 1.** Characteristics of the sample. SD Standard deviation, VA (best-corrected) Visual acuity, PIC Punctate inner choroidopathy, APMPPE Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy, MCP Multifocal choroiditis and panuveitis, POHS Presumed ocular histoplasmosis syndrome.

**Qualitative analysis of color-FAF images and association with OCT.** The typical discrete lesions on CFP in birdshot chorioretinopathy were hardly or not at all determinable on Color-FAF, grayscale FAF and intensity-normalized Color-FAF. Lesions typical of ocular sarcoidosis however, appeared hyperautofluorescent on grayscale FAF and showed a predominantly green emission wavelength of low visibility on the intensity-normalized Color-FAF (Fig. 2). OCT images revealed choroidal thinning in fundus areas corresponding to the white dots in all 13 eyes with ocular sarcoidosis both in active and inactive disease. In contrast, there was no notable choroidal thinning in fundus areas corresponding to birdshot chorioretinopathy lesions both in active and inactive disease, except for one eye (Supplementary Fig. S1). Lesions of APMPPE, typically barely visible on CFP, appeared predominantly greenish on intensity-normalized Color-FAF. On grayscale FAF and Color-FAF, lesions were clearly identifiable. APMPPE lesions showed a disrupted ellipsoid and interdigitation zone with a preserved RPE and Bruch's membrane on OCT (in 19 of 22 eyes) and RPE atrophy (in 3 of 22 eyes). PIC lesions were well demarcated in all four imaging modalities. In intensity-normalized Color-FAF, PIC lesions appeared strongly greenish (Fig. 2). An interruption of outer retinal layers, including RPE and Bruch's membrane, was evident on OCT scans corresponding to fundus areas affected by PIC in all 12 eyes with PIC (Supplementary Fig. S2).

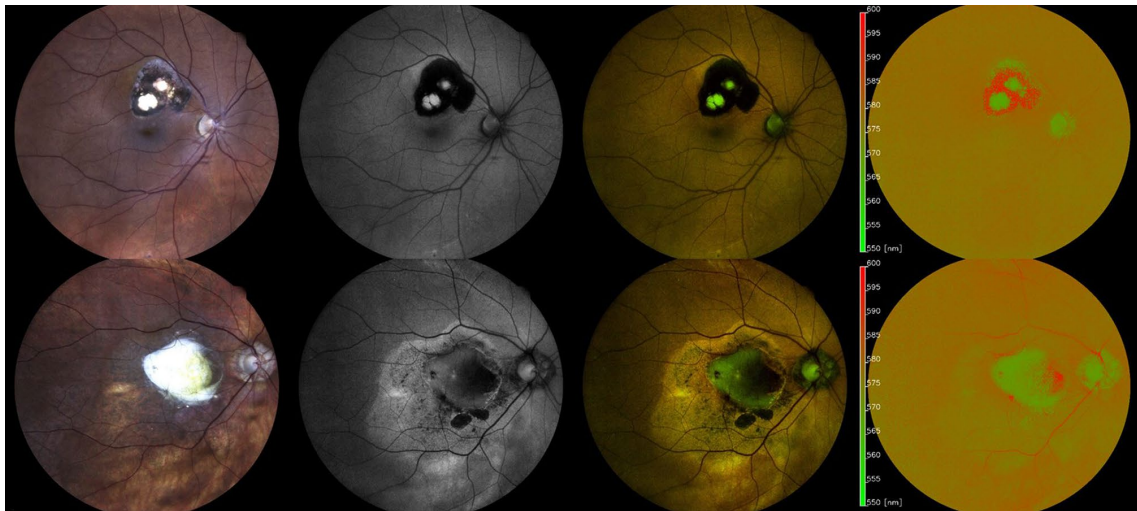


**Figure 2.** Comparison of birdshot chorioretinopathy, ocular sarcoidosis, punctate inner choroidopathy (PIC), and acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE) on spectrally resolved autofluorescence (Color-FAF) imaging. An exemplary eye with birdshot chorioretinopathy (first row), ocular sarcoidosis (second row), PIC (third row), and APMPE (fourth row) are illustrated. From left to right: color fundus photograph (CFP), grayscale fundus autofluorescence image (grayscale FAF), spectrally resolved fundus autofluorescence (Color-FAF) image, intensity-normalized Color-FAF. Lesions of eyes affected by ocular sarcoidosis were more apparent than in eyes with birdshot chorioretinopathy on grayscale FAF, Color-FAF, and intensity-normalized Color-FAF. Lesions of eyes with PIC were clearly apparent in all four modalities. Lesions of eyes affected by APMPE were hardly visible on CFP and on intensity-normalized Color-FAF, whereas they were easily definable on Color-FAF and grayscale FAF.

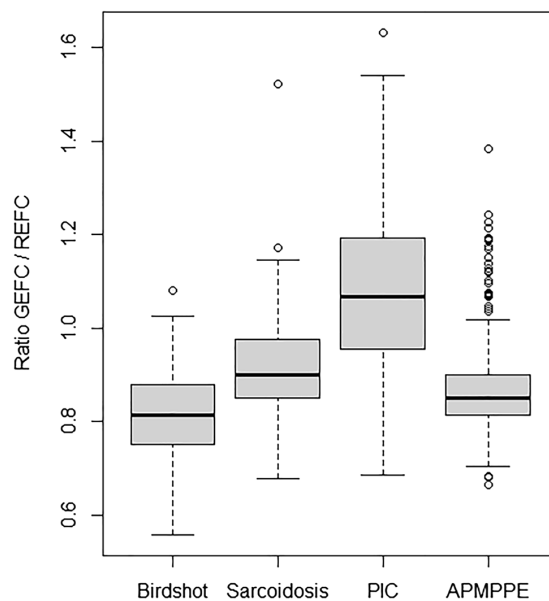
Qualitative image analysis showed that optic nerve head and RPE atrophy featured predominantly GEFC and retinal vessels predominantly REFC. Pigmented retinal lesions, present in 20 eyes (14 patients), featured mainly REFC on intensity-normalized Color-FAF, whereas macular neovascularizations (MNVs), present in 7 eyes (5 patients), featured mainly GEFC (Fig. 3).

**Quantitative analysis of color-FAF images.** The ratio of autofluorescence intensity in the GEFC and REFC channel was calculated for lesions in eyes with confirmed diagnosis of posterior uveitis of subgroups with at least 100 lesions: ocular sarcoidosis, birdshot chorioretinopathy, APMPE, and PIC. In total 742 lesions were analyzed: 124 lesions from eyes with sarcoidosis, 151 lesions from eyes with birdshot chorioretinopathy, 129 lesions from eyes with PIC, and 338 lesions from eyes with APMPE. In ocular sarcoidosis the mean GEFC/REFC ratio was  $0.92 (\pm 0.11)$ , for birdshot chorioretinopathy the mean ratio was  $0.82 (\pm 0.10)$ , for APMPE the mean ratio was  $0.86 (\pm 0.10)$ , and for PIC the mean ratio was  $1.09 (\pm 0.19)$  (Fig. 4). Repeated measures ANOVA





**Figure 3.** Sources of green and red emission fluorescent components in posterior uveitis. Exemplary eyes with a pigmented scar in toxoplasmosis chorioretinitis (top row) and with macular neovascularization (MNV) in multifocal choroiditis and panuveitis (MCP; bottom row). From left to right: color fundus photography (CFP), grayscale fundus autofluorescence (grayscale FAF), spectrally resolved fundus autofluorescence (Color-FAF) image, intensity-normalized Color-FAF. Pigmented parts of the toxoplasmosis lesion features predominantly red emission fluorescent components (REFC) on intensity-normalized Color-FAF. On grayscale FAF and Color-FAF the pigmented parts were hypoautofluorescent and indistinguishable from parts of the lesion without pigmentation. The MNV in the eye with MCP featured mainly GEFC on Color-FAF and intensity-normalized Color-FAF.



**Figure 4.** Quantitative analysis of GEFC/REFC ratio for posterior uveitis entities. Birdshot chorioretinopathy (left), ocular sarcoidosis (middle-left), punctate inner choroidopathy (PIC; middle-right), acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE; right). Values over 1.5 interquartile range below the first quartile or above the third quartile were defined as outliers. Multivariable regression analysis showed significant differences ( $p < .05$ ) among all posterior uveitis entities except for the comparison of birdshot chorioretinopathy and APMPPE ( $p = .07$ ).

showed a significant difference for the comparison of these 4 posterior uveitis entities ( $p < 0.0001$ ). Multivariable regression analysis using mixed models (and adjusting for lens status and inflammatory activity) showed significant differences for all posterior uveitis entities except for the comparison of birdshot chorioretinopathy and APMPE ( $p = 0.07$ ). Furthermore, lens status and inflammatory activity had no significant influence on the GEFC/REFC ratio ( $p = 0.98$  and  $p = 0.33$ ) in each subgroup (Supplementary Table S2).

Qualitative and quantitative findings on Color-FAF, intensity-normalized Color-FAF and OCT are summarized in Supplementary Table S3.

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating spectrally resolved fundus autofluorescence in patients with uveitis. We demonstrate involvement of both short- and long-wavelength emitting fluorophores in retinal and choroidal lesions in posterior uveitis, significantly different GEFC/REFC ratios in lesions between different posterior uveitis entities, and postulate previously unknown sources of GEFC and REFC. Spectrally resolved fundus autofluorescence introduces novel imaging biomarkers and may aid diagnosis of posterior uveitis entities.

The use of conventional FAF imaging has already been evaluated for various retinal diseases<sup>5,25–27</sup> and previous studies have shown that conventional FAF imaging can aid monitoring in posterior uveitis. FAF allows for identification of more chorioretinal lesions than conventional color fundus photography, it can reveal a greater extent of RPE damage, and it facilitates the differentiation between active and inactive parts of inflammatory lesions<sup>2,7,28,29</sup>. The autofluorescence detected in short-wavelength FAF emission (excitation: 488 nm) has its assumed origin mainly in bisretinoids of RPE lipofuscin, whereas long-wavelength FAF emissions (excitation: 785 nm) have their assumed origin mainly in melanin of the RPE and choroid<sup>30</sup>. Color-FAF imaging uses an excitation wavelength of 450 nm and is thought to excite more intensely minor fluorophores besides lipofuscin<sup>8,31</sup>. Therefore, it offers additional information and might provide novel insight into the pathophysiology of different posterior uveitis entities.

Despite multimodal imaging and a variety of available laboratory analyses, the diagnosis of posterior uveitis can remain challenging. Little is known about the pathophysiology of distinct posterior uveitis entities, and their heterogeneous manifestations can make it difficult to come to an accurate diagnosis<sup>32</sup>. For example, birdshot chorioretinopathy and ocular sarcoidosis can look alike, as both present with granulomatous inflammation of the choroid and with retinal vasculitis<sup>33,34</sup>. Our study shows that Color-FAF imaging may aid in differentiating between birdshot chorioretinopathy and ocular sarcoidosis based on significantly different GEFC/REFC ratios and by means of the intensity-normalized Color-FAF image.

A possible explanation for the observed differences in autofluorescence intensity and different main emission wavelengths might be the association with choroidal thinning, as we observed a thinner choroid on OCT in areas with lesions in ocular sarcoidosis in contrast to birdshot chorioretinopathy and to not affected fundus areas. This finding suggests that the sources of shortwave autofluorescence (GEFC) may be located in deeper choroidal layers or scleral tissue. The sources of GEFC and REFC have been discussed in previous studies: structures known to feature predominantly GEFC are fundus areas without underlying RPE (e.g. retinal scars, RPE atrophies, optic nerve head) while retinal vessels have been shown as a main source for REFC<sup>8,9</sup>. We were able to identify additional sources of REFC and GEFC: pigmented lesions appeared reddish on the intensity-normalized Color-FAF and MNVs greenish. Minor fluorophores, such as advanced glycation end products (AGE), flavin adenine dinucleotide and collagen/elastin are the main intrinsic short-wavelength fluorophores that are thought to cause GEFC autofluorescence<sup>8,31</sup>. Collagen and elastin are known to be principal parts of subchoroidal tissue, tenon's capsule, and sclera<sup>35,36</sup>, hence, may be important intrinsic fluorophores contributing to GEFC signal in presence of choroidal thinning in retinal and choroidal lesions due to posterior uveitis.

This hypothesis is further supported by our findings in PIC. PIC lesions showed a predominantly green emission wavelength on intensity-normalized Color-FAF and corresponding OCT scans revealed a disruption of RPE and Bruch's membrane, congruently with previous literature<sup>37,38</sup>. In contrast, APMPE lesions appeared rather equally greenish and reddish, and less well defined on intensity-normalized Color-FAF, and showed preserved RPE and Bruch's membrane on OCT<sup>39</sup>. It is possible that RPE disruption and concomitant reduction of RPE lipofuscin in affected fundus areas leads to stronger excitation of scleral/subchoroidal fluorophores and subsequently more intense emission of GEFC.

AGEs are considered as important source of GEFC in age-related macular degeneration<sup>8</sup>. There is a reasonable suspicion that AGEs play an important role in pathogenesis of chronic posterior uveitis as well, since patients with endogenous posterior uveitis entities show elevated serum levels of AGEs. Accumulation of AGEs in human retina is assumed based on a mouse model confirming elevated levels of retinal AGEs in mice due to induced human endogenous uveitis<sup>40</sup>. Thus, it is reasonable to assume that AGEs may contribute decisively to predominant short-wavelength emissions in lesions caused by endogenous posterior uveitis. Yet, further histopathological investigations are required to determine the involvement of AGE in posterior uveitis as well as to confirm our hypotheses.

The limitations of our study are a relatively small sample size and the exploratory, cross-sectional design. Strengths of our study include the introduction of the novel parameter GEFC/REFC ratio to characterize retinal and choroidal lesions by Color-FAF. Color-FAF imaging using the described device is an automated process and therefore easily reproducible and practicable in a clinical setting<sup>10</sup>. Owing to strict inclusion criteria we did not include any eyes with relevant media opacities, hence, minimized the influence of this potential confounder on our results. It is important to note that our quantifications aimed to analyze mean GEFC/REFC ratio for complete lesions, and therefore did not assess differences in emission spectra within single lesions. Future studies should analyze differences in GEFC/REFC ratio within single lesions, as different uveitis entities and active and inactive

lesions might have distinct intra-lesion GEFC/REFC ratio distributions. Furthermore, a method allowing for proper quantification of Color-FAF intensity similar to quantitative autofluorescence imaging using an internal reference would be useful for future investigations<sup>12</sup>.

Our study introduced GEFC/REFC ratios as a novel imaging biomarker for posterior uveitis using spectrally resolved fundus autofluorescence and provides means for differentiation of posterior uveitis entities, which can be difficult to distinguish otherwise. Furthermore, we found previously unknown sources of REFC and GEFC. Longitudinal studies are warranted to evaluate the use of spectrally resolved FAF for diagnosis and monitoring of posterior uveitis.

### Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are not publicly available due to data protection regulations but are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 9 January 2022; Accepted: 4 August 2022

Published online: 29 August 2022

### References

- Dick, A. D. *et al.* Guidance on noncorticosteroid systemic immunomodulatory therapy in noninfectious uveitis: Fundamentals of care for uveitis (FOCUS) initiative. *Ophthalmology* **125**, 757–773. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.11.017> (2018).
- Durrani, K. & Foster, C. S. Fundus autofluorescence imaging in posterior uveitis. *Semin. Ophthalmol.* **27**, 228–235. <https://doi.org/10.3109/08820538.2012.711414> (2012).
- Hashimoto, H. & Kishi, S. Ultra-wide-field fundus autofluorescence in multiple evanescent white dot syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **159**, 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.01.015> (2015).
- Pichi, F., Abboud, E. B., Ghazi, N. G. & Khan, A. O. Fundus autofluorescence imaging in hereditary retinal diseases. *Acta Ophthalmol.* **96**, e549–e561. <https://doi.org/10.1111/aos.13602> (2018).
- Holz, F. G., Steinberg, J. S., Göbel, A., Fleckenstein, M. & Schmitz-Valckenberg, S. Fundus autofluorescence imaging in dry AMD: 2014 Jules Gonin lecture of the Retina Research Foundation. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* **253**, 7–16. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2858-1> (2015).
- Haen, S. P. & Spaide, R. F. Fundus autofluorescence in multifocal choroiditis and panuveitis. *Am. J. Ophthalmol.* **145**, 847–853. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.01.008> (2008).
- Koizumi, H., Pozzoni, M. C. & Spaide, R. F. Fundus autofluorescence in birdshot chorioretinopathy. *Ophthalmology* **115**, e15–e20. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.01.025> (2008).
- Borrelli, E. *et al.* Green emission fluorophores in eyes with atrophic age-related macular degeneration: A colour fundus autofluorescence pilot study. *Br. J. Ophthalmol.* **102**, 827–832. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-310881> (2018).
- Dysli, C., Müller, P. L., Birtel, J., Holz, F. G. & Herrmann, P. Spectrally resolved fundus autofluorescence in ABCA4-related retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **60**, 274–281. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25755> (2019).
- Turski, C. A., Holz, F. G. & Brinkmann, C. K. Inter-device comparison of blue-light autofluorescence in optic disc drusen. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde* **243**, 110–119. <https://doi.org/10.1159/000501860> (2020).
- Borrelli, E. *et al.* Comparison of short-wavelength blue-light autofluorescence and conventional blue-light autofluorescence in geographic atrophy. *Br. J. Ophthalmol.* <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-311849> (2018).
- Müller, P. L., Dysli, C., Hess, K., Holz, F. G. & Herrmann, P. Spectral fundus autofluorescence excitation and emission in ABCA4-related retinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **40**, 2332–2342. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002726> (2020).
- Jabs, D. A., Nussenblatt, R. B. & Rosenbaum, J. T. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am. J. Ophthalmol.* **140**, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.03.057> (2005).
- Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Development of classification criteria for the uveitides. *Am. J. Ophthalmol.* **228**, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2021.03.061> (2021).
- Wintergerst, M. W. M. *et al.* Structural endpoints and outcome measures in uveitis. *Ophthalmologica* **244**(5), 465–479. <https://doi.org/10.1159/000517521> (2021).
- Bousquet, E. *et al.* Choroidal structural changes in patients with birdshot chorioretinopathy. *Ocular Immunol. Inflamm.* **29**(2), 346–351. <https://doi.org/10.1080/09273948.2019.1681472> (2021).
- Nussenblatt, R. B. *et al.* (eds) *Uveitis: Fundamentals and Clinical Practice* (Mosby, 1996).
- Sassalos, T. M., Vitale, A. T. & Conrady, C. D. Posterior scleritis and acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy: A case of painful chorioretinitis and review of the current literature. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* **23**, 101159. <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2021.101159> (2021).
- Ahnoo, D. *et al.* Punctate inner choroidopathy: A review. *Surv. Ophthalmol.* **62**(2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2016.10.003> (2017).
- Amer, R. & Lois, N. Punctate inner choroidopathy. *Surv. Ophthalmol.* **56**(1), 36–53. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2010.03.009> (2011).
- Ozgonul, C. & Besirli, C. G. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *Ophthalmic Res.* **57**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000449169> (2017).
- Saleh, M. Placoid pigment epitheliopathy and serpinginous choroiditis. *J. Fr. Ophthalmol.* **43**(2), e55–e66. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2019.12.001> (2020).
- Spaide, R. F., Goldberg, N. & Freund, K. B. Redefining multifocal choroiditis and panuveitis and punctate inner choroidopathy through multimodal imaging. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **33**(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318286cc77> (2013).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089> (2012).
- Schmitz-Valckenberg, S., Holz, F. G., Bird, A. C. & Spaide, R. F. Fundus autofluorescence imaging: Review and perspectives. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **28**, 385–409. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318164a907> (2008).
- Lee, C. S. *et al.* Fundus autofluorescence features in the inflammatory maculopathies. *Clin. Ophthalmol. (Auckland, N.Z.)* **8**, 2001–2012. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S68446> (2014).
- Müller, P. L. *et al.* Comparison of green versus blue fundus autofluorescence in ABCA4-related retinopathy. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **7**, 13. <https://doi.org/10.1167/tvst.7.5.13> (2018).
- Reznicek, L. *et al.* Systematic analysis of wide-field fundus autofluorescence (FAF) imaging in posterior uveitis. *Curr. Eye Res.* **39**, 164–171. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.834938> (2014).

29. Seidensticker, F. *et al.* Wide-field fundus autofluorescence corresponds to visual fields in chorioretinitis patients. *Clin. Ophthalmol. (Auckland, N.Z.)* **5**, 1667–1671. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S26224> (2011).
30. Keilhauer, C. N. & Delori, F. C. Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 3556–3564. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0122> (2006).
31. Schweitzer, D. *et al.* Towards metabolic mapping of the human retina. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 410–419. <https://doi.org/10.1002/jemt.20427> (2007).
32. Sève, P. *et al.* Uveitis: Diagnostic work-up. A literature review and recommendations from an expert committee. *Autoimmun. Rev.* **16**, 1254–1264. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.10.010> (2017).
33. Sullu, Y., Yildiran, A., Sullu, Y., Helek, D. & Ozkaya, O. Sarcoid uveitis simulating birdshot chorioretinopathy in a child. *Retinal Cases Brief Rep.* **6**, 7–10. <https://doi.org/10.1097/ICB.0b013e3181f7455d> (2012).
34. Cowan, C. L. Review for disease of the year: Differential diagnosis of ocular sarcoidosis. *Ocular Immunol. Inflamm.* **18**, 442–451. <https://doi.org/10.3109/09273948.2010.522434> (2010).
35. Coudrillier, B. *et al.* Collagen structure and mechanical properties of the human sclera: Analysis for the effects of age. *J. Biomech. Eng.* **137**, 41006. <https://doi.org/10.1115/1.4029430> (2015).
36. Park, C. Y. *et al.* Details of the collagen and elastin architecture in the human limbal conjunctiva, Tenon's capsule and sclera revealed by two-photon excited fluorescence microscopy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 5602–5610. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19706> (2016).
37. Channa, R. *et al.* Characterization of macular lesions in punctate inner choroidopathy with spectral domain optical coherence tomography. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* **2**, 113–120. <https://doi.org/10.1007/s12348-011-0054-6> (2012).
38. Zhang, X. *et al.* Spectral-domain optical coherence tomographic findings at each stage of punctate inner choroidopathy. *Ophthalmology* **120**, 2678–2683. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.05.012> (2013).
39. Steiner, S. & Goldstein, D. A. Imaging in the diagnosis and management of APMPE. *Int. Ophthalmol. Clin.* **52**, 211–219. <https://doi.org/10.1097/IIO.0b013e318265d45a> (2012).
40. Dong, Z. *et al.* Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-product formation. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 1077–1085. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0513-288RRR> (2014).

### Author contributions

M.W.M.W.: designed the experiment, conducted the experiment, prepared the data for analysis, analyzed data, interpreted data, provided material, did the literature research, generated the figures and tables, wrote the article, proofed/revised the article, provided scientific oversights; N.R.M.: designed the experiment, conducted the experiment, prepared the data for analysis, analyzed data, interpreted data, provided material, did the literature research, generated the figures and tables, wrote the article, proofed/revised the article; M.B.: analyzed data, interpreted data, proofed/revised the article; C.D.: interpreted data, proofed/revised the article; J.H.T.: interpreted data, proofed/revised the article; EP: provided material, proofed/revised the article; F.G.H.: proofed/revised the article; VSS: proofed/revised the article; M.S.: proofed/revised the article; T.A.: interpreted data, proofed/revised the article; R.P.F.: designed the experiment, interpreted data, wrote the article, proofed/revised the article, provided scientific oversights.

### Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. Funding was provided by the BONFOR GEROK Program, Faculty of Medicine, University of Bonn, (Grant No O-137.0028) to MWMW and by Else Kroener-Fresenius Foundation and the German Scholars Organization (EKFS/GSO 16) to RPF. The funding organization had no role in the design or conduct of this research.

### Competing interests

Maximilian W.M. Wintergerst: DigiSight Technologies: travel grant, D-EYE Srl: imaging devices, Heine Optotechnik GmbH: research funding, imaging devices, travel reimbursements, consultant; Eyenuk, Inc: free trial analysis; ASKIN & CO GmbH: travel reimbursement, honoraria; Berlin-Chemie AG: grant, travel reimbursements; Imaging devices were provided by Heidelberg Engineering, Optos, Carl Zeiss Meditec, and CenterVue; Nicholas R. Merten: No financial disclosures; Moritz Berger: No financial disclosures; Chantal Dysli: No financial disclosures; Jan H. Terheyden: Imaging devices were provided by Heidelberg Engineering, Optos, Carl Zeiss Meditec, and CenterVue; Enea Poletti: Employment: Centervue S.p.A.; Frank G. Holz: Research Grant Support: Acucela, Allergan, Apellis, Bayer, Bioeq/Formycon, CenterVue, Ellex, Roche/Genentech, Geuder, Kanghong, NightStarx, Novartis, Optos, Zeiss; Consultant: Acucela, Aerie, Allergan, Apellis, Bayer, Boehringer-Ingelheim, ivericbio, Roche/Genentech, Geuder, Grayburg Vision, ivericbio, LinBioscience, Kanghong, Novartis, Pixium Vision, Oxurion, Stealth BioTherapeutics, Zeiss; Valentin S. Schäfer: No financial disclosures; Matthias Schmid: No financial disclosures; Thomas Ach: Research Grant Support: Novartis; Lecture fee: Novartis, Heidelberg Engineering; Advisory Board: Roche; Invest: Macregen; Robert P. Finger: funding was provided by Else Kroener-Fresenius Foundation and the German Scholars Organization (EKFS/GSO 16); financial support: Novartis, Heidelberg Engineering, Optos, Carl Zeiss Meditec, and CenterVue. Consultant: Bayer, Novartis, Roche/Genentech, Boehringer-Ingelheim, Opthea, Santhera, Inositec, Alimera, Allergan, Ellex.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18048-4>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.W.M.W.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

## **Spectrally Resolved Autofluorescence Imaging in Posterior Uveitis**

**Maximilian W. M. Wintergerst\*<sup>1</sup>, Nicholas R. Merten\*<sup>1</sup>, Moritz Berger<sup>2</sup>, Chantal Dysli<sup>3</sup>, Jan H. Terheyden<sup>1</sup>, Enea Poletti<sup>4</sup>, Frank G. Holz<sup>1</sup>, Valentin S. Schäfer<sup>5</sup>, Matthias Schmid<sup>2</sup>, Thomas Ach<sup>1</sup>, Robert P. Finger<sup>1</sup>**

**\* contributed equally**

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, University of Bonn, Bonn, Germany

<sup>2</sup> Department of Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, University of Bonn / University Hospital Bonn, Bonn, Germany

<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland

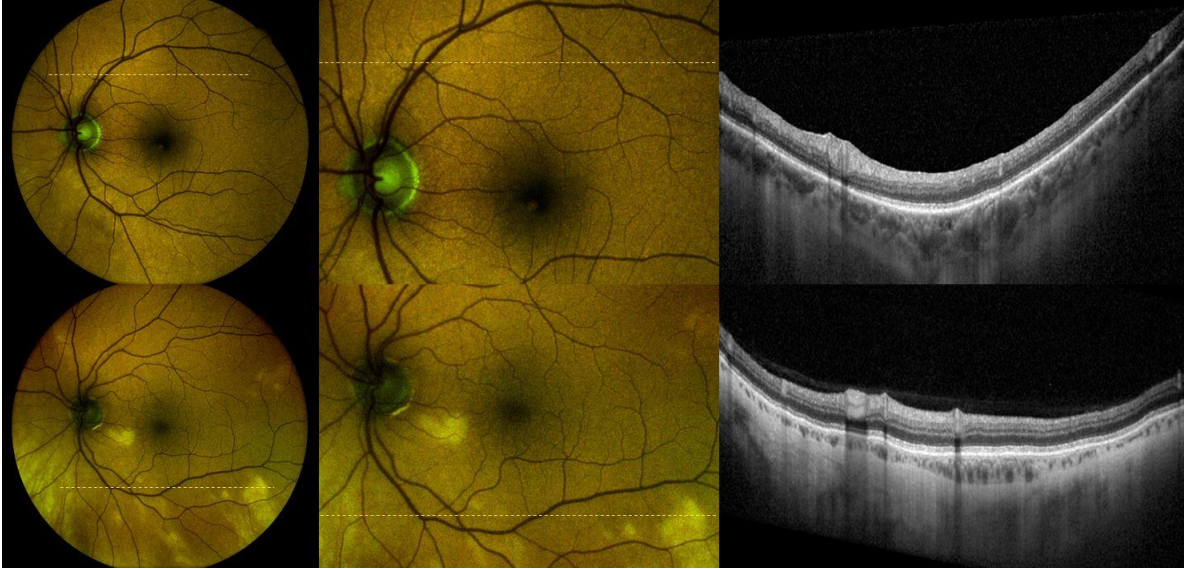
<sup>4</sup> CenterVue, Padua, Italy

<sup>5</sup> Clinic of Internal Medicine III, Oncology, Hematology, Rheumatology, and Clinical Immunology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

**Supplementary Table S1.** Inflammatory activity grading

	active	inactive
Ocular sarcoidosis &	presence of macular edema	no macular edema
Birdshot chorioretinopathy	vitreous cells $\geq$ 2+ active vasculitis new lesions	vitreous cells < 2+ no signs of active vasculitis
APMPPE	fuzzy borders, creamy, yellowish / greyish color on CFP hyperautofluorescence on FAF subretinal fluid on OCT	sharply defined borders on CFP pigment granularity on CFP hypoautofluorescence on FAF no subretinal fluid on OCT RPE hyperreflectivity on OCT
PIC	fuzzy borders, creamy, yellowish / greyish color on CFP hyperautofluorescent retina surrounding hypoautofluorescent lesion on FAF	sharply defined borders, punched-out appearance on CFP pigmentation on CFP hypoautofluorescence on FAF
Toxoplasmosis chorioretinitis &	fuzzy borders, creamy, yellowish / greyish color on CFP	sharply defined borders on CFP
MCP & POHS &	hyperautofluorescence on FAF	pigmentation on CFP hypoautofluorescence on FAF
Serpiginous choroiditis		

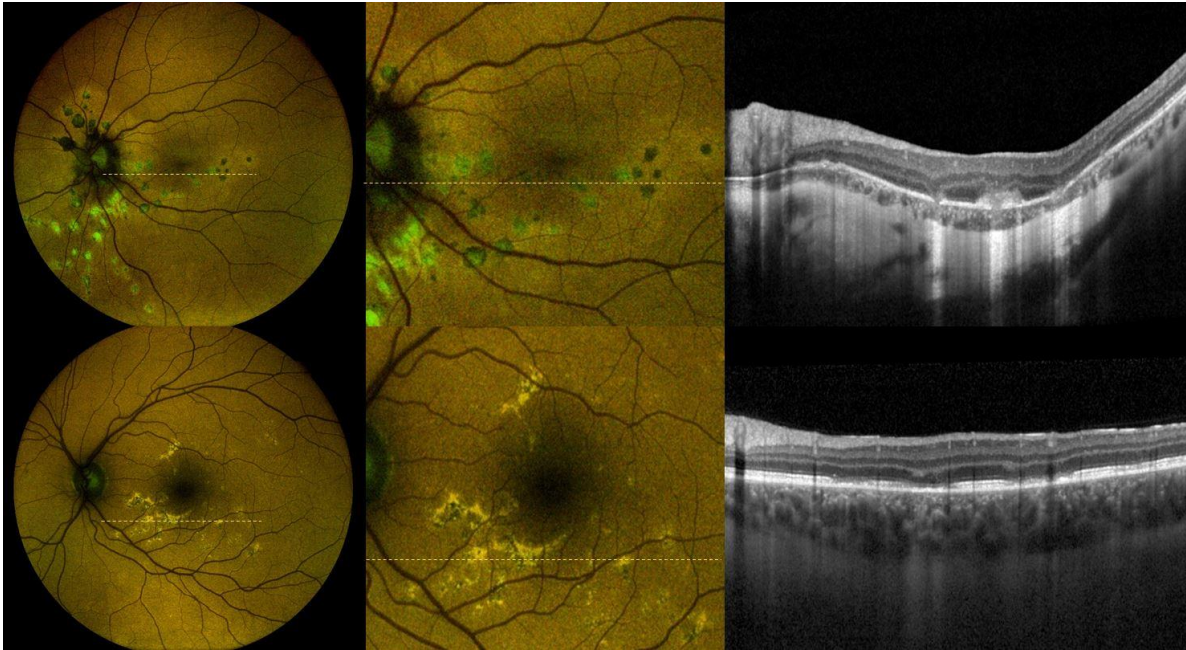
APMPPE = acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy; PIC = punctate inner choroidopathy; MCP multifocal choroiditis and panuveitis; POHS = presumed ocular histoplasmosis syndrome; CFP = color fundus photography; OCT = optical coherence tomography; FAF = fundus autofluorescence; Ocular sarcoidosis and birdshot chorioretinopathy were graded on an eye-level, whereas APMPPE, PIC, toxoplasmosis chorioretinitis, MCP, POHS, and serpiginous choroiditis were graded on a lesion level; Sources: Birdshot & Sarcoidosis: <sup>1-3</sup>, APMPPE: <sup>4,5</sup> PIC: <sup>6,7</sup>, Toxoplasmosis, APMPPE, MCP: <sup>8-10</sup>



**Supplementary Figure S1.** Exemplary comparison of OCT and Color-FAF for one eye with birdshot chorioretinopathy and ocular sarcoidosis

One exemplary eye with birdshot chorioretinopathy (top row) and ocular sarcoidosis (bottom row) are shown on Color-FAF and on OCT. Lesions due to birdshot chorioretinopathy are hardly visible on Color-FAF and show no significant choroidal thinning on OCT. Lesions secondary to ocular sarcoidosis are easily identifiable on Color-FAF and show general and lesion-specific choroidal thinning on OCT.





**Supplementary Figure S2.** Exemplary comparison of OCT and Color-FAF for one eye with punctate inner choroidopathy (PIC) and acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE)

One exemplary eye with punctate inner choroidopathy (PIC; top row) and acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE; bottom row) are shown on Color-FAF and on OCT. Lesions secondary to PIC are easily identifiable on Color-FAF and show an interruption of outer retinal layers, including retinal pigment epithelium and Bruch's membrane, on OCT. Lesions due to APMPPE are easily identifiable on Color-FAF as well and show disrupted ellipsoid and interdigitation zone but preserved retinal pigment epithelium and Bruch's membrane.

**Supplementary Table S2.** Multivariable regression analyses

	Estimate	Std. Error	p
Intercept	$8.0 \times 10^{-1}$	$4.5 \times 10^{-2}$	<b>&lt;.001</b>
Sarcoidosis	$1.2 \times 10^{-1}$	$5.3 \times 10^{-2}$	<b>.026</b>
PIC	$2.8 \times 10^{-1}$	$5.5 \times 10^{-2}$	<b>&lt;.001</b>
APMPPE	$9.2 \times 10^{-2}$	$5.1 \times 10^{-2}$	.074
Lens status	$-1.0 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-2}$	.334
Inflammatory Activity	$1.5 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-2}$	.984

PIC = punctate inner choroidopathy; APMPPE = acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy

Multivariable regression analyses using linear mixed models including a random intercept for each patient is demonstrated. Estimated variance of random effects was 0.0069. Each subgroup was compared to birdshot chorioretinopathy. Lens status and inflammatory activity were compared for all subgroups.

**Supplementary Table S3.** Multimodal findings of lesions in posterior uveitis

	Color-FAF (GEFC/REFC Ratio $\pm$ SD)	Intensity- normalized Color- FAF	OCT
<b>Birdshot</b>	lesions barely visible all lesions: 0.82 $\pm$ 0.11 active lesions: 0.81 $\pm$ 0.04 inactive lesions: 0.82 $\pm$ 0.10	slightly green	no notable choroidal thinning in fundus areas corresponding to lesions
<b>Sarcoidosis</b>	lesions visible all lesions: 0.92 $\pm$ 0.11 active lesions: 0.92 $\pm$ 0.13 inactive lesions: 0.92 $\pm$ 0.11	moderately green	choroidal thinning in fundus areas corresponding to lesions
<b>PIC</b>	lesions visible all lesions: 1.09 $\pm$ 0.19 active lesions: 1.10 $\pm$ 0.18 inactive lesions: 1.09 $\pm$ 0.15	strongly green	interruption of outer retinal layers, RPE, and Bruch's membrane
<b>APMPPE</b>	lesions visible all lesions: 0.87 $\pm$ 0.10 active lesions: 0.87 $\pm$ 0.06 inactive lesions: 0.87 $\pm$ 0.10	slightly green	disruption of ellipsoid and interdigitation zone with preserved RPE and Bruch's membrane

FAF = fundus autofluorescence; GEFC = green emission fluorescent components; REFC = red emission fluorescent components; SD = standard deviation; OCT = optical coherence tomography; PIC = punctate inner choroidopathy; APMPPE = acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy

## References

1. Wintergerst MWM, Liu X, Terheyden JH, et al. Structural Endpoints and Outcome Measures in Uveitis. *Ophthalmologica*. 2021. doi:10.1159/000517521
2. Bousquet E, Khandelwal N, Séminel M, et al. Choroidal Structural Changes in Patients with Birdshot Chorioretinopathy. *Ocul Immunol Inflamm*. 2021;29(2):346-351. doi:10.1080/09273948.2019.1681472
3. Nussenblatt RB, Whitcup SM, Palestine A. G., eds. *Uveitis: Fundamentals and Clinical Practice*. Mosby; 1996.
4. Sassalos TM, Vitale AT, Conrady CD. Posterior scleritis and acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy: A case of painful chorioretinitis and review of the current literature. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*. 2021;23:101159. doi:10.1016/j.ajoc.2021.101159
5. Steiner S, Goldstein DA. Imaging in the diagnosis and management of APMPPE. *Int Ophthalmol Clin*. 2012;52(4):211-219. doi:10.1097/IIO.0b013e318265d45a
6. Ahnood D, Madhusudhan S, Tsaloumas MD, Waheed NK, Keane PA, Denniston AK. Punctate inner choroidopathy: A review. *Survey of Ophthalmology*. 2017;62(2):113-126. doi:10.1016/j.survophthal.2016.10.003
7. Amer R, Lois N. Punctate inner choroidopathy. *Survey of Ophthalmology*. 2011;56(1):36-53. doi:10.1016/j.survophthal.2010.03.009
8. Ozgonul C, Besirli CG. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *Ophthalmic Res*. 2017;57(1):1-12. doi:10.1159/000449169
9. Saleh M. Placoid pigment epitheliopathy and serpiginous choroiditis. *J Fr Ophthalmol*. 2020;43(2):e55-e66. doi:10.1016/j.jfo.2019.12.001
10. Spaide RF, Goldberg N, Freund KB. Redefining multifocal choroiditis and panuveitis and punctate inner choroidopathy through multimodal imaging. *Retina*. 2013;33(7):1315-1324. doi:10.1097/IAE.0b013e318286cc77

### **3. Danksagung**

Mein Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn PD Dr. Maximilian Wintergerst, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die außerordentliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Untersuchungsabläufe und der Auswertung der Ergebnisse. Ich möchte mich bei ihm für die ausgezeichnete Betreuung und seine motivierenden Worte in Krisenzeiten bedanken. Meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere Herrn Omar Abdul-Aziz danke ich für ihre Unterstützung und Ermutigung.