

Spektrale Differenzierung in Eigenfluoreszenzbildern des Augenhintergrunds von Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration

Mit Hilfe der Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (SLO) gelang von Rückmann et al. 1995 erstmals die bildliche Darstellung der Autofluoreszenz des Augenhintergrunds [11]. Seither ist diese Technik zur Untersuchung einer Reihe von degenerativen Netzhauterkrankungen eingesetzt worden [6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 18]. Einen guten Überblick gab Holz [7]. Die Bedeutung der Untersuchungsmethode für die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) wird derzeit in der multizentrischen FAM-Studie untersucht. Gegenstand der Untersuchungen dieser Studie ist vornehmlich die Topographie der Fluoreszenz [8]. Daneben dürfte jedoch auch ihr chemisches Substrat sowohl für die Aufklärung der Ätiologie als auch für die Diagnostik der AMD von Belang sein. Delori [2] fand eine gute Übereinstimmung des in vivo gemessenen Emissionsspektrums der Fluoreszenz mit dem von Eldred und Katz [3] in vitro gemessenen Spektrum einer Komponente des aus Spenderaugen extrahierten Lipofusins. Diese wurde später als N-Retinylden-N-Retinyethanolamin (A2-E) identifiziert [4, 10]. Der Befund legte eine Identifikation der Fundusautofluoreszenz mit dem Lipofuszin nahe, die sich in der einschlägigen Literatur weitgehend durchgesetzt hat.

Allerdings sind auch Beobachtungen publiziert worden, die mit der Fluoreszenz des Lipofusins allein nicht zu erklären sind. So ist bereits 1985 von Teich

die Modifikation eines SLO zur Beobachtung der Fluoreszenz von Flavinadeninucleotid (FAD) am Augenhintergrund beschrieben worden [20]. Arend et al. [1] beobachteten neben dem Lipofuszin mit einem Emissionsmaximum bei der Wellenlänge 620 nm eine weitere, mit Drusen assoziierte Fluoreszenz bei 560 nm. In atrophischen Arealen fanden sie nach Anregung bei 470 nm weiterhin eine Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm, welches sie dem Kollagen zuordneten. Auch Solbach et al. [18] und Staudt et al. [19] diskutieren eine nicht mit dem Lipofuszin in Zusammenhang zu bringende Fluoreszenz von Drusen und anderen intra- und extrazellulären Kompartimenten. Von Rückmann et al. [15] werten eine erhöhte Autofluoreszenz auch als Zeichen eines aktiven Stoffwechsels im retinalen Pigmentepithel (RPE), wobei als chemisches Substrat der Fluoreszenz wiederum das Lipofuszin angenommen wird. Es akkumuliert bei erhöhter Phagozytoserate der Rezeptoraußensegmente vermehrt in den Lysosomen des RPE. Dem Ansatz von Teich [20] folgend wäre aber auch eine Änderung der Fluoreszenz der im Zitratzyklus und in der Atmungskette als Coenzyme wirkenden Flavine in Abhängigkeit von ihrem Redoxzustand als Indikator für die metabolische Aktivität der Zellen zu diskutieren. Schweitzer et al. [17] stellten eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer am Fundus von Probanden ohne oku-

läre Pathologien bei Atmung von reinem Sauerstoff fest. Dieser Befund wurde von den Autoren als möglicher Hinweis auf FAD als Fluorophor gewertet. Darüber hinaus wäre die Möglichkeit der Beobachtung der Fluoreszenz von „Advanced Glycation End Products“ (AGEs) zu diskutieren, welche bei der AMD ebenfalls in RPE-Zellen und Drusen akkumulieren [9, 16].

In der vorliegenden Arbeit werden wir zeigen, dass mit einfachen Mitteln zu gewinnende spektral selektive Autofluoreszenzaufnahmen Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Fluorophore liefern können. Des Weiteren werden Messungen der Fluoreszenzspektren der potenziellen Fundusfluorophore Lipofuszin, A2-E, FAD, NADH₂ und AGEs präsentiert und diskutiert.

Material und Methoden

Die Autofluoreszenz des Augenhintergrunds in vivo ist mit der Funduskamera FF450 (Carl Zeiss Jena GmbH) aufgezeichnet worden. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte im Spektralbereich von 475 nm bis 515 nm. Zur Blockung des Anregungslichts diente ein Filter mit einem Transmissionsbereich von 530 nm bis 675 nm. Wichtig war dabei eine ausreichend hohe Kantensteilheit der Filter,

In Teilen vorgetragen auf der 101. Jahrestagung der DOG.

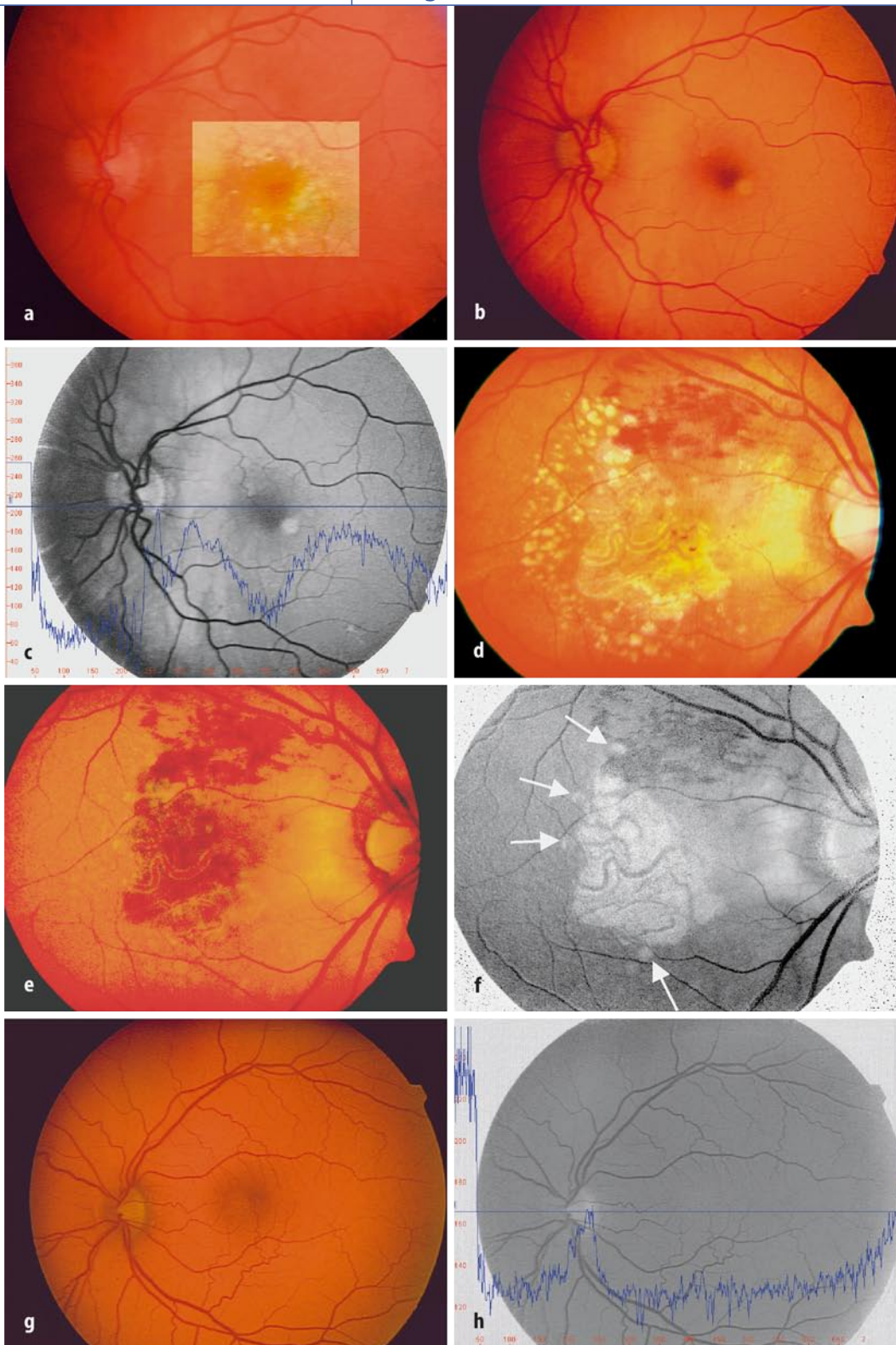


Abb. 1a–h ◀ **Fotografien und Autofluoreszenzaufnahmen des Fundus**
 a Farbaufnahme 78-jährige Patientin mit nichtexsudativer AMD. b Autofluoreszenzaufnahme zu Abb. 1a. c Verhältnis grüne zu roter Fluoreszenz aus Abb. 1b. d Farbaufnahme 80-jährige Patientin mit geographischer Atrophie. e Autofluoreszenzaufnahme zu Abb. 1d. f Verhältnis grüne zu roter Fluoreszenz aus Abb. 1e. g Autofluoreszenzaufnahme junger, gesunder Proband. h Verhältnis grüne zu roter Fluoreszenz aus Abb. 1g

die gewährleistet, dass das beobachtete Fluoreszenzlicht nicht von Reflexionslicht überlagert war. Dies wurde durch Aufnahmen eines weißen, nichtfluoreszenten Reflexionstargets (Spectralon, Labsphere Inc.) in der Fokalebene eines Modellauges

geprüft. Zur Bildaufnahme wurde eine 3-CCD-Farbkamera (HV-C20A, Hitachi) verwendet. Diese Technik erlaubt nicht nur die bildliche Darstellung der Fundusautofluoreszenz per se, sondern auch ihre spektrale Separation in einen grünen und

einen roten Anteil, wobei die Grenze bei etwa 570 nm liegt.

Demonstriert wird das Potenzial dieser Methode anhand der Aufnahmen eines 28-jährigen augengesunden Probanden, einer 78-jährigen pseudophaken Patientin mit

nichtexsudativer AMD, perimakulär konfluierenden Drusen und einem Visus von 0,4 sowie einer 80-jährigen pseudophaken Patientin mit AMD im Stadium der geographischen Atrophie (Visus 0,1). Diese sind als typische Beispiele aus dem Patientenmaterial einer derzeit laufenden Pilotstudie ausgewählt worden. Die Untersuchungen wurden mit Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Jena nach Aufklärung und unter Einwilligung der Patienten durchgeführt.

Die Fluoreszenzspektren von Lipofuszin, A2-E, NADH, FAD und AGEs wurden mit dem Jenaer Ophthalmospektrometer [5] aufgezeichnet. Die Proben wurden in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm in die Fokalebene eines Modellauges gestellt und durch die Ophthalmoskopoptik des Spektrometers beobachtet. Die Fluoreszenz wurde mit Lasern (LDH-P-C-400 bzw. LDH-P-C-440, Picoquant) angeregt, die bei 400 nm bzw. 446 nm emittierten und die Probe unter 45° beleuchteten. Zur Blockung des Anregungslichts war vor dem Spektrographen ein Langpassfilter mit einer Kante bei 425 nm bzw. 500 nm angebracht worden.

Das Lipofuszin wurde aus Spenderaugen extrahiert [16]. Die Synthese des A2-E ist bei Parish et al. [10] beschrieben. NADH und FAD (Sigma-Aldrich) sind in PBS (pH 7,4) gelöst worden. Die AGEs (Pentosidine, N^ε-(Carboxymethyl)-Lysine (CML) und Imidazolone) wurden durch Inkubation von Albumin (BSA) mit Glukose-6-Phosphat über 50 Tage synthetisiert.

Ergebnisse

Das Fundusfoto der Patientin mit nichtexsudativer AMD findet sich in **Abb. 1a**. In der mit überhöhtem Kontrast dargestellten makulären Region sind die konfluierenden Drusen deutlich zu erkennen. Das zugehörige Autofluoreszenzbild zeigt **Abb. 1b**. Deutlich sind einzelne Hyperfluoreszenzen im Bereich der Drusen zu erkennen. Das Verhältnis der Fluoreszenz im grünen zu der im roten Farbkanal wird in **Abb. 1c** gezeigt. Hier erscheinen die Strukturen heller, deren Fluoreszenz gegenüber ihrer Umgebung zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist. Dies ist sowohl für die Drusen als auch für die Papille der Fall. Das Fundusfoto des Patienten mit geographischer Atrophie wird in

Ophthalmologe 2004 · 101:1189–1193
DOI 10.1007/s00347-004-1019-z
© Springer-Verlag 2004

M. Hammer · E. Nagel · D. Schweitzer · S. Richter · F. Schweitzer · E. Königsdörffer · J. Strobel

Spektrale Differenzierung in Eigenfluoreszenzbildern des Augenhintergrunds von Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration

Zusammenfassung

Hintergrund. Eine veränderte Eigenfluoreszenz des Augenhintergrunds wird gegenwärtig insbesondere im Zusammenhang mit der altersabhängigen Makuladegeneration diskutiert. Zu ihrer richtigen Bewertung sind jedoch weitere Kenntnisse über das chemische Substrat der Fluoreszenz erforderlich.

Methode. Die Autofluoreszenz des Augenhintergrunds wurde mit einer Funduskamera beobachtet. Die Anregung erfolgte im blauen Spektralbereich. Zur Aufzeichnung der Fluoreszenz wurde eine 3-Chip-CCD-Farbkamera benutzt. Zum Vergleich wurden die Fluoreszenzspektren von Lipofuszin, A2-E, FAD, NADH₂ und AGE mit dem Jenaer Ophthalmospektrometer aufgenommen.

Ergebnisse. Im Gegensatz zu einem gesunden Fundus zeigen die Autofluoreszenzauf-

nahmen an Patienten mit AMD deutlich lokalisierbare Areale spektral unterschiedlicher Fluoreszenzemission. Die jeweils gefundenen Emissionsspektren zeigen starke Überlappungen.

Schlussfolgerungen. Die vorgestellte Technik ermöglicht es, spektrale Unterscheidungen in Bildern der Autofluoreszenz des Augenhintergrunds vorzunehmen. Neben der des Lipofuscins wurde bei Patienten mit nichtexsudativer AMD eine kurzwelligere Fluoreszenz beobachtet.

Schlüsselwörter

Fundus · Autofluoreszenz · Lipofuszin · A2-E · FAD · NADH₂ · Advanced Glycation End Products

Spectral separation in ocular fundus autofluorescence images in patients suffering from age-related macular degeneration

Abstract

Introduction. Alterations in the intrinsic ocular fundus fluorescence are under discussion particularly in connection with age-related macular degeneration. However, further knowledge of the chemical substrate of fluorescence is necessary.

Method. Ocular fundus autofluorescence was observed using a fundus camera. The fluorescence emission was recorded using a 3-chip CCD camera. For comparison, the fluorescence spectra of lipofuscin, A2-E, FAD, NADH₂ and AGE's were recorded by the Jena ophthalmospectrometer.

Results. In contrast to the homogeneous intrinsic fluorescence of a normal fundus,

the fluorescence images of patients suffering from AMD showed remarkable local differences. The detected fluorescence spectra showed remarkable overlaps.

Discussion. We introduced a new technique enabling the detection of spectral differences in images of ocular fundus autofluorescence. Besides the fluorescence of lipofuscin, we found a green one in patients suffering from nonexudative AMD.

Keywords

Ocular fundus · Autofluorescence · Lipofuscin · A2-E · FAD · NADH₂ · Advanced glycation end products

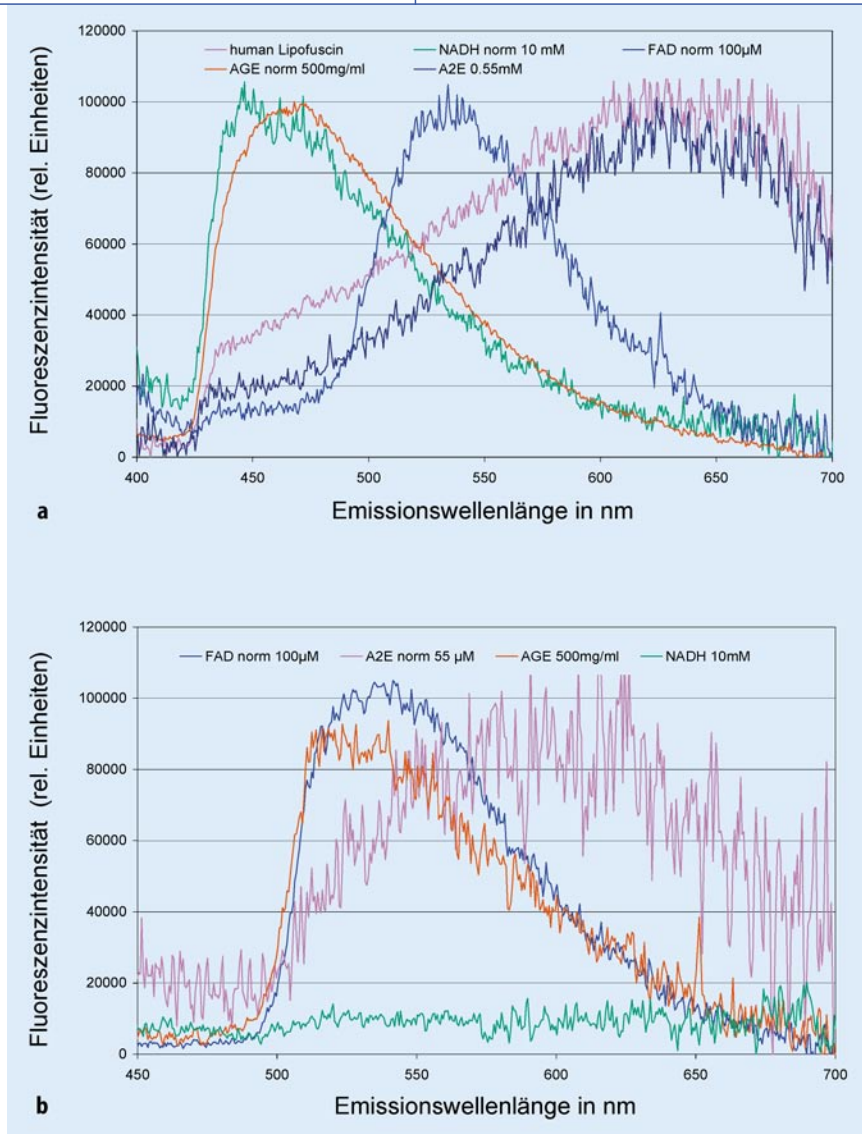


Abb.2 ▲ Fluoreszenzspektren von Lipofuszin, A2-E, FAD, NADH sowie AGEs nach Anregung bei a 400 nm und b 446 nm

■ **Abb. 1d** gezeigt. Das zugehörige Autofluoreszenzbild ist in **Abb. 1e** dargestellt und das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenz in **Abb. 1f**. Neben der atrophischen Narbe imponieren auf einen Venenastverschluss hindeutende streifenförmige Blutungen unterhalb des temporal oberen Gefäßbogens sowie die Atrophie umgebende Drusen. Zum Vergleich zeigt **Abb. 1g** die Autofluoreszenz des Fundus eines jungen, gesunden Probanden und **Abb. 1h** wiederum den Quotienten zwischen roter und grüner Fluoreszenz. In **Abb. 1c** und **Abb. 1h** ist zusätzlich ein Profil der Helligkeiten, die das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenz darstellen, längs eines Schnitts

durch die Papille und die Makula eingezeichnet.

Die Fluoreszenzspektren von NADH, FAD, AGEs, A2-E und Lipofuszin bei Anregung mit 400 nm sind in **Abb. 2a** gezeigt und **Abb. 2b** stellt diese bei Anregung mit 446 nm dar. Während bei einer Anregung der Fluoreszenz mit Licht der Wellenlänge 400 nm die einzelnen Fluorophore durchaus unterschiedliche Fluoreszenzspektren zeigen, sind bei der Anregungswellenlänge 446 nm die Fluoreszenzen der AGEs und von FAD nicht zu unterscheiden. Lediglich das A2-E weist ein Emissionsmaximum bei deutlich längeren Wellenlängen auf, während die Fluoreszenz des NADH₂ kaum noch nachweisbar ist.

Diskussion

Die hier erstmals beschriebene Technik der Aufnahme von Autofluoreszenzbildern des Augenhintergrunds unter Verwendung einer Funduskamera, geeigneter Filter und einer Farb-CCD-Kamera erlaubt die Trennung der Fluoreszenz in einen grünen (<570 nm) und in einen roten Spektralbereich (>570 nm). Die Autofluoreszenzaufnahme an einem gesunden Probanden (**Abb. 1g**) zeigt eine gleichmäßig über den hinteren Pol verteilte Fluoreszenz. Lediglich die Makula erscheint infolge der Absorption des Anregungslichts durch das Xanthophyll in den inneren Netzhautschichten etwas dunkler. Dass auch hier eine homogene Verteilung der Fluorophore vorliegt, zeigt das Bild der Quotienten von grüner und roter Fluoreszenz (**Abb. 1h**). Etwas zum Grünen hin verschoben ist dagegen die Fluoreszenz der Papille. Im Gegensatz zu Aufnahmen mit dem SLO, in denen die Papille dunkel erscheint, weil sie bei Fokussierung auf die Netzhaut oder das RPE außerhalb des von der konfokalen Optik erfassten Tiefenbereichs liegt, ist ihre Fluoreszenz in Aufnahmen mit der Funduskamera sichtbar. Während die gleichmäßige Fundusfluoreszenz die des Lipofuszins sein dürfte [12], fluoreszieren in der Papille wahrscheinlich Kollagen und Elastin im Bindegewebe.

► Es ist möglich, dass die grüne Hyperfluoreszenz der Drusen ein Hinweis auf AGEs ist

Im Vergleich mit dem Fluoreszenzbild eines jungen Probanden beobachten wir bei der Patientin mit nichtexsudativer AMD (**Abb. 1a, 1b und 1c**) perimakulär eine diffus erhöhte Autofluoreszenz. Diese emittiert tendenziell stärker im grünen Spektralbereich. Während, wie die in die **Abb. 1c und 1h** eingezeichneten Helligkeitsprofile zeigen, die Fluoreszenz auf der Papille und in der Makula der Patientin der des gesunden Probanden entsprechen, kommt perimakulär eine vornehmlich im Grünen emittierende Fluoreszenz hinzu. In diesem Spektralbereich fanden wir bei den In-vitro-Untersuchungen sowohl die Fluoreszenz von FAD als auch von AGEs. Beide Fluorophore könnten zu diesem Befund beitragen [9,

16, 20], sind aber spektral am Fundus nicht voneinander zu trennen.

Des Weiteren sind in **Abb. 1b und 1c** zwei hyperfluoreszente Drusen erkennbar, deren Fluoreszenz ebenfalls zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist. Diese Beobachtung bestätigt die von Arend et al. [1] und Solbach et al. [18] publizierten Ergebnisse. Ishibashi et al. [9] fanden bei immunhistochemischen Untersuchungen AGEs in weichen Drusen und in Ablagerungen auf der Bruch'schen Membran. Es ist also möglich, dass die grüne Hyperfluoreszenz der Drusen ein Hinweis auf AGEs ist.

Die in dieser Arbeit beschriebene Quotientenbildung zwischen grüner und roter Fluoreszenz ermöglicht es, die Atrophiezone auch bei Auftreten von Blutungen durch die Fluoreszenz des Kollagens und Elastins in der Sklera abzugrenzen

Holz et al. [7, 8] beschrieben die Hypofluoreszenz atrophischer Areale, die dadurch erklärt wird, dass mit der Atrophie des RPE die Lipofuszinfluoreszenz verschwindet. Dies bestätigen unsere Aufnahmen (**Abb. 1d, 1e und 1f**). Die von diesen Autoren beschriebene automatische Vermessung der Größe atrophischer Areale könnte allerdings, wie unser Beispiel zeigt, durch eine die Fluoreszenz blockierende Blutung verfälscht werden. Mit der hier vorgestellten Methode der Quotientenbildung zwischen der grünen und der roten Fluoreszenz ist dagegen die Atrophiezone auch bei Auftreten von Blutungen deutlich durch ihre grüne Fluoreszenz des Kollagens und Elastins in der Sklera abgrenzbar (**Abb. 1f**). Daneben zeigt der vorgestellte Fall am Rande der Atrophiezone einzelne hyperfluoreszente Drusen (*Pfeile* in **Abb. 1f**). Auch dieses Phänomen ist bereits von Holz et al. beschrieben worden [7, 8]. Wir konnten hier erstmals zeigen, dass deren Fluoreszenz spektral von der Lipofuszinfluoreszenz der Umgebung verschieden ist. Mikroperimetrische Untersuchungen sowie Verlaufsbeobachtungen des Fortschreitens der Atrophie sollten Auskunft über die funk-

tionelle und prognostische Bedeutung dieses Befunds geben.

Fazit für die Praxis

Die spektrale Selektion der grünen von der roten Fluoreszenz ist als ein weiterer Schritt zur Aufklärung des chemischen Substrats der Autofluoreszenz des Augenhintergrunds anzusehen. Allerdings ist eine eindeutige Zuordnung als verschieden erkannter Fluoreszenzen zu den möglichen Fluorophoren wegen der Überlappung der Emissionsbänder nicht möglich. Ein hoffnungsvoller Ansatz, diese Frage zu klären, besteht in der von Schweitzer et al. [17] beschriebenen Messung der Fluoreszenzlebensdauern. Die Kombination dieses Verfahrens mit der hier vorgestellten Technik scheint geeignet zu sein, einen substanziellen Beitrag zur Aufklärung des Substrats der Fluoreszenz zu leisten.

Korrespondierender Autor

Dr. M. Hammer

Augenklinik, Friedrich-Schiller-Universität Jena,
Bachstraße 18, 07740 Jena
E-Mail: martin.hammer@med.uni-jena.de

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. F. Schütt von der Universität Heidelberg für die Präparation von Lipofuszin und für die Synthese des A2-E, sowie Frau Dr. S. Franke von der Klinik für Innere Medizin der Universität Jena für die Synthese der AGEs. Die Arbeiten wurden gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, Förderkennzeichen 01EZ0309.

Interessenkonflikt: Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

Literatur

1. Arend O, Weiter JJ, Goger DG, Delori FC (1995) In vivo Fundus Fluoreszenzmessungen bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 92:647–653
2. Delori FC (1994) Spectrometer for noninvasive measurement of intrinsic fluorescence and reflectance of ocular fundus. *Appl Opt* 33:7439–7452
3. Eldred GE, Katz ML (1988) Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: Separation and spectral characterization. *Exp Eye Res* 47:71–86

4. Eldred GE, Lasky MR (1993) Retinal age-pigments generated by self-assembling lysomorphotropic detergents. *Nature* 361:724–726
5. Hammer M, Schweitzer D, Leistriz L, Scibor M, Donnerhacke KH, Strobel J (1997) Imaging Spectroscopy of the human ocular fundus. *J Biomed Opt* 2:418–425
6. Holz FG, Bellmann C, Margaritidis M, Schutt F, Otto TP, Volcker HE (1999) Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237:145–152
7. Holz FG (2001) Autofluoreszenz-Imaging der Makula. *Ophthalmologie* 98:10–18
8. Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schutt F, Volcker HE (2001) Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1051–1056
9. Ishibashi T, Murata T, Hanagai M et al. (1998) Advanced glycation end products in age related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116:1629–1632
10. Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K, Dillon J, Sparrow J (1998) Isolation and one step preparation of A2-E and iso-A2-E fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14609–14613
11. Rückmann von A, Fitzke FW, Bird AC (1995) Clinical application of in vivo imaging of fundus autofluorescence. *Invest Ophthalmol* 36:238
12. Rückmann von A, Fitzke FW, Bird AC (1995) Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol* 79:407–412
13. Rückmann von A, Fitzke FW, Bird AC (1997) Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:478–486
14. Rückmann von A, Fitzke FW, Bird AC (1999) Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and its change over time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237:1–9
15. Rückmann von A, Fitzke FW, Fan J, Halfyard A, Bird AC (2002) Abnormalities of fundus autofluorescence in central serous retinopathy. *Am J Ophthalmol* 133:780–786
16. Schütt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J (2003) Proteins modified by Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, or advanced glycation end products in Lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3663–3668
17. Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Anders R (2002) Zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz – ein Werkzeug zur Erfassung von Stoffwechsellvorgängen am Augenhintergrund. *Ophthalmologie* 99:774–779
18. Solbach U, Keilhauer C, Knabben H, Wolf S (1997) Imaging of retinal autofluorescence in patients with age-related macular degeneration. *Retina* 17:385–389
19. Staudt S, Bellmann C, Schütt F, Lösch A, Holz FG (2000) Various intra- and extracellular fluorophores other than RPE-lipofuscin contribute to variations in spacial distribution and intensity in topographic fundus autofluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:168
20. Teich JM (1985) The theory and development of a noninvasive retinal scanner with application to early diagnosis of diabetic retinopathy. PhD-thesis, MIT, Cambridge, Mass.