Baden-Württemberg Stiftung

WIR STIFTEN ZUKUNFT

Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

Quantitative Streulichtmikroskopie für die Diagnostik

Quantitative Streulichtmikroskopie für die Diagnostik

Die Kombination der Streulichtmikroskopie mit etablierten Methoden der Transmissions- und Fluoreszenzmikroskopie war ein wesentliches Ziel eines gemeinsamen Projekts der Hochschule Aalen und des Instituts für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm. Finanziert wurden die Forschungsarbeiten durch die Baden-Württemberg Stiftung gGmbH.

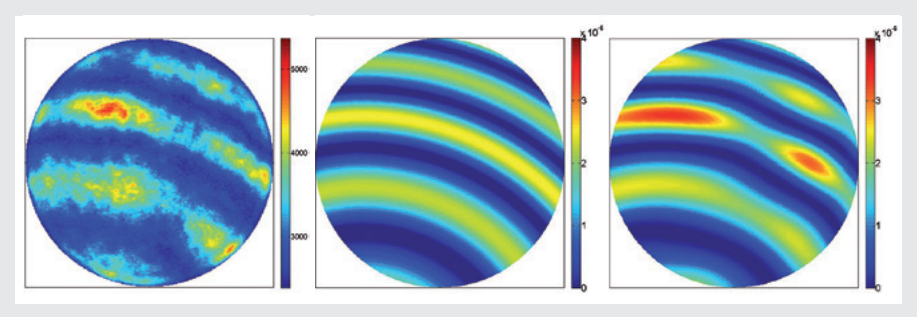

Abbildung 1: Zweidimensional winkelaufgelöste Messung an einer Hefezelle (links), Mie-Theorie für Vollkugel (Durchmesser 6 µm, n = 1,375, Mitte), Simulation für Kugel (6 µm, n = 1,375) mit nichtkonzentrischer Inklusion (2 µm, n = 1,39, rechts); der Brechungsindex der Umgebung wurde als n = 1,34 angenommen

Mit bestehenden Methoden für die markierungsfreie Diagnostik von lebenden Zellen und Gewebe, insbesondere der Autofluoreszenz- und Raman-Mikroskopie, können vor allem funktionelle Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen erfasst werden. Ergänzend können mit der winkel- und wellenlängenaufgelösten Streulichtmikroskopie strukturelle und morphologische Veränderungen von Zellen und Gewebe untersucht werden – z.B. beim Zelltod oder beim Eindringen von Tumorzellen in gesundes Gewebe. Eine Kombination der Streulichtmikroskopie mit etablierten Methoden der Transmissions- und Fluoreszenzmikroskopie – einschließlich der konfokalen Laser-Scanning- und der Lichtscheibenmikroskopie – war daher ein wesentliches Ziel eines Forschungsprojekts der Hochschule Aalen und des Instituts für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm.

Ausgangspunkt ist die charakteristische Winkelabhängigkeit der Mie-Streuung. Abbildung 1 vergleicht beispielhaft die in zwei Dimensionen winkelaufgelöste Messung an einer Hefezelle mit den durch Lösung der Maxwell-Gleichungen exakt berechneten Streulichtspektren einer homogenen Kugel sowie einer Kugel mit einer nichtkonzentrischen Inklusion. Dieser Vergleich zeigt zum einen, dass die ringförmige Struktur der Streulichtmessung durch die sphärische Form der Hefezelle bedingt ist. Zum anderen wird deutlich, dass sich die zusätzlichen Oszillationen entlang Kreisbögen konstanten Streuwinkels auf den Einfluss des Zellkerns zurückführen lassen. Weitere Streuer in der Zelle und im Zellkern tragen zum Untergrund im Signal bei und verbreitern die im reinen Zell-Kern-Modell ausgeprägten Oszillationen.

Biologische Anwendungen konzentrierten sich einerseits auf Untersuchungen zum programmierten Zelltod (Apoptose) und zum Einfluss pharmazeutischer Wirkstoffe auf die Zellvitalität. In einem Beispiel (Abb. 2) wurde die Apoptose durch 2 µM Staurosporin induziert. Nach ca. 4 Stunden führte sie zu einer kugelförmigen Zellgeometrie, die die Lichtstreuung deutlich ansteigen ließ und charak-

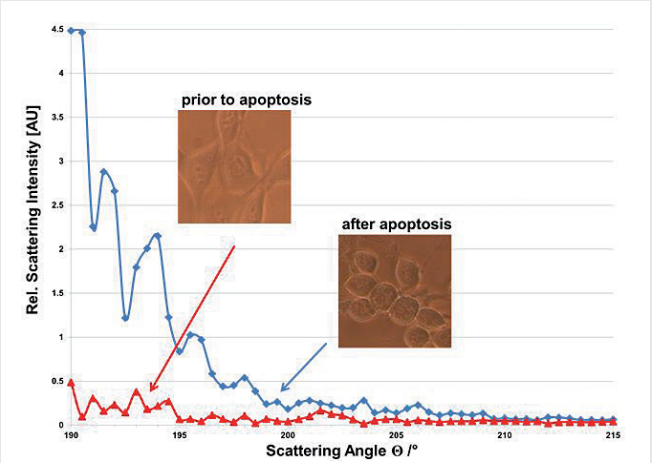

Abb. 2: Winkelabhängige Lichtstreuung vor und nach Inkubation eines Monolayers von 3T3 Fibroblasten mit Staurosporin; zugehörige Zellmorphologie (Plan Neofluar 40x/1.30 Öl; λex= 470 nm)

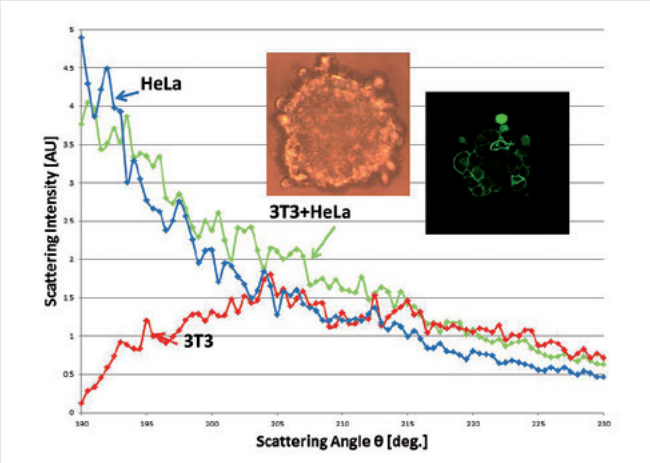

Abb. 3: Sphäroide von 3T3 Fibroblasten und HeLa 3B4 Zervixkarzinomzellen sowie von 3T3 mit infiltrierenden HeLa 3B4 Zellen. Winkelaufgelöste Lichtstreuung, Durchlichtmikroskopie und Laser-Scanning-Mikroskopie (Plan Neofluar 40x/1.3 Öl; λex = 470 nm; λdet ≥ 515 nm)

teristische Oszillationen in ihrer Winkelverteilung verursachte. Interessanterweise wurde dieses Verhalten nicht nur bei Zell-Monolayern (Abb. 2), sondern auch bei realitätsnahen größeren Zellsphäroiden von ca. 200 µm Durchmesser beobachtet und auf annähernd kugelförmige Streuer von ca. 20 µm Durchmesser (Einzelzellen) zurückgeführt.

konfokalen Systemen wesentlich. Zur Beschreibung der konfokalen Streulichtmessung unter Berücksichtigung der Welleneigenschaften des Lichts wurden die Berechnungen von der Monte-Carlo-Simulation auf die innerhalb der klassischen Physik exakte Maxwelltheorie ausgedehnt. Durch Implementierung einer fokussierten Einstrahlung und eine wesentliche

Beispielhaft wurden die Apoptose sowie das Einwachsen von Tumorzellen in Bindegewebe untersucht. Aussagekräftige Ergebnisse liefern neben Einzelzellen und kleinen Zellclustern in Monolayer-Kulturen auch größere Zellsphäroide, was eine Anwendung auf makroskopische Gewebeproben möglich erscheinen lässt.

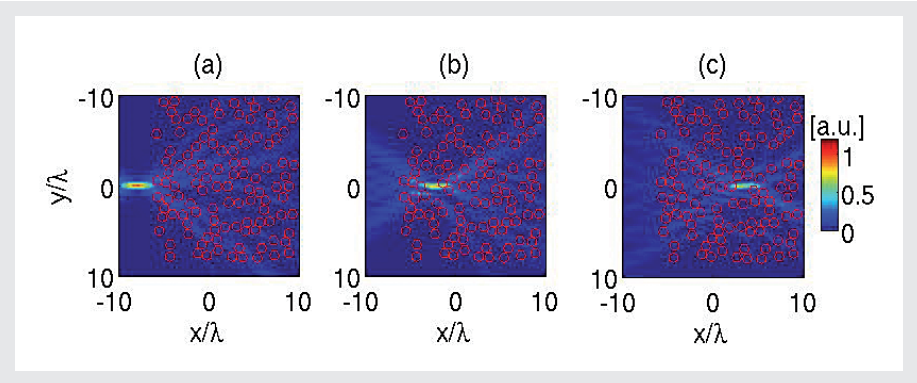

Abb. 4: Die normierte Intensität der Ez-Komponente des elektrischen Felds für axiales Scannen (x-Richtung) bei y = 0. Die Normierung ist bezogen auf die maximale Intensität des einfallenden, nicht gestreuten Strahls, siehe (a). Die Streuer sind zufällig angeordnete Zylinder mit einem Brechungsindex von 1,45, während das umgebende Medium einen Brechungsindex von 1,33 hat. Die Wellenlänge des einfallenden Lichts beträgt 1 µm. Die Ortsauflösung der FDTD-Simulation betrug ein Zwanzigstel der Wellenlänge

Als Beispiel für eine markierungsfreie Tumordetektion konnte das Eindringen von Krebszellen in ein Sphäroid-Modell von Fibroblasten über das veränderte Streulichtverhallten nachgewiesen und durch die charakteristische Fluoreszenz dieser Krebszellen (mit einem membranständigen fluoreszierenden Protein) visualisiert werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt, nähert sich das Streulichtverhalten des 3T3-Sphäroids nach Infiltration der HeLa 2E8 Tumorzellen dem der Tumorzellen an.

Zur theoretischen Beschreibung der Vielfachstreuung, die beispielsweise bei Messungen an den Sphäroiden auftritt, wird üblicherweise die Monte-Carlo-Methode verwendet, welche auch innerhalb des Projekts eingesetzt und u.a. in Richtung Polarisationsabhängigkeit erweitert wurde. Für die In-vivo-Diagnose von oberflächennahen Gewebeveränderungen mittels Streulichtmessungen sind theoretische Untersuchungen zur Lichtausbreitung in

Erhöhung der numerischen Effizienz konnten die Maxwellgleichungen für die fokussierte Beleuchtung eines streuenden Mediums mit der FDTD-Simulation exakt gelöst werden. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Berechnung der Nahfelder eines fokussierten Strahls, der in verschiedene Tiefen des streuenden Mediums fokussiert wurde. Winkelaufgelöste Messungen der Lichtstreuung bieten gemeinsam mit etablierten Methoden der Mikroskopie wie Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie, Laser-Scanning- und Lichtscheibenmikroskopie erweiterte Möglichkeiten zur markierungsfreien Diagnostik von Zellen und Gewebe. Die Arbeiten innerhalb dieses Projekts haben gezeigt, dass die Streulichtmikroskopie eine sehr sensitive Methode mit einer prinzipiellen Auflösung im Nanometerbereich darstellt. Die Interpretation der Ergebnisse erfordert jedoch systematische Berechnungen auf Basis der Maxwellgleichungen.

Kontakt:

Prof. Dr. Herbert Schneckenburger

Institut für Angewandte Forschung
Hochschule Aalen

Beethovenstr. 1
73430 Aalen
Germany

Tel. 07361 5763401

herbert.schneckenburger@htw-aalen.de

Prof. Alwin Kienle

Institut für Laseranwendungen in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm
Helmholtzstr.12
89081 Ulm

Tel. 0731 1429224

alwin.kienle@ilm.uni-ulm.de