

# Veränderungen der Autofluoreszenzlebensdauer am Fundus nach Sauerstoffprovokation

Zur Erfassung des Funktionsstoffwechsels der Netzhaut stellt die Messung von Parametern der Mikrozirkulation eine notwendige Komponente dar. Sie ist jedoch nicht ausreichend, um den Stoffwechsel auf zellulärem Niveau zu beschreiben. Im Zitratzyklus und in der Atmungskette, die in den Mitochondrien ablaufen, sind die Redoxpaare der Koenzyme NAD–NADH+H<sup>+</sup> (oxidiertes und reduziertes Nicotinamid Adenin Dinucleotid) und FAD–FADH<sub>2</sub> (oxidiertes und reduziertes Flavin Adenin Dinucleotid) wirksam. Die Fluoreszenzeigenschaften dieser Koenzyme sind zwischen reduzierter und oxidiert Form unterschiedlich. Zusätzlich ist dieses Verhalten noch entgegengesetzt zwischen beiden Koenzymen. Während bei FAD die reduzierte Form FADH<sub>2</sub> unter Umgebungsbedingungen keine messbare Fluoreszenz aufweist, fluoresziert die reduzierte Form NADH stärker als die oxidierte Form NAD [6]. Nach Chance [4] führt bereits eine geringere Konzentrationsänderung des Sauerstoffs zwischen 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-6</sup> molar zu einer Änderung zwischen reduzierter und oxidiert Form des NAD. Diese Änderung der Sauerstoffkonzentration ist um 3 Größenordnungen kleiner, als zur Änderung zwischen reduziertem und oxigeniertem Hämoglobin erforderlich ist. Wenn es gelingt, die Änderung der Autofluoreszenz der Koenzyme als Folge eines unterschiedlichen Sauerstoffangebo-

tes oder -verbrauchs am Fundus zu bestimmen, stünde eine wesentlich empfindlichere Methode zur Erfassung des Stoffwechselstatus zur Verfügung, als es mit Hilfe der Messung der Sauerstoffsättigung des Blutes derzeit möglich ist. Die orts aufgelöste Messung der Fluoreszenzeigenschaften der Redoxpaare der Koenzyme NADH–NAD und FADH<sub>2</sub>–FAD sowie von Stoffwechselendprodukten (Lipofuszin) eröffnet die Möglichkeit zu deren 2-dimensionalen Darstellung in Form eines „metabolic mapping“. Damit könnte es möglich sein, Krankheiten wie altersbezogene Makuladegeneration oder diabetische Retinopathie in einem Stadium zu erkennen, in dem noch keine morphologischen Veränderungen aufgetreten sind und die Hoffnung besteht, die noch reversible pathologische Entgleisung behandeln zu können.

Es konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden, ob die extrem schwache Autofluoreszenz dieser Koenzyme oder deren Änderung durch Stoffwechselprovokation am menschlichen Augenhintergrund orts aufgelöst nachweisbar ist.

## Gegenüberstellung von Methoden zur Unterscheidung von Fluorophoren

Zunächst erscheinen verschiedene Methoden wie selektive Anregung, Auswertung der Fluoreszenzspektren oder Aus-

wertung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz für diese Aufgabe geeignet.

In [11, 12] wurde gezeigt, dass eine Unterscheidung und 2-dimensionale Darstellung verschiedener Fluorophore am Augenhintergrund wesentlichen Beschränkungen unterliegt.

Bedingt durch den spektralen Verlauf der Okulartransmission [8] ist eine Unterscheidung der endogenen Fluorophore durch selektive Anregung in den Exzitationsspektren unterhalb von 400 nm nicht möglich. Theoretisch denkbar ist eine 2-Photonenanregung [7], bei der der Augenhintergrund mit langwelligem Licht von z. B. 640 nm bestrahlt wird, wobei Licht dieser Wellenlänge nahezu ohne Schwächung durch die Okularmedien tritt, am Augenhintergrund jedoch eine so hohe Strahldichte vorliegt, sodass 2 gleichzeitig auftreffende Photonen der Energie  $h\nu_1$  der Wellenlänge 640 nm die Energie  $h\nu_2$  der Wellenlänge 320 nm erzeugt, die für die optimale Anregung von z. B. Flavin erforderlich ist. Dieses Prinzip erfordert eine sehr große Apertur, um nur am Ort des Fokus die geforderte Strahldichte zu erreichen. Die Anwendbarkeit dieses Prinzips für Untersuchungen am

Teile des Beitrags wurden auf der 100. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Berlin vorgetragen.

Gefördert durch TMWFK 309-00015.

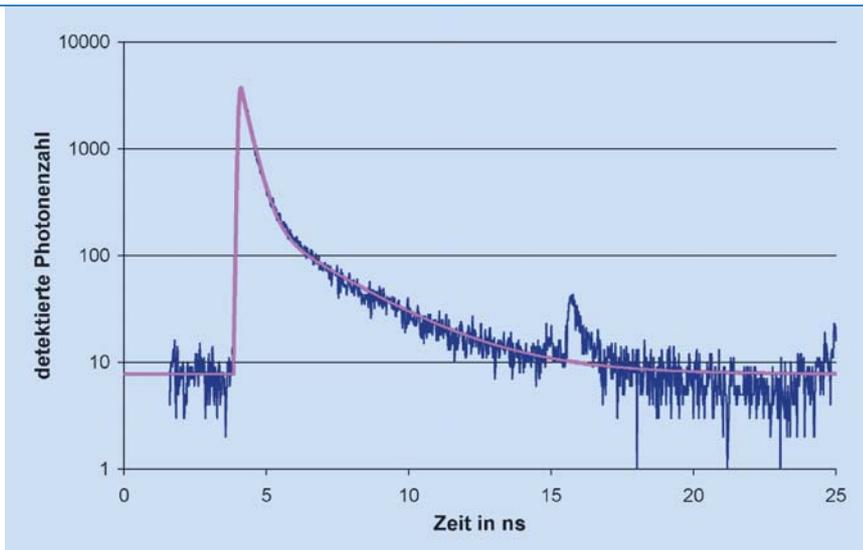


Abb. 1 ▲ Biexponentielle Approximation der Fluoreszenzphotonen nach Anregung eines Fundusortes von  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  mit 100 ps Anregungslaserpulsen bei  $\lambda=446 \text{ nm}$ , Detektion der Fluoreszenz  $475 \text{ nm} < \lambda_f < 700 \text{ nm}$

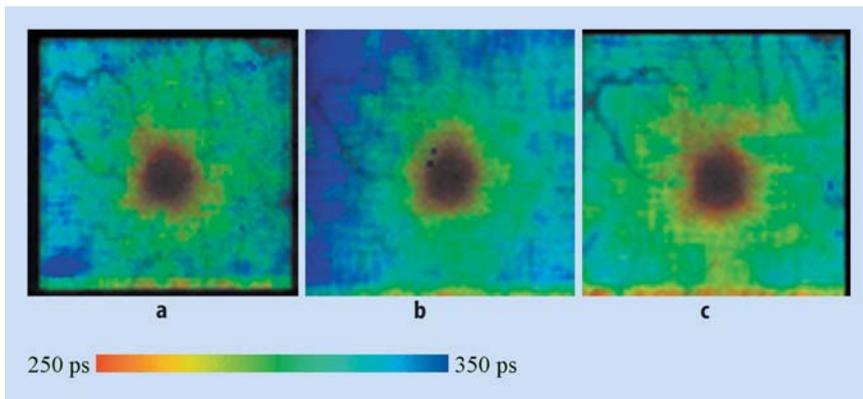


Abb. 2a–c ▲ Bild der Autofluoreszenzlebensdauer  $\tau_1$  im Bereich der Makula bei Anregung durch Laserpulse der Dauer 100 ps und einer Wellenlänge  $\lambda=446 \text{ nm}$ . Die Autofluoreszenz wurde im Spektralbereich  $475 \text{ nm} < \lambda_f < 700 \text{ nm}$  detektiert. a Ausgangsbild vor Sauerstoffatmung, b während Atmung von 100% Sauerstoff nach mindestens 6 min, c nach 30 min Wiederatmen von Luft

Augenhintergrund ist noch Gegenstand der Vorlaufsforschung.

Eine Analyse der Komponenten, die zur Bildung der Summenfluoreszenzspektren beitragen, ist prinzipiell möglich [9]. Um dieses Prinzip bei hoher örtlicher Auflösung anwenden zu können, ist für jeden Objektpunkt eine große Anzahl von Photonen zu akkumulieren. Die maximal zulässige Exposition stellt hierfür eine praktische Begrenzung dar [2]. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass Lichtabsorptionen im Auge (z. B. Makulapigment Xanthophyll, altersabhängige Okulartransmission) das Emissionsspektrum beeinflussen.

Eine 3. Möglichkeit zur örtlichen Unterscheidung von Fluorophoren besteht

in der Messung der substanzspezifischen Abklingzeit  $\tau$  der Fluoreszenz nach Anregung durch kurze Laserpulse. Diese Lebensdauer der Elektronen im angeregten Zustand ist charakteristisch für jedes Fluorophor und unabhängig von der Fluoreszenzintensität. Zu ihrer Berechnung wird der auf den Anfangswert normierte Abfall der Fluoreszenzintensität im Bereich von ps bis ns durch eine Modellfunktion nach Gleichung 1 approximiert,

$$\frac{I(t)}{I_0} = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} + b_g \quad (1)$$

wobei die  $\tau_i$  die Abklingzeiten und die  $\alpha_i$  die Gewichte der einzelnen Fluorophore

sind. Die Untergrundfluoreszenz wird durch einen zeitunabhängigen Parameter  $b_g$  berücksichtigt.

Mit der zeitaufgelösten Autofluoreszenz kann auch ein schwaches Fluorophor erkannt werden, dessen Emissionsspektrum von einem Fluorophor mit starker Fluoreszenz überdeckt ist, sofern die Abklingzeiten der Fluoreszenz ausreichend stark voneinander abweichen. Diese Eigenschaft könnte es somit ermöglichen, die schwache Autofluoreszenz der Koenzyme von der starken Autofluoreszenz des Lipofuszins oder des Bindegewebes zu unterscheiden.

Der relative Anteil  $q_k$  eines Fluorophors an der Gesamtfluoreszenz wird durch den Ausdruck (Gleichung 2)

$$q_k = \frac{\alpha_k \cdot \tau_k}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i} \quad (2)$$

beschrieben.

In [10] wurde gezeigt, dass es möglich ist, trotz der extrem schwachen Autofluoreszenz des Augenhintergrundes zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen in vivo zu realisieren. Hierzu wurde die Laser-Scanning-Ophthalmoskopie unter Verwendung eines Puls lasers als Strahlungsquelle mit dem Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens kombiniert. Da dieses Nachweisprinzip voraussetzt, dass nur ca. jeder 10. Anregungspuls zu einem detektierten Fluoreszenzphoton führt, ist es optimal zu Messungen am Fundus geeignet, wobei die maximal zulässige Exposition um Größenordnungen unterschritten wird.

## Methode

### Messanordnung für 2-dimensional zeitaufgelöste Autofluoreszenz

In einer Weiterentwicklung des in [10] beschriebenen Aufbaus wird eine selektierte Halbleiterdiode LDH 440 (Picoquant/Berlin) verwendet, die mit Pulsen der Dauer 100 ps Halbwertsbreite (FWHM – “full width at half maximum”) bei  $\lambda=446 \text{ nm}$  mit einer Repetitionsrate von 40 MHz den Fundus beleuchtet. Die mittlere Leistung in der Hornhautebene beträgt  $50 \mu\text{W}$ . Zum Ausgleich von Augenbewegungen wird aus dem vom Auge zurückgeworfenen Licht mittels eines di-

Ophthalmologie 2004 · 101:66–72  
DOI 10.1007/s00347-003-0824-0  
© Springer-Verlag 2003

D. Schweitzer · M. Hammer · R. Anders · T. Doebbecke · S. Schenke

### Veränderungen der Autofluoreszenzlebensdauer am Fundus nach Sauerstoffprovokation

#### Zusammenfassung

**Hintergrund.** Änderungen in den Redoxpaaren von Koenzymen geben Auskunft über den Stoffwechselstatus im Zitratzyklus und in der Atmungskette. Die Fluoreszenzeigenschaften von Koenzymen ändern sich zwischen reduziertem und oxidiertem Zustand. Eine Beeinflussung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe lässt sich so empfindlich nachweisen. Es war zu untersuchen, ob eine Autofluoreszenz von Koenzymen am lebenden Augenhintergrund messbar ist.

**Methode.** Eine Stoffwechselprovokation erfolgte durch Atmung von 100% Sauerstoff. Die zeitaufgelöste Autofluoreszenz wurde in zeitkorrelierter Einzelphotonenzähltechnik detektiert. Das Abklingverhalten der Autofluoreszenz wurden mit einem biexponentiellen Modell angepasst. Zur Auswertung wurden Histogramme der Abkling-

zeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  in definierten Bereichen um Makula und Papille vor, während und nach Sauerstoffatmung berechnet.

**Ergebnisse.** In der Makula korrespondieren die Abklingzeiten mit Literaturwerten von FAD und NADH. In der Papille fluoresziert zusätzlich Bindegewebe.

**Schlussfolgerung.** Die Änderungen in den Histogrammen zeigen, dass Provokationen des Stoffwechsels mittels der zeitaufgelösten Autofluoreszenz nachweisbar sind. Diese Methode eröffnet eine Beurteilung des Stoffwechsels auf zellulärem Niveau als neue diagnostische Möglichkeit.

#### Schlüsselwörter

Autofluoreszenz · Abklingzeit · Koenzym · Auge · Sauerstoffatmung

### Alterations in the autofluorescence decay time in the fundus after oxygen provocation

#### Abstract

**Background.** Alterations in the equilibrium of redox pairs of co-enzymes give information about the metabolic state in the citric acid cycle as well as in the respiratory chain. Fluorescence properties are different between the reduced and oxidised states of co-enzymes so that a change of the oxygen partial pressure can be sensitively detected in the tissue. Therefore, it was investigated whether the autofluorescence of co-enzymes is detectable in the living fundus.

**Method.** The provocation of metabolism was realised by inspiration of 100% oxygen. The time-resolved autofluorescence was detected by a single photon counting technique. The decay behaviour of autofluorescence was approximated by a bi-exponential model. For evaluation of the results, histograms of decay times  $\tau_1$  and  $\tau_2$  were

calculated in defined ranges around the macula and optic disc before, during, and after inhaling oxygen.

**Results.** The calculated decay times corresponded in the macula to the decay times of FAD and NADH<sup>+</sup> given in the literature. Connective tissue in the optic disc also showed fluorescence.

**Conclusions.** Changes in the histograms of decay rates demonstrate that provocation of metabolism is detectable by measurement of time-resolved autofluorescence. This method reveals the evaluation of metabolism at the cellular level as a new diagnostic possibility.

#### Keywords

Autofluorescence · Decay rate · Co-enzyme · Eye · Oxygen inspiration

chroitischen Spiegels (DT Blue, Linos, Göttingen) das Reflexionslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt. Ein zusätzlicher Blockfilter GG 475 (Linos, Göttingen) gewährleistet eine gesamte Unterdrückung des Reflexionslichtes im Fluoreszenzstrahlengang um den Faktor  $10^8$ . Das Reflexionslicht wird mit dem im CLSO original vorhandenen Photomultiplier und das Fluoreszenzlicht mit einem schnellen Multikanalphotomultiplier (MCP-PMT) (Hamamatsu-R3809U-50) detektiert. Das vom CLSO nach Videonorm CCIR gelieferte Reflexionsbild wird von einem Frame Grabber (B506 Inspecta-4A9, Mikrotron, Eching) aufgenommen. Die Größe von 8 MB des internen Speichers der verwendeten Karte SPC 730 für das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (Becker und Hickl/Berlin) beschränkt die örtliche Auflösung in Verbindung mit der Anzahl der Zeitkanäle zwischen 2 Anregungspulsen. Bisher hat sich eine örtliche Auflösung von  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  in einem  $20^\circ$  Fundusfeld bewährt. Die Zeit von 25 ns zwischen 2 Anregungspulsen wird gegenwärtig in 1.024 Zeitkanäle unterteilt, sodass eine Zeitauflösung von 25 ps erreichbar ist. Die Messzeit kann angepasst werden. Bisher wurden 0,5 s oder 1 s Messzeit gewählt. Die während dieser Zeit detektierten Einzelreflexionsbilder werden nach Auswahl automatisch überlagert. Die dabei berechneten Verschiebevektoren werden auf die schwachen Fluoreszenzbilder übertragen, sodass eine ausreichende Zahl von Photonen akkumuliert werden kann, die für eine biexponentielle Approximation des Abklingverhaltens erforderlich ist.

#### Methode zur Auswertung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz

Zur Auswertung der gemessenen Bilder der zeitaufgelösten Autofluoreszenz steht nun das Programm SPCImage von Becker und Hickl/Berlin zur Verfügung. Wie in [13] gezeigt, hat sich die Darstellung eines Histogramms der Fluoreszenzabklingzeiten für die einzelnen Bildpunkte innerhalb interessierender Bereiche (ROI) bewährt. Dazu wird die nach Pulsanregung gemessene zeitabhängige Autofluoreszenz für jeden einzelnen Bildpunkt innerhalb des interessierenden Be-

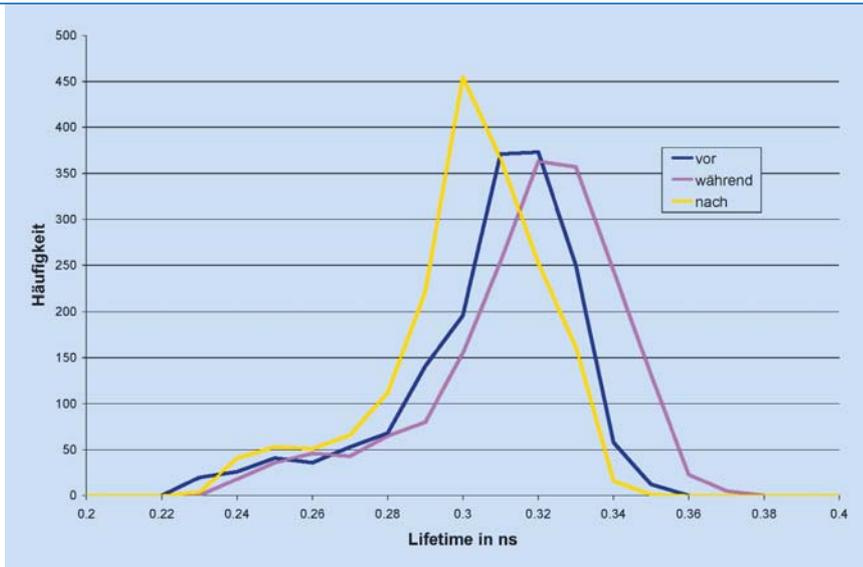


Abb. 3 ▲ Histogramm der Lebensdauer  $\tau_1$  in identischen Bereichen des makulären Gebietes vor, während und nach Sauerstoffatmung. Durch den Einfluss der Sauerstoffatmung tritt eine Verschiebung der Verteilung von  $\tau_1$  zu längeren Lebensdauern auf. Nach Wiederatmung von Luft ist die Verteilung zu kürzeren Lebensdauern verschoben

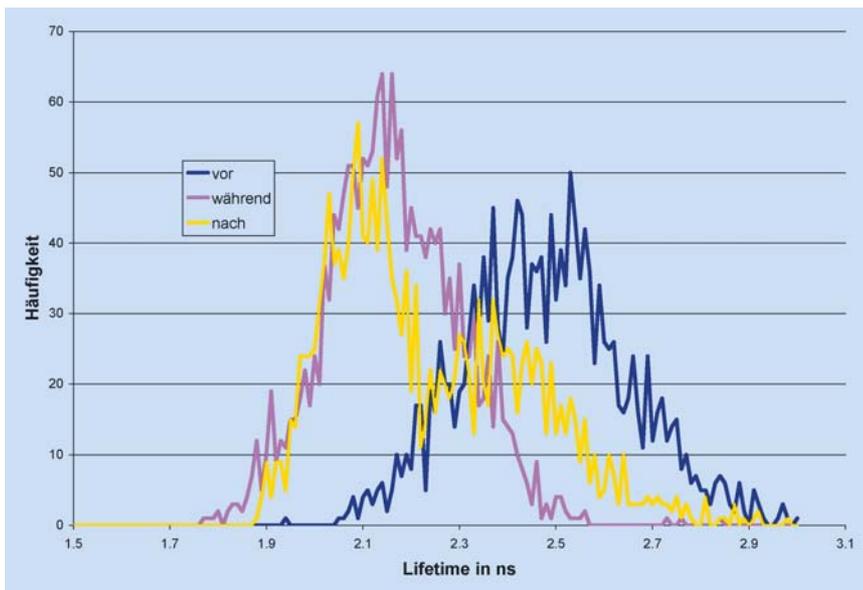


Abb. 4 ▲ Histogramm der Lebensdauer  $\tau_2$  in identischen Bereichen des makulären Gebietes vor, während und nach Sauerstoffatmung. Das Häufigkeitsmaximum der Fluoreszenzabklingzeiten ist bei Sauerstoffatmung von ca. 2,5 ns zu kürzeren Werten bei ca. 2,1 ns verschoben. Nach Wiederatmung von Luft ist diese Verteilung mit einem Maximum bei ca. 2 ns und einem weiteren bei 2,4 ns

reiches entsprechend Gleichung (1) angepasst. Für jeden Bildpunkt werden so die Abklingzeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  berechnet. Je mehr Bildpunkte die gleiche Abklingzeit besitzen, desto stärker tritt in dem Histogramm der Abklingzeiten ein Maximum hervor. Selbst, wenn in der ROI einzelne extrem stark fluoreszierende Bildpunkte vorhanden sind, werden diese nur nach der Häufigkeit der berechneten Abkling-

zeit und nicht nach der Fluoreszenzintensität im Histogramm bewertet. Für häufig vorkommende Fluorophore entstehen Maxima bei deren charakteristischen Abklingzeiten. Werden für die Ausgabe spezielle Zeitbereiche entsprechend dieser Häufigkeitsverteilung ausgewählt, so können Bilder der örtlichen Verteilung der Fluoreszenzabklingzeiten farblich kodiert angegeben werden.

## Stoffwechselprovokation durch Sauerstoffatmung

Um nachzuweisen, dass Koenzyme am Fundus mittels zeitaufgelöster Autofluoreszenz nachweisbar sind, wurde eine Provokation des Stoffwechsels durch Beatmung mit reinem Sauerstoff vorgenommen. Hierdurch sollte erreicht werden, dass Änderungen in den Gleichgewichten der Redoxpaare  $\text{NAD-NADH+H}^+$  sowie  $\text{FAD-FADH}_2$  auftreten. Die Messungen erfolgten an 2 Probanden, die 22 und 24 Jahre alt waren. Zur Bestimmung des Einflusses der Sauerstoffprovokation wurde zunächst je eine Bezugsmessung in der Makula und im Bereich der Papille vorgenommen. Nach 6 min Sauerstoffatmung begannen die Messungen der zeitaufgelösten Autofluoreszenz nacheinander an beiden Messorten. Während der Messung wurde die Sauerstoffbeatmung beibehalten. Anschließend wurde wieder normale Luft geatmet. Nach 30 min erfolgten die Kontrollmessungen. Es wurden so viele Teilmessungen vorgenommen, bis etwa 1.000 Photonen/Bildpunkt im Maximum erreicht werden konnten.

Für jeden Bildpunkt wurde eine biexponentielle Anpassung der zeitabhängig detektierten Fluoreszenzphotonen mit einer Modellfunktion entsprechend Gleichung (1) vorgenommen. **Abbildung 1** zeigt eine derartige Anpassung.

Die Anpassungsparameter können für jeden Bildpunkt berechnet werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Abklingzeiten  $\tau_1$  und die Amplituden  $\alpha_i$  für jede lokale Veränderung zu bestimmen. Ein guter Überblick über die in einem Bild auftretenden Abklingzeiten wird durch deren farbliche Kodierung erreicht. Als quantitatives Maß für die Bewertung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz wurde die Häufigkeitsverteilung der Abklingzeiten in definierten Fundusbereichen gleicher Größe herangezogen. Bei dieser Berechnung entstehen Maxima, die in Vergleichsmessungen einzelnen Fluorophoren wie Koenzymen, Stoffwechselendprodukten (Lipofuszin) oder Bindegeweben zuzuordnen sind.

## Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass Änderungen der zeitaufgelösten Autofluoreszenz

nach Provokation des Stoffwechsels durch Atmung von 100% Sauerstoff nachweisbar sind.

Die **Abb. 2** zeigt Bilder der Abklingzeit  $\tau_1$  der Autofluoreszenz im Ausgangszustand (s. **Abb. 2a**), nach 6 min Sauerstoffatmung (s. **Abb. 2b**) und nach 30 min Luftatmung (s. **Abb. 2c**) in farblicher Kodierung für den Bereich der Makula. Die kürzesten Abklingzeiten (rot) von 250 ps treten im Bereich der Fovea auf. Zur Peripherie hin steigt die Abklingzeit  $\tau_1$  bis 350 ps an. Während Sauerstoffatmung schnürt sich der grüne Bereich, der Abklingzeiten um 300 ps entspricht, ein, und der blaue Bereich von Abklingzeiten um 350 ps dehnt sich aus. Nach Wiederatmen von Luft dominieren um die Makula wieder die gelben und grünen Farbbereiche der kürzeren Abklingzeiten. Der Anteil der längeren Abklingzeiten bis 350 ps ist dann wieder deutlich verringert.

Zur mehr quantitativen Auswertung des Einflusses der Sauerstoffatmung wurde die Häufigkeit der Fluoreszenzlebensdauer in identischen Bereichen um die Fovea aus den Bildern der Fluoreszenzlebensdauer vor, während und nach Sauerstoffbeatmung bestimmt. Die **Abb. 3** zeigt das Histogramm der Lebensdauer  $\tau_1$  aus dem Bereich der Makula. Durch den Einfluss der Sauerstoffatmung tritt eine Verschiebung der Häufigkeitsverteilung von  $\tau_1$  zu längeren Abklingzeiten auf. Nach Wiederatmung von Luft ist die Verteilung zu kürzeren Lebensdauern verschoben.

Während die Lebensdauer  $\tau_1$  innerhalb eines kleinen Bereichs von  $0,3 \pm 0,16$  ns berechnet wurde, lag die Lebensdauer  $\tau_2$  in einem 10fach größeren Bereich zwischen 1,5 und 3 ns. **Abbildung 4** zeigt das Histogramm der Lebensdauer  $\tau_2$  vor, während und nach Sauerstoffatmung. Im Gegensatz zu den Änderungen in der Häufigkeitsverteilung von  $\tau_1$  verschob sich das Maximum der  $\tau_2$ -Verteilung durch die Sauerstoffatmung von 2,5 ns zu kürzeren Lebensdauern bei 2,1 ns. Nach Wiederatmung von Raumluft blieb das Maximum der  $\tau_2$ -Verteilung während der Untersuchungszeit bei ca. 2,1 ns bestehen, die Verteilung verbreiterte sich jedoch wieder zu längeren Abklingzeiten hin.

Der Einfluss der Sauerstoffatmung auf die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_1$  in Bildern

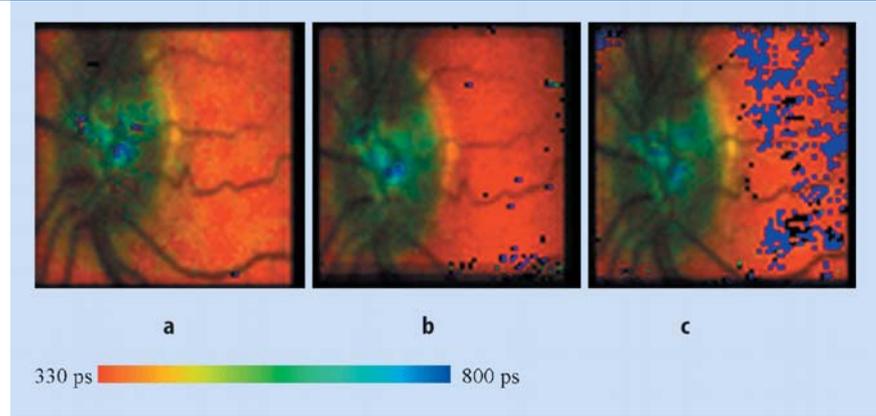


Abb. 5a–c ▲ Bilder der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_1$  ( $0,330 \text{ ns} < \tau_1 < 0,8 \text{ ns}$ ) im papillären Bereich. Anregung mit Laserpulsen der Dauer 100 ps (FWHM) und der Wellenlänge  $\lambda = 446 \text{ nm}$ . Die Fluoreszenz wurde im Bereich  $475 \text{ nm} < \lambda_f < 700 \text{ nm}$  detektiert. a Ausgangsbild vor Sauerstoffatmung, b während Atmung von 100% Sauerstoff nach mindestens 6 min, c nach 30 min Wiederatmen von Luft. Die längsten Abklingzeiten von 0,8 ns treten in der Papille auf. Nach Wiederatmen von Luft sind auch temporal der Papille Abklingzeiten der Autofluoreszenz bis 0,8 ns nachweisbar

aus dem Bereich der Papille vor, während und nach Sauerstoffatmung ist in **Abb. 5** dargestellt. Die Abklingzeit  $\tau_1$  lag hier im Bereich zwischen 330 ps und 800 ps. Sie war damit wesentlich länger als im makulären Bereich. Vor Sauerstoffbeatmung traten die längsten Abklingzeiten von 800 ps im Bereich der Papille auf. Die schwachen gelben Strukturen um die temporalen Gefäße waren während und nach Sauerstoffatmung nicht mehr erkennbar. Stattdessen traten bei Sauerstoffatmung im papillomakulären Bündel einzelne kleine Bereiche mit einer Abklingzeit  $\tau_1$  von ca. 800 ps hervor, die sich nach Wiederatmung von Luft zu zusammenhängenden Bereichen erweiterten.

Für die Darstellung des Histogramms der Fluoreszenzlebensdauern wurde aus diesen Bildern nur die Papille ausgewählt. **Abbildung 6** zeigt die Häufigkeitsverteilung der Lebensdauer  $\tau_1$  vor, während und nach Atmung von Sauerstoff. Im Gegensatz zu dem Lebensdauerbereich für  $\tau_1$  im makulärem Gebiet ( $0,22 \text{ ns} < \tau_1 < 0,38 \text{ ns}$ ) wurden in der Papille Lebensdauern  $\tau_1$  zwischen ca.  $0,33 \text{ ns}$  und  $0,8 \text{ ns}$  berechnet. Obwohl in der Papille in den Bildern der **Abb. 5** keine deutlichen Veränderungen in der farblichen Kodierung der Abklingzeit  $\tau_1$  erkennbar waren, zeigte die Häufigkeitsverteilung der Abklingzeit eine Verschiebung des Häufigkeitsmaximums von 420 ps vor Sauerstoffprovokation zu 470 ps während Sauerstoffatmung, die sich nach Wiederatmung von Luft weiter zu ca.

500 ps verschob. Durch die Sauerstoffprovokation veränderte sich die Form der Häufigkeitsverteilung von  $\tau_1$ .

Der Einfluss der Sauerstoffatmung auf die Häufigkeitsverteilung der Lebensdauer  $\tau_2$  in der Papille ist in **Abb. 7** angegeben. Das Histogramm für  $\tau_2$  überstrich von ca. 2,5 ns bis ca. 4,5 ns einen wesentlich größeren Wertebereich als für  $\tau_1$  (ca. 0,35 ns bis ca. 0,8 ns). Im Vergleich zum Wertebereich des Histogramms für  $\tau_2$  in der Makula ( $1,7 \text{ ns} < \tau_2 < 3 \text{ ns}$ ) wurden für  $\tau_2$  in der Papille längere Abklingzeiten berechnet, und der Wertebereich war auch deutlich ausgedehnter. Durch den Einfluss der Sauerstoffatmung trat eine Verschiebung des Häufigkeitsmaximums von ca. 3,2 ns zu 3,6 ns auf. Nach Wiederatmung von Luft verschob sich dieses Maximum wieder zu kürzeren Lebensdauern bei ca. 3,4 ns.

## Diskussion

Durch die Provokation des Stoffwechsels mittels Atmung von 100% Sauerstoff waren Veränderungen der Abklingzeit der Fundusautofluoreszenz nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit Veränderungen in den Redoxpaaren von Koenzymen messtechnisch am lebenden Auge nachweisbar sind. Die exakte Zuordnung der Abklingzeiten zu einzelnen Fluorophoren ist in weiteren detaillierten Untersuchungen vorzunehmen. Ein einfacher Vergleich mit Literaturwerten ist begrenzt. Hierzu sind

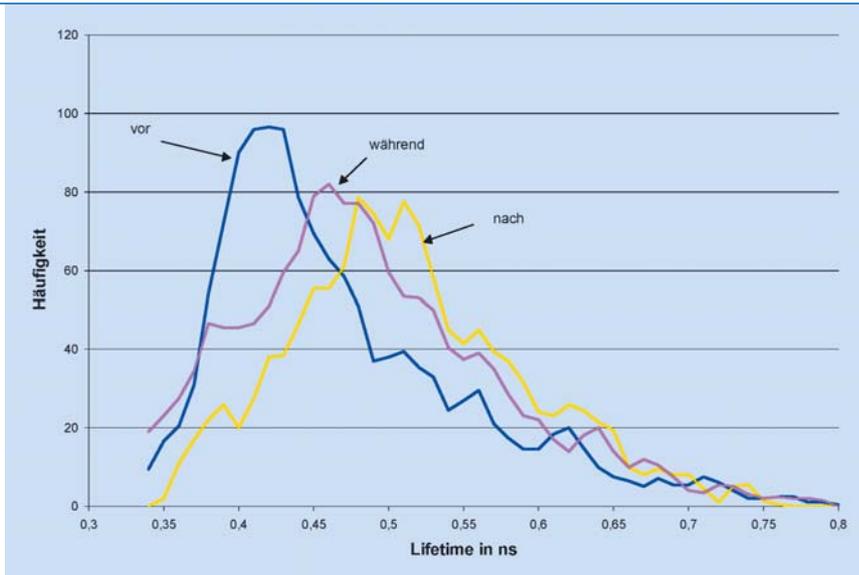


Abb. 6 ▲ Histogramm der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_1$  in der Papille vor, während und nach Sauerstoffatmung. Die Kurven wurden durch gleitende Mittelwertbildung aus 2 Messwerten geglättet. Das Maximum der häufigsten Lebensdauer  $\tau_1$  verschiebt sich bei Sauerstoffatmung von ca. 0,42 ns zu ca. 0,47 ns. Nach Ende der Sauerstoffbeatmung wurden noch längere Abklingzeiten um ca. 0,5 ns am häufigsten berechnet

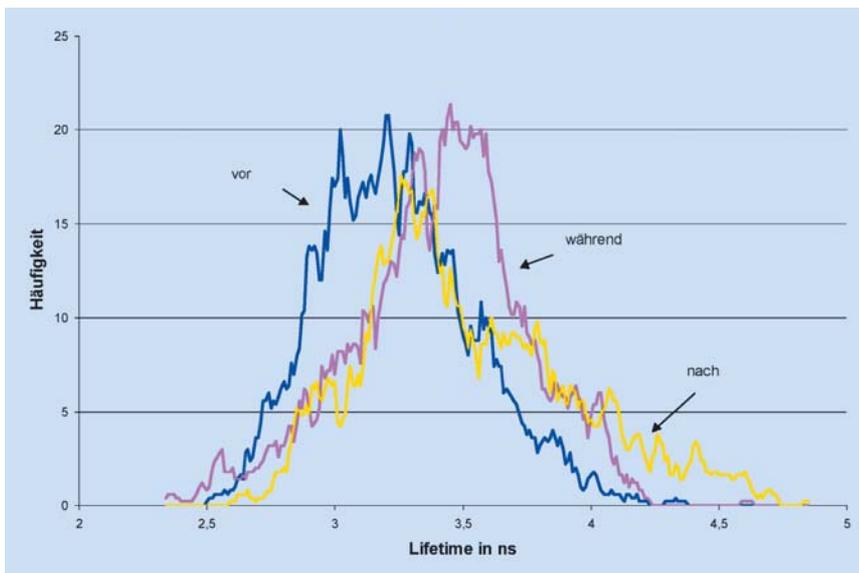


Abb. 7 ▲ Histogramm der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_2$  in der Papille vor, während und nach Sauerstoffatmung. Die Kurven wurden durch gleitende Mittelwertbildung aus 5 Messwerten geglättet. Das Maximum der häufigsten Lebensdauer  $\tau_2$  verschiebt sich bei Sauerstoffbeatmung von ca. 3,2 ns zu ca. 3,5 ns. Nach Ende der Sauerstoffbeatmung ist das Häufigkeitsmaximum bei ca. 3,3 ns, jedoch werden auch Lebensdauern bis zu 4,8 ns häufiger berechnet

Daten erforderlich, die wie im vorliegenden Falle, in biexponentieller Approximation des Abklingverhaltens reiner Substanzen gewonnen wurden. Da weiterhin die Abklingzeiten vom Lösungsmittel, vom pH-Wert und von der Viskosität der Einbettungsmatrix abhängen, sind diese Parameter bei Vergleichsmessungen mög-

lichst gut an die natürlichen Bedingungen anzupassen. Andererseits besteht gerade durch diese Abhängigkeiten die Möglichkeit, auch lokale Informationen z. B. über den pH-Wert zu gewinnen.

Es ist interessant, dass sich bei den vorgestellten Messungen an einer jungen augengesunden Normalperson die Histo-

grammveränderungen der Abklingzeiten zwischen Makula und Papille deutlich unterschieden. In der Makula wurden die Abklingzeit  $\tau_1$  zwischen 0,22 ns und 0,38 ns, in der Papille jedoch zwischen 0,35 ns und 0,8 ns berechnet. Während sich die am häufigsten berechnete Abklingzeit  $\tau_1$  sowohl in der Makula, als auch in der Papille bei Sauerstoffatmung zu größeren Werten verschob, war sie nach Wiederatmung von Luft in der Makula deutlich kürzer als vor Beginn der Sauerstoffprovokation. Im Gegensatz dazu verschob sich die am häufigsten berechnete Abklingzeit  $\tau_1$  in der Papille auch nach Wiederatmung von Luft noch zu längeren Abklingzeiten.

Das Histogramm der Abklingzeit  $\tau_2$  wurde für Makula und Papille ebenfalls unterschiedlich durch Sauerstoffatmung beeinflusst. Im Bereich der Makula wurden Abklingzeiten  $\tau_2$  zwischen 1,7 ns und 3 ns bestimmt. In der Papille wurden ebenso wie für  $\tau_1$  deutlich längere Abklingzeiten ermittelt ( $2,5 \text{ ns} < \tau_2 < 4,8 \text{ ns}$ ). Im Gegensatz zu der Veränderung des Histogramms der Abklingzeit  $\tau_1$  durch Sauerstoffatmung, bei der die häufigste Abklingzeit sowohl in der Makula als auch in der Papille zu längeren Zeiten verschoben war, ergab sich für die Abklingzeit  $\tau_2$  eine unterschiedliche Beeinflussung in Makula und in Papille. Während in der Makula die häufigste Abklingzeit  $\tau_2$  von 2,5 ns zu 2,1 ns bei Sauerstoffatmung verschoben war und nach Wiederatmung von Luft zu einer bimodalen Verteilung mit einem ersten Maximum bei 2,1 ns und einem 2. Maximum bei 2,4 ns überging, stieg die häufigste Abklingzeit  $\tau_2$  in der Papille vom Ausgangszustand bei 3,2 ns zu 3,5 ns während Sauerstoffatmung an. Nach Wiederatmung von Luft verringerte sich die häufigste Abklingzeit  $\tau_2$  mit 3,4 ns wieder teilweise in Richtung zum Ausgangswert. Allerdings wurden Abklingzeiten zwischen 4,2 ns und 4,8 ns häufiger als in der Ausgangsmessung sowie während der Sauerstoffatmung berechnet.

Für die unterschiedliche Streuung der Verteilungen von  $\tau_1$  und  $\tau_2$  kann unter messtechnischem Aspekt folgende Erklärung gegeben werden. Die Abklingzeit  $\tau_2$  wird aus einer wesentlich geringeren Photonenzahl bestimmt, als  $\tau_1$ . Je kleiner die Zahl der Photonen ist, die zur Berechnung

der Abklingzeit zur Verfügung steht, desto unsicherer ist der berechnete Wert der Abklingzeit. Somit kann im Histogramm von  $\tau_2$  bei einer großen Anzahl der untersuchten Bildpunkte auch eine große Streuung der Abklingzeit berechnet werden.

Für die Interpretation der Veränderung in den Histogrammen nach Sauerstoffprovokation sind folgende Aspekte zu beachten. Die Fluoreszenz der Koenzyme ist primär an das Vorhandensein von Mitochondrien gebunden. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der hohen Rezeptordichte in der Makula ein höherer Anteil der gesamten Fluoreszenz durch die Koenzyme bestimmt wird als in der Papille. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der Organismus ein aktives System ist und die von außen einwirkende Störung in Form der Sauerstoffprovokation z. B. durch Reduktion des Blutvolumendurchflusses ausregelt, um das Angebot an Sauerstoff konstant zu halten.

Aus diesem Grunde sind die detektierten Veränderungen die Regelabweichungen, die zu bestimmten Zeitpunkten nach Provokation noch vorhandenen sind. Das bedeutet, die unterschiedlichen Reaktionen von Makula und von Papille können auch durch die um mehrere Minuten auseinander liegenden Messzeitpunkte bedingt sein.

Trotz dieser Einflüsse ist festzustellen, dass durch Sauerstoffatmung Veränderungen in der zeitaufgelösten Autofluoreszenz nachweisbar sind. In der Makula ist die erste Zeitkonstante  $\tau_1$ , die nach Sauerstoffprovokation im Bereich um 0,3 ns schwankt, mit großer Wahrscheinlichkeit durch die kurze Komponente von FAD [12] wahrscheinlich auch noch durch die Abklingzeit von freiem NADH bei 0,4 ns [14] bedingt. Auch die Abklingzeit  $\tau_2$  um 2,4 ns spricht für den Nachweis von FAD. Für die Verschiebung der Abklingzeit  $\tau_2$  in der Makula nach kürzeren Werten während Sauerstoffatmung ist der Übergang von proteingebundenem NADH ( $\tau=1,5$  ns) [14] zu NAD ( $\tau=1,27$  ns) [1] nicht auszuschließen. In der Papille sind beide Abklingzeiten länger als in der Makula. Dies dürfte durch die Überlagerung mit der Fluoreszenz von Bindegewebe (Kollagen:  $\tau_1=0,78$  ns,  $\alpha_1=24,8\%$ ,  $\tau_2=4,99$  ns,  $\alpha_2=45,5$  ns,  $\tau_3=29,7$  ns,  $\alpha_3=29,7\%$ ) [1] bedingt sein, wobei die  $\alpha_i$  die relativen An-

teile der Fluoreszenzlebensdauern am gesamten Verlauf der dynamischen Autofluoreszenz sind. Auf die von verschiedenen Autoren gemessene Abklingzeit von Flavinmononucleotid (FMN) mit  $\tau=4,5$  ns [3] bzw.  $\tau=5,2$  ns [4] weisen die derzeitigen Ergebnisse nicht hin.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Atmung von 100% Sauerstoff zu Änderungen in der zeitaufgelösten Autofluoreszenz führt. Es ist nicht bekannt, dass sich die Fluoreszenzabklingzeit von Lipofuszin oder dessen Komponenten sowie von Bindegewebe durch den Einfluss von Sauerstoff ändern kann. Da aber andererseits bekannt ist, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von Redoxpaaren der Koenzyme (NADH+H<sup>+</sup>-NAD, FADH<sub>2</sub>-FAD) zwischen reduziertem und oxidiertem Zustand ändern, ist durch die Messungen der Nachweis für die Messbarkeit der Koenzyme am lebenden menschlichen Augenhintergrund erbracht. Damit ergibt sich die Möglichkeit, den Stoffwechsel auf zellulärem Niveau zu erfassen und früheste pathologische Veränderungen noch im reversiblen Stadium zu korrigieren.

### Fazit für die Praxis

Die Methode zur Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz eröffnet die Möglichkeit zur Erfassung von Veränderungen im zellulären Stoffwechsel, sodass die Hoffnung besteht, pathologische Entgleisungen z. B. bei AMD oder diabetischer Retinopathie am Augenhintergrund zu erkennen, bevor sich morphologische Veränderungen manifestiert haben.

### Korrespondierender Autor

Doz. Dr.-Ing. habil. D. Schweitzer

Augenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena,  
Bachstraße 18, 07740 Jena  
E-Mail: Dietrich.Schweitzer@med.uni-jena.de

### Literatur

- Anderson-Engels A, Johansson J, Svanberg K, Svanberg S (1991) Fluorescence imaging and point measurements of tissue: Applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue. *Photochem Photobiol* 53:807–814
- ANSI (2000) American National Standard for the safe use of Laser ANSI Z 136.1-2000. Orlando, Suite 128, 13501 Ingenuite Drive, FL 32826: Laser Institute of America

- Bernarding J, Napiwotzi A, Kronfeld HD (1996) Zeitaufgelöste Fluoreszenz endogener Metabolite als Nachweismethode zur Tumorfürerkennung. Teil 2: Flavine und Mischungen von Flavinen und Dinukleotiden. *Lasermethoden* 12:94–100
- Chance B (1976) Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria. *Circ Res [Suppl 1]*:131–138
- Koenig K, Schneckenburger H (1994) Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J Fluorescence* 4:17–40
- Lakowicz JR (1999) Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York Boston Dordrecht London Moscow
- Piston DW, Sandison DR, Webb WW (1992) Time-resolved fluorescence imaging and background rejection by two-photon excitation in laser scanning microscopy. *Proceedings of SPIE* 1640:379–389
- Pokorny J, Smith VC, Lutze M (1987) Aging of the human lens. *Appl Opt* 26:1437–1444
- Schweitzer D, Tröger G, Königsdörffer E, Klein S (1991) Multisubstananalyse: Nachweis von Änderungen der optischen Dichte in einzelnen Schichten des Augenhintergrundes. *Fortschr Ophthalmol* 88:554–561
- Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Thamm E (2000) Tau-mapping of the autofluorescence of the human ocular fundus. *Proceedings of SPIE* 4164:79–89
- Schweitzer D, Kolb A, Hammer M (2001) Autofluorescence lifetime measurements in images of the human ocular fundus. *Proceedings of SPIE* 4432:29–39
- Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Anders A (2002) Zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz – Ein Werkzeug zur Erfassung von Stoffwechselfvorgängen. *Ophthalmologie* 99:776–779
- Schweitzer D, Hammer M, Kolb A et al. (2002) Evaluation of time-resolved autofluorescence images of the human fundus. ARVO Poster 348
- Slavik J (1996) Fluorescence microscopy and fluorescence probes. Plenum Press, New York