

D. Schweitzer · A. Kolb · M. Hammer · R. Anders

Augenklinik der FSU Jena, Bereich Experimentelle Ophthalmologie

Zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz

Ein Werkzeug zur Erfassung von Stoffwechselvorgängen am Augenhintergrund

Zusammenfassung

Erkannte Veränderungen im Stoffwechsel eröffnen Möglichkeiten zur Intervention bei noch reversiblen pathologischen Veränderungen. Messungen der Sauerstoffsättigung sind auf das Gefäßsystem beschränkt. Messungen der Autofluoreszenz von Koenzymen gestatten es, Änderungen der Konzentration von Sauerstoff um 3 Größenordnungen empfindlicher als durch die Detektion der Sauerstoffsättigung nachzuweisen. Da infolge der begrenzten Transmission der Okularmedien keine spezifische Anregung innerer Fluorophore erreicht werden kann, wurde untersucht, ob eine Messung der substanzspezifischen Fluoreszenzlebensdauer nach Pulsanregung am lebenden Auge möglich ist. Unter Verwendung eines Laser-Scanner-Ophthalmoskopes und eines aktiv modenkoppelten Lasers gelang es, mittels des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens Bilder der Fluoreszenzlebensdauer vom lebenden Augenhintergrund zu erhalten. Bei monoexponentieller Approximation wird in der Papille eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von ca. 5 ns und im parapapillären Gebiet von ca. 1,5 ns gemessen. Aus dem Histogramm der Lebensdauern folgt, dass wahrscheinlich Lipofuszin, freies Flavin und Collagen am gesunden Auge nachweisbar sind. Es wurden Vergleichsmessungen am Funduspräparat und an gelöstem Flavinadenin-dinucleotid ausgeführt.

Schlüsselwörter

Lebensdauer · Autofluoreszenz · Auge · Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Es besteht das Ziel, Veränderungen im oxidativen Stoffwechsel der Netzhaut möglichst so zeitig zu detektieren, dass eine therapeutische Intervention in einem reversiblen Stadium der pathologischen Entgleisung erreicht werden kann, bevor morphologische Veränderungen sichtbar sind. Mit derartigen Untersuchungen könnte zur Aufklärung des Pathomechanismus bei altersbezogener Makuladegeneration beigetragen werden. Es wird weiterhin vermutet, dass Bereiche mit gestörtem zellulärem Stoffwechsel bei diabetischer Retinopathie trotz intaktem Blutvolumendurchfluss, aber gestörter Diffusion in ursächlichem Zusammenhang mit Gefäßneubildungen stehen. Eine gezielte Koagulation nur dieser Gebiete könnte eine früheste patientenspezifisch optimierte Therapie ermöglichen. Die bei Glaukom vermuteten Auswirkungen einer gestörten Mikrozirkulation auf den Stoffwechsel konnten bisher noch nicht ausreichend nachgewiesen werden. Es besteht die Forderung, diese stoffwechselbedingten Veränderungen am lebenden Augenhintergrund zu erkennen.

Chance [3] zeigte, dass die Messung der Fluoreszenzeigenschaften von Pyridin-Nucleotid-Coenzymen, die sich mit dem Oxidationszustand ändern, eine um 3 Größenordnung geringere Schwankung der Sauerstoffkonzentration erfordert, als zur Oxygenierung von Hämoglobin notwendig ist. Während die Messung der Sauerstoffsättigung an die Änderung der Absorptionsspektren von Hämoglobin und Oxyhämoglobin

in den Gefäßen gebunden ist [12], wird durch die Redoxfluorometrie der Koenzyme und prosthetischen Gruppen der Stoffwechsel in den Organellen jeder Zelle charakterisiert [10].

Fluoreszenzmessungen am Augenhintergrund setzen wegen der begrenzten Transmission der Okularmedien voraus, dass eine Anregung im Wellenlängenbereich größer als 400 nm möglich ist. Durch diese Beschränkung entfällt die Messbarkeit des Redoxpaares NAD-NADH⁺+H⁺ (oxidiertes und reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid). Die Fluoreszenz von Flavinen hingegen sollte auch am Augenhintergrund nachweisbar sein.

Flavine sind prosthetische Gruppen in einer Reihe von Stoffwechselreaktionen, so z. B. in der β -Oxidation der Fettsäuren bei der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Reaktion, im Citratzyklus bei der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion sowie in der Atmungskette im Komplex 1 bei der NADH⁺+H⁺-Ubichinon-Reduktase-Reaktion und im Komplex 2 bei der

© Springer-Verlag 2002

Teile des Beitrags wurden auf der 99. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Berlin vorgetragen.

Gefördert durch BMBF 13N7096 und TMWFK A 309-00015.

Doz. Dr. Ing. habil. D. Schweitzer
Augenklinik der FSU Jena,
Bereich Experimentelle Ophthalmologie,
Bachstraße 18, 07740 Jena
E-Mail: Dietrich.Schweitzer@med.uni-jena.de

D. Schweitzer · A. Kolb · M. Hammer
R. Anders

Time-correlated measurement of autofluorescence. A method to detect metabolic changes in the fundus

Abstract

The detection of metabolic changes opens the possibility for intervention of reversible pathological alterations. Measurements of oxygen saturation are limited to the blood vessel system. Detection of alterations in oxygen concentrations are up to 3 orders of magnitude more sensitive by autofluorescence of coenzymes than by measurement of oxygen saturation. Because of limited transmission of the ocular media no specific excitation of endogenous fluorophores can be realised. For this reason it was investigated if the fluorescence lifetime after pulse excitation can be detected at the human fundus. Applying a laser scanner ophthalmoscope and mode-locked Ar⁺ laser as well as time-correlated single photon counting, lifetime images of the living fundus were obtained. In mono-exponential approximation, a mean lifetime of 5 ns was detected from the optic disc and large vessels whereas about 1.5 ns were detected in the parapapillary area. By evaluating the frequency of lifetimes, lipofuscin, free FAD, and collagen are probably detectable. Comparative measurements were performed in fundus specimens and on free FAD.

Keywords

Lifetime · Autofluorescence · Eye · Time-correlated single photon counting

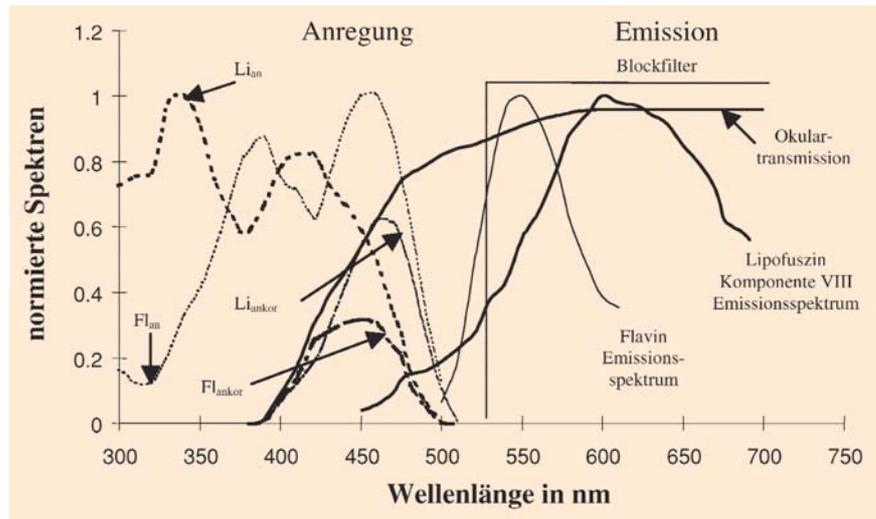


Abb. 1 ▲ Effektive Anregungsspektren der Komponente VIII von Lipofuszin [5] und von Flavinen [17] am Augenhintergrund nach Filterung durch die Transmission der Okularmedien (Li_{ankor} , Fl_{ankor} Anregungsspektren von Lipofuszin, Flavin; Li_{an} , Fl_{an} durch die Wirkung der Okulartransmission veränderte Anregungsspektren von Lipofuszin, Flavin)

Succinat-Dehydrogenase-Reaktion, die die Verbindung zwischen Citratzyklus und Atmungskette darstellt [6, 8].

„Für die bildhafte Darstellung der am Augenhintergrund wirksamen inneren Fluorophore ist eine Unterscheidung dieser Fluorophore erforderlich.“

Für die bildhafte Darstellung der am Augenhintergrund wirksamen inneren Fluorophore wie Flavinen, Lipofuszin oder Kollagen ist eine Unterscheidung dieser Fluorophore erforderlich. Hierzu ist prinzipiell eine Selektion entsprechend der spezifischen Anregungsspektren, der Fluoreszenzspektren oder der Lebensdauer der Elektronen im angeregten Zustand möglich.

In Abb. 1 ist dargestellt, dass sich die Anregungsspektren von Flavinen [17] und von der Komponente VIII des Lipofuscins [5] bei 320 nm deutlich unterscheiden. Im Gegensatz zu Fluoreszenzmessungen am vorderen Augenabschnitt werden die Anregungsspektren der Fluorophore am Augenhintergrund durch die Transmission der Okularmedien verändert. Es sind Anregungsspektren wirksam, die durch Multiplikation der Anregungsspektren der reinen Substanzen mit den Werten der Okulartransmission entstehen. Fluoreszenzmessungen für Anregungswel-

lenlängen kürzer als 400 nm sind deshalb am Augenhintergrund praktisch nicht ausführbar. Durch den Einfluss der Okulartransmission zeigen die Anregungsspektren beider Fluorophore ähnliche Verläufe mit einem Maximum um 470 nm. Eine selektive Anregung eines einzelnen Fluorophors ist deshalb nicht mehr möglich. Es ist deshalb davon auszugehen, dass am Augenhintergrund immer mehrere Fluorophore gleichzeitig zur Emission angeregt werden.

Aufgrund der sehr schwachen Signale und der damit verbundenen langen Messzeit ist es praktisch nicht möglich, wie von Schweitzer et al. [13] für kleine Bereiche demonstriert, die Fluoreszenzspektren für alle Punkte in einem Bild zu detektieren und eine Trennung zwischen den Fluorophoren entsprechend der spezifischen, aber stark überlappenden Fluoreszenzspektren vorzunehmen. Die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren bei Anregung um 470 nm und um 500 nm in einem Feld 7° temporal der Fovea sind bei Schweitzer et al. [13] angegeben.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Fluorophoren in einem 2-dimensionalen Bild ist prinzipiell durch die Messung der Fluoreszenzabklingzeit nach Pulsanregung möglich. Das zeitliche Fluoreszenzverhalten charakterisiert die Struktur des energetischen Grundzustandes eines Moleküls und stellt damit einen spezifischen Fin-

gerabdruck für jedes Fluorophor dar [9]. Das Problem besteht jedoch darin, dass die Abklingzeiten (Fluoreszenzlebensdauern) in der Größenordnung von Nanosekunden liegen [16]. Da das Fluoreszenzsignal extrem schwach ist, erscheint es zunächst aussichtslos, den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzlichtes zu messen.

Methode

Ausgehend von der maximal zulässigen Exposition des Fundus [1] und unter Berücksichtigung aller schwächenden Faktoren wie Transmissionen des Auges und der Messanordnung, Quantenwirkungsgrade der Umwandlung von Anregungslicht in Fluoreszenzlicht sowie der Umwandlung von Fluoreszenzlicht in detektierbare Elektronen am Empfänger sowie Raumwinkel und Spektralbereich der Detektion wurde von Schweitzer et al. [14] gezeigt, dass in einer Serie von 10 Anregungspulsen mit der Detektion von einem Photon zu rechnen ist. Diese Bedingung ist optimal für die Anwendung des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens [9]. Durch diese Technik erfolgt eine Zeittransformation um 9 Größenordnungen, sodass Vorgänge, die im Bereich von Nanosekunden ablaufen, im Sekundenbereich messbar sind. Bei Schweitzer et al. [14] wurde der in Abb. 2 dargestellte Aufbau beschrieben, mit dem erstmalig zeitaufgelöste Messungen der Autofluoreszenz am lebenden Auge vorgenommen werden können.

Der optomechanische Grundaufbau ist ein modifiziertes konfokales Laser-Scanner-Ophthalmoskop (cLSO, Zeiss, Oberkochen). Die Strahlquelle ist ein ILA-190-Ar⁺-Laser (LES Jena). Durch aktive Modenkopplung wurde dieser Laser so modifiziert, dass Pulse einer Dauer von kleiner 300 ps (FWHM) mit einer Wiederholrate von ca. 80 MHz bei wählbaren Wellenlängen zwischen 458 nm und 514 nm generiert werden. Die Detektion des Fluoreszenzlichtes geschieht mit einem Photomultiplier (HAM-H5783P-01, Hamamatsu, Japan) in Verbindung mit der Einheit SPC 536 für zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (Becker & Hickl, Berlin). Während der Abtastung des Augenhintergrundes wird beim Scanvorgang jeder Bildort mit einer Folge von Lichtpulsen zur Fluoreszenz angeregt. Nach einer Messzeit von ca. 5 s liegen in den Zeitkanälen zur Charakteri-

sierung des zeitabhängigen Abfalls des Fluoreszenzlichtes einige hundert Photonen vor, sodass nach Köllner und Wolfrum [7] eine monoexponentielle Approximation des gemessenen Signals mit einem Fehler von <5% möglich ist.

Zum Ausgleich von Augenbewegungen während der Messzeit ist vorgesehen, Reflexionsbilder gleichzeitig mit den Fluoreszenzbildern aufzunehmen. Entsprechend der Lagekorrektur, die aus der erforderlichen Verschiebung der Reflexionsbilder zueinander berechnet wird, erfolgt die Überlagerung der simultan detektierten Fluoreszenzbilder. Aus dem zeitabhängigen Fluoreszenzsignal von nur wenigen hundert Photonen wird anschließend die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Bei der Erprobung der Messanordnung ergab sich, dass bereits eine mittlere Strahlungsleistung von 30–40 μ W in der Hornhautebene zur Erzeugung der Fluoreszenzbilder ausreicht. Unter diesen Bedingungen wird selbst für eine Messzeit von 1.000 s der nach American National Standard for Safe Use of Lasers [1] zulässige MPE („maximal permissible exposure“) Wert für Pulsgruppen nur zu 10% erreicht.

Ergebnisse

Bei monoexponentieller Approximation des Abklingverhaltens wurde im Papillengewebe und auf den großen Gefäßen eine Abklingzeit von ca. 5 ns gemessen.

Im parapapillären Gebiet zeigte die Lebensdauer der Autofluoreszenz beträchtliche örtliche Variation und lag im Mittel etwa bei ca. 1,5 ns.

Die Abb. 3 zeigt Bilder der in vivo gemessenen Fluoreszenzlebensdauer eines gesunden menschlichen Augenhintergrundes, wobei die Anregung bei 457,9 nm erfolgte. Die farbliche Codierung der Fluoreszenzlebensdauern vermittelt einen globalen Eindruck über die örtliche Verteilung verschiedener Fluorophore. Um zu unterscheiden, welche Fluorophore an der Emission beteiligt sind, wurden die Fluoreszenzlebensdauern zusätzlich in 2 Emissionsbereichen untersucht. In Abb. 3a wurde der Fluoreszenzbereich zwischen 515 nm und 700 nm betrachtet, während in Abb. 3b nur der langwellige Emissionsbereich zwischen 550 nm und 700 nm gemessen wurde. Diese Auswahl wurde getroffen, da bekannt ist, dass die Komponente VIII des Lipofusins nach Eldred und Katz [5] sowie das am menschlichen Auge nachweisbare Lipofuszin [4] maximale Emission zwischen 605 nm und 672 nm zeigen. Es war deshalb zu erwarten, dass die Lebensdauer im langwelligen Fluoreszenzbereich durch Lipofuszin dominiert ist.

Eine visuelle Bewertung der Unterschiede in diesen Bildern ist schwierig. Eine aussichtsreiche Methode dafür besteht darin, die Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzlebensdauern in ausge-

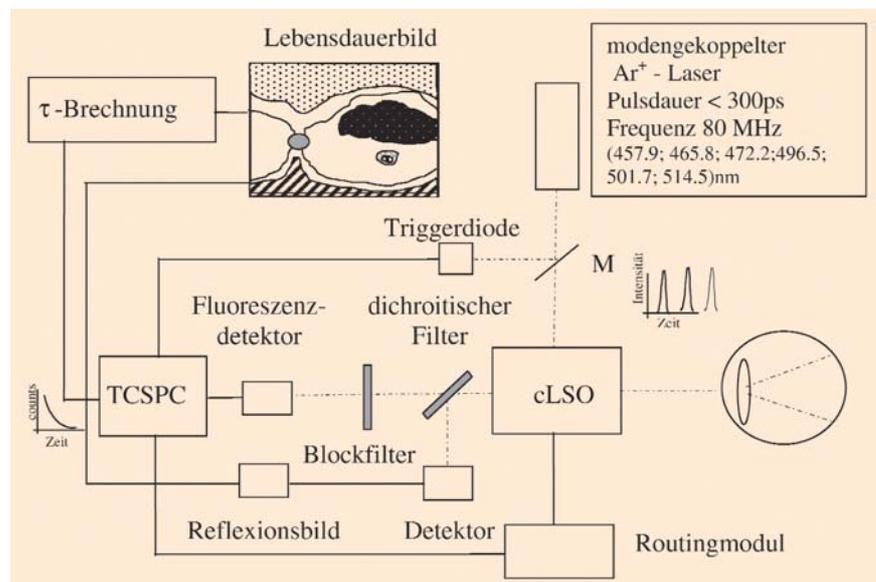


Abb. 2 ▲ Schema der Anordnung für zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz am lebenden Augenhintergrund

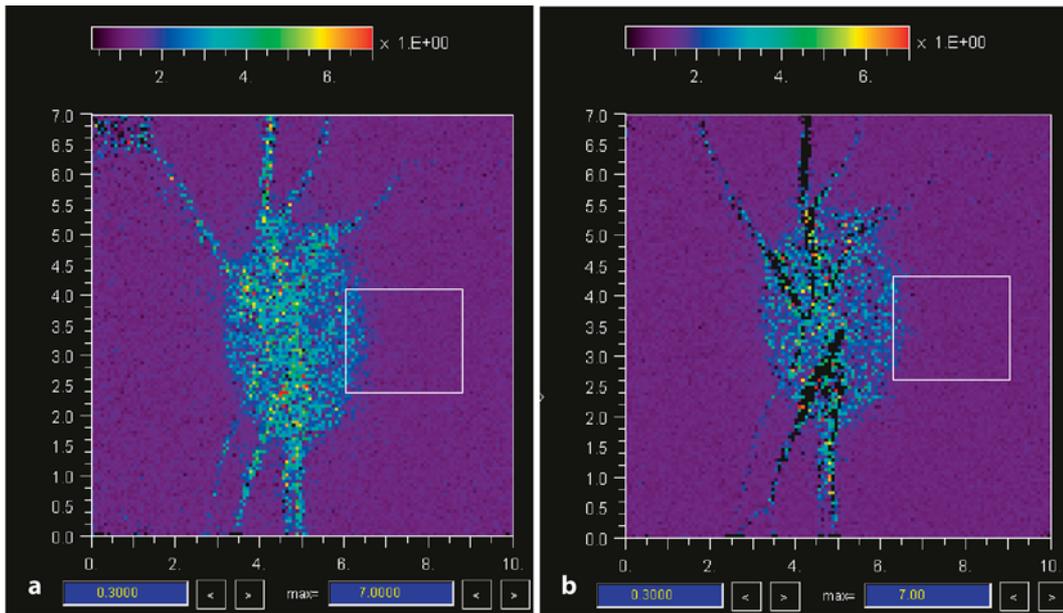


Abb. 3a,b ▲ Bilder der monoexponentiell bestimmten Fluoreszenzlebensdauer eines gesunden menschlichen Augenhintergrundes nach Anregung mit 457,9 nm. a Emissionsbereich 515–700 nm, b Emissionsbereich 550–700 nm. Das obere Farbband gibt die farbliche Codierung der Fluoreszenzlebensdauern zwischen 0,3 ns und 7 ns an. Die langwellige Emission zeigt eine Tendenz zu kürzeren Fluoreszenzlebensdauern als die Emission im ausgedehnten Spektralbereich

wählten Gebieten zu berechnen. In beiden Bildern wurde deshalb in gleichen parapapillären Bereichen die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzlebensdauern ermittelt. Die häufigste Lebensdauer im Emissionsbereich oberhalb 550 nm wurde mit 1,34 ns bestimmt. Im erweiterten, bereits bei 515 nm beginnenden Fluoreszenzbereich traten zusätzlich zu der Häufung der Fluoreszenzabklingzeiten bei 1,34 ns ein weiteres Maximum bei 2 ns und ein breites Maximum um 3 ns auf. Das bedeutet, dass zusätzlich zu der wahrscheinlich Lipofuszin zuzuordnenden Lebensdauer bei 1,34 ns mindestens noch 2 weitere Fluorophore am gesunden Augenhintergrund nachweisbar sind.

Zum Vergleich wurde ein menschliches Funduspräparat untersucht, bei dem im unteren Bereich die neuronale Netzhaut entfernt wurde. Da bekannt ist, dass sich Lipofuszin am menschlichen Auge im Pigmentepithel akkumuliert, konnte angenommen werden, dass die im unteren Bereich des Präparates nachgewiesene Fluoreszenzabklingzeit vorwiegend Lipofuszin zuzuordnen ist. Da hier am häufigsten die Lebensdauer von 1,37 ns bestimmt wurde, ist unter Berücksichtigung der obigen Ergebnisse davon auszugehen, dass die Fluoreszenzlebensdauer von ca. 1,34 ns Lipofuszin zuzuordnen ist.

Um zu untersuchen, ob die Fluoreszenzabklingzeit von ca. 2 ns Flavinen zugeordnet werden kann, wurden das Fluoreszenzspektrum und die Abklingzeit von freiem FAD bestimmt. Zur Pulsanregung wurden mit einem Ti:Sa-Laser (Mira 900, Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) Pulse der Wellenlänge 856 nm erzeugt, aus denen die 2. Harmonische bei 428 nm generiert wurde. Dieser Laser wurde von einem frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser (Verdi, Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) gepumpt. Die Probe befand sich in einem Laser-Scanner-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland). Das Fluoreszenzlicht durchlief einen Spektrographen (Model 250is, Chromex Inc., Albuquerque, USA) und wurde anschließend mit einer Strekkamera (Model C5680 mit S20-Photokathode, Hamamatsu Photonics) spektral- und zeitaufgelöst detektiert.

Um möglichst natürliche Verhältnisse nachzubilden, wurde eine 0,01molare Lösung von FAD (Sigma Aldrich, Taufkirchen) in kalziumfreier gepufferter Elektrolytlösung (HEPES, pH=7,4, 10 mmolar) hergestellt.

Unter diesen Bedingungen konnte eine Fluoreszenz des FAD zwischen 500 nm und 700 nm mit einem Maximum bei 540 nm nachgewiesen werden

(Abb. 4a). Die gemessene zeitaufgelöste Fluoreszenz von FAD zeigt Abb. 4b. Bei biexponentieller Approximation der zeitabhängigen Fluoreszenz wurde eine 1. Abklingzeit von 2,167 ns mit einem Anteil von 19% und eine 2. Abklingzeit von 0,249 ns mit einem Anteil von 81% ($\chi^2=1,28$) bestimmt. In monoexponentieller Approximation ergab sich für die Fluoreszenzlebensdauer 1,888 ns. Dieser Wert liegt nahe an dem Häufigkeitsmaximum, das am lebenden Fundus bei ca. 2 ns bestimmt wurde. Es ist anzunehmen, dass die monoexponentiell bestimmte Abklingzeit von ca. 2 ns zu freiem FAD (Flavinadenindinucleotid) gehört.

Die langen Abklingzeiten um 3 ns, die bis zu 5 ns an den Gefäßwänden und im Papillengewebe bestimmt wurden, sind wahrscheinlich auf die Fluoreszenz von Elastin und Kollagen zurückzuführen [2].

Diskussion

Die Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz am Augenhintergrund ist eine in der Ophthalmologie völlig neuartige Untersuchungstechnik. Sie ermöglicht es, Stoffwechselfvorgänge auf zellulärem Niveau zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Technik unter den Bedingungen des lebenden menschlichen Auges realisierbar ist. Es wurden Bilder der Fluoreszenzlebensdauer vom lebenden Augenhintergrund in verschiedenen Spektralbereichen aufgenom-

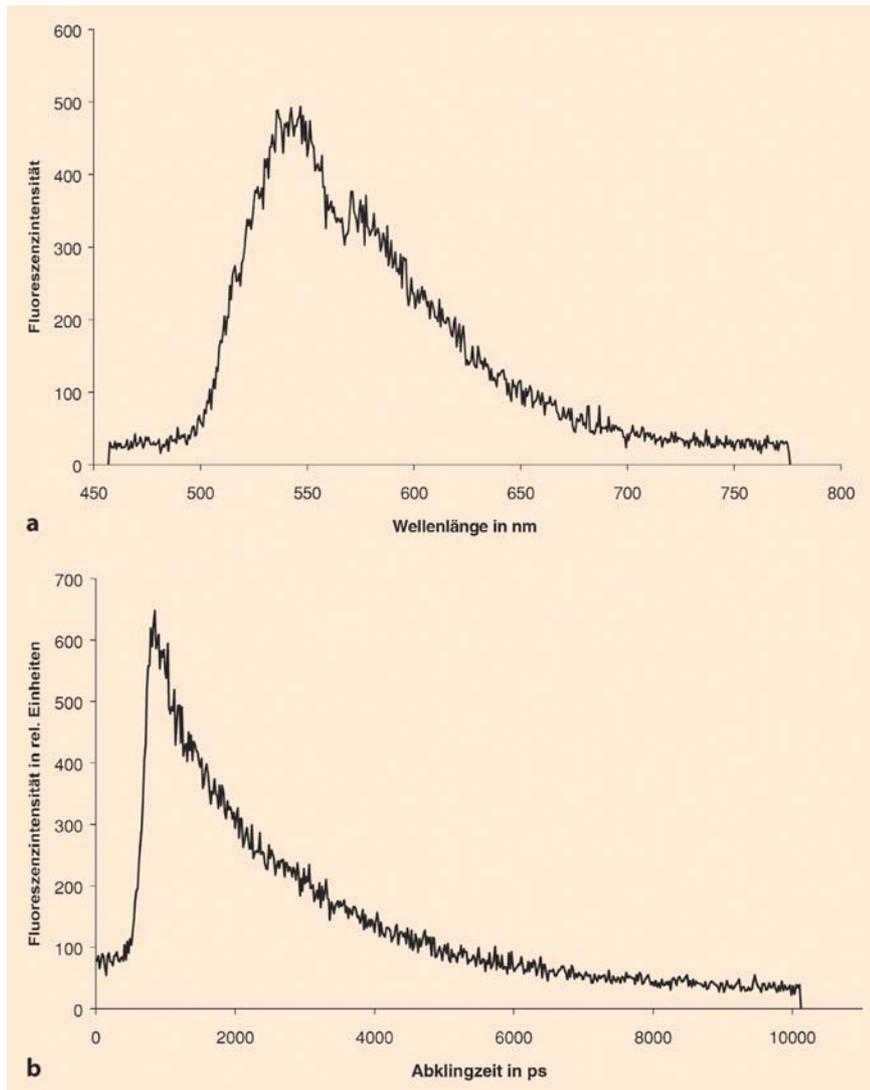


Abb. 4a,b ▲ Fluoreszenz von Flavinadeninucleotid (FAD) gelöst in HEPES-Puffer (pH=7,4) nach Anregung mit 428 nm, Pulslänge 200 ps, Pulsfrequenz 80 MHz. a Fluoreszenzspektrum, b zeitaufgelöste Fluoreszenz (biexponentielle Approximation, $a_1=19\%$, $\tau_1=2,1672$ ns; $a_2=81\%$, $\tau_2=0,249$ ns; monoexponentielle Approximation $\tau_0=1,888$ ns)

men und mit den Messungen an einem menschlichen Funduspräparat verglichen. Aus diesen Untersuchungen folgt, dass die monoexponentiell approximierte Fluoreszenzlebensdauer um 1,3 ns mit hoher Wahrscheinlichkeit Lipofuszin zuzuordnen ist. Allerdings sind störende Einflüsse durch die Formalinfixation nicht auszuschließen. Weitere Vergleichsmessungen an gelöstem FAD lassen den Schluss zu, dass die am Fundus gemessene Fluoreszenzlebensdauer um 2 ns wahrscheinlich gelöstem FAD entspricht. Die langen Abklingzeiten zwischen 3 ns und 5 ns sind wahrscheinlich durch die Bindegewebskomponenten Elastin und Kollagen verursacht.

„Die Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz am Augenhintergrund ermöglicht es, Stoffwechselfvorgänge auf zellulärem Niveau zu detektieren.“

Ein exakter Nachweis der detektierten Fluorophore ist durch Vergleichsmessungen der Fluoreszenzabklingzeit mit den Ergebnissen biochemischer Analysen, wie z. B. HPLC-Messungen an Gewebeproben oder Zellkulturen, auszuführen, die unter definiert veränderten Bedingungen versorgt wurden.

Eine Aussage zu den Einflüssen verschiedener Fundusschichten auf die gemessene Abklingzeit kann durch die Untersuchung an Patienten mit definierten morphologischen Veränderungen z. B. Makulaforamen getroffen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzlebensdauerermessung wurde an strukturierten Fluoreszenzproben bestimmt, bei denen eine dünne Fluorophorschicht (Rhodamin 6G und Coumarin 522) mittels Spin-Coating-Technik auf einen Glasträger aufgebracht wurde. Die Messbedingungen wurden so eingestellt, dass ebenfalls nur wenige hundert Photonen detektierbar waren. Die monoexponentiell approximierte Abklingzeiten wurden mit einer Standardabweichung von kleiner $\pm 0,2$ ns bestimmt. Mit dieser Unsicherheit ist auch bei Messungen am lebenden Augenhintergrund bei einer Auflösung von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ und einer Messzeit von 5 s zu rechnen. Durch Verlängern der Messzeit oder Verschlechterung der örtlichen Auflösung kann die detektierbare Photonenzahl erhöht und damit die Messunsicherheit verringert werden.

Die Messung der Fluoreszenzabklingzeit hat gegenüber Messungen der Emissionsspektren den entscheidenden Vorteil, dass sie unabhängig von der detektierten Fluoreszenzintensität ist. Das bedeutet, dass bei Kataraktpatienten eine Messung der Fluoreszenzabklingzeit ausgeführt werden kann, sofern eine ausreichende Anzahl von Photonen detektierbar ist.

Fazit für die Praxis

Es besteht die Hoffnung, dass in absehbarer Zeit mit der klinischen Verfügbarkeit einer Methode zu rechnen ist, mit der frühe funktionelle Störungen des zellulären Stoffwechsels nachgewiesen werden können, bevor morphologische Veränderungen aufgetreten sind.

Danksagung. Die Autoren danken Frau Dr. Lösch, Augenklinik der Universität Heidelberg, für die Bereitstellung des Funduspräparates und Herrn Dr. Biskup, Physiologie II der FSU Jena, für die Messung des Fluoreszenzspektrums und der zeitaufgelösten Fluoreszenz von FAD.

Literatur

1. American National Standard for Safe Use of Lasers ANSI Z 136.1-2000 (2000) Laser Institute of America, Suite 128, 13501 Ingenuite Drive, Orlando, FL 32826
2. Anderson-Engels A, Gustafson A, Johannson J, Stenram U, Svanberg K, Svanberg S (1992) Investigation of possible fluorophores in human atherosclerotic plaque. *Laser Life Science* 5:1–11
3. Chance B (1976) Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria. *Circ Res* 38 [Suppl 1]:131–138
4. Delori FC, Dorey CK, Staurengi G, Arend O, Goger DG, Weiter JJ (1995) In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:718–729
5. Eldred GE, Katz ML (1988) Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp Eye Res* 47:71–86
6. Hofmann E (1996) *Medizinische Biochemie. UNI-MED, Lorch*, S 287–291
7. Köllner M, Wolfrum J (1992) How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements? *Chem Physics Letters* 200:2
8. Kreuzig T (1994) *Biochemie. Jungjohann, Neckarsulm Lübeck Ulm*, S 198–213
9. Lakowicz JR (1993) *Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York*
10. Masters B (1990) In vivo corneal redox fluorometry. In: Masters B (eds) *Noninvasive diagnostic techniques in ophthalmology. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo*, pp 223–247
11. Richards-Kortum R, Sevick-Muraka E (1996) Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnostics. *Annu Rev Phys Chem* 47:555–606
12. Schweitzer D, Hammer M, Kraft J, Thamm E, Königsdörffer E, Strobel J (1999) In vivo measurement of the oxygen saturation of retinal vessels in healthy volunteers. *IEEE Transaction Biomedical Engineering*. 46:1454–1465
13. Schweitzer D, Lang GE, Remsch H et al. (2000) Die altersabhängige Makulopathie. Vergleichende Untersuchungen zwischen Patienten, deren Kindern und Augengesunden. *Ophthalmologie* 97:84–90
14. Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Thamm E (2000) Tau-mapping of the autofluorescence of the human ocular fundus. In: König K, Tanke HL, Schneckenburger H (eds) *Laser microscopy. Proceedings SPIE 4164:79–89*
15. Schweitzer D, Kolb A, Hammer M (2001) Autofluorescence lifetime measurements in images of the human ocular fundus. In: Papazoglou ThG, Wagniers GA (eds) *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine. Proceedings SPIE 4432:29–39*
16. Tanaka F, Tamai N, Yamazaki I (1989) Picosecond-resolved fluorescence spectra of D-amino-acid oxidase. A new fluorescent species of the coenzyme. *Biochemistry* 28:4259–4262
17. Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC (1998) In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol* 68:603–632

Edward J. Holland, Marc J. Mannis

Ocular Surface Disease – Medical and Surgical Management

Berlin, Heidelberg, New York: Springer 2002, 283 S., (ISBN 0-387-95161-X), Hardcover, 175.00 EUR

Die Herausgeber-Mitautoren E.J. Holland und M.J. Mannis haben im Springer-Verlag das erste umfassende Buch zur Erkrankung der Augenoberfläche und deren medikamentöse und chirurgische Behandlung veröffentlicht. Das Buch zeichnet sich darin aus, dass die Herausgeber Mitautoren gefunden haben, die weltweit zu den anerkanntesten Experten auf dem Gebiet der Augenoberflächen-Erkrankung gehören.

Nach der wichtigen und richtungsgebenden Einleitung zur Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche von K. Tsubota, S.C.G. Tseng und M.L. Nordlund und der wichtigen und grundlegenden Klassifikation der okulären Oberflächen-Erkrankung von F.E. Kruse werden in den folgenden Kapiteln die wichtigsten Oberflächen-Erkrankungen wie Blepharitis, Trockenes Auge, das Pterygium und die Erkrankungen vorgestellt, die charakterisiert sind durch eine fehlerhafte epitheliale Adhäsion.

Der dritte Teil des Buches widmet sich den unterschiedlichen Ursachen der Erkrankungen, die zu einem Mangel der Stammzellen und damit der Hornhautepithel-Regenerationen und den Folgen schweren limbären Erkrankungen der Hornhaut führen. Es wird differenziert zwischen den kongenitalen Stammzellstörungen, den chemischen und thermischen Verletzungen sowie zu den autoimmunologischen Erkrankungen, die zu einer Oberflächenstörung der Hornhaut führen, einschließlich iatrogenen Ursachen.

Die aufgeführten Erkrankungen der Augenoberfläche, angefangen von der häufigsten Diagnose des Alltags, dem sog. Trockenen Auge, bis zu den Erkrankungen, die Funktion und Bestand des Auges gefährden, widmet sich die zweite Hälfte des 383 Seiten umfassenden Buches den Herausforderungen der medikamentösen und chirurgischen Therapie. Hier haben in den letzten Jahren Transplantationen von Bindehaut, konjunctivalem sowie keratokonjunctivalem Limbus in vielen Fällen erfolgreiche und vielversprechende therapeutische Ansätze und Therapieverfahren möglich gemacht.

Dazu kommen die Möglichkeiten der Amnionmembran-Transplantation sowie der Ex-vivo-Stammzell-Expansion in Verbindung mit einer durchgreifenden Keratoplastik und der notwendigen immunsuppressiven Therapie bei der Behandlung der okulären Stammzellerkrankungen.

Das hervorragende Bildmaterial, die differenzialdiagnostischen Tabellen sowie Flussdiagramme und der jedem Kapitel zugeordnete Literatur-Überblick passen in klarer didaktischer Weise, Diagnostik, therapeutischer Klassifikation und chirurgischer Techniken zur Behandlung der Oberflächen-Erkrankungen des Auges zusammen.

Das in englischer Sprache gut verständlich geschriebene Buch von Holland und Mannis „Ocular Surface Disease“ stellt nicht nur für den Hornhaut-Spezialisten und den Kliniker, sondern auch für jeden praktizierenden Augenarzt eine überaus wertvolle Wissens- und Informationsquelle dar, weswegen auch eine weite Verbreitung des Buches zu wünschen ist.

H.E. Völcker (Heidelberg)