



Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

Tiefenaufgelöste Fluoreszenzdetektion
für die medizinische Diagnostik

Tiefenaufgelöste Fluoreszenzdetektion für die medizinische Diagnostik

Die In-vivo-Diagnostik von Krebsgewebe spielt eine zunehmend wichtigere Rolle in der Medizintechnik. In der nicht-invasiven Erkennung von Hautkrebs ist beispielsweise eine der großen Herausforderungen die starke Streuung von Haut und Gewebe. Dies erschwert bildgebende Verfahren, da die direkte Information enthaltenden Signale mitunter sehr gering sind und das Nutzsignal von einem starken Hintergrund aus gestreutem Licht überlagert ist. Zusätzlich zur bildgebenden Detektion von Signalen im Innern eines streuenden Volumens, ist für diagnostische Aufgaben auch das Erfassen dreidimensionaler Informationen wichtig. Konventionelle bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel die optische Kohärenztomografie (OCT), finden Anwendung in Medien mit ausreichendem Brechungsindexunterschied zwischen den zu untersuchenden Strukturen. Dieses Verfahren stößt jedoch bei kleinen Brechungsindexunterschieden an seine Grenzen.

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gezielte Anfärbung bestimmter Gewebearten und die Separation von Anregungs- und Nutzlicht durch Bandpassfilter. So kann selbst in Bereichen, in denen kein Brechungsindexunterschied besteht, wo es jedoch möglich ist Fluorophore selektiv einzulagern, trotzdem ein dreidimensionales Signal gewonnen werden. Da die Fluorophore Lichtquellen darstellen, lassen sich ihre Signale auch als physiologische Marker nutzen.

Ziel dieses durch die Baden-Württemberg Stiftung finanzierten Projektes ist es, die Vorteile von Fluoreszenzmikroskopie und interferometrischer Tiefendetektion zu kombinieren. Damit sollen Fluoreszenzsignale in streuenden Medien bei Eindringtiefen im Bereich von mehreren hundert Mikrometern mit lateraler und axialer Auflösung im Mikrometerbereich detektiert wer-

den. Die zwei zentralen Bestandteile sind:

- Eine strukturierte Beleuchtung ermöglicht die lokal diskriminierende Anregung von Fluoreszenz.
- Die Phase des lokal angeregten Fluoreszenzlichts wird durch ein Shearing-Interferometer ausgewertet. Durch die Selbstreferenz ist dieses Verfahren insbesondere auch auf kurzkohärente Wellenzüge anwendbar.

Abbildung 1 zeigt den Aufbau mit einem Sagnac-Interferometer als Beleuchtungseinheit und einem Michelson-Interferometer zur Realisierung der tiefenaufgelösten Detektion. Die Beleuchtung schränkt den Anregungsbereich für Fluoreszenz auf ein kleines

Volumen ein. In der Detektionseinheit dient eine lateral verschobene Kopie der Objektwelle als Referenz. Für die Rekonstruktion der Wellenfront werden Methoden aus der Interferometrie eingesetzt. Aus mehreren phasenverschobenen Intensitätsbildern erhält man pixelweise die Phaseninformation. Ein Polynom-Fit erlaubt es, auf die Krümmung der Wellenfront zurückzuschließen. Die Krümmung dieser Wellenfront kann dann in den Abstand des emittierenden Fluorophors zum Fokus des Mikroskopobjektivs umgerechnet werden. Abbildung 2 zeigt die Rohsignale für ein fluoreszierendes Partikel in verschiedenen Abständen zum Fokus. Deutlich erkennbar ist die Abnahme der Streifenendichte mit zunehmender Tiefe.

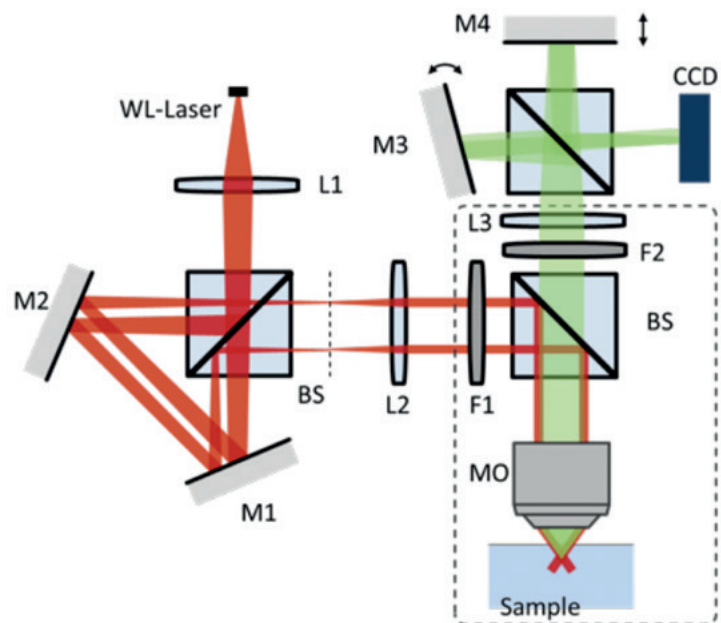


Abb. 1: Aufbau schematisch mit Beleuchtungs-Strahlengang (rot) und Detektions-Strahlengang (grün)

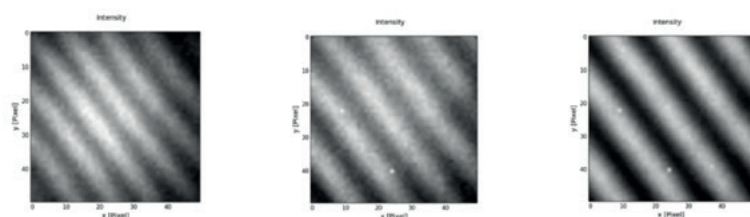


Abb. 2: Intensitätssignal von fluoreszierendem Partikel in streuendem Phantom in Abständen zum Fokus von 160 μm (links), 225 μm (Mitte) und 300 μm (rechts)

In diesem Projekt wurde die Funktionsfähigkeit des vorgeschlagenen Aufbaus zur tiefenaufgelösten Fluoreszenzdetektion nachgewiesen. Mit Eindringtiefen im Bereich von mehreren 100 Mikrometern für Materialien mit Streukoeffizienten von 2/mm und einer axialen Auflösung im Mikrometerbereich erreicht man ähnliche Parameter wie bei kommerziell erhältlichen OCT-Systemen. Allerdings ist zu bemerken, dass bei dem im Rahmen des Projekts realisierten Demonstrator-Aufbaus Potential für die Erhöhung von Auflösung und Reichweite besteht: Darunter fallen die Erhöhung der Leistung der Lichtquelle für technische Proben oder die Erhöhung der Volumenkonzentration von Fluorophoren.

Potentielle Anwendungen für das vorgestellte Verfahren liegen hauptsächlich im Bereich der medizinischen Diagnostik, wie zum Beispiel der Tumordiagnostik. Gegenüber der OCT können auch die Vorteile der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ausgenutzt werden, nämlich die höhere Selektivität und die gezielte Einfärbung bestimmter Gewebearten. Selbst wenn kein Brechungsindexunterschied vorliegt, können strukturelle Informationen bei unterschiedlichen Fluorophoranreicherungen gewonnen werden. Ein zusätzlicher Vorteil ist die vollflächige Detektion bei der hier vorgestellten Methode.

Das Verfahren ist nicht auf biologische Proben beschränkt. Mögliche technische Anwendungen, bei denen der Ursprung eines Signals in einem streuenden Medium detektiert werden muss, sind die Detektion von Fehlstellen in Werkstoffen, soweit in diese gezielt Fluoreszenzfarbstoff platziert werden können, oder die Messungen von Deformationen in Polymeren. Auch bei Beschichtungsverfahren könnte das Verfahren zur Kontrolle von Schicht-

dicken oder Detektion von möglichen Inhomogenitäten benutzt werden.

Im Rahmen der Simulationen wurde ein Verfahren entwickelt, das die Lösung der Maxwellgleichungen mit der Strahlungstransporttheorie kombiniert.

Für die Lichtausbreitung in zwei bzw. drei Dimensionen wurden analytische Lösungsverfahren der Maxwelltheorie für die fokussierte Einstrahlung erweitert und weiterentwickelt. Beliebige Einstrahlprofile ließen sich über die hierfür speziell angepasste Angular-Spectrum-of-Plane Waves-Methode modellieren.

Mithilfe einer weiteren Methode, die auf der Kombination dieses auf den Maxwellgleichungen basierenden Verfahrens mit der Monte-Carlo-Methode basiert, wurde herausgefunden, dass selbst bei einer Fokustiefe von 500 μm noch ein klarer Fokus sichtbar ist. Es wurde eruiert, dass sowohl der Fokus des eingestrahlten Lichts als auch das durch die Shearing-Methode entstehende Interferenzmuster an der Oberfläche der Probe insensitive für Einstrahlwinkel im Bereich zwischen 10° und 20° ist, was eine große Flexibilität bei der Wahl des Einstrahlwinkels im Experiment ermöglicht und die Robustheit der Methode gewährleistet.

Wie erwartet ergaben die Simulationen, dass die Abstände zwischen den Interferenzstreifen mit zunehmender Tiefe des Fluorophors im Gewebe zunehmen. Eine Berechnung des Kontrasts ergab, dass dieser bei größeren Inklusionstiefen größer wurde, was für die Shearing-Methode hilfreich ist. Dieser Effekt wurde auch experimentell untersucht und beobachtet. Durch die durch Vergleich von Experiment und Simulation mögliche Entwicklung eines Maßes für die zu erwartende Qualität der Ergebnisse des Shearing-Ver-

fahrens können so auch ohne die Anfertigung von Phantomen Optimierungsmöglichkeiten des Shearing-Verfahrens durch Simulationen untersucht werden.

Das im Rahmen dieses Projekts entwickelte Verfahren zur Herstellung von Phantomen mit exakt definierten optischen Eigenschaften ermöglicht es, Optimierungen des Shearing-Verfahrens unter reproduzierbaren Randbedingungen experimentell zu validieren und weiterzuentwickeln.

Die Phantome wurden aus dem Matrixmaterial Epoxidharz hergestellt und optisch exakt charakterisiert. Zugaben von mineralischen oder organischen Substanzen beeinflussen die optischen Eigenschaften. Das Matrixmaterial definiert den Brechungsindex und die Untergrenze des Absorptionskoeffizienten. Es wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers experimentell gezeigt, dass die intrinsische Fluoreszenz für Wellenlängen oberhalb von 450 nm vernachlässigt werden kann. Mit demselben Aufbau wurde die Fluoreszenzemission von Rhodamin, das im Epoxidharz gelöst ist, in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge gemessen, um zu ermitteln, für welche Wellenlängen Phantome auf dieser Basis optimal fluoreszieren.

Außerdem wurde durch Messung und Auswertung der orts-, ortsfrequenz- und zeitaufgelösten Reflektanz der effektive Streukoeffizient bestimmt. Der Streukoeffizient konnte aus der Messung der kollimierten Transmission berechnet werden. Diese wurde in einem speziell dafür ausgerichteten Aufbau gemessen.

Eines der hergestellten Phantome ist homogen streuend und besitzt eine um 3° zur Oberfläche verkippte 200 μm dicke Schicht, in die Rhodamin

gelöst wurde, sodass nur dort Fluoreszenz auftritt. Durch laterales Verschieben des Phantoms unter der Mikroskopoptik kann so die Tiefe variiert werden. Um härtere Grenzen zwischen Fluoreszenzbereichen und nichtfluoreszierenden Bereichen zu haben, wurde ein weiteres Phantom hergestellt, dem Pulver eines zuvor produzierten fluoreszierenden Phantoms beigemischt wurde.

Prinzipiell ermöglicht das innerhalb des Projekts entwickelte Verfahren eine dreidimensionale Darstellung der Fluoreszenzverteilung in technischen und biologischen Materialien. Anwendungsbeispiele für erstere sind die Detektion von Fehlstellen und Inhomogenitäten in Werkstoffen bei Verwendung von Fluoreszenzmarkern, für letztere die medizinische Tumordiagnostik sowohl durch Messung der Auto- als auch der Xenofluoreszenz. Hocharaufgelöste Messungen in der Tiefe sind im Wesentlichen durch die Streuung von biologischen bzw. anderen trüben Medien begrenzt. Weiterentwicklungen des Verfahrens zielen insbesondere darauf, die selektive Detektion des ungestreuten und damit direkt bildgebenden Fluoreszenzlichts zu erhöhen.

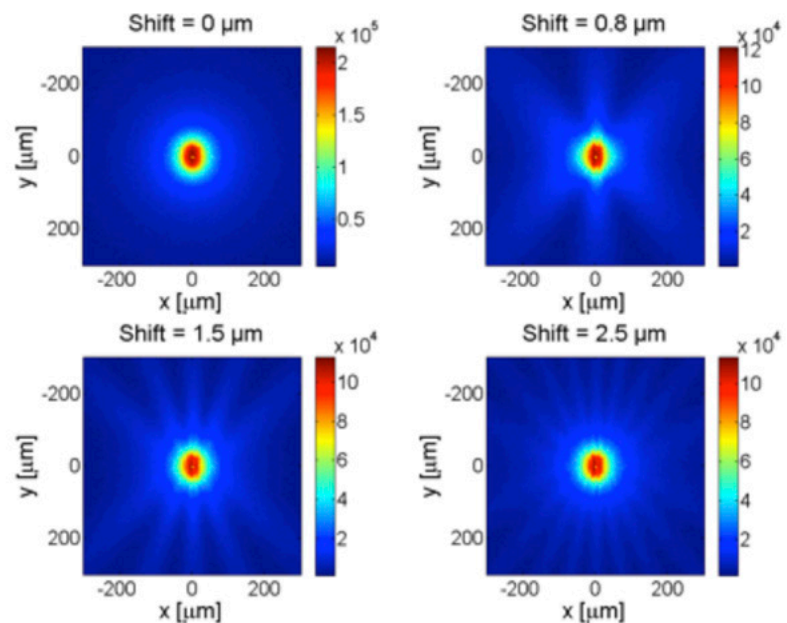


Abb. 3: Interferenzmuster (Intensität) an der Oberfläche der Probe für verschiedene Shifts. Die Fokustiefe beträgt 100 μm, der Einstrahlwinkel 20°

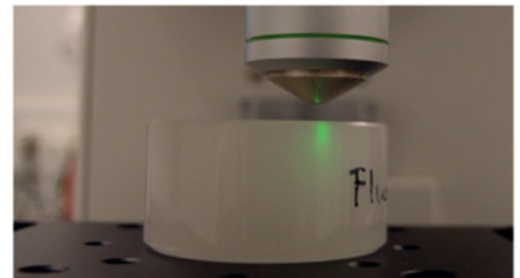
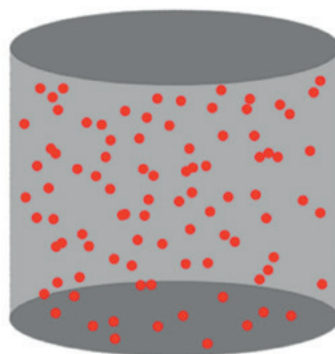


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur des Phantoms mit Fluoreszenz-Inklusionen. Die roten Punkte repräsentieren die fluoreszierenden Inklusionen mit scharfen Grenzen, sind jedoch in ihrer einzelnen Größe extrem überhöht und ebenso in der Anzahl reduziert [Schindler et al., 2016]

Prof. Dr. Wolfgang Osten
Universität Stuttgart
ITO - Institut für Technische Optik
Pfaffenwaldring 9
70569 Stuttgart

Tel. +49 711 685-66074
www.ito.uni-stuttgart.de

Prof. Dr. Alwin Kienle
Institut für Lasertechnologien
in der Medizin und Meßtechnik
an der Universität Ulm
Helmholtzstr. 12
89081 Ulm

Tel. +49 731 1429-100
www.ilm-ulm.de