

Deutsch L.<sup>1</sup>, Klemm M.<sup>2</sup>, Dawczynski J.<sup>3</sup>, Müller U.-A.<sup>4</sup>, Kloos C.<sup>4</sup>, Jentsch S.<sup>1</sup>, Hammer M.<sup>1</sup>, Schweitzer D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Augenklinik FSU Jena, Experimentelle Ophthalmologie, <sup>2</sup>Institut für Biomedizinische Technik und Informationsverarbeitung, TU Ilmenau, <sup>3</sup>Augenklinik der FSU Jena, <sup>4</sup>Innere Medizin III, FSU Jena, Endokrinologie

## Zielstellung

Können metabolische Veränderungen am Fundus detektiert werden, bevor funduskopisch eine diabetische Retinopathie diagnostiziert wird? Messungen der zeitaufgelösten Fundus-Autofluoreszenz ermöglichen eine Untersuchung des Metabolismus auf zellulärer Ebene. Ein „metabolisches Mapping“ der Retina könnte die patientenspezifische Therapie und individuelle Therapiekontrolle verbessern. Im Kernpunkt dieser Studie stand die Fragestellung, ob anhand von Parametern der Fluoreszenzlebensdauer eine Unterscheidung zwischen gesunden Probanden und Diabetes-Patienten ohne RD möglich ist.

## Methodik

**Probanden:** 44 Gesunde, 53 Diabetiker ohne RD, 18 Diabetiker mit milder/mäßiger NPDR (Beurteilung des Augenhintergrundes anhand von Farb-Fundusaufnahmen)

**Messtechnik:** modifiziertes Scanning-Laser-Ophthalmoskop (HRA2, Heidelberg Engineering) mit adaptierten ps-Puls laser (Anregungswellenlänge 448 nm, Pulsdauer 70 ps, Wiederholrate 80 MHz), Fluoreszenzdetektion über zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (SPC 150, Becker&Hickl) in zwei Spektralkanälen (K1: 490-560 nm, K2: 560-700 nm)

**Auswertung:** Fluoreszenzintensitätsabfall wurde mit 3-exponentiellen Modell angepasst, Ermittlung der Häufigkeit von Pixeln mit diskreten Werten der relativen Amplituden und Abklingzeiten in einem Bereich von 100 x 70 Pixeln gleicher Lokalisation

**Statistik:** aus individuellen Häufigkeitsverteilungen wurden Intervalle reduzierter oder gehäuft auftretender Abklingzeiten oder Amplituden ermittelt (Holm-Bonferroni-Algorithmus)

| Probanden             | n  | Alter (Jahre) | Diabetes-Dauer (Jahre) | HbA <sub>1c</sub> (%) | Glukose (mmol/l) | RR systol. (mmHg) | RR diastol. (mmHg) |
|-----------------------|----|---------------|------------------------|-----------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Gesunde               | 44 | 52,9 ± 19,2   | -                      | -                     | -                | 131,9 ± 10,9      | 78,7 ± 9,6         |
| Diabetiker (ohne RD)  | 53 | 55,3 ± 14,9   | 10,4 ± 7,2             | 8,0 ± 1,3             | 8,5 ± 2,2        | 138,7 ± 15,5      | 84,5 ± 11,5        |
| Diabetiker (frühe RD) | 18 | 61,4 ± 15,7   | 17,3 ± 10,9            | 7,6 ± 0,9             | 6,8 ± 1,3        | 138,4 ± 15,8      | 83,6 ± 6,2         |

Abb. 1: Internistische Angaben zu den Probanden

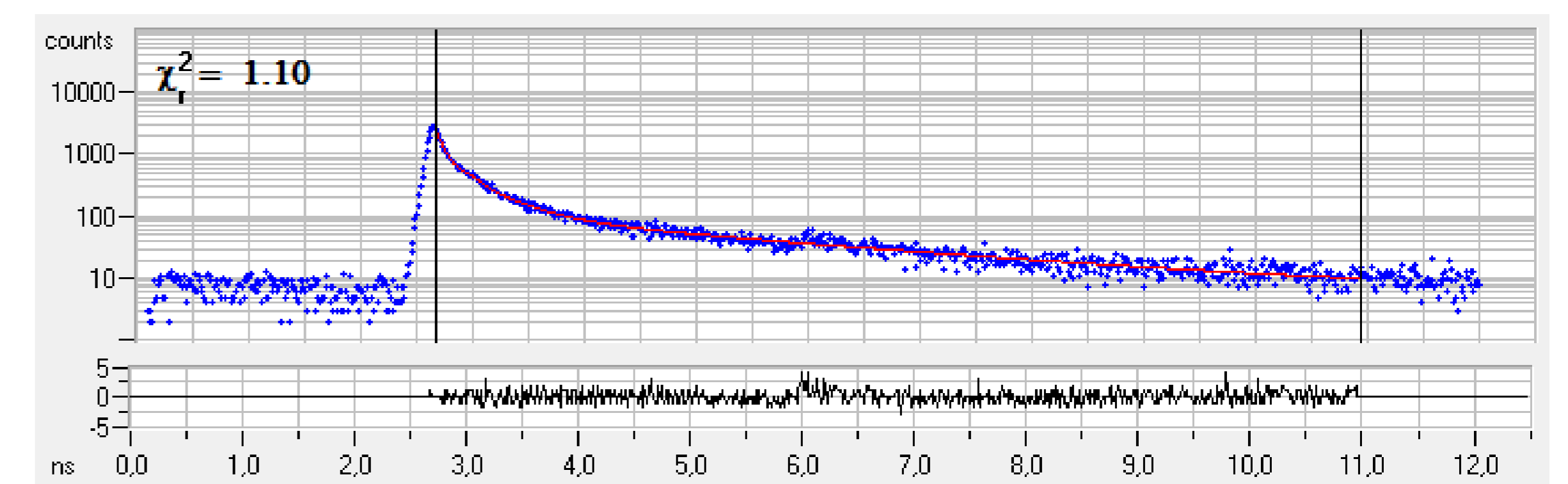


Abb. 4: Abklingkurve der Fluoreszenzintensität eines Bildpunktes mit triexponentiell angepasster Modellfunktion

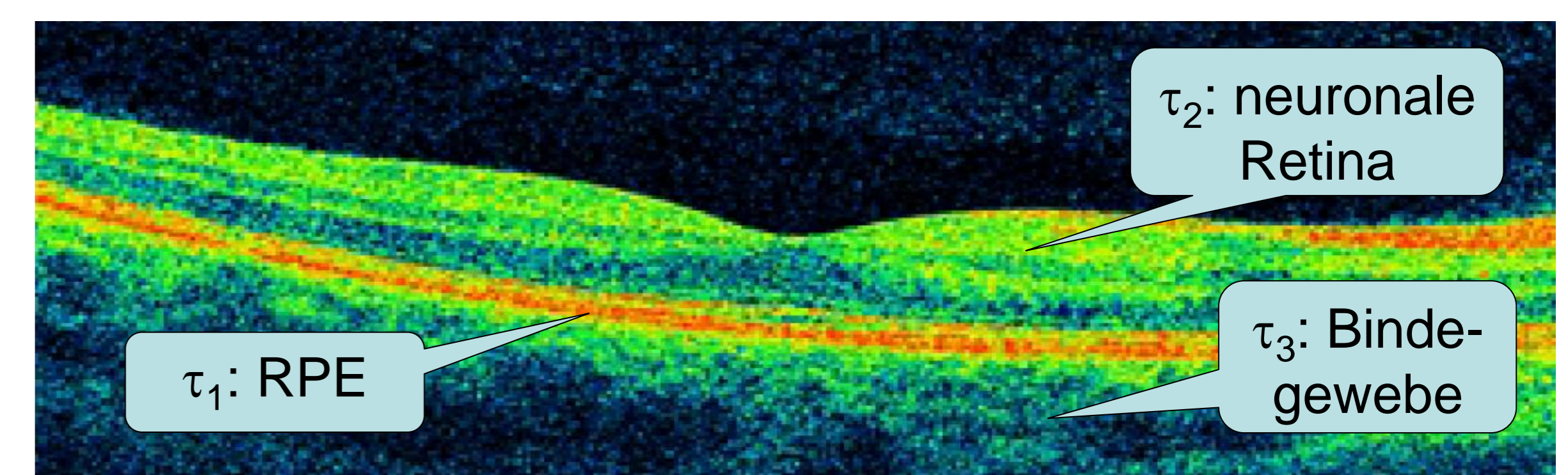


Abb. 5: Fluoreszenzursprung einzelner Komponenten der Modellfunktion

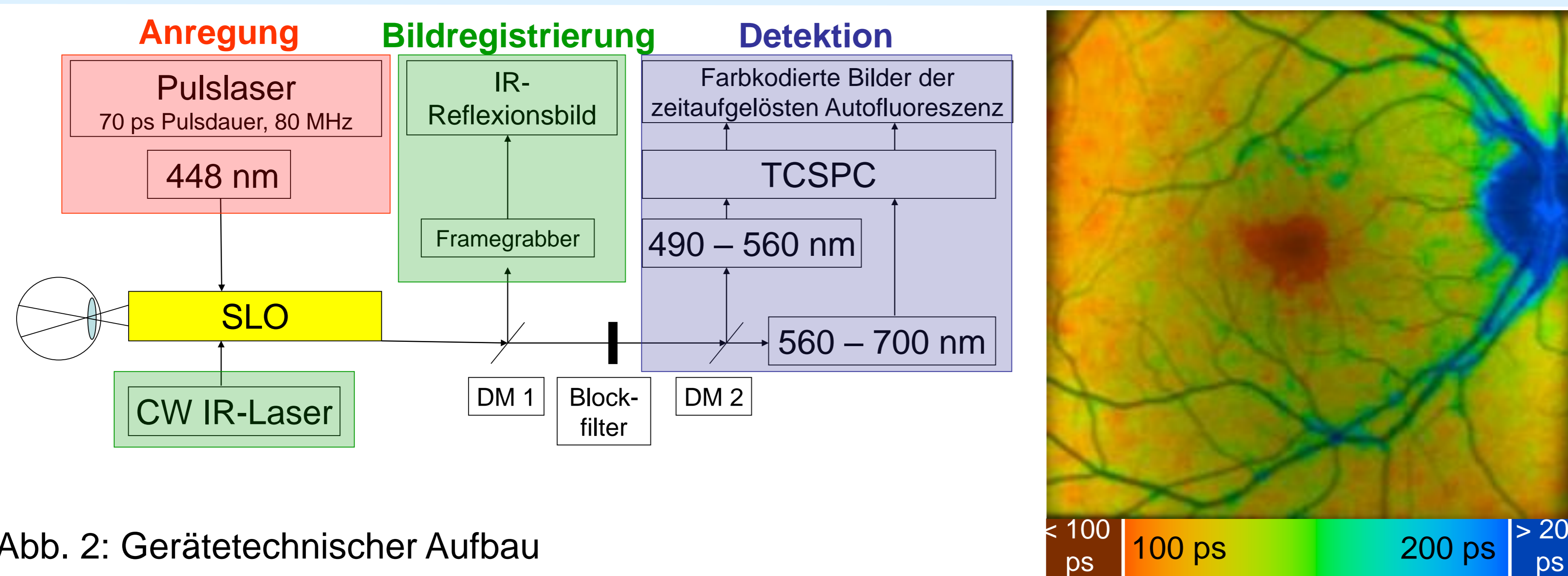


Abb. 2: Gerätetechnischer Aufbau

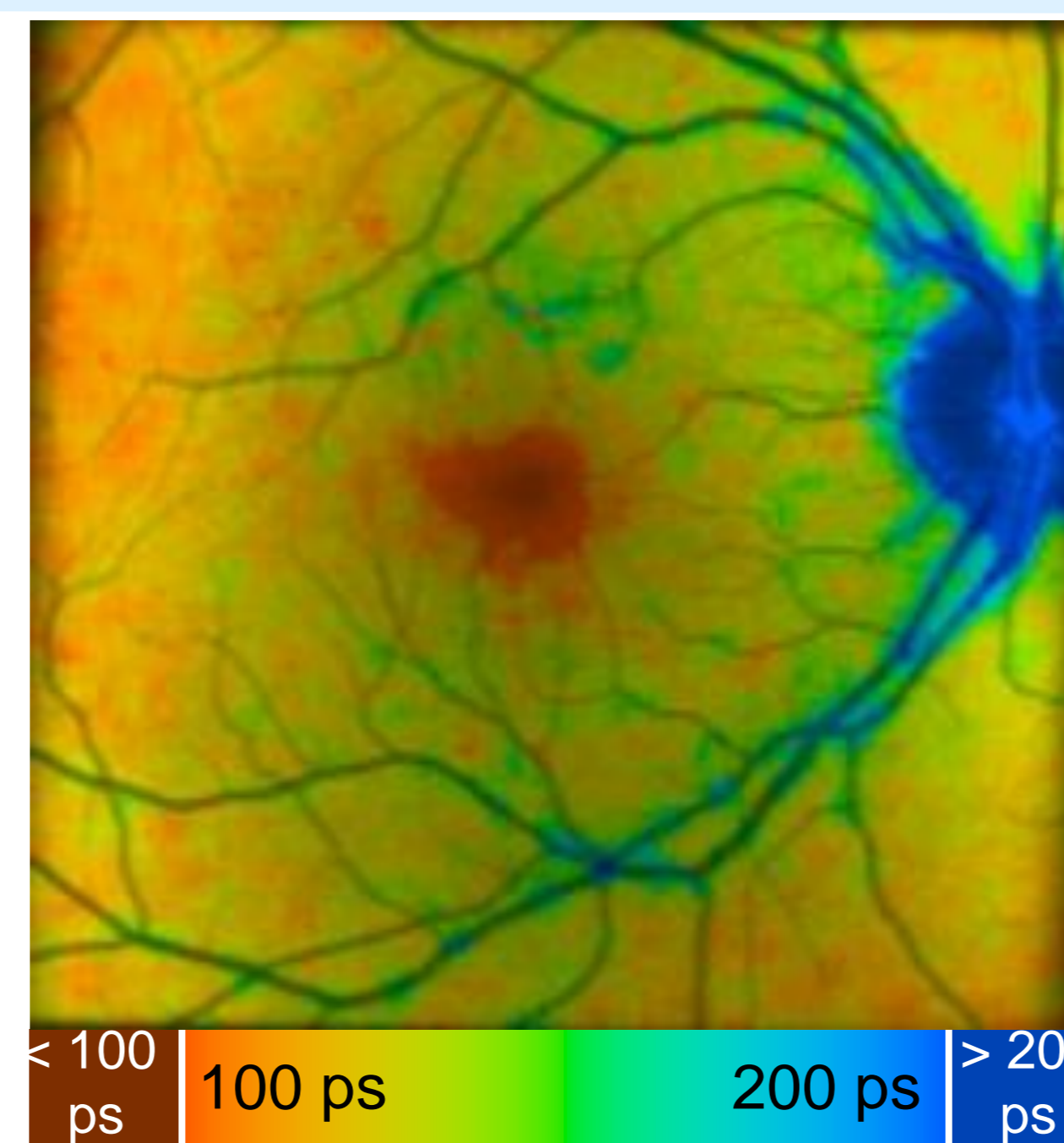
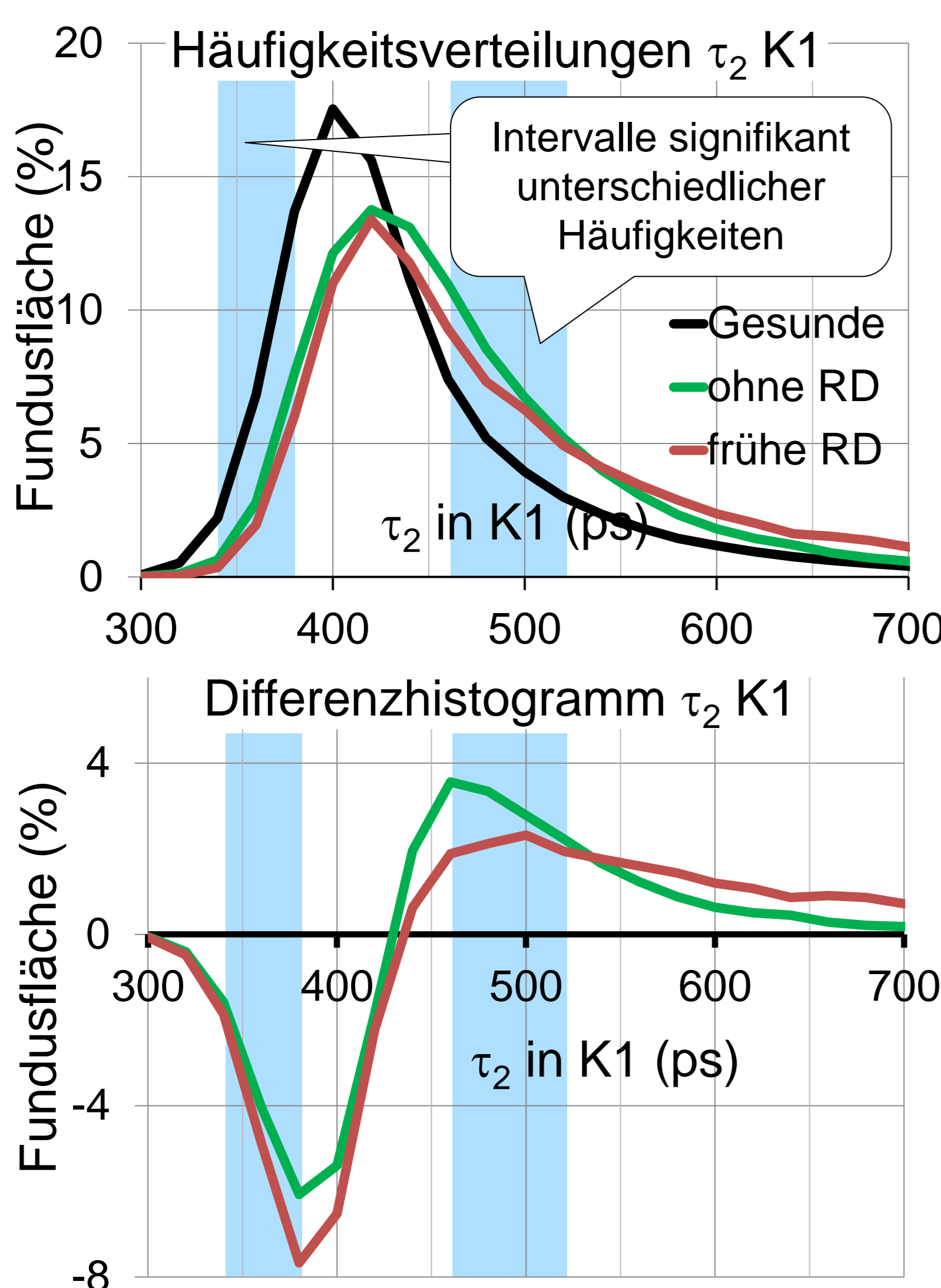


Abb. 3: Farbkodiertes Bild der mittleren Lebensdauer  $\tau_{mean}$



## Ergebnisse

Die Fundus-Fluoreszenzabklingzeiten der Diabetiker ohne RD waren in beiden Spektralkanälen im Vergleich zu Gesunden verlängert. Die beste Unterscheidung wurde durch die Abklingzeit  $\tau_2$  in K1 (490-560 nm) erreicht. Fluoreszenzlebensdauern zwischen 340 und 380 ps traten bei den Diabetikern seltener und zwischen 460 und 520 ps häufiger auf. Diabetiker ohne RD wurden mittels zeitaufgelöster Autofluoreszenz mit einer Sensitivität von 76% und Gesunde mit einer Spezifität von 71% erkannt. Die gemittelte Häufigkeitsverteilung von  $\tau_2$  in K1 der Diabetiker ohne RD war annähernd deckungsgleich mit der von Patienten mit früher RD.

Abb. 6: Häufigkeitsverteilungen von  $\tau_2$  in K1 eines Fundusausschnittes von gesunden Probanden und Diabetes-Patienten ohne bzw. mit früher RD

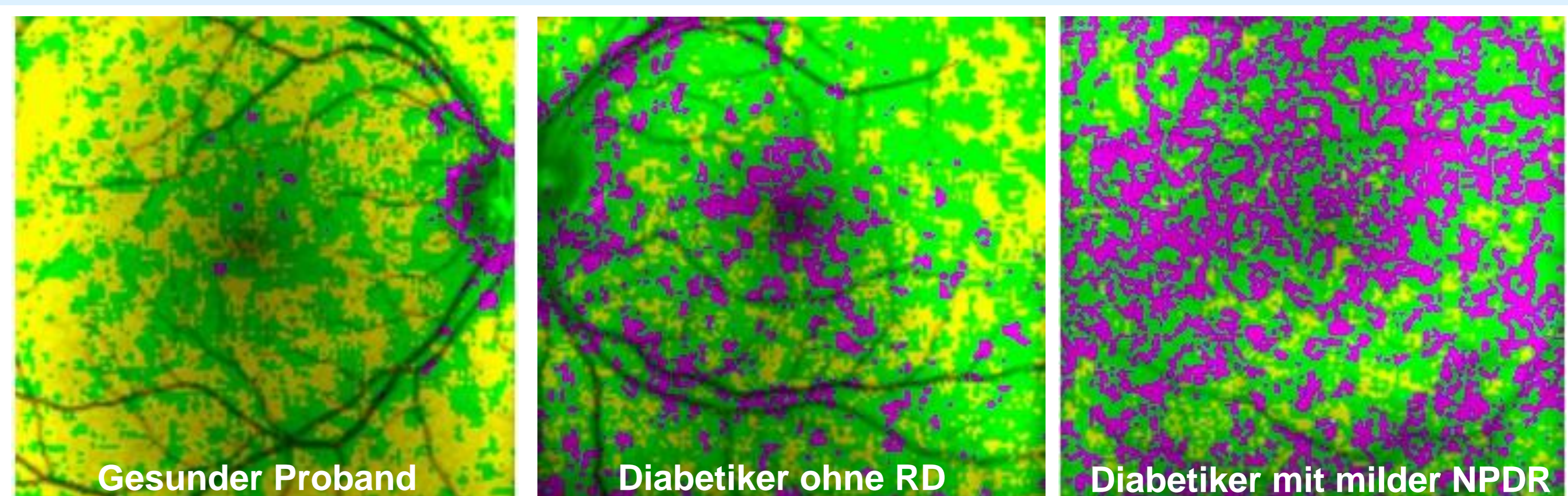


Abb. 7: Funktionelle Fundusbilder von  $\tau_2$  in K1  
Gelb: 340-380 ps  
Magenta: 460-520 ps

## Schlussfolgerung

Die Messung der zeitaufgelösten Fundus-Autofluoreszenz stellt eine neue Methode dar, Stoffwechselfathologien auf zellulärer Ebene in vivo zu detektieren. Bei Diabetes mellitus sind bereits Veränderungen messbar, obwohl keine strukturellen Schäden am Fundus feststellbar sind. Die Abklingzeit  $\tau_2$  in K1 (490-560 nm) ermöglichte die beste Unterscheidung zwischen Gesunden und Diabetikern ohne RD. Untersuchungen an präparierten Schweineaugen deuten darauf hin, dass  $\tau_2$  vor allem durch die neuronale Netzhaut bestimmt wird. Somit treten erste metabolische Veränderungen bei Diabetes im Reizleitungssystem der Retina auf. Das verringerte Auftreten der Abklingzeit 340-380 ps ist als ein Verlust an freiem NADH und das gehäufte Auftreten von Abklingzeiten größer 460 ps als ein Übergang zu protein-gebundenem NADH interpretierbar, was durch eine reduzierte zelluläre Atmung und einer verstärkt wirksamen Glykolyse bedingt sein könnte. In weiteren Studien muss die zeitaufgelöste Linsenfluoreszenz bzgl. akkumulierter nicht-enzymatischer Glykierungsprodukte bei Diabetes erforscht werden.

## Literaturnachweise

Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, Schweitzer F, Jentsch S, Birckner E, Becker W, Bergmann A. 2007. Towards metabolic mapping of the human retina. Microscopy research and technique, 70 (5):410-419.  
Peters S, Hammer M, Schweitzer D. 2011. Two-photon excited fluorescence microscopy application for ex vivo investigation of ocular fundus samples. In: So PTC und Beaufrepaire E. Advanced Microscopy Techniques II. Munich: SPIE/OSA ECBO, 8086(4):1-10.