

Theoretische und experimentelle Untersuchungen zu Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der Fakultät für Informatik und Automatisierung
der Technischen Universität Ilmenau

von Dipl.-Ing. Matthias Klemm

Tag der Einreichung: 07.05.2017

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.10.2017

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Jens Haueisen

Doz. Dr.-Ing. habil. Dietrich Schweitzer

Prof. Dr.-Ing. Daniel Baumgarten

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2017000754

angenehm sind erledigte Arbeiten

Marcus Tullius Cicero

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO), einem neuen Verfahren zur *in vivo* Messung der Autofluoreszenzabfälle endogener Fluorophore vom menschlichen Augenhintergrund. Die bisherigen Verfahren zur Approximation der Fluoreszenzlebensdauer aus den Autofluoreszenzabfällen stammen aus der Mikroskopie und sind daher nicht an die speziellen Bedingungen der *in vivo* Messungen am menschlichen Auge angepasst. Ziel der Arbeit war es, neue Verfahren der Messdatenverarbeitung zu entwickeln, welche die Fluoreszenzlebensdauerapproximation, insbesondere in FLIO-Daten, verbessern, sowie technische und physiologische Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode zu untersuchen.

Im Rahmen der Arbeit wurden daher neue Verfahren zur Behandlung von Artefakten durch eine inhomogene Fluoreszenzverteilung am Augenhintergrund sowie zur Behandlung von Artefakten durch Reflexionen im optischen Strahlengang des FLIO-Systems entwickelt. Die Modellierung der zeitaufgelösten Autofluoreszenzabfälle wurde erweitert, um die Fluoreszenz des Augenhintergrunds als dreidimensionale Fläche zu betrachten, die Schichtstruktur des Auges abzubilden sowie die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse von einer separaten Messung zu berücksichtigen. Darüber hinaus wurden Verfahren entwickelt, welche durch Ausnutzung örtlicher Information Fehler in der Fluoreszenzlebensdauerapproximation reduzieren. Auf technischer Seite wurde die Wiederholbarkeit von FLIO anhand von Farbstoffen und Probanden untersucht, verschiedene FLIO-Systeme auf Vergleichbarkeit geprüft sowie die Eignung eines Weitwinkelobjektivs für FLIO-Messungen analysiert. Letztlich wurde der Einfluss der natürlichen Augenlinse und des Blutzuckerspiegels auf die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds in Patienten bzw. Probanden charakterisiert.

Als ein Ergebnis der Arbeit entstand das umfangreiche Open-Source-Softwarepaket FLIMX, welches bestehende sowie die neu entwickelten Verfahren zur Fluoreszenzlebensdauerapproximation umsetzt. Außerdem bietet FLIMX Werkzeuge u.a. zur Simulation zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten, zur Visualisierung von Fluoreszenzlebensdauern und anderer Parameter sowie zur statistischen Analyse einzelner FLIO-Messungen oder Probandengruppen. Anhand von Anwendungsbeispielen wurde die Wirksamkeit der neu entwickelten Verfahren demonstriert. Die Modellierung fluoreszierender Schichten wurde mittels aufwendiger Simulationen und experimenteller Messungen im Detail untersucht. Eine gute Wiederholbarkeit des FLIO-System konnte belegt werden. Beim Vergleich von vier FLIO-Geräten wies ein FLIO-Gerät moderate Abweichungen zu den übrigen FLIO-Geräten auf. Das Weitwinkelobjektiv liefert FLIO-Messungen mit einer guten Wiederholbarkeit, allerdings mit signifikanten Unterschieden zum Standardobjektiv. Der Blutzuckerspiegel hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds, die natürliche Augenlinse dagegen schon.

Abstract

This work is concerned with Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO), a new technique for the *in vivo* measurement of autofluorescence decays of endogenous fluorophores from the back of the human eye. The state of the art methods for the approximation of the fluorescence lifetime from the autofluorescence decays originate from microscopy and are therefore not adapted to the specific conditions of the *in vivo* measurements in the human eye. The aim of this work was to develop new methods of measurement data processing, which improve the fluorescence lifetime approximation, in particular in FLIO data, as well as the investigation of technical and physiological influencing factors of the FLIO technique.

Therefore, new methods for the treatment of artifacts caused by an inhomogeneous fluorescence distribution at the back of the eye as well as for the treatment of artifacts caused by reflections in the optical beam path of the FLIO system were developed in this work. The modeling of the time-resolved autofluorescence decay has been extended to consider the fluorescence from the back of the eye as a three-dimensional surface, to model the layered structure of the eye and to include the fluorescence of the crystalline lens from a separate measurement. Furthermore, methods have been developed to reduce errors in the fluorescence lifetime approximation by utilizing local information. On the technical side, the reproducibility of FLIO was investigated by means of dyes and volunteers, various FLIO systems were tested for comparability and the suitability of a wide-field lens for FLIO measurements was analyzed. Finally, the influence of the crystalline lens and the blood glucose level on the fluorescence lifetime from the retina was characterized in patients and volunteers respectively.

As a result of this work, the extensive FLIMX open-source software package was developed, which implements existing as well as the newly developed methods for the fluorescence lifetime approximation. In addition, FLIMX provides tools, e.g. for the simulation of time-resolved fluorescence decays, for the visualization of fluorescence lifetime and other parameters as well as for the statistical analysis of individual FLIO measurements and groups of patients / volunteers. The efficacy of the newly developed methods has been demonstrated using application examples. The modeling of fluorescent layers was investigated in detail by complex simulations and experimental measurements. A good repeatability of the FLIO system could be demonstrated. When comparing four FLIO devices, one FLIO device had moderate deviations from the other FLIO devices. The wide-field lens delivers FLIO measurements with good repeatability, but with significant differences to the standard lens. The blood glucose level has no influence on the fluorescence lifetime from the back of the eye, but the crystalline lens already has.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter des Instituts für Biomedizinische Technik und Informatik der Technischen Universität Ilmenau, Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Jens Haueisen, für seine fachliche Betreuung, für seine Unterstützung in allen organisatorischen und inhaltlichen Fragestellungen, für den nötigen Freiraum und für die hilfreichen Anregungen und vielen Denkanstöße, trotz stets gut gefülltem Terminkalender.

Außerordentlich danken möchte ich auch Herrn Doz. Dr.-Ing. habil. Dietrich Schweitzer für die unzähligen inspirierenden Diskussionen, der kritischen Auseinandersetzung mit den Inhalten der Arbeit, das unermüdliche Testen neuer Softwareversionen und die große Geduld, wenn sich doch ein Fehler eingeschlichen hatte. Er war für mich ein ständiger Ansprechpartner sowohl bei der Einarbeitung in die Thematik, sämtlichen inhaltlichen Fragestellungen und darüber hinaus.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Daniel Baumgarten danke ich für die Bereitschaft als Gutachter tätig zu werden, die vielen anregenden Diskussionen und die fachliche sowie organisatorische Unterstützung, insbesondere bei der Projektadministration.

Während der Bearbeitung der Dissertation war ich in die Bearbeitung zweier umfangreicher BMBF-Projekte und eines komplexen DFG-Projekts eingebunden, wodurch der Kreis der Kollegen, welche die Arbeit beeinflusst haben, entsprechend groß und vielschichtig ist. Allen aktiven und ehemaligen Projektmitarbeitern sowie engeren Kollegen, insbesondere Prof. Dr. Silvio Dutz, Prof. Dr. Sascha Klee, Prof. Dr. Edgar Nagel, Dr. Patrick Beßler, Dr. Roland Eichardt, Dr. Uwe Graichen, Dr. Kutaiba Saleh, Dr. Daniel Strohmeier, Alexander Dietzel, Lorenz Esch, Patrique Fiedler, Stefanie Freitag, Alexander Hunold, Luise Krüger, Daniel Laqua, Dietmar Link, Philipp Prinke, Steffen Rieger, Bernd-Ulrich Seifert und Stefan Schramm danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die Diskussionsbereitschaft, die Denkanstöße sowie die angenehme, kreative, konstruktive, freundliche, humorvolle und sportlich-aktive Atmosphäre. Dank geht auch an Antje Geißler für die unkomplizierte und schnelle fachliche Unterstützung bei der finanziellen Administration des EyeTSS-Projekts, des DFG-Projekts sowie der DAAD-Projekte.

Großer Dank gilt der Gruppe der experimentellen Ophthalmologie an der Universitäts-Augenklinik des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, insbesondere Dr. Martin Hammer, Sven Peters, Lydia Sauer und Johanna Schmidt für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Anregungen, die vielen erleuchtenden Einblicke in medizinische Hintergründe, das Zur-Verfügung-Stellen von Messdaten sowie die angenehme Atmosphäre.

Danksagung

Ebenso danke ich allen Studenten, die durch ihre Arbeiten zu dieser Dissertation beigetragen haben, insbesondere Nico Wulfänger.

Den zahlreichen Probanden danke ich an dieser Stelle noch einmal für ihre bereitwillige Teilnahme an den verschiedenen Studien.

Für den nicht minder wichtigen Ausgleich außerhalb der wissenschaftlichen Arbeit möchte ich mich bei den Volleyballvereinen in Ilmenau, Ohrdruf und Erfurt bedanken, sowie bei allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die mich ermutigt und unterstützt haben.

An letzter und bedeutendster Stelle möchte ich meinen Eltern Karin und Konrad danken. Sie haben mich stets ermutigt, mir immer einen starken Rückhalt gegeben und mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Auch bei meiner Freundin Sandra danke ich für die Unterstützung, die begleitenden Ratschläge, die moralische Stütze sowie die Geduld und das Verständnis während der Erstellung des Manuskripts.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen	5
2.1 Fluoreszenz von Molekülen.....	5
2.1.1 Anregung	5
2.1.2 Fluoreszenzemission.....	6
2.1.3 Konkurrierende Prozesse	7
2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer.....	8
2.1.5 Fluoreszenzanisotropie.....	10
2.2 Das menschliche Auge.....	10
2.2.1 Anatomie und Physiologie.....	10
2.2.2 Fluoreszenz okularer Gewebe	12
2.2.3 Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse	14
3 Stand der Technik.....	17
3.1 Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz am Auge	17
3.1.1 FLIO-Prototyp 1	17
3.1.2 FLIO-Prototyp 2	18
3.1.3 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen	19
3.1.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenz an dreidimensionalen Oberflächen	21
3.1.5 Fluoreszenz von Schichtenstrukturen	23
3.2 Messung der optischen Systemübertragungsfunktion	24
3.2.1 Messung in Reflexion.....	24
3.2.2 Messung mittels Fluorophor	25
3.3 Vorverarbeitung: Statisches Binning	26
3.4 Modellierung zeitaufgelöster Fluoreszenzsignale	27
3.4.1 Daten	27
3.4.2 Multi-exponentieller Ansatz	28
3.4.3 Stretched Exponentials Ansatz	28
3.4.4 Spektrale globale Analyse.....	28
3.4.5 Örtliche globale Analyse.....	29
3.4.6 Incomplete Decay	29

3.4.7	Laguerre Expansion	30
3.5	Gütekriterium der Modellierung	31
3.6	Nachverarbeitung	32
4	Ziel der Arbeit	33
5	Integrative Methodik zur Approximation zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten vom Auge	35
5.1	Vorverarbeitung	35
5.1.1	Adaptives Binning	35
5.1.2	Behandlung von Reflexionen im Fluoreszenzsignal	37
5.2	Modellierung der Fluoreszenz der Augenlinse	38
5.2.1	Schichtbasierter Ansatz	38
5.2.2	Linsen-korrigierter Ansatz	39
5.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenz an dreidimensionalen Oberflächen	40
5.3.1	Modellfunktion	40
5.3.2	Ansatz zur Fixierung der Zeitverschiebung	41
5.4	Bestimmung der Modellparameter	41
5.4.1	Minimierungsalgorithmen	41
5.4.2	Verteilte Berechnung	43
5.5	Verbesserung der Fluoreszenzlebensdauer-Approximation	45
5.5.1	Ausnutzung örtlicher Information	45
5.5.2	Iterativer Algorithmus zur Behandlung von Ausreißern	45
5.6	Methodik zur statistischen Auswertung der Approximationsergebnisse	47
5.6.1	Region of Interest	47
5.6.2	Gruppenvergleich	47
5.7	Anwendungsbeispiele	48
5.7.1	Vorbetrachtungen	48
5.7.2	Adaptives Binning	49
5.7.3	Fixierung der Zeitverschiebung	49
5.7.4	Modellierung	50
5.7.5	Gruppenvergleich	50
5.8	Analyse des schichtbasierten Ansatzes	51
5.8.1	Simulationen	51
5.8.2	Experimentelle Messungen	57
5.9	Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	62
5.9.1	Wiederholbarkeit	62
5.9.2	Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme	64
5.9.3	Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv	66
5.10	Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	68

5.10.1	Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse	68
5.10.2	Glukoseprovokation	69
6	Ergebnisse.....	71
6.1	Softwarepaket FLIMX	71
6.1.1	Konzept.....	71
6.1.2	Verteilte Berechnung.....	78
6.2	Anwendungsbeispiele	79
6.2.1	Adaptives Binning	79
6.2.2	Fixierung der Zeitverschiebung	80
6.2.3	Modellierung	81
6.2.4	Gruppenvergleich	83
6.3	Analyse des schichtbasierten Ansatzes	85
6.3.1	Simulationen.....	85
6.3.2	Experimentelle Messungen	93
6.4	Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	95
6.4.1	Wiederholbarkeit.....	95
6.4.2	Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme.....	101
6.4.3	Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv.....	103
6.5	Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	107
6.5.1	Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse	107
6.5.2	Glukoseprovokation	110
7	Diskussion.....	113
7.1	Softwarepaket FLIMX	113
7.1.1	Konzept und Implementierung.....	113
7.1.2	Verteilte Berechnung.....	113
7.1.3	Vergleich mit anderen Softwarepaketen	113
7.2	Anwendungsbeispiele	114
7.3	Analyse des schichtbasierten Ansatzes	116
7.4	Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	117
7.4.1	Wiederholbarkeit.....	117
7.4.2	Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme.....	118
7.4.3	Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv.....	118
7.5	Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode	119
7.5.1	Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse	119
7.5.2	Glukoseprovokation	120
8	Zusammenfassung und Ausblick	121
	Literatur	125

Abbildungsverzeichnis	135
Tabellenverzeichnis	143
Anhang	145
A: Parameter der verwendeten Minimierungsalgorithmen.....	145
B: Zusätzliche Ergebnisse: Analyse des schichtbasierten Ansatzes, Simulationen mit zwei Fluorophoren.....	146
C: Zusätzliche Ergebnisse: Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme.....	150
D: Zusätzliche Ergebnisse: Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv	152
E: Zusätzliche Ergebnisse: Glukoseprovokation	153
Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	155
Patente	155
Offengelegt.....	155
Eingereicht.....	155
Beiträge in Fachzeitschriften	156
Konferenzbeiträge.....	157
Thesen	161

Abkürzungsverzeichnis

*	Faltungsoperator
c_l^a	Laguerre Expansionskoeffizient
d_l^a	Laguerre Funktion l -ter Ordnung
v_k^a	digitale Faltung der IRF mit den Laguerre Funktionen („key variables“)
a	Laguerre-Parameter
AGE	advanced glycation endproducts
AMD	altersbezogene Makuladegeneration
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
ap	Abtastpunkt
AP	Gesamtzahl der gemessenen Stützstellen des Fluoreszenzsignals
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. area under curve)
b	Offset
c	Lichtgeschwindigkeit
ch	spektraler Kanal (engl. spectral channel)
CPU	Hauptprozessor (engl. central processing unit)
cSLO	Konfokales Scanning Laser Ophthalmoskop (engl. Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope)
CV	Variationskoeffizient (engl. coefficient of variation)
d	Abstand bzw. Wegstrecke
dx	Wegdifferenz
e	Eulersche Zahl
E_A	Energie des absorbierten Photons
E_E	Energie des emittierten Fluoreszenzphotons
E_h	energetisch höherer Zustand
E_n	energetisch niedrigerer Zustand
ETDRS	early treatment diabetic retinopathy study
F	Binning-Faktor
f	Modellfunktion
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAF	Fundusautofluoreszenz
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FLIMX	Fluorescence Lifetime Imaging eXplorer
FLIO	fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy
fp	Anzahl der freien Parameter des Modells
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

Abkürzungsverzeichnis

FWHM	Halbwertsbreite (engl. full width at half maximum)
GUI	Graphische Benutzeroberfläche (engl. graphical user interface)
h	Planck'sche Wirkungsquantum
h	Fluoreszenzimpulsantwort
HT	Hyper-Threading, Implementierung von hardwareseitigem Multithreading in Intel-Prozessoren
I	Fluoreszenzintensität
i	Index der Exponentialfunktion
I_0	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0$
I_c	berechnete Fluoreszenzintensität
I_D	durchschnittliche Fluoreszenzintensität über alle Pixel
I_M	gemessene Fluoreszenzintensität
IRF	instrument response function
j	Anzahl der berücksichtigten Zeitperioden
K	zeitliche Länge der Fluoreszenzimpulsantwort
k_{NS}	nicht-strahlende Übergangsrate (keine Emission von Fluoreszenzphotonen)
k_S	Übergangsrate für die Emission von Photonen ohne andere Relaxationsmöglichkeiten
l	Kantenlänge des Filterfensters in Pixeln
L	Anzahl der benutzten Laguerre Funktionen
m	Anzahl der Zeitkanäle im Photonenhistogramm
MANOVA	Mehrfaktorielle Varianzanalyse (engl. multivariate analysis of variance)
MCP-PMT	micro channel plate photomultiplier tube
MW	Mittelwert
N	Anzahl der angeregten Moleküle
n	Brechzahl
N_0	Anzahl der angeregten Moleküle zum Zeitpunkt $t = 0$
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
nC	Anzahl der Histogrammklassen
p	Wahrscheinlichkeit (engl. probability)
PI	Kaliumiodid (engl. potassium iodide)
Q	relativer Anteil (Äquivalent zur Fläche unter der Exponentialfunktion)
QA	Fluoreszenzquantenausbeute
ROC	receiver operating characteristic
RPE	retinales Pigmentepithel
s	Irrtumswahrscheinlichkeit
S_0, S_1, S_2	Singulettzustand
SD	Standardabweichung

SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
β	Streckungsexponent
t	Zeitpunkt
T	Abtastintervall
T_0, T_1, T_2	Tripletzustand
tc	Abstand zwischen zwei fluoreszierenden Schichten (in Zeiteinheiten)
TCSPC	zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (engl. time-correlated single photon counting)
th	Schwellwert
t_R	Zeitdauer zwischen zwei Laserpulsen (reziproke der Laserpulswiederholrate)
$w(t_j)$	Wichtung in Zeitkanal j
x, y	Koordinaten eines Bildpunktes
α	Amplitude zur Fluoreszenzlebensdauer
λ_A	Wellenlänge der absorbierten elektromagnetischen Strahlung
λ_E	Wellenlänge des emittierten Photons
ν_A	Frequenz der absorbierten elektromagnetischen Strahlung
ν_E	Frequenz des emittierten Photons
τ	Fluoreszenzlebensdauer
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer unter Berücksichtigung der Mikroumgebung
τ_S	intrinsische Lebensdauer des angeregten Zustands ohne andere Relaxationsmöglichkeiten
χ^2	Gütekriterium
χ_r^2	reduzierte Form des Gütekriteriums

1 Einleitung

Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO) ist ein neues Verfahren zur *in vivo* Messung von Intensität und Abklingen der Autofluoreszenz endogener Fluorophore des Augenhintergrundes. Es erzeugt eine quantitative Basis der Fluoreszenzlebensdauer der verschiedenen Fluorophore im Augenhintergrund und erweitert damit die aktuelle Bildgebung auf Basis der Autofluoreszenzintensität [1, 2]. Jedes Fluorophor besitzt eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer, welche auch durch die Umgebung des Moleküls beeinflusst wird (u.a. durch das Lösungsmittel, eine Bindung an ein Protein oder durch Stöße mit anderen Molekülen).

Das Ziel von FLIO im menschlichen Auge ist die Früherkennung von Augenerkrankungen und andere Erkrankungen durch Messungen am Augenhintergrund. Eine weitere Anwendung von FLIO liegt in der Grundlagenwissenschaft, beispielsweise um pathologische Zusammenhänge in Stoffwechselerkrankungen zu entdecken [3]. FLIO am Augenhintergrund hat das Potential ein wertvolles diagnostisches Werkzeug zur Erkennung funktioneller Veränderungen zu sein, um bei Augenerkrankungen wie z.B. altersbezogener Makuladegeneration (AMD) [4], diabetischer Retinopathie oder Glaukom Veränderungen zu erkennen, bevor morphologische Schäden entstehen. In der Augenheilkunde hat die frühe Detektion von Erkrankungen einen besonderen Stellenwert, da die meisten Krankheiten noch nicht heilbar sind. Meist kann nur der Krankheitsverlauf abgemildert werden. AMD ist in Europa, den USA und in Australien die häufigste Ursache für Erblindung [5, 6], Diabetische Retinopathie ist knapp hinter Glaukom die dritthäufigste Erblindungsursache. 82% der erblindeten Personen sind über 50 Jahre alt [7]. Sobald pathologische Veränderungen am Augenhintergrund für den Augenarzt sichtbar auftreten, können diese bereits teilweise oder vollständig nicht mehr umgekehrt werden. Noch bevor es zu sichtbaren Veränderungen kommt, treten bereits Verschiebungen von Gleichgewichten in Stoffwechselprozessen auf. Diese Änderungen der Stoffwechselprozesse sind reversibel. Ein Ungleichgewicht, z.B. durch mangelnde Sauerstoffversorgung über einen längeren Zeitraum, führt letztlich zu bleibenden Schäden des Gewebes. An Stoffwechselprozessen, wie dem Citratzyklus, beteiligte Koenzyme sind u.a. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) sowie Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) [8]. FAD und NADH lassen sich zur Fluoreszenz anregen. Weiterhin besitzen einige Stoffwechselendprodukte, wie beispielsweise Lipofuszin [9-12] oder Advanced Glycation Endproducts (AGE), fluoreszierende Eigenschaften. Die Anlagerung dieser Stoffwechselendprodukte spielt eine Rolle bei der Versorgung der Retina und damit bei der Ausbildung von pathologischen Veränderungen. Daher wird die Fundusautofluoreszenz (FAF) durch eine Reihe von Forschungsgruppen untersucht [1, 13-15].

Eine intrinsische Stoffeigenschaft ist die Fluoreszenzlebensdauer (Lifetime) [16]. Sie gibt die mittlere Verweildauer eines Atoms / Moleküls im angeregten Zustand an und liegt üblicherweise im ps bis ns Bereich. Die Fluoreszenzlebensdauer liefert somit andere Informationen als die Fluoreszenzintensität und wird daher unter der Bezeichnung Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) [17, 18] von einigen Forschungsgruppen zur Gewebecharakterisierung und Diagnose verwendet [19-24]. Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy zur *in vivo* Bildgebung der Fluoreszenzlebensdauer am Auge wurde von Schweitzer et al. [25] entwickelt und ermöglicht es Stoffwechselfparameter der menschlichen Retina zu beobachten [3]. Es wurden beispielsweise Fluoreszenzlebensdauern von sub-retinalen Ablagerungen metabolischer Nebenprodukte (Drusen), von Zellen des retinalen Pigmentepitheliums (RPE) und der Bruch'schen Membran in histologischen Schnitten von menschlichen Spenderaugen bestimmt [26]. Der Einfluss des Makulapigments auf die Fluoreszenzlebensdauer wurde in gesunden Probanden untersucht [27]. Weiterhin wurden Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauer in Patienten mit Gefäßverschlüssen [28, 29], Glaukom [30], diabetischer Retinopathie [31, 32], Alzheimer [33] und Morbus Stargardt [34] gefunden. In Bezug auf Tiermodelle wurden bisher FLIO-Messungen an Mäusen durchgeführt [35, 36].

FLIO basiert auf in der Mikroskopie angewandten FLIM-Verfahren. In der Mikroskopie werden in der Regel Farbstoffe bzw. Fluorophore verwendet, mit welchen die interessanten Strukturen angefärbt werden bzw. spezifische Moleküle (z.B. DNA-Stränge, Antikörper) markiert werden. Diese Farbstoffe haben zum einen meist hohe Quantenausbeuten (Abschnitt 2.1.3) und zum anderen klar definierte spektrale Eigenschaften sowie Fluoreszenzlebensdauern. Weiterhin kann die Anzahl der unterschiedlichen Farbstoffe in einer Aufnahme durch das Design des Experimentes bestimmt werden und ist im Allgemeinen gering (oft 2 bis 3). Im Gegensatz zu den meisten FLIM-Anwendungen in der Mikroskopie wird bei FLIO, und u.a. teilweise in der Krebsdiagnostik, ohne Farbstoffe gearbeitet. Dies soll die Belastung für die Patienten geringhalten, da Farbstoffe bzw. Kontrastmittel bei anderen Bildgebungsmodalitäten oft zu Unverträglichkeiten wie z.B. allergischen Reaktionen führen. Außerdem existieren entsprechend geeignete Farbstoffe noch nicht bzw. fehlen Untersuchungen dazu. Die Messung von Autofluoreszenz stellt allerdings deutlich höhere Anforderungen an die Messtechnik, da die natürlich vorkommenden Fluorophore geringe Quantenausbeuten besitzen. Insbesondere die Begrenzung der Strahlungsleistung zur Fluoreszenzanregung im lebenden menschlichen Auge stellt eine große Limitation dar. Im Gegensatz zur Messung einer definierten Anzahl von Farbstoffen wird bei der Autofluoreszenzmessung am Auge eine unbekannte Anzahl von Fluorophoren zur Fluoreszenz angeregt, welche zusätzlich aus unterschiedlich weit voneinander entfernten Schichten stammen, was in einem deutlich komplexeren Fluoreszenzsignal resultiert. Die Fluoreszenzlebensdauer selbst ist nicht direkt messbar. Sämtliche verfügbaren Algorithmen zur Approximation der Fluoreszenzlebensdauern, u.a. [37-41], sind für die Anwendung in der Mikroskopie

und damit in erster Linie für die Analyse von Farbstoffen konzipiert. So kann beispielsweise eine geringe Veränderung der Approximationsparameter, z.B. Verschiebung der linken Grenze des zeitlichen Approximationsbereiches in SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) um eine Zeiteinheit die approximierten Fluoreszenzlebensdauern bereits über 10% verändern.

Die Zielstellung der Arbeit ist die Modellierung und Verarbeitung der FLIO-Messdaten an die speziellen Gegebenheiten am menschlichen Auge anzupassen, um Unsicherheiten in den bestimmten Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund zu reduzieren. Darüber hinaus werden ausgewählte technische und physiologische Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode untersucht, um die FLIO-Methode weiterzuentwickeln. In Summe soll die Arbeit einen Beitrag dazu leisten, FLIO in der klinischen Anwendung, zumindest im Bereich der Forschung, zu etablieren.

Die vorliegende Arbeit ist in 8 Hauptkapitel unterteilt. Nach der Einleitung werden in Kapitel 2 die Grundlagen bezüglich Anatomie und Physiologie des menschlichen Auges, Fluoreszenz im Allgemeinen und Fluoreszenz speziell am Auge beschrieben. In Kapitel 3 wird der Stand der Technik der FLIO-Methode dargelegt. Dies betrifft sowohl die Aufnahmetechnik als auch die Verarbeitung der Messdaten. Basierend auf den Kapiteln 2 und 3 erfolgt die Präzisierung der Zielstellung in Kapitel 4. In Kapitel 5 wird die methodische Herangehensweise der Arbeit zum Erreichen der Zielstellung dargelegt. Dies beinhaltet neue Ansätze zur Modellierung sowie neue Methoden zur Vor- und Nachbearbeitung der Messdaten als auch die Methodik zur statistischen Auswertung. Weiterhin werden in diesem Kapitel die durchgeführten Simulationen und experimentellen Messungen zur Analyse der Modellierung beschrieben sowie die Designs der Studien zu den FLIO-Einflussfaktoren aufgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in Kapitel 6 dargelegt. Ebenso wird in Kapitel 6 das im Rahmen der Arbeit entstandene Softwarepaket beschrieben. Die erreichten Ergebnisse werden anschließend in Kapitel 7 bewertet und diskutiert. Eine zusammenfassende Darstellung der wissenschaftlichen Beiträge der Arbeit sowie ein Ausblick werden in Kapitel 8 gegeben.

2 Grundlagen

2.1 Fluoreszenz von Molekülen

2.1.1 Anregung

Im Allgemeinen wird der innere Energiezustand eines Moleküls durch verschiedene innere Freiheitsgrade bestimmt. Die Bewegung eines Moleküls im Raum wird als Translationsfreiheitsgrad beschrieben. Weitere Freiheitsgrade beschreiben Schwingungs- und Rotationszustände und liegen in Energiebereichen von ca. 0,1 eV bzw. 0,001 eV [42]. Als elektronische Freiheitsgrade werden Änderungen der energetischen Zustände gebundener Elektronen bezeichnet. Diese besitzen charakteristische Energien von 1-10 eV. Durch Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung kann ein Molekül in einen energetisch höheren Zustand gebracht werden. Um ein Photon zu absorbieren, muss die Bohr'sche Frequenzbedingung erfüllt sein:

$$E_A = E_h - E_n = h \cdot \nu_A = \frac{h \cdot c}{\lambda_A} \quad (2.1)$$

Hierbei steht E_A für die Energie des absorbierten Photons, E_n für den energetisch niedrigeren Zustand, E_h für den energetisch höheren Zustand, h für das Planck'sche Wirkungsquantum, c für die Lichtgeschwindigkeit, ν_A für die Frequenz und λ_A für die Wellenlänge der absorbierten elektromagnetischen Strahlung. Mit Hilfe der oben angegebenen Energien und Gleichung 2.1 lassen sich die Wellenlängen für die Anregung abschätzen. Rotationsübergänge liegen demnach im Mikrowellenspektralbereich, Schwingungsübergänge im Infrarotbereich und elektronische Übergänge im sichtbaren bis ultravioletten Spektralbereich. Der Grundzustand, d.h. der Zustand der niedrigsten Energie, wird als Singulettgrundzustand S_0 bezeichnet, wo sich die meisten Moleküle im thermischen Gleichgewicht befinden. Die Absorption eines Photons findet aus dem S_0 Zustand heraus in ein beliebiges Schwingungs- bzw. Rotationsniveau eines angeregten Zustands S_1, S_2, S_3, \dots , meist S_1 , statt und dauert ca. 10^{-15} s. Durch den als Internal Conversion bezeichneten Vorgang fällt das Molekül innerhalb von 10^{-14} s bis 10^{-10} s strahlungslos auf ein höheres Schwingungsniveau von S_1 und anschließend durch Schwingungsrelaxation in das unterste Schwingungsniveau S_{10} von S_1 . Die intrinsische Lebensdauer des thermisch equilibrierten S_{10} -Zustands beträgt ca. 10^{-9} bis 10^{-8} s. Der gesamte Prozess ist im Jablonski-Diagramm in Abb. 2.1 dargestellt.

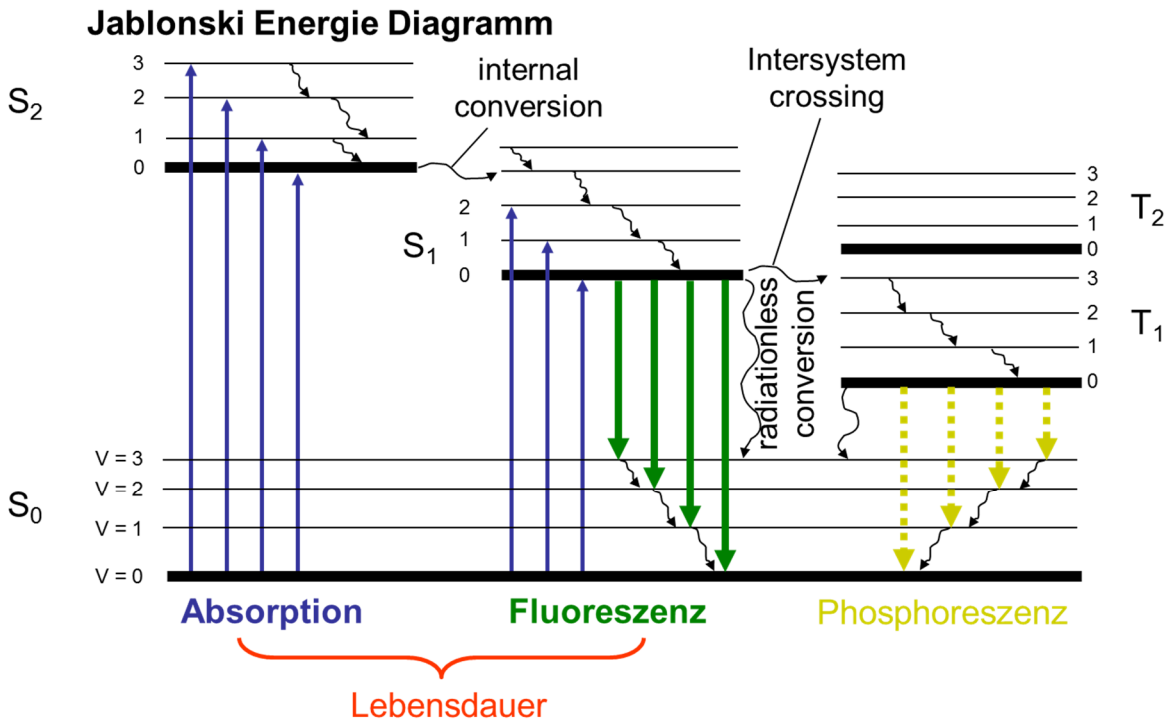


Abbildung 2.1 Jablonski Diagramm mit den verschiedenen Singulettgrund- und Triplettzuständen eines Moleküls. Die Energie eines absorbierten Anregungsphotons (blau), versetzt das Molekül in einen angeregten Zustand, von dem es durch Internal Conversion in das unterste Schwingungsniveau von S₁ gelangt. Die Verweildauer in diesem Zustand bestimmt die Fluoreszenzlebensdauer. Die Rückkehr in den Grundzustand S₀ kann strahlungslos, durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons (grün) oder in einen Triplettzustand durch Intersystem crossing erfolgen, wodurch ein Phosphoreszenzphoton (gelb) abgegeben werden kann.

2.1.2 Fluoreszenzemission

Die Rückkehr vom Zustand S₁₀ in ein Schwingungsniveau S_{0i} des Grundzustands S₀ kann unter Aussenden eines Photons erfolgen, was als Fluoreszenz bezeichnet wird und zuerst von Stokes [43] beschrieben wurde. Die energetische Struktur der Singulettzustände bestimmt die Übergangswahrscheinlichkeit für den elektronischen Dipolübergang. Daraus ergibt sich die intrinsische Übergangsrates für die Emission von Photonen ohne andere Relaxationsmöglichkeiten:

$$k_S = \frac{1}{\tau_S} \tag{2.2}$$

τ_S ist die intrinsische Lebensdauer des angeregten Zustands ohne andere Relaxationsmöglichkeiten.

Die Energie des emittierten Fluoreszenzphotons E_E beträgt:

$$E_E = E_{S_{10}} - E_{S_{0i}} = h \cdot \nu_E = \frac{h \cdot c}{\lambda_E} \tag{2.3}$$

Hierbei steht E_E für die Energie, ν_E für die Frequenz und λ_E für die Wellenlänge des emittierten Photons. Da bei der Schwingungsrelaxation Energie an die Umgebung des Moleküls abgegeben wird, ist nach Gleichung 2.1 die Wellenlänge der emittierten Fluoreszenzphotonen länger als die der Anregungsphotonen. Die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokes-

Shift bezeichnet und beträgt meist 20-50 nm, bei organischen Molekülen auch 100 nm durch die Vielzahl von Schwingungszuständen [44]. Dadurch lassen sich Anregungs- und Emissionsstrahlung voneinander trennen, beispielsweise durch den Einsatz geeigneter optischer Filter. Aufgrund der großen Anzahl an Schwingungsniveaus im Grund- als auch im angeregten Zustand ergeben sich ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum, welche sich oft überlappen und in ihrer Form gespiegelt zueinander sind. Das Absorptionsspektrum wird durch die Schwingungsniveaus des angeregten Zustands bestimmt, während das Emissionsspektrum die Schwingungsniveaus des Grundzustands darstellt.

2.1.3 Konkurrierende Prozesse

Die Rückkehr in den Grundzustand S_0 kann, außer durch Emission von Fluoreszenzphotonen, auch strahlungslos durch verschiedene Prozesse stattfinden. Durch Internal Conversion ist ein Übergang vom angeregten Zustand S_{10} strahlungslos auf ein höheres Schwingungsniveau von S_0 mit anschließender Schwingungsrelaxation in das unterste Schwingungsniveau möglich. Weiterhin kann es durch Intersystem Crossing zu einem strahlungslosen Übergang mit Spinumkehr vom Singulettzustand S_1 zum Triplettzustand T_1 kommen. Beim Übergang vom Triplettzustand T_1 zum Grundzustand S_0 spricht man von Phosphoreszenz. Die Übergangsraten der Phosphoreszenz sind deutlich geringer als die der Fluoreszenz. Daraus folgt eine längere Lebensdauer für den Triplettzustand T_1 . Weiterhin kann es zu Wechselwirkungen mit Molekülen in der Umgebung kommen, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird. Die Energie des angeregten Zustands kann durch den Stoß mit einem Umgebungsmolekül abgegeben werden (dynamisches Quenching). Beim statischen Quenching kommt es zur Komplexbildung mit einem benachbarten Molekül, wobei ebenfalls die Energie des angeregten Zustands abgegeben wird. Eine Erhöhung der Konzentration der Quenching-Moleküle erhöht die Fluoreszenzauslöschung und verringert damit die Fluoreszenzintensität. Eine Temperaturerhöhung führt bei dynamischen Quenching zu einer Erhöhung der Fluoreszenzauslöschung, da die Wahrscheinlichkeit für Stöße steigt. Bei statischem Quenching führt eine Temperaturerhöhung zu einer Verringerung der Fluoreszenzauslöschung, da die Wechselwirkungszeit abnimmt und dadurch die Wahrscheinlichkeit der Komplexbildung sinkt. Eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung mit Umgebungsmolekülen ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), zuerst beschrieben durch Förster [45]. Dabei wird die Energie des angeregten Zustands vom abgebenden Molekül (Donor) strahlungslos über direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein benachbartes Akzeptormolekül übertragen. Voraussetzungen dafür sind u.a. die Überlappung des Emissionsspektrums des Energie abgebenden Moleküls mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls, eine möglichst parallele Orientierung der elektronischen Schwingungsebenen beider Moleküle sowie insbesondere der Abstand der Moleküle von weniger als

5 nm [46]. FRET kann messtechnisch nicht direkt nachgewiesen. In Folge des Energietransfers nehmen jedoch die Strahlungsintensität und die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs ab, da die Verweildauer des Donormoleküls im angeregten Zustand durch den Energietransfer verkürzt wird. Weiterhin ist die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffs nur bei erfolgreichem Energietransfer nachweisbar [16, 47]. Letztlich kann es zu excited state reactions kommen. Dabei wird die elektronische Verteilung des Moleküls durch die Absorption eines Photons so stark verändert, dass sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften entscheidend ändern. Durch Reaktion mit benachbarten Molekülen kann es zur excimer- und exciplex-Bildung kommen, welche veränderte Absorptions- und Emissionsspektren bzw. gar keine Fluoreszenz mehr zeigen. Findet die Gegenreaktion nicht in sehr kurzem zeitlichen Abstand statt, so verringert sich die Fluoreszenzintensität über die Zeit bei konstanter Intensität des Anregungslichts und wird oft als Ausbleichen bezeichnet.

Mit Hilfe der Fluoreszenzquantenausbeute QA lässt sich der Einfluss der konkurrierenden Prozesse quantifizieren. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen und setzt sich aus strahlender Übergangsrate k_S (Emission von Fluoreszenzphotonen) und nicht-strahlender Übergangsrate k_{NS} (keine Emission von Fluoreszenzphotonen) zusammen, wobei k_{NS} die Summe der Übergangsraten aller nicht-strahlenden Prozesse ist:

$$QA = \frac{k_S}{k_S + k_{NS}} \quad (2.4)$$

Eine Quantenausbeute von nahezu 1 bedeutet, dass die Rückkehr in den Grundzustand fast ausschließlich durch Emission von Fluoreszenzphotonen erfolgt. Dies trifft beispielsweise auf Laserfarbstoffe zu.

2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer

Ein charakteristischer Parameter der Fluoreszenz eines Moleküls ist die Fluoreszenzlebensdauer. Eine mögliche Definition der Fluoreszenzlebensdauer ergibt sich aus dem Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität nach der Anregung mit einem ideal kurzen Lichtimpuls. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzintensität auf $1/e$ des Maximums abgefallen ist, ist die Fluoreszenzlebensdauer τ . Für die Menge der angeregten Moleküle gibt die Fluoreszenzlebensdauer die mittlere Verweildauer im angeregten Zustand an. Diese phänomenologische Definition berücksichtigt nicht die in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen konkurrierenden Prozesse und muss daher erweitert werden.

Für N angeregte Moleküle ergibt sich aus strahlender Übergangsrate und nicht-strahlender Übergangsrate folgender Zusammenhang:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_S + k_{NS}) \cdot N(t) \quad (2.5)$$

Unter der Annahme, dass sich zum Zeitpunkt $t = 0$ N_0 Moleküle im angeregten Zustand befinden, lässt sich die Differentialgleichung lösen:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_F}} \quad (2.6)$$

Dabei wurden Übergangsraten durch die Fluoreszenzlebensdauer τ_F ersetzt:

$$\tau_F = \frac{1}{k_S + k_{NS}} \quad (2.7)$$

Dies bedeutet, dass die Mikroumgebung direkt die beobachtete Fluoreszenzlebensdauer beeinflusst. Ein Anstieg der nicht-strahlenden Übergangsraten verursacht durch Internal Conversion, Intersystem Crossing, Quenching oder FRET verringert die Quanteneffizienz und führt zu kürzeren Fluoreszenzlebensdauern. Typische Werte für Fluoreszenzlebensdauern liegen im ps bis ns Bereich.

Die beobachtete Fluoreszenzintensität $I(t)$ zum Zeitpunkt t ist proportional zur Anzahl der angeregten Moleküle $N(t)$ und kann daher in Gleichung 2.6 ersetzt werden:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_F}} \quad (2.8)$$

Dabei ist I_0 die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0$. Abb. 2.2 zeigt ein normiertes Fluoreszenzsignal. Die Zeitdifferenz zwischen dem Maximum des Fluoreszenzsignals und dem Reziproken der Eulerschen Zahl (0,37) entspricht der Fluoreszenzlebensdauer τ .

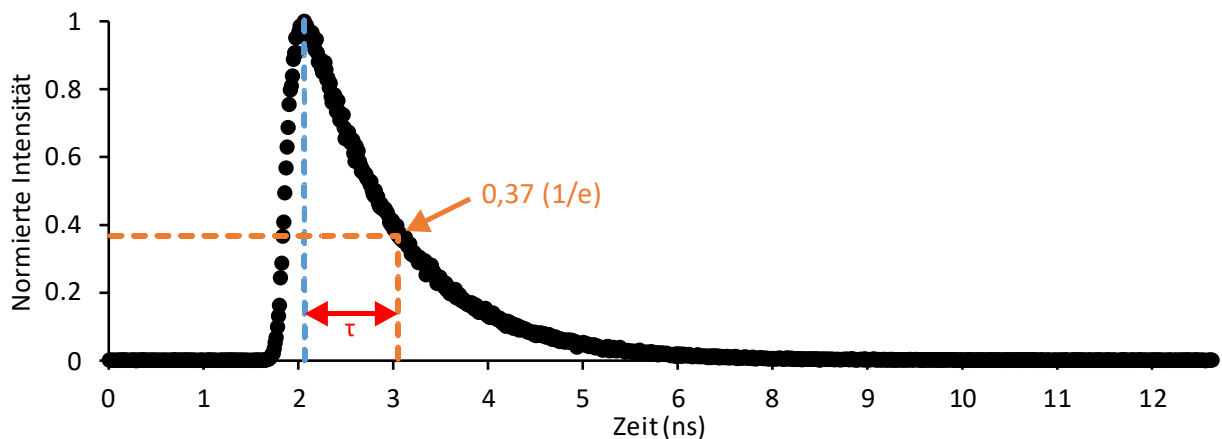


Abbildung 2.2 Normiertes zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 1 ns. Die Zeitdifferenz zwischen dem Maximum des Fluoreszenzsignals und dem Reziproken der Eulerschen Zahl (0,37) entspricht der Fluoreszenzlebensdauer τ .

In komplexen biologischen System tragen oft mehrere Fluorophore zur Gesamtfluoreszenz bei. Auch eine Inhomogenität der Probe oder mehrere Fluoreszenzzentren in einem Molekül können zu einem komplexeren Fluoreszenzsignal führen. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität lässt sich dann mit erweiterten Ansätzen beschreiben, welche in Abschnitt 3.4 beschrieben sind.

2.1.5 Fluoreszenzanisotropie

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Fluoreszenz ist die Anisotropie, welche für die Arbeit keine Rolle spielt und daher hier nur kurz beschrieben wird.

Messungen der Fluoreszenzanisotropie sind beispielsweise für biochemische Untersuchungen ein nützliches Werkzeug. Dabei wird ausgenutzt, dass eine Fluoreszenzanregung mit polarisiertem Licht zu einer ebenfalls polarisierten Fluoreszenzemission führt. Der Grad der Polarisierung der Fluoreszenzemission wird als Anisotropie bezeichnet. Der Ursprung der Anisotropie liegt in der Existenz von Übergangsmomenten für Absorption in Emission begründet, welche entlang bestimmter Richtungen innerhalb des Fluorophormoleküls liegen. In einer homogenen Lösung sind die Richtungen der Grundzustände der Fluorophormoleküle ungeordnet. Wird die Lösung mit polarisiertem Licht bestrahlt, werden vorzugsweise die Moleküle angeregt, deren Absorptionsübergangsmoment in Richtung des Vektors des elektrischen Feldes des einfallenden Lichts zeigt. Die Fluoreszenzemission kann durch eine Reihe von Prozessen depolarisiert werden, welche von der Probe abhängen. Rotationsmomente der Diffusion sind eine häufige Ursache für Depolarisation. Anisotropie Messungen sind daher ein Maß für die Drehung eines Fluorophores zwischen Anregung und der darauffolgenden Fluoreszenzemission. Das Ausmaß der Drehung eines Moleküls innerhalb der Dauer des angeregten Zustands hängt von Größe und Form des Moleküls sowie von der Viskosität des Lösungsmittels ab. In flüssigen Lösungen rotieren die meisten Moleküle vollständig innerhalb von 50-100 ps. Während der typischen Lebensdauer des angeregten Zustands von 1-10 ns rotieren die Moleküle daher mehrmals, was zu einer zufälligen Polarisationsrichtung der Fluoreszenzemission führt. In der Folge ist die detektierte Anisotropie in diesem Fall nahe Null [16, 47].

2.2 Das menschliche Auge

2.2.1 Anatomie und Physiologie

Der Prozess des Sehens verbindet eine Reihe komplexer Strukturen, von denen jede einen speziellen Zweck hat. Das Auge beherbergt die Elemente, welche Licht aufnehmen und in neuronale Signale umwandeln. Es wird durch umgebenden Knochen der Augenhöhle sowie durch das Augenlid vor äußeren Einflüssen geschützt. Ein ständiger Tränenfilm verhindert das Austrocknen der empfindlichen Hornhaut. Durch die äußeren Augenmuskeln kann das Auge bewegt werden. Die Koordination der Bewegung beider Augen ermöglicht binokulares Sehen. Ein Netzwerk aus Blutgefäßen versorgt das Auge mit Nährstoffen, während ein komplexes System von Nerven die sensorischen Informationen zum Gehirn weiterleitet sowie motorische Signale in das Auge überträgt. Die neuronalen Systeme im visuellen Kortex des Gehirns verarbeiten und interpretieren die vom Auge erfassten optischen Signale.

Abb. 2.3 stellt eine Skizze vom anatomischen Aufbau des menschlichen Auges sowie einige Schichten des Augenhintergrunds (Fundus) dar. Es besteht aus drei Kammern, der vorderen Augenkammer (begrenzt durch die Rückseite der Cornea (Hornhaut) und die Vorderseite der Iris), die hintere Augenkammer (begrenzt durch die Rückseite der Iris und die Vorderseite des Glaskörpers) sowie den Glaskörper

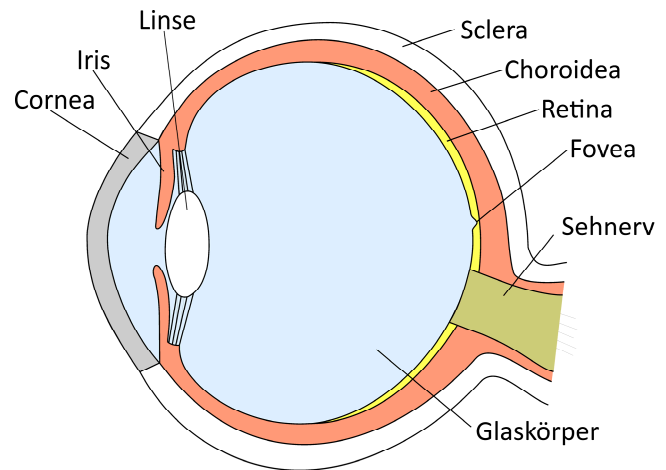


Abbildung 2.3 Schema vom anatomischen Aufbau des menschlichen Auges

(begrenzt durch die Rückseite der Linse und die Vorderseite der Retina (Netzhaut)). Das Kammerwasser, welches durch den Ziliarkörper gebildet wird, versorgt die angrenzenden Strukturen mit Nährstoffen, insbesondere Linse und Cornea. Die zur scharfen Abbildung eines Bildes auf die Retina benötigte Refraktion wird durch Cornea und Linse erzeugt. Für Objekte, die sich nah am Auge befinden, kann die Brechkraft des Auges durch eine Formänderung der Linse angepasst werden (Akkommodation). Die Lichtmenge wird durch eine Änderung des Durchmessers der Iris reguliert. Als äußere Begrenzung des Augapfels schließt sich der Cornea die Sclera (Lederhaut) an, welche zwischen 0,3 mm und 1 mm dick ist und relativ wenige Blutgefäße besitzt. Zwischen Sclera und Retina liegt die Choroidea (Aderhaut). In ihr verlaufen größere Arterien und Venen, welche auch die hinteren Schichten der Retina versorgen. Der Punkt des schärfsten Sehens auf der Retina ist die Fovea centralis mit einem Durchmesser von ca. 1,5 mm. Der restliche Bereich der Retina dient dem peripheren Sehen. Die Retina besitzt eine Dicke von durchschnittlich ca. 200 μm und besteht aus 10 Schichten [48]. Die innere Grenzmembran bildet die Grenze zwischen Glaskörper und Retina. Darunter befindet sich die Nervenfaserschicht, die etwa eine Million Ganglienzellaxone enthält, welche sternförmig von der Fovea hin zur Papille verlaufen. Die zugehörigen Ganglienzellen befinden sich in der angrenzenden Ganglienzellschicht, deren Dendriten in die darunterliegende innere plexiforme Schicht reichen. Sowohl in der Nervenfaserschicht als auch in der Ganglienzellschicht verlaufen die größeren Blutgefäße der Retina. In der inneren plexiformen Schicht, der inneren Körnerschicht sowie der äußeren plexiformen Schicht befinden sich neben Müllerzellen die Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen, welche die elektrischen Signale der Photorezeptoren vorverarbeiten und mittels der darüber liegenden Ganglienzellen die visuelle Information über den Sehnerv zum Corpus geniculatum laterale im Gehirn weiterleiten. Unter der äußeren plexiformen Schicht befindet sich die äußere Körnerschicht, welche die Zellkörper und Zellkerne der Photorezeptoren enthält. Im menschlichen Auge existieren zwei Arten von Photorezeptoren, Zapfen und Stäbchen, deren Zellkörper in der

äußeren Körnerschicht nebeneinander angeordnet sind. Die lichtsensitiven Fortsätze der Photorezeptorzellen erstrecken sich in Richtung der Choroidea, also vom einfallenden Licht weg. Unterhalb der äußeren Körnerschicht befindet sich die äußere Grenzmembran, welche eine undurchlässige Membran mit Öffnungen für den Durchtritt der Photorezeptoren ist. Die Photorezeptorschicht besteht aus dem Innensegment, in welchem die hauptsächliche Stoffwechselaktivität der Photorezeptoren stattfindet und dem Außensegment, in welchem die photoelektrische Transduktion [49, 50], d.h. die Umwandlung eines Lichtreizes in ein Rezeptorpotential (mittels in Diskmembranen eingelagertem Rhodopsin), stattfindet. Die letzte Schicht der Retina ist das retinale Pigmentepithel (RPE), welches für die Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen, den Abtransport von (Stoffwechsel-) Endprodukten sowie für die Aufarbeitung verbrauchter Diskmembranen sorgt. Darüber hinaus wird Licht, welches die Photorezeptoren passiert hat, durch im RPE enthaltenes Melanin absorbiert. Zwischen RPE und Choroidea befindet sich schließlich die Bruch'sche Membran, welche u.a. den Transport von Nährstoffen sowie Flüssigkeit zwischen RPE und Choroidea reguliert. Die beiden Arten der Photorezeptoren haben unterschiedliche Funktionen und treten in unterschiedlich großer Anzahl auf.

120 Millionen Stäbchen stehen ca. 6 Millionen Zapfen gegenüber. Die Stäbchen sind auf das Hell/Dunkel-Sehen spezialisiert und haben einen Empfindlichkeitsbereich von ca. 10^{-6} bis 10^2 cd/m². Für das Tag- bzw. Farbsehen sind hauptsächlich die Zapfen mit einem Empfindlichkeitsbereich von ca. 10^{-2} bis 10^{10} cd/m² zuständig [49, 51]. Die höchste Dichte der Zapfen ist in der Fovea zu finden [52]. Die Rezeptordichte verändert sich mit der Exzentrizität und ist unterschiedlich für Zapfen und Stäbchen, wie in Abb. 2.4 zu sehen ist.

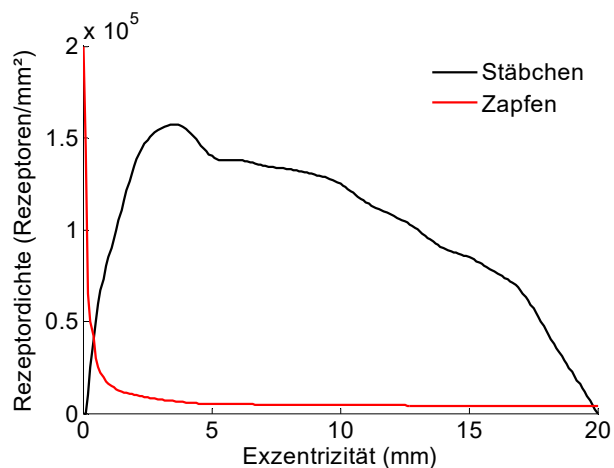


Abbildung 2.4 Dichte der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) in Abhängigkeit der Exzentrizität von der Fovea (nach [51]).

2.2.2 Fluoreszenz okularer Gewebe

Im menschlichen Auge sind eine Reihe von Stoffen bzw. Geweben zur Fluoreszenz anregbar. Mittels einem, dem FLIO-System (Abschnitt 3.1) ähnlichen, Aufbau mit nur einem spektralen Kanal (490–720 nm) hat Jentsch [53] die wichtigsten okularen Gewebe in jungen Schweinen untersucht. Die einzelnen okularen Gewebe wurden dazu freipräpariert. Abb. 2.5 stellt die Emissionsspektren bei

einer Anregung mit 446 nm dar. Die Spektren der einzelnen Gewebearten überlappen sich stark, so dass eine Trennung rein auf Basis spektraler Eigenschaften nicht möglich scheint.

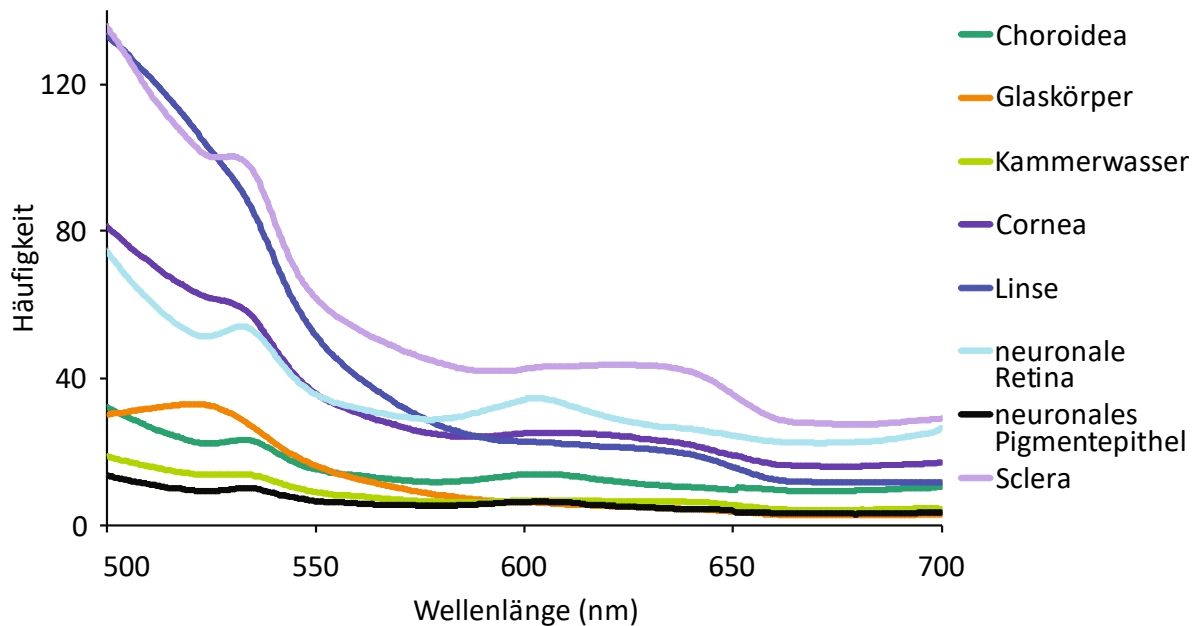


Abbildung 2.5 Fluoreszenzspektren okularer Gewebe von Augen junger Schweine bei Anregung mit 446 nm (modifiziert nach [53]).

Neben den spektralen Eigenschaften wurden auch die Fluoreszenzlebensdauern am Auge untersucht. Es treten Fluoreszenzlebensdauern in einem Bereich von einer Größenordnung auf. Die längsten Fluoreszenzlebensdauern von ca. 3500 ps stammen von Cornea, Sclera und Choroidea. Die kürzesten Fluoreszenzlebensdauern von ca. 260 ps wurden im retinalen Pigmentepithelium detektiert. Abb. 2.6 gibt einen Überblick über die Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern okularer Gewebe.

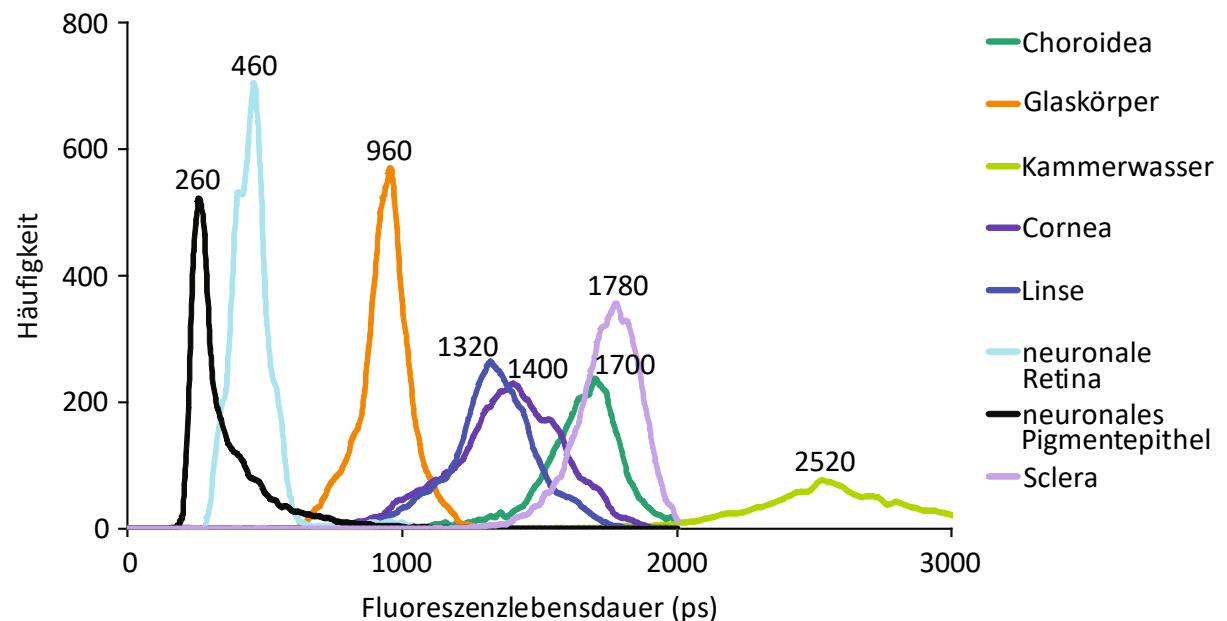


Abbildung 2.6 Mittlere Fluoreszenzlebensdauern okularer Gewebe von Augen junger Schweine bei Anregung mit 446 nm und bi-exponentieller Approximation (modifiziert nach [53]).

Ebenfalls an Proben junger Schweine haben Peters et al. [54] mit Hilfe der 2-Photonen Mikroskopie verschiedene Retinaschichten *in toto* untersucht. Die kürzesten Fluoreszenzlebensdauern sind mit 70 ± 10 ps auch hier im retinalen Pigmentepithelium aufgetreten. Die längsten Fluoreszenzlebensdauern von $2,64 \pm 0,26$ ns traten in der äußeren Körnerschicht auf. Die Unterschiede der gefundenen Fluoreszenzlebensdauern zwischen Jentsch und Peters et al. lassen sich u.a. durch das verwendete Messsystem erklären. Peters et al. haben ein 2-Photonen Mikroskop benutzt, welches eine deutlich genauere Fokussierung des Fluoreszenzanregungslichts nur auf die RPE Schicht erlaubt und somit eine isolierte Betrachtung der RPE Zellen ermöglicht. Der spektrale Detektionsbereich beider Messsysteme unterschied sich (ein spektraler Bereich bei Jentsch gegenüber zwei spektralen Kanälen analog dem FLIO-System bei Peters et al.). Zwischen Schlachtung des Schweins und Beginn der Messungen lagen bei Peters et al. nur ca. 30 min, während bei Jentsch 60 – 90 min vergingen, was zu einer Degeneration des Gewebes führen und somit einen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern haben kann.

In gesunden menschlichen Probanden (Alter $29 \pm 2,7$ Jahre) wurden bei multi-exponentieller Approximation mit drei Exponentialfunktionen, Fluoreszenzlebensdauern zwischen $34,6 \pm 13,5$ ps (Fovea, spektraler Kanal 2) und 3150 ± 628 ps (Papille, spektraler Kanal 1) gefunden [55].

2.2.3 Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse

Das Licht zur Fluoreszenzanregung durchläuft auf dem Weg zur Retina eine Reihe von Okularmedien (Abschnitt 2.2.2). Insbesondere die natürliche Augenlinse emittiert bei einer Anregung von 473 nm ein starkes Fluoreszenzsignal [56], welches hauptsächlich im kurzwelligen Detektionskanal (spektraler Kanal 1, 498-560 nm) des FLIO-Systems liegt. Die Hornhaut emittiert ebenfalls ein Fluoreszenzsignal, welches im Vergleich zur Augenlinse allerdings deutlich schwächer ist. Die Fluoreszenz der Augenlinse ist isotrop und erreicht daher auch die Retina. Das Reflexionsvermögen der Retina ist sehr gering ($\leq 2\%$), da der größte Teil des einfallenden Lichts absorbiert wird [57]. Durch das Konfokalprinzip des FLIO-Systems wird der Anteil der Fluoreszenz der Augenlinse, welcher von der Retina reflektiert wird, weiter reduziert. Aufgrund des großen Volumens und der starken Autofluoreszenz der Augenlinse kann deren direkt detektiertes Fluoreszenzsignal trotz Konfokalprinzip nicht vollständig unterdrückt werden. Das Fluoreszenzsignal der natürlichen Augenlinse ist als Buckel im Anstieg des Summensignals in Abb. 2.7 erkennbar, welche die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von natürlicher Augenlinse und Retina visualisiert. Daher wird das Fluoreszenzsignal der natürlichen Augenlinse die Approximation der Fluoreszenzlebensdauer der Retina beeinflussen, insbesondere wenn der relative Anteil des Fluoreszenzsignals der Augenlinse größer wird, z.B. in älteren Patienten mit beginnender Katarakt [58, 59].

Der Anregungspuls des FLIO-Systems erzeugt die Fluoreszenz in der Augenlinse bevor er den Glaskörper durchquert und die Retina erreicht. Die Zeit, die der Anregungspuls für die Wegstrecke d zwischen Augenlinse und Retina benötigt, wird mit t_c bezeichnet und lässt sich berechnen:

$$t_c = \frac{2 \cdot d \cdot n}{c} \quad (2.9)$$

wobei n die Brechzahl und c die Lichtgeschwindigkeit sind. Für das Gullstrand Standard Auge [60] sind $d = 22,2$ mm (Mittelpunkt der Augenlinse bis zur Retina) und $n = 1,3668$ (Glaskörper). Aus diesen Parametern ergibt sich ein t_c von 202 ps. Die Zeitauflösung des FLIO-Systems von 12,2 ps reicht aus um diese Laufzeitdifferenz der Fluoreszenzsignale zwischen Augenlinse und Retina aufzulösen.

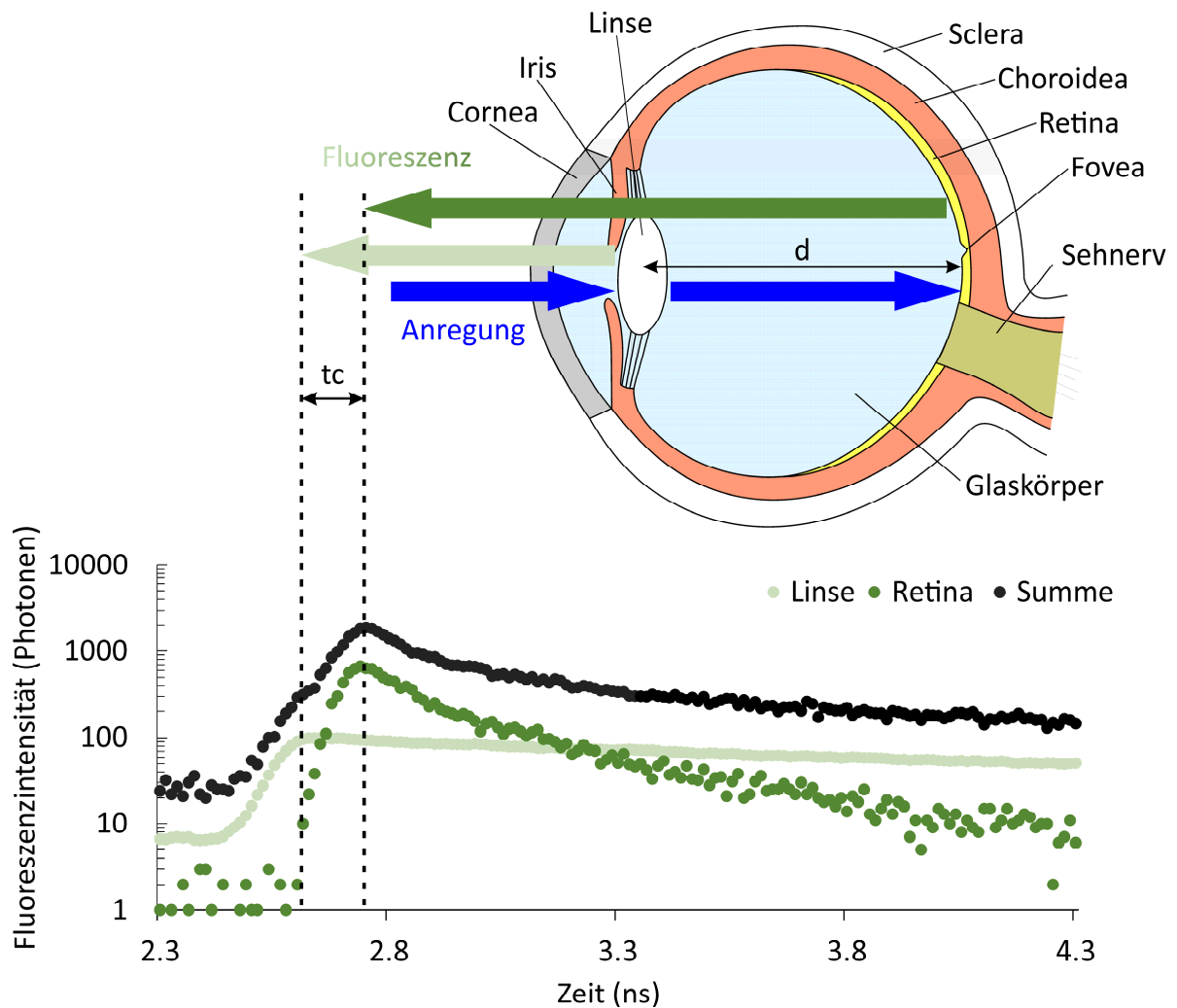


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Fluoreszenzanregung und -detektion im menschlichen Auge. Das Anregungslicht ist in dunkelblau dargestellt. Die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse und der Retina ist jeweils hell- bzw. dunkelgrün gefärbt. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale in der unteren Bildhälfte basieren auf realen Messdaten.

3 Stand der Technik

3.1 Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz am Auge

3.1.1 FLIO-Prototyp 1

Die erste *in vivo* Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz des menschlichen Auges wurde von Schweitzer et al. [61] beschrieben. Der hier betrachtete technische

Aufbau zur Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz im Auge ist eine Weiterentwicklung dieses Aufbaus und ist in Abb. 3.1 dargestellt, sowie durch Schweitzer et al. [62] beschrieben. Er basiert auf

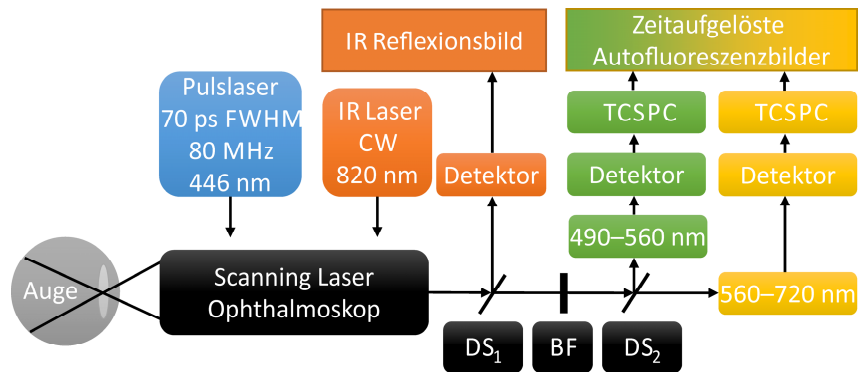


Abbildung 3.1 Schema eines konfokalen Scanning Laser Ophthalmoscopes zur Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz des menschlichen Auges *in vivo*. Die Fluoreszenz wird durch einen Diodenlaser mit einer Pulsweite von 70 ps, einer Wiederholrate von 80 MHz und einer Wellenlänge von 446 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission wird durch eine multimode Faser aufgenommen, mit einem dichroitischen Spiegel (DS₂) in zwei spektrale Kanäle (490–560 nm und 560–720 nm) aufgeteilt, mit Hilfe von multichannel plate photomultiplier Detektoren erfasst sowie zeitlich und örtlich aufgelöst durch eine TCSPC-Einheit verarbeitet. Zusätzlich zum Anregungslaser wird der Augenhintergrund durch einen Dauerstrich (continuous wave, cw) Infrarot Laser (IR, 820 nm) zur online Bildregistrierung beleuchtet. Das vom Fundus reflektierte Infrarotlicht wird durch einen dichroitischen Spiegel (DS₁) ausgekoppelt. Die Detektoren werden vor Infrarot- und Anregungslicht durch Blockfilter (BF) geschützt.

einem konfokalen Scanning Laser Ophthalmoscope (cSLO, HRA-2, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die 30° x 30° Bilder des Augenhintergrunds werden im High-Speed-Modus (8,8 Bilder / s) aufgenommen. Bei 256 x 256 Pixeln entspricht dies einer lateralen Auflösung von ca. 32 x 32 µm². Die axiale Eindringtiefe des Anregungslichts am Augenhintergrund beträgt ca. 200 µm, wobei die Schärfentiefe wesentlich größer ist. Zur Anregung der Fluoreszenz wird ein 446 nm Pulslaser (BDL-440-SMC, Becker & Hickl GmbH) mit einer Wiederholrate von 80 MHz bei einer Pulsweite von ca. 70 ps (FWHM) mit Hilfe einer Single-Mode-Faser in das cSLO eingekoppelt. Die Strahlungsleistung in Hornhautebene beträgt ca. 120 µW und liegt deutlich unter den Grenzwerten des ANSI Standards [63] für Aufnahmen bis zu einer Dauer von 8 Stunden. Um eine ausreichende Anzahl an Photonen je Pixel zu erhalten, sind Messzeiten im Minutenbereich notwendig. Möglich wird dies durch ein parallel zur Fluoreszenzmessung aufgenommenes Infrarotbild, welches zur Registrierung und Korrektur der Augenbewegungen verwendet wird. Die vom Fundus emittierten Fluoreszenzphotonen werden von einer Multi-Mode-Faser aufgenommen. Das darin enthaltene Anregungslicht wird geblockt (RazorEdge LP02-488RS-25, Semrock Inc., Rochester, NY, USA) und die übrig gebliebenen Fluoreszenzphotonen werden auf einen dichroitischen Spiegel (Grenzwellenlänge 560 nm, XF2017,

Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA) geleitet, welcher diese in zwei spektrale Kanäle (490–560 nm und 560–720 nm) aufteilt. In jedem spektralen Kanal werden die eintreffenden Photonen von einem multichannel plate photomultiplier (R3809U-50 MCP-PMT, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) mit einer Detektor-Quanteneffizienz von bis zu 15% detektiert. Um Reflexe des Fluoreszenzlichts an parallelen optischen Flächen zu reduzieren, wurden die Detektoren um ca. 10° aus der optischen Achse gekippt. Die Ausgangssignale der Detektoren sind über einen Router (HRT-41, Becker & Hickl GmbH) mit einem TCSPC-Modul (SPC-150, Becker & Hickl GmbH) verbunden und werden nach dem Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (time-correlated single photon counting; TCSPC) verarbeitet, welches in Abschnitt 3.1.3 näher erläutert wird. Die Fluoreszenzmessung nach der TCSPC-Methode wurde aufgrund der geringeren Lichtbelastung und der besseren Eignung für multi-exponentielle Abfälle des Fluoreszenzsignals der Phasenverschiebungsmethode [16] vorgezogen [61]. Das Gerät besitzt nur eine externe Fixationsleuchte für das nicht gemessene Auge. Eine Aufnahme mit ca. 150 x 150 Pixeln dauert etwa 10 Minuten.

3.1.2 FLIO-Prototyp 2

Auf Basis von Erfahrungen mit FLIO-Prototyp 1, wurde dieser im Detail verbessert, wie zuerst von Dysli et al. [64] beschrieben und in Abb. 3.2 dargestellt. Die wichtigste Änderung betrifft die Verwendung von High-Speed Hybrid Detektoren (HPM-100-40, Becker & Hickl GmbH), welche eine Detektor-

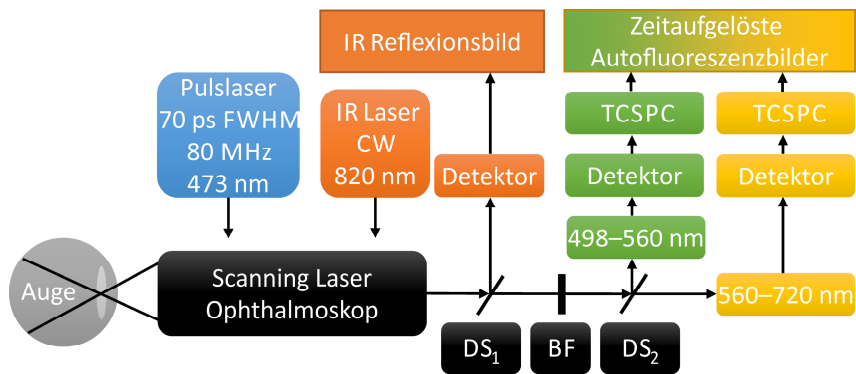


Abbildung 3.2 Das Schema des FLIO-Prototyp 2 entspricht im Wesentlichen dem des FLIO-Prototyp 1. Die Unterschiede betreffen eine von 446 nm zu 473 nm veränderte Wellenlänge des Anregungslasers und des zugehörigen Blockfilters (BF), sowie ein separates TCSPC-Modul je spektralem Kanal im Vergleich zu einem gemeinsam verwendeten beim FLIO-Prototyp 1. Die Verbesserung mit dem größten Einfluss ist die Verwendung von High-Speed Hybrid Detektoren im FLIO-Prototyp 2, was aus dem Schema allerdings nicht hervorgeht.

Quanteneffizienz von bis 45% aufweisen. Dies entspricht einer Steigerung um Faktor 4 bis 5 gegenüber den in FLIO-Prototyp 1 verwendeten MCP-PMTs. Die Transit Time Spread der HPM-100-40 verschlechtert sich auf ca. 120 ps gegenüber ca. 35 ps der MCP-PMTs. Für die im Auge auftretenden Fluoreszenzlebensdauern ist dies noch ausreichend. Die Vorteile der höheren Detektor-Quanteneffizienz überwiegen deutlich. Durch die deutlich höheren Zählraten ist nun jeder Detektor direkt mit einem TCSPC-Modul verbunden. Weiterhin wurde der Anregungswellenlänge auf 473 nm (BDL-473-SMC, Becker & Hickl GmbH) angehoben sowie die Laserleistung in Hornhautebene auf ca.

150 μW erhöht. Diese liegt wie bei FLIO-Prototyp 1 deutlich unter den Grenzwerten des ANSI Standards [63] für Aufnahmen bis zu einer Dauer von 8 Stunden. Dies zog eine Erhöhung der Grenzwellenlänge des Filters zum Blocken des Anregungslichtes auf 498 nm nach sich. Die Ortsauflösung der FLIO-Aufnahmen wurde auf 256 x 256 Pixel erhöht sowie die durchschnittliche Messdauer auf etwa 2-3 Minuten verringert. Die in FLIO-Prototyp 2 verfügbare interne Fixationsleuchte mit 9 wählbaren Positionen vereinfacht die reproduzierbare Aufnahme ähnlicher Bereiche des Fundus erheblich. Weiterhin wurde der optische Strahlengang optimiert um Reflexionen an optisch wirksamen Oberflächen zu minimieren.

3.1.3 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Die Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens benötigt u.a. eine gepulste Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung. Dabei wird die Zeitspanne zwischen zwei aufeinander folgenden Anregungspulsen (12,5 ns bei 80 MHz) in z.B. 1024 Zeitkanäle aufgeteilt, was in einer Zeitauflösung von 12,2 ps je Zeitkanal resultiert. Die Anzahl der Zeitkanäle bestimmt direkt die Zeitauflösung und wird im TCSPC-Modul umgesetzt. Im aktuellen FLIO-System sind maximal 4096 Zeitkanäle möglich, 1024 Zeitkanäle werden standardmäßig benutzt. In anderen Anwendungen für zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen werden oft auch eine geringere Anzahl an Zeitkanälen, wie z.B. 256, verwendet. Auf Basis der Zeitkanäle wird je Pixel ein Photonenhistogramm anhand der Zeitdifferenz zwischen Anregung und Detektion eines Fluoreszenzphotons erzeugt, wie in Abb. 3.3 verdeutlicht. Daraus folgt, dass die TCSPC-Methode zeit-, orts- und spektral-aufgelöste Datensätze generiert. Die aktuell verwendeten 1024 Zeitkanäle mit einer festen Zeitauflösung von 12,2 ps je Zeitkanal sind der beste Kompromiss aus benötigter Zeitauflösung und Anzahl der Photonen je Zeitkanal für Messungen am menschlichen Auge. Da die Anzahl der detektierten Photonen je Zeiteinheit unabhängig von der Anzahl der Zeitkanäle ist, resultiert aus einer höheren Anzahl an Zeitkanälen und damit einer höheren Zeitauflösung eine geringere Anzahl an Photonen je Zeitkanal und damit ein verringertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Eine Voraussetzung für die TCSPC Methode ist eine kombinierte Fluorophor Quanteneffizienz (Abschnitt 2.1.3) und Detektor-Quanteneffizienz von $< 10\%$, da das TCSPC-Modul während der Verarbeitungsdauer eines detektierten Photons von ca. 200 ns [39] andere eintreffende Photonen nicht berücksichtigt. Treffen während dieser Totzeit dennoch Photonen auf dem Detektor ein, werden diese nicht im TCSPC-Modul verarbeitet, was zu Artefakten in den TCSPC-Daten führt. Der Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit wird dadurch verkürzt. Dies bedeutet, dass bei einer Wiederholrate des Anregungslasers von 80 MHz höchstens bei jedem 16. Anregungspuls ein Fluoreszenzphoton detektiert werden kann. Die Intensität der Anregungsstrahlung muss dementsprechend gering sein. Weitere Informationen zur TCSPC-Methode liefern Becker [20, 65-67] und Lakowicz [16].

3 Stand der Technik

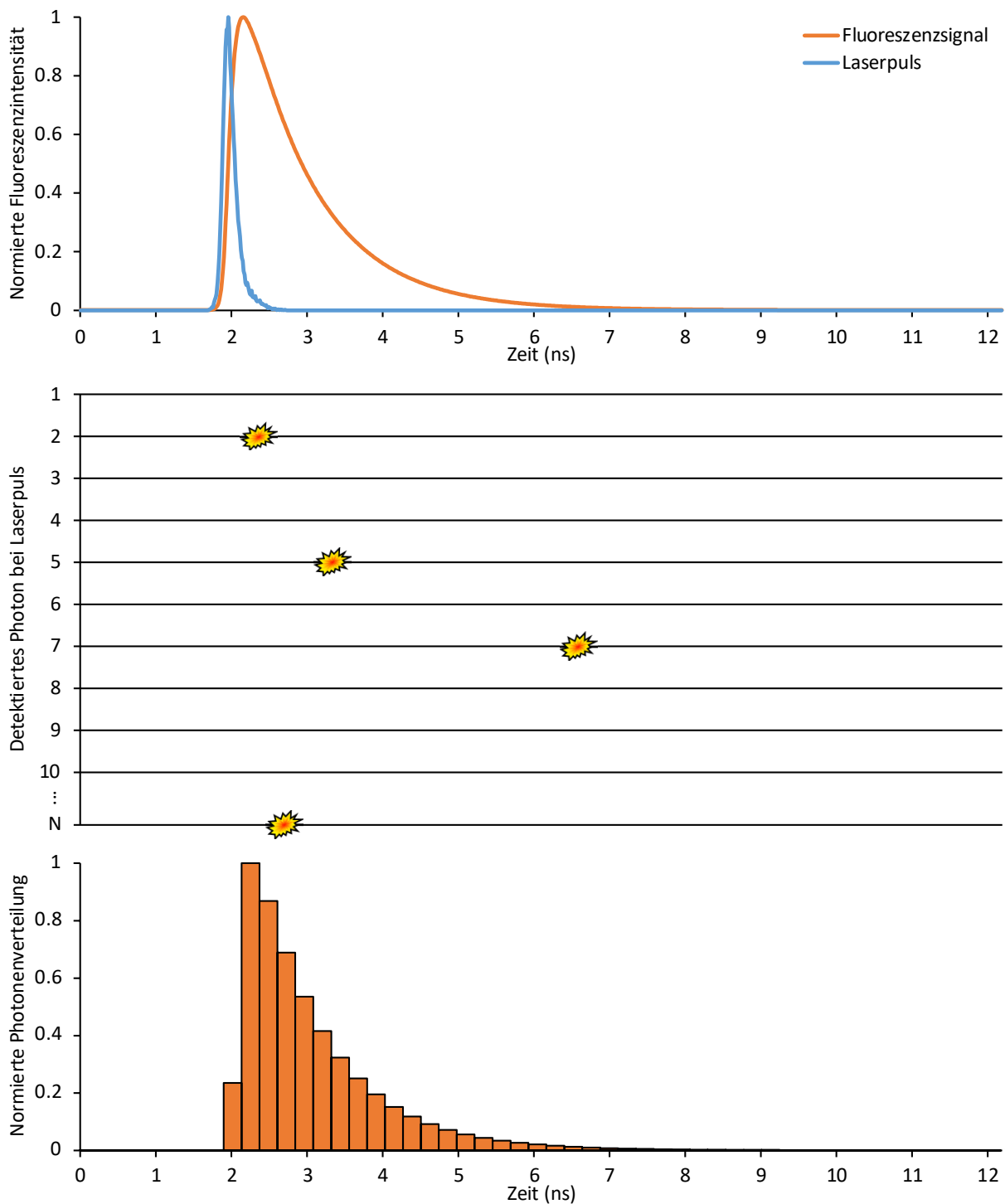


Abbildung 3.3 Schema der Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens. Das Fluoreszenzsignal (oben, orange) wird durch eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslasers (oben, blau) abgetastet. Bei einigen Laserpulsen werden einzelne Fluoreszenzphotonen detektiert (mittlerer Abschnitt). Anhand der Zeitdifferenz zwischen Laserpuls und Ankunft des Fluoreszenzphotons wird ein Photonenhistogramm (unten) aufgebaut, welches bei hinreichend vielen detektierten Photonen dem quantisierten Fluoreszenzsignal (oben) entspricht.

3.1.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenz an dreidimensionalen Oberflächen

Die Wiederholrate des Anregungslasers der aktuellen FLIO-Systeme (Abschnitt 3.1) von 80 MHz in Zusammenhang mit der gewählten Anzahl von 1024 Zeitkanälen ergibt eine Zeitauflösung von 12,2 ps je Zeitkanal. Durch diese hohe Zeitauflösung, die am Augenhintergrund auftretenden Fluoreszenzlebensdauern von < 50 ps und dem damit verbundenen sehr steilen Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit besteht eine hohe Abhängigkeit der Güte der Modellierung von der zeitlichen Verschiebung der Modellfunktion in Relation zu den Messdaten. Eine korrekte Bestimmung dieser Zeitverschiebung ist daher essentiell für die Modellierung der Fluoreszenzsignale vom Augenhintergrund.

Der Einfluss der Zeitverschiebung auf die errechneten Fluoreszenzlebensdauern wurde anhand simulierter Daten untersucht. Dafür wurden die Fluoreszenzlebensdauern von 5 ps bis 200 ps mit einer Schrittweite von 5 ps analysiert. Die Zeitverschiebung wurde von -12,2 ps bis 12,2 ps mit einer Schrittweite von 1,2 ps abgetastet. Je Kombination aus Fluoreszenzlebensdauer und Zeitverschiebung wurden 100 Simulationen mit je 50.000 Photonen durchgeführt. Anschließend wurden die Fluoreszenzlebensdauern bestimmt, wobei die Zeitverschiebung bei der Modellierung auf 0 fixiert wurde. Bei negativen Zeitverschiebungen wurde die Fluoreszenzlebensdauer als zu klein bestimmt, während bei positiven Zeitverschiebungen die Fluoreszenzlebensdauer als zu groß bestimmt wurde. Der Mittelwert des Betrags des relativen Fehlers der Fluoreszenzlebensdauer ist in Abb. 3.4 dargestellt. Bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 50 ps und einer Zeitverschiebung von einem halben Zeitkanal (6.1 ps) beträgt der relative Fehler 8%, bei einer Verschiebung von einem Zeitkanal (12,2 ps) 15%. Bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 25 ps betragen die Fehler bereits 18% bzw. 32%.

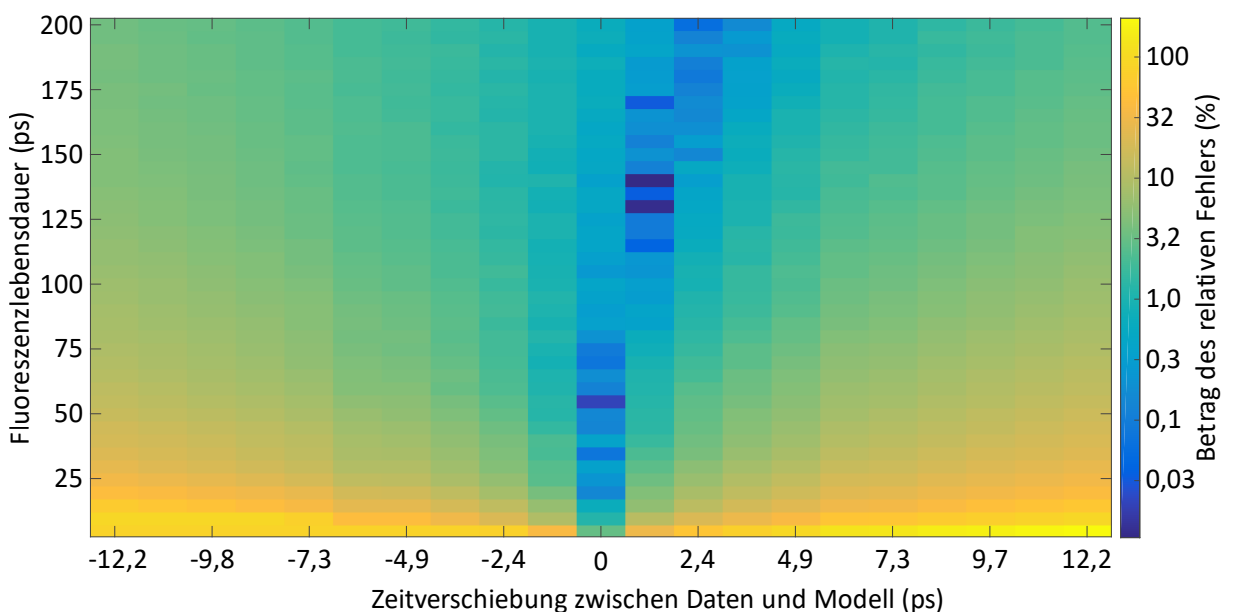


Abbildung 3.4 Einfluss der Zeitverschiebung zwischen Daten und Modell auf die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Farblich kodiert auf einer logarithmischen Skala ist der Betrag des relativen Fehlers der Fluoreszenzlebensdauer.

Durch die unterschiedlichen Ausrichtungen des vertikalen Ablenkspiegels des FLIO-Systems während des Scannens eines Bildes, ergeben sich gering unterschiedliche Weglängen des Anregungsstrahls zwischen den Zeilen des Bildes. Die Laufzeitdifferenz zwischen oberster und unterster Bildzeile beträgt ca. 10-20 ps. Weiterhin ist die Retina am hinteren Augenabschnitt, insbesondere bei Fehlsichtigkeit, nicht kugelförmig gekrümmt und das Zentrum des aufgenommenen Bildausschnitts liegt nicht zwangsläufig im Mittelpunkt der Retinakrümmung, wodurch zusätzliche Laufzeitdifferenzen zwischen Teilen eines Bildes entstehen können. Der Augenhintergrund muss daher als dreidimensionale Oberfläche betrachtet werden (Abb. 3.5).

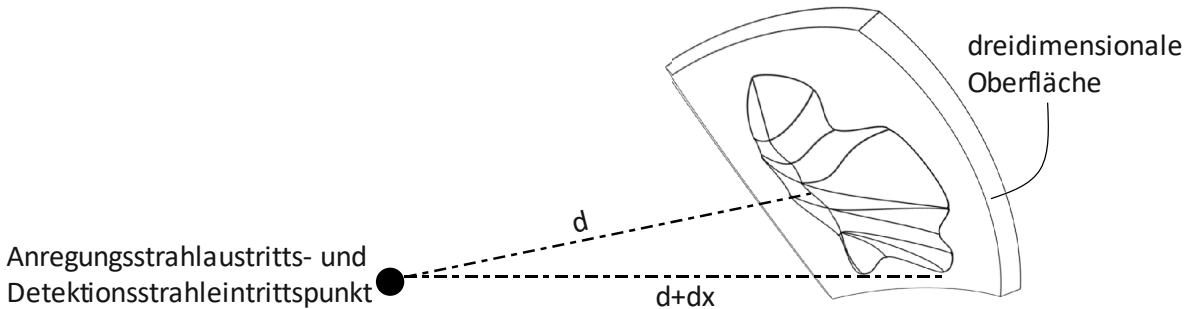


Abbildung 3.5 Schema der Fluoreszenzanregung und -erfassung eines fluoreszierenden Objekts mit dreidimensionaler Oberfläche. Der Anregungs- und Detektionsstrahl legt vom Anregungsstrahlaustrittspunkt und Detektionsstrahleintrittspunkt zum angeregten Objektpunkt einen deutlich kürzeren Weg d zurück, während ein anderer Anregungs- und Detektionsstrahl zu einem Objektpunkt den Weg $d + dx$ zurücklegt. Die Wegdifferenz x ruft einen Laufzeitunterschied hervor.

Werden die Laufzeitdifferenzen aufgrund der unterschiedlichen Weglängen nicht berücksichtigt, kann dies bei kurzen Fluoreszenzlebensdauern zu erheblichen Abweichungen zwischen errechneter und tatsächlicher Fluoreszenzlebensdauer führen, wie in Abb. 3.4 und Abb. 3.6 dargestellt.

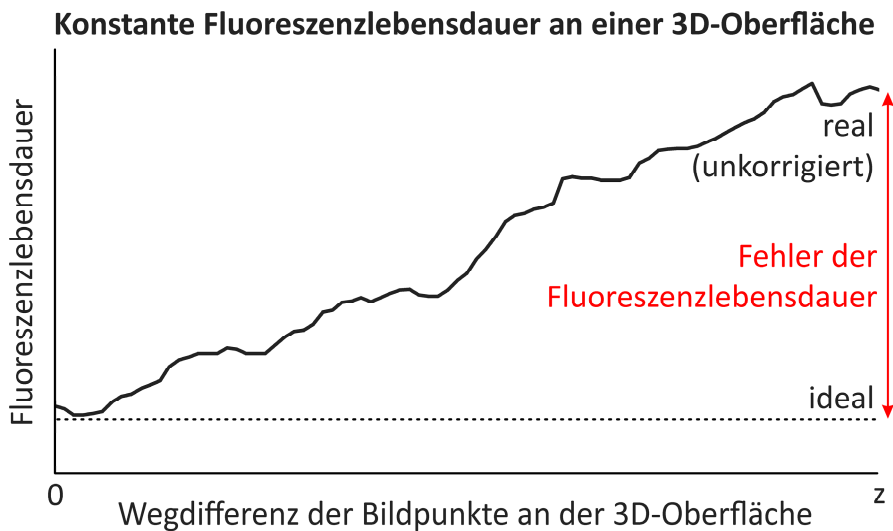


Abbildung 3.6 Fluoreszenzlebensdauer über den Ort eines fluoreszierenden Objekts mit dreidimensionaler Oberfläche, bestimmt mittels multi-exponentiellem Ansatz (Abschnitt 3.4.2), im Vergleich zum idealen Wert. Die Schwankung der real bestimmten Fluoreszenzlebensdauer ist auf Unsicherheiten in der Fluoreszenzlebensdauerapproximation zurückzuführen. Der Fehler der Fluoreszenzlebensdauer hängt scheinbar linear von der Wegdifferenz des Anregungs- bzw. Detektionsstrahls ab.

3.1.5 Fluoreszenz von Schichtenstrukturen

Ein oft diskutierter Punkt ist die Konfokalität des FLIO-Systems. Beim Konfokalprinzip wird der beleuchtete Bereich des Objekts und das Gesichtsfeld des Detektors durch Blenden auf einen kleinen Bereich um den Fokuspunkt herum eingeschränkt. Dadurch wird Licht, welches nicht aus diesem Bereich kommt, unterdrückt. Mit diesem Prinzip werden bei Scanning Laser Ophthalmoskopen in erster Linie Reflexion vom vorderen Augenabschnitt (Cornea und Linse) unterdrückt. Ob ein nennenswerter Anteil an Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse die Detektoren des FLIO-Systems erreicht, wenn der Fokus auf der Retina liegt, ist daher umstritten. In einem Experiment wurde geprüft, ob die Fluoreszenz von relativ weit entfernten Schichten mit dem FLIO-System nachweisbar ist. Dazu wurden drei Küvetten mit Fluoreszenzfarbstoffen (Natrium-Fluoreszein, DCM und Rose Bengal) gefüllt, welche unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern besitzen, und in Abständen von 70 mm, 110 mm und 150 mm zu einer Linse mit einer Brennweite von 150 mm hintereinander platziert. Das FLIO-System wurde auf die am weitesten entfernte Küvette fokussiert. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3.7(B) dargestellt. Im Anstieg des Fluoreszenzsignals sind deutlich zwei Buckel zu erkennen, welche durch die Küvette gefüllt mit DCM und durch die Küvette gefüllt mit Natriumfluoreszein verursacht werden.

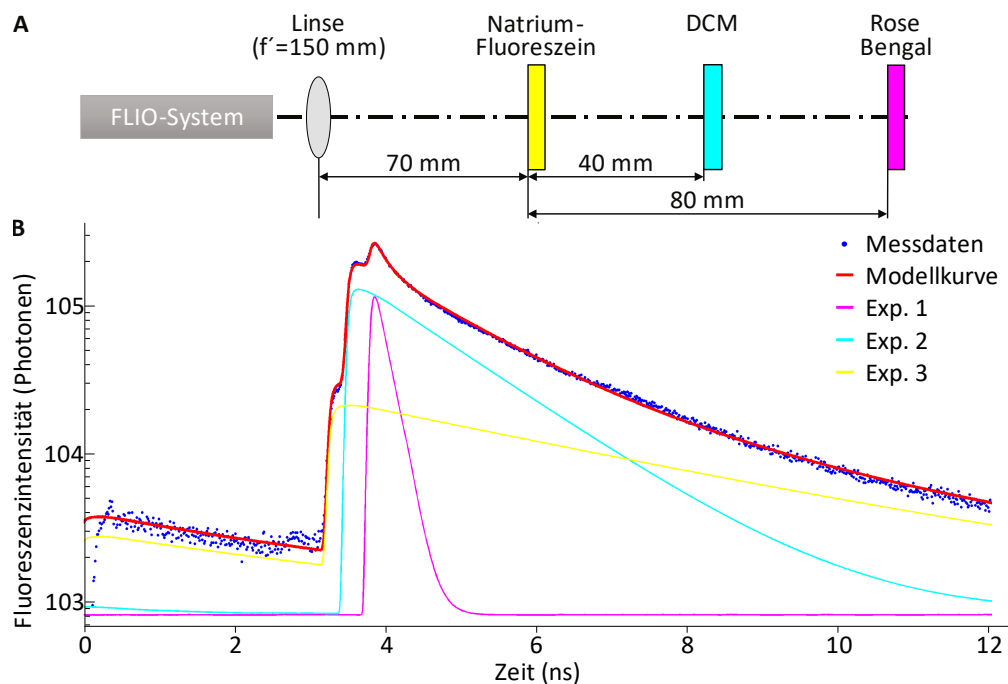


Abbildung 3.7 Schema des Messaufbaus (A) und Messergebnis (B) von drei Küvetten gefüllt mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Abständen zueinander. Die Exponentialfunktionen (Exp.) nach Faltung mit der IRF, welche in Summe die Modellkurve (rot) ergeben, modellieren jeweils das Fluoreszenzsignale eines Fluoreszenzfarbstoffs und sind in magenta (Rose Bengal), cyan (DCM) und gelb (Natrium-Fluoreszein) dargestellt.

Damit konnte gezeigt werden, dass trotz Konfokalprinzip und Fokus auf die Küvette, gefüllt mit Rose Bengal, Fluoreszenzsignale der anderen beiden Küvetten detektiert werden. Daher erscheint es plausibel, dass dies bei der Messung am menschlichen Auge für die stark fluoreszierende natürliche Augenlinse ebenso zutrifft.

3.2 Messung der optischen Systemübertragungsfunktion

3.2.1 Messung in Reflexion

Die optische Systemübertragungsfunktion (instrument response function, IRF) kann mittels eines Oberflächenspiegels bestimmt werden. Dieser wird in geringem Abstand (wenige cm) vor dem FLIO-System positioniert. Ggf. wird eine Linse mit beispielsweise 20 mm Brennweite benötigt, welche die Augenlinse simuliert, um die konfokale Abbildung des FLIO-

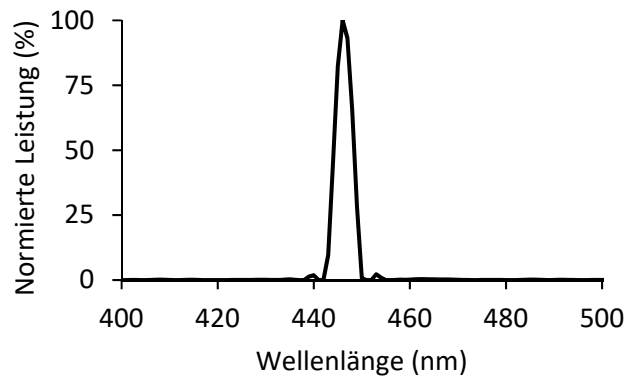


Abbildung 3.8 Normiertes Spektrum des 446 nm PulsLasers (BDL-440-SMC, Becker & Hickl GmbH).

Systems zu gewährleisten. Das FLIO-System muss auf die Oberfläche des Spiegels fokussiert werden. Damit der Anregungslaserstrahl die Detektoren erreichen kann, muss der Filter, welcher den Anregungslaser bei der FLIO am Proband blockt, entfernt und durch einen geeigneten Neutraldichtefilter ersetzt werden. Das Spektrum des Anregungslasers muss für die FLIO-Messung sehr schmal sein, wie in Abb. 3.8 am Beispiel des 446 nm Lasers zu sehen ist. Die Spitzenleistung des Lasers wird bei 446 nm erreicht, die Halbwertsbreite beträgt 4,3 nm. Da der verwendete dichroitische Spiegel zur Aufteilung des Fluoreszenzlichts auf die beiden Detektoren unterhalb von 500 nm Licht sowohl reflektiert als auch transmittiert, kann der Anregungslaser für die Messung der IRF ohne weitere Modifikation am FLIO-System verwendet werden. Abb. 3.9 stellt die IRF des FLIO-Prototyps 1 (Abschnitt 3.1.1) dar. Gemessen wurde die IRF in Reflexion. Die Halbwertsbreite beträgt für die spektralen Kanäle 1 und 2 jeweils 134 ps.

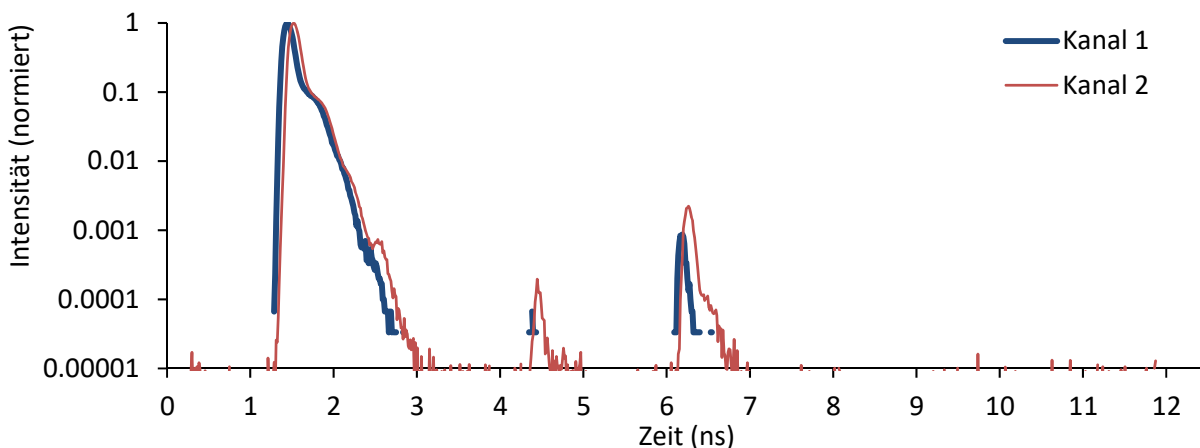


Abbildung 3.9 Instrument response functions des FLIO-Prototyps 1 für beide spektrale Kanäle, gemessen in Reflexion. Zwischen 4 und 5 ns sowie zwischen 6 und 7 ns sind Artefakte erkennbar, die durch Reflexionen an optisch wirksamen Oberflächen verursacht werden. Durch die zusätzlich zurückgelegte Wegstrecke werden die reflektierten Photonen zu einem späteren Zeitpunkt detektiert. Die Form der IRF entsteht durch eine Überlagerung der Pulsform des Anregungslasers (deutlich erkennbar ist eine Schulter bei ca. 2 ns, die der Anregungslaser erzeugt), der Transit Time Spread der Detektoren sowie die zeitliche Pulsaufweitung anderer optischer Komponenten im Strahlengang.

3.2.2 Messung mittels Fluorophor

Der Nachteil bei der Messung der optischen Systemübertragungsfunktion in Reflexion besteht darin, dass das FLIO-System dafür modifiziert werden muss. Dies erfordert zum einen Zugang zur entsprechenden Position des Filters im FLIO-System und verändert zum anderen das FLIO-System an sich, wobei jedoch das Austauschen des Filters keinen signifikanten Einfluss auf die IRF haben sollte. Eine Alternative besteht in der Messung der IRF mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs, welcher eine deutlich kürzere Fluoreszenzlebensdauer besitzt als die Halbwertsbreite der zu erwartenden IRF. Ein mögliches Fluorophor ist eine 25 μM Eosin Y Lösung mit 5 M potassium iodide [68], da Eosin Y zwischen 350 nm und 500 nm zur Fluoreszenz anregbar ist und zwischen 450 nm und 680 nm fluoresziert. Somit kann die Fluoreszenz in beiden spektralen Kanälen des FLIO-Systems gleichzeitig detektiert werden. Eine hinreichend kurze Fluoreszenzlebensdauer konnte durch Sven Peters mittels in-house Messungen bestätigt werden. Die Eosin Y Lösung wird in eine Küvette (z.B. 124–0.5–40, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) gefüllt, vor dem FLIO-System platziert und die Messung gestartet. Weitere Details zur Messung der IRF mittels Fluorophore sind unter [69] zu finden. Abb. 3.10 stellt die IRF des FLIO-Prototyps 2 (Abschnitt 3.1.2) dar. Gemessen wurde die IRF mittels Eosin Y Lösung. Die Halbwertsbreite beträgt 160 ps im spektralen Kanal 1 und 158 ps im spektralen Kanal 2. Die etwas größeren Halbwertsbreiten im Vergleich zum FLIO-Prototyp 1 werden im Wesentlichen durch die Detektoren bestimmt.

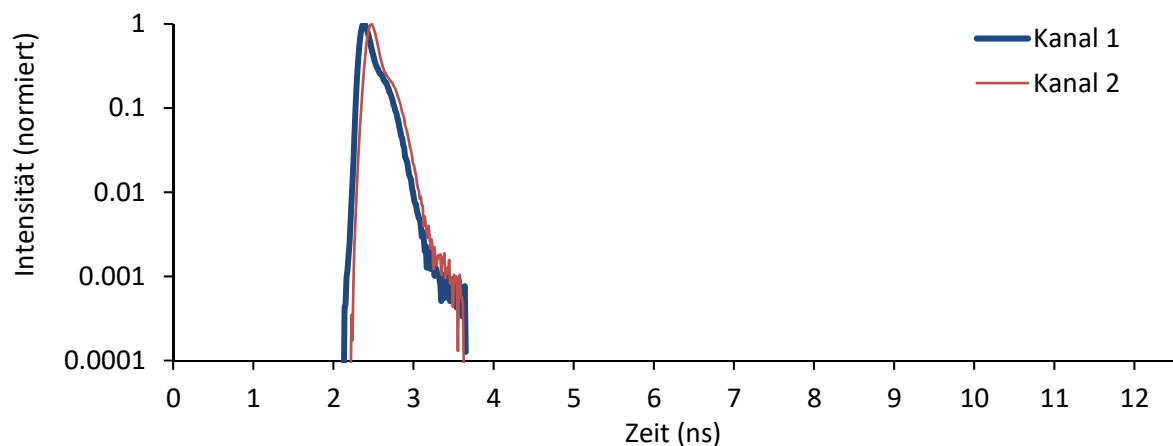


Abbildung 3.10 Instrument response functions des FLIO-Prototyps 2 für beide spektralen Kanäle, gemessen mittels Eosin Y Lösung. Durch die Optimierung des Strahlengangs beim FLIO-Prototyp 2 sind keine Artefakte durch Reflexionen an optisch wirksamen Oberflächen zu erkennen.

3.3 Vorverarbeitung: Statisches Binning

Die zeit- und orts aufgelösten FLIO-Daten werden typischerweise mit 1000 Photonen je Pixel in der Makula aufgenommen. Dies ist ein Kompromiss aus Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) und der Dauer der Aufnahme (Probandenbelastung). Da diese Anzahl an Photonen zu gering ist für z.B. eine multi-exponentielle Approximation mit drei Exponentialfunktionen, werden Photonen benachbarter Pixel zusammengefasst. Dabei wird der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals aller Pixel in einem quadratischen Fenster um jeden Pixel eines Bildes summiert. Dieser Prozess wird hier als statisches Binning bezeichnet und entspricht einem örtlichen gleitenden Mittelwertfilter. Die Kantenlänge l des Fensters ist:

$$l = 2 \cdot F + 1 \quad (3.1)$$

wobei F der Binning-Faktor ist. Oft wird ein Binning-Faktor von 1 für eine multi-exponentielle Approximation mit zwei Exponentialfunktionen [29, 34, 36, 64, 70] und ein Binning-Faktor von 2 für eine multi-exponentielle Approximation mit drei Exponentialfunktionen [27, 31-33, 71] benutzt.

Die Fluoreszenzintensität der menschlichen Retina ist nicht homogen verteilt. Die Papille ist generell schwach fluoreszierend. Das in der Fovea auftretende Makulapigment absorbiert Anregungslicht und Blutgefäße blockieren das Anregungslicht, so dass eine Fluoreszenzanregung des darunterliegenden Retina Gewebes geschwächt bzw. verhindert wird. Wird das FLIO-System nicht optimal an den Patienten angepasst, kann dies ebenso eine inhomogene Verteilung der Fluoreszenzintensität verursachen. Die schwachen Fluoreszenzsignale in den dunklen Regionen erreichen durch statisches Binning in Abhängigkeit des gewählten Binning-Faktors ggf. nicht die notwendige Anzahl an Photonen je Pixel für das ausgewählte Approximationsmodell. Dies kann zu falschen Fluoreszenzlebensdauern führen. Weiterhin steigt bei statischem Binning die Anzahl der verwendeten Pixel quadratisch mit dem Binning-Faktor, was höhere Binning-Faktoren durch den rasant ansteigenden Verlust an Ortsinformation unattraktiv macht.

3.4 Modellierung zeitaufgelöster Fluoreszenzsignale

3.4.1 Daten

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale (TCSPC-Daten) liegen als dreidimensionale Matrix vor. Neben der Ortsauflösung in zwei Dimensionen gibt die dritte Dimension die Zeit an. Je Pixel liegt also ein Photonenhistogramm vor, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben und in Abb. 3.3 dargestellt. FLIO-Daten enthalten eine weitere Dimension, den spektralen Kanal. In FLIO-Daten liegt daher pro Pixel für jeden der beiden spektralen Kanäle jeweils ein Photonenhistogramm vor. Abb. 3.11 zeigt einen schematischen Ausschnitt der TCSPC-Daten des FLIO-Systems. Die Photonenhistogramme müssen für jeden Pixel und spektralen Kanal mit einem geeigneten Ansatz modelliert werden, um die Fluoreszenzlebensdauer-Information zu extrahieren. Der aktuelle Stand dieser Modellierung wird im Folgenden beschrieben.

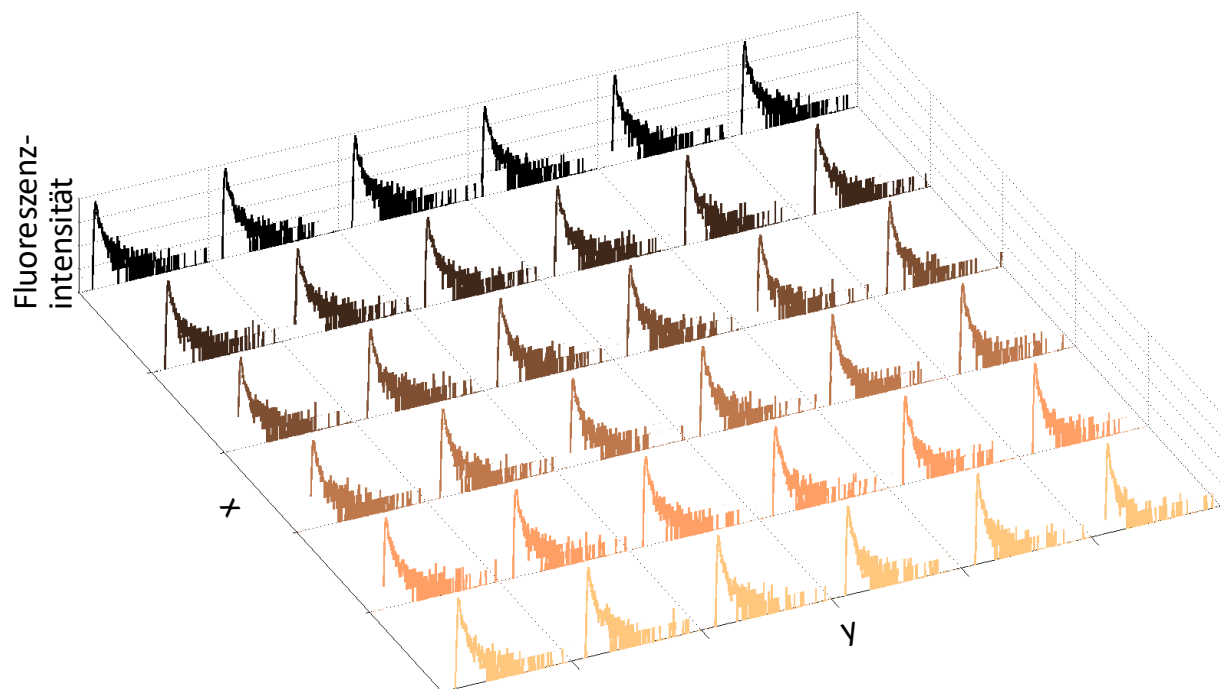


Abbildung 3.11 Ausschnitt von TCSPC-Daten des Augenhintergrunds eines gesunden Probanden vom spektralen Kanal 1 (schematische Darstellung). Je Pixel liegt ein Photonenhistogramm vor.

3.4.2 Multi-exponentieller Ansatz

Um den Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit in TCSPC-Daten zu beschreiben, sind eine Reihe von Ansätzen denkbar [16, 72]. Aktuell am häufigsten eingesetzt wird der multi-exponentielle Ansatz, welcher die Daten durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreibt:

$$I(t) = IRF * \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} + b \quad (3.2)$$

wobei I die Fluoreszenzintensität ist, IRF bezeichnet die instrument response function, α ist die Amplitude, τ ist Fluoreszenzlebensdauer, i ist der Index der Exponentialfunktion, der Asterix steht für das Faltungsintegral und b ist der Offset, z.B. thermisches Rauschen des Detektors oder Hintergrundlicht während der Messung. Aufgrund der hohen Anzahl an benötigten Photonen je Pixel für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mit einem Fehler von $\leq 10\%$ ist es nicht sinnvoll mehr als drei Exponentialfunktionen in Gleichung 3.2 zu verwenden [73].

3.4.3 Stretched Exponentials Ansatz

Die Hauptquelle der Fluoreszenz am Augenhintergrund ist das Stoffgemisch Lipofuszin, welches auch häufig als Alterspigment bezeichnet wird. Es entsteht durch oxidativen Stress an Proteinen und Lipiden und wird in den Zellen des retinalen Pigmentepitheliums über die Zeit akkumuliert, wenn es nicht in die Choroidea abtransportiert werden kann (z.B. durch verhinderte Diffusion durch die Bruch'sche Membran). Darüber hinaus fluoreszieren weitere Stoffe wie advanced glycation end products, Kollagene, Flavine und möglicherweise Nicotinamid Adenine Dinukleotid in seiner reduzierten Form (NADH). Die Anzahl der Fluorophore am Augenhintergrund ist daher größer als drei, die maximal sinnvoll verwendbare Anzahl an Exponentialfunktionen für den multi-exponentiellen Ansatz. Vielmehr liegt eine Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern vor, welche durch den Stretched Exponentials Ansatz [74-78] beschrieben werden kann. Ein Stretched Exponential kann durch die Einführung des Streckungsexponenten β eine Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern abbilden:

$$I(t) = IRF * \alpha \cdot e^{-\left(\frac{t}{\tau_i}\right)^\beta} + b \quad (3.3)$$

3.4.4 Spektrale globale Analyse

Da das Stoffgemisch Lipofuszin sehr stark fluoresziert, erscheint es nützlich die Autofluoreszenz der Retina in verschiedenen spektralen Kanälen zu messen. Dies wird versucht mit Hilfe des Strahlteilers im Detektionsstrahlengang des FLIO-Systems zu erreichen (Abschnitt 3.1). Es konnte gezeigt werden, dass dies zur Unterscheidung von Patienten mit früher altersbezogener Makuladegeneration (AMD) und einer gesunden Kontrollgruppe hilfreich ist [79]. Einige Fluorophore fluoreszieren nur in einem

spektralen Kanal, während andere in beiden Kanälen fluoreszieren. Die Fluoreszenzlebensdauer ist in letzterem Fall in beiden spektralen Kanälen identisch, da diese unabhängig von den spektralen Eigenschaften ist. Um diesen Effekt auszunutzen, kann eine spektrale globale Analyse durchgeführt werden. Dies kann die Fluoreszenzlebensdauerapproximation verbessern, da mehr Daten für die Analyse zur Verfügung stehen und die Zahl der Freiheitsgrade reduziert ist:

$$I(t) = \sum_{\lambda} \left(IRF_{\lambda} * \sum_i \alpha_{i,\lambda} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{i,\lambda}}} + b_{\lambda} \right) \quad (3.4)$$

wobei λ der Index des spektralen Kanals symbolisiert und zumindest eine Fluoreszenzlebensdauer in beiden spektralen Kanälen identisch sein muss: $\tau_{i,\lambda 1} = \tau_{i,\lambda 2}$. Die Beschreibung der spektralen globalen Analyse erfolgt hier beispielhaft anhand des FLIO-Systems mit zwei spektralen Kanälen. Der Ansatz ist auf eine beliebige Anzahl spektraler Kanäle übertragbar.

3.4.5 Örtliche globale Analyse

Neben der spektralen globalen Analyse wird in der Literatur auch die örtliche globale Analyse beschrieben [40, 80-83]. Bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen kann aufgrund des Messobjekts oder aufgrund von Randbedingungen meist nur eine geringe Anzahl an Photonen je Pixel aufgenommen werden. Dadurch steigt die Unsicherheit der Fluoreszenzlebensdauerapproximation der einzelnen Pixel. Ein Ansatz um die Fluoreszenzlebensdauern und die dazugehörigen Amplituden robust zu bestimmen ist die örtliche globale Analyse. Dabei wird angenommen, dass die Fluoreszenzlebensdauern über das gesamte Bild invariant sind. Diese Bedingung wird von Proben erfüllt, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen wurden. Bei der örtlichen globalen Analyse werden sämtliche Pixel eines Bildes gleichzeitig berechnet, was hohe Anforderungen an die benötigte Rechenleistung stellt sowie einen relativen hohen Speicherverbrauch bedingt. Für FLIO-Daten konnte die Annahme der invarianten Fluoreszenzlebensdauern über den Augenhintergrund bisher noch nicht belegt werden. Daher wird die örtliche globale Analyse in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

3.4.6 Incomplete Decay

Oft ist das Fluoreszenzsignal nicht hinreichend innerhalb der Zeitperiode t_R zwischen zwei Laserpulsen, welche das Reziproke der Pulswiederholrate ist, abgeklungen. Dies wird als incomplete decay [84] bezeichnet und modelliert als:

$$I(t) = I_B(t) + \sum_j I_B(t + j \cdot t_R) \quad (3.5)$$

wobei I_B die berechnete Fluoreszenzintensität nach Gleichungen 3.2 – 3.4, j die Anzahl der berücksichtigten Zeitperioden und t_R die Zeitdauer zwischen zwei Laserpulsen, was dem reziproken

der Laserpuls wiederholrate entspricht, ist. Die Wahl von j hängt von den in der Probe auftretenden Fluoreszenzlebensdauern ab, da die Exponentialfunktionen hinreichend im $j \cdot t_R$ Zeitfenster abgeklungen sein müssen. Bei FLIO mit einem $t_R = 12,5$ ns ist ein $j = 1$ üblicherweise ausreichend für Fluoreszenzlebensdauern bis ca. 5 ns.

3.4.7 Laguerre Expansion

Die multi-exponentielle Modellierung zeitaufgelöster Fluoreszenzsignale birgt einige Nachteile. Die iterative Faltung mit der IRF ist rechenintensiv und die Parameter des multi-exponentiellen Modells korrelieren miteinander. Unterschiedliche multi-exponentielle Modelle können daher ähnlich gut zu einem Fluoreszenzsignal passen. Weiterhin besitzen Autofluoreszenzsignale von Fluorophoren in Geweben ein potentiell komplexes Abklingverhalten, wofür eine Exponentialfunktion nicht mehr ausreichend ist. Typischerweise enthalten Gewebe mehr als ein Fluorophor, der Augenhintergrund z.B. 10 oder mehr. Daher ist ein multi-exponentielles Modell mit einer praktischen Beschränkung auf nur drei Exponentialfunktionen nur unter Einschränkungen korrekt und einzelne Exponentialfunktionen können ggf. einzelnen Gewebefluorophoren nicht mehr zugeordnet werden. Ein anderer Ansatz ist es auf ein physikalisches Fluoreszenzmodell mit *a priori* Informationen zu verzichten und eine modellfreie Zerlegungsmethode wie die Laguerre Expansion [85, 86] anzuwenden. Die Laguerre Expansion basiert auf einem orthonormalen Satz von diskreten Laguerre Funktionen und ist schnell konvergierend:

$$I(ap) = T \cdot \sum_{u=0}^{K-1} h(u) \cdot IRF(ap - u) \quad (3.6)$$

$I(n)$ ist die gemessene Fluoreszenzintensität zum Abtastpunkt ap . AP ist die Gesamtzahl der gemessenen Stützstellen von Fluoreszenzsignal sowie IRF über die Zeit und T das Abtastintervall. Der Parameter K steht für die zeitliche Länge der Fluoreszenzimpulsantwort h . Die Laguerre Entfaltungsmethode erweitert die Fluoreszenzimpulsantwort auf einen Satz orthonormaler zeitdiskreter Laguerre Funktionen:

$$h(ap) = T \cdot \sum_{l=0}^{L-1} c_l^a \cdot d_l^a(ap) \quad (3.7)$$

wobei c_l^a die zu bestimmenden Laguerre Expansionskoeffizienten und d_l^a die l -te Ordnung Laguerre Funktionen sind. L gibt die Anzahl der benutzten Laguerre Funktionen für die Modellierung an, also die Ordnung der Expansion. Der Laguerre-Parameter a ($0 < a < 1$) bestimmt die Rate des asymptotischen Abstiegs der Laguerre Funktionen. Größere a implizieren daher eine längere Zeit bis zur Konvergenz zu Null.

Durch Einsetzen von Gleichung 3.6 und Gleichung 3.7 erhält man:

$$I(n) = \sum_{l=0}^{L-1} c_l^a \cdot v_l^a(n) \quad (3.8)$$

mit

$$v_k^a(ap) = T \cdot \sum_{u=0}^{K-1} d_l^a(u) \cdot IRF(ap - u) \quad (3.9)$$

Die Funktionen $v_k^a(ap)$ repräsentieren die digitale Faltung der IRF mit den Laguerre Funktionen und werden als „key variables“ bezeichnet. Aus diesem linearen Gleichungssystem können die Expansionskoeffizienten mittels der kleinsten Quadrate Methode bestimmt werden:

$$\hat{c}_a = (V_a^T \cdot V_a)^{-1} \cdot V_a^T \cdot \bar{I} \quad (3.10)$$

Sobald die Expansionskoeffizienten bestimmt sind, können mit Gleichung 3.7 die Fluoreszenzimpulsantworten $h(ap)$ berechnet werden und daraus die mittlere Fluoreszenzlebensdauer:

$$\tau = \frac{T \cdot \sum_{ap=0}^{AP} h(ap) \cdot ap}{\sum_{ap=0}^{AP} h(ap)} \quad (3.11)$$

Die Wahl des Laguerre-Parameters a ist kritisch für eine korrekte Expansion der Fluoreszenzimpulsantworten. Dieser kann entweder empirisch bestimmt werden oder mit Hilfe eines nichtlinearen Minimierungsalgorithmus [87]. Die Laguerre Methode wurde in mehreren Arbeiten anhand von Fluoreszenzfarbstoffen validiert [88-90], die Berechnung beschleunigt [91] sowie zur Gewebecharakterisierung angewandt [92], jedoch noch nicht auf zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten vom Augenhintergrund. In dieser Arbeit wird die Laguerre Expansion nicht weiter betrachtet.

3.5 Gütekriterium der Modellierung

Um festzustellen, ob eine Modellkurve möglichst nahe an den gemessenen Daten liegt, wird oft die Methode der kleinsten Quadrate verwendet [93]. Für FLIO ergibt sich das Gütekriterium χ^2 zu:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^m \frac{(I_M(t_j) - I_B(t_j))^2}{w(t_j)} \quad (3.12)$$

wobei I_M die gemessenen Fluoreszenzintensität über die Zeitpunkte t_j , I_B die berechnete Fluoreszenzintensität des Modells, m die Anzahl der Zeitanäle im Photonenhistogramm und $w(t_j)$ die

Wichtung in Zeitkanal j ist. Da χ^2 direkt von der Anzahl der Zeitkanäle abhängt, wird häufig die reduzierte Form χ_r^2 verwendet:

$$\chi_r^2 = \frac{1}{m - fp} \sum_{j=1}^m \frac{(I_M(t_j) - I_B(t_j))^2}{w(t_j)} \quad (3.13)$$

wobei fp der Anzahl der freien Parameter des Modells entspricht.

Die Wichtung ist ein kritischer Faktor [94]. Die ideale Wichtung ist $w(t_j) = \sigma_j^2$, wobei σ_j die Standardabweichung jedes Datenpunkts ist. Für Poisson verteilte Daten entspricht die Standardabweichung eines Datenpunkts der Quadratwurzel des Erwartungswerts. Zur Schätzung der Wichtung existieren verschiedene Ansätze:

Neyman [95] $w(t_j) = I_M(t_j)$ (3.14)

Pearson [95] $w(t_j) = I_B(t_j)$ (3.15)

fitted weighting [94] $w(t_j) = f(t_j)$ (3.16)

wobei $f(t_j)$ die Modellfunktion einer vorherigen Approximation ist

Warren [40] $w(t_j) = I_D(t_j)$ (3.17)

wobei $I_D(t_j)$ der Durchschnitt von $I_M(t_j)$ über alle Pixel ist

Der Ansatz nach Neyman wird am häufigsten verwendet.

Eine Alternative zum χ^2 -Verfahren ist die Maximum-Likelihood-Methode [96-99], welche jedoch eher ungebrauchlich ist und daher hier nicht näher betrachtet wird.

3.6 Nachverarbeitung

Für einige Anwendungen ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer [100] τ_m eine gute Möglichkeit um die Anzahl der auszuwertenden Parameter (Fluoreszenzlebensdauern, Amplituden) zu reduzieren. τ_m wird aus Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern berechnet:

$$\tau_m = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i} \quad (3.18)$$

Um Rauschen im Fluoreszenzparameterraum zu reduzieren, kann örtliche Mittelwert- oder Median-Filterung angewandt werden. Sinnvolle Größen für den Filterkern sind 3 x 3 oder 5 x 5 Pixel, abhängig von der Stärke des Rauschens in den Daten.

Der relative Anteil Q einer Exponentialfunktion am gesamten Fluoreszenzabfall ergibt sich zu:

$$Q_i = 100 \cdot \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_n \alpha_n \tau_n} \quad (3.19)$$

4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Teilbereich sollen Verfahren der Messdatenverarbeitung entwickelt werden, welche die speziellen Probleme bei der *in vivo* FLIO-Messung adressieren. Konkret sollen im ersten Teilbereich der Arbeit die folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen adressiert werden:

- Artefakte durch inhomogene Fluoreszenzverteilung behandeln
- Artefakte durch Reflexionen im optischen Strahlengang des FLIO-Systems behandeln
- Modellierung der Fluoreszenz vom Augenhintergrund als dreidimensionale Oberfläche
- Modellierung der Fluoreszenz des Auges als Schichtstruktur
- Modellierung der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse
- Nutzung örtlicher Information zur Verbesserung der Fluoreszenzlebensdauerapproximation

Die zu entwickelnden Verfahren sollen in eine Software zur Modellierung und Auswertung von FLIO-Daten umgesetzt und deren Wirksamkeit anhand von Anwendungsbeispielen demonstriert werden. Mit Hilfe der Software sollen Fluoreszenzlebensdauern von einzelnen FLIO-Messungen sowie von Probandengruppen mittels deskriptiver Statistik analysierbar sein. Verschiedene Probandengruppen sollen mit geeigneten statistischen Tests verglichen werden können. Weiterhin soll die zu entwickelnde Softwarelösung auch die anwenderoptimierte Visualisierung der Fluoreszenzlebensdauern einzelner FLIO-Messungen und von Probandengruppen ermöglichen. Die Präsentation der Modellierungsergebnisse soll derart gestaltet werden, dass der Anwender die Ergebnisse optimal interpretieren kann. Ferner sollen auch Simulationsdaten erzeugt und ausgewertet werden können, um damit neue Modellierungsansätze überprüfen zu können. Im Ergebnis soll ein Werkzeug entstehen, welches für die FLIO-Technik angepasste Algorithmen zur Datenanalyse und -visualisierung bietet, aber auch darüber hinaus für FLIM-Anwendungen geeignet ist.

Der zweite Teilbereich der Arbeit soll technische Einflüsse auf die FLIO-Methode untersuchen. In einem ersten Schritt soll die Wiederholbarkeit von FLIO anhand von Fluoreszenzfarbstoffen und anhand von Probandenmessungen untersucht werden, da dies bisher unbekannt ist. Anschließend sollen die derzeit verfügbaren FLIO-Systeme mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen verglichen und die Unterschiede zwischen den Geräten quantifiziert werden, um Aussagen über die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten von verschiedenen FLIO-Systemen treffen zu können. Weiterhin soll im Rahmen der Arbeit geklärt werden, ob eine Erweiterung der Feldgröße bei der FLIO-Methode möglich ist. Läsionen bzw. Krankheiten wie z.B. Diabetische Retinopathie beginnen oft in der Peripherie des Augenhintergrundes [101]. Gefäßverschlüsse können ebenfalls in weiter außenliegenden Blutgefäßen auftreten. Eine Bildgebung über das häufig verwendete 30° Feld des Augenhintergrundes hinaus ist

daher ein aktueller Trend in der Ophthalmoskopie. Das FLIO-System ist gegenwärtig auf Feldgrößen von 30° beschränkt. Für die Frühdiagnostik von Augenkrankheiten wären größere Feldgrößen hilfreich. Vom Hersteller der Scanning Laser Ophthalmoskop Basis des FLIO-Systems ist kommerziell ein Weitwinkelobjektiv mit 55° verfügbar. Es soll im Rahmen der Arbeit geklärt werden, ob das Weitwinkelobjektiv für FLIO-Messungen geeignet ist. Daher wird mittels Fluoreszenzfarbstoffen und einer Probandenstudie untersucht, ob das Weitwinkelobjektiv wiederholbare Messdaten liefert und ob signifikante Unterschiede zwischen dem Standardobjektiv und dem Weitwinkelobjektiv bestehen.

Im dritten Teilbereich sollen physiologische Einflussfaktoren auf die FLIO-Messungen untersucht werden. Dazu soll anhand von geeigneten Probanden die Auswirkung der natürlichen Augenlinse auf die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds quantitativ bestimmt werden. Schweitzer et al. [31] haben gezeigt, dass Diabetespatienten ohne diabetische Retinopathie eine veränderte Fluoreszenzlebensdauer besitzen. Daraus abgeleitet, stellt sich die Frage, ob der Blutzuckerspiegel einen Einfluss auf die FLIO-Messung hat. Daher soll in einer Probandenstudie untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Blutzuckerspiegel und Fluoreszenzlebensdauer des Augenhintergrunds gibt.

5 Integrative Methodik zur Approximation zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten vom Auge

5.1 Vorverarbeitung

5.1.1 Adaptives Binning

Um die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Probleme der inhomogenen Fluoreszenzverteilung auf der Retina zu lösen, wird ein adaptives Verfahren zum Binning vorgeschlagen. Das neue Verfahren nutzt ein kreisförmiges Fenster, zentriert für jedes zu binnende Pixel. Der Radius des Kreises wird iterativ erhöht und fasst mit jeder Iteration mehr Pixel aus der Umgebung zusammen, bis ein vordefinierter Mindestwert an Photonen je Pixel erreicht wird. Daher kann durch adaptives Binning die Anzahl der Photonen im gebinnten Bild garantiert werden. Dies wird mit der höchstmöglichen Ortsauflösung erreicht. Abb. 5.1 stellt die Funktionsweise von statischem und adaptivem Binning anhand eines Patienten mit Diabetes Mellitus dar. Für statisches Binning wird ein Binning Faktor von 2 und für adaptives Binning ein Mindestwert von 100.000 Photonen je Pixel verwendet. Adaptives Binning erzeugt eine deutlich homogenere Verteilung der Fluoreszenzintensität, da jeder Pixel mindestens 100.000 Photonen besitzt. Auch ist der Abfall der Fluoreszenzintensität am Bildrand nicht mehr vorhanden. Im Idealfall wäre die Fluoreszenzintensität nach adaptiven Binning völlig homogen. Der Verlust an Ortsinformation im Fluoreszenzintensitätsbild ist irrelevant, da die Fluoreszenzlebensdauer unabhängig von der Fluoreszenzintensität ist (Abschnitt 2.1.4).

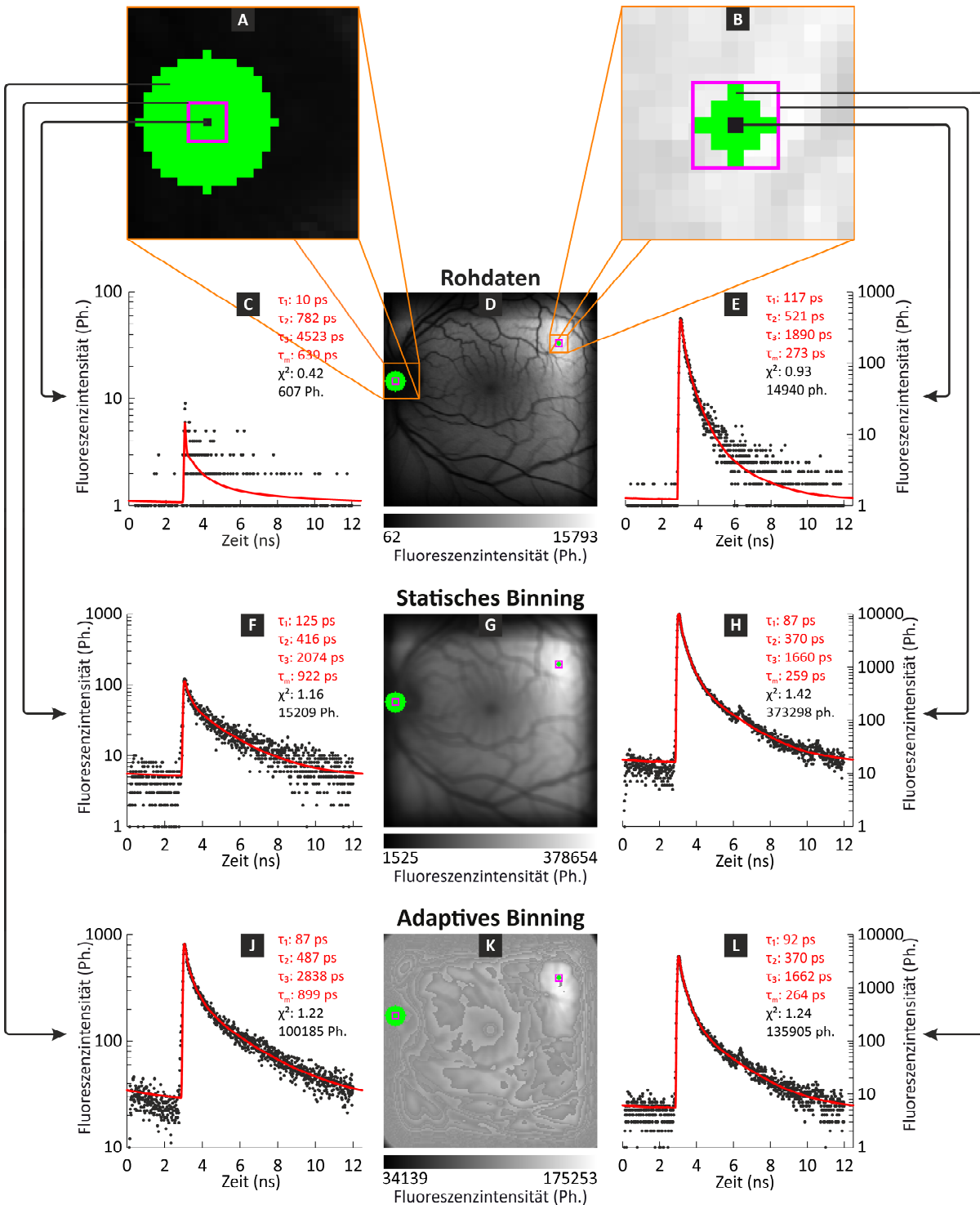


Abbildung 5.1 Demonstration der Funktionsweise von statischem und adaptivem Binning in einem Diabetes mellitus Patienten. Die obere Zeile der Photonenhistogramme (C, E) zeigt die Rohdaten, die mittlere Zeile zeigt die Photonenhistogramme nach statischem Binning (F, H) und die untere Zeile die Photonenhistogramme nach adaptivem Binning (J, L). In den vergrößerten Insets, welche über der oberen Zeile der Photonenhistogramme dargestellt sind, verwendet statisches Binning alle Pixel innerhalb des magenta Quadrats, während adaptives Binning die grün markierten Pixel benutzt. Das schwarze Quadrat markiert das jeweils zu binnende Pixel. Im hellen Bildbereich (rechtes Inset, B) werden bei statischem Binning mehr Pixel verwendet als bei adaptivem Binning. Im dunklen Bildbereich (linkes Inset, A) verwendet adaptives Binning mehr Pixel als statisches Binning. Die linke Spalte (C, F, J) zeigt die Photonenhistogramme eines Pixels in einer dunklen Bildregion, während die rechte Spalte (E, H, L) Photonenhistogramme eines Pixels in einer hellen Bildregion zeigt. Die mittlere Spalte zeigt Bilder der Fluoreszenzintensität der Rohdaten (D), nach statischem Binning (G) und nach adaptivem Binning (K). Der größere Verlust an Kontrast bei adaptivem Binning resultiert in einem höheren SNR in den Photonenhistogrammen der darunterliegenden gebinneten Pixel.

5.1.2 Behandlung von Reflexionen im Fluoreszenzsignal

Reflexionen im optischen Strahlengang können zu Artefakten im Photonenhistogramm führen. Das Fluoreszenzsignal fällt über die Zeit ab, beginnend am Zeitpunkt der Anregung. Die Reflexion von Fluoreszenzphotonen, z.B. an der Detektoroberfläche oder an optischen Filtern, verursacht einen plötzlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Da die reflektierten Photonen eine zusätzliche Wegstrecke zurücklegen, werden diese zu einem späteren Zeitpunkt detektiert und verursachen so den Anstieg des Fluoreszenzsignals. Ein Beispiel mit zwei Reflexionen ist in Abb. 5.2 dargestellt. Die Auswirkungen der Artefakte auf die Fluoreszenzlebensdauern (multi-exponentieller Ansatz, Abschnitt 3.4.2) eines Pixels sind in der Abbildung beispielhaft aufgezeigt.

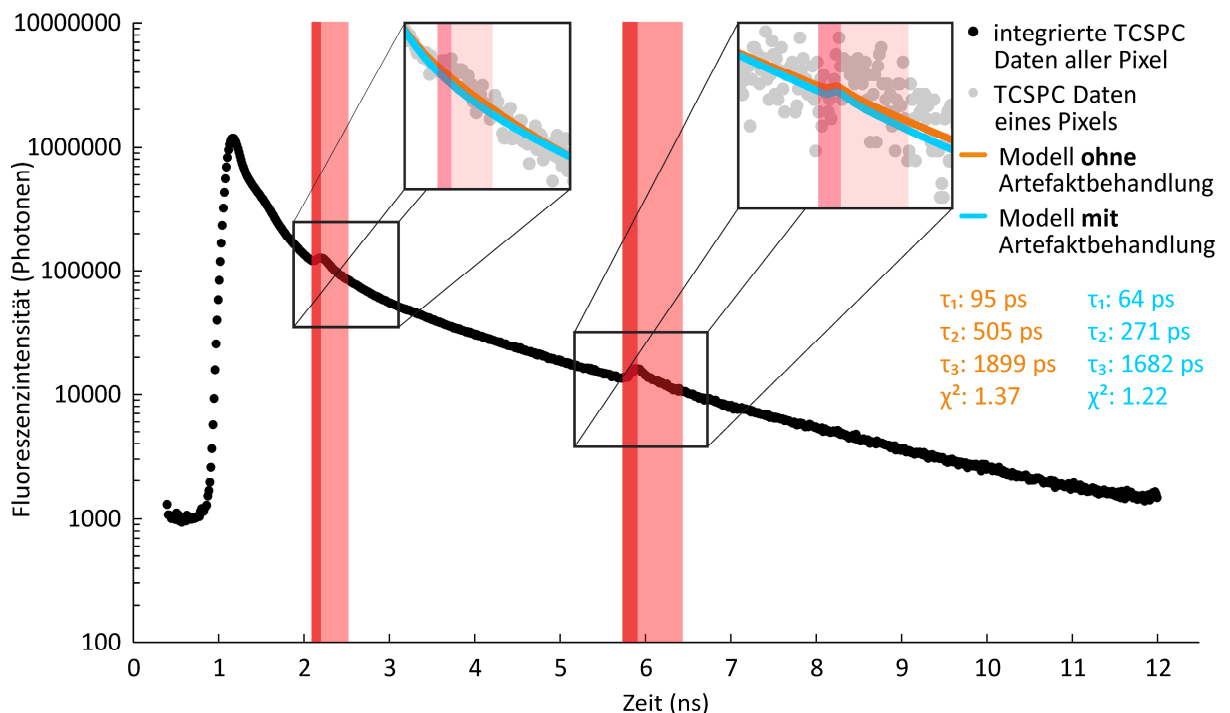


Abbildung 5.2 TCSPC Daten nachdem die Fluoreszenzsignale aller Pixel einer Messung eines gesunden Probanden zusammengefasst wurden (schwarz). Die automatisch detektierten Artefakte, welche durch Reflexionen im optischen Strahlengang verursacht wurden, unterteilen sich in Anstieg (dunkelrot) und Abfall (hellrot). Der Abfall wird durch die dreifache Länge des Anstiegs approximiert. Zur besseren Lesbarkeit ist das Fluoreszenzsignal logarithmisch skaliert. Die Insets zeigen das vergrößerte Segment der TCSPC Daten eines einzelnen Pixels (grau). Die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauerapproximation mittels multi-exponentiellem Ansatz sind mit Artefaktbehandlung (blau) und ohne Artefaktbehandlung (orange) dargestellt.

Typischerweise werden solche Artefakte verhindert, indem parallele Flächen im optischen Strahlengang vermieden werden. Gelingt dies nicht vollständig, verbleiben Artefakte im Fluoreszenzsignal. Daher wurde ein Algorithmus entwickelt, um Reflexions-Artefakte zu detektieren und zu entfernen. Um ein bestmögliches SNR zu erhalten, werden die Fluoreszenzsignale aller Pixel eines Bildes zu einem einzigen Fluoreszenzsignal zusammengefasst, da die Position der Reflexions-Artefakte im Zeitbereich nicht über die Pixel variiert. Anschließend wird der Gradient des Abfalls des Fluoreszenzsignals nach Abschnitten mit steigendem Gradienten untersucht, um die Startzeitpunkte der Reflexionsartefakte zu bestimmen. Der Endzeitpunkt eines Reflexionsartefakts ist nicht direkt

bestimmbar, da die Reflexion einer Faltung des Fluoreszenzsignals mit einem Dirac-Stoß am entsprechenden Zeitpunkt, gewichtet mit dem Reflexionsgrad der Artefaktquelle, entspricht. Da dies die Komplexität der Modellierung (Abschnitt 3.4) stark erhöht, wird der Endzeitpunkt approximiert, indem die dreifache Länge des Intervall des Startzeitpunkt zum Zeitpunkt des Maximum des Artefakts angehängt wird (hellroter Bereich in Abb. 5.2). Dies wurde empirisch bestimmt. Die detektierten Artefakte werden entfernt, indem die Zeitintervalle der Artefakte von der Berechnung des Gütekriteriums für alle Pixel ausgeschlossen werden. In Abb. 5.2 sind die detektierten Reflexionsartefakte rot markiert. Die Abschnitte mit steigendem Gradient sind dunkelrot gefärbt, während die approximierten Abfälle der Artefakte mit hellrot markiert sind.

5.2 Modellierung der Fluoreszenz der Augenlinse

5.2.1 Schichtbasierter Ansatz

Das Auge besitzt fluoreszierende Schichten, beginnend mit Cornea und Linse, bis hin zu den Schichten der Retina, welche zur Fluoreszenz anregbar sind. Fluoreszenzphotonen, die in Schichten mit größerer Entfernung vom Scanning Laser Ophthalmoscope erzeugt werden, werden aufgrund der zusätzlich zurückgelegten Wegstrecke von Anregungslicht und Fluoreszenzphotonen zu einem späteren Zeitpunkt detektiert. Um diese zusätzliche Wegstrecke zu berücksichtigen, haben Schweitzer et al. [102] den multi-exponentiellen Ansatz um einen zeitlichen Verschiebeparameter tc erweitert, welcher in dieser Arbeit als schichtbasierter Ansatz bezeichnet wird:

$$I(t) = IRF * \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t-tc_i}{\tau_i}} + b \quad (5.1)$$

Zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz der Augenlinse haben gezeigt, dass eine einzelne Exponentialfunktion oft nicht ausreicht, um das Fluoreszenzabklingverhalten zu beschreiben [103]. Daher können im schichtbasierten Ansatz auch mehrere Exponentialfunktionen verwendet werden um die Linsenfluoreszenz zu modellieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Stretched Exponentials in Kombination mit dem Schichtmodell:

$$I(t) = IRF * \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\left(\frac{t-tc_i}{\tau_i}\right)^\beta} + b \quad (5.2)$$

5.2.2 Linsen-korrigierter Ansatz

Beim schichtbasierten Ansatz (Abschnitt 5.2.1) müssen die Modellparameter für die Fluoreszenz der Augenlinse zusätzlich zu den Parametern für die Retinafluoreszenz bestimmt werden, was die Komplexität und damit die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Parameter deutlich erhöht. Alternativ kann das Fluoreszenzsignal der Augenlinse direkt in die Modellfunktion eingebettet werden. Dieser Ansatz wird „linsen-korrigierter Ansatz“ genannt, wobei das Abklingverhalten der Fluoreszenz der Augenlinse I_{Linse} separat gemessen werden muss:

$$I(t) = IRF * \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\left(\frac{t-tc_i}{\tau_i}\right)^\beta} + \alpha_{Linse} \cdot I_{Linse}(t - tc_{Linse}) + b \quad (5.3)$$

Abb. 5.3 visualisiert die Applikation des linsen-korrigierten Ansatzes im Vergleich zum multi-exponentiellen Ansatz anhand von Messdaten eines gesunden Probanden.

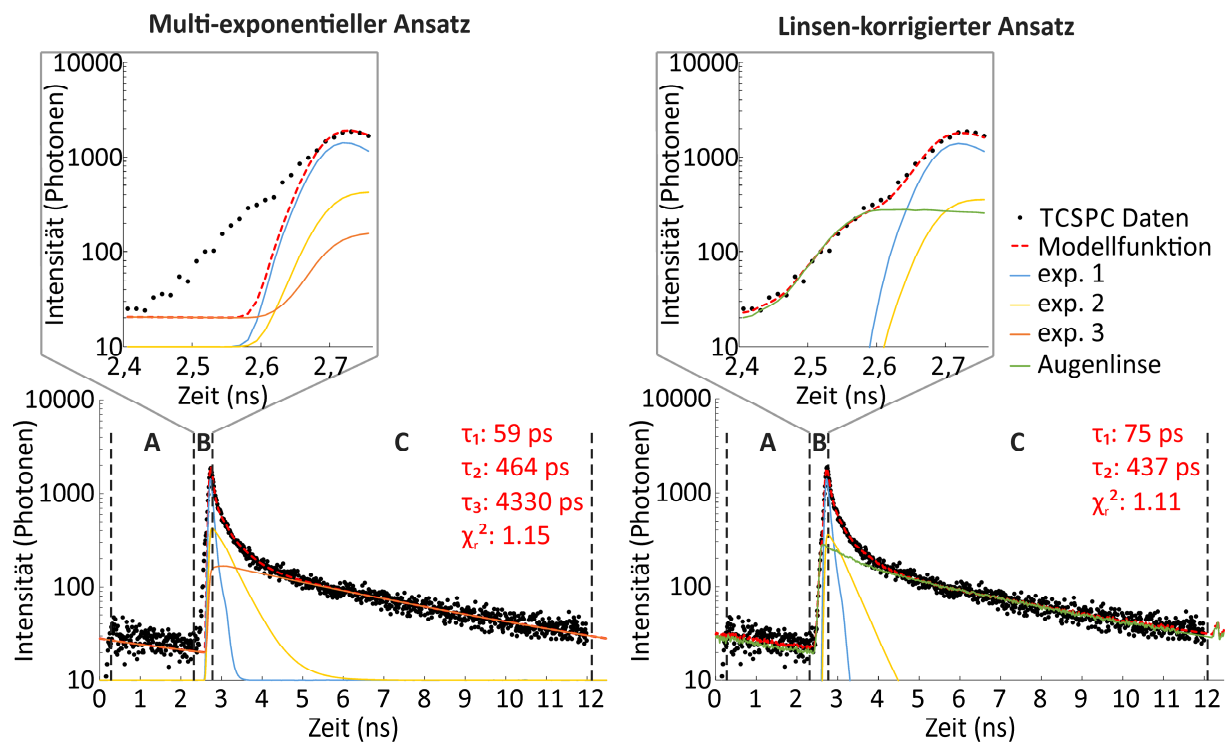


Abbildung 5.3 Die TCSPC Daten eines gesunden Probanden wurden mit adaptiven Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) vorverarbeitet (schwarz) und anschließend mit Hilfe des multi-exponentiellen Ansatzes (links) unter Benutzung von drei Exponentialfunktionen sowie des linsen-korrigierten Ansatzes (rechts) unter Benutzung von zwei Exponentialfunktionen sowie einer separaten Messung der Augenlinse approximiert. Die Daten sind in drei Intervalle eingeteilt: das pre-Anregungsintervall (A), den Fluoreszenzanstieg (B) und den Fluoreszenzabfall (C). Die Modellfunktion des multi-exponentiellen Ansatzes differiert durch den Einfluss der Augenlinse stark von den Messdaten in (B). Der linsen-korrigierte Ansatz kann den Einfluss der Augenlinse in (B) mit Hilfe einer skalierten und verschobenen separaten Messung der Fluoreszenz der Augenlinse kompensieren. Aufgrund des hohen Anteils an Fluoreszenz der Augenlinse wird das verbleibende Fluoreszenzsignal nur mit zwei Exponentialfunktionen (exp.) modelliert. Zur besseren Lesbarkeit sind die Fluoreszenzintensitäten und Modellfunktionen logarithmisch skaliert.

5.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenz an dreidimensionalen Oberflächen

5.3.1 Modellfunktion

Um die zeitaufgelöste Fluoreszenz an einer dreidimensionalen Oberfläche zu modellieren, muss die Zeit t_k , die ein Photon vom Anregungsstrahlaustrittspunkt zur dreidimensionalen Oberfläche und zurück zum Detektor benötigt, berücksichtigt werden:

$$I(t, x, y) = \sum_i \alpha_i(x, y) \cdot f_i(t - t_k(x, y), x, y) + b(x, y) \quad (5.4)$$

wobei x und y die Koordinaten eines Bildpunktes definieren und f eine Modellfunktion nach Abschnitt 3.4 oder Abschnitt 5.1.2 darstellt. Der Effekt dieses Vorgehens wird in Abb. 3.4 (relativer Fehler ohne angepasstes Modell) im Vergleich zu Abb. 5.4 (relativer Fehler mit angepasstem Modell) deutlich. Bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 50 ps ist der relative Fehler nun $\leq 1\%$, bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 25 ps $\leq 2\%$.

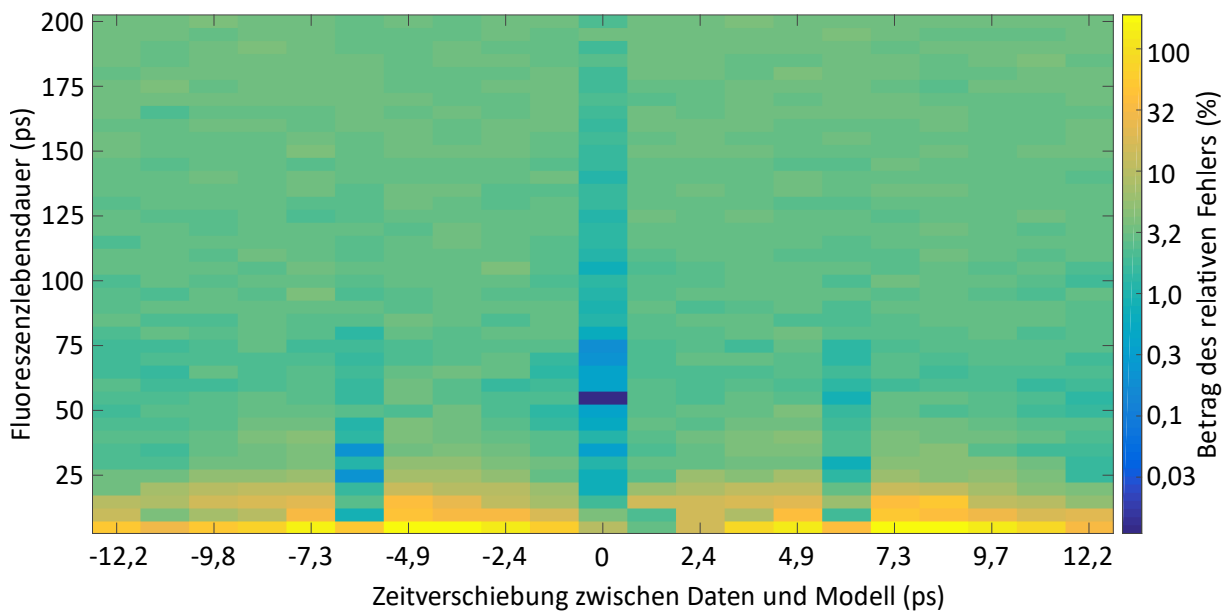


Abbildung 5.4 Einfluss der Zeitverschiebung zwischen Daten und Modell auf die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bei Berücksichtigung der Zeitverschiebung in der Modellierung. Farblich kodiert und logarithmisch skaliert ist der Betrag des relativen Fehlers der Fluoreszenzlebensdauer.

5.3.2 Ansatz zur Fixierung der Zeitverschiebung

Die zeitliche Verschiebung der Modellfunktion gegenüber den Messdaten erhöht die Komplexität des Minimierungsproblems für den entsprechenden Algorithmus erheblich, da die Faltung mit der IRF in der Modellfunktion auch eine zeitliche Verschiebung hervorruft. Diese ist abhängig von der zu Grunde liegenden Fluoreszenzlebensdauer, welche ebenfalls durch den Minimierungsalgorithmus bestimmt wird. Die Fluoreszenzlebensdauern und der Parameter der Zeitverschiebung sind also stark voneinander abhängig. Daher wird in der Praxis die Zeitverschiebung oft initial für ein Bild bestimmt und für die eigentliche Approximation der Fluoreszenzlebensdauern je Pixel fixiert. Wie oben beschrieben, führt dies bei FLIO zu Abweichungen in der zeitlichen Verschiebung und damit zu fehlerhaften Fluoreszenzlebensdauern. Auf der anderen Seite kann die erhöhte Komplexität den Minimierungsalgorithmus daran hindern, die optimale Lösung zu finden und dadurch ebenfalls zu fehlerhaften Fluoreszenzlebensdauern führen.

Um den Parameter der Zeitverschiebung dennoch bei der Minimierung je Pixel fixieren zu können, wird eine annähernd korrekte Schätzung dafür benötigt. Dies kann erreicht werden, indem das zu verarbeitende Bild vom Augenhintergrund zuerst mit einer sehr geringen Ortsauflösung abgetastet wird, z.B. mit einem Gitter aus 2 x 2 Punkten, welche sich in den Ecken des Bildes befinden. Es können auch größere Gitter sinnvoll sein, wie z.B. 10 x 10 Punkte, die gleichmäßig über das Bild verteilt werden. An jedem dieser Gitterpunkte werden mittels adaptivem Binning (Abschnitt 5.1.1) eine ausreichende Anzahl an Photonen gesammelt. Untersuchungen von Meyer [104] schlagen vor, dass 300.000 Photonen je Pixel eine fehlerarme Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern ermöglichen. An den Gitterpunkten werden anschließend mit Hilfe eines stochastischen Minimierungsverfahrens (Abschnitt 5.4.1) die Fluoreszenzlebensdauern und die Zeitverschiebungen bestimmt. Letztlich werden aus den Zahlenwerten der Zeitverschiebung der Gitterpunkte die Zeitverschiebung für die Bildpunkte linear interpoliert und für die pixelweise Approximation der Fluoreszenzlebensdauern als fix betrachtet.

5.4 Bestimmung der Modellparameter

5.4.1 Minimierungsalgorithmen

Um die für das verwendete Modell (Abschnitt 3.4) optimalen Parameter zu bestimmen, muss das globale Minimum des Gütekriteriums (Abschnitt 3.5) durch einen Minimierungsalgorithmus bestimmt werden. Die Summation von Exponentialfunktionen und des Offsets sind lineare Operationen. Daher kann ein linearer Minimierungsalgorithmus zur Bestimmung die Amplituden und des Offsets angewandt werden. Die übrigen Parameter müssen durch einen nicht-linearen Minimierungsalgorithmus bestimmt werden. Dafür gibt es zwei Arten von Algorithmen: stochastische

Ansätze wie z.B. Evolutionsstrategien [105-107] und die Particle Swarm Methode [108, 109] sowie deterministische Ansätze wie z.B. die Levenberg-Marquardt Methode [110, 111] und die Nelder-Mead Simplex Methode [112]. Deterministische Verfahren sind abhängig von der Initiallösung und sind oft nicht in der Lage das globale Minimum zu finden. Stochastische Verfahren basieren auf zufälliger Variation und können daher das globale Minimum finden, auf Kosten eines deutlich höheren Rechenaufwands.

Aus der Vielzahl der verfügbaren nichtlinearen Minimierungsalgorithmen wurden Implementierungen ausgewählt, welche in MATLAB verfügbar waren oder als Quellcode vorlagen. Diese wurden für die Modellierung nach Abschnitt 3.4 und Abschnitt 5.1.2 soweit nötig parametrisiert und anhand typischer Beispiele verglichen. Es stellte sich heraus, dass Grenzen für die Modellparameter zwingend notwendig sind und daher von den Minimierungsalgorithmen unterstützt werden müssen. Für die Fluoreszenzlebensdauern, die zugehörigen Amplituden sowie den Offset sind nur positive Zahlenwerte sinnvoll. Der Streckungsexponent einer Stretched Exponential darf nur Zahlenwerte zwischen null und eins annehmen. *A priori* Wissen kann durch eine weitere Einschränkung des Modellparameterraums eingebracht werden, beispielsweise, wenn erwartete Fluoreszenzlebensdauern aus der Stoffzusammensetzung der Probe bekannt sind. Im Ergebnis mussten an FLIO angepasste Minimierungsverfahren entwickelt werden. Dazu wurde ein stochastisches Verfahren auf Basis der Differential Evolution [113] hinsichtlich des Rechenaufwands optimiert und ein Nelder-Mead Simplex Verfahren [112] um Grenzen für die Modellparameter erweitert. Beide Verfahren können für die pixelweise Approximation der Modellparameter angewendet werden. Der Differential Evolution Algorithmus liefert robuste Ergebnisse, benötigt aber 10x bis 100x mehr Rechenzeit als das Nelder-Mead Simplex Verfahren [114]. Daher eignet sich der Differential Evolution Algorithmus besonders gut, um eine initiale Lösung der Modellparameter, auf Basis des Integrals der Fluoreszenzabfälle über das Bild, zu berechnen. Anschließend wird diese Initiallösung als Startwert für einen deterministischen Minimierungsalgorithmus für die pixelweise Berechnung der Modellparameter verwendet. Die Parametrisierung der verwendeten Minimierungsalgorithmen basiert auf einer Vielzahl von praktischen Tests und ist in Anhang A dokumentiert.

5.4.2 Verteilte Berechnung

Die Berechnung der Modellparameter kann in Abhängigkeit vom Minimierungsalgorithmus sehr zeitaufwendig sein. Eine typische FLIO-Messung besteht aus 256 x 256 Pixeln. Benötigt die Berechnung eines Pixels eine Sekunde, so würde die Berechnung aller Pixel mehr als 18 Stunden dauern. Da die Pixel unabhängig voneinander berechnet werden können, lässt sich die Berechnung vergleichsweise einfach auf mehrere Prozessorkerne (CPUs) verteilen. Bei aktuell üblichen Quad-Core Prozessoren kann so die Dauer der Berechnung um ca. Faktor 4 verringert werden. Um die Berechnung weiter zu beschleunigen, wurde ein Verfahren entwickelt um die Compute-Server des Instituts für Biomedizinische Technik und Informatik (BMTI) der TU Ilmenau einzubinden. Tabelle 5.1 listet einige technische Daten der Compute-Server auf. Es wird ersichtlich, dass die Compute-Server sehr heterogen bzgl. ihrer Rechenleistung sind, sich also stark in Anzahl der CPU-Kernen und Taktfrequenzen unterscheiden. Die verbauten CPU-Typen basieren auf Architekturen, welche zwischen 2007 und 2014 auf den Markt gebracht wurden und daher, neben Anzahl der CPU-Kerne und Taktraten, erhebliche Unterschiede in Bezug auf den Entwicklungsstand und somit in der Leistungsfähigkeit aufweisen.

Tabelle 5.1 Überblick über die Compute-Server des BMTI zur verteilten Berechnung. Es stehen insgesamt 132 CPU-Kerne sowie weitere 100 virtuelle CPU-Kerne durch Hyper-Threading (HT) zur Verfügung.

Server	CPU Typ (Generation)	CPU Kerne	CPU Taktrate	Arbeitsspeicher
huascaran	Intel Xeon E7450 (Core2)	24	2,4 GHz	128 GB
coropuna	Intel Xeon E5472 (Core2)	8	3,0 GHz	64 GB
cotopaxi	Intel Xeon X5570 (Nehalem)	8+HT	2,9 GHz	48 GB
lanin	Intel Xeon E5-2687W v3 (Haswell)	20+HT	3,1 GHz	128 GB
cabaraya	Intel Xeon E5-2690 v3 (Haswell)	24+HT	2,6 GHz	128 GB
aconcagua	Intel Xeon E5-2697 v3 (Haswell)	28+HT	2,6 GHz	384 GB
tacora	Intel Xeon E5-2650 v3 (Haswell)	20+HT	2,3 GHz	64 GB

Ein Verfahren zur verteilten Berechnung muss den heterogenen Charakter der Compute-Server bezüglich CPU-Typ und Taktrate berücksichtigen, um nicht ggf. durch die langsameren Server limitiert zu werden. Dies bedeutet, dass die Rechenlast nicht gleichmäßig über alle Server aufgeteilt werden kann. Ohnehin stehen die Compute-Server nicht exklusiv zur Verfügung und können daher durch andere Nutzer stark ausgelastet werden. Weiterhin muss die Ausfallsicherheit der verteilten Berechnung sichergestellt werden, da die Netzwerkverbindung zur Kommunikation mit den Compute-

Servern gestört sein kann und einzelne Compute-Server durch technische Defekte oder Nutzereinfluss ausfallen können. Eine weitere Anforderung an die verteilte Berechnung ist die Transparenz für den Nutzer. Die Verteilung der Berechnung auf den Computer-Servern soll für den Nutzer automatisiert im Hintergrund ablaufen. Darüber hinaus sollen mehrere Nutzer die Computer-Server gleichzeitig und fair aufgeteilt zur FLIO-Berechnung nutzen können.

Um den Anforderungen gerecht zu werden, wurde ein Master-Slave-System entwickelt. Der Master ist der vom Nutzer gesteuerte Computer. Je Compute-Server laufen ein oder mehrere Slaves. Die Daten werden über ein Netzwerklaufwerk ausgetauscht, auf welchem sowohl der Master als auch die Slaves Dateien lesen und schreiben können. Der Master zerteilt einen spektralen Kanal einer FLIO-Messung in Gruppen von Pixel und erzeugt je Pixel-Gruppe ein Arbeitspaket, welches zum einen die Messdaten enthält und zum anderen die IRF sowie die Parameter für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Die Slaves lesen einzelne Arbeitspakete und berechnen die darin enthaltenen Pixel parallel auf den ihnen zur Verfügung stehenden CPUs. Daher sollte eine Pixelgruppe möglichst ein ganzzahliges Vielfaches der CPU-Kerne als Pixel besitzen. Hat ein Slave ein Arbeitspaket eingelesen, wird dieses gelöscht, um zu verhindern, dass andere Slaves dieses Arbeitspaket ebenfalls einlesen. Der bearbeitende Slave erzeugt stattdessen eine Datei, welche signalisiert, dass das konkrete Arbeitspaket gerade bearbeitet wird. Ist die Berechnung des Arbeitspakets beendet, wird diese Datei wieder gelöscht und das Ergebnis des Arbeitspaketes abgelegt. Der Dateizugriff wird über Semaphoren geregelt. Der Master liest die von den Slaves erzeugten Ergebnisse ein und setzt diese wieder zusammen. Gleichzeitig überprüft der Master ständig, ob Arbeitspakete verloren gegangen sind oder deren Berechnung zu lange dauert (z.B. durch einen Ausfall eines Slaves) und erzeugt die betreffenden Arbeitspakete bei Bedarf neu. Wurde ein Arbeitspaket mehrmals erfolglos neu erzeugt, berechnet der Master die Ergebnisse selbst, da alle Slaves ausgefallen sein könnten. Generell kann der Master bei Bedarf analog zu den Slaves Arbeitspakete berechnen. Für jede verteilte Berechnung erzeugt der Master einen Ordner mit einer eindeutigen Bezeichnung, in dem die Arbeitspakete abgelegt werden. Wurden alle Ergebnisse eingelesen, wird dieser Ordner wieder gelöscht. Dadurch können mehrere Master gleichzeitig das Netzwerklaufwerk zur verteilten Berechnung benutzen, da jeder Master einen eigenen Ordner benutzt. Die Slaves arbeiten die Ordner nach dem Zeitpunkt der Erstellung ab (First In – First Out Verfahren), wodurch mehrere Master nacheinander fair Rechenzeit erhalten.

5.5 Verbesserung der Fluoreszenzlebensdauer-Approximation

5.5.1 Ausnutzung örtlicher Information

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Approximation von Parametern der Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe einer Modellfunktion und eines Minimierungsalgorithmus. Beispielsweise kann Rauschen im Fluoreszenzsignal, verursacht durch eine zu niedrige Anzahl detektierter Photonen, zu instabilen Ergebnissen der Approximation führen. Weiterhin kann eine ungünstige Modellfunktion, beispielsweise durch eine höhere Anzahl angeregter Fluorophore als verwendeter Exponentialfunktionen, die Formulierung des Problems verschärfen. Des Weiteren kann der Minimierungsalgorithmus in einem lokalen Minimum feststecken und so nicht in der Lage sein, das globale Minimum zu finden. Örtliche *a priori* Information kann verwendet werden um die Approximation zu stabilisieren und zu verbessern. Die FLIO-Ortsauflösung beträgt ca. $34 \times 34 \mu\text{m}^2$ je Pixel. Es kann angenommen werden, dass sich die Eigenschaften der Fluoreszenzlebensdauer nur wenig von Pixel zu Pixel verändern. Daher sollten die Parameter der Fluoreszenzlebensdauer eines Pixels gute Schätzwerte für Pixel in dessen Umgebung sein. Diese Annahme kann modelliert werden, indem das Gütekriterium (Abschnitt 3.5) zusätzlich für die benachbarten Pixel berechnet wird, mit dem Ziel einer rauschärmeren Approximation der Fluoreszenzlebensdauer. Das resultierende $\chi_{r,N}^2$ ist definiert als eine Kombination der Gütekriterien des zentralen Pixels $\chi_{r,CP}^2$ und der benachbarten Pixel $\chi_{r,APi}^2$:

$$\chi_{r,N}^2 = (\chi_{r,CP}^2)^2 + \left(\frac{1}{n} \cdot \sum_i^n \chi_{r,APi}^2 \right)^2 \quad (5.5)$$

Wobei n die Anzahl der benachbarten Pixel ist. $\chi_{r,N}^2$ wird nun an Stelle von χ_r^2 vom Minimierungsalgorithmus benutzt.

5.5.2 Iterativer Algorithmus zur Behandlung von Ausreißern

Da in Bildern der Fluoreszenzlebensdauer häufig Ausreißer erkennbar sind, kann eine separate Behandlung dieser Ausreißer sinnvoll sein um die Fluoreszenzlebensdauerapproximation zu verbessern. Nach der Fluoreszenzlebensdauerapproximation aller Pixel eines Bildes werden Ausreißer detektiert, indem ein Fenster mit nutzer-definierter Größe über das gesamte Bild geschoben wird. Eine Fenstergröße von 7×7 Pixeln zeigte gute Ergebnisse in praktischen Tests. Das bewegte Fenster wird auf sämtliche Fluoreszenzlebensdauer-Parameter und das Gütekriterium angewandt. In jedem Fenster wird der zentrale Pixel gegen den Median aller Pixel innerhalb des Fensters verglichen. Ist der relative Unterschied zwischen zentralem Pixel und Median größer als ein nutzer-definierter Schwellwert, so wird die Fluoreszenzlebensdauerapproximation für diesen Pixel wiederholt. Als

Startwerte werden dabei die Fluoreszenzlebensdauer-Parameter des Pixels innerhalb des Fensters verwendet, welcher den besten Wert des Gütekriteriums besitzt. Das Ergebnis dieser wiederholten Fluoreszenzlebensdauerapproximation wird nur übernommen, falls der Wert des Gütekriteriums besser ist, als das ursprüngliche Approximationsergebnis des Pixels. Der verwendete Schwellwert ist abhängig von der spezifischen Anwendung und der erwarteten Variabilität in Fluoreszenzlebensdauer-Parameterraum. Ein Schwellwert von ca. 30% lieferte gute Ergebnisse in praktischen Tests. Abb. 5.5 visualisiert den oben beschriebenen Algorithmus zur Behandlung von Ausreißern mit einer Fenstergröße von 7 x 7 Pixeln und einem Schwellwert von 30% anhand eines gesunden Probanden.

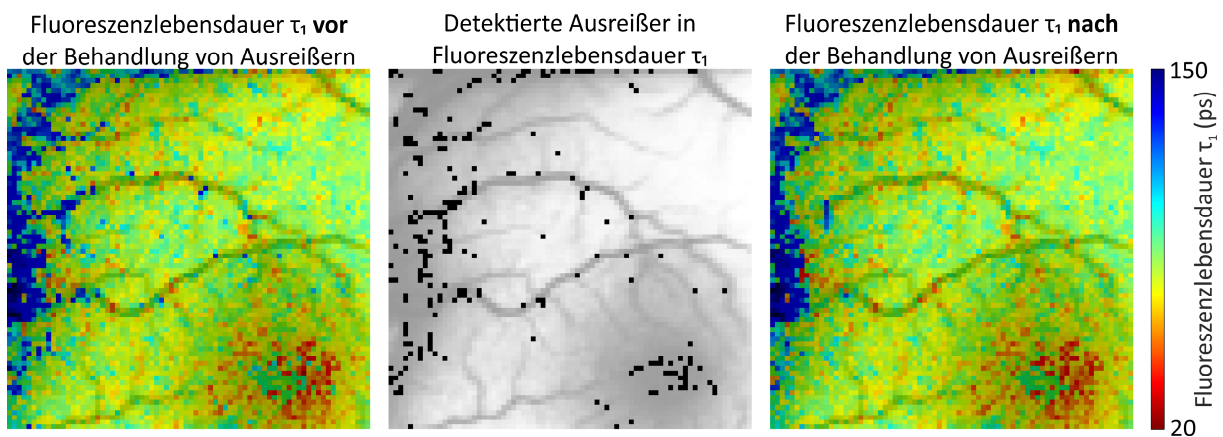


Abbildung 5.5 Vergleich eines 75 x 75 Pixel großen Ausschnitts der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 vom linken Auge eines gesunden Probanden vor (links) und nach (rechts) der Behandlung von Ausreißern. Die detektierten Ausreißer (schwarz) sind in der Mitte dargestellt. Ein Grauwertbild der Fluoreszenzintensität ist allen drei Einzelgrafiken zur besseren Orientierung überlagert. Die Farbskala der beiden Darstellungen der Fluoreszenzlebensdauer ist identisch. Die Makula des Probanden befindet sich in der unteren rechten Ecke der Bilder, wo die kürzesten Fluoreszenzlebensdauern auftreten (rot).

5.6 Methodik zur statistischen Auswertung der Approximationsergebnisse

5.6.1 Region of Interest

Eine visuelle Einschätzung der Fluoreszenzlebensdauer-Parameter ist wichtig zur generellen Bewertung der Bildqualität. Zur Erkennung von pathologischen Veränderungen ist jedoch eine quantitative Analyse notwendig. Dysli et al. [64] haben vorgeschlagen das ETDRS-Gitter (engl. early treatment diabetic retinopathy study), welches durch die Age-Related Eye Disease Study group [115] eingeführt wurde, auch für standardisierte Regions of Interest (ROI) in FLIO-Daten zu verwenden. Drei konzentrische Kreise im

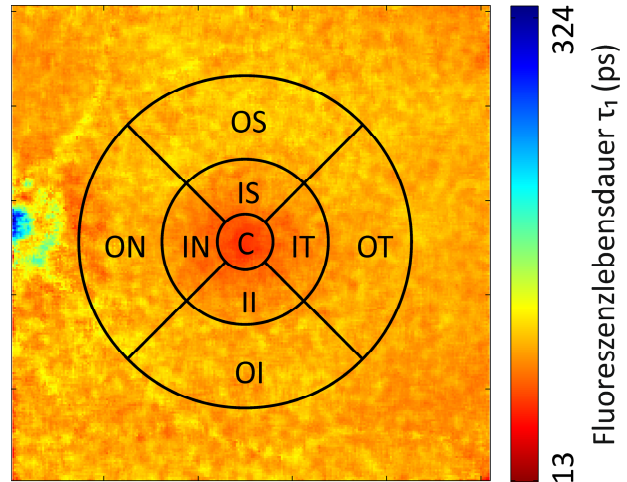


Abbildung 5.6 ETDRS-Gitter auf der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 des linken Auges eines gesunden Probanden mit den Feldern central (C), inner superior (IS), inner inferior (II), inner nasal (IN), inner temporal (IT), outer superior (OS), outer inferior (OI), outer nasal (ON), und outer temporal (OT).

Zentrum der Makula und vier radiale Linien bei 45° , 135° , 225° und 315° bilden das Gitter. Die Radien der Kreise sind abhängig vom Durchmesser der Papille eines Durchschnittsauges, welcher zu $1500 \mu\text{m}$ definiert wird. Der Radius des inneren Kreises entspricht $1/3$ des Papillen-Durchmessers ($500 \mu\text{m}$), der Radius des mittleren Kreises entspricht dem Durchmesser der Papille ($1500 \mu\text{m}$) und der Radius des äußeren Kreises entspricht zwei Papillen-Durchmessern ($3000 \mu\text{m}$). Daraus resultieren 9 Subfelder des Gitters: central, inner superior, inner inferior, inner nasal, inner temporal, outer superior, outer inferior, outer nasal, und outer temporal. Weiterhin lassen sich ein innerer und ein äußerer Ring definieren. Abb. 5.6 stellt das ETDRS-Gitter anhand der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 vom linken Auge eines gesunden Probanden dar. Neben dem ETDRS-Gitter können auch rechteckige, kreisförmige oder Freiform-ROIs, je nach Anwendungsfall, sinnvoll sein. Eine weitere Möglichkeit sind Masken zur Segmentierung von einer hohen Anzahl kleiner Regionen, wie z.B. Drusen am Augenhintergrund. Die Masken können durch Bildverarbeitung oder ggf. aus einer anderen Bildgebungsmodalität gewonnen werden.

5.6.2 Gruppenvergleich

Vergleiche zwischen Gruppen von Probanden, beispielsweise Patienten und Kontrollen werden häufig anhand ihrer Mittelwerte bzw. Mediane durchgeführt. Sind beide Gruppen normalverteilt, wird meist ein t-Test [116] verwendet. Sind die Gruppen nicht normalverteilt, kann der Wilcoxon-

Rangsummentest [117] verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Holm-Bonferroni-Methode [118], um detaillierte Informationen zu erhalten, worin sich zwei Gruppen unterscheiden, welche im Folgenden kurz beschrieben wird. Zuerst wird für die betrachtete Fluoreszenzlebensdauer ein Histogramm über sämtliche Pixel innerhalb der ausgewählten Region of Interest (Abschnitt 5.6.1) für jeden Probanden der Studie berechnet. Dieses Histogramm wird in Klassen unterteilt. Die gewählte Klassenweite hat einen großen Einfluss und ist abhängig von der Zielstellung des Vergleichs. Anschließend wird für jede Klasse des Histogramms ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen Patienten und Kontrollen berechnet. Der Ansatz testet mit einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit die Nullhypothese, dass die Daten der Patienten und Kontrollen kontinuierlichen Verteilungen mit identischen Medianen entstammen, gegenüber der Alternative, dass dies nicht der Fall ist. Die errechneten p -Werte je Klasse werden gegen einen Schwellwert th verglichen:

$$th = \frac{s}{nC} \quad (5.6)$$

wobei s die Irrtumswahrscheinlichkeit und nC die Anzahl der Histogrammklassen darstellt. Für Histogrammklassen mit einem p -Wert unterhalb des Schwellwerts, sind die Mediane von Patienten und Kontrollen signifikant verschieden.

Die mittels Holm-Bonferroni-Methode bestimmten signifikant unterschiedlichen Klassen können benutzt werden, um daraus einen Klassifikator abzuleiten. Die Klassifikationsgüte wird durch die „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) [119] dargestellt und beurteilt. Die ROC wird berechnet, indem für jeden p -Wert einer Klasse die Sensitivität und Spezifität bestimmt und im Diagramm abgetragen wird. Je weiter sich die so entstandene Kurve der linken oberen Ecke nähert, desto besser ist die Klassifikation. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) dient dabei als quantitatives Maß zur Bewertung. Die AUC kann zwischen 0 und 1 liegen. Ein schlechter Klassifikator, welcher nur zufällige Werte liefert, hat eine AUC von 0,5. Ein Wert von 1 stellt das maximal erreichbare Klassifikationsergebnis dar. Der cut-off Punkt ist der Punkt auf der ROC, welcher am nächsten an der linken oberen Ecke liegt und entspricht dem besten Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität.

5.7 Anwendungsbeispiele

5.7.1 Vorbetrachtungen

Sämtliche Probanden-Untersuchungen wurden nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Zulassung für die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena eingeholt. Vor der Teilnahme an der Studie wurde jeder Proband aufgeklärt, von einem Arzt untersucht und gab eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Die folgenden Verfahren wurden für alle Anwendungsbeispiele verwendet. Für die Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenz nach Abschnitt 3.4 wurde nur das Abklingen des Fluoreszenzsignals verwendet. Im Falle des schichtbasierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.1) bzw. des linsen-korrigierten Ansatzes wurde das gesamte Fluoreszenzsignal verwendet. Für sämtliche Modellierungen der Fluoreszenzlebensdauer wurde außerdem die Modellierung an dreidimensionalen Oberflächen (Abschnitt 5.3.1) angewandt. Das Gütekriterium (Gleichung 3.13) wurde unter Verwendung der Gewichtung nach Neyman (Gleichung 3.14) berechnet. Wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, wurde zuerst eine initiale Lösung der Modellparameter des gesamten Bildes mittels der Differential Evolution [113] berechnet. Für die pixelweise Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern wurde die Nelder-Mead Simplex Methode [112] mit der zuvor bestimmten Initiallösung als Ausgangspunkt verwendet. Incomplete Decay (Abschnitt 3.4.6) und die Behandlung von Ausreißern (Abschnitt 5.5.2) wurden ebenfalls angewandt.

5.7.2 Adaptives Binning

Die Motivation dieses Anwendungsbeispiels war es, die Vorteile des adaptiven Binnings (Abschnitt 5.1.1) im Vergleich zum statischen Binning (Abschnitt 3.3) aufzuzeigen. Dazu wurden FLIO-Daten des linken Auges eines 39 Jahre alten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 ohne diabetische Retinopathie verwendet. Der Patient besaß eine natürliche Augenlinse, von welcher eine separate FLIO-Messung aufgenommen wurde. Die FLIO-Daten vom Augenhintergrund wurden jeweils mit statischem Binning (Faktor 2) und adaptivem Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) vorverarbeitet. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden anschließend mit dem linsen-korrigierten Ansatz (Abschnitt 5.2.2) mit zwei Exponentialfunktionen, $\beta = 1$ und der oben genannten separaten FLIO-Messung der Augenlinse bestimmt.

5.7.3 Fixierung der Zeitverschiebung

Das in Abschnitt 5.3.2 beschriebene Vorgehen zur Fixierung der Zeitverschiebung wurde beispielhaft anhand eines 30jährigen gesunden Probanden demonstriert. Die Fluoreszenzlebensdauern wurde mit dem multi-exponentieller Ansatz mit drei Exponentialfunktionen (Abschnitt 3.4.2) berechnet, wobei der Parameter der Zeitverschiebung im ersten Fall je Pixel durch den Minimierungsalgorithmus bestimmt wurde. Im zweiten Fall wurde die Zeitverschiebung in einem zentralen Bereich des Bildes bestimmt und dieser Wert für die Berechnung aller Pixel verwendet. Letztlich wurde im dritten Fall nach dem oben beschriebenen Ansatz die Zeitverschiebung in einem 2 x 2 Gitter berechnet, über alle Pixel des Bildes linear interpoliert und je Pixel fixiert.

5.7.4 Modellierung

Anhand dieses Anwendungsbeispiels soll für ausgewählte Ansätze zur Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenz die jeweilige Anwendbarkeit auf FLIO-Daten gezeigt werden. Dazu wurde eine FLIO-Messung des linken Auges eines 59 Jahre alten Probanden mit einer Blutung in der superioren temporalen Region genutzt. Eine FLIO-Messung der natürlichen Augenlinse wurde separat aufgenommen. Die FLIO-Daten vom Augenhintergrund wurden mit adaptivem Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) vorverarbeitet. Die folgenden Ansätze zur Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenz wurden angewandt:

- multi-exponentieller Ansatz mit drei Exponentialfunktionen (Abschnitt 3.4.2)
- Spektrale globale Analyse mit drei Exponentialfunktionen (Abschnitt 3.4.4), wobei die kurze Fluoreszenzlebensdauer für beide spektralen Kanäle fixiert wurde
- schichtbasierter Ansatz mit drei Exponentialfunktionen (Abschnitt 5.2.1), wobei nur die lange Fluoreszenzlebensdauer auf der Zeitachse verschiebbar ist
- schichtbasierter Ansatz (Abschnitt 5.2.1) in Kombination mit zwei stretched Exponentials (Abschnitt 3.4.3), wobei nur eine stretched Exponential auf der Zeitachse verschiebbar ist
- linsen-korrigierter Ansatz (Abschnitt 5.2.2) mit zwei Exponentialfunktionen und $\beta = 1$

5.7.5 Gruppenvergleich

Die Motivation dieses Anwendungsbeispiels war es, die in Abschnitt 5.6.2 beschriebene Analyseketten zum Vergleich für Gruppen von Patienten bzw. Probanden zu demonstrieren. Dies ist wichtig, da eine hohe interindividuelle Variabilität die Proband-spezifische Diskriminierung von Pathologien möglicherweise bei einigen FLIO-Anwendungen behindern kann. Daher wurden beispielhaft eine Gruppe von 20 Patienten mit Diabetes mellitus ohne diabetische Retinopathie, im Alter von $63,9 \pm 8,2$ Jahren, und eine Kontrollgruppe mit 21 Probanden, im Alter von $59,1 \pm 11,3$ Jahren, verglichen. Alle Probanden hatten eine natürliche Augenlinse. Die FLIO-Daten wurden mit statischem Binning (Faktor 2) vorverarbeitet. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden mittels multi-exponentiellem Ansatz mit drei Exponentialfunktionen (Abschnitt 3.4.2) bestimmt. Eine 71×101 Pixel große Region im oberen temporalen Bereich des Fundus, welche die Makula enthält, wurde in allen Patienten und Kontrollen manuell segmentiert. Basierend auf dieser Region wurden signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen mit der Holm-Bonferroni-Methode bestimmt. Die folgenden Histogramm-Klassenbreiten wurden verwendet: Amplituden: 1%; Fluoreszenzlebensdauer τ_1 : 5 ps, Fluoreszenzlebensdauer τ_2 : 20 ps, Fluoreszenzlebensdauer τ_3 : 100 ps.

5.8 Analyse des schichtbasierten Ansatzes

5.8.1 Simulationen

5.8.1.1 Vorbetrachtungen

Um die Möglichkeiten und Grenzen des schichtbasierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.1) fluoreszierende Schichten zu trennen und deren Fluoreszenzlebensdauern korrekt zu bestimmen zu charakterisieren, wurden eine Reihe von Simulationen durchgeführt. Der Ausgangspunkt für die Simulationen war die Masterarbeit von Meyer [104], welcher u.a. die Bedingungen zur optimalen Unterscheidung von zwei Fluoreszenzlebensdauern untersucht hat. Meyer hat u.a. gefunden, dass sich zwei Fluorophore am besten trennen lassen, wenn die Fluoreszenzlebensdauern möglichst weit voneinander entfernt sind und der relative Anteil beider Fluorophore an der Gesamtfluoreszenz (Abschnitt 3.6) bei $Q_1 = Q_2 = 50\%$ liegt. Weiterhin wurde die Trennbarkeit von drei Fluorophoren an sechs verschiedenen Fluoreszenzlebensdauerkombinationen in Abhängigkeit der Anzahl der Photonen untersucht. Für eine Fehlersumme (Summe der Beträge der relativen Fehler der einzelnen Exponentialfunktionen) für Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden von unter 10% wurden 300.000 Photonen benötigt, für eine Fehlersumme unter 5% wurden 450.000 Photonen benötigt. Dabei hatten die Exponentialfunktionen mit dem geringsten Anteil an der Gesamtfluoreszenz den größten relativen Fehler.

Der Abstand der fluoreszierenden Schichten wurde zwischen 0 ps und 200 ps, was dem Abstand Linse-Retina entspricht (Abschnitt 2.2), variiert. Um eine sichere statistische Aussage treffen zu können, bestand ein Simulationsdatensatz für eine Kombination von Parametern (u.a. den Fluoreszenzlebensdauern) aus 100 Simulationen auf Basis dieser Parameter. Die Simulationsdaten wurden anschließend sowohl mit dem schichtbasierten Ansatz (Abschnitt 5.2.1) als auch mit dem multi-exponentiellen Ansatz (Abschnitt 3.4.2) modelliert, um die Fluoreszenzlebensdauern zu approximieren. Der Offset wurde mit 0,5 Photonen simuliert und auf diesen Wert während der Approximation der Fluoreszenzlebensdauern fixiert. Die Modellparameter wurden mit Hilfe der beschriebenen Minimierungsalgorithmen (Abschnitt 5.4.1) bestimmt. Dabei wurde je Simulationsdatensatz und Modellfunktion mit Hilfe des Differential Evolution Algorithmus' eine initiale Lösung für die Fluoreszenzlebensdauerapproximation berechnet, welche den Startwert für die Fluoreszenzlebensdauerapproximation je Simulation mittels Nelder-Mead Simplex Algorithmus gebildet hat.

5.8.1.2 Erzeugung der Simulationsdaten

Um ein synthetisches zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wird wie folgt vorgegangen. Anhand der Parameter Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern und ggf. Abstand zwischen fluoreszierenden Schichten wird eine Modellkurve mit der gewünschten Anzahl an Zeitkanälen berechnet. Dieses Photonenhistogramm wird mit der verwendeten Anzahl an Photonen normiert. Im Beispiel in Abb. 5.7 sind dies 100 Photonen. Im Ergebnis entsteht je Zeitkanal die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon in diesem Zeitkanal detektiert wird. Durch Aufsummieren des normierten Photonenhistogramms wird die Verteilungsfunktion gewonnen. Die Zahlenwerte der Verteilungsfunktion je Zeitkanal werden als Grenzen für ein Histogramm mit variabler Klassenbreite verwendet. Anschließend werden so viele gleichverteilte Zufallszahlen zwischen Null und eins generiert, wie das synthetische Fluoreszenzsignal Photonen enthalten soll. Diese werden in

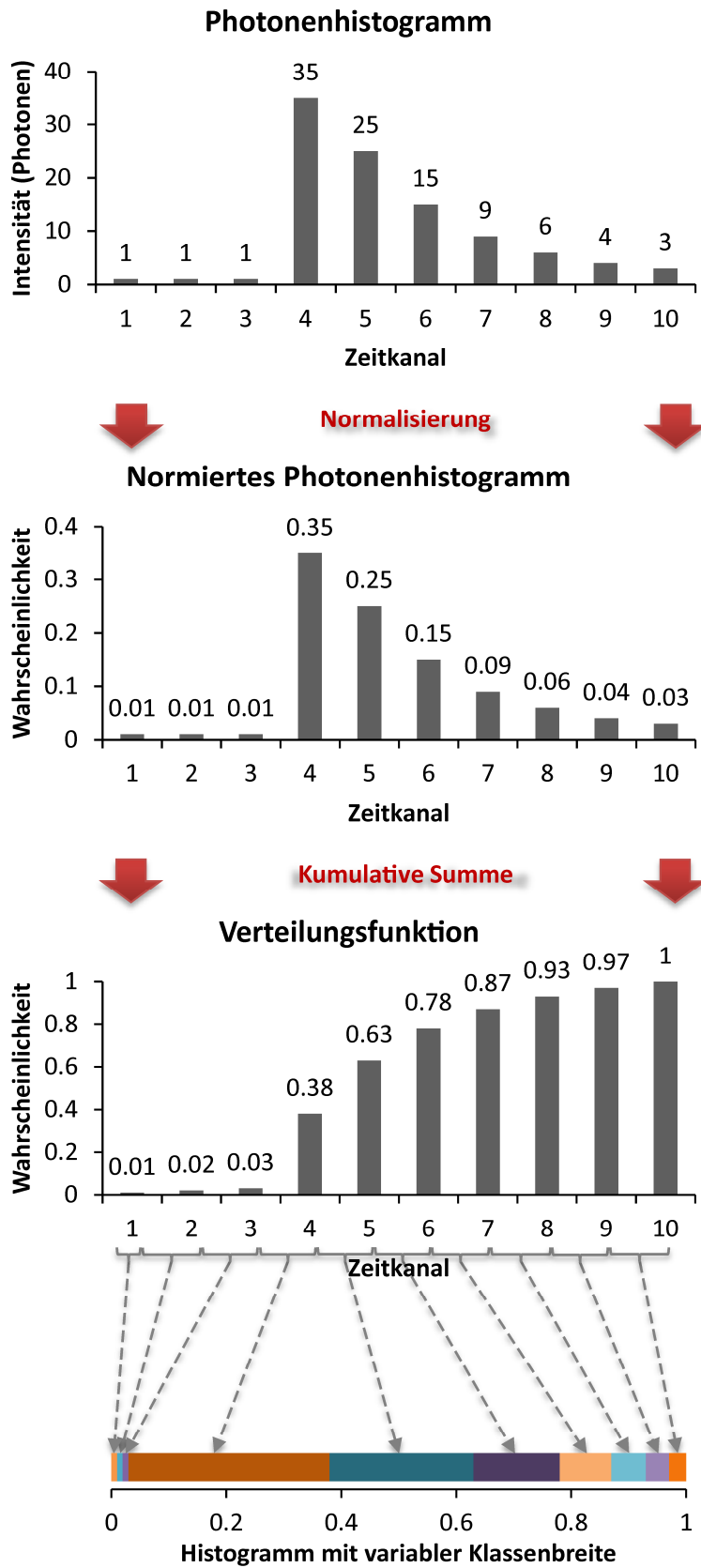


Abbildung 5.7 Vorgehensweise, die aus einem beliebigen Photonenhistogramm ein Histogramm mit variabler Klassenbreite erzeugt, aus welchem mittels gleichverteilter Zufallszahlen zwischen 0 und 1 synthetische zeitaufgelöste Fluoreszenzsignale erzeugt werden können.

das Histogramm mit variabler Klassenbreite einsortiert und es entsteht eine Variante des gesuchten synthetischen Fluoreszenzsignals. Da zufälliges Rauschen durch den Prozess der Erzeugung der Zufallszahlen bereits enthalten ist, ist es nicht nötig, einen weiteren Rauschprozess hinzuzufügen. Mit Hilfe neuer Zufallszahlen (mit der Anzahl an gewünschten Photonen) können auf Basis des berechneten Histogramms mit variabler Klassenbreite beliebig viele zufällig variierende synthetische Fluoreszenzsignale generiert werden. Die zur Erzeugung der Simulationsdaten benutzte Modellfunktion wird während der Approximation der Fluoreszenzlebensdauern aus Messdaten bzw. synthetischen Daten ebenfalls für die Modellierung verwendet. Dies wird auch als inverse crime bezeichnet [120].

5.8.1.3 Zwei Fluorophore

In einem ersten Schritt wurden nur zwei Fluorophore untersucht, da dies den einfachsten Fall für den schichtbasierten Ansatz (Abschnitt 5.2.1) darstellt. Das Ziel war es, festzustellen, ob und unter welchen Randbedingungen der schichtbasierte Ansatz im Vergleich zum multi-exponentiellen Ansatz (Abschnitt 3.4.2) geringere Fehler bei der Approximation der Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden erzeugt. Weiterhin sollte festgestellt werden, unter welchem minimalen Abstand zwei fluoreszierender Schichten mittels schichtbasiertem Ansatz bei einer Zeitauflösung von ca. 12,2 ps, welche dem FLIO-System entspricht, voneinander unterschieden werden können. Dazu wurde die Fluoreszenzlebensdauer der Schicht mit der kürzeren Komponente τ_1 auf einen Wert von 50 ps festgelegt, wie er auch am Augenhintergrund vorkommen kann. Die Schicht mit der längeren Komponente τ_2 wurde mit einer unregelmäßigen Abtastung auf Werte bis 5000 ps festgelegt. Der niedrigste Wert für τ_2 war gleich dem Wert von τ_1 . Dies bedeutet, dass beide Schichten eine identische Fluoreszenzlebensdauer besaßen, welche dadurch im Normalfall nicht trennbar sind. Durch diese Simulationen sollte analysiert werden, ob durch einen hinreichend großen Abstand die Schichten mit identischer Fluoreszenzlebensdauer doch trennbar sind. Der Parameter für den Abstand der beiden fluoreszierenden Schichten t_c wurde für jede Kombination der Fluoreszenzlebensdauern zwischen 0 ps und 200 ps in Schritten von 25 ps variiert. Sämtliche verwendete Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden für die Simulationen mit zwei Fluorophoren sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2 Auflistung der Simulationsparameter für zwei fluoreszierende Schichten

$Q_1 = 25\%, Q_2 = 75\%$				$Q_1 = 50\%, Q_2 = 50\%$				$Q_1 = 75\%, Q_2 = 25\%$			
α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)
25,0	50	75,0	50	50,0	50	50,0	50	75,0	50	25,0	50
40,0	50	60,0	100	66,7	50	33,3	100	85,7	50	14,3	100
50,0	50	50,0	150	75,0	50	25,0	150	90,0	50	10,0	150
57,1	50	42,9	200	80,0	50	20,0	200	92,3	50	7,7	200
62,5	50	37,5	250	83,3	50	16,7	250	93,8	50	6,3	250
66,7	50	33,3	300	85,7	50	14,3	300	94,7	50	5,3	300
70,0	50	30,0	350	87,5	50	12,5	350	95,5	50	4,5	350
72,7	50	27,3	400	88,9	50	11,1	400	96,0	50	4,0	400
75,0	50	25,0	450	90,0	50	10,0	450	96,4	50	3,6	450
76,9	50	23,1	500	90,9	50	9,1	500	96,8	50	3,2	500
87,0	50	13,0	1000	95,2	50	4,8	1000	98,4	50	1,6	1000
90,9	50	9,1	1500	96,8	50	3,2	1500	98,9	50	1,1	1500
93,0	50	7,0	2000	97,6	50	2,4	2000	99,2	50	0,8	2000
94,3	50	5,7	2500	98,0	50	2,0	2500	99,3	50	0,7	2500
95,2	50	4,8	3000	98,4	50	1,6	3000	99,4	50	0,6	3000
95,9	50	4,1	3500	98,6	50	1,4	3500	99,5	50	0,5	3500
96,4	50	3,6	4000	98,8	50	1,2	4000	99,6	50	0,4	4000
96,8	50	3,2	4500	98,9	50	1,1	4500	99,6	50	0,4	4500
97,1	50	2,9	5000	99,0	50	1,0	5000	99,7	50	0,3	5000

Da die Amplituden der Fluorophore auch von Bedeutung sind, wurden die relativen Anteile $Q_1 = 25\%$ ($Q_2 = 75\%$), $Q_1 = 50\%$ ($Q_2 = 50\%$) und $Q_1 = 75\%$ ($Q_2 = 25\%$) verwendet. Es ergaben sich daher insgesamt 1026 Parameterkombinationen, für welche Simulationsdatensätze mit 50.000 Photonen je Simulation erstellt wurden.

5.8.1.4 Drei Fluorophore, eine verschobene Schicht

In einem zweiten Schritt wurden drei Fluorophore untersucht, da dies den FLIO-Messungen im Auge nahekommt. Das Ziel war es festzustellen, ob der schichtbasierte Ansatz (Abschnitt 5.2.1) oder der multi-exponentielle Ansatz (Abschnitt 3.4.2) die geringeren Fehler bei der Approximation der Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden erzeugt. Entsprechend wurden die Fluoreszenzlebensdauern $\tau_1 = 50$ ps und $\tau_2 = 500$ ps so gewählt, dass diese bekannten Zahlenwerten vom Auge ähnlich sind [55]. Die längste Komponente τ_3 wurde zwischen 500 ps und 5000 ps in Schritten von 500 ps variiert. Zusätzlich wurde der Abstand der Komponente mit der längsten Fluoreszenzlebensdauer zu den beiden übrigen Komponenten für jede Kombination der Fluoreszenzlebensdauern zwischen 0 ps und 200 ps in Schritten von 25 ps variiert. Dies entsprach in etwa den Daten vom menschlichen Auge, bei denen die Komponente mit den längsten Fluoreszenzlebensdauern im spektralen Kanal 1 des FLIO-Systems stark von der Fluoreszenz der Augenlinse beeinflusst wird (Abschnitt 2.2.3). Es wurden drei verschiedene Varianten der relativen Anteile der Komponenten untersucht: $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$; $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$ sowie $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$. Sämtliche verwendete Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden für die Simulationen mit drei Fluorophoren und einer zeitlich verschobenen Schicht sind in Tabelle 5.3 aufgelistet.

Es ergeben sich insgesamt 270 Parameterkombinationen, für welche Simulationsdatensätze erstellt wurden. Die Anzahl der Photonen wurde auf 300.000 Photonen je Simulation festgelegt, da zusätzliche Simulationen gezeigt haben, dass bei 300.000 Photonen je Simulation bei den gewählten Simulationsparametern die relativen Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern bei $\leq 5\%$ liegt.

Tabelle 5.3 Auflistung der Simulationsparameter für drei fluoreszierende Schichten.

$Q_1 = 50\%, Q_2 = 25\%, Q_3 = 25\%$						$Q_1 = 25\%, Q_2 = 50\%, Q_3 = 25\%$						$Q_1 = 25\%, Q_2 = 25\%, Q_3 = 50\%$					
α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	α_3 (%)	τ_3 (ps)	α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	α_3 (%)	τ_3 (ps)	α_1 (%)	τ_1 (ps)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	α_3 (%)	τ_3 (ps)
90,9	50	4,55	500	4,55	500	76,9	50	15,4	500	7,69	500	76,9	50	7,69	500	15,4	500
93,0	50	4,65	500	2,33	1000	80,0	50	16,0	500	4,00	1000	83,3	50	8,33	500	8,33	1000
93,7	50	4,69	500	1,56	1500	81,1	50	16,2	500	2,70	1500	85,7	50	8,57	500	5,71	1500
94,1	50	4,71	500	1,18	2000	81,6	50	16,3	500	2,04	2000	87,0	50	8,70	500	4,35	2000
94,3	50	4,72	500	0,94	2500	82,0	50	16,4	500	1,64	2500	87,7	50	8,77	500	3,51	2500
94,5	50	4,72	500	0,79	3000	82,2	50	16,4	500	1,37	3000	88,2	50	8,82	500	2,94	3000
94,6	50	4,73	500	0,68	3500	82,4	50	16,5	500	1,18	3500	88,6	50	8,86	500	2,53	3500
94,7	50	4,73	500	0,59	4000	82,5	50	16,5	500	1,03	4000	88,9	50	8,89	500	2,22	4000
94,7	50	4,74	500	0,53	4500	82,6	50	16,5	500	0,92	4500	89,1	50	8,91	500	1,98	4500
94,8	50	4,74	500	0,47	5000	82,6	50	16,5	500	0,83	5000	89,3	50	8,93	500	1,79	5000

5.8.1.5 Drei Fluorophore, zwei unterschiedlich verschobene Schichten

Schließlich wurde der Fall betrachtet, bei dem jede fluoreszierende Schicht einen anderen Abstand zum Messsystem hat. Die Parameter dazu wurden an die Simulationen mit drei Fluorophoren und einer zeitlich verschobenen Schicht angelehnt. Konkret wurde die Komponente mit der längsten Fluoreszenzlebensdauer τ_3 um 200 ps gegenüber der Komponente mit der kürzesten Fluoreszenzlebensdauer ($\tau_1 = 50$ ps) verschoben. Der Abstand der Komponente mit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer ($\tau_2 = 500$ ps) gegenüber der 50 ps Komponente wurde zwischen 0 ps und 200 ps in Schritten von 25 ps variiert. Die relativen Anteile der Komponenten wurden zu $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$ gesetzt. Es ergeben sich 9 Parameterkombinationen.

5.8.2 Experimentelle Messungen

5.8.2.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Überprüfung der Simulation (Abschnitt 5.8.1) wurden experimentelle Messungen mittels fluoreszierender Farbstoffe durchgeführt. Da die Farbstoffe im Allgemeinen nicht mit den in den Simulationen verwendeten Fluoreszenzlebensdauern verfügbar sind, mussten diese durch Hinzufügen eines geeigneten Quenchers hergestellt werden. Um Fluoreszenzlebensdauern zwischen 50 ps und 4000 ps herzustellen, wurden die Fluorophore Eosin Y und Natrium-Fluoreszein (NF) verwendet. Durch Mischungen der Farbstoffe mit Wasser, Kaliumiodid (PI) oder einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern erzeugt. Im Ausgangsmaterial betrug die Konzentration von PI fünf Molar und die Konzentration der Farbstoffe jeweils ein Millimolar (1 mM Eosin Y und 1 mM NF). Es wurde ein Quencher benötigt, um den Farbstoff Eosin Y auf die gewünschten Fluoreszenzlebensdauern zu fixieren. Der Quencher wurde aus Wasser und PI hergestellt indem die 5 M PI-Lösung mit Wasser verdünnt wurde. Je nach Fluoreszenzlebensdauer wurde eine andere Quencher-Konzentration benötigt. Die benötigten Quencher-Konzentrationen wurden von Sven Peters experimentell ermittelt und sind in Abb. 5.8 dargestellt. Aus dem Diagramm bzw. mittels der approximierten Modellfunktion lassen sich für beliebige Fluoreszenzlebensdauern bis ca. 1100 ps die jeweils benötigten Quencher-Konzentrationen zur Mischung mit Eosin Y ablesen.

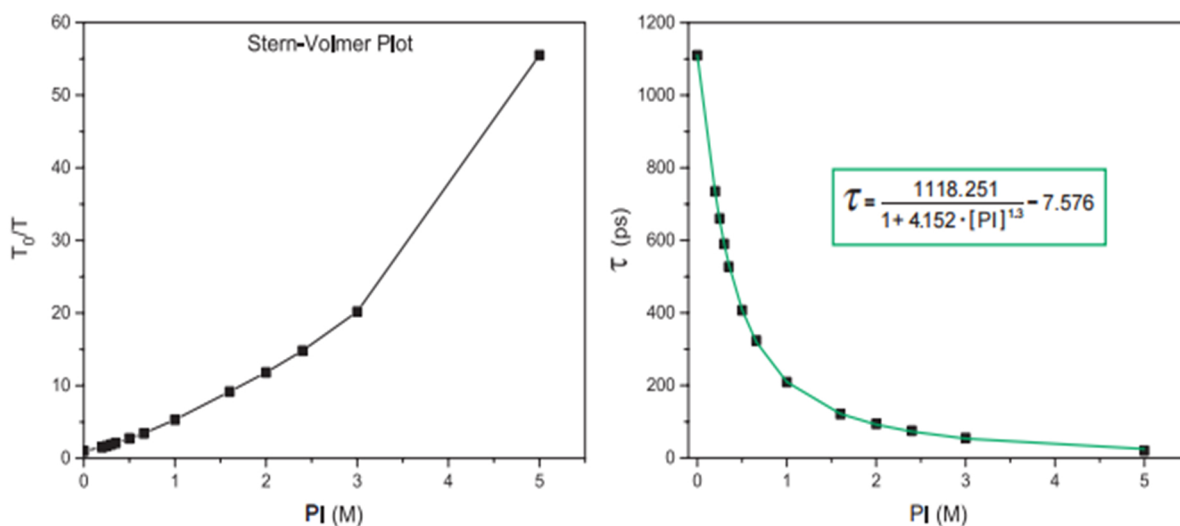


Abbildung 5.8: Voruntersuchung zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bei verschiedenen Mischverhältnissen aus Eosin Y und Kaliumiodid (PI) zwischen 0 und 5 Molar. Der Stern-Volmer-Plot (links) gibt das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern des dynamischen Quenchings in Abhängigkeit der Quencherkonzentration an. Auf der rechten Seite ist das Fluoreszenzlebensdauerverhältnis in die resultierende Fluoreszenzlebensdauer umgerechnet und mittels einer Gleichung (grün) approximiert. (Grafik modifiziert nach Sven Peters)

Nachfolgend ist einer Beispielrechnung zur Herstellung eines Fluoreszenzfarbstoffs mit einer Fluoreszenzlebensdauer τ von 50 ps dargestellt.

1. Herstellung des Quenchers:

gesucht: Quencher für eine Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 50$ ps

gegeben: reines Wasser

5 M PI

Zielkonzentration ist 2,40 M PI (bekannt aus Voruntersuchungen)

Lösungsweg: Verdünnungsfaktor = $\frac{5 \text{ M PI}}{2,40 \text{ M PI}} = 2,083$

$$\text{Volumen 5M KI} = \frac{\text{Gesamt volumen der Mischung}}{\text{Verdünnungsfaktor}} = \frac{5 \text{ ml}}{2,083} = 2,40 \text{ ml}$$

2,4 ml PI (5 M PI) + 2,6 ml Wasser = 5 ml Quencherlösung für $\tau = 50$ ps auf Basis des Farbstoffs Eosin Y

2. Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffs:

gesucht: Lösung mit einer Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 50$ ps

gegeben: Quencher für Fluoreszenzlebensdauer $\tau = 50$ ps

1 mM Eosin Y

Zielkonzentration von 0,03 mM (eigene Vorgabe, hier wird Q eingestellt)

1 ml Gesamtvolumen des Farbstoffs (eigene Vorgabe)

Lösungsweg: Verdünnungsfaktor = $\frac{1 \text{ mM}}{0,03 \text{ mM}} = 33,3$

$$\text{Volumen 1 mM Eosin Y} = \frac{\text{Gesamt volumen der Mischung}}{\text{Verdünnungsfaktor}} = \frac{1 \text{ ml}}{33,3} = 0,03 \text{ ml}$$

0,03 ml Eosin Y (1 mM) + 0,97 ml Quencher = 1 ml Fluoreszenzfarbstoff mit $\tau = 50$ ps

Aufgrund des hohen Aufwands zur Herstellung von Farbstoffen mit verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (Abschnitt 5.8.1.1) wurden für die experimentellen Messungen nur drei unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern verwendet: 50 ps, 500 ps und 4000 ps. In Tabelle 5.4 sind die Mischungsverhältnisse von Farbstoffen und Quenchern dargestellt. Für die Fluoreszenzlebensdauer von 4000 ps war kein Quencher im Sinne der anderen beiden Fluoreszenzlebensdauern nötig. Der Farbstoff wurde in diesem Fall nur durch die Verdünnung mit PBS hergestellt.

Tabelle 5.4 Mischverhältnisse zur Herstellung von Farbstoffen mit spezifischen Fluoreszenzlebensdauern. Die Farbstoffe mit Fluoreszenzlebensdauern von 50 ps und 500 ps werden mittels Eosin Y in Kombination mit Kaliumiodid hergestellt. Der Farbstoff mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 4000 ps wird durch Mischung von Natrium-Fluoreszein und phosphatgepufferter Salzlösung erreicht.

Farbstoff + Quencher	Fluoreszenzlebensdauer τ
1 mM Eosin Y + 2,40 M PI	50 ps
1 mM Eosin Y + 0,35 M PI	500 ps
1 mM NF + PBS	4000 ps

Die relativen Anteile der Farbstoffe wurden durch Variation der Konzentration der Farbstoffe im Lösungsmittel erreicht. Für die Fluoreszenzdetektion verringerte sich der Öffnungswinkel vom Objektiv des FLIO-Systems, je größer der Abstand zwischen Farbstoff und Objektiv des FLIO-Systems war. Aus diesem Grund mussten die relativen Anteile für jeden Schichtabstand neu bestimmt werden. Dies erforderte eine FLIO-Messung des Farbstoffs sowie die anschließende Approximation der Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden, als auch die Berechnung der relativen Anteile Q . Da sich die benötigten Konzentrationen nur grob abschätzen ließen, führte dies daher zu einem erheblichen experimentellen Aufwand nach der Trial-and-Error-Methode. Zur Durchführung der Messungen wurden die hergestellten Farbstoffe in Präzisionsküvetten aus speziellem optischen Glas (Brechzahl 1,523) mit den Dimensionen 52 x 12,5 x 3,5 mm³ (Höhe x Breite x Tiefe) und einer Schichtdicke von 1 mm (Typ 110-OS, Hellma GmbH & Co. KG) gefüllt.

5.8.2.2 Küvettenhalterung

Die Küvetten mit den hergestellten Farbstoffen mussten mit definierten und veränderbaren Abständen vor dem FLIO-System positioniert werden. Dazu wurde eine Küvettenhalterung entwickelt, welche es erlaubt bis zu drei Küvetten gleichzeitig aufzunehmen. Die Küvetten besitzen an der Oberseite einen Verschluss und sind an dieser Stelle daher breiter als die angegebenen 3,5 mm. Um möglichst geringe Abstände der Küvetten zu realisieren, konnten diese also nicht hintereinander aufgestellt werden, sondern mussten jeweils zueinander verdreht werden. Die entwickelte Küvettenhalterung ist in Abb. 5.9 zu sehen.

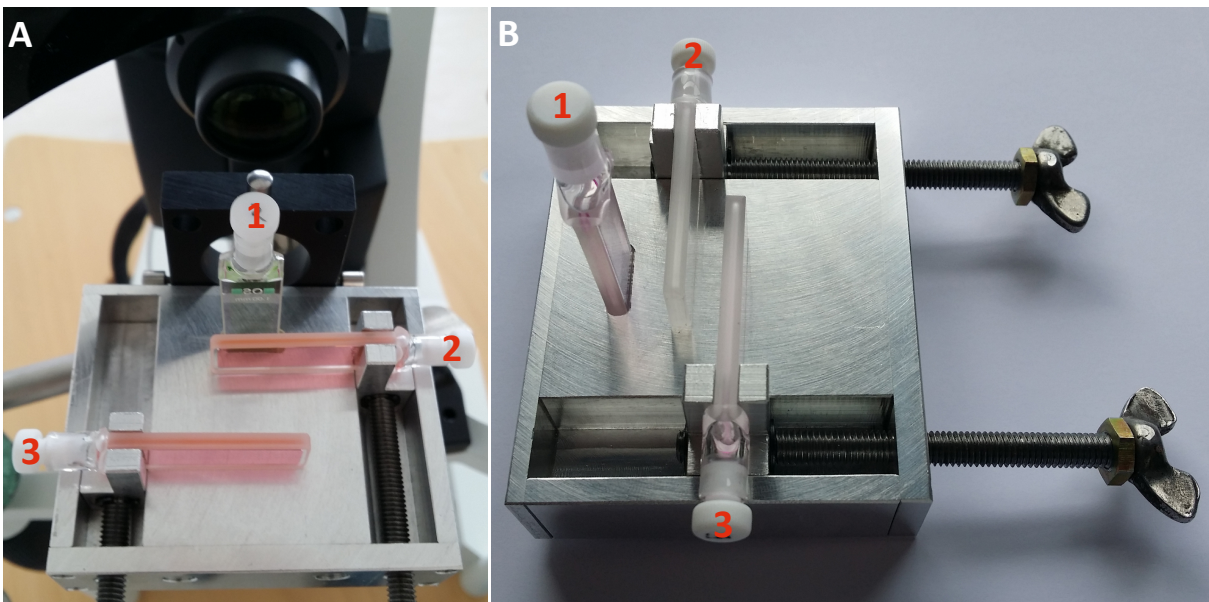


Abbildung 5.9 Küvettenhalterung zur Aufnahme von bis zu drei Hellma 110-OS Küvetten (1-3) am FLIO-System. Das Objektiv des FLIO-Systems ist in (A) am oberen Bildrand erkennbar. Küvette 1 steht in der Küvettenhalterung und kann in der Position nicht variiert werden. Küvetten 2 und 3 sind auf einem Schlitten um jeweils 90° verdreht zu Küvette 1 liegend platziert und können unabhängig voneinander bewegt werden, wodurch sich die relative Entfernung zu den anderen Küvetten und damit auch die absolute Entfernung zum FLIO-System verändert. Fokussiert wird das FLIO-System für die Messungen dieser Arbeit auf die jeweils am weitesten vom FLIO-System entfernte Küvette, im Bild ist dies Küvette 3.

In einen Aluminiumblock wurde eine Vertiefung für eine stehende Küvette gefräst. Zwei speziell angefertigte Küvetten-Schlitten zur Aufnahme je einer weiteren Küvette wurden auf beiden Seiten des Aluminiumblocks angebracht. Die Küvetten in den Schlitten wurden jeweils um 90° nach links bzw. rechts gedreht und lagen somit auf dem Aluminiumblock auf. Dadurch konnten alle drei Küvetten direkt aneinander positioniert werden. Über eine bewegliche Welle konnten die Schlitten unabhängig voneinander bewegt werden. Weiterhin besaß der Aluminiumblock zwei durchgehende Bohrungen zur Aufnahme auf ein standardisiertes Stangensystem, welches am FLIO-System befestigt wurde. Küvette 3 in Abb. 5.9 war dabei am weitesten vom FLIO-System (Abb. 5.9A im Hintergrund) entfernt. Auf diese Küvette musste vor der Messung fokussiert werden. Der minimale Abstand zweier fluoreszierender Schichten mittels dieser Küvettenhalterung betrug 2,5 mm Spezialglas der Küvetten, was nach Gleichung 2.7 25,4 ps entspricht. Der maximale Abstand von 2 Küvetten betrug 2,5 mm

Spezialglas der Küvetten + 50 mm Luft (entspricht ca. 358 ps). Eine dritte Küvette konnte entsprechend dazwischen positioniert werden. Der Abstand zweier Küvetten für ein gewünschtes tc ergab sich also zu:

$$d = \frac{(tc - 25,4 \text{ ps}) \cdot c}{2} \quad (5.7)$$

5.8.2.3 Zwei Fluorophore

Aufgrund der sehr zeitaufwändigen Herstellung für Farbstoffe mit der gewünschten Fluoreszenzlebensdauer und Konzentration (Abschnitt 5.8.2.1) wurden nur einige ausgewählte Kombinationen aus zwei Fluorophoren in experimentellen Messungen untersucht, die in Tabelle 5.5 aufgeführt sind. Der Parameter für die Verschiebung der fluoreszierenden Schicht tc_2 wurde zur Bestimmung der Auflösungsgrenze zwischen 25 ps und 75 ps variiert sowie, in Anlehnung an den Abstand von Augenlinse und Retina, auf 200 ps festgelegt (Umrechnung in realen Abstand der Küvetten mittels Gleichung 5.7). Die gewünschte Anzahl von 50.000 Photonen je Pixel wurde durch eine Kombination aus Messdauer und Binning eingestellt. Die Fluoreszenzlebensdauerapproximation erfolgte analog zu den Simulationen (Abschnitt 5.8.1.1).

Tabelle 5.5 Auflistung der Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und Konzentrationen (K) für die experimentellen Messungen mit zwei fluoreszierende Schichten.

tc_2 (ps)	$Q_1 = 25\%, Q_2 = 75\%$						$Q_1 = 50\%, Q_2 = 50\%$					
	α_1 (%)	τ_1 (ps)	K_1 (μM)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	K_2 (μM)	α_1 (%)	τ_1 (ps)	K_1 (μM)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	K_2 (μM)
25	76,9	50	30	23,1	500	10	90,9	50	30	9,1	500	10
50	76,9	50	30	23,1	500	25	90,9	50	30	9,1	500	10
75	76,9	50	30	23,1	500	30	90,9	50	30	9,1	500	10
200	76,9	50	10	23,1	500	30	90,9	50	90	9,1	500	10

5.8.2.4 Drei Fluorophore, zwei unterschiedlich verschobene Schichten

Die Messungen von zwei Farbstoffen, die unabhängig voneinander von einem dritten Farbstoff verschoben sind, wurden aufgrund des hohen experimentelle Aufwands auf wenige Kombinationen eingeschränkt. Die relativen Anteile der Farbstoffe wurden auf $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$ festgelegt. Der Parameter für die Verschiebung der fluoreszierenden Schicht mit der größten Entfernung tc_3 wurde auf 200 ps fixiert. Der Parameter für die Verschiebung der fluoreszierenden Schicht tc_2 wurde auf 50 ps, 100 ps sowie 150 ps gesetzt (Tabelle 5.6). Die gewünschte Anzahl von

300.000 Photonen je Pixel wurde durch eine Kombination aus Messdauer und Binning eingestellt. Die Fluoreszenzlebensdauerapproximation erfolgte analog zu den Simulationen (Abschnitt 5.8.1.1).

Tabelle 5.6 Auflistung der Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und Konzentrationen (K) für die experimentellen Messungen mit drei fluoreszierende Schichten.

t_{c_2} (ps)	$Q_1 = 25\%, Q_2 = 50\%, Q_3 = 25\%$								
	α_1 (%)	τ_1 (ps)	K_1 (μM)	α_2 (%)	τ_2 (ps)	K_2 (μM)	α_3 (%)	τ_3 (ps)	K_3 (μM)
50	76,9	50	90	23,1	500	130		4000	5
100	76,9	50	90	23,1	500	130		4000	5
150	76,9	50	90	23,1	500	30		4000	5

5.9 Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

5.9.1 Wiederholbarkeit

5.9.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Um den Einfluss des Probanden auszuschließen, wurde die Wiederholbarkeit der FLIO-Messungen zunächst an Fluoreszenzfarbstoffen analysiert. Dazu wurden von Sven Peters an der Friedrich-Schiller-Universität Jena vier Fluoreszenzfarbstoffe mit Fluoreszenzlebensdauern, die in einem Bereich liegen, wie sie auch am menschlichen Auge vorkommen, sowie ein Fluoreszenzfarbstoff zur Messung der optischen Systemübertragungsfunktion hergestellt und in Küvetten (Typ 110-OS, Hellma GmbH & Co. KG) gefüllt. Details zu den Fluoreszenzfarbstoffen sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

Tabelle 5.7 Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, deren Konzentrationen und Lösungsmittel zum Vergleich von FLIO-Systemen.

Küvette	Fluorophor	Fluoreszenzlebensdauer	Konzentration und Lösungsmittel bei 25 °C
A	Eosin Y	≤ 10 ps [69]	25 μM in 5 M PI
B	Erythrosin B	89 ps [121]	20 μM in Wasser
C	Eosin Y	~ 400 ps	15 μM in 0,5 M PI
D	Eosin Y	1180 ps [122]	3,3 μM in Wasser
E	Fluorescein	~ 3950 ps [123]	1 μM in PBS 150 mM, pH = 10,0

Die Küvetten mit den Fluoreszenzfarbstoffen wurden mit einer standardisierten Halterung (bereitgestellt von Heidelberg Engineering GmbH) am FLIO-System befestigt und nach einem definierten Messprotokoll vermessen. Jede Küvetten-Messung wurde dreimal durchgeführt. Die Daten wurden mit statischem Binning (Faktor 2) vorverarbeitet und einem mono-exponentiellen incomplete Decay Modell (Abschnitt 3.4.6) approximiert. Da erste Ergebnisse gezeigt haben, dass es in Küvette B noch eine zweite Komponente einer Fluoreszenzlebensdauer zu geben scheint, wurde diese Küvette zusätzlich mit einem bi-exponentiellen (Abschnitt 3.4.2) incomplete Decay Modell approximiert.

5.9.1.2 Probanden

Farbstoffmessungen sind geeignet um die Wiederholbarkeit der FLIO-Technik unter Idealbedingungen zu analysieren. Sie sind aber nur bedingt auf Probandenmessungen übertragbar, da sich u.a. die jeweilige Anatomie der Probanden leicht unterscheidet, Bewegungen von Augen bzw. Kopf unterschiedlich stark ausgeprägt sind und die Fixationsfähigkeiten differieren. Daher musste die Wiederholbarkeit von FLIO auch bei Probanden analysiert werden. Dazu wurden 10 gesunde Probanden im Alter von 25 – 30 Jahren untersucht. Der niedrige Altersdurchschnitt ($\pm SD$) von $29 \pm 2,7$ Jahren sicherte eine gute Okulartransmission [124]. Die Probanden hatten eine natürliche Augenlinse und keine signifikanten altersbedingten Aberrationen des Auges. Ein Augenarzt bestätigte die Abwesenheit von Augenerkrankungen in allen Probanden. Es wurden zwei Messungen je Proband und Tag im Abstand von ca. einer Stunde durchgeführt. Über drei Wochen wurden an zwei Tagen pro Woche zu identischen Tageszeiten Messungen aufgenommen. So wurden 10 Datensätze je Proband und insgesamt 100 Datensätze aufgenommen. Da FLIO-Prototyp 1 (Abschnitt 3.1.1) zum Einsatz kam, wurde die Aufnahmedauer auf 15 Minuten festgelegt. Die Pupille wurde mittels Tropicamide (5 mg per 1 ml, Pharma Stulln GmbH, Stulln, Deutschland) auf 7 mm geweitet. Die Fluoreszenz der Augenlinse wurde je Proband in einer Messung separat aufgenommen.

Aufgrund technischer Artefakte wurden vier der 100 aufgenommenen Datensätze von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Datenauswertung erfolgte mittels drei 15x15 Pixel großen Regionen (Fovea centralis, ein blutgefäßfreier Bereich des papillo-makulären Bündels und die Papille), welche manuell in jeder Messung platziert wurden (Abb. 5.10).

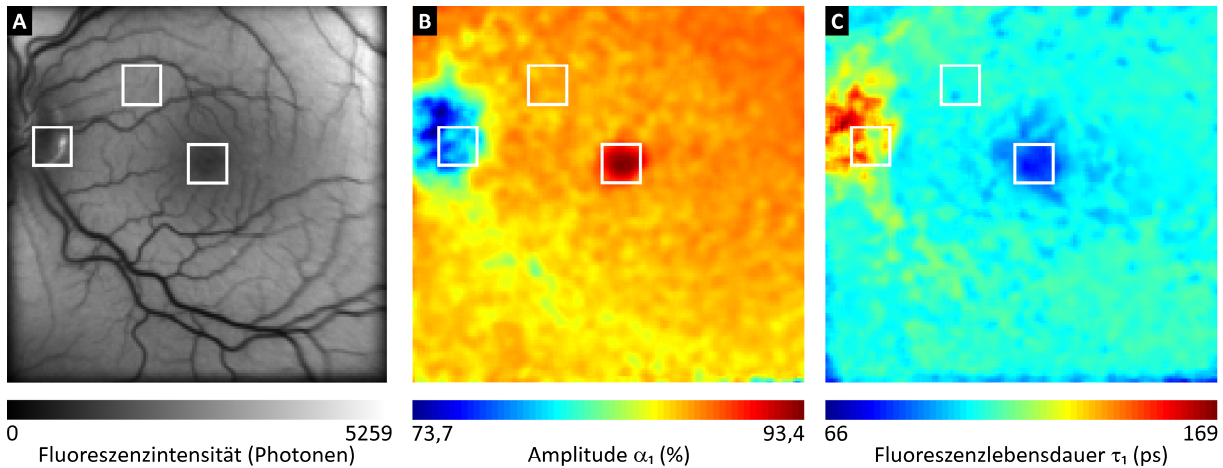


Abbildung 5.10 Fluoreszenzintensität (A), Amplitude α_1 (B) und die dazugehörige Fluoreszenzlebensdauer τ_1 (C) vom spektralen Kanal 1 (490-560 nm) eines repräsentativen Probanden. Die drei segmentierten Regionen sind durch ein weißes Quadrat hervorgehoben.

Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhöhen, wurden die Photonenhistogramme aller Pixels einer Region zu einem einzigen Photonenhistogramm zusammengefasst. Anschließend wurden aus den so erhaltenen Photonenhistogrammen mittels SPCImage (Version 3.2, Becker & Hickl GmbH) die Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden extrahiert. Dazu wurde ein der multi-exponentiellen Ansatz (Abschnitt 3.4.2) mit drei Exponentialfunktionen in Kombination mit einem incomplete Decay Modell (Abschnitt 3.4.6) verwendet. Der für den Approximationsprozess kritische Parameter der Startzeit T1 im Photonenhistogramm wurde manuell auf das Maximum des Photonenhistogramms gesetzt, so dass nur der Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit in die Berechnung eingeflossen ist.

Um die Wiederholbarkeit zu quantifizieren, wurde der Variationskoeffizient (CV) aus der Standardabweichung (SD) und dem arithmetischen Mittelwert auf Basis von Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern und den relativen Anteilen (Abschnitt 3.6) berechnet:

$$CV = \frac{SD(X)}{Mittelwert(X)} \quad (5.8)$$

5.9.2 Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit existierten weltweit vier FLIO-Systeme nach Bauart des FLIO-Prototyp 2 (Abschnitt 3.1.2). Diese standen in Bern (Schweiz), Ilmenau, Jena und Lübeck. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse von Probandenstudien an den verschiedenen Standorten gleichwertig sind, musste die Vergleichbarkeit der Geräte untersucht werden. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abschnitt 5.9.1.1 aufgelistet. Die Küvetten mit den

Fluoreszenzfarbstoffen wurden innerhalb weniger Tage an allen vier FLIO-Systemen mittels einer standardisierten Halterung (bereitgestellt von Heidelberg Engineering GmbH) nach einem definierten Messprotokoll vermessen. Die Verarbeitung der Messdaten erfolgte wie in Abschnitt 5.9.1.1. Dazu wurde die von der Heidelberg Engineering GmbH zum FLIO-System ausgelieferte IRF verwendet, welche bei Auslieferung in Reflexion gemessen (Abschnitt 3.2.1) wurde. Mittels Küvette A wurde nun an jedem FLIO-System zusätzlich eine IRF-Messung mittels Fluorophor (Abschnitt 3.2.2) durchgeführt. Daher wurde aus den Messungen von Küvette A für jeden Standort eine IRF extrahiert und die Messdaten zusätzlich mit dieser IRF ausgewertet. Nach Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer(n) wurde in jeder Messung eine 1000 Pixel umfassende Region manuell segmentiert, welche möglichst frei von Artefakten und Verunreinigungen war. In den allermeisten Fällen war dies ein Rechteck wie in Abb. 5.11 dargestellt. Auf Basis dieser Region wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

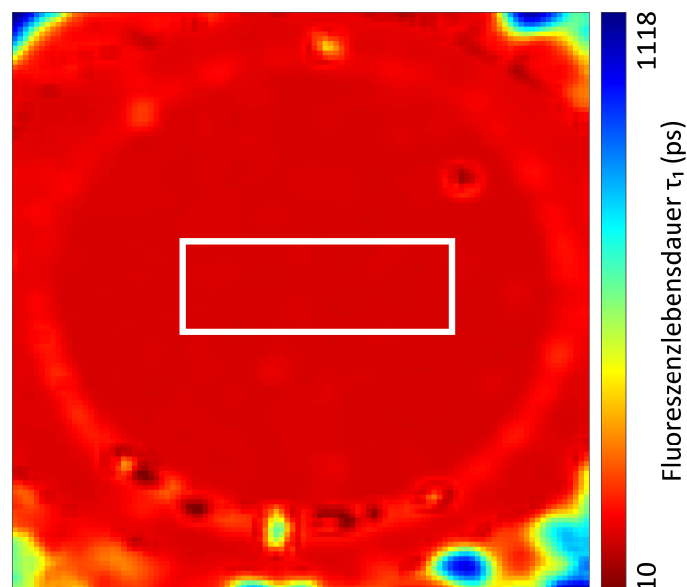


Abbildung 5.11 Fluoreszenzlebensdauer von Küvette B (spektraler Kanal 1) gemessen mit dem FLIO-System in Jena. Die Pixel innerhalb des weiß markierten Rechtecks (50 x 20 Pixel) wurden zur weiteren Auswertung verwendet.

5.9.3 Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv

5.9.3.1 Motivation

Für das Scanning Laser Ophthalmoscope, auf dem das FLIO-System basiert, ist ein Weitwinkelobjektiv mit einer Feldgröße von 55° verfügbar. Der größere Bildausschnitt dieses Objektivs im Vergleich zum Standardobjektiv mit einer Feldgröße von 30° ist in Abb. 5.12 dargestellt. Bevor das Weitwinkelobjektiv für Probandenmessungen eingesetzt werden kann, mussten mögliche Einflussfaktoren auf die Fluoreszenzlebensdauern ausgeschlossen werden.

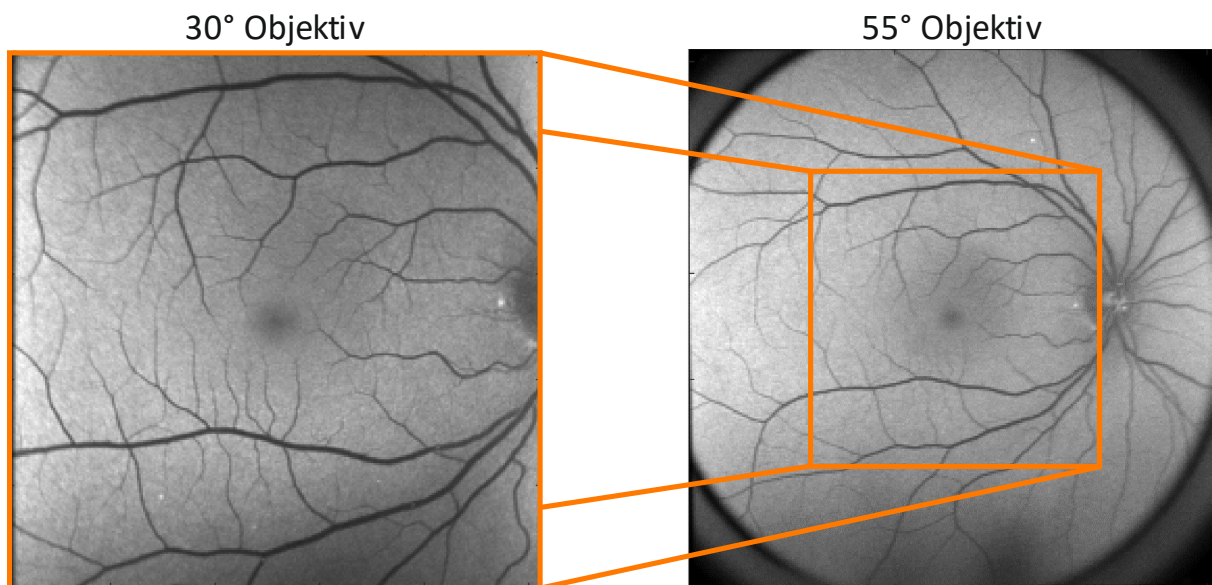


Abbildung 5.11 Fluoreszenzintensität eines jungen gesunden Probanden im spektralen Kanal 1, aufgenommen am FLIO-System mit dem Standardobjektiv (30°, links) und dem Weitwinkelobjektiv (55°, rechts).

5.9.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Analog zur Wiederholbarkeit von FLIO-Messungen in Abschnitt 5.9.1 wurden das Standardobjektiv und das Weitwinkelobjektiv zunächst anhand von Fluoreszenzfarbstoffen verglichen. Es wurden dieselben Farbstoffe verwendet, welche auch schon für die Untersuchung der Wiederholbarkeit des FLIO-Systems mit dem Standardobjektiv (Abschnitt 5.9.1) und für den Vergleich verschiedener FLIO-Systeme (Abschnitt 5.9.2) zum Einsatz kamen. Auch mit dem Weitwinkelobjektiv wurden drei Messungen je Küvette durchgeführt und die Messdaten in identischer Art und Weise ausgewertet. Dazu kam eine mit Weitwinkelobjektiv separat gemessene IRF zum Einsatz. Die Halbwertsbreiten dieser IRF sind mit 162 ps im spektralen Kanal 1 sowie 155 ps im spektralen Kanal 2 etwas breiter als die IRF des Standardobjektivs (Abschnitt 3.2.2), liegen aber im Rahmen der Messunsicherheit.

5.9.3.3 Probanden

Farbstoffmessungen sind geeignet, um die beide Objektive unter Idealbedingungen zu vergleichen. Sie sind aber nur bedingt auf Probandenmessungen übertragbar, da sich die Messbedingungen im menschlichen Auge von denen in einer Küvette deutlich unterscheiden. Das menschliche Auge besteht aus mehreren fluoreszierenden Schichten, während eine Küvette nur eine Schicht eines definierten Farbstoffs enthält. Darüber hinaus bestehen interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden, u.a. unterscheidet sich die jeweilige Anatomie der Probanden leicht voneinander, Bewegungen von Augen bzw. Kopf sind unterschiedlich stark ausgeprägt und die Fixationsfähigkeiten differieren. Daher mussten beide Objektive auch in Probanden verglichen werden. Dazu wurden 11 gesunde Probanden im Alter von 25 – 33 Jahren mit einem Altersdurchschnitt ($\pm SD$) von $28,7 \pm 3,6$ Jahren untersucht. Die Probanden hatten eine natürliche Augenlinse und keine signifikanten altersbedingten Aberrationen des Auges. Ein Augenarzt bestätigte die Abwesenheit von Augenerkrankungen in allen Probanden. Die Messungen fanden über zwei Wochen verteilt jeweils zwischen 8:30 Uhr und 13:30 Uhr statt. Die Pausenzeit zwischen zwei Messungen betrug mindestens 10 Minuten. Die Pupille der Probanden wurde nicht medikamentös geweitet. Der Untersuchungsraum wurde abgedunkelt. Es wurden beide Augen sowohl mit dem Standardobjektiv als auch mit dem Weitwinkelobjektiv jeweils drei Mal gemessen. Die Reihenfolge aller Messungen des Augenhintergrundes wurde randomisiert. Zusätzlich wurde die Augenlinse mit beiden Objektiven jeweils einmal am ersten Messtag gemessen. Die Messdaten wurden mit statischem Binning (Faktor 2) vorverarbeitet und mit einem tri-exponentiellen (Abschnitt 3.4.2) incomplete Decay Modell (Abschnitt 3.4.6) sowie einem auf 0,1 Photonen / Pixel fixiertem Offset ausgewertet. Für die weitere statistische Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m (Abschnitt 3.6) in der zentralen Region, dem inneren Ring und dem äußeren Ring des ETRS-Gitters (Abschnitt 5.6.1) sowie, im Fall des Weitwinkelobjektivs, zusätzlich eine 15x15 Pixel Region 25° superior zur Fovea betrachtet. Die beiden spektralen Kanäle wurden getrennt betrachtet. Um signifikante Unterschiede zwischen den Wiederholungsmessungen festzustellen, wurde für normalverteilte Daten eine ANOVA mit Messwertwiederholung [125] und für nichtnormalverteilte Daten der Friedman-Test [125] verwendet. Auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test [126] geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Zum direkten Vergleich beider Objektive wurde nur die erste der drei Wiederholungsmessungen verwendet, da die Stichprobe aus unabhängigen Messwerten bestehen muss. Bei vorliegender Normalverteilung wurde mittels gepaartem t-Test [116] geprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test [127] verwendet.

5.10 Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

5.10.1 Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse

Um den Einfluss der Fluoreszenz der Augenlinse (Abschnitt 2.2.3) näher zu untersuchen, wurden Probanden vor und nach dem Austausch der natürlichen Augenlinse gegen eine künstliche Augenlinse mit dem FLIO-System (FLIO-Prototyp 2) gemessen. Dafür kamen nur Probanden in Frage, die keinen bzw. nur einen sehr schwach ausgeprägten Katarakt besaßen, damit eine qualitativ ausreichende FLIO-Messung des Augenhintergrunds möglich war. Dies waren hauptsächlich Patienten, deren natürliche Augenlinse hauptsächlich aufgrund starker Fehlsichtigkeit gegen eine künstliche Augenlinse getauscht wurde. Da diese Art der Operation im Vergleich zur Katarakt Operation deutlich seltener vorkommt, gestaltet sich die Probandenakquise schwierig. Künstliche Augenlinsen besitzen üblicherweise keine nennenswerte Fluoreszenz. Somit ist die FLIO-Messung des Augenhintergrunds frei vom Einfluss der Augenlinse möglich und der direkte Einfluss der natürlichen Augenlinse auf die Fluoreszenzlebensdauern quantifizierbar.

Insgesamt konnten drei männliche Probanden im Alter von 65, 74 und 80 Jahren akquiriert und vermessen werden. Es wurden jeweils der Augenhintergrund und separat die Augenlinse sowohl vor Operation als auch ca. 4 Wochen nach der Operation mit dem FLIO-System gemessen. Die Pupille der Patienten wurde mittels Tropicamide (5 mg per 1 ml, Pharma Stulln GmbH) auf 7 mm geweitet. In einem ersten Schritt wurde die durchschnittliche Rate an detektierten Photonen analysiert. Dazu wurde die Gesamtanzahl der Fluoreszenzphotonen durch die Anzahl der Pixel und die Messdauer geteilt. Für den Augenhintergrund wurde dafür das gesamte Bild verwendet. Von der Messung der natürlichen Augenlinse wurde die Region der fluoreszierenden Augenlinse segmentiert. Um die Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund zu extrahieren, wurden die Messdaten mit statischem Binning (Faktor 2) vorverarbeitet und anschließend mit einem tri-exponentiellen incomplete Decay Modell sowie einem auf 0,1 Photonen / Pixel fixiertem Offset ausgewertet. Zusätzlich wurden die Fluoreszenzlebensdauern von Proband 2 mit dem linsen-korrigierten Ansatz (Abschnitt 5.2.2) berechnet. Die separaten Messungen der Fluoreszenz der Augenlinse waren von Proband 1 und 3 aufgrund von technischen Artefakten nicht für den linsen-korrigierten Ansatz geeignet. Zum Vergleich vor und nach der Operation wurden die mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m (Abschnitt 3.6) vom inneren Ring des ETDRS-Gitters (Abschnitt 5.6.1) in beiden spektralen Kanälen verwendet.

5.10.2 Glukoseprovokation

Veränderungen im Blutzuckerspiegel können kurzzeitige Veränderungen des retinalen Stoffwechsels hervorrufen und daher potentiell die FLIO-Messungen beeinflussen. Deshalb wurden FLIO-Messungen während eines oralen Glukosetoleranztests durchgeführt. Es wurden 10 gesunde Probanden im Alter von 25 – 35 Jahren untersucht. Die Probanden mit einem Altersdurchschnitt ($\pm SD$) von $29 \pm 3,9$ Jahren hatten eine natürliche Augenlinse und keine signifikanten altersbedingten Aberrationen des Auges. Ein Augenarzt bestätigte die Abwesenheit von Augenerkrankungen in allen Probanden. Die Pupille wurde nicht medikamentös geweitet. Vor Studienbeginn hatten die Probanden für mindestens 10 Stunden keinen Zucker zu sich genommen. Bei Studienbeginn wurde der Blutzuckerspiegel mit Hilfe eines Accu-Chek® Aviva Handmessgeräts an einer Blutprobe eines Fingers bestimmt. Die Blutprobe wurde vom Probanden unter Aufsicht selbst entnommen. Nachfolgend wurden FLIO-Daten vom Augenhintergrund und von der Augenlinse separat erfasst. Anschließend nahm der Proband eine 300 ml Lösung zu sich, welche 75 g Glukose enthielt (Accu-Chek® Dextrose O.G.T.). Über 90 Minuten wurden im Abstand von 15 Minuten Blutzuckerspiegel und FLIO-Daten der Retina erfasst. Eine Kontrollgruppe bestehend aus ebenfalls 10 gesunden Probanden mit einem Altersdurchschnitt ($\pm SD$) von $28,6 \pm 4,3$ Jahren, natürlichen Augenlinsen und keinen signifikanten altersbedingten Aberrationen des Auges wurde nach identischer Herangehensweise vermessen, wobei die verabreichte Glukoselösung durch 300 ml Wasser ersetzt wurde. Um die Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund zu extrahieren, wurden die Messdaten mit statischem Binning (Faktor 2) vorverarbeitet und mit einem tri-exponentiellen incomplete Decay Modell sowie einem auf 0,1 Photonen / Pixel fixiertem Offset ausgewertet. Zum Vergleich der mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m (Abschnitt 3.6) wurde der innere Ring des ETDRS-Gitters (Abschnitt 5.6.1) verwendet. Beide spektralen Kanäle wurden getrennt betrachtet. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, wird bei der Gruppe mit Glukoseprovokation erwartet, dass der Blutzuckerspiegel stark ansteigt, nach 30 Minuten ein Maximum erreicht und anschließend etwa auf den Ausgangswert vor Provokation absinkt. Daher wurden die mittleren Fluoreszenzlebensdauern, für Provokations- und Kontrollgruppe getrennt, auf signifikante Unterschiede geprüft. Dazu wurde für normalverteilte Daten eine ANOVA mit Messwertwiederholung [125] und für nichtnormalverteilte Daten der Friedman-Test [125] verwendet. Auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test [126] geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Um den Effekt der Provokation direkt zu untersuchen, wurde eine MANOVA [125] auf den Daten von beiden Gruppen gerechnet. Die MANOVA setzt eine Normalverteilung der Daten voraus. Mangels Alternative für nicht normalverteilte Daten, wurde die MANOVA auch angewendet, wenn einige Daten nicht normalverteilt sind, da die MANOVA als recht robust gegenüber Verletzung dieser Voraussetzung gilt.

6 Ergebnisse

6.1 Softwarepaket FLIMX

6.1.1 Konzept

6.1.1.1 Überblick

FLIMX (Fluorescence Lifetime Imaging eXplorer) ist ein MATLAB-Softwarepaket zur Approximation, Analyse und Präsentation von Fluoreszenzlebensdauern sowie zugehörigen Parametern, welche aus zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten gewonnen werden. Das FLIMX-Softwarepaket lässt sich universell zur Auswertung von Daten der zeitaufgelösten Fluoreszenz einsetzen. Zudem sind spezielle Werkzeuge integriert, die anatomische Besonderheiten der ophthalmoskopischen Anwendung speziell berücksichtigen. FLIMX implementiert die in den Abschnitten 5.1 bis 5.6 beschriebenen Verfahren. Weiterhin sind in FLIMX Werkzeuge zur Erzeugung und Auswertung von Simulationsdaten enthalten, welche für Abschnitt 5.8.1 verwendet wurden. Das FLIMX-Softwarepaket wurde in der Fachliteratur beschrieben [69] und ist unter einer Open-Source-Software Lizenz auf www.flimx.de frei zugänglich veröffentlicht. Im August 2016 besteht FLIMX aus ca. 51.000 lines of code, wovon ca. 9.000 lines of code teilweise stark angepasster, frei verfügbarer Open-Source-Quellcode von Dritten ist, welcher hauptsächlich von MATLAB File Exchange bezogen wurde. Einen Überblick über die Softwarestruktur von FLIMX liefert Abb. 6.1.

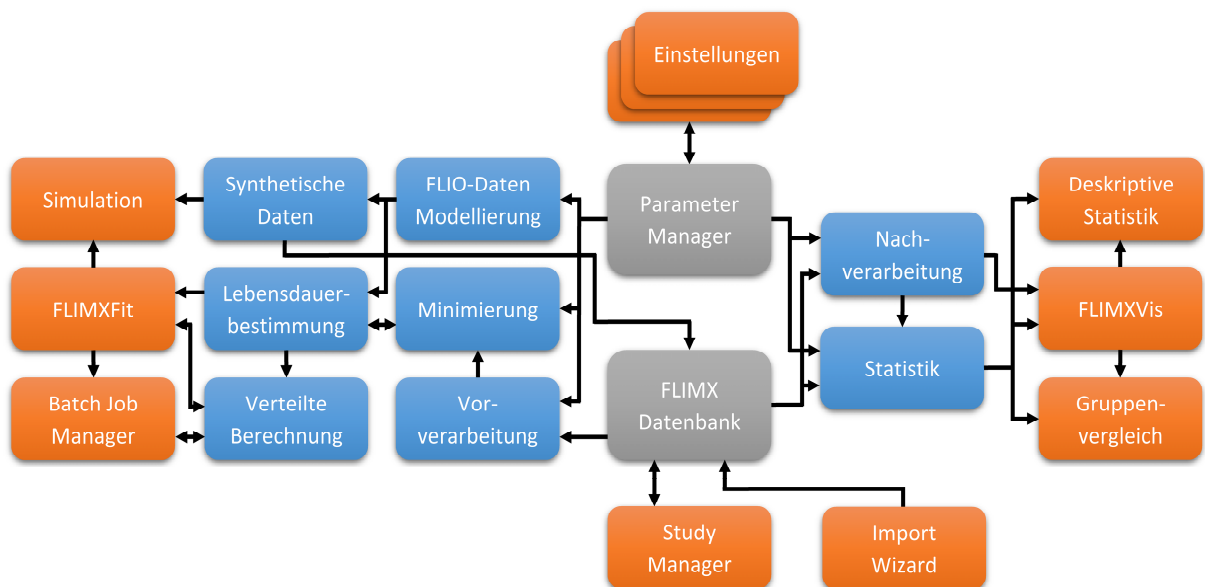


Abbildung 6.1 Schema der Softwarestruktur von FLIMX. Die grau gefärbten Module sind für die Datenverwaltung zuständig und organisieren den Zugriff auf das Speichermedium, die blau gefärbten Module verarbeiten Daten und die orange gefärbten Module stellen grafische Benutzeroberflächen dar. Nur die wichtigsten Datenströme zwischen den Modulen sind eingezeichnet.

Das Konzept hinter der FLIMX Datenbank ist die strikte Zuordnung von Messdaten und / oder Approximationsergebnissen zu einem Probanden (subject), welches Abb. 6.2 visualisiert. Ein subject kann mehrere spektrale Kanäle enthalten. Subjects werden wiederum in Studien (studies) zusammengefasst. Der Gedanke dahinter ist, dass Messdaten und / oder Approximationsergebnisse von Drittsoftware wie z.B. SPCImage (Becker & Hickl GmbH) nur einmal in FLIMX importiert werden müssen und FLIMX die Datenverwaltung ab diesem Zeitpunkt übernimmt. Durch die baumartige Struktur der FLIMX Datenbank, ist die Skalierung nur durch den verfügbaren Speicherplatz begrenzt, d.h. es können im Rahmen des vorhandenen Speicherplatzes beliebig viele studies, subjects und spektrale Kanäle verwaltet werden. Subjects und studies können innerhalb von FLIMX beliebig verschoben, kopiert, dupliziert, umbenannt oder gelöscht werden. Zusätzlich speichert FLIMX die zur Approximation benötigten instrument response functions, so dass diese ebenfalls nur einmal importiert werden müssen. Weiterhin werden sämtliche Einstellungen sowohl übergreifend als auch je Approximation gespeichert. So kann zu einem beliebigen Zeitpunkt nachvollzogen werden, unter welchen Rahmenbedingungen die jeweiligen Fluoreszenzlebensdauern berechnet wurden.

Für sämtliche Funktionen von FLIMX sind graphische Benutzeroberflächen (GUIs) verfügbar, prinzipiell sind viele Bestandteile aber auch von der Kommandozeile nutzbar.

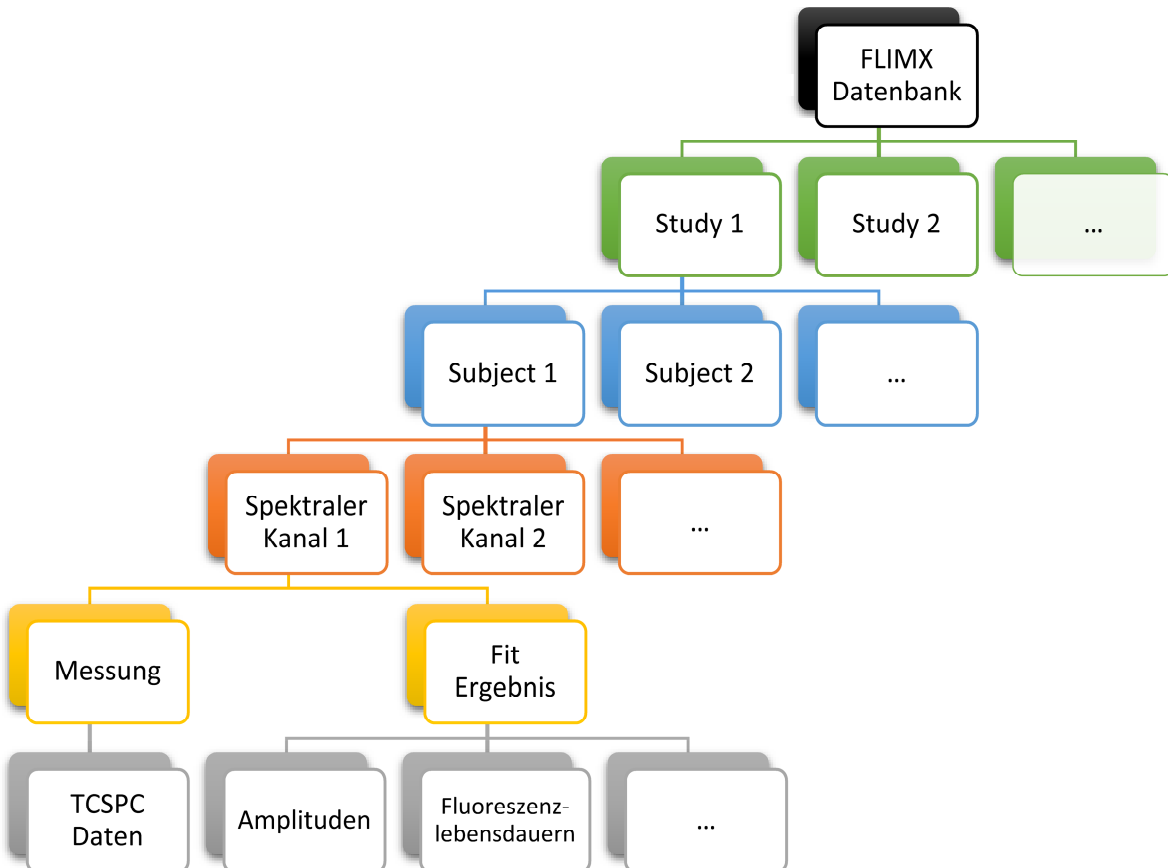


Abbildung 6.2 Schema der baumartigen Struktur von FLIMX's Verwaltung von Messdaten und Ergebnissen aus der Approximation der FLIM-Parameter.

6.1.1.2 Study Manager

Die Verwaltung von studies und subjects erfolgt über den Study Manager, welcher in Abb. 6.3 abgebildet ist. Mit dessen Hilfe werden neue subjects erstellt, Messdaten, Approximationsergebnisse oder optional zusätzliche Patienteninformationen importiert. Mit Hilfe der Patienteninformationen können Untergruppen innerhalb einer Studie basierend auf Patienteninformationen gebildet werden (in FLIMX condition genannt). Beispielsweise können subjects so nach Krankheitsstadien oder Altersgruppen unterteilt werden. Die conditions können endlos miteinander verkettet werden, was diese zu einem mächtigen Werkzeug macht. Neben der Verwaltung von studies und subjects ist der Study Manager auch das Verbindungsglied zwischen den beiden Hauptteilen von FLIMX: FLIMXFit zur Approximation der Fluoreszenzlebensdauern und FLIMXVis zur erweiterten Visualisierung und statistischen Analyse der Fluoreszenzlebensdauern.

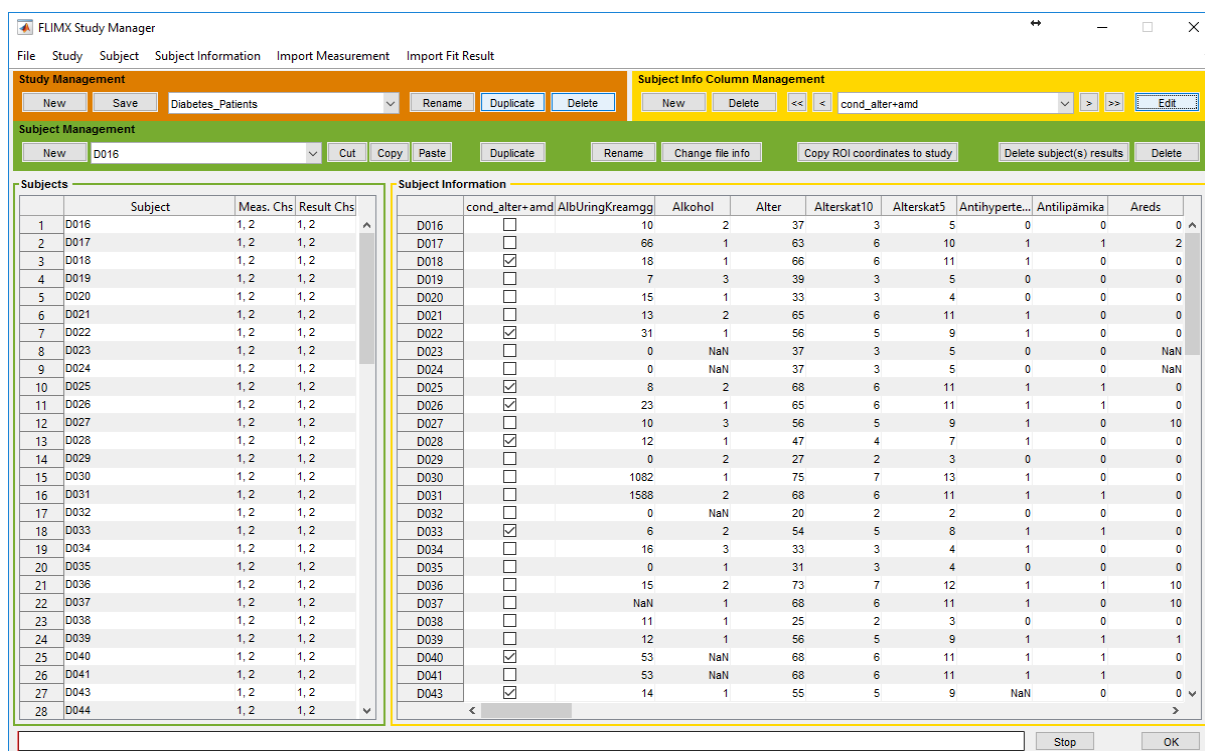


Abbildung 6.3 Study Manager der FLIMX-Software. Mit orangem Hintergrund markiert ist die Verwaltung der studies. Es kann eine neue study angelegt werden oder die gerade ausgewählte umbenannt, dupliziert oder gelöscht werden. Die subjects der ausgewählten study sind in der linken Tabelle aufgelistet, dabei werden je subject die spektralen Kanäle der Messdaten und der Fluoreszenzlebensdauerapproximation angegeben. Das ausgewählte subject kann mittels der Schaltflächen vor dem grünen Hintergrund verwaltet werden. Zusätzliche Informationen wie Alter oder Klassifikation des Krankheitszustands sind je subject in der rechten Tabelle aufgeführt, welche mit dem gelb hinterlegten Bereich oben rechts verwaltet werden kann.

6.1.1.3 FLIMXFit

FLIMXFit bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten, um die Approximation der Fluoreszenzlebensdauern anzupassen. So kann die Approximation auf einen Ausschnitt der Messdaten eingeschränkt werden. Die in Abschnitten 3.3 und 5.1 beschriebenen Methoden zur Vorverarbeitung stehen zur Verfügung. Die Approximation die Fluoreszenzlebensdauer erfolgt auf Basis der in 3.4.2 bis 3.4.4, 3.4.6 und 5.2 beschriebenen Modelle bzw. aus beliebigen Kombinationen dieser Modelle. Beliebig viele Parameter der Approximation können aus *a priori* Wissen auf einen bestimmten Wert oder auf einen geschätzten Wert aus einer initialen Lösung (Abschnitt 5.4.1) je spektralem Kanal fixiert werden. Darüber hinaus können die Minimierungsalgorithmen und der iterative Algorithmus zur Behandlung von Ausreißern (Abschnitt 5.5.2) konfiguriert werden. FLIMXFit erlaubt es, die Güte der Fluoreszenzlebensdauerapproximation je Pixel in Detail zu untersuchen. So können neben Rohdaten und der Modellfunktion auch deren einzelne Komponenten sowie das Residuum dargestellt werden. Die Darstellung ist vielfältig konfigurierbar und beispielhaft in Abb. 6.4 aufgeführt.

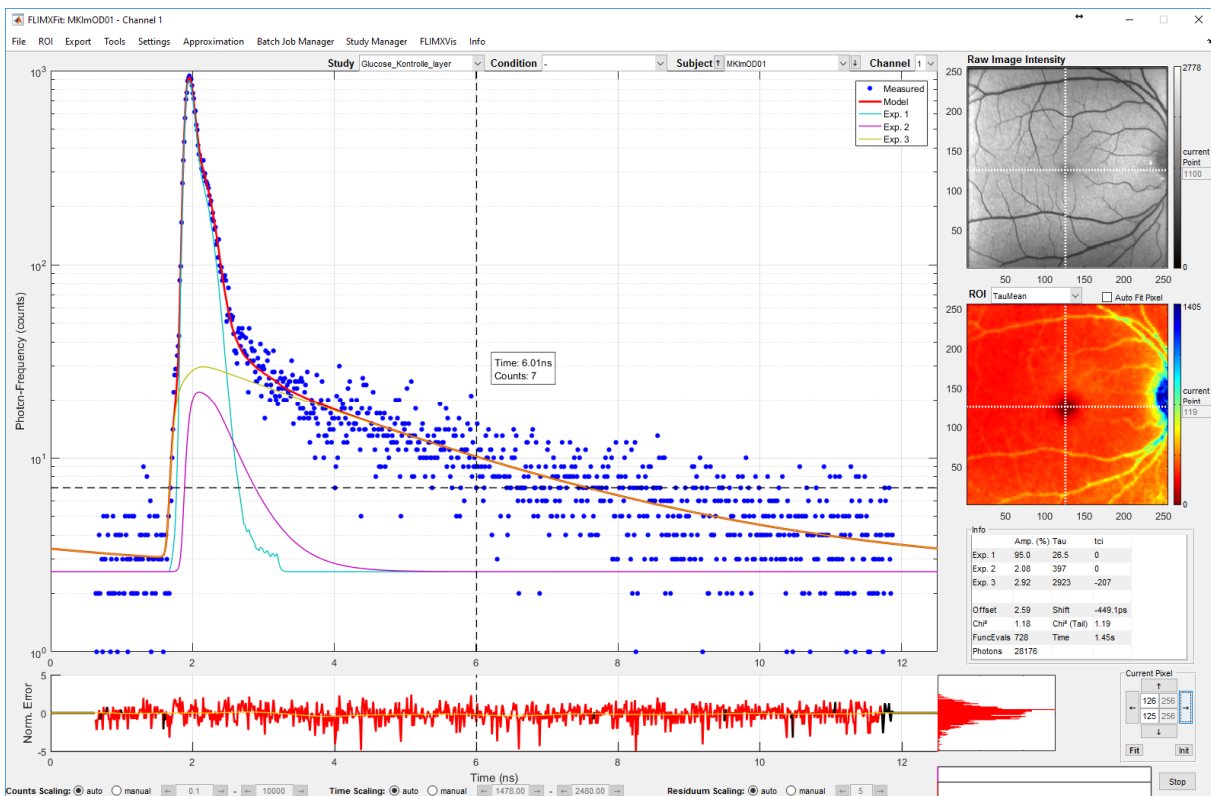


Abbildung 6.4 Im Hauptfenster von FLIMXFit wird der größte Teil des zur Verfügung stehenden Platzes für das Photonenhistogramm (blaue Punkte) sowie die Modellkurve (rot) des aktuell gewählten Pixels verwendet. Direkt darunter ist das normierte Residuum angeordnet. Auf der rechten Seite sind oben das Fluoreszenzintensitätsbild und direkt darunter die mittlere Fluoreszenzlebensdauer dargestellt. Der aktuell gewählte Pixel ist durch ein Fadenkreuz (weiß) markiert. In der Tabelle darunter sind die Parameter des Modells für den gewählten Pixel angegeben.

Mittels des Batch Job Managers können einzelne subjects, ganze studies oder Untergruppen dieser (conditions) zu einer Liste hinzugefügt werden. Je Listeneintrag werden sämtliche Parameter zur Vorverarbeitung und Fluoreszenzlebensdauerapproximation gespeichert, so dass unterschiedliche subjects oder studies mit unterschiedlichen Parametern eingetragen werden können. Die Abarbeitung der Liste kann durch den Nutzer gestartet und jederzeit unterbrochen werden. So kann die Berechnung von einer großen Anzahl von subjects sehr komfortabel, z.B. über Nacht, durchgeführt werden. FLIMXFit bietet Zugriff auf ein Werkzeug zur Erzeugung synthetischer zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten nach Abschnitt 5.8.1.2. Die Grundlage für die synthetischen Daten können eine beliebige Anzahl von Exponentialfunktionen, reale Daten oder eine Kombination davon sein. Die zu simulierende Anzahl von Photonen ist frei wählbar. Es können automatisiert Simulationsdatensätze über einen Parameterbereich (z.B. eine Fluoreszenzlebensdauer) mit einer frei wählbaren Schrittweite erzeugt werden. Die Simulationsdatensätze werden durch FLIMX verwaltet und stehen daher auch bei späteren Programmstarts zur Verfügung. Mit Hilfe eines weiteren Werkzeugs können die Simulationsdatensätze dazu verwendet werden, um die simulierten Fluoreszenzlebensdauern und deren approximierte Werte visuell anhand von Boxplots als auch anhand von deskriptiver Statistik miteinander zu vergleichen. Neben Fluoreszenzlebensdauern kann mit FLIMXFit auch die Fluoreszenz Anisotropie (Abschnitt 2.1.5) analysiert werden und es können, wie u.a. bei Yu et al. [128] beschrieben, Rotationszeitkonstanten bestimmt werden.

6.1.1.4 FLIMXVis

FLIMXVis bietet eine Reihe von Möglichkeiten zur Analyse der aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten approximierten Fluoreszenzlebensdauern und dazugehöriger FLIM-Parameter (z.B. (relative) Amplituden, relative Anteile, die mittlere Fluoreszenzlebensdauer, usw.). Im Gegensatz zu FLIMXFit kann FLIMXVis auch FLIM-Parameter verarbeiten, die mit anderer Software berechnet und in FLIMX importiert wurden. Grundsätzlich können FLIM-Parameter 2-dimensional oder 3-dimensional dargestellt werden. Dafür steht eine große Anzahl an Farbpaletten zur Verfügung. Die 3D-Ansicht kann in allen Dimensionen frei rotiert und vergrößert werden, um eine optimale Darstellung zu erreichen. Um Abhängigkeiten zwischen FLIM-Parametern zu untersuchen, können im 3D-Modus auch mehrere FLIM-Parameter übereinander dargestellt werden. Horizontale oder vertikale Schnitte durch die FLIM-Parameter zeigen Veränderungen der FLIM-Parameter zueinander und über den Ort im Detail auf. Es können Scatter Plots je subject, study oder condition sowie aus mehreren conditions erstellt werden. Das FLIMXVis Hauptfenster ist in Abb. 6.5 dargestellt.

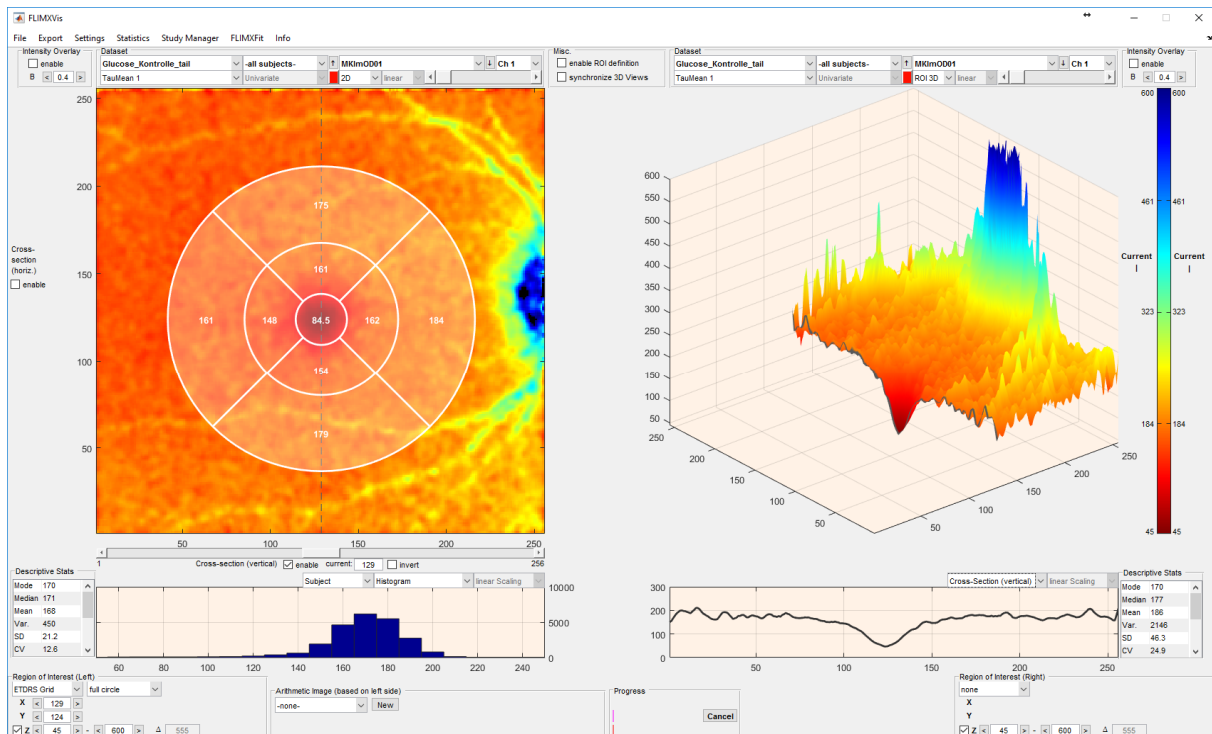


Abbildung 6.5 Das FLIMXVis Hauptfenster unterteilt sich in zwei Seiten, welche unabhängig voneinander sind. Je Seite können ein oder mehrere FLIM-Parameter eines subjects angezeigt werden. Die subjects können zu unterschiedlichen studies gehören. Das obere Diagramm stellt den bzw. die FLIM-Parameter 2- oder 3-dimensional dar. Jeweils darunter können in einem weiteren Diagramm Histogramme oder Schnitte dargestellt werden. Die Definition von ROIs erfolgt entweder per Maus oder mittels der Kontrollelemente unten links bzw. rechts. Der Export von Daten sowie die Statistikverfahren sind über Menüs zugänglich.

Um örtliche begrenzte Veränderungen zu untersuchen oder die Vergleichbarkeit zwischen Messungen zu gewährleisten, können Regions of Interest definiert werden. Je subject können ein ETDRS-Gitter, zwei Rechtecke, zwei Kreise und zwei Freiformen definiert werden. FLIMX speichert die ROI-Koordinaten für zukünftige Analysen ab. Für die jeweils ausgewählte ROI zeigt FLIMXVis ein Histogramm sowie deskriptive Statistik an. Zum statistischen Vergleich von Gruppen enthält FLIMXVis ein Werkzeug, mit dem zwei studies bzw. conditions auf signifikante Unterschiede auf Basis von statistischen Tests (gepaarter t-Test, zweiseitigen t-Test, Vorzeichen-Test und Wilcoxon-Test) überprüft werden können. Die für t-Tests vorausgesetzte Normalverteilung kann mittels Lilliefors-Test, Shapiro-Wilk-Test oder Kolmogorov-Smirnov-Test sichergestellt werden. Ein detaillierter Gruppenvergleich mittels Holm-Bonferroni-Methode (Abschnitt 5.6.2) und anschließender ROC-Analyse ist ebenfalls umgesetzt und in Abb. 6.6 am Beispiel von Gesunden im Vergleich zu Patienten mit Diabetes ohne diabetische Retinopathie (Abschnitt 5.7.5) dargestellt.

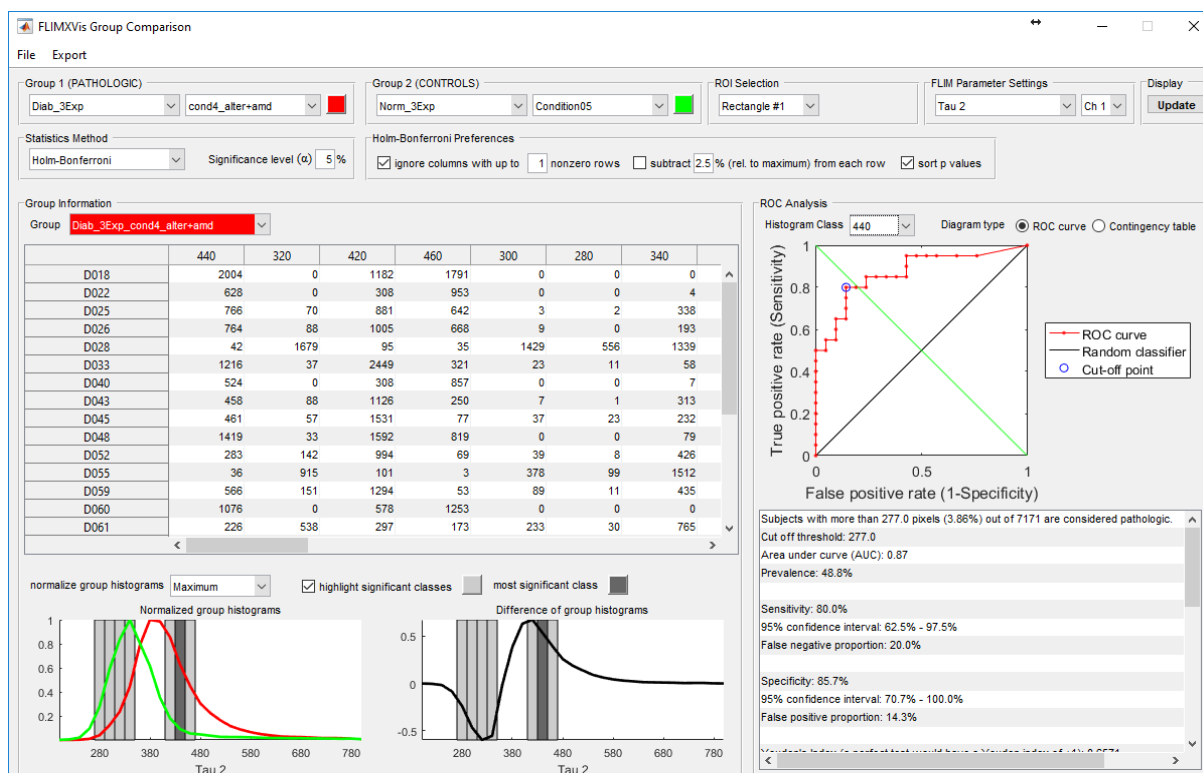


Abbildung 6.6 Beispiel eines Gruppenvergleichs auf Basis der Holm-Bonferroni-Methode anhand von Diabetikern und Gesunden (Abschnitt 5.7.5) für die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 . Die Gruppenhistogramme sind unten links dargestellt. Der kleinste p -Wert wird bei 440 ps erreicht. Für diese Histogrammklasse ist die ROC-Kurve rechts in der Abbildung dargestellt.

Neben FLIM-Parametern können in FLIMXVis auch Bilddaten aus anderen Modalitäten eingelesen werden. Diese könnten beispielsweise dazu benutzt werden, um Zellbestandteile wie die Mitochondrien mittels spectral unmixing [129, 130] zu segmentieren, was mit nutzerdefinierten ROIs nur sehr aufwendig bzw. gar nicht möglich wäre. Umgesetzt wird dies durch das arithmetic images Werkzeug, mit dessen Hilfe Bilddaten aus FLIM-Parameter und / oder zusätzlich eingeladenen Bilddaten berechnet werden. Neben arithmetischen Operationen sind auch logische Operationen möglich. Arithmetic images können aus unterschiedlichen spektralen Kanälen Daten verarbeiten und bei Bedarf auf Basis von anderen arithmetic images berechnet werden, so dass endlos viele Verkettungen möglich sind, was diesem Werkzeug einen sehr großen Anwendungsspielraum eröffnet. Die von FLIMXVis erzeugten Grafiken können hochauflösend und in diversen Dateiformaten exportiert werden. Ebenso können die Daten der deskriptiven Statistik als auch des Gruppenvergleichs in Tabellenform exportiert werden.

6.1.2 Verteilte Berechnung

Die CPU Aktivität und der Speicherverbrauch bei der verteilten Berechnung eines typischen FLIO-Datensatzes eines gesunden Probanden mit 256 x 256 Pixeln unter Anwendung des schichtbasierten Ansatzes ist in Abb. 6.7 dargestellt. Im Gegensatz zur eigentlichen Bestimmung der Modellparameter je Pixel („Approximation“) nutzt die Generierung der Arbeitspakete nur eine der vier CPUs aus. Weiterhin wird in Abb. 6.7(B) die verbrauchte CPU-Zeit für die einzelnen Abschnitte der Bestimmung der Modellparameter angegeben. Die verteilte Berechnung der Modellparameter für diese Arbeit findet aus Gründen der Zeitersparnis hauptsächlich oder ausschließlich auf den Compute-Servern des BMTI statt.

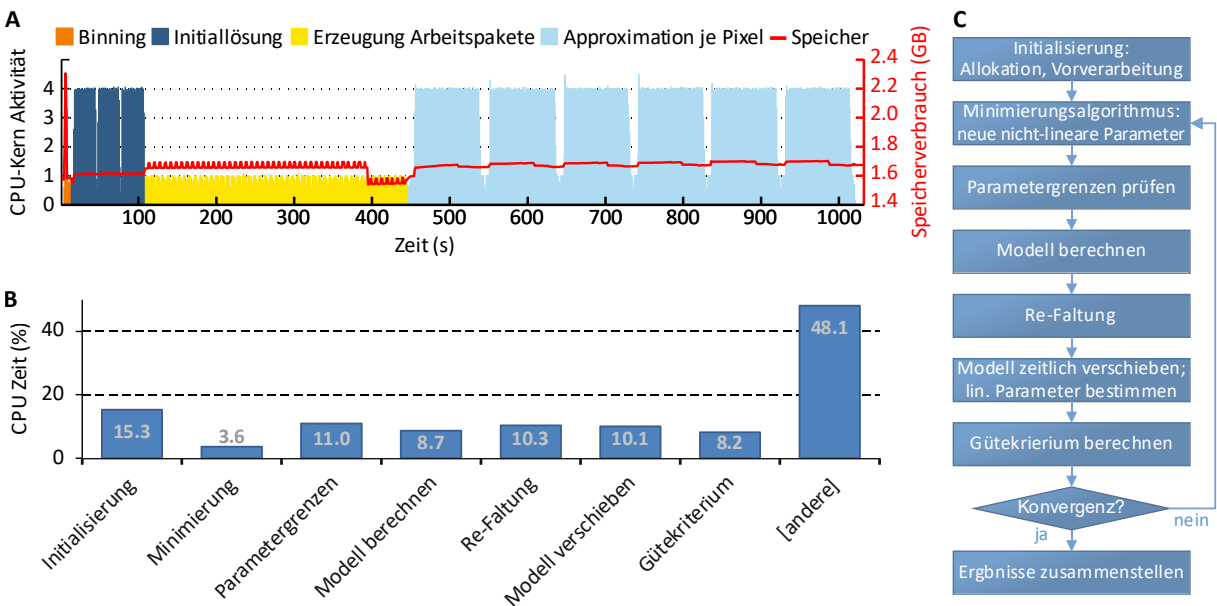


Abbildung 6.7 Profil von CPU- und Speicherverbrauch von FLIMX während der verteilten Berechnung der Modellparameter einer FLIO-Messung. (A) zeigt die anteilige Prozessorkernaktivität eines Quad-Core-Prozessors und den Gesamt-speicherverbrauch der MATLAB-Implementierung (rot). (B) stellt eine Übersicht der CPU-Zeit der verschiedenen Berechnungsschritte (C) dar.

Einige statistische Daten zu den Compute-Servern des BMTI (Tabelle 5.1) sind anhand der Berechnung eines ebenfalls typischen FLIO-Datensatzes in Abb. 6.8 dargestellt. Im Tortendiagramm im oberen Abschnitt der Abbildung sind die relativen Anteile der einzelnen Server an der Berechnung zu sehen. Die Server basierend auf den älteren CPU-Architekturen besitzen insgesamt den geringsten Anteil an der verteilten Berechnung. Im mittleren Bereich der Abbildung gibt das Balkendiagramm bzw. die Tabelle rechts daneben die durchschnittliche Zeit für Berechnung der Zielfunktion des Minimierungsalgorithmus auf einem CPU-Kern an, was den in Abb. 6.7B und Abb. 6.7C aufgelisteten Schritten entspricht. Die Server, die auf der auf der Core2-Architektur von 2007 basieren, sind mindestens 63% langsamer (coropuna) als ein Server auf Basis der Haswell-Architektur, trotz nominell fast identischer Taktrate. Dennoch skaliert das umgesetzte Verfahren zur verteilten Berechnung der Modellparameter gut über die Compute-Server des BMTI. Der FLIO-Datensatz wurde in ca. 11 Minuten berechnet, wofür ca. fast 19 Stunden CPU-Zeit eines einzelnen Rechnerkerns benötigt wurden. Durch

die Verteilung der Berechnung über mehrere CPU-Kerne und Rechner bzw. Compute-Server wurde eine Zeitersparnis von ca. Faktor 103 erreicht im Vergleich zur Berechnung auf einem einzigen CPU-Kern.

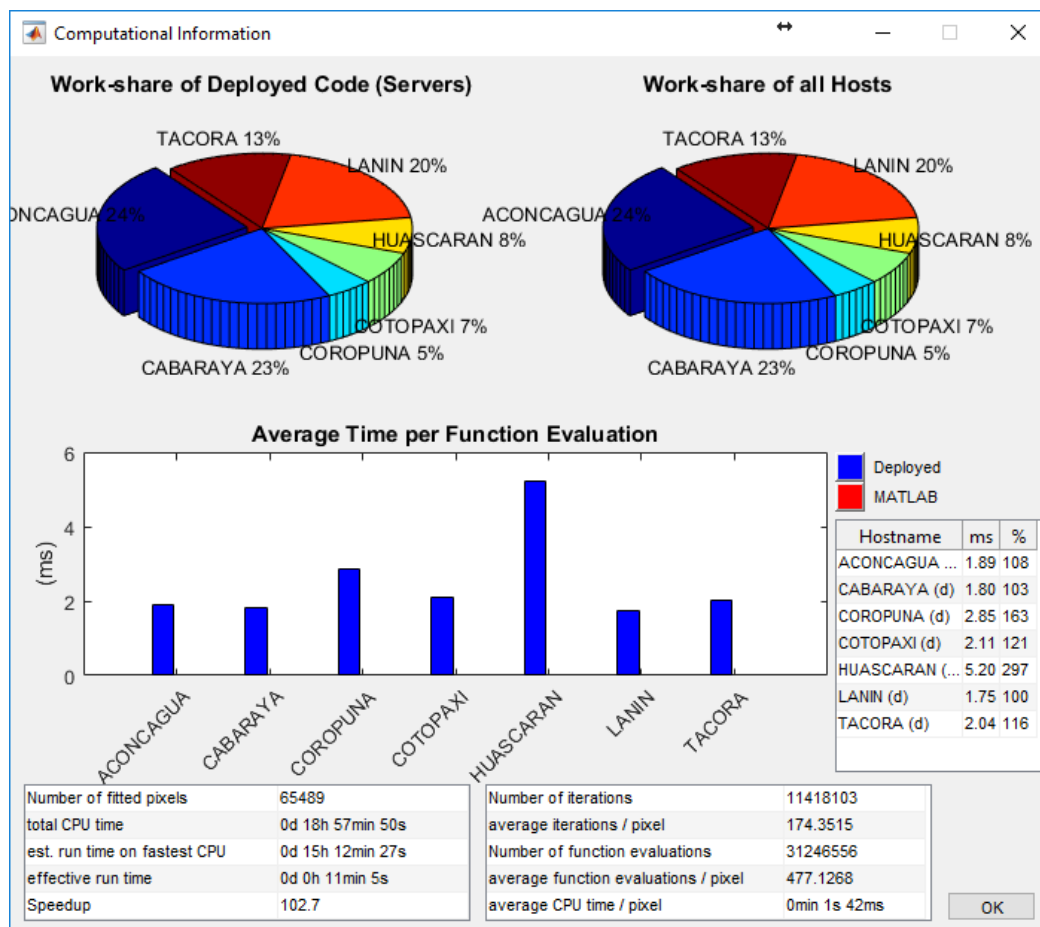


Abbildung 6.8 Statistik über den Einsatz der Compute-Server des BMTI zur Fluoreszenzlebensdauerapproximation mittels FLIMX. Die beiden Tortendiagramme im oberen Bereich der Abbildung sind identisch, da die Berechnung ausschließlich auf den Compute-Server des BMTI lief.

6.2 Anwendungsbeispiele

6.2.1 Adaptives Binning

Die Ergebnisse zum adaptiven Binning wurden publiziert [69]. Abb. 6.9 zeigt die Fluoreszenzintensität nach statischem und adaptivem Binning sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m und die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 für beide spektrale Kanäle. Da der Patient nicht von diabetischer Retinopathie betroffen war, sind keine pathologischen Veränderungen in den Bildern sichtbar. Die Menge der detektierten Fluoreszenzphotonen ist in der unteren linken Ecke des Bildes geringer als in übrigen Bereichen der FLIO-Messung. Im Fall von statischem Binning bewirkte dies eine Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer, insbesondere von τ_2 in beiden spektralen Kanälen und τ_m im spektralen Kanal 2. Mit adaptivem Binning zeigte sich die erwartete eher homogene Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern um Makula und Papille. Die für die Berechnung des Binnings benötigten

Rechenzeiten betragen für statisches Binning bzw. adaptives Binning 2,3 s bzw. 6,9 s im spektralen Kanal 1 und 2,2 s bzw. 6,3 s im spektralen Kanal 2 (Testsystem: Intel Core i7-4790K, 16 GB Arbeitsspeicher, Windows 10, MATLAB R2016b).

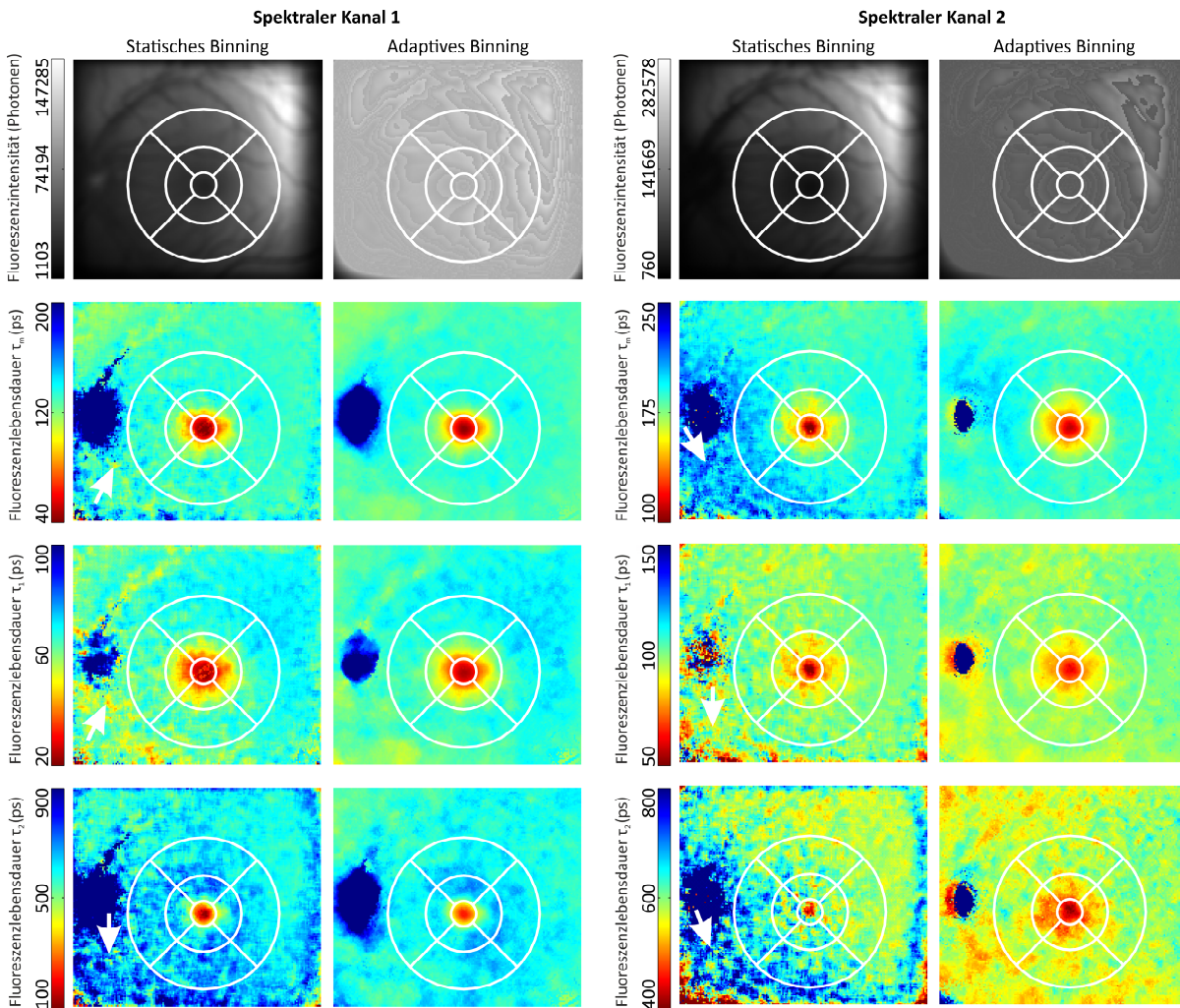


Abbildung 6.9 Vergleich von statischem und adaptivem Binning anhand eines Diabetes mellitus Patienten ohne diabetische Retinopathie. Die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauern τ_m , τ_1 und τ_2 sind in den Reihen von oben nach unten dargestellt. Entlang der Spalten sind statisches-Binning (Faktor 2) und adaptives Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) für beide spektrale Kanäle dargestellt. Die Farbskalierung ist zum besseren Vergleich identisch für die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauern je spektralem Kanal. Zur besseren Orientierung ist in jeder Grafik das ETDRS-Gitter aufgetragen. Die größten Unterschiede sind durch weiße Pfeile markiert.

6.2.2 Fixierung der Zeitverschiebung

Die Ergebnisse für mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m (Abschnitt 3.6) und Zeitverschiebung sind für die drei betrachteten Fälle (Fall 1: Zeitverschiebung je Pixel berechnet; Fall 2: Zeitverschiebung auf einen zentralen Wert fixiert; Fall 3: Zeitverschiebung in den Ecken berechnet und über das Bild interpoliert) in Abb. 6.10 dargestellt. Die errechneten mittleren Fluoreszenzlebensdauern für das zentrale Feld des ETDRS-Gitters (Abschnitt 5.6.1) sind $74,7 \pm 19$ ps (Fall 1), $73,1 \pm 14$ ps (Fall 2) bzw. $96,3 \pm 17$ ps (Fall 3) und damit sehr ähnlich. Die berechnete Zeitverschiebung in Fall 1 im zentralen Feld ist mit $-34,8$ ps ca. 6 ps von den rechts und links direkt angrenzenden Feldern ($-40,4$ ps bzw. $41,1$ ps) verschieden. Nach Gleichung 2.7 entspricht dies einer Wegstrecke von ca. $660 \mu\text{m}$ (bei einer

angenommenen Brechzahl von 1,36 für die Retina), was etwa der 3-fachen Dicke der Retina entspricht (Abschnitt 2.2.1) und daher nicht plausibel erscheint. Als Nebeneffekt sank die Anzahl der Funktionsevaluierungen des Minimierungsalgorithmus je Pixel von 229 (Fall 1) auf 147 (Fall 2) bzw. 149 (Fall 3) im Mittel über das gesamte ETDRS-Gitter.

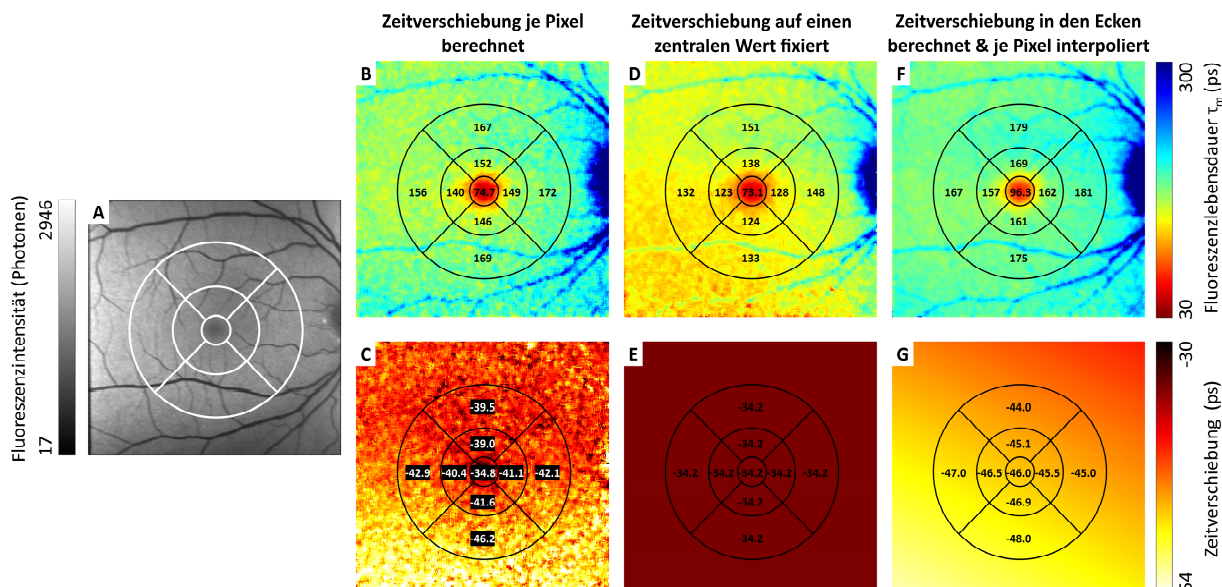


Abbildung 6.10 Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer Approximation an einem jungen gesunden Probanden mit je Pixel approximierter Zeitverschiebung (B, C), einer aus dem Zentrum bestimmten Zeitverschiebung von -34,2 ps, welche für die Approximation aller Pixel verwendet wurde (D, E) sowie einer Zeitverschiebung, die in den Ecken des Bildes bestimmt und zur Approximation je Pixel linear über den Ort interpoliert wurde (F, G). Im ETDRS-Gitter sind die Mittelwerte je Feld aufgetragen. In C ist eine vertikale Veränderung der Zeitverschiebung zu erkennen. Die starke Änderung der Zeitverschiebung im zentralen Feld des ETDRS-Gitters ist physiologisch nicht erklärbar und könnte ein Artefakt der Fluoreszenzlebensdauerapproximation sein. Die Fixierung der Zeitverschiebung auf einen Wert je Bild führt zur kürzeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern in der unteren Bildhälfte, die nicht korrekt sind (D). Die Interpolation der Zeitverschiebung resultiert in sehr ähnlichen mittleren Fluoreszenzlebensdauern (F) wie B, mit deutlich reduziertem Rauschen und etwas längeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern in der zentralen Region des ETDRS-Gitters.

6.2.3 Modellierung

Die Ergebnisse zu den Modellierungsansätzen wurden publiziert [69]. Die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauern τ_m und τ_l im spektralen Kanal 1 sind in Abb. 6.11 für die verschiedenen Ansätze zur Modellierung der Fluoreszenzlebensdauer dargestellt. Im Fall der Stretched Exponentials wurden nur zwei Exponentialfunktionen verwendet, im Gegensatz zu drei Exponentialfunktionen in den anderen Fällen. Ferner ist die Fluoreszenzlebensdauer der Stretched Exponentials nicht direkt vergleichbar mit den anderen Ansätzen, da die Interpretation zwingend in Verbindung mit dem dazugehörigen β (nicht dargestellt) erfolgen muss.

6 Ergebnisse

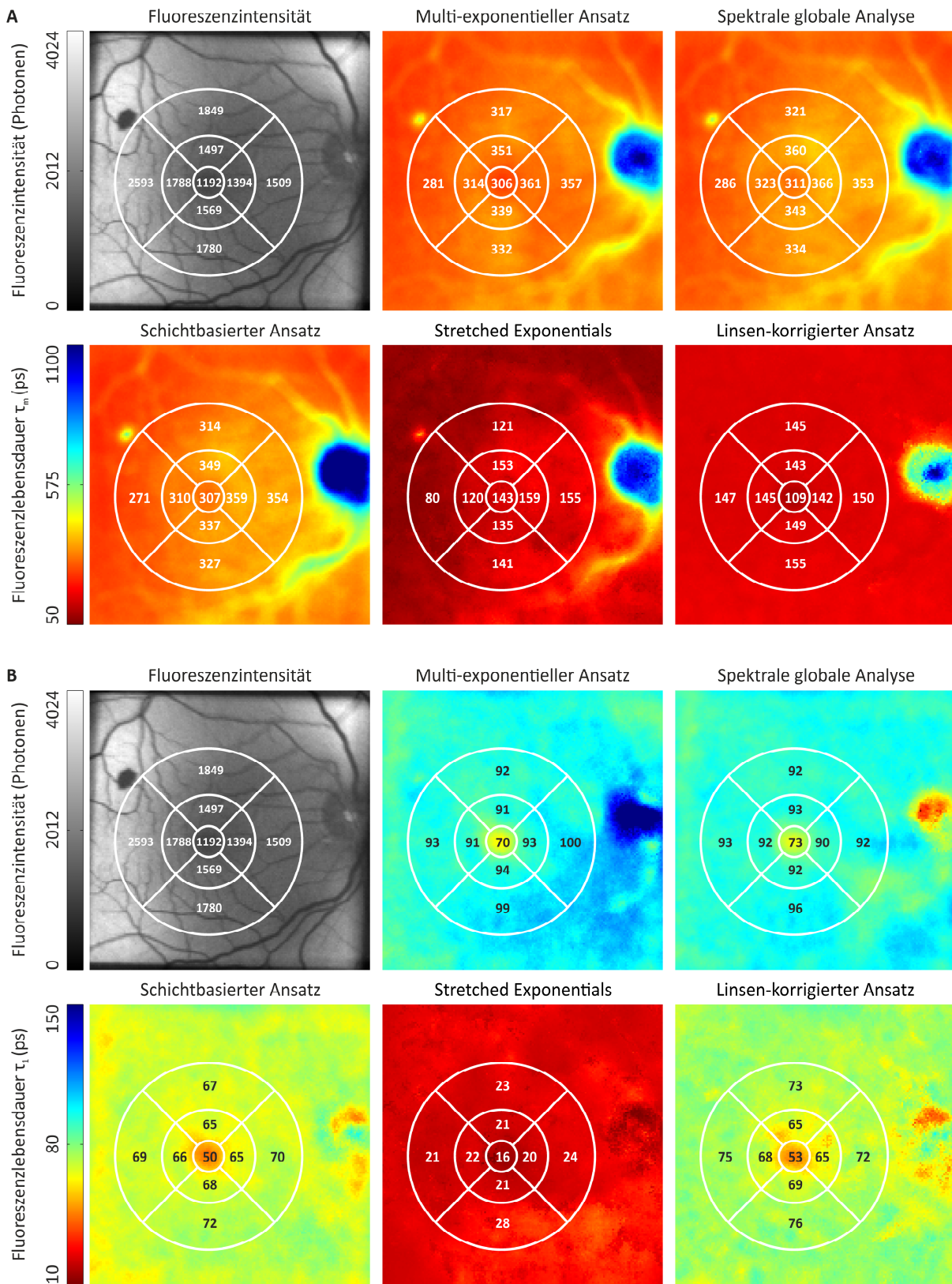


Abbildung 6.11 Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauer-Modellierungsansätze in einem gesunden Probanden. Die Fluoreszenzintensität sowie die Fluoreszenzlebensdauern τ_m (A) und τ_1 (B) sind vom spektralen Kanal 1 dargestellt. Die Farbskalierung der Fluoreszenzlebensdauer ist in (A) und (B) jeweils identisch. In jeder Grafik ist das ETDRS-Gitter inklusive die Mittelwerten je Subfeld aufgetragen. Das Fluoreszenzintensitätsbild ist das gemessene Signal vor Binning. Bei den Fluoreszenzlebensdauern τ_1 stimmen schichtbasierter Ansatz und linsen-korrigierter Ansatz in allen Feldern des ETDRS-Gitters gut überein.

Die durch die verschiedenen Ansätze bestimmten mittleren Fluoreszenzlebensdauern waren relativ ähnlich, unabhängig von den zugrundeliegenden Modellen. Die Stretched Exponentials lieferten kürzere Fluoreszenzlebensdauern im Vergleich zum multi-exponentiellen Ansatz, zur spektralen globalen Analyse und zum schichtbasierten Ansatz, zeigten aber auch sehr ähnliche Merkmale wie längere Fluoreszenzlebensdauern auf den dickeren Blutgefäßen, der Papille und dem sehr gering fluoreszierenden Punkt im oberen linken Teil des Bildes. Der linsen-korrigierte Ansatz zeigte keine solchen verlängerten Fluoreszenzlebensdauern, mit Ausnahme der Papille, wodurch anzunehmen ist, dass die längeren Fluoreszenzlebensdauern in diesen Bereichen hauptsächlich von der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse hervorgerufen wurden. Weiterhin waren die durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern des linsen-korrigierten Ansatzes kürzer und homogener im Vergleich zum multi-exponentiellen Ansatz, zur spektralen globalen Analyse und zum schichtbasierten Ansatz. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 , in der Regel die Exponentialfunktion mit den höchsten Amplituden, wies die größten Unterschiede zwischen den Modellierungsansätzen auf. Beispielsweise berechnete einzig der multi-exponentielle Ansatz in der Papille längere Fluoreszenzlebensdauern als in der umgebenden Retina. Interessanterweise waren die Ergebnisse von schichtbasiertem Ansatz und linsen-korrigiertem Ansatz bei Fluoreszenzlebensdauer τ_1 sehr ähnlich, obwohl ihre mittleren Fluoreszenzlebensdauern Unterschiede zeigten, vor allem in den Bereichen der größeren Blutgefäße. Außerdem waren die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 von schichtbasiertem Ansatz und linsen-korrigiertem Ansatz deutlich kürzer als von multi-exponentiellem Ansatz und der spektralen globalen Analyse. Auf der anderen Seite besaß die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 des linsen-korrigierten Ansatzes eine höhere Fleckigkeit bzw. stärkeres Rauschen, was darauf hindeutet, dass dieser komplexe Ansatz eine höhere Anzahl an Photonen je Pixel benötigt, als die anderen Ansätze.

6.2.4 Gruppenvergleich

Die Ergebnisse des Gruppenvergleichs von Diabetes Patienten und Gesunden wurden teilweise publiziert [69], sowie die Methodik des Gruppenvergleichs in einer weiteren Publikation [31] angewandt. Die normierten Histogramme der Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern für Diabetes Patienten und Kontrollen sind in Abb. 6.12 für beide spektrale Kanäle dargestellt. Die Verschiebung zu längeren Fluoreszenzlebensdauern bei den Diabetes Patienten war in allen Fluoreszenzlebensdauern und beiden spektralen Kanälen deutlich sichtbar. Signifikant verschiedene Histogrammklassen wurden für alle Fluoreszenzlebensdauern gefunden, mit Ausnahme von Fluoreszenzlebensdauer τ_2 im spektralen Kanal 2. Für die Amplituden wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Für jede Histogrammkategorie mit dem höchsten Signifikanzniveau wird die zugehörige ROC-Kurve neben dem Histogramm angegeben. Der größte Wert von 0,85 für die Fläche unter der ROC-Kurve wurde von Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im spektralen Kanal 2 erreicht. Daher würde dieser cut-off Punkt zur

bestmöglichen Klassifizierung zwischen Diabetes Patienten ohne diabetische Retinopathie und der Kontrollgruppe führen.

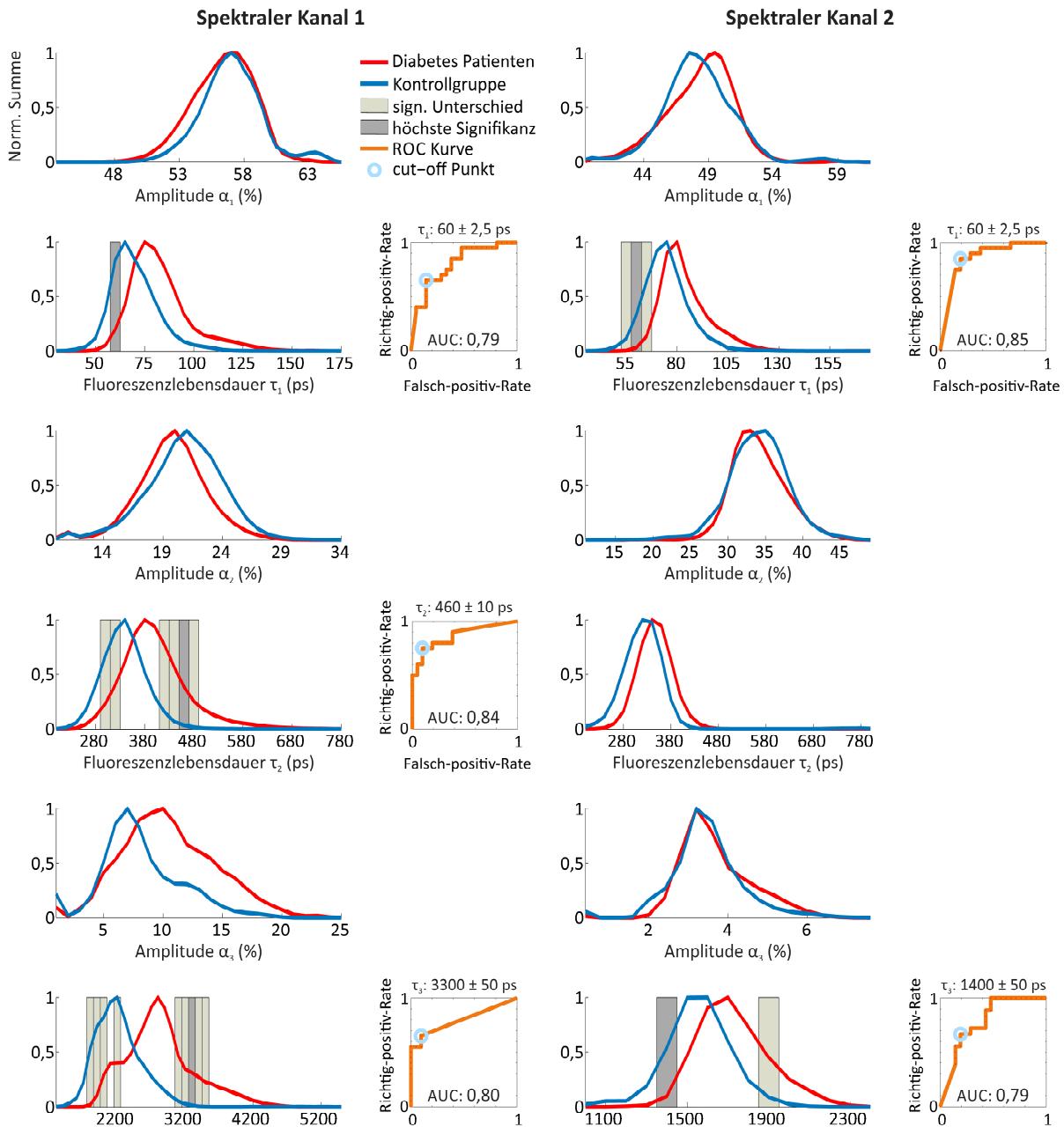


Abbildung 6.12 Normierte Histogramme der Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern von beiden spektralen Kanälen für Kontrollen (blau) und Diabetes-Patienten (rot). Histogrammklassen mit signifikanten Unterschieden nach der Holm-Bonferroni-Methode sind hellgrau gefärbt. Die Klasse mit dem höchsten Signifikanzniveau (kleinster p -Wert) ist dunkelgrau gefärbt. Für die Klasse mit dem höchsten Signifikanzniveau ist die zugehörige ROC-Kurve (orange) neben dem Histogramm angegeben. Der cut-off Punkt als besten Kompromiss zwischen Richtig-positiv-Rate und Falsch-positiv-Rate ist hellblau gefärbt.

6.3 Analyse des schichtbasierten Ansatzes

6.3.1 Simulationen

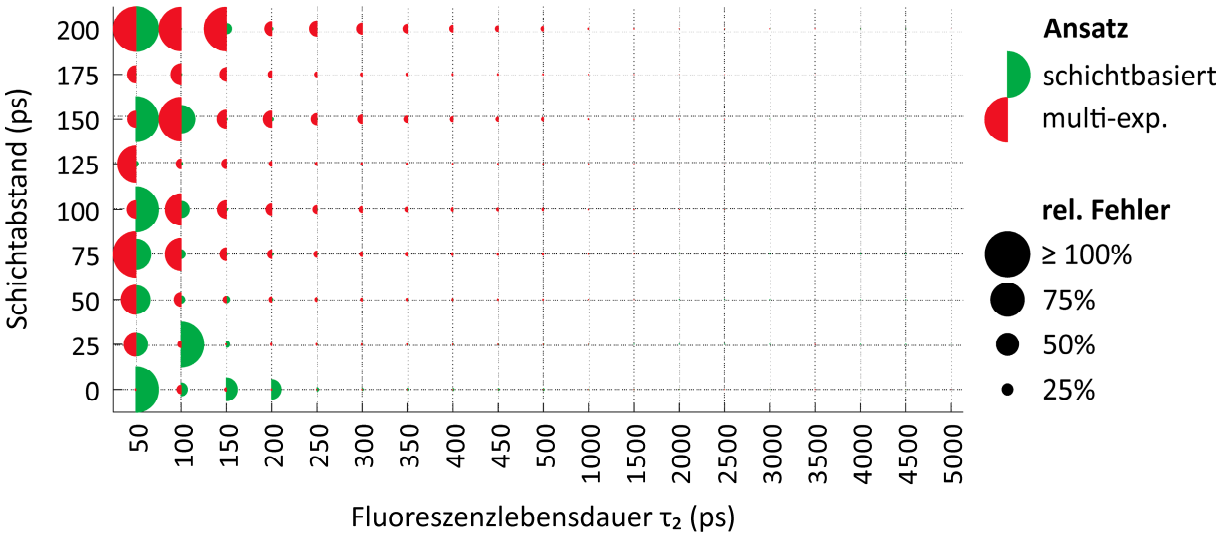
6.3.1.1 Allgemeines

Zur Darstellung der Simulationsergebnisse wurde eine angepasste Form von Punchcard-Plots verwendet. Anstatt eines vollen Kreises, wurde jeweils ein grüner Halbkreis für die Ergebnisse des schichtbasierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.1) sowie ein roter Halbkreis für die Ergebnisse des multi-exponentiellen Ansatzes (Abschnitt 3.4.2) verwendet. Der Radius des Halbkreises gibt den relativen Fehler an. Je kleiner der Radius, desto geringer der relative Fehler des jeweils betrachteten Parameters. Der maximale Radius eines Halbkreises wurde auf einen relativen Fehler von 100% begrenzt, da bei derart starken Abweichungen die Fluoreszenzlebensdauerapproximation fehlschlug und die genaue Fehlergröße nicht mehr relevant war. Im Gegenzug erleichterte die Begrenzung auf maximal 100% relativen Fehler die Sichtbarkeit kleinerer Abweichungen und verbesserte insbesondere die Vergleichbarkeit der Abbildungen untereinander.

6.3.1.2 Zwei Fluorophore

Einige Simulationsergebnisse wurden publiziert [131, 132]. Die Ergebnisse der Simulationen mit zwei Fluorophoren sind im Folgenden für $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ dargestellt. Die Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern für die beiden anderen betrachteten Q -Verhältnisse sind in Anhang B zu finden. Abb. 6.13 stellt die relativen Fehler der Amplituden α in Abhängigkeit von Schichtabstand und der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 der verschobenen Schicht dar. Der über alle Kombinationen gemittelte relative Fehler war bei den Amplituden für den schichtbasierten Ansatz kleiner (7,6% ggü. 16,8%). Die schnell abklingenden kurzen Fluoreszenzlebensdauern τ_2 der verschobenen Schicht erzeugten für größere Schichtabstände größere relative Fehler beim multi-exponentiellen Ansatz, insbesondere für Amplitude α_2 . Dieser Effekt nahm mit steigender Fluoreszenzlebensdauer τ_2 ab.

A Relativer Fehler Amplitude α_1 ($Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 75\%$)



B Relativer Fehler Amplitude α_2 ($Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 75\%$)

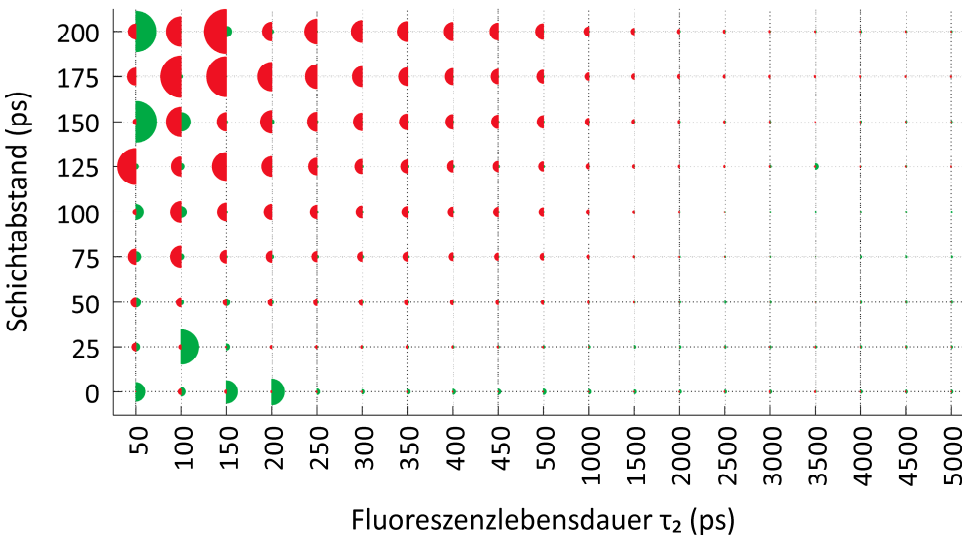


Abbildung 6.13 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 9,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 11,0% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 7,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 16,8% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2 .

Der mittlere relative Fehler für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 war beim multi-exponentiellen Ansatz geringer (6,8% ggü. 8,6%, Abb. 6.14A) als beim schichtbasierten Ansatz. Bei Fluoreszenzlebensdauer τ_2 war der mittlere relative Fehler wiederum beim schichtbasierten Ansatz deutlich kleiner (11% ggü. 115%), wie in Abb. 6.14B dargestellt. Die Fehler traten hauptsächlich bei kurzen Fluoreszenzlebensdauern auf, die in der Nähe der auf 50 ps festgelegten Fluoreszenzlebensdauer τ_1 lagen. Der schichtbasierte Ansatz konnte durch die Modellierung des Schichtabstands nah beieinanderliegende Fluoreszenzlebensdauern besser trennen.

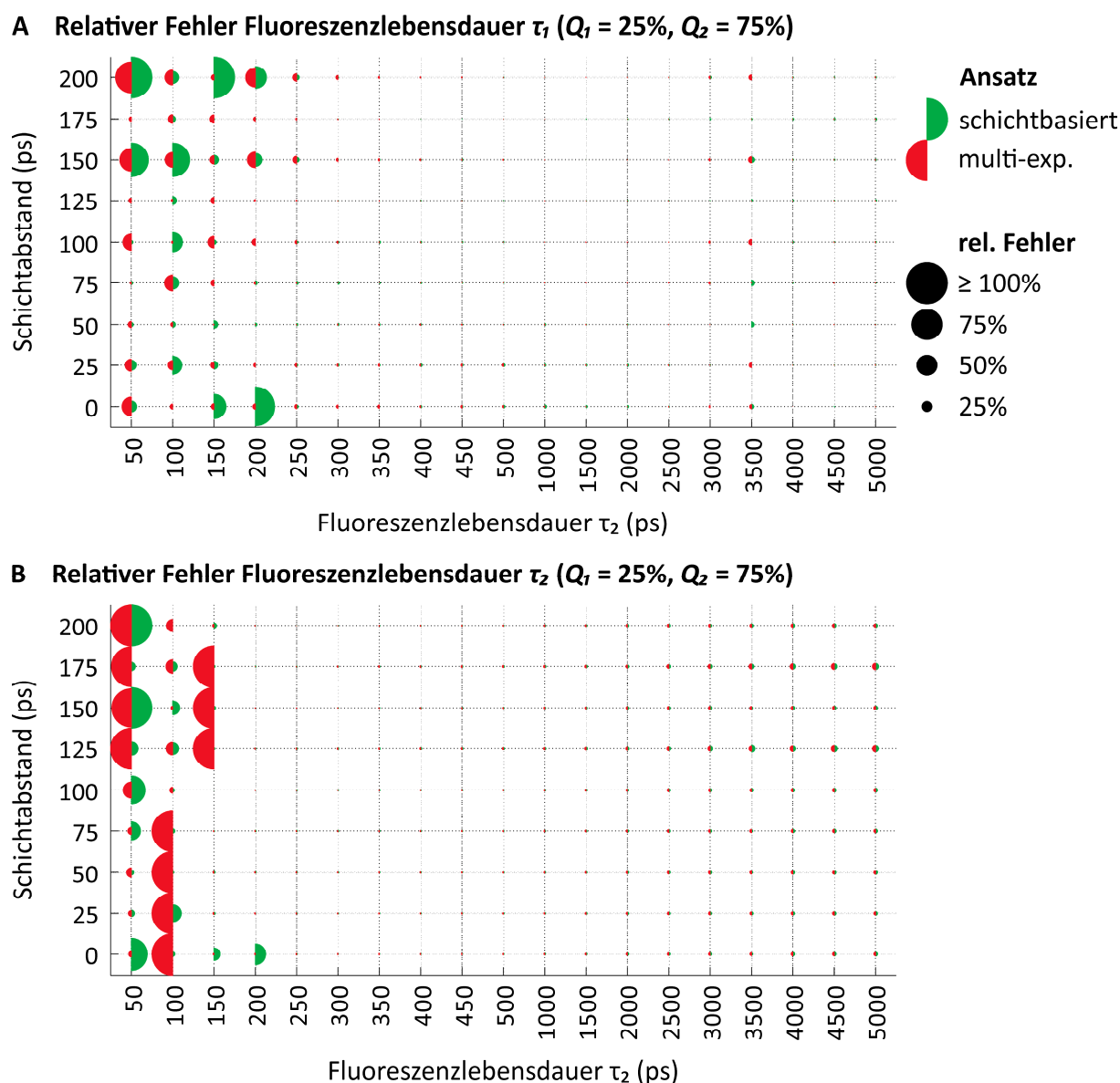
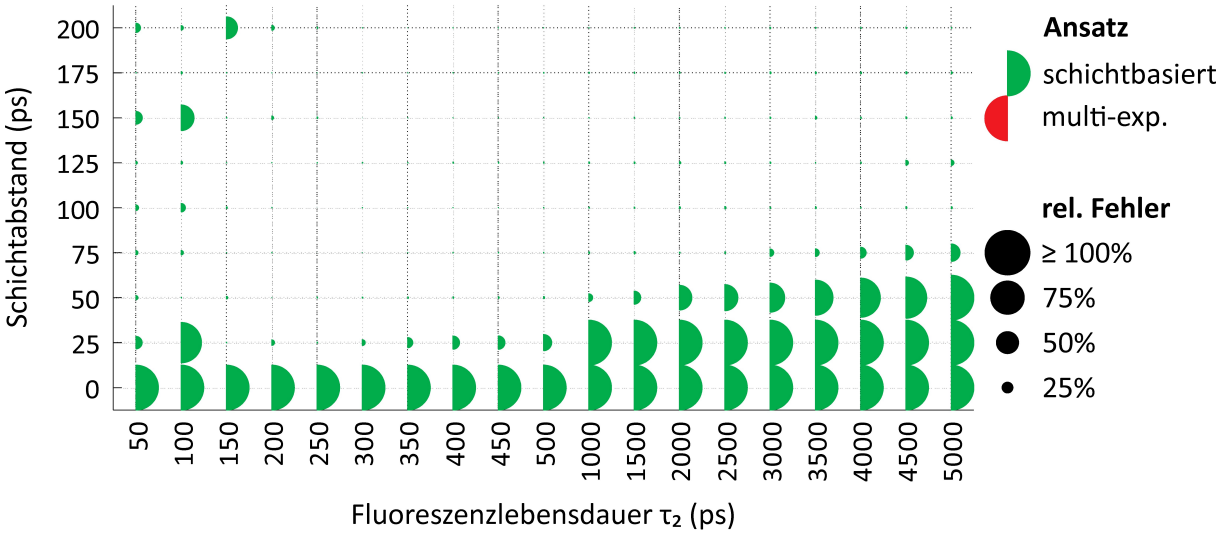


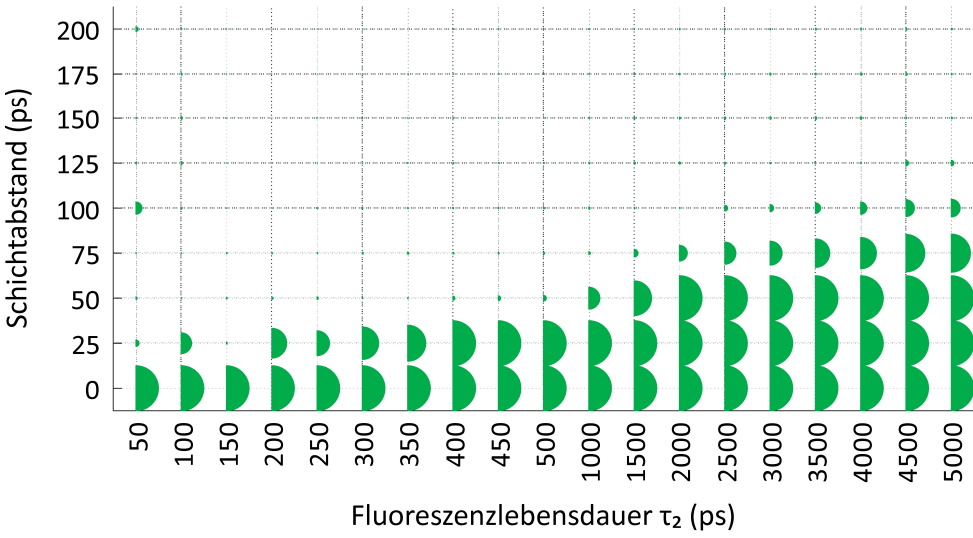
Abbildung 6.14 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 8,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 6,8% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 11,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 115% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2 .

Die Betrachtung des relativen Fehlers des Schichtabstands (Abb. 6.15A) zeigte einen Bereich der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 zwischen 100 ps und 1000 ps, in welchem Schichtabstände ≥ 25 ps mit geringen Fehlern aufgelöst werden konnten. Von 1000 ps bis 5000 ps stieg der minimale Schichtabstand für eine gute Unterscheidung von 50 ps auf über 75 ps an. Bei einer Reduktion des relativen Anteils der verschobenen Schicht um 50% (Abb. 6.15B) bzw. 25% (Abb. 6.15C) verringerte sich die Schichtauflösung um ca. 25 ps, insbesondere bei Fluoreszenzlebensdauern τ_2 von über 3000 ps.

A Relativer Fehler Schichtabstand ($Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 75\%$)



B Relativer Fehler Schichtabstand ($Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 50\%$)



C Relativer Fehler Schichtabstand ($Q_1 = 75\%$, $Q_2 = 25\%$)

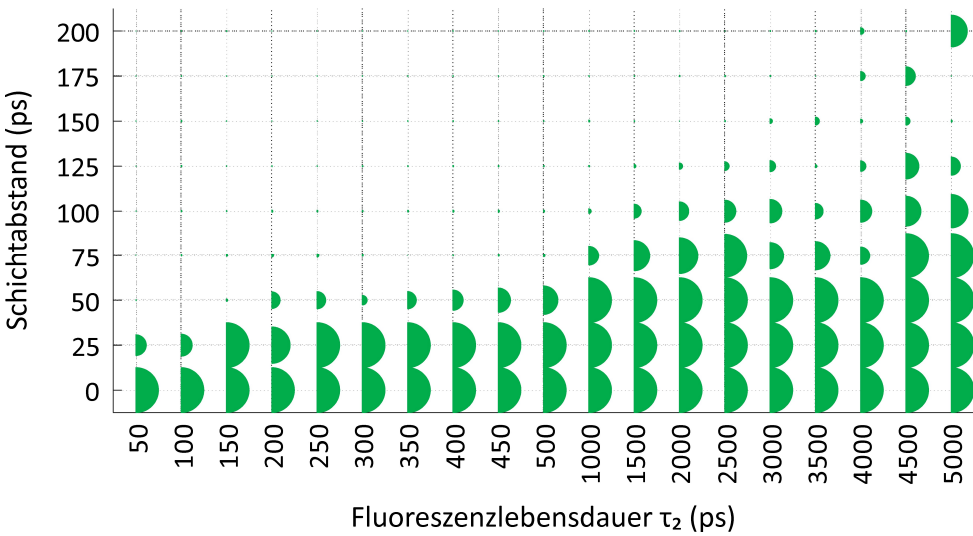


Abbildung 6.15 Relative Fehler für den Schichtabstand t_{c_2} . Der mittlere Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ (A) beträgt 32,2%. Für $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ (B) beträgt der mittlere Fehler 46,4% und für $Q_1 = 75\%$ und $Q_2 = 25\%$ (C) beträgt der mittlere Fehler 59,8%. Der multi-exponentielle Ansatz ist nicht aufgeführt, da dieser keine Schichtabstände berechnen kann.

6.3.1.3 Drei Fluorophore, eine verschobene Schicht

Die Simulationen mit drei Fluorophoren und einer verschobenen Schicht (die Schicht mit der Fluoreszenzlebensdauer, τ_3) waren den Messdaten vom menschlichen Auge ähnlich. Die Ergebnisse für Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern der Simulationen mit $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$ sind in Abb. 6.16 dargestellt.

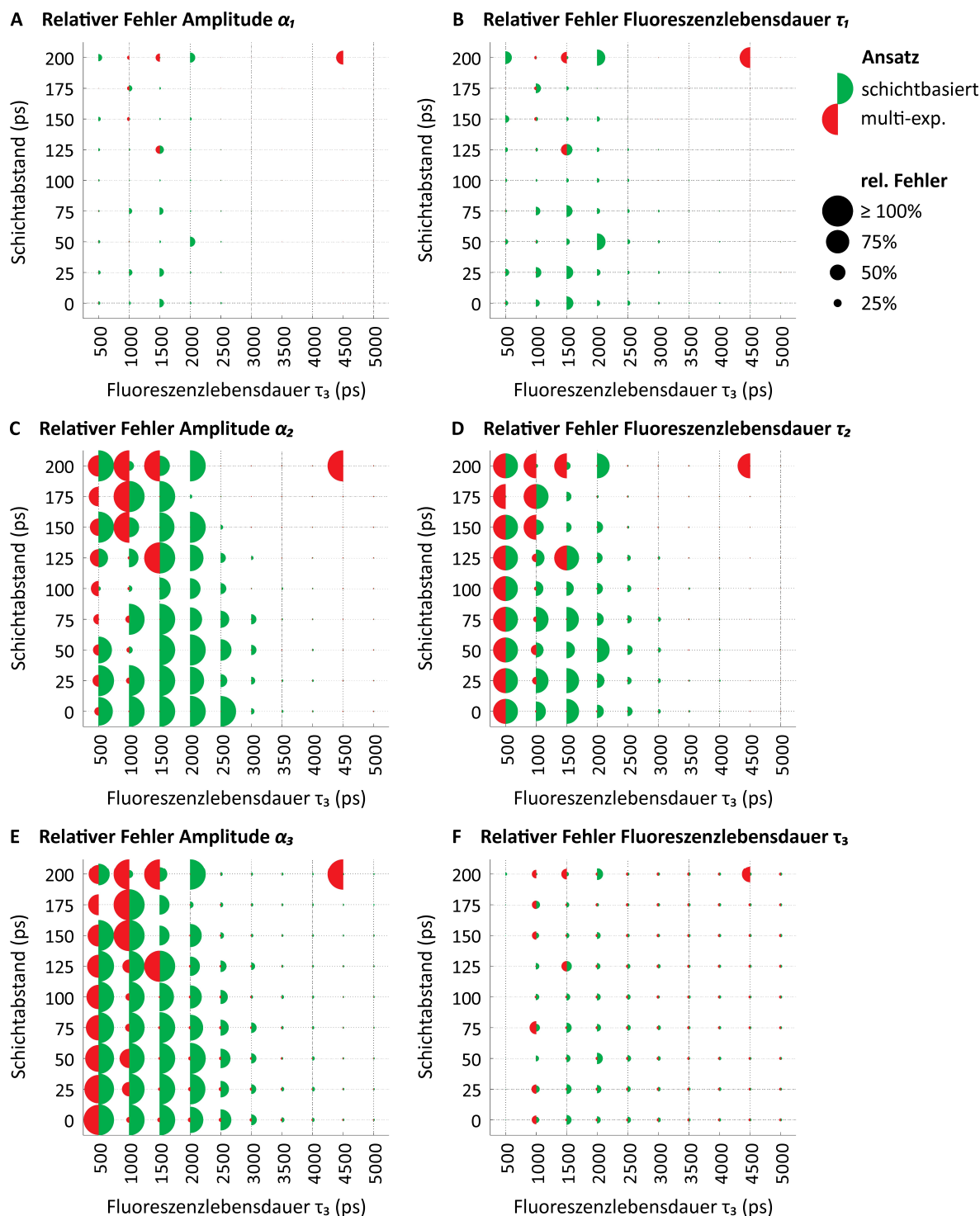


Abbildung 6.16 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (B), τ_2 (D) und τ_3 (F), sowie die dazugehörigen Amplituden α_1 (A), α_2 (C) und α_3 (E) für $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 1,8% bzw. 5,0% (α_1), 33,1% bzw. 76,8% (α_2), 23,1% bzw. 50,0% (α_3), 2,6% bzw. 10,2% (τ_1), 17,0% bzw. 26,9% (τ_2) und 10,2% bzw. 13,4% (τ_3).

Die Ergebnisse für Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern der Simulationen mit $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$ sind in Abb. 6.17 dargestellt. Die Ergebnisse für die verbleibenden Simulationen mit sind in Anhang B zu finden. Die relativen Fehler waren für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$ am kleinsten, selbst für die die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 sowie die dazugehörigen Amplituden. Im Vergleich der Modellierungsansätze erzeugte der schichtbasierte Ansatz häufiger und meist größere relative Fehler als der multi-exponentielle Ansatz, insbesondere für $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$.

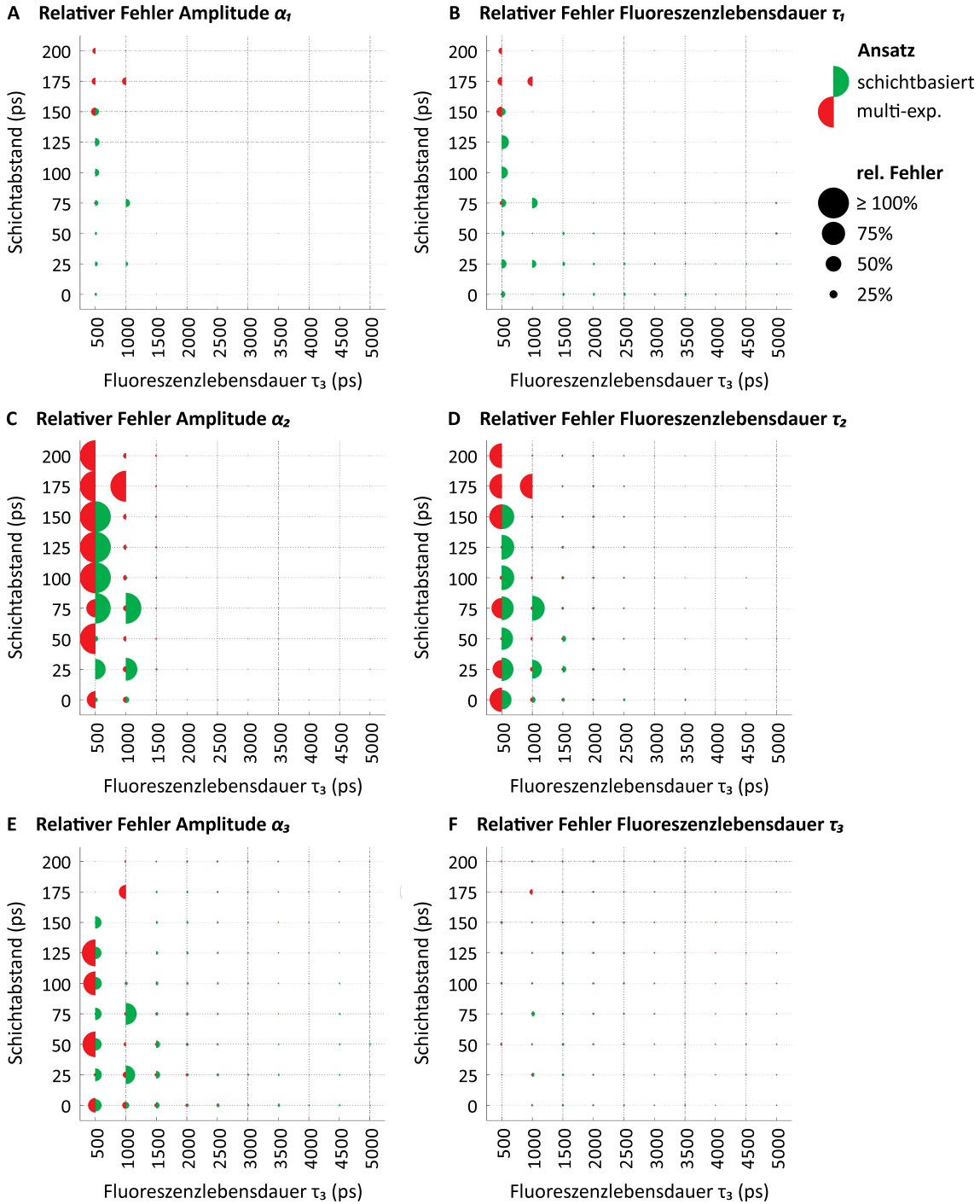


Abbildung 6.17 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (B), τ_2 (D) und τ_3 (F), sowie die dazugehörigen Amplituden α_1 (A), α_2 (C) und α_3 (E) für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 1,5% bzw. 2,1% (α_1), 17,5% bzw. 12,4% (α_2), 6,8% bzw. 10,0% (α_3), 2,3% bzw. 5,6% (τ_1), 9,1% bzw. 11,1% (τ_2) und 4,3% bzw. 4,4% (τ_3).

Abb. 6.18 stellt die relativen Fehler des Schichtabstands für alle drei Q -Verhältnisse dar. Auch hier zeigten sich die geringsten relativen Fehler für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$. Lagen die Fluoreszenzlebensdauern τ_3 der verschobenen Schicht zwischen 1000 ps und 2000 ps, sind Abstände ≥ 75 ps gut auflösbar. Zwischen 2500 ps und 5000 ps ließen sich Schichten mit einem Abstand von ≥ 100 ps gut unterscheiden.

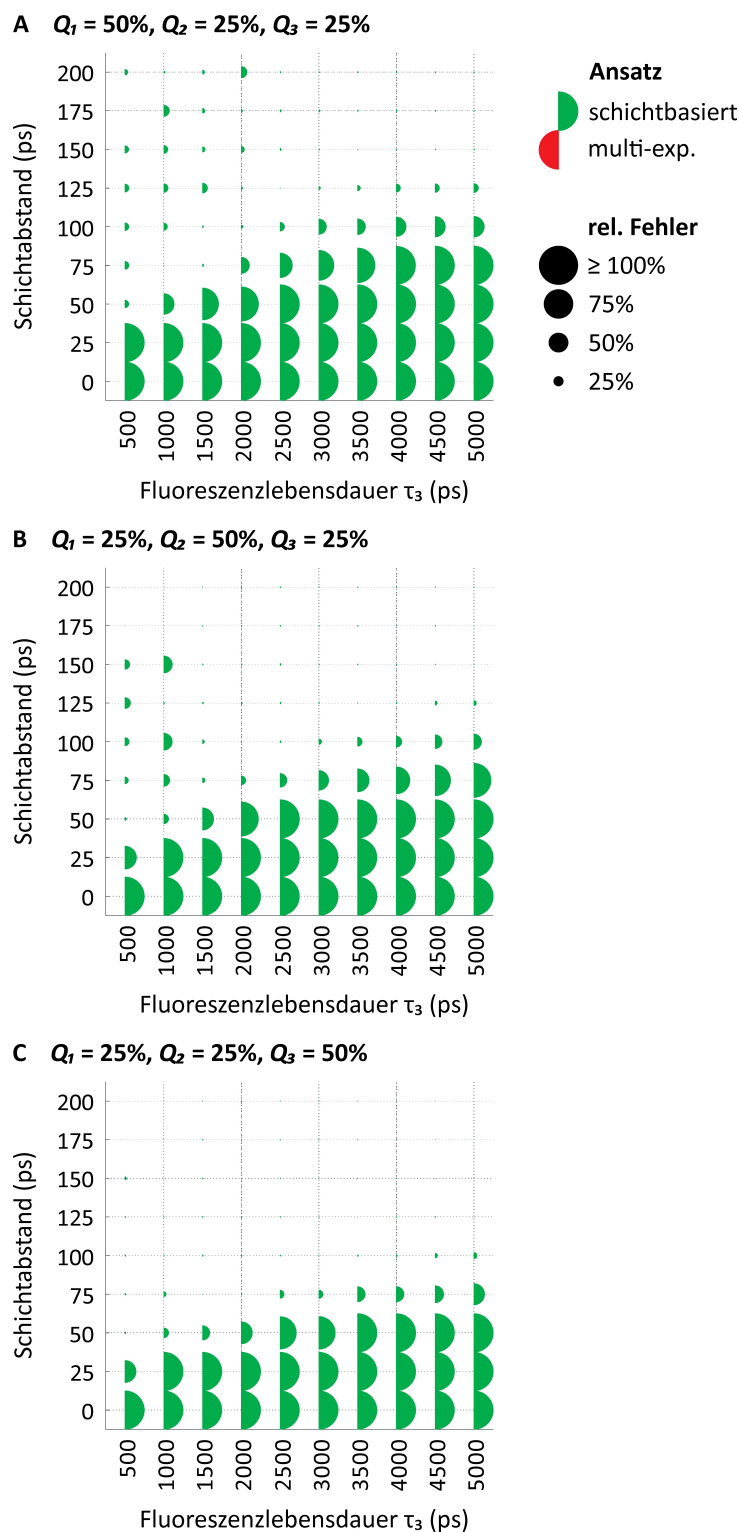


Abbildung 6.18 Relative Fehler für den Schichtabstand τ_3 für $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$ (A), $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$ (B) sowie $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$ (C). Die mittleren Fehler betragen 82,0% (A), 66,8% (B) und 50,8% (C). Der multi-exponentielle Ansatz ist nicht aufgeführt, da dieser keine Schichtabstände berechnen kann.

6.3.1.4 Drei Fluorophore, zwei unterschiedlich verschobene Schichten

Für die Simulationen mit drei Fluorophoren und zwei verschobenen Schichten wurde nur der Schichtabstand der mittleren Komponente (Fluoreszenzlebensdauer τ_2) variiert und die übrigen Parameter fixiert. Abb. 6.19 visualisiert die relativen Fehler der Ergebnisse.

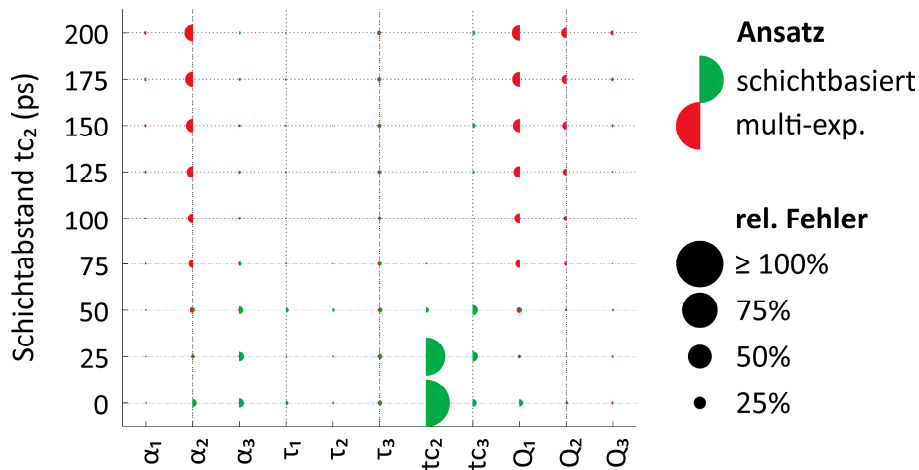


Abbildung 6.19 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün). Nur der Schichtabstand tc_2 der mittleren Komponente (α_2, τ_2) wird zwischen 0 ps und 200 ps variiert. Die übrigen Parameter sind fixiert.

Schichtbasierter Ansatz und multi-exponentieller Ansatz unterschieden sich im Wesentlichen nur in Amplitude α_2 , deren relative Fehler mit dem Abstand tc_2 beim multi-exponentiellen Ansatz auf 34% anwachsen. Infolgedessen kam es auch zu Fehlern bei Q_1 und Q_2 . Die Fluoreszenzlebensdauern wurden trotz der Verschiebung von zwei fluoreszierenden Schichten vom multi-exponentiellen Ansatz mit geringen Fehlern bestimmt. Ab einer Verschiebung um 50 ps ließ sich der Schichtabstand der mittleren Komponente mittels schichtbasiertem Ansatz mit geringen Fehlern auflösen.

6.3.2 Experimentelle Messungen

6.3.2.1 Zwei Fluorophore

Zur Überprüfung der Simulationen anhand realer Messungen in ausgewählten Parameterkombinationen sind die relativen Fehler für Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern, Schichtabstände und relative Anteile für $Q_1 = 25\%$ ($Q_2 = 75\%$) bzw. $Q_1 = 50\%$ ($Q_2 = 50\%$) in Abb. 6.20A bzw. Abb. 6.20B analog zu Abschnitt 6.3.1.2 dargestellt.

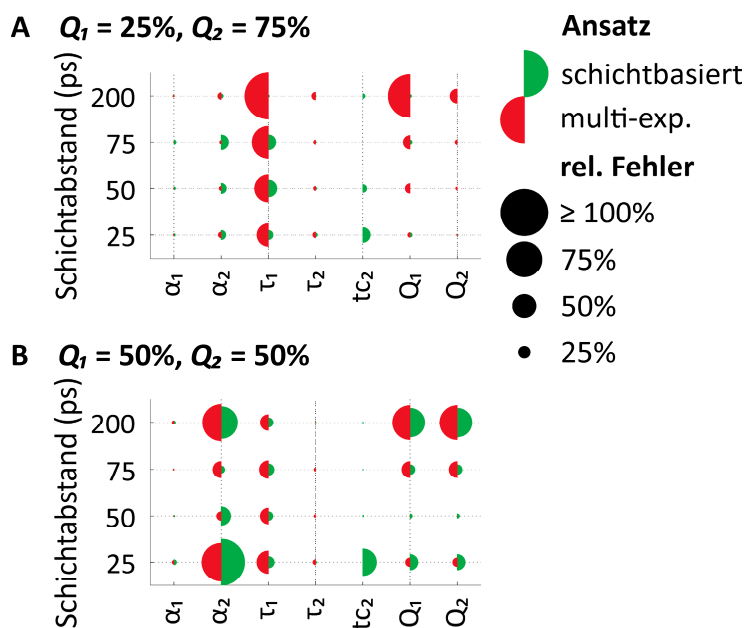


Abbildung 6.20 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün) für $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ (A) und $Q_1 = Q_2 = 50\%$ (B). In (A) betragen die mittleren Fehler für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 3,3% bzw. 6,2% (α_1), 10,9% bzw. 20,8% (α_2), 85,5% bzw. 23,4% (τ_1), 11,7% bzw. 5,0% (τ_2), 38,1% bzw. 6,6% (Q_1) und 12,7% bzw. 2,2% (Q_2). In (B) betragen die mittleren Fehler für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 5,4% bzw. 6,0% (α_1), 54,0% bzw. 60,2% (α_2), 39,1% bzw. 22,6% (τ_1), 6,8% bzw. 2,5% (τ_2), 32,7% bzw. 32,0% (Q_1) und 32,7% bzw. 32,0% (Q_2).

Die Fehler der Amplituden sind durch nicht perfekt getroffene Verdünnungen der Fluorophor-Mischungen begründet. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden experimentell recht gut hergestellt, insbesondere Fluoreszenzlebensdauern τ_2 wiesen bei beiden Experimenten geringe Fehler auf. Die relativen Fehler waren insbesondere für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 beim schichtbasierten Ansatz deutlich kleiner als beim multi-exponentiellen Ansatz. Die relativen Fehler bei der Bestimmung des Schichtabstands tc_2 stimmten mit den Simulationsergebnissen überein (Abschnitt 6.3.1.2) bzw. waren sogar etwas besser als diese. Ab einem Schichtabstand von 50 ps ließ sich der Schichtabstand, für die beiden betrachteten fluoreszierenden Schichten, mit geringen Fehlern bestimmen.

6.3.2.2 Drei Fluorophore, zwei unterschiedlich verschobene Schichten

Abb. 6.21 stellt die relativen Fehler für Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern, Schichtabstände und relativen Anteile der experimentellen Messungen mit zwei unterschiedlich verschobenen Schichten dar, welche analog zu den Simulationen mit multi-exponentiellem Ansatz und schichtbasiertem Ansatz ausgewertet wurden.

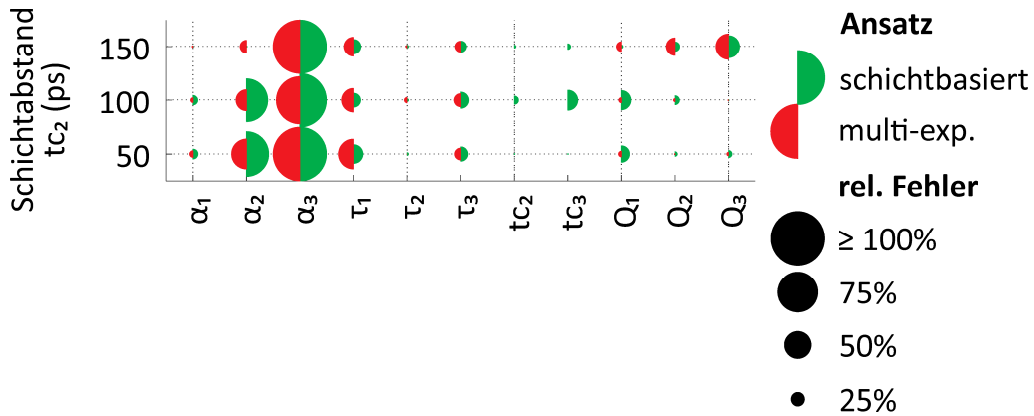


Abbildung 6.21 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün) für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 8,3% bzw. 12,9% (α_1), 39,7% bzw. 55,5% (α_2), 105,8% bzw. 142,2% (α_3), 45,0% bzw. 29,3% (τ_1), 5,0% bzw. 5,5% (τ_2), 22,4% bzw. 26,0% (τ_3), 12,8% bzw. 24,3% (Q_1), 13,5% bzw. 14,4% (Q_2) und 18,7% bzw. 19,0% (Q_3). Die mittleren Fehler der Schichtabstände betragen 7,7% (tc_2) und 26,0% (tc_3).

Die Fehler der Amplituden und relativen Anteile sind durch nicht perfekt getroffene Verdünnungen der Fluorophore begründet. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden experimentell recht gut hergestellt, insbesondere Fluoreszenzlebensdauern τ_2 wiesen geringe Fehler auf. Die relativen Fehler waren für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 beim schichtbasierten Ansatz deutlich kleiner als beim multi-exponentiellen Ansatz. Die relativen Fehler bei der Bestimmung der Schichtabstände tc_2 stimmten mit den Simulationsergebnissen überein (Abschnitt 6.3.1.4). Alle betrachteten Schichtabstände wiesen geringe relative Fehler auf.

6.4 Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

6.4.1 Wiederholbarkeit

6.4.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 6.1 listet die errechneten Fluoreszenzlebensdauern von drei Wiederholungsmessungen für beide spektrale Kanäle auf. Die größten relativen Abweichungen traten für den Fluoreszenzfarbstoff mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 100 ps (Küvette B) im spektralen Kanal 2 für die mono-exponentielle Approximation auf. Wie in Abschnitt 5.9.1 beschrieben, wurden die Daten von Küvette B zusätzlich mittels eines bi-exponentiellen incomplete Decay Modells analysiert. Die mono- und bi-exponentiellen Approximationen eines Pixels von Küvette B sind in Abb. 6.22 dargestellt.

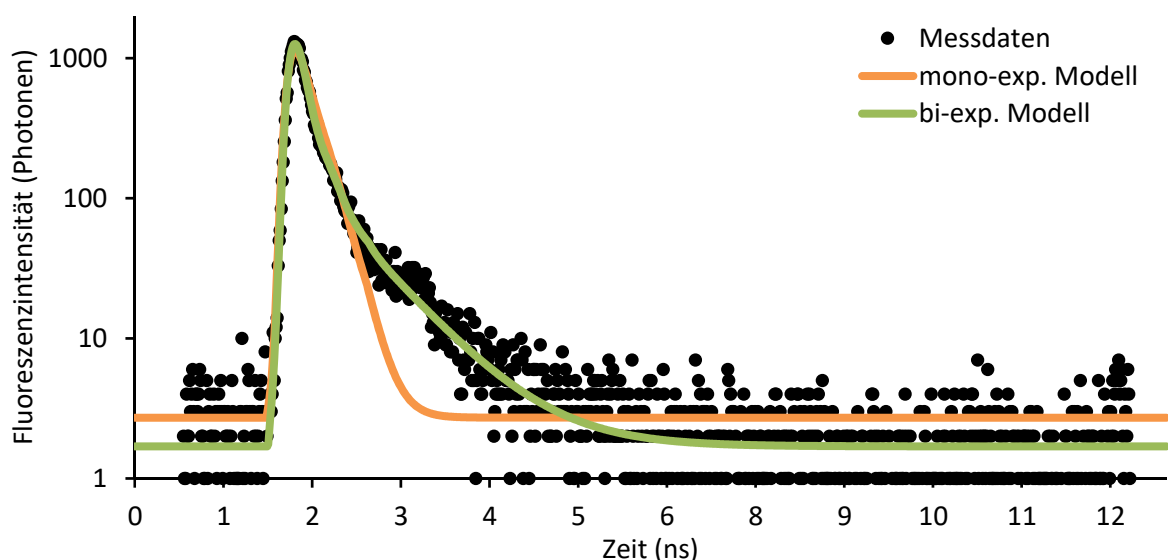


Abbildung 6.22 TCSPC-Daten (schwarz) eines Pixels von Küvette B (spektraler Kanal 2) mono-exponentiell (orange, $\tau = 164$ ps) und bi-exponentiell (grün, $\tau_1 = 89$ ps, $\tau_2 = 534$ ps) approximiert. Die bi-exponentielle Approximation passt deutlich besser zu den Messdaten.

Das bi-exponentielle Modell passte deutlich besser zu den Messdaten. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 des bi-exponentiellen Modells (89 ps) stimmte im Gegensatz zur Fluoreszenzlebensdauer des mono-exponentiellen Modells (164 ps) mit dem Referenzwert (89 ps) überein. Gemittelt über die betrachtete ROI lieferte die bi-exponentielle Fluoreszenzlebensdauerapproximation deutlich bessere Ergebnisse als die mono-exponentielle Fluoreszenzlebensdauerapproximation, welche in beiden spektralen Kanälen sehr ähnliche Ergebnisse lieferten. Für den Fluoreszenzfarbstoff mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 400 ps (Küvette C) wurde in beiden spektralen Kanälen eine deutlich zu kurze Fluoreszenzlebensdauer berechnet. Der größte relative Fehler von 13% trat bei Messung 3 von Küvette D im spektralen Kanal 2 auf (ausgenommen die mono-exponentielle Approximation von Küvette B). Es ist anzunehmen, dass die Referenzwerte für die Küvetten C und D etwas zu groß sind.

Tabelle 6.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzlebensdauern der je Küvette segmentierten Region von drei Wiederholungsmessungen für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (Küvetten A bis E). Von der bi-exponentiellen Fluoreszenzlebensdauerapproximation bei Küvette B ist nur die kurze Fluoreszenzlebensdauer angegeben.

Küvette	Nr. exp. Fkt.	Referenz	Fluoreszenzlebensdauer (ps)					
			Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
			1	2	3	1	2	3
A	1	10	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,1	10,0 ± 0,0	10,2 ± 0,6	10,2 ± 0,7	10,0 ± 0,1
B	1	89	99,5 ± 1,9	98,6 ± 2,5	96,7 ± 2,7	167,6 ± 3,6	161,1 ± 3,0	160,8 ± 3,4
B	2	89	89,9 ± 2,6	90,0 ± 2,6	88,8 ± 2,4	95,1 ± 2,6	94,9 ± 2,7	94,2 ± 2,3
C	1	400	382,8 ± 4,0	381,3 ± 4,1	378,1 ± 4,8	374,8 ± 4,1	373,7 ± 4,1	369,8 ± 4,6
D	1	1180	1057,6 ± 9	1053,1 ± 9	1052,2 ± 10	1032,3 ± 9	1030,0 ± 9	1027,9 ± 8
E	1	3950	3914,4 ± 33	3912,5 ± 37	3903,2 ± 34	3711,1 ± 39	3676,9 ± 42	3675,4 ± 47

Abb. 6.23 stellt die Variationskoeffizienten über die segmentierte Region je Küvette für beide spektrale Kanäle dar. Bis auf die praxisferne Küvette A lagen die Variationskoeffizienten unter 3%, teilweise sehr deutlich darunter. Die Variationskoeffizienten waren bei Küvette B am größten, da im mono-exponentiellen Fall das Modell nicht gut zu den Messdaten passte und im bi-exponentiellen Fall die höhere Modellkomplexität zu einer größeren Variabilität führte.

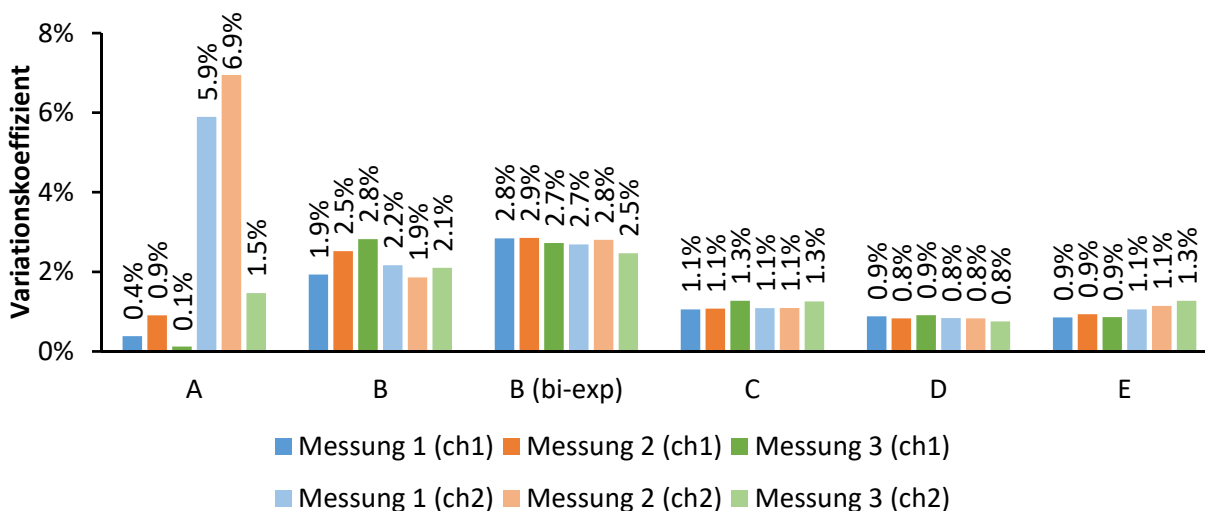


Abbildung 6.23 Variationskoeffizienten, basierend auf Tabelle 6.1, für beide spektrale Kanäle der Fluoreszenzlebensdauern von drei Wiederholungsmessungen für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern nach mono-exponentieller Approximation (A bis E) bzw. bi-exponentieller Approximation (B (bi-exp)).

Die Untersuchung der Wiederholbarkeit anhand von Fluoreszenzfarbstoffen zeigte, dass mit dem FLIO-System Fluoreszenzlebensdauern in einem Bereich von 89 ps bis 3950 ps mit guter Genauigkeit bestimmt werden können.

6.4.1.2 Probanden

Die Ergebnisse der Wiederholbarkeitsuntersuchung wurden publiziert [55, 133]. Abb. 6.24(A) stellt die Anzahl der detektierten Photonen je segmentierter Region, spektralem Kanal und Proband dar. Die Anzahl der Photonen wurde über die Wiederholungsmessungen gemittelt und für die unterschiedlichen Detektorsensitivitäten korrigiert. Die meisten Photonen wurden bei allen Probanden im papillo-makulären Bündel im spektralen Kanal 2 detektiert.

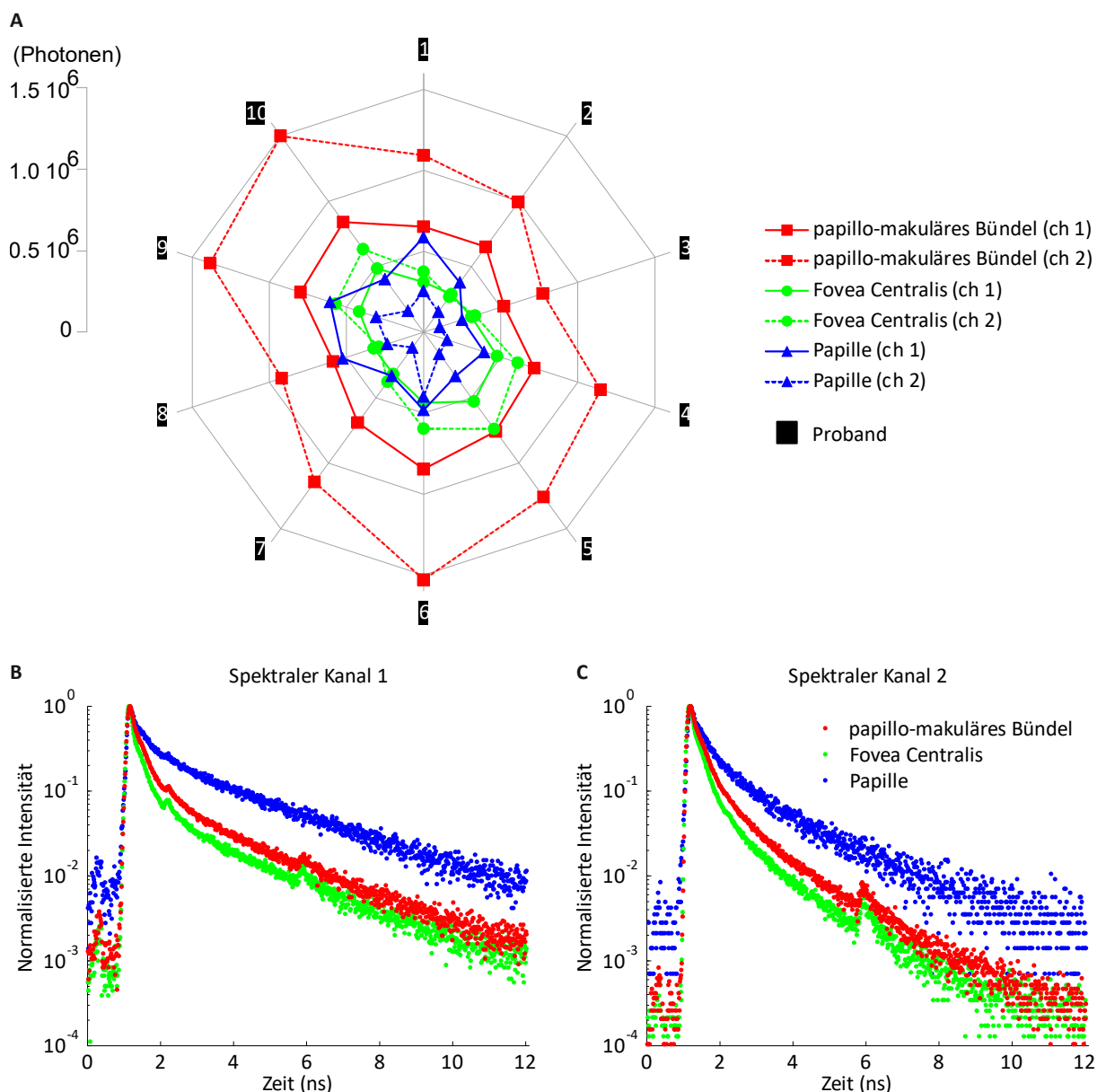


Abbildung 6.24 Mittlere Anzahl der detektierten Photonen je Proband, Region und spektralem Kanal (A). Anhand von Proband 7 sind die normierten zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale für die drei segmentierten Regionen sowie für den spektralen Kanal 1 (B) und den spektralen Kanal 2 (C) dargestellt. Bei ca. 2 ns (B) und ca. 6 ns (B, C) sind Artefakte durch Reflexionen an optischen wirksamen Flächen im Strahlengang des Fluoreszenzlichts erkennbar.

Die wenigsten Photonen wurden in der Papille ebenfalls im spektralen Kanal 2 detektiert. Es gab deutliche Unterschiede, sowohl zwischen den Regionen und spektralen Kanälen, als auch zwischen den Probanden. So wurden bei den Probanden 6 und 10 fast doppelt so viele Photonen im papillo-makulären Bündel im spektralen Kanal 2 detektiert als bei Proband 3. Auch die Verhältnisse der Photonen je Region zueinander waren zwischen den Probanden unterschiedlich. So wurden bei Proband 5 im papillo-makulären Bündel im spektralen Kanal 1 in etwa genauso viele Photonen detektiert wie in der Fovea centralis im spektralen Kanal 2, während bei den meisten übrigen Probanden in der Fovea centralis deutlich weniger Photonen detektiert wurden als im papillo-makulären Bündel. Auch bei den normalisierten zeitaufgelösten Fluoreszenzsignalen (Abb. 6.24B, C) gab es deutliche Unterschiede zwischen den Regionen und den spektralen Kanälen. Der steilste Abfall des Fluoreszenzsignals über die Zeit trat in der Fovea centralis im spektralen Kanal 1 auf, während der langsamste Abfall jeweils in der Papille auftrat. Bei ca. 2 ns (Abb. 6.24B) und ca. 6 ns (Abb. 6.24B, C) waren Artefakte durch Reflexionen an optisch wirksamen Flächen (z.B. optische Filter, die Oberfläche von optischen Fasern oder die Oberfläche eines Detektors) im Strahlengang des Fluoreszenzlichts erkennbar.

Tabelle 6.2 gibt die aus den Regionen extrahierten Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern und deren relativen Anteile für beide spektrale Kanäle, gemittelt über alle Messungen, an.

Tabelle 6.2 Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und relative Anteile (Q) für die drei untersuchten Regionen und beide spektrale Kanäle. Die angegebenen Zahlenwerte setzen sich aus Mittelwert \pm Standardabweichung über alle Messungen zusammen.

	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
	papillo-makuläres Bündel	Fovea centralis	Papille	papillo-makuläres Bündel	Fovea centralis	Papille
α_1 (%)	85,3 \pm 8,8	92,3 \pm 9,5	71,6 \pm 8,8	73,1 \pm 8,2	79,4 \pm 8,6	66,9 \pm 8,7
α_2 (%)	10,7 \pm 1,3	4,9 \pm 1,0	14,7 \pm 3,1	22,4 \pm 3,7	17,4 \pm 3,0	21,1 \pm 5,3
α_3 (%)	3,0 \pm 0,5	1,8 \pm 0,4	12,6 \pm 3,1	3,4 \pm 0,7	2,2 \pm 0,5	11,0 \pm 3,3
τ_1 (ps)	95,3 \pm 11,7	70,5 \pm 9,3	117,8 \pm 24,4	45,3 \pm 21,8	34,6 \pm 13,5	100,6 \pm 40,6
τ_2 (ps)	541,8 \pm 62,9	572,7 \pm 78,9	880,4 \pm 274,2	279,1 \pm 55,2	228,3 \pm 44,1	536,1 \pm 234,3
τ_3 (ps)	2219,0 \pm 297	2192,8 \pm 314	3150,5 \pm 628	1311,4 \pm 211	1125,2 \pm 182	1924,7 \pm 339
τ_m (ps)	211 \pm 27	137 \pm 19	561 \pm 159	152 \pm 30	101 \pm 25	354 \pm 104
Q_1 (%)	39,2 \pm 4,6	48,9 \pm 5,7	14,3 \pm 4,2	22,2 \pm 5,1	29,0 \pm 5,6	17,3 \pm 5,7
Q_2 (%)	28,0 \pm 3,6	20,7 \pm 3,4	20,8 \pm 4,7	44,6 \pm 5,6	43,4 \pm 5,5	27,6 \pm 6,3
Q_3 (%)	31,8 \pm 4,9	29,4 \pm 5,0	63,9 \pm 8,8	32,2 \pm 4,7	26,6 \pm 4,2	54,0 \pm 10,3

In Übereinstimmung mit Abb. 6.24 waren die kürzesten Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und die größten Amplituden α_1 in der Fovea centralis zu finden. Die relativen Anteile Q_3 dominierten die Papillen-Region mit 63,9% (spektraler Kanal 1) bzw. 54% (spektraler Kanal 2), was wahrscheinlich durch die fehlenden RPE-Zellen begründet ist. Generell waren die Fluoreszenzlebensdauern im spektralen Kanal 1 länger als im spektralen Kanal 2, was durch die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse (Abschnitt 2.2.3) sowie ggf. durch Fluoreszenz von Bindegewebe hervorgerufen wird, welche hauptsächlich im spektralen Kanal 1 wirksam sind.

Die über die Probanden gemittelten Variationskoeffizienten sind in Tabelle 6.3 aufgelistet und lagen zwischen 0,5% (Amplitude α_1 der Fovea centralis im spektralen Kanal 1) und 42,8% (Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im papillo-makulären Bündel im spektralen Kanal 2). Im Mittel war der Variationskoeffizient im spektralen Kanal 1 ($CV = 7,9\%$) geringer als im spektralen Kanal 2 ($CV = 17,7\%$, $p < 0,001$). Im Mittel waren die Variationskoeffizienten im papillo-makulären Bündel am kleinsten und in der Papille am größten.

Tabelle 6.3 Variationskoeffizient gemittelt über alle Probanden für Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und relative Anteile (Q) für die drei untersuchten Regionen und beide spektrale Kanäle. Die Zahlenwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
	papillo-makuläres Bündel	Fovea centralis	Papille	papillo-makuläres Bündel	Fovea centralis	Papille
α_1	0,7% \pm 0,2%	0,5% \pm 0,2%	3,2% \pm 1,7%	4,2% \pm 1,4%	3,0% \pm 0,8%	7,4% \pm 2,0%
α_2	4,7% \pm 0,8%	7,6% \pm 2,6%	9,3% \pm 3,5%	12,1% \pm 4,3%	12,1% \pm 3,5%	20,3% \pm 10,1%
α_3	9,3% \pm 4,4%	14,5% \pm 4,9%	12,1% \pm 4,1%	16,4% \pm 6,5%	16,6% \pm 6,2%	18,5% \pm 7,7%
τ_1	5,5% \pm 2,1%	6,8% \pm 2,0%	12,7% \pm 4,2%	42,8% \pm 9,3%	36,2% \pm 9,3%	33,5% \pm 10,5%
τ_2	4,7% \pm 0,9%	6,9% \pm 1,6%	20,2% \pm 8,1%	14,4% \pm 5,3%	15,5% \pm 4,5%	33,3% \pm 15,3%
τ_3	6,2% \pm 2,4%	6,1% \pm 2,1%	10,5% \pm 3,3%	10,3% \pm 4,4%	11,1% \pm 3,3%	10,6% \pm 4,1%
τ_m	5,1% \pm 2,2%	8,2% \pm 2,8%	13,5% \pm 6,9%	16,4% \pm 4,2%	21,5% \pm 4,9%	21,5% \pm 9,3%
Q_1	4,1% \pm 1,0%	4,7% \pm 1,8%	13,6% \pm 8,8%	18,5% \pm 5,7%	13,6% \pm 4,0%	29,2% \pm 5,0%
Q_2	5,2% \pm 3,2%	8,5% \pm 3,4%	16,3% \pm 7,7%	6,4% \pm 3,7%	6,3% \pm 2,7%	13,7% \pm 5,1%
Q_3	8,1% \pm 3,4%	11,4% \pm 3,5%	7,0% \pm 3,2%	7,9% \pm 6,3%	10,1% \pm 4,9%	12,2% \pm 5,8%

In Abb. 6.25 sind kombinierte Bland-Altman-Diagramme [134] für alle Amplituden (Abb. 6.25A) und Fluoreszenzlebensdauern (Abb. 6.25B) dargestellt. Die kombinierten Diagramme wurden durch Überlagerung der einzelnen Bland-Altman-Diagramme je Exponentialfunktion, Region und spektralem Kanal erzeugt. Dazu wurde von jedem Einzeldiagramm der Mittelwert abgezogen und das Diagramm auf die Standardabweichung normiert. Im Ergebnis lagen mehr als 95% der Werte zwischen $\pm 1,96$ Standardabweichungen. Abb. 6.25B enthält zusätzlich eine Regressionsgerade zur Approximation des linearen Zusammenhangs zwischen Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzlebensdauern (Anstieg 0,48; $R^2 = 0,23$; $p < 0,01$). Für die Amplituden wurde keine signifikante Regressionsgerade gefunden.

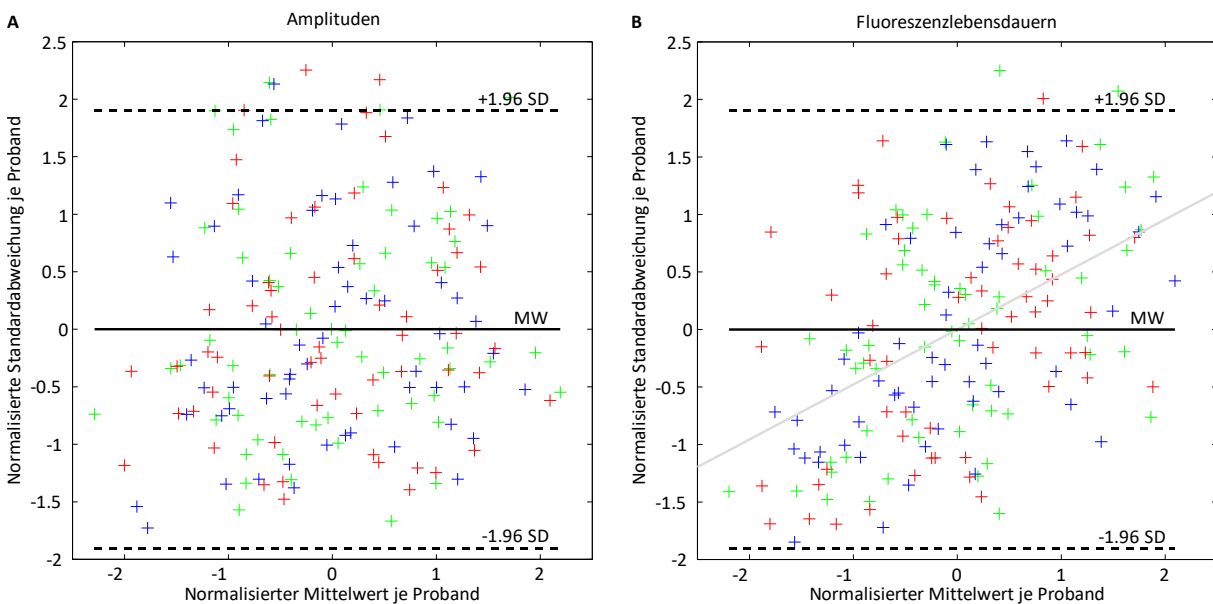


Abbildung 6.25 Kombinierte Bland-Altman-Diagramme für alle Amplituden (A) und Fluoreszenzlebensdauern (B). Jedes Diagramm enthält alle segmentierten Regionen (papillo-makuläres Bündel: rot, Fovea centralis: grün, Papille: blau) und beide spektrale Kanäle indem von den Einzeldiagrammen der Mittelwert abgezogen und es auf die Standardabweichung normiert wurde. (B) enthält außerdem eine Regressionsgerade (grau).

6.4.2 Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme

Tabelle 6.4 listet die Halbwertsbreiten der verwendeten IRFs für beide spektrale Kanäle auf. In allen FLIO-System und bei beiden Messverfahren waren die Halbwertsbreiten im spektralen Kanal 2 kleiner als im spektralen Kanal 1. Auch hatten die mit dem Farbstoff gemessenen IRFs stets größere Halbwertsbreiten als die in Reflexion gemessenen IRFs.

Tabelle 6.4 Halbwertsbreiten der verwendeten IRFs für beide spektrale Kanäle. Die Halbwertsbreiten der aus Küvette A extrahierten IRFs sind deutlich breiter als die der von Heidelberg Engineering GmbH in Reflexion gemessenen IRFs.

Standort	IRF Heidelberg Engineering GmbH		IRF aus Küvette A	
	Kanal 1	Kanal 2	Kanal 1	Kanal 2
Bern	104 ps	104 ps	165 ps	158 ps
Ilmenau	133 ps	115 ps	149 ps	146 ps
Jena	136 ps	109 ps	181 ps	164 ps
Lübeck	209 ps	173 ps	237 ps	200 ps

Die Fluoreszenzlebensdauern im spektralen Kanal 1 der untersuchten FLIO-Systeme sind für die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe in den Küvetten A bis E in Abb. 6.26 dargestellt. Große Unterschiede traten zwischen den verwendeten IRFs bei Küvetten A bis C bzw. Fluoreszenzlebensdauern ≤ 400 ps auf, da der Einfluss der IRF bei großen Fluoreszenzlebensdauern abnimmt. Die IRF der Heidelberg Engineering GmbH liefert bei allen FLIO-Systemen zwar nicht die korrekten Fluoreszenzlebensdauern (insbesondere bei Küvette B), die Werte waren aber über die Geräte ähnlich. Die aus Küvette A gewonnene IRF lieferte insbesondere für die Küvetten A und B über alle FLIO-Systeme Fluoreszenzlebensdauern, die näher am Referenzwert lagen. Die größte Abweichung vom Referenzwert von ca. 40% außerhalb von Küvette A trat beim Lübecker FLIO-System bei der Messung von Küvette E im spektralen Kanal 1 auf.

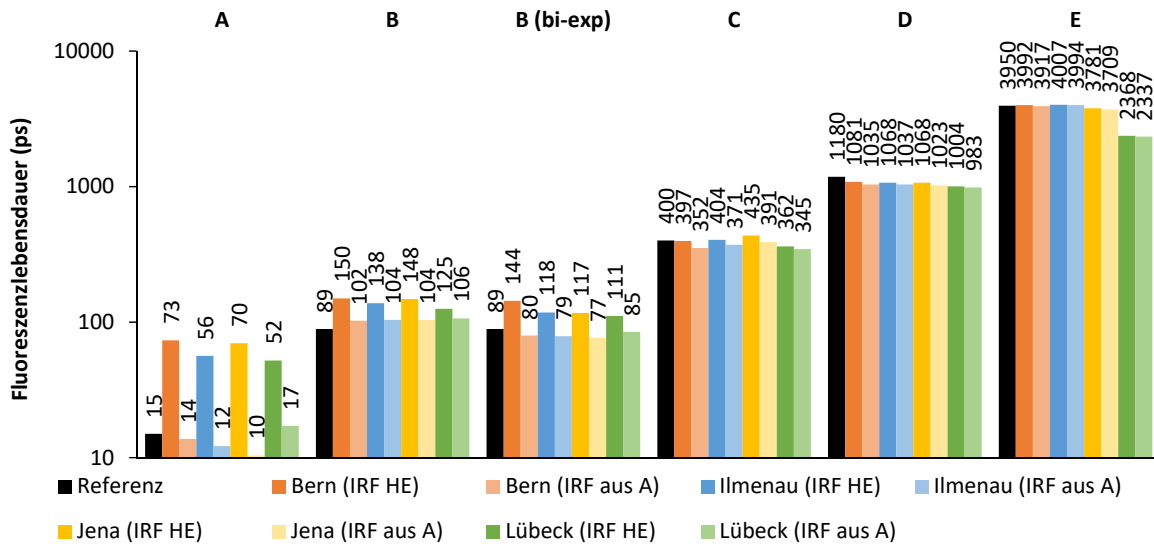


Abbildung 6.26 Fluoreszenzlebensdauern der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs im Vergleich zum Referenzwert für den spektralen Kanal 1. Von der bi-exponentiellen Fluoreszenzlebensdauerapproximation bei Küvette B ist nur die kurze Fluoreszenzlebensdauer angegeben.

Die Variabilität der jeweiligen Messungen selbst war gering (Variationskoeffizient zumeist deutlich unter 5%) und unter den FLIO-Systemen ähnlich (Abb. 6.27). Die bi-exponentielle Approximation von Küvette B verursachte wie erwartet eine höhere Variabilität als die mono-exponentielle Approximation, lieferte dafür aber Fluoreszenzlebensdauern, die näher am Referenzwert liegen.

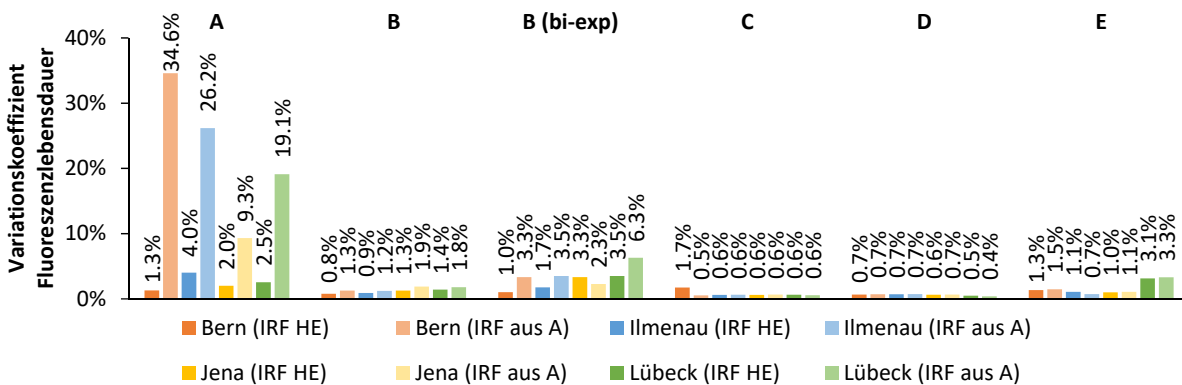


Abbildung 6.27 Variationskoeffizienten für die Messungen der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.

Die Abweichungen der Geräte untereinander waren meist kleiner als 10% (Abb. 6.28), insbesondere für die Fluoreszenzlebensdauern auf Basis der IRF aus Küvette A. Das FLIO-System in Lübeck mit IRF der Heidelberg Engineering GmbH zeigte größere Abweichungen zum FLIO-System in Bern als die FLIO-Systeme in Ilmenau und Jena.

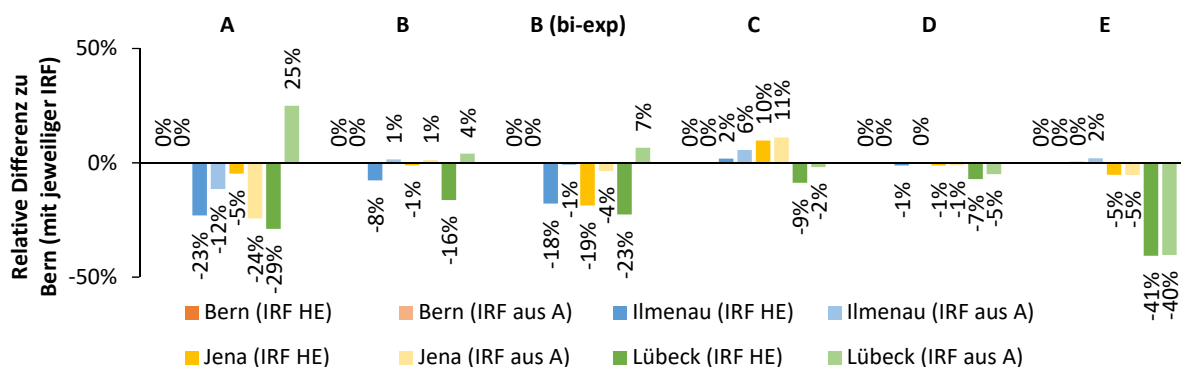


Abbildung 6.28 Relative Differenzen zum FLIO-System in Bern für die Messungen von der Küvetten A bis E von den drei übrigen FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.

In Anhang C sind die relativen Differenzen der FLIO-Standorte und für beide IRFs angegeben. Die Ergebnisse im spektralen Kanal 2 waren denen vom spektralen Kanal 1 sehr ähnlich und sind ebenfalls in Anhang C aufgeführt.

6.4.3 Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv

6.4.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Die aus dem Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv ermittelten Fluoreszenzlebensdauern sind analog zur Untersuchung der Wiederholbarkeit des Standardobjektivs (Abschnitt 6.4.1, Tabelle 6.1) in Tabelle 6.5 dargestellt. Es gab keine Auffälligkeiten zwischen den Wiederholungsmessungen. Wie schon beim Standardobjektiv, lieferte die bi-exponentielle Approximation bei Küvette B deutlich bessere Ergebnisse als die mono-exponentielle Approximation. Die Ergebnisse beider spektraler Kanäle waren sehr ähnlich. Für den Fluoreszenzfarbstoff mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 400 ps wurde in beiden spektralen Kanälen eine deutlich zu kurze Fluoreszenzlebensdauer berechnet. Der maximale Fehler betrug 16% bei Messung 2 von Küvette D im spektralen Kanal 2 (ausgenommen die mono-exponentielle Approximation von Küvette B). Es ist anzunehmen, dass die Referenzwerte für die Küvetten C und D etwas zu groß sind.

Tabelle 6.5 Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzlebensdauern von drei Wiederholungsmessungen mit dem Weitwinkelobjektiv (55°) für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (Küvetten A bis E). Die Referenzwerte sind angegeben. Die Unterschiede der Fluoreszenzlebensdauern zum Standardobjektiv (30°) sind minimal.

Küvette	Nr. exp. Fkt.	Referenz	Fluoreszenzlebensdauer (ps)					
			Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
			1	2	3	1	2	3
A	1	10	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
B	1	89	94,3 ± 2,4	93,5 ± 2,9	93,4 ± 1,8	159,3 ± 3,1	153,0 ± 4,4	150,8 ± 3,7
B	2	89	82,4 ± 3,2	81,7 ± 2,8	81,5 ± 2,6	84,7 ± 2,1	84,0 ± 2,9	83,6 ± 2,0
C	1	400	368,6 ± 4,0	367,7 ± 4,4	370,4 ± 4,2	363,8 ± 4,5	361,5 ± 4,3	364,1 ± 4,7
D	1	1180	1042,2 ± 7,3	1032,3 ± 8,7	1050,9 ± 9,2	1003,2 ± 8,8	995,4 ± 8,5	1020,6 ± 8,8
E	1	3950	3944,5 ± 26,2	3907,4 ± 33,8	3916,5 ± 34,8	3763,1 ± 39,5	3706,7 ± 41,9	3716,3 ± 40,9

Im Vergleich zum Standardobjektiv waren die Fluoreszenzlebensdauern beim Weitwinkelobjektiv geringfügig kürzer. Die Standardabweichungen des Weitwinkelobjektivs waren denen vom Standardobjektiv sehr ähnlich. Um dies zu verdeutlichen sind in Tabelle 6.6 die relativen Differenzen von Standard- und Weitwinkelobjektiv sowie deren Mittelwert aus den drei Wiederholungsmessungen angegeben.

Tabelle 6.6 Relative Unterschiede zwischen Standard- und Weitwinkelobjektiv anhand von fünf Fluoreszenzfarbstoffen (Küvetten A bis E) und 3 Wiederholungsmessungen. Mit Ausnahme der bi-exponentiellen Approximation von Küvette B im spektralen Kanal 2 liegen die Beträge der relativen Unterschiede stets unter 10%, häufig unter 5%.

Küvette	Nr. exp. Fkt.	Referenz	Differenz der mittleren Fluoreszenzlebensdauer zwischen 30° und 55° Objektiv							
			Spektraler Kanal 1				Spektraler Kanal 2			
			1	2	3	MW	1	2	3	MW
A	1	10	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	1,5%	2,1%	0,2%	1,3%
B	1	89	5,2%	5,2%	3,4%	4,6%	4,9%	5,0%	6,2%	5,4%
B	2	89	8,3%	9,2%	8,2%	8,6%	11,0%	11,4%	11,3%	11,2%
C	1	400	3,7%	3,6%	2,1%	3,1%	2,9%	3,3%	1,5%	2,6%
D	1	1180	1,5%	2,0%	0,1%	1,2%	2,8%	3,4%	0,7%	2,3%
E	1	3950	-0,8%	0,1%	-0,3%	-0,3%	-1,4%	-0,8%	-1,1%	-1,1%

Die relativen Unterschiede zwischen den Objektiven für die mono-exponentielle Modellierung lagen im Mittel bei $\leq 6\%$, für die bi-exponentielle Modellierung im Mittel bei $\leq 11\%$. Insgesamt waren die relativen Unterschiede im spektralen Kanal 2 größer als im spektralen Kanal 1. Es ist anzunehmen,

dass die, im Vergleich zu den anderen Küvetten, relativ großen Unterschiede zwischen den Objektiven bei Küvette B im Zusammenhang mit dem Fluoreszenzfarbstoff stehen.

Durch die geringen Unterschiede bei den Fluoreszenzlebensdauern im Vergleich zum Standardobjektiv sowie die gute Wiederholbarkeit der Messungen, erscheint das Weitwinkelobjektiv gut für FLIO-Messungen geeignet zu sein.

6.4.3.2 Probanden

Einige Ergebnisse zur Analyse des Weitwinkelobjekts wurden publiziert [135-137]. Zunächst wurde die Wiederholbarkeit der FLIO-Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv untersucht. In Abb. 6.29 sind beispielhaft drei Wiederholungsmessungen vom rechten Auge eines gesunden Probanden dargestellt. Durch das Augenlid bzw. die nicht geweitete Iris kam es zu Abschattungen im unteren Bildbereich und damit zu einer geringeren Anzahl an Photonen je Pixel. Dies führte zu Unsicherheiten in der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer, welche in Abb. 6.29 bei Messung 2 und 3 sichtbar sind.

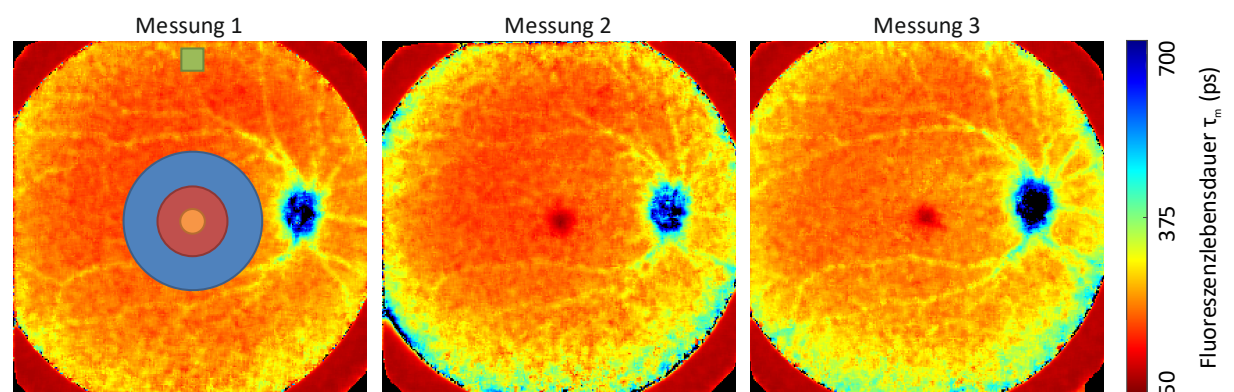


Abbildung 6.29 Mittlere Fluoreszenzlebensdauer im spektralen Kanal 1 aller drei Wiederholungsmessungen vom rechten Auge eines gesunden Probanden. Der äußere Ring (blau), der innere Ring (rot), die zentrale Region (orange) des ETDRS-Gitters sowie die superior Region (grün) sind in Messung 1 markiert. Die Farbskalierung ist zur besseren Vergleichbarkeit für alle drei Messungen identisch.

Mit Ausnahme einzelner Messungen in der superior Region im spektralen Kanal 1 waren, nach Shapiro-Wilk-Test, die mittleren Fluoreszenzlebensdauern der Wiederholungsmessung alle untersuchten Regionen normalverteilt (Tabelle A.2 in Anhang D). Mittels ANOVA mit Messwertwiederholung bzw. Friedman-Test für die nichtnormalverteilten Daten wurden für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m in allen untersuchten Regionen und je spektralem Kanal keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wiederholungsmessungen festgestellt (Signifikanzniveau 5%). Zwischen rechtem und linkem Auge wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die Verteilung der Variationskoeffizienten der mittleren Fluoreszenzlebensdauer aus drei Wiederholungsmessungen über die Probanden, aufgeteilt nach rechtem und linkem Auge sowie spektralem Kanal, ist in Abb. 6.30 dargestellt. Mit Ausnahme der zentralen Region des ETDRS-Gitters im rechten Auge waren die Variationskoeffizienten im Mittel über die Probanden kleiner als 5%. Der

spektrale Kanal 2 besaß geringere Variationskoeffizienten. Die Verteilung der Variationskoeffizienten war für die superior Region zumeist breiter als bei den anderen Regionen.

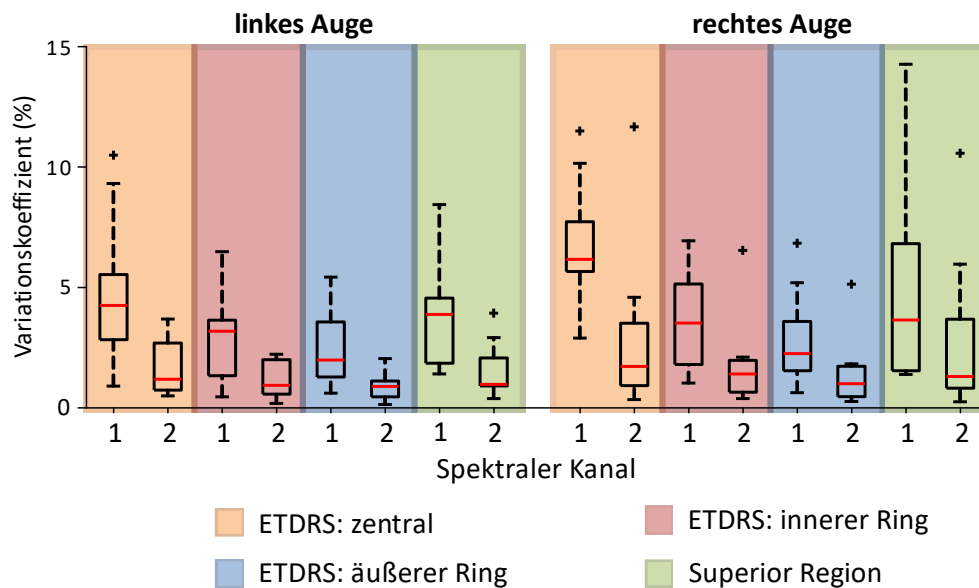


Abbildung 6.30 Verteilung der Variationskoeffizienten der mittleren Fluoreszenzlebensdauer aus drei Wiederholungsmessungen über die Probanden, aufgeteilt nach rechtem und linkem Auge sowie spektralem Kanal. Der Median ist als rote Linie angegeben. Die Verteilungen der Variationskoeffizienten sind im rechten Auge etwas breiter als im linken Auge. In beiden Augen treten die größten Variationskoeffizienten im spektralen Kanal 1 der zentralen Region des ETDRS-Gitters auf.

Zur statistischen Gegenüberstellung der beiden Objektive wurde auch für den betrachteten Bereich des Standardobjektivs die Normalverteilung geprüft werden, welche bis auf wenige Ausnahmen vorlag (Tabelle A.3 in Anhang D). Analog zum Weitwinkelobjektiv wurden die Daten vom Standardobjektiv mittels ANOVA mit Messwertwiederholung bzw. Friedman-Test für die nichtnormalverteilten Daten (Signifikanzniveau jeweils 5%) auf signifikanten Unterschiede zwischen den Wiederholungsmessungen in den mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m in allen betrachteten Regionen und je spektralem Kanal untersucht. Da zwischem rechten und linken Auge keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden, wurden die Messungen von beiden Augen der jeweiligen Objektiv als unabhängig betrachtet und in einer Gruppe zusammengefasst. Da die Wiederholungsmessungen nicht unabhängig voneinander sind und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wiederholungsmessungen festgestellt wurden, kamen die Daten von der jeweils ersten Messung beider Objektive für die weitere Verarbeitung zum Einsatz. Lag eine Normalverteilung vor, wurde mittels gepaartem t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Objektiven geprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Tabelle 6.7 listet die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzlebensdauern über die betrachteten Regionen sowie die p -Werte der statistischen Tests auf.

Tabelle 6.7 Mittelwerte \pm Standardabweichung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m der zentralen Region (C), des inneren Rings (IR) sowie des äußeren Rings (OR) des ETDRS-Gitters von Weitwinkelobjektiv (55°) und dem Standardobjektiv (30°) in beiden spektralen Kanälen von Messung 1. Zusätzlich sind die p -Werte nach gepaartem t-Test (kursiv) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angegeben. Die signifikanten Unterschiede ($\alpha = 5\%$) sind hervorgehoben.

Region	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer (ps), p -Wert					
	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
	30°	55°	p	30°	55°	p
C	76 \pm 13,3	96 \pm 19,9	< 0,005	125 \pm 14,2	126 \pm 10,2	<i>0,43</i>
IR	136 \pm 15,8	157 \pm 23,0	< 0,005	165 \pm 9,7	162 \pm 7,5	0,03
OR	158 \pm 15,5	179 \pm 21,9	< 0,005	183 \pm 10,5	179 \pm 8,5	< 0,005

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern waren bei den Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv im spektralen Kanal 1 in allen betrachteten Regionen ca. 20 ps länger als beim Standardobjektiv. Im spektralen Kanal 2 traten im inneren und äußeren Ring des ETDRS Gitters ebenfalls signifikante Unterschiede auf, jedoch waren die Differenzen der mittleren Fluoreszenzlebensdauern zwischen den Objektiven mit 3 ps bzw. 6 ps deutlich geringer. Auch im spektralen Kanal 2 waren die Fluoreszenzlebensdauern des Standardobjektivs länger als beim Weitwinkelobjektiv (innerer und äußerer Ring). In der zentralen Region des Gitters gab es im spektralen Kanal 2 keine signifikanten Unterschiede.

6.5 Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

6.5.1 Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse

Die durchschnittlichen Photonennraten je Pixel für alle drei Patienten sind in Abb. 6.31 dargestellt. Die Photonennraten waren über die Patienten recht ähnlich. Im Durchschnitt fluoreszierte die natürliche Augenlinse im spektralen Kanal 1 3,5x stärker als der Fundus (Messung nach Katarakt Operation) bzw. 2x stärker im spektralen Kanal 2. Nach der Operation stieg die Fundus-Fluoreszenz im Mittel um 20% (spektraler Kanal 1) bzw. um 44% (spektraler Kanal 2) an. Erstaunlicherweise waren die Photonennraten bei der Messung der natürlichen Augenlinse im spektralen Kanal 2 in allen Patienten größer als im spektralen Kanal 1. Nach Abschnitt 2.2.3 liegt das Maximum der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse im spektralen Kanal 1, daher wären dort die höchsten Photonennraten zu erwarten gewesen. Die höheren Photonennraten im spektralen Kanal 2 lassen sich möglicherweise durch dessen mehr als 2-fache spektrale Bandbreite (spektraler Kanal 1: ca. 62 nm, spektraler Kanal 2: ca. 160 nm; Abschnitt 3.1.2) sowie ggf. durch einen Detektor mit höherer Empfindlichkeit im

spektralen Kanal 2 erklären. Auch eine verstärkte Fluoreszenzanregung von Lipofuszin, welches hauptsächlich im spektralen Kanal 2 fluoresziert, könnte eine Ursache sein.

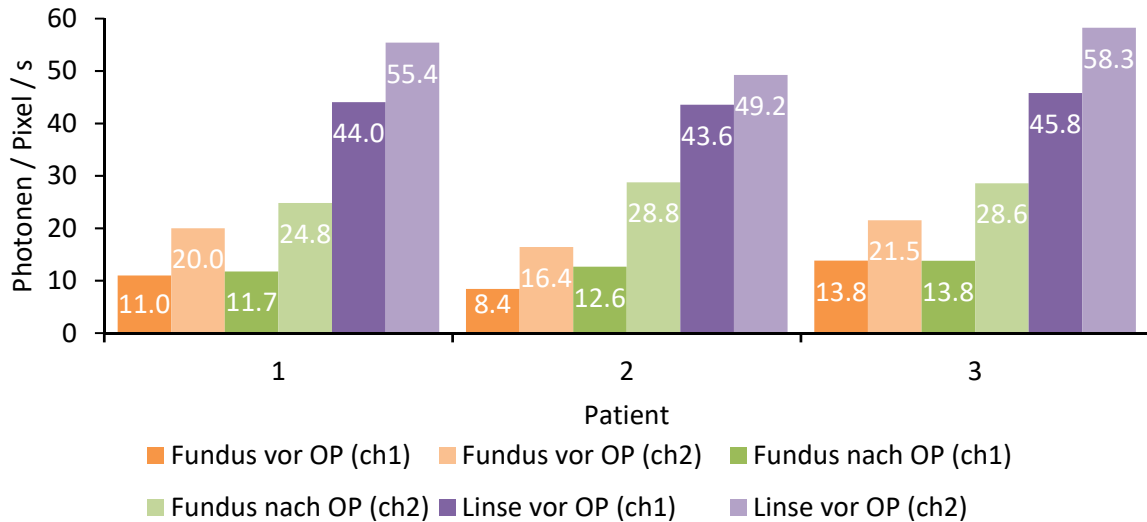


Abbildung 6.31 Durchschnittliche Photonennraten je Pixel vom Augenhintergrund vor (orange) und nach Katarakt Operation (grün) sowie für die separate Messung der Augenlinse vor der Operation (violett) von beiden spektralen Kanälen. Die höhere Photonennrate im spektralen Kanal 2 widerspricht der Annahme der stärkeren Fluoreszenz der Augenlinse im spektralen Kanal 1, aber lässt sich möglicherweise durch dessen > 2-fache spektrale Bandbreite im Vergleich zum spektralen Kanal 1 sowie ggf. durch einen Detektor mit höherer Empfindlichkeit erklären. Insbesondere im spektralen Kanal 2 sind die Photonennraten vom Fundus nach der Operation deutlich höher. Im spektralen Kanal 1 wird die fehlende Fluoreszenz der Augenlinse scheinbar durch eine erhöhte Fluoreszenz des Augenhintergrunds ausgeglichen.

Die Fluoreszenzintensitätsbilder vor und nach Katarakt Operation von Patient 3 sind in Abb. 6.32A und Abb. 6.32B dargestellt. Der verringerte Kontrast aufgrund der Fluoreszenz der Augenlinse in Abb. 6.32A ist deutlich erkennbar. Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern im spektralen Kanal 1 waren für alle Pixel des Augenhintergrunds nach der Katarakt Operation deutlich kürzer (Abb. 6.32D) als vor der Operation (Abb. 6.32C). Die Fluoreszenzlebensdauern nach der Operation waren frei vom Einfluss der natürlichen Augenlinse und sind daher als Referenz zu betrachten. Die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse stellt in diesem Fall ein deutliches Artefakt in den Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds dar.

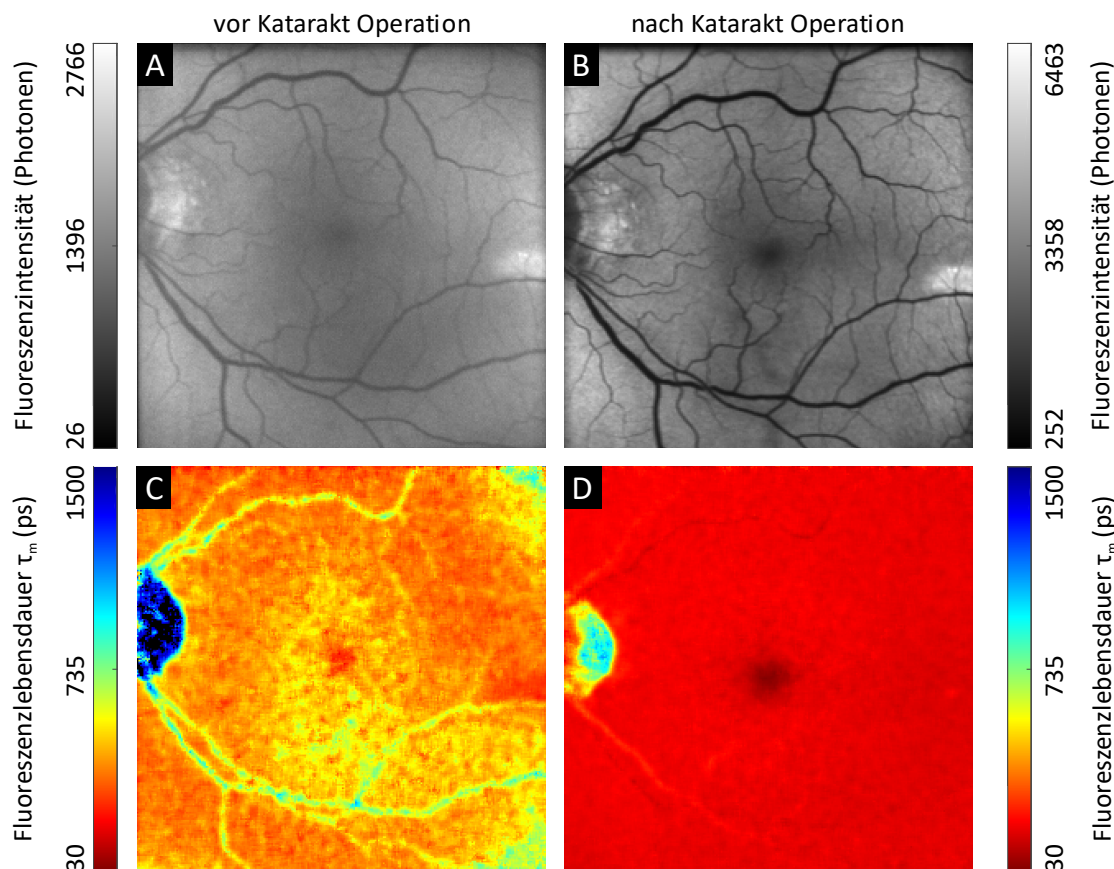


Abbildung 6.32 FLIO-Daten vom spektralen Kanal 1 vor (links) und nach (rechts) Katarakt Operation im linken Auge von Patient 3. Die Kontrastverbesserung im Fluoreszenzintensitätsbild nach der Operation (B) ist deutlich erkennbar. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer nach der Operation (D) ist deutlich kürzer als vor der Operation (C). Die Farbskalierung ist zum besseren Vergleich in (C) und (D) identisch.

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern vom inneren Rings des ETDRS-Gitters über die drei betrachteten Patienten sind in Abb. 6.33 angegeben. Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern nahmen von durchschnittlich 398 ps (spektraler Kanal 1) bzw. 306 ps (spektraler Kanal 2) zu 188 ps (spektraler Kanal 1) bzw. 261 ps (spektraler Kanal 2) deutlich ab. Der Einfluss der Fluoreszenz der Augenlinse auf die Fluoreszenzlebensdauer war, wie erwartet, im spektralen Kanal 1 stärker als im spektralen Kanal 2. Obwohl die mittlere Fluoreszenzlebensdauer vor Operation von Proband 2 kürzer war als bei den anderen beiden Probanden, erreichten alle Probanden nach der Operation ähnliche mittlere Fluoreszenzlebensdauern.

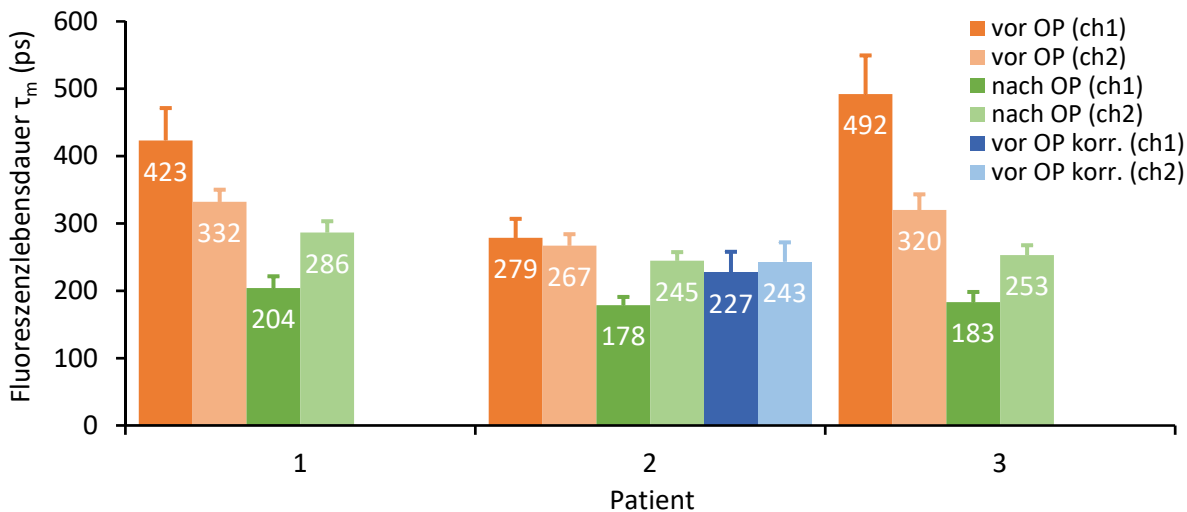


Abbildung 6.33 Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund (innerer Ring des ETDRS Gitters, Abschnitt 5.6.1) vor (orange), nach Katarakt Operation (grün) und nach Korrektur mit dem linsen-korrigierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.2, blau) von beiden spektralen Kanälen. Insbesondere im spektralen Kanal 1 verkürzen sich die mittleren Fluoreszenzlebensdauern nach der Katarakt Operation deutlich. Die Veränderung im spektralen Kanal 2 nach der Operation sind wie erwartet weniger stark ausgeprägt. Die Anwendung des linsen-korrigierten Ansatzes führt zu kürzeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern, welche allerdings noch deutlich länger als nach der Operation sind. Die Anwendung des linsen-korrigierten Ansatzes war aufgrund verwertbarer Daten nur für Patient 2 möglich.

Die Anwendung des linsen-korrigierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.2) auf die FLIO-Daten vor der Katarakt Operation von Patient 2 ergab für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer 227 ± 31 ps (spektraler Kanal 1) bzw. 243 ± 29 ps (spektraler Kanal 2). Die größten Unterschiede traten dabei jeweils bei Fluoreszenzlebensdauer τ_3 auf. Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern des linsen-korrigierten Ansatzes lagen damit zwischen den Werten von vor und nach der Operation.

6.5.2 Glukoseprovokation

Ergebnisse zur Glukoseprovokation bei FLIO wurden publiziert [138, 139]. Die Werte für den Blutzuckerspiegel sind in Abb. 6.34 für beide Probandengruppen angegeben. Wie zu erwarten, kam es durch die Einnahme von Glukose zu einem deutlichen Anstieg des Blutzuckerspiegels, welcher nach 30 Minuten das Maximum erreichte und nachfolgend wieder abfiel. Jedoch wurde nach den betrachteten 90 Minuten der Ursprungswert noch nicht wieder erreicht. Im Gegensatz dazu blieb der Blutzuckerspiegel der Kontrollgruppe über die Zeit bei ca. 5 mg/dl stabil und lag damit im Bereich der Provokationsgruppe vor Glukosegabe.

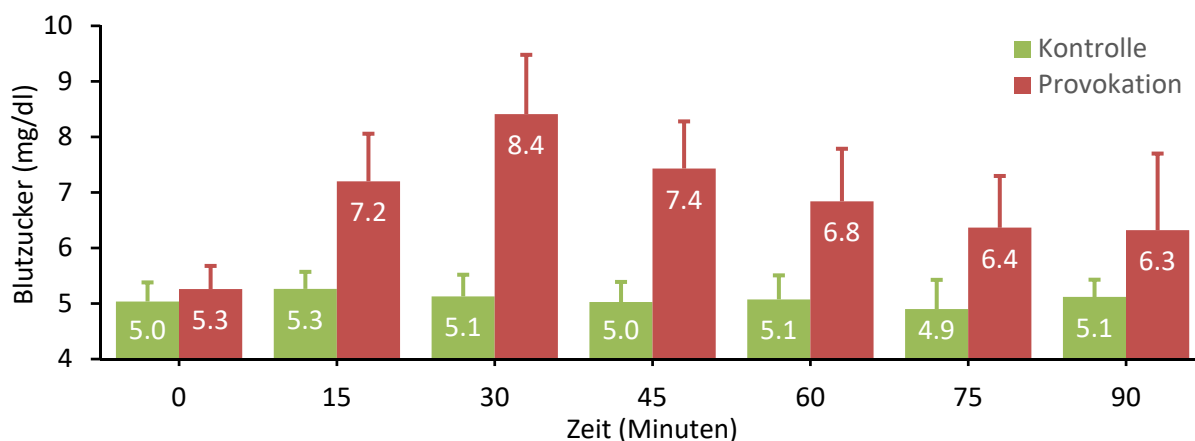


Abbildung 6.34 Mittelwert und Standardabweichung des Blutzuckerspiegels für die Probanden mit Glukoseprovokation (rot) und die Kontrollgruppe (grün).

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern vom inneren Ring des ETDRES-Gitters der Probanden unter Glukoseprovokation sowie der Kontrollgruppe sind für beide spektralen Kanäle in Abb. 6.35 dargestellt. Erkennbar ist ein Abfall der mittleren Fluoreszenzlebensdauer über die Zeit. Dieser war unter Glukoseprovokation mit ca. 10 ps nach 90 Minuten im spektralen Kanal 1 am stärksten ausgeprägt.

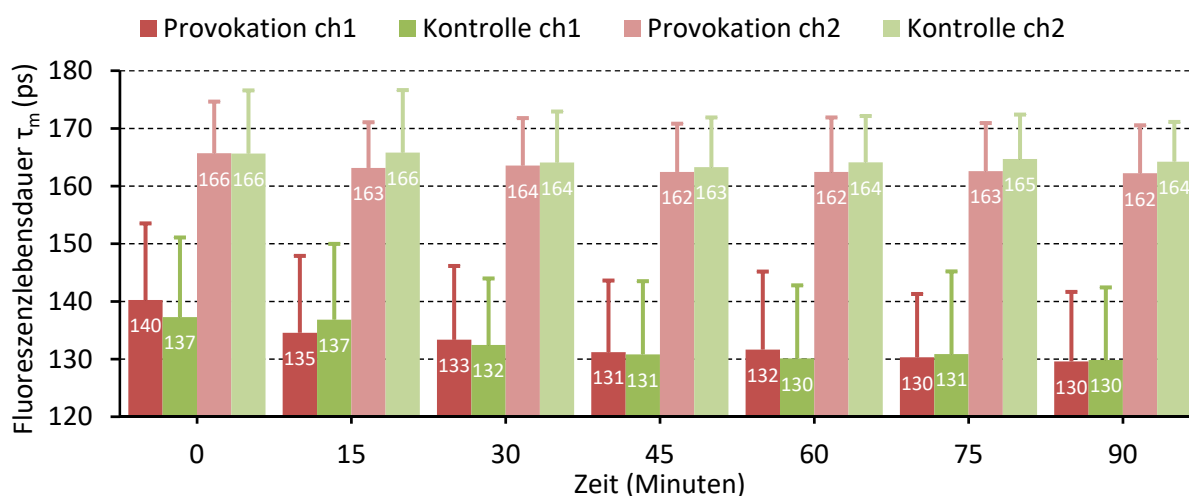


Abbildung 6.35 Mittelwert und Standardabweichung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer vom inneren Ring des ETDRES-Gitters für die Probanden unter Glukoseprovokation (rot) und die Kontrollgruppe (grün) in beiden spektralen Kanälen.

Bevor der Effekt der Glukoseprovokation statistisch untersucht werden konnte, mussten die Daten auf Normalverteilung geprüft werden. Die Analyse mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab, dass nur einige Messungen der Kontrollgruppe von der Normalverteilung abwichen (Tabelle A.4 in Anhang E).

Da der Test auf Sphärizität nach Mauchly für beide spektralen Kanäle der Gruppe unter Glukoseprovokation nicht signifikant war, wurde für diese Gruppe je spektralem Kanal eine ANOVA mit Messwertwiederholung berechnet. Die ANOVA mit Messwertwiederholung ergab, dass die mittlere Fluoreszenzlebensdauer unter Glukoseprovokation in beiden spektralen Kanälen signifikant ($p < 0,005$ in beiden spektralen Kanälen) vom Messzeitpunkt abhing. Die bonferronikorrigierten

paarweisen Post-Hoc Tests ergaben im spektralen Kanal 1 signifikante Unterschiede zwischen dem Messzeitpunkt bei 0 Minuten und den Messzeitpunkten von 45 Minuten bis 90 Minuten (jeweils $p < 0,05$). Im spektralen Kanal 2 gab es nur einen signifikanten Unterschied zwischen dem Messzeitpunkt bei 0 Minuten und den Messzeitpunkt bei 45 Minuten ($p < 0,05$).

Die beiden spektralen Kanäle der Kontrollgruppe wurden jeweils mit dem Friedman-Test analysiert. Im spektralen Kanal 1 wurde ein signifikanter Unterschied der mittleren Fluoreszenzlebensdauer über die Messzeitpunkte festgestellt ($p < 0,005$). Die bonferronikorrigierten paarweisen Post-Hoc Tests ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten bei 0 Minuten sowie 15 Minuten und den Messzeitpunkten bei 75 Minuten sowie 90 Minuten (jeweils $p < 0,05$). Im spektralen Kanal 2 der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Zusammenhang zwischen Messzeitpunkt und mittlerer Fluoreszenzlebensdauer nachgewiesen werden.

Obwohl die Normalverteilung für einige wenige Datensätze nicht gegeben war, wurde mangels Alternative trotzdem eine MANOVA über die FLIM-Parameter (Amplituden, Fluoreszenzlebensdauern und Q_s) vom inneren Ring des ETDRS-Gitters gerechnet. Als Faktoren wurden Glukoseprovokation, spektraler Kanal und Messzeitpunkt definiert. Die MANOVA ergab signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Glukoseprovokation und der Kontrollgruppe ($p < 0,005$) und den spektralen Kanälen ($p < 0,005$) sowie für die Interaktion zwischen Provokation und zwischen spektralem Kanal ($p < 0,005$), jedoch nicht für den Messzeitpunkt. Für die signifikanten Faktoren der MANOVA sind die dazugehörigen univariaten ANOVAs in Tabelle A.5 in Anhang E aufgelistet. Wie zu erwarten, unterschieden sich die beiden spektralen Kanäle in allen betrachteten FLIM-Parametern signifikant. Die Gruppe der Glukoseprovokation unterschied sich in den Fluoreszenzlebensdauern τ_2 und τ_3 signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Kombination aus Glukoseprovokation und spektralem Kanal führte allerdings bei keinem betrachteten FLIM-Parameter zu einem signifikanten Unterschied.

7 Diskussion

7.1 Softwarepaket FLIMX

7.1.1 Konzept und Implementierung

FLIMX ermöglicht die einfache Auswertung großer Probandenstudien und die Analyse komplexer Zusammenhänge auf Basis der Fluoreszenzlebensdauer und anderer FLIM-Parameter. FLIMX ist Open Source und dadurch für jeden frei zugänglich und erweiterbar. Die Implementierung in MATLAB setzt allerdings eine kostenpflichtige MATLAB Lizenz voraus. Freie Alternativen wie beispielsweise GNU Octave wurden nicht getestet. Die Implementierung in MATLAB resultiert in einer langsameren Ausführungsgeschwindigkeit als eine Implementierung in z.B. C++. Auf der anderen Seite ist die Entwicklung neuer Algorithmen in MATLAB deutlich schneller und eine Plattformunabhängigkeit sehr einfach zu erreichen. Insbesondere ersteres ist eines der Hauptziele von FLIMX und Begründung für die Wahl von MATLAB zur Implementation. Für die FLIMX Datenbank wurde kein bestehendes Datenbanksystem, wie z.B. MySQL, verwendet, sondern eine eigens dafür entwickelte dateibasierte Datenverwaltung. Dem erhöhten Implementierungsaufwand stehen geringere Abhängigkeiten von Drittsoftware sowie ein vergrößerter Funktionsumfang, wie beispielsweise, dass Daten erst eingelesen werden, wenn diese benötigt werden, und höhere Sicherheit im Fehlerfall gegenüber.

7.1.2 Verteilte Berechnung

Die verteilte Berechnung der Fluoreszenzlebensdauern mit Hilfe mehrerer Compute-Server funktioniert sehr robust, effizient und transparent für den Nutzer der FLIMX-Software. Die Erzeugung der Arbeitspakete ist nach aktuellem Stand noch nicht parallelisiert (Abb. 6.7) und begrenzt daher die Skalierbarkeit über eine größere Anzahl bzw. deutlich schnellere Compute-Server. Bei einer relativ einfachen Modellierung der Fluoreszenzlebensdauer, beispielsweise mit einem multi-exponentiellen Modell mit nur zwei Exponentialfunktionen, bearbeiteten die Compute-Server des BMTI die Arbeitspakete bereits schneller, als diese erzeugt werden konnten. Um diese Limitation zu umgehen, kann die Erzeugung der Arbeitspakete über mehrere CPU-Kerne parallelisiert werden, was aber aus Zeitgründen noch nicht umgesetzt wurde.

7.1.3 Vergleich mit anderen Softwarepaketen

Eines der ältesten Softwarepakete zur Analyse zeitaufgelöster Fluoreszenzsignale ist FluoFit [38], welches ebenfalls in MATLAB implementiert und frei verfügbar ist. Im Gegensatz zu FLIMX unterstützt FluoFit nicht die Verarbeitung ganzer TCSPC-Datensätze, sondern nur die multi-exponentielle Fluoreszenzlebensdauerapproximation eines einzelnen zeitaufgelösten Fluoreszenzsignals.

Vorverarbeitung wie beispielsweise Binning wird daher nicht unterstützt. Eine grafische Benutzeroberfläche bietet FluoFit ebenfalls nicht. Das Open-Source-Softwarepaket TIMP [37] ist in der offenen Softwareumgebung R [140] implementiert und ist für die Analyse von FLIM-Daten aus der Mikroskopie optimiert, beispielsweise für FRET-Experimente. Das TIMP-Softwarepaket kann für die spektrale globale Analyse (Abschnitt 3.4.4) auf Basis der multi-exponentiellen Fluoreszenzlebensdauerapproximation angewendet werden. Messdaten müssen für TIMP in ein kompatibles Format konvertiert werden. Eine graphische Benutzeroberfläche bietet TIMP nicht. Der TIMP-Anwender benötigt daher einige Kenntnisse in R um das Softwarepaket nutzen zu können. Die Open-Source-Software FLIMfit [40] ist für die schnelle Analyse von hunderten FLIM-Messungen, meist einzelner Zellen, mit oft sehr geringen Photonenzahlen je Pixel, optimiert. FLIMfit unterstützt durch die sehr effizienten Algorithmen in Bezug auf Rechenleistung und Speicherverbrauch die örtliche globale Analyse (Abschnitt 3.4.5). Im Gegensatz zu den FluoFit und TIMP kann FLIMfit direkt FLIM-Messdaten einlesen und besitzt eine grafische Benutzeroberfläche, was den Einstieg und die Anwendung von FLIMfit vereinfacht. Weiterhin können, wie auch bei FLIMX, ROIs manuell segmentiert werden. FLIMfit berechnet deskriptive Statistik auf Basis der berechneten Fluoreszenzlebensdauern je FLIM-Datensatz, bietet aber keine weiterführende statistische Auswertung an. Die kommerzielle Software SPCImage [39] unterstützt die multi-exponentielle Fluoreszenzlebensdauerapproximation eines FLIM-Datensatzes nutzfremdlich mittels einer grafische Benutzeroberfläche. Andere Möglichkeiten zur Modellierung der Fluoreszenzlebensdauer bietet SPCImage nicht. Mehrere FLIM-Datensätze können nicht gleichzeitig betrachtet werden. FLIMfit besitzt von den verfügbaren Softwarepaketen die größte Schnittmenge von Eigenschaften und Funktionen mit FLIMX, sowie eine schnelle Fluoreszenzlebensdauerapproximation. FLIMfit fehlt die Möglichkeiten synthetische FLIM-Daten zu generieren, adaptives Binning, die angepasste Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten wie (schichtbasierter sowie linsen-korrigierter Ansatz), die Verfahren zur Behandlung von Artefakten durch Reflexionen im Fluoreszenzsignal und Ausreißern, die Segmentierung mittels ETDRS-Gitter, die Verteilungstests für Fluoreszenzlebensdauern mehrerer Messungen und der paarweise Gruppenvergleich auf Basis von Probandengruppen (in FLIMX studies) und die Generierung von Untergruppen aus Zusatzinformationen.

7.2 Anwendungsbeispiele

In einem Anwendungsbeispiel konnte gezeigt werden, dass FLIMX' adaptives Binning den optimalen Kompromiss aus Ortsauflösung und Signalqualität darstellt. In den Bereichen des Augenhintergrunds mit niedriger Fluoreszenzintensität waren die Artefakte in der Fluoreszenzlebensdauer deutlich reduziert im Vergleich zu statischem Binning. Dem gegenüber stand ein erhöhter Bedarf an Rechenleistung des adaptiven Binnings von ca. Faktor 3 über dem statischen Binning. Obwohl bereits

einiger Aufwand in die Reduzierung der Berechnungszeiten beider Binning Verfahren geflossen ist, kann die aktuelle Implementierung des adaptiven Binnings bezüglich der Geschwindigkeit noch weiter optimiert werden. Im Gegensatz zu statischem Binning ist die benötigte Rechenzeit bei adaptivem Binning von den Messdaten abhängig, da es ein iteratives Verfahren ist und bei FLIO-Messungen mit wenigen Photonen je Pixel entsprechend mehr Pixel zusammengefasst werden müssen. Weiterhin sind die Auswirkungen von adaptivem Binning auf sehr kleine lokale Veränderungen, wie z.B. Drusen, nicht bekannt. Für Anwendungsfälle, bei denen eine möglichst hohe Ortsauflösung gefordert ist, muss daher untersucht werden, ob die Schwelle für die minimale Anzahl an Photonen je Pixel ggf. geringer angesetzt werden kann. Allgemein kann die Interpretation von Fluoreszenzlebensdauerbilder durch adaptives Binning erschwert werden, da die Ortsauflösung über das Bild variabel ist. In den typischen Anwendungsfällen dürften die Vorteile der stark reduzierten Fluoreszenzlebensdauerartefakte überwiegen.

Im zweiten Anwendungsbeispiel wurde die Fixierung der Zeitverschiebung bei der Modellierung betrachtet. War die Zeitverschiebung ein freier Modellparameter, kam es im Bereich der Fovea zu unplausiblen Werten für die Zeitverschiebung. Daher ist die Fixierung der Zeitverschiebung wichtig. Die Berechnung der Zeitverschiebung mit geringer Ortsauflösung hat einige Limitationen. Die lineare Interpolation zwischen den Gitterpunkten ist nur näherungsweise korrekt. Wurde an einem der Gitterpunkte eine Initiallösung berechnet, welche schlechte Modellparameter und damit eine ungenaue Zeitverschiebung liefert, so wird diese über einen großen Bildbereich zur Interpolation verwendet, was für diese Pixel zu Fehlern führt. Allerdings besteht auch bei der Variante mit der Fixierung der Zeitverschiebung aus einem zentralen Bildbereich dieses Risiko.

In einem weiteren Anwendungsbeispiel wurden die in FLIMX umgesetzten Ansätze zur Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale beispielhaft auf einen Datensatz vom Augenhintergrund angewandt. Alle Ansätze eigneten sich zur Modellierung von Messdaten des Augenhintergrunds, wobei teilweise deutliche Unterschiede in den bestimmten Fluoreszenzlebensdauern auftraten. Da die wahren Werte der Fluoreszenzlebensdauern unbekannt sind, ist eine Bewertung der Modellierungsansätze schwierig. Auch ist die Aussagekraft eines Einzelfalls stark eingeschränkt. Allerdings war die Bewertung der Modellierungsansätze nicht das Ziel des Anwendungsbeispiels und müsste anhand einer größeren Probandengruppe geschehen.

Die Fähigkeit von FLIMX Gruppen von Probanden bzw. Patienten zu verarbeiten wurde in einem vierten Anwendungsbeispiel vorgestellt. Im Ergebnis war es mittels FLIO möglich, Kontrollpersonen von Diabetes Patienten zu unterscheiden, die keine sichtbaren Veränderungen des Augenhintergrunds besaßen. Es ist anzunehmen, dass die Holm-Bonferroni-Methode nicht notwendig war, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Wahrscheinlich wäre

dies auch mittels t-Test bzw. Wilcoxon-Rangsummentest möglich gewesen. Im Gegensatz dazu liefert die Holm-Bonferroni-Methode neben der Aussage des signifikanten Unterschieds auch den Zahlenwert der Fluoreszenzlebensdauer (bzw. die Histogrammklasse), wo der größte Unterschied zwischen zwei Gruppen auftritt. Von Schweitzer et al. [31] wurde anhand einer ähnlichen Datenbasis und identischem statistischem Vorgehen die beste Unterscheidung bei Fluoreszenzlebensdauer τ_2 im spektralen Kanal 1 gefunden, während in dieser Arbeit der größte Unterschied bei Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im spektralen Kanal 2 aufgetreten sind. Der Unterschied lässt sich möglicherweise durch eine leicht differierende Patientenauswahl sowie durch die Verwendung von SPCImage zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern bei Schweitzer et al. erklären.

Die gesamte Kette der Vorverarbeitung und Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern, automatisiert für alle Probanden bzw. Patienten mittels FLIMX's Batch Job Manager (Abschnitt 6.1.1), die Definition der ROIs sowie die komplette statistische Auswertung und Visualisierung bietet keine andere verfügbare Software in einem Paket. Da sämtliche Daten in FLIMX automatisch gespeichert werden, sind die Ergebnisse dokumentiert und jederzeit nachvollziehbar. Dies stellt eine erhebliche Erleichterung der Auswertung von FLIO-Studien mit großen Probandengruppen dar bzw. macht dies erst praktikabel umsetzbar.

Darüber hinaus wurde mit FLIMX in der FLIM-Mikroskopie der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf den Energiestoffwechsel von Müllerzellen untersucht und publiziert [141].

7.3 Analyse des schichtbasierten Ansatzes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Wirksamkeit des schichtbasierten Ansatzes von Schweitzer et al. [102] (Abschnitt 5.2.1) durch Simulationen und experimentelle Messungen belegt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der aktuellen FLIO-Technik Schichtabstände von ≥ 25 ps separiert werden können. Die Untersuchungen an zwei und drei fluoreszierenden Schichten haben auch gezeigt, dass die Schichtauflösung stark von den verwendeten Fluoreszenzlebensdauern und deren relativen Amplituden abhängt. So konnte belegt werden, dass mittels schichtbasiertem Ansatz das Fluoreszenzsignal der Retina von dem vom Fluoreszenzsignal der natürlichen Linse separiert werden kann. Allerdings führt die Anwendung des schichtbasierten Ansatzes nicht zu einer verbesserten Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern am menschlichen Auge mit natürlicher Augenlinse, da der zusätzliche Modellierungsparameter für den Schichtabstand die Unsicherheiten aller freien Parameter erhöht. Bei langen Fluoreszenzlebensdauern und kleinen relativen Anteilen Q_2 und Q_3 sind die entsprechenden Amplituden kleiner und dadurch störanfälliger. Darüber hinaus sinkt der Fehlereinfluss der Verschiebung je größer die Fluoreszenzlebensdauer der verschobenen Schicht ist. Im Gegenzug liefert der zusätzliche Parameter des schichtbasierten Ansatzes Informationen über den Abstand zwischen Retina und natürlicher Augenlinse. Es wird daher nicht empfohlen FLIO-Daten

mittels schichtbasiertem Ansatz zu modellieren. Möglicherweise kann die erhöhte Unsicherheit des schichtbasierten Ansatzes durch eine Weiterentwicklung des Algorithmus reduziert werden. Die im Idealfall erreichte Schichtauflösung von 25 ps reicht bei weitem nicht aus, um einzelne Retinaschichten zu separieren. Dazu müsste die Zeitauflösung des FLIO-Systems erheblich gesteigert werden. Ansätze dazu wurden bereits erforscht [142, 143]. Im Ergebnis scheint eine axiale Auflösung fluoreszierender Schichten von etwa 100 μm möglich zu sein.

Allgemein wird der Vergleich zwischen schichtbasiertem Ansatz und multi-exponentiellem Ansatz stark durch die verwendeten Minimierungsalgorithmen, deren Parameter sowie die gewählte Minimierungsstrategie beeinflusst. Da die Initialisierung einen stochastischen Algorithmus (Differential Evolution) verwendet, kann möglicherweise eine suboptimale Initiallösung bestimmt werden. In der Folge sind die darauf basierenden Simulationsergebnisse wahrscheinlich ebenfalls fehlerbehaftet, je nachdem wie gut der nachgeschaltete deterministische Minimierungsalgorithmus dies ausgleichen kann. Eine erhöhte Komplexität des Modells erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine schlechte Initiallösung. Da die Parameter für die Minimierungsalgorithmen für beide Modellierungsansätze aufgrund der besseren Vergleichbarkeit identisch sind, ist der schichtbasierte Ansatz hier potentiell im Nachteil.

Die experimentellen Messungen bestätigten die Simulationen und damit den praktischen Nutzen des Schichtmodells. Aus Zeitgründen konnten nicht mehr Simulationen experimentell überprüft werden. Der entwickelte Küvettenhalter hat sich als gut geeignet herausgestellt und kann auch für zukünftige derartige Experimente verwendet werden.

7.4 Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

7.4.1 Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit der FLIO-Technik wurde anhand von Messungen an Farbstoffen und Probanden gezeigt. Die Wiederholbarkeit der Probandenmessungen wurde detaillierter, nach einem anderen Paradigma sowie mit FLIO-Prototyp 1 durchgeführt, als die Wiederholbarkeit des Weitwinkelobjektivs. Eine weitere Einschränkung der Vergleichbarkeit ist die Verwendung der kommerziellen Software SPImage für die Fluoreszenzlebensdauerapproximation der Probandenmessungen für die Untersuchung der Wiederholbarkeit mit dem Standardobjektiv, da dies mit FLIMX zum Zeitpunkt der Studie noch nicht möglich war. Sämtliche übrige FLIO-Messungen wurden mit FLIMX analysiert. Die errechneten Variationskoeffizienten waren in den Probandenmessungen beim Standardobjektiv generell deutlich größer als beim Weitwinkelobjektiv. Allerdings waren die Probandenmessungen beider Objektive aufgrund unterschiedlich definierter ROIs nicht direkt vergleichbar. Zwei Regionen

sollten zumindest ähnlich gewesen sein: die zentrale Region des ETDRS-Gitters entsprach in etwa der Fovea-Region und der äußere Ring des ETDRS-Gitters entsprach von der Position her grob der papillomakulären Bündel Region. Auch im paarweisen Vergleich dieser beiden Regionen waren die Variationskoeffizienten des Standardobjektivs in beiden spektralen Kanälen deutlich größer. Dies kann durch das ältere FLIO-System sowie die für die Studiauswertung verwendete und inzwischen stark überholte Software zur Fluoreszenzlebensdauerapproximation begründet sein.

7.4.2 Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme

Anhand von fünf Fluoreszenzfarbstoffen wurden vier FLIO-Systeme auf Basis des FLIO-Prototyps 2 (Abschnitt 3.1.2) an unterschiedlichen Standorten verglichen. Dieselben Proben wurden innerhalb eines kurzen Zeitraums vermessen. Einen Einfluss durch Probanden auf den Vergleich gab es daher nicht. Selbst der Einfluss unterschiedlicher Bediener war durch das definierte strikte Messprotokoll minimiert. Die Untersuchung stellte Idealbedingen für die FLIO-Messung dar. Trotzdem waren die Abweichungen zwischen den FLIO-Systemen recht groß, insbesondere unter Verwendung der von der Heidelberg Engineering GmbH bereitgestellten IRFs. Die Vergleichbarkeit der FLIO-Systeme nimmt noch weiter ab, wenn nicht alle Standorte dasselbe Messprinzip für die IRF verwenden, wie in der Praxis leider im Moment der Fall. In der Folge muss bei FLIO-Messungen von einer Unsicherheit der absoluten Fluoreszenzlebensdauern von circa 10% ausgegangen werden. Das Lübecker FLIO-System stach schon bei der IRF-Messung mit den größten Halbwertsbreiten aus den anderen Systemen heraus, welche ca. 60-80 ps länger waren als bei den anderen FLIO-Systemen. Ursachen dafür könnten beispielsweise eine größere Halbwertsbreite des Anregungslasers oder Dispersion in einer optischen Faser sein. Obwohl sich die Halbwertsbreite der IRF des Lübecker FLIO-Systems von den anderen FLIO-Systemen deutlich unterschied, waren die Abweichungen bei den Farbstoffen mit einer Fluoreszenzlebensdauer < 4000 ps gering. Die Ursache für die großen Abweichungen des FLIO-Systems in Lübeck bei einer Fluoreszenzlebensdauer um 4000 ps, welche weitgehend unabhängig von der IRF waren, da die Faltung hier kaum noch einen Einfluss auf die Signalform hatte, konnte nicht geklärt werden.

7.4.3 Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv

Bei den Messungen an den Fluoreszenzfarbstoffen traten wiederholbar keine signifikanten Unterschiede zwischen Standard- und Weitwinkelobjektiv auf. Analog zum Standardobjektiv traten auch beim Weitwinkelobjektiv keine signifikanten Unterschiede zwischen rechtem und linkem Auge bei der verwendeten Probandengruppe (junge Gesunde) auf. Dysli et al. [64] haben zwischen rechtem und linkem Auge Korrelationskoeffizienten (Spearman) von 0,52 (spektraler Kanal 1) und 0,72 (spektraler Kanal 2) in einer Gruppe von 31 gesunder Probanden (Alter 22 bis 61) für das Standardobjektiv gefunden. Die relativ geringen Korrelationskoeffizienten lassen vermuten, dass die

altersbedingten Veränderungen nicht simultan verlaufen. Die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzlebensdauern dieser Arbeit mit denen von Dysli et al. ist begrenzt, da zur Approximation der Fluoreszenzlebensdauer bei Dysli et al. nur zwei statt der sonst üblichen drei Exponentialfunktionen verwendet wurden. Überraschenderweise traten signifikante Unterschiede zwischen den Objektiven bei den Probandenmessungen auf. Da die Unterschiede in Ausprägung und Häufigkeit im spektralen Kanal 1 am stärksten waren, könnte die Ursache in der Fluoreszenz der Augenlinse liegen. Möglicherweise erfasste das Weitwinkelobjektiv durch einen größeren Öffnungswinkel mehr Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse in Relation zur Fluoreszenz der Retina, verglichen mit dem Standardobjektiv. Diese These ließ sich mangels Zugänglichkeit der Optikdesigns beider Objektive leider nicht überprüfen. Aus den Probandenmessungen dieser Arbeit folgt, dass die Absolutwerte der Fluoreszenzlebensdauern von FLIO-Messungen an Probanden der beiden Objektive nicht verglichen werden können. Auch lässt sich daraus ableiten, dass quantitative Vergleiche der Fluoreszenzintensität zwischen den Objektiven ebenfalls fehlerbehaftet sind müssen.

7.5 Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode

7.5.1 Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse

Da sowohl bei den FLIMX Anwendungsbeispielen als auch beim Vergleich vom Standard- mit dem Weitwinkelobjektiv die natürliche Augenlinse im Verdacht stand, die Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund zu beeinflussen, wurde die Wirkung der Augenlinse auf die Fluoreszenzsignale vom Augenhintergrund anhand einer Patientengruppe untersucht. Im Ergebnis wurden vor und nach Katarakt-Operation erhebliche Unterschiede in den Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund in beiden spektralen Kanälen, aber insbesondere im spektralen Kanal 1, festgestellt. Die durchschnittlichen Photonennraten je Sekunde stiegen in allen Patienten nach der Katarakt-Operation an, insbesondere im spektralen Kanal 2. Der Einfluss der natürlichen Augenlinse auf die Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund war deutlich erkennbar. Für korrekte Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund, auch zwischen Probanden mit unterschiedlich stark fluoreszierenden Augenlinsen, muss daher die Fluoreszenz der Augenlinse zwingend unterdrückt werden. Eine Möglichkeit dazu ist der in dieser Arbeit vorgestellte linsen-korrigierte Ansatz. Dieser ist in der Lage den Einfluss der Augenlinse zu reduzieren, wenn eine verwertbare zusätzliche Messung der Augenlinse vorliegt. Der Ansatz bedarf weiterer Messdaten zur Validierung, da die Wirksamkeit nur an einem Patienten gezeigt werden konnte.

Da der linsen-korrigierte Ansatz durch die zusätzlichen Messungen eine erhöhte Belastung für den Patienten darstellt und die im Vergleich zum multi-exponentiellen Modell deutlich komplexere

Modellierung die Unsicherheiten in der Fluoreszenzlebensdauerapproximation erhöht, wurde ein Ansatz zur gerätetechnischen Unterdrückung der Fluoreszenz der Augenlinse untersucht [144]. Bei diesem Ansatz wurde einer Ringblende in den Detektionsstrahlengang eingefügt. Im Modellauge konnte bei einer geschätzten Verdopplung der Messdauer, die Fluoreszenz der modellierten Augenlinse um circa 90% reduziert werden.

7.5.2 Glukoseprovokation

Mittels oralem Glukosetoleranztest wurde anhand einer Probandengruppe der Einfluss des Blutzuckerspiegels auf die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds untersucht. Zwischen der Gruppe mit Glukoseprovokation und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es gab keine Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des Augenhintergrunds vom Blutzuckerspiegel. Die Ernährung eines Probanden / Patienten unmittelbar vor einer FLIO-Messung ist daher scheinbar bedeutungslos. Dies vereinfacht die klinische Anwendbarkeit von FLIO erheblich. Es ist anzunehmen, dass mit FLIO keine kurzfristigen Änderungen des Zellstoffwechsels detektierbar sind, sondern eher kumulative Effekte, wie im Anwendungsbeispiel (Abschnitt 5.7.5). Bei der Auswertung der Studiendaten zeigte sich allerdings zwischen erster und letzter Messung eine signifikante Verringerung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern um 7-10 ps im spektralen Kanal 1, sowohl bei der Gruppe mit Glukoseprovokation als auch bei der Kontrollgruppe. Die Ursache dafür konnte im Rahmen der Arbeit nicht bestimmt werden. Evtl. war dies ein Ausbleicheffekt eines oder mehrerer Fluorophore im Auge. Die Fluoreszenzbleichung einer Hauptkomponente von Lipofuszin wurde *in vitro* mit Regenerationszeiten im Bereich von einigen Stunden bis Tagen beschrieben [145]. Im menschlichen Auge wurde dieser Effekt bisher noch nicht nachgewiesen. Eine Bleichung des Sehpigments in den Rezeptoren dürfte aufgrund der relativ langen Pausen von ca. 10 Minuten zwischen den Messungen keinen signifikanten Einfluss gehabt haben, da die Dauer der Pausen ausreichend lang war, um einen Großteil des Sehpigment zu regenerieren [146, 147].

8 Zusammenfassung und Ausblick

FLIO ist neues *in vivo* Verfahren auf Basis der Fluoreszenzlebensdauer endogener Fluorophore des Augenhintergrundes mit dem Ziel der Früherkennung von Augenkrankheiten sowie der Grundlagenforschung pathologischer Zusammenhänge in Stoffwechselerkrankungen. Die bisherigen Verfahren zur Approximation der Fluoreszenzlebensdauer aus den Autofluoreszenzabfällen stammen aus der Fluoreszenzmikroskopie und sind daher nicht an die speziellen Bedingungen der *in vivo* Messungen am menschlichen Auge angepasst. Aufgrund der relativ großen Anzahl von Fluorophoren am Augenhintergrund und deren Bindung an teilweise unterschiedliche Proteine ist die Fluoreszenzlebensdauerapproximation mit Unsicherheiten behaftet. Der störende Einfluss der Fluoreszenz von Cornea und natürlicher Augenlinse sowie die schwierigen Bedingungen der *in vivo* Messung am beweglichen Auge rufen diverse Artefakte in den Messdaten und dadurch auch in den Fluoreszenzlebensdauern hervor. Daher war ein Ziel der Arbeit die Modellierung und Approximation der Fluoreszenzlebensdauern auf die Bedingungen der Messungen am menschlichen Augen zu erweitern sowie auftretende Artefakte zu behandeln. Ein weiteres Ziel war die Evaluierung und Quantifizierung von bisher unbekanntem technischen und physiologischen Einflussfaktoren auf die FLIO-Methode. Im Rahmen der Arbeit wurden folgende wissenschaftliche Beiträge erarbeitet:

- **Modellierung des Augenhintergrunds als dreidimensionale Oberfläche:**

Im Gegensatz zur Mikroskopie wurde für die Modellierung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten des gemessenen Bildausschnitts am Augenhintergrund keine zweidimensionale Ebene betrachtet, sondern die Modellierung als eine dreidimensionale Oberfläche eingeführt, was die Genauigkeit bei der Bestimmung kurzer Fluoreszenzlebensdauern erheblich verbessert. Um die dadurch gestiegene Modellkomplexität zu reduzieren, wurde ein Ansatz auf Basis einer Initialisierung mit geringer Ortsauflösung vorgeschlagen.

- **Charakterisierung der Grenzen und Möglichkeiten eines Ansatzes zur Bestimmung von Abständen fluoreszierender Schichten:**

Um die störende Fluoreszenz von Cornea und Augenlinse bei Messung der Fluoreszenz des Augenhintergrundes zu berücksichtigen, wurde von Schweitzer et al. ein Ansatz zur Modellierung entwickelt. Dieser wurde in dieser Arbeit erstmals durch aufwendige Simulationen und experimentelle Messungen untersucht. Leider zeigte sich, dass der Ansatz die Genauigkeit der Fluoreszenzlebensdauerapproximation am simulierten Augenhintergrund aufgrund der erhöhten Modellkomplexität nicht verbessern kann. Der Ansatz liefert aber zusätzlich zur Fluoreszenzlebensdauer Informationen zum Abstand der Augenlinse von der Retina.

- **Einbeziehung der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse in die Modellierung der FLIO-Daten:**

Der linsen-korrigierte Ansatz berücksichtigt das separat gemessene Fluoreszenzsignal der Augenlinse in der Modellierung. An einem Patienten mit einer Katarakt-Operation konnte im Vergleich vor und nach der Operation gezeigt werden, dass dieser Ansatz Fluoreszenzlebensdauern liefert, die deutlich näher an den Zahlenwerten ohne Fluoreszenz der Augenlinse liegen, als die bisherige Modellierung.
- **Speziell angepasste Algorithmen zur Behandlung von Artefakten in FLIO-Daten:**

Die entwickelten Algorithmen behandeln Artefakte, die durch Reflexionen im Strahlengang oder durch eine inhomogene Fluoreszenzverteilung entstehen. Weiterhin wurde ein Algorithmus entwickelt, der zuverlässig einzelne Pixel detektiert und korrigiert, bei denen die Fluoreszenzlebensdauerapproximation, z.B. aufgrund eines zu geringen SNR, keine gute Lösung gefunden und damit zu fehlerhaften Fluoreszenzlebensdauern geführt hat.
- **Untersuchung ausgewählter technischer Einflussfaktoren der FLIO-Methode:**

Die Wiederholbarkeit der FLIO-Technik wurde sowohl an Farbstoffen als auch an Probanden gezeigt. Ebenso liefern FLIO-Systeme an verschiedenen Standorten weitgehend vergleichbare Daten. Bei der Fluoreszenzlebensdauerapproximation wurde eine starke Abhängigkeit von der verwendeten IRF für kurze Fluoreszenzlebensdauern (< 400 ps) festgestellt. An allen FLIO-Standorten muss daher eine IRF nach demselben Messprinzip verwendet werden. Weiterhin wurde die Tauglichkeit eines Weitwinkelobjektivs für die FLIO-Methode untersucht. An Farbstoffen liefern Standard- und Weitwinkelobjektiv vergleichbare Fluoreszenzlebensdauern. Bei Probandenmessungen unterscheiden sich beide Objektive jedoch signifikant, insbesondere im spektralen Kanal 1. Nach aktuellem Stand sollten daher Fluoreszenzlebensdauern des Weitwinkelobjektivs nicht mit denen des Standardobjektivs verglichen / kombiniert werden.
- **Untersuchung ausgewählter physiologischer Einflussfaktoren der FLIO-Methode:**

Der Einfluss der natürlichen Augenlinse wurde anhand von drei Patienten belegt, deren natürliche Augenlinse durch eine nichtfluoreszierende künstliche Linse ersetzt wurde. Da die Augenlinse nicht primär aufgrund von Katarakt ersetzt wurde, waren auch vor der Operation qualitativ gute FLIO-Messungen der Retina möglich. Durch den Vergleich mit FLIO-Messungen nach der Operation wurde der Einfluss der natürlichen Augenlinse auf die mittlere Fluoreszenzlebensdauer quantifiziert (Reduzierung um 92 ps im spektralen Kanal 1 bzw. 45 ps im spektralen Kanal 2). Des Weiteren wurde der Einfluss des Blutzuckerspiegels auf die FLIO-Messung untersucht und kein signifikanter Zusammenhang zwischen Blutzuckerspiegel und Fluoreszenzlebensdauer festgestellt. Allerdings wurde eine signifikante Reduktion der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von 7-10 ps im spektralen Kanal 1 über die Studiendauer von ca. 90 Minuten gefunden, deren Ursache noch ungeklärt ist.

Die neu entwickelten Modelle und Algorithmen wurden neben den bekannten Fluoreszenzlebensdauermodellen im FLIMX-Softwarepaket umgesetzt. Darüber hinaus bietet FLIMX vielfältige Möglichkeiten zur Visualisierung von Messdaten und Fluoreszenzlebensdauern, deskriptive Statistik sowie statistische Methoden zum Gruppenvergleich auf Basis der Fluoreszenzlebensdauer, als auch zur Simulation zeitaufgelöster Fluoreszenzsignale. Der Open-Source-Charakter von FLIMX bietet den freien Zugang für potentielle Benutzer sowie die Möglichkeit zur Anpassung an spezifische Anforderungen.

Auf Basis des dargelegten Bearbeitungsstands zur FLIO-Datenanalyse mittels FLIMX sowie zur Analyse technischer und physiologischer Einflussfaktoren der FLIO-Methode ergeben sich einige weiterführende Arbeiten.

Zweifelsfrei gibt es bei FLIMX noch Potential für Erweiterungen der Datenanalysealgorithmen sowie für Verbesserungen bei der Nutzerfreundlichkeit, dem effizienteren Umgang mit Ressourcen und der Performance, besonders bei der Approximation der Fluoreszenzlebensdauern. Die Fluoreszenzlebensdauerapproximation könnte zukünftig auf Grafikprozessoren portiert und damit erheblich beschleunigt werden, Ansätze von anderen Gruppen existieren dazu bereits [148, 149]. Die Robustheit der Fluoreszenzlebensdauerapproximation bei niedrigem SNR könnte durch die verfeinerte Ausnutzung von *a priori* Wissen und örtlicher Information weiter gesteigert werden. Ferner könnten Verfahren zur örtlichen globalen Analyse umgesetzt und analysiert werden. Die statistischen Verfahren zum Gruppenvergleich könnten um ANOVA mit Messwertwiederholung und Friedman-Test erweitert werden, um die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen, beispielsweise bei der Untersuchung der Glukoseprovokation (Abschnitt 5.10.2), direkt mit FLIMX durchführen zu können. Schließlich könnte der Datenimport von FLIMX von ASCII-Dateien und einem Becker & Hickl spezifischen Dateiformat auf andere Hersteller von TCSPC-Elektronik, wie beispielsweise PicoQuant (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland), erweitert werden.

Im Themengebiet der technischen Einflussfaktoren könnte nachverfolgt werden, warum die Fluoreszenzlebensdauern des Weitwinkelobjektivs von denen des Standardobjektivs abweichen. Die These, dass die Ursache in der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse liegt, konnte aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht mehr adressiert werden. Die Untersuchung technischer Möglichkeiten zu einer verbesserten Unterdrückung der Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse liefen bereits parallel zu dieser Arbeit [144]. Weitere technische Möglichkeiten sollten entwickelt, eruiert und evaluiert werden. Ebenso sind weitere physiologische Einflussfaktoren wie Koffein, Blutdruck, körperliche Belastung (Laktat), Tagesform, Tageszeit bzw. circadiane Rhythmik, etc. bisher nicht untersucht. Zukünftig könnten diese in Probandenstudien mittels FLIMX sehr einfach untersucht werden.

Literatur

- [1] M. Hammer, E. Konigsdorffer, C. Liebermann, C. Framme, G. Schuch, D. Schweitzer, *et al.*, "Ocular fundus auto-fluorescence observations at different wavelengths in patients with age-related macular degeneration and diabetic retinopathy," *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 246, pp. 105-114, Jan 2008.
- [2] R. F. Spaide, S. Schmitz-Valckenberg, F. G. Holz, and A. C. Bird, "Fundus autofluorescence imaging - Review and perspectives," *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, vol. 28, pp. 385-409, Mar 2008.
- [3] D. Schweitzer, S. Schenke, M. Hammer, F. Schweitzer, S. Jentsch, E. Birckner, *et al.*, "Towards metabolic mapping of the human retina," *Microscopy Research and Technique*, vol. 70, pp. 410-419, May 2007.
- [4] R. D. Jager, W. F. Mieler, and J. W. Miller, "Age-related macular degeneration - Reply," *New England Journal of Medicine*, vol. 359, pp. 1736-1736, Oct 16 2008.
- [5] S. Resnikoff, D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G. P. Pokharel, *et al.*, "Global data on visual impairment in the year 2002," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 82, pp. 844-851, Nov 2004.
- [6] D. Pascolini, S. P. Mariotti, G. P. Pokharel, R. Pararajasegaram, D. Etya'ale, A. D. Negrel, *et al.*, "2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies," *Ophthalmic Epidemiology*, vol. 11, pp. 67-115, Apr 2004.
- [7] D. Pascolini and S. P. Mariotti, "Global estimates of visual impairment: 2010," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 96, pp. 614-618, May 2012.
- [8] M. C. Skala, K. M. Ricking, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K. W. Eliceiri, J. G. White, *et al.*, "In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 19494-19499, Dec 4 2007.
- [9] F. C. Delori, D. G. Goger, and C. K. Dorey, "Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 42, pp. 1855-1866, Jul 2001.
- [10] G. E. Eldred and M. L. Katz, "Fluorophores of the Human Retinal-Pigment Epithelium - Separation and Spectral Characterization," *Experimental Eye Research*, vol. 47, pp. 71-86, Jul 1988.
- [11] N. Sakai, J. Decatur, K. Nakanishi, and G. E. Eldred, "Ocular age pigment "A2-E": An unprecedented pyridinium bisretinoid," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, pp. 1559-1560, Feb 14 1996.
- [12] M. A. Yakovleva, T. B. Feldman, P. M. Arbukhanova, S. A. Borzenok, V. A. Kuzmin, and M. A. Ostrovsky, "Estimation of fluorescence lifetime of lipofuscin fluorophores contained in lipofuscin granules of retinal pigment epithelium of human cadaver eyes without signs of pathology," *Dokl Biochem Biophys*, vol. 472, pp. 19-22, Jan 2017.
- [13] F. C. Delori, M. R. Fleckner, D. G. Goger, J. J. Weiter, and C. K. Dorey, "Autofluorescence distribution associated with drusen in age-related macular degeneration," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 41, pp. 496-504, Feb 2000.
- [14] S. Schmitz-Valckenberg, F. G. Holz, A. C. Bird, and R. F. Spaide, "Fundus autofluorescence imaging - Review and perspectives," *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, vol. 28, pp. 385-409, Mar 2008.

-
- [15] T. Theelen, C. J. F. Boon, B. J. Klevering, and C. B. Hoyng, "Fundus autofluorescence in patients with inherited retinal diseases. Patterns of fluorescence at two different wavelengths," *Ophthalmologe*, vol. 105, pp. 1013-1022, Nov 2008.
- [16] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [17] X. F. Wang, A. Periasamy, B. Herman, and D. M. Coleman, "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Flim) - Instrumentation and Applications," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 369-395, 1992.
- [18] K. Suhling, P. M. W. French, and D. Phillips, "Time-resolved fluorescence microscopy," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 4, pp. 13-22, 2005.
- [19] L. Marcu, "Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, pp. 304-331, Jan 25 2012.
- [20] W. Becker, "Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications," *Journal of Microscopy*, vol. 247, pp. 119-136, Aug 2012.
- [21] M. Y. Berezin and S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging," *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 2641-2684, May 2010.
- [22] K. Dowling, M. J. Dayel, M. J. Lever, P. M. W. French, J. D. Hares, and A. K. L. Dymoke-Bradshaw, "Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications," *Optics Letters*, vol. 23, pp. 810-812, May 15 1998.
- [23] E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, and Q. Q. Ruan, "Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, pp. 381-390, Jul 2003.
- [24] K. Konig and I. Riemann, "High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 8, pp. 432-439, Jul 2003.
- [25] D. Schweitzer, M. Hammer, F. Schweitzer, R. Anders, T. Doebbecke, S. Schenke, *et al.*, "In vivo measurement of time-resolved autofluorescence at the human fundus," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, pp. 1214-1222, Nov-Dec 2004.
- [26] D. Schweitzer, E. R. Gaillard, J. Dillon, R. F. Mullins, S. Russell, B. Hoffmann, *et al.*, "Time-Resolved Autofluorescence Imaging of Human Donor Retina Tissue from Donors with Significant Extramacular Drusen," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 53, pp. 3376-3386, Jun 2012.
- [27] L. Sauer, D. Schweitzer, L. Ramm, R. Augsten, M. Hammer, and S. Peters, "Impact of Macular Pigment on Fundus Autofluorescence Lifetimes," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 56, pp. 4668-79, Jul 1 2015.
- [28] D. Schweitzer, S. Quick, M. Klemm, M. Hammer, S. Jentsch, and J. Dawczynski, "Time-resolved autofluorescence in retinal vascular occlusions," *Ophthalmologe*, vol. 107, pp. 1145-1152, Dec 2010.
- [29] C. Dysli, S. Wolf, and M. S. Zinkernagel, "Fluorescence Lifetime Imaging in Retinal Artery Occlusion," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, pp. 3329-3336, May 2015.
- [30] L. Ramm, S. Jentsch, R. Augsten, and M. Hammer, "Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in glaucoma," *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 252, pp. 2025-2026, Dec 2014.
- [31] D. Schweitzer, L. Deutsch, M. Klemm, S. Jentsch, M. Hammer, S. Peters, *et al.*, "Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in type 2 diabetic patients who have no signs of diabetic retinopathy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, p. 061106, 2015.

- [32] J. Schmidt, S. Peters, L. Sauer, D. Schweitzer, M. Klemm, R. Augsten, *et al.*, "Fundus autofluorescence lifetimes are increased in non-proliferative diabetic retinopathy," *Acta Ophthalmologica*, pp. n/a-n/a, 2016.
- [33] S. Jentsch, D. Schweitzer, K. U. Schmidtke, S. Peters, J. Dawczynski, K. J. Bar, *et al.*, "Retinal fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy measures depend on the severity of Alzheimer's disease," *Acta Ophthalmologica*, Dec 7 2014.
- [34] C. Dysli, S. Wolf, K. Hatz, and M. S. Zinkernagel, "Fluorescence Lifetime Imaging in Stargardt Disease: Potential Marker for Disease Progression Fluorescence Lifetime Imaging in Stargardt Disease," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 832-841, 2016.
- [35] C. Dysli, M. Dysli, V. Enzmann, S. Wolf, and M. S. Zinkernagel, "Fluorescence Lifetime Imaging of the Ocular Fundus in Mice," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 55, pp. 7206-7215, Nov 2014.
- [36] C. Dysli, M. Dysli, M. S. Zinkernagel, and V. Enzmann, "Retinal Fluorescence Lifetime Characteristics in Mouse Models of Pharmacologically Induced Retinal Degeneration," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, Jun 2015.
- [37] S. Liptenok, K. M. Mullen, J. W. Borst, I. H. M. van Stokkum, V. V. Apanasovich, and A. J. W. G. Visser, "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) data analysis with TIMP," *Journal of Statistical Software*, vol. 18, Jan 2007.
- [38] J. Enderlein and R. Erdmann, "Fast fitting of multi-exponential decay curves," *Optics Communications*, vol. 134, pp. 371-378, Jan 15 1997.
- [39] W. Becker, *The bh TCPSC Handbook*, 5th ed. Berlin: Becker & Hickl GmbH, 2012.
- [40] S. C. Warren, A. Margineanu, D. Alibhai, D. J. Kelly, C. Talbot, Y. Alexandrov, *et al.*, "Rapid Global Fitting of Large Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Datasets," *Plos One*, vol. 8, Aug 5 2013.
- [41] D. U. Campos-Delgado, O. G. Navarro, E. R. Arce-Santana, A. J. Walsh, M. C. Skala, and J. A. Jo, "Deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy by a library of exponentials," *Optics Express*, vol. 23, pp. 23748-23767, Sep 7 2015.
- [42] M. Schüttpelz, *Fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Charakterisierung von Protein-Wechselwirkungen*, 2006.
- [43] G. G. Stokes, "On the Change of Refrangibility of Light," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 142, pp. 463-562, 1852.
- [44] F. Ließmann, *Zeitaufgelöste Fluoreszenzbildgebung für die Tumordiagnostik*, 1. Aufl. ed. München: Hieronymus, 2005.
- [45] T. Förster, "Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz," *Annalen Der Physik*, vol. 2, pp. 55-75, 1948.
- [46] M. Volgger, *Lichtmikroskopie Theorie und Anwendung*. Wien, 2008.
- [47] B. Valeur, *Molecular fluorescence : principles and applications*. Weinheim ; New York: Wiley-VCH, 2002.
- [48] L. A. Remington, *Clinical anatomy of the visual system*. St. Louis, Mo.: Elsevier, 2005.
- [49] U. Eysel, "Sehen und Augenbewegungen," in *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, R. F. Schmidt and F. Lang, Eds., ed Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 377-420.
- [50] J. R. Heckenlively and G. B. Arden, *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision*, 2nd ed. Cambridge, Mass.: MIT Press, 2006.

- [51] C. A. Curcio, K. R. Sloan, R. E. Kalina, and A. E. Hendrickson, "Human Photoreceptor Topography," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 292, pp. 497-523, Feb 22 1990.
- [52] C. A. Curcio, K. A. Allen, K. R. Sloan, C. L. Lerea, J. B. Hurley, I. B. Klock, *et al.*, "Distribution and Morphology of Human Cone Photoreceptors Stained with Anti-Blue Opsin," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 312, pp. 610-624, Oct 22 1991.
- [53] S. Jentsch, "Charakterisierung anatomischer Strukturen des Auges durch Messen von Anregungs- und Emissionsspektren sowie der Fluoreszenzlebensdauer," Dipl.-Ing. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, Jena, 2007.
- [54] S. Peters, M. Hammer, and D. Schweitzer, "Two-photon excited fluorescence microscopy application for ex vivo investigation of ocular fundus samples," *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 8086, p. 808605, 2011 2011.
- [55] M. Klemm, A. Dietzel, J. Haueisen, E. Nagel, M. Hammer, and D. Schweitzer, "Repeatability of Autofluorescence Lifetime Imaging at the Human Fundus in Healthy Volunteers," *Current Eye Research*, vol. 38, pp. 793-801, Jul 2013.
- [56] H. Pau, J. Degen, and H. H. Schmidtke, "Different Regional Changes of Fluorescence-Spectra of Clear Human Lenses and Nuclear Cataracts," *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 231, pp. 656-661, Nov 1993.
- [57] T. T. J. M. Berendschot, P. J. DeLint, and D. van Norren, "Fundus reflectance - historical and present ideas," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 22, pp. 171-200, Mar 2003.
- [58] A. J. Bron, G. F. J. M. Vrensen, J. Koretz, G. Maraini, and J. J. Harding, "The ageing lens," *Ophthalmologica*, vol. 214, pp. 86-104, Jan-Feb 2000.
- [59] R. Michael and A. J. Bron, "The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing," *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, vol. 366, pp. 1278-1292, Apr 27 2011.
- [60] D. A. Goss and R. W. West, *Introduction to the optics of the eye*. Boston: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [61] D. Schweitzer, A. Kolb, M. Hammer, and E. Thamm, " τ mapping of the autofluorescence of the human ocular fundus," in *EOS/SPIE/ELA European Biomedical Optics Week – EBiOS*, Amsterdam, 2000, pp. 79-89.
- [62] D. Schweitzer, "Metabolic mapping," in *Medical Retina: Focus on Retinal Imaging (Essentials in Ophthalmology)*, F. G. Holz and R. F. Spaide, Eds., ed Heidelberg: Springer, 2010, pp. 107-123.
- [63] A. N. S. Institute and L. I. o. America, *American National Standard for Safe Use of Lasers (ANSI Z136.1)*: Laser Institute of America, 2007.
- [64] C. Dysli, G. Quellec, M. Abegg, M. N. Menke, U. Wolf-Schnurrbusch, J. Kowal, *et al.*, "Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 55, pp. 2106-13, 2014.
- [65] W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Berlin: Springer, 2005.
- [66] W. Becker, *The bh TCPSC Handbook*, 4 ed. Berlin, 2010.
- [67] W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf, and C. Biskup, "Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting," *Microscopy Research and Technique*, vol. 63, pp. 58-66, Jan 1 2004.

- [68] R. Luchowski, M. Szabelski, P. Sarkar, E. Apicella, K. Midde, S. Raut, *et al.*, "Fluorescence Instrument Response Standards in Two-Photon Time-Resolved Spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, vol. 64, pp. 918-922, Aug 2010.
- [69] M. Klemm, D. Schweitzer, S. Peters, L. Sauer, M. Hammer, and J. Haueisen, "FLIMX: A Software Package to Determine and Analyze the Fluorescence Lifetime in Time-Resolved Fluorescence Data from the Human Eye," *PLoS One*, vol. 10, p. e0131640, 2015.
- [70] C. Dysli, S. Wolf, and M. S. Zinkernagel, "Autofluorescence Lifetimes in Geographic Atrophy in Patients With Age-Related Macular Degeneration," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 2479-2487, May 2016.
- [71] L. Sauer, S. Peters, J. Schmidt, D. Schweitzer, M. Klemm, L. Ramm, *et al.*, "Monitoring macular pigment changes in macular holes using fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy," *Acta Ophthalmologica*, pp. n/a-n/a, 2016.
- [72] D. V. O'Connor, W. R. Ware, and J. C. Andre, "Deconvolution of Fluorescence Decay Curves - Critical Comparison of Techniques," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 83, pp. 1333-1343, 1979.
- [73] M. Koellner and J. Wolfrum, "How Many Photons Are Necessary for Fluorescence-Lifetime Measurements," *Chemical Physics Letters*, vol. 200, pp. 199-204, Nov 27 1992.
- [74] E. G. Novikov, A. van Hoek, A. J. W. G. Visser, and J. W. Hofstraat, "Linear algorithms for stretched exponential decay analysis," *Optics Communications*, vol. 166, pp. 189-198, Aug 1 1999.
- [75] K. C. B. Lee, J. Siegel, S. E. D. Webb, S. Leveque-Fort, M. J. Cole, R. Jones, *et al.*, "Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging," *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 1265-1274, Sep 2001.
- [76] D. Apitz and P. M. Johansen, "Limitations of the stretched exponential function for describing dynamics in disordered solid materials," *Journal of Applied Physics*, vol. 97, Mar 15 2005.
- [77] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, and B. Valeur, "Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential)," *Chemical Physics*, vol. 315, pp. 171-182, Aug 8 2005.
- [78] O. Flomenbom, K. Velonia, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, *et al.*, "Stretched exponential decay and correlations in the catalytic activity of fluctuating single lipase molecules," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 2368-2372, Feb 15 2005.
- [79] D. Schweitzer, S. Quick, S. Schenke, M. Klemm, S. Gehlert, M. Hammer, *et al.*, "Comparison of parameters of time-resolved autofluorescence between healthy subjects and patients suffering from early AMD," *Ophthalmologe*, vol. 106, pp. 714-722, Aug 2009.
- [80] P. R. Barber, S. M. Ameer-Beg, J. Gilbey, L. M. Carlin, M. Keppler, T. C. Ng, *et al.*, "Multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy: practical application to protein-protein interactions using global analysis," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 6, pp. S93-S105, Feb 6 2009.
- [81] J. R. Knutson, J. M. Beechem, and L. Brand, "Simultaneous Analysis of Multiple Fluorescence Decay Curves - a Global Approach," *Chemical Physics Letters*, vol. 102, pp. 501-507, 1983.
- [82] M. M. G. Krishna and N. Periasamy, "Spectrally constrained global analysis of fluorescence decays in biomembrane systems," *Analytical Biochemistry*, vol. 253, pp. 1-7, Nov 1 1997.
- [83] S. Pelet, M. J. R. Previte, L. H. Laiho, and P. T. C. So, "A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation," *Biophysical Journal*, vol. 87, pp. 2807-2817, Oct 2004.

-
- [84] R. W. K. Leung, S. C. A. Yeh, and Q. Y. Fang, "Effects of incomplete decay in fluorescence lifetime estimation," *Biomedical Optics Express*, vol. 2, pp. 2517-2531, Sep 1 2011.
- [85] J. M. I. Maarek, L. Marcu, W. J. Snyder, and W. S. Grundfest, "Time-resolved fluorescence spectra of arterial fluorescent compounds: Reconstruction with the laguerre expansion technique," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 71, pp. 178-187, Feb 2000.
- [86] J. A. Jo, Q. Y. Fang, T. Papaioannou, and L. Marcu, "Fast model-free deconvolution of fluorescence decay for analysis of biological systems," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, pp. 743-752, Jul-Aug 2004.
- [87] A. S. Dabir, C. A. Trivedi, Y. Ryu, P. Pande, and J. A. Jo, "Fully automated deconvolution method for on-line analysis of time-resolved fluorescence spectroscopy data based on an iterative Laguerre expansion technique," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, Mar-Apr 2009.
- [88] J. A. Jo, Q. Fang, T. Papaioannou, J. D. Baker, A. H. Dorafshar, T. Reil, *et al.*, "Laguerre-based method for analysis of time-resolved fluorescence data: application to in-vivo characterization and diagnosis of atherosclerotic lesions," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, Mar-Apr 2006.
- [89] J. A. Jo, Q. Y. Fang, and L. Marcu, "Ultrafast method for the analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data based on the Laguerre expansion technique," *Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 11, pp. 835-845, Jul-Aug 2005.
- [90] V. V. Olga, L. Marcu, and M. C. K. Khoo, "A nonparametric method for analysis of fluorescence emission in combined time and wavelength dimensions," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 33, pp. 531-544, Apr 2005.
- [91] P. Pande and J. A. Jo, "Automated Analysis of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) Data Based on the Laguerre Deconvolution Method," *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 58, pp. 172-181, Jan 2011.
- [92] J. A. Jo, L. Marcu, Q. Fang, T. Papaioannou, J. H. Qiao, M. C. Fishbein, *et al.*, "New methods for time-resolved fluorescence spectroscopy data analysis based on the Laguerre expansion technique - Applications in tissue diagnosis," *Methods of Information in Medicine*, vol. 46, pp. 206-211, 2007.
- [93] W. R. Ware, L. J. Doemeny, and T. L. Nemzek, "Deconvolution of Fluorescence and Phosphorescence Decay Curves - Least-Squares Method," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 77, pp. 2038-2048, 1973.
- [94] D. A. Turton, G. D. Reid, and G. S. Beddard, "Accurate analysis of fluorescence decays from single molecules in photon counting experiments," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 4182-4187, Aug 15 2003.
- [95] J. Neyman and E. S. Pearson, "On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference," *Biometrika*, vol. 20A, pp. 263-294, 1928.
- [96] T. Hauschild and M. Jentschel, "Comparison of maximum likelihood estimation and chi-square statistics applied to counting experiments," *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, vol. 457, pp. 384-401, Jan 11 2001.
- [97] K. Holmstrom and J. Petersson, "A review of the parameter estimation problem of fitting positive exponential sums to empirical data," *Applied Mathematics and Computation*, vol. 126, pp. 31-61, Feb 15 2002.
- [98] J. Aldrich, "R. A. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922," *Statistical Science*, vol. 12, pp. 162-176, Aug 1997.
- [99] R. A. Fisher, "On an absolute criterion for fitting frequency curves (Reprinted from Messenger of Mathematics, vol 41, pg 155-160, 1912)," *Statistical Science*, vol. 12, pp. 39-41, Feb 1997.

- [100] A. Sillen and Y. Engelborghs, "The correct use of "average" fluorescence parameters," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 67, pp. 475-486, May 1998.
- [101] R. P. McNabb, D. S. Grewal, R. Mehta, S. G. Schuman, J. A. Izatt, T. H. Mahmoud, *et al.*, "Wide field of view swept-source optical coherence tomography for peripheral retinal disease," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 100, pp. 1377-1382, Oct 2016.
- [102] D. Schweitzer, M. Klemm, M. Hammer, S. Jentsch, and F. Schweitzer, "Method for simultaneous detection of functionality and tomography," *Clinical and Biomedical Spectroscopy*, vol. 7368, p. 736804, 2009/06/14 2009.
- [103] J. Dillon and S. J. Atherton, "Time Resolved Spectroscopic Studies on the Intact Human Lens," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 51, pp. 465-468, Apr 1990.
- [104] J. Meyer, "Modellierung der integralen zeitaufgelösten Autofluoreszenz des Augenhintergrundes durch die spektralen Eigenschaften und Parameter des Fluoreszenzabklingverhaltens einzelner endogener Fluorophore – Vergleich mit in vivo Messungen," M.Sc., Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena, Jena, 2012.
- [105] I. Rechenberg and M. Eigen, *Evolutionsstrategie : Optimierung technischer Systeme nach Prinzipien der biologischen Evolution*. Stuttgart-Bad Cannstadt: Frommann-Holzboog, 1973.
- [106] R. K. Ursem, J. J. M. ED Guervos, P. Adamidis, H.-G. Beyer, J.-L. Fernandez-Villacanas, and H.-P. Schwefel, "Diversity-guided evolutionary algorithms " *Parallel Problem Solving from Nature - PPSN VII. 7th International Conference. Proceedings*, pp. 462-471, 2002.
- [107] R. Eichardt, J. Haueisen, T. R. Knoesche, and E. G. Schukat-Talamazzini, "Reconstruction of multiple neuromagnetic sources using augmented evolution strategies - A comparative study," *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 55, pp. 703-712, Feb 2008.
- [108] J. F. Kennedy, R. C. Eberhart, and Y. Shi, *Swarm intelligence*. San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers, 2001.
- [109] M. Clerc and J. Kennedy, "The particle swarm - Explosion, stability, and convergence in a multidimensional complex space," *Ieee Transactions on Evolutionary Computation*, vol. 6, pp. 58-73, Feb 2002.
- [110] D. W. Marquardt, "An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters," *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, vol. 11, pp. 431-441, 1963.
- [111] R. Fletcher, "A modified Marquardt subroutine for non-linear least squares," *A modified Marquardt subroutine for non-linear least squares*, p. 24 pp, May 1971.
- [112] J. A. Nelder and R. Mead, "A Simplex-Method for Function Minimization," *Computer Journal*, vol. 7, pp. 308-313, 1965.
- [113] R. Storn and K. Price, "Differential evolution - A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces," *Journal of Global Optimization*, vol. 11, pp. 341-359, Dec 1997.
- [114] M. Klemm and D. Schweitzer, "Multi-exponential approximation adapted to autofluorescence lifetime imaging (FLIM) of the human eye," in *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, Fort Lauderdale, 2011.
- [115] "Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group," *Ophthalmology*, vol. 98, pp. 786-806, May 1991.
- [116] Student, "The Probable Error of a Mean," *Biometrika* vol. 6, 1908.
- [117] M. Hollander and D. A. Wolfe, *Nonparametric statistical methods*, 2nd ed. New York: Wiley, 1999.

-
- [118] S. Holm, "A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure," *Scandinavian Journal of Statistics*, vol. 6, pp. 65-70, 1979.
- [119] E. R. DeLong, D. M. DeLong, and D. I. Clarkepearson, "Comparing the Areas under 2 or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves - a Nonparametric Approach," *Biometrics*, vol. 44, pp. 837-845, Sep 1988.
- [120] J. Kaipio and E. Somersalo, "Statistical inverse problems: Discretization, model reduction and inverse crimes," *Journal of Computational and Applied Mathematics*, vol. 198, pp. 493-504, Jan 15 2007.
- [121] N. Boens, W. W. Qin, N. Basaric, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, *et al.*, "Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 2137-2149, Mar 1 2007.
- [122] W. A. Wyatt, G. E. Poirier, F. V. Bright, and G. M. Hieftje, "Fluorescence-Spectra and Lifetimes of Several Fluorophores Immobilized on Nonionic Resins for Use in Fiberoptic Sensors," *Analytical Chemistry*, vol. 59, pp. 572-576, Feb 15 1987.
- [123] D. Magde, G. E. Rojas, and P. G. Seybold, "Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 70, pp. 737-744, Nov 1999.
- [124] J. van de Kraats and D. van Norren, "Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV," *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, vol. 24, pp. 1842-1857, Jul 2007.
- [125] D. Sheskin, *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*, 5th ed.: CRC Press, 2011.
- [126] S. S. Shapiro and M. B. Wilk, "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)," *Biometrika*, vol. 52, pp. 591-&, 1965.
- [127] S. Siegel and N. J. Castellan, *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1988.
- [128] Q. R. Yu and A. A. Heikal, "Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 95, pp. 46-57, Apr 2 2009.
- [129] D. Chorvat, J. Kirchnerova, M. Cagalinec, J. Smolka, A. Mateasik, and A. Chorvatova, "Spectral unmixing of flavin autofluorescence components in cardiac myocytes," *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. L55-L57, Dec 2005.
- [130] G. J. Kremers, E. B. van Munster, J. Goedhart, and T. W. J. Gadella, "Quantitative lifetime unmixing of multiexponentially decaying fluorophores using single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 95, pp. 378-389, Jul 1 2008.
- [131] M. Klemm, D. Baumgarten, E. Supriyanto, and D. Schweitzer, "Investigation of the Stretched Exponentials Method for an Application in Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)," Conference on Biomedical Engineering and Sciences, Miri, 2014.
- [132] M. Klemm, D. Schweitzer, and J. Haueisen, "Limits and abilities of a fluorescence lifetime based approach to separate two fluorescent layers," Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Lübeck, 2015.
- [133] M. Klemm, A. Dietzel, E. Nagel, D. Schweitzer, U. Graichen, and J. Haueisen, "Statistical Analysis of Reproducibility of Fluorescence Decay Histograms at the Fundus," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, pp. 2293-2293, 2010.
- [134] J. M. Bland and D. G. Altman, "Statistical-Methods for Assessing Agreement between 2 Methods of Clinical Measurement," *Lancet*, vol. 1, pp. 307-310, Feb 8 1986.

- [135] M. Klemm, E. Nagel, A. Dietzel, K. W. Lai, E. Supriyanto, and D. Schweitzer, "Agreement Between Eyes in Wide-Field Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy Measurements at the Human Retina in Healthy Volunteers," in *International Conference for Innovation in Biomedical Engineering and Life Sciences*. vol. 56, F. Ibrahim, J. Usman, M. S. Mohktar, and M. Y. Ahmad, Eds., ed: Springer Singapore, 2015, pp. 298-301.
- [136] M. Klemm, A. Dietzel, E. Nagel, and D. Schweitzer, "Repeatability of wide-field autofluorescence lifetime imaging at the human retina in healthy volunteers," *Acta Ophthalmologica*, vol. 93, 2015.
- [137] M. Klemm, A. Dietzel, E. Nagel, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Comparison of 30° and 55° autofluorescence lifetime images in healthy volunteers," World Ophthalmology Congress, Guadalajara, 2016.
- [138] M. Klemm and D. Schweitzer, "Influence of the blood glucose level on FLIO measurements at the human retina in healthy volunteers," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, pp. 390-390, 2015.
- [139] M. Klemm, E. Nagel, D. Schweitzer, S. Schramm, and J. Haueisen, "Effects of short term changes in the blood glucose level on the autofluorescence lifetime of the human retina in healthy volunteers," in *Ophthalmic Technologies XXVI*, SPIE Photonics West, San Francisco, 2016, pp. 96931R-96931R-5.
- [140] D. Dolić, *Statistik mit R Einführung für Wirtschafts- und Sozialwissenschaftler*. München [u.a.]: Oldenbourg, 2010.
- [141] S. Peters, M. Griebisch, M. Klemm, J. Haueisen, and M. Hammer, "Hydrogen peroxide modulates energy metabolism and oxidative stress in cultures of permanent human Muller cells MIO-M1," *J Biophotonics*, pp. n/a-n/a, Nov 29 2016.
- [142] M. G. O. Grafe, A. Hoffmann, and C. Spielmann, "Ultrafast fluorescence spectroscopy for axial resolution of fluorophore distributions," *Applied Physics B-Lasers and Optics*, vol. 117, pp. 833-840, Dec 2014.
- [143] C. Karras, W. Paa, D. Litzkendorf, S. Grimm, K. Schuster, and H. Stafast, "SiO₂-Al₂O₃-La₂O₃ glass - a superior medium for optical Kerr gating at moderate pump intensity," *Optical Materials Express*, vol. 6, pp. 125-130, Jan 1 2016.
- [144] M. Klemm, J. Blum, D. Link, M. Hammer, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Combination of confocal principle and aperture stop separation improves suppression of crystalline lens fluorescence in an eye model," *Biomedical Optics Express*, vol. 7, pp. 3198-3210, 2016/09/01 2016.
- [145] K. Yamamoto, J. L. Zhou, J. J. Hunter, D. R. Williams, and J. R. Sparrow, "Toward an Understanding of Bisretinoid Autofluorescence Bleaching and Recovery," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 53, pp. 3536-3544, Jun 2012.
- [146] W. A. H. Rushton and G. H. Henry, "Bleaching and Regeneration of Cone Pigments in Man," *Vision Research*, vol. 8, pp. 617-&, 1968.
- [147] D. C. Coile and H. D. Baker, "Foveal Dark-Adaptation, Photopigment Regeneration, and Aging," *Visual Neuroscience*, vol. 8, pp. 27-39, Jan 1992.
- [148] X. Zhu and D. W. Zhang, "Efficient Parallel Levenberg-Marquardt Model Fitting towards Real-Time Automated Parametric Imaging Microscopy," *Plos One*, vol. 8, Oct 10 2013.
- [149] G. Wu, T. Nowotny, Y. Chen, and D. D. U. Li, "GPU acceleration of time-domain fluorescence lifetime imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, Jan 2016.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Jablonski Diagramm mit den verschiedenen Singulettgrund- und Triplettzuständen eines Moleküls. Die Energie eines absorbierten Anregungsphotons (blau), versetzt das Molekül in einen angeregten Zustand, von dem es durch Internal Conversion in das unterste Schwingungsniveau von S_1 gelangt. Die Verweildauer in diesem Zustand bestimmt die Fluoreszenzlebensdauer. Die Rückkehr in den Grundzustand S_0 kann strahlungslos, durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons (grün) oder in einen Triplettzustand durch Intersystem crossing erfolgen, wodurch ein Phosphoreszenzphoton (gelb) abgegeben werden kann.	6
Abbildung 2.2 Normiertes zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 1 ns. Die Zeitdifferenz zwischen dem Maximum des Fluoreszenzsignals und dem Reziproken der Eulerschen Zahl (0,37) entspricht der Fluoreszenzlebensdauer τ	9
Abbildung 2.3 Schema vom anatomischen Aufbau des menschlichen Auges	11
Abbildung 2.4 Dichte der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) in Abhängigkeit der Exzentrizität von der Fovea (nach [51]).	12
Abbildung 2.5 Fluoreszenzspektren okularer Gewebe von Augen junger Schweine bei Anregung mit 446 nm (modifiziert nach [53]).	13
Abbildung 2.6 Mittlere Fluoreszenzlebensdauern okularer Gewebe von Augen junger Schweine bei Anregung mit 446 nm und bi-exponentieller Approximation (modifiziert nach [53]).	13
Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Fluoreszenzanregung und -detektion im menschlichen Auge. Das Anregungslicht ist in dunkelblau dargestellt. Die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse und der Retina ist jeweils hell- bzw. dunkelgrün gefärbt. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale in der unteren Bildhälfte basieren auf realen Messdaten.	15
Abbildung 3.1 Schema eines konfokalen Scanning Laser Ophthalmoscopes zur Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz des menschlichen Auges in vivo. Die Fluoreszenz wird durch einen Diodenlaser mit einer Pulsweite von 70 ps, einer Wiederholrate von 80 MHz und einer Wellenlänge von 446 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission wird durch eine multimode Faser aufgenommen, mit einem dichroitischen Spiegel (DS_2) in zwei spektrale Kanäle (490–560 nm und 560–720 nm) aufgeteilt, mit Hilfe von multichannel plate photomultiplier Detektoren erfasst sowie zeitlich und örtlich aufgelöst durch eine TCSPC-Einheit verarbeitet. Zusätzlich zum Anregungslaser wird der Augenhintergrund durch einen Dauerstrich (continuous wave, cw) Infrarot Laser (IR, 820 nm) zur online Bildregistrierung beleuchtet. Das vom Fundus reflektierte Infrarotlicht wird durch einen dichroitischen Spiegel (DS_1) ausgekoppelt. Die Detektoren werden vor Infrarot- und Anregungslicht durch Blockfilter (BF) geschützt.	17
Abbildung 3.2 Das Schema des FLIO-Prototyp 2 entspricht im Wesentlichen dem des FLIO-Prototyp 1. Die Unterschiede betreffen eine von 446 nm zu 473 nm veränderte Wellenlänge des Anregungslasers und des zugehörigen Blockfilters (BF), sowie ein separates TCSPC-Modul je spektralem Kanal im Vergleich zu einem gemeinsam verwendeten beim FLIO-Prototyp 1. Die Verbesserung mit dem größten Einfluss ist die Verwendung von High-Speed Hybrid Detektoren im FLIO-Prototyp 2, was aus dem Schema allerdings nicht hervorgeht.	18
Abbildung 3.3 Schema der Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens. Das Fluoreszenzsignal (oben, orange) wird durch eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslasers (oben, blau) abgetastet. Bei einigen Laserpulsen werden einzelne Fluoreszenzphotonen detektiert (mittlerer Abschnitt). Anhand der Zeitdifferenz zwischen Laserpuls und Ankunft des Fluoreszenzphotons wird ein Photonenhistogramm (unten) aufgebaut, welches bei hinreichend vielen detektierten Photonen dem quantisierten Fluoreszenzsignal (oben) entspricht.	20
Abbildung 3.4 Einfluss der Zeitverschiebung zwischen Daten und Modell auf die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Farblich kodiert auf einer logarithmischen Skala ist der Betrag des relativen Fehlers der Fluoreszenzlebensdauer.	21
Abbildung 3.5 Schema der Fluoreszenzanregung und -erfassung eines fluoreszierenden Objekts mit dreidimensionaler Oberfläche. Der Anregungs- und Detektionsstrahl legt vom Anregungsstrahlaustrittspunkt und Detektionsstrahleintrittspunkt zum angeregten Objektpunkt einen deutlichen kürzeren Weg d zurück, während ein anderer Anregungs- und Detektionsstrahl zu einem Objektpunkt den Weg $d + dx$ zurücklegt. Die Wegdifferenz x ruft einen Laufzeitunterschied hervor.	22

Abbildung 3.6 Fluoreszenzlebensdauer über den Ort eines fluoreszierenden Objekts mit dreidimensionaler Oberfläche, bestimmt mittels multi-exponentiellem Ansatz (Abschnitt 3.4.2), im Vergleich zum idealen Wert. Die Schwankung der real bestimmten Fluoreszenzlebensdauer ist auf Unsicherheiten in der Fluoreszenzlebensdauerapproximation zurückzuführen. Der Fehler der Fluoreszenzlebensdauer hängt scheinbar linear von der Wegdifferenz des Anregungs- bzw. Detektionsstrahls ab. 22

Abbildung 3.7 Schema des Messaufbaus (A) und Messergebnis (B) von drei Küvetten gefüllt mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Abständen zueinander. Die Exponentialfunktionen (Exp.) nach Faltung mit der IRF, welche in Summe die Modellkurve (rot) ergeben, modellieren jeweils das Fluoreszenzsignals eines Fluoreszenzfarbstoffs und sind in magenta (Rose Bengal), cyan (DCM) und gelb (Natrium-Fluoreszein) dargestellt. 23

Abbildung 3.8 Normiertes Spektrum des 446 nm PulsLasers (BDL-440-SMC, Becker & Hickl GmbH). 24

Abbildung 3.9 Instrument response functions des FLIO-Prototyps 1 für beide spektrale Kanäle, gemessen in Reflexion. Zwischen 4 und 5 ns sowie zwischen 6 und 7 ns sind Artefakte erkennbar, die durch Reflexionen an optisch wirksamen Oberflächen verursacht werden. Durch die zusätzlich zurückgelegte Wegstrecke werden die reflektierten Photonen zu einem späteren Zeitpunkt detektiert. Die Form der IRF entsteht durch eine Überlagerung der Pulsform des Anregungslasers (deutlich erkennbar ist eine Schulter bei ca. 2 ns, die der Anregungslaser erzeugt), der Transit Time Spread der Detektoren sowie die zeitliche Pulsaufweitung anderer optischer Komponenten im Strahlengang. 24

Abbildung 3.10 Instrument response functions des FLIO-Prototyps 2 für beide spektrale Kanäle, gemessen mittels Eosin Y Lösung. Durch die Optimierung des Strahlengangs beim FLIO-Prototyp 2 sind keine Artefakte durch Reflexionen an optisch wirksamen Oberflächen zu erkennen. 25

Abbildung 3.11 Ausschnitt von TCSPC-Daten des Augenhintergrunds eines gesunden Probanden vom spektralen Kanal 1 (schematische Darstellung). Je Pixel liegt ein Photonenhistogramm vor. 27

Abbildung 5.1 Demonstration der Funktionsweise von statischem und adaptivem Binning in einem Diabetes mellitus Patienten. Die obere Zeile der Photonenhistogramme (C, E) zeigt die Rohdaten, die mittlere Zeile zeigt die Photonenhistogramme nach statischem Binning (F, H) und die untere Zeile die Photonenhistogramme nach adaptivem Binning (J, L). In den vergrößerten Insets, welche über der oberen Zeile der Photonenhistogramme dargestellt sind, verwendet statisches Binning alle Pixel innerhalb des magenta Quadrats, während adaptives Binning die grün markierten Pixel benutzt. Das schwarze Quadrat markiert das jeweils zu binnende Pixel. Im hellen Bildbereich (rechtes Inset, B) werden bei statischem Binning mehr Pixel verwendet als bei adaptivem Binning. Im dunklen Bildbereich (linkes Inset, A) verwendet adaptives Binning mehr Pixel als statisches Binning. Die linke Spalte (C, F, J) zeigt die Photonenhistogramme eines Pixels in einer dunklen Bildregion, während die rechte Spalte (E, H, L) Photonenhistogramme eines Pixels in einer hellen Bildregion zeigt. Die mittlere Spalte zeigt Bilder der Fluoreszenzintensität der Rohdaten (D), nach statischem Binning (G) und nach adaptivem Binning (K). Der größere Verlust an Kontrast bei adaptivem Binning resultiert in einem höheren SNR in den Photonenhistogrammen der darunterliegenden gebinneten Pixel. 36

Abbildung 5.2 TCSPC Daten nachdem die Fluoreszenzsignale aller Pixel einer Messung eines gesunden Probanden zusammengefasst wurden (schwarz). Die automatisch detektierten Artefakte, welche durch Reflexionen im optischen Strahlengang verursacht wurden, unterteilen sich in Anstieg (dunkelrot) und Abfall (hellrot). Der Abfall wird durch die dreifache Länge des Anstiegs approximiert. Zur besseren Lesbarkeit ist das Fluoreszenzsignal logarithmisch skaliert. Die Insets zeigen das vergrößerte Segment der TCSPC Daten eines einzelnen Pixels (grau). Die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauerapproximation mittels multi-exponentiellem Ansatz sind mit Artefaktbehandlung (blau) und ohne Artefaktbehandlung (orange) dargestellt. 37

Abbildung 5.3 Die TCSPC Daten eines gesunden Probanden wurden mit adaptivem Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) vorverarbeitet (schwarz) und anschließend mit Hilfe des multi-exponentiellen Ansatzes (links) unter Benutzung von drei Exponentialfunktionen sowie des linsen-korrigierten Ansatzes (rechts) unter Benutzung von zwei Exponentialfunktionen sowie einer separaten Messung der Augenlinse approximiert. Die Daten sind in drei Intervalle eingeteilt: das pre-Anregungsintervall (A), den Fluoreszenzanstieg (B) und den Fluoreszenzabfall (C). Die Modellfunktion des multi-exponentiellen Ansatzes differiert durch den Einfluss der Augenlinse stark von den Messdaten in (B). Der linsen-korrigierte Ansatz kann den Einfluss der Augenlinse in (B) mit Hilfe einer skalierten und verschobenen separaten Messung der Fluoreszenz der Augenlinse kompensieren. Aufgrund des hohen Anteils an Fluoreszenz der Augenlinse wird das verbleibende Fluoreszenzsignal nur mit zwei Exponentialfunktionen (exp.) modelliert. Zur besseren Lesbarkeit sind die Fluoreszenzintensitäten und Modellfunktionen logarithmisch skaliert. 39

Abbildung 5.4 Einfluss der Zeitverschiebung zwischen Daten und Modell auf die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bei Berücksichtigung der Zeitverschiebung in der Modellierung. Farblich kodiert und logarithmisch skaliert ist der Betrag des relativen Fehlers der Fluoreszenzlebensdauer.	40
Abbildung 5.5 Vergleich eines 75 x 75 Pixel großen Ausschnitts der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 vom linken Auge eines gesunden Probanden vor (links) und nach (rechts) der Behandlung von Ausreißern. Die detektierten Ausreißer (schwarz) sind in der Mitte dargestellt. Ein Grauwertbild der Fluoreszenzintensität ist allen drei Einzelgrafiken zur besseren Orientierung überlagert. Die Farbskala der beiden Darstellungen der Fluoreszenzlebensdauer ist identisch. Die Makula des Probanden befindet sich in der unteren rechten Ecke der Bilder, wo die kürzesten Fluoreszenzlebensdauern auftreten (rot).	46
Abbildung 5.6 ETRS-Gitter auf der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 des linken Auges eines gesunden Probanden mit den Feldern central (C), inner superior (IS), inner inferior (II), inner nasal (IN), inner temporal (IT), outer superior (OS), outer inferior (OI), outer nasal (ON), und outer temporal (OT).	47
Abbildung 5.7 Vorgehensweise, die aus einem beliebigen Photonenhistogramm ein Histogramm mit variabler Klassenbreite erzeugt, aus welchem mittels gleichverteilter Zufallszahlen zwischen 0 und 1 synthetische zeitaufgelöste Fluoreszenzsignale erzeugt werden können.	52
Abbildung 5.8: Voruntersuchung zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bei verschiedenen Mischverhältnissen aus Eosin Y und Kaliumiodid (PI) zwischen 0 und 5 Molar. Der Stern-Volmer-Plot (links) gibt das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern des dynamischen Quenchings in Abhängigkeit der Quencherkonzentration an. Auf der rechten Seite ist das Fluoreszenzlebensdauerverhältnis in die resultierende Fluoreszenzlebensdauer umgerechnet und mittels einer Gleichung (grün) approximiert. (Grafik modifiziert nach Sven Peters).....	58
Abbildung 5.9 Küvettenhalterung zur Aufnahme von bis zu drei Hellma 110-OS Küvetten (1-3) am FLIO-System. Das Objektiv des FLIO-Systems ist in (A) am oberen Bildrand erkennbar. Küvette 1 steht in der Küvettenhalterung und kann in der Position nicht variiert werden. Küvetten 2 und 3 sind auf einem Schlitten um jeweils 90° verdreht zu Küvette 1 liegend platziert und können unabhängig voneinander bewegt werden, wodurch sich die relative Entfernung zu den anderen Küvetten und damit auch die absolute Entfernung zum FLIO-System verändert. Fokussiert wird das FLIO-System für die Messungen dieser Arbeit auf die jeweils am weitesten vom FLIO-System entfernte Küvette, im Bild ist dies Küvette 3.....	60
Abbildung 5.10 Fluoreszenzintensität (A), Amplitude α_1 (B) und die dazugehörige Fluoreszenzlebensdauer τ_1 (C) vom spektralen Kanal 1 (490-560 nm) eines repräsentativen Probanden. Die drei segmentierten Regionen sind durch ein weißes Quadrat hervorgehoben.	64
Abbildung 5.11 Fluoreszenzintensität eines jungen gesunden Probanden im spektralen Kanal 1, aufgenommen am FLIO-System mit dem Standardobjektiv (30°, links) und dem Weitwinkelobjektiv (55°, rechts).....	66
Abbildung 6.1 Schema der Softwarestruktur von FLIMX. Die grau gefärbten Module sind für die Datenverwaltung zuständig und organisieren den Zugriff auf das Speichermedium, die blau gefärbten Module verarbeiten Daten und die orange gefärbten Module stellen grafische Benutzeroberflächen dar. Nur die wichtigsten Datenströme zwischen den Modulen sind eingezeichnet.....	71
Abbildung 6.2 Schema der baumartigen Struktur von FLIMX's Verwaltung von Messdaten und Ergebnissen aus der Approximation der FLIM-Parameter.	72
Abbildung 6.3 Study Manager der FLIMX-Software. Mit orangem Hintergrund markiert ist die Verwaltung der studies. Es kann eine neue study angelegt werden oder die gerade ausgewählte umbenannt, dupliziert oder gelöscht werden. Die subjects der ausgewählten study sind in der linken Tabelle aufgelistet, dabei werden je subject die spektralen Kanäle der Messdaten und der Fluoreszenzlebensdauerapproximation angegeben. Das ausgewählte subject kann mittels der Schaltflächen vor dem grünen Hintergrund verwaltet werden. Zusätzliche Informationen wie Alter oder Klassifikation des Krankheitszustands sind je subject in der rechten Tabelle aufgeführt, welche mit dem gelb hinterlegten Bereich oben rechts verwaltet werden kann.....	73
Abbildung 6.4 Im Hauptfenster von FLIMXFit wird der größte Teil des zur Verfügung stehenden Platzes für das Photonenhistogramm (blaue Punkte) sowie die Modellkurve (rot) des aktuell gewählten Pixels verwendet. Direkt darunter ist das normierte Residuum angeordnet. Auf der rechten Seite sind oben das Fluoreszenzintensitätsbild und direkt darunter die mittlere Fluoreszenzlebensdauer dargestellt. Der aktuell gewählte Pixel ist durch ein Fadenkreuz (weiß) markiert. In der Tabelle darunter sind die Parameter des Modells für den gewählten Pixel angegeben.....	74

- Abbildung 6.5 Das FLIMXVis Hauptfenster unterteilt sich in zwei Seiten, welche unabhängig voneinander sind. Je Seite können ein oder mehrere FLIM-Parameter eines subjects angezeigt werden. Die subjects können zu unterschiedlichen studies gehören. Das obere Diagramm stellt den bzw. die FLIM-Parameter 2- oder 3-dimensional dar. Jeweils darunter können in einem weiteren Diagramm Histogramme oder Schnitte dargestellt werden. Die Definition von ROIs erfolgt entweder per Maus oder mittels der Kontrollelemente unten links bzw. rechts. Der Export von Daten sowie die Statistikverfahren sind über Menüs zugänglich. 76
- Abbildung 6.6 Beispiel eines Gruppenvergleichs auf Basis der Holm-Bonferroni-Methode anhand von Diabetikern und Gesunden (Abschnitt 5.7.5) für die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 . Die Gruppenhistogramme sind unten links dargestellt. Der kleinste p-Wert wird bei 440 ps erreicht. Für diese Histogrammklasse ist die ROC-Kurve rechts in der Abbildung dargestellt. 77
- Abbildung 6.7 Profil von CPU- und Speicherverbrauch von FLIMX während der verteilten Berechnung der Modellparameter einer FLIO-Messung. (A) zeigt die anteilige Prozessorkernaktivität eines Quad-Core-Prozessors und den Gesamtspeicherverbrauch der MATLAB-Implementierung (rot). (B) stellt eine Übersicht der CPU-Zeit der verschiedenen Berechnungsschritte (C) dar. 78
- Abbildung 6.8 Statistik über den Einsatz der Compute-Server des BMTI zur Fluoreszenzlebensdauerapproximation mittels FLIMX. Die beiden Tortendiagramme im oberen Bereich der Abbildung sind identisch, da die Berechnung ausschließlich auf den Compute-Server des BMTI lief. 79
- Abbildung 6.9 Vergleich von statischem und adaptivem Binning anhand eines Diabetes mellitus Patienten ohne diabetische Retinopathie. Die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauern τ_m , τ_1 und τ_2 sind in den Reihen von oben nach unten dargestellt. Entlang der Spalten sind statisches-Binning (Faktor 2) und adaptives Binning (mindestens 100.000 Photonen je Pixel) für beide spektrale Kanäle dargestellt. Die Farbskalierung ist zum besseren Vergleich identisch für die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauern je spektralem Kanal. Zur besseren Orientierung ist in jeder Grafik das ETDRS-Gitter aufgetragen. Die größten Unterschiede sind durch weiße Pfeile markiert. 80
- Abbildung 6.10 Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer Approximation an einem jungen gesunden Probanden mit je Pixel approximierter Zeitverschiebung (B, C), einer aus dem Zentrum bestimmten Zeitverschiebung von -34,2 ps, welche für die Approximation aller Pixel verwendet wurde (D, E) sowie einer Zeitverschiebung, die in den Ecken des Bildes bestimmt und zur Approximation je Pixel linear über den Ort interpoliert wurde (F, G). Im ETDRS-Gitter sind die Mittelwerte je Feld aufgetragen. In C ist eine vertikale Veränderung der Zeitverschiebung zu erkennen. Die starke Änderung der Zeitverschiebung im zentralen Feld des ETDRS-Gitters ist physiologisch nicht erklärbar und könnte ein Artefakt der Fluoreszenzlebensdauerapproximation sein. Die Fixierung der Zeitverschiebung auf einen Wert je Bild führt zur kürzeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern in der unteren Bildhälfte, die nicht korrekt sind (D). Die Interpolation der Zeitverschiebung resultiert in sehr ähnlichen mittleren Fluoreszenzlebensdauern (F) wie B, mit deutlich reduziertem Rauschen und etwas längeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern in der zentralen Region des ETDRS-Gitters. 81
- Abbildung 6.11 Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauer-Modellierungsansätze in einem gesunden Probanden. Die Fluoreszenzintensität sowie die Fluoreszenzlebensdauern τ_m (A) und τ_1 (B) sind vom spektralen Kanal 1 dargestellt. Die Farbskalierung der Fluoreszenzlebensdauer ist in (A) und (B) jeweils identisch. In jeder Grafik ist das ETDRS-Gitter inklusive den Mittelwerten je Subfeld aufgetragen. Das Fluoreszenzintensitätsbild ist das gemessene Signal vor Binning. Bei den Fluoreszenzlebensdauern τ_1 stimmen schichtbasierter Ansatz und linsen-korrigierter Ansatz in allen Feldern des ETDRS-Gitters gut überein. 82
- Abbildung 6.12 Normierte Histogramme der Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern von beiden spektralen Kanälen für Kontrollen (blau) und Diabetes-Patienten (rot). Histogrammklassen mit signifikanten Unterschieden nach der Holm-Bonferroni-Methode sind hellgrau gefärbt. Die Klasse mit dem höchsten Signifikanzniveau (kleinster p-Wert) ist dunkelgrau gefärbt. Für die Klasse mit dem höchsten Signifikanzniveau ist die zugehörige ROC-Kurve (orange) neben dem Histogramm angegeben. Der cut-off Punkt als besten Kompromiss zwischen Richtig-positiv-Rate und Falsch-positiv-Rate ist hellblau gefärbt. 84
- Abbildung 6.13 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 9,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 11,0% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 7,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 16,8% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2 86
- Abbildung 6.14 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 8,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 6,8% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 11,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 115% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2 87

- Abbildung 6.15 Relative Fehler für den Schichtabstand tc_2 . Der mittlere Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ (A) beträgt 32,2%. Für $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ (B) beträgt der mittlere Fehler 46,4% und für $Q_1 = 75\%$ und $Q_2 = 25\%$ (C) beträgt der mittlere Fehler 59,8%. Der multi-exponentielle Ansatz ist nicht aufgeführt, da dieser keine Schichtabstände berechnen kann..... 88
- Abbildung 6.16 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (B), τ_2 (D) und τ_3 (F), sowie die dazugehörigen Amplituden α_1 (A), α_2 (C) und α_3 (E) für $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 1,8% bzw. 5,0% (α_1), 33,1% bzw. 76,8% (α_2), 23,1% bzw. 50,0% (α_3), 2,6% bzw. 10,2% (τ_1), 17,0% bzw. 26,9% (τ_2) und 10,2% bzw. 13,4% (τ_3). 89
- Abbildung 6.17 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (B), τ_2 (D) und τ_3 (F), sowie die dazugehörigen Amplituden α_1 (A), α_2 (C) und α_3 (E) für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 1,5% bzw. 2,1% (α_1), 17,5% bzw. 12,4% (α_2), 6,8% bzw. 10,0% (α_3), 2,3% bzw. 5,6% (τ_1), 9,1% bzw. 11,1% (τ_2) und 4,3% bzw. 4,4% (τ_3). 90
- Abbildung 6.18 Relative Fehler für den Schichtabstand tc_3 für $Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 25\%$ (A), $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$ (B) sowie $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 25\%$ und $Q_3 = 50\%$ (C). Die mittleren Fehler betragen 82,0% (A), 66,8% (B) und 50,8% (C). Der multi-exponentielle Ansatz ist nicht aufgeführt, da dieser keine Schichtabstände berechnen kann. 91
- Abbildung 6.19 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün). Nur der Schichtabstand tc_2 der mittleren Komponente (α_2 , τ_2) wird zwischen 0 ps und 200 ps variiert. Die übrigen Parameter sind fixiert. . 92
- Abbildung 6.20 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün) für $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ (A) und $Q_1 = Q_2 = 50\%$ (B). In (A) betragen die mittleren Fehler für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 3,3% bzw. 6,2% (α_1), 10,9% bzw. 20,8% (α_2), 85,5% bzw. 23,4% (τ_1), 11,7% bzw. 5,0% (τ_2), 38,1% bzw. 6,6% (Q_1) und 12,7% bzw. 2,2% (Q_2). In (B) betragen die mittleren Fehler für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 5,4% bzw. 6,0% (α_1), 54,0% bzw. 60,2% (α_2), 39,1% bzw. 22,6% (τ_1), 6,8% bzw. 2,5% (τ_2), 32,7% bzw. 32,0% (Q_1) und 32,7% bzw. 32,0% (Q_2). 93
- Abbildung 6.21 Relative Fehler der Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α), Schichtabstände (tc) und relativen Anteile (Q) für multi-exp. Ansatz (rot) und schichtbasierten Ansatz (grün) für $Q_1 = 25\%$, $Q_2 = 50\%$ und $Q_3 = 25\%$. Die mittleren Fehler betragen für den multi-exp. Ansatz bzw. den schichtbasierten Ansatz: 8,3% bzw. 12,9% (α_1), 39,7% bzw. 55,5% (α_2), 105,8% bzw. 142,2% (α_3), 45,0% bzw. 29,3% (τ_1), 5,0% bzw. 5,5% (τ_2), 22,4% bzw. 26,0% (τ_3), 12,8% bzw. 24,3% (Q_1), 13,5% bzw. 14,4% (Q_2) und 18,7% bzw. 19,0% (Q_3). Die mittleren Fehler der Schichtabstände betragen 7,7% (tc_2) und 26,0% (tc_3). 94
- Abbildung 6.22 TCSPC-Daten (schwarz) eines Pixels von Küvette B (spektraler Kanal 2) mono-exponentiell (orange, $\tau = 164$ ps) und bi-exponentiell (grün, $\tau_1 = 89$ ps, $\tau_2 = 534$ ps) approximiert. Die bi-exponentielle Approximation passt deutlich besser zu den Messdaten..... 95
- Abbildung 6.23 Variationskoeffizienten, basierend auf Tabelle 6.1, für beide spektrale Kanäle der Fluoreszenzlebensdauern von drei Wiederholungsmessungen für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern nach mono-exponentieller Approximation (A bis E) bzw. bi-exponentieller Approximation (B (bi-exp)). 96
- Abbildung 6.24 Mittlere Anzahl der detektierten Photonen je Proband, Region und spektralem Kanal (A). Anhand von Proband 7 sind die normierten zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale für die drei segmentierten Regionen sowie für den spektralen Kanal 1 (B) und den spektralen Kanal 2 (C) dargestellt. Bei ca. 2 ns (B) und ca. 6 ns (B, C) sind Artefakte durch Reflexionen an optischen wirksamen Flächen im Strahlengang des Fluoreszenzlichts erkennbar. 97
- Abbildung 6.25 Kombinierte Bland-Altman-Diagramme für alle Amplituden (A) und Fluoreszenzlebensdauern (B). Jedes Diagramm enthält alle segmentierten Regionen (papillo-makuläres Bündel: rot, Fovea centralis: grün, Papille: blau) und beide spektrale Kanäle indem von den Einzeldiagrammen der Mittelwert abgezogen und es auf die Standardabweichung normiert wurde. (B) enthält außerdem eine Regressionsgerade (grau). 100
- Abbildung 6.26 Fluoreszenzlebensdauern der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs im Vergleich zum Referenzwert für den spektralen Kanal 1. Von der bi-exponentiellen Fluoreszenzlebensdauerapproximation bei Küvette B ist nur die kurze Fluoreszenzlebensdauer angegeben..... 102

Abbildung 6.27 Variationskoeffizienten für die Messungen der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.....	102
Abbildung 6.28 Relative Differenzen zum FLIO-System in Bern für die Messungen von der Küvetten A bis E von den drei übrigen FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.....	103
Abbildung 6.29 Mittlere Fluoreszenzlebensdauer im spektralen Kanal 1 aller drei Wiederholungsmessungen vom rechten Auge eines gesunden Probanden. Der äußere Ring (blau), der innere Ring (rot), die zentrale Region (orange) des ETDRS-Gitters sowie die superior Region (grün) sind in Messung 1 markiert. Die Farbskalierung ist zur besseren Vergleichbarkeit für alle drei Messungen identisch.....	105
Abbildung 6.30 Verteilung der Variationskoeffizienten der mittleren Fluoreszenzlebensdauer aus drei Wiederholungsmessungen über die Probanden, aufgeteilt nach rechtem und linkem Auge sowie spektralem Kanal. Der Median ist als rote Linie angegeben. Die Verteilungen der Variationskoeffizienten sind im rechten Auge etwas breiter als im linken Auge. In beiden Augen treten die größten Variationskoeffizienten im spektralen Kanal 1 der zentralen Region des ETDRS-Gitters auf.....	106
Abbildung 6.31 Durchschnittliche Photonennraten je Pixel vom Augenhintergrund vor (orange) und nach Katarakt Operation (grün) sowie für die separate Messung der Augenlinse vor der Operation (violett) von beiden spektralen Kanälen. Die höhere Photonennrate im spektralen Kanal 2 widerspricht der Annahme der stärkeren Fluoreszenz der Augenlinse im spektralen Kanal 1, aber lässt sich möglicherweise durch dessen >2-fache spektrale Bandbreite im Vergleich zum spektralen Kanal 1 sowie ggf. durch einen Detektor mit höherer Empfindlichkeit erklären. Insbesondere im spektralen Kanal 2 sind die Photonennraten vom Fundus nach der Operation deutlich höher. Im spektralen Kanal 1 wird die fehlende Fluoreszenz der Augenlinse scheinbar durch eine erhöhte Fluoreszenz des Augenhintergrunds ausgeglichen.....	108
Abbildung 6.32 FLIO-Daten vom spektralen Kanal 1 vor (links) und nach (rechts) Katarakt Operation im linken Auge von Patient 3. Die Kontrastverbesserung im Fluoreszenzintensitätsbild nach der Operation (B) ist deutlich erkennbar. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer nach der Operation (D) ist deutlich kürzer als vor der Operation (C). Die Farbskalierung ist zum besseren Vergleich in (C) und (D) identisch.....	109
Abbildung 6.33 Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzlebensdauern vom Augenhintergrund (innerer Ring des ETDRS Gitters, Abschnitt 5.6.1) vor (orange), nach Katarakt Operation (grün) und nach Korrektur mit dem linsen-korrigierten Ansatzes (Abschnitt 5.2.2, blau) von beiden spektralen Kanälen. Insbesondere im spektralen Kanal 1 verkürzen sich die mittleren Fluoreszenzlebensdauern nach der Katarakt Operation deutlich. Die Veränderung im spektralen Kanal 2 nach der Operation sind wie erwartet weniger stark ausgeprägt. Die Anwendung des linsen-korrigierten Ansatzes führt zu kürzeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern, welche allerdings noch deutlicher länger als nach der Operation sind. Die Anwendung des linsen-korrigierten Ansatzes war aufgrund verwertbarer Daten nur für Patient 2 möglich.....	110
Abbildung 6.34 Mittelwert und Standardabweichung des Blutzuckerspiegels für die Probanden mit Glukoseprovokation (rot) und die Kontrollgruppe (grün).....	111
Abbildung 6.35 Mittelwert und Standardabweichung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer vom inneren Ring des ETDRS-Gitters für die Probanden unter Glukoseprovokation (rot) und die Kontrollgruppe (grün) in beiden spektralen Kanälen.....	111
Abbildung A.1 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ betragen 2,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 6,2% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 8,2% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 17,9% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2	146
Abbildung A.2 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ betragen 4,7% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 3,6% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 13,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 78,5% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2	147
Abbildung A.3 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 4,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 5,4% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 512% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 137% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2	148
Abbildung A.4 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 5,7% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 3,7% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 17,2% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 138% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2	149

<i>Abbildung A.5 Relative Differenzen zum Referenzwert für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.....</i>	<i>150</i>
<i>Abbildung A.6 Fluoreszenzlebensdauern der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs im Vergleich zum Referenzwert für den spektralen Kanal 2.....</i>	<i>150</i>
<i>Abbildung A.7 Variationskoeffizienten für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.....</i>	<i>151</i>
<i>Abbildung A.8 Relative Differenzen zum Referenzwert für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.....</i>	<i>151</i>
<i>Abbildung A.9 Relative Differenzen zum FLIO-System in Bern für die Messungen von der Küvetten A bis E von den drei übrigen FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.....</i>	<i>151</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 5.1 Überblick über die Compute-Server des BMTI zur verteilten Berechnung. Es stehen insgesamt 132 CPU-Kerne sowie weitere 100 virtuelle CPU-Kerne durch Hyper-Threading (HT) zur Verfügung.</i>	43
<i>Tabelle 5.2 Auflistung der Simulationsparameter für zwei fluoreszierende Schichten.....</i>	54
<i>Tabelle 5.3 Auflistung der Simulationsparameter für drei fluoreszierende Schichten.....</i>	56
<i>Tabelle 5.4 Mischverhältnisse zur Herstellung von Farbstoffen mit spezifischen Fluoreszenzlebensdauern. Die Farbstoffe mit Fluoreszenzlebensdauern von 50 ps und 500 ps werden mittels Eosin Y in Kombination mit Kaliumiodid hergestellt. Der Farbstoff mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 4000 ps wird durch Mischung von Natrium-Fluoreszein und phosphatgepuffertes Salzlösung erreicht.....</i>	59
<i>Tabelle 5.5 Auflistung der Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und Konzentrationen (K) für die experimentellen Messungen mit zwei fluoreszierende Schichten.</i>	61
<i>Tabelle 5.6 Auflistung der Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und Konzentrationen (K) für die experimentellen Messungen mit drei fluoreszierende Schichten.</i>	62
<i>Tabelle 5.7 Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, deren Konzentrationen und Lösungsmittel zum Vergleich von FLIO-Systemen.</i>	62
<i>Tabelle 6.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzlebensdauern der je Küvette segmentierten Region von drei Wiederholungsmessungen für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (Küvetten A bis E). Von der bi-exponentiellen Fluoreszenzlebensdauerapproximation bei Küvette B ist nur die kurze Fluoreszenzlebensdauer angegeben.</i>	96
<i>Tabelle 6.2 Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und relative Anteile (Q) für die drei untersuchten Regionen und beide spektrale Kanäle. Die angegebenen Zahlenwerte setzen sich aus Mittelwert \pm Standardabweichung über alle Messungen zusammen.</i>	98
<i>Tabelle 6.3 Variationskoeffizient gemittelt über alle Probanden für Amplituden (α), Fluoreszenzlebensdauern (τ) und relative Anteile (Q) für die drei untersuchten Regionen und beide spektrale Kanäle. Die Zahlenwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.....</i>	99
<i>Tabelle 6.4 Halbwertsbreiten der verwendeten IRFs für beide spektrale Kanäle. Die Halbwertsbreiten der aus Küvette A extrahierten IRFs sind deutlich breiter als die der von Heidelberg Engineering GmbH in Reflexion gemessenen IRFs.</i>	101
<i>Tabelle 6.5 Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzlebensdauern von drei Wiederholungsmessungen mit dem Weitwinkelobjektiv (55°) für Fluoreszenzfarbstoffe mit fünf verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (Küvetten A bis E). Die Referenzwerte sind angegeben. Die Unterschiede der Fluoreszenzlebensdauern zum Standardobjektiv (30°) sind minimal.</i>	104
<i>Tabelle 6.6 Relative Unterschiede zwischen Standard- und Weitwinkelobjektiv anhand von fünf Fluoreszenzfarbstoffen (Küvetten A bis E) und 3 Wiederholungsmessungen. Mit Ausnahme der bi-exponentiellen Approximation von Küvette B im spektralen Kanal 2 liegen die Beträge der relativen Unterschiede stets unter 10%, häufig unter 5%.</i>	104
<i>Tabelle 6.7 Mittelwerte \pm Standardabweichung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m der zentralen Region (C), des inneren Rings (IR) sowie des äußeren Rings (OR) des ETDRS-Gitters von Weitwinkelobjektiv (55°) und dem Standardobjektiv (30°) in beiden spektralen Kanälen von Messung 1. Zusätzlich sind die p-Werte nach gepaartem t-Test (kursiv) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angegeben. Die signifikanten Unterschiede ($\alpha = 5\%$) sind hervorgehoben.....</i>	107
<i>Tabelle A.1 Parameter für die verwendete Variante des Differential Evolution Algorithmus [113] und für MSimplexBnd, eine Variante des Nelder-Mead Simplex Algorithmus [112]......</i>	145
<i>Tabelle A.2 p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m der Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv über alle Probanden im zentralen Bereich (C), inneren Ring (IR) und äußeren Ring (OR) des ETDRS-Gitters sowie der superior Region (SR). Die signifikanten Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben.....</i>	152

Tabelle A.3 p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m der Messungen mit dem Standardobjektiv über alle Probanden im zentralen Bereich (C), inneren Ring (IR) und äußeren Ring (OR) des ETDRS-Gitters. Die signifikanten Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben. 152

Tabelle A.4 p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m vom inneren Ring des ETDRS-Gitters der Messungen mit Glukoseprovokation und der Kontrollgruppe in beiden spektralen Kanälen. Signifikante Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben..... 153

Tabelle A.5 p-Werte der univariaten ANOVAs für Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α) und relative Anteile (Q) des inneren Rings des ETDRS-Gitters für den Vergleich von Probanden mit Glukoseprovokation und einer Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau 5%) sind hervorgehoben. 154

Anhang

A: Parameter der verwendeten Minimierungsalgorithmen

Tabelle A.1 listet die Parameter für die verwendeten Minimierungsalgorithmen auf. Die Algorithmen sind in FLIMX implementiert und können über eine graphische Benutzeroberfläche konfiguriert werden.

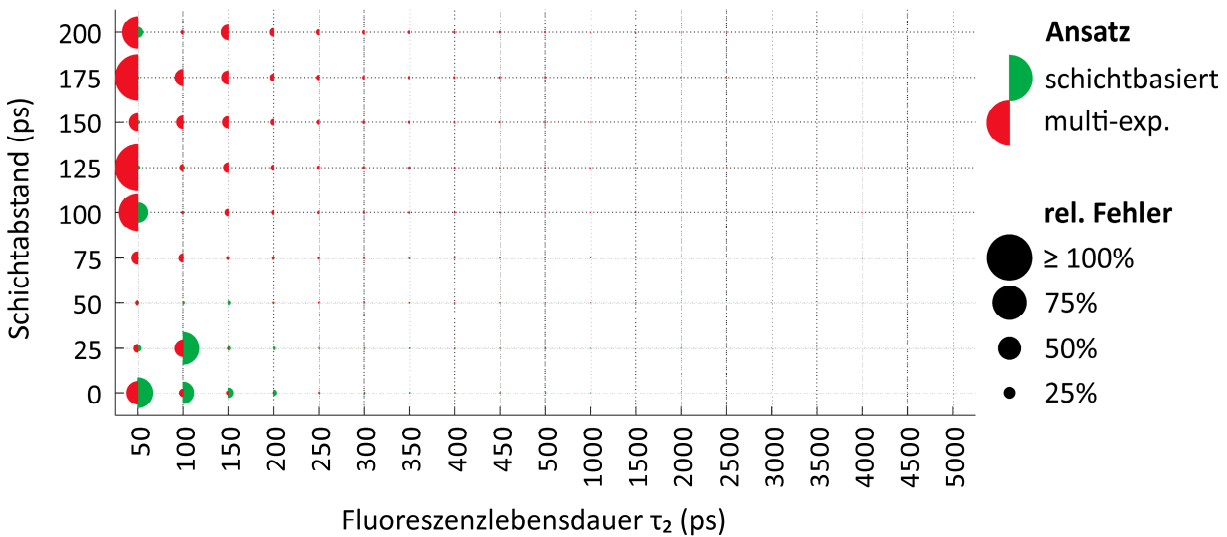
Tabelle A.1 Parameter für die verwendete Variante des Differential Evolution Algorithmus [113] und für MSimplexBnd, eine Variante des Nelder-Mead Simplex Algorithmus [112].

Parameter	Minimierungsalgorithmus	
	Differential Evolution	MSimplexBnd
Max. iterations	1000	300
Max. function evaluations	<i>[keine Angabe]</i>	200
Function value tolerance	0,3	0,001
Multiple seeds	<i>[keine Angabe]</i>	Complete optimization
Crossover probability	0,9	<i>[keine Angabe]</i>
F (initial value)	0,35	<i>[keine Angabe]</i>
Fv (variable value)	0,5	<i>[keine Angabe]</i>
Population members / parameter	10	<i>[keine Angabe]</i>
Strategy	7	<i>[keine Angabe]</i>
Max. re-initializations	10	<i>[keine Angabe]</i>
Max. best value constant	25	<i>[keine Angabe]</i>
Min. function value standard deviation	0,1	<i>[keine Angabe]</i>
Min. parameter standard deviation	0,025	<i>[keine Angabe]</i>
Stop value	0	<i>[keine Angabe]</i>

B: Zusätzliche Ergebnisse: Analyse des schichtbasierten Ansatzes, Simulationen mit zwei Fluorophoren

Weitere Ergebnisse der Simulationen mit zwei Fluorophoren sind analog zu Abschnitt 6.3.1.2 in den Abbildungen A.1 – A.4 aufgeführt, welche die relativen Fehler der Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern für $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ darstellen.

A Relativer Fehler Amplitude α_1 ($Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 50\%$)



B Relativer Fehler Amplitude α_2 ($Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 50\%$)

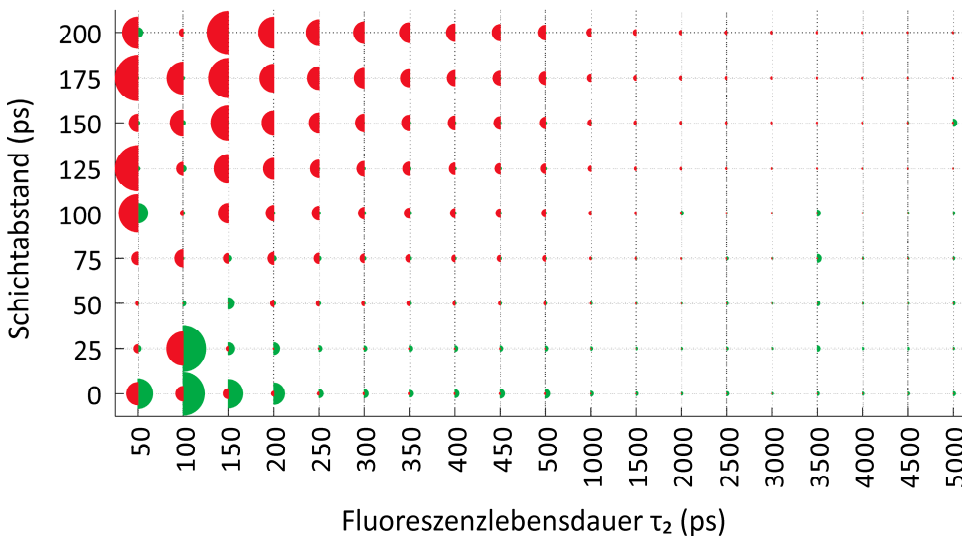


Abbildung A.1 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ betragen 2,6% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 6,2% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 8,2% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 17,9% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2 .

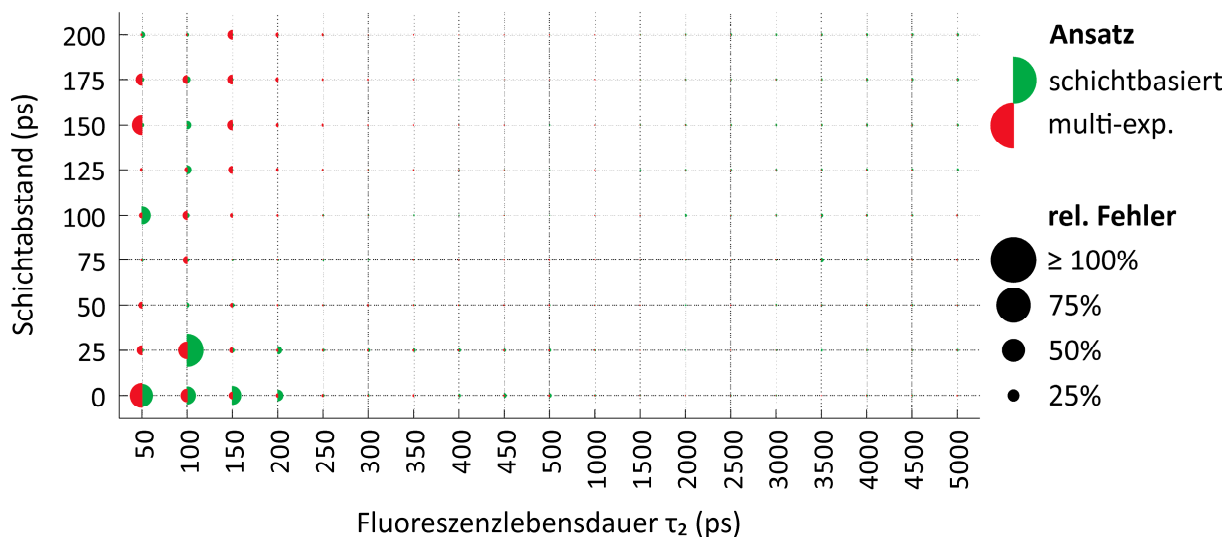
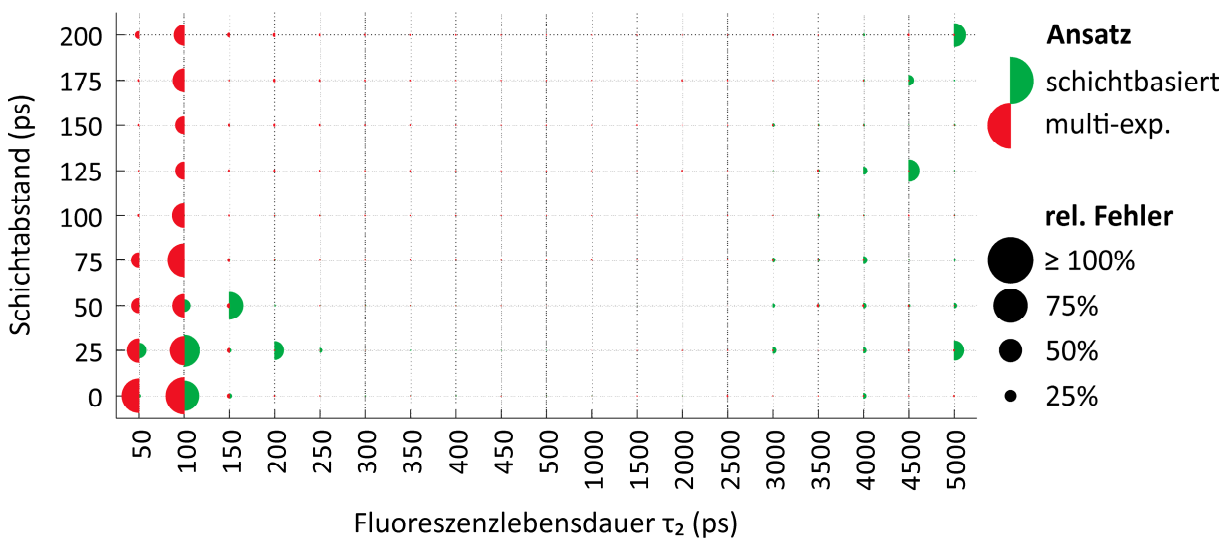
A Relativer Fehler Fluoreszenzlebensdauer τ_1 ($Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 50\%$)

B Relativer Fehler Fluoreszenzlebensdauer τ_2 ($Q_1 = 50\%$, $Q_2 = 50\%$)


Abbildung A.2 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 50\%$ und $Q_2 = 50\%$ betragen 4,7% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 3,6% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 13,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 78,5% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2 .

Abbildungen A.3 und A.4 stellen die relativen Fehler der Amplituden und Fluoreszenzlebensdauern für $Q_1 = 75\%$ und $Q_2 = 25\%$ dar.

A Relativer Fehler Amplitude α_1 ($Q_1 = 75\%$, $Q_2 = 25\%$)



B Relativer Fehler Amplitude α_2 ($Q_1 = 75\%$, $Q_2 = 25\%$)

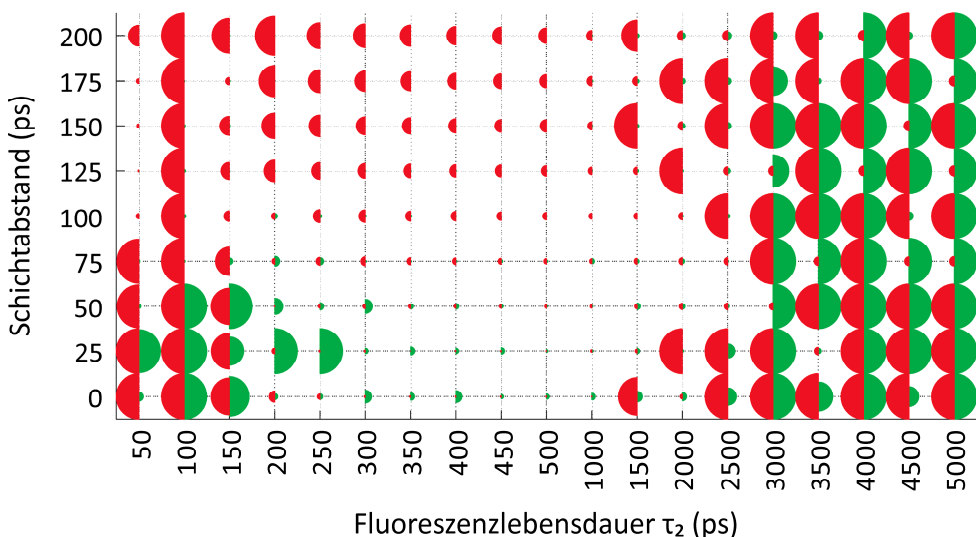


Abbildung A.3 Relative Fehler für die Amplituden α_1 (A) und α_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 4,0% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 5,4% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_1 und 512% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 137% (multi-exp. Ansatz) für Amplitude α_2 .

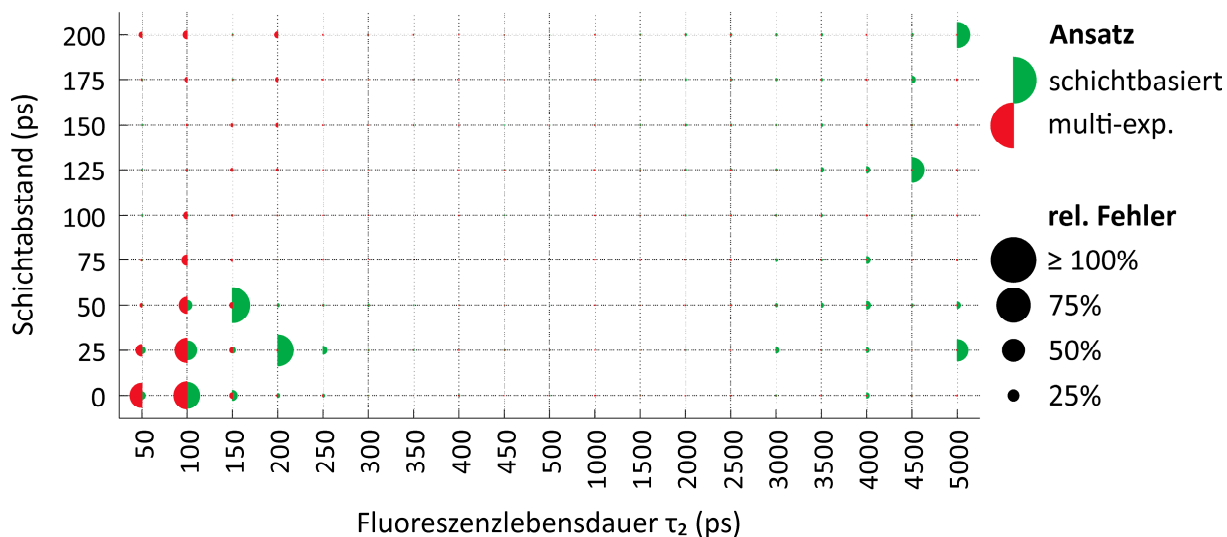
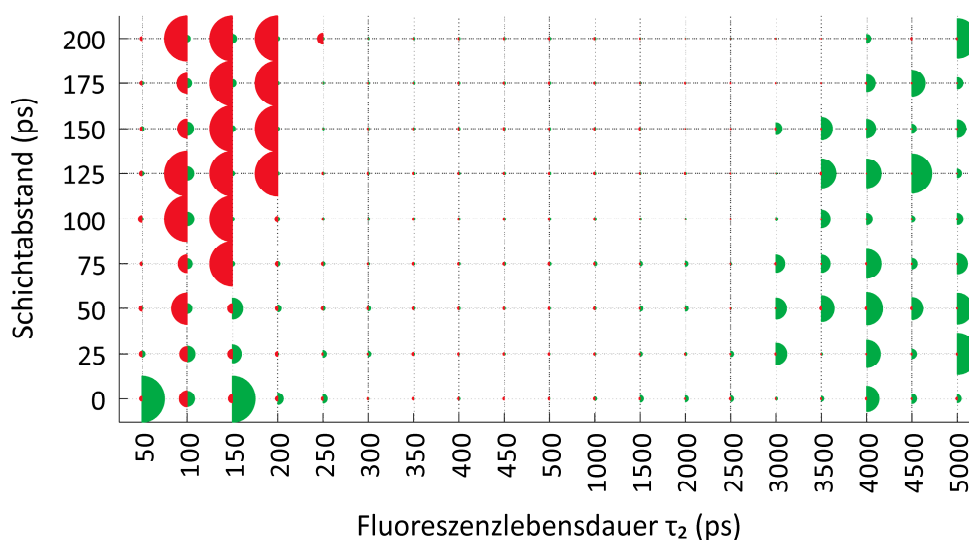
A Relativer Fehler Fluoreszenzlebensdauer τ_1 ($Q_1 = 75\%$, $Q_2 = 25\%$)

B Relativer Fehler Fluoreszenzlebensdauer τ_2 ($Q_1 = 75\%$, $Q_2 = 25\%$)


Abbildung A.4 Relative Fehler für die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 (A) und τ_2 (B). Die mittleren Fehler über alle Kombinationen von $Q_1 = 25\%$ und $Q_2 = 75\%$ betragen 5,7% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 3,7% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_1 und 17,2% (schichtbasierter Ansatz) bzw. 138% (multi-exp. Ansatz) für Fluoreszenzlebensdauer τ_2 .

C: Zusätzliche Ergebnisse: Vergleich unterschiedlicher FLIO-Systeme

Abb. A.5 visualisiert die Differenzen der einzelnen FLIO-Standorte und IRFs zum Referenzwert im spektralen Kanal 1.

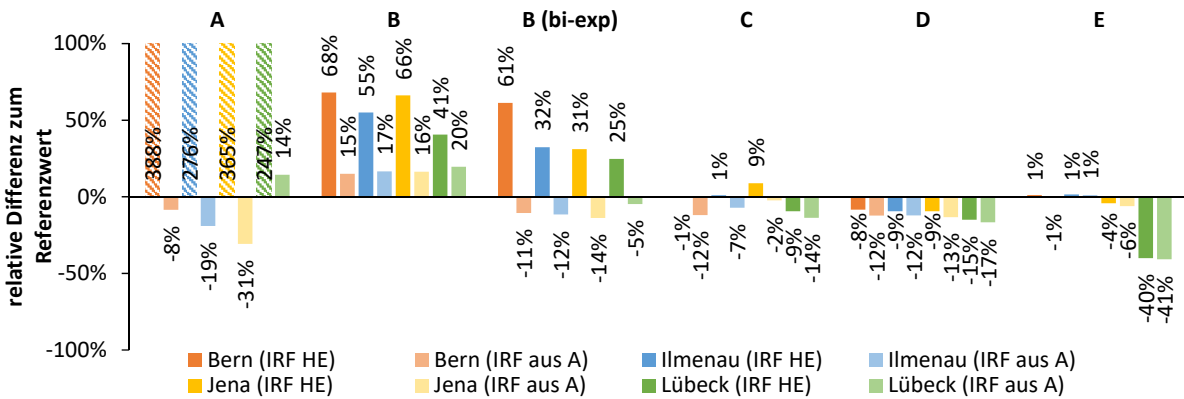


Abbildung A.5 Relative Differenzen zum Referenzwert für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 1.

Abbildungen A.6 bis A.9 stellen die Ergebnisse für den spektralen Kanal 2 analog zu Abschnitt 6.4.2 dar. Die Ergebnisse des spektralen Kanals 2 sind denen des spektralen Kanals 1 sehr ähnlich.

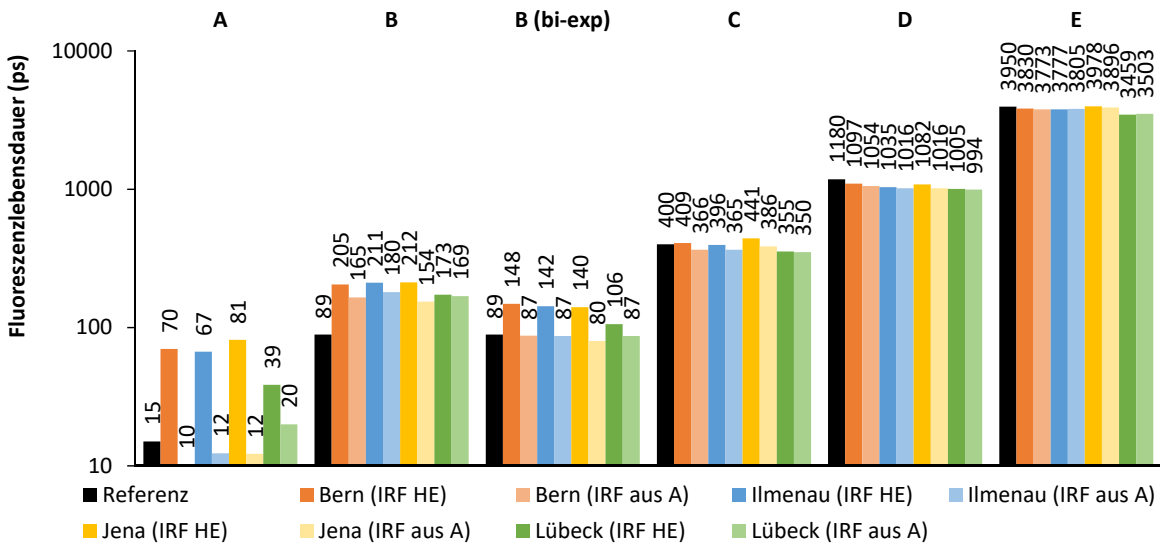


Abbildung A.6 Fluoreszenzlebensdauern der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs im Vergleich zum Referenzwert für den spektralen Kanal 2.

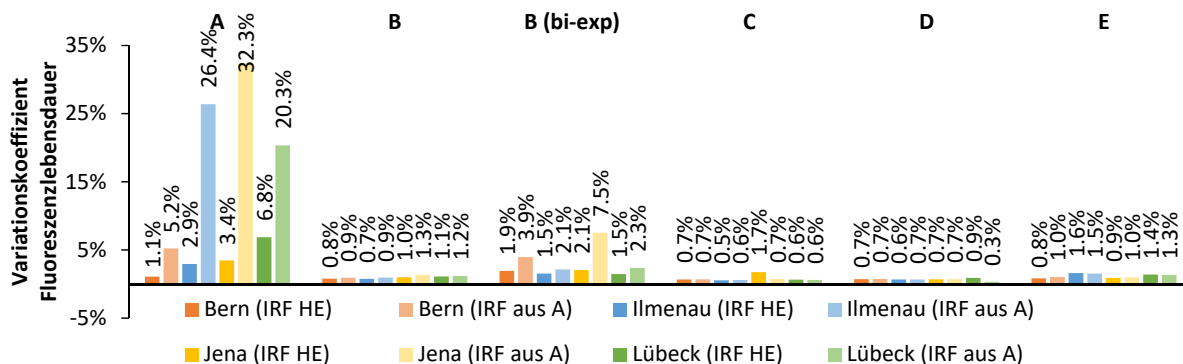


Abbildung A.7 Variationskoeffizienten für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.

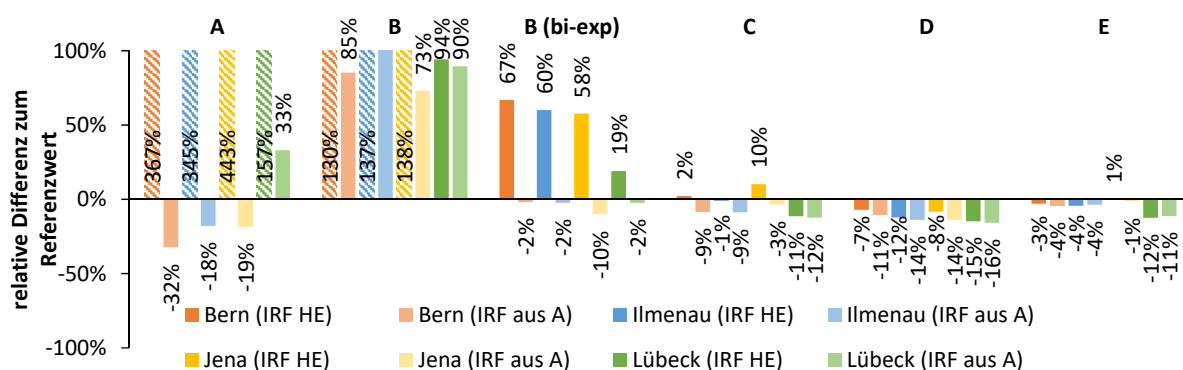


Abbildung A.8 Relative Differenzen zum Referenzwert für die Messungen von der Küvetten A bis E von vier FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.

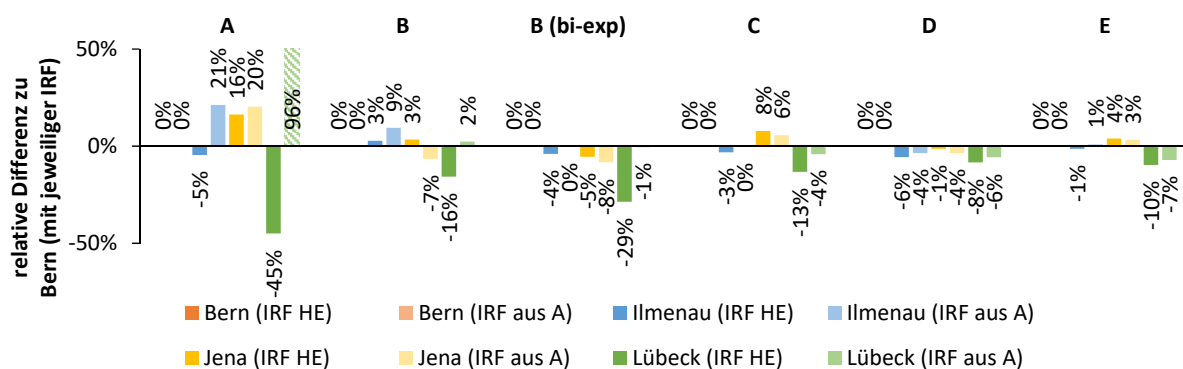


Abbildung A.9 Relative Differenzen zum FLIO-System in Bern für die Messungen von der Küvetten A bis E von den drei übrigen FLIO-Standorten basierend auf je zwei IRFs für den spektralen Kanal 2.

D: Zusätzliche Ergebnisse: Vergleich Standard- und Weitwinkelobjektiv

Tabelle A.2 (Weitwinkelobjektiv) und Tabelle A.3 (Standardobjektiv) listen die Ergebnisse der Normalverteilungstests der mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m von den betrachteten Regionen des ETDRS-Gitters sowie der superior Region (nur Weitwinkelobjektiv) für alle Wiederholungsmessungen, beide spektrale Kanäle und beide Augen auf. Bis auf je eine Messreihe im rechten und linken Auge im spektralen Kanal 1 sind beim Weitwinkelobjektiv alle Daten normalverteilt. Beim Standardobjektiv sind fünf Messreihen nicht normalverteilt.

Tabelle A.2 *p*-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m der Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv über alle Probanden im zentralen Bereich (C), inneren Ring (IR) und äußeren Ring (OR) des ETDRS-Gitters sowie der superior Region (SR). Die signifikanten Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben.

rechtes Auge	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
Messung	1	2	3	1	2	3
C	0,7543	0,6074	0,4098	0,4989	0,7386	0,9890
IR	0,2005	0,4679	0,2351	0,7406	0,5278	0,6158
OR	0,6724	0,7396	0,6439	0,7727	0,3503	0,6141
SR	0,1312	0,0137	0,1074	0,799	0,6446	0,6699
linkes Auge	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
Messung	1	2	3	1	2	3
C	0,4268	0,2412	0,7992	0,4433	0,8062	0,5554
IR	0,5009	0,9603	0,7345	0,4680	0,7097	0,7883
OR	0,9781	0,6904	0,5748	0,7320	0,4205	0,5972
SR	0,7597	0,5651	0,0509	0,2913	0,8058	0,8549

Tabelle A.3 *p*-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m der Messungen mit dem Standardobjektiv über alle Probanden im zentralen Bereich (C), inneren Ring (IR) und äußeren Ring (OR) des ETDRS-Gitters. Die signifikanten Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben.

rechtes Auge	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
Messung	1	2	3	1	2	3
C	0,7101	0,0368	0,5974	0,5405	0,0563	0,0118
IR	0,8683	0,2799	0,6652	0,7579	0,9021	0,0286
OR	0,2716	0,0177	0,1175	0,4178	0,2102	0,2442
linkes Auge	Spektraler Kanal 1			Spektraler Kanal 2		
Messung	1	2	3	1	2	3
C	0,5621	0,0301	0,9599	0,7562	0,3709	0,9255
IR	0,8753	0,2764	0,6909	0,9054	0,4093	0,9086
OR	0,6642	0,3596	0,4442	0,8664	0,9744	0,3217

E: Zusätzliche Ergebnisse: Glukoseprovokation

Tabelle A.4 listet die Ergebnisse der Normalverteilungstests der mittleren Fluoreszenzlebensdauern τ_m vom inneren Ring des ETDRS-Gitters für die Gruppe mit Glukoseprovokation sowie für die Kontrollgruppe zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf. Bis auf zwei Messzeitpunkte bei der Kontrollgruppe sind alle Daten normalverteilt.

Tabelle A.4 *p*-Werte des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung für die mittlere Fluoreszenzlebensdauern τ_m vom inneren Ring des ETDRS-Gitters der Messungen mit Glukoseprovokation und der Kontrollgruppe in beiden spektralen Kanälen. Signifikante Abweichungen (Signifikanzniveau 5%) von der Normalverteilung sind hervorgehoben.

Zeit	Glukoseprovokation		Kontrollgruppe	
	Spektraler Kanal 1	Spektraler Kanal 2	Spektraler Kanal 1	Spektraler Kanal 2
0 min	0,5703	0,8790	0,1199	0,0391
15 min	0,4143	0,6884	0,0319	0,0085
30 min	0,2425	0,3429	0,4519	0,6268
45 min	0,5816	0,6832	0,4643	0,7620
60 min	0,8721	0,5626	0,9347	0,8450
75 min	0,8551	0,5974	0,9257	0,7135
90 min	0,4258	0,6954	0,7901	0,1266

Tabelle A.5 listet die p -Werte für die univariaten ANOVAs (bonferronikorrigierte paarweise Post-Hoc Tests) für die signifikanten Faktoren der MANOVA auf.

Tabelle A.5 p -Werte der univariaten ANOVAs für Fluoreszenzlebensdauern (τ), Amplituden (α) und relative Anteile (Q) des inneren Rings des ETDRS-Gitters für den Vergleich von Probanden mit Glukoseprovokation und einer Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau 5%) sind hervorgehoben.

	FLIM Parameter	p -Wert
Provokation	τ_m	0,703
	α_1	0,617
	α_2	0,798
	α_3	0,141
	τ_1	0,925
	τ_2	0,016
	τ_3	0,007
	Q_1	0,363
	Q_2	0,213
	Q_3	0,860
Spektraler Kanal	τ_m	0,000
	α_1	0,000
	α_2	0,000
	α_3	0,000
	τ_1	0,000
	τ_2	0,000
	τ_3	0,000
	Q_1	0,000
	Q_2	0,000
	Q_3	0,000
Provokation x Spektraler Kanal	τ_m	0,499
	α_1	0,823
	α_2	0,855
	α_3	0,713
	τ_1	0,143
	τ_2	0,113
	τ_3	0,283
	Q_1	0,494
	Q_2	0,826
	Q_3	0,335

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Patente

Offengelegt

Matthias Klemm, Jens Haueisen, Dietrich Schweitzer

„Verfahren zur Bestimmung und Auswertung zeitaufgelöster Fluoreszenz- oder Reflexionsbilder an dreidimensionalen Objekten“

DE 10 2014 017 006 A1 2016.05.19

Eingereicht

Dietrich Schweitzer, Jens Haueisen, Matthias Klemm

„Anordnung und Verfahren zur simultanen Messung der Fluoreszenz einzelner Schichten in einem Schichtsystem, beispielsweise dem Augenhintergrund“

Dietrich Schweitzer, Jens Haueisen, Matthias Klemm

„Anordnung und Verfahren zur Elimination des Einflusses und gesonderten Auswertung vorgelagerter Schichten bei spektralen Messungen, vorzugsweise der zeitaufgelösten Fluoreszenz, in geschichteten Objekten, vorzugsweise dem Auge, mittels konfokalen Scanning Laser Systemen“

Beiträge in Fachzeitschriften

- [1] **M. Klemm**, J. Haueisen, and G. Ivanova, "Independent component analysis: comparison of algorithms for the investigation of surface electrical brain activity," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 47, pp. 413-423, Apr 2009.
- [2] **M. Klemm**, A. Dietzel, J. Haueisen, E. Nagel, M. Hammer, and D. Schweitzer, "Repeatability of Autofluorescence Lifetime Imaging at the Human Fundus in Healthy Volunteers," *Current Eye Research*, vol. 38, pp. 793-801, Jul 2013.
- [3] **M. Klemm**, D. Schweitzer, S. Peters, L. Sauer, M. Hammer, and J. Haueisen, "FLIMX: A Software Package to Determine and Analyze the Fluorescence Lifetime in Time-Resolved Fluorescence Data from the Human Eye," *PLoS One*, vol. 10, p. e0131640, 2015.
- [4] **M. Klemm**, J. Blum, D. Link, M. Hammer, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Combination of confocal principle and aperture stop separation improves suppression of crystalline lens fluorescence in an eye model," *Biomedical Optics Express*, vol. 7, pp. 3198-3210, 2016/09/01 2016.
- [5] D. Schweitzer, S. Quick, S. Schenke, **M. Klemm**, S. Gehlert, M. Hammer, *et al.*, "Comparison of parameters of time-resolved autofluorescence between healthy subjects and patients suffering from early AMD," *Ophthalmologie*, vol. 106, pp. 714-722, Aug 2009.
- [6] D. Schweitzer, S. Quick, **M. Klemm**, M. Hammer, S. Jentsch, and J. Dawczynski, "Time-resolved autofluorescence in retinal vascular occlusions," *Ophthalmologie*, vol. 107, pp. 1145-1152, Dec 2010.
- [7] D. Schweitzer, L. Deutsch, **M. Klemm**, S. Jentsch, M. Hammer, S. Peters, *et al.*, "Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in type 2 diabetic patients who have no signs of diabetic retinopathy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, p. 061106, 2015.
- [8] L. Sauer, S. Peters, J. Schmidt, D. Schweitzer, **M. Klemm**, L. Ramm, *et al.*, "Monitoring macular pigment changes in macular holes using fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy," *Acta Ophthalmologica*, pp. n/a-n/a, 2016.
- [9] J. Schmidt, S. Peters, L. Sauer, D. Schweitzer, **M. Klemm**, R. Augsten, *et al.*, "Fundus autofluorescence lifetimes are increased in non-proliferative diabetic retinopathy," *Acta Ophthalmologica*, pp. n/a-n/a, 2016.
- [10] S. Peters, M. Griebisch, **M. Klemm**, J. Haueisen, and M. Hammer, "Hydrogen peroxide modulates energy metabolism and oxidative stress in cultures of permanent human Muller cells MIO-M1," *J Biophotonics*, pp. n/a-n/a, Nov 29 2016.
- [11] M. Griebisch, **M. Klemm**, J. Haueisen, and M. Hammer, "Hypoxia-induced redox signalling in Müller cells," *Acta Ophthalmologica*, pp. n/a-n/a, 2016.

Konferenzbeiträge

- [12] D. Schweitzer, S. Quick, **M. Klemm**, M. Hammer, S. Jentsch, J. Dawczynski, *et al.*, "Clinical results of fluorescence lifetime imaging in ophthalmology," *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 7368, pp. 736802-736813, 2009.
- [13] D. Schweitzer, **M. Klemm**, M. Hammer, S. Jentsch, and F. Schweitzer, "Method for simultaneous detection of functionality and tomography," *Clinical and Biomedical Spectroscopy*, vol. 7368, p. 736804, 2009/06/14 2009.
- [14] D. Schweitzer, **M. Klemm**, S. Quick, F. Schweitzer, M. Hammer, and S. Jentsch, "New Method for Combination of Functional and Geometric Information Based on Time-Resolved Autofluorescence Measurements," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 50, pp. 1398-1398, 2009.
- [15] M. Hammer, S. Quick, **M. Klemm**, S. Schenke, N. Mata, A. Eitner, *et al.*, "In vivo and in vitro investigations of retinal fluorophores in age-related macular degeneration by fluorescence lifetime imaging," 2009, pp. 71832S-71832S-12.
- [16] M. Hammer, S. Quick, **M. Klemm**, S. Schenke, N. Mata, A. Eitner, *et al.*, "In-vivo and in-vitro investigations of retinal fluorophores in age - related macular degeneration by fluorescence lifetime imaging," Workshop on Advanced Multiphoton and FLIM Techniques, Berkeley, 2009.
- [17] **M. Klemm** und A. Dietzel, "Bildgebung und Spectral Imaging an der Netzhaut," NEMO-SpectroNet Kollaboration Forum, Ilmenau, 2009.
- [18] **M. Klemm**, A. Dietzel, E. Nagel, D. Schweitzer, U. Graichen, and J. Haeisen, "Statistical Analysis of Reproducibility of Fluorescence Decay Histograms at the Fundus," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, pp. 2293-2293, 2010.
- [19] **M. Klemm** und D. Schweitzer, "A layer based approach for multi-exponential fitting of autofluorescence data in the human eye," Symposium FLIM2010, Ilmenau, 2010.
- [20] **M. Klemm**, A. Dietzel, E. Nagel, D. Schweitzer, U. Graichen, and J. Haeisen, "Reproducibility of Ophthalmic Lifetime Mapper measurements," Symposium FLIM2010, Ilmenau, 2010.
- [21] D. Schweitzer, S. Schenke, **M. Klemm**, S. Quick, S. Jentsch, M. Hammer, *et al.*, "Fluorescence Lifetime Imaging in Ophthalmoscopy," Symposium FLIM2010, Ilmenau, 2010.
- [22] M. Hammer, S. Peters, S. Quick, L. Deutsch, **M. Klemm**, S. Jentsch, *et al.*, "Functional imaging at the ocular fundus by FLIM-first clinical results," Workshop on Advanced Multiphoton and FLIM Techniques, Berkeley, 2010.
- [23] D. Schweitzer, S. Quick, **M. Klemm**, S. Jentsch, M. Hammer, and J. Dawczynski, "Clinical Application of fluorescence lifetime imaging at the eye," Workshop on advanced microscopic imaging methods, Shenzhen, 2010.
- [24] **M. Klemm** and D. Schweitzer, "Multi-exponential Approximation Adapted To Autofluorescence Lifetime Imaging (FLIM) Of The Human Eye," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 52, pp. 4051-4051, 2011.
- [25] D. Schweitzer, L. Deutsch, **M. Klemm**, S. Jentsch, M. Hammer, J. Dawczynski, *et al.*, "Detection Of Early Metabolic Alterations In Diabetes Mellitus By Time-resolved Fundus Autofluorescence (FLIM)," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 52, pp. 1753-1753, 2011.
- [26] L. Deutsch, **M. Klemm**, J. Dawczynski, U. A. Müller, C. Kloos, S. Jentsch, *et al.*, "Detektion früher metabolischer Veränderungen am Fundus bei Diabetes mellitus," Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) Kongress, Berlin, 2011.

- [27] T. Behnke, E. M. Laux, K. Hoffmann, S. Peters, J. Haueisen, **M. Klemm**, *et al.*, "Simple Approaches to Fluorescence Lifetime Standards Using Dye-Quencher Pairs," in *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik* vol. 57, ed, 2012, p. 613.
- [28] **M. Klemm**, A. Dietzel, D. Schweitzer, and J. Haueisen, "Analyse von Autofluorescence Lifetime Imaging Ophthalmology (FLIO) Daten mittels Stretched Exponentials Methode," Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik, Jena, 2012.
- [29] A. Dietzel, **M. Klemm**, E. Nagel, and J. Haueisen, "Autofluorescence lifetime imaging – A repeatability study on physiological human retinas," Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik, Jena, 2012.
- [30] K. Wildner, S. Jentsch, **M. Klemm**, D. Schweitzer, R. Augsten, and M. Hammer, "Zeitaufgelöste Autofluoreszenz: Vergleich zwischen Gesunden und Patienten mit altersbezogener Makuladegeneration (AMD) bei Pseudophakie," Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) Kongress, Berlin, 2012.
- [31] **M. Klemm**, "Alternative evaluation algorithms for FLIM-measurements of the retina," FLIO Workshop, Heidelberg, 2012.
- [32] **M. Klemm**, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Detection of metabolic changes at the human fundus in patients with diabetes mellitus without diabetic retinopathy," World Ophthalmology Congress, Tokyo, 2014.
- [33] **M. Klemm**, D. Baumgarten, E. Supriyanto, and D. Schweitzer, "Investigation of the Stretched Exponentials Method for an Application in Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)," Conference on Biomedical Engineering and Sciences, Miri, 2014.
- [34] **M. Klemm**, "FLIO – Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy," 23. Treffen des Arbeitskreises Ophthalmologische Optik, Ilmenau, 2014.
- [35] **M. Klemm** und D. Schweitzer, "An adaptive binning approach in auto-fluorescence lifetime ophthalmology (FLIO) applied to healthy volunteers and patients with diabetes mellitus without diabetic retinopathy," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 55, pp. 209-209, 2014.
- [36] N. K. Hoo, **M. Klemm**, E. Supriyanto, and D. Baumgarten, "Effects of excitation coil configurations in magnetorelaxometry imaging of magnetic nanoparticles," in *2014 IEEE Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES)*, 2014, pp. 715-718.
- [37] **M. Klemm**, "FLIO – Lebensdauerapproximation und -analyse," FLIO Workshop, Bern, 2014.
- [38] **M. Klemm**, E. Nagel, A. Dietzel, K. W. Lai, E. Supriyanto, and D. Schweitzer, "Agreement Between Eyes in Wide-Field Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy Measurements at the Human Retina in Healthy Volunteers," in *International Conference for Innovation in Biomedical Engineering and Life Sciences*. vol. 56, F. Ibrahim, J. Usman, M. S. Mohktar, and M. Y. Ahmad, Eds., ed: Springer Singapore, 2015, pp. 298-301.
- [39] **M. Klemm**, D. Schweitzer, and J. Haueisen, "Limits and abilities of a fluorescence lifetime based approach to separate two fluorescent layers," Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Lübeck, 2015.
- [40] **M. Klemm**, A. Dietzel, E. Nagel, and D. Schweitzer, "Repeatability of wide-field autofluorescence lifetime imaging at the human retina in healthy volunteers," *Acta Ophthalmologica*, vol. 93, 2015.
- [41] **M. Klemm** und D. Schweitzer, "Influence of the blood glucose level on FLIO measurements at the human retina in healthy volunteers," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, pp. 390-390, 2015.

-
- [42] S. Freitag, A. Hunold, **M. Klemm**, and J. Haueisen, "Simultaneous dynamic retinal vessel analysis and pulsed anodal transcranial electrical stimulation at the eye," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, pp. 760-760, 2015.
- [43] S. Freitag, A. Hunold, **M. Klemm**, G. Enders, E. Nagel, and J. Haueisen, "Effects of pulsed anodal transcranial electrical stimulation at the eye," Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Lübeck, 2015.
- [44] O. Titova, S. Freitag, A. Hunold, **M. Klemm**, and J. Haueisen, "Effects of anodal transcranial direct current stimulation at the eye on the electroretinogram," Second International Scientific Symposium "Sense. Enable. SPITSE.", St. Petersburg, 2015.
- [45] **M. Klemm**, E. Nagel, D. Schweitzer, S. Schramm, and J. Haueisen, "Effects of short term changes in the blood glucose level on the autofluorescence lifetime of the human retina in healthy volunteers," in *Ophthalmic Technologies XXVI*, SPIE Photonics West, San Francisco, 2016, pp. 96931R-96931R-5.
- [46] S. Schramm, P. Schikowski, E. Lerm, A. Kaeding, **M. Klemm**, J. Haueisen, *et al.*, "Objective straylight assessment of the human eye with a novel device," 2016, pp. 96931K-96931K-6.
- [47] **M. Klemm**, A. Dietzel, E. Nagel, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Comparison of 30° and 55° autofluorescence lifetime images in healthy volunteers," World Ophthalmology Congress, Guadalajara, 2016.
- [48] **M. Klemm**, J. Blum, D. Link, S. Klee, J. Haueisen, and D. Schweitzer, "Improved autofluorescence lifetime ophthalmoscopy image quality based on suppression of the crystalline lens fluorescence," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 1709-1709, 2016.
- [49] L. Sauer, S. Peters, J. Schmidt, D. Schweitzer, **M. Klemm**, R. Augsten, *et al.*, "Monitoring macular pigment in geographic atrophy using FLIO," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 1707-1707, 2016.
- [50] M. Hammer, J. Schmidt, S. Peters, L. Sauer, N. Müller, **M. Klemm**, *et al.*, "Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy in Diabetic Retinopathy," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 3405-3405, 2016.
- [51] S. Freitag, A. Hunold, **M. Klemm**, S. Klee, S. Rieger, D. Link, *et al.*, "Anodal direct current stimulation at the eye evokes temporary variations in retinal vessel response to flicker," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, pp. 4620-4620, 2016.
- [52] S. Freitag, A. Hunold, **M. Klemm**, and J. Haueisen, "Variation der retinalen Gefäßreaktion während elektrischer Stimulation am Auge," Innovationen bei der Erfassung und Analyse bioelektrischer und biomagnetischer Signale: Workshop Biosignalverarbeitung 2016, Berlin, 2016.

Thesen

- FLIMX ist ein für die Ophthalmologie optimiertes Softwarepaket mit angepasster Datenauswertung, Simulation und Präsentation von FLIO-Messungen, insbesondere für Gruppen von Probanden.
- Die vorgestellten Algorithmen zur Detektion und Behandlung von Artefakten in FLIO-Daten verbessern die Fluoreszenzlebensdauerapproximation.
- Das entwickelte adaptive Binning-Verfahren ermöglicht den optimalen Kompromiss aus Ortsauflösung und Qualität des zeitaufgelösten Fluoreszenzsignals.
- Der erarbeitete linsen-korrigierte Ansatz kann auf Basis einer separaten FLIO-Messung der natürlichen Augenlinsen deren Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds reduzieren.
- Der schichtbasierte-Ansatz kann in FLIM-Daten mit einer Zeitauflösung von 12,2 ps, in Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden, fluoreszierende Schichten mit einem Abstand von ≥ 25 ps separieren.
- Die vorgeschlagene Interpolation der Zeitverschiebung je Pixel, basierend auf der Fluoreszenzlebensdauerapproximation mit grober Ortsauflösung, führt zu geringeren Fehlern der Fluoreszenzlebensdauern als eine pixelweise Berechnung der Zeitverschiebung oder die Fixierung der Zeitverschiebung auf einen Wert aus dem zentralen Bereich des Bilds.
- FLIO-Geräte an unterschiedlichen Standorten liefern größtenteils vergleichbare Fluoreszenzlebensdauern.
- FLIO-Messungen mit dem Standardobjektiv besitzen sowohl in Farbstoffen als auch in Probanden eine gute Wiederholbarkeit.
- FLIO-Messungen mit dem Weitwinkelobjektiv besitzen sowohl in Farbstoffen als auch in Probanden eine gute Wiederholbarkeit.
- FLIO-Messungen des Weitwinkelobjektivs unterscheiden sich signifikant von denen des Standardobjektivs, insbesondere im spektralen Kanal 1.
- Die Messmethode der zur Fluoreszenzlebensdauerapproximation verwendeten instrument response function hat einen erheblichen Einfluss auf Fluoreszenzlebensdauern ≤ 400 ps.
- Die Fluoreszenz der natürlichen Augenlinse beeinträchtigt die Fluoreszenzlebensdauern des Augenhintergrunds.
- Der Blutzuckerspiegel von Probanden hat keinen Einfluss auf die FLIO-Messung.
- Bei mehreren FLIO-Messungen in kurzer zeitlicher Folge (15 Minuten) über einen Zeitraum von 90 Minuten kommt es zu signifikant kürzeren mittleren Fluoreszenzlebensdauern im Vergleich zur ersten Messung.