

Entwicklung einer Software zur Akquisition von Autofluoreszenzlebensdauern und Autofluoreszenzintensitätsbildern der Retina

Arbeit zur Erlangung des Diploms der Medizinischen Informatik

An der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,

Fakultät für Medizinische Informatik

Vorgelegt am 05. September 2012

Johannes Blatz

Wilhelm-Busch-Str. 2, 76684 Östringen

Tel. 0 72 53/ 2 47 27, Email: johannes.blatz@onlinemed.de

Matrikelnummer Universität Heidelberg: 2550058,

Matrikelnummer Hochschule Heilbronn: 165883

Referent: Prof. Dr. Rolf Bendl

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Kalthoff

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Aufnahme-Software sowie der Optimierung einer Aufnahmeapparatur zur Messung von Autofluoreszenzlebensdauern und Autofluoreszenzintensitäten im Bereich der Retina. Mithilfe eines blauen Lasers werden fluoreszierende Moleküle in der Retina, Fluorophore, zum Abstrahlen von Licht, der so genannten Fluoreszenz, angeregt. Die Abklingzeit der Fluoreszenzintensität bis zum Ende der Lichtemission eines Moleküls, wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet. Die Software ermöglicht es, durch den Einsatz eines speziellen Detektors und einer sehr genauen Stoppuhr diese Fluoreszenzlebensdauer im Pikosekundenbereich zu messen. Anhand der für jeden Stoff individuellen Fluoreszenzlebensdauer können die Moleküle exakt bestimmt werden. Mit einem Messgerät, welches die im Auge vorkommenden Substanzen und deren Verhältnis zueinander messen kann, lassen sich bei Abweichungen von der Norm Diagnosen erstellen und eine Behandlung einleiten. Soft- und Hardware sind in der Lage, die Augenbewegung während einer Messung auszugleichen, sodass selbst bei Messungen im Bereich von einigen Minuten verlässliche Messdaten generiert werden. Ziel dieser Arbeit ist die Fertigstellung eines für den Routineeinsatz geeigneten Prototyps.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Formelverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Ausgangssituation.....	2
1.2 Problemstellung	2
1.3 Ziel der Arbeit.....	2
1.4 Aufbau und Methodik der Arbeit.....	3
1.5 Hinweise	4
2 Medizinische Grundlagen und Hintergründe.....	5
2.1 Umwandlung der Glukose zur Energiegewinnung (Zellatmung).....	5
2.1.1 Bilanz der Zellatmung.....	9
2.2 Das Auge und seine herausragende Bedeutung.....	9
2.2.1 Die innere Augenhaut.....	10
2.3 Wichtige Augenkrankheiten	11
2.3.1 Netzhautablösung	11
2.3.2 Katarakt	12
2.3.3 Makuladegeneration	13
2.3.4 Drusen.....	13
2.3.5 Geographische Atrophie.....	14
2.3.6 Die Netzhautgefäße und Zentralarterienverschluss.....	15
3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen	17
3.1 Der Einsatz von Lasern in Medizin und Forschung.....	17
3.1.1 Gepulste optische Anregung.....	18
3.2 Eigenschaften des Lichts.....	18
3.2.1 Lichtquellen.....	18
3.2.2 Spontane Emission und Fluoreszenz.....	20
3.3 Fluoreszenzlebensdauer	22
3.4 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC).....	23

3.5	Technische Veranschaulichung des TCSPC-Prinzips	24
3.5.1	Zwei Verfahren zur Fluoreszenzlebensdauerermessung	26
3.6	Instrument Response Function (IRF).....	26
3.7	Hardwarekomponenten zur Fluoreszenz-Lebensdauer-Messung im Detail	29
3.8	FLIO auf Basis des SPECTRALIS HRA+OCT-Systems.....	31
3.8.1	Beispiel einer SPECTRALIS HRA-OCT-Aufnahme	32
3.9	TruTrack™ Aktives Eye Tracking und FLIO.....	33
3.10	Heidelberg Eye Explorer (HEYEX)	35
4	Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauerermessungen	36
4.1	Vergleich von Parametern der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und Patienten mit früher AMD	36
4.1.1	Methodik.....	37
4.1.2	Ergebnisse.....	38
4.1.3	Diskussion	40
4.1.4	Schlussfolgerung	41
4.2	Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen	41
4.2.1	Methodik.....	42
4.2.2	Ergebnisse.....	43
4.2.2.1	Patientin A.....	43
4.2.2.2	Patient B	46
4.2.2.3	Augengesunde	50
4.2.2.4	Zusammenschau	54
4.2.3	Diskussion	55
4.2.4	Schlussfolgerung	55
5	Resultate	57
5.1	Anforderungsanalyse	58
5.1.1	Detaillierte Ausgangssituation.....	58
5.1.2	Detaillierte Problemstellung.....	58
5.1.3	Ziel der Arbeit	59
5.2	Software	61
5.2.1	Das Logo	61
5.2.2	Use-Cases und Use-Case-Diagramme.....	62
5.2.2.1	Grundvoraussetzungen einer Patientenmessung mit dem FLIO-Aufnahmemodul.....	62
5.2.2.2	Eine neue Messung starten und Patienten verwalten	63
5.2.2.3	Eine Patientenmessung mit dem FLIO-Aufnahmemodul ausführen	64
5.2.2.4	Interaktion zwischen HEYEX-AQM und dem FLIO- Aufnahmemodul.....	65

5.2.2.5	Datenverwaltung und Datenauswertung der FLIO-Messdaten	66
5.2.2.6	Datenverwaltung mit dem FLIO-Viewer	68
5.2.3	Wahl der Programmiersprache	69
5.2.4	Software-Design	69
5.2.4.1	Wahl der Architektur	70
5.2.5	Gestaltung der grafischen Benutzeroberfläche (GUI)	72
5.2.5.1	Gestaltung der Benutzeroberfläche des FLIO-Aufnahmemoduls	72
5.2.5.2	Gestaltung der Benutzeroberfläche des FLIO-Viewers	73
5.2.6	Datenhaltung	74
5.2.7	Schnittstellen	76
5.2.8	Statische Modellierung	77
5.2.9	Dynamische Modellierung	78
5.2.9.1	Initialisierung und Starten des FLIO-Aufnahmemoduls	79
5.2.9.2	Vorbedingungen, um einen Messvorgang zu starten	82
5.2.9.3	Einen Messvorgang starten	83
5.2.9.4	Genauere Betrachtung der Threads StartMeasLoopThread	86
5.2.9.5	Genauere Betrachtung der Threads StartSPC150LoopThread und StartSecondSPC150LoopThread	89
5.2.9.6	Einen Messvorgang stoppen	91
5.2.9.7	Genauere Betrachtung des Threads StartSavingThread	92
5.2.9.8	Einen Messvorgang neu starten	95
5.2.10	Implementierung der Software	97
5.2.10.1	Grafische Benutzeroberfläche (GUI) und Assistenten der Messsoftware	97
5.2.10.2	Benutzeroberfläche (GUI) und Assistenten des Viewers	112
5.2.11	Präsentation der Software im Live-Einsatz an einem Probanden	117
5.2.12	Softwaregestützte Datenauswertung	118
5.3	Klinischer Einsatz und Messergebnisse des FLIO-Geräts	120
5.3.1	Klinische Messergebnisse und Auswertungen	120
5.3.2	Auswertungsbögen von Augengesunden	125
5.3.3	Auswertungsbögen mit Anomalien durch diagnostizierte Erkrankungen	131
5.3.3.1	Erkrankung: Altersbedingte Makuladegeneration (trocken)	131
5.3.3.2	Erkrankung: Altersbedingte Makuladegeneration (feucht)	136
5.3.3.3	Erkrankung: Drusen und Altersbedingte Makuladegeneration (trocken)	137
5.3.3.4	Erkrankung: Altersbedingte Makuladegeneration (trocken)	139

5.3.3.5	Erkrankung: Altersbedingte Makulageration (trocken)	140
5.3.4	Auswertungsbögen mit Anomalien in den Fluoreszenzbildern ohne exakte medizinische Diagnose	142
5.3.4.1	Patientin mit möglicher Erkrankung: Drusen.....	145
5.3.4.2	Patient mit möglicher Erkrankung: Drusen.....	147
6	Diskussion und Ausblick.....	150
6.1	Diskussion.....	150
6.2	Ausblick und Anregung für die weitere Forschung.....	152
	Literaturverzeichnis.....	155
	Anhangsverzeichnis	160
	Eidesstattliche Versicherung.....	186

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die vier Phasen der Energiegewinnung aus Glukose	6
Abbildung 2: Detaillierte Betrachtung des Zitratzyklus	8
Abbildung 3: Struktur des Augapfels samt Hornhaut und Sehnerv	9
Abbildung 4: Ziliarkörper, Linse und Aufhängeapparat	10
Abbildung 5: Physiologischer Augenhintergrund eines Augengesunden	11
Abbildung 6: Augenhintergrund eines Patienten Netzhautablösung	12
Abbildung 7: Verschiedene Formen von Katarakt	12
Abbildung 8: trockene (links) und feuchte exsudative Makuladegeneration	13
Abbildung 9: Zahlreiche Drusen im linken Auge	14
Abbildung 10: Geographische Atrophie	15
Abbildung 11: Astarterienverschluss	16
Abbildung 12: Licht-Gewebe-Wechselwirkung	17
Abbildung 13: Pikosekundenlaser	18
Abbildung 14: Spektrum des Sonnenlichts	19
Abbildung 15: Kontinuierliches Spektrum des sichtbaren Bereichs	20
Abbildung 16: Violetter Fluorit aus Marokko	21
Abbildung 17: Grundprinzip von TCSPC	23
Abbildung 18: Kanäle (Klassen) eines TCSPC-Histogramms	24
Abbildung 19: Erwartetes und tatsächliches Detektor-Signal	24
Abbildung 20: Histogramm einer Fluoreszenzlebensdauerermessung	25
Abbildung 21: Becker & Hickl Puls laser BDL-473-SMC	29
Abbildung 22: FLIO-Kamerakopf mit Stativ	29
Abbildung 23: Zwei TCSPC-Detektoren und Puls laser	30
Abbildung 24: SPC-150-PCI-Karte	30
Abbildung 25: DCC-100-PCI-Karte	31
Abbildung 26: Heidelberg Engineering SPECTRALIS	31
Abbildung 27: OCT-Aufnahme mit dem SPECTRALIS HRA+OCT	32
Abbildung 28: In-Vivo Histologie einer SPECTRALIS HRA+OCT-Aufnahme	32
Abbildung 29: Eye Tracking	33
Abbildung 30: Referenzbild mit festgesetzten Datenpunkten	34
Abbildung 31: Heidelberg Eye Explorer (HEYEX)	35
Abbildung 32: Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	39

Abbildung 33: Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer τ_2	40
Abbildung 34: Fundus der 69-jährigen Patientin	43
Abbildung 35: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	44
Abbildung 36: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	44
Abbildung 37: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	45
Abbildung 38: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	45
Abbildung 39: Retinaler Arterienverschluss im temporal superioren Bereich	46
Abbildung 40: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	47
Abbildung 41: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	47
Abbildung 42: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	48
Abbildung 43: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	48
Abbildung 44: Fundusbild eines Augengesunden	50
Abbildung 45: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	51
Abbildung 46: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1	51
Abbildung 47: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	52
Abbildung 48: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2	52
Abbildung 49: Fundusbilder und TCSPC-Histogramme der Studie.....	54
Abbildung 50: FLIO-Logo	61
Abbildung 51: Use-Case-Diagramm "Fluo-Aufnahme"	62
Abbildung 52: Use-Case-Diagramm "HEYEX"	63
Abbildung 53: Use-Case-Diagramm "FLIO-Aufnahmemodul"	64
Abbildung 54: Use-Case-Diagramm "Interaktion HEYEX-AQM "	65
Abbildung 55: Use-Case-Diagramm "Datenverwaltung und Datenauswertung"	66
Abbildung 56: Use-Case-Diagramm "FLIO-Viewer"	68
Abbildung 57: Drei-Schichten-Architektur.....	71
Abbildung 58: Anwendungsarchitektur mit Schnittstellen	76
Abbildung 59: Konzept des Model-View-Controller Patterns [46].....	78
Abbildung 60: Sequenzdiagramm der Initialisierung des FLIO-Aufnahmemoduls..	81
Abbildung 61: TouchPanel-Anzeige nach dem Starten der Scanner	82
Abbildung 62: TouchPanel-Anzeige zur Wahl des Aufnahmemodus	82
Abbildung 63: SPECTRALIS-TouchPanel.....	83
Abbildung 64: Sequenzdiagramm zum Starten einer FLIO-Messung.....	85
Abbildung 65: Sequenzdiagramm des Threads StartMeasLoopThread.....	88
Abbildung 66: Sequenzdiagramm des Threads StartSPC150LoopThread	90

Abbildung 67: Sequenzdiagramm zum Stoppen einer FLIO-Messung	92
Abbildung 68: Sequenzdiagramm des Threads StartSavingThread.....	94
Abbildung 69: Sequenzdiagramm für den Neustart einer Messung	96
Abbildung 70: Das FLIO-Aufnahmemodul nach dem Start aus HEYEX heraus.....	97
Abbildung 71: Darstellung des FLIO-Assistenten "Dataset Info"	98
Abbildung 72: Der Filterstab	98
Abbildung 73: Gehäuse mit Filterstab	99
Abbildung 74: Nachrichten im Assistentenfenster unterstützen den Anwender	99
Abbildung 75: FLIO-Anzeigemodul mit schwerer Fehlermeldung.....	101
Abbildung 76: FLIO-Anzeigemodul mit Hinweis innerhalb der FLIO-Anzeige	102
Abbildung 77: Navigationsleiste für die diversen Ansichtsmodi	103
Abbildung 78: TCSPC-Histogramm während einer Messung.....	104
Abbildung 79: Gemitteltes Fluoreszenzintensitätsbild des kurzwelligen Kanals	105
Abbildung 80: Gemitteltes Fluoreszenzintensitätsbild des langwelligen Kanals	106
Abbildung 81: Fluoreszenzintensitätsbild des kurzwelligen, langwelligen Kanals.	107
Abbildung 82: Darstellung des FLIO-Assistenten "Measurement Info"	108
Abbildung 83: Darstellung des FLIO-Assistenten "Hardware Params"	111
Abbildung 84: Starten des FLIO-Viewers aus HEYEX heraus.....	112
Abbildung 85: Hauptfenster des FLIO-Viewers und die Bildervorschau.....	113
Abbildung 86: Toolbar des Viewers	114
Abbildung 87: Generiertes Infodokument zu einer Messung	115
Abbildung 88: Dateimanager zum Öffnen von Messungen.....	116
Abbildung 89: SPCImage	119
Abbildung 90: FLIO-Arbeitsplatz Augenklinik des Universitätsspitals Bern	120
Abbildung 91: Zweiseitiger Auswertungsbogen einer FLIO-Untersuchung	122
Abbildung 92: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD).....	125
Abbildung 93: Auswertungsbogen des linken Auges (OS)	126
Abbildung 94: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD).....	127
Abbildung 95: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD).	128
Abbildung 96: Auswertungsbogen des linken Auges (OS)	129
Abbildung 97: Seite 2 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS)	130
Abbildung 98: Auswertungsbogens des rechten Auges (OD)	131
Abbildung 99: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD).....	132
Abbildung 100: Seite 1 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS)	133

Abbildung 101: Seite 2 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS)	134
Abbildung 102: τ_m des lang- und kurzwelligen Kanals des rechten Auges (OD) ...	135
Abbildung 103: τ_m des lang- und kurzwelligen Kanals des linken Auges (OS)	135
Abbildung 104: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) der Patientin S., E. ...	136
Abbildung 105: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Patienten Z., F. ...	137
Abbildung 106: Fluoreszenzintensitäts- und Fluoreszenzlebensdauerbilder	138
Abbildung 107: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) des Patienten G., A. ...	139
Abbildung 108: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Patienten K., D. ...	140
Abbildung 109: Intensitätsbild des langwelligen und τ_m kurzwelligen Kanals	141
Abbildung 110: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD)	142
Abbildung 111: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD)	143
Abbildung 112: τ_m des lang- und kurzwelligen Kanals	144
Abbildung 113: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) der Patientin S., E.	145
Abbildung 114: IR-Reflektionsbild (Fundusbild) der Patientin S., E.	146
Abbildung 115: τ_m des kurzwelligen Kanals	146
Abbildung 116: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) des Patienten Z., F. ...	147
Abbildung 117: IR-Reflektionsbild (Fundusbild) des Patienten Z., F.	148
Abbildung 118: Intensitätsbild und τ_m des kurzwelligen Kanals	149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Mittelwert und Standardabweichung der summierten Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung bei Augengesunden.....	38
Tabelle 2:	Mittelwert und Standardabweichung der summierten Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung bei Patienten im Frühstadium der AMD	38
Tabelle 3:	Modalwerte der Lebensdauerverteilungen von drei Augengesunden (N_1, N_2, N_3).....	53

Formelverzeichnis

Formel 1:	Bilanz der Zellatmung	9
Formel 2:	Zeitabhängiger Zerfall der Fluoreszenz.....	22
Formel 3:	Faltung der IRF mit dem zeitabhängigen Zerfall der Fluoreszenz.....	28
Formel 4:	Fluoreszenzlebensdauer approximiert mit einer triexponentiellen Modellfunktion	37
Formel 5:	Fluoreszenzlebensdauer approximiert mit einer triexponentiellen Modellfunktion	42

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Altersbedingte bzw. senile Makuladegeneration
APD	Avalanche-Photo-Diode
AQM	Acquisition Module
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bitmap, zweidimensionales Rastergrafikformat
CPP	Dateiendung von Dateien, die in der Programmiersprache C++ verfasst wurden, C-Plus-Plus
CPU	Central Processing Unit, Hauptprozessor
CSS	Cascading Style Sheets
DLL	Dynamic Link Library
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FAF	Fundus-Autofluoreszenz
FIFO	First In- First Out
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FLIO	Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscope
GPU	Graphics Processing Unit, Grafikprozessor
GTP	Guanosintriphosphat
GUI	Graphical User Interface
HDD	Hard Disk Drive
HEYEX	Heidelberg Eye Explorer
HRA	Heidelberg-Retina-Angiograph
HTML	Hypertext Markup Language
INI	Initialisierungsdatei, kurz INI-Datei
IR	Infrarot
IRF	Instrument Response Function
N/A	Not applicable, keine Angabe
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
ND-Filter	Neutraldichtefilter
OCT	Optische Kohärenztomographie (optical coherence tomography)
OD bzw. O.D.	Oculus dexter, rechtes Auge
OOAD	Object-oriented analysis and design (Objektorientierte Analyse und Design)

OS bzw. O.S.	Oculus sinister, linkes Auge
PMT	Photomultiplier
RAM	Random-Access Memory, Arbeitsspeicher
RPE	Retinales Pigmentepithel
SLO	Scanning Laser Ophthalmoskopie
SSD	Solid State Drive
TCSPC	Time-correlated single photon counting
UML	Unified Modeling Language
W3C	World Wide Web Consortium
XML	Extensible Markup Language
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Viele Krankheiten weisen die Eigenschaft auf, dass sich frühe Anzeichen der Erkrankung in einer Veränderung des zellulären Stoffwechsels bemerkbar machen, noch bevor sich irreversible Schäden bilden konnten. [1]

Der zelluläre Stoffwechselzustand im Bereich der Retina kann anhand des Verhältnisses von Molekülen charakterisiert werden, die im Verlauf des Glukoseabbaus zur Energiegewinnung entstehen. Die entsprechenden Moleküle weisen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften auf (siehe Kapitel 2) und werden Fluorophore genannt.

Veränderungen in der Fluoreszenz der Retina können die Entwicklung von Krankheiten wie Katarakt, Glaukom und weiteren frühzeitig offenbaren. [2] Mit kurzen Laserpulsen lassen sich Substanzen zur Fluoreszenz anregen.

Es ist zunächst notwendig, die einzelnen fluoreszierenden Stoffe voneinander zu unterscheiden. Ein Verfahren hierfür ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauer, welche für jeden Stoff einzigartig ist und diesen charakterisiert.

Gelingt es, diese Lebensdauern zu messen und einer Substanz eindeutig zuzuweisen, kann der akute Stoffwechselzustand und eine mögliche Veränderung durch die Abweichung im Vergleich zum Norm- bzw. Sollzustand ermittelt werden.

Aus diesem Grund bietet die Analyse der Fluoreszenz in der Medizin große Chancen, welche in der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) bereits erfolgreich unter Beweis gestellt wurden.

Aufgrund der Vielzahl der endogenen Fluorophore in der Retina werden bei derselben Wellenlänge, mit welcher der Anregungslaser emittiert, sehr viele Substanzen zur Fluoreszenz angeregt. Durch die Fluoreszenzlebensdauermessung in der Retina kann im Gegensatz zu den bislang bekannten Methoden nicht nur die Intensität aller angeregter Substanzen und deren Muster detektiert werden, sondern vielmehr auch das dynamische Abklingverhalten der Fluoreszenzintensitäten. Dieses spezifische Abklingverhalten bzw. die Fluoreszenzlebensdauer ermöglichen Rückschlüsse auf die fluoreszierenden Substanzen. Die Substanzen und das Verhältnis, in denen diese vorkommen, liefern wichtige Informationen über Mangel- bzw. Überschussvorkommen einzelner Stoffe, woraus unter Umständen bereits frühzeitig auf eine Erkrankung geschlossen und eine Therapie eingeleitet werden kann.

1.1 Ausgangssituation

Um erstmalig Autofluoreszenzmessungen an der Retina eines lebenden Patienten durchführen zu können, entwickelte die Universität Jena zusammen mit der Firma Heidelberg Engineering ein Testgerät. Es handelte sich dabei um einen modifizierten Laser-Scanner-Angiograph (HRAII) der Firma Heidelberg Engineering, welcher um einige Hardware-Komponenten für die Autofluoreszenzmessung erweitert wurde.

1.2 Problemstellung

Das neue Verfahren wurde an einigen wenigen Probanden getestet und lieferte vielversprechende Ergebnisse. Die Messzeiten für Patienten lagen bei dem vorgestellten Testgerät typischerweise bei mehreren Minuten pro Auge, was eine Belastung des Patienten darstellt und dessen intensive Kooperation erfordert.

Die eingesetzten Softwaresysteme erschwerten den Umgang mit dem Gerät für Ungeübte und waren für den Betrieb im klinischen Alltag nicht geeignet. Die zugrunde liegende Software-Architektur war zudem nicht in der Lage, die Leistung moderner Computersysteme auszunutzen.

Die Hardwarearchitektur vereinfachte die softwareseitige Datenverarbeitung und sparte Ressourcen ein. Gleichzeitig limitierte diese Architektur aber die Bandbreite der Signale. Die vereinfachte Software- und Hardwarearchitektur drosselten die Leistungsfähigkeit des Verfahrens.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, eine Software zur Messung und Verarbeitung von Fluoreszenzlebensdauern im Bereich der Retina neu zu entwickeln, welche an moderne Hochleistungssysteme angepasst ist und deren Potential voll ausschöpft.

Zusammen mit der Software soll die Hardware des Messgeräts (FLIO) optimiert und erweitert werden.

Die damit verbundenen Ziele sind die Reduzierung der Messzeiten für Patienten um ein Vielfaches und die Entwicklung und Fertigstellung eines neuartigen Prototyps, der reif für den Routineeinsatz in Kliniken und später evtl. auch in Praxen ist.

Desweiteren wird die Entwicklung eines Viewers forciert, der die Datenauswertung und Verwaltung von Fluoreszenzmessungen erleichtert.

1.4 Aufbau und Methodik der Arbeit

Diese Arbeit dokumentiert den Entwicklungsprozess der Software über verschiedene Phasen hinweg. Die Entwicklung findet unter Anwendung des Konzepts der objektorientierten Softwareentwicklung statt. [3]

Kapitel 2 thematisiert zunächst medizinische Hintergründe und Grundlagen, die die Motivation und Chancen der Entwicklung eines solchen Systems darlegen und dessen Anwendungsmöglichkeiten erörtern. Ferner werden Krankheiten thematisiert, für welche das Verfahren der retinalen Fluoreszenzlebensdauerermessung von besonderem Interesse ist.

Das nachfolgende Kapitel 3 widmet sich den physikalischen und technischen Rahmenbedingungen, Grundlagen und Voraussetzungen des zur Fluoreszenzlebensdauerermessung angewendeten TCSPC-Verfahrens sowie der dafür notwendigen und eingesetzten Hardwarekomponenten.

Das 4. Kapitel befasst sich mit Studien und ersten Ergebnissen auf Basis von Fluoreszenzlebensdauerermessungen im Bereich der Retina.

Im Anschluss daran wird im 5. Kapitel eine objektorientierte Analyse (OOA) durchgeführt, welche fachliche Anforderungen der neuen FLIO-Software definiert. Es werden dabei die benötigten Funktionalitäten und die zu beachtenden Rahmenbedingungen untersucht. Neben der Erstellung eines objektorientierten Designs (OOD) werden die Gestaltung der grafischen Benutzeroberfläche, die Schnittstellen zwischen Softwaremodulen und Hardwarekomponenten sowie der softwareseitigen Hardwareintegration, Grundsatzüberlegungen und die Implementierung der gesamten Software im Detail thematisiert. Neben einem Ausblick auf die Datenauswertung der

1 Einleitung

Messdaten werden Ergebnisse und Diagnosen, die mit dem neuen System bereits gewonnen werden konnten, präsentiert und erörtert.

In Kapitel 6 werden diese Resultate diskutiert und ein Ausblick auf mögliche Weiterentwicklungen gegeben.

1.5 Hinweise

Um Schlüsselwörter von Informatik-Quelltexten von normalen Texten abzuheben, werden diese in der Schriftart **Consolas** und farblich hervorgehoben dargestellt.

2 Medizinische Grundlagen und Hintergründe

„Der zelluläre Stoffwechsellzustand kann durch das Verhältnis der Redoxpaare der Koenzyme NAD^+ - NADH [...] und FAD - FADH_2 [...] charakterisiert werden, die in den grundlegenden Mechanismen der Energiegewinnung Glykolyse, Zitratzyklus und Atmungskette als Elektronentransporter wirken, um die Umwandlung von ADP zu ATP in der oxydativen Phosphorylierung zu ermöglichen. Diese Redoxpaare weisen je nach Oxidationszustand unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften auf.“ [4]

Bereits die Messung der reinen Fluoreszenzintensität, welche keine eindeutige Unterscheidung der unterschiedlichen Stoffe zulässt, ist von klinischer Bedeutung und wird in der Ophthalmologie angewendet. „Durch die Auswertung von örtlichen Mustern der Fluoreszenzintensität gelingt es, prognostische Aussagen zur Entwicklung der geographischen Atrophie abzuleiten.“ [1]

Mit der Fluoreszenzlebensdauer messung „kann ein schwach emittierendes Fluorophor auch dann erkannt werden, wenn dessen Intensität von einem stark emittierenden Fluorophor überdeckt wird.“ [1]

2.1 Umwandlung der Glukose zur Energiegewinnung (Zellatmung)

Die meisten menschlichen Zellen gewinnen die benötigte Energie bevorzugt aus Glukose. Der Glukoseabbau teilt sich in vier Hauptabschnitte, in denen die für die Fluoreszenz interessanten Moleküle NADH und FADH_2 entstehen:

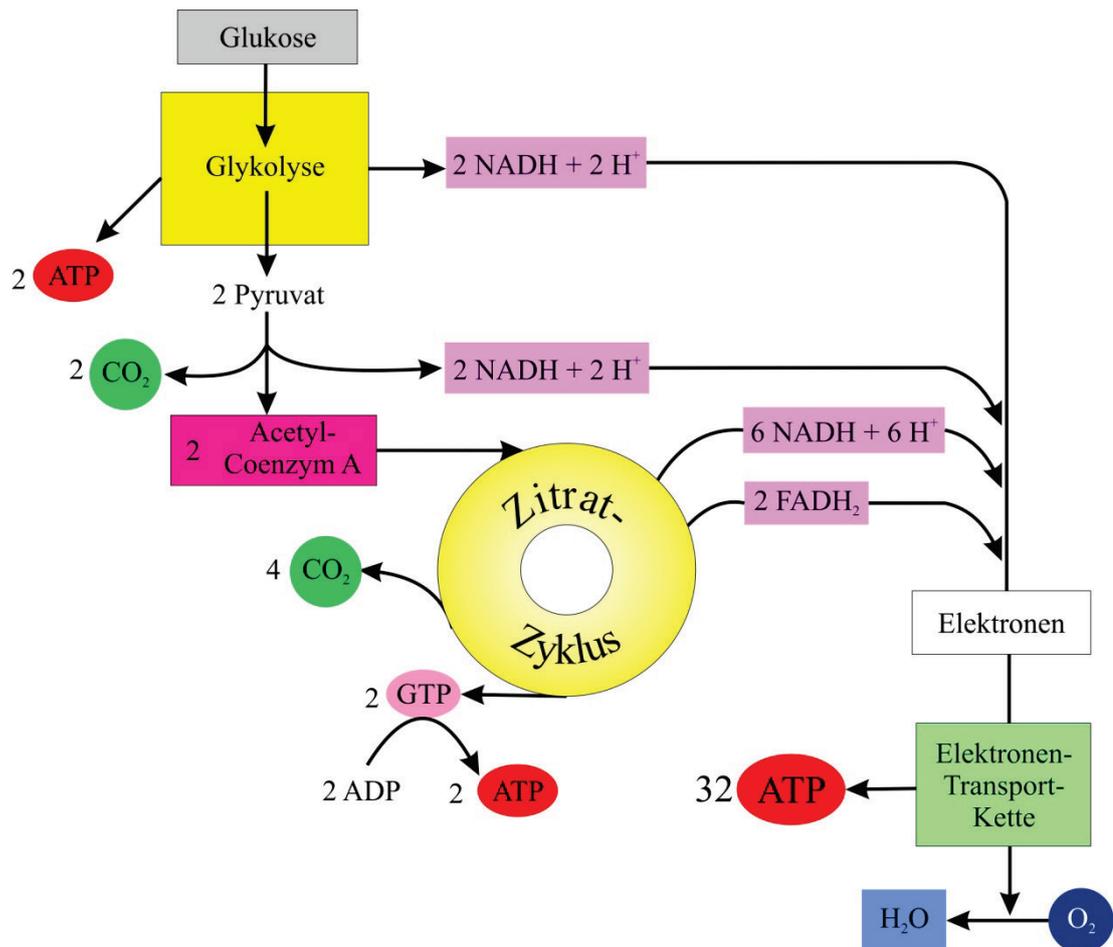


Abbildung 1: Die vier Phasen der Energiegewinnung aus Glukose

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Huch, Renate; Bauer, Christian: Mensch Körper Krankheit. München, 2003, S. 23, Abb. 2.22.

Abschnitt 1: Glykolyse

Unter dem Begriff der Glykolyse werden sehr viele enzymatische Reaktionen beschrieben, bei denen ein Molekül Glukose in zwei Moleküle Pyruvat (Benztraubensäure) aufgespalten wird. Gleichzeitig werden zwei Moleküle ATP regeneriert, wobei es sich um eine vergleichsweise geringe Ausbeute handelt. Der große Vorteil der im Zytoplasma stattfindenden Glykolyse besteht darin, dass selbst unter Sauerstoffmangel weiterhin Energie erzeugt werden kann.

Abschnitt 2: Acetyl-Coenzym-A

Ist ausreichend Sauerstoff vorhanden, tritt das Pyruvat in das Mitochondrium ein und verbindet sich mit Coenzym A (Acetyl-CoA), wobei zwar kein ATP anfällt, jedoch das reduzierte **NADH** (**NAD** = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid), welches zu einem späteren Zeitpunkt in der Atmungskette (siehe Teilschritt 4) energiebringend verwertet wird.

Anmerkung: Es handelt sich bei Acetyl-CoA um ein zentrales Molekül, das im gesamten Energiestoffwechsel wiederkehrt. Neben dem oxidativen Abbau der Glukose führt auch der Fettsäureabbau einiger Aminosäuren zur Bildung von Acetyl-CoA.

Abschnitt 3: Der Zitratzyklus

Der Zitratzyklus findet innerhalb der Mitochondrien statt und ist ebenfalls eine enzymatisch gesteuerte Reaktion. Pro Acetyl-CoA entsteht ein energiereiches Phosphat, das GTP (Guanosintriphosphat), welches ein ADP zu ATP überführen kann. Ferner fallen dabei als reduzierte Co-Enzyme **NADH** und **FADH₂** (**FAD** = Flavin-Adenin-Dinucleotid) an, welche wiederum in der Atmungskette (Abschnitt 4) energiereich verwertet werden.

Anmerkung: Die Aufgaben des Zitratzyklus sind vielfältig und reichen weit über den Glukoseabbau hinaus. Etliche katabole Stoffwechselfvorgänge münden direkt oder indirekt in den Zitratzyklus, welcher wiederum viele Ausgangsstoffe für einige weitere anabole Stoffwechselreaktionen liefert. Der Zitratzyklus ist essentielles Zentrum des Stoffwechsels.

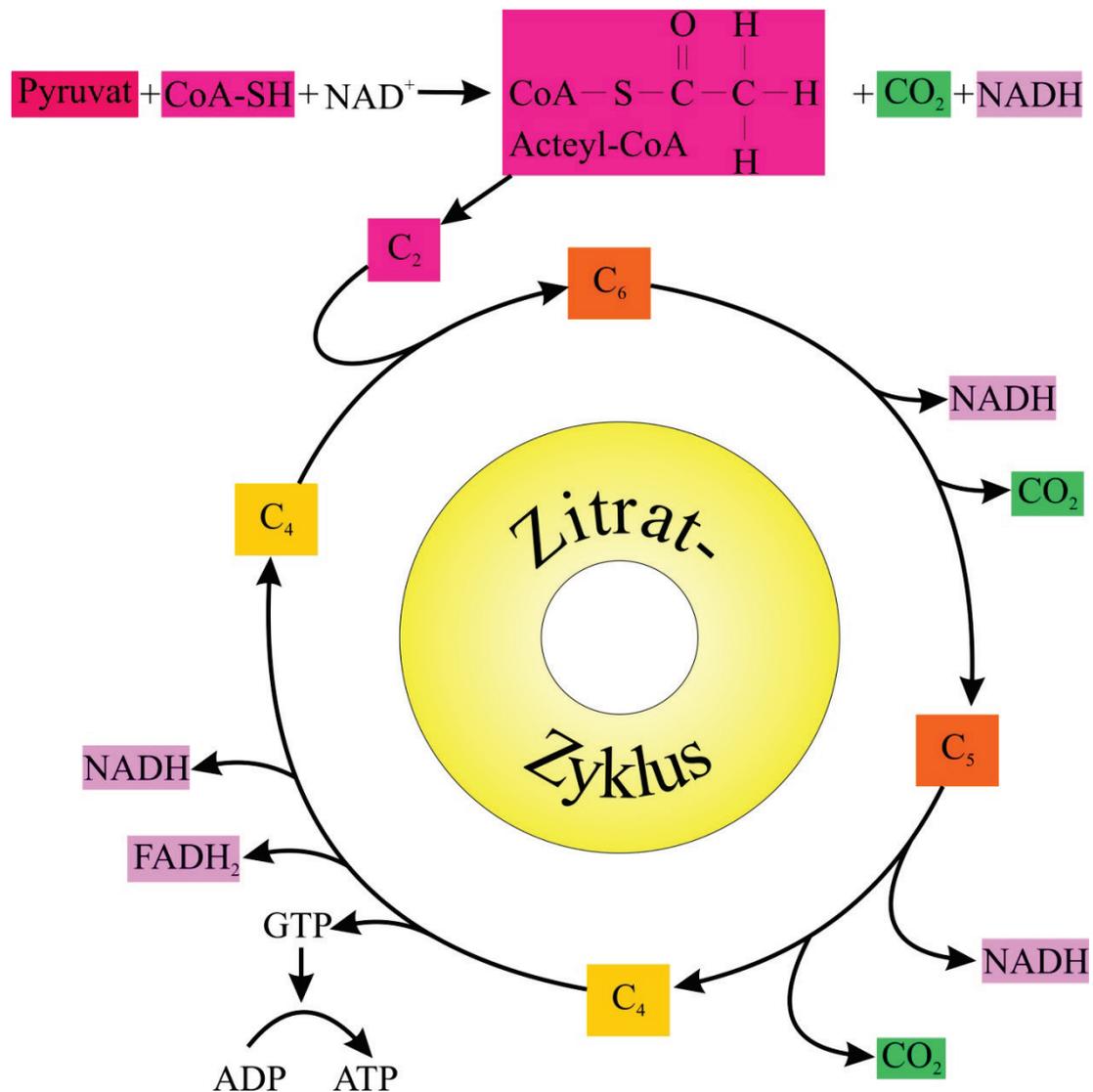


Abbildung 2: Detaillierte Betrachtung des Zitratzyklus

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Huch, Renate; Bauer, Christian: Mensch Körper Krankheit. München, 2003, S. 23, Abb. 2.21.

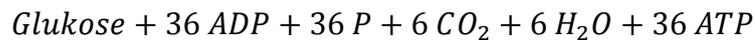
Abschnitt 4: Die Atmungskette (Elektronentransportkette)

In den vorangegangenen Teilabschnitten werden durch Reduktionsreaktionen Elektronen an Coenzyme gebunden. In der Atmungskette oder Elektronentransportkette werden diese Elektronen nun dem Sauerstoff zugeführt, wobei Wasser und Energie frei werden und die Energie zur Regeneration von ATP verwertet wird, während ADP mit einem Phosphat phosphoryliert wird. Man spricht von der oxidativen Phosphorylierung.

Im Rahmen der Atmungskette werden die Elektronen von NADH und FADH₂ nicht in einem Schritt als Ganzes an den Sauerstoff übertragen, sondern vielmehr von den Enzymen und Coenzymen schrittweise weitergereicht.

2.1.1 Bilanz der Zellatmung

Im Fall der Glukose ergibt sich die folgende Bilanz [5]:



Formel 1: Bilanz der Zellatmung

2.2 Das Auge und seine herausragende Bedeutung

Das Sehen nimmt beim Menschen im Vergleich zu den übrigen Sinnesmodalitäten eine herausragende Stellung ein. Ein Drittel der Großhirnrinde widmet sich dem visuellen System. Ferner dienen nahezu 40 Prozent aller Leitungswege zum Zentralen Nervensystem (ZNS) der Sehleitung. [6]

Im Folgenden werden einige wichtige Bereiche und Zusammenhänge des Auges kurz beleuchtet, die für Messungen am Patienten und zur Krankheitsdiagnose grundsätzlich von großem Interesse sind.

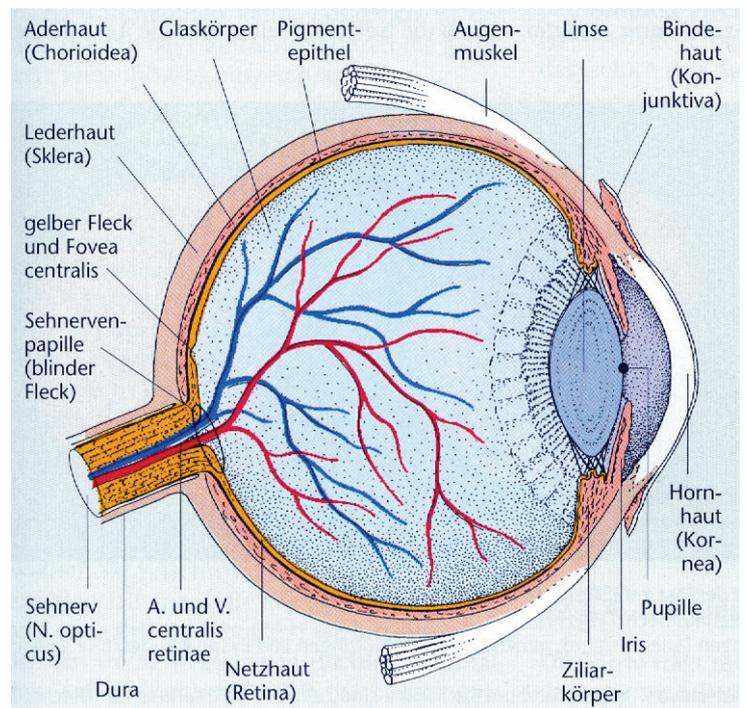


Abbildung 3: Struktur des Augapfels samt Hornhaut und Sehnerv

Quelle: Huch, Renate; Bauer, Christian: Mensch Körper Krankheit. München, 2003, S. 223, Abb. 12.12.

2.2.1 Die innere Augenhaut

Die innere Augenhaut setzt sich aus Netzhaut (Retina), in der die bildaufnehmenden Sinnesrezeptoren liegen, und dem Pigmentepithel, das die Netzhaut umgibt und damit störende Lichtstreuung verhindert, zusammen.

Die Pigmentepithelschicht ist fest mit der Aderhaut verwachsen, mit der Netzhaut selbst ist sie jedoch nur im Bereich der Papille (Sehnervenaustritt) fest verbunden. Der Augeninnendruck stellt sicher, dass der notwendige enge Kontakt zwischen den beiden Schichten auch an den übrigen Stellen gewährleistet ist.

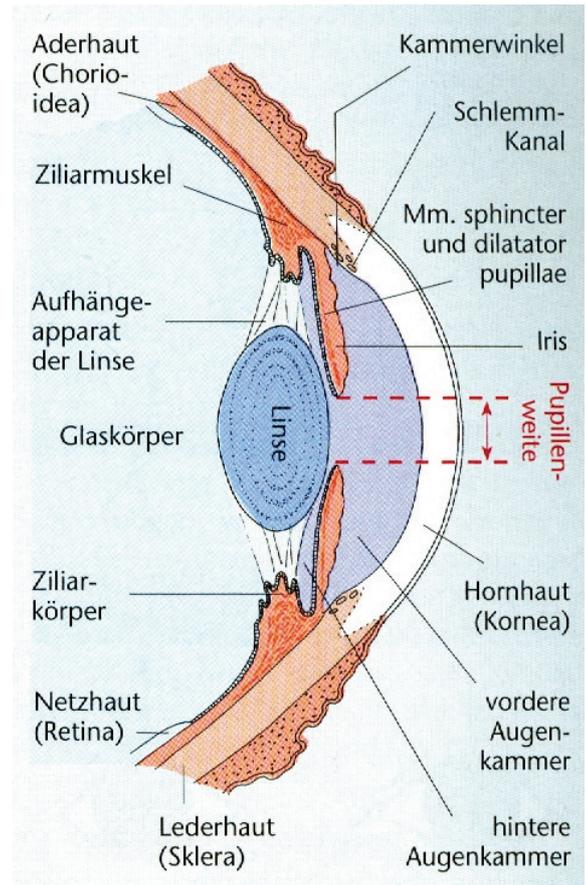


Abbildung 4: Ziliarkörper, Linse und Aufhängeapparat

Quelle: Huch, Renate; Bauer, Christian: *Mensch Körper Krankheit*. München, 2003, S. 223, Abb. 12.14.

2.3 Wichtige Augenkrankheiten

Das neue Verfahren der Autofluoreszenzlebensdauerermessung soll grundsätzlich an allen wichtigen Krankheiten der Augenheilkunde getestet werden. Insbesondere geht es dabei um die Früherkennung und nach Möglichkeit Verhinderung von irreversiblen Krankheiten. Einige Erkrankungen, die im Fokus erster klinischer Studien mit dem FLIO-Gerät stehen, werden im Folgenden dargelegt.

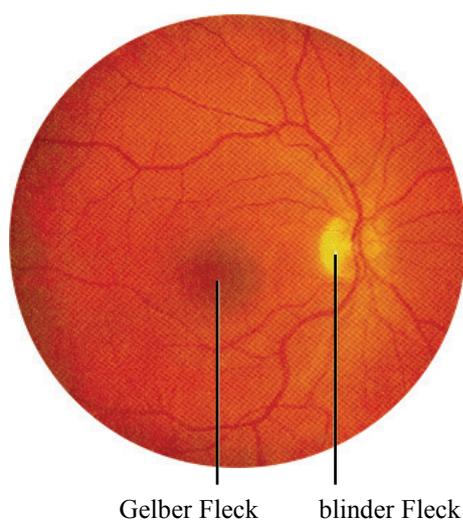


Abbildung 5: Physiologischer Augenhintergrund eines Augengesunden

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Huch, Renate; Bauer, Christian: Mensch Körper Krankheit. München, 2003, S. 224, Abb. 12.16.

2.3.1 Netzhautablösung

Die Netzhaut benötigt die Pigmentepithelschicht zur „Ernährung“, da diese Schicht sie mit wichtigen Nährstoffen versorgt. Aufgrund degenerativer Prozesse oder Verletzungen kann sich die Netzhaut von der Pigmentepithelschicht ablösen, man spricht von der in Abbildung 5 dargestellten Netzhautablösung (Ablatio retinae), wodurch die Retina nicht mehr ernährt werden kann und Flüssigkeit zwischen Netzhaut und Pigmentepithel eindringt. Es kommt zu schmerzlosen Sehstörungen, Lichtblitzen, verschlechtertem Sehen und Gesichtsfeldausfällen beim Patienten. Ein Voranschreiten der Netzhautablösung muss frühzeitig verhindert werden, indem man die beiden Schichten durch Laserstrahlen miteinander verklebt.



Abbildung 6: Augenhintergrund eines Patienten Netzhautablösung

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Huch, Renate; Bauer, Christian: Mensch Körper Krankheit. München, 2003, S. 224, Abb. 12.17.

2.3.2 Katarakt

Katarakt oder Grauer Star bezeichnen eine Trübung der Linse, die sich in der Regel um das 60. Lebensjahr bemerkbar macht. Durch die Trübung der Linse wird das Sehvermögen beeinträchtigt, was dazu führt, dass in einem späteren Stadium nur noch Helligkeitsunterschiede wahrzunehmen sind. In einer Operation (Staroperation) wird die getrübte Linse durch eine implantierte Kunststofflinse ersetzt, mit der der Patient nicht mehr akkomodieren kann. Der Patient braucht daher eine Lesebrille, um die fehlende Akkommodation in der Nähe auszugleichen. [7]

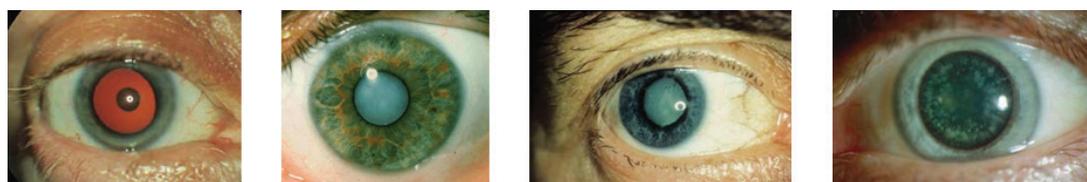


Abbildung 7: Verschiedene Formen von Katarakt

Quelle 1-4: Illustration des Autors, vgl. http://www.dr-leber.de/gr_star_i.htm

2.3.3 Makuladegeneration

Wird die Netzhaut in der Makularegion geschädigt, kommt es zum Verlust des zentralen Sehens und Scharfsehens sowie des Lesevermögens. Die häufigste Form ist die altersbedingte bzw. senile Makuladegeneration (AMD), die ca. 5 Prozent der Bevölkerung über 60 Jahren betrifft. Die peripheren Netzhautabschnitte sind erst später befallen, sodass im Anfangsstadium ein gewisses unscharfes Sehvermögen erhalten bleibt, das jedoch nicht zum Lesen ausreicht. Im Endstadium führt die Erkrankung zur Erblindung. [7]

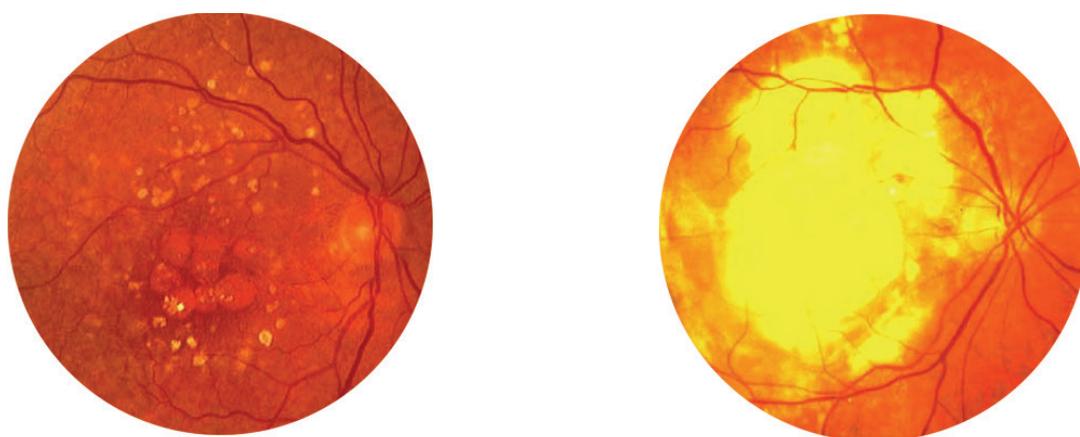


Abbildung 8: trockene (links) und feuchte exsudative Makuladegeneration

Quelle: Illustration des Autors, vgl. <http://www.dr-goldammer.de/patienteninformationen/makuladegeneration.html>

2.3.4 Drusen

Drusen sind Ablagerungen von extrazellulärem Material unterhalb der Netzhaut (Abbildung 9), müssen jedoch keine Einschränkung der Sehkraft bedeuten. Dennoch können sie zu Störungen in der Wahrnehmung von Farb- und Kontrastintensitäten führen und gelten als eine frühe Form der altersbedingten Makuladegeneration. Die Drusen finden sich in allen Altersklassen, mit steigendem Lebensalter nimmt die Größe und Anzahl in der Regel zu. [8]



Abbildung 9: Zahlreiche Drusen im linken Auge

Quelle: Illustration des Autors, vgl. <http://www.rvahouston.com/wp-content/uploads/2011/03/macular-degeneration-5.jpg>

2.3.5 Geographische Atrophie

Die geographische Atrophie ist ein Symptom der fortgeschrittenen trockenen altersbedingten Makuladegeneration (AMD). Sie wird anhand eines fleckig abgestorbenen Bereichs der Retina erkannt. In den betroffenen Bereichen ist die Sehfähigkeit irreversibel zerstört. Das letzte Stadium der Erkrankung wird erreicht, wenn sich die geographische Atrophie auf die Makula ausbreitet und die Sehfähigkeit sehr stark beeinträchtigt. Die Makula bildet den für scharfes Sehen zuständigen Bereich der Retina.

Bei der geographischen Atrophie lassen sich, wie in Abbildung 10 eingezeichnet, im Randbereich häufig erhöhte Autofluoreszenzintensitäten erkennen, was „für einen erhöhten Lipofuszeingehalt in den randständigen RPE-Zellen“ [9] spricht (siehe Kapitel 4). Man vermutet, dass erhöhte Lipofuszeinmengen die Funktion der RPE-Zellen beeinträchtigen und zu deren Zelltod führen. [9]



Abbildung 10: Geographische Atrophie

Quelle: Illustration des Autors, vgl. http://www.whklein.de/images/Abbl_de.gif

2.3.6 Die Netzhautgefäße und Zentralarterienverschluss

Die zentrale Netzhautarterie (Arteria centralis retinae) ist ein Ast der Arteria carotis interna und tritt gemeinsam mit den Sehnerven in das Auge ein, um damit die Netzhaut (Retina) mit den Sinneszellen zu versorgen. Die zentrale Netzhautvene (Vena centralis retinae) dient der venösen Ableitung. Die Arterien und Venen verlaufen in vier Hauptästen über die gesamte optische Schicht, lediglich die Stelle des schärfsten Sehens (Fovea centralis) im Zentrum des Gelben Flecks (Macula lutea) ist frei von Arterien und Venen.

Die Überlebenszeit der Netzhaut ohne Versorgung ist sehr kurz, weshalb bei einem Zentralarterienverschluss, der zu einer sofortigen, schmerzfreien Erblindung führt, ein augenblickliches therapeutisches Eingreifen zwingend notwendig ist. [10]

Zu den Risikofaktoren zählen hoher Blutdruck, Übergewicht, Rauchen, hohe Cholesterinwerte, Diabetes mellitus und Glaukom. [11]

In der folgenden Abbildung 11 ist ein Astarterienverschluss dargestellt, der anhand der weißlichen Aufhellung der gesamten Umgebung des Verschlusses erkennbar ist.

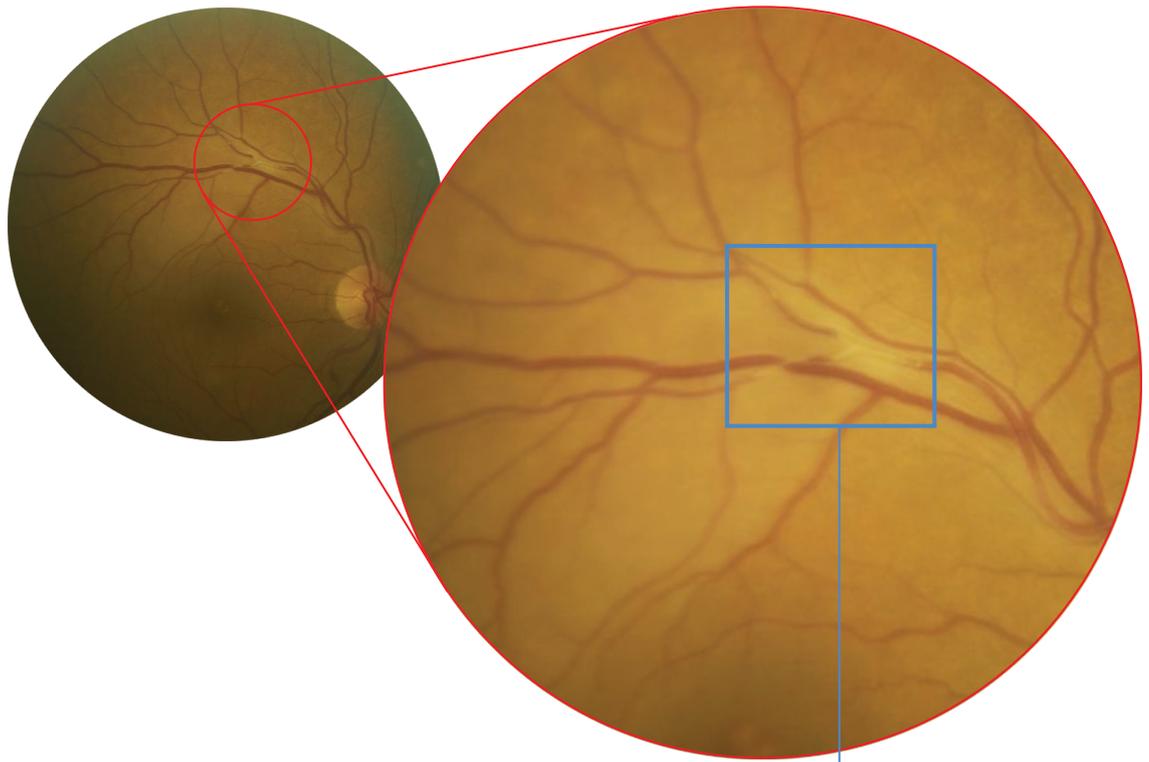


Abbildung 11: Astarterienverschluss □

Quelle 1: http://www.zeitfrankozeit.de/tl_files/Bilder/Dictionary/aav%20foto%20t1.jpg

Quelle 2: http://www.zeitfrankozeit.de/tl_files/Bilder/Dictionary/aav%20foto%20t3.jpg

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

3.1 Der Einsatz von Lasern in Medizin und Forschung

Es ist zunächst sinnvoll, allgemein zu betrachten, wie sich Laserstrahlung in biologischem Gewebe verhält und was diese dort auslöst. Viele Parameter beeinflussen die Wirkung des Lichts auf das biologische Gewebe. Dazu zählen die Wellenlänge des Lichts, die Intensität der Strahlung, die Bestrahlungszeit und die Art und Zusammensetzung des bestrahlten Gewebes.

Einzelne Gewebebestandteile wie Blut, Wasser oder Pigmente können jeweils Licht in unterschiedlichen Wellenlängen und in verschiedener Stärke absorbieren.

Aufgrund der verschiedenen Gewebearten und Absorptionseigenschaften dienen jeweils angepasste Lasertypen der gezielten Bestrahlung. [12]

Die Wechselwirkungen von Licht und Gewebe lassen sich in vier Kategorien klassifizieren:

- Fotochemische Mechanismen
- Fotothermische Mechanismen
- Photoablative Mechanismen
- Fotomechanische Mechanismen

Die Intensität beschreibt eine auf eine definierte Fläche gestrahlte Leistung. Die Energiedichte ist damit das Produkt aus Intensität und Wechselwirkungszeit. Die diagonalen Linien der nebenstehenden Abbildung 12 geben Punkte gleicher Energiedichte mit abnehmender Lichtintensität und steigender Bestrahlungsdauer an. [13]

Für die diagnostische Anwendung der Fluoreszenzdarstellung im Auge befindet man sich im Bereich der in Abbildung 9 dargestellten „photochemischen Wechselwirkung“. [13] Hierbei löst die Energie der absorbierten Photonen (Lichtteilchen) im

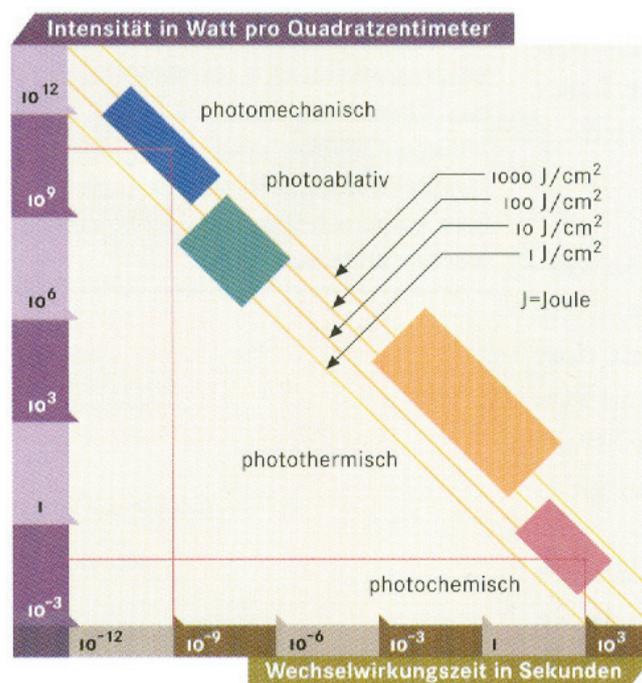


Abbildung 12: Licht-Gewebe-Wechselwirkung in Abhängigkeit der Lichtintensität und Bestrahlungsdauer

Quelle: Brockhaus-Redaktion: Mensch, Natur, Technik: Forschung und Schlüsseltechnologien. Leipzig, Mannheim, 2000, S. 178.

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

sichtbaren Spektralbereich fotochemische Reaktionen im Gewebe aus, gleichzeitig reicht die Energie für eine Erwärmung des bestrahlten Gewebes nicht aus.

3.1.1 Gepulste optische Anregung

Um kurze Lichtimpulse zu erzeugen, können unterschiedliche Lichtquellen verwendet werden. Kürzeste Pulse (Femtosekunden fs bis Nanosekunden ns) werden mit Puls-Lasern erzeugt, die das Licht in zeitlich begrenzten Pulsen emittieren. [14]

Der blaue Laser, der im FLIO-Gerät zum Einsatz kommt, emittiert 70 ps-Pulse mit einer Wellenlänge von 473nm und einer Wiederholfrequenz (Repetitionsrate) von 80 MHz.



Abbildung 13: Pikosekundenlaser, der bei 473 nm emittiert mit einer Wiederholfrequenz von 80 MHz, und Shutter (rechts), der ausschließlich während einer Messung geöffnet ist und sich beispielsweise im Falle einer Sicherheitsabschaltung unverzüglich zum Schutz des Patienten und des Geräts schließt

Quelle: Illustration des Autors.

3.2 Eigenschaften des Lichts

3.2.1 Lichtquellen

Durch Übergänge von äußeren Elektronen in Atomen entsteht Licht. Üblicherweise besitzen Elektronen in einem Atom den so genannten Grundzustand mit den nied-

rigsten erlaubten Energieniveaus. Dabei gilt das 1925 von Wolfgang Pauli formulierte Ausschließungsprinzip. Nach diesem Prinzip können sich zwei Elektronen niemals in demselben Quantenzustand befinden.

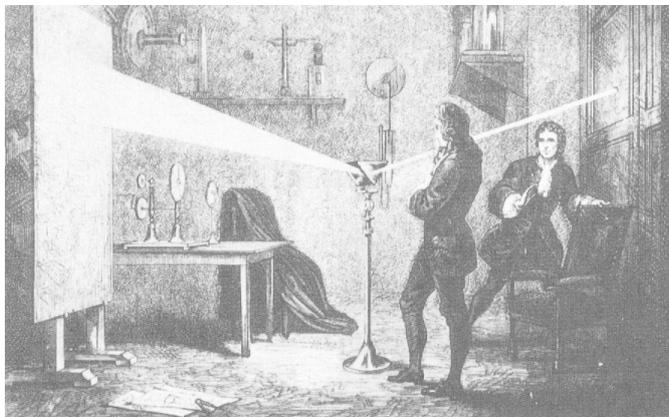


Abbildung 14: Isaac Newton demonstriert das Spektrum des Sonnenlichts mit einem Glasprisma. Als Erster erkannte er Ende des 17. Jahrhunderts, dass weißes Licht eine Mischung aus Licht aller Farben mit etwa derselben Intensität darstellt

Das Menschliche Auge ist in der Lage, elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen zwischen etwa 400nm und 700nm als Licht wahrzunehmen.

Quelle: Tipler, Paul A.; Mosca, Gene: Physik. Heidelberg, 2. Auflage 2006, S. 992, 31.1.

Je niedriger die Energie der Elektronen, desto näher liegen sie am Atomkern und sind somit besonders eng an diesen gebunden. Es bildet sich dadurch eine recht stabile innere Elektronenhülle. In der äußeren Schale befinden sich die wenigen Elektronen mit den höchsten Energien, die damit weiter vom Atomkern entfernt liegen.

Diese entfernten Elektronen lassen sich leicht anregen, wobei sie unbesetzte Zustände mit höherer Energie besetzen können.

Damit sind diese äußeren Elektronen mit den höchsten Energien unter Lichteinwirkung für die Energieänderungen im Atom

verantwortlich, die zu Emission oder Absorption des sichtbaren Lichts führen.

Stößt ein Atom mit einem freien Elektron oder einem anderen Atom zusammen oder nimmt Energie aus elektromagnetischer Strahlung auf, können diese äußeren Elektronen in Zustände mit höherer Energie übergehen. In diesem Fall spricht man davon, dass diese angeregt werden.

Ein angeregtes, äußeres Elektron geht innerhalb von ca. 10 ns spontan wieder in einen Zustand mit geringerer Energie über, gleichzeitig wird ein Photon emittiert. Dieser Vorgang wird spontane Emission genannt. Aufgrund des physikalischen Prinzips der Energieerhaltung ist die Energie eines emittierten Photons gleich dem Betrag der Energiedifferenz zwischen Anfangs- und Endzustand des Elektrons beim Übergang in das tiefere Energieniveau. [15]

Die Energieniveaus in Atomen können keine beliebigen Zwischenwerte annehmen, weshalb sich die Energien der emittierten Photonen auf bestimmte Werte beschränken und zu Spektrallinien führen. Die Energieniveaus und damit die Spektrallinien des emittierten Lichts sind charakteristisch für das chemische Element, das diese aussendet. [16]

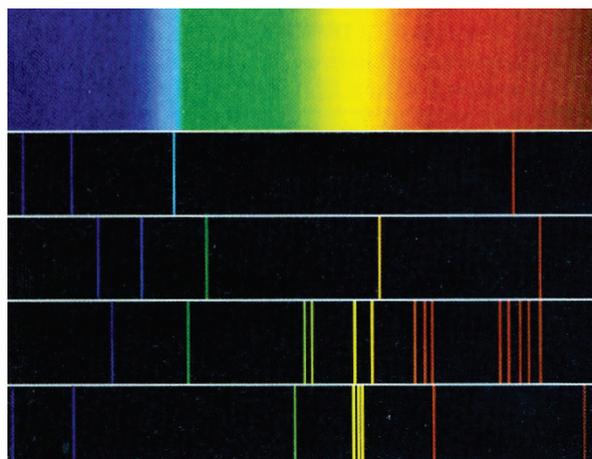


Abbildung 15: Im oberen Bereich ist ein kontinuierliches Spektrum des sichtbaren Bereichs zu sehen. Darunter befinden sich die Linienspektren von Wasserstoff, Helium, Barium und Quecksilber (von oben nach unten)

Quelle: Tipler, Paul A.; Mosca, Gene: Physik. Heidelberg, 2. Auflage 2006, S. 993.

3.2.2 Spontane Emission und Fluoreszenz

Die spontane Emission beschreibt den Vorgang, bei dem ein Atom oder Molekül, das sich in einem angeregten Zustand befindet, spontan in einen energetisch tieferen Zustand übergeht. Häufig gibt es einige dazwischenliegende Zustände, bis das angeregte Atom oder Molekül in den Grundzustand zurückkehrt.

Wird ein Atom beispielsweise durch ultraviolettes Licht angeregt, strahlt es sichtbares Licht aus, bis es über verschiedene Übergangszustände wieder den Grundzustand erreicht. [17] Man spricht von Fluoreszenz.

Fluoreszenz ist die Eigenschaft einiger Stoffe, Bruchteile von Sekunden nach der Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen, beispielsweise Licht, während des Übergangs eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie selbst zu leuchten. Das abgestrahlte Licht besteht aus einer für jeden Stoff charakteristischen Mischung von Wellenlängen. Die abgestrahlte Wellenlänge ist dabei immer mindestens so groß wie die Wellenlänge des eingestrahlt Lichts.

Fluoreszenz wurde erstmals an dem Fluor enthaltenden Mineral Fluorit (oder Flussspat bzw. chemisch Calciumfluorid) beobachtet, woher sich der Name ableitet. [18]
[19]

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

In der Medizin werden zwei Formen der Fluoreszenz unterschieden:

- **Autofluoreszenz bzw. Primäre oder intrinsische Fluoreszenz**

Fähigkeit eines Stoffes nach Energieeinstrahlung selbst zu leuchten. Eine Färbung ist nicht erforderlich.

- **Sekundäre Fluoreszenz**

Das Leuchten eines Stoffes wird durch einen Fluoreszenzmarker oder Färbung mit einem Fluorochrom erreicht. [20]



Abbildung 16: Violetter Fluorit aus Marokko

Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Fluorite-191782.jpg>

3.3 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer gibt die mittlere Abklingzeit an, die ein Stoff in einem angeregten Zustand verweilt, bevor er ein Photon emittiert und in den Grundzustand zurückkehrt. [21]

Die Lebensdauer kann dabei abhängig von der Konzentration des jeweiligen Stoffes sein. Anhand der Fluoreszenzlebensdauer lassen sich schwach vorkommende Fluorophore von stärkeren mithilfe deren Abklingzeit unterscheiden. In einem reinen Intensitätsfluoreszenzbild ist dies nicht der Fall.

Ferner lassen sich durch die unterschiedlichen Abklingzeiten selbst Fluorophore unterscheiden, die dasselbe spektrale Emissionsverhalten aufweisen, beispielsweise Lipofuszin und FAD. Somit bietet die Fluoreszenzlebensdauer noch mehr essentielle Informationen, als die für chemische Elemente charakteristischen Spektrallinien.

Der zeitabhängige Zerfall der Fluoreszenz folgt dem folgenden exponentiellen Gesetz:

$$I(t) = I_0 e^{\left(-\frac{t}{\tau}\right)}$$

Formel 2: Zeitabhängiger Zerfall der Fluoreszenz

In dieser Formel stellt I_0 die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Anregungspuls dar, wie er durch einen Laser erzeugt wird, t steht für die Zeit und τ für die Fluoreszenzlebensdauer. $I(t)$ steht somit für die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t . [4]

Um Fluoreszenzlebensdauern messen zu können, ist die zeitaufgelöste Aufzeichnung der Intensität emittierter Strahlung notwendig. Ein Verfahren, das dabei häufig Anwendung findet und auch bei dem FLIO-Gerät zum Einsatz kommt, ist die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC).

3.4 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC)

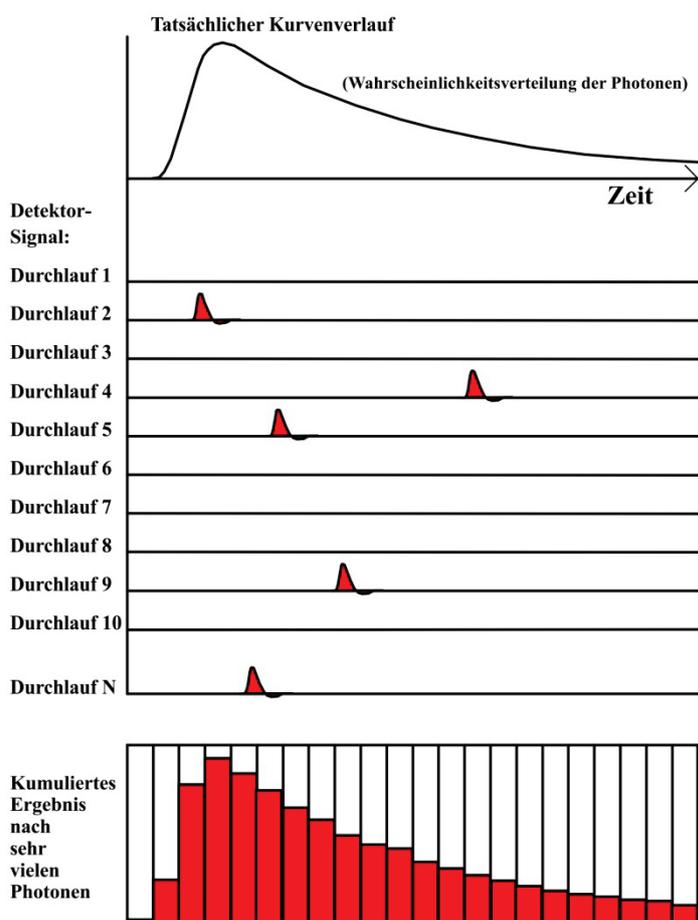


Abbildung 17: Grundprinzip von TCSPC

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Becker, Wolfgang: *The bh TCSPC Handbook*. Heidelberg, 4th Edition 2010, S. 38, Fig. 75.

Time-correlated single photon counting (TCSPC) oder zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung basiert auf der Detektion einzelner Photonen eines periodischen Anregungspulses (gepulste Lichtquelle) im Pikosekundenbereich, der Messung der Zeiten zwischen Anregung und Detektion sowie der Rekonstruktion des Kurvenverlaufs anhand der einzelnen Messungen. [22]

Vereinfacht beschreibt es eine Technik zur Messung von sich zeitlich schnell ändernden Lichtintensitäten. Hauptanwendung dieser Technik ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauern.

Mittels einer gepulsten Lichtquelle, beispielsweise eines gepulsten Lasers, werden die zu untersuchenden Fluorophore angeregt. Gleichzeitig mit diesem Anregungspuls wird eine sehr genaue Stoppuhr gestartet. Beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand wird ein Photon emittiert. Dieses emittierte Photon wird durch einen Detektor registriert und die Zeitmessung hierdurch gestoppt. Diese Messung wird in sehr vielen Durchläufen wiederholt, man erhält eine sehr große Anzahl an einzelnen zeitlich korrelierten Photonen, welche entsprechend der gemessenen Zeit in Bezug zum Anregungspuls in ein Histogramm einsortiert werden, ein so genanntes TCSPC-Histogramm. [23]

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

Ein TCSPC-Histogramm besitzt typischerweise eine zeitliche Klassenbreite bzw. Kanalauflösung von 1 bis 50ps und stellt den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität nach dem Anregungspuls dar.

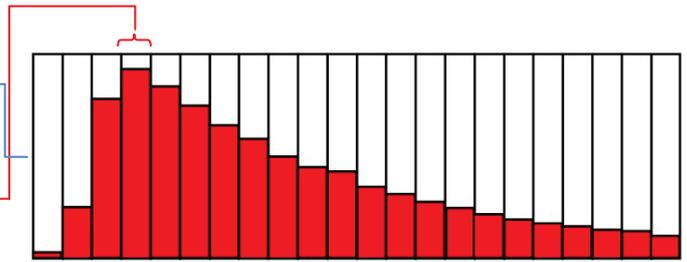


Abbildung 18: Kanäle (Klassen) eines TCSPC-Histogramms

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Becker, Wolfgang: *The bh TCSPC Handbook*. Heidelberg, 4th Edition 2010, S. 38, Fig. 75.

3.5 Technische Veranschaulichung des TCSPC-Prinzips

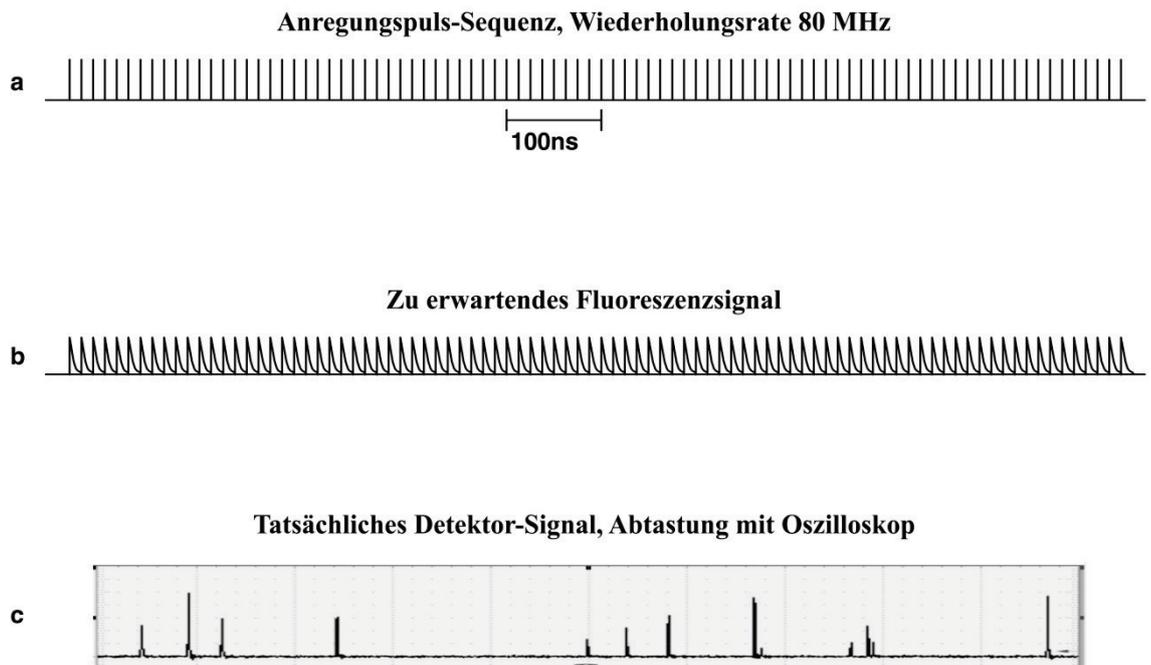


Abbildung 19: Erwartetes und tatsächliches Detektor-Signal einer Fluoreszenzmessung bei einer Puls-Wiederholungsrate von 80 MHz

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Becker, Wolfgang: *The bh TCSPC Handbook*. Heidelberg, 4th Edition 2010, S. 38, Fig. 74.

Abbildung 19 zeigt die Anregungspuls-Sequenz eines Lasers mit einer Puls-Wiederholungsfrequenz von 80 MHz (a). Der theoretisch zu erwartende Kurvenverlauf der gemessenen Fluoreszenz ist unter Punkt b aufgeführt. Ankommende Lichtimpulse äußern sich auf der Diode des Detektors in Spannungsänderungen und damit in einem eigenen Detektor-Signal. Dieses Signal eines Detektors, wie er auch im FLIO-Gerät verbaut ist, wird mit einem Oszilloskop, wie in Abbildung 19 (c) dargestellt, visualisiert. Tatsächlich hat die gemessene Kurvenform der Detektoren mit der zu erwartenden keinerlei Ähnlichkeit. Stattdessen liegen einige Pulse auf der Zeitachse verteilt. Die Pulse stehen repräsentativ für die Detektion einzelner Photonen des Fluoreszenzsignals. Die Lichtintensität ist so gering, dass die Wahrscheinlichkeit, in einer Periode überhaupt ein Photon zu detektieren, sehr klein ist. [24] Die Detektionsrate, welche in c dargestellt ist, beträgt 10^7 s^{-1} , was der üblichen technisch maximal möglichen Detektionsrate

der meisten Detektoren für Photonenzählung entspricht. Aus diesem Grund muss die gemessene Fluoreszenz-Kurve als Wahrscheinlichkeitsverteilung sehr vieler Photonen und Perioden betrachtet und kumuliert werden. Sehr deutlich wird in Abschnitt c, dass die Detektion von mehr als einem Photon pro Messperiode sehr unwahrscheinlich ist. [25] Wird aufgrund seltener Ereignisse dennoch mehr als ein Photon gemessen, wird das Ergebnis verworfen und nicht in die Verteilung einberechnet, da pro Anregungspuls nur ein Detektorpuls zulässig ist.

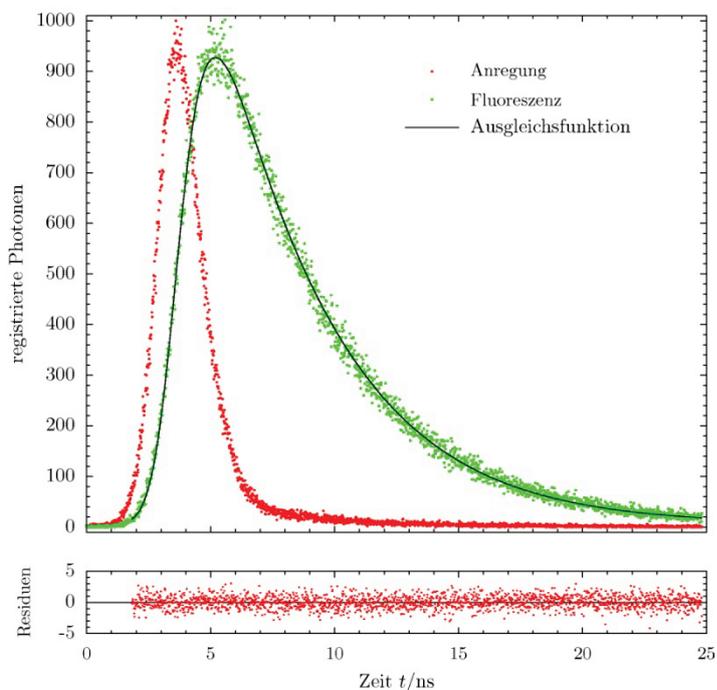


Abbildung 20: Histogramm einer Fluoreszenzlebensdauerermessung

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzlebensdauer>

dennoch mehr als ein Photon gemessen, wird das Ergebnis verworfen und nicht in die Verteilung einberechnet, da pro Anregungspuls nur ein Detektorpuls zulässig ist.

Die Abbildung 19 (c) macht sehr deutlich, dass das zu verarbeitende Detektorsignal aus einer Reihe von einigen wenigen verteilten Pulsen besteht, wovon jeder Puls der Detektion eines einzelnen Photons entspricht.

Wurde ein Photon detektiert, wird die Ankunftszeit des entsprechenden Detektorpulses innerhalb der Periode gemessen und im Speicher abgelegt, gleichzeitig wird der Puls selbst gespeichert. Somit erhält man eine genaue Anzahl an gemessenen Photonen sowie die genaue Messzeit nach Anregung für jedes einzelne dieser Photonen. Nach einer sehr großen Anzahl an Messdurchläufen (Perioden) ist eine ebenfalls sehr große Anzahl an Photonen gemessen. Es entsteht eine repräsentative und aussagekräftige Verteilung der Photonen über die Zeitperiode. Das Ergebnis ist das TCSPC-Histogramm.

3.5.1 Zwei Verfahren zur Fluoreszenzlebensdauer messung

Es existieren zwei Verfahren, welche zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer zum Einsatz kommen. Neben der vorgestellten Methodik der Messtechnik im Zeitbereich (time domain) kann die Fluoreszenzlebensdauer auch im Frequenzbereich (frequency domain) bestimmt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer messung im Frequenzbereich arbeitet mit einer zeitlich modulierten Anregungsquelle und kann daher mit einem Scanning Laser System (beispielsweise FLIO) nicht kombiniert werden.

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung ist die am weitesten verbreitete Methodik, die auch beim FLIO-Gerät zum Einsatz kommt. [23]

3.6 Instrument Response Function (IRF)

Die Instrument Response Function (IRF), frei übersetzt instrumentelle Zeitauflösung [14], wird durch alle Komponenten bestimmt, welche an der Messung beteiligt sind. Es handelt sich dabei um exogene Daten bzw. Gesetzmäßigkeiten, welche für die Auswertung der Messdaten wichtig sind. Das Zustandekommen dieser Einflüsse wird dabei nicht näher untersucht.

Bei dem TCSPC-Verfahren ist eine sehr gute Zeitauflösung essentiell, da man möglichst schnelle Prozesse messen möchte. Hierfür muss die Apparatur die grundsätzlichen Voraussetzungen erfüllen, den für die jeweilige Anwendung interessanten Wellenlängenbereich zu detektieren.

Beim FLIO-Gerät, wie auch bei den üblichen Aufbauten für die Fluoreszenz-Mikroskopie (FLIM), bestimmen die folgenden Komponenten die Instrument Response Function maßgeblich:

- **Gepulster Laser**

Im Pikosekundenlaser (Diodenlaser), der in dem Gerät zum Einsatz kommt, sind Pulslänge und Pulsform von der angelegten Leistung abhängig. Aus diesem Grund liegt bei diesem Laser immer die volle Leistung an, da in diesem Szenario die Pulslänge minimal ist. Ist aufgrund zu hoher Leistung eine Reduzierung der Laserintensität notwendig, werden geeignete Filter eingesetzt. Die typischen mittleren Pulslängen liegen im Bereich von 70 ps [26]. Wird ein Molekül durch einen Laserpuls angeregt, so ist nicht exakt bekannt, wann innerhalb dieses Pulses die Anregung tatsächlich stattgefunden hat. Diese Ungenauigkeit beeinflusst die Instrument Response Function.

- **Detektoren**

Die Detektoren besitzen ebenfalls eine eigene, spezifische Zeitauflösung, welche zudem von der Wellenlänge abhängig ist. Die beiden Detektoren, welche in dem FLIO-Gerät eingesetzt werden, besitzen eine Instrument Response Function von 120 ps [27].

- **Elektronik**

Neben der allgemeinen Elektronik des umgebauten SPECTRALIS HRA-Geräts (FLIO) tragen die verwendeten TCSPC-Steckkarten, welche an den PCI-Bus im PC angeschlossen sind, zur IRF bei. Die Elektronik der verwendeten SPC-150-Karten arbeitet mit einer Instrument Response Function von weniger als 3 ps [28].

- **Faseroptik**

Laufzeitunterschiede in den verwendeten Faseroptiken können beispielsweise aufgrund von Dispersion oder unterschiedlicher Einkoppelwinkel die IRF verbreitern.

Für das FLIO-Gerät werden die einzelnen Beiträge der Komponenten zur Gesamtzeitauflösung (IRF) nicht getrennt bestimmt, stattdessen wird für das gesamte Gerät eine IRF gemessen. Diese gesamte IRF reicht für die Auswertung der Daten aus, da wie bereits beschrieben, das Zustandekommen der Einzeleinwirkungen nicht von wesentlicher Bedeutung ist.

Wichtig ist die Instrument Response Function deswegen, weil es sich bei den Messergebnissen mathematisch betrachtet um eine Faltung der IRF-Beiträge der einzelnen Komponenten mit der beschriebenen Funktion für den zeitabhängigen Zerfall der Fluoreszenz $I(t)$ handelt [29]:

$$M(t) = IRF(t) \otimes I(t)$$

Formel 3: Faltung der IRF mit dem zeitabhängigen Zerfall der Fluoreszenz

Das bedeutet: wurde mit dem FLIO-Gerät durch eine Messung eine Fluoreszenzzerfallskurve bestimmt, so sind die zurückgelieferten Messdaten mit der Instrument Response Function des Geräts gefaltet. Vereinfacht kann von einer Unschärfe gesprochen werden.

Mit einem speziellen Spiegel als Target (künstlicher Augenersatz für Probemessungen) kann die Instrument Response Function des FLIO-Geräts gemessen und für die Entfaltung der Messdaten verwendet werden, um so die geschilderten Beiträge der technischen Komponenten herauszurechnen. Aus diesem Grund werden die Messdaten immer mit der zuvor bestimmten IRF entfaltet.

In der Auswertungssoftware zur Verarbeitung der gemessenen Daten wird die IRF für die Aufnahmeapparatur hinterlegt und bei jeder Auswertung neuer Messdaten automatisch in die Berechnungen einbezogen.

3.7 Hardwarekomponenten zur Fluoreszenz-Lebensdauer-Messung im Detail

Das optisch-mechanische Basissystem für das Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscope (FLIO) bildet ein modifiziertes SPECTRALIS HRA+OCT-System der Firma Heidelberg Engineering.



Abbildung 21: Becker & Hickl Puls laser BDL-473-SMC

Quelle: Illustration des Autors.

Als Anregungsquelle dient der Puls laser BDL-473-SMC mit einer Emissionswellenlänge von 473 nm. Der Laser erzeugt Pulse von 70 ps Dauer mit einer Repetitionsrate von 80 MHz. Die mittlere Leistung in der Hornhautebene beträgt maximal 200 μ W. Parallel zum Anregungslaser wird der Fundus (Augenhintergrund) mit einem Infrarot-Laser (IR-Laser) beleuchtet, um kontrastreiche Fundusbilder für das Eye Tracking-Verfahren aufzunehmen.

Die Exposition beider Laser ist dabei so gering, dass selbst bei einer Messzeit von 30.000 s der zulässige Grenzwert nicht erreicht wird. [30] [31]

Die eigentliche Detektion findet nicht im Kamerakopf statt, wie dies beim Standard-SPECTRALIS-System der Fall ist. Vielmehr wird das IR- und Fluoreszenzlicht über eine Multimode-Faser zu den TCSPC-Detektoren geführt, welche sich wie auch der Puls laser im Netzteil des Gerätes befinden. Durch einen Langpassfilter mit Kante bei 490 nm wird das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt. Ein dichroitischer Strahlleiter trennt das Fluoreszenzlicht vom Infrarot-Licht des IR-Lasers für die Fundusbilder. Über einen dichroitischen Spiegel wird das Fluoreszenzlicht schließlich in einen kurzwelligen (498 nm bis 560 nm) und einen langwelligen (560 nm bis 720 nm) Spektralbereich aufgeteilt, bevor es auf die Detektoren trifft.

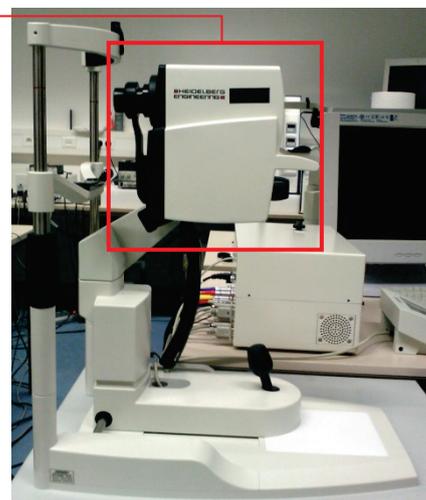


Abbildung 22: FLIO-Kamerakopf mit Stativ

Quelle: Illustration des Autors.

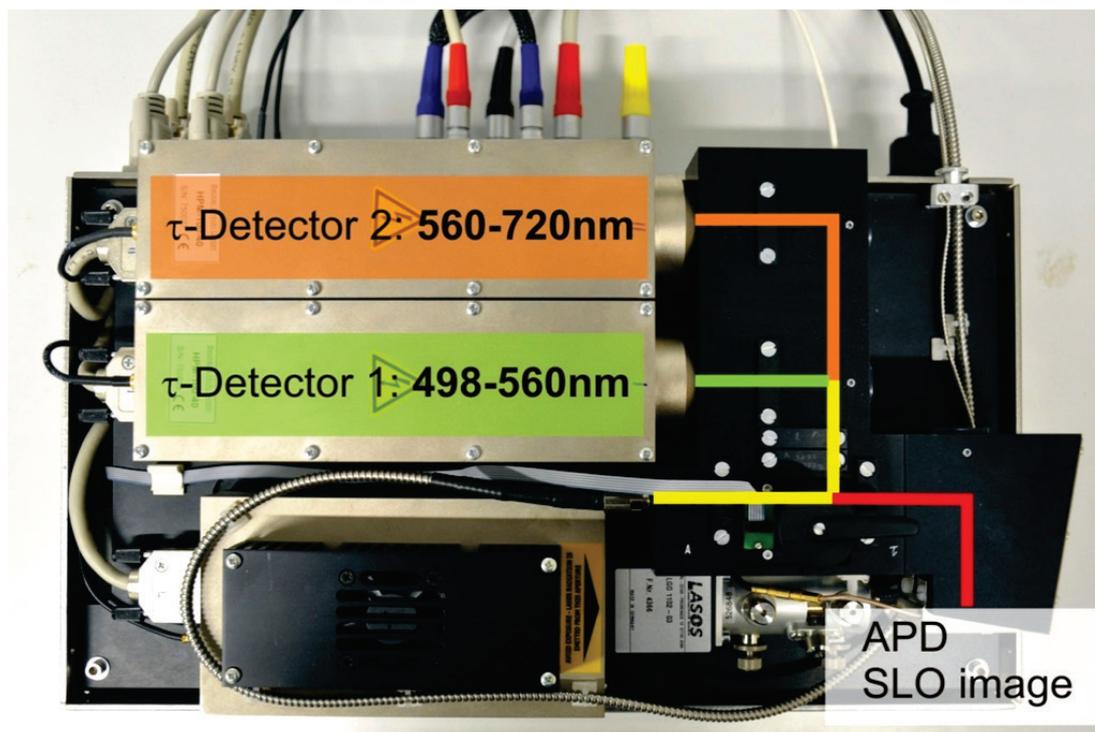


Abbildung 23: Zwei TCSPC-Detektoren (Hybrid-Detektoren) und Puls laser (unten)

Quelle: Heidelberg Engineering.

Die Detektion der zeitaufgelösten Fluoreszenz wird durch zwei TCSPC-Detektoren (Hybrid-Detektoren zur Detektion einzelner Photonen) des Typs HPM-100-40 nach dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) realisiert.

Als Stoppuhr, welche die Zeitspanne zwischen Anregungspuls und in dessen Folge Eintreffen des Photons auf einem Detektor misst, kommt das SPC-150-PCI-Kartensystem zum Einsatz. Hierfür wird pro Detektor eine entsprechende PCI-Karte in einem leistungsfähigen PC-System installiert. Die Karten ermöglichen, Zeitspannen ab $0,1 \mu\text{s}$ zu messen und Zeitkanäle mit einer Kanalaufösung (Kanalbreite) ab 813 fs [32] bei maximal 4096 Zeitkanälen insgesamt zu erreichen. [33]

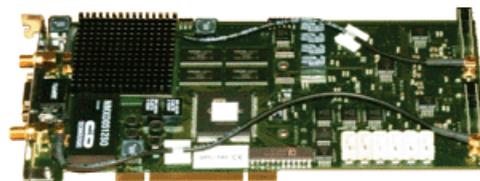


Abbildung 24: SPC-150-PCI-Karte

Quelle: <http://www.beckerhickl.com/images/spc140b.gif>

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

Die Konfiguration, Verwaltung, Überwachung und Spannungsversorgung der Detektoren und des PulsLasers erfolgt über eine DCC-100-PCI-Karte, die ebenfalls im PC-System installiert wird.



Abbildung 25: DCC-100-PCI-Karte

Quelle: <http://www.becker-hickl.com/images/dcc100.gif>

3.8 FLIO auf Basis des SPECTRALIS HRA+OCT-Systems

Das FLIO-Gerät wird auf Basis des etablierten SPECTRALIS-HRA+OCT-Systems aufgebaut und dessen Funktionen um die Fluoreszenzlebensdauer mit den beschriebenen Hardwarekomponenten sowie weiteren notwendigen Systemanpassungen erweitert.

„Auf einer erweiterbaren Plattform vereint das SPECTRALIS die Vorteile der Spektral-Domänen OCT mit denen der konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO).“ [34]

Eine der wichtigsten Technologien und Grundvoraussetzung für die Fluoreszenzlebensdauerermessung über einen längeren Zeitraum am Patienten bildet das aktive Eye Tracking-Verfahren TruTrack™ (siehe Kapitel 3.9). Ergänzt wird das System durch die Heidelberg Rauschunterdrückung, welche der bekannten Technologie der Dolby Laboratories für Tonaufnahmen gleicht und gestochen scharfe Bilder ermöglicht (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).



Abbildung 26: Heidelberg Engineering SPECTRALIS - Multimodale diagnostische Bildgebung

Quelle: Heidelberg Engineering.

3.8.1 Beispiel einer SPECTRALIS HRA-OCT-Aufnahme

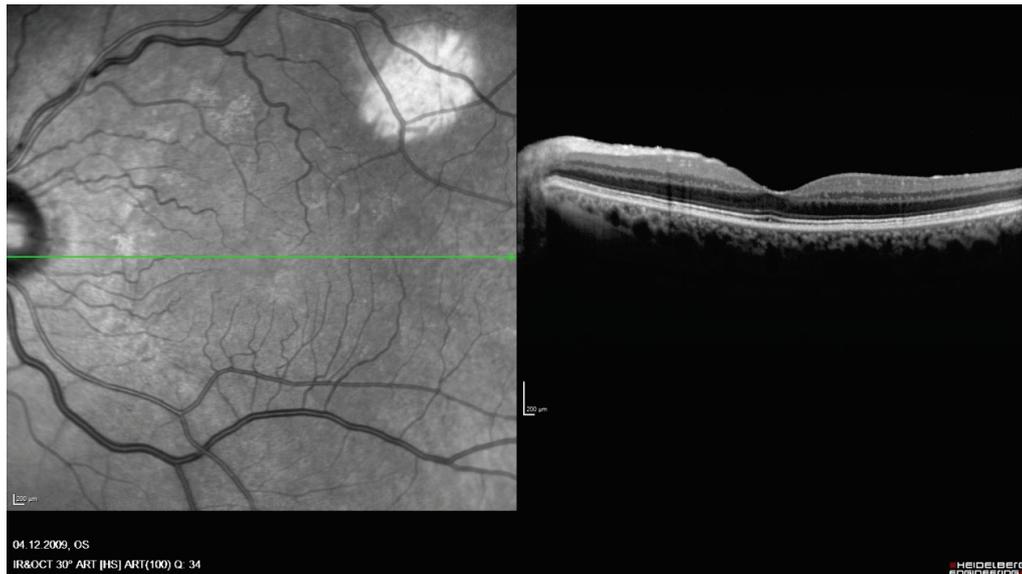


Abbildung 27: OCT-Aufnahme mit dem SPECTRALIS HRA+OCT

Quelle: Heidelberg Engineering.

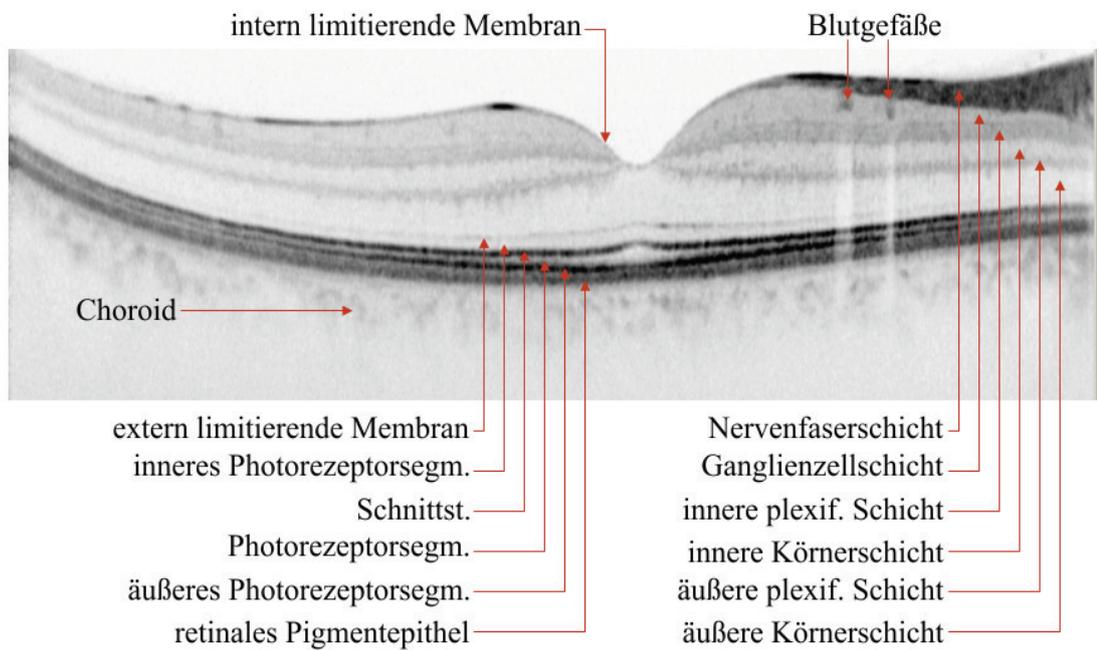


Abbildung 28: In-Vivo Histologie einer SPECTRALIS HRA+OCT-Aufnahme

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Heidelberg Engineering.

3.9 TruTrack™ Aktives Eye Tracking und FLIO



Abbildung 29: Eye Tracking

Quelle: Illustration des Autors, Lizenzierung durch Fotolia LLC.

TruTrack™ bezeichnet einen Software-Algorithmus, der von der Firma Heidelberg Engineering GmbH entwickelt wurde. Die Software besteht aus komplexen Mustererkennungsalgorithmen, die dazu dienen, anhand eines Infrarot-Reflektionsbildes, das durch einen Infrarot-Laser erzeugt und durch Scanner detektiert wird, wichtige Strukturen des Augenhintergrundes zu erfassen, insbesondere Blutgefäße und Bildveränderungen. Es werden dabei mehr als 1000 Datenpunkte [35] aufgenommen und verglichen. Mithilfe dieser Datenpunkte lassen sich die aufgenommenen Bilder überlagern und exakt ausrichten.

Durch die TruTrack-Technologie ist die Verfolgung und Kompensierung der Augenbewegungen während einer Messung und die Wiederholung von Aufnahmen an exakt derselben Stelle möglich. [36] Die Technologie befähigt das System, Änderungen in Größenordnungen von einem Mikrometer sicher zu messen. [37]

3 Technischer Hintergrund und theoretische Grundlagen

Das FLIO-Aufnahmemodul überträgt die durch die TruTrack™ -Technologie gelieferten Augenbewegungen auf die Fluoreszenzlebensdauerinformationen, um für jeden einzelnen Pixel des aufgenommenen endgültigen Bildes punktgenaue, zuverlässige und aussagekräftige Messdaten am lebenden Subjekt zu ermöglichen. Das Aufnahmemodul verifiziert die Daten automatisiert und entscheidet selbstständig darüber, neue Messdaten in die Gesamtaufnahme zuverlässig übertragen und zuordnen zu können oder ggfs. Messdaten zu verwerfen und aus Gründen der Zuverlässigkeit eine möglicherweise verlängerte Messdauer in Kauf zu nehmen. So wird erreicht, dass die detektierten Photonen am richtigen Bildpunkt in den richtigen Zeitkanal akkumuliert werden.

Die Überlagerung vieler Fluoreszenzbilder unter Berücksichtigung der Augenbewegung ist wichtig, um für jeden Pixel des Bildes ausreichend viele Fluoreszenzinformationen zu messen. Eine sehr große Anzahl an Informationen ist notwendig, um die Messdaten mit einem Fitting-Algorithmus weiterverarbeiten und einzelne Fluoreszenzlebensdauern (τ_i) mit einer Auswertungssoftware herausrechnen zu können (siehe Kapitel 4.12).

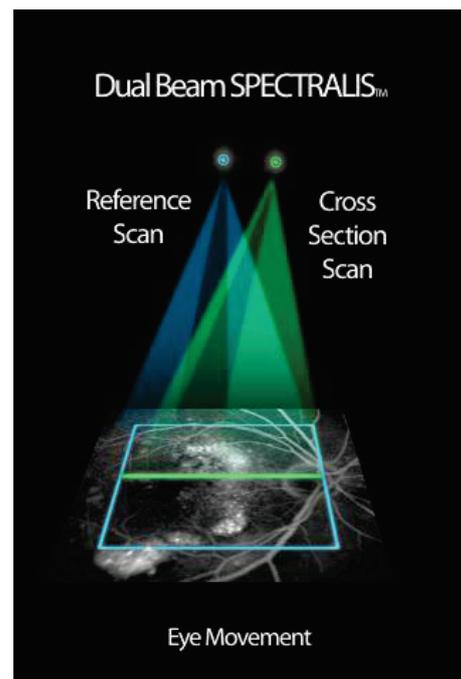


Abbildung 30: Anhand eines Referenzbildes mit festgesetzten Datenpunkten lassen sich nachfolgende Aufnahmen auf diesen Referenz-Scan übertragen

Quelle: Heidelberg Engineering

3.10 Heidelberg Eye Explorer (HEYEX)

Der Heidelberg Eye Explorer (HEYEX) ist die zentrale Softwarelösung für alle diagnostischen Geräte der Firma Heidelberg Engineering, so auch des SPECTRALIS-Systems, auf dem FLIO basiert. Es handelt sich um eine Patientenverwaltungssoftware, die es den Anwendern ermöglicht, Aufnahmen auf allen berechtigten Arbeitsplätzen in einem Praxis- oder Kliniknetzwerk betrachten und bearbeiten zu können.

Das System ist modular aufgebaut und lässt sich über Schnittstellen erweitern. Diese Schnittstellen nutzen das FLIO-Aufnahmemodul und der FLIO-Viewer, um sich fest in das System zu integrieren und unter anderem dessen Aufnahmefunktionen (TruTrack™) und die Patientendatenbank verwenden zu können. [38]

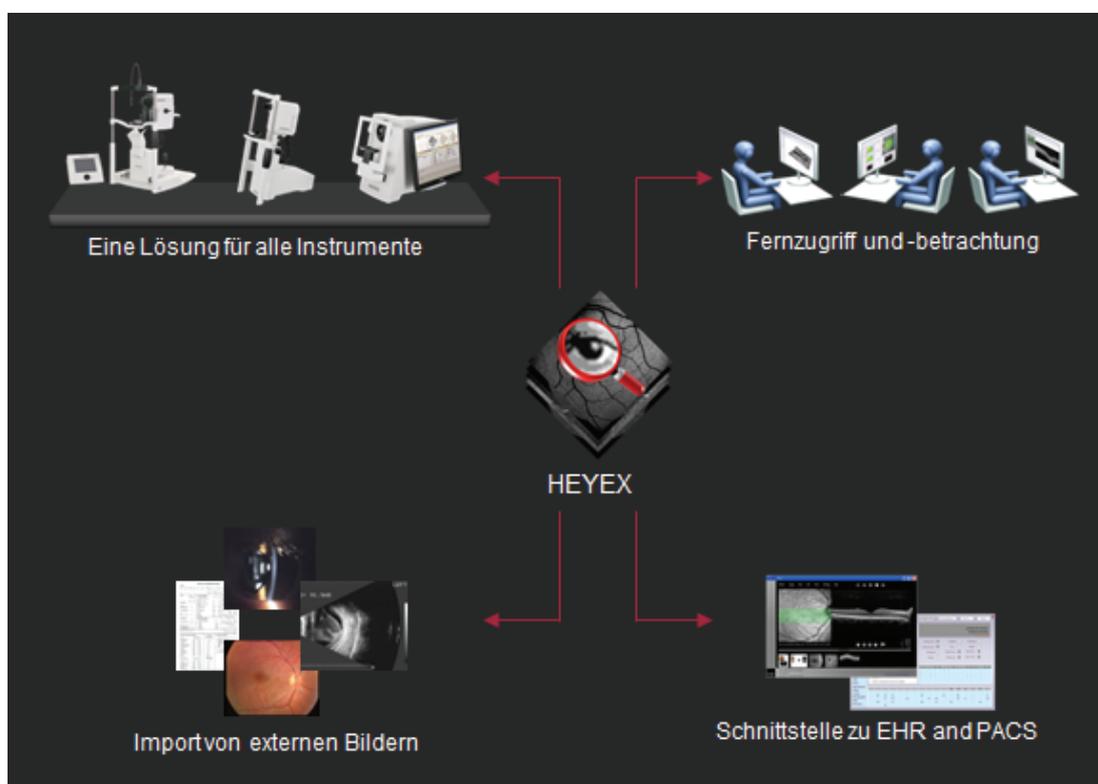


Abbildung 31: Heidelberg Eye Explorer (HEYEX) als zentrale Softwarelösung für alle Instrumente

Quelle: Heidelberg Engineering.

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauer-messungen

Im Folgenden werden in den Kapitel 4.1 und 4.2 zwei Studien näher erläutert, die sich dem Thema der Autofluoreszenz und bestimmten Erkrankungen im Bereich der Retina widmen. Die Aufnahmen wurden an den Augen von Probanden und Patienten mit einem ersten Prototyp auf Basis des Laser-Scanning-Angiograph (HRAII) der Firma Heidelberg Engineering erstellt (siehe Kapitel 1.1). Autoren der Studien sind Wissenschaftler der Universitäten Jena und Ilmenau.

4.1 Vergleich von Parametern der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und Patienten mit früher AMD

In einer sehr bedeutenden Studie [39] konnten im Chloroformextrakt des retinalen Pigmentepithels (RPE) erstmalig zehn verschiedene, fluoreszierende Komponenten des Alterspigments Lipofuszein unterschieden und charakterisiert werden. Diese Komponenten lagern sich bei altersbedingter Makuladegeneration in Zellen des RPE an, wobei die Komponenten 8, 9 und 10 des Lipofuszeins für Untersuchungen am lebenden Patienten von besonderem Interesse sind, da sie sich bei Wellenlängen über 400 nm zur Fluoreszenz anregen lassen [1]. Die Absorptionskante der Augenlinse gestattet keine Anregung der Fluoreszenz mit kürzeren Wellenlängen als 400 nm. [1] Bislang wurde lediglich die chemische Struktur der Komponente 8, wobei es sich um A2E handelt, analysiert. [40]

„Ziel der vorliegenden Studie war [...] [die] Messung von Unterschieden der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und AMD-Patienten. Insbesondere war zu untersuchen, ob Patienten [...] mittels der zeitaufgelösten Autofluoreszenz objektiv von Augengesunden differenzierbar sind.“ [1]

4.1.1 Methodik

Das zeitabhängige Abklingen der Fluoreszenzintensität wurde mit einer triexponentiellen Modellfunktion nach Kapitel 3.3 (Fluoreszenzlebensdauer) approximiert und nach drei Fluoreszenzlebensdauern aufgelöst (τ_1 bis τ_3):

$$\frac{I(t)}{I_0} = \sum_{i=1}^3 \alpha_i \cdot e\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + b$$

Formel 4: Fluoreszenzlebensdauer approximiert mit einer triexponentiellen Modellfunktion

$I(t)$ beschreibt dabei die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , I_0 die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t=0$, α_i die Amplitude der Komponente i , τ_i die Fluoreszenzlebensdauer bzw. Abklingzeit der Fluoreszenz der Komponente i und b das Untergrundrauschen (Background).

Für die Bestimmung des Abklingverhaltens wurde die Software SPCImage in Version 2.9.1 eingesetzt. „Die statistische Auswertung von globalen Veränderungen erfolgte anhand von Histogrammen der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 bis τ_3 . [...] Für die Studie wurden zur statistischen Auswertung globaler Veränderungen Messungen an 8 Augengesunden und 15 Patienten im Frühstadium der AMD [...] herangezogen. Das Alter der Augengesunden umfasste den Bereich von 41 bis 85 Jahren, mit einem mittleren Alter von 63,2 Jahren. Das mittlere Alter der AMD-Patienten betrug 74,7 Jahre und umfasste den Altersbereich von 65 bis 87 Jahren.“ [1]

Patienten mit künstlicher Linse (IOL) oder Augengesunde mit systemischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertension und anderen wurden nicht in die Statistik einbezogen, um eine ideale Vergleichsgruppe frei von Störsignalen zu gewährleisten. Ferner wurden ausschließlich Messungen für die Statistik berücksichtigt, bei denen ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte.

Durch einen dichroitischen Spiegel wurde das Fluoreszenzlicht in einen kurzwelligen Kanal (K1) mit 490-560 nm und einen langwelligen Kanal (K2) mit 560-700 nm spektral aufgeteilt.

4.1.2 Ergebnisse

Die für jeden Patienten individuellen Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzlebensdauern wurden summiert und tabellarisch dargestellt.

Tabelle 1 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von τ_1 bis τ_3 in beiden spektralen Kanälen (K1 und K2) dar. Die Lebensdauern, die für Patienten im Frühstadium der AMD gemessen und in Tabelle 2 dargestellt wurden, weisen im Mittel erhöhte Abklingzeiten auf.

Tabelle 1: Mittelwert und Standardabweichung der summierten Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung bei Augengesunden

Lebensdauer	Kanal	Mittelwert (ps)	Standardabweichung	Patientenanzahl
τ_1	K1	118	23	8
τ_1	K2	104	31	7
τ_2	K1	584	184	8
τ_2	K2	477	82	7
τ_3	K1	2826	583	8
τ_3	K2	1623	242	7

Tabelle 2: Mittelwert und Standardabweichung der summierten Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung bei Patienten im Frühstadium der AMD

Lebensdauer	Kanal	Mittelwert (ps)	Standardabweichung	Patientenanzahl
τ_1	K1	166	51	15
τ_1	K2	137	55	14
τ_2	K1	986	408	14
τ_2	K2	583	218	14
τ_3	K1	3309	989	15
τ_3	K2	1924	540	14

Aufgrund einer asymmetrischen Verteilung der TCSPC-Histogramme wurden die individuellen Medianwerte der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 bis τ_3 für den kurzwelligen (K1) und langwelligen Spektralkanal (K2) ausgewertet.

Es ließen sich Gesunde und Patienten im Frühstadium der AMD anhand der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 aus Kanal 1 und 2 sowie τ_2 des Kanals 1 statistische gesichert voneinander trennen. Gleichzeitig stellte sich heraus, dass τ_2 des zweiten Kanals und τ_3 beider Kanäle nicht für eine Trennung von Gesunden und Patienten im Frühstadium der AMD geeignet sind. Die folgenden Abbildungen 32 und 33 zeigen die Boxplots der Medianwerte der Fluorezenzlebensdauern τ_1 und τ_2 in den Kanälen 1 und 2.

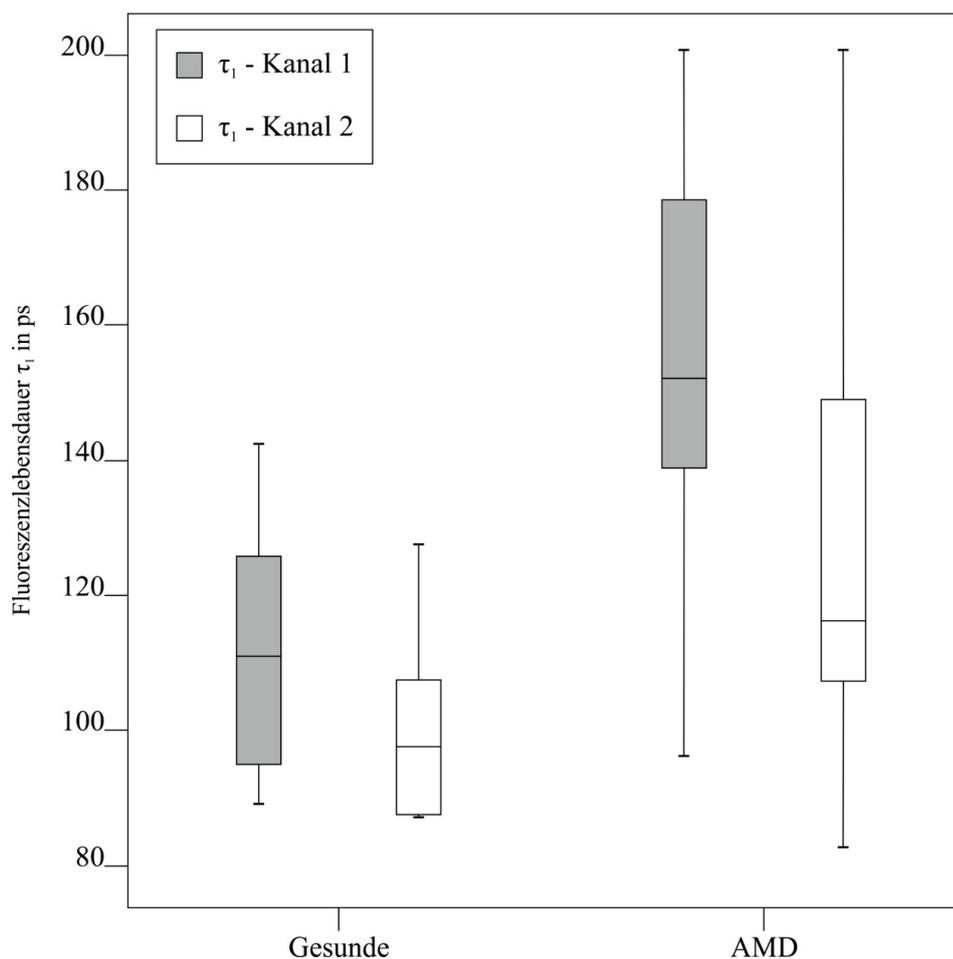


Abbildung 32: Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 von Gesunden und Patienten im Frühstadium der AMD

Quelle: Illustration des Autors, Schweitzer, vgl. D.; Quick, S.; Schenke, S.; Klemm, M.; Gehlert, S.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Fischer, J.: Vergleich von Parametern der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und Patienten mit früher AMD. Heidelberg, 2009, S. 718.

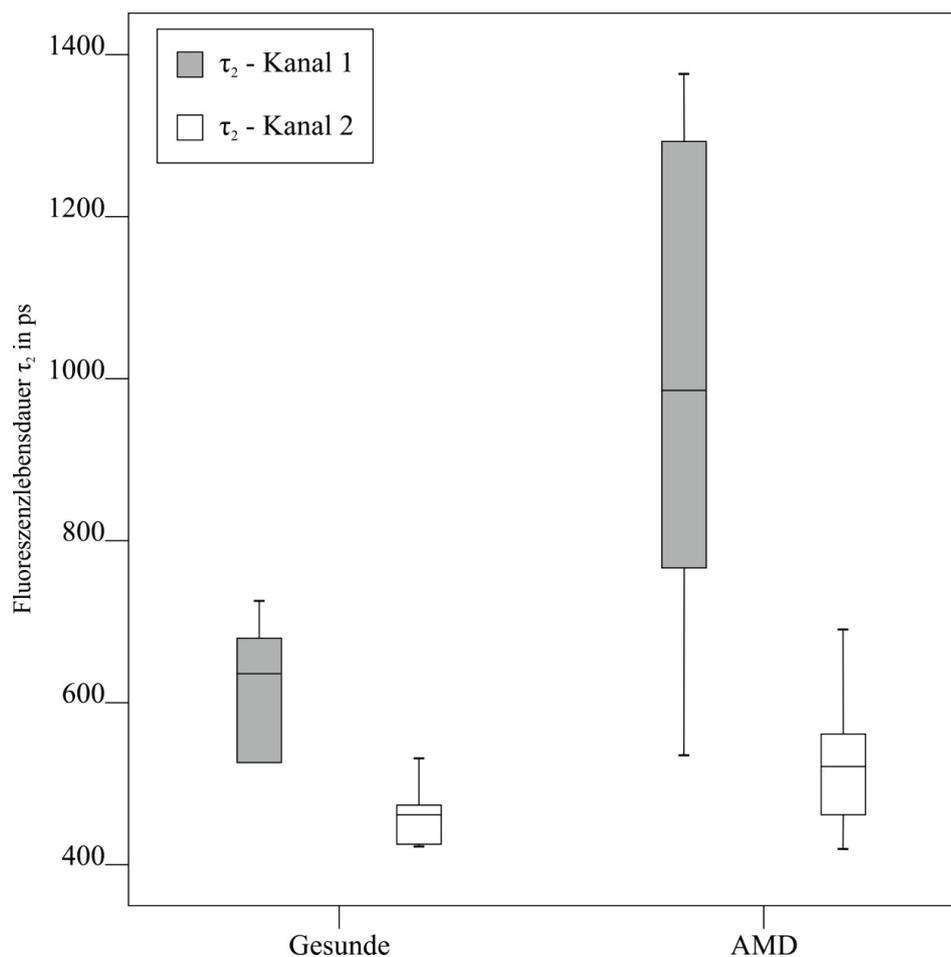


Abbildung 33: Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 von Gesunden und Patienten im Frühstadium der AMD. Nur im kurzwelligen Spektralkanal (Kanal 1) sind Gesunde und Patienten mit früher AMD hochsignifikant unterscheidbar

Quelle: Illustration des Autors, Schweitzer, vgl. D.; Quick, S.; Schenke, S.; Klemm, M.; Gehlert, S.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Fischer, J.: Vergleich von Parametern der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und Patienten mit früher AMD. Heidelberg, 2009, S. 718.

4.1.3 Diskussion

„In der vorliegenden Studie werden erstmalig Werte für die Fluoreszenzlebensdauern bei Augengesunden angegeben, die bei Messungen im 30-Grad-Feld gewonnen worden waren. Dabei zeigte sich, dass entsprechend der Voruntersuchungen [...] unterschiedliche Informationen aus den spektralen Kanälen 490-560 nm und 560-700 nm gewonnen werden konnten. Die Abklingzeiten im langwelligen Spektralkanal waren grundsätzlich kürzer als im kurzwelligen Spektralkanal. Interessant waren insbesondere die unterschiedlichen Abklingzeiten τ_2 in beiden Spektralkanälen.“ [1]

Es „zeigte sich, dass die Fluoreszenzlebensdauern bereits im Frühstadium der AMD in beiden spektralen Kanälen immer länger waren als bei Augengesunden.“ [1]

„Da die Messungen in einem 30-Grad-Fundusfeld vorgenommen wurden und nicht nur auf die Makula beschränkt waren, folgt, dass Veränderungen im Frühstadium der AMD, die mittels zeitaufgelöster Autofluoreszenz nachweisbar sind, den gesamten Augenhintergrund betreffen.“ [1]

Die Studie gibt einen interessanten Einblick in das Potential der Fluoreszenzlebensdauermessungen, um altersbedingte Makuladegeneration (AMD) frühzeitig erkennen und behandeln zu können. Auf dieser Grundlage lassen sich weitere Studien aufbauen, um die Aussagen zu quantifizieren. Die Anzahl der untersuchten Patienten reicht meines Erachtens bisher nicht aus, um gesicherte und medizinisch fundierte Aussagen treffen zu können. Der Einfluss von systemischen Krankheiten auf das Fluoreszenzverhalten muss näher untersucht werden, um Fehldiagnosen aufgrund einer beispielsweise noch nicht diagnostizierten Krankheit ausschließen zu können. Die tabellarische Darstellung der Mittelwerte verschiedener Patienten (siehe Tabelle 1 und 2) lässt eine differenzierte Betrachtung der individuellen Messergebnisse nicht zu.

4.1.4 Schlussfolgerung

„Die Messungen im 30-Grad-Fundusfeld zeigen, dass bereits im Frühstadium der AMD spezifische Änderungen auch außerhalb der Makula vorliegen. [...] Verlängerungen der Lifetime τ_2 im kurzwelligen Kanal können zumindest teilweise auf eine Zunahme von an Protein gebundenem NADH zurückgeführt werden, dessen Anteil bei verringerter Zellatmung steigt.“ [1]

4.2 Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen

Durch Provokation des Stoffwechsels kann der Einfluss einzelner Fluorophore deutlicher erfasst werden. Verschlüsse im retinalen Gefäßsystem verändern den retinalen Stoffwechsel.

„Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob bei arteriellen retinalen Verschlüssen Veränderungen in der zeitaufgelösten Autofluoreszenz [...] nachweisbar waren.“ [4]

4.2.1 Methodik

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, wurde der zeitabhängige Abfall der Fluoreszenzintensität mit der triexponentiellen Modellfunktion approximiert:

$$\frac{I(t)}{I_0} = \sum_{i=1}^3 \alpha_i \cdot e\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + b$$

Formel 5: Fluoreszenzlebensdauer approximiert mit einer triexponentiellen Modellfunktion

Die Autofluoreszenzlebensdauern wurden an sechs Patienten mit Astarterienverschluss gemessen.

Um Stoffwechselunterschiede, die durch die Astarterienverschlüsse verursacht wurden, zu erkennen, „wurden die Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzlebensdauern in gleich großen Feldern des gesunden und des unversorgten Fundusbereichs bestimmt.

Die typischen Veränderungen der dynamischen Fluoreszenz werden an 2 Einzelbeispielen demonstriert“ [4] und mit repräsentativen Ergebnissen eines Augengesunden verglichen.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Patientin A

Am Fundus (Augenhintergrund) einer 69-jährigen Patientin mit Astarterienverschluss (Abbildung 34) konnten metabolische Veränderungen im temporal inferioren Gebiet nachgewiesen werden.

Die Daten der Fluoreszenzlebensdauermessung wurden einerseits für den temporal inferioren Bereich ausgewertet, der vollständig im nicht versorgten Fundusgebiet liegt , und andererseits zum Vergleich für einen ebenso großen Bereich im gesunden  temporal superioren Fundusgebiet. Die Rechtecke begrenzen die ausgewerteten Bereiche, sind in der Größe deckungsgleich und liegen symmetrisch zur Fovea.

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden wie bereits in der vorangegangenen Studie in den Spektralkanälen 490-560 nm und 560-700 nm gemessen. Die Histogramme zu den ausgewerteten Bereichen zeigen die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 , „da deren unterschiedliche Histogrammverteilungen Rückschlüsse auf Veränderungen des Stoffwechsels gestatten.“ [4]

In den folgenden Histogrammen beschreiben die blauen Kurven jeweils die Fluoreszenzlebensdauern des aufgrund eines Verschlusses nicht versorgten Fundusbereichs, die roten Kurven die Lebensdauern des gesunden Fundusbereichs.

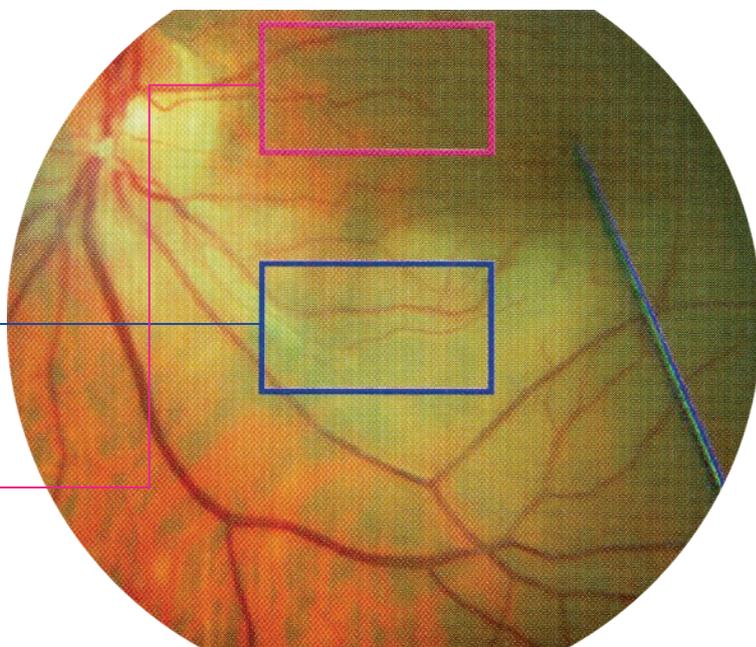


Abbildung 34: Fundus der 69-jährigen Patientin mit retinalem Astarterienverschluss im temporal inferioren Bereich (blau), unter anderem an der weißlichen Färbung erkennbar

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1146.

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen

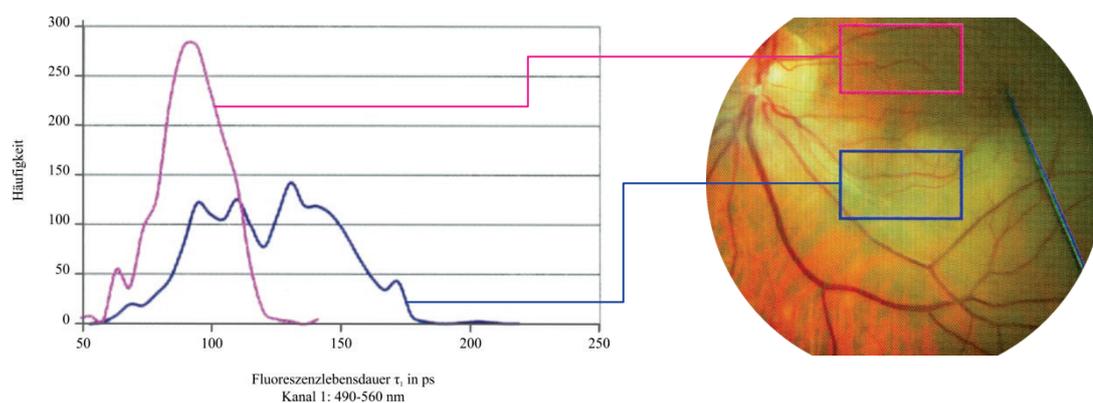


Abbildung 35: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm (links) und Fundus der untersuchten Patientin mit eingezeichneten Auswertungsbereichen (rechts)

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1146.

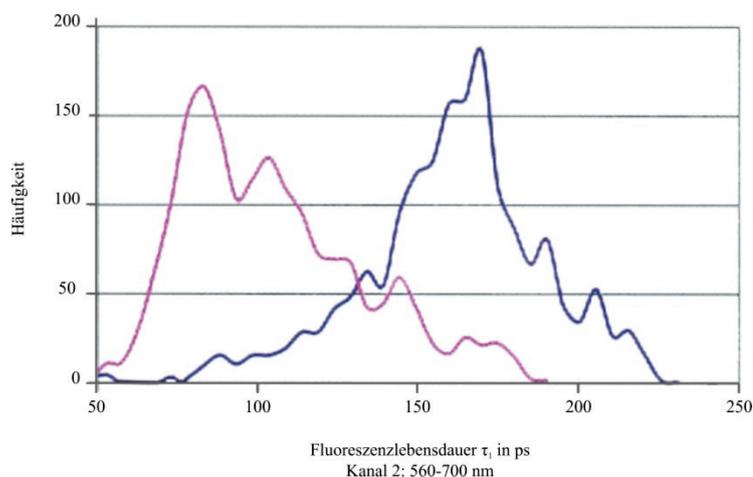


Abbildung 36: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1146.

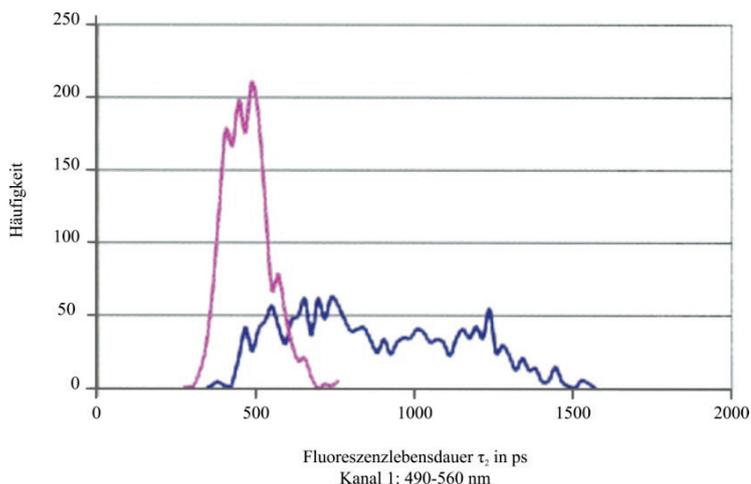


Abbildung 37: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1146.

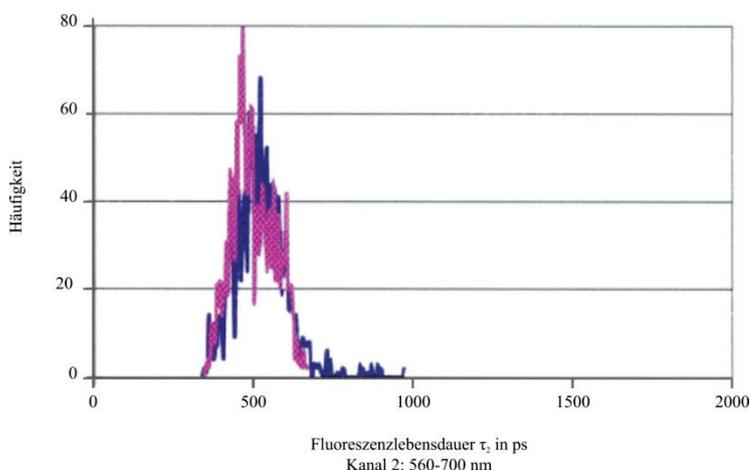


Abbildung 38: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1146.

„Die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 war in beiden Spektralkanälen [...] im nicht versorgten Bereich gegenüber dem gesunden Bereich verlängert. Im kurzwelligen Spektralkanal [...] war der Modalwert von $\tau_1 = 127,5 \text{ ps}$ im mangelversorgten Fundusbereich gegenüber $\tau_1 = 92,5 \text{ ps}$ im gesunden Fundusbereich erhöht [Abbil-

dung 35]. Dabei ist der Modalwert im Histogramm der Fluoreszenzlebensdauer die Lebensdauer, die im betrachteten Fundusgebiet am häufigsten bestimmt wird.

Auch im langwelligen Spektralbereich [...] war der Modalwert von $\tau_1 = 167,5 \text{ ps}$ im mangelversorgten Bereich deutlich höher als im gesunden Bereich ($\tau_1 = 82,5 \text{ ps}$) [Abbildung 36].“ [4]

Die deutlichsten Veränderungen konnten für die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 im kurzwelligen Spektralkanal nachgewiesen werden (Abbildung 37). Während sich im gesunden Fundusbereich eine sehr schmale Verteilung mit einem Modalwert $\tau_2 = 470 \text{ ps}$ und einer Halbwertsbreite von 160 ps ergab, wurde im unterversorgten Bereich eine sehr breite Verteilung gemessen, die von $\tau_2 = 500 \text{ ps}$ bis $\tau_2 = 1500 \text{ ps}$ reichte. Für den langwelligen Spektralkanal konnte zwischen gesundem und unterversorgtem Bereich keine auffällige Verteilung detektiert werden, die Kurven waren vielmehr deckungsgleich. Die Halbwertsbreite betrug ca. 150 ps (Abbildung 38).

4.2.2.2 Patient B

Weitere Messungen wurden an einem 49-jährigen Patienten mit Gefäßverschluss im temporal superioren Bereich durchgeführt. Anhand der weißlichen Färbung ist in Abbildung 39 der nicht versorgte Bereich deutlich zu erkennen. □

Erneut wurde ein gesunder Bereich derselben Größe für den Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 in den beiden genannten Spektralkanälen ausgewählt. □

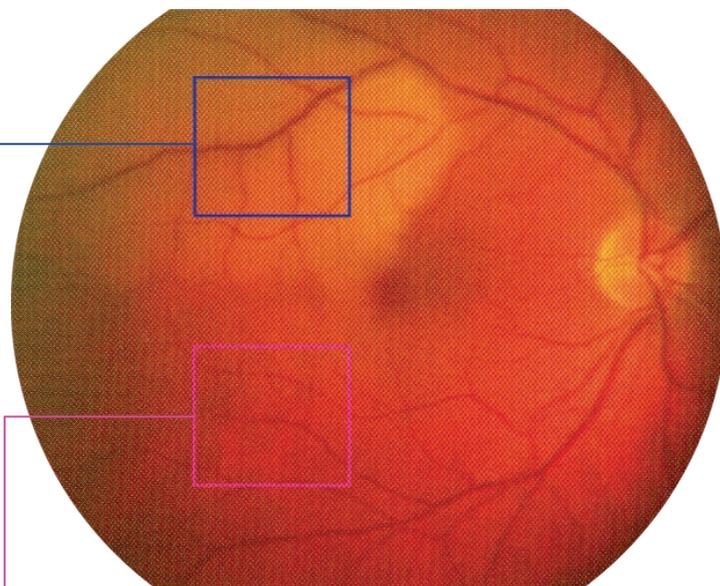


Abbildung 39: Retinaler Arterienverschluss im temporal superioren Bereich eines 49-jährigen Patienten

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1148.

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen

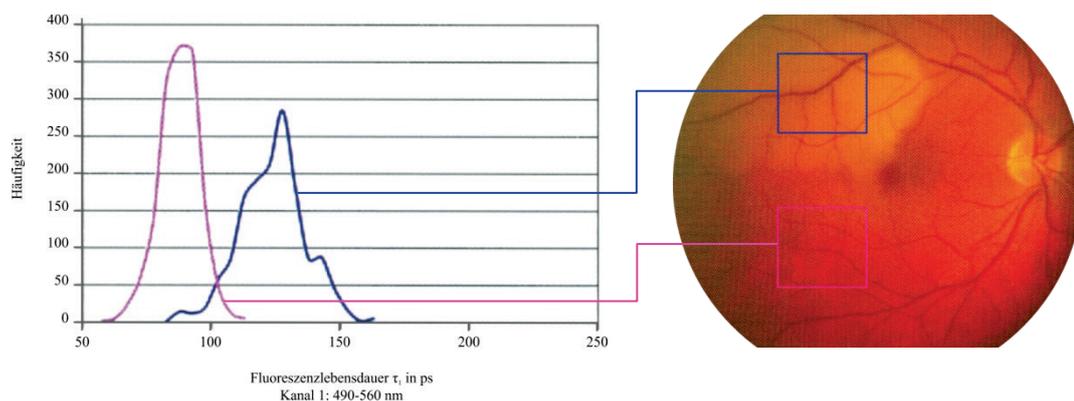


Abbildung 40: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm (links) und Fundus des untersuchten Patienten mit eingezeichneten Auswertungsbereichen (rechts)

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologie: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1148.

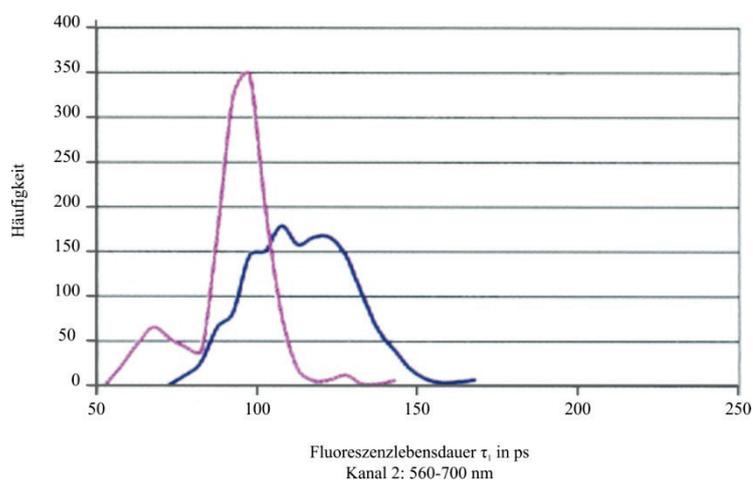


Abbildung 41: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologie: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1148.

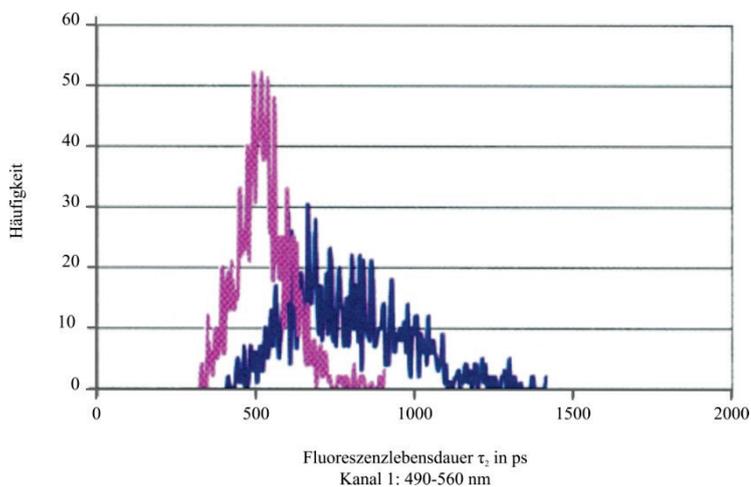


Abbildung 42: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1148.

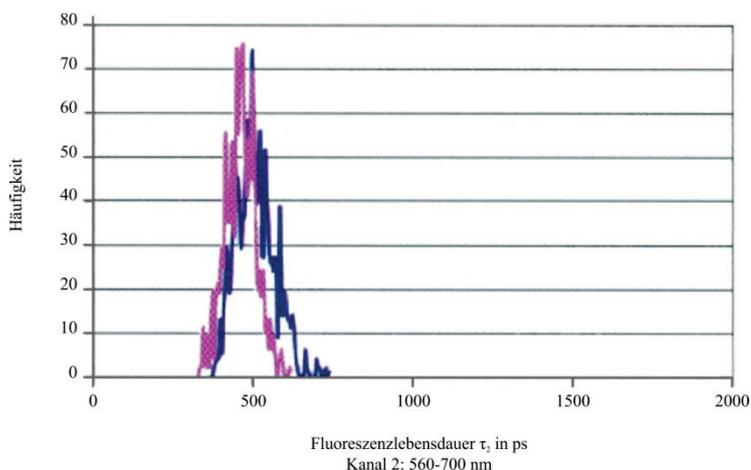


Abbildung 43: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1148.

„Unabhängig von der Lage des Verschlusses war die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im ersten Beispiel in beiden Spektralkanälen [...] im mangelversorgten Bereich immer länger als im nicht betroffenen Bereich.“ [4]

Verglichen mit den Ergebnissen der Patientin A war die Halbwertsbreite der Verteilung von τ_1 im kurzwelligen Kanal 1 des Patienten B im nicht versorgten Fundusbereich mit 25 ps deutlich kleiner als die Werte der Patientin A, die bei 75 ps lagen. Dennoch wird sofort deutlich, dass der Modalwert der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im kurzwelligen Spektralkanal wiederum im gesunden Bereich mit 92,5 ps deutlich unter dem verlängerten Wert von 127,5 ps des nicht versorgten Bereichs liegt (Abbildung 40).

Im langwelligen Kanal 2 betrug der Modalwert von τ_1 im gesunden Bereich 97,5 ps und besaß eine Halbwertsbreite von 15 ps. Der unterversorgte Bereich hatte eine deutlich flachere Verteilung von τ_1 mit einem Modalwert von 112,5 ps und einer Halbwertsbreite von 40 ps (Abbildung 41).

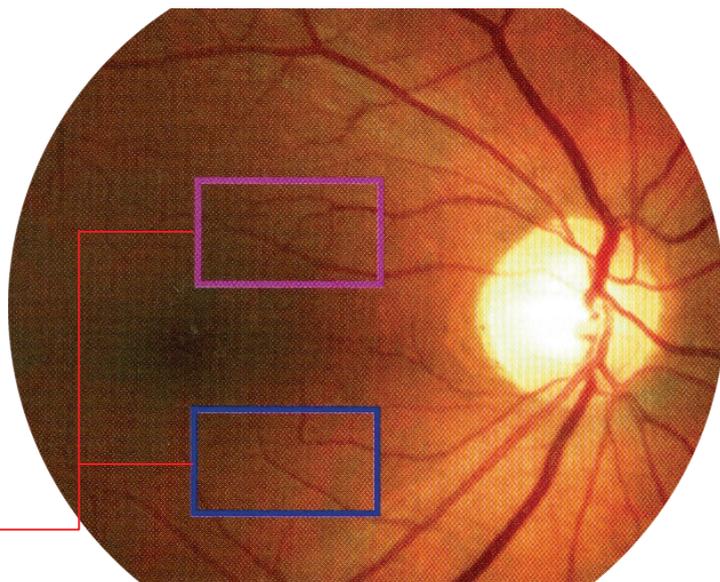
Erneut waren die Ergebnisse für τ_2 im langwelligen Kanal 2 annähernd deckungsgleich für den gesunden und den unterversorgten Bereich (Abbildung 43). Im kurzwelligen Spektralkanal unterschieden sich die Modalwerte der Verteilung von τ_2 erheblich. Im gesunden Fundusbereich lag der Modalwert bei 517 ps bei einer Halbwertsbreite von 280 ps, im nicht versorgten Bereich bei 280 ps und einer Verteilung von 500 bis 1400 ps (Abbildung 42).

Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauern unabhängig davon sind, ob sich der nicht versorgte Bereich im superioren oder inferioren Fundusgebiet befindet.

4.2.2.3 Augengesunde

Um diese Aussage untermauern zu können, „wurden zum Vergleich die Verteilungen der Fluoreszenzlebensdauern in gleich großen Bereichen der temporalen superioren und inferioren Gebiete einer 55-jährigen Augengesunden herangezogen.“ [4]

In der Abbildung 44 sind die betrachteten Fundusbereiche eingezeichnet. □



„Die berechneten Verteilungen der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 waren für den superioren und den inferioren Bereich in beiden Spektralkanälen nahezu deckungsgleich [Abbildung 45 und Abbildung 46].“ [4] Die Verteilungskurven von τ_2 sind bei diesem Probanden im Gegensatz zu den Vergleichen hinsichtlich τ_2 in gesundem und mangelhaft versorgtem Fundusbereich der Patienten A und B in beiden Spektralkanälen annähernd identisch (Abbildung 47 und Abbildung 48).

Abbildung 44: Fundusbild eines Augengesunden mit temporal superiorem und inferiorem Vergleichsfeld

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologie: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1150.

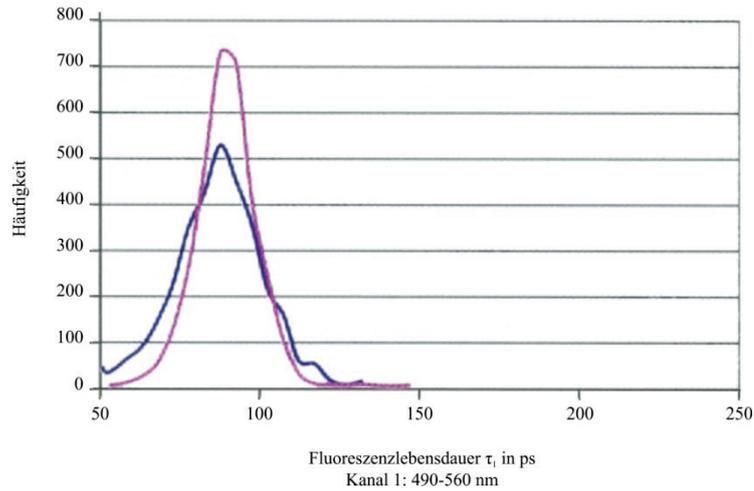


Abbildung 45: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1150.

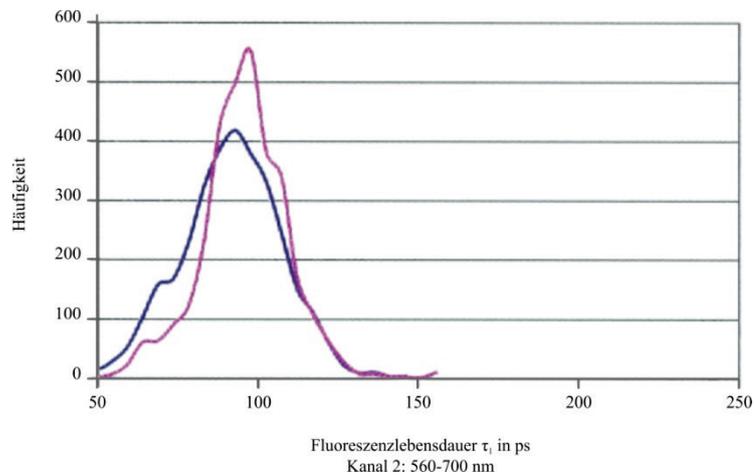


Abbildung 46: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1150.

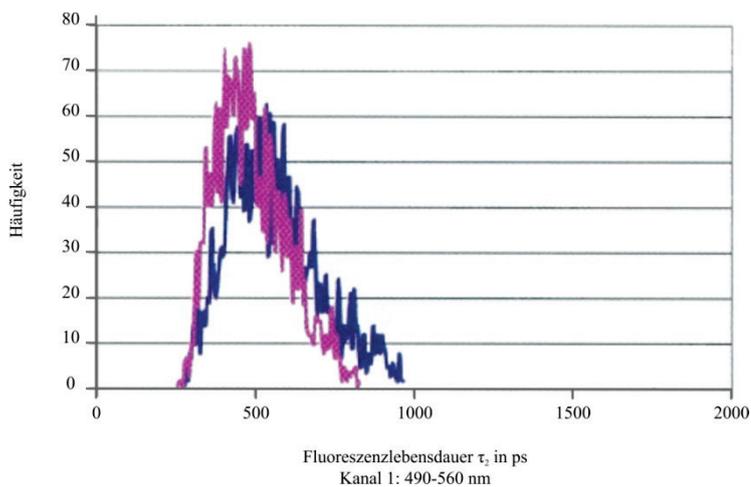


Abbildung 47: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 1 mit 490-560 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1150.

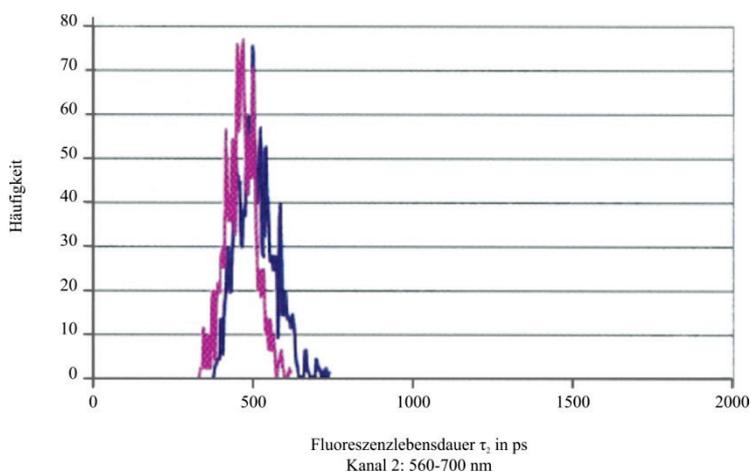


Abbildung 48: TCSPC-Histogramm der Fluoreszenzlebensdauern τ_2 im Spektralkanal 2 mit 560-700 nm

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. Heidelberg, 2010, S. 1150.

Die Fluoreszenzlebensdauern unterscheiden sich bei Augengesunden zwar leicht im Vergleich zwischen dem langwelligen und kurzwelligen Spektralkanal, es bestehen jedoch keine Unterschiede zwischen den temporal superioren und inferioren Bereichen. Um diese Aussage zu bekräftigen, werden in der folgenden Tabelle 3 die

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen

Modalwerte der Lebensdauervertelungen von drei weiteren Augengesunden (N_1 , N_2 , N_3) dargestellt.

Tabelle 3: Modalwerte der Lebensdauervertelungen von drei Augengesunden (N_1 , N_2 , N_3)

Proband	Bereich	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)
N_1	Superior	88	498	2209	91	476	1446
N_1	Inferior	86	487	2164	88	477	1447
N_2	Superior	95	520	3819	93	452	2523
N_2	Inferior	91	545	4034	92	459	2710
N_3	Superior	63	356	1639	41	312	1205
N_3	Inferior	58	339	1635	40	312	1190



Kanal 1 (490-560 nm)



Kanal 2 (560-700 nm)

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen

4.2.2.4 Zusammenschau

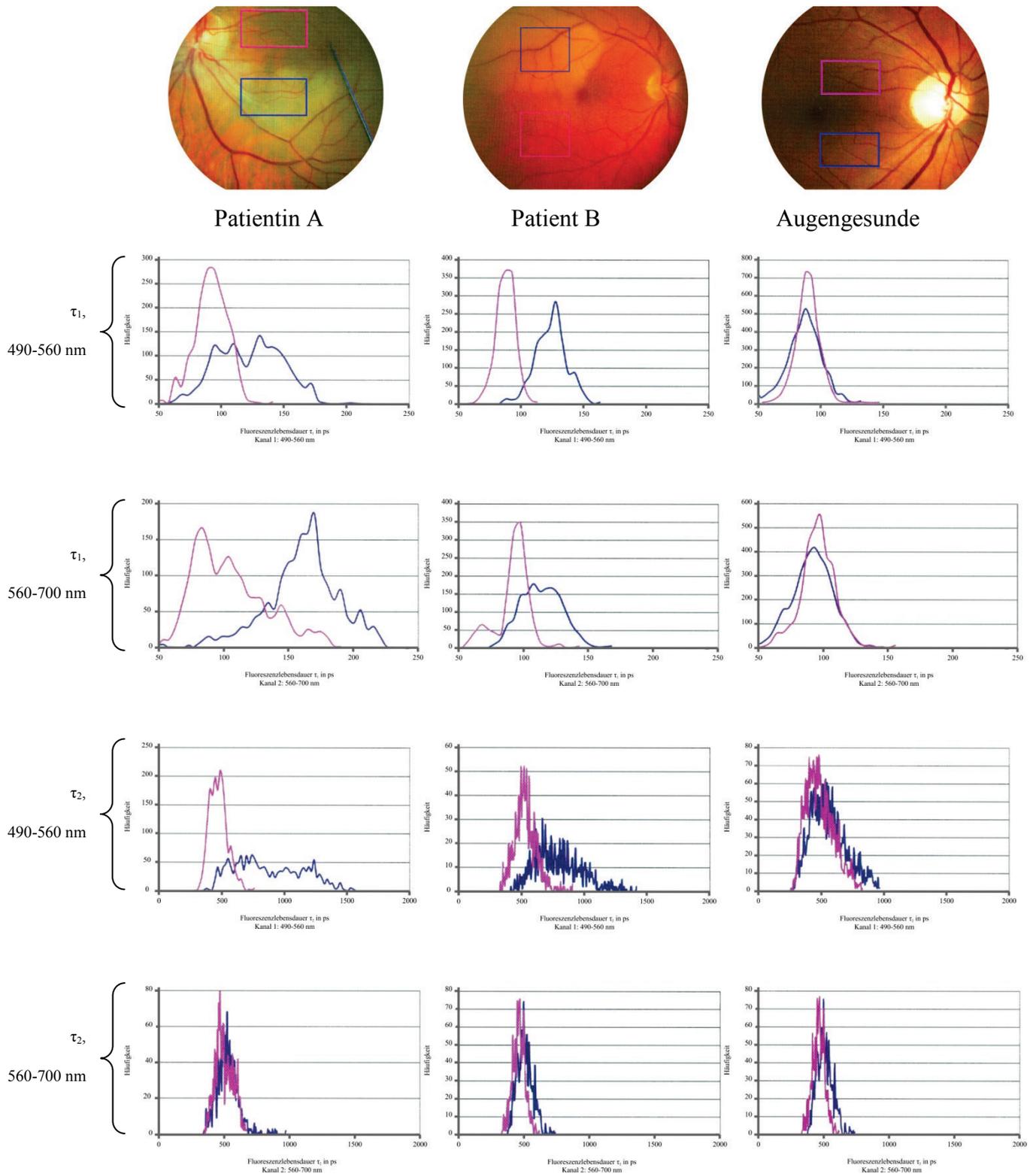


Abbildung 49: Fundusbilder und TCSPC-Histogramme der Studie in einer Zusammenschau, Patientin A (links), Patient B (Mitte), Augengesunde (rechts)

Quelle: Illustration des Autors, vgl. Schweitzer, D.; Quick, S.; Klemm, M.; Hammer, M.; Jentsch, S.; Dawczynski, J.: *Ophthalmologe: Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen*. Heidelberg, 2010, S. 1146, 1148, 1150.

4.2.3 *Diskussion*

„Die Fluoreszenzlebensdauer ist bei Messungen am Auge vorwiegend durch FAD und durch Lipofuszein geprägt. FAD fluoresziert stark mit einem Maximum bei 530 nm, wenn genügend Sauerstoff für den zellulären Metabolismus zur Verfügung steht.“ [4] Lipofuszein fluoresziert maximal bei 600 nm. Der Einfluss von FAD ist im kurzwelligen Kanal größer als im langwelligen, wogegen Lipofuszein einen größeren Einfluss auf den langwelligen Kanal als auf den kurzwelligen hat. Im unterversorgten Fundusbereich herrscht ein Mangel an Sauerstoff, wodurch sich der Anteil von FAD an der Bildung der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 verringert (siehe Kapitel 2.1). Gleichzeitig erhöht sich der Einfluss von Lipofuszein, insbesondere der Komponente A2E, dessen Vorkommen unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit fluoresziert. Aus diesem Grund verlängert sich die approximierte Fluoreszenzlebensdauer τ_1 im nicht versorgten Gewebe. [4]

Sehr interessant ist die Verteilung von τ_2 zwischen gesunden und unterversorgten Fundusbereichen. Während τ_2 im kurzwelligen Spektralbereich im unterversorgten Fundusbereich sehr stark in Richtung verlängerter Lebensdauern verschoben war, konnten im langwelligen Spektralbereich für τ_2 keine Unterschiede zwischen gesunden und unterversorgten Bereichen nachgewiesen werden.

„Dieses unterschiedliche Verhalten ist durch den Einfluss von NADH auf die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 , speziell im kurzwelligen Spektralkanal [...], erklärbar.“ [4] Im kurzwelligen Spektralkanal ist NADH nachweisbar, im langwelligen Spektralkanal jedoch nicht mehr, da das Maximum der Fluoreszenz von NADH bei 460 nm liegt. „Die Verlängerung der Fluoreszenzabklingzeit τ_2 in den nicht versorgten Bereichen bei Astarterienverschluss ausschließlich im kurzwelligen Spektralkanal [...] ist als Zunahme des proteingebundenen NADH zu interpretieren, die bei glykolytischer Energiegewinnung auftritt“ [4] (siehe Kapitel 2.1). Proteingebundenes NADH hat eine höhere Fluoreszenzlebensdauer, als freies NADH. Unter anaeroben Bedingungen erhöht sich der Anteil an proteingebundenem NADH. [4]

4.2.4 *Schlussfolgerung*

„Die Verlängerung von τ_1 im unterversorgten Gewebe ist auf geringeren Beitrag von proteingebundenem FAD zurückzuführen. Die Verlängerung von τ_2 (ca. 500 ps) in

4 Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen

gesundem Gewebe gegenüber ca. 1,5 ns im unterversorgten ist wahrscheinlich durch proteingebundenes NADH verursacht, das bei der Glykolyse entsteht.“ [4]

5 Resultate

Im Zentrum der Arbeit stand die Entwicklung des FLIO-Aufnahmemoduls zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern und Fluoreszenzintensitäten. Daneben wurde ein FLIO-Viewer umgesetzt, um die umfangreichen Daten, die während einer Messung anfallen, verwalten zu können.

In Kapitel 5.1 werden die in Kapitel 1 erwähnten Anforderungen, Problemstellungen und Zielsetzung sowie die Ausgangssituation präzisiert.

Kapitel 5.2 widmet sich der Entwicklung und Realisierung der Software sowie der Möglichkeiten der Weiterverarbeitung der Messdaten.

Desweiteren konnte ein Prototyp fertiggestellt und in einem Klinikum an Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen getestet werden. In besonderem Fokus standen dabei die in Kapitel 2.3 beschriebenen Erkrankungen. Im Anschluss an die Präsentation der Software und deren Leistungsfähigkeit werden in Kapitel 5.3 exemplarisch einige wenige Auswertungsbögen zu Patientenmessungen dargestellt, welche mit der neuen Software und dem neuen FLIO-Gerät im Klinikeinsatz angefertigt wurden. Die Aufnahmen bzw. Messungen wurden durch den Autor sowie Fotografen des Inselspitals Bern durchgeführt und die Auswertungsbögen durch den Autor erstellt.

In Anhang A finden sich weitere Auswertungsbögen auf Basis von Patientenmessungen im Klinikum, welche gemeinsam mit den Bögen aus Kapitel 5.3 unter anderem die in Kapitel 4 aufgeführten Studien quantifizieren und weitere interessante Messergebnisse dokumentieren.

5.1 Anforderungsanalyse

5.1.1 Detaillierte Ausgangssituation

Die Universität Jena entwickelte zusammen mit der Firma Heidelberg Engineering ein Testgerät, um erstmalig Autofluoreszenzmessungen im Bereich der Retina eines lebenden Patienten durchführen zu können. Dabei handelte es sich um einen modifizierten Laser-Scanner-Angiograph (HRAII) der Firma Heidelberg Engineering, welcher um einige Hardware-Komponenten für die Autofluoreszenzmessung erweitert wurde. Die Anregungsquelle bildete ein blauer Pulslaser mit einer Emissionswellenlänge von 448 nm, der Pulse mit einer Dauer von 80 ps bei einer Repetitionsrate von 80 MHz erzeugt. Über Spiegel und Filter wurde das Fluoreszenzlicht in einen kurzwelligen und einen langwelligen Teil aufgespalten. Die beiden entstehenden Spektral-kanäle teilen das Licht in die Wellenlängenbereiche 490-560 nm und 560-700 nm und ermöglichen eine differenziertere Betrachtungsweise der Fluoreszenz. Um die Fluoreszenzlebensdauer messen zu können, wurde das Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC) angewendet. Für dieses Verfahren sind ein Detektor, der das Fluoreszenzlicht einer angeregten Substanz auffängt, und eine Stoppuhr, welche die Zeit zwischen Anregung und Detektion der Fluoreszenz misst, notwendig. Da das Fluoreszenzlicht in einen kurz- und langwelligen Teil gesplittet wurde, war für jeden Spektralkanal ein Detektor notwendig. Um eine zweite Stoppuhr einsparen zu können, wurden die Signale der beiden Detektoren über einen speziellen Router zusammengeführt und später softwareseitig wieder getrennt. Augenbewegungen während der Messung wurden über das Eye Tracking-Verfahren des optisch-mechanischen Basisgeräts (HRA II) ausgeglichen [4], wodurch erstmals die Messung am lebenden Patienten ermöglicht wurde.

5.1.2 Detaillierte Problemstellung

Das neue Verfahren konnte lediglich an einigen wenigen Probanden getestet werden, da die Messzeiten für Patienten bei dem vorgestellten Testgerät typischerweise bei mehreren Minuten pro Auge lagen und damit eine Belastung für die Patienten darstellte.

Dennoch waren die Ergebnisse sehr vielversprechend.

Für die Messungen kamen zum Teil Standardmesssoftware des Detektorenlieferanten Becker & Hickl sowie Eigenentwicklungen zum Einsatz, die den Umgang mit dem System für Ungeübte erschwerten und einen Einsatz im klinischen Alltag kaum ermöglichten. Innerhalb der Software kommt eine unflexible Speicherverwaltung zum Einsatz, welche dem hohen Datenaufkommen während einer Messung nicht immer gerecht wird, weshalb es zu Problemen kommen kann. Die Thread-Struktur sowie die zugrunde liegende Software-Architektur nutzt die Leistung moderner Computersysteme mit Mehrkernprozessoren nicht aus.

Die Hardwarearchitektur setzt auf einen Router zum Zusammenführen der Signale der beiden Detektoren. Dies bringt sowohl Vor- als auch erhebliche Nachteile mit sich. Auf der Softwareseite lassen sich über den Router die Signale deutlich einfacher verarbeiten, da lediglich ein einziger Datenstrom des Routers bewältigt werden muss, statt die asynchronen Datenströme beider Detektoren getrennt voneinander zu betrachten. Ein bedeutender Vorteil ist die Einsparung einer weiteren Stoppuhr, welche erhebliche Mehrkosten verursacht und ebenfalls über die Software gesteuert, konfiguriert und verwaltet werden muss.

Die Bandbreite der Signale, die der Router verarbeiten kann ist begrenzt und entspricht der Kapazität, die durch die verwendete Software weiterverarbeitet werden kann. Router und Software bremsen damit gleichermaßen das Potential des Verfahrens und des Gerätes aus und beanspruchen den Patienten sehr stark, indem die Messzeit deutlich erhöht wird.

5.1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, eine Software zur Messung und Verarbeitung von Fluoreszenzlebensdauern im Bereich der Retina neu zu entwickeln, welche an moderne Hochleistungssysteme angepasst ist und deren Potential voll ausschöpft. Wichtiger Bestandteil dabei ist ein intelligentes Speichermanagement, welches selbstständig die Speicherverwaltung an die Gegebenheiten der jeweiligen Messung und des Computersystems anpasst.

Durch eine optimale Architektur soll die Software in der Lage sein, sehr große Datenmengen in Echtzeit zu verarbeiten und dem Anwender zu präsentieren. Dies

gelingt über eine intelligente Thread-Struktur, welche die Leistung moderner Multi-core-Prozessoren und Grafikprozessoren ausnutzen kann.

Zusammen mit der Software soll die Hardware des Messgeräts (FLIO) optimiert werden. Der Router wird entfernt und eine weitere Stoppuhr in dem Computersystem verbaut. Das gesamte Hardwaremanagement sowie die Konfiguration der einzelnen Komponenten sollen direkt und selbstständig von der Messsoftware durchgeführt werden.

Ferner soll die Applikation als integraler Bestandteil der Softwareinfrastruktur von Heidelberg Engineering entwickelt werden, sodass diese in vorhandenen Kliniknetzwerken eingesetzt werden kann.

Die damit verbundenen Ziele sind die Reduzierung der Messzeiten für Patienten um ein Vielfaches und die Entwicklung und Fertigstellung eines Prototyps auf der Basis der neuesten SPECTRALIS-Produktreihe der Firma Heidelberg Engineering, der reif für den Routineeinsatz in Kliniken und später evtl. auch in Praxen ist. Die Software muss den Qualitätsstandards einer klinischen Applikation genügen und dem klinischen Personal alle notwendigen Funktionen bereitstellen, dieses unterstützen und nicht überfordern.

Desweiteren wird die Entwicklung eines Viewers forciert, der die Datenauswertung und Verwaltung von Fluoreszenzmessungen erleichtert. Der Viewer soll die Softwareinfrastruktur von Heidelberg Engineering mit Softwareprodukten zur Datenauswertung und -analyse verknüpfen. Darüber hinaus soll die Software in der Lage sein, Messinformationen, Histogramme und Fluoreszenzintensitätsbilder einer Messung anzuzeigen. Über die Entwicklung eines speziellen Plug-Ins ist der Viewer in der Lage mit der HEYEX-Infrastruktur zu kommunizieren.

5.2 Software

5.2.1 Das Logo

„Ein Projekt [Änderung d. Verf.] ohne Logo ist wie ein Mann ohne Gesicht“. [41]

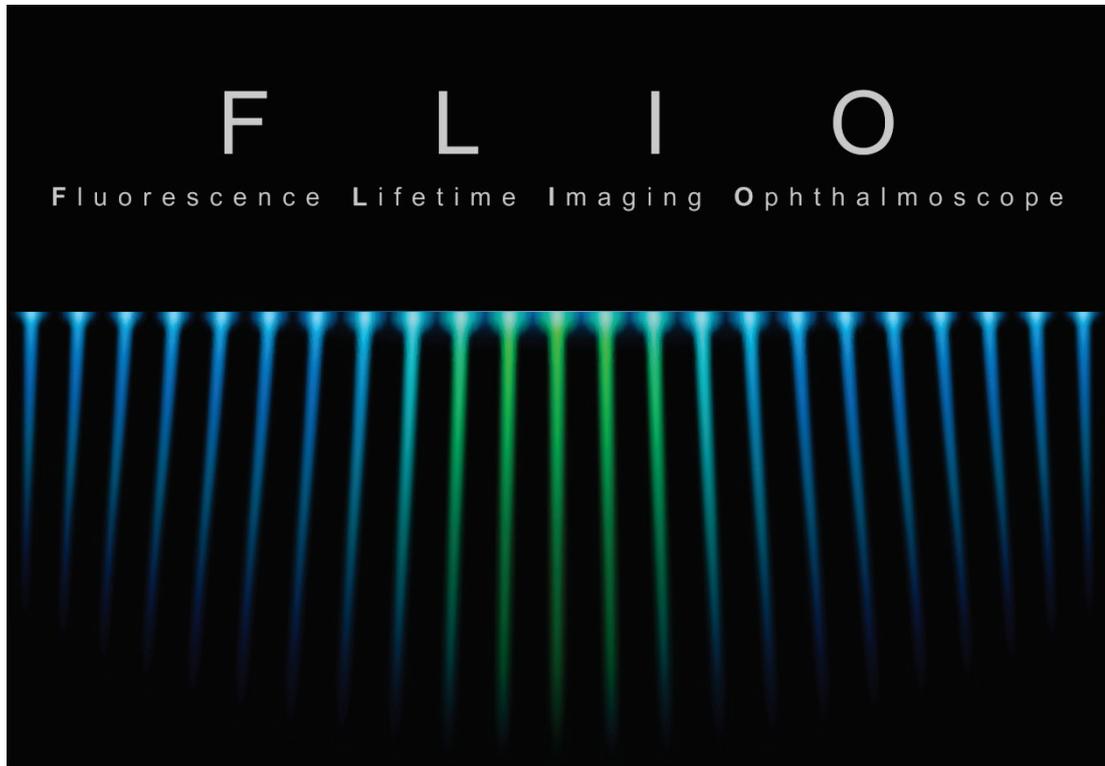


Abbildung 50: FLIO-Logo

Quelle: Illustration des Autors.

Das Logo steht ganz im Zeichen des Themas Fluoreszenz, die durch Lichtstrahlen verschiedener Frequenzspektren dargestellt wird.

5.2.2 Use-Cases und Use-Case-Diagramme

„Ein Use-Case (use case) beschreibt die Funktionalität des Softwaresystems, die ein Akteur ausführen muss, um ein gewünschtes Ergebnis zu erhalten oder um ein Ziel zu erreichen. Use-Cases sollen es [...] ermöglichen, mit dem zukünftigen Benutzer über die Funktionalität des Softwaresystems zu sprechen, ohne sich gleich in Details zu verlieren.“ [42]

Ein „Akteur“ beschreibt eine Rolle, die ein Benutzer innerhalb des Softwaresystems einnimmt, es kann sich dabei um Menschen oder automatisierte Systeme handeln. Akteure befinden sich stets außerhalb des Systems.

Ein Use-Case-Diagramm gibt auf hohem Abstraktionsniveau einen Überblick über das System und dessen Schnittstellen mit seiner Umgebung. [42]

Nachdem die Anforderungen ausgearbeitet wurden, werden einige der wichtigsten Use-Cases grafisch dargestellt.

5.2.2.1 Grundvoraussetzungen einer Patientenmessung mit dem FLIO-Aufnahmemodul

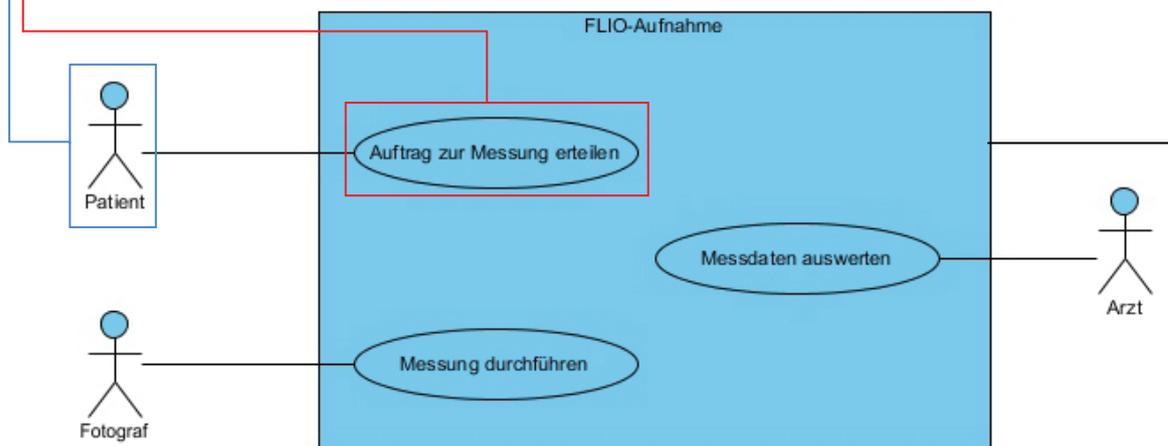


Abbildung 51: Use-Case-Diagramm der Grundvoraussetzungen einer neuen "Fluo-Aufnahme"

Quelle: Illustration des Autors.

In Kliniken werden die Aufnahmen bzw. Messungen am Patienten in der Regel von ausgebildeten Fotografen durchgeführt. Zunächst muss der Patient dem Fotografen

den Auftrag für eine Messung erteilen, bevor dieser schließlich die Messung durchführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgt im Anschluss durch den Arzt.

5.2.2.2 Eine neue Messung starten und Patienten verwalten

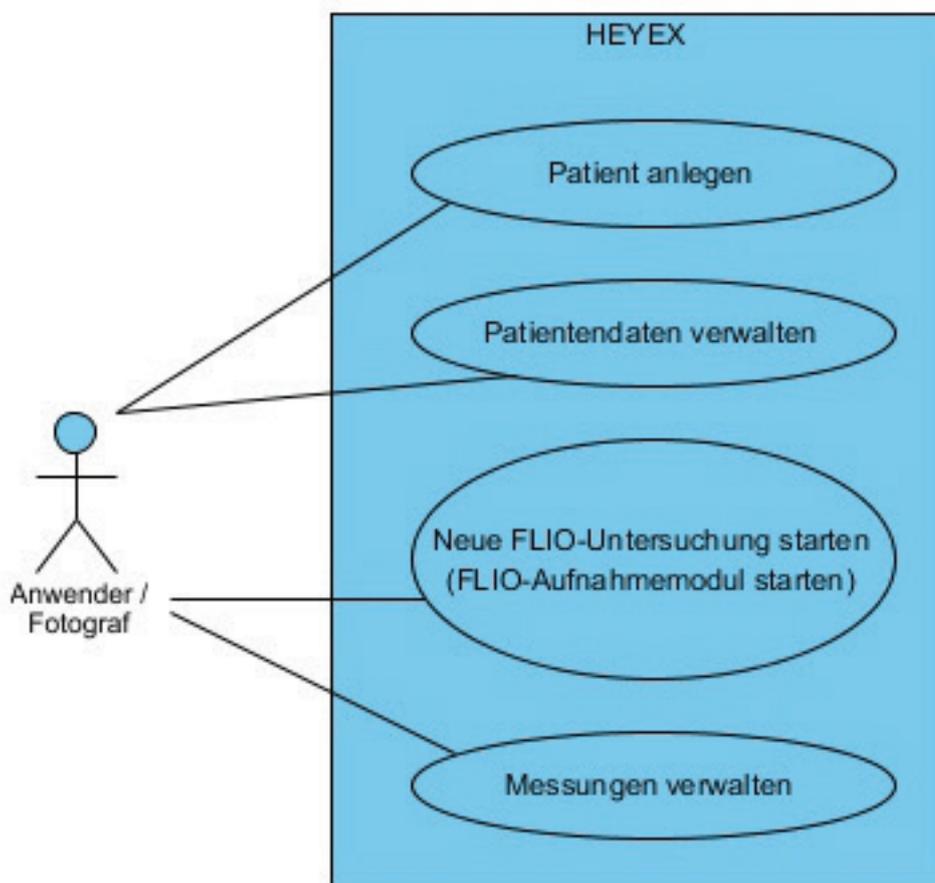


Abbildung 52: Use-Case-Diagramm der Arbeit mit "HEYEX"

Quelle: Illustration des Autors.

Eine neue Messung startet der Anwender aus der Patientenverwaltung des HEYEX heraus. Der Anwender hat dabei die Wahl, einen Patienten neu anzulegen oder einen bereits im System vorhandenen Patienten zu wählen und dessen Daten ggfs. anzupassen. Ist der Patient angelegt bzw. gewählt, kann eine neue Messung veranlasst werden, indem das FLIO-Aufnahmemodul gestartet wird. Diese Option steht ausschließlich dann zur Verfügung, wenn ein Patient ausgewählt wurde.

Informationen zu Messungen werden automatisiert zu jedem Patienten gespeichert, sodass der Anwender aus HEYEX heraus vorherige Messungen verwalten kann.

5.2.2.3 Eine Patientenmessung mit dem FLIO-Aufnahmemodul ausführen

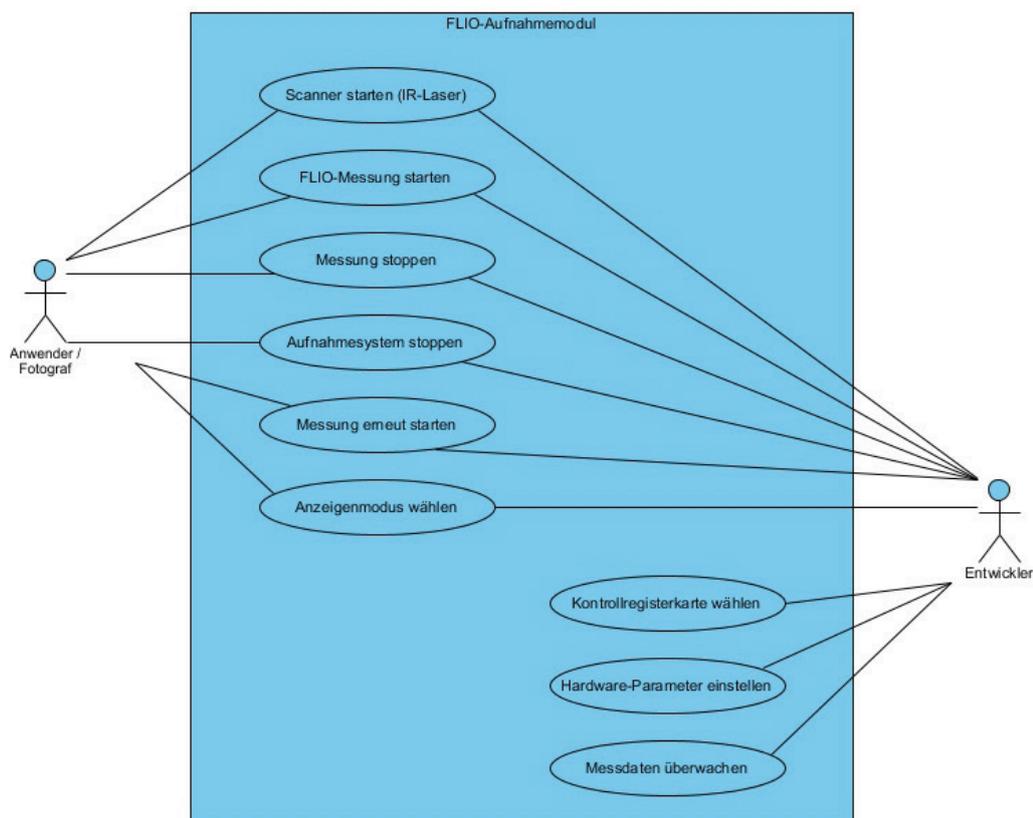


Abbildung 53: Use-Case-Diagramm der Arbeit mit dem "FLIO-Aufnahmemodul"

Quelle: Illustration des Autors.

Die FLIO-Software verwaltet zwei unterschiedliche Anwendergruppen und optimiert die grafische Benutzeroberfläche entsprechend, sodass jeder Gruppe die Funktionalitäten zur Verfügung stehen, die sie benötigt und jene ausgeblendet werden, die gewissen Anwendergruppen bewusst vorenthalten werden, um Komplexität aus der Benutzerführung zu nehmen und vergleichbare Messdaten sicherzustellen.

Sobald das FLIO-Aufnahmemodul für Standardanwender gestartet wurde, stehen diesem Funktionen zur Verfügung, um die Scanner zu starten und eine FLIO-Messung zu beginnen. Während einer Messung kann die Messung neu gestartet werden, wobei die bisherigen Messdaten verworfen werden, falls der Patient beispielsweise unruhig war bzw. sich zunächst an das Blenden des blauen Pulslasers gewöhnen musste. Es stehen diverse Anzeigemodi zur Auswahl, wobei es sich um Intensitätsbilder und ein gemitteltes TCSPC-Histogramm für beide Detektoren handelt, die in Echtzeit aktualisiert werden. Indem der Anwender eine Messung stoppt, wird diese automatisch vom System gespeichert. Wird das gesamte Aufnah-

mesystem gestoppt bzw. geschlossen, führt die Software zunächst das Stoppen und Speichern der Messung aus, bevor das System beendet wird.

Über eine spezielle Einstellung in der Initialisierungsdatei lässt sich das FLIO-Aufnahmemodul mit einer Benutzeroberfläche für Entwickler bzw. Support-Mitarbeiter starten. Es stehen dabei alle Funktionen und Ansichten eines Standardanwenders zur Verfügung, welche um weitere Features erweitert werden.

Entwickler haben zusätzliche Anzeigen mit allen wichtigen Messwerten, die die TCSPC-Hardware zurückliefert und die Software im Hintergrund verarbeitet. Diese Anzeigen werden als Registerkarten zusätzlich zur Standardansicht angezeigt.

Während einer Messung kann der Entwickler diverse Hardwareparameter der TCSPC-Hardware ändern und deren Auswirkungen zur Laufzeit im Histogramm auswerten und ggfs. als neue Standardparameter speichern.

5.2.2.4 Interaktion zwischen HEYEX-AQM und dem FLIO-Aufnahmemodul

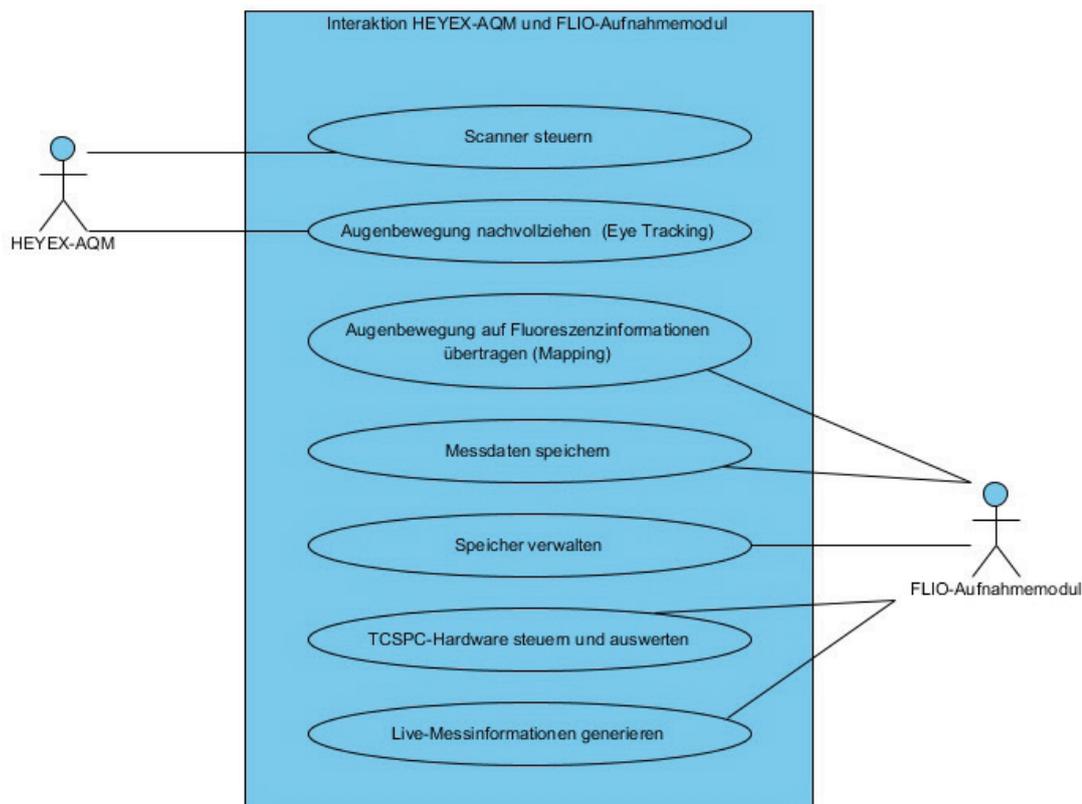


Abbildung 54: Use-Case-Diagramm der "Interaktion HEYEX-AQM und FLIO-Aufnahmemodul"

Quelle: Illustration des Autors.

Während einer Messung laufen sehr viele parallele, asynchrone Prozesse ab, die zu großen Teilen voneinander abhängig sind. Das Standard-SPECTRALIS-Aufnahmemodul (HEYEX-AQM) kontrolliert während einer Messung die Scanner, welche ein Referenzbild erzeugen. Darauf aufbauend kann die Augenbewegung nachvollzogen werden. Die Scanner bewegen sich dabei zeilenweise über das Auge.

Das FLIO-Aufnahmemodul nutzt die Daten über die aktuelle Scannerposition und die Augenbewegung und überträgt diese auf die aufgenommenen Fluoreszenzdaten, sodass jeder Messwert punktgenau auf eine Fluoreszenzkarte (TauMap, Tau (τ) = Fluoreszenzlebensdauer (siehe Kapitel 3.3), Map (englisch) = Karte), des Auges übertragen werden kann.

Desweiteren verarbeitet das FLIO-Aufnahmemodul die Messdaten zur Laufzeit, um Messinformationen in Form von Histogrammen, Intensitätsbildern sowie weiteren wichtigen Messparametern live zur Verfügung stellen zu können. Eine effiziente Speicherverwaltung ist aufgrund der sehr hohen Anzahl der zu erwartenden Messwerte essentiell (mehrere Gigabyte an Daten pro Messung möglich).

Am Ende jeder Messung werden die Messdaten, Histogramme und generierten Bilder in automatisch angelegte und verwaltete Verzeichnisse gespeichert.

5.2.2.5 Datenverwaltung und Datenauswertung der FLIO-Messdaten

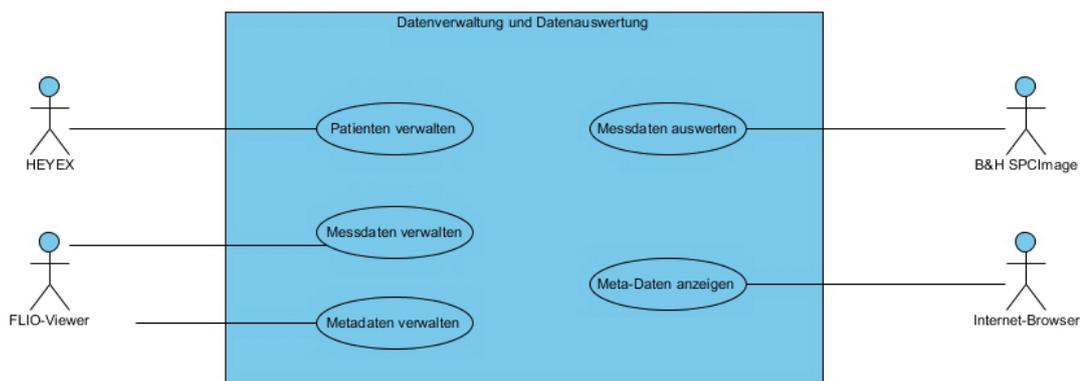


Abbildung 55: Use-Case-Diagramm der "Datenverwaltung und Datenauswertung"

Quelle: Illustration des Autors.

Die gesamte Patientenverwaltung findet in HEYEX statt, sodass Messungen mit der FLIO-Aufnahmesoftware gemeinsam mit Messungen anderer Geräte von Heidelberg

Engineering in einer Software hinterlegt werden und eine zentrale Patientendatenbank in der Klinik möglich wird sowie vorhandene Datenbanken auch für das neue System genutzt werden können.

Über den in HEYEX zu jeder FLIO-Messung gespeicherten Verweis lässt sich der FLIO-Viewer starten, mit dem sich die Messungen und Metadaten zu jeder Messung verwalten und anzeigen lassen.

Die im Viewer verwalteten Messdaten werden in einer speziellen Software ausgewertet, welche über Schnittstellen aus dem Viewer heraus teilweise gesteuert werden kann.

Die Metadaten liegen neben der reinen Datenform auch in einer für Präsentationen optimierten HTML-Version vor, die sich in jedem Internetbrowser anzeigen lässt. Eine entsprechende Browser-Integration findet sich ebenfalls im Viewer.

5.2.2.6 Datenverwaltung mit dem FLIO-Viewer

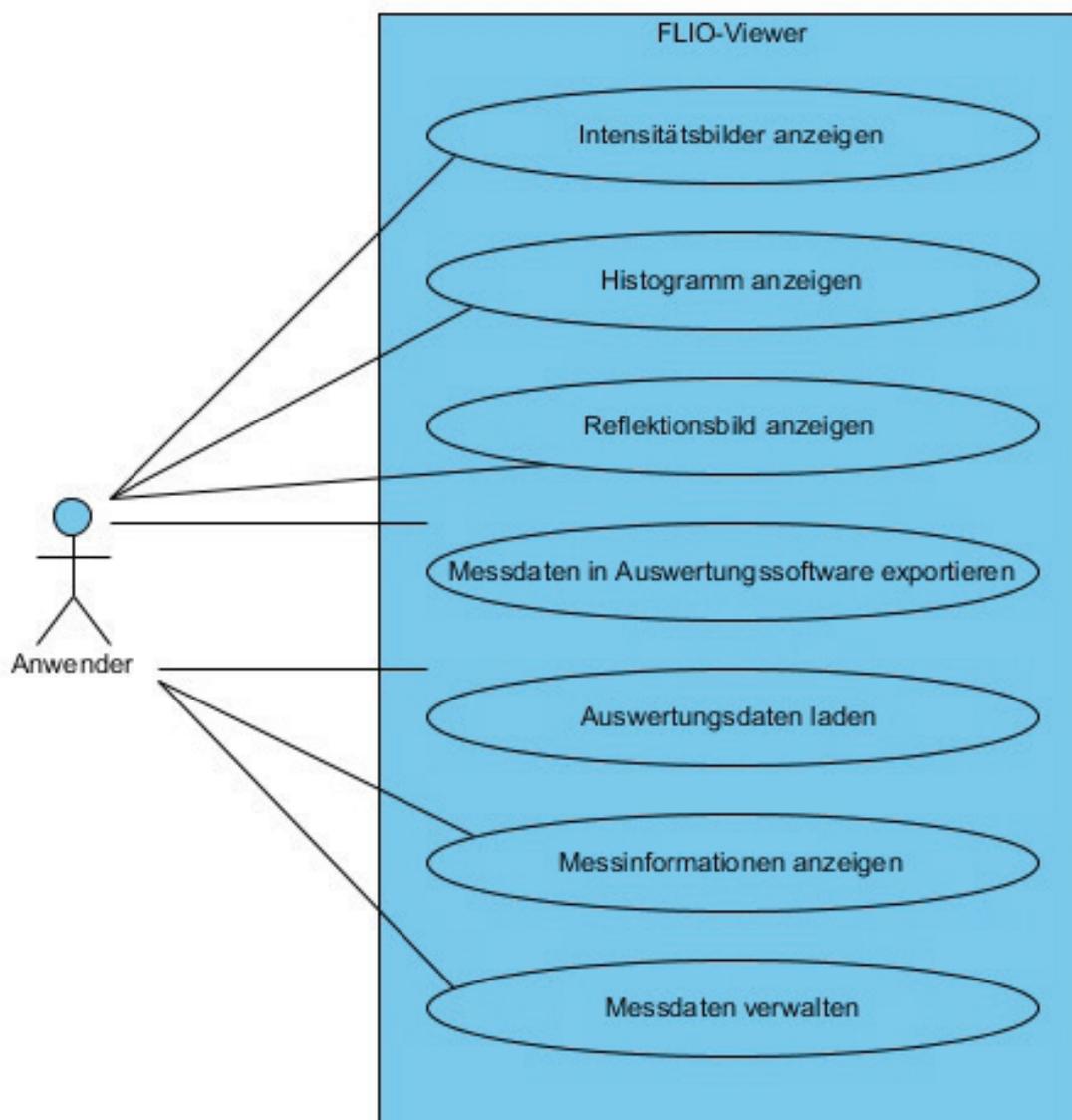


Abbildung 56: Use-Case-Diagramm der Datenverwaltung mit dem "FLIO-Viewer"

Quelle: Illustration des Autors.

In HEYEX sind Verweise für jede Messung eines Patienten hinterlegt, mit denen aus HEYEX heraus der FLIO-Viewer gestartet werden kann, der die Datenverwaltung ermöglicht.

Zu jeder Messung stehen dem Anwender direkt im Viewer Fluoreszenzintensitätsbilder, TCSPC-Histogramm, Reflektionsbild der Scanner und wichtige Messdaten zur direkten Anzeige mit Vorschaufunktionen zur Verfügung. Um die Messdaten zu analysieren bzw. bereits analysierte Daten auszuwerten, bestehen Schnittstellen zu

einer Auswertungssoftware, in welche die jeweiligen Daten direkt exportiert bzw. von dieser importiert werden.

Aus dem Viewer heraus hat der Benutzer die Möglichkeit, andere Messdaten desselben sowie anderer Patienten auszuwerten und zu verwalten.

5.2.3 Wahl der Programmiersprache

C++ ist verglichen mit anderen Programmiersprachen nicht auf dem neuesten Stand der Technik, dennoch handelt es sich um eine Art „Industriestandard“ für Anwendungen mit dem Fokus auf Hardware-Performance und „Arbeitstauglichkeit“.

Die objektorientierte Sprache C++ enthält einige komplexe Merkmale und stammt von der nicht-objektorientierten Sprache C ab, zu welcher sie abwärtskompatibel ist. Diese Umstände bieten nicht das komfortabelste Arbeitsumfeld.

Die große Akzeptanz in der Industrie und ihre große Verbreitung machen die Sprache C++ dennoch sehr attraktiv für den produktiven Einsatz. [43]

Die direkte Ansprache von Treibern, Speicher, Fremdbibliotheken sowie die Unabhängigkeit von Laufzeitumgebungen und hohe Performance machten C++ zur ersten Wahl für die Entwicklung des FLIO-Aufnahmemoduls.

Ein weiterer Vorteil der Sprache und ihrer hohen Verbreitung wird in der Verfügbarkeit sehr guter Entwicklungsumgebungen deutlich.

Das Projekt wurde mit Visual Studio 2010 und darin Visual C++ 2010 der Firma Microsoft realisiert.

Auch der Viewer wurde mit Visual C++ 2010 entwickelt, um einen Bruch in der Softwarearchitektur zu vermeiden.

5.2.4 Software-Design

Ziel der objektorientierten Analyse- und Designphase (OOAD für object-oriented analysis and design) ist es, die zuvor geplante Anwendung innerhalb der technisch gegebenen Rahmenbedingungen zu realisieren. Hierbei gilt es, das Modell unter den Gesichtspunkten der Effizienz und Standardisierung innerhalb der vorhandenen Hard- und Softwareplattformen noch detaillierter herauszuarbeiten.

5.2.4.1 Wahl der Architektur

Um die Wiederverwendbarkeit und Wartungsfreundlichkeit der Anwendung zu erhöhen und sicherzustellen, wurde auf eine Drei-Schichten-Architektur gesetzt, welche die GUI von der Fachlogik abtrennt.

Die Anwendung ist in eine GUI-Schicht (Präsentation), eine Fachkonzeptschicht (Anwendungslogik) und eine Datenhaltungsschicht untergliedert.

„Die GUI-Schicht realisiert die Benutzungsoberfläche einer Anwendung. Dazu gehören die Dialogführung und die Präsentation aller Daten in Fenstern, Berichten usw. Die Fachkonzeptschicht modelliert den funktionalen Kern der Anwendung. Außerdem enthält sie die Zugriffe auf die Datenhaltungsschicht, in der die jeweilige Form der Datenspeicherung realisiert wird [...].“ [44]

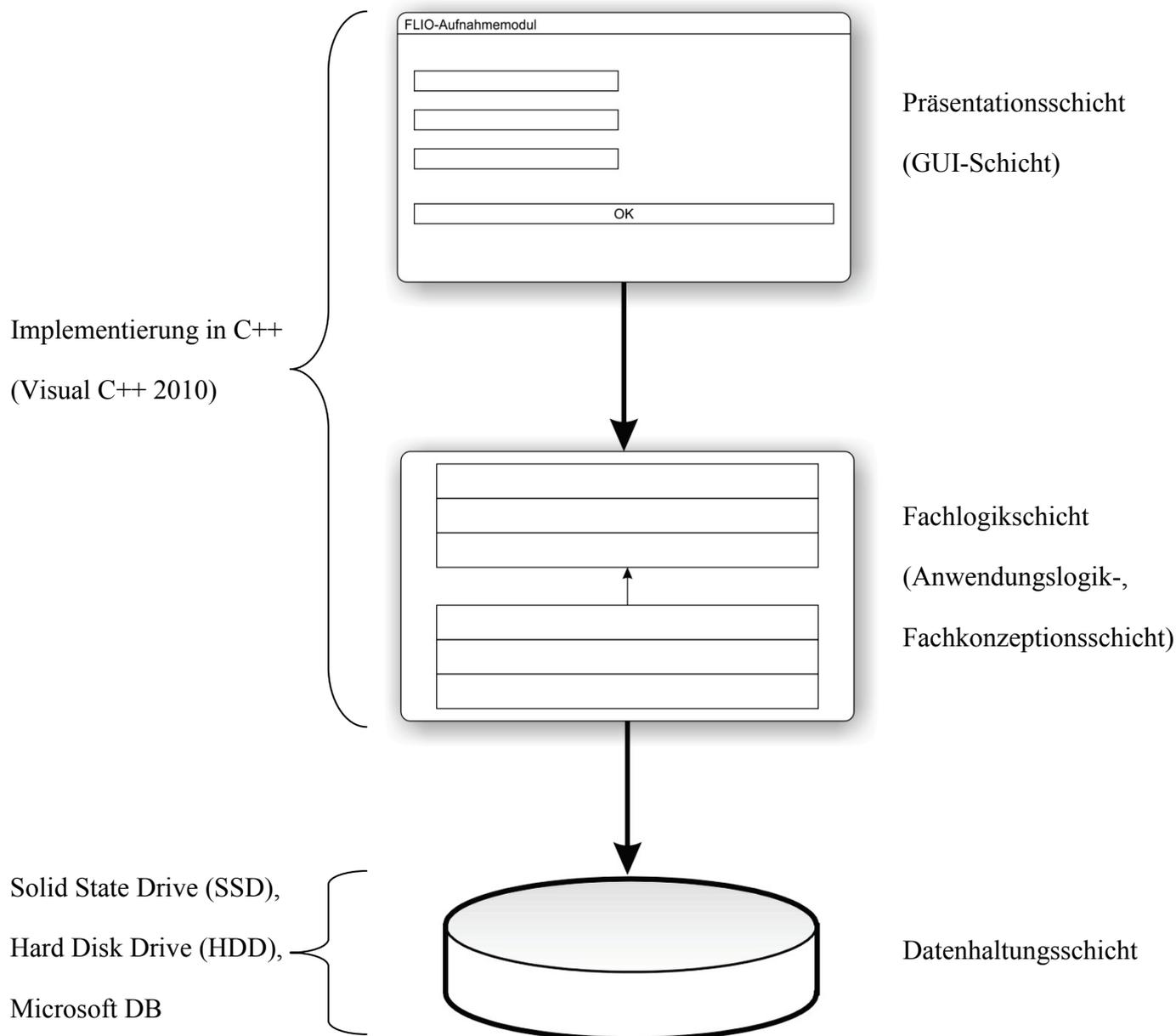


Abbildung 57: Drei-Schichten-Architektur

Quelle: Illustration des Autors.

Die GUI-Schicht enthält keinerlei Programmlogik, sondern dient ausschließlich der Darstellung der jeweiligen Information. Die dafür notwendigen Daten werden von der Fachkonzeptionsschicht bereitgestellt, welche diese wiederum aus der Datenhaltungsschicht lädt. Eine strenge Drei-Schichten-Architektur erlaubt Zugriffe nur entlang dieser Hierarchie.

Die GUI-Schicht erhält nach diesen Konventionen keinen Zugriff auf die Datenhaltungsschicht, sondern delegiert entsprechende Anforderungen an die Fachkonzeptionsschicht.

Eine solche Aufgliederung bietet große Vorteile, da sie erlaubt, die GUI-Schicht jederzeit zu verändern oder auszutauschen, ohne dass dadurch Einfluss auf die darunter liegenden Schichten genommen wird.

Wird das FLIO-Aufnahmemodul fester Bestandteil der Software-Produkte von Heidelberg Engineering, kann die Benutzeroberfläche nahtlos an die bestehenden Anforderungen angepasst werden, ohne die Programmlogik ändern zu müssen.

5.2.5 Gestaltung der grafischen Benutzeroberfläche (GUI)

Bei der Gestaltung einer grafischen Benutzeroberfläche (Graphical User Interface, GUI) ist die Mensch-Maschine-Interaktion von zentraler Bedeutung. Ein mangelhaftes Design der Oberfläche verursacht neben einer schlechten und zeitraubenden Bedienbarkeit auch eine Irritation des Anwenders, was zu Fehlern und fehlerhaften Ergebnissen führen kann.

Für die Programmiersprache Java hat die Firma Sun Microsystems (mittlerweile Oracle) Richtlinien zur Gestaltung einer GUI konzipiert (Java Look and Feel Guidelines [45]), die sich auch auf andere Programmiersprachen übertragen lassen. Entsprechende Design-Richtlinien wurden auch von weiteren Autoren verfasst.

Diese Richtlinien sollen ein einheitliches Design von Benutzeroberflächen sicherstellen, sofern es sich um Anwendungen mit grafischer Benutzeroberfläche handelt.

Zentrales Ziel ist es, durch sinnvolles Design von Schaltflächen (Buttons), Menüs und Listen nach wiederkehrenden, gewohnten Mustern ein klar strukturiertes Design und eine intuitive Bedienung zu ermöglichen.

5.2.5.1 Gestaltung der Benutzeroberfläche des FLIO-Aufnahmemoduls

Die Benutzeroberfläche wird unter den Gesichtspunkten der Softwareergonomie sowie einer intuitiven Bedienbarkeit frei von betriebsinternen Vorgaben realisiert. Da das FLIO-Aufnahmemodul als Plug-In in die bestehende Software-Infrastruktur von Heidelberg Engineering, den Heidelberg Eye Explorer (HEYEX), integriert wird,

wird die Software optisch weitgehend an andere Aufnahmemodule angenähert, verfolgt dabei aber ein eigenes Bedienungskonzept, um den Anwender sinnvoll zu unterstützen und zu leiten. Falsche Eingaben werden durch eine eigene, eingeschränkte Benutzeroberfläche für Fotografen weitgehend vermieden. In einer besonderen Entwickleransicht werden umfangreiche Konfigurationen ermöglicht. Eine solche Konfiguration ist in der Regel nur einmalig bei der Installation und Kalibrierung des Systems notwendig.

Auswahlfelder, die eine differenziertere Anzeige der Live-Messdaten ermöglichen, beeinflussen die Messdaten selbst nicht. Treten Fehler auf oder ist eine Benutzerinteraktion notwendig, wird der Anwender durch Assistenten eingewiesen.

5.2.5.2 Gestaltung der Benutzeroberfläche des FLIO-Viewers

Der FLIO-Viewer dient der Präsentation und Weiterverarbeitung der Messdaten. Der Viewer ist ein weitgehend unabhängiges Software-Tool, das aus HEYEX heraus mit patienten- und messspezifischen Startparametern aufgerufen wird, aber auch unabhängig ausgeführt werden kann. Das Oberflächendesign wird von Grund auf neu konzipiert. Da diese Anwendung kein integraler Bestandteil einer Fremdanwendung ist, sondern als Stand-Alone-Applikation realisiert wird, unterliegt sie keinerlei gestalterischen Vorgaben. Um eine gute Softwareergonomie und leichte Bedienbarkeit zu erreichen, wird das Design an gängige Bildbetrachter angelehnt und um sinnvolle Funktionen für die Messdaten erweitert.

Um eine fehlerhafte Bedienung zu erschweren, analysiert die Software ständig die zur betrachteten Messung zur Verfügung stehenden Bild-, Informations- und Messdaten und ermöglicht dem Anwender ausschließlich die dazu passende Interaktion, Anzeige der Daten oder Auswahl einer anderen Messung bzw. eines anderen Patienten.

Änderungen an den Daten kann der Anwender aus dem Viewer heraus nicht vornehmen.

5.2.6 Datenhaltung

Die zum Starten des FLIO-Aufnahmemoduls von HEYEX übermittelten Patientendaten werden in einer Microsoft Datenbank gehalten. Das FLIO-Aufnahmemodul selbst legt die bei der Messung anfallenden Daten im Dateisystem auf der Festplatte so ab, dass diese jedem Patienten eindeutig zugeordnet werden können.

Alle Daten werden so gespeichert, dass sie sowohl in visueller Form als auch in einem Format zur weiteren Auswertung und Verarbeitung verwendet werden können. Die visuellen Informationen ermöglichen Einblicke in wichtige Messdaten, anhand derer eingeschätzt werden kann, ob sich eine zeitaufwändige weitere Analyse, Auswertung und Verarbeitung der Daten lohnt.

Folgende Daten werden im Dateisystem gehalten:

- Die gemittelten Intensitätsbilder über die gesamte Messung für den kurz- und langwelligen Kanal als Bitmaps (BMP).
- Ein über die gesamte Länge der Messung gemitteltes Histogrammbild sowie eine ASCII-Datei mit den dazu entsprechenden Koordinaten für beide Wellenlängenkanäle zur maschinellen Auswertung.
- Das Infrarot-Reflektionsbild, welches auch für das Eye Tracking (TruTrack™) zur Anwendung kommt und für die Diagnose wichtige Anhaltspunkte liefern kann.
- Eine für die Auswertung aufbereitete HTML-Datei mit allen Messinformationen, den Messumständen sowie den Patientendaten, welche im Viewer und in jedem Internetbrowser angezeigt werden können. Ferner liegen diese Informationen auch als standardisierte XML-Datei vor, damit die Daten maschinell weiterverarbeitet werden können.
- Die eigentlichen Messdaten im SDT-Dateiformat. Hierbei handelt es sich um ein für Fluoreszenzlebensdauermessungen sehr weit verbreitetes Dateiformat, wie es beispielsweise auch bei der Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie sehr häufig zur Anwendung kommt.

Für die gesamte Datenhaltung wird auf Standards mit hoher Verbreitung gesetzt, um Abhängigkeiten zu vermeiden und eine hohe Vergleichbarkeit der Daten zu erzielen.

Ferner bringt der Einsatz von Standards die Möglichkeiten für Anwender mit sich, die Auswertung und weitere Verarbeitung der Daten mit Software eines fremden

Anbieters oder einer Eigenentwicklung durchzuführen und fördert die Fortentwicklung des gesamten Verfahrens.

Die Datenauswertung der SDT-Messdaten erfolgt über eine für das FLIO-Projekt angepasste Version der Software SPCImage der Firma Becker & Hickl (auf Basis der Version 3.8.9), welche an den FLIO-Viewer angebunden wird. Der FLIO-Viewer kontrolliert Teile von SPCImage so, dass die verarbeiteten Messdaten ebenfalls passend zu den übrigen Daten der jeweiligen Messung und Patient abgelegt und durch den Viewer verwaltet werden. Die verarbeiteten Daten liegen in einem proprietären IMG-Dateiformat vor.

5.2.7 Schnittstellen

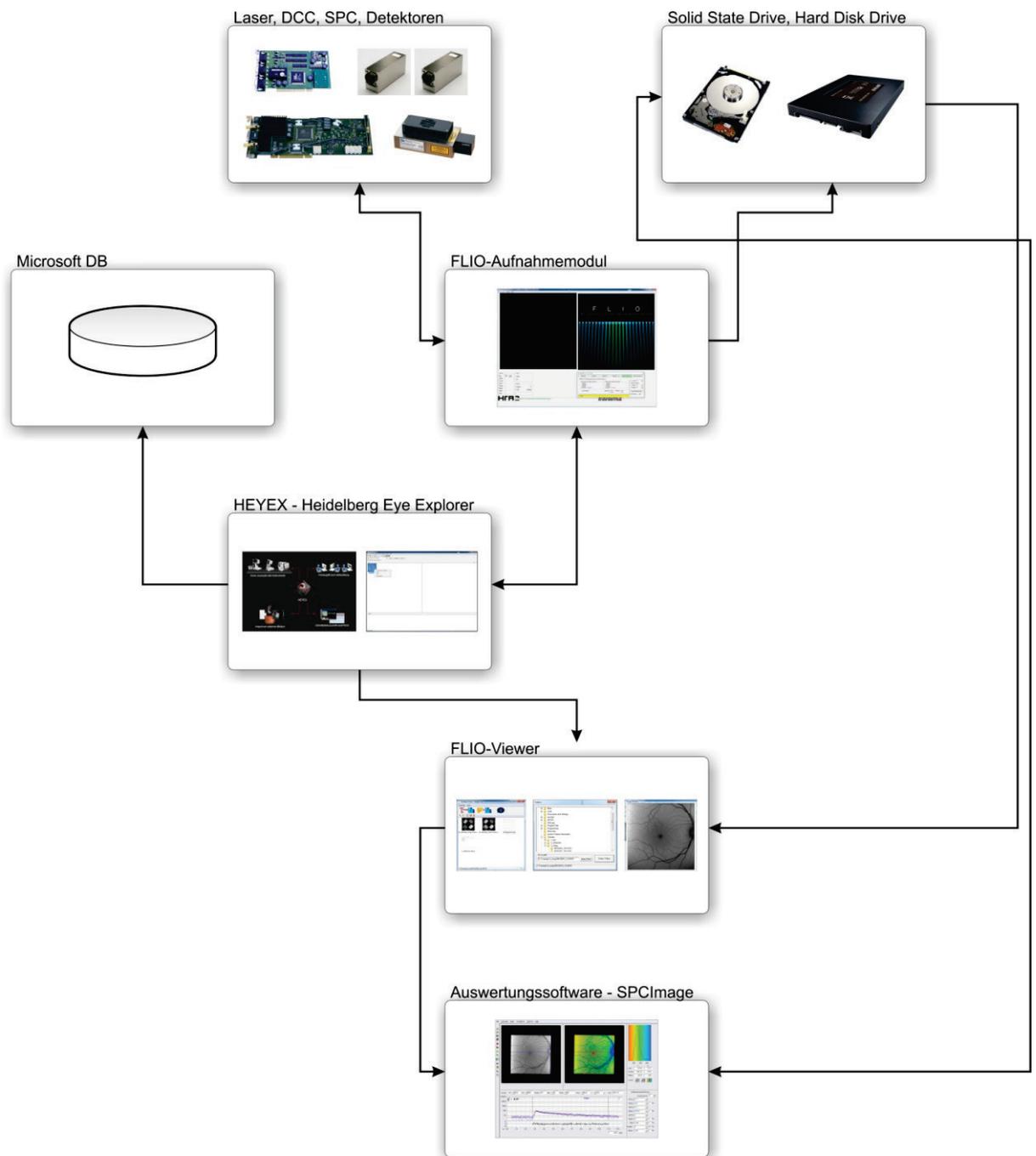


Abbildung 58: Anwendungsarchitektur mit Schnittstellen

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.8 *Statische Modellierung*

Die statische Modellierung beschreibt den Aufbau eines Softwaresystems und gibt Aufschluss über Beziehungen und Abhängigkeiten einzelner Komponenten zueinander.

Das FLIO-Aufnahmemodul wird nach dem Model-View-Controller (MVC) Pattern entwickelt (Abbildung 59), welches eine Software-Applikation mit grafischer Benutzeroberfläche in drei Kernkomponenten unterteilt:

- **Datenmodell (Model)**

Das Datenmodell beinhaltet die darzustellenden Daten und die Anwendungslogik. Das Modell ist dabei unabhängig von der Präsentation und der Programmsteuerung.

- **Präsentation (View)**

Die Präsentation ist für die repräsentative Darstellung der im Datenmodell gehaltenen Daten verantwortlich und nimmt Benutzereingaben entgegen. Hierfür kennt die Präsentationsschicht die Programmsteuerung und das Datenmodell, die Weiterverarbeitung der Benutzereingaben bzw. Änderungen fällt nicht in deren Zuständigkeitsbereich.

- **Programmsteuerung (Controller)**

Die Programmsteuerung verwaltet die Präsentationsschicht und verarbeitet die Benutzereingaben. Die Programmsteuerung manipuliert anhand der Benutzereingaben die im Datenmodell gehaltenen Daten.

Das MVC-Pattern bietet innerhalb größerer Anwendungen einige Vorteile. Durch die klare Strukturierung sind einzelne Module leichter zu warten und bei Bedarf austauschbar. Soll beispielsweise die Präsentation (GUI) verändert werden, muss die Programmlogik nicht erneut implementiert werden.

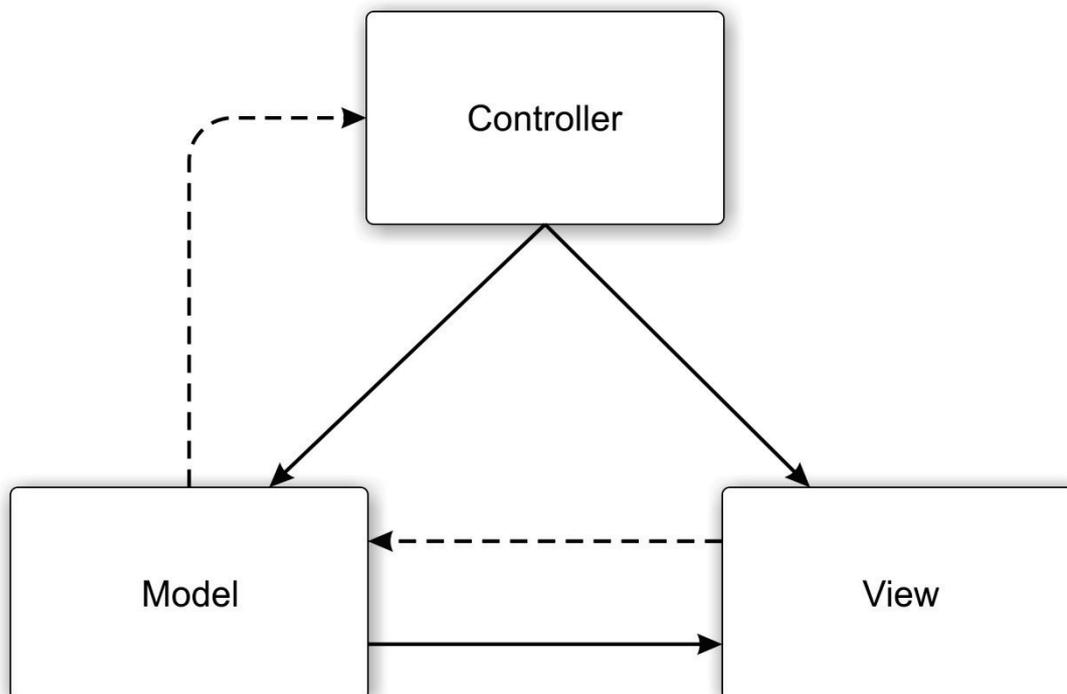


Abbildung 59: Konzept des Model-View-Controller Patterns [46]

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9 Dynamische Modellierung

Die dynamische Modellierung dient der Beschreibung von Funktionsabläufen einer Software-Applikation. Die technischen Rahmenbedingungen für die Realisierung des FLIO-Aufnahmemoduls wurden bereits betrachtet, im Folgenden werden mit Hilfe von Sequenzdiagrammen wichtige Szenarien vorgestellt.

Sequenzdiagramme erfassen die Abläufe innerhalb eines Systems und die Interaktionen zwischen einzelnen Objekten in einem zeitlichen Verlauf.

„Die dynamische Modellierung mittels Sequenzdiagrammen ist eine der wichtigsten Aufgaben im Entwurf, weil sie das dynamische Verhalten von Anfang bis zum Ende transparent macht.“ [47]

5.2.9.1 Initialisierung und Starten des FLIO-Aufnahmemoduls

Indem der Anwender aus HEYEX heraus eine neue Aufnahme startet, wird wie in Abbildung 60 dargestellt zunächst das HEYEX-AQM aufgerufen, welches das HEYEX-Standardaufnahmemodul darstellt und Schnittstellen für weitere Aufnahmemodule anbietet. Ferner findet innerhalb des HEYEX-AQM das Eye Tracking statt.

Über die Schnittstelle für weitere Aufnahmemodule wird die Funktion `DllMain` der Klasse `FlioAQM` aufgerufen. Über diese Funktion wird ein Objekt der Klasse `SPCMeasurement` angelegt und deren Konstruktor `SPCMeasurement` ausgeführt. Im Konstruktor der Klasse `SPCMeasurement` werden einige für den Messprozess benötigte Variablen gesetzt, die zentrale Initialisierungsdatei (INI), in der alle wichtigen Konfigurationsparameter gespeichert sind, ausgelesen und in die entsprechenden Variablen überführt. Ein sehr wichtiger Schritt, der bereits in diesem Stadium durchgeführt wird, ist die Reservierung von benötigtem Arbeits- und Auslagerungsspeicher für die während der Messung anfallenden Datenmengen. Sollte bei diesem Vorgang ein Fehler auftreten, wird der Benutzer darüber informiert und der gesamte Prozess abgebrochen, da keine ausreichenden Leistungsreserven des Computersystems zur Verfügung stehen. Desweiteren werden in diesem Konstruktor Objekte der Klassen `SPC150`, die von der Klasse `SPCDevice` erbt, und `DCC100` angelegt sowie deren Konstruktoren ausgeführt. Auch in deren Konstruktoren werden einige Variablen und Hardwarekonfigurationen, die für die spätere Initialisierung benötigt werden, aus der Initialisierungsdatei ausgelesen und den jeweiligen Variablen zugewiesen.

Sobald die Objekte erstellt wurden, wird über die Funktion `TauMappingInit` die Initialisierung von Hard- und Software gestartet. Mit der Funktion `Init` der Klasse `SPCMeasurement` werden die Patientendaten aus HEYEX übertragen, mit `beginthreadex` der Prozess `StartGUIThread` zur Darstellung und Kontrolle der grafischen Benutzeroberfläche (GUI) gestartet und über `InitHardware` jeweils die SPC150-PCI- und DCC100-PCI-Karten initialisiert.

Der Prozess `StartGUIThread` initialisiert über die Funktion `InitGUI` die grafische Benutzeroberfläche und verharrt dann in einer Schleife (`loop`), in der er auf Nachrichten wartet, die der Benutzeroberfläche mitteilen, welche Informationen dargestellt werden sollen. Diese Nachrichten werden über `GetMessage` abgerufen und

daraufhin grafisch dargestellt. Beim Beenden des FLIO-Aufnahmemoduls erhält der Thread eine entsprechende Nachricht, wodurch die Schleife beendet wird und mit `DeInitGUI` die Deinitialisierung der grafischen Benutzeroberfläche und die Freigabe von belegtem Speicherplatz eingeleitet werden.

`InitHardware` der Klasse `SPC150` überprüft zunächst, wie viele SPC150-PCI-Karten an den PC angeschlossen sind, überprüft deren individuelle Signaturen, mit denen diese adressiert und eingesetzt werden können, und bereitet die Hardware für die Messung vor. Mit `SetLaserFrequency` und `SetHWParams` werden die Konfigurationsparameter der Initialisierungsdatei an die TCSPC-Hardware bzw. SPC150-PCI-Karten übermittelt. Ferner werden der FIFO-Speicher und einige weitere hardware-spezifische Einstellungen zurückgesetzt und neu belegt. Mithilfe der Klasse `SPC150` werden beide SPC150-PCI-Karten kontrolliert und verwaltet.

Mit `InitHardware` der Klasse `DCC100` werden die DCC100-PCI-Karte und die daran angeschlossenen Hardwarekomponenten konfiguriert und deren Betriebsspannung geregelt. An die DCC100-PCI-Karte sind der blaue Laser und die beiden Detektoren angeschlossen.

Während der Initialisierung aller Hardwarekomponenten in allen Klassen wird das System auf Probleme und Fehler überprüft. Aus Sicherheitsgründen werden Laser und Detektoren über die Software so gesteuert, dass diese nur dann mit Strom versorgt werden, wenn alle Tests erfolgreich abgeschlossen wurden und das System einwandfrei einsatzbereit ist. Über Fehler wird der Anwender auf der grafischen Benutzeroberfläche informiert. Sind Fehler aufgetreten, kann eine Messung erst erfolgen, nachdem die FLIO-Software aus HEYEX heraus neu gestartet und neu initialisiert wurde. Voraussetzung ist, dass die Fehler behoben werden konnten.

Nachdem die Initialisierung von Hard- und Software abgeschlossen wurde, wird über `SetStatusInformation` die Benutzeroberfläche angewiesen, einen entsprechenden Hinweis über den erfolgreichen oder unter Umständen fehlerhaften Systemstatus auszugeben. Über `SetSelectedMode` wird dem Benutzer dargestellt, welcher Anzeigemodus ausgewählt ist. Als Anzeigemodi stehen Histogramm und Intensitätsbilder zur Auswahl (siehe Kapitel 5.2.10.1).

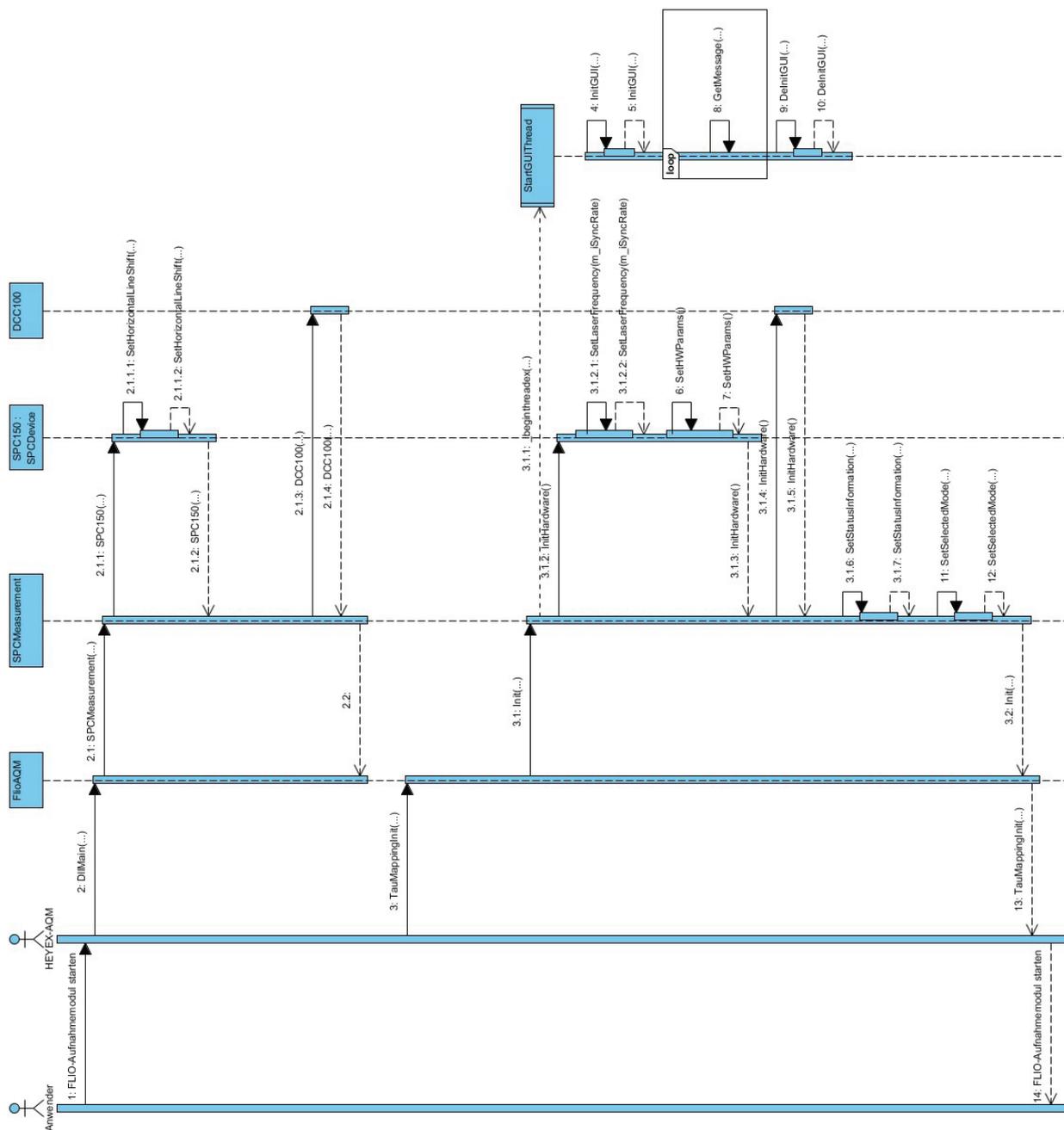


Abbildung 60: Sequenzdiagramm der Initialisierung des FLIO-Aufnahmemoduls

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9.2 Vorbedingungen, um einen Messvorgang zu starten

Nach dem Einschalten des Geräts und Starten des FLIO-Aufnahmemoduls aus HEYEX heraus erscheint auf dem TouchPanel ein gelber Power-Button. Durch Drücken des Buttons startet der Anwender zunächst die Scanner, die ein Infrarot-Referenzbild für das Eye Tracking-Verfahren zur Verfügung stellen. Der Button wird daraufhin grün angezeigt.

Um eine Fluoreszenzlebensdauerermessung durchführen zu können, muss der Anwender zunächst in den richtigen Modus wechseln. Dies gelingt durch Drücken des „More“-Buttons.

In der folgenden Anzeige hat der Anwender die Möglichkeit in den „TAU“-Modus zu wechseln, welcher für das FLIO-Aufnahmemodul notwendig ist.



Abbildung 61: TouchPanel-Anzeige nach dem Starten der Scanner

Quelle: Illustration des Autors.



Abbildung 62: TouchPanel-Anzeige zur Wahl des Aufnahmemodus

Quelle: Illustration des Autors.

Das Aufnahmemodul assistiert dem Anwender dabei und informiert über fehlerhafte Zustände. Die Wahl der verschiedenen Modi ist notwendig, weil das Gerät die ursprünglichen Möglichkeiten eines SPECTRALIS-HRA2 weiterhin unterstützt. Sobald alle Einstellungen vorgenommen wurden, liefert das FLIO-Aufnahmemodul eine Erfolgsmeldung und

signalisiert, dass die Software verwendet und Messungen durchgeführt werden können.

5.2.9.3 Einen Messvorgang starten

Indem der Anwender auf dem TouchPanel den „Acquisition“-Button betätigt, wird eine Messung gestartet und die Funktion `TauMappingEnable` aufgerufen. □

Durch `StartMeasLoop` der Klasse `SPCMeasurement` wird der Messvorgang initiiert. Der Ablauf ist in Abbildung 64 dokumentiert.

Zunächst werden die SPC-150-PCI-Karten, welche über die Klasse `SPCDevice` bzw. der von dieser erbenenden Klasse `SPC150` verwaltet werden, mit den entsprechenden Parametern vorbereitet. `SetLaserFrequency` stellt die verwendete Laserfrequenz ein und `SetHWParams` setzt spezielle Parameter des TCSPC-Verfahrens. Da für jeden Detektor eine SPC-Karte zum Einsatz kommt, müssen zwei Karten verwaltet und eingestellt werden, was über die Funktion `SetHWParamsPerDetector` geschieht. Diese Funktion wird für jeden Detektor aufgerufen, ist zur vereinfachten Darstellung im Diagramm jedoch nur einmal aufgeführt.

Die Berechnung des Histogramms zur Laufzeit der Messung erfolgt in der Klasse `Histogram`. Vor jeder Messung wird über die Funktion `SetHistoWidth` die Histogrammbreite bzw. Auflösung (siehe Kapitel 3.4) übermittelt und über `ResetHistograms` alle bisherigen Messwerte zurückgesetzt.

Über die Funktion `PowerOn` werden die DCC-100-Karten, welche über die Klasse `DCC100` gesteuert werden, eingeschaltet und damit die beiden Detektoren und der Laser gesteuert und mit Spannung versorgt. Die Funktion `setDCCParametersFromIni` lädt aus der Initialisierungsdatei (INI) alle wichtigen Konfigurationsparameter und bereitet diese vor. Danach werden sie über `setDCCParameter` an die Hardware übermittelt.

Daraufhin werden die zwei weitgehend gleichen, aber für den jeweiligen Detektor optimierten Threads `StartMeasLoopThread` und `StartMeasLoopThreadSecondDetector` gestartet, welche die eigentlichen Messdaten erfassen und verarbeiten. Es ist dabei ein Thread pro Detektor und SPC-

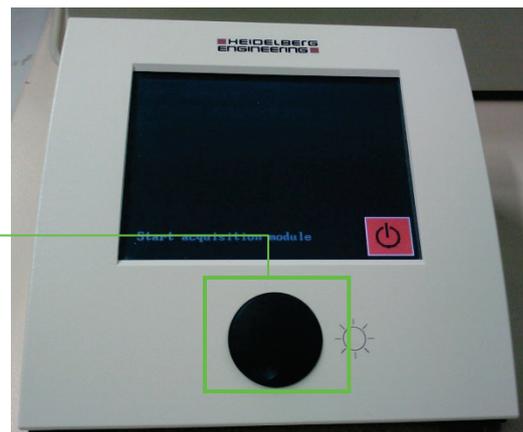


Abbildung 63: SPECTRALIS-TouchPanel

Quelle: Illustration des Autors.

150-Karte notwendig. Da die ablaufenden Prozesse innerhalb des Threads recht komplex sind, werden diese in einem eigenen Sequenzdiagramm im Anschluss in Kapitel 5.2.9.4 gesondert betrachtet.

Parallel dazu werden die Speicherorte zur Ablage der Messdaten über `GenerateMeasurementFolderForSaving` vorbereitet, HEYEX über `RegisterHEYEXMessage` mitgeteilt, dass die Messung startet und in der Patientenverwaltung für den jeweiligen Patienten ein Verweis für diese Messung angelegt wird, durch welchen später die Messergebnisse über den FLIO-Viewer direkt zugänglich sind. Ferner wird bereits jetzt das Referenzbild für das Tracking der Augenbewegung eingefroren und über `SaveBitmap` den Messdaten hinzugefügt.

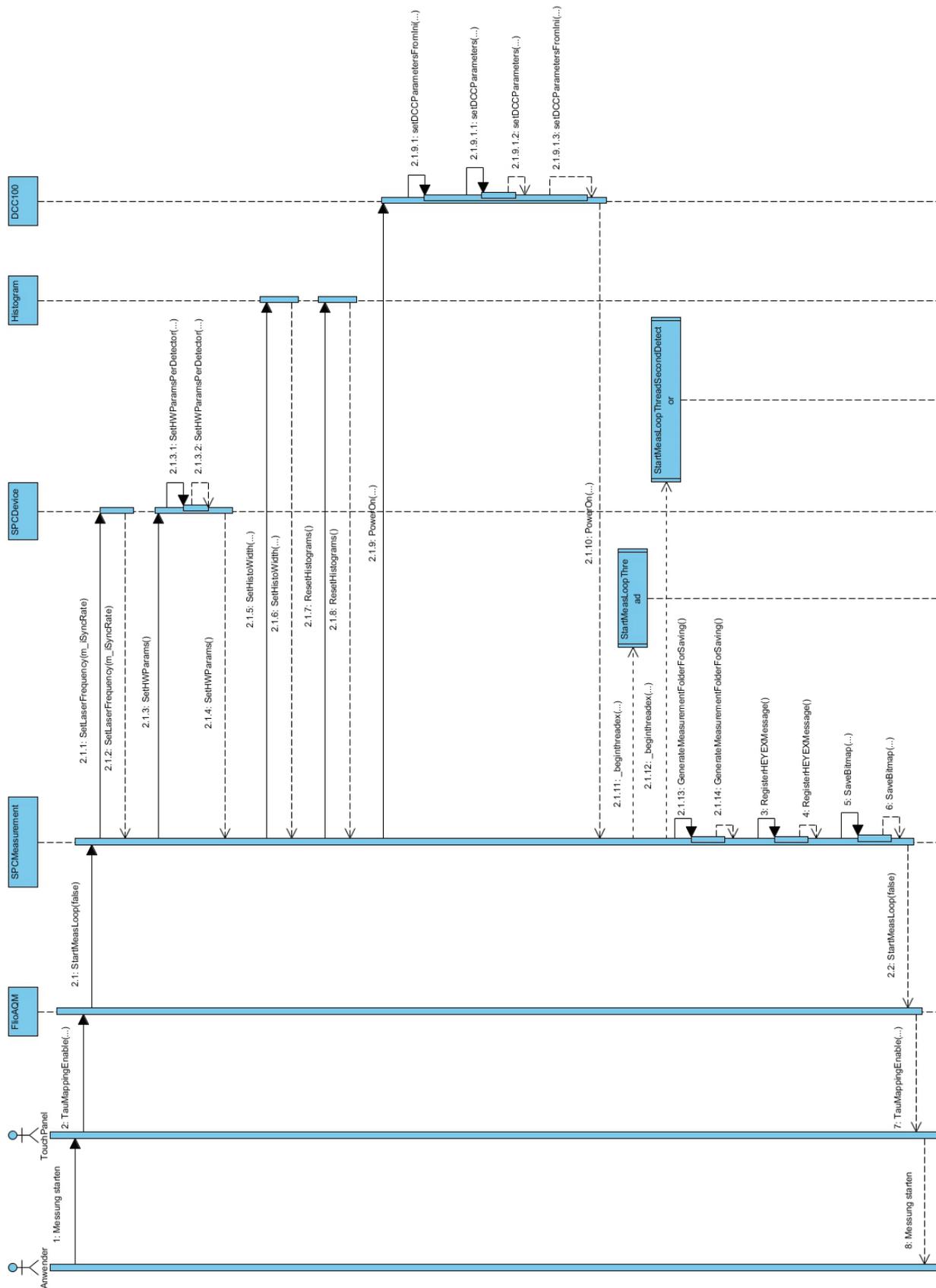


Abbildung 64: Sequenzdiagramm zum Starten einer FLIO-Messung

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9.4 Genauere Betrachtung der Threads `StartMeasLoopThread`

Die in Abbildung 65 illustrierten Threads `StartMeasLoopThread` und `StartMeasLoopThreadSecondDetector` sind funktional weitgehend identisch und greifen auf dieselben Funktionen zu. Daher wird exemplarisch für beide Prozesse der Thread `StartMeasLoopThread` betrachtet, welcher die Daten des ersten Detektors und der dazugehörigen Stoppuhr (SPC150) verarbeitet. `StartMeasLoopThreadSecondDetector` kontrolliert hingegen die Daten des zweiten Detektors und der zweiten Stoppuhr.

Über die Funktion `StartMeasurement` der Klasse `SPCDevice` sowie der davon ererbenden Klasse `SPC150` werden einige Variablen zur internen Verarbeitung der Daten des FIFO-Speichers der SPC150-PCI-Karten zurückgesetzt. Der FIFO-Speicher ist ein besonders schneller Speicher, in welchem alle Messdaten zwischengespeichert werden, bevor diese dann von der Software abgerufen werden. Die Verarbeitung der im FIFO-Speicher vorgehaltenen Messinformationen erfolgt in den Threads `StartSPC150LoopThread` für den ersten Detektor sowie `StartSecondSPC150LoopThread` für den zweiten Detektor. Anhand dieser Struktur ist zu erkennen, dass `StartMeasLoopThread` der federführende Verarbeitungsprozess ist, während `StartMeasLoopThreadSecondDetector` lediglich als Verarbeitungsinstanz für die im Folgenden beschriebene Schleife des zweiten Detektors ist.

`StartSPC150LoopThread` und `StartSecondSPC150LoopThread` werden im nachfolgenden Kapitel 5.2.9.5 genauer behandelt.

Die Messdaten der TCSPC-Hardware werden in den Threads `StartSPC150LoopThread` und `StartSecondSPC150LoopThread`, welche direkt mit der Hardware kommunizieren, zur Verfügung gestellt. Für jedes aufgenommene Bild (Frame) werden vom HEYEX-Aufnahmemodul (HEYEX-AQM) Informationen über die Augenbewegung mit der Funktion `NewFrameTrafo` an das FLIO-Aufnahmemodul (FlioAQM) und damit das `SPCMeasurement`-Objekt übermittelt. In der Klasse `SPCMeasurement` wird daraus ein Event erstellt, das dem Thread mitteilt, dass die Daten zum Abrufen bereitstehen und via `SetEvent` an den Prozess `StartMeasLoopThread` übermittelt. Der Thread `StartMeasLoopThread` wartet in einer Schleife (`loop`) fortwährend über `WaitForSingleObject` auf

dieses Event und beginnt erst im Anschluss mit der Weiterverarbeitung der Transformations- und Messdaten.

Da es unter Umständen passieren kann, dass neue Messdaten bzw. Frames aufgenommen wurden, bereits zuvor aufgenommene Messdaten jedoch noch nicht verarbeitet werden konnten und noch im Speicher vorgehalten werden, werden über die Funktion `GetMatchingPhotonFrame` die zu den Transformationsdaten passenden Messinformationen zurückgeliefert bzw. ein Pointer auf diese Messergebnisse.

Sofern die zueinander passenden Daten vorliegen, werden diese über die Funktion `AccumulatePhotonFrame` verarbeitet. Die Funktion `AccumulatePhotonFrame` stellt die zentrale Funktion der Photonenverarbeitung dar. Innerhalb dieser Funktion werden die Daten der Augenbewegung und die Messinformationen aufeinander übertragen und damit die Messinformationen an der richtigen Stelle im Auge gespeichert. Aus diesen Daten werden die Informationen für die Fluoreszenzlebensdauern, die Fluoreszenzintensitätsbilder und die Histogramme generiert. Prinzipiell werden die einzelnen Fluoreszenzlebensdauerinformationen in ein mehrdimensionales Koordinatensystem eingeordnet. Über die Funktion `AddHistogram` werden die gemittelten Fluoreszenzlebensdauern eines Bildes (Frame) für den jeweiligen Kanal an ein Objekt der Klasse `Histogram` übertragen, in welchem daraus die Histogrammanzeige für beide Detektoren generiert wird.

Bereits während einer Messung können Informationen für einzelne Bildpixel in der Registerkarte „Dataset Info“ angezeigt werden (siehe Kapitel 5.2.10). Hierfür muss der Anwender lediglich mit dem Cursor über die Stelle, die von besonderem Interesse ist, fahren. Die Funktion `ShowDatasetInfoAtCursor` stellt die Informationen für die aktuelle Cursorposition im Fluoreszenzbild zur Verfügung, welche dann durch den GUI-Thread zur Anzeige gebracht werden (siehe Kapitel 5.2.9.1).

Sobald die Daten eines Frames verarbeitet und eindeutig im Fluoreszenzbild eingeordnet wurden, werden diese über die Funktion `CleanupPhotonBuffer` aus dem Zwischenspeicher gelöscht.

Die Messschleife wird solange durchlaufen, bis der Anwender die Messung manuell beendet oder ein Systemfehler auftritt.

Im Anschluss daran werden die einzelnen Threads, die an der Messung beteiligt sind, über die Funktion `StopMeasurement` beendet.

5.2.9.5 Genauere Betrachtung der Threads `StartSPC150LoopThread` und `StartSecondSPC150LoopThread`

Beispielhaft für beide Threads wird in Abbildung 66 der Thread `SPC150LoopThread` betrachtet, der die Daten der ersten Stoppuhr (SPC150) und des ersten Detektors verarbeitet.

Der Thread kommuniziert direkt mit der SPC150-PCI-Karte und verarbeitet die Daten des FIFO-Speichers der Karte, in dem alle Messdaten der Karte zwischengespeichert werden.

Bevor der Thread in einer Schleife verweilt, um andauernd neue Messdaten der PCI-Karte abzurufen, wird die Hardware für die neue Messung zurückgesetzt und mit den Einstellungen der zentralen Initialisierungsdatei (INI) neu konfiguriert.

Standardanwendern steht keine Möglichkeit zur Verfügung, diese Parameter während einer Messung zu verändern. In einer Entwickleransicht sind Konfigurationseinstellungen jedoch auch während einer Messung möglich (siehe Kapitel 5.2.10).

Während einer Messung wird in der Schleife (`loop`) ständig überprüft, ob die Hardwarekonfiguration durch den Anwender (Entwickleransicht) verändert wurde. Ist dies der Fall, werden die Änderungen mit der Funktion `SetHWParams` an das Objekt der Klasse der Stoppuhr (`SPCDevice` und die davon ererbende Klasse `SPC150`) übertragen und über die Funktion `SetHWParamsPerDetector` an die jeweilige SPC150-PCI-Karte übertragen.

Auf der grafischen Benutzeroberfläche (GUI) werden die Photonenzählraten dargestellt (siehe Kapitel 5.2.10). Über die Funktion `DeliverCountRatesPerDetector` werden diese Zählraten der einzelnen SPC150-Karten bzw. Detektoren zur Abholung durch den GUI-Thread hinterlegt.

Die gesamte Hardware, welche durch die beiden Threads `StartSPC150LoopThread` und `StartSecondSPC150LoopThread` gesteuert wird, wird durch die Threads ständig auf Fehlerhinweise, Speicherprobleme (FIFO-Speicher) und sonstige Probleme überprüft. Handelt es sich um Bedienungsfehler des Anwenders, wird dieser darüber informiert und kann entsprechend reagieren. Bei Hardwareproblemen, die der Anwender nicht selbstständig oder während einer Messung beheben kann, werden die Messung abgebrochen und entsprechende Hinweise ausgegeben.

Die direkt von der Hardware abgerufenen Messdaten werden in der Funktion **ProcessFIFO** verarbeitet. Es handelt sich dabei um eine sehr umfangreiche Funktion, welche die Informationen für die weitere Verarbeitung aufbereitet und in das jeweilige Bild (Frame) einsortiert. Neben der Position wird für jedes detektierte Photon die Fluoreszenzlebensdauer abgespeichert.

Nachdem die Daten aus dem FIFO-Speicher verarbeitet wurden, werden diese sofort aus dem FIFO-Speicher gelöscht sowie in einen Zwischenspeicher des Computersystems überführt und aus diesem, wie in Kapitel 5.2.9.4 beschrieben, verarbeitet, damit der FIFO-Speicher nicht vollläuft.

Die Schleife endet, sobald ein entsprechendes Signal des Verarbeitungstreads **StartMeasLoopThread** (siehe Kapitel 5.2.9.4) gesendet wird.

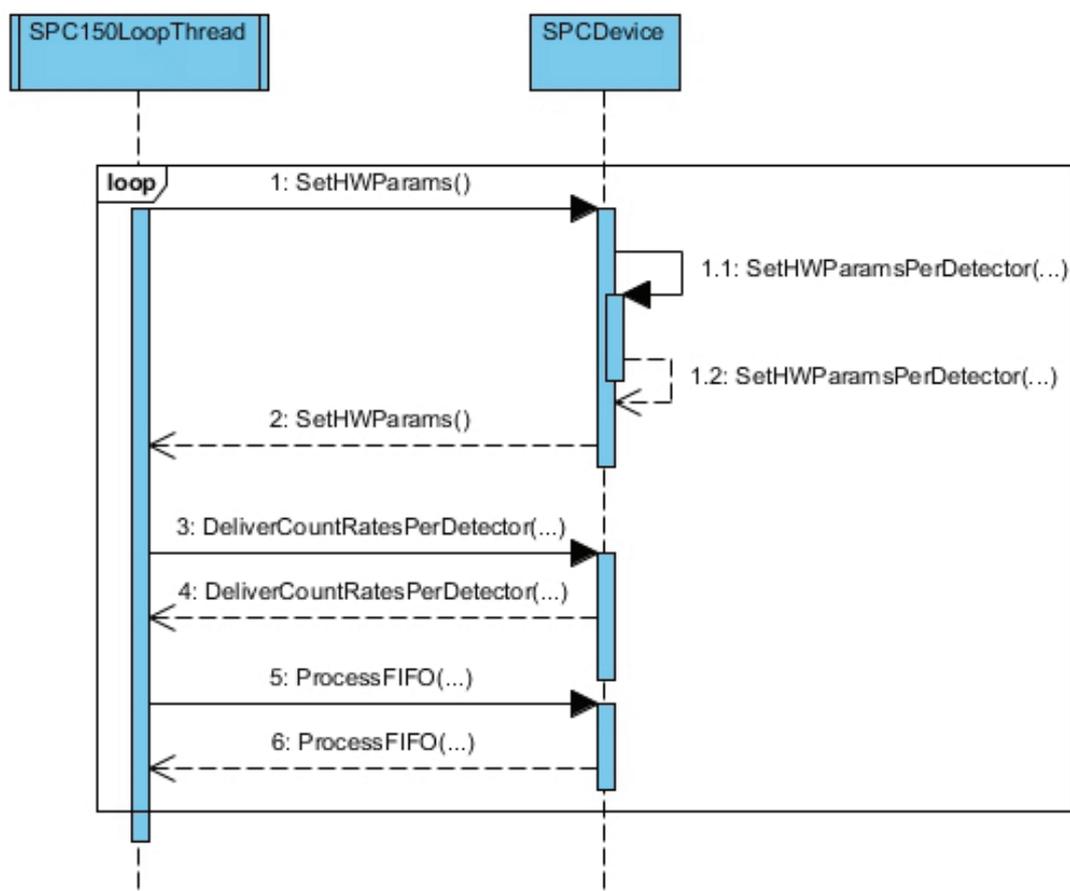


Abbildung 66: Sequenzdiagramm des Threads StartSPC150LoopThread

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9.6 Einen Messvorgang stoppen

Nachdem eine Messung gestartet wurde, indem der Anwender auf dem TouchPanel den „Acquisition“-Button gedrückt hatte, kann der Anwender über erneutes Drücken desselben Buttons die Messung beenden. Das Sequenzdiagramm in Abbildung 67 illustriert die zeitlichen Abläufe.

Über die Funktion **TauMappingEnable** teilt das HEYEX-AQM das manuelle Beenden der Messung dem FLIO-Aufnahmemodul (Flio-AQM) mit. Das Aufnahmemodul leitet diese Information über die Funktion **StopMeasLoop** dem Objekt der Klasse **SPCMeasurement** weiter, welches die zentrale Klasse darstellt, die alle Messvorgänge kontrolliert.

Ausgehend von dieser Funktion erhalten alle in die Messung involvierten Threads ein Stop-Signal, wodurch diese das Ende der Messung einleiten und die Hardware auf das Ende der Messung vorbereiten. Mit der Funktion **PowerOff** der Klasse **DCC100**, mit welcher die Stromversorgung des Lasers und der Detektoren kontrolliert wird (siehe Kapitel 5.2.9.1 und Kapitel 5.2.9.3), werden Laser und Detektoren abgeschaltet, sobald die dafür notwendigen Vorbereitungen in den Threads abgeschlossen wurden. Kommt es dabei in den Threads zu Problemen, erfolgt eine Notabschaltung, wobei die Messdaten nicht verloren gehen.

Nach der Abschaltung wird der Thread **StartSavingThread** gestartet, welcher die gesammelten Fluoreszenzlebensdauerdaten, Fluoreszenzintensitätsbilder und das gemittelte Histogramm über die gesamte Messung im Dateisystem abspeichert und den reservierten Speicher freigibt. Die genauen Abläufe der Speicherung werden im folgenden Kapitel 5.2.9.7 dargestellt.

Über die Funktion **SetSelectedMode** wird dem Benutzer erneut dargestellt, welcher Anzeigemodus vor dem Beenden der Messung ausgewählt war. Auch nach einer Messung kann der Anwender sich die generierten Fluoreszenzintensitätsbilder und Histogramme der beiden Detektoren ansehen.

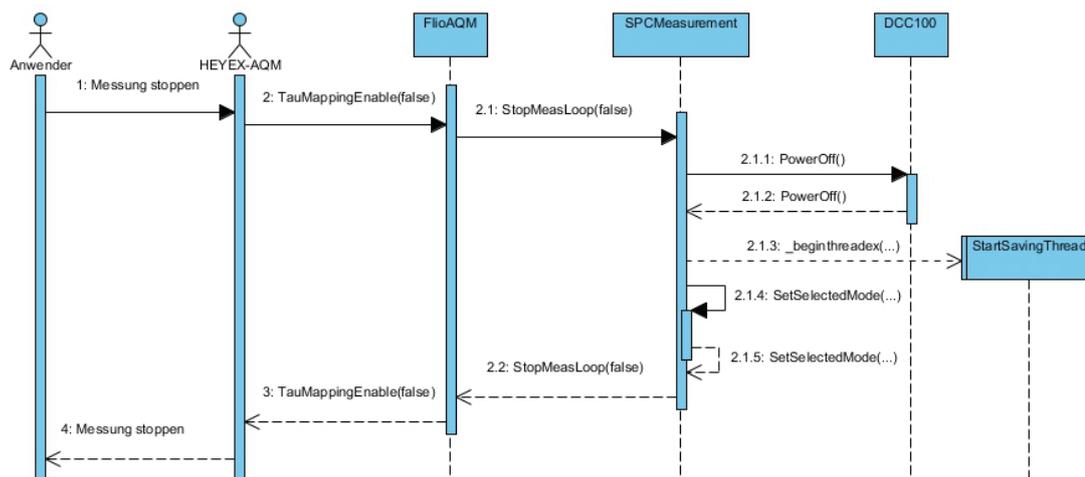


Abbildung 67: Sequenzdiagramm zum Stoppen einer FLIO-Messung

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9.7 Genauere Betrachtung des Threads StartSavingThread

In dem in Abbildung 68 dargestellten Thread werden alle Daten gespeichert, die während des Messprozesses aufgenommen wurden. Der Anwender wird in der grafischen Benutzeroberfläche über den Fortschritt der teilweise sehr umfangreichen Speicherung stets informiert.

Über die Funktion `SaveData` der Klasse `STDIO` werden die Fluoreszenzlebensdauerermessungen im standardisierten SDT-Format abgespeichert (siehe Kapitel 5.2.6). Neben den Fluoreszenzlebensdauerinformationen der beiden Spektralkanäle werden die Hardwarekonfigurationen, mit denen die Aufnahmen erstellt wurden, ebenfalls in die Datei gespeichert. Eine SDT-Datei mit den empfohlenen 1000 Photonen im Durchschnitt pro Pixel und Spektralkanal besitzt eine Dateigröße von ungefähr 300 MB.

Mit der Funktion `setStatusInformation` wird dem Benutzer angezeigt, unter welchem Dateinamen und Dateipfad die Messdaten abgelegt wurden. Bei Fehlern wird dies ebenfalls über diese Funktion angezeigt.

Der Basis-Speicherpfad kann in der zentralen Initialisierungsdatei (INI) festgelegt werden. Dieser Basis-Pfad wird um einige patientenspezifische Merkmale erweitert. So werden alle Messungen eines Patienten in ein Verzeichnis gespeichert, das sich aus der Datenbank-ID des Patienten in der HEYEX-Datenbank sowie dem Vor- und Nachnamen des Patienten zusammensetzt und hierdurch für jeden Patienten einmalig

ist. Jede Messung wird innerhalb dieses Verzeichnisses in ein eigenes Verzeichnis gespeichert, das über Datum und Uhrzeit der Messung eindeutig von anderen Messungen unterschieden werden kann. Die Verzeichnisstruktur wird bei jedem Start einer Messung generiert (siehe Kapitel 5.2.9.3).

Im Anschluss an die Messdaten wird mit der Funktion `SaveBitmap` das über die gesamte Messung gemittelte TCSPC-Histogramm als Bilddatei gespeichert. Über die Funktion `SaveHistograms` werden zudem die einzelnen Punkte der beiden Histogrammkurven als Textdatei so abgespeichert, dass diese durch eine Software ausgewertet werden können.

Durch die Funktion `SetAccumHistograms` werden die gemittelten Histogramme für die grafische Benutzeroberfläche bereitgestellt. Nach Beenden und Speicherung einer Messung kann sich der Anwender alle zur Verfügung stehenden Ergebnisse und Ansichtsmodi (siehe Kapitel 5.2.10) erneut ansehen und eine erste Beurteilung vornehmen. So ist es dem Benutzer möglich, sich direkt im FLIO-Aufnahmemodul die Fluoreszenzintensitätsbilder und TCSPC-Histogramme anzusehen und ggfs. mit dem Patienten zu besprechen.

In der folgenden Schleife (`loop`) werden die Fluoreszenzintensitätsbilder beider Spektralkanäle gespeichert. Über die Funktion `UpdateIntensityBitmap` wird das jeweilige Intensitätsbild erneut mit allen Messdaten aktualisiert, um auch die jüngsten Messinformationen in das Aufnahmebild einzubeziehen. Die Funktion `SaveBitmap` speichert das Fluoreszenzintensitätsbild in das Verzeichnis, das für diese Messung angelegt wurde. Im zweiten Durchlauf wird derselbe Vorgang für den zweiten Spektralkanal durchgeführt, weshalb die Prozedur in einer Schleife realisiert wurde.

Im Anschluss daran werden alle wichtigen Statusinformationen einer Messung in zwei Varianten abgespeichert. Zunächst wird eine HTML-Datei generiert, die die Informationen über beispielsweise Messdauer, Anzahl der Photonen sowie einige weitere wichtige Daten übersichtlich abbildet (siehe Kapitel 5.2.10.2). Diese Datei kann im FLIO-Viewer und in jedem Internetbrowser angezeigt werden. Danach werden dieselben Informationen als XML-Datei abgelegt, welche ggfs. mit einer Software weiterverarbeitet werden können (siehe Kapitel 5.2.6).

Sobald der Speichervorgang beendet wurde, wird der Anwender über die Funktion `setStatusInformation` auf der grafischen Benutzeroberfläche darüber informiert.

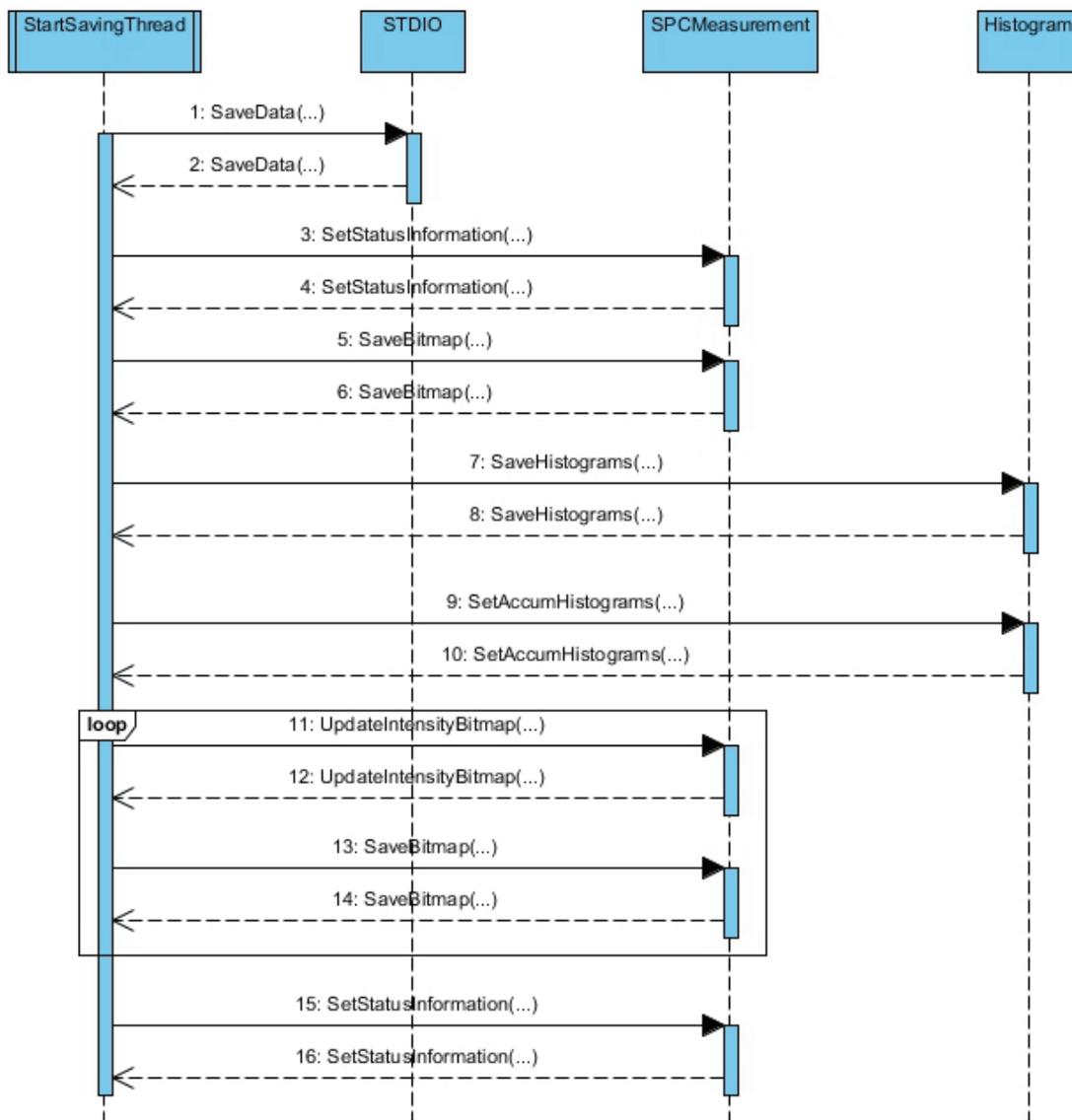


Abbildung 68: Sequenzdiagramm des Threads StartSavingThread

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.9.8 Einen Messvorgang neu starten

Es kommt vor, dass Patienten zum Beginn einer Messung sehr unruhig sind und die Augenbewegung so stark ist, dass nur sehr wenige für die Weiterverarbeitung brauchbare Messdaten gesammelt werden können.

Zu einem unruhigen Verhalten kann es beispielsweise kommen, wenn die Patienten durch das Einschalten des Lasers mit dem Starten der Messung geblendet werden und das Auge sich zunächst an das helle Licht gewöhnen muss.

Für diesen Fall hat der Anwender die Möglichkeit, einen Messvorgang über den Button „Restart Measurement“ (siehe Kapitel 5.2.10.1) neu zu starten.

Der Vorteil gegenüber der Möglichkeit, die Messung über das TouchPanel zu stoppen und neu zu beginnen, liegt darin, dass die laufende Messung für den Patienten durchgehend fortgeführt wird sowie dieser von dem Neustart der Messung nichts mitbekommt und sich hierdurch nicht erneut an das auftauchende Laserlicht gewöhnen muss. Intern verwirft das FLIO-Aufnahmemodul alle bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen Messdaten und beginnt eine neue Messung. Der Laser und die Detektoren werden dabei nicht ausgeschaltet. Durch den Neustart der Messung werden die zu verwerfenden Messdaten nicht abgespeichert. Die neuen Messinformationen, die nach dem Neustart aufgenommen werden, werden in das Verzeichnis, das für die erste Messung angelegt wurde (siehe Kapitel 5.2.9.3), gespeichert.

Die für einen Neustart der Messung notwendigen Abläufe zeigt das Sequenzdiagramm in Abbildung 69.

Durch das Klicken des Buttons „Restart Measurement“ auf der grafischen Benutzeroberfläche wird im Objekt der Klasse `SPCMeasurement` die Funktion `RestartMeasurement` aufgerufen. Es erfolgt zunächst eine Abfrage, ob die Messung tatsächlich neu gestartet werden soll. Durch das Bestätigen dieser Abfrage wird der Thread `RestartMeasurementThread` gestartet.

Der gesamte Neustart einer Messung ist ein recht umfangreicher Vorgang, da zunächst alle an der Messung beteiligten Threads gestoppt und auf der Hardwareseite die Zwischenspeicher geleert werden müssen. Da dieser Vorgang einige wenige Sekunden andauern kann und das Gesamtsystem dabei nicht stoppen soll, wird der Vorgang in einem eigenen Thread ausgeführt. Über Funktion `StopMeasLoop` wird

die laufende Messung gestoppt. Diese Funktion wird in Kapitel 5.2.9.6 näher erläutert.

Die Funktion `StartMeasLoop` initiiert den Neustart der Messung. Die Abläufe der Funktion werden in Kapitel 5.2.9.3 detailliert erklärt.

Wie dem Sequenzdiagramm zu entnehmen ist, wird bei beiden Funktionen der boolesche Wert „`true`“ übermittelt. Dieser Wert signalisiert, dass die die gesamte Messung neu initialisiert wird, die Hardware selbst jedoch nicht abgeschaltet bzw. neu eingeschaltet wird. In den beschriebenen Abläufen der Kapitel 5.2.9.3 und Kapitel 5.2.9.8 wird stattdessen „`false`“ übergeben.

Der Benutzer wird über den Status des Neustarts stets informiert. Ein Neustart läuft üblicherweise innerhalb von 0,5 bis 2 Sekunden ab.

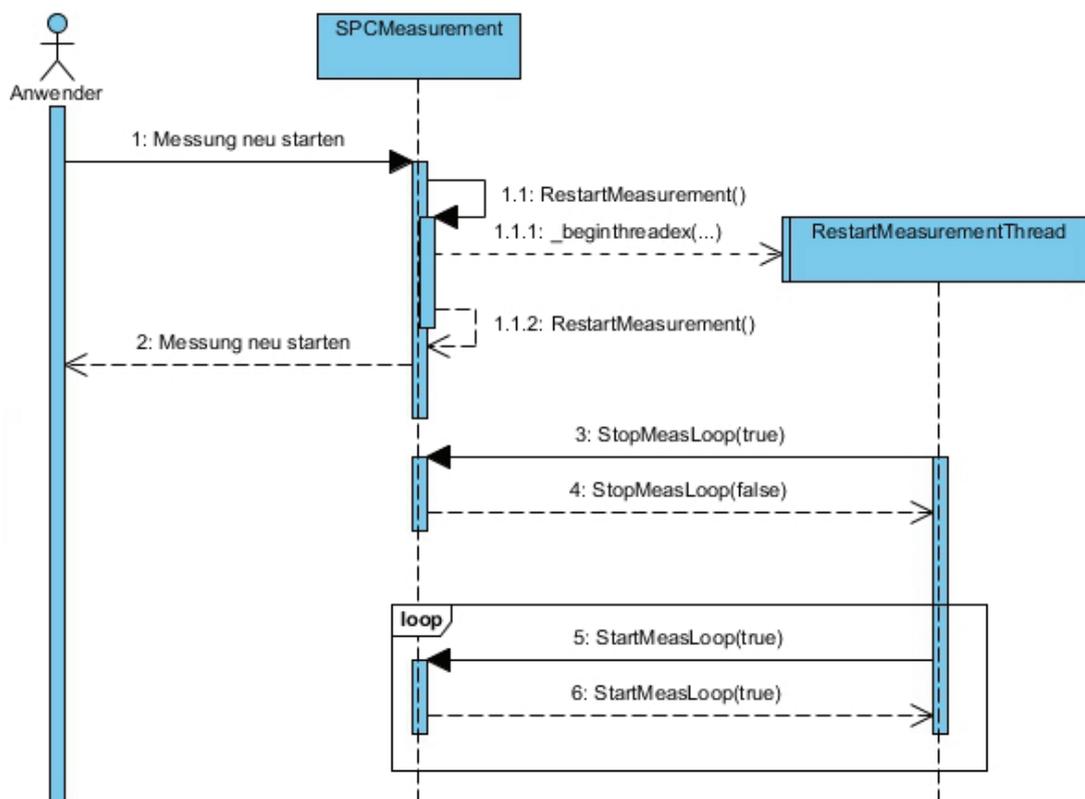


Abbildung 69: Sequenzdiagramm für den Neustart einer Messung

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.10 Implementierung der Software

Nachdem die Rahmenbedingungen ermittelt wurden, thematisiert dieses Kapitel die Realisierung des FLIO-Aufnahmemoduls und des FLIO-Viewers mit Visual Studio 2010. Der FLIO-Viewer und seine Funktionalität wird dabei lediglich vorgestellt, dessen technische Realisierung jedoch nicht ausführlich behandelt.

5.2.10.1 Grafische Benutzeroberfläche (GUI) und Assistenten der Messsoftware

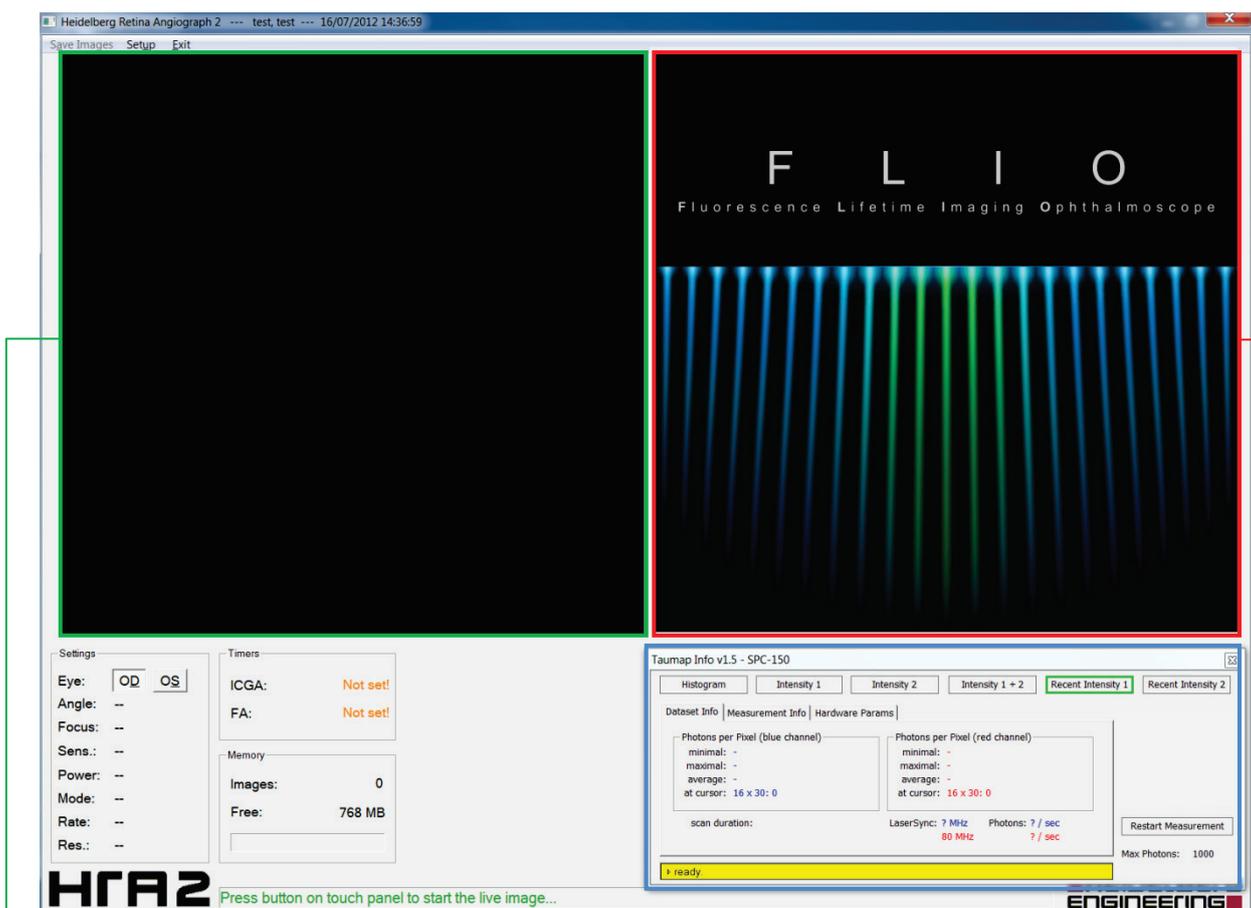


Abbildung 70: Das FLIO-Aufnahmemodul nach dem Start aus HEYEX heraus

Quelle: Illustration des Autors.

Das FLIO-Aufnahmemodul besteht aus den folgenden drei Kernkomponenten:

- Infrarot Reflektionsbild (Referenzbild für Eye Tracking)
- FLIO-Darstellungen (Intensitätsbilder, Histogramm, etc.)
- Assistent mit Messinformationen, Benutzeranweisungen und Manipulationsmöglichkeiten (blauer Rahmen)

Dabei liefert das FLIO-Aufnahmemodul die FLIO-Anzeige und den Assistenten. Der Fensterrahmen und das Reflektionsbild werden durch das HEYEX-AQM erzeugt, in das sich das FLIO-Aufnahmemodul integriert.

In der Version für Standardanwender (Fotografen) wird im Assistenten ausschließlich die Registerkarte „Dataset Info“ angezeigt.

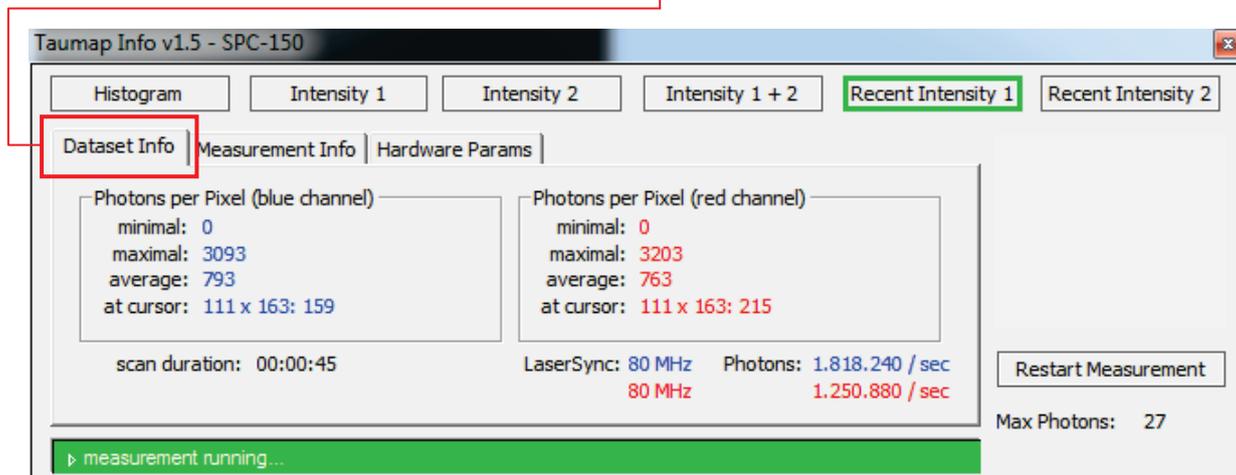


Abbildung 71: Darstellung des FLIO-Assistenten mit der Registerkarte "Dataset Info"

Quelle: Illustration des Autors.

Auf dieser Registerkarte werden die für den ausführenden Fotografen wichtigsten Informationen bezüglich der laufenden oder angehaltenen Messung angezeigt.

Für die einzelnen Kanäle (Detektoren), die Messungen auf verschiedenen Wellenlängen durchführen, werden einige Daten der Photonenzählung zusammengestellt. Es handelt sich dabei um Informationen über die minimale, maximale und durchschnittliche Anzahl an Photonen pro Pixel sowie die genaue Anzahl an Photonen in einem bestimmten Pixel, der über den Mauszeiger gewählt werden kann.

Die durchschnittliche Anzahl an Photonen pro Pixel ist ein guter Anhaltspunkt dafür, ob im Mittel genügend Informationen für eine aussagekräftige Datenauswertung gesammelt wurden und die Messung gestoppt werden kann. Klinische Studien haben ergeben, dass im Mittel eine Anzahl von durchschnittlich 1000 Photonen pro Pixel sinnvoll ist.



Abbildung 72: Der Filterstab ist direkt hinter dem Lasershutter an der Quelle integriert

Quelle: Illustration des Autors.

Daneben werden die Laufzeit der Messung, die aktuelle Laserfrequenz und die Photonenzählrate in detektierten Photonen pro Sekunde ausgewiesen. Die Photonenzählrate ist ein wichtiges Indiz dafür, wie stark die Belastungsgrenzen der Detektoren ausgereizt werden. Wird über einen gewissen Zeitraum ein Limit überschritten, gibt die Software Hinweise zum Einführen von Filtern aus, damit es zu keinem „Overload“ (Überbelastung) der Detektoren kommt und die Zählungen verlässlich sind. Es handelt sich dabei um ND-Filter (Neutraldichtefilter), die der Anwender über eine Mechanik direkt vor den Puls laserstrahl einführen kann, um dessen Lichtintensität und damit die resultierende Fluoreszenz stufenweise zu reduzieren. Sobald die Zählraten wieder in einem idealen Rahmen angelangt sind, gibt die Software ebenfalls eine entsprechende Meldung aus.

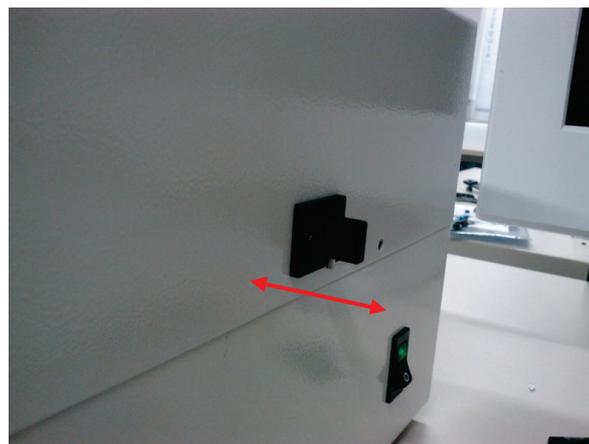


Abbildung 73: Gehäuse mit Filterstab, durch das Ein- und Herausführen des seitlich am Gehäuse angebrachten Filterstabs kann die Laserintensität reduziert werden

Quelle: Illustration des Autors.

Wird in den Detektoren doch ein „Overload“ erzeugt, indem zu viel Fluoreszenz in den Detektoren ankommt, wird der gesamte Messprozess und die TCSPC-Hardware abgeschaltet.

Für Hinweise, Fehlermeldungen und Warnungen sind zwei Assistenzanzeigen vorgesehen. Ein Leitsystem im Assistentenfenster unterstützt den Nutzer bei der Bedienung.

Es existieren vier Dringlichkeits- bzw. Schweregrade, die farblich entsprechend hervorgehoben werden. Ein Auszug der Meldungen, mit denen die Software den Benutzer führt:

- Hinweise

ready

Initializing SPCDevice...

Initializing DCC-100...

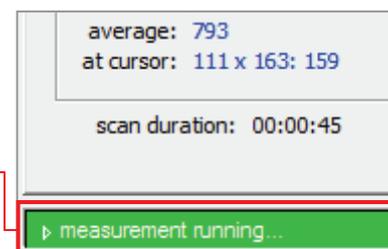


Abbildung 74: Nachrichten im Assistentenfenster unterstützen den Anwender

Quelle: Illustration des Autors.

ready - Scanning Angle set to XX*

* Scanning-Winkel in Grad.

Video format has changed or reference been reset, measurement will be

set ini settings

ready - measurement saved

- Positives Feedback als Reaktion auf die Benutzerinteraktion während der Messung:

measurement running...

Restarting Measurement.

Measurement successfully restarted.

ND-filter adequate - measurement running.

- Verarbeitung und Speicherung

saving measurement...

- Fehler

Couldn't open SPCDevice

Error initializing SPC/DCC Hardware

ERROR - Wrong Resolution Mode, please select High Speed

ERROR: DCC-Hardware not running (Overload). Please restart TauMap and start New Examination.

ERROR: Detector 1 Missing Photon Statistics - Restart Measurement

- ERROR: Detector 2 Missing Photon Statistics - Restart Measurement
- Count rates too high. Please insert additional ND-filter.
- Error while setting ini settings
- ERROR occurred while saving measurement.

Ferner werden wichtige Warnungen und Fehler, die die Messung unmittelbar betreffen, im FLIO-Bild rot angezeigt. Dabei handelt es sich um grobe Fehler, Hardwareprobleme oder Maßnahmen, die der Anwender betreiben muss, damit es zu keinem Fehler kommt.



Abbildung 75: FLIO-Anzeigemodul mit schwerer Fehlermeldung innerhalb der FLIO-Anzeige

Quelle: Illustration des Autors.

Während des fehlerfreien Betriebs werden innerhalb des FLIO-Bildes Hinweise über die eingestellte Auflösung des FLIO-Bildes, welche in der Initialisierungsdatei eingestellt werden kann, sowie weitere wichtige Informationen angezeigt.

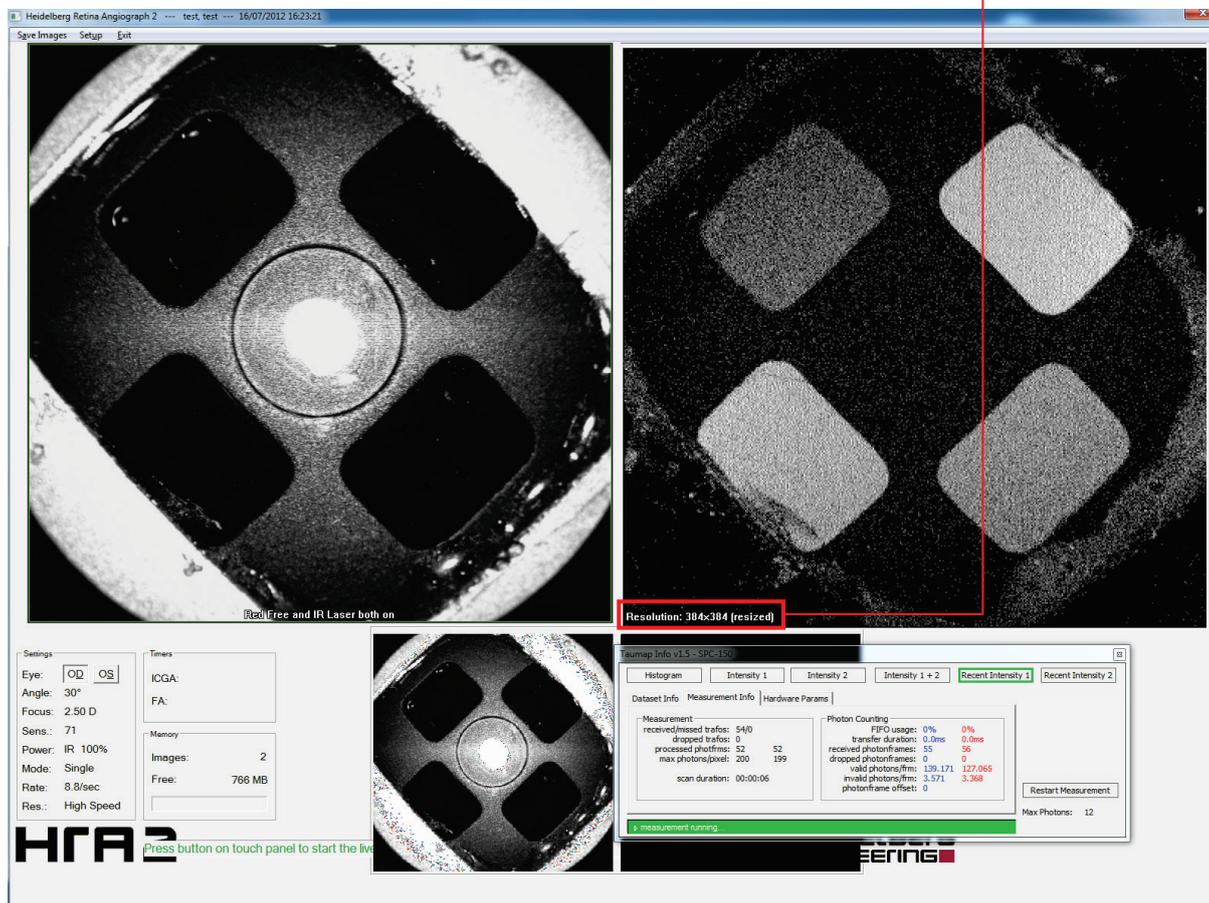


Abbildung 76: FLIO-Anzeigemodul mit Hinweis innerhalb der FLIO-Anzeige

Quelle: Illustration des Autors.

Informationen und Fehlermeldungen, die für die Messung von besonderer Bedeutung sind und daher in der FLIO-Anzeige dargestellt werden:

- Hinweise

Resolution: XXXxXXX (resized*)

*resized: Entspricht die in der Initialisierungsdatei eingestellte und aufgenommene nicht der dargestellten Auflösung (Darstellung wird skaliert), wird dies dem Anwender angezeigt, da durch die Skalierung eines Bildes Aliasing-Effekte nicht immer verhindert werden können.

No Output: IR Mode

No Output: Red Free Mode

- Schwere Fehlermeldungen

ERROR: Detector 1 Missing Photon Statistics - Restart Measurement

ERROR: Detector 2 Missing Photon Statistics - Restart Measurement

Mit Hilfe der obersten Navigationsleiste wählt der Anwender die Ansichtsmodi.

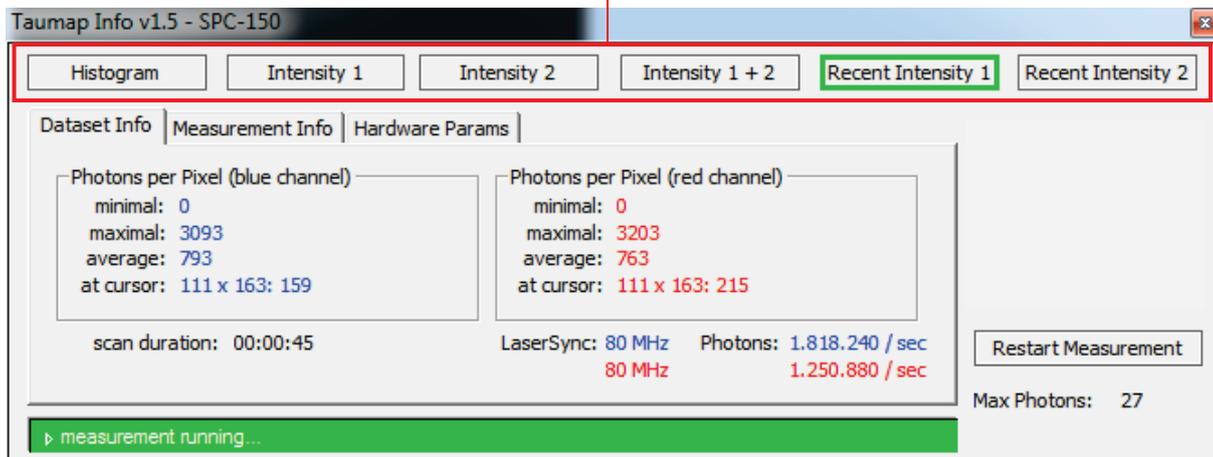


Abbildung 77: Navigationsleiste für die diversen Ansichtsmodi im oberen Bereich des Assistenten

Quelle: Illustration des Autors.

Es stehen dabei die folgenden Modi zur Verfügung:

- **Histogram (Histogramm)**

Das gemittelte Live-TCSPC-Histogramm für beide Detektorkanäle, das während der Messung fortlaufend aktualisiert wird.

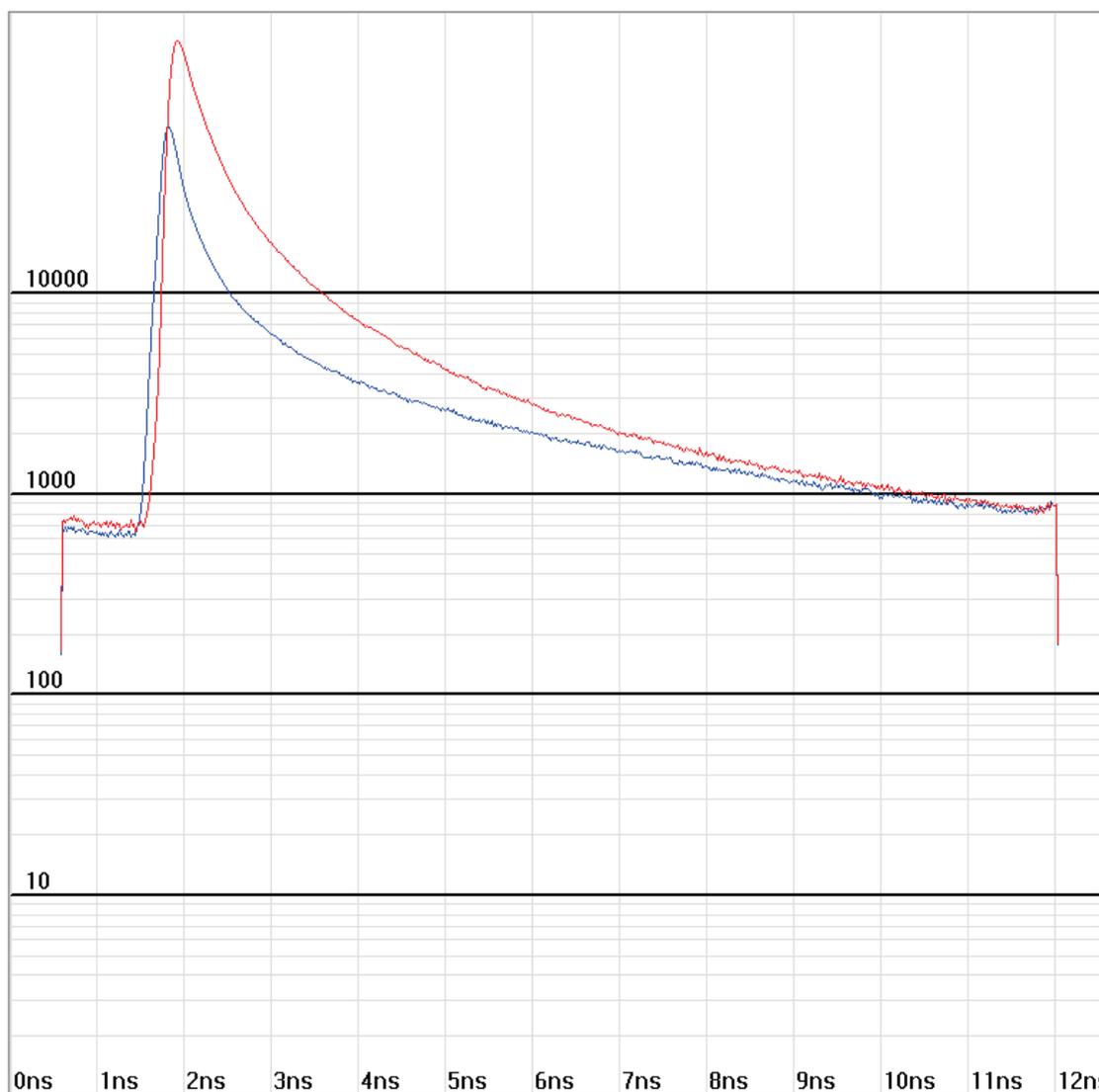


Abbildung 78: TCSPC-Histogramm während einer Messung an Patient X - die blaue Kurve stellt die Fluoreszenzlebensdauern des langwelligen Kanals dar, die rote Kurve die des kurzwelligen Kanals

Quelle: Illustration des Autors.

- **Intensity 1 (Intensität 1)**

Darstellung des über den gesamten Messzeitraum gemittelten Fluoreszenzintensitätsbildes des **kurzwelligen Kanals**.



Abbildung 79: Über Messzeitraum gemitteltes Fluoreszenzintensitätsbild des kurzwelligen Kanals der Messung an Patienten X

Quelle: Illustration des Autors.

- **Intensity 2 (Intensität 2)**

Darstellung des über den gesamten Messzeitraum gemittelten Fluoreszenzintensitätsbildes des langwelligen Kanals.

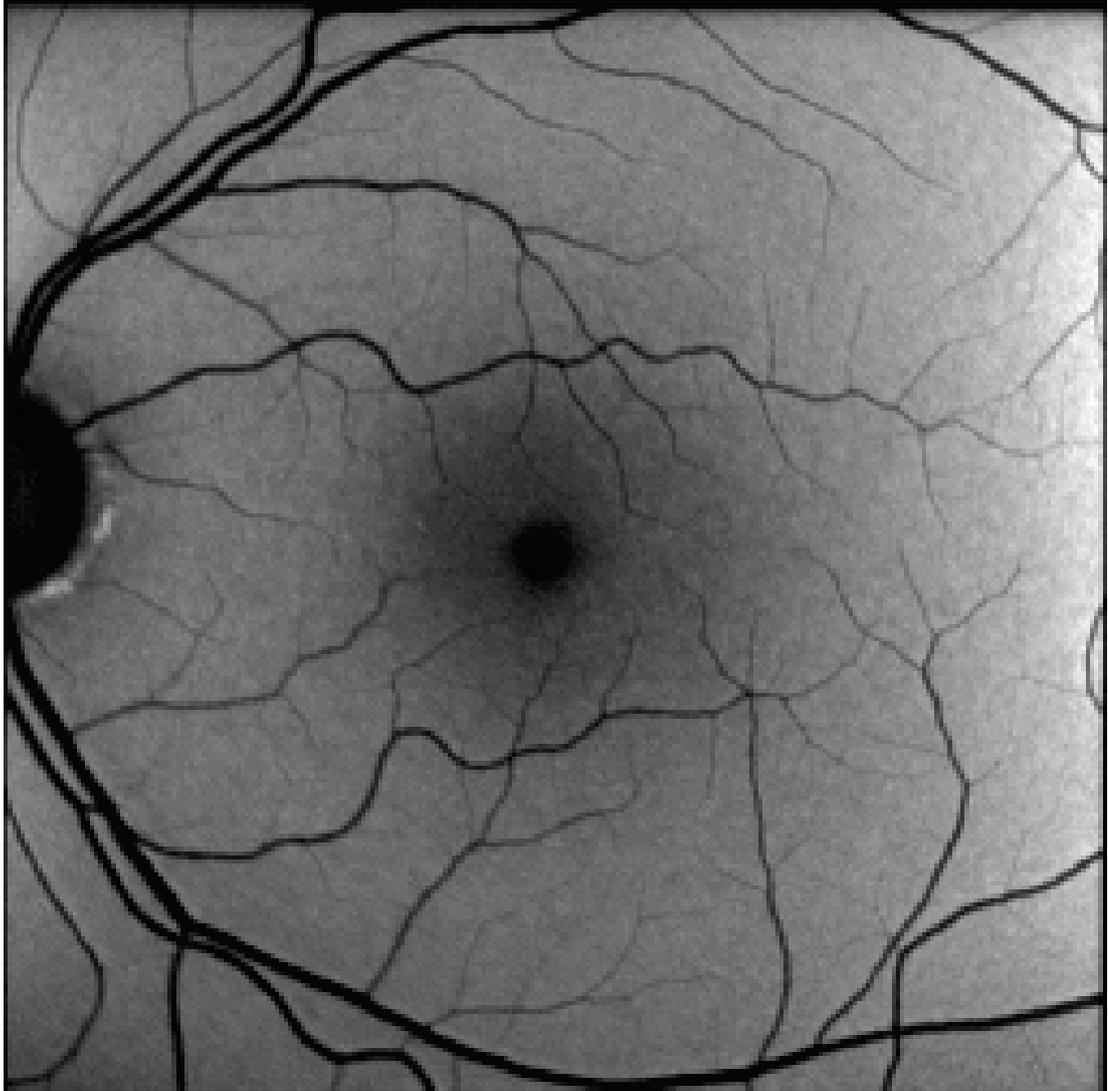


Abbildung 80: Über Messzeitraum gemitteltes Fluoreszenzintensitätsbild des langwelligen Kanals der Messung an Patienten X

Quelle: Illustration des Autors.

- **Intensity 1 + 2 (Intensität 1 + 2)**

Kumulierte Darstellung der Intensitäten beider Detektor-Kanäle.

- **Recent Intensity 1 (aktuell gemessene Intensität 1)**

Darstellung des Intensitätsbildes des kurzwelligen Kanals. Im Gegensatz zu „Intensity 1“ werden hierbei nicht die Messergebnisse der gesamten Messung kumuliert, sondern lediglich das aktuelle Frame (das jüngste errechnete Bild) ausgegeben. Aufgrund der Tatsache, dass weniger Messinformationen zur Verfügung stehen als bei den kumulierten Intensitätsbildern über den gesamten Messzeitraum, enthalten die „Live“-Bilder etwas weniger Kontrast und Schärfe.

- **Recent Intensity 2 (aktuell gemessene Intensität 2)**

Wie bei „Recent Intensity 1“ handelt es sich hierbei um die Darstellung der Live-Intensitäts-Bilder, das heißt der neuesten, zur Verfügung stehenden Intensitäten des letzten Frames.

Sehr interessant ist dabei, dass bereits während der Messung festgestellt werden kann, auf welchem der beiden Kanäle mehr Informationen zur Verfügung stehen, das heißt mehr Fluoreszenz auf den Detektoren ankommt, was auf das erhöhte Vorkommen gewisser Stoffe im Auge rückschließen lässt.

Die beiden gemittelten Fluoreszenzintensitätsbilder in Kombination mit dem Histogramm des Patienten X im Vergleich:

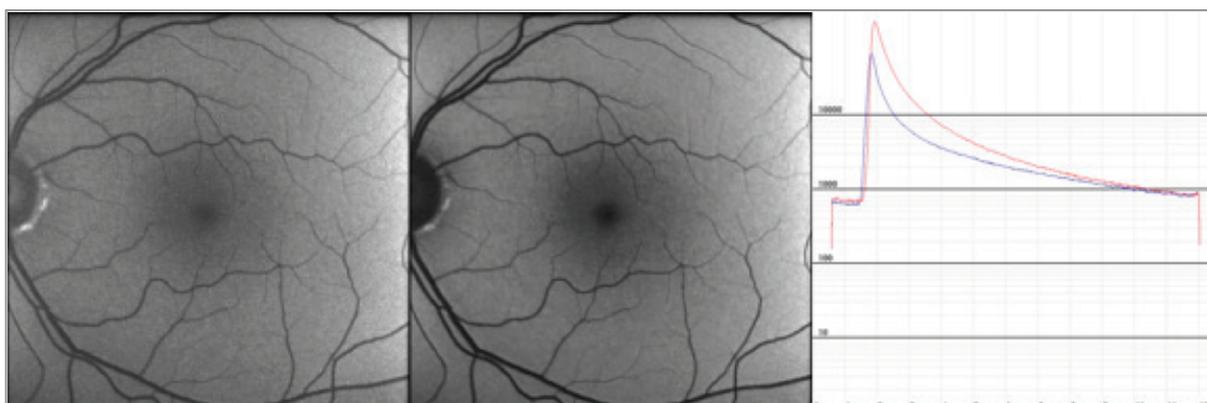


Abbildung 81: Fluoreszenzintensitätsbild des kurzwelligen (links) und langwelligen (Mitte) Kanals, in Kombination mit dem Histogramm (rechts)

Quelle: Illustration des Autors.

Die Registerkarte „Measurement Info“ (Abbildung 82) ist ausschließlich in der Entwickler- und Administratoransicht verfügbar und zeigt einige aussagekräftige Details, die wichtige Informationen über das Zusammenspiel der Hardwarekomponenten liefern. Die Informationen sind in der Anwender-Ansicht nicht verfügbar, um den Fokus des Anwenders auf die für die Auswertung wesentlichen Daten zu lenken.

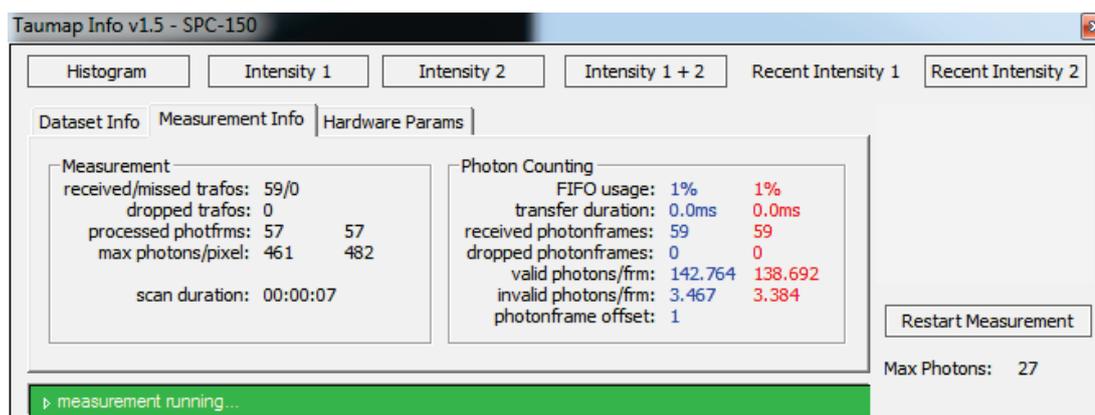


Abbildung 82: Darstellung des FLIO-Assistenten mit Registerkarte "Measurement Info"

Quelle: Illustration des Autors.

Einzelbilder, welche die Informationen eines Scandurchlaufs anzeigen, werden als Frames bezeichnet.

Im Detail werden folgende Informationen in dieser Registerkarte angezeigt:

- **Received/missed trafos**

Gibt die Anzahl der durch das HEYEX-Aufnahmemodul (HEYEX-Acquisition-Module = HEYEX-AQM) und das integrierte Eye Tracking-Verfahren detektierten Veränderungen und Bewegungen des Auges an sowie die Anzahl der nicht feststellbaren Veränderungen. Veränderungen, die nicht feststell- und damit auf das Auge übertragbar sind, entstehen, wenn das Eye Tracking-Verfahren das Auge nicht registrieren kann. Zu diesem Problem kann es vermehrt kommen, wenn eine Defokussierung des Auges vorliegt, da beispielsweise eine vorhandene Fern- oder Nahsichtigkeit nicht berücksichtigt, die Messung zu früh gestartet wurde oder der Patient das Auge aus dem messbaren Bereich bewegt hat.

- **Dropped trafos**

Anzahl der durch das HEYEX-AQM festgestellten Veränderungen, die nicht in den internen trafo-Buffer gespeichert werden konnten, aufgrund einer temporären Hardware- bzw. Speicherüberlastung.

- **Processed photon frames**

Anzahl der Frames, die seit dem Start der Messung bereits erfolgreich verarbeitet wurden. Im Gegensatz zu den bisherigen Messwerten, welche sich auf beide Wellenlängen und Detektoren gleichermaßen beziehen, erfolgt die Anzeige dieses Wertes für beide Detektoren separat. Der linke Wert entspricht dem langwelligen Kanal (im Histogramm blau dargestellt), der rechte Wert dem kurzwelligen Detektorkanal.

- **Max photons/pixel**

Präsentiert die Maxima der in einem Pixel gemessenen Photonen für beide Detektoren.

- **Scan duration**

Repräsentiert die Zeitspanne seit dem Beginn der Messung. Die Zeitspanne kann von Patient zu Patient sehr stark variieren in Abhängigkeit davon, wie viel fluoreszierendes Material in den Augen des Patienten vorhanden ist. Durch massives Auftreten von fluoreszierenden Stoffen wird die empfohlene durchschnittliche Anzahl an Photonen pro Pixel schneller erreicht.

Ferner werden Details über das Verfahren der Photonenzählung (**Photon Counting**) an sich herausgestellt. Es handelt sich um Daten, die aus dem Zusammenspiel von Hard- und Software entstehen. Die Werte sind zweifach aufgeführt, da das System über zwei SPC-Karten verfügt, mit denen jeweils die Messungen eines Detektors verarbeitet werden:

- **FIFO usage**

Gibt die prozentuale Auslastung des SPC-FIFO-Speichers an. Die Messinformationen werden vom Detektor abgegriffen und im FIFO-Speicher der jeweiligen SPC-Karte zwischengelagert. Das Speichermanagement der FLIO-

Software übernimmt das Management der FIFO-Speicher auf beiden SPC-Karten, liest diese aus, verarbeitet die Daten und leert den Speicher. Hierdurch kann es im PC zu Speicherengpässen kommen, weshalb ein flexibles Speichermanagement notwendig ist, welches die Daten schnellstmöglich aus dem FIFO-Speicher in den Arbeitsspeicher überträgt und ggfs. Messdaten auf der Festplatte auslagert.

FIFO (First In – First Out) bezeichnet ein spezielles Speicherverfahren, bei dem diejenigen Elemente, welche zuerst in dem Speicher abgelegt wurden, auch die Elemente sind, die als erste wieder aus dem Speicher gelesen werden. Häufig wird die Art der Datenstruktur auch als Schlange bezeichnet. [48]

- **Transfer duration**

Gibt die Zeit in Millisekunden (ms) an, die das Auslesen und Übertragen der Photon-Informationen des SPC-Speichers in den Arbeitsspeicher des PCs benötigen.

- **Received photonframes**

Zeigt die Anzahl der seit Beginn der Messung empfangenen Frames.

- **Dropped photonframes**

Beschreibt die Anzahl der Frames, welche verworfen werden mussten. Dies kann passieren, wenn der Photon-Speicher nicht mehr ausreicht, da er nicht schnell genug geleert und die Daten verarbeitet werden konnten.

- **Valid photons/frame**

Gibt die Anzahl zulässiger Photonen pro Frame an. Es handelt sich dabei um die Anzahl der Photonen, die eindeutig einem Pixel zugeordnet werden konnten. Im Zweifelsfall werden die Photonen als nicht zulässig eingestuft und die Information nicht in die Messergebnisse übernommen.

- **Invalid photons/frame**

In Anlehnung an den Punkt „valid photons/frame“ beschreiben die nicht zulässigen Photonen eines Frames die Anzahl an Photonen, welche nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

- **Photon frame offset**

Gibt die Anzahl an Frames an, bei denen sich das empfangene Photonframe der SPC-Hardware und die empfangenen Transformationen (Veränderungen) des HEYEX-AQM so unterscheiden, dass sich die Information der Augenbewegung nicht auf die empfangenen Photoneninformationen lässt.

Ebenso wie die Registerkarte für die detaillierten Messinformationen (Measurement Info) ist die Registerkarte „Hardware Params“ (Abbildung 83) ausschließlich in der Entwickler- und Administratoransicht verfügbar.

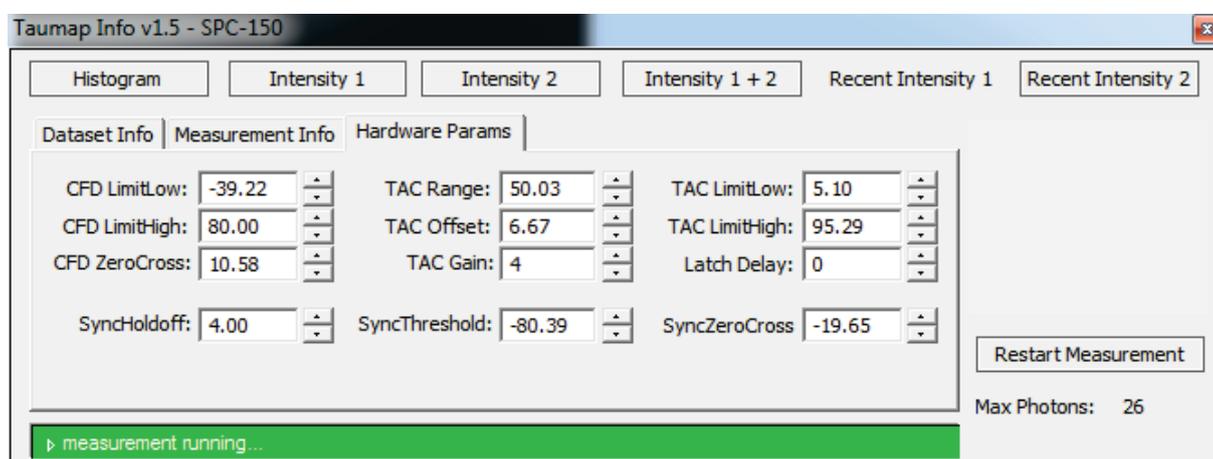


Abbildung 83: Darstellung des FLIO-Assistenten mit Registerkarte "Hardware Params"

Quelle: Illustration des Autors.

Es handelt sich um alle Systemparameter, welche die SPC-Hardware zur Verfügung stellt. Diese Einstellungen müssen sorgfältig aufeinander abgestimmt werden und können in Echtzeit während einer Messung variiert werden, um eine optimale Abstimmung zu erreichen. Sind die idealen Einstellungen gefunden, werden diese fest in einer Initialisierungsdatei (INI) gespeichert, die bei jedem Start des Moduls geladen wird. Da durch fehlerhaftes Abstimmen der Parameter Messergebnisse stark verfälscht werden können, werden diese Einstellungsoptionen nur in der Entwickleransicht zur Erstkonfiguration angeboten. Ist die optimale Konfiguration vorgenommen, ist ein nachträgliches Anpassen der Parameter auch nach vielen Messvorgängen in der Regel nicht notwendig.

5.2.10.2 Benutzeroberfläche (GUI) und Assistenten des Viewers

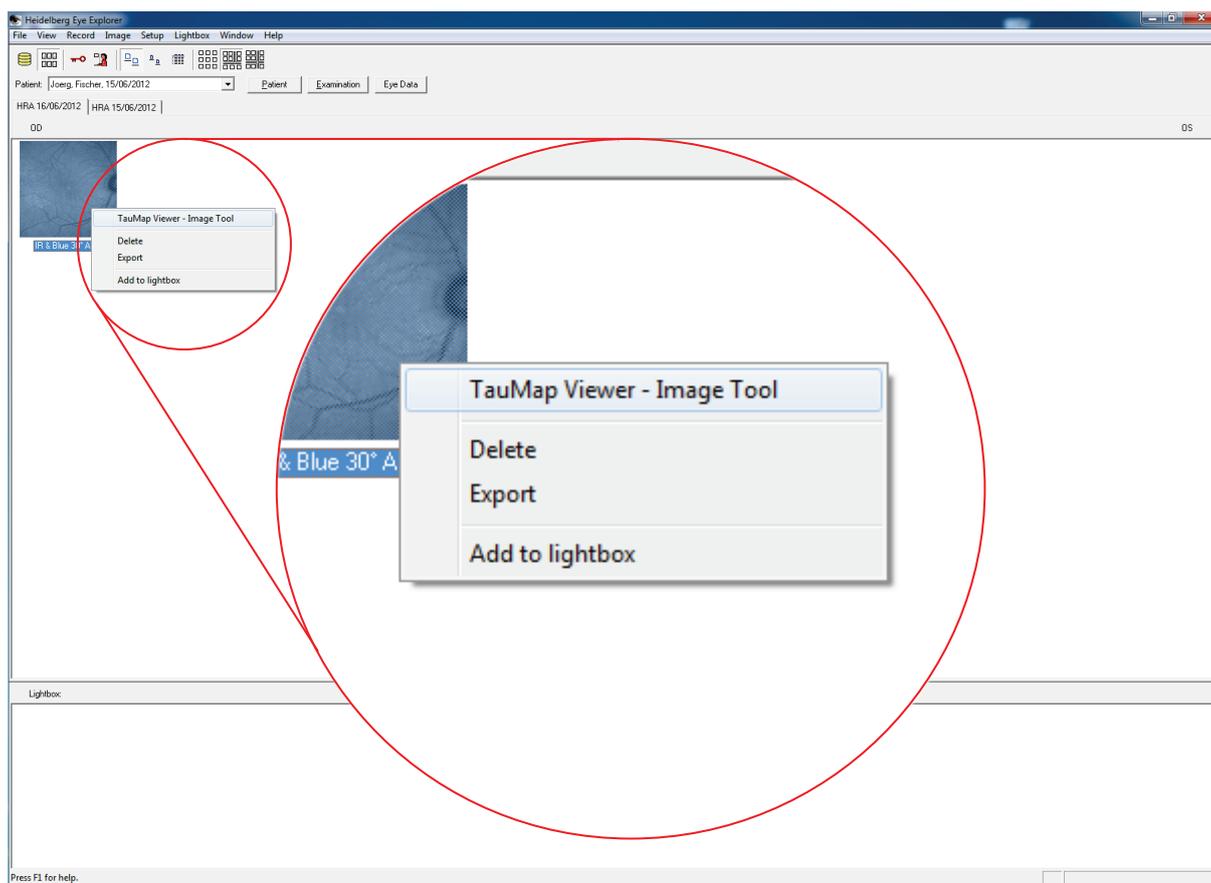


Abbildung 84: Starten des FLIO-Viewers aus HEYEX heraus

Quelle: Illustration des Autors.

In HEYEX wird zu jeder Messung und jedem Patient ein Verweis gespeichert. Über diesen Verweis, der über eine Miniaturansicht des Reflektionsbildes der Messung zu erkennen ist, lässt sich der FLIO-Viewer (auch „TauMap-Viewer – Image Tool“) starten.

Hierfür ist in HEYEX ein Plug-In registriert, welches die Informationen des Verweises an den FLIO-Viewer übermittelt. Der FLIO-Viewer ist eine eigenständige Software und kein integraler Bestandteil von HEYEX, wird aber durch das Plug-In mit speziellen Startparametern ausgeführt.

Da es sich bei dem FLIO-Viewer um eine selbständig ausführbare Software handelt, kann diese auch ohne die HEYEX-Startparameter gestartet werden. In diesem Fall startet die Anwendung jedoch ohne einen vorausgewählten Patienten bzw. Messung eines Patienten.

Die grafische Benutzeroberfläche des Viewers orientiert sich an üblichen Dateimanagern und soll einen schnellen Überblick über die vorhandenen Daten der Messsoftware liefern.

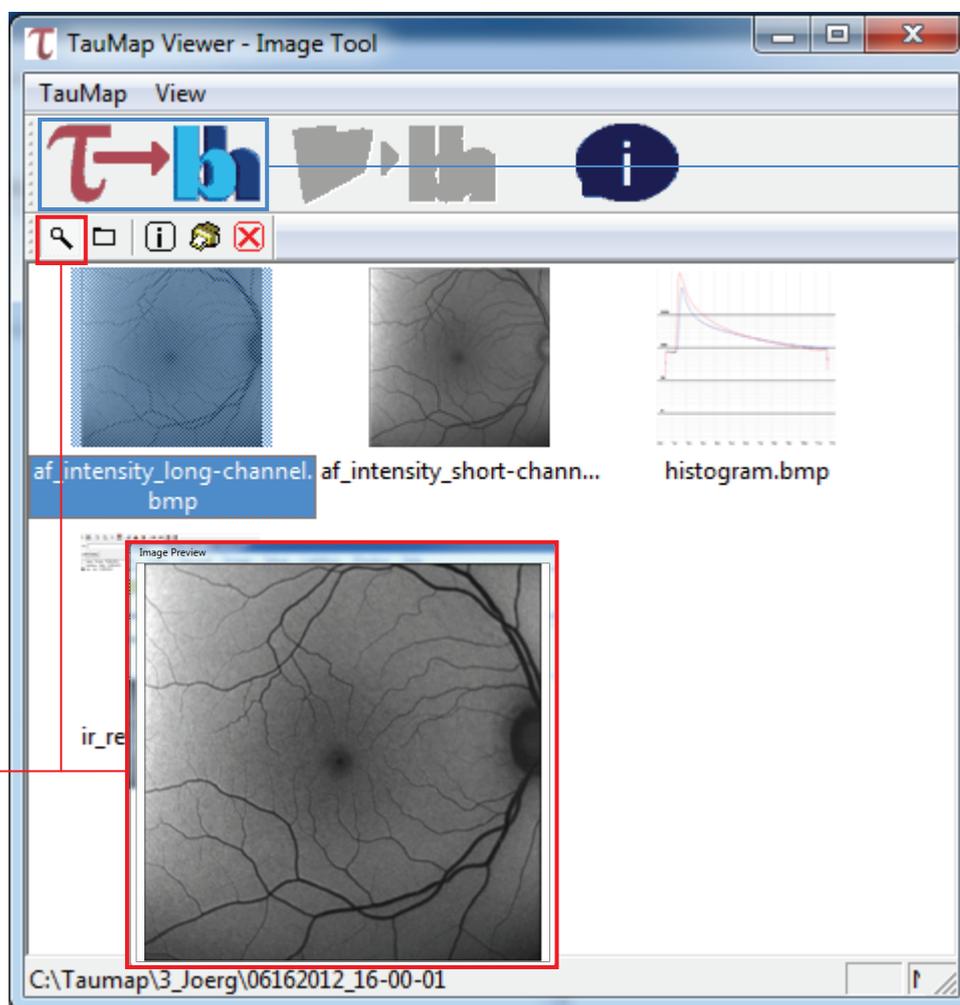


Abbildung 85: Hauptfenster des FLIO-Viewers und die Bildervorschau

Quelle: Illustration des Autors.

Für die gespeicherten Intensitätsbilder, Reflektionsbild sowie Histogramm bietet die Software eine Miniaturansicht sowie eine vergrößerte Darstellung, die sich in Größe und Zoom frei skalieren lässt . Neben den Vorschaufunktionen bietet der Viewer Schnittstellen zu einer Auswertungssoftware für die eigentlichen Lebensdauer messdaten (SDT-Dateien). Für den Export kontrolliert der Viewer das Verzeichnis, in dem alle Messdaten der jeweiligen Messung gespeichert sind, auf das Vorhandensein entsprechender Dateien. Ist eine Messdatei vorhanden, wird der Export in die

Auswertungssoftware SPCImage der Firma Becker & Hickl angeboten, andernfalls wird diese Option ausgeblendet.

Sofern die Messdaten bereits ausgewertet wurden, wird dies ebenfalls erkannt und die Option, direkt mit diesen Auswertungen weiterzuarbeiten, ebenfalls angeboten. Die Auswertungssoftware erhält hierfür vom Viewer alle notwendigen Informationen, um die Auswertungen entsprechend abzuspeichern, sodass alle Dateien und Informationen zu einer Messung nach den Konventionen der FLIO-Software zusammenhängend abgelegt sind. Wurden mehrere verschiedene Auswertungen abgespeichert, wird die ebenfalls registriert und dem Anwender in diesem Fall ein Auswahl-dialog angezeigt.



Abbildung 86: Toolbar des Viewers mit vorhandenen Mess- und Auswertungsdaten □

Quelle: Illustration des Autors.

Zu jeder Messung wird zusätzlich ein Infodokument generiert, das sich mit jedem beliebigen Browser betrachten lässt, damit Werte sich unter Ärzten sehr leicht austauschen und kommunizieren lassen. Das Infodokument lässt sich direkt aus dem Viewer heraus aufrufen. □

TauMap: Measurement Info		
1. Patient Data		
surname, firstname	W., S.	
sex	male	
Pat-ID (HEYEX)	2	
2. Measurement Data		
scan duration	00:01:29	
	Red Channel	Blue Channel
minimal photons/pixel	124	0
maximal photons/pixel	2699	3002
Ø photons/pixel	1397	1541
processed photonframes	709	410
Ø valid photons/frame	156390	183934
Ø invalid photons/frame	2216	1931
Ø Photons/s	1.315.267	2.435.486

Abbildung 87: Generiertes Infodokument zu einer Messung

Quelle: Illustration des Autors.

In der Informationsdatei (Abbildung 87) werden alle für den Arzt wichtigen Parameter angezeigt, die den Messverlauf und Messbedingungen dokumentieren.

Neben dem Infodokument in der dargestellten, für die Betrachtung optimierten Form, liegen die Informationen auch im maschinenlesbaren XML-Format vor.

Um auch Messungen eines fremden Instituts betrachten zu können, die nicht in HEYEX hinterlegt sind, lassen sich über einen Dateimanager (Abbildung 88) auch andere Speicherorte, Patienten und Messungen laden.

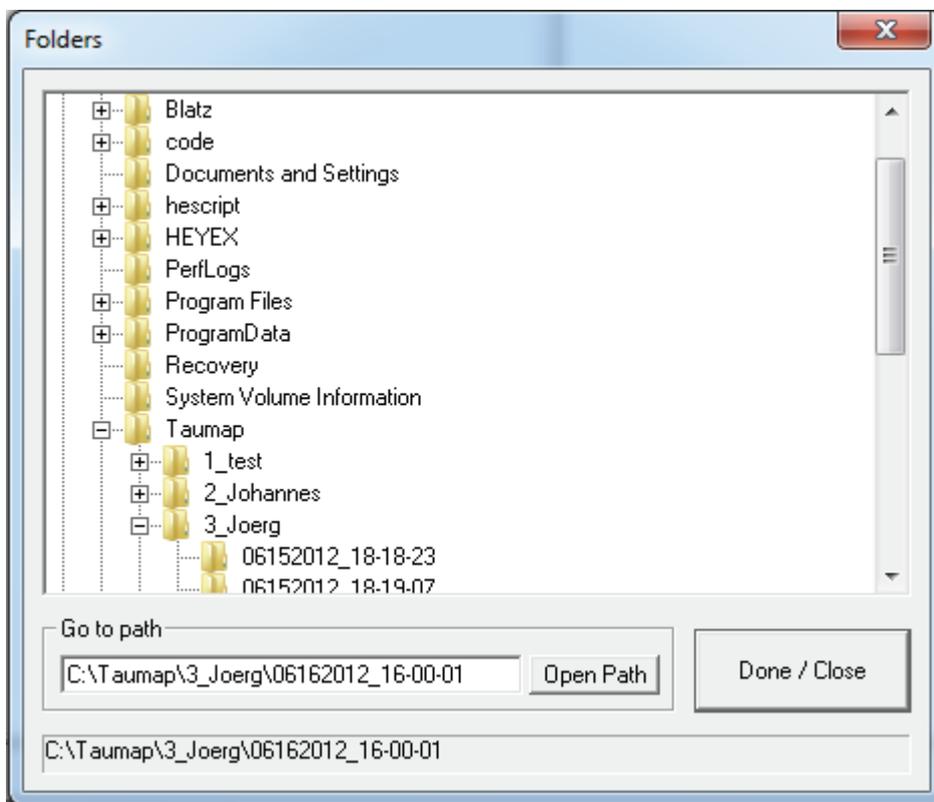


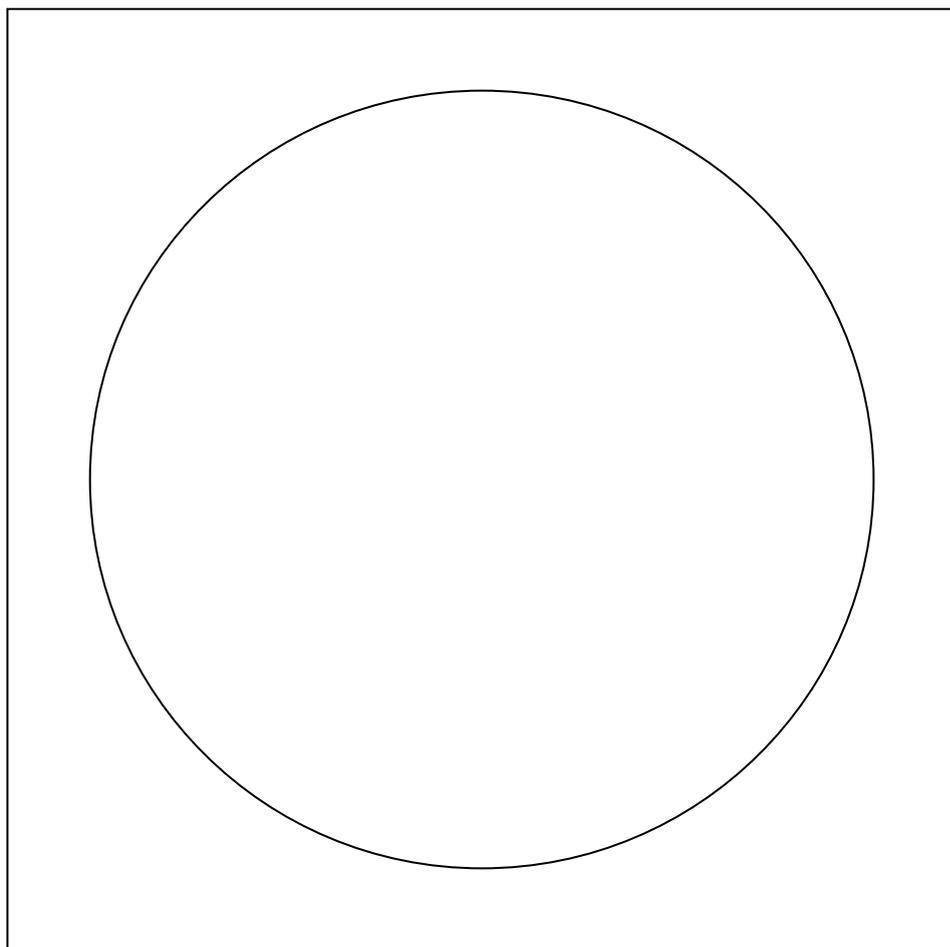
Abbildung 88: Dateimanager zum Öffnen von Messungen

Quelle: Illustration des Autors.

5.2.11 Präsentation der Software im Live-Einsatz an einem Probanden

Auf der folgenden DVD wird die Software im Einsatz an einem Patienten demonstriert. Es handelt sich um einen Video-Film, der in jedem DVD-Spieler wiedergegeben werden kann.

Der Film demonstriert alle Funktionalitäten der Software und den Einsatz des FLIO-Geräts unter realen Bedingungen.



5.2.12 Softwaregestützte Datenauswertung

Aus dem FLIO-Viewer heraus wird die Software SPCImage (Abbildung 89) der Firma Becker & Hickl mit den jeweiligen Messdaten im SDT-Dateiformat geöffnet. Ebenso wie das FLIO-Aufnahmemodul generiert die Software zunächst aus den Messdaten ein Fluoreszenzintensitätsbild und ein dazugehöriges TCSPC-Histogramm für den kurzwelligen und langwelligen Kanal.

Die Fluoreszenzlebensdauer eines bestimmten Moleküls in einer definierten Umgebung entspricht einer physikalischen Konstante. [49] Zur Bestimmung der Lebensdauern und Gewichtungsfaktoren aus den Rohdaten wird SPCImage eingesetzt. Mit der Software können Zeitkonstanten aus den Zerfallskurven ermittelt werden, wobei die IRF der Messapparatur, die in den Basis-Einstellungen der Software hinterlegt ist, berücksichtigt wird. SPCImage ist ein für zeitaufgelöste Messungen konzipiertes Fit(ting)-Programm. Die Applikation erlaubt eine Fixierung einzelner Fitparameter, wodurch der Parameterraum bei Vorkenntnissen systematisch eingeschränkt werden kann, um exaktere Ergebnisse zu erhalten. [50] Die eingesetzten Ausgleichsrechnungen (Fitting) basieren auf dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus. [51]

Das Ergebnis des Fittens ist ein Satz von Lebensdauern in einem TCSPC-Histogramm für jeden einzelnen Pixel des Bildes. [49]

Aus diesen Informationen errechnet die Software eine Fluoreszenzlebensdauerkarte, die eine schnellere Analyse ermöglicht als das händische Auswerten jedes einzelnen Pixels.

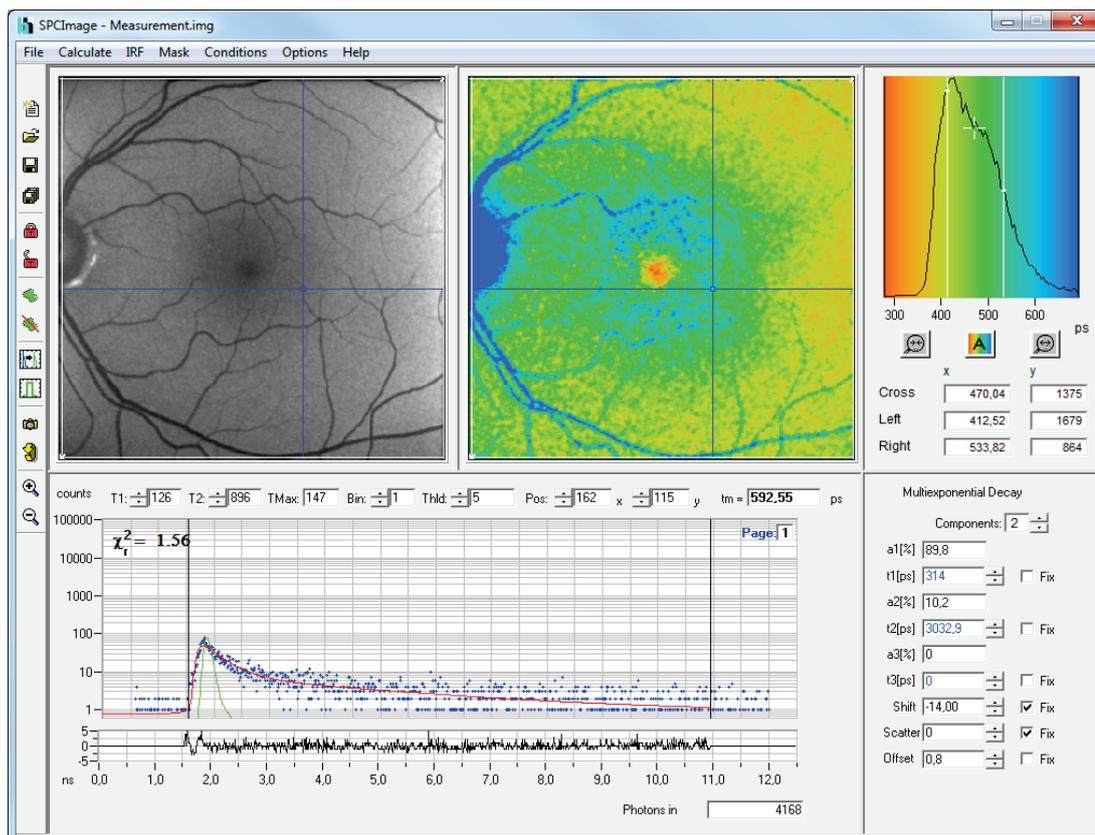


Abbildung 89: SPCImage mit Fluoreszenzintensitätsbild (links), Fluoreszenzlebensdauerkarte (rechts) und TCSPC-Histogramm des gewählten Pixels (unten, gewählter Pixel im Fadenkreuz)

Quelle: Illustration des Autors.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Auswertungssoftware nicht detaillierter betrachtet. Die umfangreiche Einführung des Herstellers befindet sich auf der dem Anhang beiliegenden CD-Rom.

5.3 Klinischer Einsatz und Messergebnisse des FLIO-Geräts

Das FLIO-Gerät befindet sich in der beschriebenen Bauweise und Softwareimplementierung mittlerweile als Prototyp in der Augenklinik des Universitätsspitals Bern (Inselspital) im Einsatz, um dort bei täglicher Anwendung die Funktionsweise unter Beweis zu stellen und eine große Anzahl an Messdaten zu sammeln. Auf Basis dieser Messdaten sollen fundierte medizinische Aussagen getroffen und die verlässliche Anwendbarkeit verifiziert werden. Täglich werden durch Fotografen bis zu zehn Patienten untersucht, wodurch bereits eine erhebliche Anzahl an Daten erfasst wurde.



Abbildung 90: FLIO-Arbeitsplatz in der Augenklinik des Universitätsspitals Bern

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.1 Klinische Messergebnisse und Auswertungen

Alle Messdaten werden unter Leitung von Klinikdirektor und Chefarzt Professor Dr. Sebastian Wolf mit Hilfe des FLIO-Aufnahmemoduls erzeugt und in HEYEX sowie dem FLIO-Viewer verwaltet. Die Datenauswertung erfolgt durch die Auswertungssoftware SPCImage in der beschriebenen modifizierten Variante (siehe Kapitel 4.12).

Einige Messungen wurden zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt, sodass diese in einem eigens angefertigten Auswertungsbogen verglichen werden können. Die Auswertungsbögen wurden mit Hilfe der Illustrationssoftware Corel Draw X5 der Corel Corporation aus den Daten der FLIO- und SPCImage-Software erstellt, um diese im Rahmen dieser Arbeit und zur Analyse präsentieren zu können. Die verfügbaren Auswertungsbögen finden sich im Anhang sowie auf der beiliegenden CD-Rom im PDF-Format.

Aus Datenschutzgründen wurden die Patientendaten anonymisiert.

Jeder Auswertungsbogen besteht aus einer oder mehreren Din-A4-Seiten, wobei die erste Seite jedes Bogens dieselben Informationen enthält. Diese Informationen bestehen aus dem Infrarot-Reflektionsbild der Netzhaut sowie den Intensitätsbildern des langwelligigen und kurzwelligen Kanals, welche durch das FLIO-Aufnahmemodul während der Messung erstellt wurden. Ferner wurde aus den Messinformationen der

beiden Kanäle für jeden Bildpixel die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m errechnet und diese in Form einer Fluoreszenzlebensdauerkarte visualisiert. Dabei entspricht τ_m dem arithmetischen Mittel (Mean), das aus den Fluoreszenzlebensdauern τ_1 bis τ_3 hergeleitet wird.

Bei besonders interessanten Messergebnissen und Diagnosen sind weitere Details auf den Folgeseiten in die Bögen eingearbeitet, darunter auch Einzelbetrachtungen der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 .

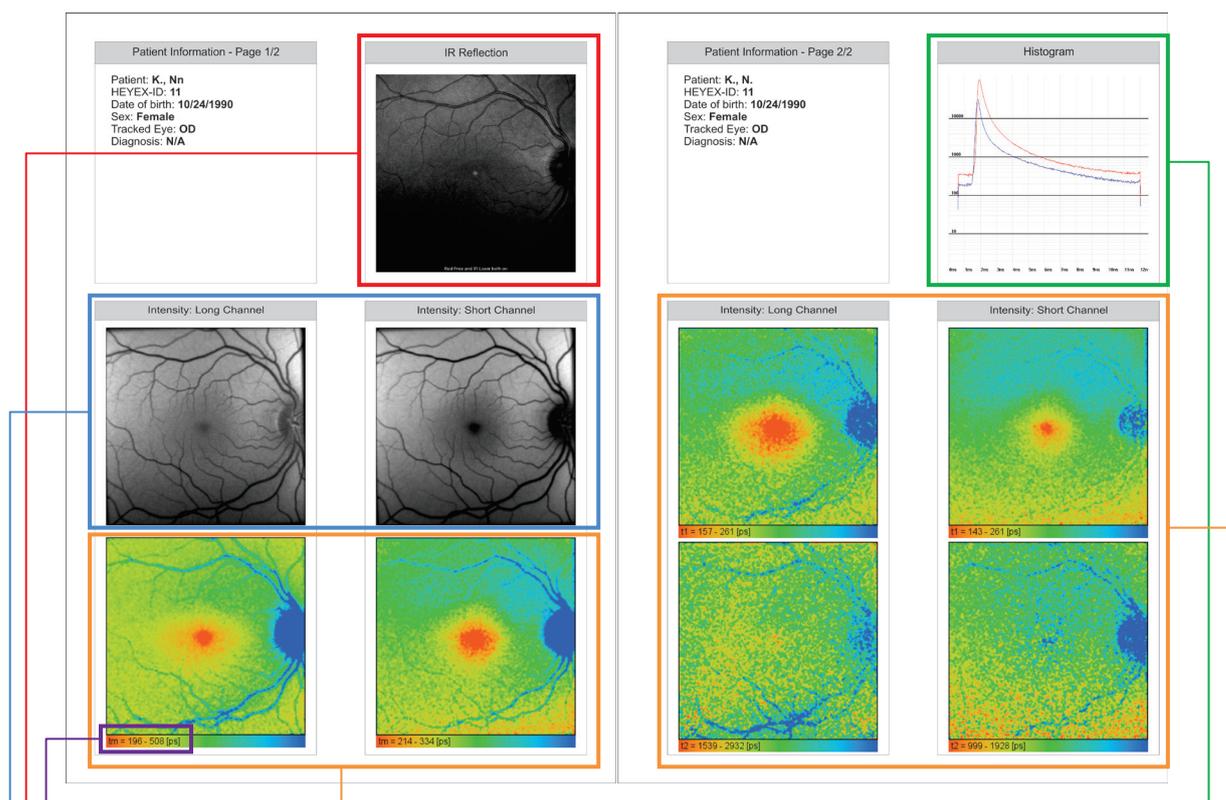


Abbildung 91: Zweiseitiger Auswertungsbogen einer FLIO-Untersuchung

Quelle: Illustration des Autors, Messdaten der Universitätsklinik für Augenheilkunde Bern.

Auf diesem Bogen sind einige der wichtigsten Resultate einer Messung dargestellt.

Neben dem Infrarot-Reflektionsbild , den Intensitätsbildern und dem Histogramm finden sich nach verschiedenen Kriterien errechnete Fluoreszenzlebensdauerkarten .

Wichtig bei der Betrachtung der Bögen ist, dass in SPCImage durch einen automatisierten Mechanismus ein möglichst guter Kontrast in den Bildern dadurch erreicht wird, dass die farbliche Kodierung der Fluoreszenzlebensdauern variabel ist. Die verwendeten Ober- und Untergrenzen in Pikosekunden sind in den Bildern daher eingetragen.

Durch dieses Verfahren kann dieselbe Farbe bei verschiedenen Patientenaufnahmen eine andere Fluoreszenzlebensdauer bedeuten. Diese Automatisierung lässt sich abschalten, sodass die oberen und unteren Grenzen fest eingetragen werden können. Entfallen sehr viele Photonen der Aufnahme auf einen sehr ähnlichen Messdauerbereich kann es hierdurch passieren, dass die minimalen zeitlichen Unterschiede aufgrund des geringeren Kontrastes nur noch schwer zu unterscheiden sind. Die

Aufnahmen sind daher sehr exakt zu betrachten, um deren Informationsgehalt nicht falsch zu interpretieren.

Im Folgenden werden exemplarisch einige interessante Auswertungsbögen begutachtet. Eine medizinisch gesicherte Diagnose liegt dabei nicht vor. Es handelt sich um die Berechnungen und Interpretationen des Autors.

Zum anschaulichen Vergleich werden zunächst die Auswertungsbögen des rechten und linken Auges zweier Augengesunder präsentiert, deren Augengesundheit durch Ärzte festgestellt und bestätigt wurde. Im Anschluss daran folgen Auswertungsbögen mit Anomalien, die in Kapitel 2.3 medizinisch erklärt werden. Anhand der Grundlagen von Augengesunden in Kapitel 5.3.2 und Patienten in Kapitel 5.3.3 lassen sich die im Anhang A angefügten Auswertungsbögen analysieren und vergleichen.

In den Auswertungsbögen der Patienten mit einer Erkrankung (Kapitel 5.3.3) sind die jeweiligen Erkrankungen zur besseren Orientierung eingezeichnet. Besonders interessante Fälle werden differenzierter betrachtet und vorgestellt.

Die Betrachtung von τ_m an beispielsweise Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (z. B. Kapitel 5.3.3.1) zeigt erhöhte Fluoreszenzlebensdauern an, was mit den Ergebnissen und der Schlussfolgerung der Studie in Kapitel 4.1 weitgehend übereinstimmt. Durch die Leistungsoptimierung und das erheblich schnellere Messverfahren (siehe Details in Kapitel 6), die durch das FLIO-Aufnahmemodul und Hardwareoptimierungen erreicht wurden, können in einer vergleichsweise kurzen Messzeit wesentlich umfangreichere Messinformationen gesammelt und hierdurch noch aussagekräftigere Messdaten gewonnen werden. Je mehr Photonen und Intensitäten sowie deren Abklingzeiten gemessen werden können, desto besser wird die Statistik der TCSPC-Histogramme, aus welchen die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern errechnet werden. Da es vielen Patienten nicht möglich ist, über einen Zeitraum von mehreren Minuten in ein helles Laserlicht zu blicken, bietet das für Patienten schonendere Verfahren zudem die Möglichkeit, eine deutlich größere Anzahl an Patienten zu messen.

Es werden Augengesunde und Patienten mit auffälligen Anomalien verglichen. Diese Anomalien sind bereits im Fundusbild eindeutig erkennbar und bedürfen prinzipiell keiner Fluoreszenzlebensdauerermessung. Anhand von medizinisch gesichert diagnostizierten Erkrankungen wird versucht, eindeutige Muster in den Fluoreszenzlebens-

dauerkarten zu erkennen und über die Fluoreszenzlebensdauern einzelne Stoffe zu separieren. Mithilfe einer solchen differenzierten Betrachtung und der Identifizierung von ungewöhnlichen Stoffwechselkonzentrationen könnte es gelingen, Krankheiten frühzeitig zu erkennen und eine Behandlung einzuleiten, noch bevor ein Patient unter einer irreversiblen Erkrankung leidet.

Es liegen bereits Aufnahmen vor, die Anomalien in den Fluoreszenzlebensdauerkarten erkennen lassen, welche in den IR-Reflektions- und Fluoreszenzintensitätsbildern nicht sichtbar sind. Es liegen noch keine medizinisch gesicherten Erkenntnisse und Diagnosen vor, die diese Anomalien erklären oder eine Frühdiagnose einer Erkrankung ermöglichen. Es gilt, diese Patienten und den Verlauf der Stoffwechseländerungen zu begleiten und daraus weitere Erkenntnisse abzuleiten. Die Auffälligkeiten rechtfertigen es, auch augenscheinlich Gesunde routinemäßig mit dem FLIO-Gerät zu untersuchen. Einige dieser Fälle werden in Kapitel 5.3.4 näher erläutert.

Erkrankungen, die bisher mithilfe von Fluoreszenzintensitätsbildern diagnostiziert wurden (geographische Atrophie, siehe Kapitel 2.3), lassen sich durch die Fluoreszenzlebensdauerinformationen noch genauer untersuchen und unter Umständen besser behandeln.

5.3.2 Auswertungsbögen von Augengesunden

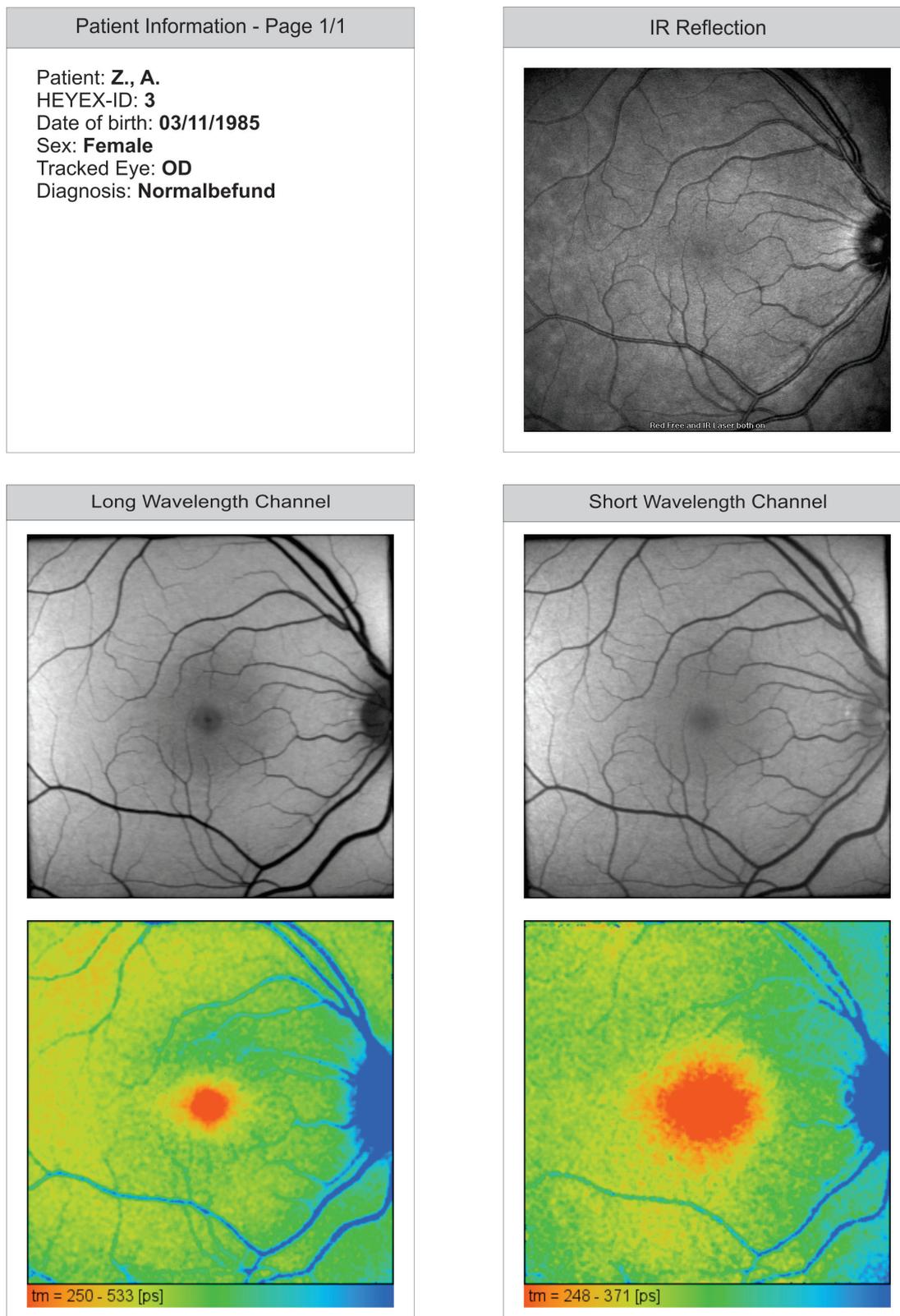


Abbildung 92: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) der Augengesunden Z., A.

Quelle: Illustration des Autors.

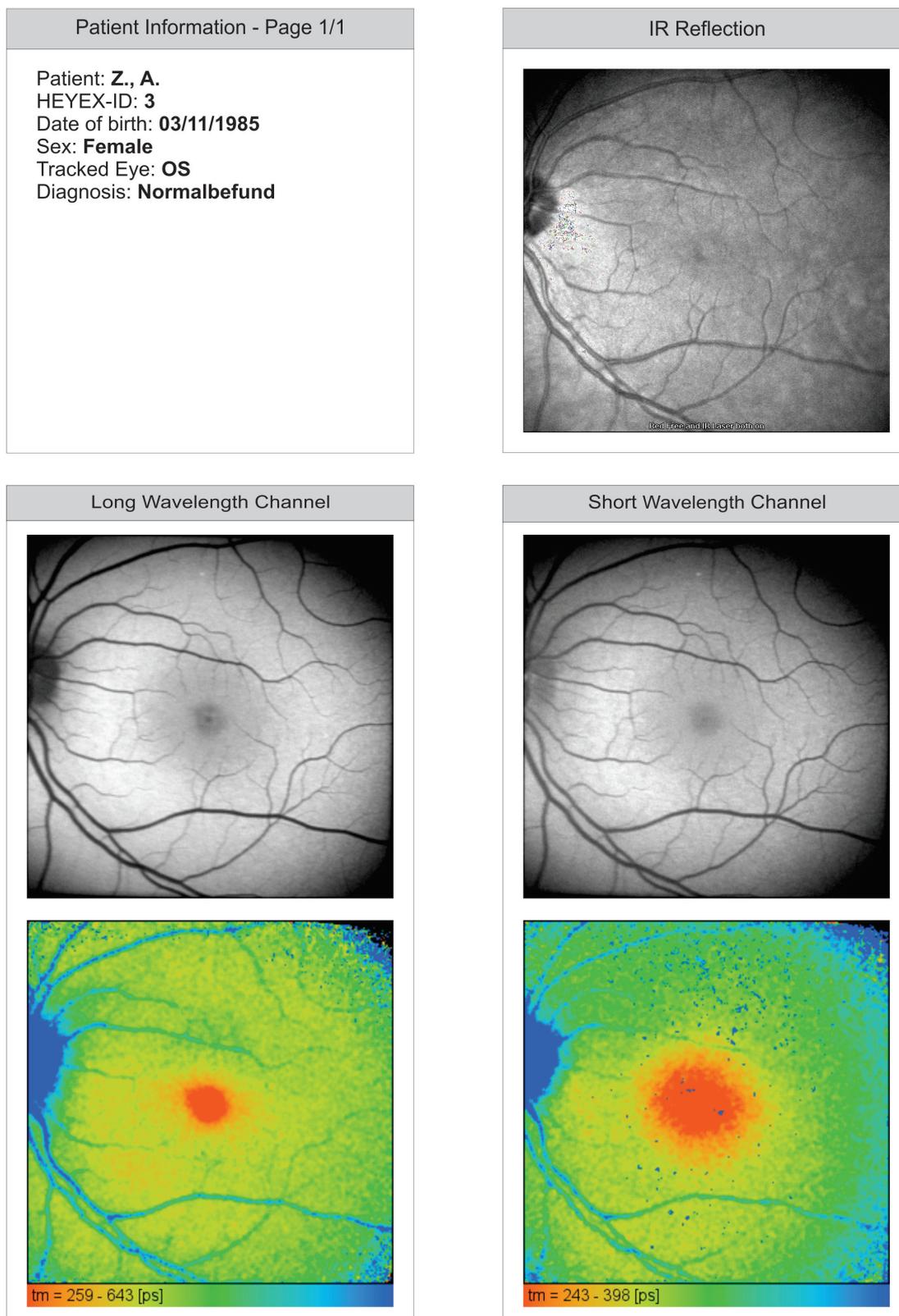


Abbildung 93: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) der Augengesunden Z., A.
Quelle: Illustration des Autors.

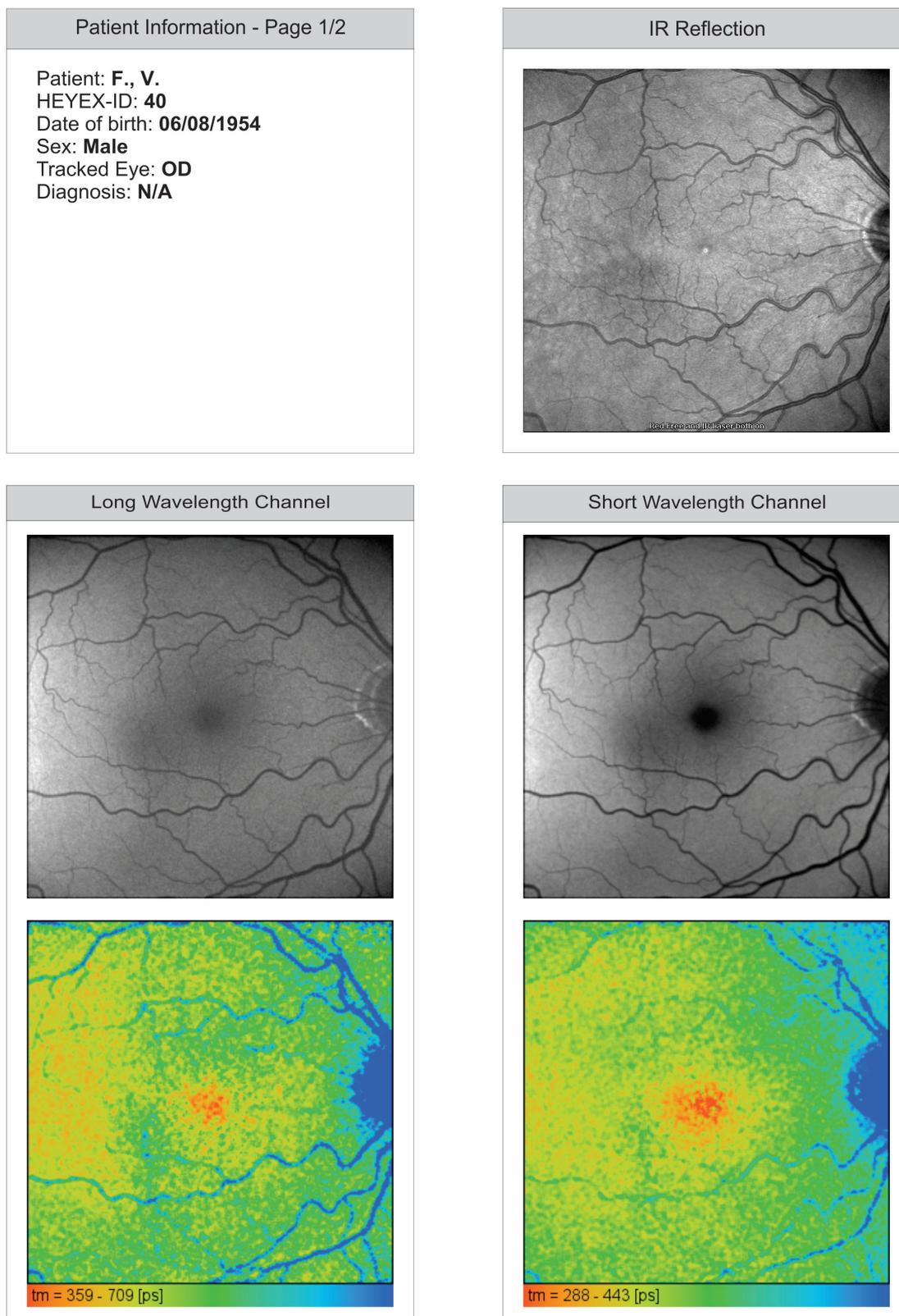


Abbildung 94: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Augengesunden F., V.

Quelle: Illustration des Autors.

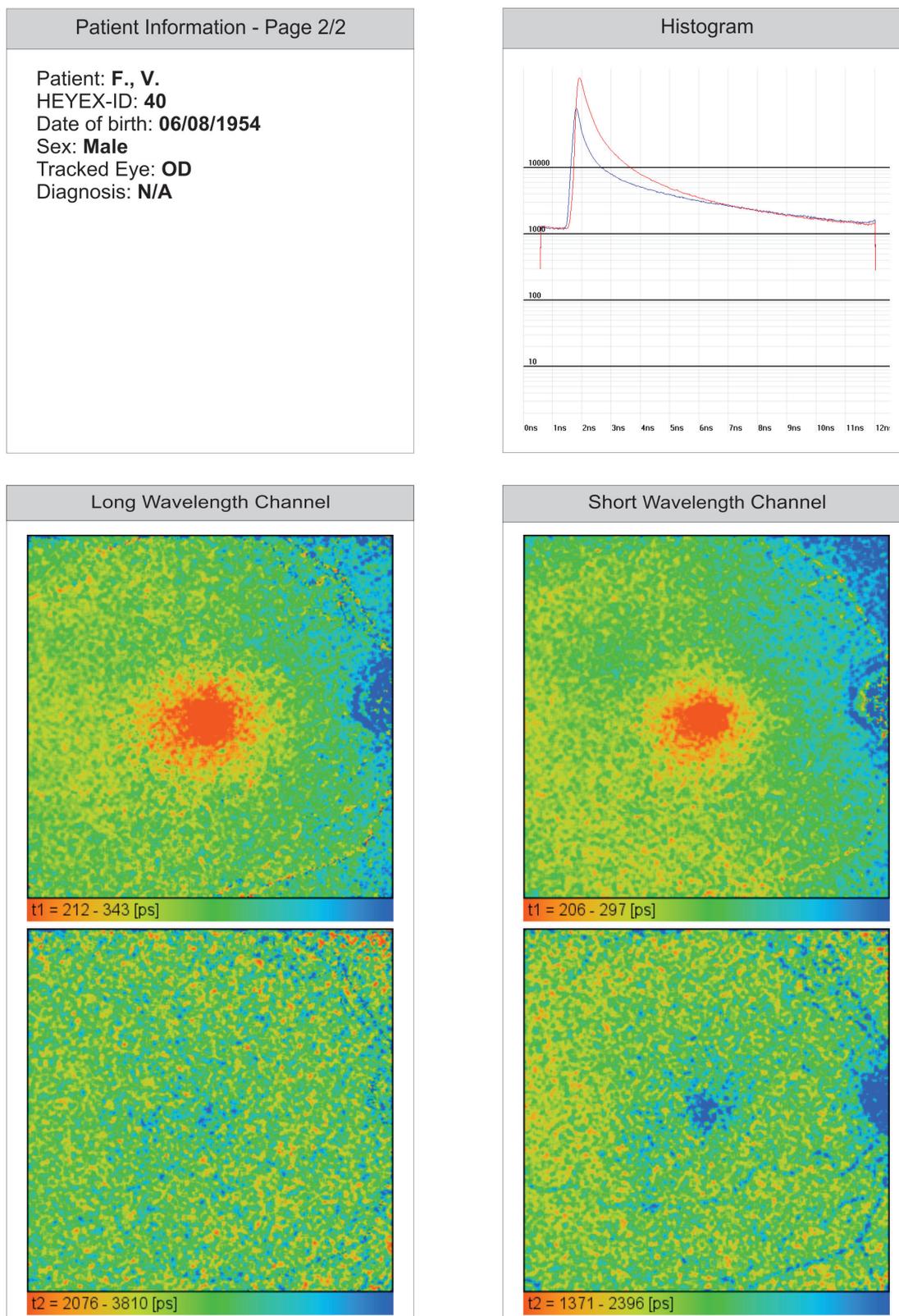


Abbildung 95: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD) des Augengesunden F., V.

Quelle: Illustration des Autors.

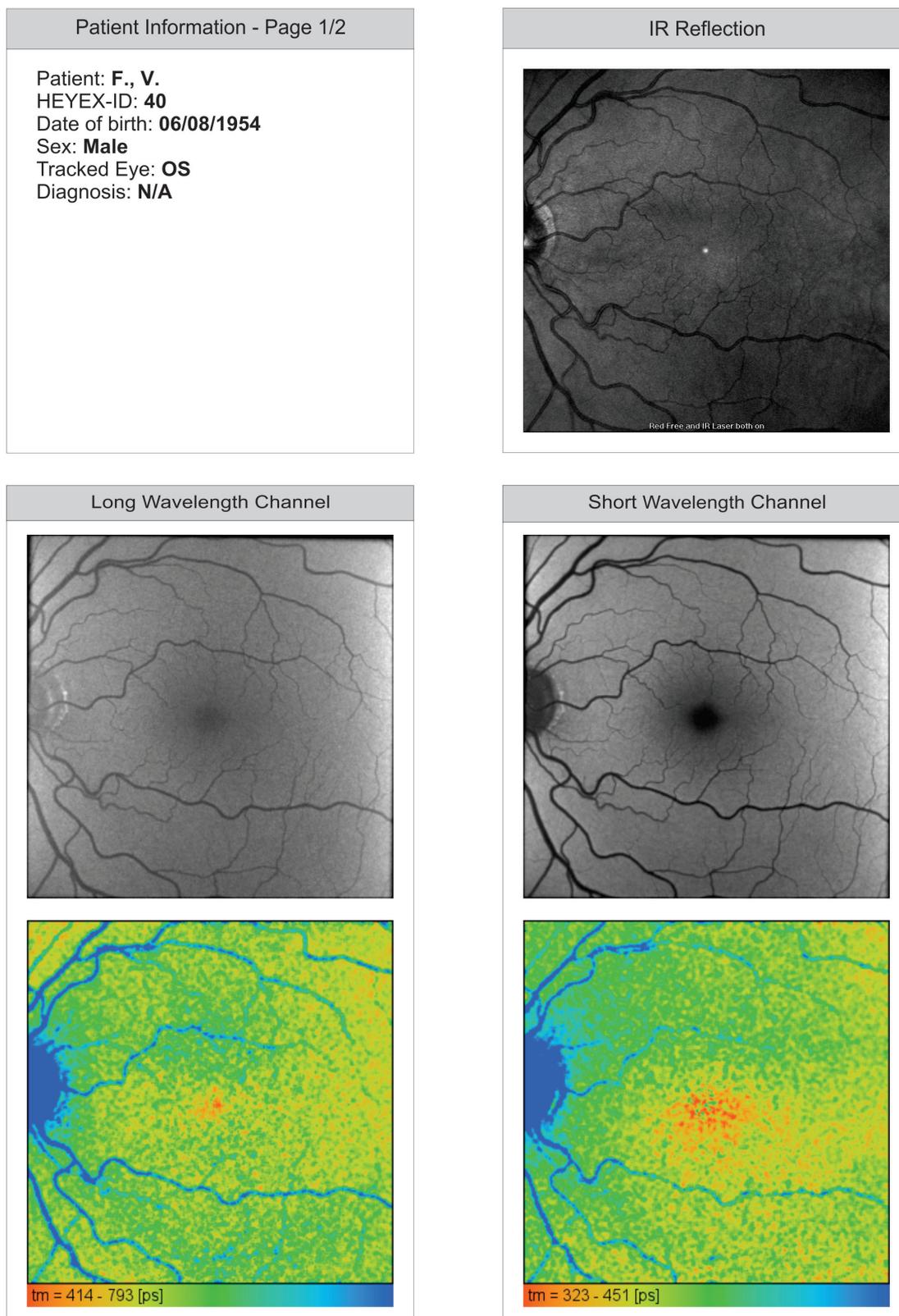


Abbildung 96: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) des Augengesunden F., V.

Quelle: Illustration des Autors.

Patient Information - Page 2/2

Patient: **F., V.**
 HEYEX-ID: **40**
 Date of birth: **06/08/1954**
 Sex: **Male**
 Tracked Eye: **OS**
 Diagnosis: **N/A**

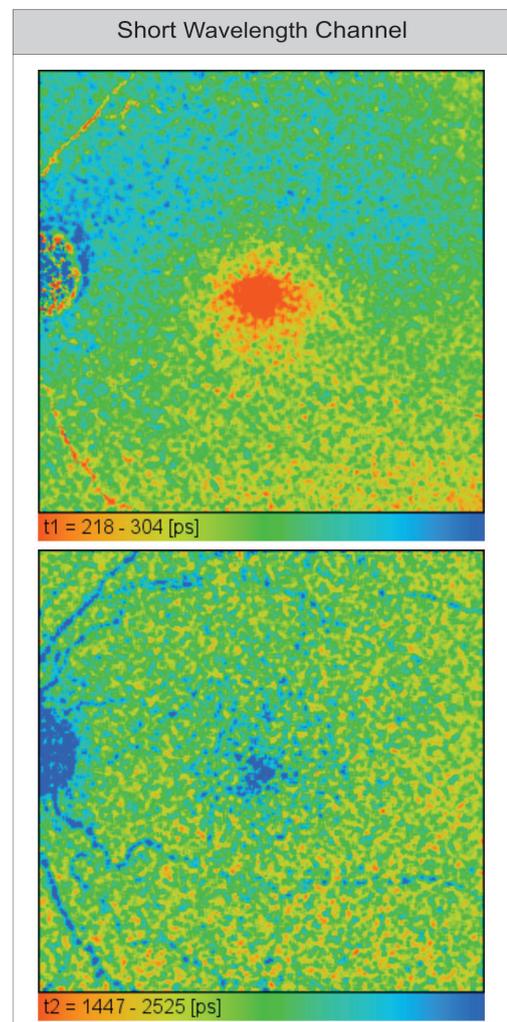
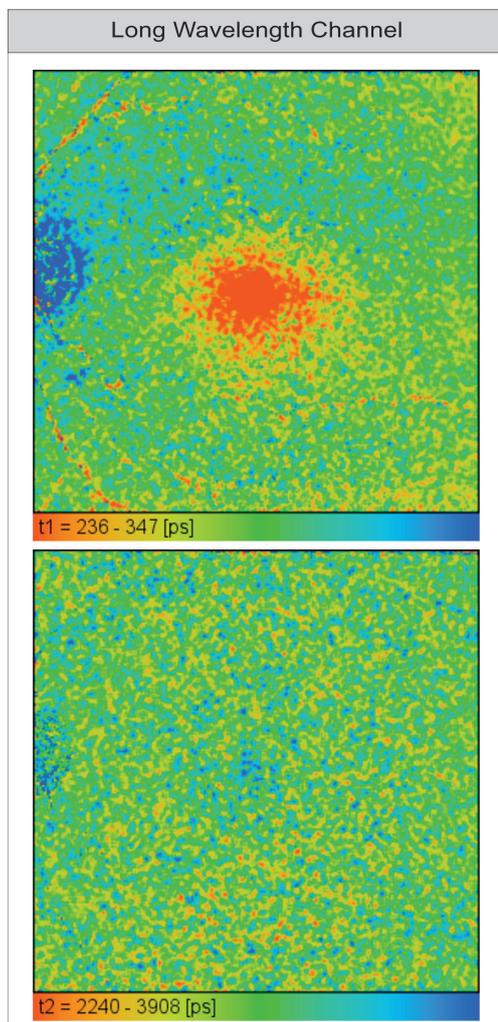
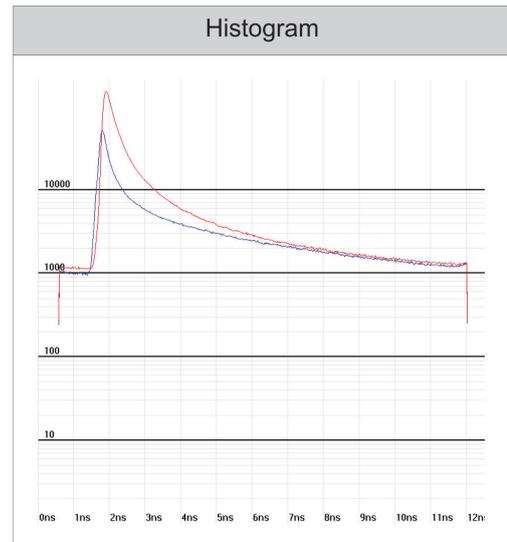


Abbildung 97: Seite 2 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS) des Augengesunden F., V.

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.3 Auswertungsbögen mit Anomalien durch diagnostizierte Erkrankungen

5.3.3.1 Erkrankung: Altersbedingte Makuladegeneration (trocken)

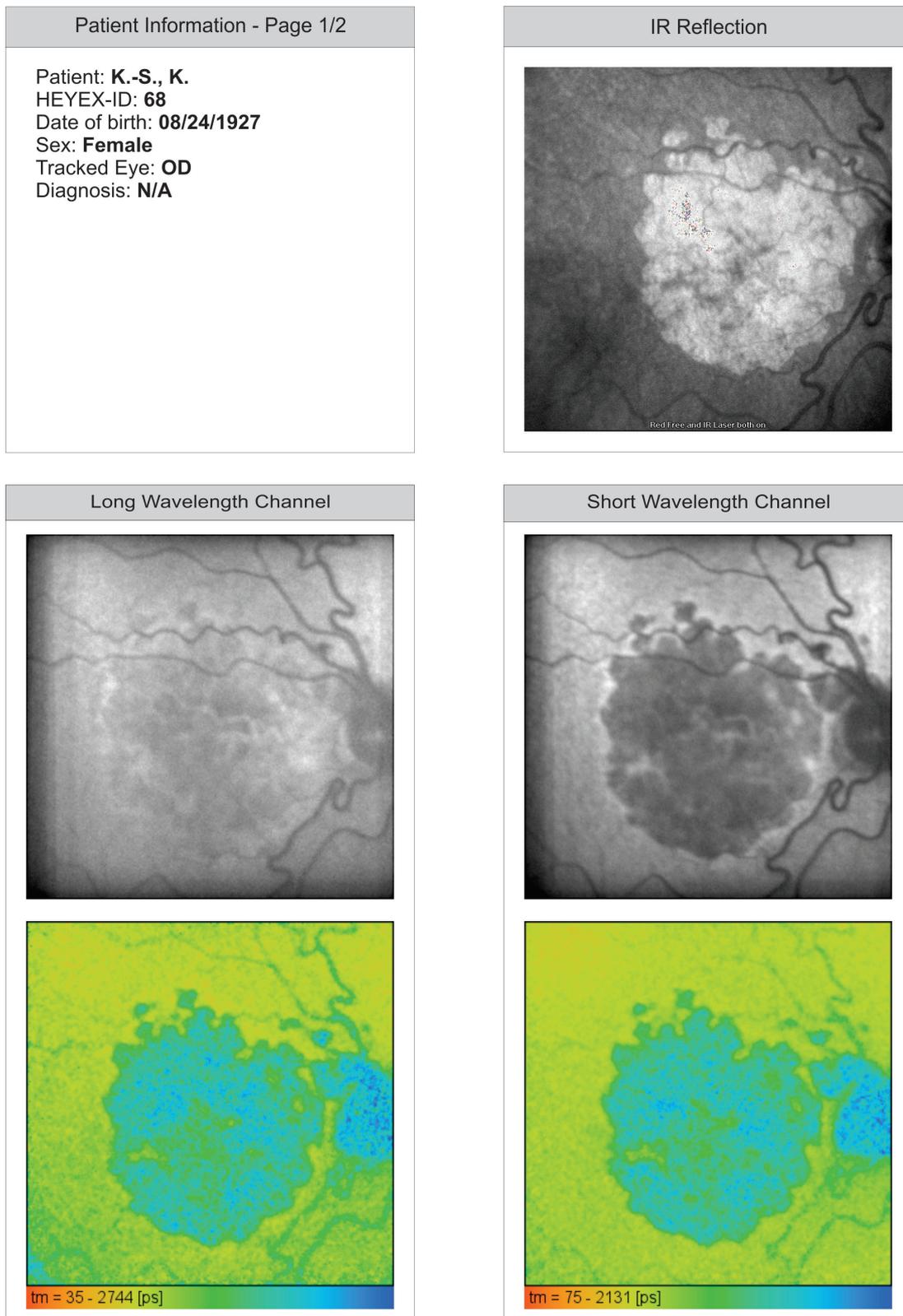


Abbildung 98: Auswertungsbogens des rechten Auges (OD) der Patientin K.-S., K.

Quelle: Illustration des Autors.

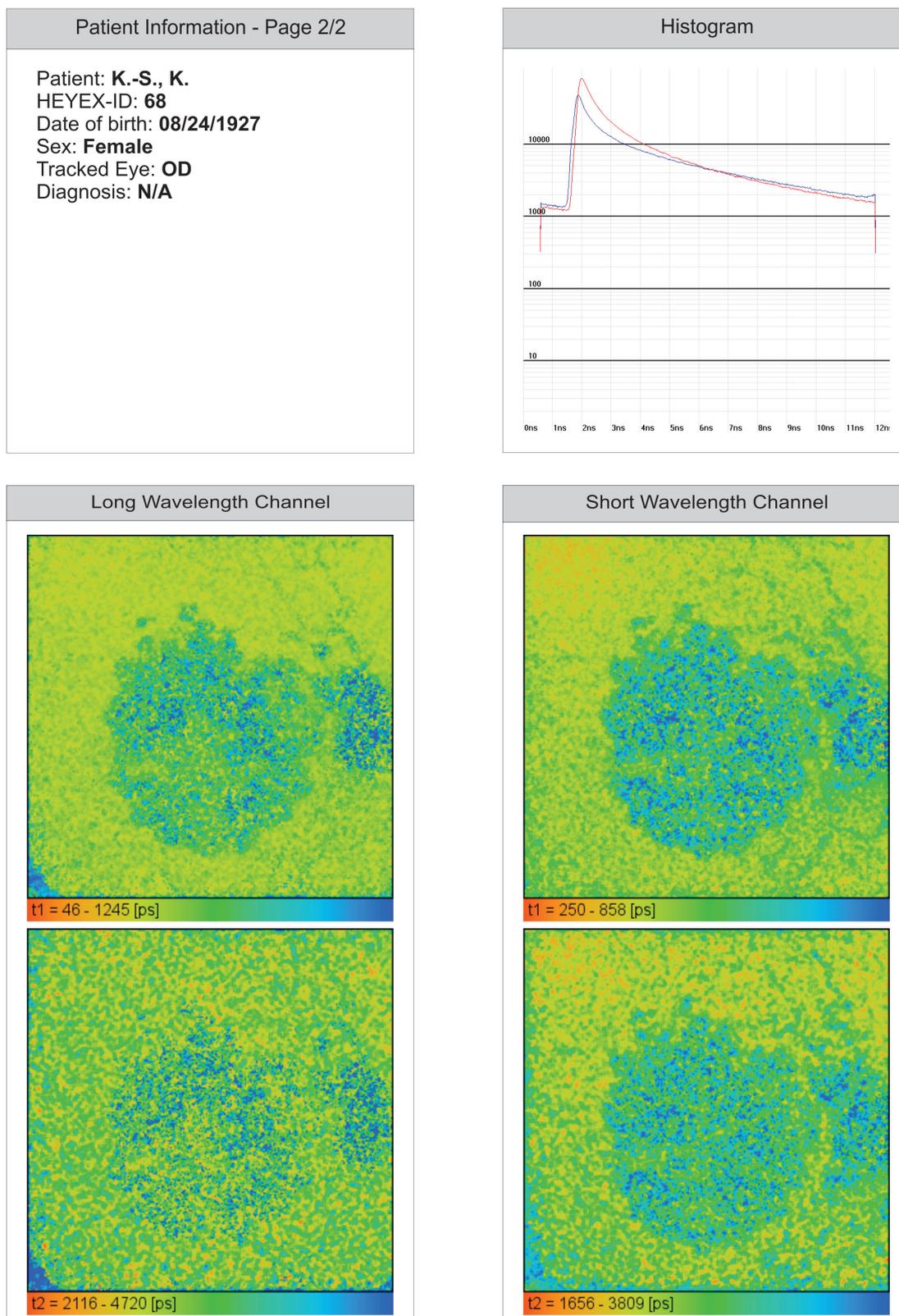


Abbildung 99: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD) der Patientin K.-S., K.

Quelle: Illustration des Autors.

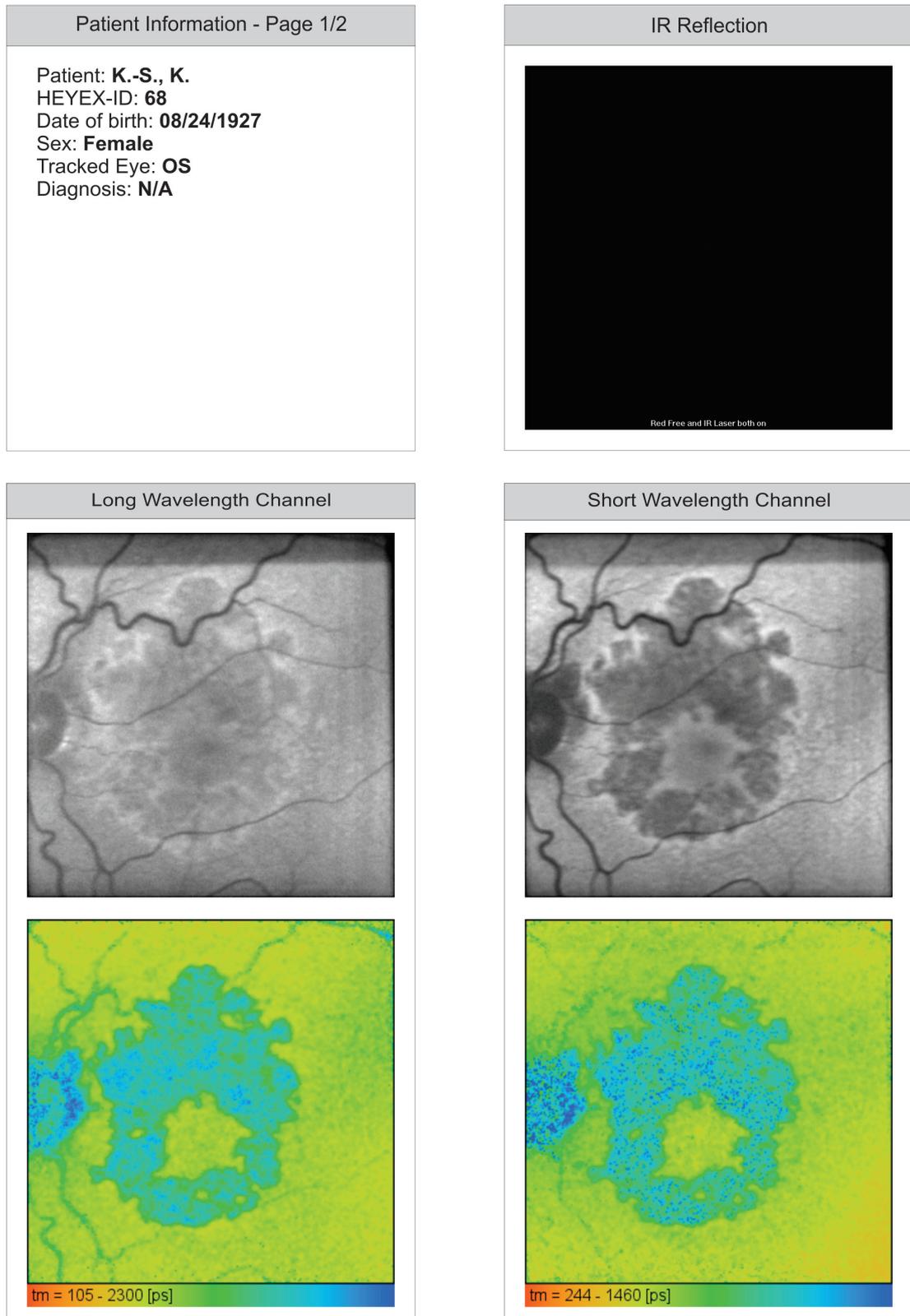


Abbildung 100: Seite 1 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS) der Patientin K.-S., K.

Quelle: Illustration des Autors.

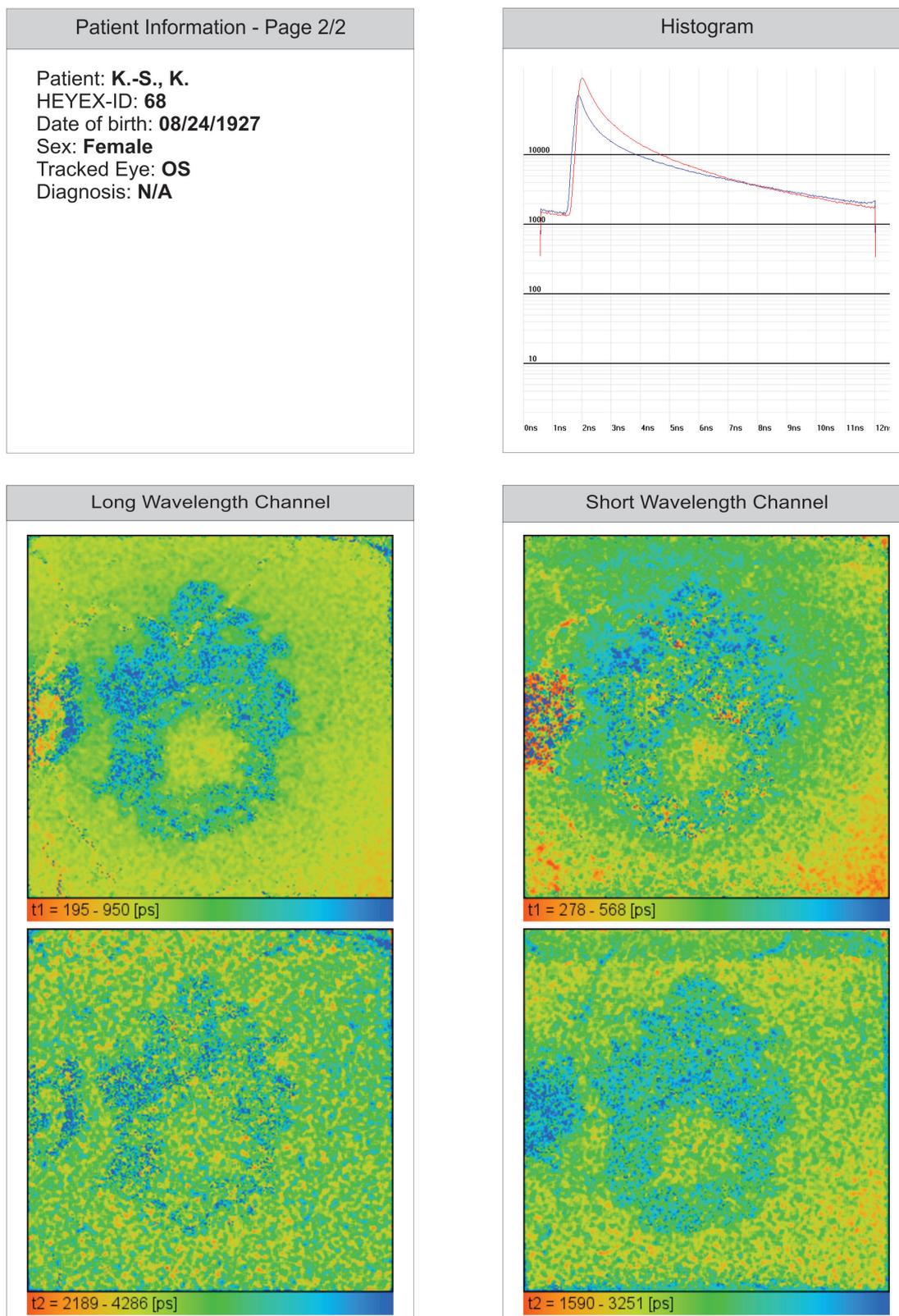


Abbildung 101: Seite 2 des Auswertungsbogens des linken Auges (OS) der Patientin K.-S., K.

Quelle: Illustration des Autors.

Die Patientin leidet an einer schweren altersbedingten Makuladegeneration, die sich in beiden spektralen Kanälen durch deutliche verlängerte Fluoreszenzlebensdauern bemerkbar macht. Die Erkrankung ist in beiden Augen ausgeprägt. □

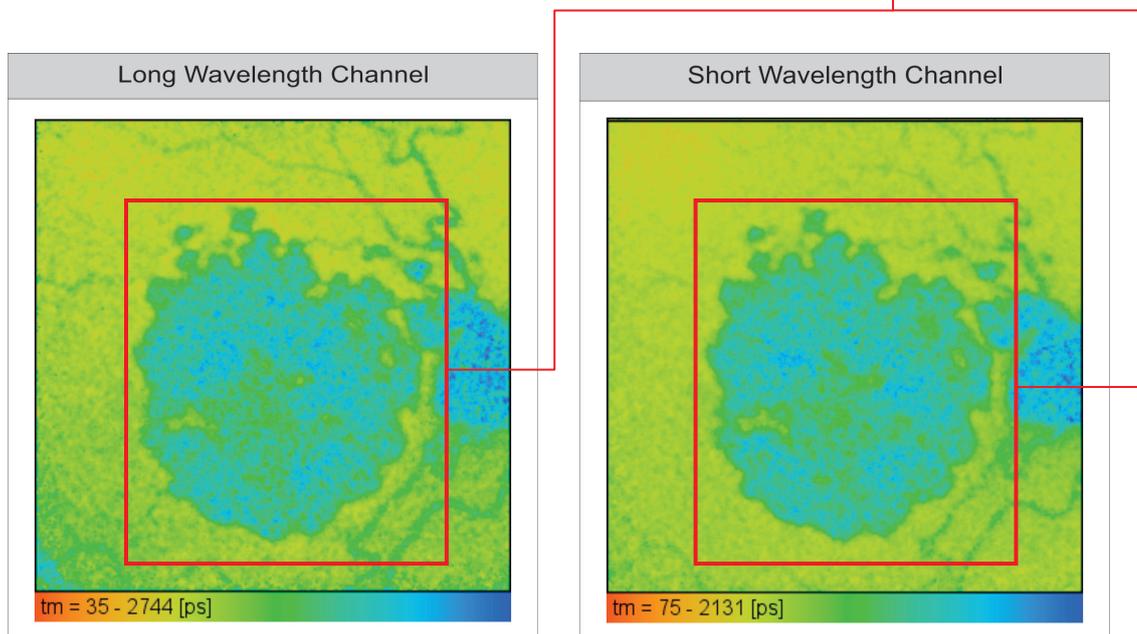


Abbildung 102: τ_m des lang- und kurzwelligigen Kanals des rechten Auges (OD)

Quelle: Illustration des Autors.

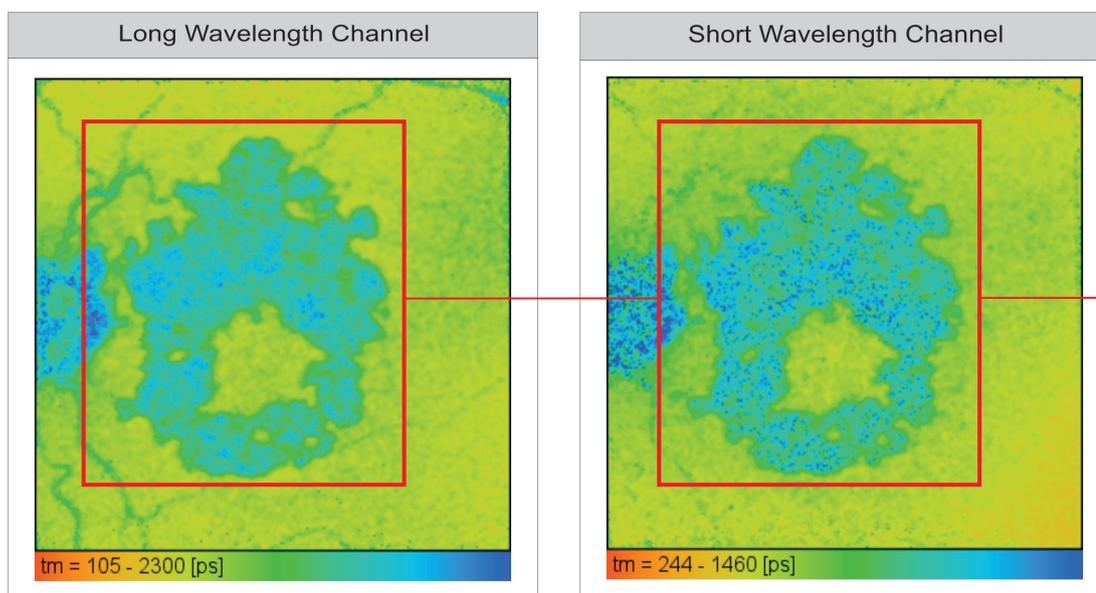


Abbildung 103: τ_m des lang- und kurzwelligigen Kanals des linken Auges (OS)

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.3.2 Erkrankung: Altersbedingte Makuladegeneration (feucht)

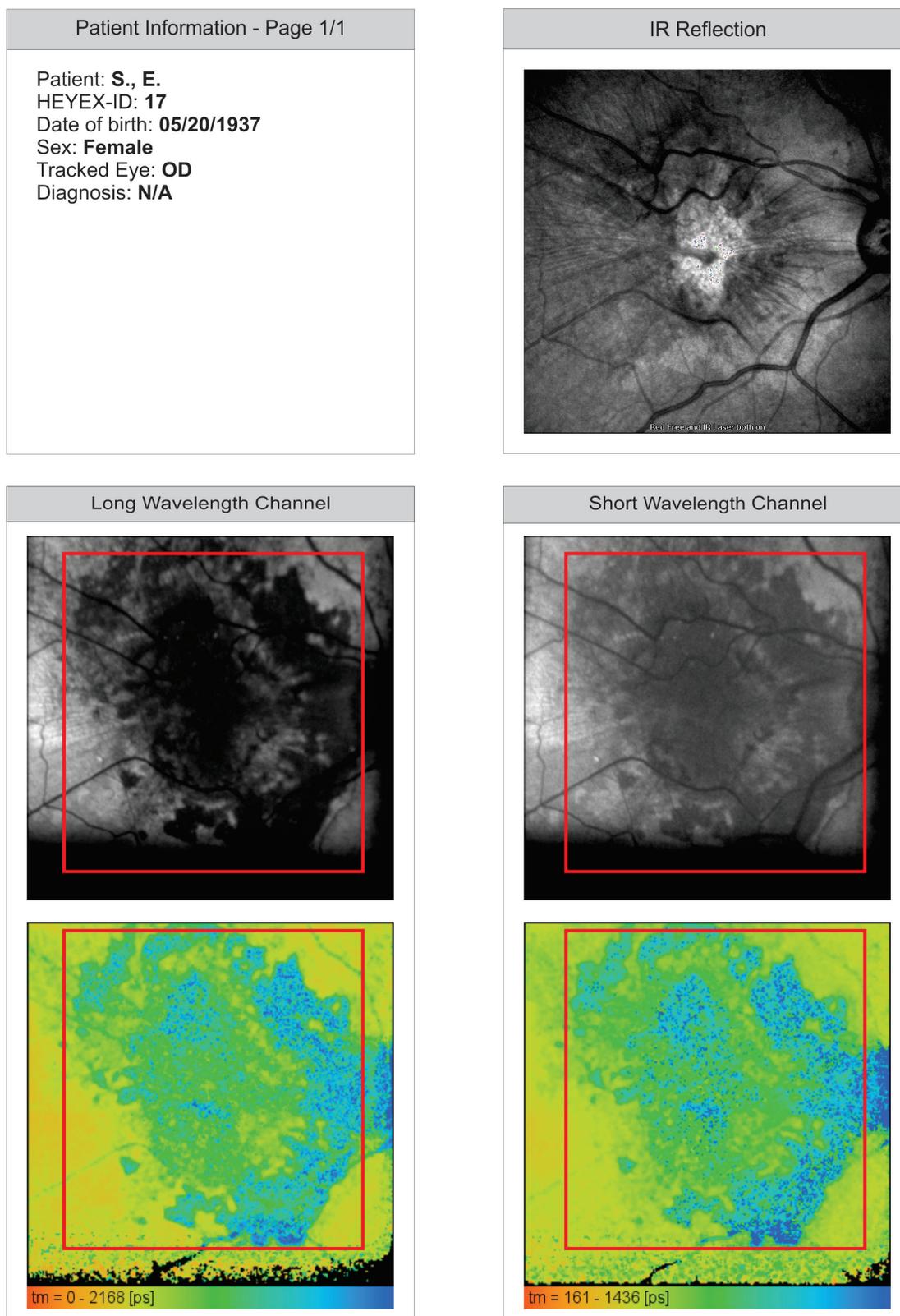


Abbildung 104: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) der Patientin S., E.

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.3.3 Erkrankung: Drusen und Altersbedingte Makulageration (trocken)

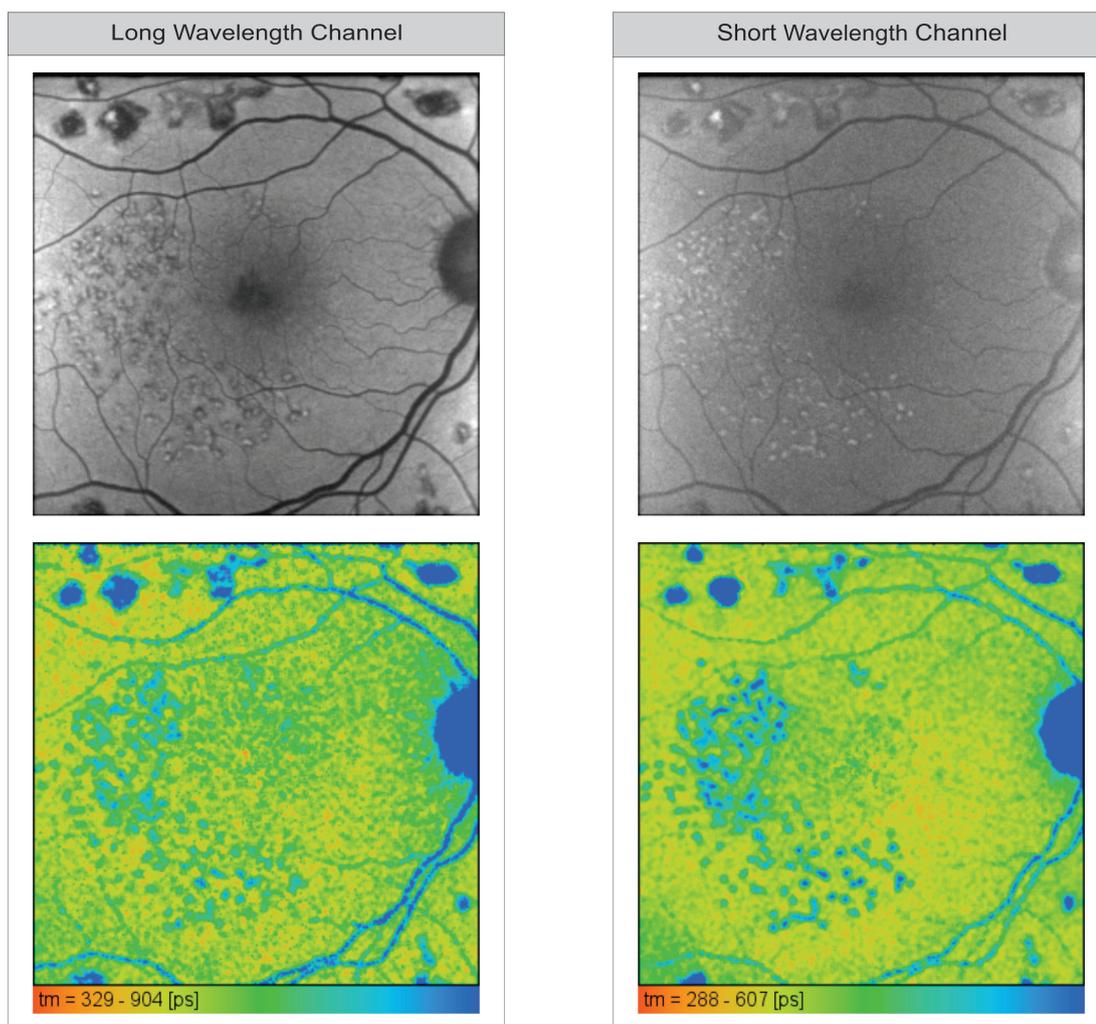
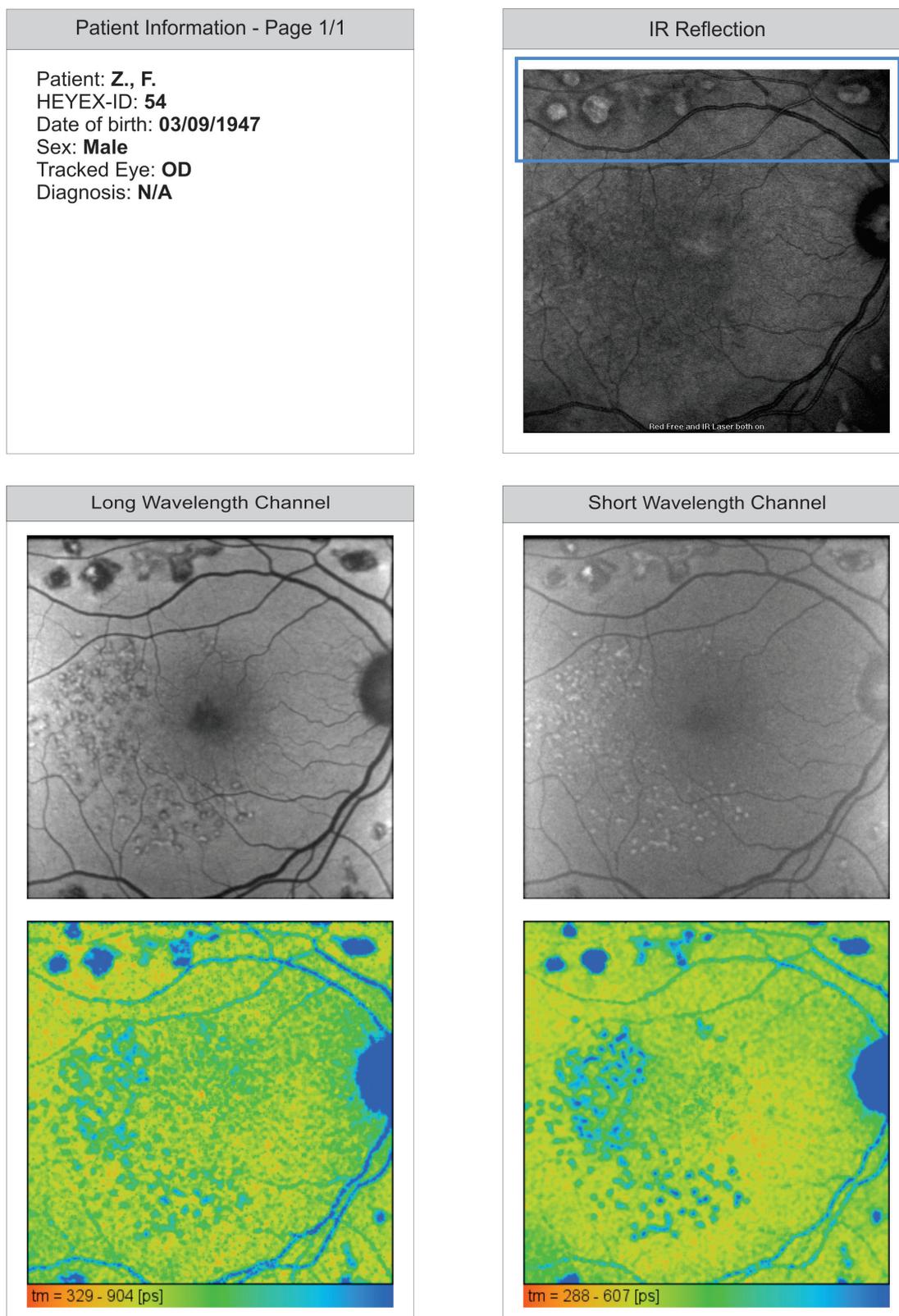


Abbildung 105: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Patienten Z., F.

Quelle: Illustration des Autors.

Das IR-Reflektionsbild in Abbildung 105 lässt eine Diagnose der trockenen altersbedingten Makuladegeneration zu (blauer Rahmen). Erst das Fluoreszenzintensitätsbild sowie die Fluoreszenzlebensdauerbilder offenbaren weitere fleckige Anomalien, die wie in Abbildung 106 eingezeichnet auf Drusen schließen lassen. □

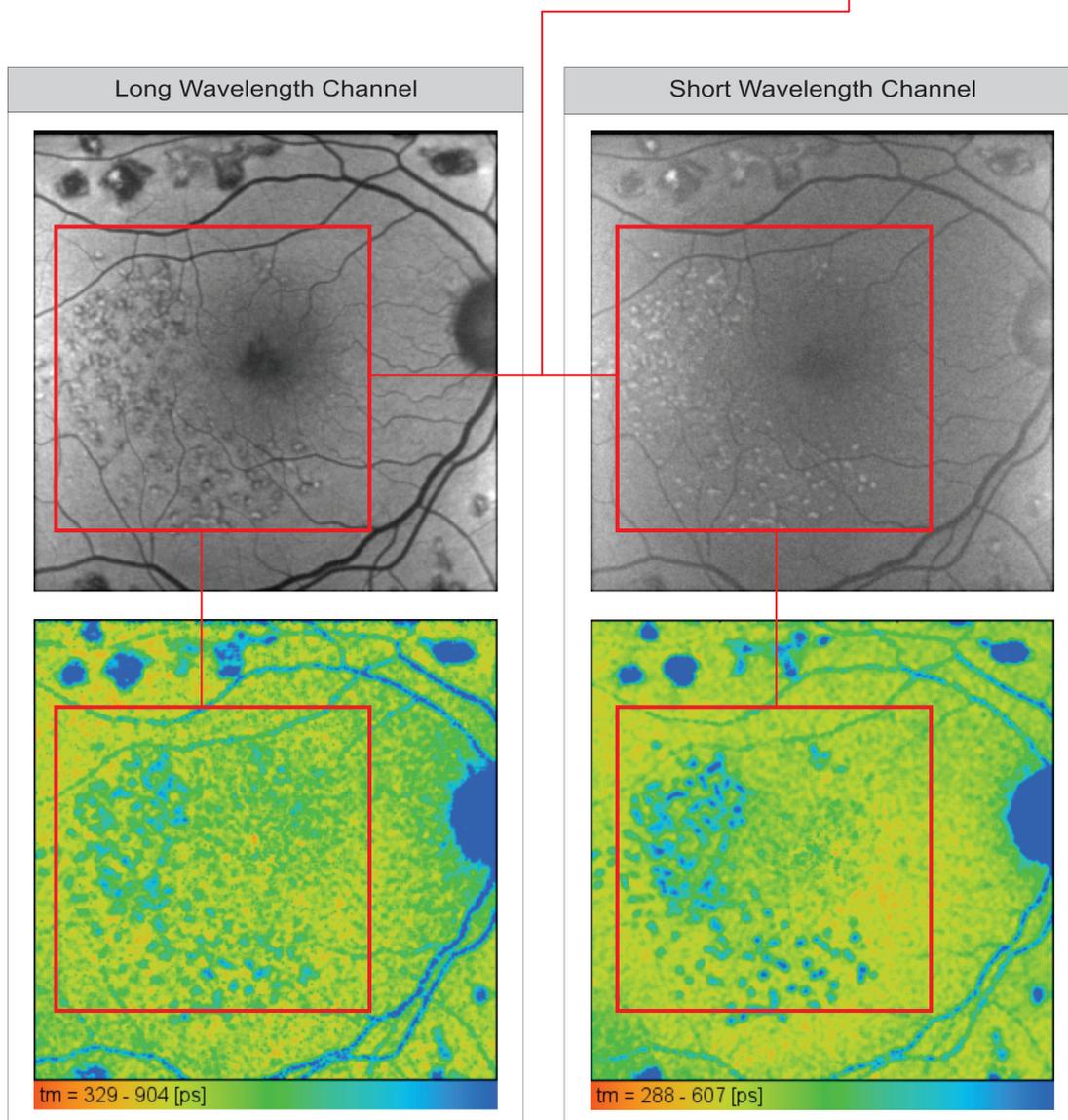


Abbildung 106: Fluoreszenzintensitäts- und Fluoreszenzlebensdauerbilder des Patienten

Quelle: Illustration des Autors.

Die Drusen werden in den Intensitätsbildern durch Muster deutlich, während die Fluoreszenzlebensdauerbilder einen noch differenzierten Blick erlauben. Es sind deutlich erhöhte Fluoreszenzlebensdauern zu erkennen.

5.3.3.4 Erkrankung: Altersbedingte Makulageneneration (trocken)

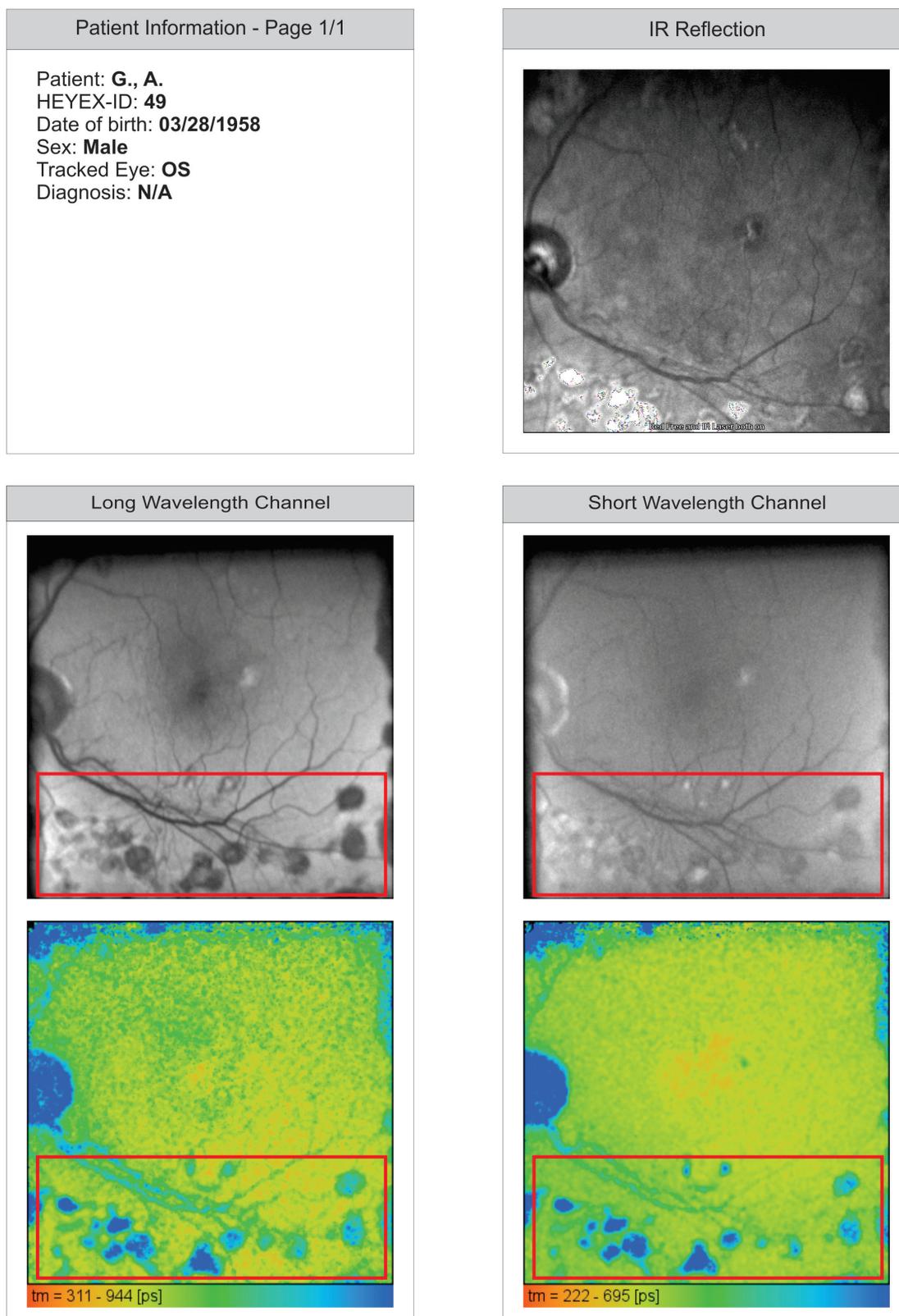


Abbildung 107: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) des Patienten G., A.

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.3.5 Erkrankung: Altersbedingte Makulageneneration (trocken)

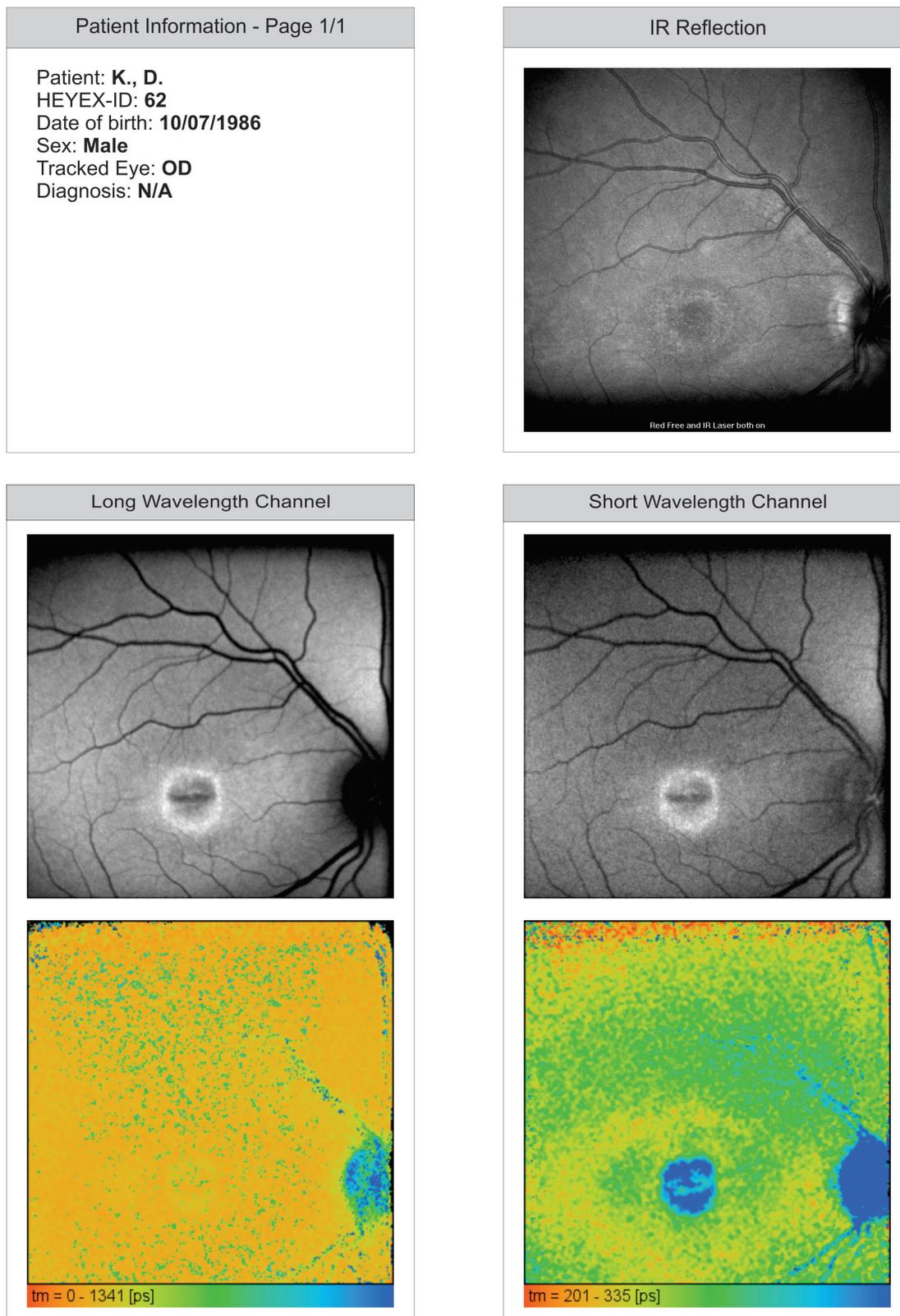


Abbildung 108: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Patienten K., D.

Quelle: Illustration des Autors.

Die Erkrankung ist bei diesem Patienten im IR-Reflektionsbild nur sehr schwach zu erkennen. In beiden Fluoreszenzintensitätsbildern hingegen, sind deutliche Ausprägungen zu lokalisieren.

Das Fluoreszenzlebensdauerbild des kurzwelligen Kanals zeigt in der entsprechenden Region bereits stark erhöhte Fluoreszenzlebensdauern an, obwohl es sich um sehr frühes Stadium der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) handelt.

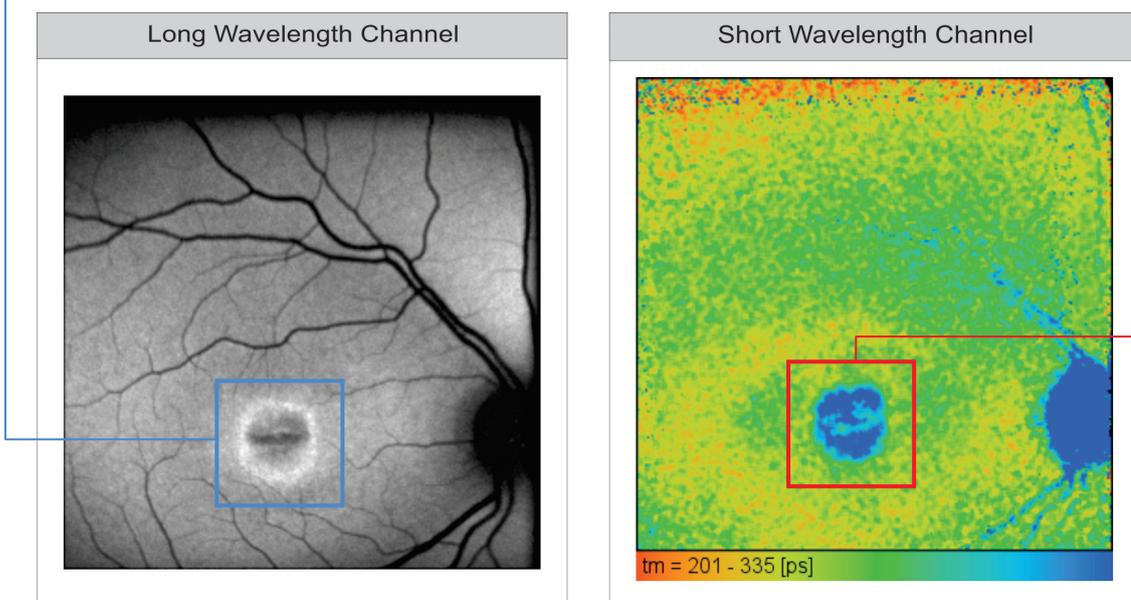


Abbildung 109: Intensitätsbild des langwelligen und τ_m kurzwelligen Kanals

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.4 Auswertungsbögen mit Anomalien in den Fluoreszenzbildern ohne exakte medizinische Diagnose

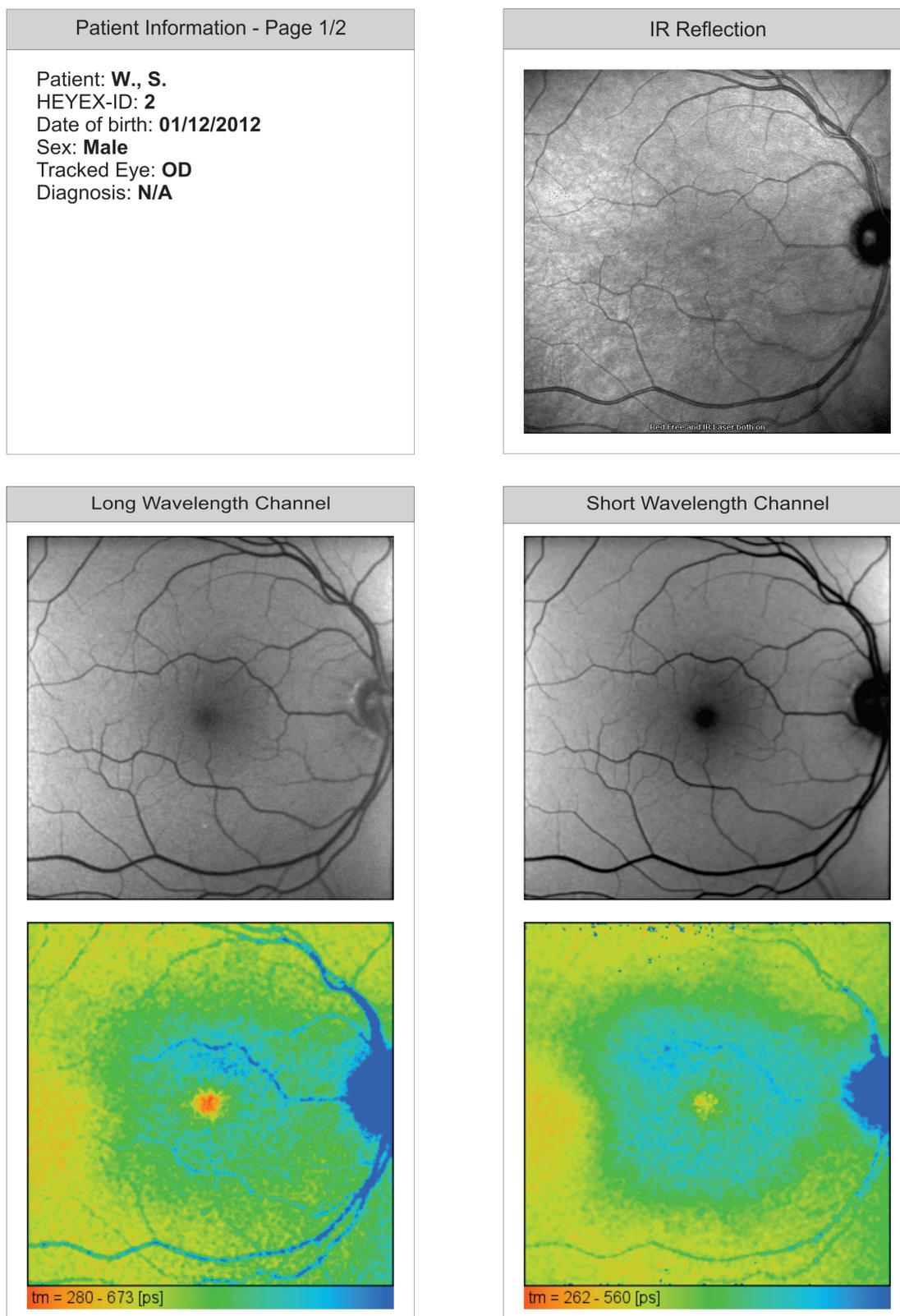


Abbildung 110: Auswertungsbogen des rechten Auges (OD) des Patienten W., S.

Quelle: Illustration des Autors.

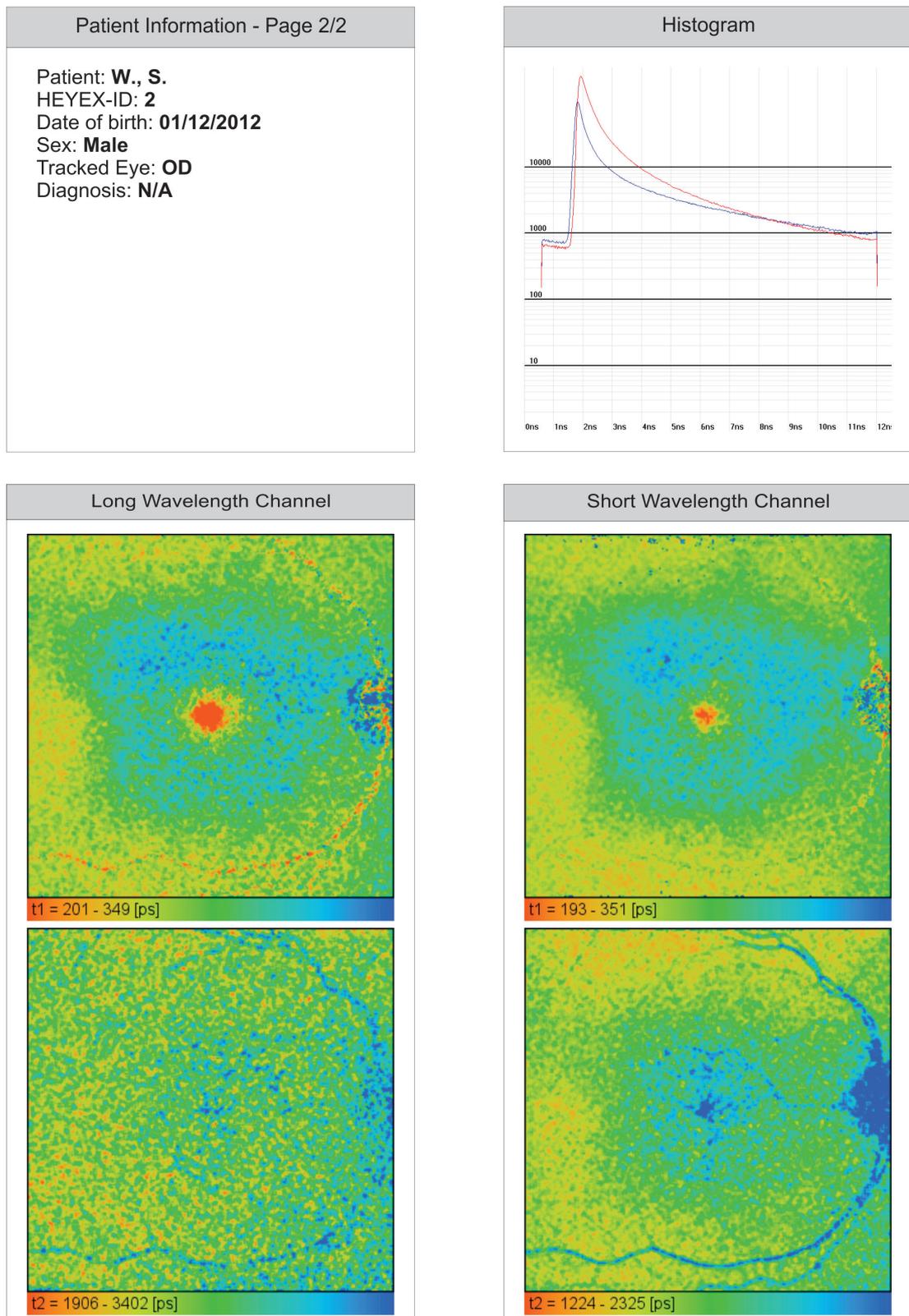


Abbildung 111: Seite 2 des Auswertungsbogens des rechten Auges (OD) des Patienten W., S.

Quelle: Illustration des Autors.

Bei diesem Patienten sind in Abbildung 111 sowohl im IR-Reflektions- bzw. Fundusbild als auch in den Intensitätsbildern des langwelligen und kurzwelligen Kanals keine Anomalien sichtbar, anhand derer eine medizinische Diagnose erstellt werden kann.

Verglichen mit anderen Augengesunden weisen die Fluoreszenzlebensdauerbilder Veränderungen der Makula und deren kreisförmigen Umgebung auf.

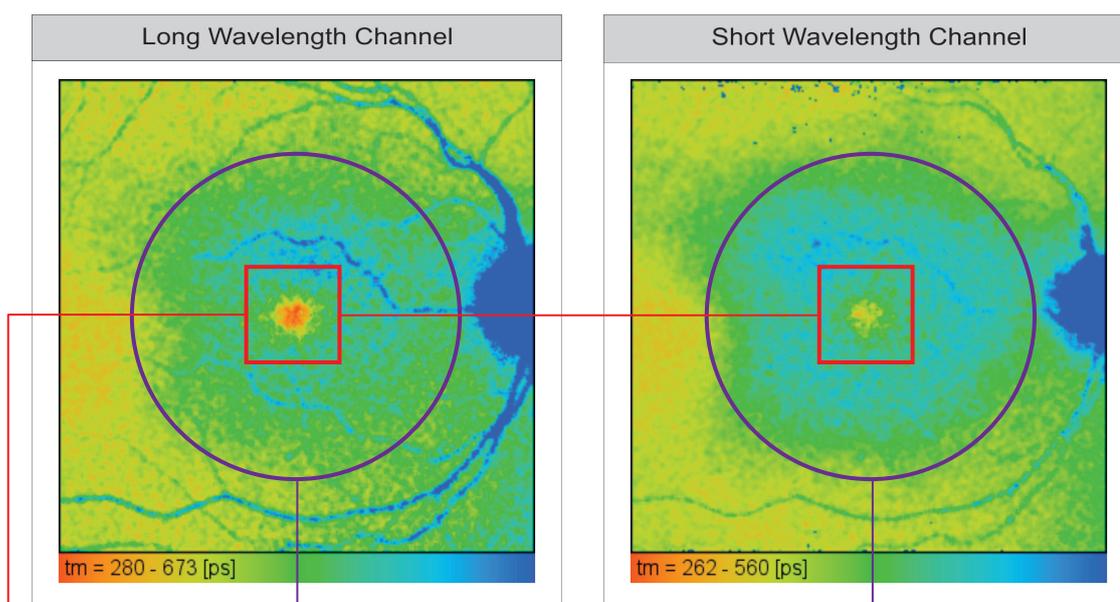


Abbildung 112: τ_m des lang- und kurzwelligen Kanals

Quelle: Illustration des Autors.

In Abbildung 112 ist anhand der Farbgebung in beiden Kanälen detektierbar, dass die Fluoreszenzlebensdauern in der Makula sowie des umliegenden Bereichs in der Retina gegenüber anderer Augengesunder verlängert sind.

Dieses Phänomen tritt bei diesem Patienten in beiden Augen auf (siehe linkes Auge des Patienten in Anhang A).

5.3.4.1 Patientin mit möglicher Erkrankung: Drusen

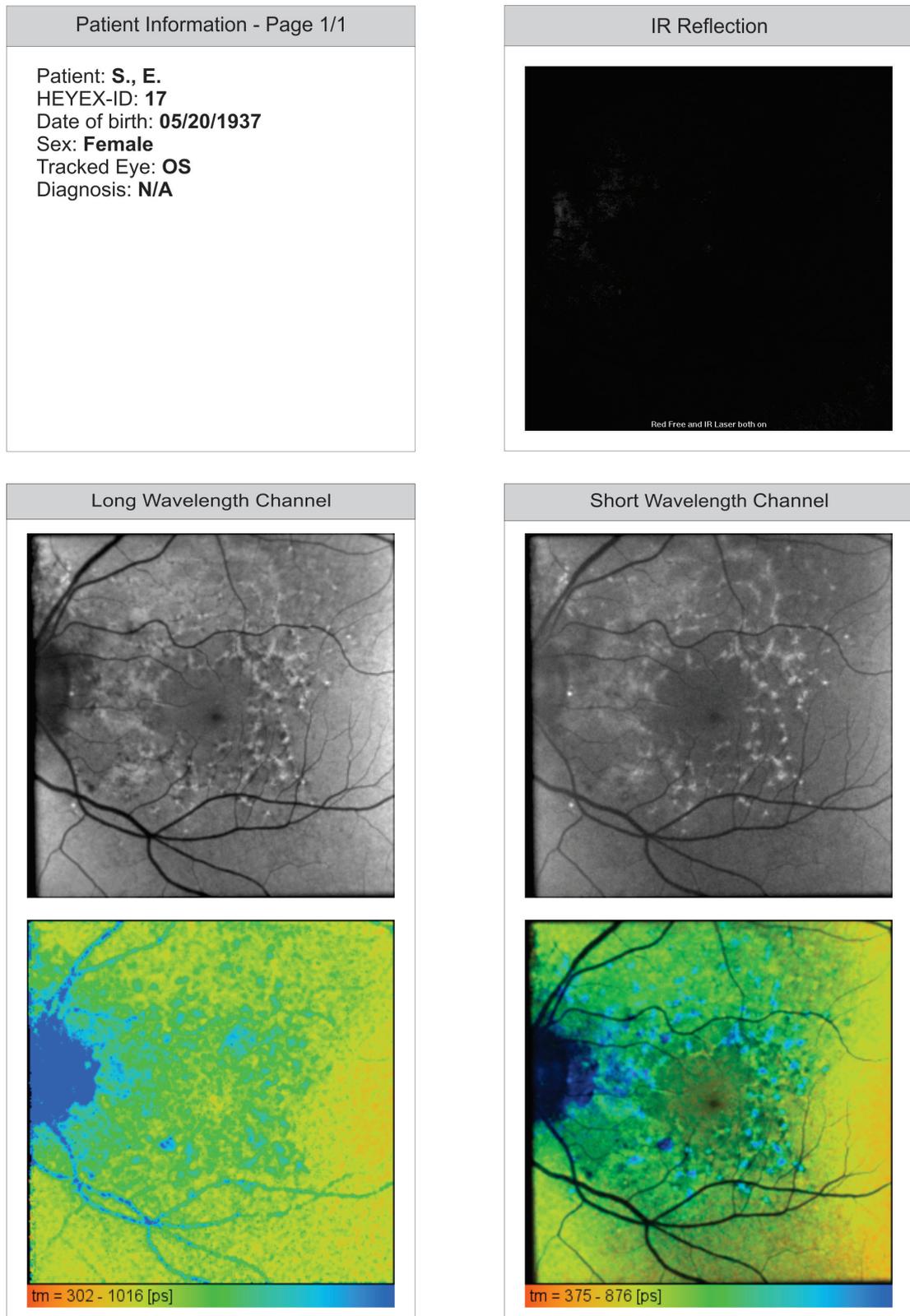


Abbildung 113: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) der Patientin S., E.

Quelle: Illustration des Autors.

Selbst bei einer wie in Abbildung 114 vergrößerten und optimierten Darstellung des IR-Reflektionsbildes lassen sich bei dieser Patientin nur schwer Anomalien erkennen.

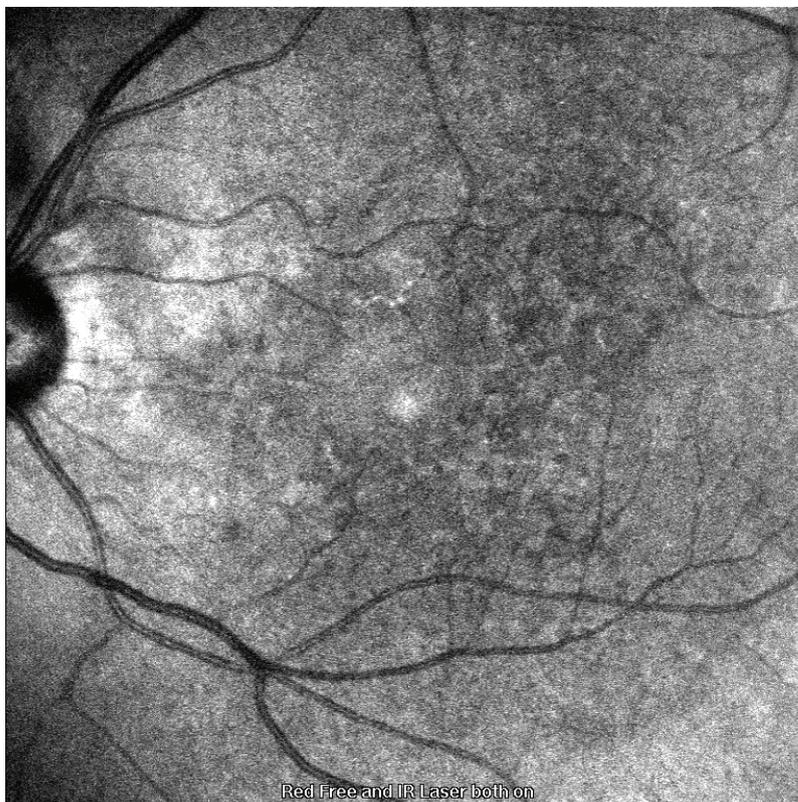


Abbildung 114: IR-Reflektionsbild (Fundusbild) der Patientin S., E.

Quelle: Illustration des Autors.

Eine genauere Betrachtung der Fluoreszenzintensitätsbilder beider Kanäle sowie des Fluoreszenzlebensdauerbildes des kurzwelligen Kanals lassen auf Drusen als Erkrankung schließen, welche in Abbildung 115 markiert sind. □

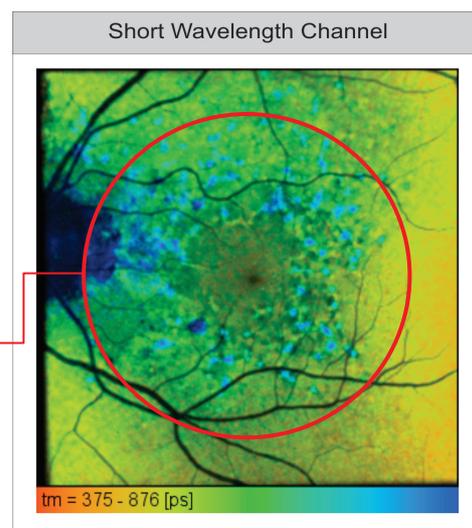


Abbildung 115: τ_m des kurzwelligen Kanals

Quelle: Illustration des Autors.

5.3.4.2 Patient mit möglicher Erkrankung: Drusen

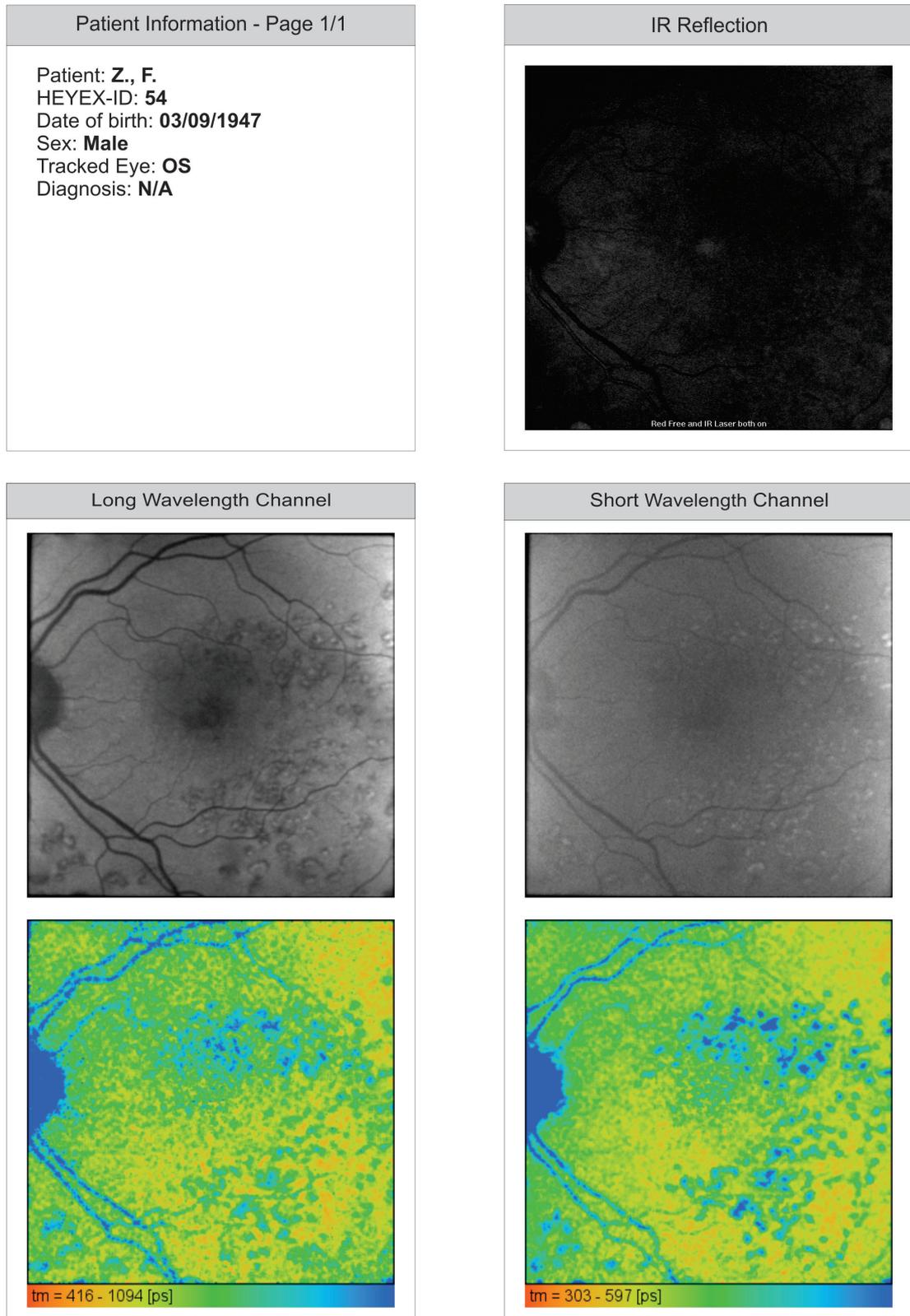


Abbildung 116: Auswertungsbogen des linken Auges (OS) des Patienten Z., F.

Quelle: Illustration des Autors.

Auch bei diesem Patienten kann selbst nach Optimierung und Vergrößerung des IR-Reflektionsbildes kaum eine Anomalie erkannt werden.

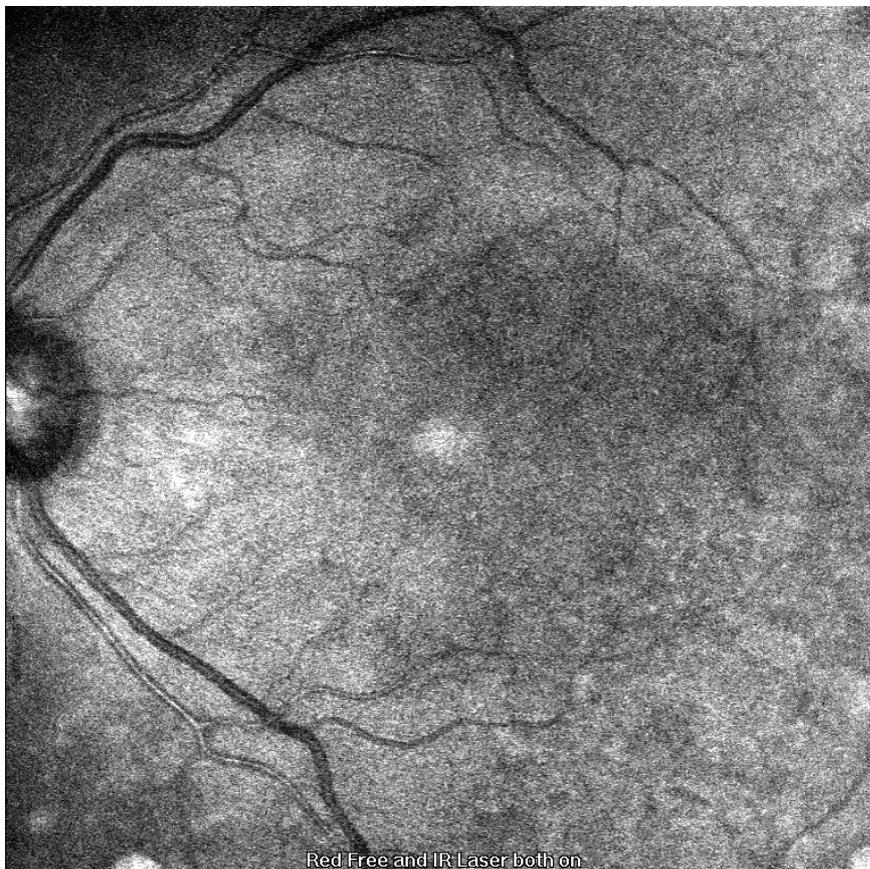


Abbildung 117: IR-Reflektionsbild (Fundusbild) des Patienten Z., F.

Quelle: Illustration des Autors.

Sehr interessant sind hingegen die Betrachtung des Fluoreszenzintensitätsbildes des langwelligen Kanals und das Fluoreszenzlebensdauerbild des kurzwelligen Kanals. In Abbildung 118 können im Intensitätsbild des langwelligen Spektralkanals eindeutig Anomalien festgestellt werden. Das Fluoreszenzlebensdauerbild des kurzwelligen Kanals weist in denselben Regionen erhöhte Fluoreszenzlebensdauern auf, die anhand der Blaufärbung erkannt werden können (roter Rahmen).

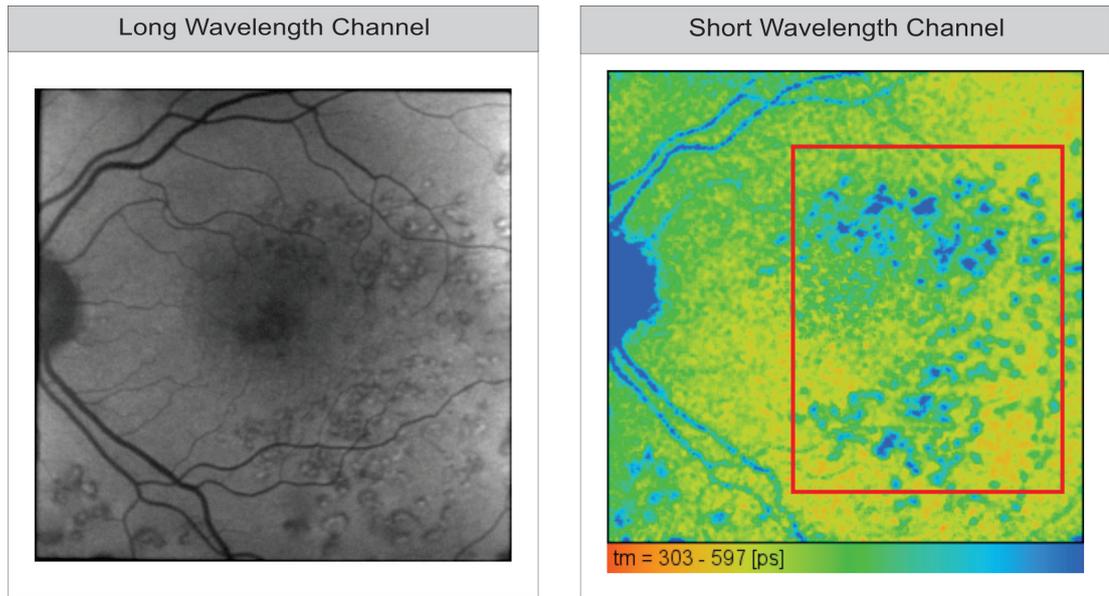


Abbildung 118: Intensitätsbild und τ_m des kurzwelligen Kanals

6 Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine Software zur Messung und Verarbeitung von Fluoreszenzlebensdauern im Bereich der Retina neu zu entwickeln, die die Leistung moderner Hochleistungssysteme verarbeiten und ausnutzen kann.

Neben einer Aufnahmesoftware war die Entwicklung eines Viewer zur Verwaltung der Messdaten wünschenswert.

Aufnahmesoftware und Viewer sollten als integraler Bestandteil der Verwaltungs- und Aufnahmesoftware HEYEX von Heidelberg Engineering umgesetzt werden.

Parallel zur Software sollte die Hardware optimiert und an ihre Leistungsgrenzen gebracht werden, um die Messzeiten für Patienten zu verringern.

Das zentrale Ziel war die Fertigstellung eines Prototyps zur Erprobung im klinischen Alltag.

6.1 Diskussion

Die neue Software schöpft in Kombination mit einigen Verbesserungen an der Hardware das Potential des Verfahrens und der TCSPC-Hardware voll aus und schont dabei Systemressourcen.

Durch die neue Architektur ist die Software in der Lage, große Datenmengen von weit über fünf Millionen Photonen pro Sekunde in Echtzeit zu verarbeiten und dem Anwender während einer Messung in Form von errechneten Intensitätsbildern und Histogrammen zu präsentieren. Die Verzögerung, bis erste Fluoreszenzintensitätsbilder und TCSPC-Histogramme angezeigt werden, liegt bei dem neuen FLIO-Aufnahmemodul bei unter 0,2 Sekunden, wogegen frühere Softwarelösungen weniger als ein Bild pro Sekunde erzeugen konnten. Die physikalischen Grenzen der neuesten TCSPC-Hardware liegen bei fünf Millionen Photonen pro Sekunde. Die Software bietet Möglichkeiten und genügend Potential, um noch höhere Datenmengen pro Sekunde zu verarbeiten, falls die Detektorenleistung weiterentwickelt und gesteigert wird. Durch Kommunikation mit der Hardware erkennt die Software selbstständig deren Leistungsgrenzen und passt sich entsprechend an. Die hierfür

benötigte Rechenleistung wird auf alle vorhandenen Prozessorkerne des Computersystems verteilt. Um die großen Datenmengen von teilweise einigen Gigabyte aufnehmen, weiterverarbeiten und speichern zu können, wurde eine diesen Anforderungen entsprechende leistungsfähige Speicherverwaltung realisiert. Obwohl bei einer Messung, abhängig von Messdauer und Umfang der vorhandenen fluoreszierenden Moleküle in der Retina, deutlich größere Datenmengen anfallen können, reicht durch dynamisches Auslagern auf die Festplatte (idealerweise SSD) eine Hardwarekonfiguration mit einem Arbeitsspeicher von 4 GB-RAM aus, wodurch die Soft- und Hardware bereits auf einem 32-Bit-System in vollem Umfang eingesetzt werden kann. 32-Bit-Systeme, wie sie in Kliniken häufig zum Einsatz kommen, sind nicht in der Lage, einen größeren Arbeitsspeicher als 4 GB-RAM zu adressieren.

Die ersten Entwicklungen lasteten einzelne Prozessorkerne zu 100 Prozent aus und konnten die Rechenlast nicht gleichmäßig verteilen. Die neu entwickelten Algorithmen verarbeiten einerseits deutlich mehr Daten und andererseits konnte erreicht werden, dass das Gesamtsystem durch eine ideale Verteilung der Last nur zu zehn Prozent ausgelastet wird. Zum Einsatz kommt ein Vierkernprozessor, die Software ist jedoch in der Lage, die Last auf weitere Prozessorkerne zu verteilen, sofern diese im Computersystem zur Verfügung stehen.

Die Optimierung der Hardware und Neuentwicklung der Software übertreffen im Zusammenspiel die gesetzten Erwartungen. Die Leistung des Gesamtsystems konnte im Durchschnitt um das Fünf- bis Zehnfache gesteigert werden und reizt die TCSPC-Hardware voll aus. In gleichem Maße konnte die Messzeit um denselben Faktor reduziert werden. Das Verfahren ist für den Patienten damit erheblich weniger beanspruchend.

Das FLIO-Aufnahmemodul wurde als Plug-In für die bestehende Softwareinfrastruktur (HEYEX) von Heidelberg Engineering realisiert und kann Patientendaten des etablierten Softwaresystems verarbeiten sowie mit diesem kommunizieren. Neue Messungen werden zu jedem Patienten individuell gespeichert, sodass sie in Form einer elektronischen Patientenakte zu diesem Patienten vorliegen bzw. von dort über den Viewer aufgerufen werden können. Über den FLIO-Viewer können Messdaten und Ergebnisse betrachtet und verwaltet werden. Bei der Weiterverarbeitung der Messdaten wird der Anwender stets unterstützt. Die Auswertungssoftware SPCImage

wurde in einer angepassten Variante an den FLIO-Viewer angebunden und ermöglicht die Datenauswertung durch die Generierung von Fluoreszenzlebensdauerkarten. Die Entwicklung eines Prototyps, der den Ansprüchen im Klinikeinsatz gerecht wird, konnte erfolgreich abgeschlossen und dieser in der Augenklinik des Inselspitals Bern installiert werden.

Seitdem werden täglich ungefähr zehn Patienten mit diesem Prototyp untersucht und dabei eine Vielzahl von Messdaten und Erfahrungen gewonnen. Die jeweilige Auswahl geeigneter Patienten obliegt dem behandelnden Arzt. Grundsätzlich werden mit dem Verfahren jedoch Patienten mit verschiedensten Krankheitsbildern untersucht. Bis September 2012 wurden bereits über 250 Messungen an Patienten durchgeführt.

6.2 Ausblick und Anregung für die weitere Forschung

Die durch die neue Software und das neue Gerät gewonnenen Messergebnisse sind sehr vielversprechend. Wie in Kapitel 4 „Medizinische Studien auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen“ dargelegt, wurden bereits erste Studien mit dem Verfahren durchgeführt, in denen Erkrankungen durch die Verarbeitung der Fluoreszenzlebensdauern eindeutig erkannt werden konnten. Die Studien suggerieren, dass insbesondere die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 beider Spektralkanäle (490-560 nm und 560-700 nm) sowie τ_2 des kurzwelligen Spektralkanals (490-560 nm) von besonderem Interesse sind. Die wissenschaftliche Vorgehensweise und der Umfang der Studien müssen dabei weiter verbessert werden, um in der Fachwelt eine größere Anerkennung zu erhalten. Das Inselspital Bern bereitet größere Studien mit dem neuen FLIO-Gerät und dem beschriebenen FLIO-Aufnahmemodul vor, welche bei den offiziellen Behörden und Einrichtungen angemeldet werden.

Auch Nichtmediziner erkennen auf den Auswertungsbögen (siehe Kapitel 5.3.2 und Anhang A) sofort Unterschiede zwischen den Autofluoreszenzbildern von Augengesunden und Patienten mit Netzhauterkrankungen.

Während des Prototypeneinsatzes im Inselspital Bern konnten alle Komponenten unter Beweis stellen, dass sie für den täglichen Einsatz geeignet sind. Die Messdauer

konnte auf ein für die Patienten erträgliches Maß von teilweise unter einer Minute reduziert werden.

Der wichtigste Entwicklungsschritt in naher Zukunft wird die Entwicklung einer geeigneten Auswertungssoftware sein. Die Verwendung von SPCImage (siehe Kapitel 5.2.12) ist für den Einsatz im Prototypenstadium ideal geeignet, wurde jedoch für effizientes klinisches Arbeiten nicht konzipiert und ist aufgrund der sehr wissenschaftlichen Oberfläche sowie zahlreicher variabler Einstellungsmöglichkeiten in der Klinik nicht optimal verwendbar.

Ferner bietet sich aufgrund der hohen Rechenzeit der Fluoreszenzlebensdauerkarten eine Auftragsverwaltung an, die es ermöglicht, mehrere Patientenmessungen gleichzeitig zu berechnen und auf eine Softwarearchitektur zu setzen, welche die Leistung von modernen 64-Bit-Betriebssystemen und mehreren Prozessorkernen ausnutzt. Es handelt sich bei den Fluoreszenzlebensdauerberechnungen um sehr viele kleine Einzelberechnungen jedes einzelnen Bildpixels. Es bietet sich daher an, die Leistungsfähigkeit einer modernen GPU (Graphics Processing Unit) auszunutzen, um den Rechenprozess zu parallelisieren und zu beschleunigen. Während sich der Hauptprozessor des Computersystems durch sehr hohe Rechenleistung und ein geringeres Maß an Parallelisierung mit bis zu acht Prozessorkernen auszeichnet, setzt die GPU der Grafikkarte auf ein sehr hohes Maß an Parallelisierung mit Hunderten von Prozessorkernen. Es lassen sich dadurch sehr viele Operationen parallel ausführen, wodurch die Bildgenerierung enorm gesteigert werden kann.

Die automatisierte Generierung von vergleichbaren Auswertungsbögen ist ebenfalls ein weiterer sinnvoller Schritt, um die Daten leichter für Vergleiche zur Verfügung zu stellen.

Die erfolgreiche Erprobung in der Klinik und das positive Feedback aus der Fachwelt rechtfertigen die Weiterentwicklung sowie den Zeit- und Kostenaufwand dieses Systems.

Weitere klinische Studien sind notwendig, um Diagnosen und Funktionalitäten zu verifizieren, Erfahrung in der Interpretation der Messergebnisse zu sammeln und für die evidenzbasierte Medizin nutzbar zu machen. Mit großer Spannung und Unterstützung werden die Studien im Inselspital Bern begleitet, weil die Fluoreszenzlebensdauerermessung aufgrund der bisherigen Ergebnisse das Potential hat, ein vielver-

sprechendes Diagnoseverfahren in der Augenheilkunde zu werden, mit dem sich frühzeitig Erkrankungen erkennen lassen. Forschungsprojekte mit weiteren Kliniken sind notwendig und in Planung, um den Erfahrungspool stetig zu erweitern und die Fachwelt für das Thema Autofluoreszenzlebensdauern im Bereich der Retina zu sensibilisieren.

Literaturverzeichnis

1. **Schweitzer, D., et al.** Vergleich von Parametern der zeitaufgelösten Autofluoreszenz bei Gesunden und Patienten mit früher AMD. *Ophthalmologe*. 10. Juli 2009, S. 714-721.
2. **Schweitzer, D., et al.** *Erprobung des optimierten Fluoreszenz-Lifetime Mappers auf der Grundlage des HRA II von Heidelberg Engineering*. Heidelberg : s.n., 2008.
3. **Balzer, Heide.** *Lehrbuch der Objektmodellierung*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 1999. ISBN: 3827402859.
4. **Schweitzer, D., et al.** Zeitaufgelöste Autofluoreszenz bei retinalen Gefäßverschlüssen. *Ophthalmologe*. 17. Juni 2010, S. 1145-1142.
5. **Huch, Renate und Bauer, Christian.** *Mensch Körper Krankheit*. München : Urban & Fischer Verlag, 2003. S. 22f. ISBN: 3-437-26790-6.
6. —. *Mensch Körper Krankheit*. München : Urban & Fischer Verlag, 2003. ISBN: 3-437-26790-6.
7. —. *Mensch Körper Krankheit*. München : Urban & Fischer Verlag, 2003. S. 225. ISBN: 3-437-26790-6.
8. Druse (Medizin). *Wikipedia*. [Online] Wikimedia Foundation Inc., 25. Juli 2011. [Zitat vom: 03. August 2012.] http://de.wikipedia.org/wiki/Druse_%28Medizin%29.
9. Geographische Atrophie. *Trockene AMD*. [Online] Verein Trockene AMD. [Zitat vom: 30. August 2012.] http://www.whklein.de/de/?Die%26nbsp%3BKrankheit:Ursachen:Geographische_Atrophie.
10. **Huch, Renate und Bauer, Christian.** *Mensch Körper Krankheit*. München : Urban & Fischer Verlag, 2003. ISBN: 3-437-26790-6.
11. Gefäßverschlüsse am Auge. *miomedi Augen*. [Online] Miomedia GmbH & Co. KG, 06. April 2011. [Zitat vom: 29. August 2012.] <http://www.portal-der-auge-medizin.de/augekrankheiten/gefaessverschluesse/gefaessverschluss-auge-gefaessverschluesse.html>.

12. **Brockhaus-Redaktion.** *Mensch, Natur, Technik: Forschung und Schlüsseltechnologien.* Leipzig, Mannheim : Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, 2000. S. 177. ISBN: 3-7653-7041-x.
13. —. *Mensch, Natur, Technik: Forschung und Schlüsseltechnologien.* Leipzig, Mannheim : Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, 2000. S. 178. ISBN: 3-7653-7041-x.
14. **Hinze, PD Dr. Gerald.** Physikalische Chemie – Zeitaufgelöste Fluoreszenz und Energietransfer. *Johannes Gutenberg Universität Mainz.* [Online] 2011. [Zitat vom: 01. August 2012.] http://www.uni-mainz.de/FB/Chemie/fbhome/physc/Dateien/Modul_zeitaufgeloesteFluoreszenzmessung.pdf.
15. **Tipler, Paul A. und Mosca, Gene.** *Physik.* Heidelberg : Elsevier, 2006, 2. Auflage. S. 993. 3-8274-1164-5.
16. —. *Physik.* Heidelberg : Elsevier, 2006, 2. Auflage. S. 994. ISBN: 3-8274-1164-5.
17. —. *Physik.* Heidelberg : Elsevier, 2006, 2. Auflage. S. 995. ISBN: 3-8274-1164-5.
18. **Brockhaus-Redaktion.** *Mensch, Natur, Technik: Forschung und Schlüsseltechnologien.* Leipzig, Mannheim : Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, 2000. S. 187. ISBN: 3-7653-7041-x.
19. Fluoreszenz. *Wikipedia.* [Online] 16. Juli 2012. [Zitat vom: 20. Juli 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz>.
20. Fluoreszenz. *DocCheck Flexikon.* [Online] [Zitat vom: 20. Juli 2012.] <http://flexikon.doccheck.com/de/Fluoreszenz>.
21. Fluoreszenzlebensdauer. *Wikipedia.* [Online] 21. Juli 2012. [Zitat vom: 21. Juli 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzlebensdauer>.
22. **Becker, Wolfgang.** *The bh TCSPC Handbook.* Berlin : Becker & Hickl GmbH, 2010, 4th Edition. S. 37.
23. Fluoreszenzlebensdauer. *Wikipedia.* [Online] Wikimedia Foundation Inc., 2012. Januar 2012. [Zitat vom: 22. Juli 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/TCSPC>.

24. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung. *Aktuelle Verfahren der biomedizinischen Optik*. [Online] [Zitat vom: 22. Juli 2012.] <http://www.htw-saarland.de/Members/michael.moeller/BMTMasMedOpt/TCSPC.ppt>.
25. **Becker, Wolfgang**. *The bh TCSPC Handbook*. Berlin : Becker & Hickl GmbH, 2010, 4th Edition. S. 38.
26. BDL-473-SMC – Lasers. *Becker & Hickl*. [Online] Becker & Hickl GmbH. [Zitat vom: 25. Juli 2012.] <http://www.becker-hickl.com/lasers.htm#BDL-473>.
27. BDL-473-SMC – Detectors. *Becker & Hickl*. [Online] Becker & Hickl GmbH. [Zitat vom: 25. Juli 2012.] <http://www.becker-hickl.com/detectors.htm#HPM100>.
28. BDL-473-SMC – TCSPC. *Becker & Hickl*. [Online] Becker & Hickl GmbH. [Zitat vom: 25. Juli 2012.] <http://www.becker-hickl.com/tcspc.htm#spc150>.
29. Fluorescence-lifetime imaging microscopy. *Wikipedia*. [Online] Wikimedia Foundation Inc., 25. Juli 2012. [Zitat vom: 25. Juli 2012.] http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence-lifetime_imaging_microscopy.
30. **America, Laser Institute of**. *American National Standard for the safe use of laser*. Orlando : Laser Institute of America, 2000. ANSI Z 136.1-2000 (2000).
31. **Commission, International Electrotechnical**. *Safety of laser products – Part 1: Classification and requirements*. Genf : International Electrotechnical Commission. IEC 60825-1:2007.
32. TCSPC – SPC-150. *Becker & Hickl*. [Online] [Zitat vom: 03. August 2012.] <http://www.becker-hickl.com/tcspc.htm#spc150>.
33. **Becker, Wolfgang**. *The bh TCSPC Handbook*. Berlin : Becker & Hickl GmbH, 2010, 4th Edition. S. 17.
34. SPECTRALIS – Multimodale diagnostische Bildgebung. *Heidelberg Engineering*. [Online] Heidelberg Engineering GmbH. [Zitat vom: 03. August 2012.] <http://www.heidelbergengineering.com/germany/produkte/spectralis/>.
35. TruTrack Aktives Eye Tracking. *Heidelberg Engineering*. [Online] Heidelberg Engineering GmbH. [Zitat vom: 02. August 2012.]

- <http://www.heidelbergengineering.com/germany/produkte/spectralis/technologie/trutrack-aktives-eye-tracking/>.
36. TruTrack Aktiives Eye Tracking. *Heidelberg Engineering*. [Online] Heidelberg Engineering GmbH. [Zitat vom: 02. August 2012.]
<http://www.heidelbergengineering.com/germany/unternehmen/technologien/trutrack-aktives-eye-tracking/>.
37. SPECTRALIS – Multimodale diagnostische Bildgebung. *Heidelberg Engineering*. [Online] Heidelberg Engineering GmbH. [Zitat vom: 03. August 2012.] <http://www.heidelbergengineering.com/germany/produkte/spectralis/>.
38. HEYEX Netzwerklösung. *Heidelberg Engineering*. [Online] Heidelberg Engineering GmbH. [Zitat vom: 07. August 2012.]
<http://www.heidelbergengineering.com/germany/produkte/heyex-netzwerklosungen/>.
39. **GE, Eldred und ML, Katz.** *Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization*. Columbia : Department of Ophthalmology, University of Missouri, 1988.
40. **GE, Eldred und MR, Lasky.** *Retinal age-pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents*. Columbia : Manson Institute of Ophthalmology, University of Missouri, 1993.
41. **Airey, David.** *Logo Design Love – Kultverdächtige Markenidentitäten gestalten*. München : Addison-Wesley Verlag, 2010. S. 10. ISBN: 3827329884.
42. **Balzert, Heide.** *UML 2 in 5 Tagen*. Witten : W3L-Verlag, 2009, 2. Auflage. S. 79-80. ISBN: 978-3-86834-002-0.
43. **Lee, Peter und Phillips, Chris.** *C++*. Bonn : verlag moderne industrie Buch AG & Co. KG, 2001. S. 46. ISBN: 3-8266-8113-4.
44. **Balzert, Heide.** *UML 2 in 5 Tagen*. Bochum : W3L-Verlag, 2009, 2. Auflage. S. 124. ISBN: 978-3-86834-002-0.
45. Look and Feel Design Guidelines – Second Edition. *Java*. [Online] Sun Microsystems, Februar 2001. [Zitat vom: 30. Juli 2012.]
<http://java.sun.com/products/jlf/ed2/book/>.

46. Model View Controller. *Wikipedia*. [Online] Wikimedia Foundation Inc., 31. Juli 2012. [Zitat vom: 31. Juli 2012.]
http://de.wikipedia.org/wiki/Model_View_Controller.
47. **Balzert, Heide**. *Lehrbuch der Objektmodellierung*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 1999. S. 271. ISBN: 3827402859.
48. First In – First Out. *Wikipedia*. [Online] Wikimedia Foundation Inc., 29. Juli 2012. [Zitat vom: 07. August 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/FIFO>.
49. *SPCImage 3.2 Handbook*. Berlin : Becker & Hickl GmbH, 2010.
50. **Schwendt, Tilman**. *Lasermessungsverfahren für die zeitaufgelöste Quantifizierung von Konzentrationsprofilen in Hydrogel Matrices*. Aachen : Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 2010.
51. **Jones, Carolyn und Suhling, Klaus**. Refractive index sensing using Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM). *IOPscience*. [Online] 2006. [Zitat vom: 06. August 2012.] http://iopscience.iop.org/1742-6596/45/1/031/pdf/jpconf6_45_031.pdf.
52. **Huch, Renate und Bauer, Christian**. *Mensch Körper Krankheit*. München : Urban & Fischer Verlag, 2003. S. 227f. ISBN: 3-437-26790-6.

Anhangsverzeichnis

Anhang A: Auswertungsbogen von Messungen an Patienten 161

Anhang B: CD-ROM 185

Anhang A: Auswertungsbogen von Messungen an Patienten

Auswertungsbögen von Augengesunden

Patient Information - Page 1/2

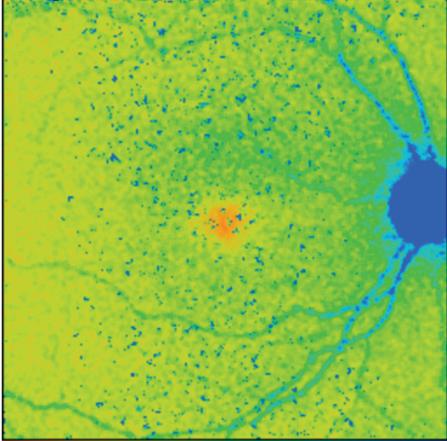
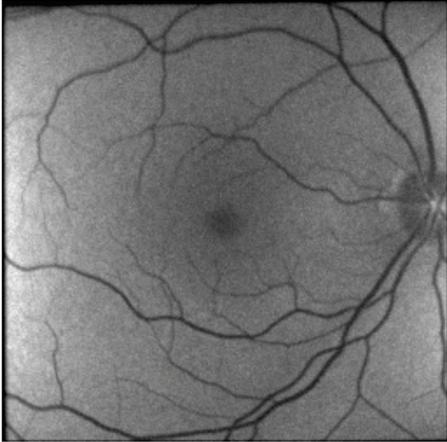
Patient: **D., A.**
HEYEX-ID: **37**
Date of birth: **09/13/1985**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

IR Reflection



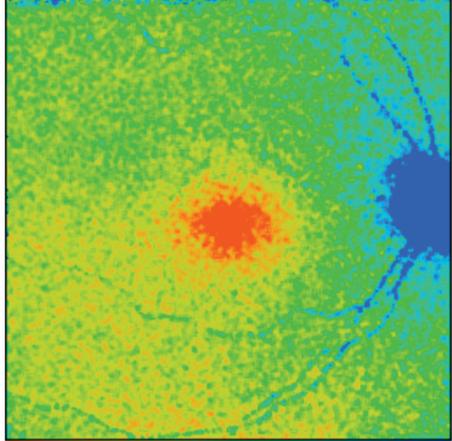
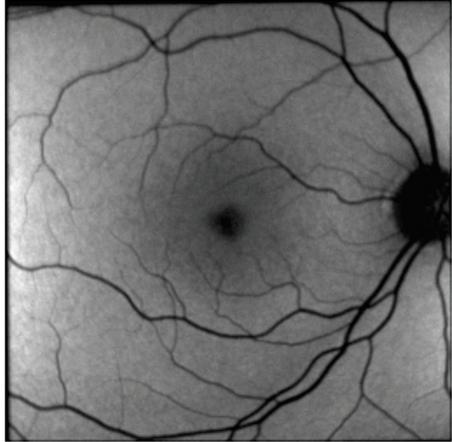
Red Free and IR Laser both on

Long Wavelength Channel



tm = 147 - 670 [ps]

Short Wavelength Channel

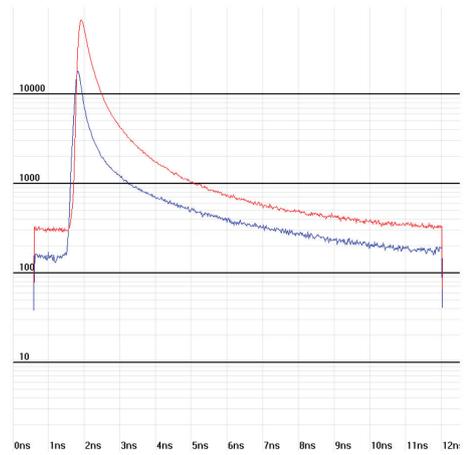


tm = 237 - 345 [ps]

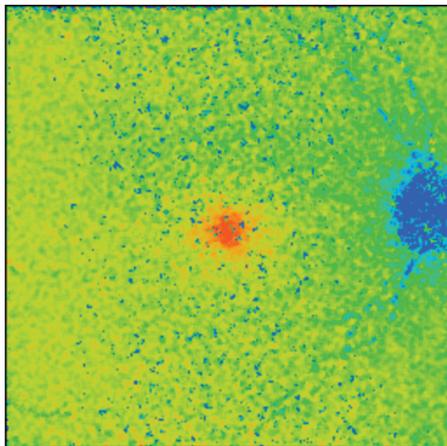
Patient Information - Page 2/2

Patient: **D., A.**
HEYEX-ID: **37**
Date of birth: **09/13/1985**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

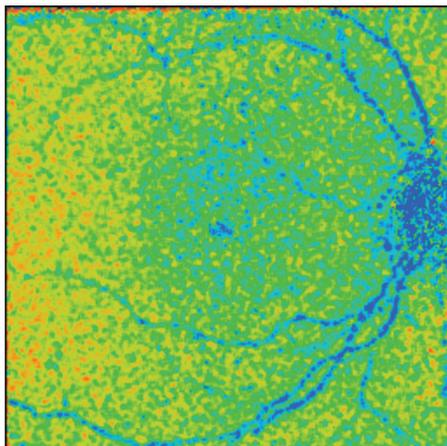
Histogram



Long Wavelength Channel

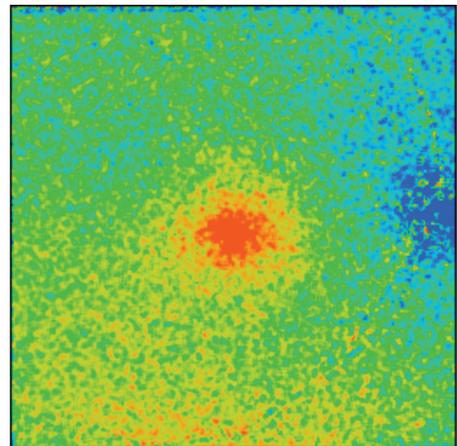


t1 = 131 - 334 [ps]

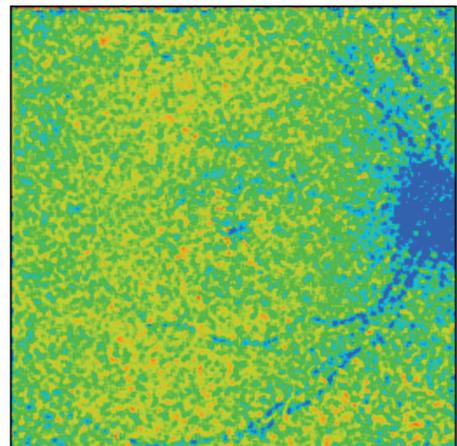


t2 = 1635 - 3417 [ps]

Short Wavelength Channel



t1 = 169 - 240 [ps]



t2 = 1082 - 1916 [ps]

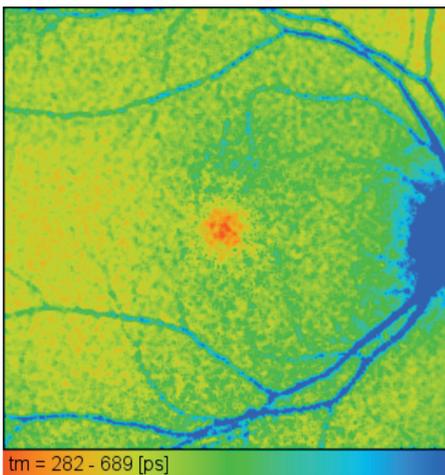
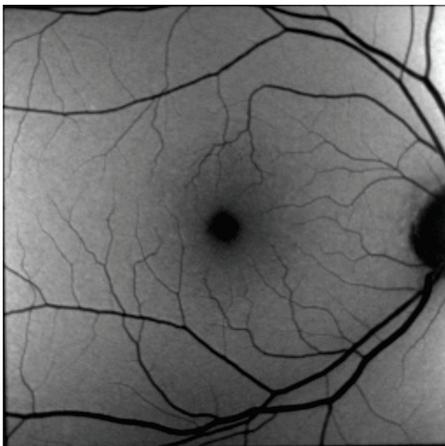
Patient Information - Page 1/1

Patient: **D., C.**
HEYEX-ID: **50**
Date of birth: **12/15/1953**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

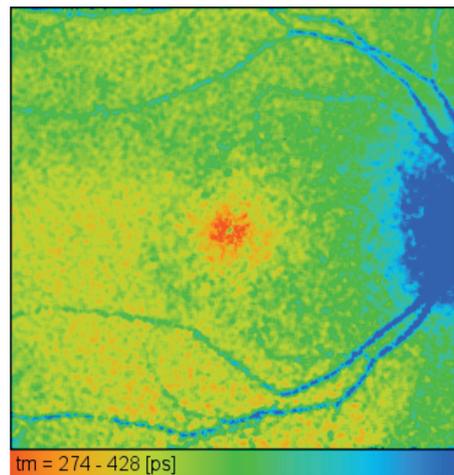
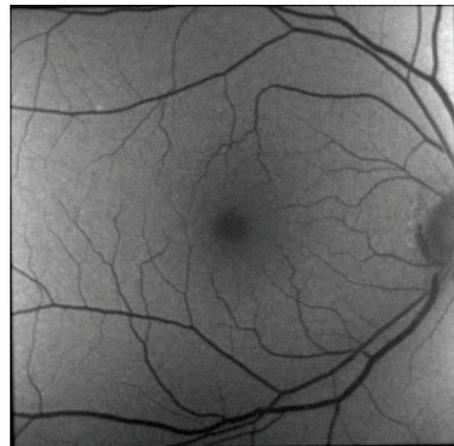
IR Reflection



Long Wavelength Channel



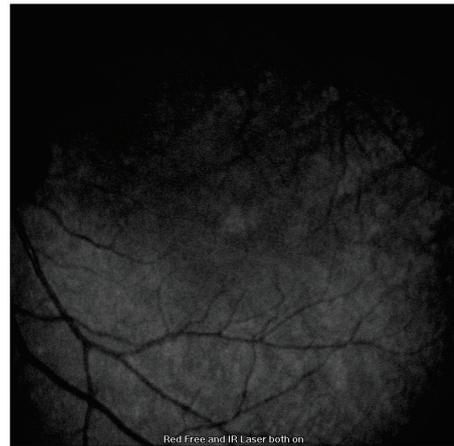
Short Wavelength Channel



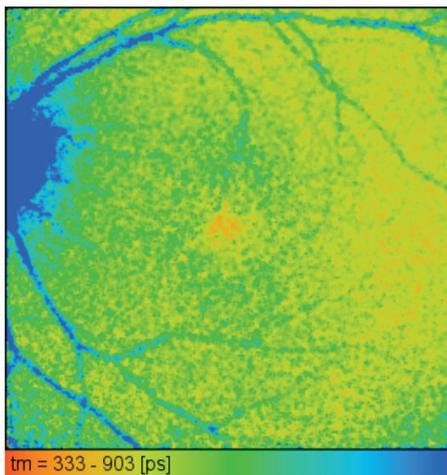
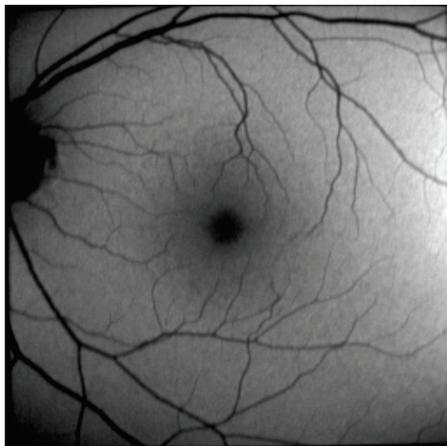
Patient Information - Page 1/1

Patient: **D., C.**
HEYEX-ID: **50**
Date of birth: **12/15/1953**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

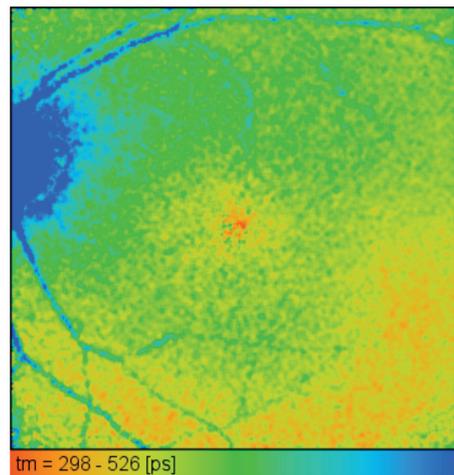
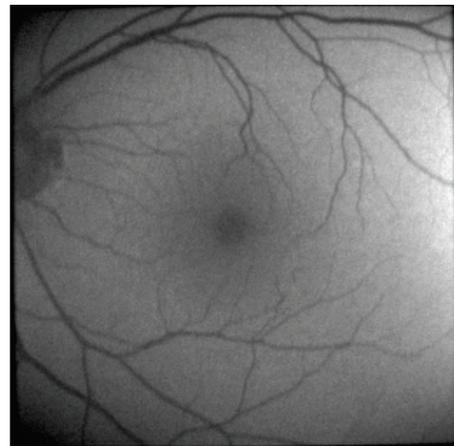
IR Reflection



Long Wavelength Channel



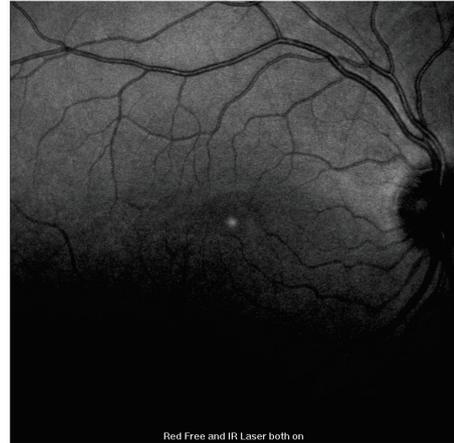
Short Wavelength Channel



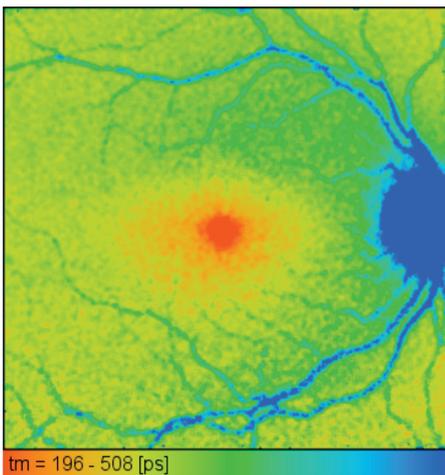
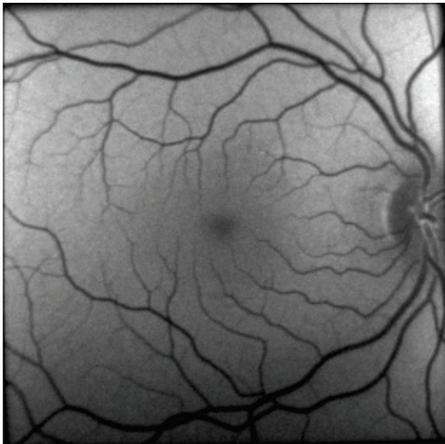
Patient Information - Page 1/2

Patient: **K., N.**
HEYEX-ID: **11**
Date of birth: **10/24/1990**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

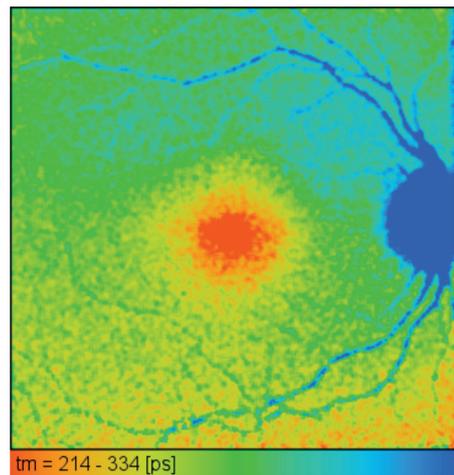
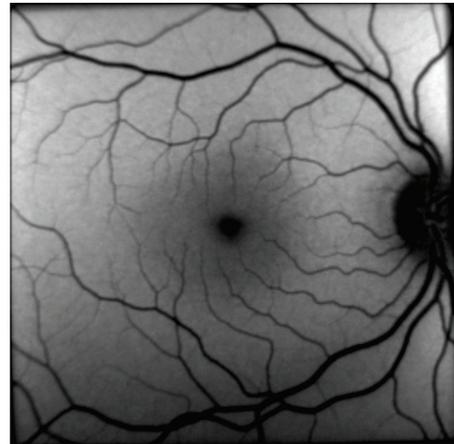
IR Reflection



Long Wavelength Channel



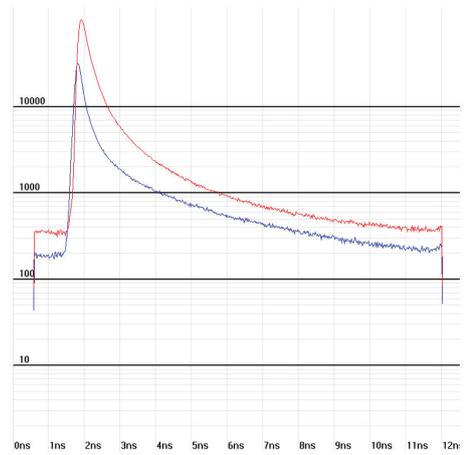
Short Wavelength Channel



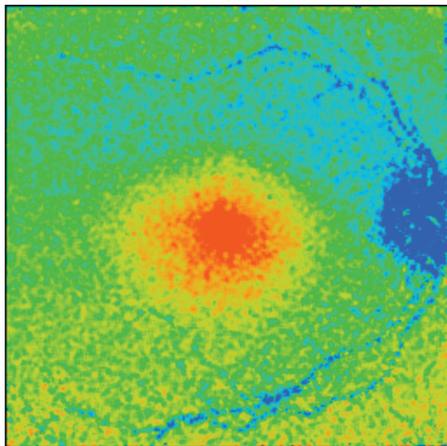
Patient Information - Page 2/2

Patient: **K., N.**
HEYEX-ID: **11**
Date of birth: **10/24/1990**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

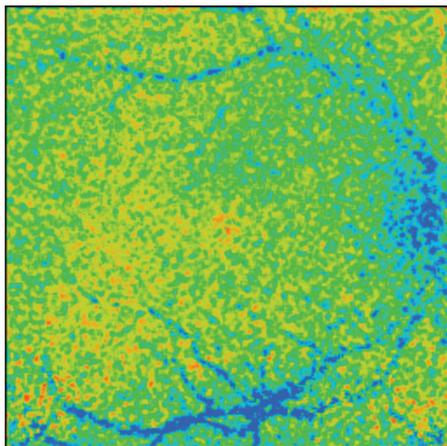
Histogram



Long Wavelength Channel

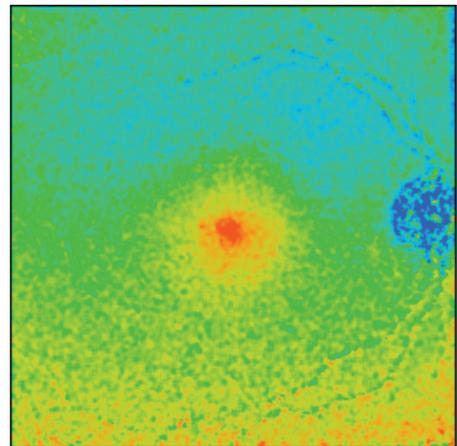


t1 = 157 - 261 [ps]

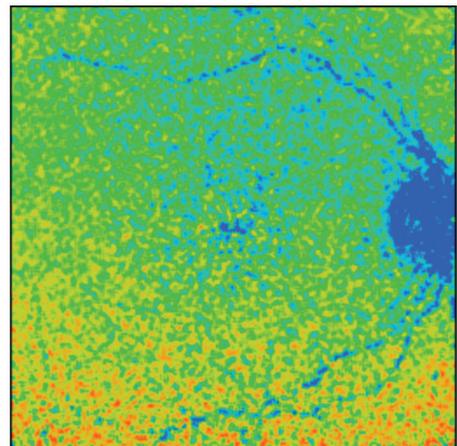


t2 = 1539 - 2932 [ps]

Short Wavelength Channel



t1 = 143 - 261 [ps]

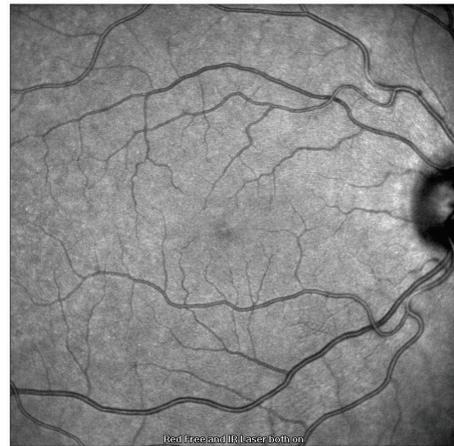


t2 = 999 - 1928 [ps]

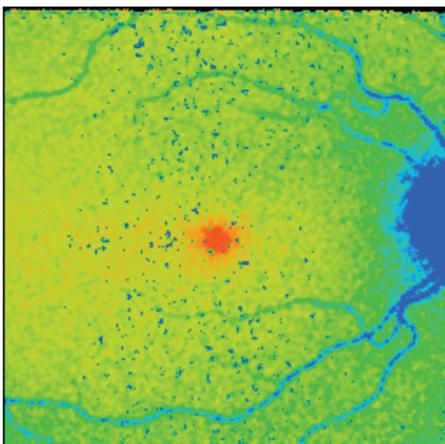
Patient Information - Page 1/1

Patient: **L., B.**
HEYEX-ID: **9**
Date of birth: **03/06/1970**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **Normalbefund**

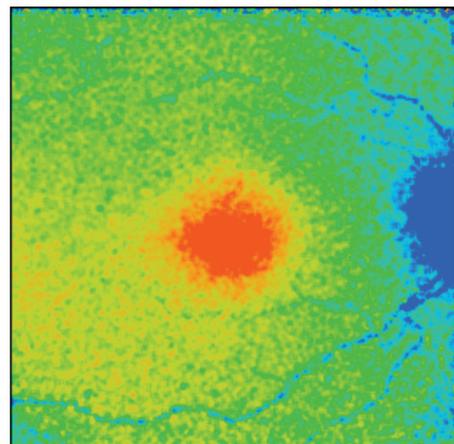
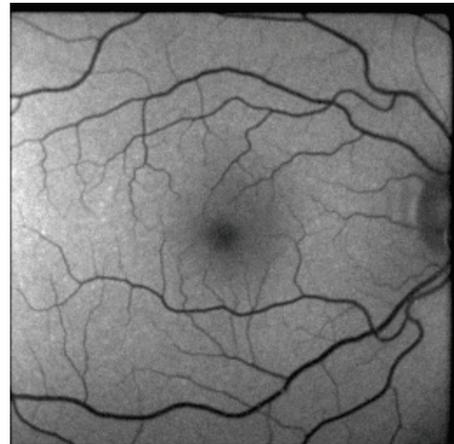
IR Reflection



Long Wavelength Channel



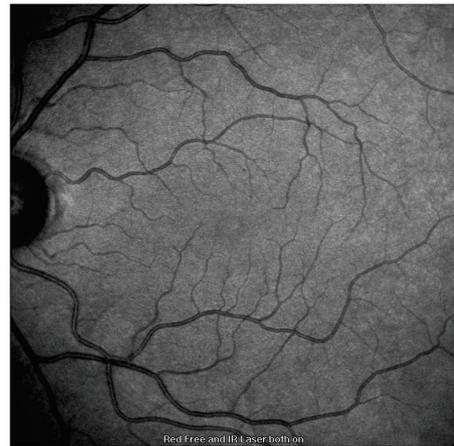
Short Wavelength Channel



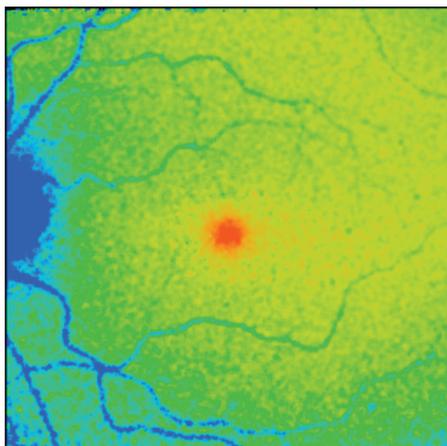
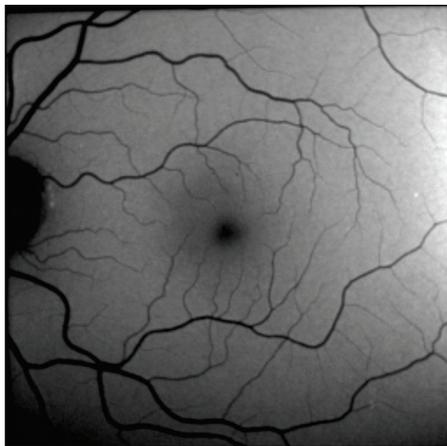
Patient Information - Page 1/1

Patient: **L., B.**
HEYEX-ID: **9**
Date of birth: **03/06/1970**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **Normalbefund**

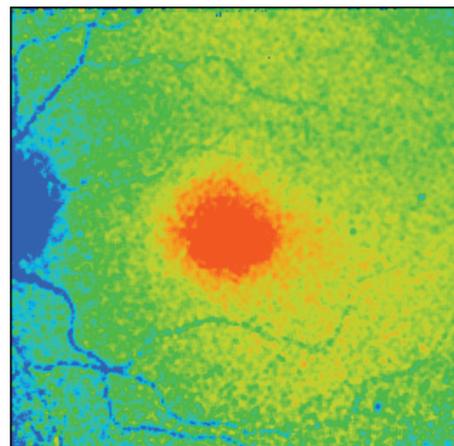
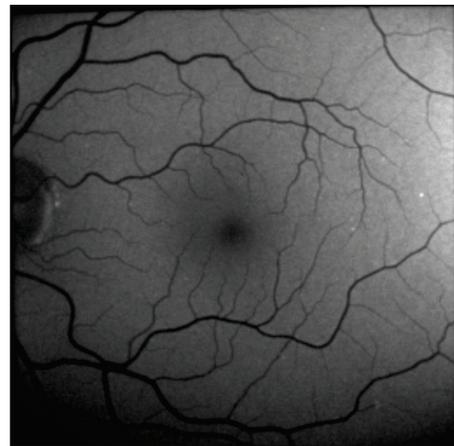
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



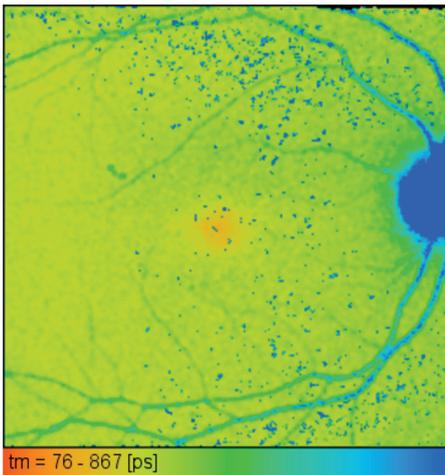
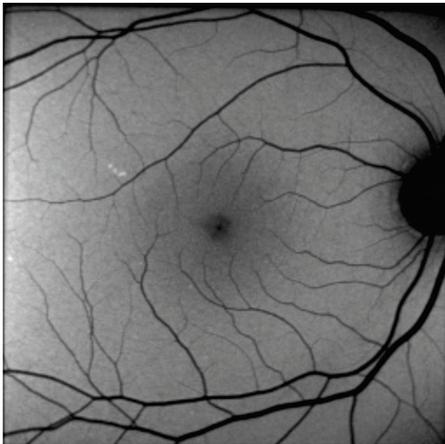
Patient Information - Page 1/1

Patient: **N., M.**
HEYEX-ID: **4**
Date of birth: **06/15/1982**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **Normalbefund**

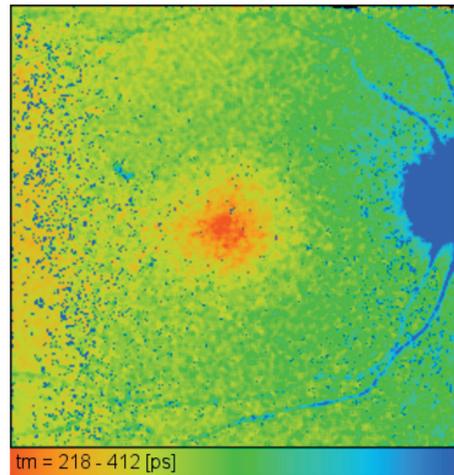
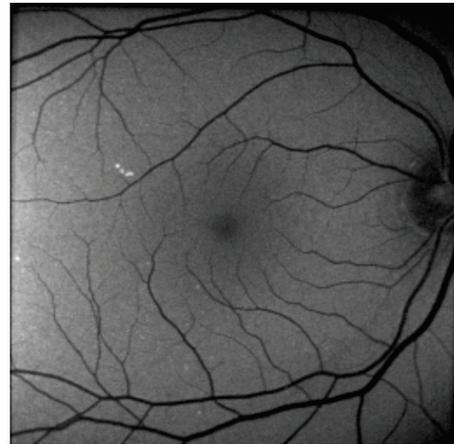
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



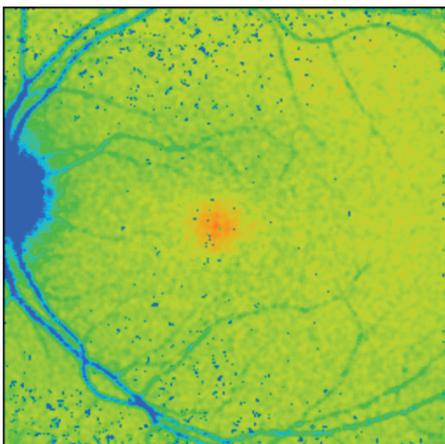
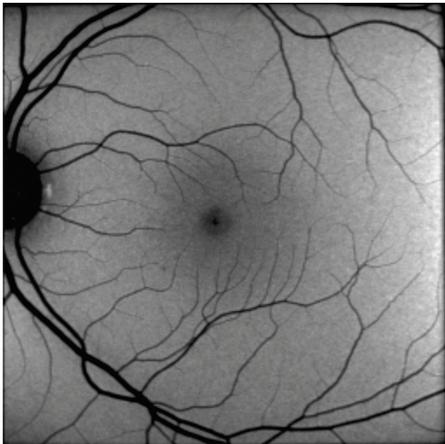
Patient Information - Page 1/1

Patient: **N., M.**
HEYEX-ID: **4**
Date of birth: **06/15/1982**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **Normalbefund**

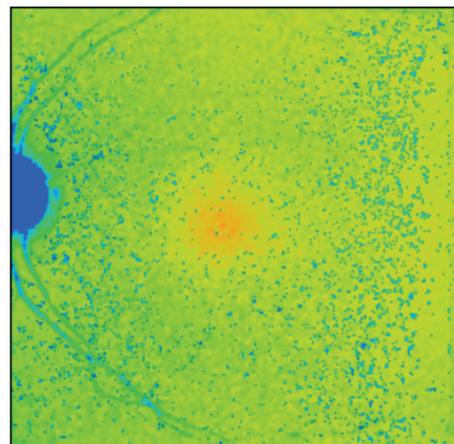
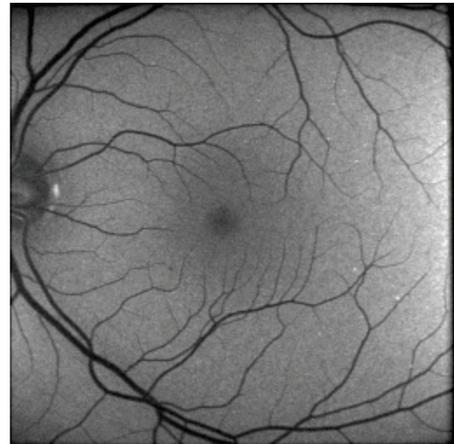
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



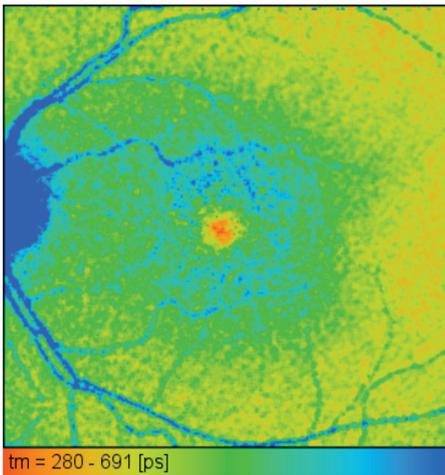
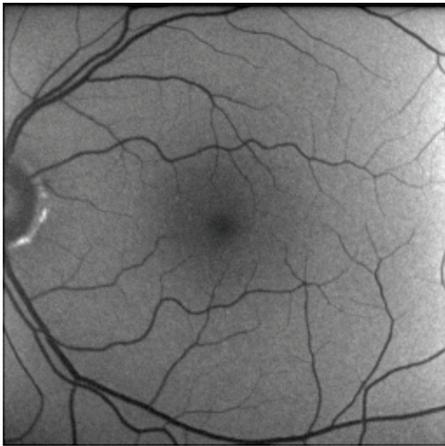
Patient Information - Page 1/2

Patient: **W., S.**
HEYEX-ID: **2**
Date of birth: **01/12/2012**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

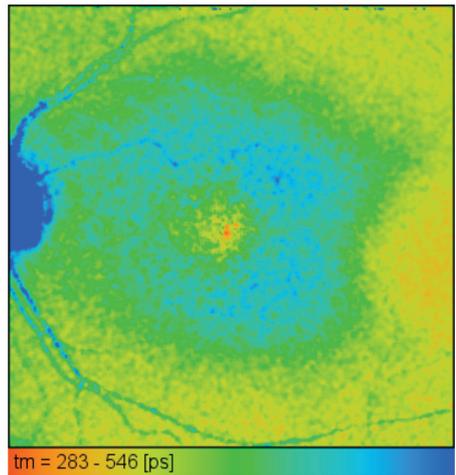
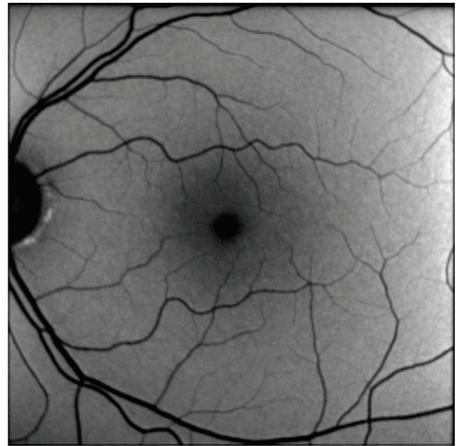
IR Reflection



Long Wavelength Channel



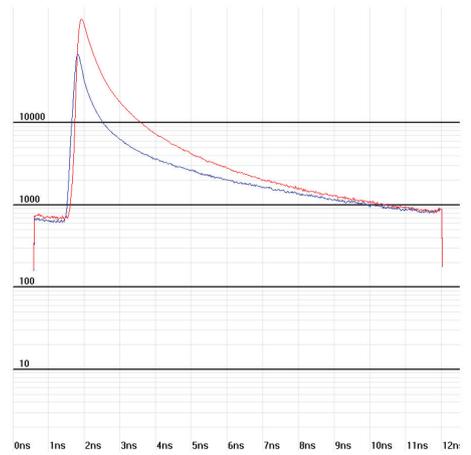
Short Wavelength Channel



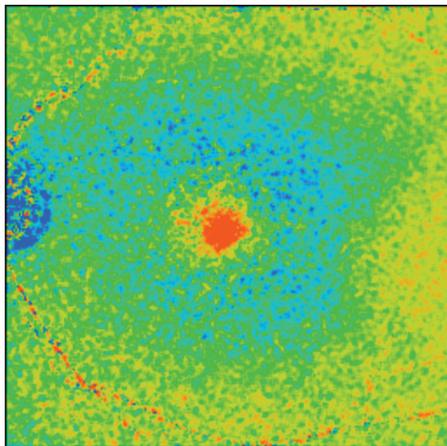
Patient Information - Page 2/2

Patient: **W., S.**
HEYEX-ID: **2**
Date of birth: **01/12/2012**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

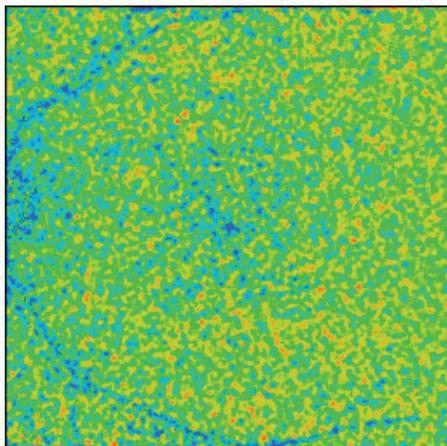
Histogram



Long Wavelength Channel

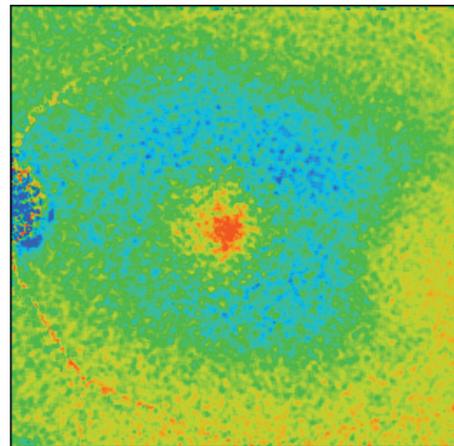


t1 = 191 - 340 [ps]

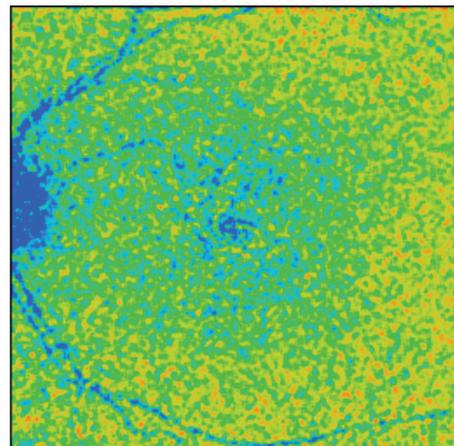


t2 = 1895 - 3472 [ps]

Short Wavelength Channel



t1 = 209 - 345 [ps]



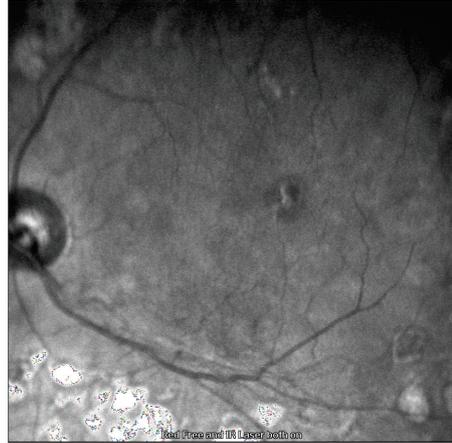
t2 = 1366 - 2281 [ps]

Auswertungsbögen mit Anomalien

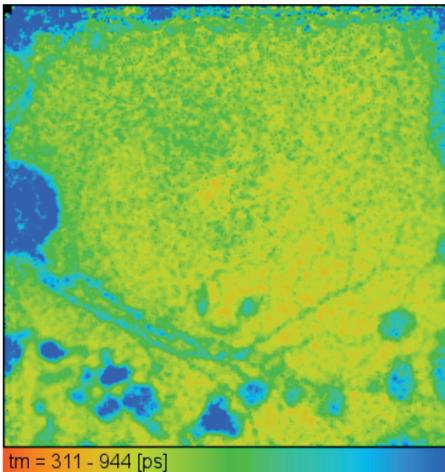
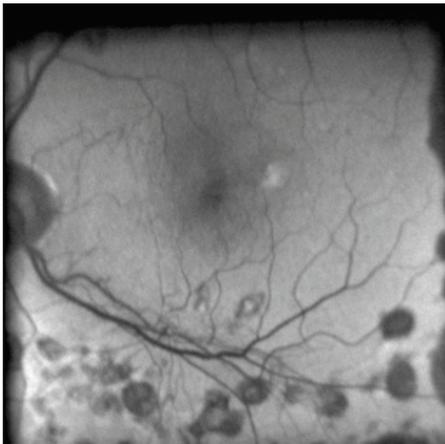
Patient Information - Page 1/1

Patient: **G., A.**
HEYEX-ID: **49**
Date of birth: **03/28/1958**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

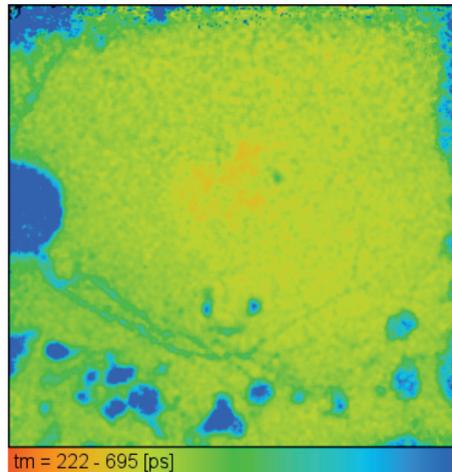
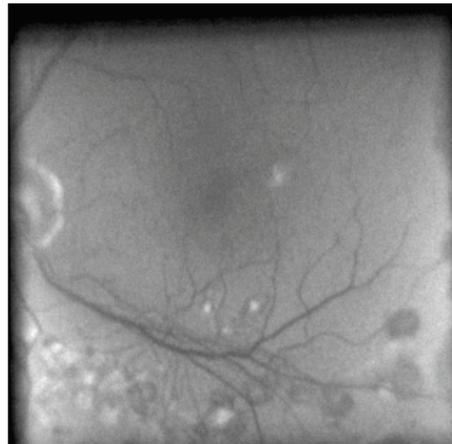
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



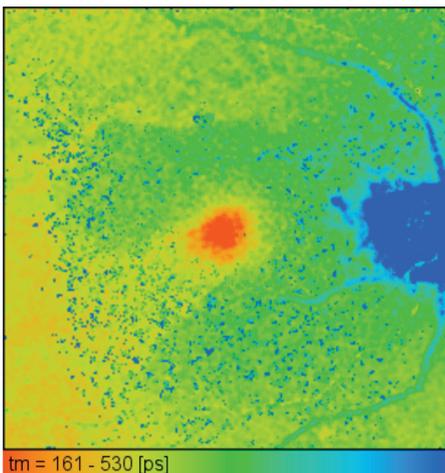
Patient Information - Page 1/1

Patient: **K., D.**
HEYEX-ID: **25**
Date of birth: **12/21/1923**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

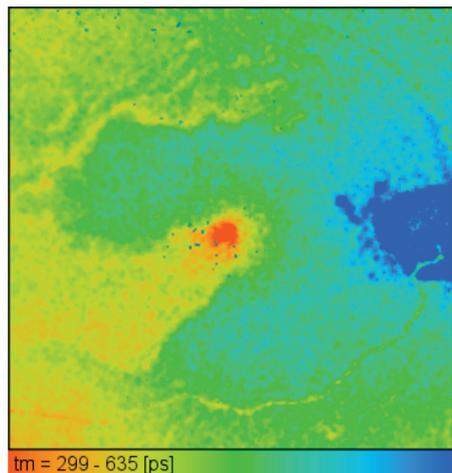
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



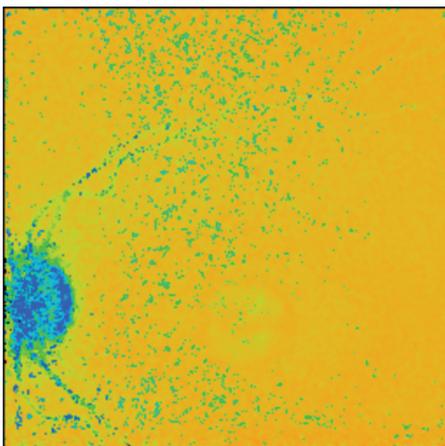
Patient Information - Page 1/1

Patient: **K., D.**
HEYEX-ID: **62**
Date of birth: **10/07/1986**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

IR Reflection

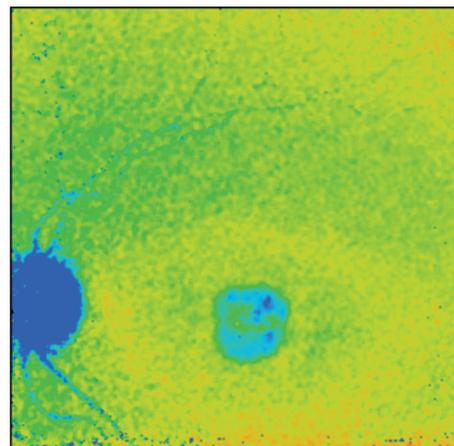


Long Wavelength Channel



tm = 0 - 1271 [ps]

Short Wavelength Channel

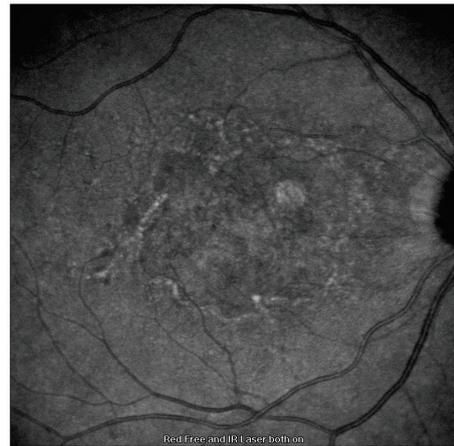


tm = 170 - 402 [ps]

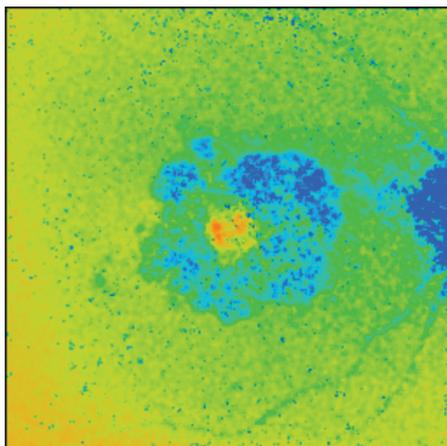
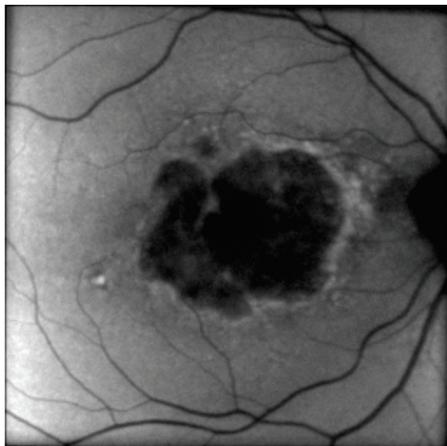
Patient Information - Page 1/1

Patient: **R., D.**
HEYEX-ID: **33**
Date of birth: **01/17/1926**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

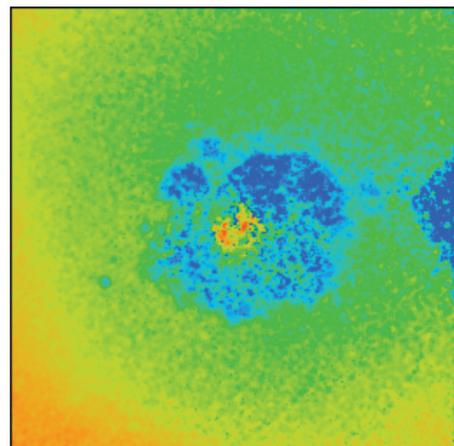
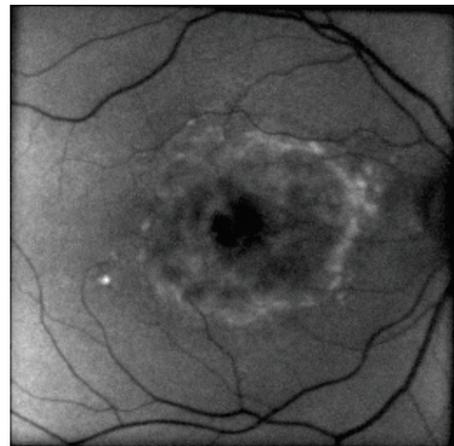
IR Reflection



Long Wavelength Channel



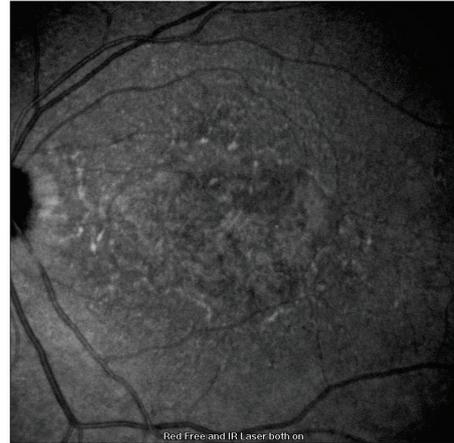
Short Wavelength Channel



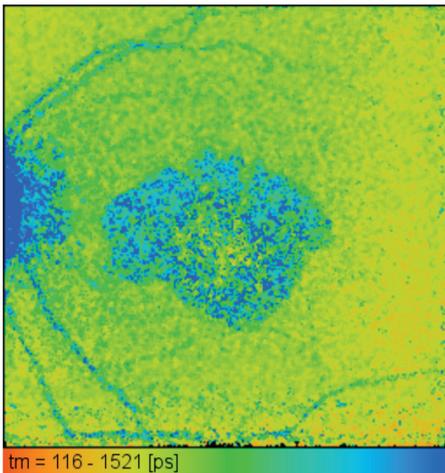
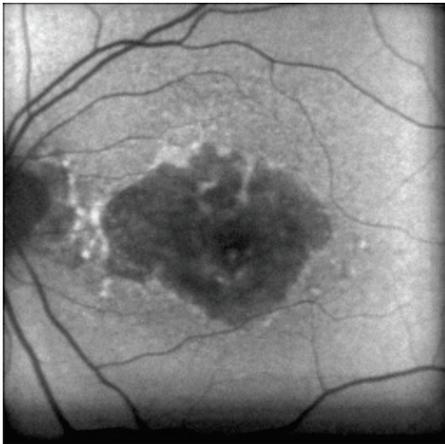
Patient Information - Page 1/1

Patient: **R., D.**
HEYEX-ID: **33**
Date of birth: **01/17/1926**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

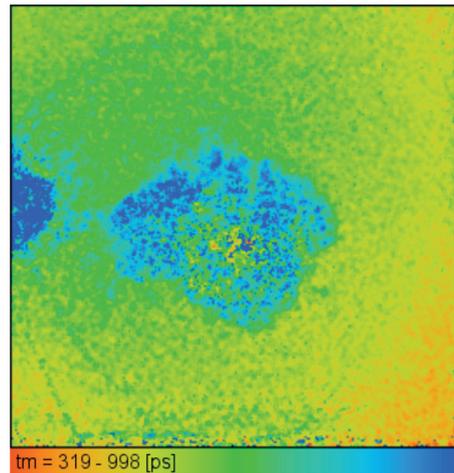
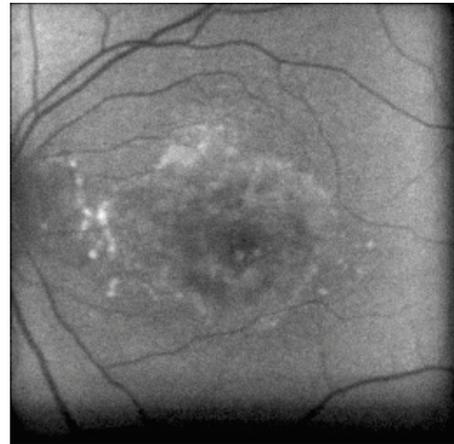
IR Reflection



Long Wavelength Channel



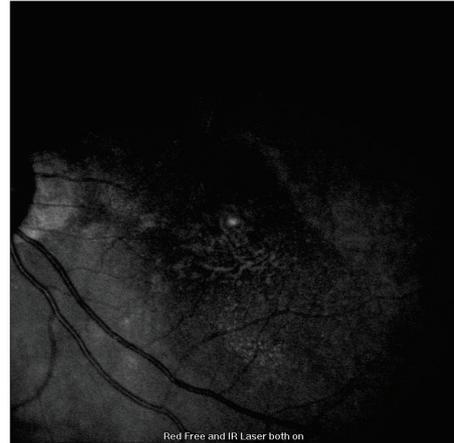
Short Wavelength Channel



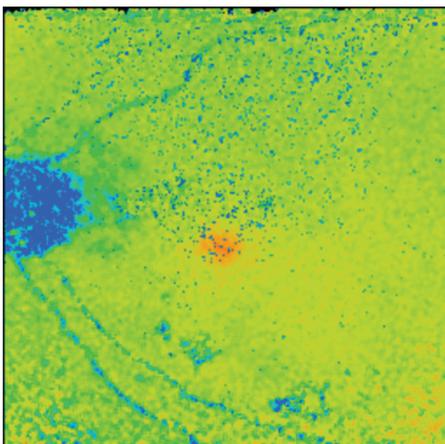
Patient Information - Page 1/1

Patient: **R., M.**
HEYEX-ID: **58**
Date of birth: **02/14/1935**
Sex: Female
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

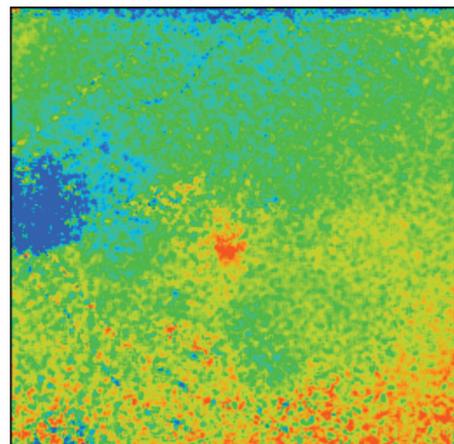
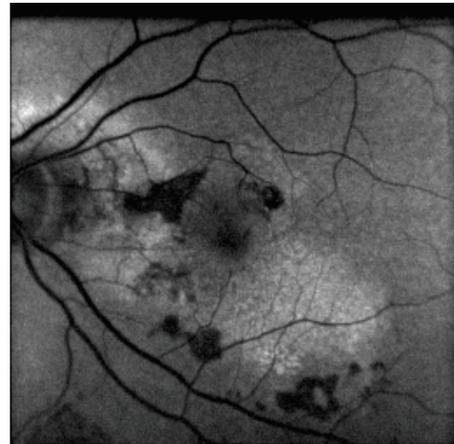
IR Reflection



Long Wavelength Channel



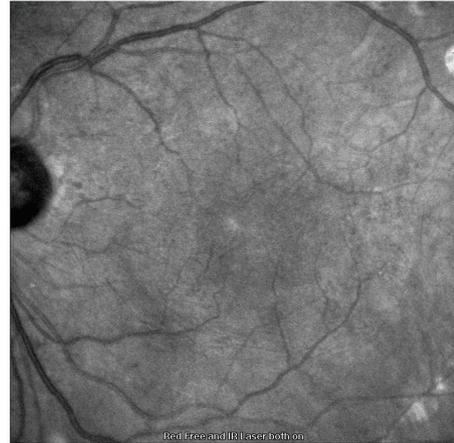
Short Wavelength Channel



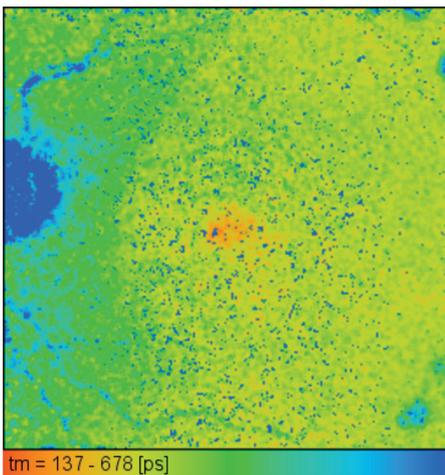
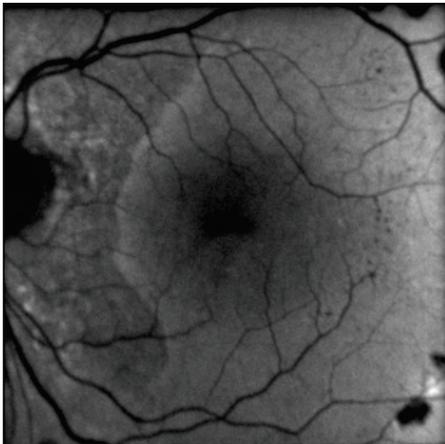
Patient Information - Page 1/1

Patient: **S., E.**
HEYEX-ID: **61**
Date of birth: **01/15/1938**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

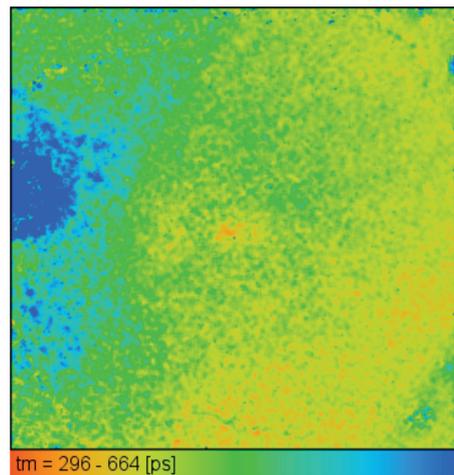
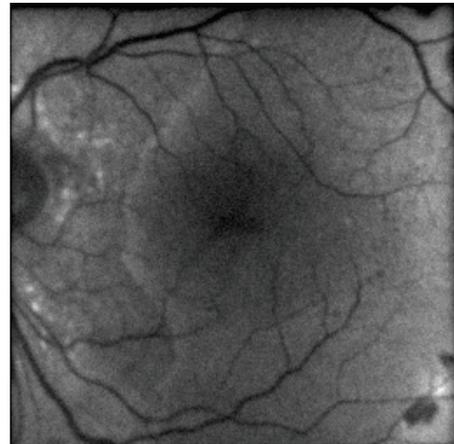
IR Reflection



Long Wavelength Channel



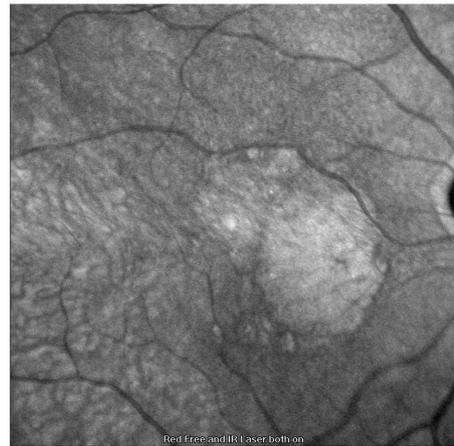
Short Wavelength Channel



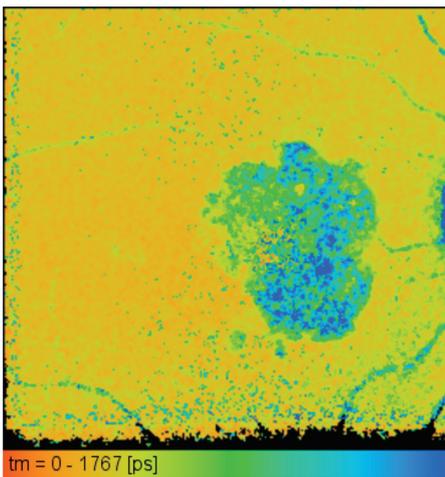
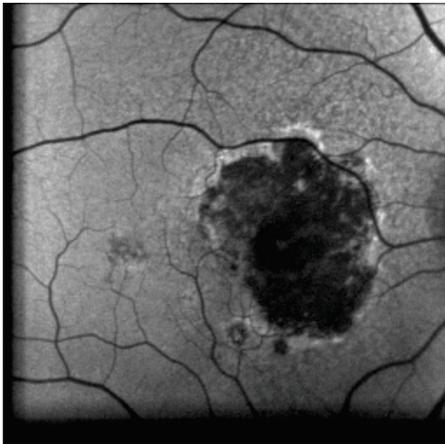
Patient Information - Page 1/1

Patient: **S., M.**
HEYEX-ID: **44**
Date of birth: **02/08/1925**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

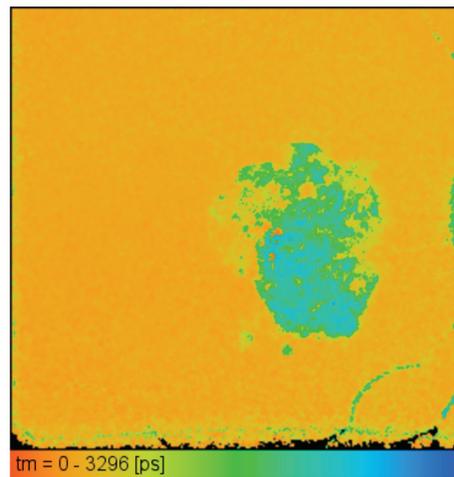
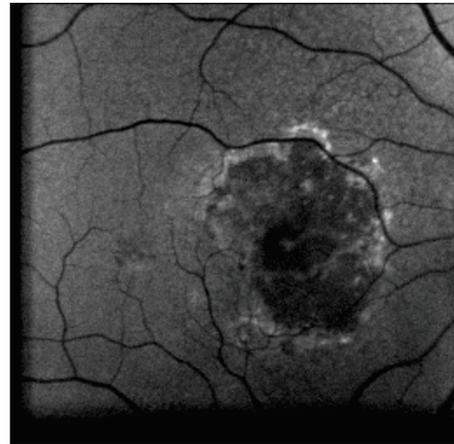
IR Reflection



Long Wavelength Channel



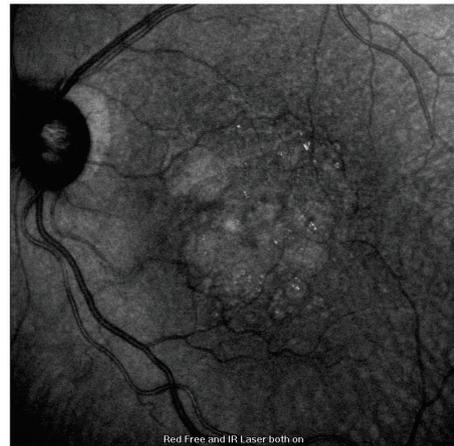
Short Wavelength Channel



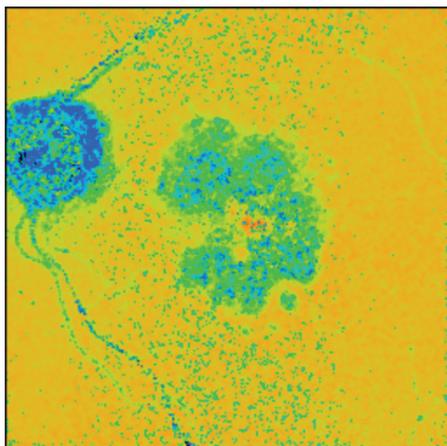
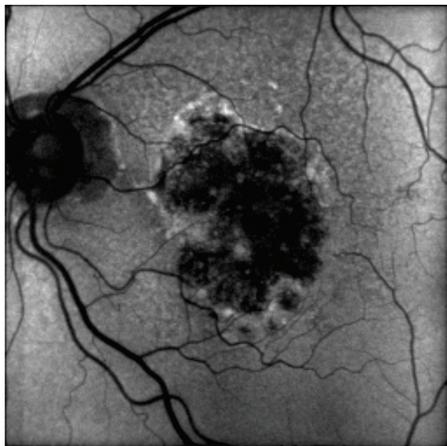
Patient Information - Page 1/1

Patient: **S., M.**
HEYEX-ID: **44**
Date of birth: **02/08/1925**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

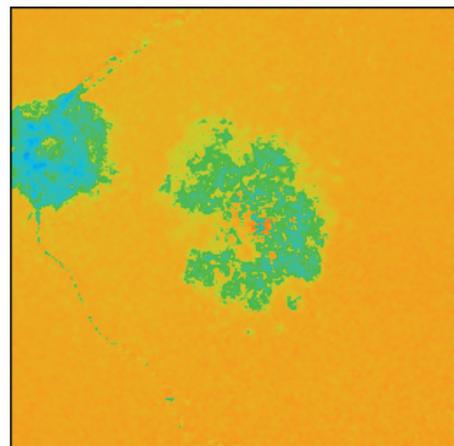
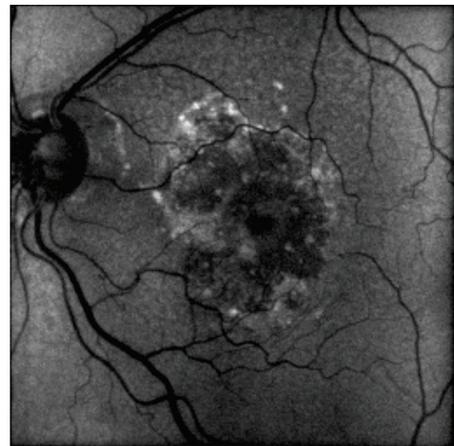
IR Reflection



Long Wavelength Channel



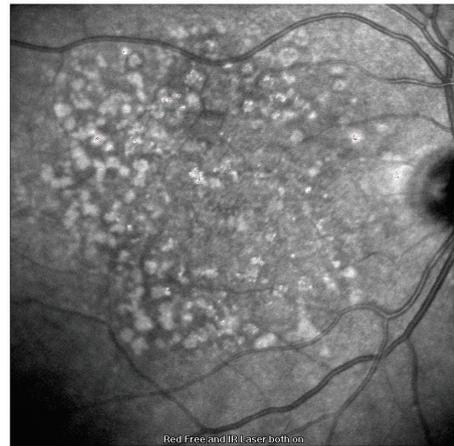
Short Wavelength Channel



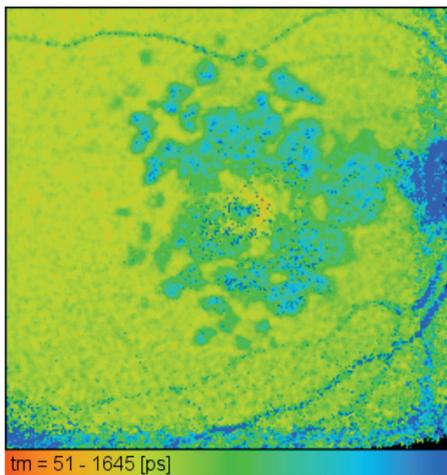
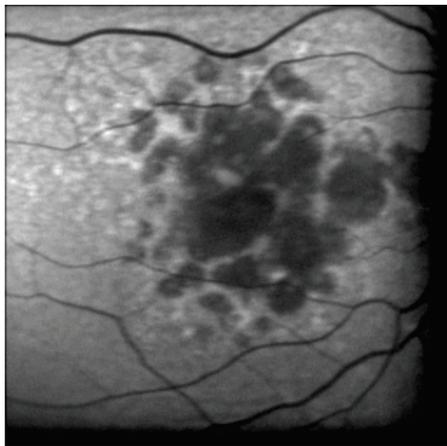
Patient Information - Page 1/1

Patient: **T., G.**
HEYEX-ID: **31**
Date of birth: **08/29/1931**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

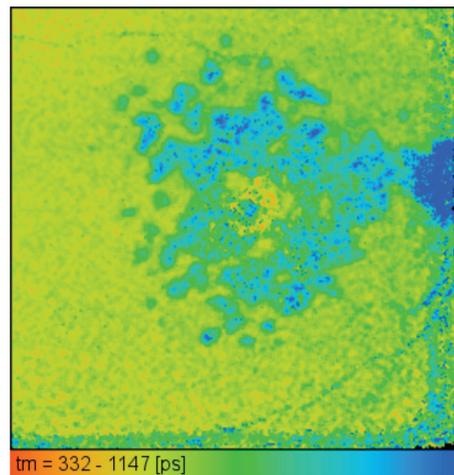
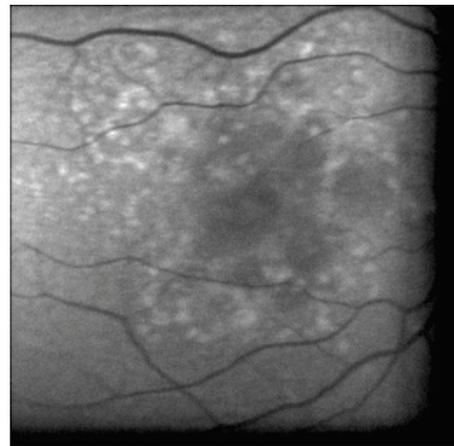
IR Reflection



Long Wavelength Channel



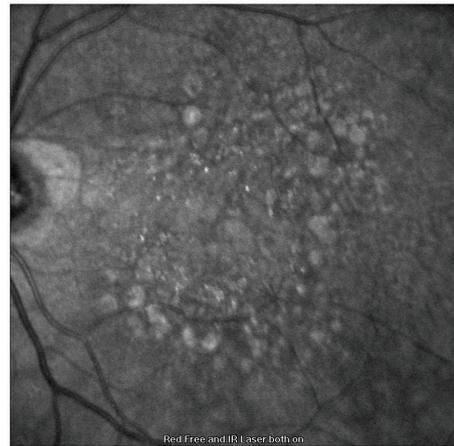
Short Wavelength Channel



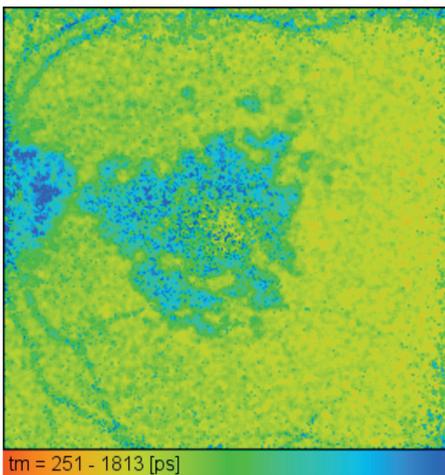
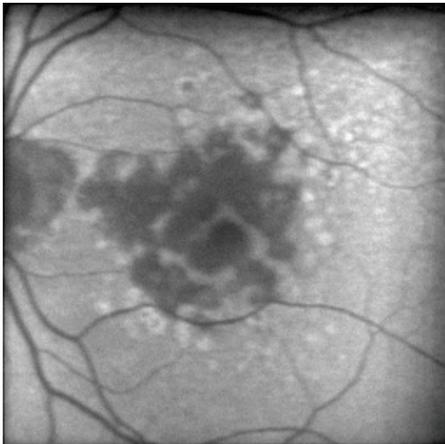
Patient Information - Page 1/1

Patient: **T., G.**
HEYEX-ID: **31**
Date of birth: **08/29/1931**
Sex: **Female**
Tracked Eye: **OS**
Diagnosis: **N/A**

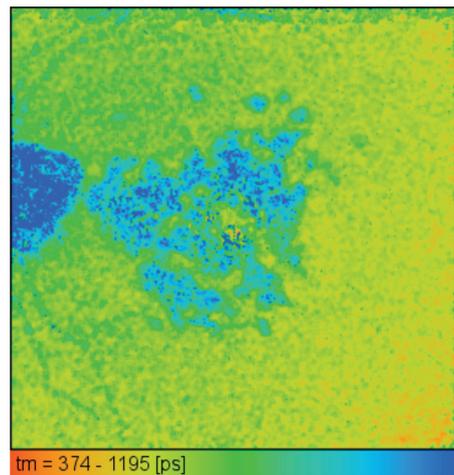
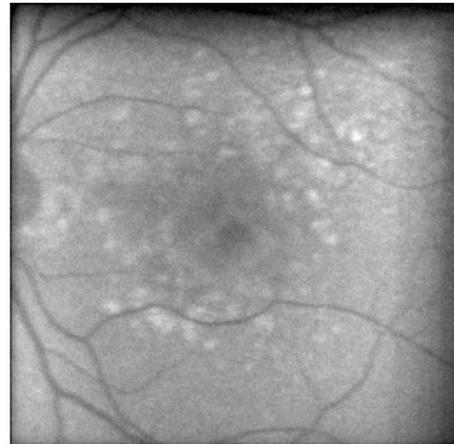
IR Reflection



Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



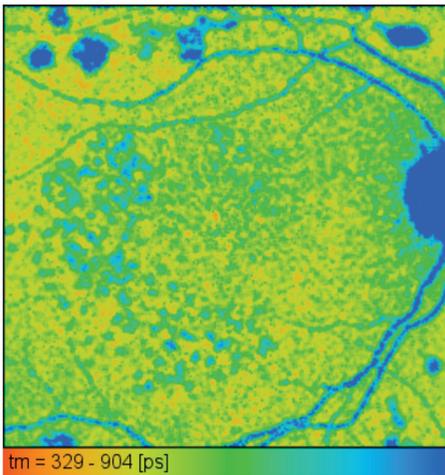
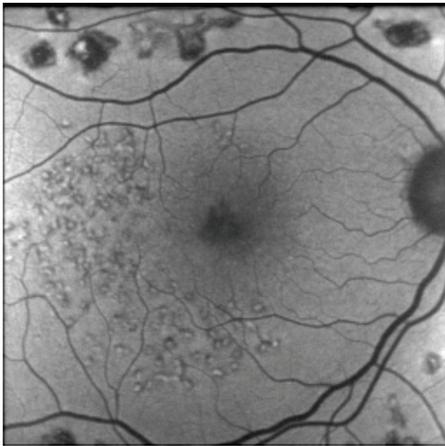
Patient Information - Page 1/1

Patient: **Z., F.**
HEYEX-ID: **54**
Date of birth: **03/09/1947**
Sex: **Male**
Tracked Eye: **OD**
Diagnosis: **N/A**

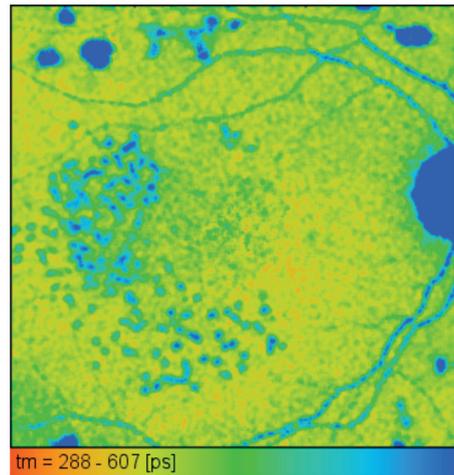
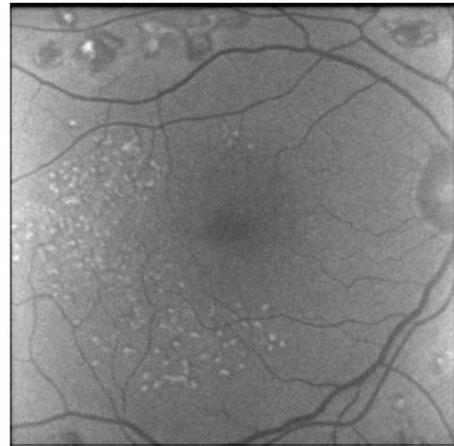
IR Reflection



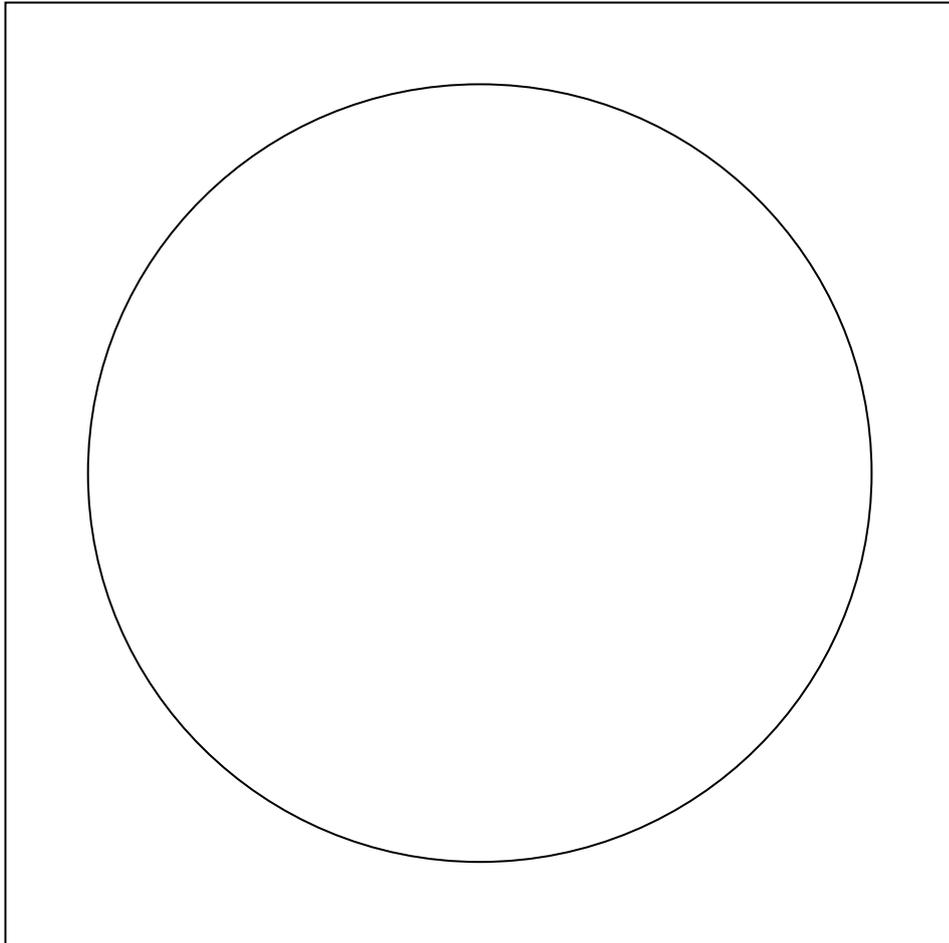
Long Wavelength Channel



Short Wavelength Channel



Anhang B: CD-ROM



Inhaltsverzeichnis der CD-ROM:

- Diplomarbeit im PDF-Format
- Kopien der Online-Ressourcen
- Klassendiagramme
- Sequenzdiagramme
- Aktivitätsdiagramm
- SPCImage-Handbuch
- Auswertungsbögen von Messungen an Patienten (durchgeführt von Autor und Inselspital Bern)
- Lasersicherheitsbestimmungen und -berechnungen

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit mit dem Thema

„Entwicklung einer Software zur Akquisition von Autofluoreszenzlebensdauern und Autofluoreszenzintensitätsbildern der Retina“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Östringen, den 05. September 2012,

Johannes Blatz