

Klinische Anwendungen der
Multiphotonen-Tomographie
humaner Haut

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II
- Physik und Mechatronik -
der Universität des Saarlandes

von

Alexander Ehlers

Saarbrücken

2007

Tag des Kolloquiums: 06.03.2008

Dekanin/Dekan: Univ.-Prof. Dr. Andreas Schütze

Mitglieder des
Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Karsten König
Prof. Dr. Christian Wagner
Prof. Dr. Helmut Seidel

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Michael Koblischka

Kurzdarstellung

Multiphotonen-Tomographie ist eine nicht-invasive, klinisch zugelassene Untersuchungsmethode basierend auf Femtosekunden-Lasern im nahen Infrarot. Hautareale werden mit subzellulärer Auflösung ($<1\text{ }\mu\text{m}$) abgebildet.

In der vorliegenden Arbeit werden neue Erweiterungen der Multiphotonen-Tomographie vorgestellt.

Eine neue Laserquelle mit GHz-Repetitionsraten sowie Fokussieroptiken mit größerem Bildfeld (Millimeter-Bereich) erweitern den Anwendungsbereich. Risikoabschätzungen ergeben, dass beide Techniken an humaner Haut ohne Gefahr von instantanen Schädigungen anwendbar sind.

Die zeitliche Charakteristik der Fluoreszenz enthält Informationen über die molekulare Umgebung eines Fluorophors. Eine neue Auswertungsmethode der zeitaufgelösten Bilder am Beispiel Malignes Melanom der Haut vorgestellt deckt diese Unterschiede auf. Ein drittes Ziel ist die Entwicklung eines miniaturisierten GRIN-Linsen-Endoskops für den Einsatz in schwer zugängliche Körperregionen. Nach der Charakterisierung wird der Einsatz der Prototypen in klinischen Wundheilungsstudien vorgestellt.

Abstract

Multiphoton tomography is a non-invasive and clinically approved technique based on near-infrared (NIR) femtosecond laser pulses. Skin areas are imaged with subcellular resolution.

In this thesis new extensions in the field of multiphoton tomography are presented.

A new laser source with GHz repetition rates as well as focussing optics for images with millimeter-size expand the imaging parameters of multiphoton tomography. Risk analyses show that both extension possibilities are applicable without instant damage to human skin.

Analysis of the temporal characteristics of the fluorescence offers further information on the molecular environment of a certain fluorophore. A new analysis method for clinical fluorescence lifetime measurements of malignant melanoma unravels these differences. The third part presents the extension of multiphoton tomography to skin areas not accessible for bulky focussing optics by miniaturized GRIN-lens endoscopes. After characterization the systems are tested in clinical trials in wound healing studies.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	1
2 Grundlagen	5
2.1 Signalentstehung	5
2.1.1 Multiphotonen-Anregung	5
2.1.2 Fluoreszenz	10
2.1.3 Second Harmonic Generation	14
2.1.4 Auflösungsvermögen	15
2.2 Gradientenindex-Linsen	16
2.3 Haut und Hautanhangsgebilde	19
2.4 Nichtlineare Optik in biologischem Gewebe	22
2.4.1 Natürliche Chromophore	22
2.4.2 Wechselwirkung von Licht mit Haut	27
2.4.3 Schädigungseffekte in biologischem Gewebe	29
3 Experimentelle Systeme und Methoden	31
3.1 Multiphotonen-Mikroskopie	31
3.2 Datenanalyse	37
3.3 Klinische Aspekte	38
4 Multiphotonen-Tomographie	41
4.1 Ziel	41
4.2 Optische Schnitte durch die Haut	41
4.3 GHz-Laserquelle	49
4.4 Einfluss der Fokussieroptik	56
4.5 Fazit	63
5 Optische Werkzeuge für die klinische Melanom-Früherkennung	65
5.1 Parametrische Fluoreszenzlebensdauer-Analysen	65

Inhaltsverzeichnis

5.2	Theoretische Betrachtungen zur Sensitivität	65
5.3	Entwicklung der Methoden und Vorexperimente	72
5.3.1	Humane Haut <i>in vivo</i>	72
5.3.2	Melanin	77
5.4	FLIM an Melanomen <i>in vivo</i>	84
5.5	Fazit	88
6	Klinische <i>In vivo</i> Multiphotonen-Endoskopie	89
6.1	Von der Tomographie zur Endoskopie	89
6.2	Endoskopische Systeme	90
6.3	Charakterisierung der optischen Eigenschaften	94
6.4	Klinische Studien	106
6.5	Fazit	113
7	Zusammenfassung	117
Literaturverzeichnis		119
A	IGOR-PRO Skripte	129
A.1	Konvergenz der Anpassungskurven	129
A.2	Auswirkungen von Rauschen	130
B	Reprints der vorab veröffentlichten Arbeiten	133

1 Einführung

Es ist seit jeher das Anliegen der Medizin, bei der Diagnose von Krankheiten und bei operativen Eingriffen den Patienten so wenig Schädigungen wie möglich zuzufügen. In den letzten Jahrzehnten haben durch die kontinuierliche technische Entwicklung Methoden wie Messung der elektrischen Signale des Körpers (EKG, EEG), Endoskopie und minimal invasive Operationsmethoden (Laparoskopie) einen festen Platz in der Medizintechnik erhalten. Dabei liegt das natürliche Bestreben der Forschung darin, nicht nur eine verbesserte Auflösung zu erreichen, sondern auch immer differenziertere körpereigene Signale verwerten zu können.

In der Früherkennung von Krankheiten oder auch bei der Erforschung der Wechselwirkung zwischen potenziellen Arzneiwirkstoffen sind mikroskopische Methoden gefragt, da sich viele Prozesse auf (sub)zellulärer Ebene abspielen. Ideal wäre die Möglichkeit, Signale aus dem molekularen Stoffwechsel selbst detektieren zu können. Etablierte Methoden wie Computertomographie (CT), oder Sonographie vermögen nur über unterschiedliche Kontrasteigenschaften ein Bild der Morphologie zu vermitteln. Magnetresonanztomographie detektiert Signale der Atome im Körperinneren, lässt aber in klinischer Anwendung keine subzelluläre Auflösung in adäquater Zeit zu.

Eine nicht-invasive Untersuchungsmethode mit höchster Auflösung stellt die Methode der Multiphotonen-Mikroskopie, entwickelt durch Denk *et al.* im Jahr 1990 [1] dar. Mit einem Femtosekunden-Laser mit Wellenlängen im Nahen Infrarot (NIR) und Intensitäten zwischen MW/cm^2 bis GW/cm^2 werden in den Proben nichtlineare Effekte wie die gleichzeitige Absorption zweier oder mehrerer Photonen oder Frequenzvervielfachung angeregt. Die Anregung geschieht dabei ausschließlich in einem sub-Kubikmikrometer ($< \mu m^3$)-großen Fokusvolumen. Durch das *Optische Fenster* dringt die Strahlung sehr tief in Zellen und ganze Gewebeproben ohne schädliche Wechselwirkung ein. Dabei muss die Probe nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sein, sondern es ist auch möglich, die endogenen (Zell- oder Gewebe-eigenen) Fluorophore zur Autofluoreszenz anzuregen. Damit sind intrinsische Eigenschaften des Gewebes und der Zellen zugänglich. Die Signale liegen zumeist im sichtbaren Wellenlängenbereich und stammen aus einem räumlich eng begrenzten und somit zuordbaren Ort, so dass au-

tomatisch eine 3D-Information (*optical sectioning*) generiert wird. Mittlerweile wird diese Methode in der biologischen Forschung angewendet und stetig weiterentwickelt [2, 3]. Dabei werden Fokussieroptiken mit hoher numerischer Apertur und mehreren Zentimetern Durchmessern eingesetzt. Im klinischen Bereich können daher nur offen zugängliche Körperregion untersucht werden. Deshalb ist bisher die Anwendung auf die Multiphotonen-Tomographie der humanen Haut *in vivo* [4, 5, 6, 7] beschränkt.

Als Basis für eine Erweiterung auf endoskopische Übertragungssysteme für Femtosekunden-Laserstrahlung sind Gradientenindex-Linsen (*GRIN-Linsen*) ideal geeignet. Sie kombinieren Übertragungs- und Strahlformungssystem und eröffnen für Femtosekunden-Laserstrahlung die Möglichkeit, einer verlustarmen Übertragung [8]. GRIN-Linsen besitzen einen geringen Durchmesser (0,5-3 mm), sind kompakt und lassen sich durch plane Grenzflächen leicht kombinieren. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Ergebnisse von Jung *et al.* [9, 10], Levene *et al.* [11] und Goebel *et al.* [12] veröffentlicht. Hier werden GRIN-Linsen als Miniaturendoskop zur minimalinvasiven Untersuchung tiefliegender Mäusegehirn-Arreale eingesetzt. Neuere Entwicklungen sind flexible Ansätze [13], [14] und [15]. In allen zitierten Fällen muss das Gewebe mit bioverträglichen Farbstoffen markiert sein, um gute Bildqualität zu erreichen [16]. Diese Farbstoffe haben eine um mehrere Größenordnungen höhere Quanteneffizienz als die natürlichen Fluorophore.

Das Konzept eines starren Miniaturendoskops auf GRIN-Linsen-Basis soll in der vorliegenden Arbeit für die Erweiterung des schon bestehenden Multiphotonen-Tomographen genutzt werden. Im Gegensatz zu den bekannten Arbeiten soll aber weiterhin ohne Farbstoffe gearbeitet werden, was bedeutet, dass das Detektionsvermögen für die Autofluoreszenz endogener Fluorophore ausreichend sein muss. Ziel ist ein Einsatz in für die große Fokussieroptik unzugängliche Hautgebiete und als minimalinvasives Endoskop für schwer zugängliche Körperregionen. Nach der Entwicklung und Charakterisierung der endoskopischen Systeme wird der Einsatz der Prototypen in klinischen Studien untersucht.

Zur Generierung eines Bildes wird in der klinischen Multiphotonen-Tomographie die Intensität des Fluoreszenzsignals genutzt. Die zeitliche Charakteristik der Fluoreszenz beinhaltet aber zusätzlich noch Informationen über die molekulare Umgebung eines Fluorophors. Sie wird bei den Messmethoden für jeden Bildpunkt detektiert, wodurch eine große Menge an Daten erzeugt wird. Eine Aufgabe in der vorliegenden Arbeit ist es, eine Strategie zur Auswertung der zeitaufgelösten Bilder zu entwickeln, die die oben bereits erwähnte klinische verwertbare Analyse molekularer Stoffwechselsignale ermöglicht.

Die endoskopischen Systeme wurden in enger Zusammenarbeit mit der Firma *GRIN-TECH GmbH, Jena* konzipiert und entwickelt.

In Kooperation mit der *Uniklinik für Allergologie und Dermatologie, Jena* und der *JenLab GmbH* fanden klinische Studien am System der *JenLab GmbH* im Rahmen zweier Ethikanträge statt. Ebenso wurden die Endoskopsysteme dort an Biopsien und *in vivo* getestet. Im Rahmen dieser Kooperation konnten in Kap. 5.4 daher für statistische Zwecke auf eine größere Anzahl an Messungen zur Melanomdiagnostik zurückgegriffen werden.

Diese Arbeit baut auf verschiedenen Vorarbeiten der Gruppe Lasermedizin am IBMT auf. Der Tomograph war zuvor von der *JenLab GmbH* entwickelt und in Ref. [5] vorgestellt worden. Im Rahmen dieser Arbeit am Fraunhofer-IBMT lag das Augenmerk auf einer potentiellen Applikation physikalischer Methoden in der diagnostischen Forschung.

Einführung

2 Grundlagen

2.1 Signalentstehung

Im Folgenden werden die Mechanismen vorgestellt, die in der Multiphotonen-Tomographie zur Entstehung des Signals beitragen. Wie auch beispielsweise in der Konfokalen Mikroskopie werden die punktweise detektierten Signale mit dem Rasterscanning-Prinzip zu einem Bild zusammengesetzt.

Bei stark erhöhten Lichtintensitäten treten nichtlineare Effekte auf, die zur Bildentstehung genutzt werden. Die gleichzeitige Absorption von zwei (oder mehreren) Photonen wurde schon 1931 durch Göppert-Mayer [17] vorhergesagt, konnte aber erst 1961 durch Kaiser und Garrett [18] nachgewiesen werden. Die Entwicklung von Lasern mit ultrakurzer Pulsdauer im fs-Bereich ermöglichte die Weiterentwicklung zur Multiphotonen-Mikroskopie durch Denk 1990 [1]. Die nötigen Intensitäten werden durch die zeitliche Konzentration der Energie in kurzen Pulsen und eine räumliche Konzentration durch Fokussierung in einem Volumen von unter einem bis wenige Kubikmikrometer (μm^3) Größe erzeugt. Ausserhalb dieses Bereiches dominiert die lineare Wechselwirkung zwischen Laserstrahlung und Probe.

2.1.1 Multiphotonen-Anregung

Eine quantenmechanische Beschreibung der Multiphotonen-Absorption findet sich beispielsweise in [19] oder [20], im Folgenden werden kurz die Mechanismen erläutert. Lichtabsorption ist eine resonante Kopplung zwischen einer einfallenden elektromagnetischen Welle und den Zuständen eines Moleküls. Dabei gibt das Strahlungsfeld quantisierte Energie in Form von einem oder mehreren Photonen an das Molekül ab, wobei die Gesamtenergie der Photonen gleich dem Energieunterschied der Molekülzustände ist. In Abb. 2.1 ist dies schematisch skizziert und wird im Folgenden für die Zweiphotonen-Anregung beschrieben.

Der Hamilton Operator \mathbf{H} wird als Summe aus dem Operator für den ungestörten zu-

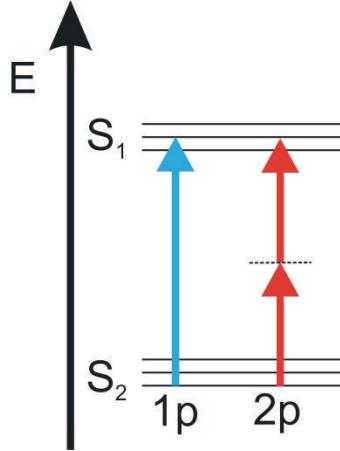


Abb. 2.1: Ein- und Zweiphotonen-Anregung in einem Jablonski-Diagramm skizziert. Statt eines einzelnen Photons können auch zwei Photonen (hier mit gleicher Energie) absorbiert werden. Die gepunktet Linie bezeichnet das virtuelle Zwischenniveau.

stand \mathbf{H}_0 und dem Störtherm \mathbf{H}^S angesetzt. Damit lautet die Schrödinger-Gleichung:

$$i\hbar\partial_t\Psi = (\mathbf{H}_0 + \mathbf{H}^S)\Psi \quad (2.1)$$

Dabei ist \mathbf{H}_0 zeitunabhängig, so dass die Lösung des ungestörten Systems mit den Eigenfunktionen ϕ_k und den Energien E_k

$$\Psi_k^0 = e^{\frac{i}{\hbar}E_k t}\phi_k \quad (2.2)$$

für den gestörten Fall zu

$$\Psi(t) = \sum_{k=1}^{\infty} c_k(t)\Psi_k^0 \quad (2.3)$$

entwickelt werden kann. Wegen (2.2) gilt für das Matrixelement $\mathbf{H}_{kl}^S = \langle \Psi_k^{0*} | \mathbf{H}^S | \Psi_l^0 \rangle$

$$\mathbf{H}_{kl}^S = \mathbf{H}_{kl}^S(0)e^{i\omega_{kl}t}. \quad (2.4)$$

Wenn nur Prozesse zweiter Ordnung betrachtet werden, kann für den speziellen Fall der Zweiphotonen-Absorption vom Grundzustand Φ_a in einen angeregten Zustand Φ_e ein effektiver Störterm

$$\mathbf{H}_{\Phi_e, \Phi_a}^{S,\text{eff}} = \sqrt{n}\sqrt{n-1} \sum_{\Phi_z} \frac{\mathbf{H}_{\Phi_e, \Phi_z}^{S,\text{eff}} - \mathbf{H}_{\Phi_z, \Phi_a}^{S,\text{eff}}}{E_{\Phi_z} - E_{\Phi_a} + h\nu_0} \quad (2.5)$$

konstruiert werden. Dabei wird berücksichtigt, dass in diesem Fall in einem Lichtfeld von n Photonen vom Zustand Φ_a ausgehend zunächst durch den Störoperator $\mathbf{H}_{\Phi_z, \Phi_a}^{\text{S,eff}}$ ein Photon vernichtet wird und in einem zweiten Schritt durch $\mathbf{H}_{\Phi_e, \Phi_z}^{\text{S,eff}}$ noch ein weiteres Photon. Hier sind E_{Φ_z} und E_{Φ_a} die Energien des Zwischen- und Grundzustandes. Da die Übergangswahrscheinlichkeit W pro Sekunde proportional zum Absolutquadrat von (2.1) ist, ergibt sich zunächst

$$W \propto n(n - 1) \quad (2.6)$$

und für genügend große n darf

$$n(n - 1) \cong n^2 \quad (2.7)$$

angenommen werden.

Quantentheoretisch kann also die Zweiphotonen-Absorption durch die Einführung eines virtuellen Zwischenniveaus erklärt werden. Das erste Photon bringt ein Elektron auf dieses virtuelle Zwischenniveau und das zweite auf den realen angeregten Zustand. Diese Wechselwirkung muss auf der Zeitskala des Anregungsprozesses erfolgen, also innerhalb von $\approx 10^{-15}$ s. Die einzelnen Photonen müssen nicht die gleiche Energie besitzen, in der Praxis ist die Anregung mit einer einzigen Wellenlänge aber leichter realisierbar.

Für die Zweiphotonen-Absorption gelten andere Auswahlregeln als für die Einphotonen-Absorption: Bei letzterer ändert sich in den Wellenfunktionen von Anfangs- nach Endzustand die Parität, bei der Zweiphotonen-Absorption bleibt sie erhalten. Die Spektren sind meist sehr ähnlich, eventuell etwas blauverschoben.

Während die Einphotonen-Absorptionsrate linear proportional zur eingestrahlten Intensität I ist

$$W_{ab}^1 \propto \delta_1(\lambda)I, \quad (2.8)$$

hängt nach (2.6) die Zweiphotonen-Absorptionsrate W_{ab}^2 proportional mit dem Quadrat der Anregungsintensität zusammen:

$$W_{ab}^2 \propto \delta_2(\lambda)I^2, \quad (2.9)$$

dabei steht δ_2 für den wellenlängenabhängigen Zweiphotonen-Anregungsquerschnitt. Er wird in der Einheit Göppert-Mayer angegeben ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ m}^4 \text{s}$).

Die Anregungswahrscheinlichkeit eines Moleküls wird zu [1]

$$n_a = \frac{P_{av}^2 \delta_2}{\tau f^2} \left(\frac{(NA)^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2 \quad (2.10)$$

dabei ist P_{av} die mittlere Leistung des Lasers, τ die Pulsbreite (FWHM), f die Repetitionsrate, NA die Numerische Apertur des Objektivs, λ die Laser-Wellenlänge und \hbar die

reduzierte Planck-Konstante.

Zumeist werden die nötigen Photonendichten (und damit hohe (Laser-)Intensitäten) durch Verwendung von kurzen Laserpulsen und beugungsbegrenzter Fokussierung durch hochaperturige Objektive erzeugt. Im Fall der Multiphotonen-Mikroskopie werden (wegen des interessanten Wellenlängenbereichs) als Laserquellen häufig Ti:Sa-Laser mit Pulslängen von typischerweise 100 fs und Repetitionsraten von 80-100 MHz eingesetzt. Die Verteilung der Intensität $U(P)$ in einem Punkt P der Nähe des geometrischen Fokus einer Linse kann mit Hilfe des Huygens-Fresnel'schen Prinzips beschrieben werden [21], siehe dazu Skizze in Abb 4.4. Für kreisförmige Aperturen werden Zylinderkoordinaten ρ, z, θ verwendet, wobei bei der Betrachtung die Winkelkoordinate θ aus Symmetriegründen vernachlässigt werden kann. Für eine allgemein gültige Beschreibung werden normierte Koordinaten u, v eingeführt, indem die Wellenlänge des Lichts λ , der Radius der Aperturblende a und die Brennweite der Linse f in u und v integriert werden:

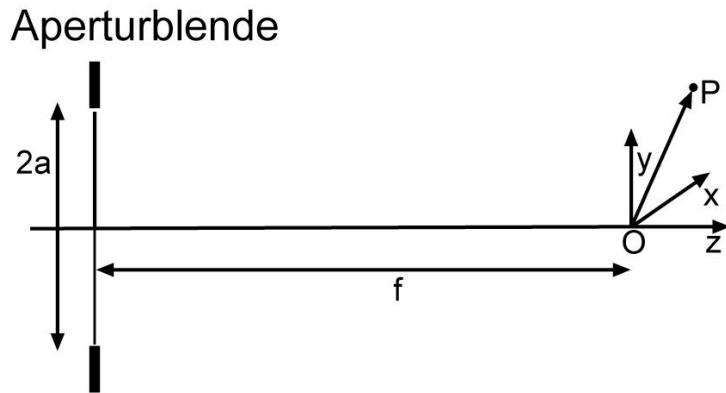


Abb. 2.2: Zur Herleitung der Intensitätsverteilung im Fokus einer Linse

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f} \right) \rho \quad (2.11)$$

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f} \right) z. \quad (2.12)$$

Die Intensität wird nun beschrieben durch

$$I(u, v) = \left| 2 \int_0^1 J_0(v\rho) e^{-\frac{1}{2}iu\rho} d\rho \right|^2 \quad (2.13)$$

Für die Praxis sind die lateralen und axialen Verteilungen der Intensität von Bedeutung. Die Integrale lassen sich analytisch lösen:

$$I(0, v) = \left| \frac{2J_1(v)}{v} \right|^2 \quad (2.14)$$

$$I(u, 0) = \left| \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right|^2 \quad (2.15)$$

Im Fall von Zweiphotonen-Anregung ist die Anregungswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Intensität, daher gilt:

$$I_{\text{radial}}^{2P} = \left| \frac{2J_1(v)}{v} \right|^4 \quad (2.16)$$

$$I_{\text{axial}}^{2P} = \left| \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right|^4 \quad (2.17)$$

Beide Gleichungen sind in Abb. 2.3 graphisch dargestellt. Die axiale Intensitätsverteilung

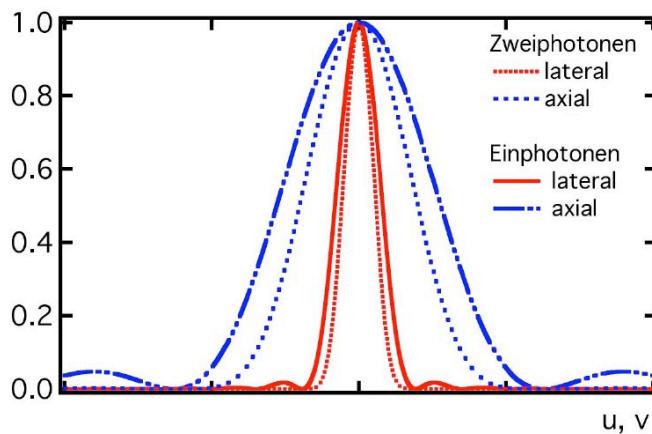


Abb. 2.3: Vergleich der lateralen (rot) und axialen (blau) Intensitätsverteilung für die Ein- und Zweiphotonen-Anregung.

besitzt eine größere Halbwertsbreite als die laterale. Durch die vierte Potenz werden die Nebenmaxima der Besselfunktion und der Sinc-Funktion weitgehend unterdrückt, daher ergibt sich auch bei hoher Leistung nur im Hauptmaximum genug Intensität zur Anregung. Im Vergleich zur Einphotonen-Intensitätsverteilung (in Abb. 2.3 gepunktet dargestellt) ist das Fokusvolumen im Fall der Zweiphotonenanregung kleiner.

2.1.2 Fluoreszenz

Entstehung und zeitlicher Verlauf

Lumineszenz bezeichnet allgemein die Aussendung elektromagnetischer Strahlung durch Moleküle bzw. Atome. Hierbei sind zwei verschiedenen Effekte zu unterscheiden: Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Fluoreszenzemission ist eine Sequenz mehrerer Einzelprozesse und ist durch folgendes Schema veranschaulicht (Abb. 2.4):

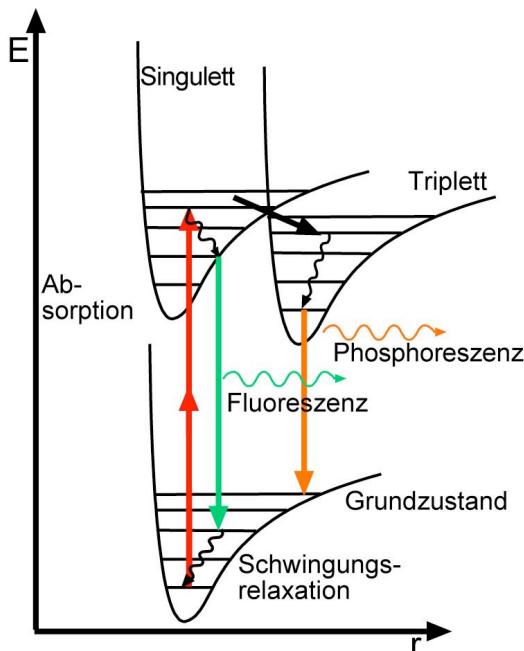


Abb. 2.4: Fluoreszenz: Anregung in einen energetisch höheren Zustand, interne Schwingungsrelaxation, Fluoreszenz in den Grundzustand und interne Schwingungsrelaxation im Grundzustand.

- Anregung von Elektronen aus dem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 ohne Änderung des Spins
- interne (strahlungslose) Relaxation im angeregten Zustand auf das niedrigste vibronische Niveau
- strahlender Übergang in den Grundzustand
- interne (strahlungslose) Relaxation im Grundzustand

Absorption geschieht auf einer Zeitskala von 10^{-15} s, interne Relaxation auf einer Zeitskala von 10^{-12} s, Emission von Fluoreszenzlicht erfolgt im Mittel innerhalb von etwa 10^{-9} s. Die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung ist im Gegensatz zur Wellenlänge der Einphotonen-Anregung aus Gründen der Energieerhaltung rotverschoben (*Stokes-Shift*).

Vom angeregten Zustand besteht für das Molekül die Möglichkeit durch *Intersystem crossing* in den Triplet-Zustand S_1^* überzugehen. Dies ist ein quantenmechanisch verbotener Übergang, der die Änderung der Spinquantenzahl bedingt. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes liegt hier im Rahmen von 10^{-6} s bis Sekunden und die ausgesendete Strahlung wird als *Phosphoreszenz* bezeichnet.

Bezeichnet k_{ij} die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül (oder Atom) vom Zustand $|i\rangle$ in den energetisch tieferen Zustand $|j\rangle$ übergeht, dann ist die Anzahl der im Intervall dt übergehenden Moleküle

$$dN_i = -k_{ij}N_i dt \quad (2.18)$$

und damit gilt

$$N_i(t) = N_i(0)e^{-k_{ij}t} \quad (2.19)$$

In der Zerfallskonstante k_{ij} sind alle Zerfallskanäle repräsentiert. Es tragen nicht nur reine strahlende Dipolübergänge k_f , von $|i\rangle$ nach $|j\rangle$ bei, sondern auch Übergänge, bei der die Energie strahlungslos umgewandelt wird, wie Intersystem crossing k_{ic} oder inelastische Stöße k_q . Diese Stöße übertragen die Energie auf ein anderes Molekül (*Quenching*), wodurch die Lebensdauer abhängig von der Konzentration des Stoffes wird. Eine weitere Möglichkeit ist interne Konversion k_k , bei der die Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Als mittlere Lebensdauer τ ist der Kehrwert von k_{ij} definiert

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_q + k_k} \quad (2.20)$$

Für die Fluoreszenzintensität I ergibt sich somit

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2.21)$$

Messung der Fluoreszenz: Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *Zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung* (*time-correlated single photon counting, TCSPC*) eingesetzt, um das zeitliche Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals zu messen. Eine ausführliche Beschreibung des Prinzip des TCSPC findet sich in [22].

Jeder Laserpuls regt mehrere Moleküle zur Fluoreszenz an, die eine gewisse Lebensdauer in diesem angeregten Zustand besitzen und typischerweise nach einer mittleren Zeit von einigen Nanosekunden wieder in den Grundzustand zurückkehren. Das Messprinzip des TCSPC macht sich die Tatsache zunutze, dass bei Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer die mittlere Signalintensität in jeder Periode zwischen zwei Laserpulsen sehr niedrig ist, und erst durch die Summation aller Signale in einem Zeitabschnitt verwertbare Informationen entstehen. Aus diesem Grund reicht es aus, die Zeitdauer zwischen Detektion eines Photons und initierendem Laserpuls zu messen. Der Detektor liefert so während einer Messung eine Folge zufallsverteilter Zeitwerte, die den Ankunftszeiten der Photonen entsprechen. Anschließend werden die Messungen in jedem Zeitabschnitt addiert und es ergibt sich das gesamte zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal. Der zeitliche Verlauf ist digitalisiert mit einer Mindestbreite von 1 ps. Die maximale Anzahl der Photonen pro Periode darf im Mittel nicht größer sein als 0,01-0,1 (dies entspricht ca. $10^6 - 10^7$ Photonen/s), sonst ist das Messprinzip nicht mehr anwendbar. Zu viele Photonen würden zu verfälschten Ergebnissen führen, und die Lebenszeiten würden als zu kurz bestimmt werden (*Pile-up-Effekt*).

Wird die Erfassung der Lebensdauer mit dem Synchronisationssignal des Mikroskops gekoppelt, wird für jeden abgerasterten Bildpunkt ein Fluoreszenzintensitäts-Verlauf aufgenommen (*Fluorescence lifetime imaging, FLIM*). Es ergibt sich eine Zeitreihe von Abklingkurven, die separat ausgewertet werden oder unter Verwendung des Synchronisationssignals zu einer dreidimensionalen (x, y, t) -Matrix zusammengesetzt werden können. Wird jede Kurve mit dem gleichen theoretischen Modell angepasst, können die Modellparameter in Form einer $(x, y, \text{Parameter})$ -Karte dargestellt werden. Auf diese Weise kann die räumliche Verteilung der Parameter in der untersuchten Probe rekonstruiert werden und erlaubt so Rückschlüsse auf die Position der Fluorophore innerhalb der Probe. Ein Histogramm der Karten zeigt die Verteilung einer oder verschiedener Anpassungsparameter auf und kann zur Auswertung der Fluoreszenzcharakteristik dienen. Statistisch gesehen stellt dieses Histogramm eine Erfassung aller Pixel des Bildes oder aller Elemente der Zeitreihe dar .

Durch die geringe Anzahl der Ereignisse pro Pulsperiode wird die Signalentstehung mit der Poisson-Statistik beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit, n Photonen zu zählen, beträgt

$$P_\lambda(n) = \frac{\xi^n}{n!} e^{-\xi}. \quad (2.22)$$

Eine typische Aufnahmezeit bei einer FLIM-Messung waren in dieser Arbeit 13,4 s pro Bild mit 256×256 Pixel, was einer mittleren Pixelzeit von $\approx 200 \mu\text{s}$ entspricht. Ein Bild-

punkt wird also über eine Zeit von vielen Pulsperioden vermessen und die Photonen summiert. Damit wird ξ bei 0,01 Photon pro Pulsperiode zu

$$\xi = \frac{200 \cdot 10^{-6} \text{s}}{0,01 \cdot 12,5 \cdot 10^{-9} \text{s}} \approx 1,6 \cdot 10^6 \quad (2.23)$$

Bei großen ξ geht die Form der Poisson-Verteilung in eine Gauß-Verteilung über. Die Zeitabschnitte zwischen Initiatorpuls und Ankunft eines Photons können sehr genau gemessen werden, begrenzendes Element für die Auflösung ist die zeitliche Breite des Detektors (*transient time spread, TTS*). Weiterhin bestimmt der gesamte Messaufbau, also die Pulsform des Lasers, disulative optische Elemente und Elektronik die Auflösung. Die Messung wird daher durch die Instrumentenantwortfunktion *IRF (instrument response function)* bestimmt, also der Antwort auf einen zeitlichen Delta-puls. Dieses Signal kann hinreichend genau durch ein streuendes Medium oder SHG-erzeugendes Medium (beispielsweise Kollagen) experimentell bestimmt werden.

Das vom Detektor gemessene Signal $I(t)$ ist eine Faltung aus Fluoreszenz

$$F(t) = \begin{cases} e^{-t/\tau} & t \geq 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.24)$$

und der IRF $R(t)$:

$$I(t) = F(t) \otimes R(t). \quad (2.25)$$

Wenn $R(t)$ durch eine Gaußverteilung

$$R(t) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{t^2}{\sigma^2}} \quad (2.26)$$

beschrieben werden kann, ist das Faltungsintegral analytisch lösbar [23]:

$$I(t) = \frac{1}{2} e^{-t/\tau} e^{-\frac{\sigma^2}{2\tau^2}} \Theta_k \left(\frac{\sigma}{\tau \sqrt{2}} - \frac{t}{\sigma \sqrt{2}} \right) \quad (2.27)$$

Dabei ist $\Theta_k(x) = 1 - \Theta(x)$ die *komplementäre Error-Funktion* mit

$$\Theta(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt. \quad (2.28)$$

Dieser Zusammenhang ist in Abb. 2.5 dargestellt. Im Fall eines Ensembles aus mehreren Fluoreszenzmolekülen mit unterschiedlicher Lebensdauer müssen (2.24) und (2.27) durch Summen von verschiedenen Kurven mit unterschiedlicher Lebensdauer τ_i erweitert werden:

$$F(t) = \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.29)$$

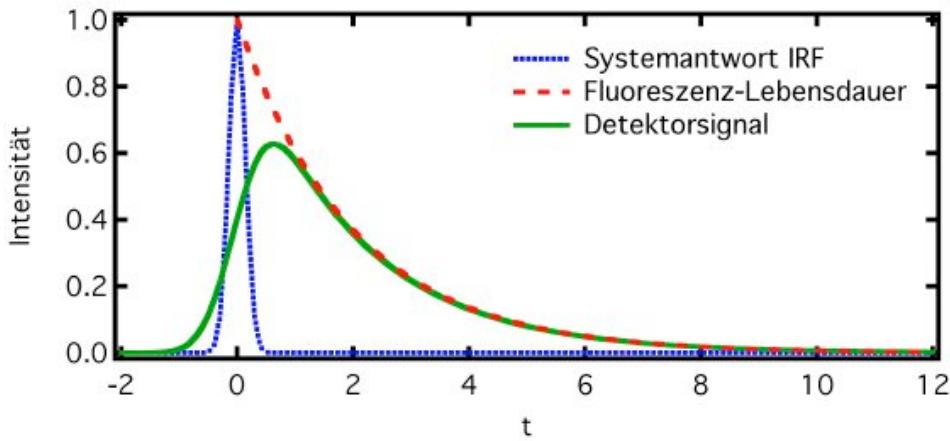


Abb. 2.5: Entstehung des Detektorsignals (grün) einer TCSPC-Messung aus Systemantwort (blau) und Fluoreszenz-Verlauf (rot).

Die Amplituden A_i beschreiben den relativen Anteil der jeweiligen Lebensdauern am Gesamtsignal.

2.1.3 Second Harmonic Generation

Als Frequenzverdopplung oder *Second Harmonic generation (SHG)* wird die instante Entstehung einer optischen Welle mit der doppelten Frequenz der Erzeugerwelle beim Durchgang durch ein nichtlineares optisches Medium mit speziellen Eigenschaften bezeichnet. Dieser Effekt wurde durch die Entwicklung des Lasers ermöglicht und erstmals 1961 von Franken *et al.* in kristallinem Quarz gezeigt [24].

Bei Bestrahlung mit hohen Intensitäten kommen bei der Polarisation \vec{P} eines Dielektrikums höhere Terme zu tragen:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi_1 \vec{E} + \varepsilon_0 \chi_2 \vec{E}^2 + \varepsilon_0 \chi_3 \vec{E}^3 + \dots \quad (2.30)$$

Dabei sind χ_n die Suszeptibilitäten der n -ten Ordnung. Für die Erzeugung der SHG wird der zweite Term betrachtet. In punktsymmetrischen Materialien ist $\chi_2 \neq 0$, und eine elektromagnetische Welle mit $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos(\omega t - \vec{k}\vec{r})$ mit $\vec{r} = (x, y, z)$ erzeugt am Ort z erzeugt eine x -Komponente der Polarisation ($|\vec{E}_0| \equiv E_0$) [25]

$$|\vec{P}_x| = \varepsilon_0 (\chi_1 E_{0x} \cos(\omega t) + \chi_2 E_{0x}^2 \cos^2(\omega t)) \quad (2.31)$$

$$= \frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi_2 E_{0x}^2 + \varepsilon_0 \chi_1 E_{0x} \cos(\omega t) + \frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi_2 E_{0x} \cos(2\omega t) \quad (2.32)$$

Analog gilt dies für die y, z -Komponenten. Das erzeugte elektromagnetische Feld besteht aus einem konstanten Term, einem linearen Term mit Frequenz der Eingangswelle und einem weiteren Term, der eine Welle mit doppelter Frequenz beschreibt. Läuft nun die Welle durch das Dielektrikum werden an jeder Stelle mikroskopisch Dipole, die mit den beiden Frequenzen schwingen, erzeugt. Addieren sich die Sekundärwellen phasenrichtig auf, wird eine makroskopische Sekundärwelle erzeugt. Die Bedingung der Phasenanpassung ist, dass die Brechungsindizes für Grund- und Oberwelle gleich sind, was für die Wellenvektoren

$$\vec{k}(2\omega) = 2\vec{k}(\omega) \quad (2.33)$$

bedeutet (Impulserhaltung).

Nach dem gleichen Prinzip können bei höherer Lichtintensität die dritte, vierte und höhere Harmonische erzeugt werden, wobei höhere Terme in (2.30) zum Tragen kommen und andere Symmetrieeigenschaften der Materialien vorhanden sein müssen. Von Bedeutung für die Mikroskopie ist neben SHG auch noch die *Frequenzverdreifachung* (*Third Harmonic Generation, THG*).

Beispiele für Kristalle, die SHG zeigen, sind Lithiumniobat, Kaliumtitanylphosphat (KTP) oder Lithiumtriborat (LBO). Natürlich in biologischem Gewebe vorkommende Materialien sind beispielsweise Kollagen [26], Polysaccharide (Stärke) [27, 28], Microtubuli (im Zellskelett) [29] und Myosin (Muskelfilamente) [30].

2.1.4 Auflösungsvermögen

Durch die intrinsischen Eigenschaften des Zweiphotonen-Effekts kann der Ursprung des Fluoreszenzsignals einem dreidimensionalen Raumpunkt zugeordnet werden. Die Fluoreszenzstrahlung wird mit dem Fokussierobjektiv wieder gesammelt und auf einen Detektor geleitet. Dabei muss die Fluoreszenzstrahlung nicht über die Scanspiegel zurückgeleitet werden, wie es bei konfokalen Mikroskopen notwendig ist. Die Strahlung trifft dort durch eine ortsfeste Blende in den Detektor. Meistens dienen Photomultiplier (PMT) oder Avalanche-Dioden (APD) als Detektor.

Als Maß für das Auflösungsvermögen eines Systems dient die *Punktspreizfunktion* (*point spread function, PSF*). Sie ist die Impulsantwort eines abbildenden Systems im Ortsraum und beschreibt die Form des Ausgangssignals, wenn am Eingang eine ideale punktförmige Quelle vorliegt.

In der Multiphotonen-Mikroskopie kann die PSF als Maß für das Auflösungsvermögen [31] experimentell folgendermaßen bestimmt werden: Nahezu punktförmige Quellen

wie fluoreszierende Mikrokügelchen mit geringerer Größe als die zu erwartende PSF werden als Probe verwendet. Die gemessene Intensität der Punktquelle beschreibt die PSF und verteilt sich, abhängig von der *numerischen Apertur* NA der verwendeten Fokussieroptik, lateral und axial gaußförmig, mit dem lateralen (ω_{xy}) und axialen (ω_z) $1/e^2$ -Radius [32]:

$$\omega_{xy} = \begin{cases} \frac{0,320\lambda}{\sqrt{2}NA} & NA \leq 0,7 \\ \frac{0,325\lambda}{\sqrt{2}NA^{0,91}} & NA > 0,7 \end{cases}; \quad \omega_z = \frac{0,532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (2.34)$$

Die Halbwertsbreite (FWHM) ergibt sich zu $\omega_i 2\sqrt{\ln(2)}$. Die in (2.16) und (2.17) beschriebene PSF kann gut mit einer Gaußkurve angepasst werden. Im Fall der axialen PSF beeinflusst das Verhältnis zwischen NA und Brechungsindex n des Gewebes deren Ausdehnung.

2.2 Gradientenindex-Linsen

Klassische optische Linsen bestehen aus einem Material mit homogenem Brechungsindex, bei denen die lichtbrechenden Eigenschaften durch gekrümmte Flächen erzeugt werden. Der Begriff *Gradientenindex*-Linse (GRIN-Linse) beschreibt Linsen aus inhomogenen Medien, bei denen die optischen Eigenschaften durch einen ortsabhängigen Brechungsindex beschrieben werden. Lichtstrahlen laufen auf gekrümmten Bahnen, da das Licht ständig in Richtung des größeren Brechungsindex gebrochen wird. In der Natur kommen Gradientenindex-Systeme häufig vor, z.B. die Linse im menschlichen Auge [33] oder die Erdatmosphäre (verschiedene Luftsichten).

Da in diesen Linsen das Material selbst für die Brechung verantwortlich ist, können die Grenzflächen beliebig gestaltet werden. Besonders handlich werden Linsen mit planaren Grenzflächen, da so die Linsen einfach und platzsparend in Systeme integriert werden können. Anwendungen von GRIN-Linsen finden sich in der optischen Nachrichtentechnik, Unterhaltungsindustrie (CD-Player, Laserdioden, Kopierer, Scanner) und in der Medizintechnik [8]. In Abb. 2.6 sind zum Größenvergleich die in dieser Arbeit verwendeten GRIN-Linsen-Endoskope neben einem Mikroskop-Objektiv dargestellt.

Das am häufigsten in der Industrie angewandte Verfahren zur Herstellung von GRIN-Linsen stellt das Austauschionenverfahren dar [34, 35, 36]. Dabei werden die Gläser in Hochtemperatur-Salzschorze getaucht. Durch Diffusionsprozesse werden die Ionen im Glas mit den Ionen der Schmelze ausgetauscht. Auf diese Weise hergestellte Linsen werden in dieser Arbeit verwendet. Weitere Herstellungsverfahren sind CVD (Chemical



Abb. 2.6: GRIN-Linsen im Größenvergleich mit einem Standard-Mikroskop-Objektiv

Vapor Deposition), bei dem unter Vakuum Schichten mit unterschiedlichem Brechungsindex abgeschieden werden, oder der Molecular-Stuffing-Prozess, bei dem Diffusionsprozesse in einem porösen Glas in wässrigen Lösungen ausgenutzt werden. Durchmesser der GRIN-Linsen liegen typischerweise in der Größenordnung einiger Millimeter. Die allgemeine Theorie zum optischen Verhalten von GRIN-Linsen wird ausführlich in Ref. [37] beschrieben, die für diese Arbeit wesentlichen Zusammenhänge sollen im Folgenden dargestellt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten GRIN-Linsen besitzen einen durch die Charakteristik der Ionendiffusion definierten, radial variierenden Brechungsindex $n(r)$, der sich durch den Brechungsindex im Zentrum der Verteilung n_0 und der material- und herstellungsabhängigen Gradientenkonstante g mit $g(z) = \text{const.}$ beschreiben lässt:

$$n(r) = n_0 \operatorname{sech}(gr) = n_0 + n_0 \frac{1}{2} (gr)^2 + \mathcal{O}(r^4) \quad (2.35)$$

Treffen Strahlen wie in Abb. 2.7 (a) skizziert von einem Punkt im Abstand d von der Linse auf die Oberfläche einer GRIN-Linse, werden sie zuerst am Übergang beider Medien gebrochen. Der Verlauf im Medium folgt einer sinusförmigen Trajektorie. Die charakteristische Länge, nach der die Periodizität einmal durchlaufen wurde, heißt Pitch P und ist mit der physikalischen Länge l und der Gradientenkonstante verknüpft zu $P = 2\pi/gl$. Da die Linse einen begrenzten Radius a besitzt, existiert ein maximaler Abstand $a_e \leq a$ von der optischen Achse, so dass Strahlen, die weiter entfernt auf die Linse treffen, in ihr nicht vollständig weitergeleitet werden (vgl. Abb. 2.7). Liegt der Punkt auf der optischen Achse, entspricht der Radius a_e in Abb. 2.7 der effektiven

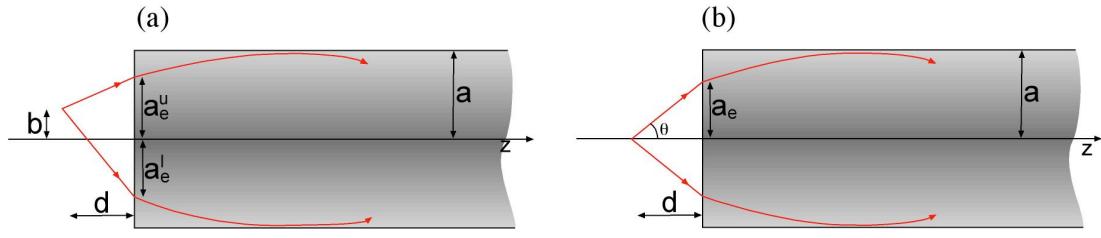


Abb. 2.7: Zur Herleitung der GRIN-Optik

Apertur der GRIN-Linse und die numerische Apertur NA_{in} kann beschrieben werden durch

$$\text{NA}_{\text{in}} = \frac{n_0 a_e g}{\sqrt{1 + n_0^2 g^2 (a^2 + d^2)}}, \quad (2.36)$$

dabei ist a der Radius der GRIN-Linse und d der Abstand vom Bildpunkt zur Linsengrenzfläche. Die Abbildungseigenschaften optischer Systeme lassen sich auch in der Matrix-Schreibweise (ABCD-Matrix) ausdrücken. Sie lautet für GRIN-Linsen mit Länge l :

$$M = \begin{pmatrix} \cos(gl) & \frac{1}{n_0 g} \sin(gl) \\ -g n_0 \sin(gl) & \cos(gl) \end{pmatrix} \quad (2.37)$$

Ist gl ein ganzzahliges Vielfaches von 2π wird $M=\mathbb{1}$. Dies bedeutet, dass ein Strahl, der unter einem bestimmten Winkel und einem bestimmten Abstand von der optischen Achse in die Linse eindringt, sie unter dem gleichen Winkel und im gleichen Abstand wieder verlässt. So erzeugt beispielsweise ein fokussierter Strahl auf der Eintrittsstelle wieder einen Fokus nach der Länge l , ein kollimierter Strahl verlässt die Linse kollimiert. Eine $0,25P$ -Linse ist in ihrer Funktion einer ‘normalen’ Sammellinse vergleichbar.

Je nach Geometrie und Länge der Linse müssen auch noch die Vergrößerungen der Linse in lateraler Richtung m_l und axialer Richtung m_a berücksichtigt werden. Sie können mit Hilfe des ABCD-Matrix-Formalismus hergeleitet werden. Die Vergrößerung ergeben sich damit bei einer Linse der Länge d zu

$$m_l = \cos(gd) - n_0^2 g \frac{d'}{n'} \sin(gd) \quad (2.38)$$

$$m_a = \frac{(n' \cos(gd) - n_0^2 d g \sin(gd))}{n n'} \quad (2.39)$$

und es gilt der Zusammenhang

$$m_a = -\frac{n_{\text{ob}}}{n_{\text{im}}} m_l^2. \quad (2.40)$$

Dabei sind n_{ob} und n_{im} jeweils die Brechungssindizes ausserhalb der Linse im Objekt- und Bildraum. Aus der einfachen Messung der lateralen Vergrößerung mittels Kalibrierproben lässt sich die axiale Vergrößerung berechnen.

2.3 Haut und Hautanhangsgebilde

Aufbau der Haut

Der Aufbau der Haut wird hier kurz dargestellt. Eine ausführliche Beschreibungen findet sich beispielsweise in Ref. [38].

Mit bis zu etwa 2 m^2 Oberfläche stellt die Haut das größte Organ des Menschen dar. Sie erfüllt wesentliche Aufgaben als Sinnesorgan, bietet als Hüllorgan Schutz vor der Umwelt, regelt den Wärmeaushalt des Körpers und erfüllt Aufgaben im Stoffwechsel. Daneben übernimmt die Haut als Grenz- und Schutzorgan auch wichtige Funktionen in der menschlichen Psyche.

In der Dermatologie ist ein weites Feld an verschiedenen Hauterkrankungen bekannt, unter anderem Infektionserkrankungen (Bakterien, Viren, Pilze, usw.), Erkrankungen der Hautanhangsgebilde (Drüsen, Haare), Intoleranzreaktionen (z.B. Neurodermitis), Autoimmunerkrankungen (z.B. Kollagenosen) und Hautkrebs, insbesondere Melanome.

Die Haut ist in drei Schichten unterteilt: Epidermis, Dermis und Subcutis (Oberhaut, Leiderhaut und Unterhaut). Mit der bisher klinisch eingesetzten Multiphotonen-Mikroskopie ist die Epidermis und Dermis zugänglich. Grund für diese Beschränkung der Ein dringtiefe ist der Arbeitsabstand der eingesetzten Objektive (max. $200 \mu\text{m}$) [5]. Die Epidermis selbst unterteilt sich wieder in verschiedene Schichten, wie in Abb. 2.8 skizziert. Die oberste Schicht ist das *stratum corneum*. Es besteht aus abgestorbenen Zellen, den Keratinozyten, deren Überreste ein verhorntes Plattenepithel aus Keratin bilden. Dieser Abbau geschieht im *stratum granulosum*. Tiefer in der Epidermis im *stratum spinosum* finden sich lebende Zellen, die im *stratum basale* gebildet werden. Sie ist die unterste Schicht der Epidermis, zur Dermis durch eine Membranschicht abgegrenzt und gut mit Nährstoffen versorgt. Durch die ständige Zellteilung werden die Keratinozyten nach aussen verschoben. Auf diesem Weg werden die Zellen ständig flacher, größer (etwa $20 \mu\text{m}$) und bilden in ihrem Inneren Keratin. Zusätzlich zu Keratinozyten findet man in der Epidermis auch Melanozyten im Bereich der Basalschicht, sowie Langerhanszellen (Abwehrzellen), die Bestandteil des Lymphsystems sind. Die Melanozyten versorgen die Zellen der Epidermis mit Melanin als Lichtschutz gegen schädliche UV-Strahlung.

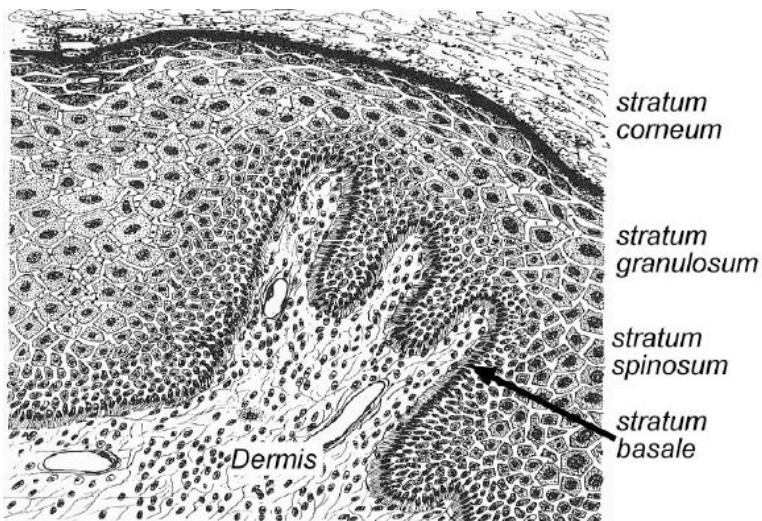


Abb. 2.8: Schnitt durch die Epidermis und obere Dermis. Aus Ref. [39]

Sie kommen vermehrt in Nävi vor. Haarkanäle und Poren durchziehen die Epidermis von der Dermis aus.

Die Dermis besteht aus Bindegewebsfasern (hauptsächlich Kollagen Typ I und Elastin), sowie Blutgefäßen, Haarwurzeln, Hautdrüsen und Sinneszellen. Die oberste Schicht der Dermis, die auch in den Tomographien erfasst werden kann, bildet das *stratum papillare*. Hier sind die verschiedenen Zellen (Abwehrzellen und Zellen, die für die Gewebebildung verantwortlich sind) weit voneinander entfernt.

Die Subkutis ist die unterste Hautschicht. Sie besteht aus Fettgewebe und die Haut versorgende Blutgefäßen und Nerven. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie nicht untersucht.

Aufbau des Haares

Das menschliche Haar ist das am meisten untersuchte Hautanhangsgebilde. Von verschiedenen Gruppen wurde die chemische Zusammensetzung und die Struktur untersucht [40, 41]. Eine ausführliche Beschreibung des Aufbaus eines Haares findet sich in Ref. [41]. Aus dem Haarfollikel, einer Vertiefung in der Haut, wächst das Haar aus dem Körper heraus. Es ist aus drei unterschiedlichen Lagen aufgebaut und besteht hauptsächlich aus Keratin. Die äußerste Schicht heißt Cuticula (Schuppenschicht), bei der Keratinzellen übereinanderliegend wie Schuppen um das Innere angeordnet sind. Die Dicke dieser Schicht beträgt im Durchschnitt etwa $5 \mu\text{m}$. Der Hauptteil des Haares wird als Cortex bezeichnet und besteht aus spindelförmigen Zellen mit einer typischen Länge von $100 \mu\text{m}$, die wiederum aus Makrofibrillen, (ebenfalls fadenförmige Zellen)

aufgebaut sind. Die innerste Schicht wird als Medulla bezeichnet. Hier sind die Zellen größer und weniger stark verbunden und von großen, luftgefüllten Zwischenräumen abgetrennt. Diese Schicht kommt ausschließlich in dicken Haaren vor. Typische Durchmesser menschlicher Haare liegen zwischen 55 und 85 μm [40] mit leicht ovalem Querschnitt.

Für die Haarfarbe sind Melaningranula verantwortlich, die sich hauptsächlich im äußersten Bereich des Cortex befinden. Sie haben eine Größe von ca. $0,8\text{--}1,0 \mu\text{m} \times 0,3\text{--}0,4 \mu\text{m}$ [40]. Von den drei verschiedenen Melaninsorten Eumelanin, Phaeomelanin und Neuro-melanin werden nur die ersten beiden in Haaren gefunden. Phaeomelanin ist für rote und blonde Haare das fargebende Pigment, während Eumelanin dies in schwarzen und braunen Haaren ist.

Nävus

Ein Nävus ist allgemein eine gutartige Veränderung in der Haut oder Schleimhaut. In dieser Arbeit von Bedeutung sind *Nävuszellnävi* oder epidermale Nävi, umgangssprachlich Muttermale, die durch vermehrte Anzahl von Melanozyten bräunlich eingefärbte Bereiche in der Haut bilden.

Hautkrebs

Es gibt verschiedene Formen des Hautkrebs, die durch bösartige Veränderungen verschiedener Zelltypen in der Haut entstehen. Besonders häufige Ausbildungsarten finden sich in den Epithelzellen (Beispiele sind Basalzellkarzinom, aktinische Keratose) und in den Melanozyten (Malignes Melanom). Weitere Arten des Hautkrebs sind bekannt.

Das Maligne Melanom ist ein bösartiger melanozytärer Tumor. Diese Form des Krebs kann in vorher klinisch normaler Haut oder Nävuszellnävi entstehen. Ein histologisches Kennzeichen ist eine übermäßige Vermehrung der Melanozyten. Mit zunehmender Entwicklung beginnen diese, sich in allen Epidermislagen auszubreiten und aufzusteigen. Eine besondere Gefahr bildet dieser Tumor, da er metastasiert. In Deutschland macht das Maligne Melanom etwa 3% aller Krebsneuerkrankungen mit 13.700 Betroffenen aus, der Anteil an den Krebstodesfällen liegt bei 1% [42].

Um einen pigmetierten Bereich als Nävus zu identifizieren, werden in der Diagnostik verschiedene Methoden verwendet. Die einfachste ist die *ABCDE-Regel*: Eine bösartige Veränderung liegt vor, wenn der untersuchte Bereich in seiner Form (**A**symmetrie), unscharfen Begrenzung zum Nachbargewebe (**B**egrenzung), Farbe (**C**olour), Größe (**D**urchmesser), Oberflächenstruktur (**E**rhabenheit) auffällig ist. Der betroffene Hautbereich

kann auch nach dieser Regel in Vergrößerung mit einer Bildanalyse-Software (z.B. *Foto-finder, FotoFinder Systems GmbH, Deutschland*) untersucht werden. Ebenso kann mittels *Photodynamischer Therapie* sowohl Diagnose als auch Behandlung durchgeführt werden [43]. Im experimentellen Stadium [44] befinden sich Ultraschallmethoden mit Frequenzen >20 MHz, *Optische Kohärenz-Tomographie, OCT* [45] und konfokale Reflexions-Mikroskopie (z.B. *Vivascope, Lucid Inc., USA*). Zur eindeutigen Identifizierung dient letztendlich die histologische Untersuchung nach Biopsieentnahme.

Ulkus

Ein Ulkus ist ganz allgemein ein Geschwür der Haut oder Schleimhaut, bei dem die Oberfläche zerstört wird. Auf diese Weise entstehen oft sehr tiefe Wunden. In dieser Arbeit wurden Patienten mit der Diagnose *ulcus cruris* untersucht (im weiteren nur Ulkus). Diese Form entsteht durch mangelnde Versorgung des betroffenen Gewebes mit Nährstoffen, als Hauptgrund zählt *chronisch venöse Insuffizienz (CVI)*. Es entstehen dadurch Geschwüre und die Heilung wird verzögert, so dass lange andauernde Beschwerden auftreten. Diese führen zu einer schwierigen Behandlung, zudem sind verschiedene Prozesse während des Heilungsprozesses noch nicht vollständig aufgeklärt [46, 47].

2.4 Nichtlineare Optik in biologischem Gewebe

2.4.1 Natürliche Chromophore

In der klassischen Fluoreszenzmikroskopie werden dem untersuchten Gewebe oder den Zellen exogene Fluorophore zugesetzt. Viele dieser Farbstoffe binden spezifisch an bestimmte biologische Strukturen, beispielsweise DNA, Cytoskelett, Zellmembran oder erfüllen Marker-Funktionen wie eine Lebend-Tod-Färbung (*live-dead-assay*). Gemeinsam ist diesen Farbstoffen ein hoher Zweiphotonen-Anregungsquerschnitt. Beispiele für weit verbreitete Farbstoffe und deren Anregungsquerschnitt sind Rhodamin 6G mit 100 GM [48] oder *GFP*-Typen (*GFP: green fluorescent protein*) mit bis weit über 150 GM für [32]. Je nach Autor und Messmethode streuen diese Werte beträchtlich, da es sich hier um absolute Werte handelt und daher die Messung sehr schwierig ist.

Im Gegensatz dazu liegen die Anregungsquerschnitte der endogenen Fluorophore dagegen im Bereich von nur $10^{-3} - 10^{-1}$ GM.

Die optischen Parameter der natürlichen Fluorophore bei Zweiphotonen-Anregung sind von verschiedenen Autoren untersucht worden (z.B. [49, 50]). Hier folgt ein kurzer

Überblick über die wichtigsten optischen Eigenschaften.

Keratin

Von Keratin existieren eine große Anzahl verschiedener Arten in menschlichem Gewebe [51]. Das Maximum der Fluoreszenz liegt, je nach Anregung, zwischen 450 und 550 nm. Die Graphen in Abb 2.9 legen nahe, dass es sich hier um zwei oder mehr Absorptionsbanden handeln könnte. Keratin kann mit dem ganzen Wellenlängenbereich des Ti:Sa-Lasers angeregt werden, ein Effizienzmaximum befindet sich hier im Bereich um 750 nm. In Abb. 2.9 sind das Spektrum der Zweiphotonen-Anregung und der Anre-

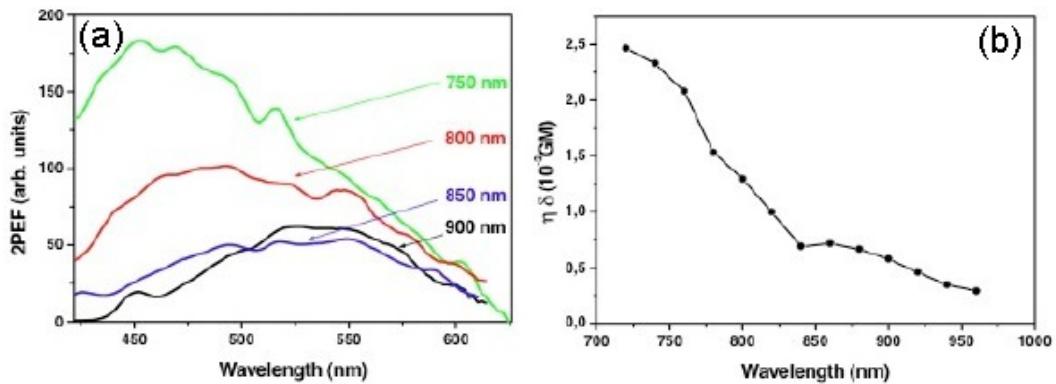


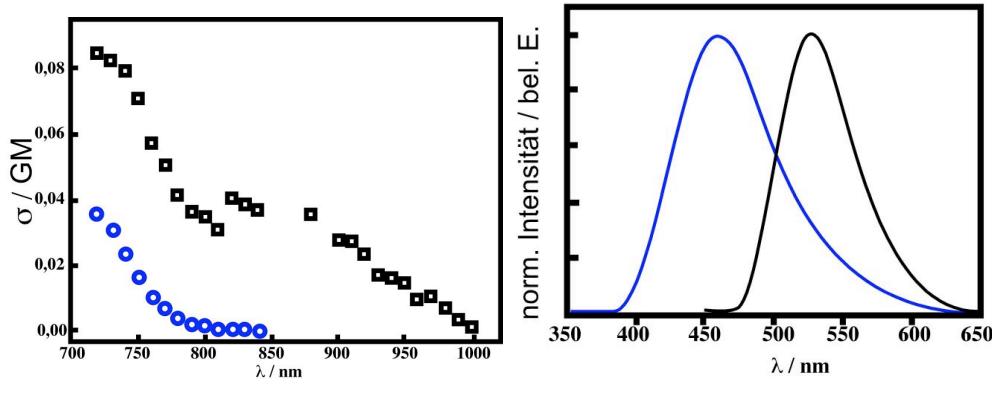
Abb. 2.9: Zweiphotonen-Anregung von Keratin (a) Fluoreszenzspektren bei Zweiphotonen-Anregung mit verschiedenen Wellenlängen und (b) Anregungsquerschnitt. Aus [52]

gungsquerschnitt aus [52] gezeigt.

NAD(P)H

NADH ist die Kurzform für die reduzierte Form von *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid*, einem Koenzym, das an verschiedenen Stoffwechselprozessen der Zelle beteiligt ist. NADPH ist die Kurzform für die reduzierte Form von *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat*. NADH dient als Wasserstofflieferant in der Atmungskette der Zellen, wo es oxidiert wird, um ATP (Energieeinheiten der Zellversorgung) zu erzeugen. NADPH dient als Wasserstoff-Lieferant in der Biosynthese (Erzeugung von Aminosäuren, Nukleinsäuren und weiteren Molekülen). Beide Stoffe werden in der Glykolyse freigesetzt und kommen hauptsächlich in den Mitochondrien der Zellen vor. Nur die reduzierte Form NAD(P)H fluoresziert im blauen Spektralbereich [49, 53, 54].

Das oxidierte (NAD(P)^+) dagegen zeigt keine Fluoreszenz. *In vivo* kommt NAD(P)H in freier und proteingebundener Form vor, dabei ändert sich die Fluoreszenz-Lebensdauer von typischerweise 0,3-0,5 ns im freien zu ca. 2,2-3,0 ns im gebundenen Zustand [55, 54, 56]. Die Anregungsquerschnitte von NAD(P)H sind in Abb. 2.10 dargestellt. Zu-



(a) Zweiphotonen-Anregungsquerschnitte von NADH und NADPH (blau), sowie von Flavin-Adenin-Dinukleotid (schwarz). (b) Emission nach Zweiphotonen-Anregung bei 730 nm von NAD(P)H (blau), Flavin-Adenin-Dinukleotid (schwarz).

Abb. 2.10: Anregung von NAD(P)H und FAD. Nach [57]

sätzlich sind in der aus Ref. [57] entnommenen Abbildung noch die Werte für *Flavin-Adenin-Dinukleotid / FAD* angefügt. FAD ist ein weiteres, in den Mitochondrien am Stoffwechsel beteiligtes Fluorophor. Es kann gleichzeitig mit NAD(P)H angeregt werden. Allerdings können wegen der geringen Stoffkonzentrationen in den Zellen die Fluoreszenzsignale von FAD vernachlässigt werden [57].

Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix [39]. Es ist wesentlicher Bestandteil von Knochen, Knorpel, Sehnen, Haut und Bindegewebe. Es besteht aus Polypeptidketten, die eine linksgängige Helix aufweisen. Drei solcher Helices sind zu einer rechtsgängigen Helix zusammengefasst, die wiederum Fibrillen (feine Fasern) bilden. Die Fasern sind sehr zugfest und dienen in Organismen dem Gewebezusammenhalt. Dieser periodische Aufbau besitzt die notwendigen Voraussetzungen, um aus intensivem Licht ein SHG-Signal zu erzeugen. Es existieren verschiedene Arten von Kollagen, der hauptsächlich in der Haut vorkommende wird als Typ I bezeichnet. Neben dem

SHG-Signal zeigt Kollagen auch eine schwache Fluoreszenz im blau-grünen Spektralbereich. Der für die Tomographie der Haut wesentliche Effekt ist die SHG-Generierung, da hier eine direkte Stoffidentifizierung möglich ist.

Elastin

Elastin ist ein weiterer Bestandteil des Bindegewebes. Es ist für die Elastizität und das Rückstellvermögen von Gewebe verantwortlich. Das Maximum der Zweiphotonen-Anregung, bei dem mehr als 50% der gesamten Fluoreszenz erzeugt wird, befindet sich zwischen 700 und 740 nm [50]. Elastin bildet in der Dermis netzwerkartige Strukturen.

Melanin

Melanine sind verschiedenfarbige Pigmente, die in Menschen, Tieren, aber auch Pflanzen vorkommen. Im Menschen finden sich drei Phänotypen: Eumelanin, Phäomelanin und Neuromelanin. Eumelanin besitzt eine bräunliche bis schwarze Farbe, und kommt hauptsächlich in Haut, braunen bis schwarzen Haaren und im Auge vor. Phäomelanin hat eine rot-gelbe Färbung und findet sich in der Haut und in blonden bis roten Haaren. Dunkle Haut besitzt dabei einen höheren Gehalt an Eumelanin als an Phäomelanin [58, 59]. Neuromelanin kommt in pigmentierten Zellen des Nervensystems vor.

Der Nachweis wird chemisch durchgeführt, indem im Fall von Eumelanin durch eine Oxidation mit Permanganat Pyrrol-2,3,5-Tricarbocysäure (PTCA) und im Fall von Phäomelanin durch Hydrolyse mit Iodwasserstoff Aminohydroxyphenylalanin (AHP) frei wird, dessen Konzentration durch Chromatographie bestimmt wird und so eine Quantifizierung des jeweiligen Gehalts zulässt [60]. Weitere Methoden sind Infrarotspektroskopie [61] oder Massenspektroskopie [62] zum Nachweis von Eumelanin. Keine der genannten Methoden konnte *in vivo* angewendet werden.

In einer Folgereaktion werden in den Melanozyten die beiden in der Haut auftretenden Melanintypen synthetisiert [60]. Dabei wird die Aminosäure Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und dann zu DOPA-Chinon, das zyklisiert und oxidiert zu Eumelanin wird. Phäomelanin entsteht aus DOPA-Chinon, das mit Schwefelwasserstoffen reagiert. Die genauen Strukturen sind allerdings noch nicht bekannt. Bisher war es auch noch nicht möglich, die natürlich vorkommenden Melanine vollständig synthetisch herzustellen. In vielen Eigenschaften kommt das künstlich hergestellte DOPA-Melanin dem natürlichen Melanin nahe.

Die Melanozyten geben das Melanin in Form von Melanosomen an die Keratinozyten in der Epidermis ab. Dazu sind sie gleichmäßig im *stratum basale* verteilt und versor-

gen jeweils mehrere Keratinozyten, die sie mit langen verzweigten Dendriten erreichen [38]. Beide Melaninarten werden in einem einzelnen Melanozyten synthetisiert, allerdings in unterschiedlichen Verhältnissen. Verschiedene Umweltreize, beispielsweise UV-Strahlung, verändern die Melaninproduktion, jedoch nicht die Anzahl der Melanozyten [38].

Der Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und den optischen Eigenschaften ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden [63]. In den Zellen übernimmt Melanin die Aufgabe als Photoprotektor der Zellen, indem es UV-Strahlung absorbiert und so die Keratinozyten und die tieferen Hautschichten vor schädlicher Strahlung schützt. Das Absorptionsspektrum von Melanin fällt monoton von UV hin zum NIR-Bereich ab [64]. Zur Zeit ist noch in der Diskussion, ob angeregtes Melanin freie Radikale bildet, die wiederum karzinogene Wirkung haben können [65, 64]. Von synthetischem Melanin wurde in Ref. [64] das Fluoreszenz-Spektrum bestimmt, sie sind zur Veranschaulichung in Abb. 2.11 dargestellt. Die Fluoreszenzlebensdauer konnte bisher nur mit einer Auflösung $> 200 \text{ ps}$ bestimmt werden: Teuchner et al. [64] fanden eine dreifach-exponentielle Abklingkurve von synthetischem Melanin in DMSO mit $\tau_1=0,2 \text{ ns}$, $\tau_2=1,5 \text{ ns}$ und $\tau_3=5,8 \text{ ns}$, mit $A_1=0,56\%$, $A_2=0,32\%$, $A_3=0,11\%$.

Die Anregung der Fluoreszenz geschieht bei Melaninen nicht über eine Zweiphotonen-Absorption mit einer Übergangswahrscheinlichkeit

$$n_a \propto \sigma_{2P} P^2, \quad (2.41)$$

sondern durch eine schrittweise Einphotonenabsorption oder auch resonante Zweiphotonenabsorption [66, 64, 67]. Hier spielen mehrere reale Zustände eine Rolle: Durch Einphotonen-Absorption wird ein Elektron in ein höheres Niveau angeregt, um in diesem angeregten Zustand erneut ein Photon zu absorbieren:

$$n_a^1 \propto \sigma_{1P}^1 P \quad (2.42)$$

$$n_a^2 \propto \sigma_{1P}^2 P \quad (2.43)$$

$$\Rightarrow n_a^{ges} \propto \sigma_{1P}^1 \sigma_{1P}^2 P^2 \quad (2.44)$$

Dabei sind n_a^1, n_a^2 die Anregungswahrscheinlichkeit der einzelnen Zustände $\sigma_{1P}^1, \sigma_{1P}^2$ die Absorptionsquerschnitte der Einphotonenanregung und P die Laserleistung. Wird die Anregung des fluoreszierenden Zustandes gemessen, ergibt sich ein quadratischer Zusammenhang der gesamten Übergangswahrscheinlichkeit n_a^{ges} .

Melanine spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. In Ref. [68] wurde beschrieben, dass das Verhältnis von Pheomelanin zu Eumelanin in dysplastischen Nävi

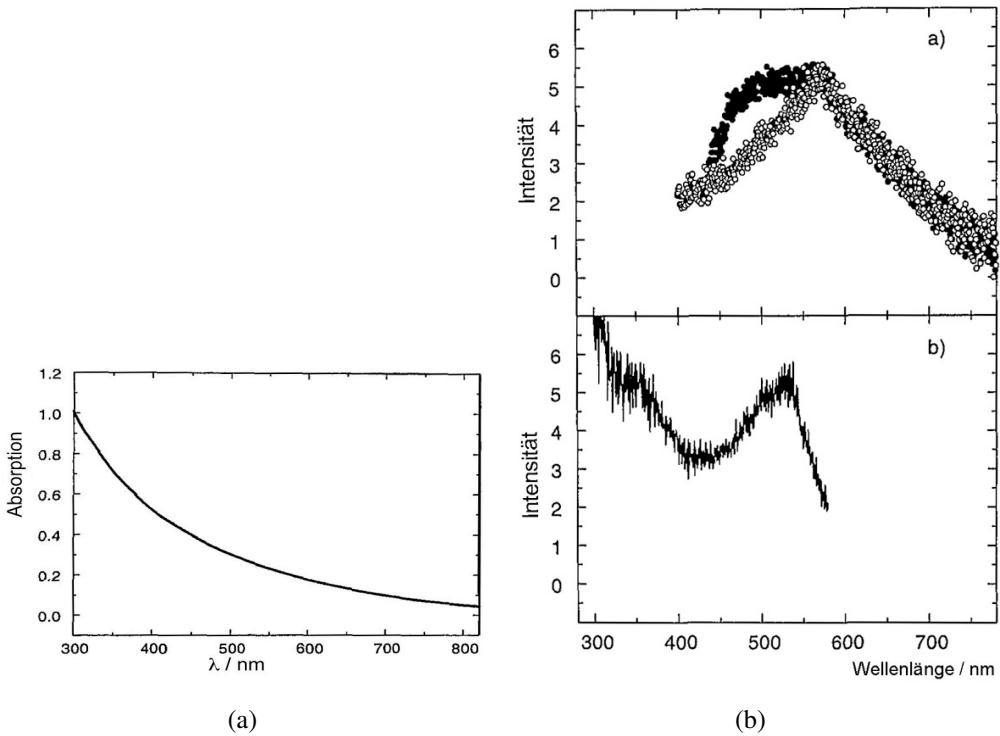


Abb. 2.11: Optische Eigenschaften von synthetischem Melanin in DMSO gelöst. (a) Absorptionsspektrum; (b) oben: Fluoreszenzspektrum bei 337 nm Anregung (Kreise) und 400 nm Anregung (Punkte), unten: Fluoreszenz-Anregung bei Emission von $\lambda=620$ nm. Aus Ref. [64]

stark ansteigt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da solche gutartigen erworbenen Nävi in vielen Fällen von einem Melanom nicht unterscheidbar sind [38]. Teuchner *et al.* [67] fanden in malignen Melanomen *in vitro* bei Zweiphotonen-Anregung mit einem Femtosekunden-NIR-Laser bei 800 nm eine Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums, die auf eine Veränderung des Melanins in den Gewebeproben zurückzuführen war.

2.4.2 Wechselwirkung von Licht mit Haut

Trifft ein Lichtstrahl auf biologisches Gewebe, wird ein Teil davon reflektiert. Hier gelten die gleichen Bedingungen, die aus Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und Dielektrika bekannt sind. Der Teil des Strahls, der in das Gewebe eindringt, wird durch Absorption und Streuung geschwächt. Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die Intensität $I(z)$ nach einer Dicke z im Medium aus der Intensität I_0 bei

$z = 0$ zu

$$I(z) = I_0 e^{(\mu_a + \mu_s)z}. \quad (2.45)$$

Dabei ist μ_a der *Absorptionskoeffizient* und μ_s der *Streukoeffizient*, beide sind in Abb. 2.12 (a) und (b) für Haut dargestellt. Die Eindringtiefe d ergibt sich aus $d = 1/(\mu_a + \mu_s)$. Im

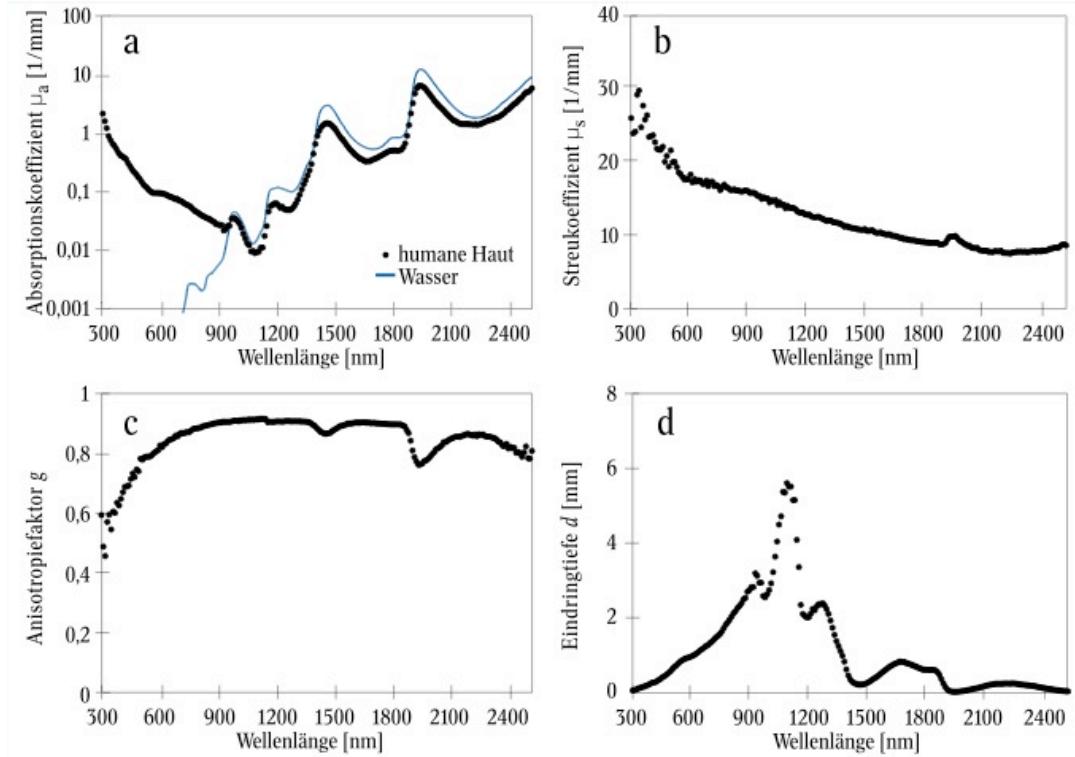


Abb. 2.12: Optische Parameter der Haut: (a) Absorptionskoeffizient, (b) Streukoeffizient, (c) Anisotropiefaktor und (d) Einringtiefe. Aus [69]

sichtbaren Bereich des Lichts überwiegen allerdings die Absorptionen von verschiedenen Fluorophoren in den Zellen. Je nach Größenverhältnis zwischen Wellenlänge und Streuzentrum wird zwischen *Rayleigh*- und *Mie-Streuung* unterschieden. Ist die Wellenlänge groß im Vergleich zum Streuzentrum, tritt Rayleigh-Streuung auf. Hier regt die einfallende Lichtwelle in den Molekülen Dipolschwingungen an. Für die Intensität der gestreuten Welle I mit Wellenlänge λ und Streuwinkel θ gilt:

$$I \propto I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{\lambda^4} \quad (2.46)$$

Rayleigh-Streuung ist daher besonders im Fall von UV-Strahlung wichtig.

Bei Streuern in der Größenordnung der Wellenlänge entsteht *Mie-Streuung* durch kohärente Überlagerung der gestreuten Wellen, die einkommende Welle wird hauptsächlich

in Vorwärtsrichtung gestreut.

Streuung in biologische Gewebe kann durch beide Theorien nicht vollständig geklärt werden [43]. Stattdessen wird als Maß der Streuungsrichtung der Anisotropiefaktor g angegeben, dabei steht $g = 1$ für reine Vorwärtsstreuung, $g = -1$ für reine Rückstreuung und $g = 0$ für isotrope Streuung. Für verschiedene Wellenlängen in Haut ist g in Abb. 2.12(c) gezeigt. Mit Werten von $g > 0,6 - 0,8$ im NIR-Bereich wird die Laserstrahlung und die erzeugte Fluoreszenzstrahlung zumeist in Vorwärtsrichtung gestreut. Aus Abb. 2.12 ergibt sich, dass im Bereich des Nahen Infrarot ein *Optisches Fenster* befindet. Laserstrahlung in diesem Wellenlängenbereich kann vergleichsweise tief in die Haut eindringen und fokussiert werden. Die Fluoreszenzstrahlung im sichtbaren Bereich des Spektrums wird durch die höheren Abschwächungskoeffizienten wiederum stärker beeinflusst.

2.4.3 Schädigungseffekte in biologischem Gewebe

Bei der Einwirkung von Laserstrahlung auf Zellen und Gewebe können unter Umständen Schädigungen entstehen. Bei Experimenten muss darauf geachtet werden, dass die Laserparameter unterhalb der Schwellen für die Schädigung des Gewebes liegen.

In Ref. [70, 71, 72, 73, 74, 75] wurde beschrieben, dass Zellen schon nach wenigen Scans mit Femtosekunden-Lasern in *Apoptose* (kontrollierter Zelltod) übergehen können. Eine weitere Auswirkung der Laserstrahlung besteht in einer reduzierten Fähigkeit zur Zellteilung [73], die mit der mittleren Laserleistung und der Pulslänge $\propto \bar{P}^2/\tau$ skaliert [74]. Bei Multiphotonen-Mikroskopie sind ausser den Laserparametern weiter die NA, Bildgröße und Scanzeit für die Photonendichte auf der Probe von Relevanz [76], vgl. dazu (2.10). Photothermische Effekte bei der Wechselwirkung mit Zellen sind unwahrscheinlich (Optisches Fenster). Im Fall von Chlorophyll oder Melanin können allerdings thermische Effekte auftreten.

Bei hohen Leistungsdichten kann es zu Photodisruption kommen, dabei entsteht in dem Fokusvolumen ein Plasma. Hier kommt es zum *optischen Durchbruch*, wenn durch Ionisation die Dichte der freien (bzw. quasi-freien) Elektronen größer als ein Schwellwert von 10^{21} cm^{-3} [77, 78] wird. Für Zellen wird als Schwelle für die benötigte Intensität des Lasers die Ionisationsschwelle von Wasser angenommen mit 10^{11} W/cm^2 . Die Gültigkeit dieses Ansatzes kann experimentell bestätigt werden. Zwei Mechanismen sind hier für die Plasmabildung im Fall von fs-Laserstrahlung im nahen Infrarot verantwortlich: *Multiphotonen-Ionisation* und *Kaskadenionisation*. Bei der Multiphotonen-Ionisation muss durch gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen mindestens die Io-

nisationsenergie aufgebracht werden, die im Fall von Wasser 6,5 eV beträgt. Bei einer Wellenlänge von 750 nm würde das bedeuten, dass vier Photonen gleichzeitig an der Ionisation beteiligt sein müssen.

Die freien Elektronen sammeln durch die Laserstrahlung kinetische Energie, dieser Effekt wird als *inverse Bremsstrahlung* bezeichnet, aber sie geben auch wieder Energie in Form von Stößen an die Umgebung ab. Durch hohe Laserintensitäten wird die kinetische Energie ausreichend, um ein weiteres Elektron zu ionisieren: Es kommt zu einem Lawineneffekt. Dieser Prozess läuft in Wasser auf der Zeitskala von wenigen Femtosekunden ab [79]. Ergebnis ist die Ionisierung größerer Bereiche des Fokusvolumens. Dabei entstehen Gase und Bruchstücke von Molekülen, die längere Zeit noch in der Zelle sichtbar sind [78], bei dieser *Photodisruption* entstehen Schockwellen und Kavitationsblasen.

Bei geringeren Intensitäten können auch Plasmen mit geringer Dichte entstehen, bei denen keine Kavitation entsteht [78]. Freie Elektronen entstehen, die chemische und thermische Veränderungen erzeugen. Besonders die Erzeugung von Reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) wie z.B. OH* oder H₂O₂ kann zu Zellschädigungen führen.

3 Experimentelle Systeme und Methoden

3.1 Multiphotonen-Mikroskopie

Laser

Verschiedene Titan-Saphir (Ti:Sa)-Laser wurden im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt.

Als Laserquelle für die Versuche am Fraunhofer-IBMT diente ein MaiTai BB (*Newport, USA*) mit variablem Wellenlängenbereich (710-990 nm), 80 MHz Pulsrepetitionsrate, maximaler Leistung von 1,5 W und Pulslänge von typischerweise 100 fs, sowie ein weiteres System Chameleon (*Coherent Inc., USA*) mit Wellenlängenbereich von 720 bis 940 nm, 90 MHz Pulsrepetitionsrate, maximaler Leistung von 1,2 W und Pulslänge um 150 fs.

An der Dermatologischen Klinik in Jena wurde ein MaiTai (*Newport, USA*) mit variablem Wellenlängenbereich (750-850 nm), mit maximaler Leistung von 900 mW und 75 fs Pulslänge verwendet.

Mikroskope / Tomograph

Das Laser-Scanning-Mikroskop TauMap (*JenLab GmbH, Deutschland*) basiert auf einem Axiovert 200 (*Carl-Zeiss AG, Deutschland*), erweitert mit einer x,y-Scaneinheit (*GSI Lummonics, USA*).

Das DermaInspect (*JenLab GmbH, Deutschland*) ist ein klinisch zugelassener, CE-zertifizierter Multiphotonen-Tomograph der Laserschutzklasse 1M. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an zwei unterschiedlichen Geräten gearbeitet. Klinische Studien fanden am System an der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie in Jena statt. Ein zweites Gerät stand am Fraunhofer-Institut zur Verfügung. Dieses konnte so umgebaut und erweitert werden, dass im klinischen Betrieb nicht zugelassene Laserquellen, Detektoren oder weitere Komponenten verwendet werden konnten. In diesem Modus

wurden keine Studien an Patienten durchgeführt.

Ein Schema des Tomographen ist in Abb. 3.1 dargestellt. Der Laser wird über Spiegel in die Haupteinheit des DermaInspect eingekoppelt, durchläuft einen Glan-Calcit-Polarisator als Abschwächer, einen Shutter und wird mit einem Umlenkspiegel auf die x,y-Galvosannereinheit gelenkt. Anschließend wird der gescannte Laserstrahl mit einem Teleskop im Verhältnis 1:6 aufgeweitet und gelangt über einen dichroitischen Strahlteiler (Grenzwellenlänge 700 nm) in ein 40×/NA1,3-Mikroskop-Objektiv (*Carl-Zeiss AG, Deutschland*), das den Laser in der Probe fokussiert. Ein Bild des Gerätes ist in Abb. 3.2

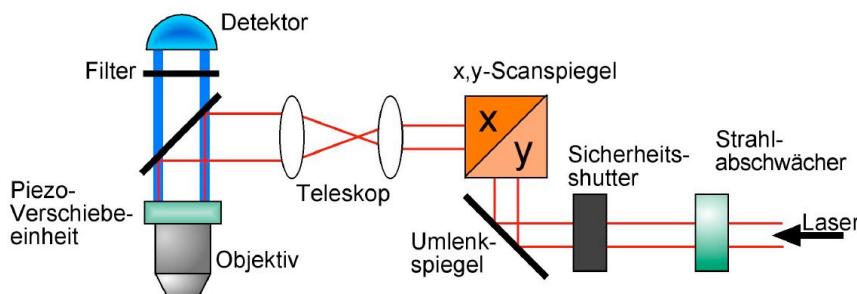


Abb. 3.1: Schema des Multiphotonen-Tomographen DermaInspect

zu sehen.

Im Scanning-Mikroskop und im DermaInspect werden Photomultiplier *H7732 (Hamamatsu K.K., Japan)* eingesetzt.

Für FLIM-Messungen wurden zwei verschiedene Detektorsysteme verwendet:

- *PMH100, PMC-100 (Becker&Hickl GmbH, Deutschland)*. Beide enthalten einen Vorverstärker und einen *H5773 (Hamamatsu K.K., Japan)*-Detektor, die Version PMC-100 zusätzlich noch einen Kühler.
- *R3809 (Hamamatsu K.K., Japan)*. Multichannel-plate (MCP)-PMT. Wegen der Empfindlichkeit gegenüber Tageslicht wird dieser Detektor mit einem elektronischen Shutter betrieben.

Mit Kollagen wurde die IRF der Detektoren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt. Die Halbwertsbreite (FWHM) der IRF der Detektoren PMH100 und PMC-100 beträgt 215 ps, die des MCP 22 ps. Beide IRF-Kurven verlaufen nahezu Gaußförmig (Übereinstimmung mit der Anpassungskurve PMH100/PMC100 96%, MCP 92%).



Abb. 3.2: DermaInspect am Fraunhofer-IBMT mit Liege und dem Chameleon-Laser

Messkarten

Für TCSPC-Messungen wurden die PCI-Karten SPC-730 und SPC-830 (*Becker&Hickl GmbH, Deutschland*) verwendet.

Objektive und optische Komponenten

Folgende Objektive von (*Carl-Zeiss AG, Deutschland*) wurden eingesetzt:

- EC-Plan-Neofluar, $40\times/\text{NA}1,3$, Arbeitsabstand $200\ \mu\text{m}$: *In vivo*-Untersuchungen, Biopsien, Zellen.
- EC-Plan-Neofluar, $20\times/\text{NA}0,5$ Arbeitsabstand 2 mm: Biopsien, Zellen, Endoskop-Systeme
- Plan-Neofluar, $10\times/\text{NA}0,3$, Arbeitsabstand: Biopsien, Zellen
- EC-Plan-Neofluar, $5\times/\text{NA}0,16$, Arbeitsabstand 16 mm: Endoskop-Systeme

Folgendes Objektiv wurde von *Olympus Corp., Japan* bezogen:

- XLMPLFL $20\times/\text{NA}0,9$ Arbeitsabstand 2 mm: Biopsien, Zellen

Als Filter wurden verwendet:

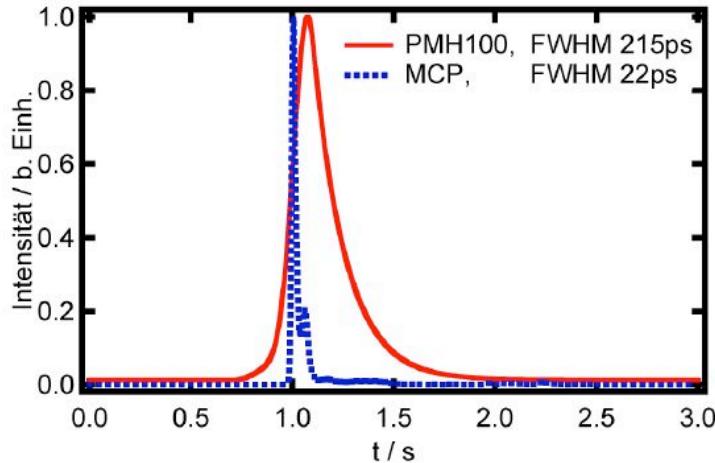


Abb. 3.3: Systemantwort der Detektoren, Halbwertsbreite des PMH-100: 215 ps (rot), Halbwertsbreite des MCP: 22 ps (blau)

- BG39, (*Schott AG, Deutschland*), Transmissionsbereich \approx 350-650 nm
- Kurzpassfilter 700 nm, (*Chroma Technology, USA*), Spezialanfertigung, Transmissionsbereich \approx 400-700 nm
- Bandpassfilter (*Thorlabs Inc. USA*): 400/10(FWHM), 410/10, 420/10,

Autokorrelator

Die Pulslängen der Laser wurden mit dem Autokorrelator *MINI (APE GmbH, Germany)*, bestimmt. Das Gerät ist mit einem externen Halbleiterdetektor ausgestattet, der die Messung der Pulslängen nach Durchgang durch ein optisches System im Fokus eines Objektivs ermöglicht. Es wurden Pulse mit sech^2 -Profil angenommen. Beim Durchgang durch ein optisches Material verhalten sich daher die Eingangspulslänge τ_{in} zur Ausgangspulslänge τ_{out} wie [80]

$$\frac{\tau_{out}}{\tau_{in}} = \sqrt{1 + \left(\frac{D_\omega L}{\tau_{in}^2} 16(\ln 2)^2 \right)^2}, \quad (3.1)$$

mit D_ω der *Gruppengeschwindigkeits-Dispersion (GVD)* in [fs²/cm] und L der optischen Weglänge des Materials. Beim Vermessen der Systeme in dieser Arbeit ist es zweckmäßiger, die weglängenunabhängige *Gruppenlaufzeit-Dispersion (group delay)*

dispersion, GDD) $D_\omega L$ anzugeben mit

$$GDD = D_\omega L = \sqrt{\frac{\tau_{\text{in}}^2 \tau_{\text{out}}^2 - \tau_{\text{in}}^4}{16(\ln 2)^2}}. \quad (3.2)$$

Der Hauptanteil der Dispersion wird von den verwendeten Objektiven erzeugt. Sie hat die Einheit [fs²].

Gradientenindex-Linsen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GRIN-Linsen von zwei Anbietern bezogen. Mit Thallium dotierte Linsen wurden von der Firma *NSG Europe, Belgien* bezogen. Die Silber- und Lithium-dotierten Linsen stammen von der Firma *GRINTECH GmbH, Deutschland*.

Simulation der Strahlverläufe

Mit der Ray-Tracing-Software *ZEMAX (ZEMAX Development Corporation, USA)* wurden die Strahlverläufe der Endoskopsysteme simuliert. Eingangsparameter waren dabei die Parameter der GRIN-Linse (Gradientenkonstante g , Länge, Durchmesser, Material). Wellenlänge und Startposition konnten variiert werden.

Auswertesoftware

Zur Analyse der FLIM-Messungen wurde das der TCSPC-Karte beigelegte Softwarepaket der Firma *Becker&Hickl* eingesetzt. Dieses erlaubt, die einzelnen Kurven der Bildpunkte des FLIM-Bildes mit einer ein- bis dreifach exponentiellen Kurve anzupassen. Die einzelnen Fitparameter können danach in einem Falschfarbenbild dargestellt werden, dass die Lebensdauer multipliziert mit dem Intensitätssignal zeigt. Bei der Auswertung der Messungen in dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass bis auf zwei Ausnahmen für die Fluoreszenzintensitäts-Verläufe ein biexponentielles Modell die Messpunkte am Besten beschreibt. Die Proben mit Keratin und Fluoreszein wurden einfach-exponentiell am Besten angepasst.

Die Software *IgorPro 6.0 (WaveMetrics, Inc., USA)* wurde verwendet, um Messungen auszuwerten, darzustellen und mit theoretischen Modellkurven anzupassen. Weiterhin ermöglicht es die Erstellung von selbstgeschriebenen Programmen in einer eigenen Skriptsprache. Diese Option wurde verwendet, um die Auswertung der TCSPC-

Software zu überprüfen, die Datenverarbeitung zu automatisieren und um Phantomdatensätze für FLIM-Messungen zu simulieren.

Vergleichsproben

Als Standard-Testsystem zur Bestimmung der Bildqualität und Auflösung wurden grün fluoreszierende Kugelchen aus Latex (*Polysciences, USA*) mit Durchmesser $5,56\text{ }\mu\text{m}$ verwendet. Sie wurden in Wasser verdünnt auf einem Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (Dicke $0,17\text{ }\mu\text{m}$) verschlossen. Die Konzentration wurde so gewählt, dass ein Teppich aus fluoreszierenden Kugelchen entstand. Die Skalierung der Mikroskope wurde damit kalibriert.

Zur Bestimmung der Auflösung wurden $0,2\text{ }\mu\text{m}$ große Kugelchen verwendet, die kleiner sind als die theoretischen Fokalvolumina der verwendeten Objektive. Da Objekte in dieser Größe durch den Laser verschoben werden können (optische Pinzette), wurden die Kugelchen auf ein Deckglas aufgebracht und kurz nach dem Eintrocknen verwendet. Die Adhesion zwischen Glas und Kugelchen verhindert das Verschieben.

Fluoreszein (10 mM, tech., *Sigma-Aldrich, Deutschland*) wurde mit destilliertem Wasser auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versiegelt.

CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) wurden trypsinisiert, ein Teil der Kultur entnommen und in sterilen Zellkammern (*MiniCEM, Jenlab GmbH, Deutschland*) untersucht. Humane Metaphasen Chromosomen wurden aus peripherem Blut nach Standard-Methoden gewonnen. In einer sterilen Zellkammer (*MiniCEM, JenLab GmbH, Deutschland*) wurden sie eingetrocknet und anschließend vermessen. Weitere Proben wurden mit 5% *Giemsa*, (*Merck KGaA, Deutschland*) angefärbt. Ein Protokoll findet sich im Anhang. DOPA-Melanin, Kollagen (I, II, IV), Keratin, *Sigma-Aldrich, Deutschland* wurden auf Objektträger gegeben und zusammen mit destilliertem Wasser unter einem Deckglas mit Silikonklebstoff versiegelt.

Einzelne Stücke von Haaren wurden den Probanden abgeschnitten und zusammen mit destilliertem Wasser auf einen Objektträger gebracht und unter einem Deckglas versiegelt.

Einzelne Blätter der Wasserpflanze *Elodea spec* (Wasserpest) wurden frisch auf einen Objektträger gebracht und unter einem Deckglas versiegelt.

3.2 Datenanalyse

Bestimmung der Bildqualität

Als quantitatives Maß für die Bildqualität wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (signal-noise-ratio SNR) und Kontrast K berechnet. Dazu wurde bei einem Bildstapel ein Bereich mit typisch 100×100 Pixel gemittelt, jeweils aus einem Bereich mit maximaler Helligkeit (I_{\max}) und aus einem Bereich, der nur Rauschen I_{\min} zeigt.

$$SNR = \frac{I_{\max}}{I_{\min}} \quad (3.3)$$

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (3.4)$$

Auswertung der TCSPC-Daten

Bei Fluoreszenz-Lebensdauer-Kurven mit geringer Intensität kann in der Auswertung die Photonenzahl pro Messkurve nachträglich erhöht werden. Dies geschieht über den *Binning-Parameter*. Dabei wird bei Binning=1 die Messkurve eines Pixels mit seinen acht Nachbarpixeln zusammenaddiert, bei Binning=2 werden die übernächsten Nachbarn mit dazugenommen, und so fort. Binning=0 bedeutet, dass nur der Pixel selbst in Betracht gezogen wird. Binning verwischt aber andererseits die Grenzen zwischen Bereichen mit unterschiedlichen Parametern. Daher sollte dieser Parameter so gering wie möglich gehalten werden.

Die Histogramme selbst wurden weiter analysiert und charakterisiert. Hier wurden Methoden der Statistik angewendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden: Ist $f(x)$ eine Wahrscheinlichkeitsdichte einer zufällig verteilten Größe, dann sind die statistischen Momente Γ_k der k -ten Ordnung allgemein definiert:

$$\Gamma_k(m) := \int_{-\infty}^{+\infty} (x - m)^k f(x) dx. \quad (3.5)$$

Wird für m der Mittelwert der Verteilung eingesetzt, ergeben sich die zentralen Momente. Die höheren Momente sind nach Normierung:

$$\Gamma_2 =: \sigma^2, \text{Varianz} \quad (3.6)$$

$$\Gamma_3/\sigma^3 =: \eta_1, \text{Schiefe} \quad (3.7)$$

$$\Gamma_4/\sigma^4 - 3 =: \eta_2, \text{Kurtosis} \quad (3.8)$$

Die Schiefe ist ein Maß für die Symmetrie einer Verteilung. Gilt $\eta_1 - 1 > 0$, ist eine Verteilung rechtsschief und die Verteilung ist rechts flacher, im umgekehrten Fall heißt sie eine Verteilung linksschief. Die Kurtosis η_2 beschreibt, wie stark eine Verteilung gewölbt ist. Werte $\eta_2 < 0$ bedeuten eine abgeflachte, Verteilung (flachgipflig), $\eta_2 > 0$ bezeichnet spitze Verteilungen (steilgipflig). Für eine Gaußverteilung gilt $\eta_1 = 0, \eta_2 = 0$.

3.3 Klinische Aspekte

Biopsien und Probanden

Alle Studien an Biopsien und Patienten wurden von der Ethik-Komission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt, Bearbeitungsnummer 1566-06/05 vom 21.06.2005.

Frisch entnommene Biospien wurden direkt vom Operationssaal der *Klinik für Dermatologie und Allergologie, Jena* für dortige Messungen bezogen. Weitere Biopsien wurden von der *Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Homburg* bezogen und am Fraunhofer-IBMT vermessen. Mit physiologischer Kochsalzlösung wurde dem Austrocknen der Proben vorgebeugt. Die Biopsien in Jena wurden nach der Untersuchung wieder in den normalen Ablauf der Klinik eingegliedert.

Im Rahmen der *in vivo*-Messungen am Fraunhofer-IBMT standen mehrere freiwillige, unterwiesene Probanden zur Verfügung. Über die Untersuchungen wurde vorher aufgeklärt.

Mehrere Patienten wurden mit Prototypen der verschiedenen Endoskopsysteme am Klinikum in Jena untersucht. Bei ihnen wurde ein Ulkus im Bein bzw. Unterschenkel diagnostiziert. In Abb. 3.4 sind zwei Beispiele dargestellt. Die offenen Wunden waren mehrere Millimeter tief.

Zudem standen weitere Probanden mit der Diagnose "Verdacht auf Malignes Melanom" zur Verfügung. Mit ihnen wurde identisch verfahren.

Die Patienten wurden auf einer verstellbaren Liege gelagert und die zu untersuchende Stelle gegen Verrutschen stabilisiert. Direkt vor der Untersuchung wurde eine sterile Kontaktplatte des *In vivo*-Adapters und ein steriles Linsensystem eingebaut, bzw. im Fall des Halbkugelsystems wurde das komplette System sterilisiert. Die Wunden selbst wurden nicht behandelt.



Abb. 3.4: Photographie zweier untersuchter Ulcera

Handhabung der Endoskopsysteme

Für das Linsenmaterial der Firma *GRINTECH* wurde von der Firma *Medical Device Services, Deutschland* die Bioverträglichkeit entsprechend der Normen EN ISO 10993-5, -12, EN ISO 9363-1, LM P4-06 und LM SOP4-06-0 bestätigt. Weiterhin wurden von *Blazejewski Medi-Tech GmbH, Deutschland* biokompatible Stahlkanülen mit Saphirfenster (Dicke 0,3µm) angefertigt, die die GRIN-Linsen aufnehmen können. Die Stahlkanüle dient als Fassung, die in die Halterungssysteme fest eingebaut werden kann und das Saphirfenster erfüllt die Richtlinien zur medizinischen Verträglichkeit (DIN EN ISO 9001, DIN EN ISO13485, DIN EN ISO14971 and EG RL 94/42/EWG). Außerdem schützt das Saphirfenster das Endoskop vor Verkratzen.

Für klinische Untersuchungen wurden die Halterungssysteme für das Endoskop so modifiziert, dass ein ungefährlicher Patientenkontakt hergestellt werden kann und dass die Teile, die mit Wunden in Berührung kommen, entsprechend desinfiziert und ausgetauscht werden können (Edelstahl), vgl. Abb. 3.5.

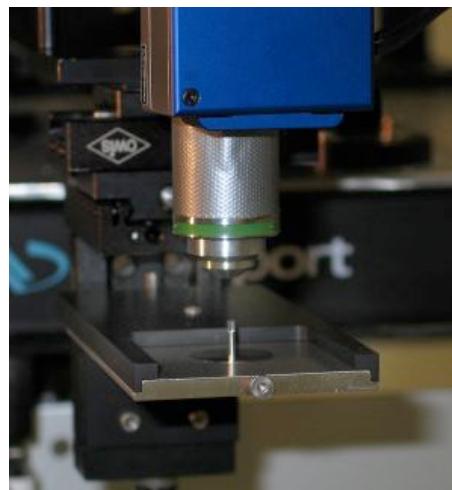


Abb. 3.5: In vivo-Adapter zur Halterung der GRIN-Linsen

4 Multiphotonen-Tomographie

4.1 Ziel

In diesem Kapitel werden anhand von gesunden Hautarealen *in vivo* das qualitative und quantitative Leistungsverhalten der Multiphotonen-Tomographie untersucht. Dies liefert wichtige Referenzdaten für nachfolgende Kapitel und zeigt die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode.

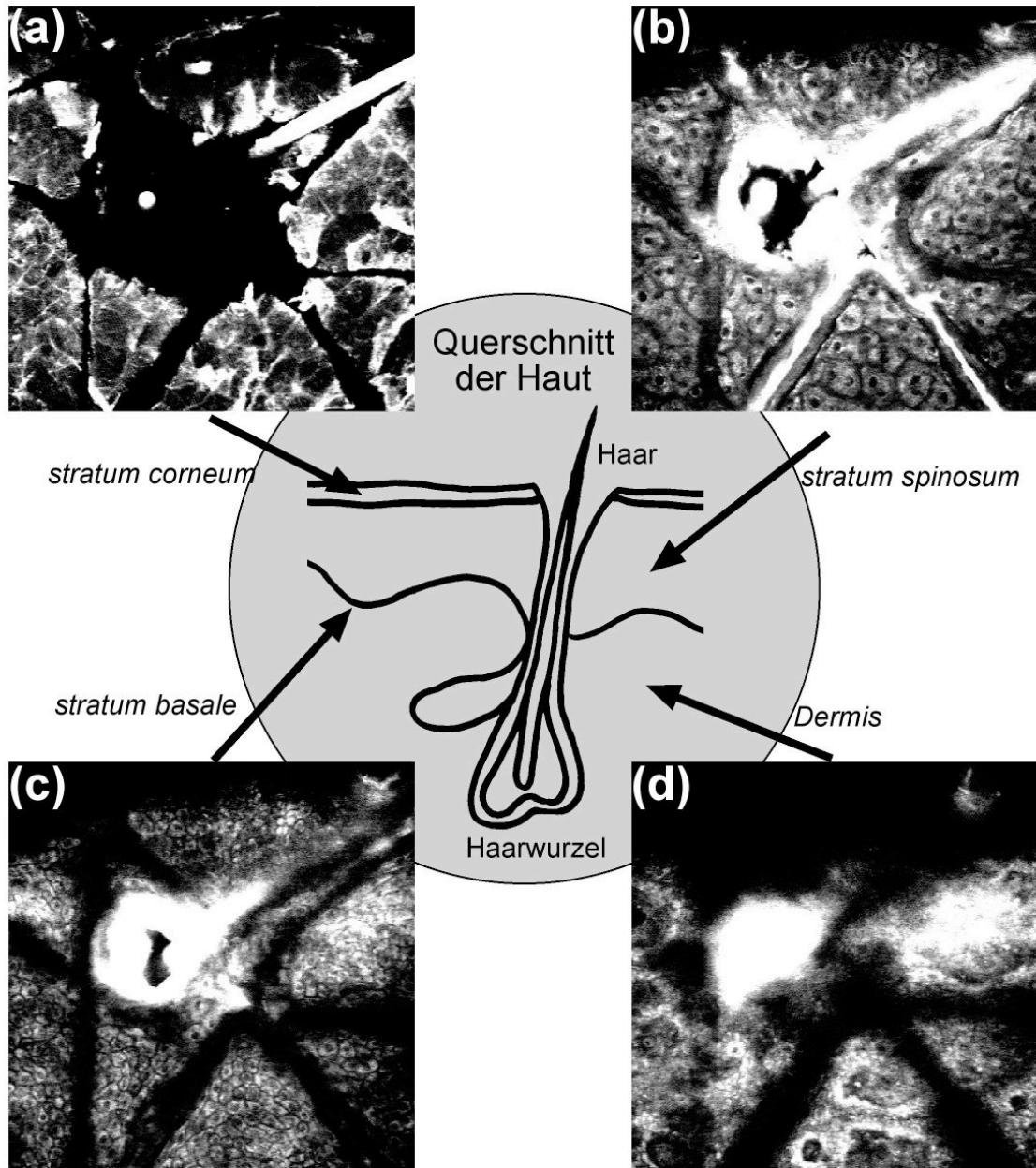
Im nächsten Schritt wird untersucht, inwieweit sich durch Variation der Parameter Laserquelle, speziell der Laserrepetitionsrate und der Variation der Fokussieroptik neue Einsatzgebiete erschließen lassen. Ziel ist hier eine Verringerung der in die Probe eingebrachten Laserenergie und damit des Schädigungspotentials beziehungsweise eine Erweiterung der Größe des Untersuchungsfeldes.

4.2 Optische Schnitte durch die Haut

In der klinisch zugelassenen Standardkonfiguration, bei der ein $40\times/\text{NA}1,3$ -Objektiv zur Fokussierung der Laserstrahlung verwendet wird, kann mit dem Tomographen die humane Epidermis und Dermis *in vivo* untersucht werden. Das Gerät liefert einen Bildstapel, der weiter analysiert werden kann.

In Abb. 4.1 ist ein Teil eines typischen Tomogramms, aufgenommen an einer Probandin, Unterarm-Innenseite, dargestellt. Die oberste Schicht der Epidermis ist in Abb. 4.1 (a) zu sehen. Zu erkennen sind hier die flachen, im Idealfall hexagonal geformten Zellen des *stratum corneum*. Sie bestehen hauptsächlich aus Keratin. In tieferen Lagen des *stratum corneum* können nur undeutlich Strukturen erkannt werden.

Die ersten lebenden Keratinozyten sind im *stratum granulosum* zu finden, im Mittel in einer Tiefe von $15\text{-}20\ \mu\text{m}$, wie Abb. 4.1 (b) zeigt. Die Bestandteile des Zellkerns (DNA und Proteine), die Zellmembran und verschiedene Proteine können bei den eingesetzten Wellenlängen nicht zur Fluoreszenz angeregt werden. Daher erscheint der Zellkern dunkel. Zu erkennen sind in den Zellen die Bestandteile des Zytoplasmas, bei geeig-



*Abb. 4.1: Multiphotonen-Autofluoreszenz-Tomogramm von gesunder Haut.
Mehrere Hautfelder stoßen um einen Haarkanal zusammen. $\lambda = 750\text{ nm}$*

neter Vergrößerung können einzelne Zellorganellen abgebildet werden. Eine schwache Fluoreszenz zeigt dagegen der interzelluläre Zwischenraum, besonders nahe der Oberfläche, weniger in der Nähe des *stratum basale*. Er besteht hier aus dünnen, keratinhaltigen Filamenten (vgl. Kap. 2.3). Strukturen konnten in keinem der untersuchten Fälle wiedergegeben werden. Die Keratinozyten sind in gesunder Haut homogen verteilt, besitzen in gleicher Tiefe etwa die gleiche Größe und ein ähnliches Fluoreszenzverhalten (Helligkeit). Da die Haut in einzelne Hautfelder unterteilt ist, kann bis fast zum Ende der Epidermis ein (nahezu) senkrechter Rand eines Hautfeldes, bestehend aus Material des *stratum corneum* (Keratin) verfolgt werden.

Mit zunehmender Tiefe nimmt die Größe der Zellen ab, bis schließlich das *stratum basale* erreicht wird wie in Abb. 4.1 (c). Hier befinden sich typischerweise (vor allem in Nävi) Melanozyten, wie in Abb. 4.2 gezeigt (Pfeil). Sie besitzen eine ähnliche Größe

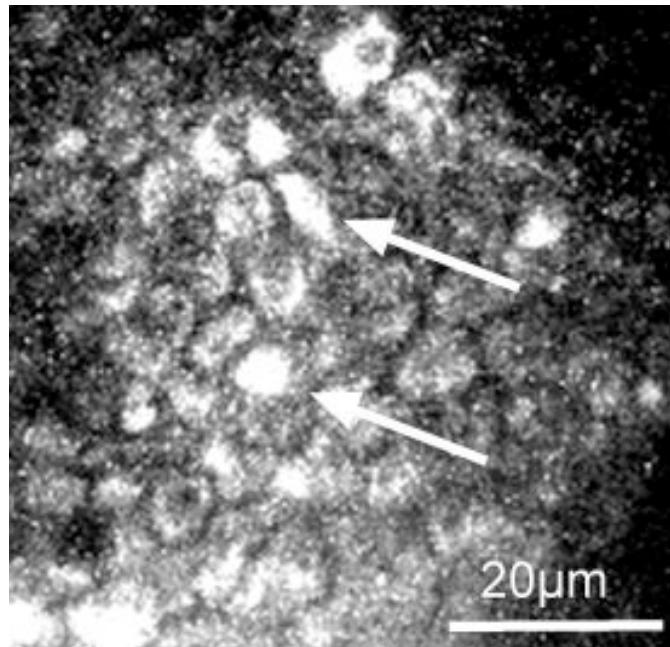
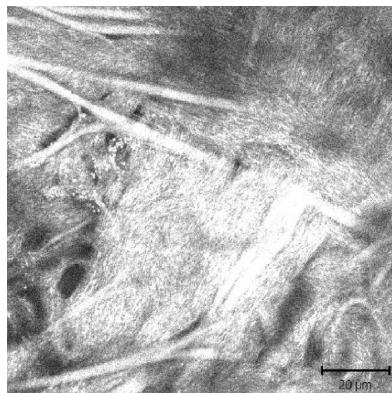


Abb. 4.2: *Stratum basale* in einem Návus, die Melanozyten sind durch ein intensives Fluoreszenzsignal deutlich von den Zellen unterscheidbar (Pfeile).

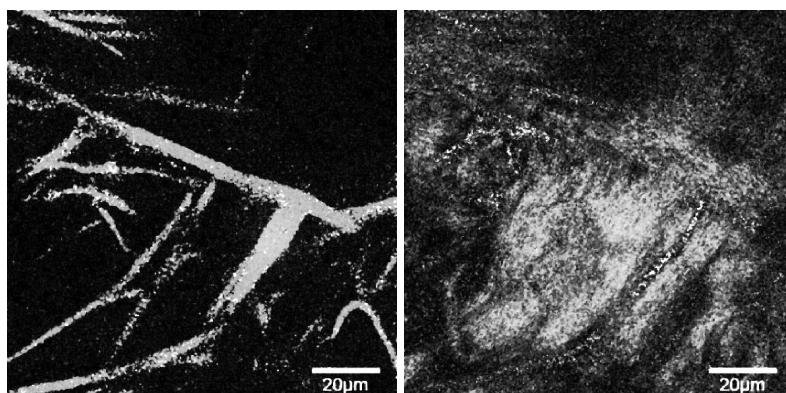
wie die Zellen des *stratum basale*, unterscheiden sich aber durch ein sehr helles Signal im Detektor, bedingt durch die schrittweise Einphotonenanregung, siehe dazu auch Kap. 2.4.1. Ausserdem zeichnet sie ein massives Erscheinungsbild aus.

Unterhalb des *stratum basale* wird, je nach Form der Papillen des *stratum papillare*, die obere Dermis abgebildet. Wie in Abb. 4.1 (d) sind kreisförmige Anschnitte der Pa-

pillen zu erkennen. Je nach Patient und untersuchter Stelle lassen sich elastische Fasern (Elastin) und Kollagen-Strukturen abbilden. Beispiele für Strukturen von Elastin-Fasergeflechten und Kollagen sind in Abb. 4.3 gezeigt. Das Bild Abb. 4.3(a) ist mit



(a) Dermis $\lambda_{\text{ex}} = 800 \text{ nm}$



(b) $\lambda_{\text{ex}} = 750 \text{ nm}$

(c) Kollagen $\lambda_{\text{ex}} = 840 \text{ nm}$

Abb. 4.3: Kollagen und Elastin in der Dermis. (a) Gleichzeitig aufgenommen, angeregt mit 800 nm; (b+c) Selektive Anregung der beiden Fluorophore: (b) Elastin bei 750 nm; (c) Kollagen bei 840 nm.

einer Wellenlänge von 800 nm aufgenommen. So konnte gleichzeitig die Autofluoreszenz von Elastin und Kollagen, sowie das SHG-Signal von Kollagen angeregt werden. In Abb. 4.3 (b) wurde die Anregungswellenlänge auf 750 nm gesetzt, so dass fast nur das Autofluoreszenzsignal von Elastin zu erkennen ist. Wird die Anregungswellenlänge auf Werte $>800 \text{ nm}$ verschoben, wird Elastin kaum noch angeregt (siehe Kap. 2.4.1). Dagegen kann aber, wie in Abb. 4.3 (c) gezeigt, das SHG-Signal von Kollagen deutlich detektiert werden. Die SHG-Strahlung hat ursprünglich die gleiche Ausbreitungsrichtung wie die sie erzeugende Laserstrahlung. Durch die Streuung im Gewebe gelangt ein

kleinerer Anteil in Richtung des Objektivs und kann detektiert werden.

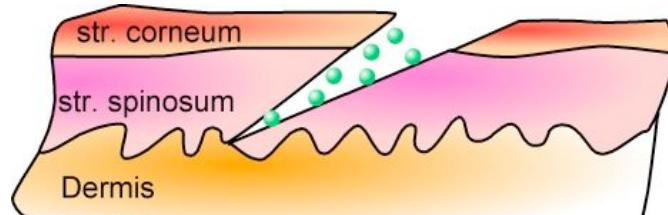
Quantifizierung der Bildqualität

Die optischen Parameter hängen hauptsächlich von der eingesetzten Laserstrahlung (Wellenlänge, Pulslänge, Repetitionsrate, mittlere Leistung) und der Fokussieroptik (Standard: $40 \times NA 1,3$) ab, sowie von den Streu- und Absorptionseigenschaften des Gewebes für die Fluoreszenzstrahlung (Detektionsweg). Die Auflösung des Systems ist durch die Größe der PSF beschrieben und wurde experimentell, wie in Kap. 3.1 beschrieben, bestimmt. Sie beträgt lateral $0,39 \mu\text{m}$, axial $0,7 \mu\text{m}$ (FWHM), die theoretischen Werte sind $0,24 \mu\text{m}$ bzw. $0,39 \mu\text{m}$. Bei Messungen in tiefer liegendem Gewebe wird die Strahlqualität durch Streuung der NIR-Laserstrahlung beeinflusst.

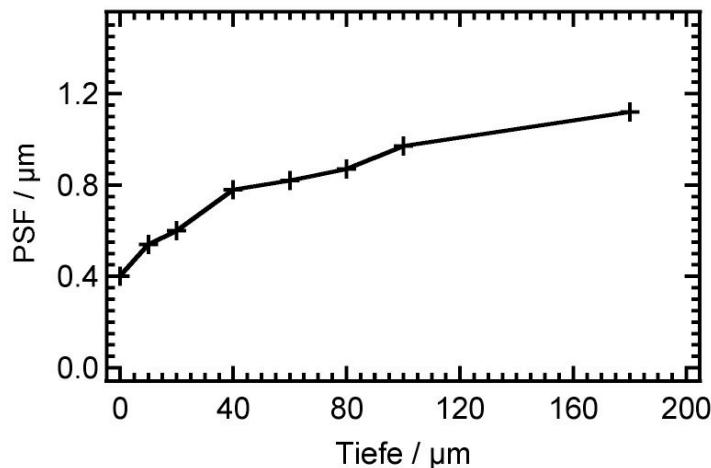
Um die Tiefenabhängigkeit der lateralen Ausdehnung der PSF experimentell zu bestimmen, wurde eine humane Biopsie, vgl. Abb. 4.4 (a) schräg mit dem Skalpell eingeschnitten und der Schnitt mit grün fluoreszierenden $0,2 \mu\text{m}$ -durchmessenden Mikrokügelchen gefüllt. Die Biopsie wurde in einer Zellkammer mit dem Tomographen untersucht und die Mikrokügelchen in verschiedenen Tiefen abgebildet. Dabei fiel auf, dass die Kugelchen in jeder Tiefe durch den Laserstrahl verschoben wurden (Optische Pinzette), was ein korrektes Detektieren der axialen PSF verhinderte. Die Größe des Scanfeldes betrug $10 \mu\text{m}$ Kantenlänge bei 512×512 Pixel. Dabei wurde die Laserleistung mit steigender Tiefe so eingestellt, dass die Kugelchen gerade noch detektiert wurden. Die Halbwertsbreiten der lateralen PSF sind in Abb. 4.4 (b) gezeigt.

Die Pulslängen am Probenort und die Gruppenlaufzeit-Dispersion (GDD) des Geräts sind in Abb. 4.5 (a) und (b) dargestellt. Zum Vergleich sind in der Darstellung die Pulslänge des Ti:Sa-Lasers (im Bsp. MaiTai) und die jeweiligen Werte für verschiedenen andere Objektive mit eingetragen. Die Pulslänge in der Standardkonfiguration des Tomographen liegt für den gesamten Wellenlängenbereich des Lasers bei ca. 150 fs , die GDD variiert nur leicht und liegt im Bereich von 1200 bis 1800 fs^2 . Im zentralen Verstärkungsbereich des Ti:Sa-Kristalls von 800 nm ist die Pulsvbreiterung etwas geringer.

Wird die Laserleistung bei Aufnahme der Bilder konstant gehalten, wird die detektierte Fluoreszenzstrahlung mit steigender Tiefe geringer. Dies wirkt sich auf den Bildkontrast K und das Signal-Rausch-Verhältnis SNR aus. In Abb. 4.6 sind diese Werte für humane Haut *in vivo* dargestellt (vgl. Kap. 3.2). Im Bereich des *stratum corneum* beträgt $SNR \approx 4$ und $K = 0,6$ bis $0,7$. Im Bereich der lebenden Zellen sinken die Werte stark



(a)



(b)

Abb. 4.4: Mit fluoreszierenden Kugelchen gefüllte humanen Biopsie (a) zur Ermittlung der lateralen PSF für verschiedene Tiefen.

ab auf $SNR \approx 2$ bzw. $K = 0,1$ bis $0,2$.

In der Praxis kann der Abfall der SNR und des Kontrasts durch Erhöhung der Laserleistung mit steigender Tiefe ausgeglichen werden.

Aus den gezeigten Beispielen geht hervor, dass die maximale Messtiefe durch den Arbeitsabstand des Objektives limitiert wird. Strukturelle Informationen können noch bis in einer Tiefe von $200 \mu\text{m}$ erkannt werden.

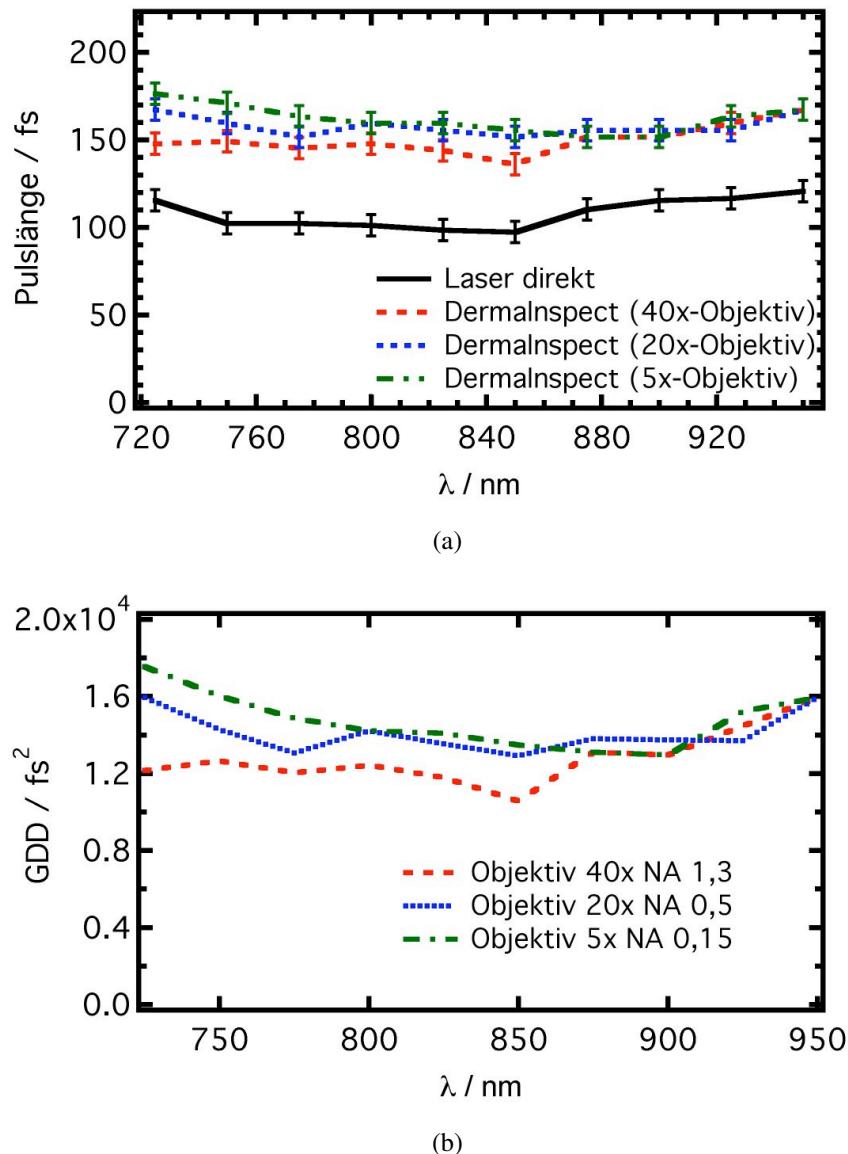


Abb. 4.5: (a) Pulslängen des Ti:Sa-Lasers vor und nach Durchgang durch das DermalInspect für verschiedene Objektive. (b) Gruppenlaufzeit-Dispersion GDD nach DermalInspect

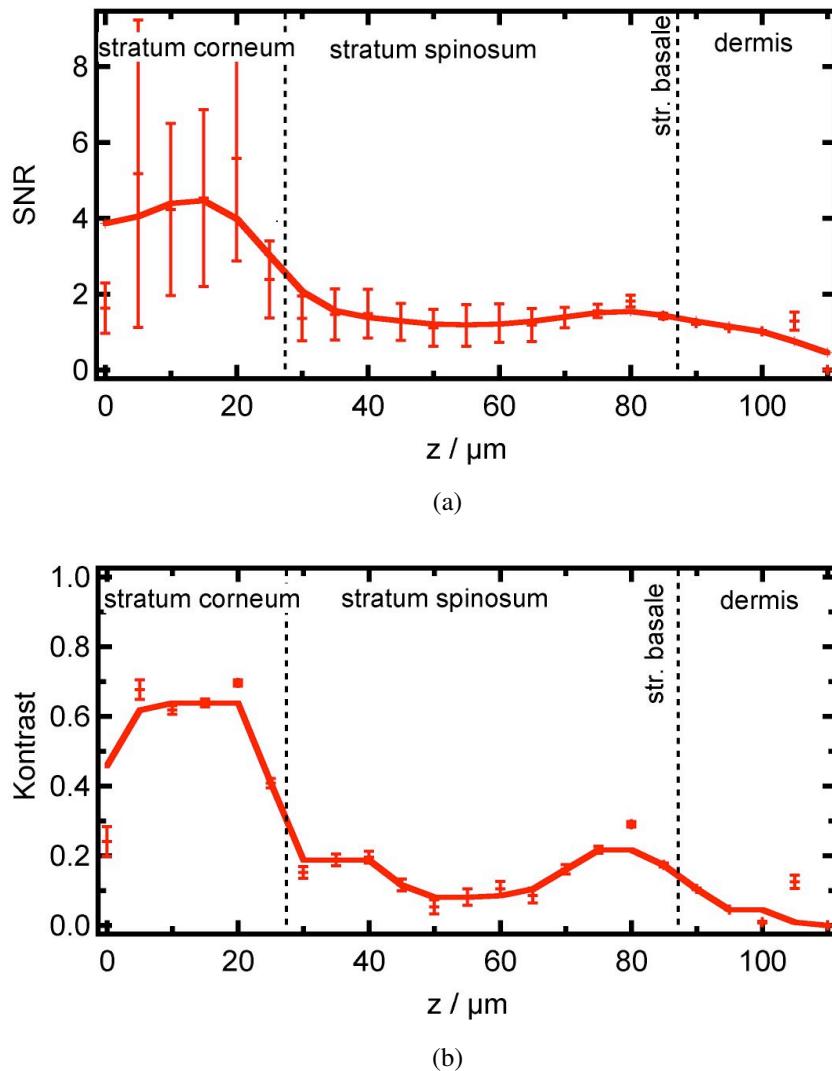


Abb. 4.6: (a) Signal-Rausch-Verhältnis SNR und (b) Kontrast K für den Tomographen bei konstanter Anregungsleistung von 20 mW.

4.3 GHz-Laserquelle

Standardmäßig wird in der Multiphotonen-Mikroskopie als Laserquelle der Ti:Sa-Laser mit einer typischen Repetitionsrate zwischen 70 und 90 MHz und Pulslängen von 70-170 fs eingesetzt. Diese Systeme sind kommerziell von mehreren Anbietern erhältlich. Laserquellen im kHz-Bereich wurden ebenfalls schon eingesetzt [81, 82]. Mit diesen Quellen konnten in Gehirngewebe Strukturen in Tiefen von bis zu 1 mm dargestellt werden [83].

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Lasertechnik wird aber auch der höhere Bereich der Repetitionsraten erschlossen, so dass Laser, die im GHz-Bereich arbeiten, für mikroskopische Techniken möglich werden. Chu *et al.* [84] haben einen GHz-Ti:Sa-Laser im NIR erfolgreich eingesetzt, um SHG-Mikroskopie an Muskelfasern von Mäusen *ex vivo* zu betreiben. Diese Studie ergab, dass der durch den Laser im Gewebe erzeugte Schaden geringer ausfällt, als bei Verwendung eines MHz-Lasers. Solche ersten Ergebnisse sind übertragen auf die Anwendung im Bereich Dermatologie an Patienten von besonderem Interesse.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Ti:Sa-Laser mit Repetitionsrate 1 GHz (GigaJet 20c, Prototyp, *Gigaoptics GmbH, Deutschland*) als Laserquelle des Tomographen eingesetzt. Bei einem Laser mit einer Repetitionsrate im GHz-Bereich ist im Vergleich zu einem MHz-Laser zu erwarten, dass bei gleicher mittlerer Leistung die Pulsspitzenleistung geringer wird. Weniger Energie wird pro Puls in die Probe appliziert, wodurch weniger Fluoreszenzstrahlung zu erwarten ist. Gleichzeitig sinkt aber auch die Gefahr eines Schädigungseffektes durch Plasma-Erzeugung. Außerdem ist zu erwarten, dass *Energy upconversion* auftritt (also die sukzessive Multiphotonen-Absorption von mehreren realen Niveaus im Molekül), wenn die Repetitionsrate in etwa gleich der Lebensdauer der Fluorophore kommt.

Die Einsatzmöglichkeiten eines solchen Lasers sollen im Folgenden untersucht werden. Zuerst soll eine Abschätzung über das Schädigungspotential erfolgen. Anschließend wird an humaner Haut untersucht, ob genügend Signalstärke zur Erstellung eines Bildes erzeugt werden kann.

Diese Untersuchung wurde vorab in Ref. [85] veröffentlicht.

Laserdaten und Parameter

Die Daten des Lasers sowie die des gesamten Tomographie-Systems sind in Tab. 4.1 zusammengestellt. Bis auf die Laserquelle wurden keine Veränderungen am Tomo-

max. mittl. Leistung \bar{P}_{max} nach Laser	676 mW
max. mittl. Leistung \bar{P}_{max} nach Tomograph	88 mW
max. mittl. Leistung \bar{P}_{max} nach Laserscanning-Mikroskop	130 mW
Wellenlänge	750 nm
Pulslänge τ direkt	61 fs
Pulslänge τ nach Tomograph	310 fs
max. Spitzenleistung P_{Peak} nach Tomograph	55 GW/cm ²
Pulsenergie E nach Tomograph	0,09 nJ
PSF _{lateral} (Theorie: 0,24 μm [32])	0,4 μm
PSF _{axial} (Theorie: 0,39 μm [32])	3 μm

Tab. 4.1: Daten des GHz-Lasers

graphen vorgenommen. Entsprechend der Ergebnisse in Ref. [86] wird die Pulslänge beim Durchgang durch die optischen Komponenten stark verbreitert. Trotzdem lassen die Werte aber erwarten, dass Anregung und Detektion von natürlichen Fluorophoren möglich ist. Die Auflösung, gemessen an der PSF, reicht für subzelluläre Aufnahmen problemlos aus. Die laterale PSF liegt nahe bei den theoretischen Werten, nur die axiale PSF von 3 μm weicht besonders von den maximal erzielbaren theoretischen Werten von 0,39 μm ab, vgl. Tab. 4.1. Für Hautuntersuchungen *in vivo* sollten dies aber keine große Einschränkung bedeuten.

Untersuchungen des Schädigungspotentials

Bevor der Tomograph mit dem GHz-Laser an Haut eingesetzt wurde, fand ein Test an Pflanzengewebe statt. Hierzu wurde ein Laserscanningmikroskop verwendet, die optischen Parameter stimmen mit dem Tomographen überein. In Abb. 4.7 ist ein Beispiel für eine Aufnahme der Fluoreszenz von *elodea spec.* gezeigt. Gut zu erkennen sind die runden und hell fluoreszierenden Chloroplasten. Im Bild etwas undeutlicher zu sehen sind die Zellwände. In den Experimenten konnte selbst mit maximaler Leistung \bar{P} und sequentiell wiederholter Abbildung keine sichtbare Veränderung der Morphologie oder des Fluoreszenzverhaltens der Pflanzenzellen erzeugt werden. Daraus ergibt sich, dass eine instantane Schädigung nicht vorliegt.

Das Zerstörungspotential durch Ablationseffekte wurde an menschlichen Chromosomen in Metaphase genauer untersucht. Chromosomen eignen sich gut für eine Ab-

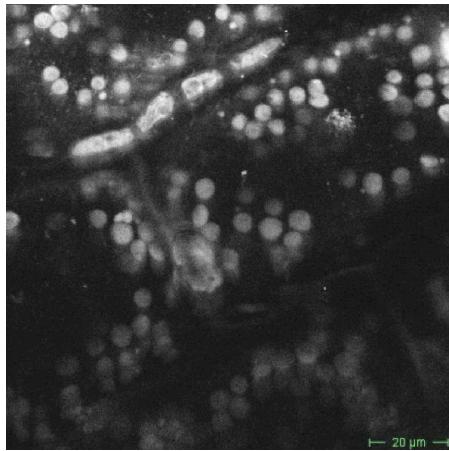


Abb. 4.7: Durch Multiphotonenabsorption angeregte Autofluoreszenz von *eldoea spec.*

schätzung der Ablationsfähigkeit des Lasers, da Schäden an den DNA-Strängen besonders gravierend für die Zelle sind. Zudem existieren hier gute Vergleichswerte mit dem Verhalten von MHz-Lasern [87]. Dazu wurden jeweils ungefärbte beziehungsweise mit Giemsa gefärbte Chromosomen auf einem Objektträger präpariert. Im Linienscan-Modus der Steuerungssoftware wurde der Laserstrahl in einzelnen Linien über die Chromosomen verfahren.

In den Experimenten, die in Ref. [87] beschrieben sind, wurden so kleinste Schnitte mit Breiten $< 200 \text{ nm}$ erzeugt. Die Schwelle der eingetragenen Energie für die Laserablation sank für Giemsa-gefärbte Chromosomen um einen Faktor 2,7. Die verwendete Laserquelle war ein Ti:Sa-Laser mit Pulslänge 170 fs an der Probe, 80 MHz Repetitionsrate bei 40 mW Leistung, was einer Pulsenegie von 0,5 nJ entspricht.

Im Unterschied zu den Experimenten aus Ref. [87] wurde im Rahmen dieser Arbeit stattdessen der GHz-Laser verwendet, um Schnitte in Chromosomen zu erzeugen. Das Ergebnis zeigt Abb 4.8. In ungefärbten Chromosomen konnte kein Materialabtrag erzeugt werden, im Fall von Giemsa-gefärbten Chromosomen allerdings war dies möglich (Pfeil in Abb 4.8). Die im Experiment verwendeten Parameter waren eine Scanzeit von 17 ms bei einer Scanfeldbreite von $20 \mu\text{m}$ (512 Pixel), bei $\bar{P}_{max} = 130 \text{ mW}$ ergibt sich eine Pulsenegie von $E = 0,09 \text{ nJ}$. Durch die geringere Pulsenegie ist trotz der höheren Repetitionsrate mehr mittlere Laserleistung zum Schneiden der Chromosomen notwendig als in Ref. [87].

Der maßgebliche Unterschied liegt in der Repetitionsrate der beiden Laser. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Pulsen des MHz-Lasers beträgt 12,5 ns gegenüber 1 ns im Fall

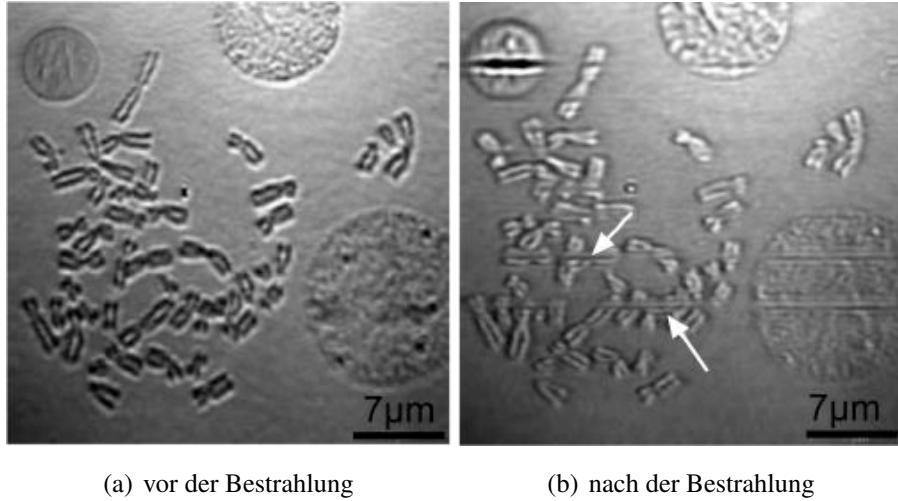


Abb. 4.8: Giemsa-gefärbte Chromosomen. (a) vor der Bestrahlung, (b) nach der Laserablation, die Linienscans waagrecht im Bild sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

des GHz-Lasers. Die in die Probe eingetragene Energie wird also in der gleichen Zeit auf 12,5 mal mehr Pulse verteilt, was bei gleicher mittlerer Leistung die Pulsennergie und die Pulsleistung verringert.

Um die Effektivität der Ablation abschätzen zu können, werden die maximale Strahlungsdichte P_{Peak} in W/cm^2 verglichen (z.B. [78]). Aus den Messungen in Ref. [87] errechnet sich damit eine Schwelle für die Spitzenwerte der Strahlungsdichte $P_{\text{Peak}}^{\text{MHz}}$ von $1,6 \text{ TW}/\text{cm}^2$ für ungefärbte und $0,6 \text{ TW}/\text{cm}^2$ für gefärbte Chromosomen. Im Experiment mit GHz-Repetitionsrate wurde eine Strahlungsdichte $P_{\text{Peak}}^{\text{GHz}}$ von $0,2 \text{ TW}/\text{cm}^2$ erzeugt. Diese ist an sich nicht ausreichend, um gefärbte und ungefärbte Chromosomen zu schädigen (vgl. auch [78]). Die Ursache, dass trotzdem eine Schädigung erzeugt wurde, liegt in der kurzen Repetitionsrate: Der Abstand zwischen aufeinander folgenden Laserpulsen ist meist geringer als die Lebensdauer der angeregten Zustände der Farbstoffe mit typischen 1-10 ns [22] (im Fall der gefärbten Chromosomen wurde als Lebensdauer von Giemsa $\approx 1,5 \text{ ns}$ gemessen). Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Laserpuls ein schon angeregtes Molekül trifft. Dieses angeregte Molekül kann nun seinerseits weiter angeregt oder dissoziiert werden (*energy upconversion* oder auch *Resonant Multiphoton Absorption*). Nur über solche Mechanismen kann die Erzeugung kleiner Schnitte in das Chromosomenmaterial erklärt werden.

Wie zu erwarten, sinkt bei GHz-Lasern die Pulsennergie und damit der Energieeintrag in

die Probe. Chromosomen konnten ungefärbt nicht geschnitten werden. Der Einsatz dieser Laserquelle kann das Potential für instantane Schädigung des Patienten verringern.

Untersuchungen der Abbildungseigenschaften

Nach der Abschätzung der Schädigung durch GHz-Laserstrahlung werden nun die erzielbaren Abbildungseigenschaften, also die detektierbare Signalstärke, sowie SNR und Kontrast untersucht und mit dem Standard-System mit 80 MHz verglichen.

Abb. 4.9 zeigt eine Messung an humaner Haut. Alle Bilder wurden bei der maximal applizierbaren Leistung aufgenommen. Schäden an Zellen konnten während der Untersuchung nicht festgestellt werden, auch nach sequentiell wiederholter Abbildung. Die Aufnahmen zeigen qualitativ die gleichen Strukturen der verschiedenen Hautschichten wie sie schon in Kap. 4.2 beschrieben wurden. Das streifenförmige Muster in den oberen Lagen des *stratum corneum* entsteht durch leichte Bewegung des Probanden.

Zum Vergleich der Abbildungseigenschaften von MHz- und GHz-System, wurden beide Laser über einen Klappspiegel wahlweise als Laserquelle in den Tomographen eingekoppelt, so dass die selbe Hautstelle nacheinander mit beiden Lasern untersucht wurde. Aus diesen Messungen wurde jeweils SNR, Kontrast und relative Fluoreszenzhelligkeit aus den Grauwerten der gemessenen Bildern in Abhängigkeit der Eindringtiefe bestimmt. In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse dargestellt. Aus Abb. 4.10 (a) wird ersichtlich, dass schon bei 40 mW Laserleistung am MHz-System ein viel helleres Signal detektiert wird, als bei 88 mW für den GHz-Laser. Ein direkter Vergleich der Systeme bei gleicher Leistung erweist sich als unmöglich. Voruntersuchungen und der Vergleich mit den Chromosomen haben gezeigt, dass bei 40 mW Leistung am GHz-System kein ausreichendes Signal am Detektor zur Bilderstellung mehr detektiert werden konnte. Aus Gründen der Patientensicherheit darf der MHz-Laser aber nicht mit höheren Leistungen als 40 mW betrieben werden, zudem können in den oberen Hautschichten durch Überbestrahlung SNR und Kontrast nicht bestimmt werden.

Für die Vergleichsstudie von SNR und Kontrast wurde deshalb das MHz-System bei 20 mW betrieben. Bei dieser Einstellung entsprach der visuelle Eindruck der Ergebnisse des MHz-Systems etwa denen des GHz-Systems. In jeder Tiefe der Haut konnten SNR und Kontrast bestimmt werden. Für den GHz-Laser (blaue Kurven) wurde ein SNR von 5-7 und ein Kontrast von 0,6-0,7 im *stratum corneum* gefunden, die Werte des MHz-Lasers (rote Kurven) liegen hier bei SNR 5-8 und Kontrast 0,6-0,7. Im *stratum spinosum* sinken die Werte auf 1,5-3,0 bzw. 0,1-0,3 für den GHz-Laser und 2-3 bzw. 0,1-0,4 für den MHz-Laser. Im Fall des MHz-Lasers steigt im Bereich des *stratum ba-*

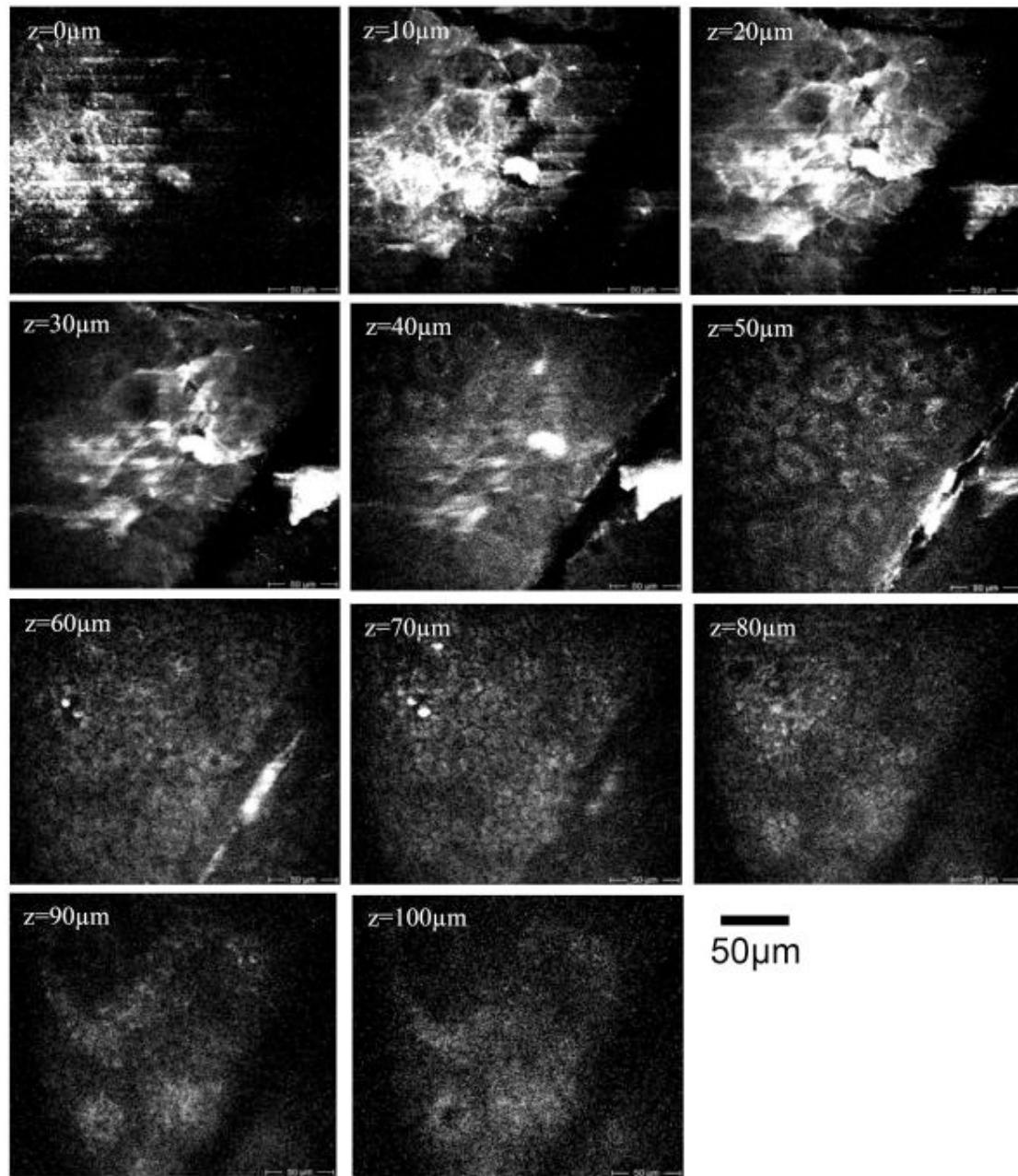


Abb. 4.9: Optisches Tomogramm humaner Haut, erstellt mit dem GHz-Laser.

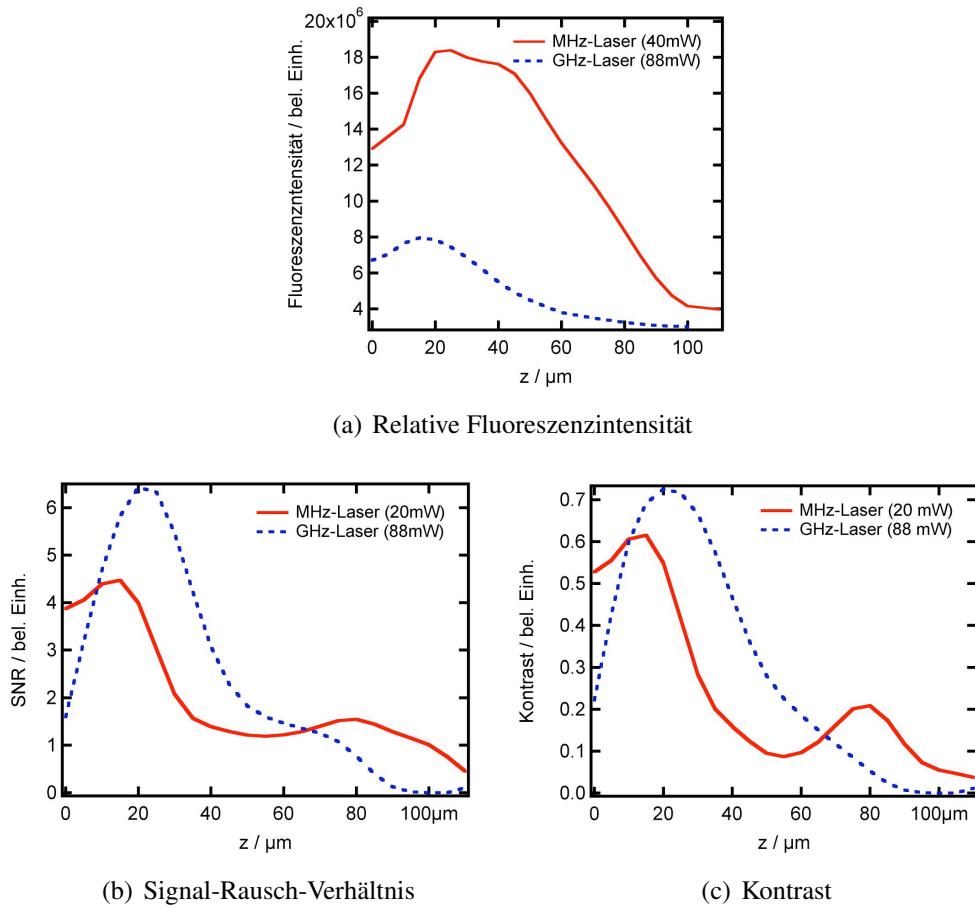


Abb. 4.10: Vergleich des GHz- und MHz-Lasers: (a) relative Fluoreszenzintensität, (b) Signal-Rausch-Verhältnis und (c) Kontrast.

sale das *SNR* ein wenig an (rote Kurve in Abb 4.10 (c), $z \approx 80 \mu\text{m}$), was an den hier etwas schärfer vom interzellulären Zwischenraum abgrenzbaren Zellen liegen kann. Im Experiment wurden alle Parameter der Messungen gleich gehalten. Im Vergleich von *SNR* und *Kontrast* liefert der GHz-Laser vergleichbare Werte und kann so zur Bildgebung eingesetzt werden. Tatsächlich dürfte durch eine gezielte Optimierung des Systems für den GHz-Laser eine noch höhere Bildqualität erreichbar sein. Nachteilig hat sich die zu geringe mittlere Leistung erwiesen. Zwar ist das Schädigungspotential für den GHz-Laser gering, aber dies bedeutet zwangsläufig auch, dass nicht viel Leistung im Gewebe deponiert wird und deshalb nur wenig Fluoreszenz angeregt wird. Aus dem Vergleich der Anregungswahrscheinlichkeiten in Gl. (2.10) ergibt sich, als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten $\langle I \rangle_t^{\text{MHz}}$ des MHz-Systems zu der des GHz-Systems

$\langle I \rangle_t^{\text{GHz}}$, bei gleicher mittlerer Leistung, Optik, Wellenlänge und Probe:

$$\frac{\langle I \rangle_t^{\text{MHz}}}{\langle I \rangle_t^{\text{GHz}}} = \frac{f_{\text{GHz}} t_{\text{GHz}}}{f_{\text{MHz}} t_{\text{MHz}}} \approx 19. \quad (4.1)$$

Demnach erzeugt der MHz-Laser trotz der hohen Repetitionsrate bei gleicher mittlerer Leistung ein 19-faches der Fluoreszenz, die der GHz-Laser liefern kann. Nicht berücksichtigt sind in dieser Abschätzung Effekte durch energy upconversion, die eine höhere Fluoreszenzintensität erzeugen können: Beim Vergleich der Intensitäten in Abb. 4.10 (a) bei unterschiedlichen Leistungen ergibt sich ein Faktor von ≈ 4 , nach (4.1) unter Einbeziehung der unterschiedlichen Leistungen sollte sich jedoch ein Faktor ≈ 9 ergeben. Das erhöhte Signal im Falle einer Messung mit dem GHz-Laser ergibt sich durch energy upconversion.

4.4 Einfluss der Fokussieroptik

Ein Einsatz verschiedener Objektive ermöglicht neue Aspekte bei der Untersuchung von Proben und Patienten zu berücksichtigen. Inwiefern der Einsatz anderer Objektive mit kleinerer numerischer Apertur, aber größerem Darstellungsbereich (axial und lateral) sinnvoll ist, wird in diesem Kapitel untersucht.

Maximale Eindringtiefe

Ein wichtiger Aspekt ist die maximale Tiefe, aus der noch sinnvoll Daten ausgewertet werden können. Dazu wurde im Experiment das Standard-Objektiv ($40\times/\text{NA}1,3$, Arbeitsabstand $200\ \mu\text{m}$) durch ein $20\times/\text{NA}0,9$ -Objektiv (Olympus) mit Arbeitsabstand 2 mm ersetzt. Im Experiment wurde Haut *in vivo* vermessen, dabei wurde ein Haarkanal so tief wie möglich verfolgt. Auszüge aus dieser Messung sind in Abb. 4.11 dargestellt. Zu sehen ist der in Kap. 4.2 vorgestellte Schichtaufbau der Haut. Ab einer Tiefe von $260\ \mu\text{m}$ können allerdings keine Strukturen mehr erkannt werden. Die Messungen zeigen ausschließlich eine diffuse Hintergrundfluoreszenz.

Einsatz verschiedener Objektive

Für verschiedene Objektive wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anregungsleistung bestimmt. Als Probe diente eine $0,1\ \text{mM}$ Fluoreszeinlösung. Für stei-

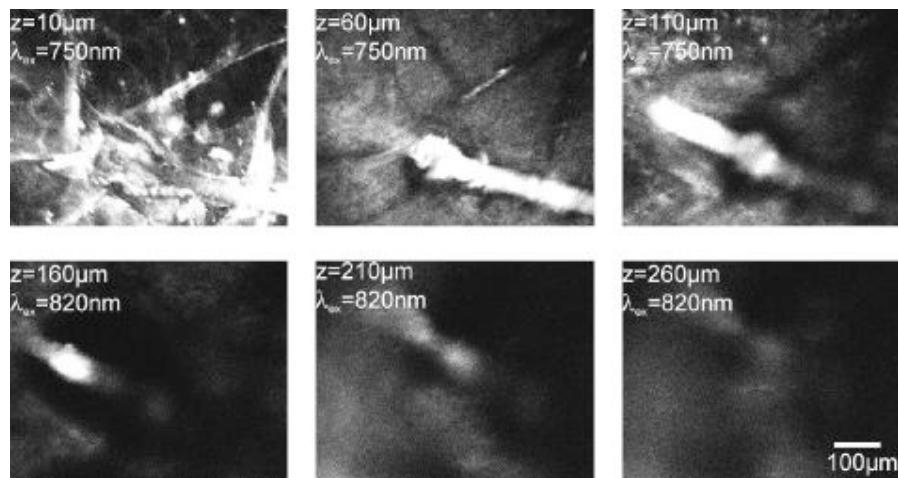


Abb. 4.11: Haarkanal *in vivo*, aufgenommen mit 20×/NA0,9-Objekiv. Bis zu einer Tiefe von 260 µm können noch Strukturen erkannt werden.

gende Laserleistungen P wurden bei gleichen Aufnahmeparametern Bilder aufgenommen, die Grauwerte eines zentralen $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ -Bereichs wurden summiert und in Abb. 4.12 dargestellt. Die Daten sind mit einem $A\bar{P}^n$ -Fit angepasst. Weiterhin musste ein linear ansteigender Hintergrund im Bild berücksichtigt werden, der möglicherweise auf einen geringen Anteil an Einphotonen-Streuung zurückzuführen ist. Die Fitparame-

Vergrößerung	NA	A	n
5x	0,16	173	1.99
10x	0,3	405	2.05
20x	0,5	482	1.95
40x	1,3	89046	2.01

Tab. 4.2: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anregungsleistung, für die Endoskopsysteme.

ter sind in Tab. 4.2 zusammengestellt. Der Parameter n beschreibt, mit welcher Potenz die mittlere Leistung \bar{P} in die Fluoreszenzintensität eingeht. Für die untersuchten Objektive ergibt sich im Rahmen der Fehlergrenzen ein quadratischer Zusammenhang, das bedeutet, dass Zweiphotonen-Anregung stattfindet. Alle untersuchten Objektive sind geeignet, um Mehrphotoneneffekte zu erzeugen und anschließend die Fluoreszenzstrahlung zu detektieren.

Der Parameter A ist ein Maß für die Effektivität der Anregung: Im Volumen eines hoch-

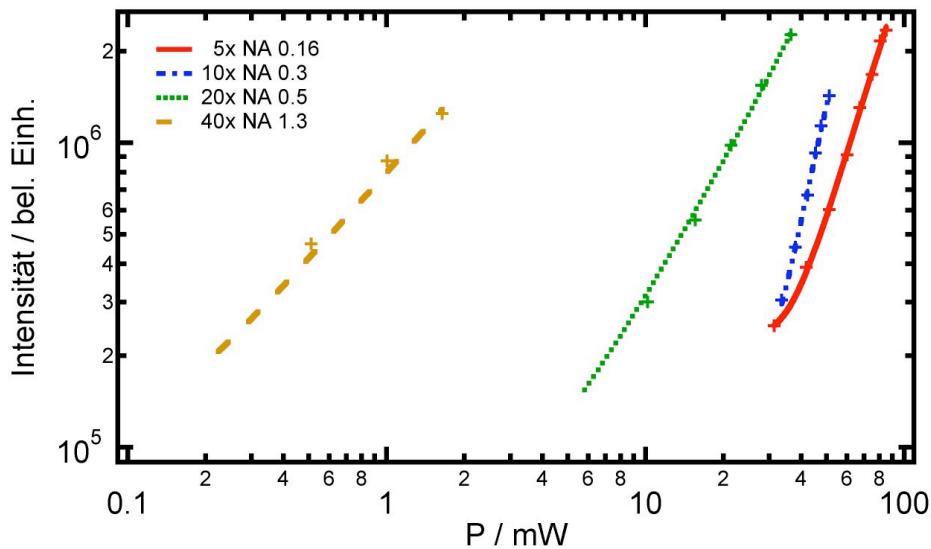


Abb. 4.12: Zweiphotonen-Effekt für verschiedene Objektive. Aufgenommen mit 0,1 mM Fluoreszein-Lösung

aperturigen Objektivs kann schon mit geringen mittleren Leistungen eine hohe Photonenanzahl im Fokusvolumen und somit eine hohe Fluoreszenzintensität erzeugt werden. Mit allen Objektiven wurden anschließend CHO-Zellen *in vitro* untersucht. Die Zellen konnten mit ausreichender Bildqualität und subzellulärer Auflösung dargestellt werden. Bei den Untersuchungen wurden bei sukzessiven Scans keine Veränderungen der Bilder festgestellt, so dass auch bei niedrig-aperturigen Objektiven nicht auf instantane Zerstörungen (Optical Breakdown) geschlossen wurde.

Die Abbildungen verschiedener Ebenen humaner Haut *in vivo* sind in Abb. 4.13 gegenübergestellt. Dabei wurde während des Experiments Zoom, Bildauflösung (512×512 Pixel), Scanzeit 13,4 s und die Detektoreinstellungen gleich gehalten. Die drei Spalten in Abb. 4.13 entsprechen den Abbildungen für das $40 \times$ /NA1,3-Objektiv, Kantenlänge 263 μm (links), $20 \times$ /NA0,5-Objektiv, Kantenlänge hier 528 μm (Mitte) und $10 \times$ /NA0,3-Objektiv, Kantenlänge 1056 μm (rechts).

Bei allen drei Objektiven kann das *stratum corneum* sehr deutlich dargestellt werden. Besonders das $10 \times$ -Objektiv bietet einen sehr guten Überblick über mehrere große Hautfelder. Dafür können kleinere Details nicht mehr aufgelöst werden. In der Ebene der lebenden Zellen zeigt das $40 \times$ -Objektiv die typische subzelluläre Auflösung mit der Mitochondrien-Struktur. Mit halbierter Vergrößerung lassen sich immer noch subzelluläre Strukturen erkennen, die dann im Fall des $10 \times$ -Objektivs nicht mehr dar-

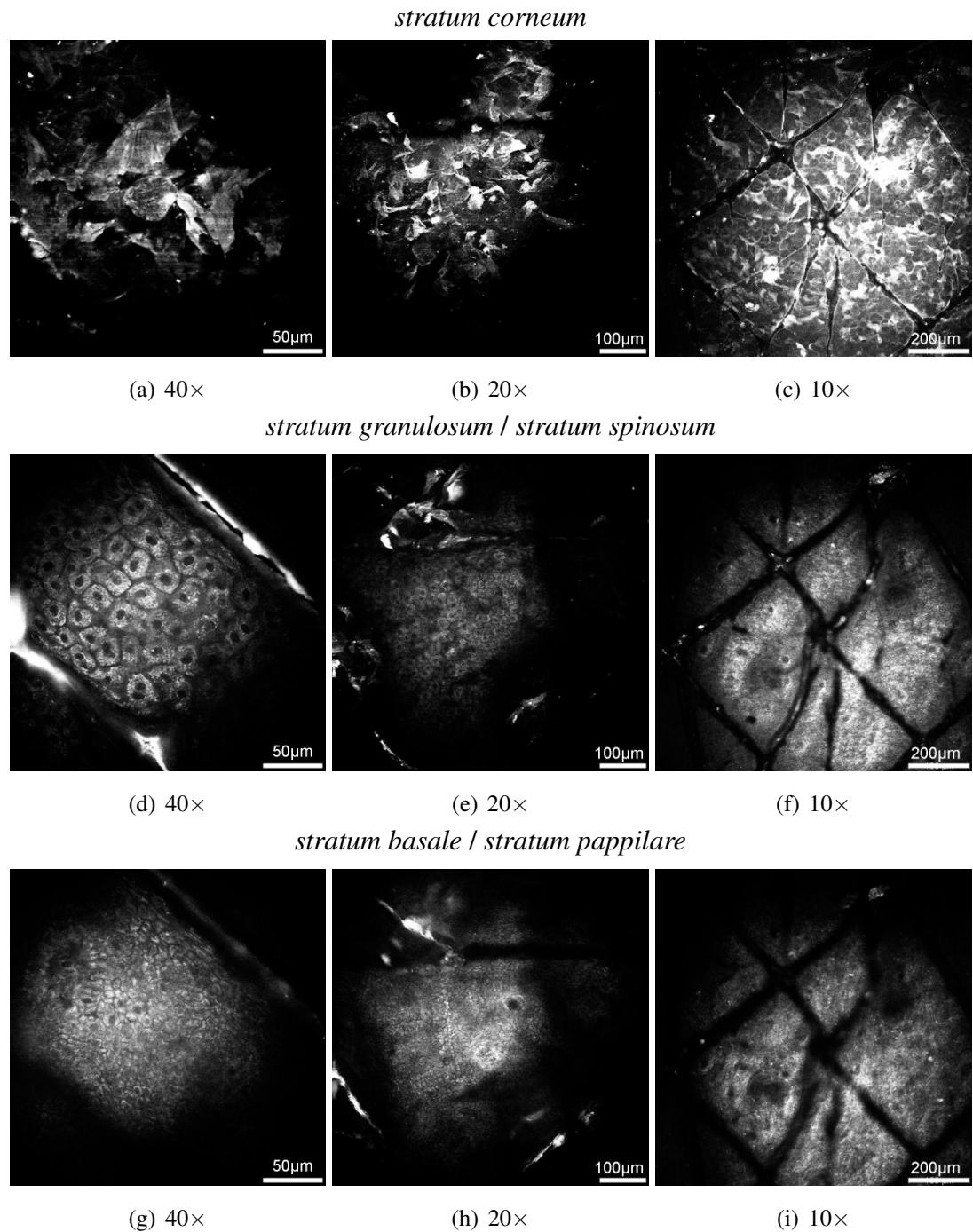


Abb. 4.13: Verschiedene Hautschichten, aufgenommen mit drei Objektiven mit unterschiedlicher Vergrößerung, mittlerer Laserleistung und NA. $\lambda = 750\text{ nm}$

stellbar sind. Die genaue Lage der Basalschicht kann ausser im Fall des $40\times$ -Objektivs nicht mehr genau festgelegt werden. Dies liegt auch an der Tatsache, dass bei großen Scanfeldern die einzelnen Hautbereiche nicht mehr auf einer Ebene sind. Besonders Abb. 4.13 (h) macht dies deutlich, da hier im linken Bereich Zellen zu sehen sind, in der rechten Bildhälfte allerdings schon eindeutig papilläre Strukturen der Dermis.

Risikoabschätzung

Bisher ist der Tomograph nicht mit den oben verwendeten zusätzlichen Objektiven zugelassen, bei der erlaubten Fokussieroptik ($40\times/\text{NA}1,3$) und den verwendeten Ti:Sa-Lasern liegt die maximal zulässige mittlere Energie bei max. 40 mW. Daher muss abgeschätzt werden, inwieweit sich das Schädigungspotential verändert.

In Ref. [88] wird das Schädigungspotential von fokussierter NIR-fs-Laserstrahlung in Haut untersucht und mit den Schädigungseffekten von UV-Strahlung (generiert mit einer UV-Lampe) verglichen. Als Maßstab für Schädigung wurde hier die Zerstörung von DNA und die daraus entstehende Bildung von Zyklobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) mittels fluoreszierender Antikörper verwendet. Als quantitatives Maß für UV-Lichtexposition dient die *minimale Erythemdosis (MED)*. Sie ist definiert als die Lichtenergie, die gerade ausreicht, um Hautrötungen hervorzurufen (MED=1). Sie ist für jeden Menschen leicht unterschiedlich und Faktoren wie Hauttyp, Bräunungsgrad, Anwesenheit von Photosensibilisatoren im Gewebe bestimmen die MED.

Das Ergebnis dieser Studie war, dass mit Laserleistungen bis zu 60 mW im Bereich des *stratum basale* die minimale Erythemdosis (MED) weit unterschritten wird (max. 0,6 MED). In Ref. [88] wurde ein System mit den selben Parametern eingesetzt, wie der in dieser Arbeit verwendete Tomograph.

Durch die Verwendung verschiedener Objektive ändert sich sowohl die Fläche, als auch die axiale Ausdehnung des Fokusvolumens. Daher wurde als vergleichender Massstab die eingestrahlte Energie pro Volumeneinheit ρ_V^E herangezogen. Beim Multiphotoneneffekt wird im gesamten Fokusvolumen Energie in die Zellen des Gewebes eingebracht. Typischerweise wird in der Literatur [78, 77] nur die Energiedichte im Fokus (in J/cm^2) als Parameter genutzt, der für instantane Schädigungen, z.B. thermische Schäden und optischer Durchbruch ein gutes Vergleichsmaß darstellt. Das Volumen V , in das tatsächlich Energie eingetragen wird, ist (da laterale Pixelgröße $>$ Fokusgröße)

$$V = \frac{4}{3}\pi \frac{1}{2} \text{PSF}_{\text{lat}} \frac{1}{2} \text{PSF}_{\text{ax}} k, \quad (4.2)$$

mit k =Scanfeld-Kantenlänge. Hier werden, als Abschätzung des maximalen Schadens, die theoretischen PSF (FWHM) verwendet. Mit der Scanzeit t , der nominellen mittleren Leistung \bar{P} , ergibt sich:

$$\rho_V^E = \frac{E}{V} = \frac{\bar{P}t}{\frac{4}{3}\pi \text{PSF}_{\text{lat}} \text{PSF}_{\text{ax}} k} \quad (4.3)$$

Die Parameter der Bilder aus Abb. 4.13 sind in Tab. 4.3 eingetragen.

In Abb. 4.14 sind die errechneten Energiedichten graphisch für die verschiedenen Haut-

Objektiv	Bildgröße / μm	PSF_{lat} / μm	PSF_{ax} / μm	Pixelgröße / μm	\bar{P} / mW	ρ_V^E / MJ/cm ³	Tiefe
$40\times /1,3$	263	0,2	0,5	0,5	9,8	8,5	<i>str. cor.</i>
					27,8	24,0	<i>str. sp.</i>
					40	34,6	<i>str. bas.</i>
$20\times /0,5$	528	0,6	1,7	1,0	61,5	2,8	<i>str. cor.</i>
					79,2	3,6	<i>str. sp.</i>
					105	12,0	<i>str. bas.</i>
$10\times /0,3$	1056	1,0	2,3	2,1	176	1,8	<i>str. cor.</i>
					151	1,5	<i>str. sp.</i>
					151	1,5	<i>str. bas.</i>

Tab. 4.3: Parameter der Bilder aus Abb. 4.13.

schichten dargestellt, wobei zum Vergleich die in [88] eingesetzten Scanparameter ebenfalls entsprechend in ρ_V^E umgerechnet [89] wurden. Trotz der mit geringerer NA steigenden mittleren Leistung des Lasers fällt ρ_V^E im Experiment ab. In allen Fällen liegt ρ_V^E immer noch um mehr als 1/4 unter denen aus [88, 89] berechneten Werten.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Abstände zwischen den einzelnen Linien zwar relativ gleich bleiben, absolut aber größer werden. Das führt dazu, dass eine einzelne Hautzelle (gleichbleibende Größe) nochmals weniger Energie in einem Scan absorbiert.

Im Vergleich befinden sich die hier errechneten Energiedichten weit unterhalb derer, die in [88] eine Dosis von 0,6 MED hervorgerufen haben. Die Verwendung von niedrig-aperturigen Objektiven in der MP-Mikroskopie ist möglich und bringt ein geringeres Schädigungspotential mit sich im Vergleich zu dem Standardobjektiv $40\times/\text{NA}1,3$.

Dies gilt nur, solange relative Größen (in % der maximalen Bildfeldgröße) verglichen werden. Beim Beobachten einer Struktur mit verschiedenen Objektiven wird durch den

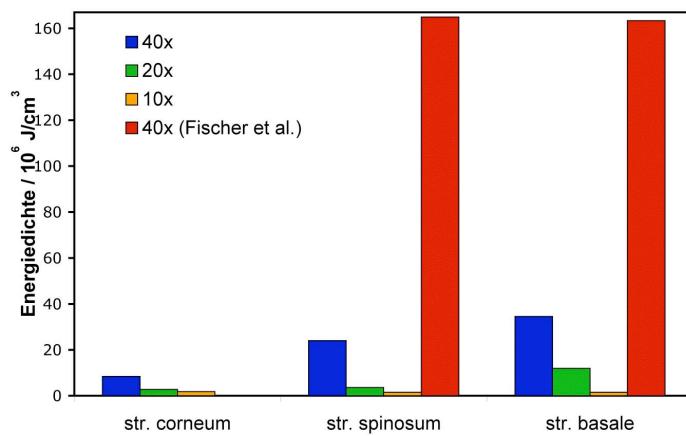


Abb. 4.14: Mittlere Energiedichten in verschiedenen Hautschichten für die unterschiedlichen Objektive aus Abb. 4.13. In rot die Vergleichswerte aus [88].

unterschiedlichen Anteil an der Bildfeldgröße bei niedrigaperturigen Objektiven mehr Energie an die Probe abgegeben als bei einem hochaperturigen Objektiv.

4.5 Fazit

Im ersten Teil dieses Kapitels wurden optische Schnitte durch die Haut vorgestellt. Die Detektion der über Zweiphotonen-Absorption angeregten Autofluoreszenz endogener Fluorophore ermöglicht, die Morphologie der epidermalen Zellen und der oberen Dermis zu untersuchen. Zusätzlich können verschiedene Fluorophore nachgewiesen werden: Melanin in der Epidermis sowie Kollagen in der Dermis. Die Anregung von Melanin geschieht, wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, über einen resonanten Zweiphotonenprozess. Dadurch zeigen die Melanozyten, verglichen mit der Umgebung, eine starke Fluoreszenz. Kollagen dagegen lässt sich eindeutig über den SHG-Prozess mit Bandpassfiltern nachweisen. Bildqualität und Auflösung wurden quantifiziert. Das System ist einsetzbar für subzelluläre Untersuchungen *in vivo*. Multiphotonen-Tomographie stellt daher ein geeignetes Werkzeug für die klinische Forschung dar.

Laserquellen mit Repetitionsraten im GHz-Bereich bieten eine Alternative zu den standard-Systemem im MHz-Bereich. Zuerst wurde gezeigt, dass instantane Schäden an ungefärbtem biologischem Material in den Experimenten mit den eingesetzten Laserparametern nicht erzeugt werden konnten, was ein verringertes Schädigungspotential eines Patienten bedeutet. Anschließend wurde der Einsatz an humaner Haut untersucht. Es zeigte sich, dass die quantifizierbaren Bildparameter SNR und Kontrast mit den von einem MHz-System erstellten vergleichbar sind. Die detektierbare Signalstärke fällt bei gleichen mittleren Leistungen wesentlich geringer aus. Jedoch steigt durch Energy Upconversion die Fluoreszenzintensität wieder an. Ein begrenzender Faktor für klinische Anwendungen des Tomographen ist die relativ geringe Größe des Scanfeldes. Auch die maximale Eindringtiefe in die Haut ist durch den Arbeitsabstand des Objektives vorgegeben. Für den klinischen Bereich ist nicht nur die genaue Untersuchung einer einzelnen Zelle bedeutend. Vielmehr muss die Morphologie großer Hautbereiche erfasst und beurteilt werden. Um ein größeres Bildfeld zu erreichen wurde untersucht, inwieweit sich Objektive mit gerinerer Vergrößerung und niedriger NA einsetzen lassen.

Die Experimente haben gezeigt, dass in biologischem Material (Zellen und Gewebe) trotz des größeren Fokusvolumens Zweiphotoneneffekte erzeugt werden können, die zu einer guten Bildqualität führen. Interessante Anwendungen sind beispielsweise die Einwirkung von Wirkstoffen an Haut [89], oder auch das Monitoring von Läsionen (z.B. Melanome, Wundheilung) *in vivo* mit Bildgrößen bis zu 1 mm.

Für eine klinische Zulassung muss die Schädigung durch den veränderten optischen Aufbau des Gerätes untersucht werden. Erste Abschätzungen für das entstehende Schädigungspotential wurden erarbeitet. Im Vergleich mit Literaturwerten und der Standard-

Multiphotonen-Tomographie

konfiguration ist die Verwendung von Objektiven mit niedriger NA bei richtiger Anwendung (Zoomfaktor) in diesem Zusammenhang als an sich ungefährlich einzustufen. Die Untersuchungen geben für den Einsatz niedrig-aperturiger Objektive eine Einschränkung in der Handhabung. Das Scanfeld darf nicht explizit eingeschränkt werden, um denselben Bildausschnitt zu erteilen, wie bei einem $40\times/\text{NA}1,3$ -Objektiv. In diesem Fall würde die in die Probe deponierte Energie stark ansteigen.

Um diese Untersuchungen in einer klinischen Anwendung münden zu lassen sind aber noch weitere Studien notwendig. Sofortige Schädigungen sind zwar nicht nachgewiesen worden, aber möglicherweise könnten bestrahlte Zellen nach der Untersuchung in Apoptose übergehen. Der Einsatz von Cloning assays oder CPDs analog der zitierten Studie ist unbedingt notwendig, um Spätfolgen zu untersuchen.

5 Optische Werkzeuge für die klinische Melanom-Früherkennung

5.1 Parametrische Fluoreszenzlebensdauer-Analysen

Im folgenden Kapitel wird gezeigt, dass mit der Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauern die Art des Gewebes identifiziert und zu charakterisiert werden kann. Als Ausgangspunkt dienen Fluoreszenz-Lebensdauer-Messungen. Die hier vorgestellte Methode setzt die gemessenen Datensätze nicht zu einem Bild zusammen, sondern reduziert sie durch statistische Methoden so weit, dass eine Automatisierung der Auswertung möglich wird. Aus Messungen an gesundem Gewebe wird ein statistischer Referenzdatensatz geschaffen. Mit dessen Verwendung wird das Ziel der Entwicklung einer Methode für die nicht-invasive, optische Krebsfrühdiagnostik *in vivo* am Beispiel Malignes Melanom der Haut erreicht.

5.2 Theoretische Betrachtungen zur Sensitivität

Im Vorfeld soll untersucht werden, wie physikalisch verlässlich die Auswertung der Datensätze aus Messungen mit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC, siehe Kap. 2.1.2) der Fluoreszenz-Lebensdauer sind. Dazu wird abgeschätzt, welche Photonenanzahl und welches Signal-Rauschverhältnis in einer Messung benötigt wird, um ausreichend Datenpunkte für eine theoretische Anpassungskurve zu erhalten.

Am Computer wurden Messkurven simuliert wie in (2.27) beschrieben. Diesen idealen Zerfallskurven wurde ein zufallsverteiltes Rauschen additiv aufgeprägt.

Die Anzahl der gemessenen Photonen pro Zeitkanal ist durch das Messprinzip nach der Poissonstatistik verteilt. Dies kann in der Simulation durch eine Variation des Pa-

rameters y_0 erfasst werden. Diese Werte wurden durch Kalibriermessungen an die experimentellen Bedingungen angepasst. Durch die langen Beobachtungszeiten pro Pixel (μs) im Vergleich zu der Wahrscheinlichkeit, in einer Pulsperiode (12,5 ns) ein Photon zu zählen, geht die Poisson-Verteilung in eine Normalverteilung über. Nach der Ergodenhypothese (Zeitmittel → Ensemblemittel) bedeutet dies, dass die Lebensdauern in der Probe auch als normalverteilt angenommen werden dürfen.

Amplituden und Fluoreszenz-Lebensdauern können einer Schwankung unterliegen, bedingt durch Variationen der lokalen Fluoreszenzintensität in der Probe. Für die Simulation ist eine Variation beider Parameter allerdings äquivalent, da eine Variation ε in der Amplitude äquivalent zu einer Variation δ im Exponenten ist:

$$(A + \varepsilon)e^{-\frac{t}{\tau}} = Ae^{\ln\varepsilon - \frac{t}{\tau}} \equiv Ae^{-\frac{t}{\tau+\delta}} \quad (5.1)$$

Als Beispiel wurde eine Fluoreszenz-Lebensdauer-Kurve verwendet, wies sie typischerweise für die Fluoreszenz von Mitochondrien vorliegt. Diese Fluoreszenz entsteht durch die Anregung von freien bzw. gebundenem NAD(P)H [49, 90, 56], entsprechend mit Amplituden $A_1 = 0,7\text{\AA}$, $A_2 = 0,3\text{\AA}$ und Lebensdauern $\tau_1 = 0,4\text{ ns}$ (freies NAD(P)H) $\tau_2 = 2,5\text{ ns}$ (gebundenes NAD(P)H). Dabei bezeichnet \hat{A} einen in der Simulation veränderbaren Parameter, der die Amplitude beschreibt. Es ergibt sich

$$\begin{aligned} I(t) = & (y_0 + \varepsilon) + A_1 e^{-t/(\tau_1+\delta)} e^{-\frac{\sigma^2}{2(\tau_1+\delta)^2}} \Theta_k \left(\frac{\sigma}{(\tau_1+\delta)\sqrt{2}} - \frac{t}{\sigma\sqrt{2}} \right) \\ & + A_2 e^{-t/(\tau_2+\delta)} e^{-\frac{\sigma^2}{2(\tau_2+\delta)^2}} \Theta_k \left(\frac{\sigma}{(\tau_2+\delta)\sqrt{2}} - \frac{t}{\sigma\sqrt{2}} \right). \end{aligned} \quad (5.2)$$

Die Parameter ε und δ wurden auch variiert. Der Parameter σ , der die IRF beschreibt, wurde auf 0,12 gesetzt. Dies entspricht einer Halbwertsbreite von 0,2 ns für den Detektor PMH-100. Analog zu den Messungen wurden 64 Zeitkanäle angenommen, dazu gibt $I(t) \rightarrow I_t \in \mathbb{N}^+$ die Anzahl der Photonen pro Zeitkanal Δt an.

Zuerst wurde bestimmt, ab welcher Mindestanzahl N von Photonen pro Kurve mit

$$N = \sum_{\Delta t=0}^{64} I_t \quad (5.3)$$

die Anpassung mit der Theoriekurve konvergiert und wie genau die vorgegebenen Werte erreicht werden können. Dazu wurden die Parameter folgendermaßen variiert: \hat{A} von 0 bis 3000 in Schritten von 10, ε pro Zeitkanal zwischen 0 und 10, bzw. 0 bis 20 gleichmäßig verteilt und $\delta = 0$. Pro Schritt \hat{A} wurden 100 Beispielkurven erzeugt und mit der Theoriekurve angepasst. Die prozentuale Abweichung des Ergebnisses dieser

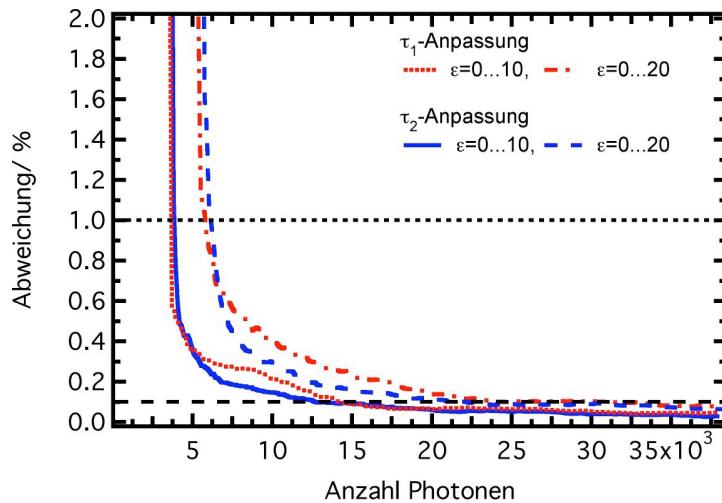


Abb. 5.1: Prozentuale Abweichung der Werte der verrauschten Anpassungskurve zu den vorgegebenen Werten vom τ_1 und τ_2 im Fall von kleinem ($\varepsilon = 0..10$) und großem ($\varepsilon = 0..20$) Untergrundrauschen.

Anpassung von dem vorgegebenen Wert der Lebensdauern wurde gegenüber N aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abb. 5.1 zu sehen. In beiden Simulationen sinkt die Abweichung steil bei einer bestimmten Anzahl Photonen ab und fällt rasch unter 1%, dabei sind die Abweichungen von τ_1 und τ_2 jeweils nahezu identisch. Im Fall von geringem Untergrundrauschen (durchgezogene Linien) liegt dieser Schwellwert bei etwa $N_1 = 5.000$, bei höherem Untergrundrauschen (gestrichelte Linien) bei etwa $N_1 = 7.000$. Zwischen $N_2 = 10.000$ und 20.000 sinkt die Abweichung unter 0,1% und fällt ab hier nur noch sehr gering ab. Dies bedeutet, dass ab rund $5000\text{-}7000$ Photonen die Anpassung verlässliche und eindeutige Werte liefert, nach Möglichkeit sollte aber eine Messkurve 10^4 Photonen pro Kurve erhalten, da mit Variationen der anderen Parameter gerechnet werden muss. Außerdem wurden dem Anpassungsalgorithmus in der Simulation die unverrauschten Parameter als Startwerte vorgegeben, dies ist bei echten Messungen nicht mehr möglich.

Bei typischen Scanzeiten zwischen 10 s und 30 s liegt N bei den messtechnisch maximal möglichen 256×256 Pixel zwischen 10^3 und $4 \cdot 10^3$ Photonen bei 80 MHz und mittlerer maximalen Anzahl der Photonen pro Periode von 0,1 (vgl. Kap. 2.1.2). Für verlässliche Fitkurven muss über mehrere Fitkurven gemittelt werden. Dazu wird im Folgenden jeder Messpunkt mit seinen nächsten 8 Nachbarn gemittelt (vgl. Kap. 3.2).

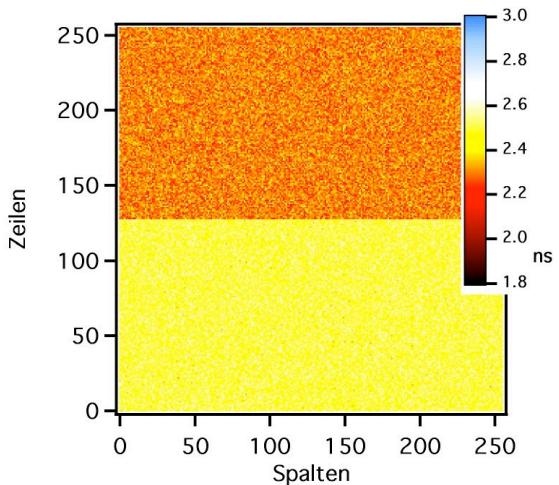
Im folgenden wurde untersucht, wie gut zwei unterschiedliche Lebensdauer-Kurven ge-

trennt werden können. Dazu wurde ein Testbild mit 256×256 Pixel erstellt. In jedem Pixel wird ein einfacher-exponentieller Fluoreszenz-Zerfall vorgegeben. Bei einer Hälfte des Bildes wurde die Lebensdauer der Kurven auf τ_a , bei den anderen auf τ_b gesetzt. Verschiedene Simulationen mit unterschiedlichen Parametern wurden durchgeführt, die Kurven wurden mit der jeweiligen Theoriekurve angepasst. Die Lebensdauern wurden in einer FLIM-Karte dargestellt und die Häufigkeiten für die Lebensdauern wurden als Histogramm aufgetragen.

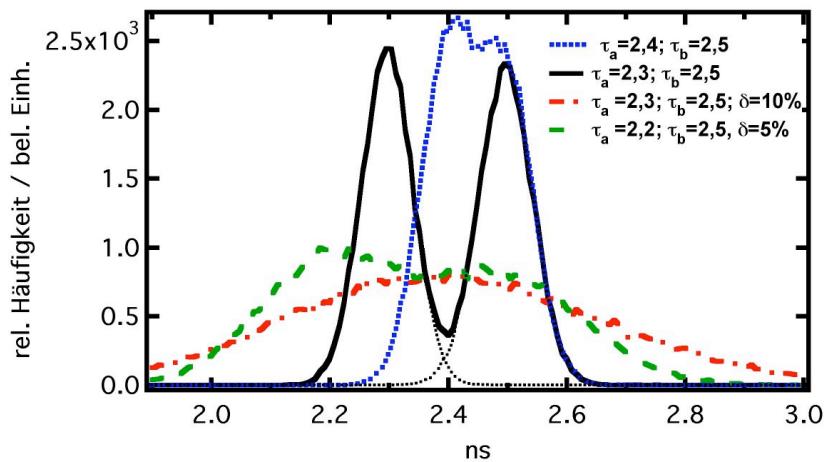
Zuerst wurde die Variation der Lebensdauern unterdrückt, $\delta = 0$ und nur der Untergrund variiert mit $\varepsilon=5\%$ (entspricht einer Variation zwischen 0 und 10 Photonen, siehe (5.2)). Als Beispiel für das Aussehen der FLIM-Karten dient Abb. 5.2 (a) mit der Karte der ersten Simulation mit $\tau_a=2,3$ ns, $\tau_b=2,5$ ns. Das zugehörige Histogramm ist in Abb. 5.2 (b) gezeigt (schwarze Kurve). Es zeigt zwei voneinander getrennte Gauß-Verteilungen mit einem Maximum beim jeweiligen Sollwert, die leicht ineinander übergehen (schwarz gepunktete Linien, Anpassung mit Gaußkurve $\chi^2 = 0,99$). Durch das Untergrundausraschen verteilen sich die errechnete Lebensdauer statistisch um die beiden Sollwerte. Werden die Werte für die Lebensdauern näher zusammen gerückt mit $\tau_a=2,4$ ns (blaue Kurve), überlappen die beiden Komponenten stark. Anschließend wurde zusätzlich der Parameter δ variiert. Die rote Kurve in Abb. 5.2 (b) zeigt das Histogramm für die Situation $\tau_a=2,3$ ns, $\tau_b=2,5$ ns, $\delta = 10\%$. Im Vergleich zu der ersten Situation (schwarze Kurve) können nun die beiden Verteilungen nicht mehr voneinander getrennt werden, es erscheint eine breite, gleichmäßig zufallsverteilte Histogrammkurve. Erst bei weniger Variation der Lebensdauern, $\delta = 5\%$ und weiter getrennten Werten für τ mit $\tau_a=2,2$ ns, $\tau_b=2,5$ ns können wieder zwei Komponenten im Histogramm identifiziert werden.

Das Ergebnis dieser Simulation ist, dass durch das Untergrundausraschen eine statistische Verteilung der errechneten Lebensdauern um den Sollwert entsteht. Diese Verteilung ermöglicht aber noch, innerhalb der Grenzen des durch die IRF vorgegebenen Auflösungsvermögens zwei Bereiche trennen zu können. Durch statistische Schwankungen in der Lebensdauer in der Probe werden die Breiten der Histogramme aufgeweitet. Je nach Größe der Variation sinkt das Auflösungsvermögen auf Werte >IRF. In biologischen Proben ist eine solche signifikante statistische Verteilung der Lebensdauern zu erwarten.

Trotz der statistischen Varianz können Information aus überlappenden Verteilungskurven gewonnen werden. Zur Veranschaulichung wurde ein zweites Testbild eingeführt. Es bestand aus zwei Pixel breiten Linien im Abstand von zwei Pixeln auf einem homogenen Feld. Im Gegensatz zum ersten Testbild wird nun zusätzlich eine räumliche



(a) Tau-Karte



(b) Histogramme

Abb. 5.2: Ergebnisse der Simulationsrechnungen zur Unterscheidbarkeit von zwei Zerfallskurven. Die Falschfarbendarstellung zeigt die Lebensdauern der Pixel. (a) Beispiel der FLIM-Karte mit den Parametern $\tau_a=2,3\text{ ns}$ (Pixel obere Hälfte) und $\tau_b=2,5\text{ ns}$ (untere Hälfte). (b) Histogramme der einzelnen Simulationsschritte.

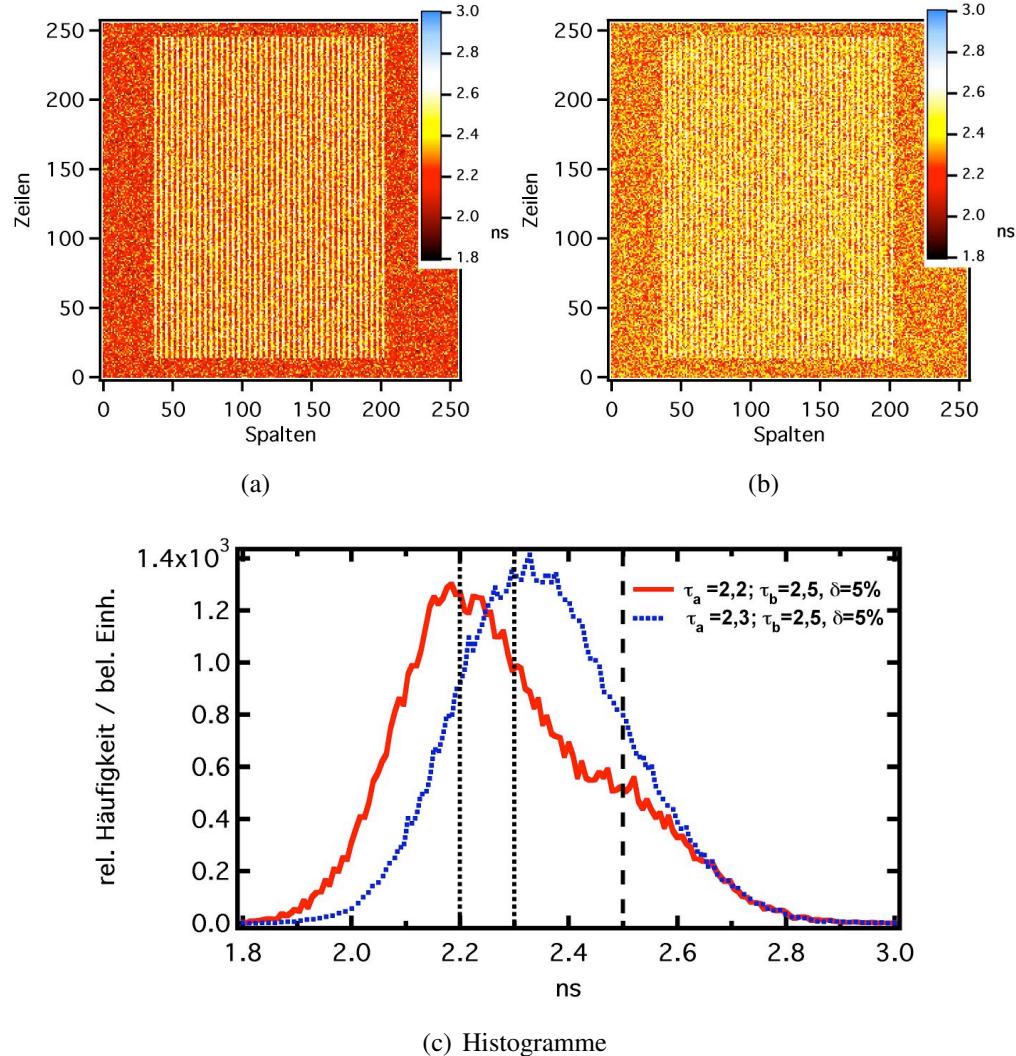


Abb. 5.3: Simulation zur Trennung der Zerfallskurven bei strukturierten Proben. Die Falschfarendarstellungen in (a) und (b) zeigen die Lebensdauern der Pixel. (a) $\tau_a=2,2$ ns (Hintergrund), $\tau_b=2,5$ ns (Streifen); (b) $\tau_a=2,3$ ns (Hintergrund), $\tau_b=2,5$ ns (Streifen). (c) Histogramme der Lebensdauern der FLIM-Karten aus (a) und (b).

“morphologische“ Eigenschaft aufgeprägt. Die Linien wurden als Signal, das Feld als Hintergrund interpretiert, mit jeweils unterschiedlichen Lebensdauern. Die so erzeugten FLIM-Karten sind in Abb. 5.3 (a) und (b) dargestellt, die zugehörigen Histogramme zeigt Abb. 5.3 (c). Die Werte für die Lebensdauern wurden folgendermaßen eingestellt: $\tau_a=2,2$ ns, $\tau_b=2,5$ ns in Abb. 5.3 (a) (rote Kurve) und $\tau_a=2,3$ ns, $\tau_b=2,5$ ns in Abb. 5.3 (b) (blaue Kurve). Die FLIM-Karten zeigen gut, dass über die strukturelle Information noch eine Trennung der einzelnen Bereiche erfolgen kann. Im Fall $\tau_a=2,2$ ns kann dies noch anhand der erhöhten rechten Flanke des Histogramms geschlossen werden, aber für $\tau_a=2,3$ ns ist dies nicht mehr möglich. Hier ist also eine Kombination der strukturellen Information mit den Histogrammen notwendig, um eine Aussage über vorhandene Lebensdauer-Klassen zu treffen. Wenn die gleiche Anzahl an Bildpunkten stochastisch über die Probe verteilt vorliegt, erhält man das identische Histogramm. Allerdings könnte aus der Kartierung der Lebensdauern (Bild) dann nicht mehr auf das Vorhandensein von zwei Unterschiedlichen Klassen von Lebensdauern geschlossen werden.

Die hier gezeigte Verteilungskurven lassen sich mit einer Normalverteilung gut anpassen. Dieses Verhalten wurde auch für die Messdaten beobachtet. Sie weichen nur geringfügig von Gaußverteilungen ab. In diesem Fall reicht es aus, zusammen mit dem Maximalwert die zentralen Momente einer Lebensdauer-Verteilung anzugeben. Diese sind, wie in Kap. 3.2 beschrieben, Mittelwert, Varianz, Schiefe und Wölbung (Kurtosis). Überspitzt formuliert bedeutet dies, dass letztendlich eine Datenreduktion von 4.194.304 Messpunkten auf fünf Werte durchgeführt wird. Die Momente sind ausreichend, die physikalischen Gegebenheiten am Probenort zu beschreiben.

Bei der Anwendung wird ein Signal aus unterschiedlichen Tiefen detektiert. Für die Anwendung Haut in dieser Arbeit sollen die Effekte nun kurz betrachtetet werden. Der Brechungsindex in der Epidermis variiert zwischen $n=1,55$ und $n=1,3$. Damit verlängert sich die Laufzeit

$$t = n \frac{s}{c_0} \quad (5.4)$$

mit Schichtdicke s und Vakuum-Lichtgeschwindigkeit c_0 bei Durchgang durch beispielsweise $s=10 \mu\text{m}$ dickes Gewebe um 40 bis 50 fs. Da eine maximale Abbildungstiefe der Multiphotonen-Tomographie zwischen 200 und 300 μm liegt (siehe S.56), kann diese Verzögerung im Vergleich zur IRF (24 ps / 220 ps) vernachlässigt werden (Anisotropiefaktor $g > 0,6$).

Nach [91] muss bei der genauen Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffes in einem Medium mit Brechungsindex n eine Korrektur durchgeführt werden. Beschreibt $k = 1/\tau$ die Summe aller Zerfallskonstanten, gilt nach der Strickler-Berg-

Gleichung folgender Zusammenhang zwischen k , n , der molaren Extinktion ε_ν bei der Frequenz ν im angeregten Zustand und Frequenz ν_0 im Grundzustand [91]:

$$k = 2,88 \cdot 10^{-9} n^2 \int \frac{(\nu_0 - \nu)^2}{\nu} \varepsilon_\nu d\nu. \quad (5.5)$$

Unter der Annahme, dass k im hier betrachteten Fall nicht durch die Umgebung, besonders durch die Viskosität, beeinflusst wird, ergibt sich in erster Näherung [91]

$$\tau = \beta \frac{1}{n^2}, \quad (5.6)$$

und im Fall von Haut ein Wert von $\beta=0,9$.

Im Rahmen der hier gemessenen Lebensdauern der Fluorophore ist die Auswirkung des Korrekturfaktors gering und verändert die Lebensdauern nur in vernachlässigbarer Weise.

5.3 Entwicklung der Methoden und Vorexperimente

5.3.1 Humane Haut *in vivo*

Von humander Haut *in vivo* wurden mit den in Kap. 2.1.2 beschriebenen Detektorsystemen FLIM-Karten der Haut für verschiedene Tiefen aufgenommen. Als Beispiel sind in Abb. 5.4 die FLIM-Karten der τ_2 -Verteilung verschiedener Hautebenen dargestellt, aufgenommen mit dem DetektorPMC-100 (IRF 220 ps). Die Bilder besitzen gleiche

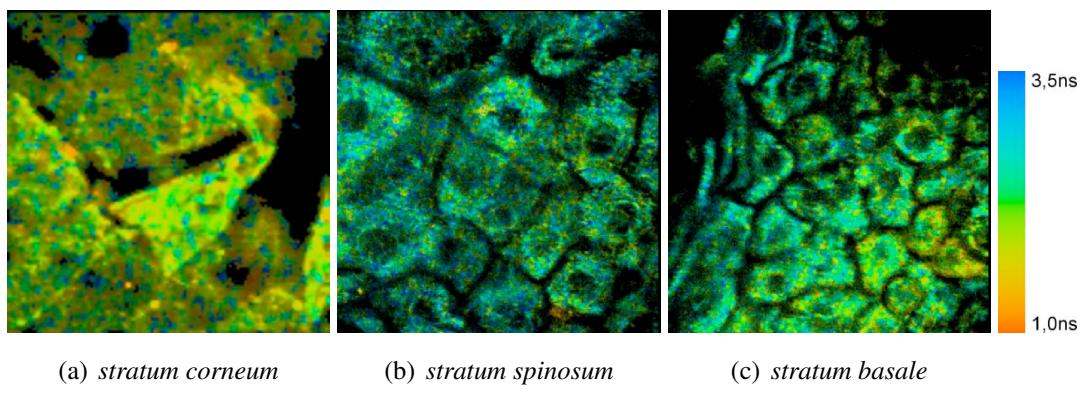


Abb. 5.4: τ_2 -Karten humander Haut *in vivo* in verschiedenen Hautschichten.

Farbkodierung von 1ns (rot) bis 3,5 ns (blau). In Abb. 5.4 (a) können Hautschuppen des

stratum corneum erkannt werden, die Lebensdauer liegt hier im Bereich von $\tau_2 \approx 2\text{ns}$. Dazwischen sind kleinere Bereiche mit Lebensdauer um 1-1,5 ns (rötlich) und um 2,8-3 ns zu erkennen (blau). Solche partikelförmige Strukturen konnten in verschiedenen Messungen mit dem Tomographen beobachtet werden. Da diese Region dauernd wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt ist und diese Strukturen nur direkt auf der Oberfläche gemessen werden konnten, handelt es sich hierbei wahrscheinlich nicht um direkte Bestandteile der Haut, sondern um Bakterien, Pilze, Schweißreste, Talgreste oder ähnliches.

Die anschließende Abb. 5.4 (b) zeigt Zellverbände des *stratum spinosum*, die Werte von τ_2 variieren von 2-2,4 ns. Innerhalb des Zytoplasmas sind einzelne kleine, nur wenige Pixel große Bereiche zu erkennen, die eine relativ kurze Lebensdauer von etwa 1,7 ns besitzen (gelb). In dieser Aufnahme handelt es sich um den oberen Bereich des *stratum spinosum*, was in Vergleich mit Abb. 5.4 (a) den Schluß nahe legt, dass es sich bei den gelben Bereichen um Keratingranula handelt, die hier in den Zellen gebildet werden. Dies wird im Folgenden bestätigt werden. Eine andere Erklärung, die im Anschluß wieder ausgeschlossen werden kann, wären Melaningranula, die von Melanozyten im *stratum basale* an die Keratinozyten abgegeben werden.

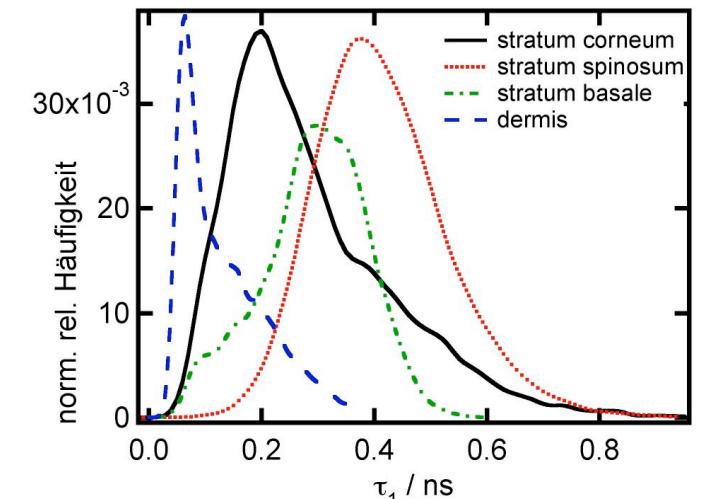
Das *stratum basale* ist in Abb. 5.4 (c) zu sehen. Die Zellen sind kleiner, die Zellkerne sind nicht mehr gut erkennbar. Die Zellen weisen etwa die gleiche Farbkodierung auf. Auch in dieser Schicht finden sich hellere Bereiche, die hier nicht auf Keratin zurückführbar sein sollten, da es erst in höheren Schichten gebildet wird. Andererseits befindet sich in diesen Schichten Melanin, das in den Zellen eingelagert wird.

In Abb. 5.5 ist die Verteilung in den einzelnen Ebenen als Histogrammkurve dargestellt, dabei zeigt Abb. 5.5 (a) die τ_1 -Verteilung und Abb. 5.5 (b) die τ_2 -Verteilung (Daten aufgenommen mit dem Detektor MCP, IRF=22 ps(FWHM)). Grundsätzlich bestätigen die Graphen die schon oben beschriebenen Verhältnisse. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die τ_1 -Verteilungen im Bereich lebender Zellen zumeist zwischen 0,1 und 0,7 ns variieren, auch die Messung des *stratum corneum* liegt in diesem Bereich.

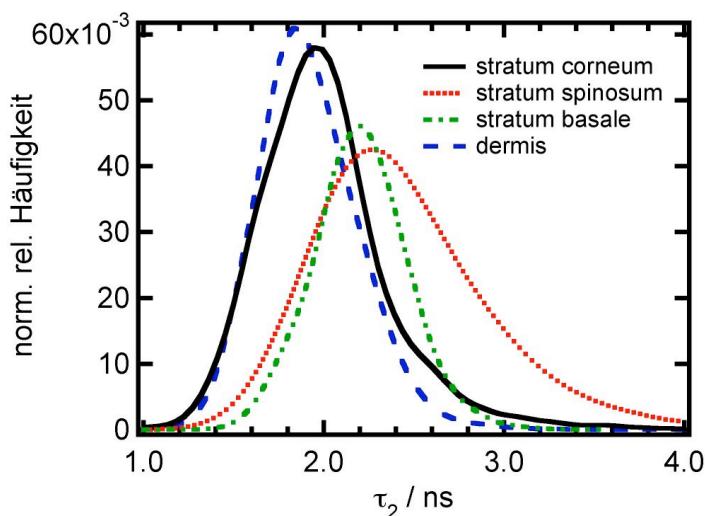
Die τ_1 -Werte für die angefügte Verteilung der Lebensdauern in der Dermis besitzt ein scharfes Maximum bei 0,06 ns und eine breite Schulter zu größeren Werten.

Die zentralen Momente der Lebensdauerverteilungen sind in Tab. 5.1 eingetragen. Die meisten Verteilungen sind rechtsschief und steilgipfliger als die Normalverteilung, eine Ausnahme bildet hier das *stratum basale*. Gemeinsam ist allen auch eine geringe Varianz ($< 0,3$)

Die Lebensdauer eines Fluorophors ändert sich mehr oder weniger stark mit der Umgebung. Die hier beobachteten breiten Verteilungen der Lebensdauern bedeuten eine nor-



(a) Kurze Komponente τ_1



(b) Lange Komponente τ_2

Abb. 5.5: Verteilungen der Lebensdauer in verschiedenen ausgewählten Ebenen der Haut *in vivo*, aufgenommen mit schnellem Detektor (MCP).

	τ_1				τ_2			
	str. cor.	str. spin.	str. bas.	derm.	str. cor.	str. spin.	str. bas.	derm.
Max.	0,20	0,38	0,30	0,06	1,94	2,26	2,20	1,83
Mittelw.	0,29	0,41	0,29	0,13	1,98	2,44	2,13	1,92
Varianz	0,02	0,01	0,01	0,01	0,11	0,26	0,04	0,08
Schiefe	1,06	0,57	-0,29	0,90	0,47	0,79	-0,58	0,48
Kurtosis	1,06	0,62	-0,22	0,04	0,46	1,10	-0,05	0,69

Tab. 5.1: Statistische Auswertung der Lebensdauer-Histogramme aus Abb. 5.5.

malverteilte Verteilung der Fluorophor-Umgebungen auf molekularer Ebene, die selbst wiederum nahezu homogen über das gesamte Bild normalverteilt auftreten. Es existieren keine Spitzen, also Bereiche in denen eine Lebensdauer verstärkt messbar ist. Die erste Zufallsverteilung ergibt sich aus der Tatsache, dass das Fokusvolumen nicht punktförmig ist, sondern eine Größe von mindestens $0,15 \mu\text{m}^3$ besitzt. Durch den Laserstrahl können daher gleichzeitig mehrere unterschiedliche Moleküle angeregt werden, die in der lebenden Zelle alle in verschiedenen chemischen Umgebungen vorliegen können. Trotz dieser mehrfachen Normalverteilung lassen sich bestimmte Charakteristika für gesundes Gewebe in der jeweiligen Tiefe der Epidermis finden.

Stratum corneum: Keratin Im Fall der τ_1 -Komponente wird hier die breiteste Verteilung (größte Varianz mit 0,02) beobachtet die sich deutlich von der hauptsächlich durch SHG bestimmten τ_1 -Komponente der Dermis abhebt. Beide Verteilungen der Komponenten des *stratum corneum* sind vergleichsweise steilgipflig (Kurtosis) und rechtsschief. Die Analyse τ_2 -Komponente lässt keine eindeutige Unterscheidung zur Dermis zu, die der τ_1 -Komponente ist aber signifikant. Der Unterschied liegt im SHG-Signal begründet, so dass Maximum, Mittelwert und Kurtosis zur Charakterisierung dienen.

Bei Messungen im *stratum corneum* muss allerdings beachtet werden, dass diese Schicht ständig den Umwelteinflüssen ausgesetzt ist. Dies ist zum Beispiel wichtig für die Interpretationen bei Messungen von Transportvorgängen von Wirkstoffen in die Haut. Hier muss darauf geachtet werden, dass von aussen eingebrachte Farbstoffe (Xenofluorophore) eindeutige Identifikationsparameter besitzen sollten.

Stratum spinosum und stratum basale: Lebende Zellen Die Verteilungen im *stratum spinosum* und *stratum basale* sind ähnlich. Dies liegt daran, dass es sich in beiden Fällen um lebende und vor allem gesunde Zellen handelt. Die Verteilungen der τ_1 -Komponenten können deutlich voneinander getrennt werden, dabei sind die des *stratum basale* leicht linksverschoben. Die τ_2 -Komponente der Zellen besitzt im Bereich des *stratum basale* eine Verteilung mit geringer Varianz von 0,04, die sich mit dem Aufsteigen der Zellen in der Epidermis stark verbreitert zu 0,26. Die Maxima und Mittelwerte verschieben sich dabei nur leicht von 2,20 und 2,13 zu 2,26 und 2,44. Unterscheidungsmerkmale sind Schiefe und Kurtosis, die von negativen zu positiven Werten wechseln. Auffallend ist auch ein großer Anteil an größeren Lebensdauern.

Das hier beobachtete Verhalten der Lebensdauer-Verteilungen lebender Zellen *in vivo* entspricht dem, das in der Literatur in *in vitro*-Versuchen beobachtet wurde. In Ref. [49, 90] und [56] wurde die Lebensdauer-Verteilung gesunder Zellen (CHO-Zellen bzw. humane dermale Fibroblasten) bestimmt, und ebenfalls ein biexponentieller Fit verwendet. Die Autoren bestimmten die Komponenten zu $\tau_1 \approx 0,4$ ns bzw. $\tau_2 \approx 2$ ns [90] und $\tau_1 = 0,444 \pm 0,016$ ns für NADH, $\tau_1 = 0,412 \pm 0,015$ ns für NADPH bzw. $\tau_2 = 2,225 \pm 0,20$ ns [56] für NAD(P)H. Die geringen Fehlergrenzen in [56] werden von den Autoren für die statistische Schwankung bei der Auswertung angesetzt, weshalb sie kleiner als die IRF des Messsystems sind. Dabei werden die Ergebnisse so interpretiert, dass die kurze Komponente dem freien NAD(P)H und die lange Komponente dem gebundenen NAD(P)H entspricht. Diese Literaturwerte sind kompatibel mit den hier gemessenen Daten.

Mit der Analyse der Verteilungskurve können die kurzlebigeren Bereiche in Abb. 5.4 (b) als Keratin identifiziert werden, das in den Zellen gebildet und eingelagert wird. Diese Bereiche entsprechen in den Verteilungskurven in Abb. 5.5 (b) dem Teil, um den sich die τ_2 -Verteilung von *stratum basale* hin zum *stratum spinosum* verändert hat. Weiterhin unterscheiden sich die Keratin-Bereiche aus Abb. 5.4 (b) deutlich von den ebenfalls gelb eingefärbten großflächigen Bereichen in Abb. 5.4 (c) durch das Verhältnis der Amplituden des biexponentiellen Fits. Die zugehörigen Histogramme der Fluoreszenz-Lebensdauer liefern hier keinen Anhaltspunkt für eine Unterscheidung. Erst wenn direkt Messkurven beispielhaft hinzugezogen werden, erschließen sich Details. In Abb. 5.6 sind solche Beispiele von Fluoreszenz-Lebensdauerkurven von Bereichen mit nahezu gleichen Abklingzeiten dargestellt. Die unterschiedlichen Schichten sind farblich entsprechend der Kodierung der obigen Abbildungen eingefärbt. Es ergeben sich folgende

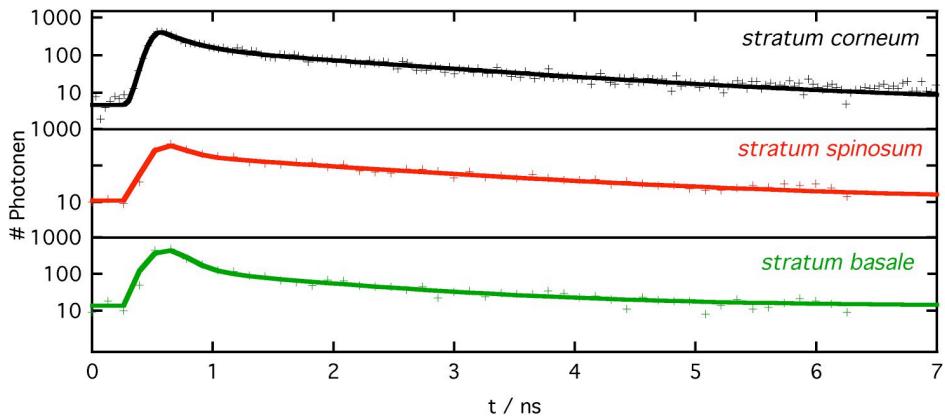


Abb. 5.6: Abklingkurven verschiedener Hautebenen *in vivo* für Bereiche mit gleicher Farbkodierung der τ_2 -Komponente. *stratum corneum*: $A_1=65\%$, $\tau_1 = 0, 2 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1, 9 \text{ ns}$; *stratum spinosum*: $A_1=58\%$, $\tau_1 = 0, 5 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2, 0 \text{ ns}$; *stratum basale* $A_1=88\%$, $\tau_1 = 0, 2 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1, 9 \text{ ns}$.

Fitparameter:

- *stratum corneum*: $A_1=65\%$, $\tau_1 = 0, 2 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1, 9 \text{ ns}$
- *stratum spinosum*: $A_1=58\%$, $\tau_1 = 0, 5 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2, 0 \text{ ns}$
- *stratum basale*: $A_1=88\%$, $\tau_1 = 0, 2 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1, 9 \text{ ns}$

Obwohl die Lebensdauern der kritischen Bereiche des *stratum corneum* und des *stratum basale* gleiche Werte annehmen, sind die Verhältnisse der Amplituden A_1 von 58% zu 88% sehr unterschiedlich.

Mit dieser Information kann nun jeder Bereich der humanen Haut anhand der Lebensdauer charakterisiert werden. Insbesondere bietet sich die Möglichkeit, durch Erfassung großer Datenmengen typische Werte zu ermitteln. Krankhafte Veränderungen könnten anhand solcher Bibliotheken verglichen und eingeordnet werden.

5.3.2 Melanin

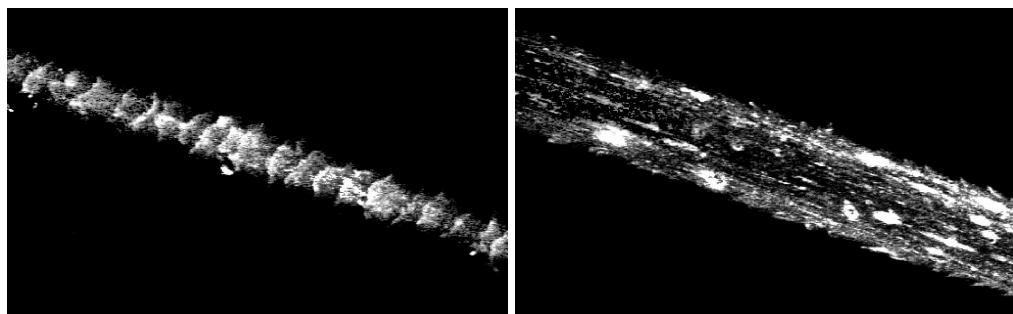
In Kap. 2.3 wurde beschrieben, dass Maligne Melanome durch eine Vermehrung von Melanozyten definiert sind. Diese finden sich dort vor allem in Hautschichten oberhalb des *stratum basale*, wo sie in gesunder Haut nicht vorkommen sollten. Multiphotonen-Tomographie allein bietet aber nur die Möglichkeit, Melanozyten *in vivo* anhand der

Morphologie zu identifizieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Analyse der Lebensdauer-Charakteristik zur eindeutigen Identifikation der Melanozyten.

Nach [67] ändert sich in Melanomen das Verhältnis von Eumelanin zu Phäomelanin im Gegensatz zu gesunder Haut. Eine Identifikation von Melanin und insbesondere der Phänotypen ist daher wünschenswert und könnte in der Melanomdiagnostik eingesetzt werden.

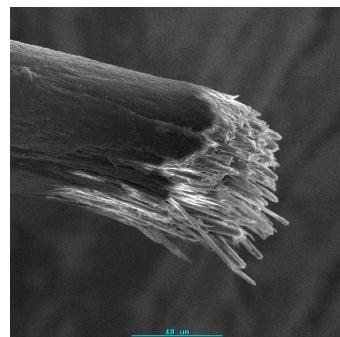
In diesem Kapitel wird gezeigt, dass mit der Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer-Charakteristik Melanin nachgewiesen werden kann.

Zuerst wurden auch hier Referenzdatensätze erarbeitet. Dazu bietet sich die Untersu-



(a) Haar: Cuticula, $z=5 \mu\text{m}$

(b) Haar: Cortex, $z=10 \mu\text{m}$



(c) REM-Aufnahme eines
Haares

Abb. 5.7: (a), (b) menschliches Haar in verschiedenen Tiefen, $\lambda_{ex}=800 \text{ nm}$,
(c) REM-Aufnahme eines Haares

chung von verschiedenfarbigen Haaren an und der Vergleich dieser Ergebnisse mit synthetischem Melanin. Der Melanintyp in Haaren ist über Literaturwerte bekannt [92, 93] und die Proben sind einfach zu erhalten und zu präparieren. Außerdem kann durch die Wahl der Haarfarbe der Melanintyp vorbestimmt werden.

In Abb. 5.7 sind die Fluoreszenz-Intensitätsbilder eines braunen Haares dargestellt, an-

geregt bei 800 nm. Typischerweise wurde eine Anregungsleistung von \bar{P} von 3-7 mW zur Bilderzeugung verwendet. In Abb. 5.7 (c) ist zum Vergleich eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines weiteren Haares dargestellt. Deutlich ist in Abb. 5.7 (a) die schuppenartige Struktur der Cuticula zu erkennen. Hier ist das Keratin das hauptsächliche Fluorophor. In tieferen Ebenen kann die faserartige Zellstruktur des Cortex erkannt werden, in Übereinstimmung mit Abb. 5.7 (c). An den Rändern sind die nun eher senkrecht abstehenden Keratinschuppen gut auflösbar. Außerdem wird in Abb. 5.7 (b) anhand der hellen Bereiche deutlich, dass trotz der geringen Anregungsleistung im Bereich von 4-7 mW in bestimmten Bereichen irreversible Schädigungen erzeugt werden können. Wird die Leistung stark erhöht, werden die hellen Bereiche größer und können schließlich das gesamte Haar ausfüllen. Im Durchlichtmodus des Mikroskops betrachtet erscheinen die so bestrahlten Bereiche geschwärzt und sichtlich beschädigt. Als ein so stark absorbierendes Medium kommen nur die Melaningranula in Frage. Gestützt wird diese Beobachtung dadurch, dass die Schädigungen hauptsächlich in Randbereichen des Haares oder nur in geringen Tiefen (max. 5-15 μm) auftraten. Zudem sind die beschriebenen Effekte mit denen vergleichbar, die in frischen humanen Hautbiopsien im Fall zu starker Bestrahlung von Melanozyten auftreten.

Nach dieser Voruntersuchung sind in Abb. 5.8 die Lebensdauer τ_2 von humanen Haaren *in vitro* farbkodiert dargestellt. Die aus Keratin bestehende Cuticula ist Abb. 5.8 (a) sehr

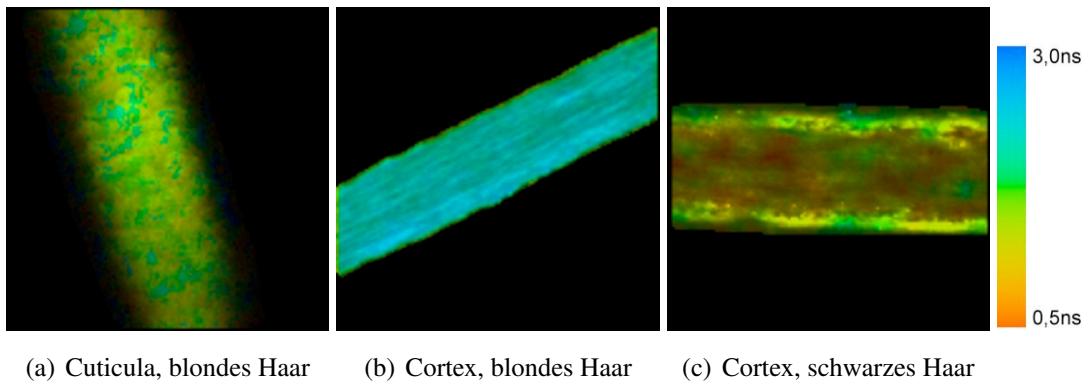


Abb. 5.8: FLIM-Karten von Haaren

gut zu erkennen, die Färbung liegt im Bereich von 1,5 ns (gelb-grün). Die nebenstehenden Abb. 5.8 (b) und (c) sind beide jeweils in einer Tiefe von etwa 10 μm aufgenommen worden. Dort ist die Konzentration von Melaningranula am größten [41]. Ein blondes Haar zeigt Abb. 5.8 (b). Die spindelförmigen Zellen sind im Cortex gut als lange Strukturen erkennbar. Der Schwerpunkt der Farbverteilung liegt bei etwa 2,5 ns (blau-türkis).

Die Ränder, die zur Cuticula gehören, können als grüne Umrandungen erkannt werden. Dagegen zeigt Abb. 5.8 (c) ein schwarzes Haar. Die Cuticula besitzt hier ebenso eine Lebensdauer von etwa 1,5 ns. Das Innere des Haares weist eine deutlich kürzere Lebensdauer von 1 ns (rot) auf. Eine Zellstruktur im Cortex kann nicht mehr erkannt werden. Die beiden Haarsorten unterscheiden sich merklich in ihrer Fluoreszenz-Lebensdauer. Im Fall von blonden Haaren konnten noch aus den tieferen Ebenen des Haares ausreichend Fluoreszenzphotonen detektiert werden. Diese Situation ändert sich im Fall von schwarzen Haaren: Das Melanin absorbiert sehr stark die (im sichtbaren Bereich emittierten) Fluoreszenzphotonen, so dass bei diesen Haaren aus den äußeren Bereichen sehr viel, aus dem Inneren allerdings nur sehr wenig Fluoreszenz detektiert werden kann. Die Tiefenabhängigkeit des Fluoreszenzsignals der Melaningranula wurde in Abb. 5.9 dokumentiert. Sie zeigt dazu die τ_2 -Komponente eines schwarzen Haares in Falschfarbendarstellung. Dabei wurde die Farbkodierung so gewählt, dass (eu)melaninhaltige Bereiche ($\tau_2 < 0,8$ ns, rot) leicht von keratinhaltigen Bereichen ($\tau_2 > 1$ ns, blau) unterscheiden werden können. Im Bereich nahe der Oberfläche ($z=5 \mu\text{m}$) ist die τ_2 -Komponente

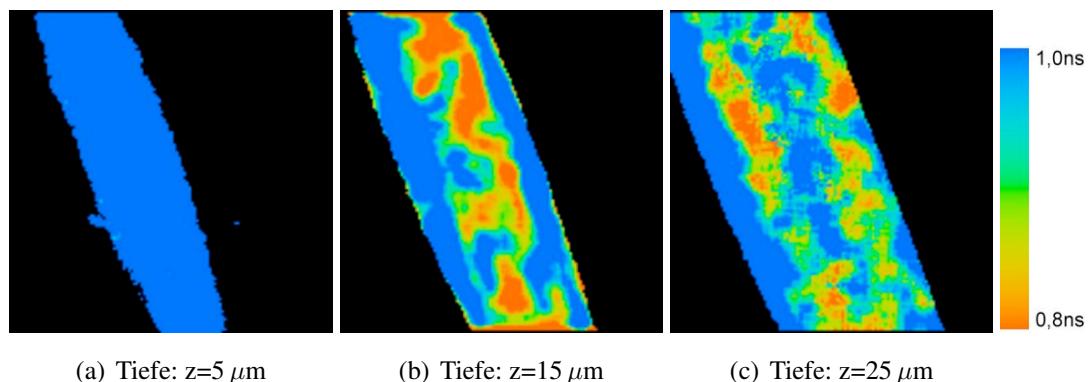


Abb. 5.9: Tiefenaufgelöste FLIM-Karten eines schwarzen Haares, gezeigt ist die τ_2 -Komponente zwischen 0,8 und 1,0 ns. Rote Bereiche sind als eu-melaninhaltige Bereiche identifizierbar, die hauptsächlich im äußerem Cor-tex auftreten.

des Haares überall größer 1 ns. Bei einer Tiefe von $z=15\text{ }\mu\text{m}$ liegt die Fluoreszenz-Lebensdauer im zentralen Bereich des Haares unter 0,8 ns (rot). Allerdings können hier Bereiche mit unterschiedlicher Lebensdauer erkannt werden. In einer Tiefe von $z=25\text{ }\mu\text{m}$ schließlich zeigen sich wieder im Inneren des Haares Bereiche mit längerer Lebensdauer, die von Bereichen mit sehr kurzer Lebensdauer umrandet sind. Damit kann gezeigt werden, dass das Haar aus Keratin besteht, sich aber in einer Tiefe um

5.3. Entwicklung der Methoden und Vorexperimente

etwa $15 \mu\text{m}$ Melanin ringförmig um das Haar anordnet.

Im Folgenden wird die Fluoreszenzcharakteristik der Haare und damit der Melanin-Phänotypen genauer untersucht. Dazu ist in Abb. 5.10 die Verteilung der Fluoreszenz-Abklingkurven von verschiedenen Haaren zu sehen. Gemessen wurde mit dem Detektor mit einer IRF von 24 ps (MCP). Eingetragen sind hier die τ_1 - und τ_2 -Verteilungen von blonden/roten und schwarzen Haaren. Zum Vergleich sind die Verteilungen von Melanozyten *in vivo*, DOPA-Melanin (a. dest) und Keratin beigefügt. Die Fluoreszenz-Lebensdauern der Haare, der Melanozyten und von DOPA-Melanin wurden mit einem biexponentiellen Modell angepasst, nur Keratin wurde mit einer monoexponentiellen Kurve angepasst. Analog wie zur Bestimmung der Hautfluorophore wurden auch hier die ersten vier zentralen Momente für die τ -Komponenten berechnet.

Anhand der Ergebnisse können die untersuchten Proben in zwei Gruppen unterteilt wer-

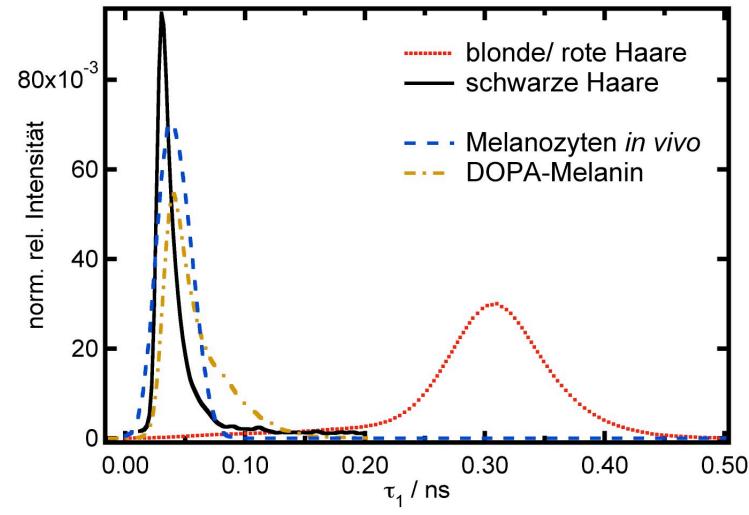
τ_1	blond	schwarz	Melanozyten	DOPA-Melanin	
Maximum	0,31	0,03	0,04	0,04	
Mittelwert	0,30	0,05	0,04	0,06	
Varianz	0,01	0,001	0,001	0,001	
Schiefe	-0,97	2,60	0,18	1,36	
Kurtosis	2,83	7,32	-0,13	2,12	

τ_2	blond	schwarz	Melanozyten	DOPA-Melanin	Keratin
Maximum	2,46	0,94	0,89	1,16	1,43
Mittelwert	2,34	0,98	1,05	1,27	1,42
Varianz	0,1	0,05	0,07	0,04	0,01
Schiefe	-2,06	0,07	0,86	0,54	0,06
Kurtosis	5,57	1,98	0,035	0,29	0,02

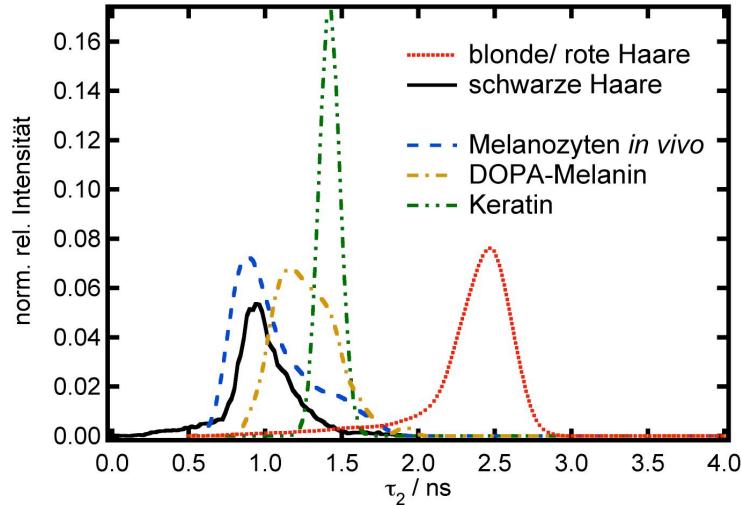
Tab. 5.2: FLIM-Statistiken der τ -Verteilungen von Haaren.

den. Gruppe 1 enthält alle Eumelanin enthaltenden Materialien: schwarze Haare und Melanozyten, außerdem wird hier zusätzlich DOPA-Melanin zugeordnet. Gruppe 2 umfasst hauptsächlich Phäomelanin-haltige blonde und rote Haare.

Auffallend ist, dass alle τ_1 -Komponenten der Gruppe 1 im Bereich nahe der Detektorcharakteristik zu finden sind. Deren Verteilungen zeichnen sich durch eine sehr ausgeprägte Rechtsschiefe aus. Alle Verteilungskurven der Haare sind stark steilgipflig ausgeprägt. Gruppe 2 ist klar getrennt von den anderen Proben durch ein Maximum der Verteilung $>3 \text{ ns}$. Hier ist zu sehen, dass zwischen den optisch dunklen und da-



(a) kurze Komponente τ_1



(b) Lange Komponente τ_2

Abb. 5.10: Verteilungen der Lebensdauern τ_1 und τ_2 in verschiedenen Haaren und Vergleichsmessungen mit DOPA-Melanin und Keratin.

5.3. Entwicklung der Methoden und Vorexperimente

mit hauptsächlich Eumelanin enthaltenden Stoffen große Übereinstimmung im Fluoreszenzverhalten herrscht.

Dieses Ergebnis ergibt sich weiterhin auch aus den Parametern der Verteilungen der τ_2 -Komponenten. Hier sind die Komponenten, wie auch analog bei Betrachtung der Haut, stärker differenzierbar. Schwarze Haare und Melanozyten besitzen fast gleiche Maxima und stimmen auch in den ersten zwei Momenten sehr gut überein. In Kurtosis und besonders in der Schiefe wird ein Unterschied erkennbar, der möglicherweise auf weitere Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der Haut (im Fall der Melanozyten) zurückführbar ist. Die Verteilung von DOPA-Melanin ist auf der τ_2 -Achse weiter rechts zu finden (Mittelwert 1,27 ns gegenüber ≈ 1 ns). Im Vergleich zu diesen drei heben sich auch hier die Werte für die Phäomelanin enthaltende Gruppe 2 ab mit einem Maximum bei 2,46 ns. Weiterhin besitzt diese Gruppe als einzige eine ausgeprägte linksschiefe Verteilung bei gleichzeitig starker Kurtosis.

Alle Verteilungen der beiden Haarsorten überlappen im Bereich der monoexponentiellen Verteilungskurve von Keratin. Keratin ist eines der Hauptbestandteile der Haare. Dementsprechend ist es, wenn auch nur schwach, in den Verteilungscharakteristiken erkennbar.

Anhand der τ_2 -Komponenten und deren Verteilungsform kann eindeutig zwischen Eumelanin und Phäomelanin unterschieden werden. Diesen Schluss lässt der Vergleich zwischen den stark Eumelanin haltigen Mitgliedern der Gruppe 1 im Gegensatz zu den Phäomelanin haltigen Haaren der Gruppe 2 zu. Synthetisch hergestelltes Melanin weicht leicht von der Eumelanin-Charakteristik ab. Durch die Art der Herstellung und wahrscheinlich durch die fehlenden Thiolverbindungen sind deutlich andere Lebensdauern messbar. Die beiden Melaninsorten können weiterhin eindeutig von Keratin unterschieden werden. Die kurze Komponente des Eumelanin liegt bei diesen Messungen im Bereich der IRF des Messsystems und kann nicht eindeutig quantifiziert werden.

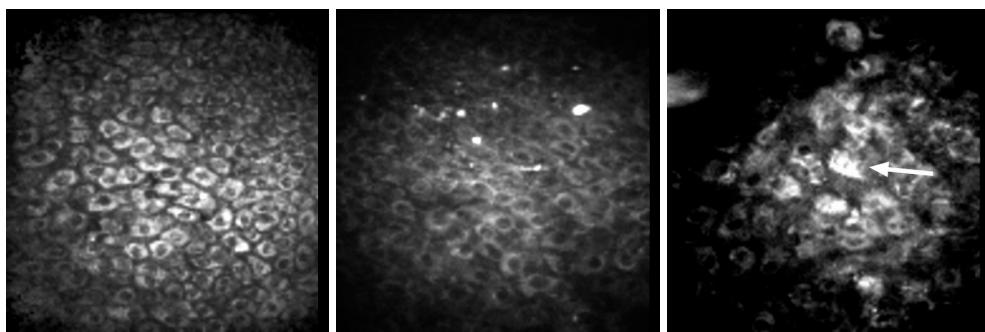
Nachteilig ist für Anwendungen im Bereich Haut, dass die beiden τ -Verteilungen von Phäomelanin und NADH nahezu identisch übereinander liegen, was deren Unterscheidung nahezu unmöglich macht. Für eine Melanomdiagnostik ist die Unterscheidung zwischen den Phänotypen des Melanin nicht geeignet.

Eumelanin kann eindeutig über die zentralen Momente nachgewiesen werden. Über die Analyse der Lebensdauer können so Melanozyten in höheren Hautschichten identifiziert werden, was einen Einsatz in der Krebsdiagnose ermöglicht.

5.4 FLIM an Melanomen *in vivo*

In diesem Kapitel wird demonstriert, dass die Parametrisierung der Fluoreszenz-Lebensdauer ein Werkzeug für die Melanom-Frühdiagnostik darstellt. Der Anspruch ist die Erkennung von biochemischen Veränderungen im Gewebe noch bevor eine messbare morphologische Veränderung eingetreten ist.

In Melanomen entsteht die karzinogene Veränderung zuerst in den Melanozyten [38]. Die erhöhte Aktivität dieser Melanozyten beeinflusst aber auch schon frühzeitig höhere Lagen der Epidermis. Die Fluoreszenz-Lebensdauer reagiert auf Variationen in der biochemischen Umgebung der Zellen. Diese Auswirkungen sollen hier untersucht werden. Die folgende Abbildung soll diese Idee verdeutlichen: Abb. 5.11 (a) zeigt einen Ausschnitt aus dem tiefen *stratum spinosum* gesunder pigmentierter humaner Haut (Nävuszellnävus). Die Keratinozyten sind homogen über die Probe verteilt und besitzen eine



(a) Nävuszellnävus (b) malignes Melanom mit fast normal erscheinender Morphologie (c) maligne Läsion mit deutlich verändert erscheinender Morphologie

Abb. 5.11: Morphologie der Zellen im Fall von benignen und malignen Befunden.

geringe Variation der Zellgröße. Dagegen zeigt Abb. 5.11 (b) eine Aufnahme aus der gleichen Ebene der Epidermis eines Nävus, der nach Entnahme histologisch als malignes Melanom identifiziert wurde. Die Abstände der Zellen variieren etwas stärker voneinander, eindeutige Unterschiede sind schwer zu erkennen. Im Vergleich zeigt Abb. 5.11 (c) ein weiteres Beispiel für ein malignes Melanom. Der Zellverband wirkt heterogen und die Struktur der Zellen hat sich aufgelöst. Die Zellen selbst sind deutlich verändert im Vergleich zu Abb. 5.11 (a), bei einigen sind stark fluoreszierende, massive Bereiche entstanden (Pfeil). Hier kann direkt auf eine krankhafte Veränderung geschlossen wer-

den. Ohne große diagnostische Erfahrung dagegen hätte allein anhand der optischen Biopsie das Melanom in Abb. 5.11 (b) leicht übersehen werden können.

Für die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer-Daten in Abb. 5.12 wurden mehrere FLIM-Messungen verwendet [94]. Alle Aufnahmen stammen aus dem *stratum spinosum* und beinhalten keine Bereiche mit offensichtlich anderen Fluorophorquellen (z.B. Melanozyten). Anschließend wurden die Verteilungskurven der τ_2 -Lebensdauer und die Verteilungen der Amplituden A_1 (in %) der ersten Komponente der biexponentiellen Anpassungskurve für jeweils fünf verschiedene Patienten gemittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.12 dargestellt, Tab. 5.3 zeigt die dazugehörigen Momente der τ_2 -Verteilungen. In beiden Graphen zeigt sich schon anhand der Mittelwerte und der Varianz ein signifi-

	benigne Diagnose	maligne Diagnose	Melanozyten
Maximum	2,39	1,59	0,89
Mittelwert	2,53	1,62	1,05
Varianz	0,52	0,18	0,07
Schiefe	-0,16	0,22	0,86
Kurtosis	-0,36	-0,03	0,03

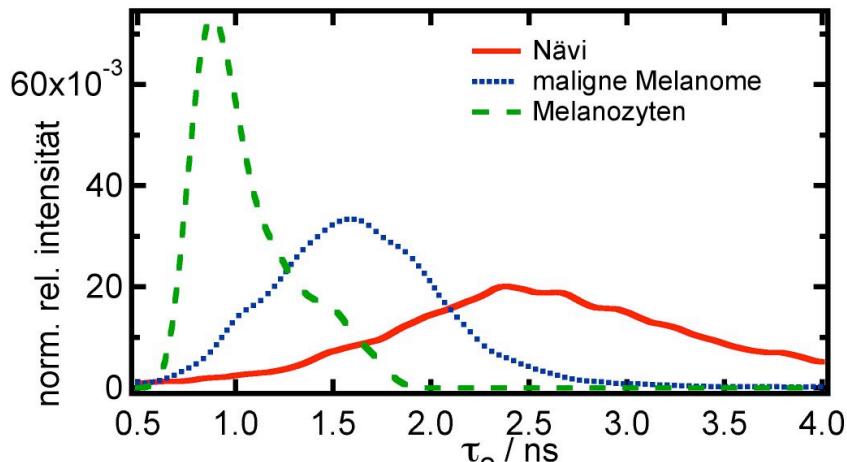
Tab. 5.3: Statistische Momente der τ_2 Verteilungen von gutartigen und bösartigem Befunden.

kanter quantitativer Unterschied zwischen krankem und gesundem Gewebe.

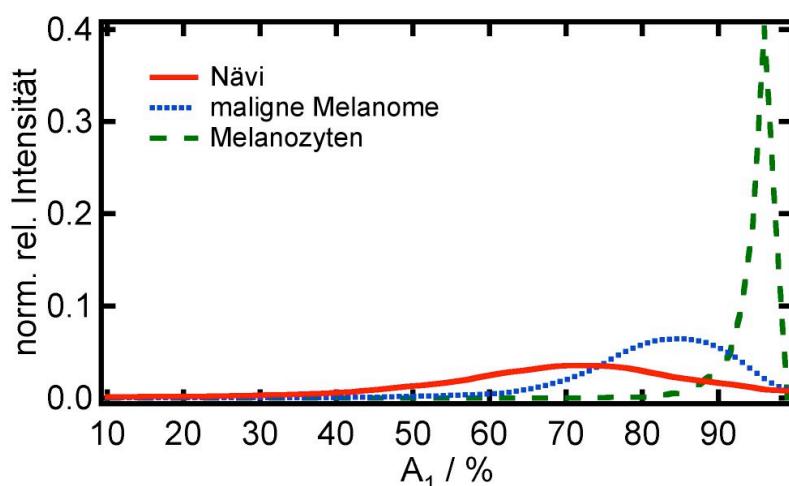
Als Grund lässt sich eine biochemische Veränderung der Hauptfluorophore vermuten, die sich als Veränderung der Lebensdauercharakteristik auswirkt. Da sich in Melanomen auch die Morphologie und die Aktivität der Zellen stark ändert, sind zu den Graphen in Abb. 5.12 auch noch die Kurven für Melanozyten *in vivo* (grün) eingetragen. Es zeigt sich anhand der Abbildung, dass sich Melanin sowohl von kranken als auch von gesunden Zellen unterscheidet. Der Einfluss von Melanin oder Melanozyten kann daher in diesen Experimenten ausgeschlossen werden.

Aus Abb. 5.12 muss daher geschlossen werden, dass die Veränderung durch das NADH in den Mitochondrien der Zellen selbst entsteht.

Eine stimmige Erklärung bietet die Warburg-Hypothese [95]. Sie wird durch neuere Erkenntnisse [96, 97] bestätigt. Demnach kennzeichnet die Karzinogenese ein Verschieben von oxidativer Phosphorylierung (oder auch Atmungskettenphosphorylierung) hin zur Glykolyse um in den Zellen ATP zu produzieren. Dabei ist NADH der hauptsächliche Elektronenakzeptor bei der Glykolyse und der Elektronendonator bei der Atmungskette.



(a) τ_2 -Verteilung



(b) Verteilung von A_1

Abb. 5.12: (a) τ_2 -Verteilung (b) Verteilung von A_1 , Amplitude der kurzen Komponente τ_1 in benignen und malignen Melanomen

Die oxidative Phosphorylierung ist ein Schritt in der Atmungskette und findet in den Mitochondrien statt [98]. Dabei wird in mehreren katalytischen Prozessen NADH unter Zuhilfenahme von Sauerstoff zu NAD^+ und H^+ reduziert:



Die freie Energie wird zur Synthese von ATP verwendet, das als Energieträger für die Zelle fungiert. Bei der Glykolyse wird in vielen Einzelschritten Glucose mit NAD^+ zu ATP und NADH umgewandelt. Dieser Prozess findet ohne die Einwirkung von Sauerstoff statt (anaerob) und stellt im Prinzip eine Gärung dar. In humanen Zellen können oxidative Phosphorylierung und Glykolyse ablaufen, dabei erzeugt der Glykolysezyklus freies NADH, das dann unter aeroben Bedingungen reduziert wird. Glykolyse ist weniger effizient, da hier netto pro Glucosemolekül nur 2 ATP Moleküle entstehen im Vergleich zu 38 ATP-Molekülen bei der oxidativen Phosphorylierung.

In gesundem Gewebe herrscht unter normalen Umständen kein Mangel, sondern ein Überschuss an Sauerstoff. Starke Beanspruchung, wie beispielsweise in Muskelzellen, können den Sauerstoffbedarf kurzfristig über das Angebot hinaus heraufsetzen, so dass die Zellen zusätzlich auf Glykolyse umschalten. Untersuchungen an Tumorgewebe deuten nun darauf hin, dass die Effizienz der Energieerzeugung in den Mitochondrien stark abnimmt [97] und Glykolyse einsetzt. Dieser Effekt konnte kürzlich mit biochemischen Methoden in Zellkulturen [99] und optisch in Tierversuchen [100] nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Daten zeigen auf folgenden Zusammenhang hin: Durch die im Vergleich zum gesunden Keratinozyten veränderten biochemischen Reaktionswege wechselt die Umgebung der NADH-Moleküle sowie ihre Bindung an andere Proteine, was im deutlichen Unterschied der τ_2 -Komponenten der Fluoreszenz-Lebensdauer messbar ist. Bei der Glykolyse wird fortwährend freies NADH erzeugt, dass nun durch die ausgesetzte bzw. reduzierte oxidative Phosphorylierung nicht mehr zusätzlich abgebaut werden kann. Ein Überschuss an freiem NADH im Vergleich zu gebundenem NADH entsteht. Dieser Effekt beeinflusst die Fluoreszenzlebensdauer-Charakteristik, indem sich das Verhältnis der τ_1 - zur τ_2 -Komponente verschiebt wodurch die Amplitude A_1 im Vergleich zu A_2 messbar ansteigt.

Der Grund für die hier gefundenen Prozesse entsteht wahrscheinlich dadurch, dass die Versorgung der Keratinozyten mit Nährstoffen durch Diffusion geschieht. Durch die mutierten Melanozyten und deren erhöhtem Stoffwechsel wird die Versorgung äußerer Körperregionen unterbunden.

Hier konnte also demonstriert werden, wie in Zukunft ohne die Analyse der Morpho-

logie quantitativ die Entstehung von Melanomen frühzeitig und sensitiv diagnostiziert werden könnte.

5.5 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Fluoreszenz-Lebensdauer endogener Fluorophore erfolgreich analysiert werden, um Methoden zu entwickeln, die eine (klinische) Diagnostik ermöglichen.

Bei *in vivo*-Messungen liegen die Fluorophore in komplexen Mischungen und in heterogener Umgebung vor. Sie sind in unterschiedlichen Umgebungen innerhalb der GeWEBEBEREICHE unterschiedlich konzentriert. Die Verteilung eines einzelnen Molekültyps liegt statistisch zumeist normalverteilt vor.

Durch die Betrachtung der statistischen Verteilungen verschiedener Anpassungsparameter aller Messkurven löst sich die Auswertung der Messung vom tatsächlichen Bild. Die Verteilungen schließlich werden auf die Zahlenwerte der zentralen Momente der jeweiligen Verteilung reduziert. Die Fluorophore in der Haut können über diese Quantifizierung leichter identifiziert werden.

Diese Verfahren konnten in Experimenten bestätigt werden und führten schließlich zur Anwendung in der Melanomdiagnostik.

Es ist hier gelungen, sich diese Änderung als “endogenen Biosensor“ zunutze zu machen, der als einfaches Ergebnis eine Zahl (z.B. Mittelwert der Verteilung) liefert. Schon im Frühstadium ist die Detektion möglich. Vergleich mit einem Massstab liefert eine quantifizierbare Aussage über den Gesundheitszustand des Patienten (Melanom / kein Melanom).

Als eine künftige Erweiterung ist die gleichzeitige Auswertung von Emissionswellenlänge und Fluoreszenz-Lebenszeit denkbar. Messsysteme für spektral aufgelöstes FLIM sind kommerziell erhältlich. Auf diese Weise ergibt sich ein weiterer Unterscheidungsparameter, der zur Charakterisierung mit einbezogen werden kann. Auf diese Weise ist beispielsweise eine Unterscheidung von Phäomelanin zu Keratinozyten möglich.

6 Klinische *In vivo* Multiphotonen-Endoskopie

6.1 Von der Tomographie zur Endoskopie

Die biologischen Abläufe in der Heilung von Wunden sind noch nicht endgültig erforscht [101, 47]. Neue Einsichten würden eine Therapie und so die Heilungschancen effektiver gestalten.

Die in den letzten Kapiteln erarbeiteten Methoden liefern markerfreie diagnostische Werkzeuge für den klinischen Einsatz und wären ein geeignetes Mittel, die Wundforschung zu unterstützen. Besonderer Bedarf besteht im Fall von Ulcera.

Bisher beschränkt sich die Untersuchung mittels Multiphotonen-Tomographie auf gut zugängliche Körperregionen und selbst dort ist die vermessbare Tiefe eingeschränkt. Mit verschieden optischen Methoden konnte diese gewebeabhängige Tiefe der Multiphotonen-Mikroskopie auf maximal etwa 1 mm [81] ausgedehnt werden.

Als minimal invasiver Lösungsansatz wird im Folgenden die Entwicklung eines starren Endoskops für die Multiphotonen-Endoskopie von Wundgewebe vorgestellt.

Eine geringe Größe (Durchmesser) ist dabei ein wesentliches Merkmal. Soll in das Körperinnere vorgedrungen werden, darf so wenig Gewebe wie möglich verletzt werden. Die Laserstrahlung im NIR und die Fluoreszenzstrahlung im sichtbaren Bereich müssen verlustarm transferiert werden, um gute Anregungsleistung und unverfälschte Detektion zu erreichen. Für eine klinische Zulassung darf die Patientensicherheit nicht vernachlässigt werden: Biosicherheit, Benutzerfreundlichkeit und möglichst kurze Aufnahmzeiten sollen gute Untersuchungsbedingungen ermöglichen. GRIN-Linsen bieten ideale optische Eigenschaften für ein Multiphotonen-Endoskop.

Als Ausgangspunkt wurde der Multiphotonen-Tomograph gewählt. Das starre, endoskopische System bildete ein Erweiterungsmodul, eine Art “optische Verlängerung“. In Abb. 6.1 ist der Aufbau skizziert, der in dieser Weise für die verwendeten Systeme realisiert wurde.

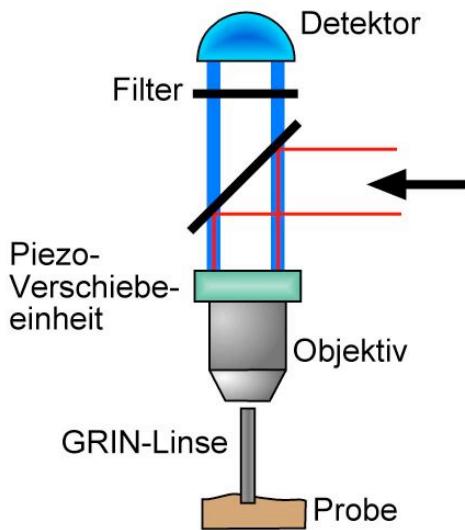


Abb. 6.1: Erweiterung des Tomographen durch ein GRIN-Endoskop zur Untersuchung von Wunden und unzugänglichem Gewebe.

6.2 Endoskopische Systeme

Ein-Komponenten-Systeme

Diese einfachsten Endoskopsysteme bestehen aus einer einzelnen GRIN-Linse, wie in Kap. 3.3 beschrieben. Zwei Systeme mit unterschiedlichen Austauschionen wurden eingesetzt, was in leicht unterschiedlichen Strahlverläufen resultiert. In Abbildung 6.2 sind beide nebeneinander gestellt. Die Abbildungen sind das Ergebnis von ZEMAX-Simulationen der beiden Linsensysteme. Die Abmessungen und alle weiteren mechanischen Daten können der Zusammenstellung in Tab. 6.1 entnommen werden.

Das Ag-basierte System in Abb. 6.2 (a) besitzt eine Länge von 0,97 Pitch und NA 0,45, das Thallium-basierte System 0,48 Pitch und NA 0,46. Vereinfacht beschrieben sind beide Systeme so gewählt, dass - ausgehend von 1 Pitch bzw. 0,5 Pitch-System - die GRIN-Linse soweit gekürzt wurde, dass die Arbeitsabstände von den Grenzflächen entfernt ausserhalb der Linse liegen. Die Strahlenverläufe beim Einkoppeln eines Laserstrahls durch das Tomographen-Objektiv in die GRIN-Linsen wurden mit ZEMAX simuliert und sind der Abbildung zu entnehmen: Der Laser wird durch das Objektiv 50 μm vor dem proximalen Ende der GRIN-Linse fokussiert. Der Strahl tritt divergent in die Linse ein und durchläuft sie sinusförmig, passiert ein 300 μm -dickes Saphirfenster und wird am distalen Ende des Endoskops wieder fokussiert. Bei dem Ag-System wird das Laserlicht zusätzlich in der Mitte der Linse fokussiert. Zur Einkopplung des Lasers wird

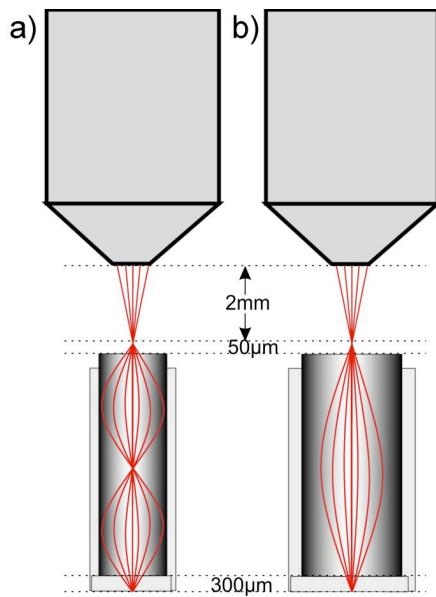


Abb. 6.2: Strahlenverlauf bei 1-Komponenten-Systemen, nach einer ZEMAX-Simulation. Zur Einkopplung wird ein 20×/NA0,5-Objektiv verwendet. Links das 0,97 Pitch Ag-System, rechts das 0,48 Pitch Ta-System.

ein $20\times$ -Objektiv mit NA 0,5 eingesetzt, um die Intensitätsverluste bei Einkopplung des Lasers und Auskopplung der Fluoreszenz gering zu halten (NA-Anpassung). Das Standardobjektiv des Tomographen besitzt NA 1,3 und einen Öffnungswinkel von 60° , so dass ein großer Anteil der Laserstrahlung nicht in die Endoskope eingekoppelt werden kann. Ein weiterer Vorteil der NA-Anpassung ist, dass die laterale Vergrößerung ≈ 1 und damit auch die axiale Vergrößerung ≈ 1 bleiben. Wird das Objektiv proximal näher an das GRIN-Endoskop herangefahren, verschiebt sich auch der distale Abstand um den gleichen Betrag in die Probe hinein. Die gemessene Vergrößerung beträgt 1,18 für das Ag-dotierte und 1,16 für das Ta-dotierte System.

Die Bildfeldgröße wurde (für alle Systeme) mit fluoreszierenden Mikrokügelchen bestimmt und ist in Abb. 6.3 für beide Systeme exemplarisch dargestellt. Der Durchmesser des aberrationsfreien, hellen Bereichs beträgt für das Ag-basierte System $100 \mu\text{m}$, für das Ta-basierte System $130 \mu\text{m}$. Die Größe der PSF beträgt für beide Systeme lateral $0,9 \mu\text{m}$, axial $10 \mu\text{m}$. Im Vergleich dazu betragen die theoretischen Werte für ein NA0,5-Objektiv $0,6 \mu\text{m}$ für die laterale und $3,74 \mu\text{m}$ für die axiale PSF. Der Grund für die extrem große axiale PSF ist der chromatische Fokusversatz und wird in Kap. 6.3 genauer beschrieben.

Austausch-Ion	Ag	Ta
Länge	18,16 mm	14,81 mm
Durchmesser	1,7 mm	3,0 mm
Pitch	0,97	0,48
Kanüle		
Aussendurchmesser	1,9 mm	3,5 mm
Länge	11,9 mm	10,4 mm
Dicke Saphirfenster	300 μ m	

Tab. 6.1: Mechanische Daten der Einkomponenten-Systeme.

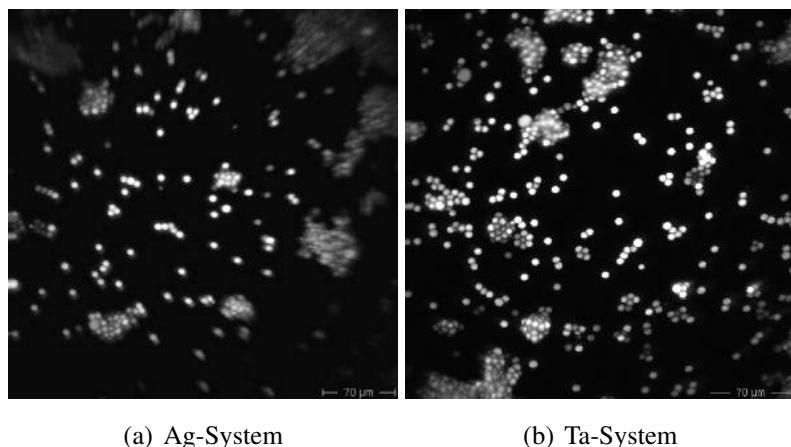


Abb. 6.3: Veranschaulichung der Abbildungseigenschaften und Aberrationen bei den Einkomponenten-Systemen, aufgenommen mit fluoreszierenden Mikrokugelchen (5,56 μ m)

Zwei-Komponenten-System

Dieses GRIN-Endoskop besteht aus zwei verschiedenen GRIN-Linsen, wie in Abb. 6.4 gezeigt. Das distale Ende besteht aus einer 0,24-Pitch Objektivlinse mit Ag-Dotierung. Dadurch wird eine NA von 0,5 erreicht, um die NIR-Laserstrahlung zu fokussieren bzw. die VIS-Fluoreszenzstrahlung einzusammeln. Der Arbeitsabstand beträgt 50 μm . Eine

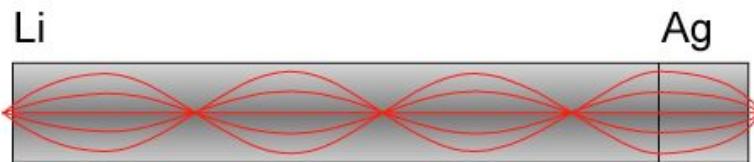


Abb. 6.4: Zwei-Komponenten-System nach einer ZEMAX-Simulation. Rechts die Ag-dotierte Objektivlinse, links die Li-dotierte Übertragungslinse.

zweite Linse aus Li-dotiertem GRIN-Material mit Pitch 1,75 mit NA 0,11 und bildseitigem Arbeitsabstand 50 μm wirkt als Übertragungslinse. Insgesamt besitzt dieses Endoskopmodell einen Pitch von 2, das Licht durchläuft sie also mit 2 vollständigen Sinusschwingungen. Dabei liegen interne Foki immer in Li-dotierten Bereichen. Da die Übertragungslinse durch ihre Dotierung nur eine geringe NA von 0,1 besitzt, wird am Tomographen ein 5×-Objektiv mit NA 0,15 zur Ein- und Auskopplung verwendet. Die PSF wurde, wie oben beschrieben, bestimmt und beträgt lateral 0,9 μm und axial 5,5 μm . Theoretisch kann mit der NA eine Auflösung von 0,6 μm für die laterale und 3,74 μm für die axiale PSF erreicht werden. Die Vergrößerung ist lateral 4,1 und axial 16,8. Die Bildfeldgröße für den aberrationsfreien Bereich wurde zu 110 μm bestimmt, innerhalb eines Bereichs mit Radius 170 μm ist die gemessene Fluoreszenzintensität noch ausreichend zur Orientierung.

Die Gesamtlänge des Systems beträgt 81,17 mm mit einem Durchmesser von 1,0 mm.

Halbkugelsystem

Dieses System besteht aus mehreren Komponenten, wie in Abb. 6.5 gezeigt. Es handelt sich im einzelnen um zwei Ag-dotierte GRIN-Linsen mit Durchmesser 1 mm und Gesamtpitch $\approx 0,5$. An der distalen Seite befindet sich eine Halbkugel-Linse mit Durchmesser 1 mm. Das ganze System ist in einer Edelstahlkanüle gefasst und mit einem Deckglas mit 170 μm Dicke verschlossen. Die Halbkugel-Linse erhöht die NA objektseitig auf 0,65, proximal ist sie bestimmt durch das Ag-dotierte Material und hat den

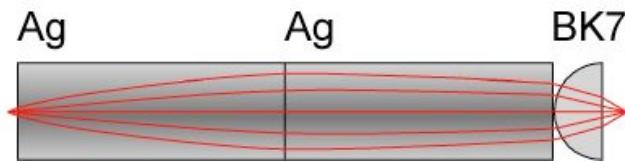


Abb. 6.5: Halbkugel-System, nach einer ZEMAX-Simulation.

Wert 0,5. Zum Ein- und Auskoppeln der Fluoreszenzstrahlung wurde ein $20\times/\text{NA}0,5$ -Objektiv verwendet.

Die PSF wurde lateral zu $0,8 \mu\text{m}$ und axial zu $2,7 \mu\text{m}$ bestimmt, die laterale Vergrößerung beträgt 1,35. Die Größe des weitgehend aberrationsfreien Bereichs beträgt $80 \mu\text{m}$, bis zu einem Durchmesser von $160 \mu\text{m}$ können Strukturen noch mit ausreichend Intensität detektiert werden, was eine Orientierung auf der Probe erleichtert.

6.3 Charakterisierung der optischen Eigenschaften

Im Folgenden werden die optischen Eigenschaften der GRIN-Endoskope untersucht und gegenübergestellt. Ziel ist, eine möglichst gute Abbildung der zu untersuchenden Probe zu erreichen, um bei späteren Untersuchungen an Gewebe mit möglichst wenig Laserleistung gewebeschonend ein möglichst intensives Detektorsignal und eine qualitativ gute Abbildung zu erzeugen.

Transmission

In Abb. 6.6 ist die Transmission für die drei verschiedenen dotierten Materialien dargestellt. Im Bereich ab 450 nm bieten alle Materialien 90 % Transmission bis in den IR-Bereich. Wie bei den meisten Gläsern sinkt die Transmission im blauen Spektralbereich bzw. nahen UV-Bereich stark ab auf nahezu Null. Die Autofluoreszenzstrahlung von biologischem Gewebe (im Bild hellgrauer Bereich) liegt im Bereich ab ca. 420 nm. So mit besitzt nur das Ag-dotierte Material in diesem Bereich eine etwas geringere Transmission von noch 80 %.

Die Transmission der drei Materialien ist für die verwendeten Wellenlängenbereiche ausreichend.

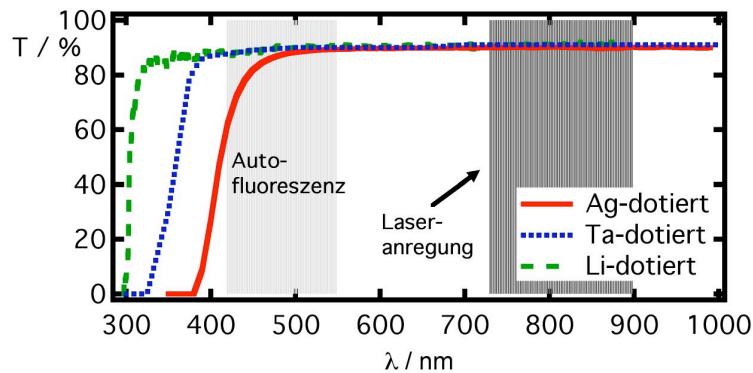


Abb. 6.6: Transmission der GRIN-Materialien. (Ag-Linsen und Ta-Linsen: [34, 102, 103], Li-Linsen: Eigene Messung)

Linsenfehler

Bei Betrachtung der Bildfeldgröße wird deutlich, dass von Bereichen, die nicht auf der optischen Achse liegen, weniger Fluoreszenzlicht detektiert wird. Ein Grund dafür ist die Bildfeldwölbung durch die Linsen, die sowohl die Laser- als auch auf die Fluoreszenzstrahlung beeinflusst. Die für die oben beschriebenen Kalibriermessungen eingesetzten Mikrokügelchen liegen in einer Ebene. Der Fokus des Lasers beschreibt aber eine stark gekrümmte Fläche, so dass Kügelchen fernab der optischen Achse nicht mehr im Fokus sind und durch geringere Laseranregung dunkler erscheinen. Auf dem Rückweg erfährt die Fluoreszenzstrahlung den gleichen Effekt. Die Unterschiede bei der Abbildung von Gewebeschichten sind aber so gering, dass sie für medizinische Untersuchungen wenig von Bedeutung sind.

Aus Abb. 2.7 wird zudem deutlich, dass durch die Begrenzung der Linse von Randbereichen des Bildes weniger Fluoreszenzlicht aufgesammelt werden kann. Dieses Verhalten der verschiedenen Systeme wurde mit ZEMAX simuliert. Stellvertretend sind die Verhältnisse für das Ta-Einkomponentensystems in Abb. 6.7 dargestellt. Der Öffnungswinkel der Strahlenbündel wurde entsprechend der NA eingestellt, die Wellenlänge ist auf 450 nm gesetzt. Das Strahlenbündel, das von einem Punkt auf der optischen Achse ausgeht, wird ideal übertragen und gelangt zum Objektiv des Tomographen. Das von einem achsfernen Punkt ausgehende Bündel (im Beispiel 0,9 mm) wird an den Randbereichen nicht mehr transferiert. Nur ein Teil gelangt zur Eingangsapertur des Objektivs. Für das Mikroskopobjektiv ist dieser Teil ebenfalls achsfern und auch hier entstehen im Weiteren Verluste.

Im Experiment werden Scanfelder von maximal etwa 200 μm betrachtet. Im Fall des 2-

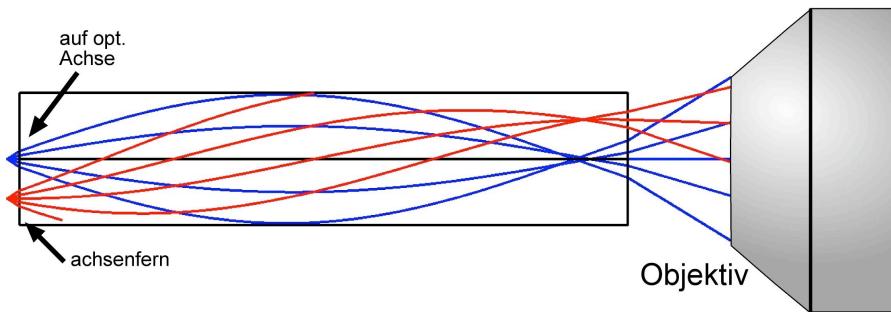


Abb. 6.7: ZEMAX-Simulation des TA-Systems. Von achsenfernen Punkten werden Randbereiche der Strahlenbündel nicht vollständig zum Tomographen-Objektiv übertragen.

Komponentensystems erklärt die Abschwächung durch Übertragungsverluste der Randbereiche die eingeschränkte Bildfeldgröße. Die Verluste entstehen in der Li-Übertragungslinse.

Die Simulationen zeigen weiter, dass die Abschwächung in allen anderen Systemen durch Übertragungsverluste zu vernachlässigen sind. Sie muss in diesen Fällen über andere Effekte erklärt werden (chromatischer Fokusversatz, siehe S. 100).

Wie schon in (2.36) gezeigt, hängt die NA nicht nur von $g(\lambda)$ und dem Linsendurchmesser a , sondern auch vom Abstand d der Lichtquelle von der Linsengrenzfläche. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 6.8 am Beispiel des Ag-Einkomponenten-Systems berechnet und graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass die NA mit steigendem Abstand von der GRIN-Grenzfläche absinkt. Bis etwa $300 \mu\text{m}$ ist der Verlust noch nicht so stark, nimmt dann aber stetig zu. Die Linsen sollten deshalb in möglichst direktem Kontakt mit der Probe betrieben werden, um die NA für Anregung und Detektion zu optimieren.

Schädigung des Ag-Materials

Die Ag-Linsen zeigten die Besonderheit, dass bei zu intensiver Bestrahlung eine irreversible Lumineszenz des Materials erzeugt werden kann. Bei der Referenzmessung in Glas ohne Austauschionen konnten bei allen Wellenlängen und maximaler Laserleistung keine Zerstöreffekte gemessen werden, daher liegt der Effekt an den Ag-Ionen im Glas. In Abb. 6.9 ist die optische Veränderung von Ag-GRIN-Linsen verdeutlicht, hier wurde von den lumineszierenden Bereichen eine Aufnahme mit dem Tomographen erstellt. Abb. 6.9 (a) zeigt die Oberfläche einer Ag-GRIN-Linse, die schon mehrmals in Gebrauch und in direktem Kontakt mit Probenoberflächen (Deckglas) war. Die Aufnah-

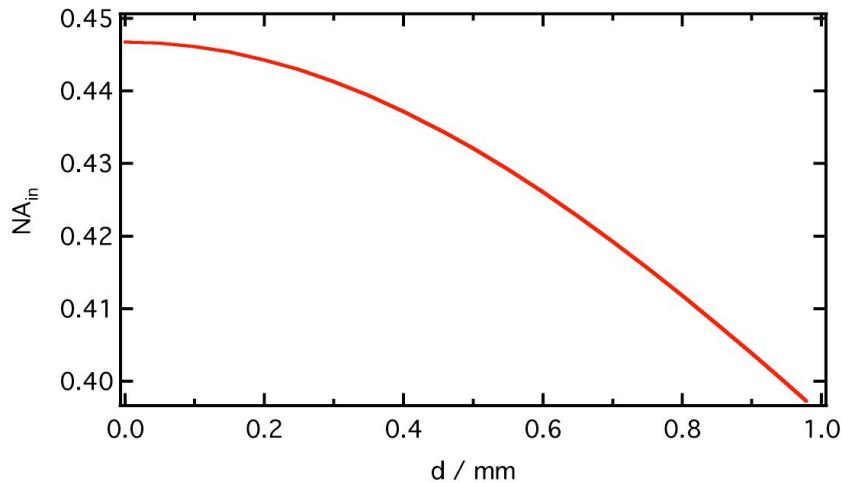


Abb. 6.8: Die NA der GRIN-Endoskope ist vom Abstand der Fluoreszenzquelle von der Optik abhängig.

me wurde mit dem Tomographen selbst erstellt, indem die Strukturen gescannt, und das entstehende Lumineszenzsignal detektiert wurde. Kratzerartige Strukturen sind auf der Oberfläche zu erkennen. Mit dem Laser lassen sich ebenfalls lumineszierende Bereiche im Glas der silberhaltigen GRIN-Linse erzeugen. Abb. 6.9 (b) ist entstanden, indem mit dem Tomographen ein kleiner Auschnitt mit hoher mittlerer Leistung bestrahlt wurde. Der Bereich, der zuvor nicht bestrahlt wurde, erscheint weiterhin dunkel.

Das Spektrum der Lumineszenzstrahlung, sowohl das der Kratzer als auch der durch den Laser erzeugten Strahlung, ist in Abb. 6.9 (c) dargestellt. Es zeigt einen relativ intensiven Bereich zwischen 410 und 480 nm, mit kleineren Peaks im roten Spektralbereich (600, bzw. 650 nm), also Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich. Der Hauptanteil dieser Strahlung überdeckt sich mit dem klinisch interessanten Spektralbereich (Autofluoreszenz, SHG). Daher wird die Lumineszenz als potentiell Artefakt-erzeugend eingestuft. Da die Schädigung dauerhaft ist, können Linsen mit lumineszierenden Bereichen nicht weiter verwendet werden. Das zeitliche Verhalten der Strahlung kann aufgrund der begrenzenden IRF des Detektors von 200 ps FWHM nicht aufgelöst werden, siehe Abb. 6.9 (d). Kontrollmessungen schließen SHG aus (Bandpassfilter). Die Entstehung dieser kurzlebigen Fluoreszenz und ihr möglicher Einfluss auf die Messungen soll im Folgenden genauer untersucht werden.

Analog zu Abb. 6.9 (b) wurden mit dem Tomographen Zerstörungen in der GRIN-Linse in einer Tiefe von 50 μm gesetzt, um die Zerstörschwellen für einen internen Fokus zu bestimmen. Dabei wurde das gleiche 20 \times / NA 0,5-Objektiv eingesetzt, mit dem auch

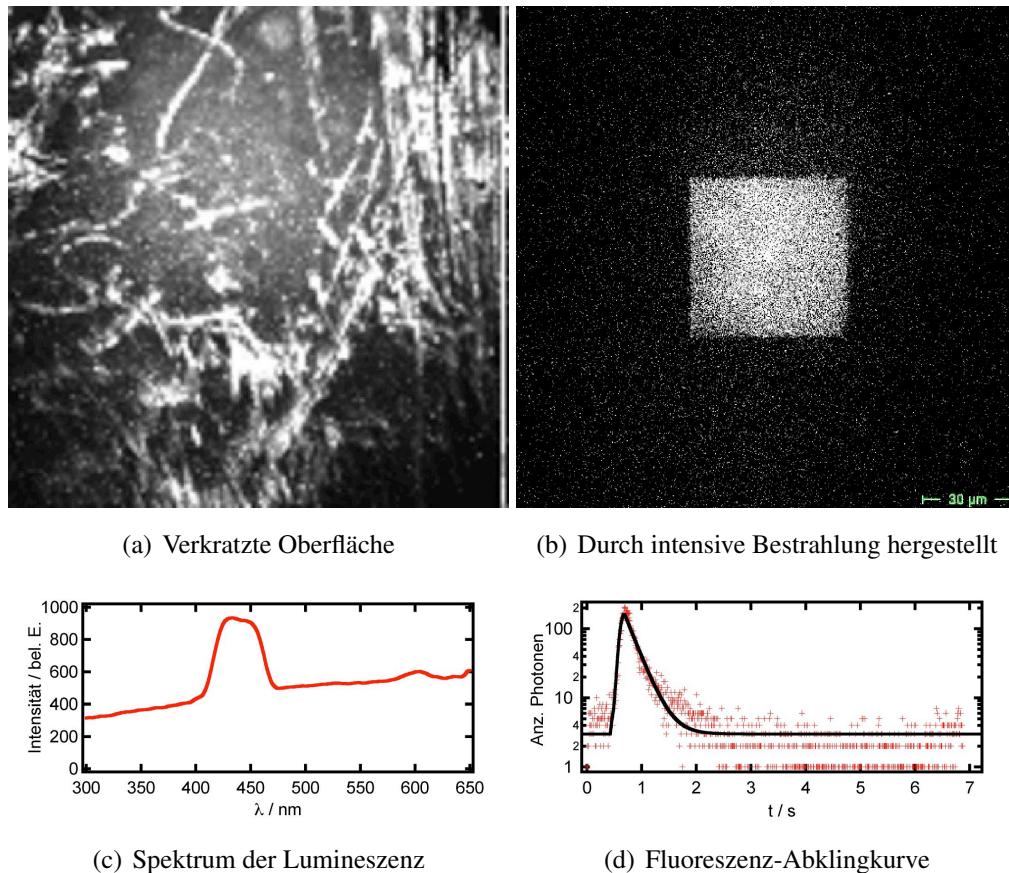
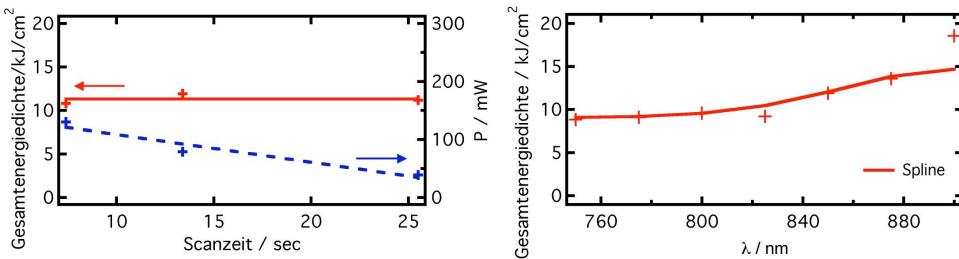


Abb. 6.9: Darstellung der Zerstöreffekte

die endoskopischem Messungen durchgeführt wurden. Ein kleines Scanfeld mit den Kantenlängen $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ wurde abgerastert und anschliessend in einem größeren Scanfeld dokumentiert. Als geschädigt wurde ein Bereich definiert, sobald gerade ein Ansteigen der Intensität im gescannten Bereich erkennbar war, d.h. sobald $SNR > 1$. Die Scanzeiten wurden zuerst für die Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}}=800 \text{ nm}$ variiert, um festzustellen, ob die Intensität oder der Gesamtenergieeintrag der Laserstrahlung der für die Zerstörung verantwortliche Parameter ist. In Abb. 6.10 (a) ist die verwendete Leistung \bar{P} (rechte Ordinate) gegenüber der Scanzeit aufgetragen. Bei steigenden Scanzeiten sinkt die nötige Schwellenleistung ab, dabei steigt jedoch durch die erhöhte Gesamtzahl der Laserpulse pro Feld die darin deponierte Energie. Als Schädigungsschwelle muss deswegen die eingestrahlte Gesamtenergiedichte (Energie pro bestrahltem Feld) ρ_{ges}^E angesehen werden, die für alle Scanzeiten im Rahmen der Messgenauigkeit konstant bleibt (Abb. 6.10 (a), linke Ordinate). Hierbei muss beachtet werden, dass der Fokus



(a) Abhängigkeit der Zerstörung des Ag-Materials von der Scanzeit (b) Zerstörschwellen des Ag-Materials

Abb. 6.10: (a) Zeitabhängigkeit der Zerstöreffekte: Bestimmender Parameter ist die in das System eingebrachte Gesamtenergie. (b) Zerstörschwellen (Energie pro Fläche) für verschiedene Wellenlängen.

durch die NA des Objektivs einen Durchmesser von $0,6 \mu\text{m}$ (FWHM) besitzt und ein Pixel eine kleinere Kantenlänge von $0,19 \mu\text{m}$. Durch das Scannen wird also in mehrere Pixel gleichzeitig Energie deponiert. Um diesen Überlappeffekt auszugleichen, wird daher als Maß zur Bestimmung der Energiedichte-Schwellen die Energiedichte pro gesamtem Scanfeld gewählt, gemessen bei einer Scanzeit von 13,4 sec. Abb. 6.10 (b) zeigt die mittleren Zerstörschwellen der silberhaltigen GRIN-Medien (linke Ordinate). Für die verschiedenen untersuchten GRIN-Linsen variieren diese Werte nur leicht mit der Ag-Ionen-Konzentration. Die Gesamtenergiedichte ist bei Wellenlängen $< 840 \text{ nm}$ etwa konstant bei $< 10 \text{ kJ/cm}^2$, steigt darüber hinaus aber an bis etwa 20 kJ/cm^2 . Über die Ursprünge dieser Lumineszenz ist in der Literatur nichts bekannt. In einem ähnlichen Glas (gleiche Bestandteile, jedoch in anderen Anteilen) wurden in Ref. [104] ebenfalls Luminesenzspektren gemessen, mit Anteilen im UV- und grünen Spektralbereich. Diese Ergebnisse konnten hier nicht nachvollzogen werden. Möglicherweise entstehen durch die Laserstrahlung Silber-Kolloide oder Farbzentren. Die Schädigungen sind dauerhaft.

Bei Untersuchungen von Proben muss, wenn der Laser in der Linse fokussiert wird, darauf geachtet werden, dass die Laserleistung so gewählt wird, dass die in die Linse eingetragenen Energie unterhalb der Schwelle bleibt. Idealerweise sollte der Aufbau des gesamten Systems so erfolgen, dass solche Foki vermieden werden.

Chromatischer Fokusversatz

Bei der Berechnung der Länge muss beachtet werden, dass die Gradientenkonstante von der Wellenlänge abhängt, woraus sich ein unterschiedlicher Pitch für NIR-Laserstrahlung und VIS-Fluoreszenzstrahlung ergibt. In Abb. 6.11 ist das Ergebnis einer ZEMAX-

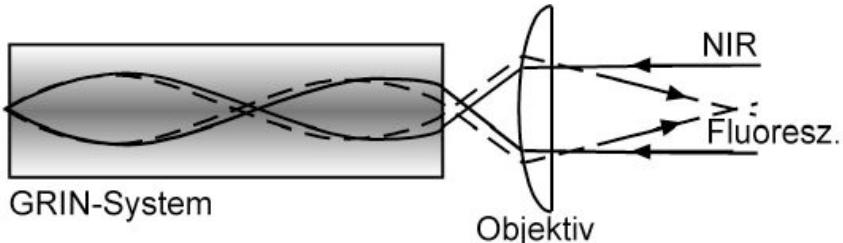
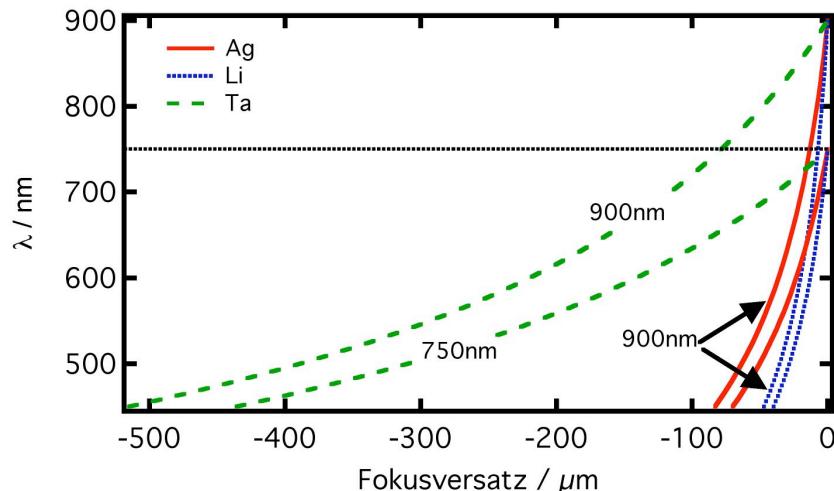


Abb. 6.11: Chromatischer Fokusversatz in (a) den verwendeten GRIN-materialien und (b) den eingesetzten Systemen. Blaue Strahlen: $\lambda = 800 \text{ nm}$, grüne Strahlen: $\lambda = 450 \text{ nm}$. Nach einer ZEMAX-Simulation.

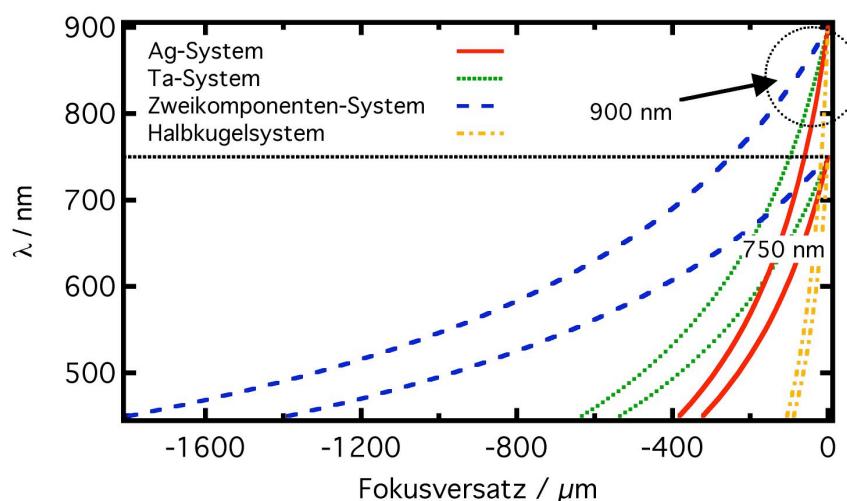
Simulation dargestellt, die diesen Zusammenhang beschreibt. Die Konvex-Plan-Linse steht dabei stellvertretend für das Mikroskop-Objektiv.

Der NIR-Laserstrahl, im Bild von rechts kommend, wird vom Objektiv wenige μm vor der GRIN-Oberfläche fokussiert und durchläuft die GRIN-Linse. Hinter der Oberfläche der GRIN-Linse erzeugen Multiphotonen-Prozesse Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Spektrums. Ein Teil davon (entsprechend der NA) durchläuft die GRIN-Linse zurück (im Bild nach rechts). Durch den axialen chromatischen Versatz liegt der Fokus der Fluoreszenzstrahlung näher an der Oberfläche der GRIN-Linse und damit weiter vom Objektiv entfernt. Das Fluoreszenzlicht wird nicht mehr optimal erfasst und daher hinter dem Objektiv wieder fokussiert. Der Detektor ist für kollimierte Strahlung optimiert, so dass das nun divergente Fluoreszenzlicht deutlich geschwächt detektiert werden kann.

Diese Situation wurde für die verschiedenen Systeme untersucht. Besonders ausgeprägt tritt sie in den Einkomponenten-Systemen auf. Hier entstehen durch diesen Effekt hohe Verluste. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde mit ZEMAX der chromatische Fokusversatz für die verschiedenen GRIN-Gläser simuliert und in Abb. 6.12(a) eingetragen. Die Graphen zeigen die Wellenlänge gegenüber dem Fokusversatz, der relativ zu einer festen Wellenlänge λ_{basis} entsteht. In Abb. 6.12 (a) sind die Ergebnisse für die einzelnen Materialien am Beispiel einer 0,25 Pitch-Linse gezeigt. Im Fall der durchgezogenen Linien gilt $\lambda_{\text{basis}} = 900 \text{ nm}$, für die gepunkteten Linien $\lambda_{\text{basis}}=750 \text{ nm}$. Diese wurden beispielhaft gewählt, um die Verhältnisse zu verdeutlichen.



(a) Chromatischer Fokusversatz GRIN Materialien



(b) Chromatischer Fokusversatz der Systeme

Abb. 6.12: (a) Chromatischer Fokusversatz einer 0.25 Pitch-Linse für verschiedene GRIN-Materialien und (b) Chromatischer Fokusversatz der Systeme; jeweils relativ zu 900 nm bzw. 750 nm. Daten aus ZEMAX-Simulation

chen, besonders interessant ist der Fall für $\lambda_{\text{basis}} = 750 \text{ nm}$, da hier Zellen gut angeregt werden können. Hier wird ein Nachteil der Ta-dotierten Gläser deutlich, denn sie weisen einen deutlich stärkeren chromatischen Fokusversatz auf. Aus diesem Grund ist die weitere Verwendung von Ag- und Li-dotierten Linsen (oder eine Kombination davon) vorteilhaft.

Für die kompletten Systeme in Abb. 6.12 (b) wird der Fokusversatz natürlich wesentlich größer und skaliert mit der physikalischen Länge des Endoskop-Systems, was besonders für das extrem lange Zwei-Komponenten-System auffällt. Bei ähnlichen Längen schneidet hier erwartungsgemäß das Ta-System schlechter als das Ag-dotierte Einkomponenten-System ab. Im Gegensatz dazu besitzt das Halbkugelsystem einen geringeren maximalen chromatischen Versatz im Bereich $100 \mu\text{m}$ und erzielt so ein vergleichsweise besseres Verhalten.

Die Verluste, die durch den chromatischen Fokusversatz beim Einkoppeln der Fluoreszenzstrahlung vom Endoskop zum Objektiv entstehen, können auch durch eine Längenanpassung der GRIN-Linse verringert werden. In Abb. 6.13 soll dies am Beispiel des Zweikomponenten-Systems veranschaulicht werden. Das blaue Strahlenbündel zeigt

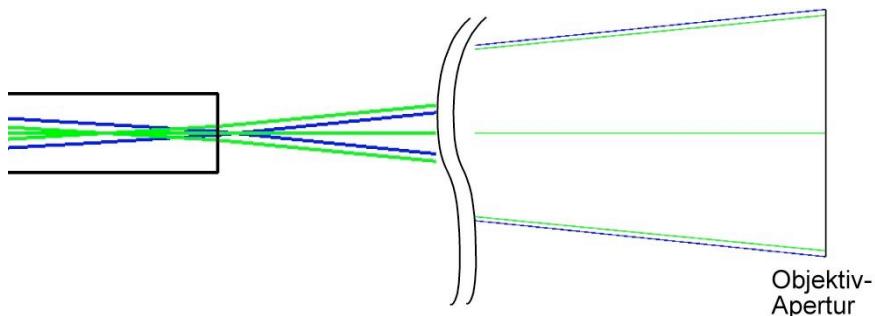


Abb. 6.13: Chromatischer Fokusversatz im Fall des 2-Komponenten-Systems
Daten aus ZEMAX-Simulation.

den Verlauf der im Bild nach links eingekoppelten NIR-Laserstrahlung, das grüne Bündel die von der Linse übetrugene VIS-Fluoreszenzstrahlung. In der gezeigten ZEMAX-Simulation wurden als Beispiel 800 und 450 nm eingesetzt, der distale Fokus befindet sich $50 \mu\text{m}$ außerhalb der Linse. Wie zu erkennen ist, liegt der proximale Fokus des Laserstrahls $200 \mu\text{m}$ außerhalb der Linse, der Fokus der Fluoreszenzstrahlung jedoch innerhalb, $1,55 \text{ mm}$ von der proximalen Linsenoberfläche entfernt. Für das Fluoreszenzlicht hat das GRIN-Endoskop einen längeren Pitch als für das längerwellige Laserlicht. Dadurch tritt das Licht mit einem weniger großen Divergenzwinkel aus der Linse aus, als dies für eine längere Wellenlänge der Fall wäre. Dies führt dazu, dass der Durch-

messer des Fluoreszenzstrahlbündels auf dem Weg zum Objektiv kaum von dem der Laserstrahlung abweicht, wodurch die sichtbare Strahlung nahezu verlustfrei wieder in das Objektiv eingekoppelt werden kann. Besonders im Fall des Zweikomponentensystems ergibt sich der Zusammenhang wie in Abb. 6.13 simuliert: Das Fluoreszenzlicht (grün) liegt innerhalb der Begrenzung durch das Laserlicht und so entstehen hier keine Verluste durch den Fokusversatz.

Durch dieses Design, wie es im Fall des Zwei-Komponenten-Systems eingesetzt wird, können die Effekte des chromatischen Fokusversatzes wieder ausgeglichen werden. Eine solche Konfiguration sollte beim Erstellen von Linsen(systemen) angestrebt werden. Zudem entstehen im Li-Bereich der Übertragungslinse keine Fokussierungen der Laserstrahlung.

Zweiphotonen-Anregung

Wie schon in Kap. 4.4 wurde auch für die GRIN-Endoskope die Effektivität der Anregung bestimmt. Die entsprechenden Graphen sind in Abb. 6.14 dargestellt, der Fitparameter n , der die Art der Absorption beschreibt, ist in Tab. 6.3 aufgelistet. Die Werte der

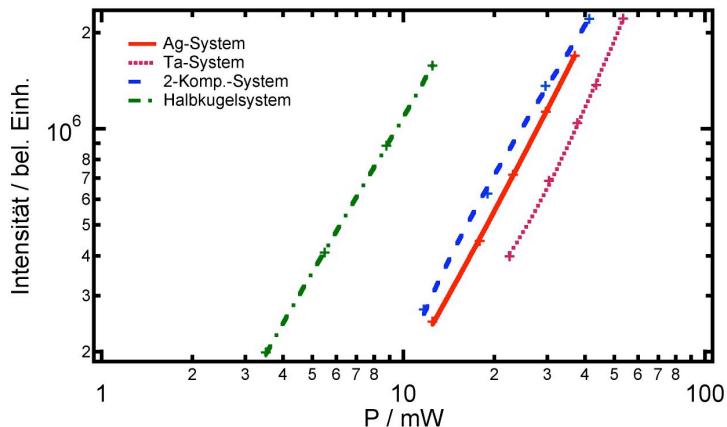


Abb. 6.14: Zweiphotonen-Effekt für die Endoskopsysteme. Aufgenommen mit 0,1 mM Fluoreszein-Lösung

Potenz n liegen für die untersuchten Systeme im Bereich $2,0 \pm 0,1$. Auch hier erweist sich das Halbkugel-System als sehr effizient, zu sehen an der geringeren Leistung die notwendig ist, um gleiche Fluoreszenzintensitäten zu erzeugen. Trotz der großen Länge und den damit verbunden Verlusten durch Absorption in der Linse ist das Zweikomponenten-System noch effizienter in der Zweiphotonen-Anregung als das Ag-dotierte

System	n
Ag-System	1,99
Ta-System	2,10
Zweikomponenten-System	1,95
Halbkugel-System	2,05

Tab. 6.2: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anregungsleistung, für verschiedene Endoskop-Systeme. Verwendet wurde, wie schon zuvor, ein \bar{P}^n -Fit

Einkomponenten-System. Das Ta-dotierte Einkomponenten-System zeigt die schlechteste Anregungseffizienz. Im Vergleich zu den Objektiven schneiden die eingesetzten Systeme dennoch nur leicht schlechter ab als das 20 \times /NA0,5-Objektiv.

Pulsverbreiterung

Ein wichtiger Aspekt für den Einsatz der GRIN-Linsen war die geringe Pulsverbreiterung des Laserlichts beim Durchlauf durch das System, bei gleichzeitiger strahlformender Funktion. Um dies genauer zu quantifizieren wurde die Pulsverbreiterung gemessen, wie in Kap. 3.1 beschrieben. Das Ergebnis ist die Pulsverbreiterung (GDD) in fs^2 , die in Abb. 6.15 in Abhängigkeit der Wellenlänge des Lasers dargestellt ist. Über den vermessenen Wellenlängen-Bereich kann keine Tendenz festgestellt werden, der Verlauf ist für alle Systeme in etwa konstant. Erwartungsgemäß durch die große Länge bedingt besitzt das Zweikomponenten-System die größte Pulsverbreiterung von 14.000 fs^2 , was in etwa den Werten des Tomographen mit Objektiv entspricht (vgl. Abb 4.5). Durch die geringen Maße ist auch hier für das Halbkugelsystem die Pulsverbreiterung sehr gering und damit vorteilhaft.

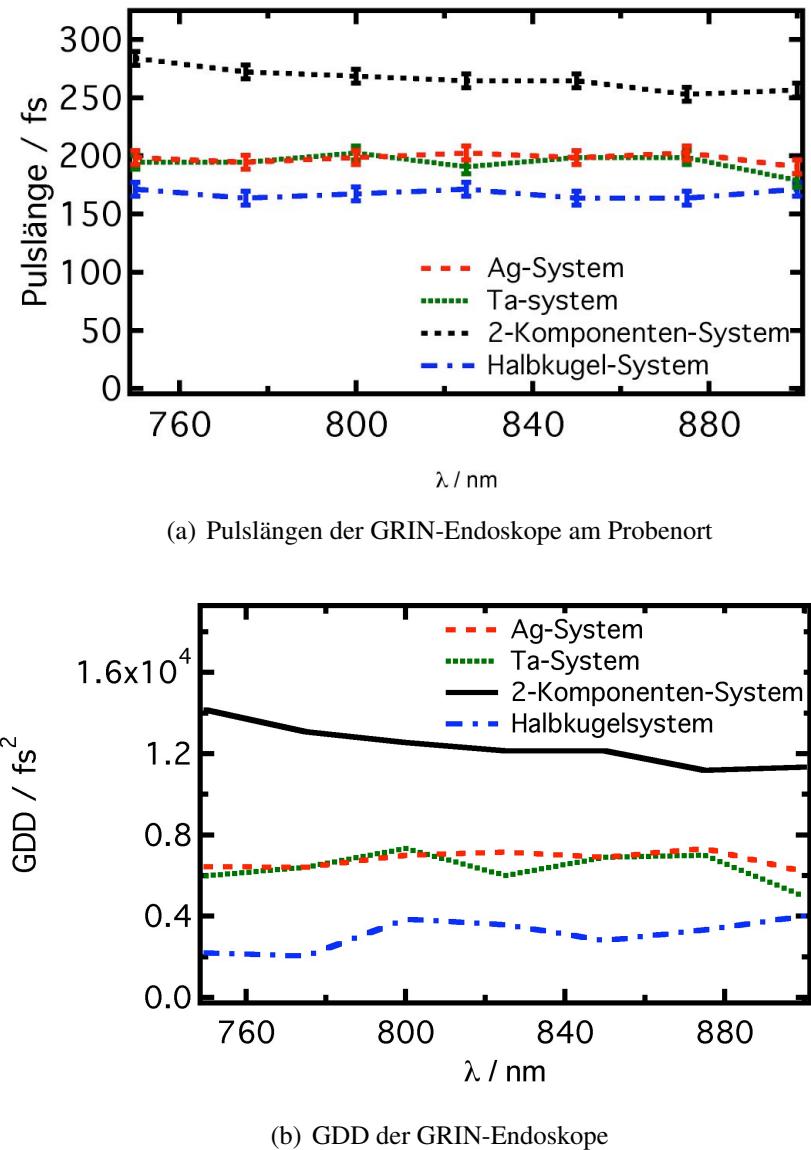


Abb. 6.15: (a) Pulslänge und (b) Pulsverbreiterung der Endoskop-Systeme

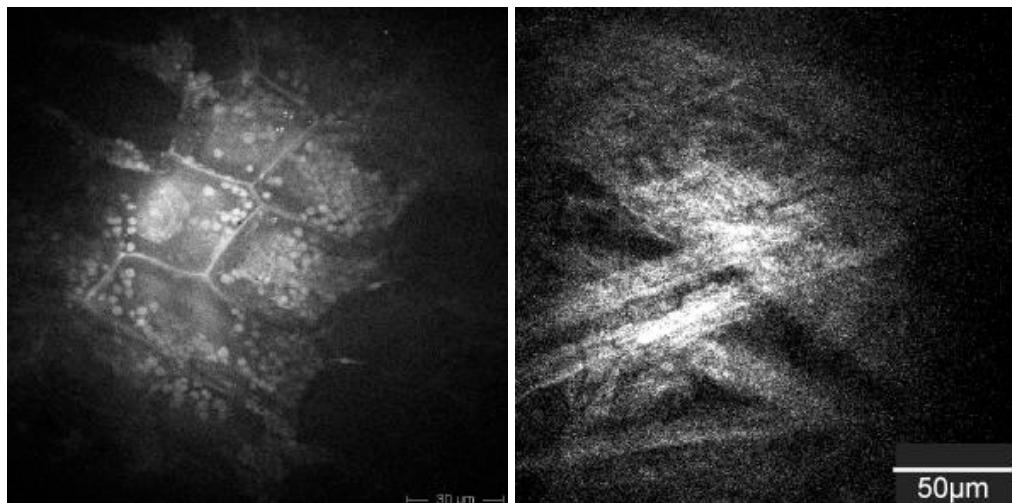
6.4 Klinische Studien

Voruntersuchungen

Bisher wurde gezeigt, dass mit den vorgestellten Endoskopsystemen gute Abbildungseigenschaften für den Einsatz in der Zweiphotonen-Endoskopie zu erwarten sind. Vor den klinischen Studien wurden die Prototypen an biologischen Proben getestet.

Neben der Bildqualität muss eine eventuelle Schädigung der Probe untersucht werden. Die eingesetzten Laserintensitäten dürfen bei klinischen Anwendungen nicht beliebig erhöht werden.

Als einfache Modelle dienen Pflanzenzellen, hier am Beispiel Blätter von *elodea spec.* (Wasserpest) und bovine Muskeln. In den Blättern kann die Zweiphotonen-induzierte Autofluoreszenz von Chlorophyll angeregt werden. In den Muskelbestandteilen befindet sich Kollagen, das ein intensives SHG-Signal erzeugt. In Abb. 6.16 sind Beispieldurchmessungen dargestellt. Dabei zeigt Abb. 6.16 (a) eine Lage von Zellen der *Elodea*, an-



(a) Blatt der *elodea densa*

(b) Bovine Muskelfasern mit Kollagen

Abb. 6.16: Verschiedene Proben zum Testen der Abbildungseigenschaften der Mini-Endoskope an biologischem Material.

geregt mit 750 nm. Hier wurde das Halbkugelsystem verwendet. Gut zu erkennen sind die fluoreszierenden Chloroplasten und die Zellwände. Aufeinanderfolgende Aufnahmen führten zu keiner sichtbaren Veränderung im Bild. Ablation des bestrahlten Gewebes und Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften durch den Energieeintrag des Lasers können daher ausgeschlossen werden. In Abb. 6.16 (b) sind Kollagenfasern dar-

gestellt, aufgenommen mit dem Ag-Einkomponentensystem bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm und detektiert durch einen Bandpass bei 400 nm. Die Faserstrukturen können deutlich dargestellt werden. Auch hier können durch wiederholtes Scannen keine sofortigen sichtbaren Zerstörungen erzeugt werden. In diesen Beispielen ist eine gute Bildqualität mit SNR von bis zu 7 und K bis zu 0,7 erreichbar. Allerdings zeigen sich schon hier die Nachteile der Einkomponentensysteme: Die benötigte Anregungsleistung liegt im Bereich von 100-150 mW im Vergleich 2-10 mW bei den anderen beiden Systemen.

Biopsien

In Rahmen der klinischen Studien wurden zuerst Hautbiopsien von Patienten untersucht, bevor die Systeme *in vivo* eingesetzt wurden. Einige Beispiele dieser Messungen sind in Abb. 6.17 dargestellt. Aufnahmen mit dem Ta-Einkomponenten-System zeigt Abb. 6.17 (a)-(c). Die helle Fluoreszenz der Haare und des *stratum corneum* wurde sehr gut angeregt und detektiert. Kleinere Strukturen wie die Haarschuppen oder einzelne Zellen können nicht mehr dargestellt werden. In Abb. 6.17 (c) und (d) sind Strukturen in der Fettschicht von Biopsien zu sehen, angeregt bei 820 nm. Dabei zeigte das Zweikomponenten-System eine wesentlich bessere Auflösung (vgl. Massstab) bei geringerer Anregungsleistung von 14 mW gegenüber 80 mW beim Ta-System.

Verschiedene Strukturen in humanen Biopsien liessen sich eindeutig abbilden, dabei lag die Bildqualität bei mit dem Tomograph vergleichbaren Werten (SNR , Kontrast). Die Einkomponenten-Systeme erweisen sich hier als weniger geeignet. Besonders die Erzeugung der Luminenzenz im Ag-dotierten GRIN-Material konnte störende Artefakte erzeugen.

Gute Bildqualität wurden mit dem Halbkugelsystem erreicht. Als Beispiel sind mehrere Bilder humaner Haut in Abb. 6.18 gezeigt. Die verschiedenen, in Kap. 4 beschriebenen Hautebenen können gut abgebildet werden. Die Werte für SNR liegen bei 2,7-4,0 und für den Kontrast K bei 0,3-0,6. Im *stratum corneum* in Abb. 6.18 (a) können eindeutig lebende Zellen erkannt werden.

Mechanische Vibrationen im Gesamtsystem führen zu streifenförmigen Artefakten im Bild. Alle mechanischen Halterungen und Verstellmechanismen haben geringe Toleranzen und besitzen ein leichtes mechanisches Spiel. Da im Gegensatz zu den Biopsien Patienten nicht vollständig fixiert werden, übertragen sich Bewegungen leichter auf das gemessene Bild. Besonders deutlich wurde dieser Effekt im Fall des Zweikomponenten-

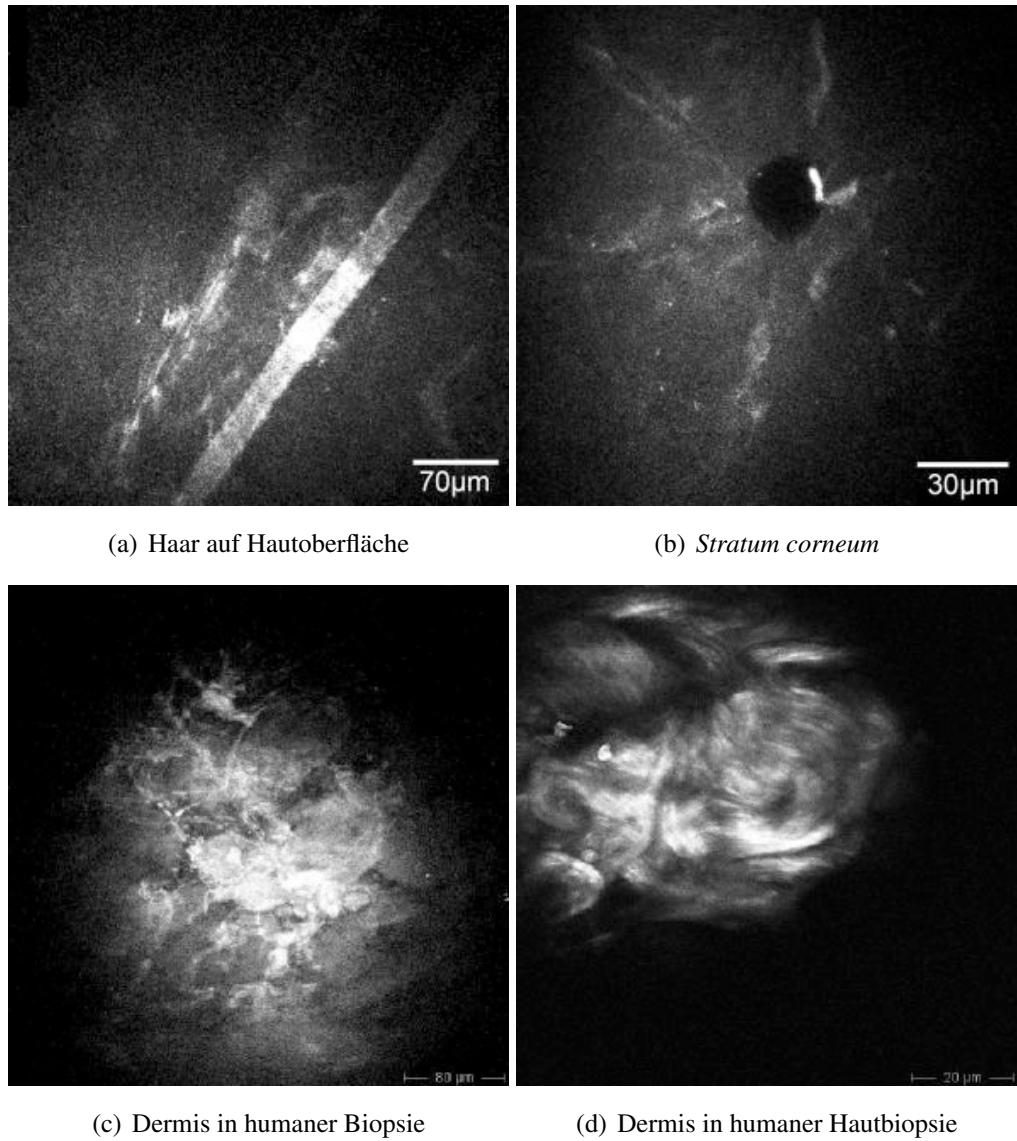


Abb. 6.17: Biopsien, aufgenommen mit verschiedenen GRIN-Endoskopen.
(a), (b), (c) mit Ta-Einkomponenten-System; (d) Zweikomponenten-System

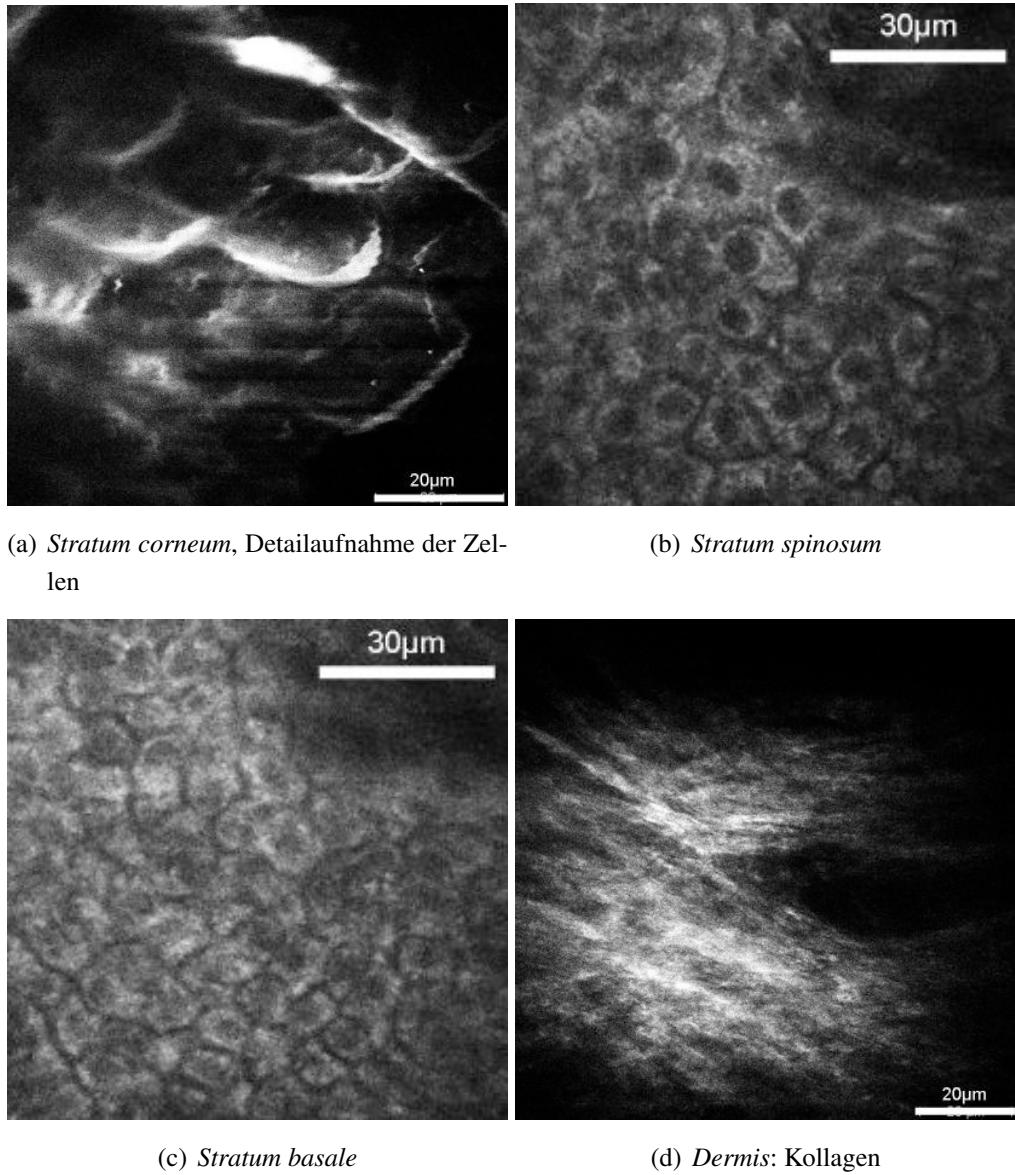
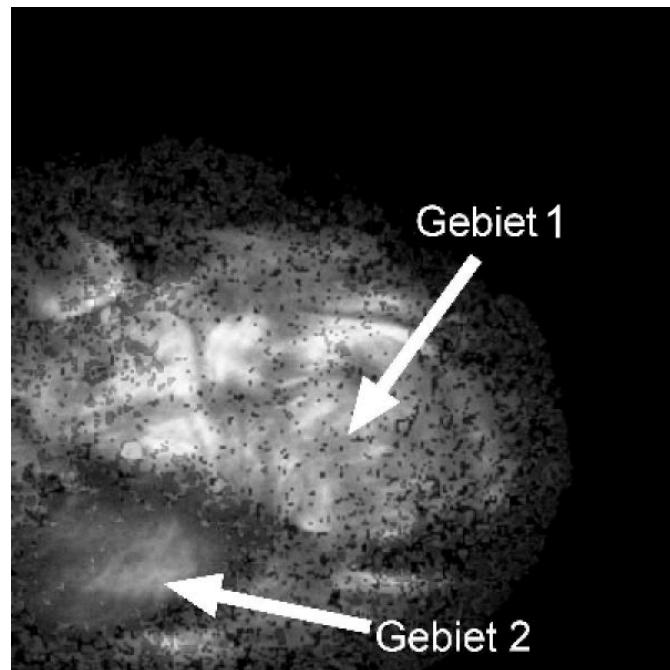


Abb. 6.18: Humane Haut, aufgenommen durch das Halbkugelsystem, angeregt bei 750 nm (a)-(c) und 820 nm (d).

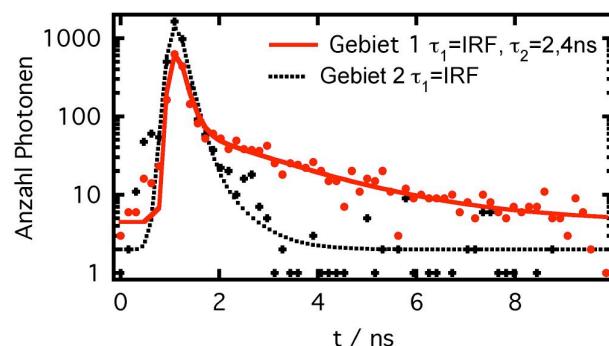
Systems, bei dem die Länge des Systems zu stärkeren Artefakten führt.

Die tieferen Schichten des *stratum spinosum* bis hinab in die Dermis können mit den Ein-Komponenten- und dem Halbkugelsystem fehlerfrei dargestellt werden. In den lebenden Zellen selbst zeigen sich einzelne Strukturen der Mitochondrien, die Zellen erscheinen klar voneinander abgegrenzt und es lässt sich die schon bekannte Morphologie erkennen. Aufnahmen der Dermis, angeregt bei 820 nm zeigt Abb. 6.18 (d). Hier können faserartige Strukturen erkannt werden, die durch ihr SHG-Signal als Kollagen identifiziert wurden.

Das Potential der Multiphotonen-Endoskopie liegt in der Kombination aus reiner Endoskopie und der Analyse der Fluoreszenzlebensdauern. Dies soll Abb. 6.19 verdeutlichen. Abb. 6.19 (a) zeigt eine FLIM-Karte einer humane Biopsie durch das Zweikomponenten-System aufgenommen. Der untersuchte Bereich entspricht einer Schicht innerhalb der Dermis (ca. 500 μm). Hier lassen sich zwei verschiedene Bereiche identifizieren. Gebiet 1 (siehe Bild) zeigt ein biexponentielles Fluoreszenzverhalten mit τ_2 -Komponenten mit einem Mittelwert von 2 ns. Gebiet 2 dagegen ein monoexponentielles Fluoreszenzverhalten mit einer Abklingkurve die der IRF entspricht. Mit einem Bandpass wurde dieser Bereich als Kollagen identifiziert.



(a) FLIM-Karte einer Biopsie



(b) Lebensdauern ausgewählter Bereiche

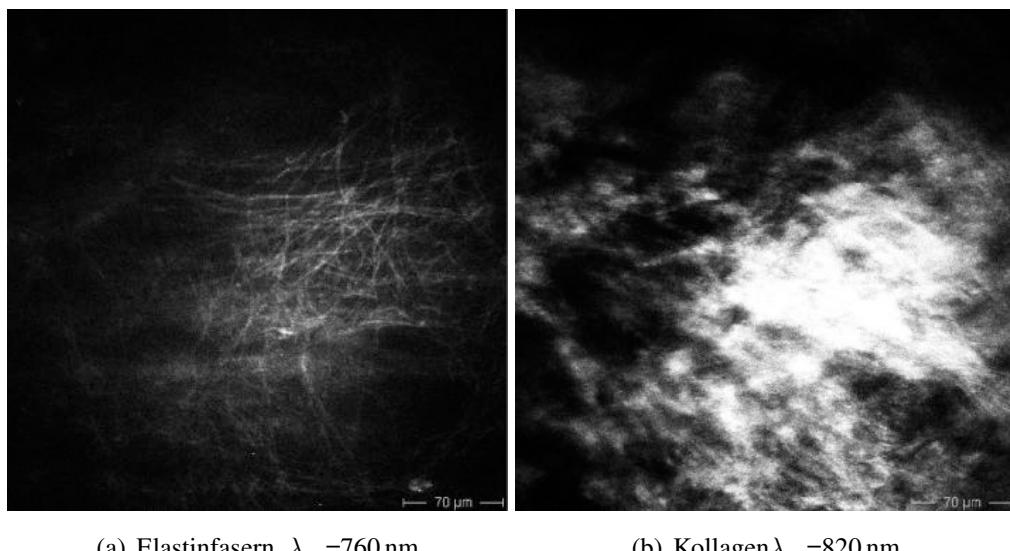
Abb. 6.19: (a) FLIM-Karte einer humane Biopsie durch das Zweikomponenten-System aufgenommen. Es können verschiedene Kollagenhaltige Gebiete identifiziert werden. Helle Bereiche: $\tau = 1400-2500\text{ ns}$ (Gebiet 1), dunkel-graue-Bereiche: $\tau = 200-1400\text{ ns}$ (Gebiet 2). (b) Das zeitliche Fluoreszenzverhalten an den markierten Stellen in (a).

Ulkuspatienten

Ein ideales Einsatzgebiet für die starren Endoskope findet sich in Wundheilungsstudien und speziell im Falle von Ulkuspatienten (*ulcus cruris*). Diese oft tiefen Wunden können mit mikroskopischen Methoden oder dem Tomographen nicht erreicht werden. In der hier vorgestellten klinischen Studie wurden fünf Patienten mit der Diagnose *ulcus cruris* untersucht. Dabei waren zwei verschiedene Bereiche der Wunden besonders wichtig für die Studie [46]: Der Bereich in der Mitte des Ulkus, der vom Körper am schlechtesten versorgt wird und stärker und länger betroffen ist, sowie der Randbereich, der möglicherweise schon heilt. Dort wird auch das Bindegewebe wieder aufgebaut. Eben dieser Heilungsprozess wurde in dieser Studie betrachtet. Dabei steht vor allem die Frage im Vordergrund, ob und wie der Heilungsprozess mit mikroskopischen oder endoskopischen Methoden charakterisierbar ist.

Als Referenzdaten wurde im Vorfeld gesunde Haut untersucht. Diese Daten helfen, den Krankheitszustand der Patienten besser einschätzen zu können.

Die Abb. 6.20 zeigt Bilder von Kollagen in gesunder Haut. Dazu wurde die Epidermis



(a) Elastinfasern, $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$

(b) Kollagen, $\lambda_{\text{ex}}=820 \text{ nm}$

Abb. 6.20: Elastin und Kollagen in gesunder humaner Haut *in vivo*.

eines gesunden, freiwilligen Probanden in einem kleinen Bereich mit einem *chirurgischen Löffel* entfernt und mit dem Einkomponentensystem untersucht.

In Abb. 6.20 (a) sind Elastinfaser-Netzwerke zu erkennen, aufgenommen mit $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$. Sie besitzen einen Durchmesser von $1-4 \mu\text{m}$. Im Gegensatz dazu stellt Abb. 6.20 (b) die Kollagenverteilung an der gleichen Stelle dar, aufgenommen bei $\lambda_{\text{ex}}=840 \text{ nm}$. Mit ei-

nem Bandpass bei 420 nm konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Strukturen tatsächlich um Kollagen handelt.

Die wesentlichen Ergebnisse der nachfolgenden klinischen Studie sind in Abb. 6.21 zusammengefasst. In der Mitte der Wunden konnte meistens nur eine diffuse Fluoreszenz festgestellt werden. Messungen der Fluoreszenzlebensdauer zeigten aber eine Verteilung mit Maximalwert der τ_2 -Komponente von 2,3 ns. Fremdkörper konnten an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Da innerhalb des Systems keine Artefakte mit einer solchen Fluoreszenzabklingzeit existieren, muss die Strahlung von biologischem Gewebe stammen (vgl. dazu Kap. 5). In den meisten Fällen konnte keine, allenfalls eine sehr verschwommene Struktur in diesen Bereichen erkannt werden. Ein Beispiel dazu zeigt Abb. 6.21 (a), angeregt bei $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$.

In den Randbereichen dagegen konnten verschiedene Strukturen nachgewiesen werden. Der Begrenzungsrand des Ulkus liegt im Bild parallel zu den seitlichen Kanten der Abbildung. Angeregt bei $\lambda_{\text{ex}}=760 \text{ nm}$ zeigt Abb. 6.21 (b) dem Elastin ähnliche faserartige Strukturen mit zusätzlichen hellen, runden Ausformungen. Die Fasern besitzen eine Dicke von $0,8\text{-}2 \mu\text{m}$. Sie zeigen eine leichte Vorzugsrichtung (im Bild waagerechter) senkrecht zum Begrenzungsrand des Ulkus. Wird die Anregungswellenlänge auf $\lambda_{\text{ex}}=820 \text{ nm}$ geändert, können kollagenartige Formen wie in Abb. 6.21 (c) abgebildet werden. Die Dicke der Strukturen liegt zwischen 1,5 und $4 \mu\text{m}$, die Anordnung ist ähnlich zu Abb. 6.21 (b) senkrecht zur Ulkus-Grenzfläche. Diese Strukturen konnten kein detektierbares SHG-Signal erzeugen, obwohl sie in allen anderen Eigenschaften (Morphologie, Anregungswellenlänge) sehr gut mit Kollagen vergleichbar waren. Eine mögliche Erklärung liefert Ref. [47]. Hier wird vermutet, dass im *ulcus cruris* sehr viel Kollagen I, II und IV produziert wird. Dieses ist aber durch die Unterversorgung nicht stabil ist und wird daher unvollständig aufgebaut. Ist allerdings die Konformation des Kollagen unvollständig, so bedeutet dies, dass auch dessen Fähigkeit, SHG-Signal zu erzeugen, nicht mehr gewährleistet ist.

Es sollten noch weitere Studien an Patienten erfolgen, um diese ersten Untersuchungen verfeinern und bestätigen zu können.

6.5 Fazit

Mit den starren Multiphotonen-Endoskopen konnte das Ziel, klinische Wundheilungsstudien *in vivo* durchzuführen, erreicht werden. Alle in diesem Kapitel vorgestellten Endoskope können die Femtosekunden-Laserstrahlung im gesamten verwendeten Infrarotbereich ohne große Verluste übertragen, so dass eine effektive Zweiphotonen-

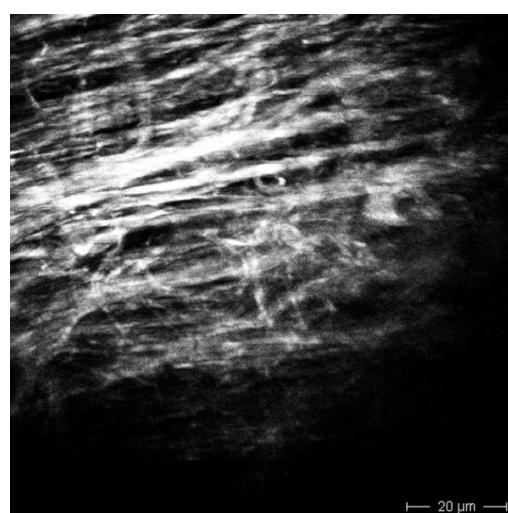
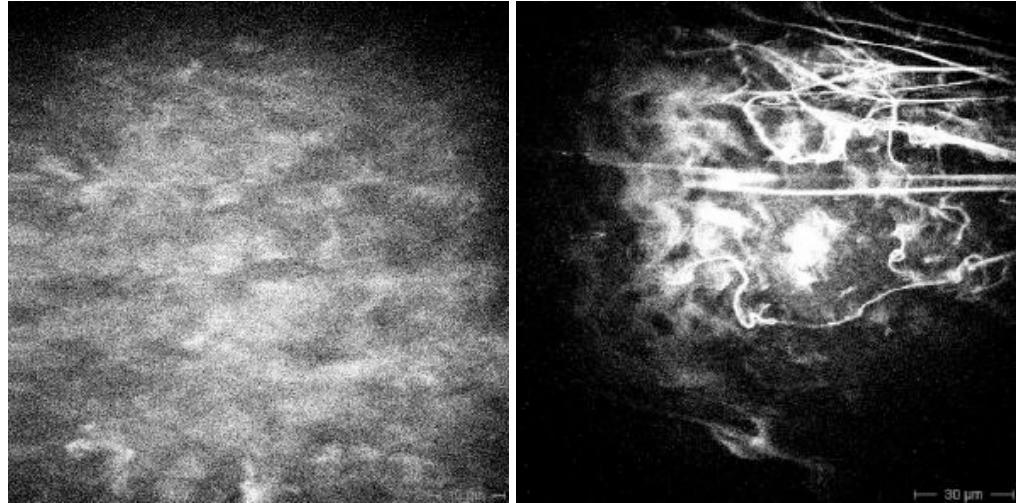


Abb. 6.21: *ulcus cruris in vivo bei verschiedenen Wellenlängen. Der Begrenzungsrand liegt in (b) und (c) parallel zur seitlichen Bildkante.*

Anregung möglich ist. Die Pulsverbreiterung ist gering und liegt in der Größenordnung von kommerziell erhältlichen Objektiven, ebenso wie die laterale Auflösung. Gute axiale Auflösung konnte nur mit dem Zweikomponenten- und dem Halbkugelsystem erreicht werden. Nachteilig wirkt sich aus, dass verschiedene Linsenfehler die Übertragung der Fluoreszenzstrahlung zurück in den Tomographen verringern. Daraus resultiert eine kleinere Bildfeldgröße bei gleichzeitig geringerem Signalpegel. Mit Kombinationen aus unterschiedlichen GRIN-Linsen-Materialien können diese Verluste verringert werden. Besonders geachtet werden muss darauf, dass bei Verwendung von Ag-dotierten Linsen durch den Laserfokus keine irreversiblen Schädigungen im Material erzeugt werden, die die effektive Signalübertragung behindern und Artefakte erzeugen. Werden diese Punkte beachtet, können in biologischem Gewebe Bilder mit gutem *SNR* und *K* erstellt werden. Dabei ist die Anregung und Detektion effektiv genug, um selbst vergleichsweise schwache Autofluoreszenzsignale abbilden zu können.

Am effektivsten ist das System mit zusätzlicher refraktiver Optik, bei dem eine relativ hohe numerische Apertur erreicht wird (Halbkugelsystem). Auch das System mit Übertragungslinse und GRIN-Objektivlinse konnte erfolgreich eingesetzt werden. Die einfach aufgebauten Einkomponenten-Systeme liefern weniger gute Ergebnisse.

Ein Designvorschlag für ein künftiges System wäre eine Kombination aus Halbkugelsystem und Zwei-Komponenten-System. Es würde eine hohe NA erzielen und hätte mehrere Zentimeter an Länge. Außerdem könnte durch die Li-Transferlinse der chromatische Fokusversatz auf ein Minimum reduziert werden.

Nach ausführlichen Tests wurden die Mini-Endoskope in einer klinischen Studie bei der Untersuchung der Ulkus-Patienten eingesetzt. Erste Bilder der Autofluoreszenz der Faserstrukturen von *ulcus cruris in vivo* wurden gezeigt.

Multiphotonen-Endoskopie besitzt ein hohes Potential, zu Klärung wichtiger Fragen in Bereichen der klinischen Forschung und Diagnostik beizutragen. Selektiv kann der Fokus der Untersuchungen auf bestimmte Bestandteile des in Frage kommenden Gewebes gelegt werden. Wie hier am Beispiel gezeigt, sind vor allem Bindegewebsbestandteile wie Elastin und Kollagen von großem Interesse.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden neue Anwendungen in der klinischen Multiphotonen-Tomographie humaner Haut vorgestellt.

Die Einsatzmöglichkeiten einer neuen Laserquelle mit Wellenlänge im nahen Infrarot und Repetitionsraten im GHz-Bereich wurden gezeigt. Dieser Laser ist geeignet, Multiphotonen-Tomographie mit ausreichender Signalstärke in humaner Haut zu erzeugen. Kontrast und Signal-Rausch-Verhältnis haben ähnliche Werte wie die üblicherweise verwendeten Strahlquellen. Instantane Schädigungen während der Bilderstellung durch die applizierte Laserenergie können ausgeschlossen werden. Da hier Fluoreszenzlebensdauer und Pulsperiode gleiche Größenordnung annehmen, kann in den untersuchten Fällen auf sukzessive Multiphotonen-Anregung der Fluorophore geschlossen werden. Große Bildfelder im Bereich bis zu einem Millimeter sind wünschenswert, da sie einen sofortigen Überblick über mehrere Hautareale liefern. Für Anwendungen mit vergrößertem Bildfeld wurde der Einsatz von Objektiven mit geringer Vergrößerung und daher niedriger numerischer Apertur untersucht. Multiphotonen-Tomographie kann mit guter Signalstärke in humaner Haut bis in eine Tiefe von etwa $250\text{ }\mu\text{m}$ betrieben werden. Dabei können Bereiche bis zu einer Größe von einem Millimeter abgebildet werden. Die Experimente und eine Abschätzung des Schädigungspotentials ergeben, dass Objektive mit Numerischer Apertur bis hinunter zu 0,3 ohne instantane Schäden am Gewebe eingesetzt werden können.

In klinischer Anwendung wurden die molekularen Stoffwechselsignale von NAD(P)H verwendet, um eine Methode zur Melanomfrühdiagnostik auszuarbeiten. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz-Lebensdauer detektiert und mit einem biexponentiellen Modell angepasst. Eine weitere Datenreduktion wurde mit der Erstellung der zentralen Momente der Verteilungen der Parameter der Anpassungskurve durchgeführt. Diese Zahlenwerte waren ausreichend, um zwischen gutartigem und bösartigen Proben zu unterscheiden.

Es wurden verschiedene Prototypen eines starren Multiphotonen-Endoskops auf Basis von GRIN-Linsen vorgestellt, die in klinischen Patientenstudien eingesetzt wurden. Nach ausgiebiger Charakterisierung der physikalischen Abbildungseigenschaften wur-

Zusammenfassung

den die Endoskopsysteme verwendet, um die extrazellulären Matrixbausteine an Patienten mit *ulcus cruris* abzubilden. Erste Ergebnisse zeigen, dass Kollagen durch Unterversorgung mit Nährstoffen nicht vollständig ausgebildet ist. Dies stützt die Forschungsergebnisse von anderen Autoren.

Ein hohes Potential für die Medizin der Zukunft zeigt sich in der Kombination der vorgestellten Methoden. Große, gut zugängliche Areale können mit der Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer auf Krankheiten schnell untersucht werden. Mit Multiphotonen-Endoskopie können die endogenen molekularen Signale aus dem Körperinneren detektiert und werden. Auf Basis der hier vorgestellten Entwicklungen ergeben sich viele innovative diagnostische Methoden für minimal-invasive Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

- [1] DENK, W., J. STRICKLER und W. W. WEBB: *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 248(4951):73–76, 1990.
- [2] KÖNIG, K.: *Multiphoton microscopy in life sciences*. J. Microsc., 200(2):83–104, 2000.
- [3] WILLIAMS, R. M., W. R. ZIPFEL und W. W. WEBB: *Multiphoton microscopy in biological research*. Curr. Opin. Chem. Biol., 5:603–608, 2001.
- [4] MASTERS, B. R., P. T. SO und E. GRATTON: *Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin*. Biophys. J., 72(6):2405–2412, 1997.
- [5] KÖNIG, K. und I. RIEMANN: *High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution*. J. Biomed. Opt., 8(432-439), 2003.
- [6] KÖNIG, K., A. EHLERS, F. STRACKE und I. RIEMANN: *In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography*. Skin. Pharmacol. Physiol., 19(2):78–88, 2006.
- [7] KÖNIG, K., I. RIEMANN, A. EHLERS, R. BUECKLE, E. DIMITROW, M. KAATZ, J. FLUHR und P. ELSNER: *In vivo multiphoton tomography of skin cancer*. Proc. SPIE, 6089:0R, 2006.
- [8] HAMMER, D. X., G. D. NOOJIN, R. J. THOMAS, C. E. CLARY, B. A. ROCKWELL, C. A. TOTH und W. P. ROACH: *Intraocular laser surgical probe for membrane disruption by laser-induced breakdown*. Appl. Optics, 36(7):1684–1693, 1997.
- [9] JUNG, J. C. und M. J. SCHNITZER: *Multiphoton endoscopy*. Opt. Lett., 28(11):902–904, 2003.

- [10] JUNG, J. C., A. D. MEHTA, E. AMSAY, R. STEPNOISKI und M. J. SCHNITZER: *In vivo mammalian imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy*. J. Neurophysiol., 92:3121–3133, 2004.
- [11] LEVENE, M. J., D. A. DOMBECK, K. A. KASISCHKE, R. P. MOLLOY und W. W. WEBB: *In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue*. J. Neurophysiol., 91:1908–1912, 2004.
- [12] GOEBEL, W., J. N. KERR, A. NIMMERJAHN und F. HELMCHEN: *Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiber bundle and a gradient-index lens objective*. Opt. Lett., 29:2521–2523, 2004.
- [13] FLUSBERG, B. A., J. C. JUNG, E. D. COCKER, E. P. ANDERSON und M. J. SCHNITZER: *In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope*. Opt. Lett., 30(17):2272–2274, 2005.
- [14] MYAING, M. T., D. J. McDONALD und X. LI: *Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope*. Opt. Lett., 31(8):1076–1078, 2006.
- [15] FU, L., X. GAN und M. GU: *Nonlinear optical microscopy based on double-clad photonic crystal fibers*. Opt. Express, 13(14):5528–5534, 2005.
- [16] FLUSBERG, B. A., E. D. COCKER, W. PIYAWATTANAMETHA, J. C. JUNG, E. L. M. CHEUNG und M. J. SCHNITZER: *Fiber-optic fluorescence imaging*. Nat. Methods, 2(12):941–950, 2005.
- [17] GÖPPERT-MAYER, M.: *Über Elementarakte mit 2 Quantensprüngen*. Ann. Phys. (Leipzig), 9:273–294, 1931.
- [18] KAISER, W. und C. G. B. GARRETT: *Two-photon excitation in CaF_2 : Eu^{2+}* . Phys. Rev. Lett., 7:229–231, 1961.
- [19] HAKEN, H. und H. WOLF: *Moleküllphysik und Quantenchemie*. Springer, 3 Auflage, 1998.
- [20] NAKAMURA, O.: *Fundamental of two-photon microscopy*. Microsc. Res. Techniq., 47:165–171, 1999.
- [21] BORN, M. und E. WOLF: *Principles of Optics*. Pergamon Press, Oxford, 5. Ausg. Auflage, 1975.

- [22] BECKER, W.: *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [23] BUTZ, T.: *Fouriertransformation für Fußgänger*. B. G. Teubner Stuttgart Leipzig, 1998.
- [24] FRANKEN, P. A., A. E. HILL, C. W. PETERS und G. WEINREICH: *Generation of optical harmonics*. Phys. Rev. Lett., 7(4):118–120, 1961.
- [25] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 2*, Band 2. Springer Berlin Heidelberg, 1. Ausgabe Auflage, 1995.
- [26] WILLIAMS, R. M., W. R. ZIPFEL und W. W. WEBB: *Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils*. Biophys. J., 88:1377–1386, 2005.
- [27] COX, G., N. MORENO und J. FEIJÓ: *Second-harmonic imaging of plant polysaccharides*. J. Biomed. Opt., 10(2):024013, 2005.
- [28] STARK, M., B. MANZ, A. EHLERS, M. KÜPPERS, I. RIEMANN, F. VOLKE, U. SIEBERT, W. WESCHKE und K. KÖNIG: *Multiparametric high-resolution imaging of barley embryos by multiphoton microscopy and magnetic-resonance micro-imaging*. Microsc. Res. Techniq., 70:426–432, 2007.
- [29] DOMBECK, D. A., K. A. KASISCHKE, H. D. VISHWASRAO, M. INGELSSON, B. T. HYMAN und W. W. WEBB: *Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy*. P. Natl. Acad. Sci. USA, 100(12):7081–7086, 2003.
- [30] PLOTNIKOV, S. V., A. C. MILLARD, P. J. CAMPAGNOLA und W. A. MOHLER: *Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres*. Biophys. J., 90:693–703, 2006.
- [31] SHEPPARD, C. J. R. und M. GU: *Image formation in two-photon fluorescence microscopy*. Optik, 86(3):104–106, 1990.
- [32] ZIPFEL, W. R., R. M. WILLIAMS und W. W. WEBB: *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat. Biotechnol., 21(11):1369–1377, 2003.

- [33] KLEBERGER, E., H. J. PLÖHN und G. SIMONSOHN: *Zur Brechungsindexverteilung in der Augenlinse.* Graef. Arch. Clin. Exp., 176(2), 1968.
- [34] MESSERSCHMIDT, B., T. POSSNER und R. GOERING: *Colorless gradient-index cylindrical lenses with high numerical apertures produced by silver-ion exchange.* Appl. Optics, 34(34):7825–7830, 1995.
- [35] MESSERSCHMIDT, B., B. L. MCINTYRE und S. N. HOEDE-WALTER: *Desired concentration-dependent ion exchange for micro-optic lenses.* Appl. Optics, 35(28):5670–5676, 1996.
- [36] SOODBISWAS, N., S. K. SARKAR und A. BASURAY: *Radial GRIN glasses in $Li_2O-Na_2O-Al_2O_3-TiO_2-SiO_2$ systems.* J. Mater. Sci., 33:5401–5403, 1998.
- [37] GOMEZ-REINO, C., M. V. PEREZ und C. BAO: *Gradient-index optics: fundamentals and applications.* Springer, 2002.
- [38] CZARNETZKI, B. M., H. KERL und W. STERRY: *Dermatologie und Venerologie.* de Gruyter, 1991.
- [39] LEONHARDT, H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.* Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 7. Auflage Auflage, 1985.
- [40] VANNESTE, DOMINIQUE (Herausgeber): *Hair science and technology.* Skintec face sprl, 9 rue du Sondart B-7500 Tournai Belgium, 2003.
- [41] ZAHN, HELMUT: *Feinbau und Chemie des Haares.* Parfümerie Kosmetik, 65(9):507–594, 1984.
- [42] *Krebs in Deutschland.* 5. Auflage. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Saarbrücken, 2006.
- [43] NIEMZ, M. H.: *Laser-tissue interactions.* Springer Berlin Heidelberg, 1. Auflage, 1996.
- [44] BRAUN, R. P., L. FRENCH und J.-H. SAURAT: *Das maligne Melanom.* Onkologie, 3:12–17, 2004.
- [45] WELZEL, J.: *Optical coherence tomography in dermatology: a review.* Skin Res. Technol., 7:1–9, 2001.

- [46] PASCARELLA, L., G.W. SCHMID SCHÖNBEIN und J.J. BERGAN: *Microcirculation and venous ulcers: a review.* Ann. Vasc. Surg., 19:921–927, 2005.
- [47] DALTON, S. J., C. V. WHITING, J. R. BAILEY, D. C. MITCHELL und J. F. TARLTON: *Mechanisms of chronic skin ulceration linking lactate, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, collagen remodeling, collagen stability, and defective angiogenesis.* J. Invest. Dermatol., 127:958–968, 2007.
- [48] ALBOTA, M. A., C. XU und W. W. WEBB: *Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm.* Appl. Optics, 37(31):7352–7356, 1998.
- [49] KÖNIG, K. und H. SCHNECKENBURGER: *Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis.* J Fluoresc., 4(1):17–40, 1994.
- [50] ZIPFEL, W. R., R. M. WILLIAMS, R. CHRISTIE, A. Y. NIKITIN, B. T. HYMAN und W. W. WEBB: *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation.* P. Natl. Acad. Sci. USA, 100(12):7075–7080, 2003.
- [51] PORTER, R. M. und E. B. LANE: *Pheotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function.* Trends Genet., 19(5):278–285, 2003.
- [52] PENA, A.-M., M. STRUPLER, T. BOULESTEIX, G. GODEAU und M.-C. SCHANNE-KLEIN: *Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy.* Opt. Express, 13(16):6268–6274, 2005.
- [53] IWEIBO, I.: *Protein fluorescence and electronic energy transfer in the determination of molecular dimensions and rotational relaxation times of native and coenzyme-bound horse liver alcohol dehydrogenase.* Biochim. Biophys. Acta, 446:192–205, 1976.
- [54] KÖNIG, K., M. W. BERNS und B. J. TROMBERG: *Time-resolved steady-state fluorescence measurements of β -nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure.* J. Photochem. Photobio. B, 37:91–95, 1997.
- [55] LAKOWICZ, J. R., H. SZMACINSKI, K. NOWACZYK und M. L. JOHNSON: *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH.* P. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1271–1275, 1992.

- [56] NIESNER, R., B. PEKER, P. SCHLÜSCHE und K. GERICKE: *Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging in the Investigation of Cellular Metabolism by Means of NAD(P)H Autofluorescence*. ChemPhysChem, 5(8):1141–1149, 2004.
- [57] HUANG, S., A. A. HEIKAL und W. W. WEBB: *Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein*. Biophys. J., 82(5):2811–2825, 2002.
- [58] THODY, A. J., E. M. HIGGINS, K. WAKAMATSU, S. ITO, S. A. BURCHILL und J. M. MARKS: *Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis*. J. Invest. Dermatol., 97:340–344, 1991.
- [59] ITO, S. und K. WAKAMATSU: *Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review*. Pigm. Cell Res., 16:523–531, 2003.
- [60] ITO, S. und K. FUJITA: *Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography*. Anal. Biochem., 144:527–536, 1985.
- [61] ZOCCOLA, M., R. MOSSOTTI, R. INNOCENTI, D. I. LORIA, S. ROSSO und R. ZANETTI: *Near infrared spectroscopy as a tool for determination of eumelanin in human hair*. Pigm. Cell Res., 17:379–385, 2004.
- [62] HALLÉGOT, P., R. PETERANDERL und C. LECHENE: *In-situ imaging and mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft*. J. Invest. Dermatol., 122:381–386, 2004.
- [63] ORTONNE, J-P.: *Photoprotective properties of skin melanin*. Brit. J. Dermatol., 146(Suppl. 61):7–10, 2002.
- [64] TEUCHNER, K., W. FREYER, D. LEUPOLD, A. VOLKMER, D. J. BIRCH, P. ALTMAYER, M. STÜCKER und K. HOFFMANN: *Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin*. Photochem. Photobiol., 70(2):146–151, 1999.
- [65] HILL, H. Z.: *Melanin - a two-edged sword?* Photochem. Photobiol., 63:41S–42S, 1996.

- [66] EHLERT, J., K. KÖNIG, D. LEUPOLD und K. TEUCHNER: *Fluorophor für die Multi-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie.* Patentanmeldung DE000019939706A1, 1999.
- [67] TEUCHNER, K., J. EHLERT, W. FREYER, D. LEUPOLD, P. ALTMAYER, M. STÜCKER und K. HOFFMANN: *Fluorescence studies of melanin by stepwise two-photon femtosecond laser excitation.* J Fluoresc., 10(3):275–281, 2000.
- [68] SALOPEK, T.G., K. YAMADA, S. ITO und K. JIMBOW: *Dysplastic melanocytic nevi contain high levels of pheomelanin: quantitative comparison of pheomelanin/eumelanin levels between normal skin, common nevi and dysplastiv nevi.* Pigm. Cell Res., 4:172–179, 1991.
- [69] ROGGAN, A., J. BEUTHAN, S. SCHRÜNDER und G. MÜLLER: *Diagnostik und Therapie mit dem Laser.* Physikalische Blätter, 55(3):25–30, 1999.
- [70] KÖNIG, K., H. LIANG, M. W. BERNS und B. J. TROMBERG: *Cell damage by near-IR microbeams.* Nature, 377:20–21, 1995.
- [71] KÖNIG, K., H. LIANG, M. W. BERNS und B. J. TROMBERG: *Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption.* Opt. Lett., 21(14):1090–1092, 1996.
- [72] KÖNIG, K., U. SIMON und K.-J. HALBHUBER: *3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope.* Cell. Mol. Biol., 42(8):1181–1194, 1996.
- [73] KÖNIG, K., P. T. SO, W. MANTULIN und E. GRATTON: *Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes.* Opt. Lett., 22(2):135–136, 1997.
- [74] KÖNIG, K., T. W. BECKER, P. FISCHER, I. RIEMANN und K.-J. HALBHUBER: *Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes.* Opt. Lett., 24(2):113–115, 1999.
- [75] KOESTER, H. J., D. BAUR, R. UHL und S. W. HELL: *Ca²⁺ Fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage.* Biophys. J., 77:2226–2236, 1999.
- [76] HOPT, A. und E. NEHER: *Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy.* Biophys. J., 80:2029–2036, 1999.

- [77] VOGEL, A., J. NOACK, K. NAHEN, D. THEISEN, S. BUSCH, U. PARLITZ, D.X. HAMMER, G.D. NOOJIN, B.A. ROCKWELL und R. BIRNGRUBER: *Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales.* Appl. Phys. B, 68:271–280, 1999.
- [78] VOGEL, A., J. NOACK, G. HÜTTMAN und G. PALTAUF: *Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues.* Appl. Phys. B, 81:1015–1047, 2005.
- [79] DAUSINGER, F., F. LICHTNER und H. LUBATSCHOWSKI (Herausgeber): *Femtosecond technology for technical and medical application.* Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- [80] AGRAWAL, G. P.: *Nonlinear fiber optics.* Academic Press Inc., US, 2. Auflage, 1995.
- [81] BEAUREPAIRE, E. und J. MERTZ: *Epifluorescence collection in two-photon microscopy.* Appl. Optics, 41(25):5376–5382, 2002.
- [82] HELMCHEN, F. und W. DENK: *Deep tissue two-photon microscopy.* Nat. Methods, 2(12):932–940, 2005.
- [83] THEER, P., M. T. HASAN und W. DENK: *Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier.* Opt. Lett., 28(12):1022–1024, 2003.
- [84] CHU, S.-W., T.-M. LIU, C.-K. SUN, C.-Y. LIN und H.-J. TSAI: *Real-time second-harmonic-generation microscopy based on a 2-GHz repetition rate Ti:sapphire laser.* Opt. Express, 11(8):933–938, 2003.
- [85] EHLERS, A., I. RIEMANN, S. MARTIN, R. LEHARZIC, A. BARTELS, C. JANKE und K. KÖNIG: *High (1 GHz) repetition rate compact femtosecond laser: a powerful multiphoton tool for nanomedicine and nanobiotechnology.* J. Appl. Phys., 102:014701, 2007.
- [86] KÖNIG, K.: *Biomedizinische Applikation der optischen Mikromanipulation und Zweiphotonen-Anregung vitaler Zellen mittels Naher-Infrarot Laser-Mikroskopie.* Shaker-Verlag Aachen, 1999.

- [87] KÖNIG, K., I. RIEMANN und W. FRITZSCHE: *Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses.* Opt. Lett., 26(11):819–821, 2001.
- [88] FISCHER, F., B. VOLLMER, S. PUSCHMANN, R. GREINERT, W. BREITBART, J. KIEFER und R. WEPF: *Skin imaging by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications.* Proc. SPIE, 6191:5, 2006.
- [89] F. FISCHER, BEIERSDORF AG, GERMANY: *Persönliche Mitteilung.* Juni 2006.
- [90] KÖNIG, K., P. T. SO, W. W. MANTULIN, B. J. TROMBERG und E. GRATTON: *Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress.* J. Microsc., 183(3):197–204, 1996.
- [91] HANSON, K. M., M. J. BEHNE, N. P. BARRY, T. M. MAURO, E. GRATTON und R. M. CLEGG: *Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient.* Biophys. J., 83:1682–1690, 2002.
- [92] OZEKI, H., S. ITO und K. WAKAMATSU: *Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair.* Pigm. Cell Res., 9:51–57, 1996.
- [93] LIU, Y., L. HONG, K. WAKAMATSU, S. ITO, B. ADHYARU, C-Y. CHENG, C. R. BOWERS und J. D. SIMON: *Comparison of Structural and Chemical Properties of Black and Red Human Hair Melanosomes.* Photochem. Photobiol., 81:135–144, 2005.
- [94] DIMITROW, E.: *Messdaten aus gemeinsamem BMBF-Projekt.* Mai 2007.
- [95] WARBURG, O.: *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.* Naturwissenschaften, 12(50):1131–1137, 1924.
- [96] GULLEDGE, C. J. und M. W. DEWHIRST: *Tumor oxygenation: a matter of supply and demand.* Anticancer Res., 16:741–750, 1996.
- [97] SCHULZ, T. J., R. THIERBACH, A. VOIGT, G. DREWES, B. MIETZNER, P. STEINBERG, A. F. H. PFEIFFER und M. RISTOW: *Induction of Oxidative Metabolism by Mitochondrial Frataxin Inhibits Cancer Growth: OTTO WARBURG REVISITED.* J. Biol. Chem., 281(2):977–981, 2006.
- [98] STRYER, L.: *Biochemie.* Spektrum-der-Wissenschaft Verlagsgesellschaft GmbH, 3 Auflage, 1990.

Literaturverzeichnis

- [99] SUD, D., W. ZHONG, D. G. BEER und M.-A. MYCEK: *Time-resolved optical imaging provides a molecular snapshot of altered metabolic function in living human cancer cell models.* Opt. Express, 14(10):4412–4426, 2006.
- [100] SKALA, M. C., K. M. RICHING, D. K. BIRD, A. GENDRON-FITZPATRICK, J. EICKHOFF, K. W. ELICEIRI, P. J. KEELY und N. RAMANUJAM: *In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia.* J. Biomed. Opt., 12(2):024014, 2007.
- [101] AUKHIL, I.: *Biology of wound healing.* Periodont., 22:44–50, 2000.
- [102] B. MESSERSCHMIDT, GRINTECH AG: *Persönliche Mitteilung.*
- [103] R. FONTEYNE, NSG EUROPE: *Persönliche Mitteilung.*
- [104] PAJE, S. E., J. LOPIS, M. A. VILLEGRAS und J. M. FERNANDEZ NAVARRO: *Photoluminescence of a silver-doped glass.* Appl. Phys. A, 63:431–434, 1996.

A IGOR-PRO Skripte

A.1 Konvergenz der Anpassungskurven

Mit diesem Skript wurden Zerfallskurven simuliert, die eine immer größere Anzahl Photonen enthalten. Nach Erzeugung, Addition von Rauschen wurden die Kurven mit der unverrauschten Kurve als Startwert angepasst. Die Übereinstimmung mit der Anpassungskurve wurde ausgegeben.

```
function SeekMin(zeit, points, minAmp, maxAmp, step)
wave zeit
variable minAmp, maxAmp, points, step

variable k, Amplitude, tau1, tau2, l, dim, summe

Variable V_fitOptions=4
Variable V_fitMaxIters=100

tau1=0.4
tau2=2.5
Make/D/N=7/O W_coef

dim=floor((MaxAmp-minAmp)/step+0.5)
W_coef[0] = {tau1,0.2,0,minAmp*0.7,2, maxamp*0.3, tau2}

make /o /n=(dim, 9) ergebnis; wave ergebnis=ergebnis
make /o /n=7 zwischen; wave zwischen =zwischen
make /O /N=(points, dim, 64) Daten ; wave Daten=Daten
make /O /N=(64) dummy ; wave dummy=dummy
ergebnis=0; dummy=0; zwischen=0;
ergebnis=0; dummy=0; zwischen=0;
Amplitude=minAmp;
for(l=0; Amplitude<=maxAmp;l+=1)
summe=0
for(k=0;k<points;k+=1)
//sigfluo=(1+noise(0.1))*wert_sigfluo
dummy[] =floor(10+noise(10)+.5)+(Amplitude*0.7)*exp(-(zeit-1.5)/tau1)*exp(-0.12^2/(2*tau1^2))*erfc((0.12/sqrt(2))/tau1)-((zeit-1.5)/0.12/sqrt(2))+(Amplitude*0.3)*exp(-(zeit-1.5)/tau2)*exp(-0.12^2/(2*tau2^2))*erfc((0.12/sqrt(2))/tau2)-((zeit-1.5)/0.12/sqrt(2)))

//Daten[k][Amplitude][]=dummy[r]
W_coef[0] = {tau1,0.2,0,Amplitude*0.7,1.5, Amplitude*0.3, tau2}
FuncFit /Q /N /NTHR=1/TBOX=0 zweifachexp W_coef dummy
/X=zeit /d; doupdate;
Integrate dummy
summe+=dummy[64]
zwischen+=w_coef
endfor
//print zwischen
ergebnis[1][]=zwischen[q]/points; doupdate
ergebnis[1][7]=Amplitude
ergebnis[1][8]=summe/points
zwischen=0
Amplitude+=step
endfor

end // of seek
```

A.2 Auswirkungen von Rauschen

Mit den folgenden Programmen wurde simuliert, inwieweit verschiedene Arten und Stärken von aufaddiertem Rauschen die Histogrammkurven beeinflusst. Dazu konnten verschiedene 256×256 Pixel-Masken eingelesen werden, die jedem Bildpunkt eine eigene Abklingkurve zuweisen konnten.

```
#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.
#include <AllStatsProcedures>

function CreateData(zeit, maske, thres, sigfluo, noise, taunoise)
//Erzeugt 3D-Datenmatrix aus 2D-File maske,
// Exponentielle Kurve, gefaltet mit Gaußkurve mit zeit als Zeitachse

wave maske, zeit
variable thres, sigfluo, noise, noisefluo, taunoise

variable k, l,wert_sigfluo, wert_noisefluo

wert_sigfluo=sigfluo
wert_noisefluo=noisefluo

//Daten initialisieren
make /O /N=(256, 256, 64) Daten ; wave Daten=Daten
make /O /N=(64) dummy ; wave dummy=dummy

daten=0
// Daten-Matrix erstellen
for(k=0;k<256;k+=1)
for(l=0;l<256;l+=1)
if (maske[k][l]==thres)
sigfluo=(1+gnoise(taunoise))*wert_sigfluo
dummy[] = floor(abs(gnoise(15)+.5))+floor(0.5+(gnoise(noise)+300)*exp(-(zeit-1.5)/sigfluo)*
exp(-0.12^2/(2*sigfluo^2))*erfc((0.12/sqrt(2))/sigfluo)-((zeit-1.5)/0.12/sqrt(2)))
else
noisefluo=(1+gnoise(taunoise))*wert_noisefluo
dummy[] = floor(abs(gnoise(15)+.5))+floor(0.5+(gnoise(noise)+300)*exp(-(zeit-1.5)/noisefluo)*
exp(-0.12^2/(2*noisefluo^2))*erfc((0.12/sqrt(2))/noisefluo)-((zeit-1.5)/0.12/sqrt(2)))

endif
Daten[k][l][]=dummy[r]
endfor
endfor
end
//-----
function fitndata(zeit, data)
//Fitted Daten, die mit CreateData erzeugt wurden mit Modell an
wave data, zeit

variable k, l

variable V_fitOptions=4
Make/D/N=5/O W_coef
W_coef[0] = {2,0.2,0,300,2}

make /o /n=64 dummy, wave dummy=dummy
make / o /n=(256, 256) tau; wave tau=tau
dummy=0;tau=0
//display dummy vs zeit as "Fenster"

for(k=0;k<256;k+=1)
for(l=0;l<256;l+=1)
//doupdate
W_coef[0] = {2,0.2,0,300,2}
dummy[] = data[k][l][p]; DelayUpdate
FuncFit /Q /N /NTHR=1/TBOX=0 einfachexp W_coef
dummy /X=zeit /d; DelayUpdate
tau[k][l]=w_coef[0]
endfor
endfor

end // of fitndisplay
```

```
//-----
Function einfachexp(w,t) : FitFunc
Wave w
Variable t

//CurveFitDialog/ These comments were created by the Curve
Fitting dialog. Altering them will
//CurveFitDialog/ make the function less convenient to work
with in the Curve Fitting dialog.
//CurveFitDialog/ Equation:
//CurveFitDialog/ f(t) = y0+A*exp(-(t-t0)/tau)*
exp(-sigma^2/(2*tau^2))*erfc((sigma/sqrt(2))/tau)-((t-t0)/sigma/sqrt(2)))
//CurveFitDialog/ End of Equation
//CurveFitDialog/ Independent Variables 1
//CurveFitDialog/ t
//CurveFitDialog/ Coefficients 5
//CurveFitDialog/ w[0] = tau
//CurveFitDialog/ w[1] = sigma
//CurveFitDialog/ w[2] = y0
//CurveFitDialog/ w[3] = A
//CurveFitDialog/ w[4] = t0

return w[2]+w[3]*exp(-(t-w[4])/w[0])*exp(-w[1]^2/(2*w[0]^2))* erfc((w[1]/sqrt(2))/w[0])-((t-w[4])/w[1]/sqrt(2)))
End
```

B Publikationsliste

Folgende Veröffentlichungen als Erstautor und Beiträge auf Fachtagungen (als Erstautor) sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden:

B.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

A. Ehlers, I. Riemann, M. Stark, K. König

Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair
Microscopy Research and Technique 70, 154-161 (2007)

A. Ehlers, I. Riemann, S. Martin, R. LeHarzic, A. Bartels, C. Janke, K. König

High (1GHz) repetition rate compact femtosecond laser: a powerful multiphoton tool
for nanomedicine and nanobiotechnology

J. Appl. Phys. 102, 014701 (2007)

K. König, A. Ehlers, F. Stracke, I. Riemann

In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton microscopy
Skin Pharmacol Physiol 19, 78-88 (2006)

J. Luengo, B. Weiss, M. Schneider, A. Ehlers, F. Stracke, K. König, K.H. Kostka, C.M.
Lehr, U.F. Schäfer

Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid
Skin Pharmacol Physiol 19, 190-197 (2006)

K. König, A. Ehlers, I. Riemann, S. Schenkl, R. Bückle, M. Kaatz

Clinical two-photon microendoscopy

Microscopy Research and Technique, 70, 398-402 (2007)

B.2 Vorträge auf internationalen Tagungen

A. Ehlers, S. Schenkl, I. Riemann, B. Messerschmidt, M. Kaatz, R. Bückle, K. König

In vivo multiphoton endoscopy of endogenous skin fluorophores

Photonics West, 6442, 2007

A. Ehlers, in Vertretung von K. König

Multiphotonen-Tomographie: Krebsdiagnose und Arzneistoffscreening

Medica 2006, Düsseldorf

A. Ehlers, S. Schenkl, K. König

In vivo Multiphoton-Endoscopy based on a GRIN-lens

EOS 2006, Paris

A. Ehlers, I. Riemann, T. Anhut, M. Kaatz, P. Elsner, K. König

Fluorescence lifetime-imaging of human skin and hair

Photonics West, 6089, 2006

A. Ehlers, I. Riemann, T. Anhut, J. Kobow, K. König

Multiphoton tomography of epidermis and dermis

Proc. SPIE 5700, 2005

A. Ehlers, I. Riemann, T. Anhut, J. Kobow, K. König

Multiphoton tomography of skin with gradient index-lenses

Focus on Microscopy 2005, Mar 20-23, 2005, Jena

A. Ehlers, I. Riemann, T. Anhut, E. Dimitrow, M. Kaatz, J. Fluhr, P. Elsner, J. Kobow,

K. König

5D-NIR-Multiphotonen Untersuchungen von Epidermis und Haaren

43. DDG-Tagung 20.-23. April 2005, Dresden

A. Ehlers, I. Riemann, T. Anhut, E. Dimitrow, M. Kaatz, J. Fluhr, P. Elsner, J. Kobow,

K. König

Multiphoton-tomography of human skin *in vivo*

13th International AEK/AIO Cancer Congress of the German Cancer Society March 13

- 16, 2005, Würzburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Dr. K. König bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung und Unterstützung während meiner Promotion.

Prof. Dr. G. Fuhr danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Fraunhofer-IBMT durchführen zu können.

Prof. Dr. Wagner danke ich für die Übernahme als Zweitgutachter.

Bei Herrn Oberarzt Dr. Kaatz (Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität) bedanke ich mich für die Unterstützung der klinischen Untersuchungen.

Dr. Bernhard Messerschmidt und Dr. Thorsten Possner (GRINTECH-GmbH) danke ich für die Beratung und Hilfe bei allen Problemen mit den GRIN-Linsen.

Bei Herrn Rainer Bückle (JenLab GmbH) möchte ich mich für die Hilfe bei Messungen und beim Lösen von technischen Problemen rund ums DermaInspect bedanken.

Bei Enrico Dimitrow (Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität) bedanke ich mich für die Diskussionen und die Hilfe bei medizinischen Fragen.

Bei Herrn Luck und seinem Team von der Werkstatt bedanke ich mich für die vielen Ideen für den Aufbau mechanischer Komponenten.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Gruppe in der "Villa" am Fraunhofer-IBMT möchte ich mich herzlich für ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe bedanken, für das tolle Arbeitsklima und für die vielen wissenschaftlichen und auch weniger wissenschaftlichen Diskussionen: Iris Riemann, Frank Stracke, Selma Schenkl, Martin Stark, Tiemo Anhut, Daniel Sauer, Sven Martin, Ronan LeHarzic, Aisada Uchugonova, Daniel Dörr, Kerstin Knobe, Judith Klement und Juliette Müller.

Ein weiterer Dank geht an die vielen Mitarbeiter am IBMT, die hier und dort ein Puzzleteilchen zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Ein besonders riesiges Dankeschön für ihr Vertrauen und ihre Geduld geht dabei an meine Frau Simone und meinen Sohn Philipp.