

## „Blue Laser Autofluoreszenz“ in der Retinadiagnostik

Steffen Schmitz-Valckenberg, Monika Fleckenstein, Frank G. Holz  
Univ.-Augenklinik Bonn

### Natürlich oder pathologisch auftretende Fluoreszenz wird erfasst

Die Fundusautofluoreszenz (FAF) ist ein Bildgebungsverfahren zum metabolischen Mapping von intrinsischen Fluorophoren der Retina. Im Gegensatz zur gewöhnlichen Farbfundusphotographie beruht die FAF-Darstellung nicht auf der Detektion von reflektiertem Licht der Netzhaut, sondern auf Fluoreszenztechniken. Als Anregung dient hierbei energiereiches, kurzwelliges blaues Licht, welches von natürlich oder pathologisch vorkommenden Substanzen mit Eigenfluoreszenzeigenschaften am Augenhintergrund absorbiert und in energieärmeres, langwelligeres Licht umgewandelt wird. Sperrfilter innerhalb des Aufnahmegerätes stellen sicher, dass nur dieses generierte Fluoreszenzlicht den Detektor erreicht, während das ebenfalls zurückkommende Reflektionslicht geblockt wird. Zwei wesentliche Unterschiede grenzen das FAF-Verfahren von der Fluoreszenzangiographie ab:

1. Die FAF beruht nicht auf der Gabe von Farbstoffen (wie Fluoreszein oder Indocyaningrün), sondern stellt natürlich oder pathologisch vorkommende fluoreszierende Substanzen des hinteren Augenpols dar.
2. Die Intensität des FAF-Signals ist deutlich geringer.

Damit ist die FAF ein vollkommen nicht-invasives Bildgebungsverfahren, erfordert jedoch ein hochempfindliches Aufnahmesystem. Die Hauptquelle der FAF sind Fluorophore wie A2-E (N-retinylidene-N-retinylethanolamin) als Bestandteil von Lipofuszin. Dieses wird im retinalen Pigmentepithel (RPE) als Abfallprodukt des unvollständigen Abbaus von Photorezeptoraußensegmenten akkumuliert [2]. Im Gegensatz zu anderen Fundusaufnahmetechniken liegt die besondere klinische Bedeutung der FAF-Bildgebung in der Möglichkeit, metabolische und krankhafte Veränderungen auf der Ebene des Photorezeptor/RPE-Komplex frühzeitig und selektiv zu erfassen.

### FAF-Darstellung einfach, sekunden- schnell und nicht-invasiv möglich

Die Darstellung der FAF in der klinischen Routineanwendung ist einfach und in wenigen Sekunden nicht-invasiv möglich. Das konfokale Scanning Laser Ophthalmoskop (cSLO) ist besonderes für die FAF-Bildgebung geeignet. Die konfokale Optik gewährleistet, dass nur Fluoreszenzlicht aus der in der Netzhaut liegenden Fokalebene den Detektor erreicht. Der Einfluss von Streulicht und von außerhalb der Fokalebene generiertem Fluoreszenzlicht (besonders Störun-

gen durch die Augenlinse) wird minimiert. Zudem führt das schnelle Abtasten des Augenhintergrundes mit dem Laserscanner zu einer deutlich geringeren Lichtbelastung als bei einer gewöhnlichen Funduskamera. Dadurch können längere Bildsequenzen aufgenommen und daraus besonders kontrastreiche und detailtreue gemittelte Bildern (sog. mean images) berechnet werden. Die einzigen derzeit kommerziell erhältlichen konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskope zur FAF-Darstellung sind der Heidelberg Retina Angiograph (HRA) und die BluePeak™ Modelle der Spectralis® Produktfamilie der Firma Heidelberg Engineering.

### FAF-Darstellung als Grauwertbild

Eine FAF-Aufnahme zeigt die relative Verteilung von FAF-Intensitäten in Form eines Grauwertbildes. Hohe Intensitäten werden weiß, niedrige schwarz dargestellt. Bei der Auswertung von FAF-Aufnahmen sollte grundsätzlich jede Veränderung vom Normalbefund (Abbildung 1) erkannt und deren mögliche Ursache identifiziert werden. Merkmale eines Normalbefundes sind:

1. Der Sehnervenkopf erscheint dunkel, da hier RPE und so Lipofuszin fehlen.

2. Retinale Blutgefäße erscheinen ebenfalls dunkel, da Blutbestandteile das im RPE entstehende Autofluoreszenzlicht absorbieren.

3. Im Zentrum der Makula wird das FAF-Signal physiologisch durch luteales gelbes Pigment (Lutein und Zexanthin) maskiert. Gleichzeitig ist die Lipofuszinichte und damit die FAF-Intensität im Netzhautzentrum niedriger.

Außerhalb dieser drei anatomischen Landmarken erscheint das FAF-Signal weitestgehend gleich über den hinteren Augenpol verteilt. Jede Veränderung wird relativ zu diesem Hintergrundsignal eingeteilt. So führt die exzessive Akkumulation oder Verlust von Lipofuszin/RPE-Zellen zu einem relativ erhöhten bzw. relativ erniedrigtem FAF-Signal. Veränderungen der physiologischen Ablagerung von lutealem Pigment im Zentrum der Makula (z. B. bei Makulaödem oder Schisis) führen ebenfalls zu Variationen

von FAF-Intensitäten. Letztendlich ist die Möglichkeit der Identifizierung von FAF-Veränderungen maßgeblich von der Bildqualität abhängig. Neben technisch bedingten Artefakten (z. B. falsche Ausrichtung der Kamera), können vor allem Trübungen der Linse oder des Glaskörpers zu deutlichen Schwierigkeiten bei der Interpretation führen [3].

### FAF-Diagnostik: Besonders hilfreich bei unklaren Sehstörungen, AMD und erblichen Netzhauterkrankungen

Metabolische Veränderungen auf der Ebene der Photorezeptoren/RPE-Zellschicht in Frühstadien von makulären und diffusen Netzhautdystrophien können teilweise nicht mit Funduskopie oder anderen Routinebildgebungsverfahren wie Fluoreszenzangiographie detektiert werden. Die FAF-Diagnostik ist besonders

hilfreich bei der Untersuchung von Patienten mit unklaren Sehstörungen oder einer positiven Familienanamnese bei erblichen Netzhauterkrankungen. Bei früher altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) erlaubt die FAF die Visualisierung von Veränderungen auf der Ebene der äußeren Netzhaut, die in der Funduskopie normal erscheinen. Retikuläre Drusen sind hierbei besonders gut mittels FAF zu identifizieren. Auch im Frühstadium von idiopathischen juxtafoveolaren retinalen Telangiectasien Typ 2a werden mittels FAF-typische Veränderungen, die auf einen Verlust von Makulapigment zurückzuführen sind, detektiert (Abbildung 2) [4].

### Phänotypisierung: Charakterische FAF-Muster bei Netzhauterkrankungen

Bei verschiedenen Netzhauterkrankungen treten Änderungen der FAF-

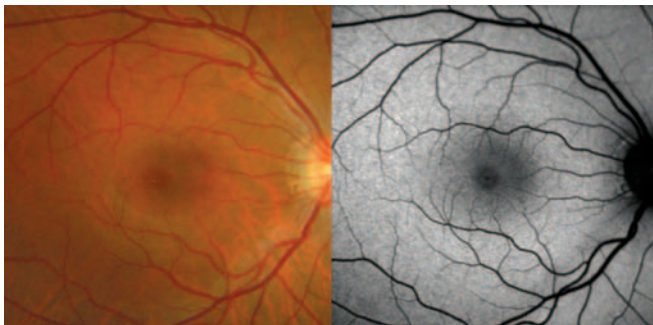


Abbildung 1: Fundusphotographie und Blue Laser Fundusautofluoreszenz im gesunden Auge

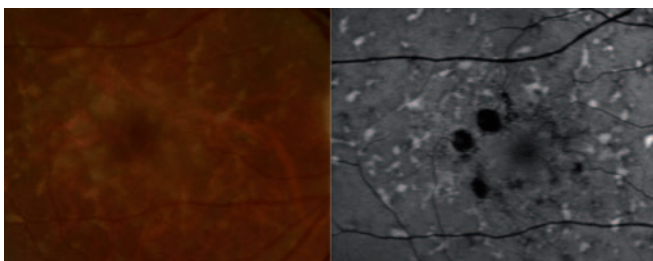


Abbildung 3: Beim Morbus Stargardt sind Fundusveränderung wesentlich besser mit der Fundusautofluoreszenz im Vergleich zur Farbfundusphotographie erkennbar.

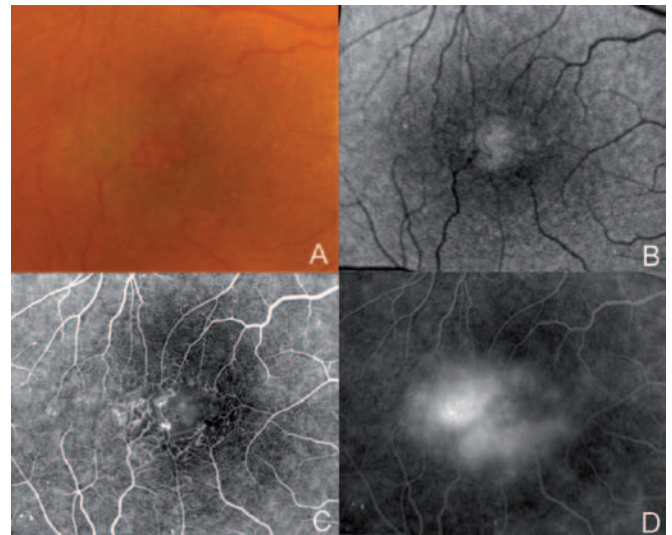


Abbildung 2: Im Frühstadium bei idiopathischen juxtafoveolaren Telangiectasien Type 2a (MacTel) sind keine wesentlichen Veränderungen in Farbfundusphotographie (A) zu erkennen. Die Fundusautofluoreszenz (B) zeigt im Gegensatz zum Normalbefund (Abbildung 1) deutliche erhöhte Intensitäten im Makulazentrum auf. Die Fluoreszenzangiographie (C und D) bestätigt die Diagnose.



Intensitäten in der äußeren Netzhaut wesentlich deutlicher auf als strukturelle oder optische Veränderungen, die mit anderen Bildgebungsverfahren betrachtet werden [5, 6]. Dies ist hilfreich zum Beispiel bei der Diagnostik von hereditären retinalen Erkrankungen wie Morbus Stargardt (Abbildung 3), vitelliforme makuläre oder Musterdystrophien und kann zur Korrelation mit spezifischen Gendefekten verwendet werden. Bei AMD können charakteristischen FAF-Muster sowohl bei früher als auch bei fortgeschrittener atrophischer Form mittels FAF-Diagnostik klassifiziert werden. Hiermit gelingt auch die frühzeitige Identifizierung von spät auftretenden („late-onset“) Makuladystrophien, die oft zunächst als Altersveränderungen eingeordnet werden.

**Verwendung als Krankheitsmarker:  
Gibt Auskunft über Progression und  
Therapiechancen**

FAF-Veränderungen, die mit anderen Bildgebungsverfahren nicht sichtbar gemacht werden, korrelieren mit Krankheitsaktivität und können als prognostische Faktoren für zukünftige Krankheitsprogression herangezogen werden. Bei atrophischer AMD gehen retinale Areale mit erhöhter FAF, die auf eine verstärkte Lipofuszinakkumulation hindeuten, der Entwicklung und dem Wachstum von Atrophieflächen voraus (Abbildung 4) [7]. Sowohl die Ausdehnung abnormaler FAF als auch bestimmte FAF-Mustern sind mit dem weiteren Atrophiewachstum korreliert. Die Identifizierung von Hochrisikomer-

malen (Biomarkern) für das weitere Krankheitsfortschreiten ist zum Monitoring von Patienten hilfreich. Bei Patienten mit choroidaler Neovaskularisation (CNV) oder inflammatorischen Netzhauterkrankungen gehen fassbare FAF-Abnormalitäten typischerweise über die angiographisch und funduskopisch sichtbaren Veränderungen hinaus, was tatsächlich betroffenen Netzhautareale reflektiert. Vor kurzem konnten Heimes und Mitarbeiter über einen positiven prädiktiven Wert von FAF-Veränderungen hinsichtlich der Festlegung von therapeutischen Erfolg unter anti-VEGF-Behandlung demonstrieren [8]. Hierbei scheinen besonders initial erhöhte FAF-Intensitäten auf einen ungünstigen Visusverlauf hinzudeuten.

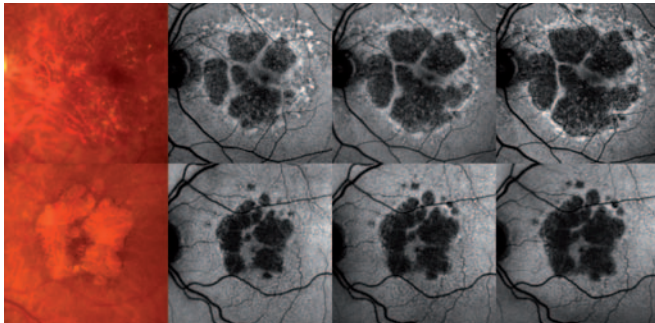


Abbildung 4: Farb- und Fundusautofluoreszenz bei atrophischer altersabhängiger Makuladegeneration und Monitoring des Atrophiewachstums über die Zeit (Baseline, 6 und 12 Monate) mittels Fundusautofluoreszenz-Bildgebung.

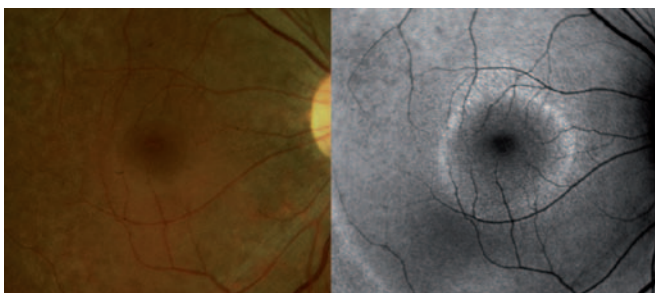


Abbildung 5: Farb- und Fundusautofluoreszenz bei Retinopathia pigmentosa

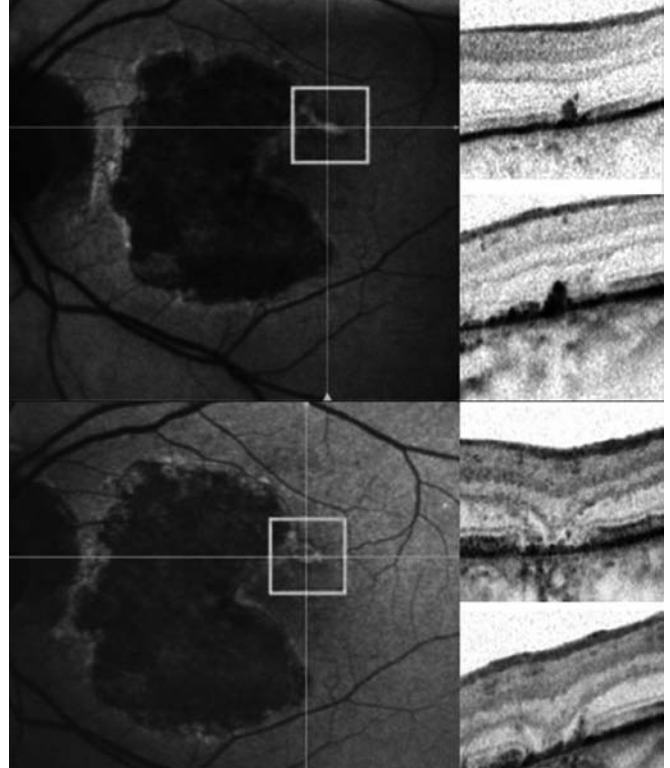


Abbildung 6: Simultanes Fundusautofluoreszenz-Mapping und Spektral-Domänen optische Kohärenztomographie (SD-OCT) bei atrophischer altersabhängiger Makuladegeneration

### Krankheitsprogression: Einfache Identifikation und Quantifizierung möglich

Aufgrund der Abwesenheit von RPE-Lipofuszin zeigen Atrophieareale bei Netzhauterkrankungen wie AMD oder Morbus Stargardt ein stark erniedrigtes Signal. Die krankhaften Netzhautareale und Atrophieflächen können einfach identifiziert und darüber hinaus auch präzise unter Verwendung von speziell entwickelter Bildanalyse-Software quantifiziert werden (Abbildung 4) [1]. Dieses nicht-invasive Monitoring der Atrophieprogression über die Zeit wird bereits bei interventionellen Studien zur geographischen Atrophie breit eingesetzt.

### FAF-Intensität korreliert mit der Netzhautfunktion

Die Reduktion der FAF-Intensität im Rahmen von RPE-Atrophie oder Fibrose geht in der Regel mit einem Verlust der lokalen retinalen Sensitivität einher. Areale mit erhöhter FAF im Randbereich von Atrophie bei Patienten mit atrophischer AMD korrelieren mit relativer Dysfunktion, was auf eine bereits gestörte Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten, erhöhte Lipofuszinakkumulation und konsekutiven funktionellen Beeinträchtigungen hindeutet [1]. Bei Patienten mit Retinopathia pigmentosa (Abb. 5) und Zapfendystrophien demarkieren parafoveale Ringe und Linien erhöhter FAF, die nicht mittels Funduskopie sichtbar sind, Netzhautareale erhaltener Netzhautfunktion.

### Multimodale Bildgebung durch Kombination mit SD-OCT

Die simultane Kombination von Spektral-Domänen OCT (SD-OCT) mit konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (BluePeak Modelle der

Spectralis Produktfamilie, Heidelberg Engineering) erlaubt die genaue Orientierung von SD-OCT-Scans zu Fundusbildern (Abbildung 6). Die Verwendung dieser Technologie zur simultanen Aufnahme von FAF Verteilungen und SD-OCT-Schnittbildern liefert damit bisher nicht möglich gewesene Einblicke in Struktur und Funktion ausgewählter Bereiche der Netzhaut während einer einzigen Untersuchung. Dieses dreidimensionale Mapping von pathologischen Netzhautveränderungen bedeutet einen wichtigen Schritt nach vorne zum besseren Verständnis des FAF-Signals innerhalb der Retina und damit auch zur klinischen Anwendung bei verschiedenen Netzhauterkrankungen [9].

### Zukünftige Anwendungen

Pathophysiologische Konzepte, wie sie durch Anwendung der FAF-Bildgebung gewonnen wurden – wie z. B. das Vorgehen von erhöhter FAF vor Atrophieentstehung – können bei der Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien helfen. So zielt die in der Erprobung befindliche Substanz Fenretinide auf die Verringerungen der Bildung von toxischen Fluorophoren, womit das weitere Wachstum von Atrophieflächen letztendlich verlangsamt werden soll.

Eine Weiterentwicklung der FAF-Bildgebung mit metabolischen Mapping von RPE-Veränderungen stellt die molekulare Bildgebung dar. Hierbei können individuelle Reporter-moleküle mit Fluoreszenz-techniken detektiert werden und so direkt zelluläre Dysfunktionen vor dem Auftreten von manifesten anatomischen Veränderungen in-vivo sichtbar gemacht werden. Unter Verwendung der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie-Technik ist dies im Tierversuch bereits gelungen

[10]. Von der klinischen Anwendung der molekularen Bildgebung verspricht man sich bedeutende Vorteile auf den Gebieten der Früherkennung, des Therapiemonitorings und der Individualisierung von Therapien.

### Literatur

1. Holz F G et al (2007) Atlas of fundus autofluorescence imaging. Vol. 1 Springer, Berlin
2. Delori F C et al (1995) In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 718-729
3. Schmitz-Valckenberg S et al (2008) Evaluation of autofluorescence imaging with the scanning laser ophthalmoscope and the fundus camera in age-related geographic atrophy. Am J Ophthalmol 146: 183-192
4. Helb H M et al (2008) Abnormal Macular Pigment Distribution in Type 2 Idiopathic Macular Telangiectasia. Retina 28: 808-816
5. Renner A B et al (2004) Morphology and functional characteristics in adult vitelliform macular dystrophy. Retina 24: 929-939
6. von Ruckmann A et al (1998) Fundus-Auto-fluoreszenz bei Patienten mit vererbten Makuladystrophien, Malattia leventinese, familiär dominanten und altersbedingten Drusen. Klin Monatsbl Augenheilkd 213: 81-86
7. Holz F G et al (2007) Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 143: 463-472
8. Heimes B et al (2008) Foveal RPE autofluorescence as a prognostic factor for anti-VEGF therapy in exudative AMD. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 246: 1229-1234
9. Helb H M et al (2009) Clinical evaluation of simultaneous confocal scanning laser ophthalmology imaging combined with high-resolution, spectral-domain optical coherence tomography. Acta Ophthalmol [epub 25. 8.]
10. Cordeiro M F et al (2004) Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci USA 101:13352-13356

### Korrespondenzadresse:

Dr. med. S. Schmitz-Valckenberg  
Univ.-Augenklinik Bonn  
Ernst-Abbe-Str. 2  
53127 Bonn  
E-Mail: steffen.schmitz-valckenberg@  
ukb.uni-bonn.de