

**INAUGURAL -DISSERTATION**  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Stefan Karl Fischer  
aus Freiburg

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1996

**Entwicklung eines  
konfokalen Laserscanning-Mikroskops  
zum Einsatz in der  
stereotaktischen Laser-Neurochirurgie**

Gutachter: Prof. Dr. Josef F. Bille  
Prof. Dr. Wolfgang Schlegel

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein konfokales Laserscanning-Mikroskop entwickelt, das der Überwachung einer stereotaktischen Operation mit einer Lasersonde dient. Es werden die Konstruktionsvorgaben und die Folgerungen für das Design des Mikroskops diskutiert und der realisierte Aufbau vorgestellt.

Speziell entwickelt wurde sowohl die Optik, als auch die Elektronik und Mechanik des Mikroskops. Die zur Steuerung des Mikroskops programmierte Software hat neben der Bildaufnahme und -darstellung auch die Aufgabe, die Bewegungen der gesamten Sonde zu steuern und mit dem Mikroskop zu koordinieren. Messungen an Testobjekten zeigen die Funktion des Bildaufbaus während der Sondenbewegungen, und in ersten Tierexperimenten wurde gezeigt, daß die Auflösung des Mikroskops ausreicht, Blutgefäße mit relevanten Dimensionen darzustellen. Allerdings zeigte sich, daß der Blutgefäßkontrast noch zu gering ist, um einfach und sicher Gefäße auch eingebettet in Hirngewebe zu erkennen. Hierzu müssen kontraststeigernde Verfahren wie Mehrfarben-Differenzbilder oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

Neben der Erprobung des Mikroskops wurde im Tierexperiment auch der Einfluß der Sondenbewegungen und der Spülung getestet.

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                 | <b>4</b>  |
| 1.1      | Das menschliche Gehirn . . . . .                  | 6         |
| 1.2      | Raumfordernde Prozesse im Gehirn . . . . .        | 8         |
| 1.3      | Aktuelle Methoden der Tumorbehandlung . . . . .   | 8         |
| 1.4      | Stereotaktische Laser-Neurochirurgie . . . . .    | 9         |
| 1.5      | Möglichkeiten der Operationsüberwachung . . . . . | 11        |
| <b>2</b> | <b>Stereotaktische Laser-Neurochirurgie</b>       | <b>14</b> |
| 2.1      | Stereotaxie . . . . .                             | 15        |
| 2.2      | Lasergewebewechselwirkungen . . . . .             | 18        |
| 2.3      | Pikosekunden-Lasersystem . . . . .                | 21        |
| 2.4      | Stereotaktische Lasersonde . . . . .              | 23        |
| <b>3</b> | <b>Konfokales Laserscanning-Mikroskop</b>         | <b>26</b> |
| 3.1      | Scanner . . . . .                                 | 26        |
| 3.2      | Definition von Scan und Strahl . . . . .          | 27        |
| 3.2.1    | Abbildung des Scans . . . . .                     | 27        |
| 3.2.2    | Abbildung des Strahls . . . . .                   | 29        |
| 3.3      | Konfokale Detektion . . . . .                     | 30        |
| 3.3.1    | Tiefendiskriminierung . . . . .                   | 31        |
| <b>4</b> | <b>Aufbau des verwendeten Mikroskops</b>          | <b>34</b> |
| 4.1      | Geometrische Anforderungen . . . . .              | 34        |
| 4.2      | Optischer Aufbau . . . . .                        | 36        |
| 4.2.1    | Auswahl der optischen Elemente . . . . .          | 37        |
| 4.2.2    | Scanfeldgröße . . . . .                           | 39        |
| 4.2.3    | Fokus in der Pinholeebene . . . . .               | 40        |
| 4.3      | Mechanischer Aufbau des Mikroskops . . . . .      | 41        |
| 4.4      | Elektronik . . . . .                              | 42        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.4.1    | Steuerung des Mikroskops . . . . .                               | 42        |
| 4.4.2    | Lichtquelle . . . . .  | 43        |
| 4.4.3    | Signalaufbereitung . . . . .                                     | 44        |
| 4.4.4    | Auswertung mit intelligenter AD-Karte und PC . . . . .           | 46        |
| 4.4.5    | Schrittmotoransteuerung . . . . .                                | 47        |
| 4.5      | Programm zur Steuerung, Bildgewinnung und -darstellung . . . . . | 48        |
| 4.5.1    | Steuerung der Sondenbewegung . . . . .                           | 48        |
| 4.5.2    | Bildaufnahme . . . . .   | 50        |
| 4.5.3    | Bilddarstellung . . . . .  | 52        |
| <b>5</b> | <b>Messungen</b>   | <b>54</b> |
| 5.1      | Vermessung der Apparatur . . . . .                               | 54        |
| 5.1.1    | Fokussmessung . . . . .  | 54        |
| 5.1.2    | Testmessungen . . . . .  | 55        |
| <b>6</b> | <b>in-vivo-Messungen</b>   | <b>57</b> |
| 6.1      | Experimente an Ratten . . . . .                                  | 57        |
| 6.1.1    | Tierversuche in Köln . . . . .                                   | 57        |
| 6.1.2    | Laserablation und histologische Bewertung . . . . .              | 59        |
| 6.1.3    | Bildaufnahme . . . . .   | 60        |
| 6.2      | Experimente an größeren Tieren . . . . .                         | 61        |
| 6.2.1    | Sterilisierbarkeit . . . . .                                     | 64        |
| 6.2.2    | Positionierung der Lasersonde . . . . .                          | 65        |
| 6.2.3    | Durchführung der Experimente . . . . .                           | 66        |
| 6.2.4    | Histologie . . . . .   | 67        |
| 6.2.5    | Bildaufnahme . . . . .   | 68        |
| <b>7</b> | <b>Diskussion und Ausblick</b>                                   | <b>73</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                      | <b>78</b> |

# Kapitel 1

## Einleitung

Die minimalinvasive Medizin hat das Ziel, mit miniaturisierten Instrumenten durch möglichst kleine Körperöffnungen tief im Körperinnern zu operieren. Man benutzt bei dieser Technik endoskopische Systeme, um dem Arzt eine Orientierung im Operationsgebiet zur Verfügung zu stellen, auf das er keine direkte Sicht hat. Da die Instrumente in der Neurochirurgie sehr dünn sein müssen, so daß man keine konventionellen Videoendoskope einsetzen kann, hat die Endoskopie in dieser Disziplin bislang noch keine große Bedeutung erlangt. In der Regel wird bei einer neurochirurgischen Operation deshalb der Schädel großflächig eröffnet und das Operationsfeld mit Retraktoren und Dilatatoren freigelegt. Auf diese Weise hat der Arzt zwar freie Sicht; das Vorgehen ist allerdings trotz Einsatz modernster mikrochirurgischer Instrumente nicht unbedingt als minimalinvasiv zu bezeichnen. Ein großes Problem bei dieser *offenen Neurochirurgie* ist darüberhinaus, daß die mittlerweile gut auflösenden tomographischen Verfahren nicht besonders gut in solche Operationen miteinbezogen werden können.

Eine Alternative zur unmittelbaren optischen Information bietet die Methode der Stereotaxie [Lek51, SPS<sup>+</sup>83], bei der über bildgebende Verfahren und darin definierte, fest mit dem Patienten verbundene Koordinatensysteme eine sehr präzise Orientierung geschaffen wird. Beispielsweise werden immer häufiger dünne Biopsienadeln auf zuvor bestimmten Zugangswegen tief in das Gehirn geführt, um kleine Gewebeproben aus Arealen, die in Computer- oder Kernspintomographieaufnahmen aufgefallen waren, zu entnehmen und zu untersuchen. Zur Planung und Verifikation der entsprechenden Zugangskanäle kommen aufwendige Computerprogramme zur Analyse der tomographischen Daten und Berechnung der benötigten Koordinaten zum Einsatz [SSS<sup>+</sup>81]. In Verbindung mit der Strahlentherapie wird die Stereotaxie auch zur Behandlung von Hirntumoren und funktionellen Störungen eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer neuartigen Operationstechnik, bei der über eine stereotaktische Sonde ein Pikosekundenlaser zur Abtragung von malignem

Gewebe in das Gehirn geführt wird. Das größte Risiko bei diesem Eingriff stellen Blutungen dar, die durch das Öffnen von Blutgefäßen bei der Laserablation verursacht werden. Zur Überwachung der Operation wurde ein konfokales Laserscanning-Mikroskop entwickelt und in die Lasersonde integriert. Das Mikroskop stellt einen neuen Ansatz dar, die stereotaktische Methode mit einer intraoperativen Informationsquelle zu ergänzen.

Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß aufgrund verbesserter technischer Möglichkeiten im Bereich der Mikrosystemtechnik und Mikrooptik andere Gruppen derzeit Ansätze zur Benutzung von lichtleiterbasierten Videoendoskopen verfolgen [GWD<sup>+</sup>96]. Solche Systeme lassen sich mit dem oben genannten Operationskonzept nicht verbinden.

In Kapitel 2 wird nach einer Einführung in die Stereotaxie zunächst dieses Operationskonzept vorgestellt. Ein kurzer Abschnitt charakterisiert dabei insbesondere das Pikosekunden-Lasersystem und dessen Ablations- und Schädigungseigenschaften. Den Schwerpunkt des Kapitels bilden dann die Beschreibung, der Aufbau und das Funktionsprinzip der Lasersonde sowie der damit verbundenen Systemkomponenten.

Das folgende Kapitel 3 beschäftigt sich mit den Grundlagen der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie. Hierbei werden in den ersten Abschnitten Technik und Theorie des optischen Scannings und im dritten Abschnitt Besonderheiten der konfokalen Detektion diskutiert.

Danach wird der Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mikroskops erläutert. Kapitel 4 geht zunächst auf die Anforderungen und Randbedingungen des Mikroskops ein, um im weiteren die sich daraus ergebenden Konsequenzen für das Design der Optik, der Mechanik und der Elektronik des Mikroskops aufzuzeigen. Am Ende des Kapitels wird das Programm vorgestellt, das die Hardwarekomponenten untereinander und mit dem Benutzer verbindet.

Kapitel 5 leitet mit Testmessungen und exemplarischen Aufnahmen, die einige Charakteristika des konfokalen Laserscanning-Mikroskops hervorheben, den experimentellen Teil ein. Die optischen Kenndaten des Mikroskops werden hier dargestellt.

Das abschließende Kapitel 6 behandelt dann die Ergebnisse, die in Tierversuchen an Ratten und Hunden in zwei klinischen Meßkampagnen in Köln bzw. in Leuven/Belgien gewonnen wurden. Zum Verständnis der experimentellen Begebenheiten werden dabei zunächst etwas ausführlicher die unterschiedlichen Operationsszenarien beschrieben. In den Experimenten wurden erstmals Gewebestrukturen detektiert, die Blutgefäße enthielten; aufgrund der Größenunterschiede der Gehirne wurden bei den Ratten oberflächliche Schichten bevorzugt, während bei den Hunden tiefliegende Areale betrachtet wurden. Anhand von ausgewählten Beispielaufnahmen werden nicht nur ein erster Ein-

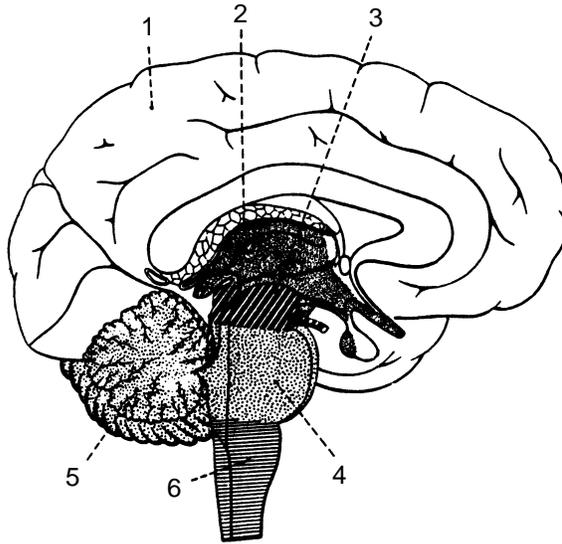


Abbildung 1.1: Aufbau des menschlichen Gehirns [Sch89]:

- |              |                           |
|--------------|---------------------------|
| 1 Großhirn   | 2 Zwischenhirn            |
| 3 Mittelhirn | 4 Brücke                  |
| 5 Kleinhirn  | 6 Verlängertes Rückenmark |

druck der erzielten Bildqualität vermittelt, sondern darüberhinaus bei der Aquisition auftretende Probleme untersucht.

## 1.1 Das menschliche Gehirn

Bei der Entwicklung von technischen Hilfsmitteln für die Neurochirurgie müssen einige Grundlagen des Gehirns berücksichtigt werden, die im folgenden kurz angedeutet werden sollen. In Abbildung 1.1 ist ein sagittaler Schnitt durch das menschliche Gehirn dargestellt. Durch die Trennung der Aufgaben der unterschiedlichen Bereiche ist eine anatomisch sichtbare Gliederung vorgegeben.

Den größten Teil nimmt das Großhirn ein. Seine besonders hervortretende Bedeutung unterscheidet das menschliche Gehirn von dem der Tiere. Die beiden Hemisphären des Großhirns umschließen den größten Teil des gesamten Gehirns und sind durch zahlreiche, bei allen Menschen ähnlich angeordnete Furchen und Windungen strukturiert. In einem aufgeschnittenen Gehirn erkennt man entlang der oberflächlichen Konturen einen etwa 0.5 cm breiten Bereich grauer Substanz, die sogenannte Hirnrinde. Weiterhin finden sich im Innern ebenfalls grau gefärbte Kerne in das ansonsten weiße Marklager eingebettet. Die graue Färbung wird dabei durch eine große Zahl von Nervenzellen verursacht, während die weiße Färbung des Marklagers durch eine Anhäufung von Nervenfasern bestimmt wird. Das Großhirn beherbergt die Funktionen des bewussten Handelns, des Denkens und weiterer wichtiger Funktionen, die den Menschen über das Tier stellen. Vielen Bezirken kann man relativ zuverlässig eindeutige Funktionen zuordnen. Die rechte und linke Hirnhälfte sind dabei nicht völlig identisch; beispielsweise

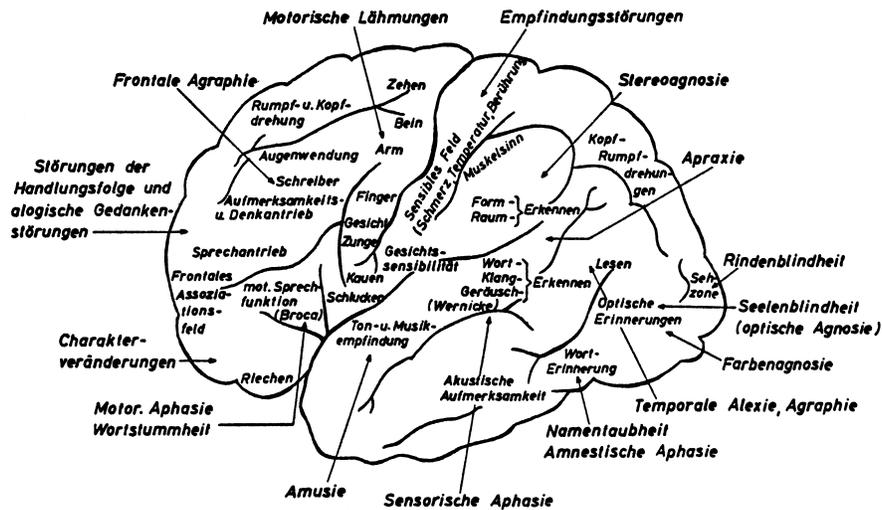


Abbildung 1.2: Funktionelle Einteilung der Großhirnrinde und entsprechende Ausfallerscheinungen [Sch89]

ist bei Rechtshändern in der Regel die linke Großhirnhemisphäre dominant. Andererseits sind unabhängig von der Händigkeit die für das Sprechen und Sprachverständnis zuständigen funktionellen Zentren fast regelmäßig in der linken Hemisphäre lokalisiert. Einen Überblick über die Funktionen, ihre Lage und die mit einer Störung der Areale verbundenen Ausfallerscheinungen zeigt Abbildung 1.2.

Das in der hinteren Schädelgrube liegende, blumenkohlartige Kleinhirn ist ebenso wie das Großhirn in zwei Hemisphären unterteilt und enthält in der Mitte den Kleinhirnwurm. Auch das Kleinhirn weist zahlreiche Windungen und Furchen auf. Seine Hauptaufgabe liegt in der Koordination sämtlicher Bewegungen sowie der Aufrechterhaltung der normalen Körperstellung.

Die weiteren in Abbildung 1.1 bezeichneten Hirnteile sind das Zwischenhirn, das Mittelhirn, die Brücke und das verlängerte Rückenmark. Diese Teile werden häufig gemeinsam als Stammhirn bezeichnet, dem entsprechend die Steuerung aller unbewussten Regulationsabläufe unterliegt. Während im Zwischenhirn die vegetativen Zentren zur Steuerung aller wichtigen Stoffwechselvorgänge liegen und das Mittelhirn Erregungen aus allen wichtigen Sinnessystemen erhält, dienen Brücke und verlängertes Rückenmark als Übergang zum Rückenmark.

Das gesamte Gehirn ist von einem Flüssigkeitspolster, dem Liquor, umgeben. Er wird in vier verschiedenen Ventrikeln im Gehirn in einer täglichen Menge von 120 bis 180 ml produziert. Seine bedeutendsten Aufgaben sind der Volumenausgleich und die Stoßdämpfung des Gehirns.

## 1.2 Raumfordernde Prozesse im Gehirn

Werden Tumoren nicht zufällig entdeckt, so manifestieren sie sich zuerst durch häufige Kopfschmerzen bis hin zu Funktionsausfällen, weiterhin ist die Erhöhung des Hirndruckes festzustellen. Verantwortlich für diese Erscheinungen ist die Verdrängung von Hirngewebe durch die Ausbreitung des Tumors. Im Körperstamm zeichnen sich gutartige oder benigne Tumoren dadurch aus, daß sie langsam und abgegrenzt wachsen. Wuchernde und schnell wachsende Tumoren, die das umgebende Gewebe infiltrieren und Metastasen bilden, bezeichnet man als bösartig oder malign. Im Gehirn ist diese Einteilung nicht angebracht; hier sind eigentlich alle Tumoren bösartig, denn sie beanspruchen Platz im Innern der Schädelkalotte und führen so zwangsläufig zur Schädigung des umliegenden Hirngewebes. Die Weltgesundheitsorganisation unterscheidet deshalb bei intrakraniellen Tumoren vier Malignitätsgrade, die sich nach dem histologischen Aufbau der Geschwülste richten und nach der postoperativen Überlebenschance abgestuft sind. Die Bezeichnung der Tumoren und auch diese Klassifikation richten sich im wesentlichen danach, von welchem Gewebe das Tumorwachstum herrührt. Die genaue Unterscheidung der aus der großen Vielzahl von Zellen und Geweben innerhalb des Schädels hervorgehenden Tumoren soll hier nicht dargestellt werden, wichtig ist nur, daß, wegen der Vielzahl der möglichen Ursprungszellen, Tumoren nahezu überall im Gehirn auftreten und fast beliebige Geometrien annehmen können.

Ein weiterer raumfordernder Prozeß sind Nekrosen. Sie bestehen aus abgestorbenem Gewebe und können unter anderem nach Schlaganfällen oder radiologischer Behandlung größerer Tumoren auftreten. Je nach Lokalisation und Ausmaß der Nekrose kann es zu einer Vernarbung oder einer Pseudozyste kommen. Durch Zellgifte, die sich bei der Zersetzung der toten Zellen bilden, können angrenzende gesunde Zellen ebenfalls getötet werden, so daß sich die Nekrose weiter ausbreitet.

## 1.3 Aktuelle Methoden der Tumorbehandlung

Die wichtigste Form der Behandlung von Hirntumoren ist die radikale Entfernung. Aufgrund der sensiblen Umgebung ist diese Radikalität in der Neurochirurgie dabei weniger ausgeprägt als in anderen Bereichen der Onkologie. Das konventionelle Vorgehen in der „offenen Neurochirurgie“ schließt dabei das meist großflächige Eröffnen des Schädels und die Schaffung eines Zugangs zum Tumor mit ein. Mit modernsten mikrochirurgischen Instrumenten können insbesondere massive Tumoren in vielen Fällen vollständig herausgeschält werden. Der Nachteil dieser Methode, daß gesundes Gewebe verdrängt werden muß, ist bei großen und tiefliegenden Tumoren besonders schwerwie-

gend. Dennoch wird diese Resektion in allen möglichen Fällen vorgenommen, da nur sie zu einer Entfernung aller malignen Zellen führen kann.

Bei der Strahlentherapie dagegen bleiben die Tumorzellen im Körper. Das Ziel der Behandlung ist die maximale Schädigung dieser Zellen bei gleichzeitig maximaler Schonung des gesunden Gewebes. Diese Methode wird sehr häufig auch als adjuvante Therapie zur Mikrochirurgie verwendet, um nach einer Entfernung des Tumorkerns möglicherweise im Gewebesaum verbliebene Tumorzellen abzutöten. Eine moderne Ausprägung der Strahlentherapie ist die Konformationstherapie mit hochenergetischen Photonen [SSP<sup>+</sup>93], bei der Strahlen aus mehreren Richtungen im Zielvolumen überlagert werden, um eine lokale Dosisüberhöhung im Tumor zu erreichen. Der hervorstechendste Vorteil dieser Technik ist ihre Nicht-Invasivität; es ist kein mechanischer Eingriff in den Körper erforderlich.

Eine andere Form der Strahlentherapie ist die stereotaktische interstitielle Radiotherapie, bei der über eine dünne Nadel radioaktive Implantate unmittelbar im Tumor plaziert werden, um diesen von innen heraus zu zerstrahlen [RGS<sup>+</sup>87, VTS<sup>+</sup>93]. Diese Methode ist vor allem bei langsam wachsenden Tumoren von Bedeutung, da die Zellen der Strahlung über längere Zeit ausgesetzt sind und sie somit auch bei langen Zellzyklen wirksam wird. Ein Nachteil aller Techniken der Strahlentherapie ist das Verbleiben des abgetöteten Materials im Körperinnern, das über lange Zeit nach der Operation vom Körper selbst abgebaut werden muß. Bei größeren Tumoren können in Folge der Strahlenbehandlung Nekrosen entstehen, die entfernt werden müssen, da sie aufgrund ihrer das gesunde Gewebe angreifenden Zellgifte ähnlich wie Tumoren wachsen und andere Strukturen verdrängen können (vgl. Abschnitt 1.2).

Andere Behandlungsmethoden wie die Chemotherapie haben sich in der Neurochirurgie noch nicht durchgesetzt.

## 1.4 Stereotaktische Laser-Neurochirurgie

Die Grundidee der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie, die im folgenden vorgestellt werden soll, ist der perkutanen Strahlentherapie mit radioaktiven Präparaten verwandt, da auch hier der Tumor von innen heraus angegangen wird. Eine Übersicht der vorgeschlagenen Operationsmethode zeigt Abbildung 1.3.

Ausgangspunkt für die Entwicklung der Methode sind die schonenden Eigenschaften von Pikosekunden-Laserpulsen bei der Abtragung von neuronalem Gewebe [Fis95, SGF<sup>+</sup>96]. Der Ablationsprozeß beruht auf einer nicht-thermischen Wechselwirkung mit geringen mechanischen Nebenwirkungen und ist sehr gut lokalisiert. Entsprechend steht im Mittelpunkt des Operationssystems ein leistungsstarker Pikosekundenlaser [Göt96].

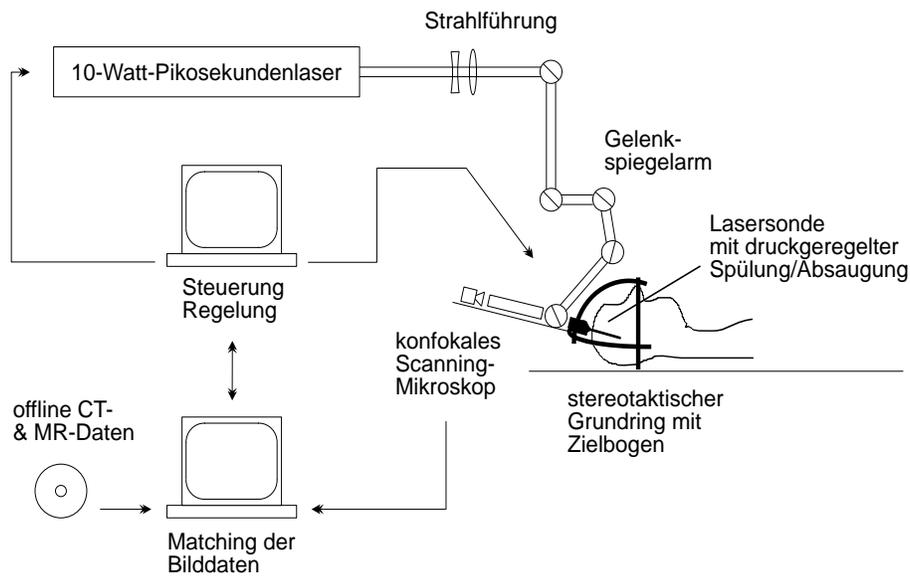


Abbildung 1.3: Übersicht der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie [Göt96]

Über einen Gelenkspiegelarm wird der Laserstrahl in eine speziell entwickelte Lasersonde eingekoppelt, die stereotaktisch in das Zielvolumen eingeführt werden kann. Eine präzise Planung des Eingriffs auf der Basis von unmittelbar vor der Operation aufgenommenen CT- und MR-Datensätzen ermöglicht die Wahl eines schonenden Zugangs in das Gehirn. Die Planung erfolgt in einem Koordinatensystem, das durch einen stabilen Grundring fest mit dem Schädel des Patienten verbunden ist. Über einen Zielbogen wird die Sonde in der bei der Planung berechneten Richtung in das Gehirn eingeführt.

Ist die Sonde im Ziel positioniert, wird der Fokus des Ablationslasers mit Hilfe der Freiheitsgrade der Sonde dreidimensional über den Tumor bewegt und dieser von innen heraus ablatiert. Um die optischen Elemente der Sondenspitze sauber und die Gewebeoberfläche feucht zu halten und um anfallende Gewebefragmente aus der Operationshöhle zu entfernen, wird während des Eingriffs durch die Sonde gespült und abgesaugt. Dabei wird mit einem integrierten Druckmesser der Druck überwacht und durch Zu- und Abfluß geregelt. Das zerstörte Gewebe verbleibt also nicht im Körper; es wird schon bei der Operation entfernt und kann daher nicht zu einer Nekrose führen.

Da eine solche Operation nicht unter Sicht des Chirurgen stattfindet, Gewebeverschiebungen aber durchaus auftreten können, wenn Tumorgewebe entfernt wird, muß eine Möglichkeit gegeben sein, eine intraoperative Überwachung des Operationsverlaufs durchzuführen. Diese Überwachung umfaßt weiterhin die Erkennung von großen und mittleren Blutgefäßen, deren Verletzung ohne vorherige Koagulation vermieden werden muß.

## 1.5 Möglichkeiten der Operationsüberwachung

Zur intraoperativen Überwachung kommen mehrere Verfahren in Betracht. Insbesondere ist der Einsatz der Ultraschallbildgebung zu nennen, da entsprechende Geräte vergleichsweise preiswert sind und in vielen Disziplinen routinemäßig eingesetzt werden. Zum Einsatz in der Neurochirurgie ist allerdings eine weitere Schädelöffnung nötig, um den Schallkopf zur besseren Schallkopplung auf die Hirnoberfläche aufsetzen zu können. Darüberhinaus kann die Bildorientierung relativ zu CT- und MR-Daten im festen Koordinatensystem Probleme bereiten, da der Schallkopf in der Regel in der Hand gehalten werden muß und nur eine Schnittebene darstellt. Es gibt auch Ansätze, Ultraschallsonden stereotaktisch zu positionieren, so daß die Bilder in einem festen Koordinatensystem absolut eingeordnet werden können [KLAO93]. Inzwischen werden auch dreidimensionale Ultraschallsonden kommerziell angeboten, mit denen erste Studien auch in der Neurochirurgie durchgeführt werden.

Weiterhin ist an den Einsatz von Kernspintomographen (MRT) zu denken, mit denen ebenfalls während der Operation Schnitte durch das Operationsgebiet dargestellt werden können. Besonders attraktiv erscheinen dabei offene Kernspintomographen, bei denen der Chirurg guten Zugang zum Patienten hat. Für den Einsatz in der Stereotaxie sind jedoch auch verschiedene Modelle geschlossener Geräte praktikabel, da diese Operationen nur wenige Eingriffe durch den Neurochirurgen erfordern. Nachteil der offenen Tomographen gegenüber geschlossenen Systeme ist die noch geringe Auflösung und der langsamere Bildaufbau. Eine Schwierigkeit bei allen Systemen bringt die Tatsache mit sich, daß elektrisch leitende und ferromagnetische Materialien die Bildaufnahme stören. Da die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Sonde im momentanen Entwicklungsgrad aus Edelstahl, Aluminium und Messing besteht und mit Schrittmotoren angetrieben wird, sind Störungen der MR-Bildaufnahme besonders im interessanten Bereich um die Sondenspitze zu erwarten, so daß mit dem Labormodell noch kein Einsatz unter MRT-Überwachung angestrebt wird.

Die Integration eines Endoskops in die Lasersonde ist eine weitere Möglichkeit, Informationen aus der Operationshöhle zu erhalten. Die optische Bildaufnahme liefert sehr gut aufgelöste Daten von der beleuchteten Gewebeoberfläche; echte dreidimensionale Volumenbilder kann man dagegen nicht erhalten. Immerhin läßt sich die optische Information aber in das stereotaktische Bezugssystem einordnen und auf diese Weise bezüglich der dreidimensionalen *off-line*-Daten orientieren. Ein stereotaktisch verwendetes Endoskop muß, soll es in die Lasersonde integrierbar sein, denselben optischen Kanal benutzen wie der Ablationslaser, und es darf keine weiteren optischen Elemente innerhalb dieses Kanals benötigen.

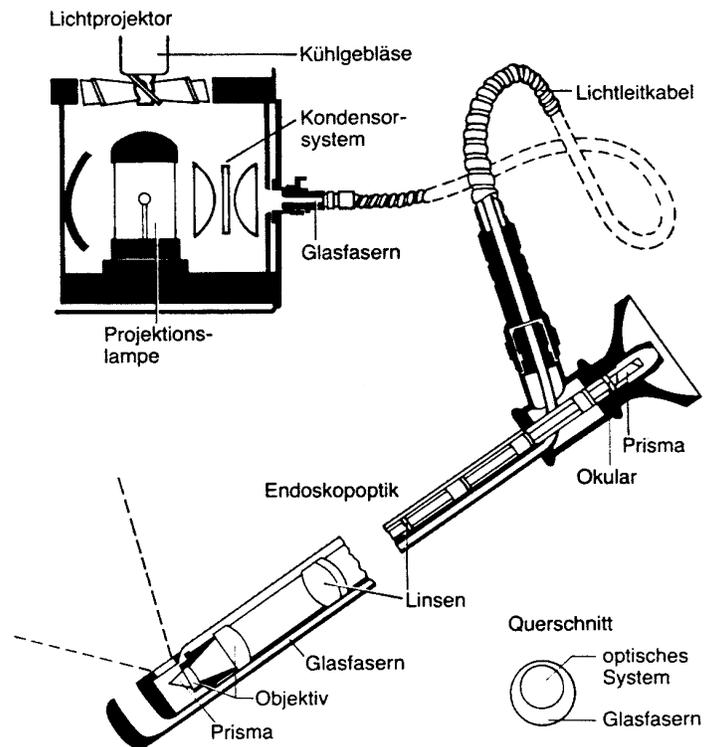


Abbildung 1.4: Prinzip eines starren Endoskops [HZ82]

Herkömmliche starre Endoskope, wie in Abbildung 1.4 zu sehen, benötigen im Tubus weitere Abbildungslinsen, die mit Distanzstücken fixiert sind. Da Reflexe an den optischen Komponenten des Endoskops ebenfalls in das Auge des Beobachters oder auf den CCD-Empfänger treffen würden, kann hier nicht durch den gleichen Strahlengang beleuchtet werden, und das Licht muß über einen weiteren Kanal zugeführt werden. Hierzu werden in der Regel Lichtleitfasern eingesetzt, mit denen der Raum um den Beobachtungskanal ausgenutzt werden kann. Durch die Beleuchtung mit weißem Licht und die Beobachtung mit dem Auge oder der Videokamera sieht der Arzt das Operationsgebiet in ähnlichen Farben wie in einer offenen Operation. Die Durchmesser solcher Endoskope liegen zwischen 5 bis 8 mm, für urologische Untersuchungen bei Kindern werden sogenannte Miniaturzystoskope eingesetzt, die noch kleinere Durchmesser von 3-4 mm besitzen.

Flexible Endoskope können noch schlechter eingesetzt werden, da hier der Bildkanal mit einem Glasfaserbündel ausgefüllt ist, durch den der Ablationsstrahl keinesfalls geleitet werden kann. Außerdem sind solche Endoskope aufgrund ihrer Flexibilität nicht einsetzbar.

Weitere Probleme verursacht für solche Endoskope die Rotation der Sondenspitze. Durch sie würde nicht nur der Ablationslaser auf der Gewebeoberfläche positioniert,

sondern auch das Bild des Endoskops, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, im Kreis gedreht und müßte mit Bildverarbeitungsalgorithmen in Echtzeit zurückgedreht werden, um dem Operateur ein lesbares Bild zur Verfügung zu stellen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß konventionelle Videoendoskope in Verbindung mit der vorgeschlagenen Operationsmethode nicht geeignet sind, da sie durch den vorhandenen optischen Kanal nicht geführt werden können, andererseits aber auch kein Raum für weitere Kanäle geschaffen werden kann, ohne den Sondendurchmesser unakzeptabel zu vergrößern.

Das in dieser Arbeit entwickelte konfokale Laserscanning-Mikroskop geht hier einen anderen Weg, indem es den optischen Kanal des Ablationslasers mitbenutzt. Mit einer konfokalen Detektion ist es möglich, Reflexe von den optischen Komponenten weitgehend zu unterdrücken. Das Prinzip und der Aufbau des Mikroskops sowie die Integration in die stereotaktische Lasersonde werden in den Kapiteln 3 bzw. 4 ausführlich dargestellt.

# Kapitel 2

## Stereotaktische Laser-Neurochirurgie

Die Entwicklung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops ist Bestandteil eines umfangreichen interdisziplinären Gesamtprojekts, an dem mehrere Arbeitsgruppen mit klinischer, technischer und grundlagenorientierter Ausrichtung beteiligt sind. Ziel dieser Kooperation ist die Realisierung eines laserbasierten stereotaktischen Operationssystems für Tumorbehandlungen, funktionelle Eingriffe und Ablationen und Absaugungen von nekrotischen Geweben.

Auf klinischer Seite arbeiten Mitarbeiter der Klinik für Stereotaxie und funktionelle Neurochirurgie der Universität zu Köln und des Laboratoriums für experimentelle Neurochirurgie und Neuroanatomie der Katholischen Universität Leuven (Belgien). Diese Arbeitsgruppen waren auch für die Vorbereitung und Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Tierversuche verantwortlich (siehe Kapitel 6). Darüber hinaus wurden von diesen Partnern die medizinischen Randbedingungen definiert, die experimentellen Zwischenergebnisse kritisch bewertet und die technische Funktionalität aus der medizinischen Praxis heraus beurteilt. Am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg werden interaktive Computerprogramme für die präzise Planung und Verifikation von stereotaktischen Operationen, insbesondere auch für Lasereingriffe [Dam96] entwickelt. Für die Druckregelung des Spül- und Absaugsystems der Sonde ist eine Ingenieursgruppe des Zentrums für Sensorsysteme und des Instituts für Regelungs- und Steuerungstechnik der Universität Siegen verantwortlich. Die Entwicklung des Nd:YLF-Lasers und der stereotaktischen Sonde wurde am Institut für Angewandte Physik durchgeführt, von wo aus das Projekt auch koordiniert wird.

Im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Demonstrationsprojekts werden zukünftig auch industrielle Kooperationspartner an der Umsetzung der Forschungsergebnisse mitarbeiten.

## 2.1 Stereotaxie

Grundprinzip der Stereotaxie, die eine wesentliche Rolle für die schonende Anwendung des Pikosekundenlasers im Gehirn spielt, ist die Festlegung von patientengebundenen Koordinaten und die präzise Führung von Strahlung und dünnen Instrumenten in diesem Koordinatensystem. Die Basis des Koordinatensystems bildet in der Regel ein fest mit dem Patientenschädel verschraubter Grundring (vgl. Abb. 2.1). An diesem Grund-

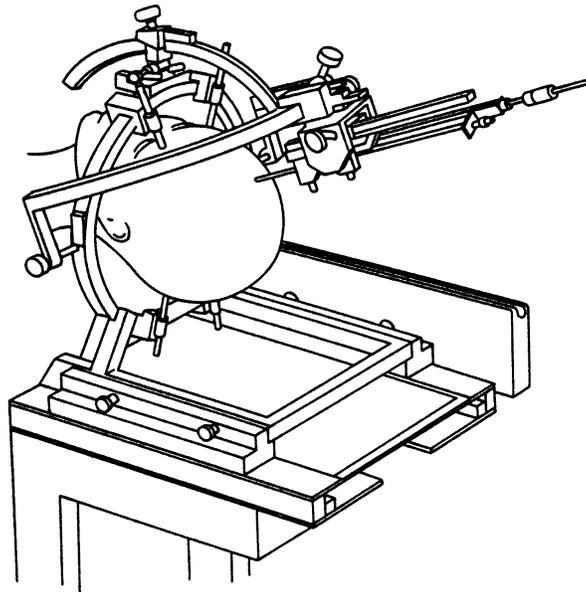


Abbildung 2.1: Stereotaktisches System nach Riechert/Mundinger [Sch89]

ring können modular spezielle Lokalisatoren angebracht werden, die sich in Röntgen-, CT- und MR-Aufnahmen abbilden und somit absolute Koordinaten in allen Schnittbildern repräsentieren. Im einfacheren Fall der Röntgen-Bildgebung werden dünne Drähte verwendet, die in einer wohldefinierten Orientierung zueinander und zum Grundring befestigt sind. Bei der MR-Tomographie ist die Gestaltung dieser Lokalisatoren aufwendiger. Weil hier metallische Materialien das Magnetfeld stören, kommen beispielsweise statt der Drähte mit paramagnetischer Flüssigkeit gefüllte Schläuche zum Einsatz. Aus dem Abstand der Durchstoßpunkte der Lokalisatoren in den Bildschichten werden die  $z$ -Achse, aus ihrer Position die  $x$ - und  $y$ -Achsen bestimmt.

Diese Koordinaten bleiben über den stereotaktischen Grundring für den gesamten Verlauf der Operation fest mit dem Patientenschädel verbunden. Die stabile Lagerung des Grundrings am Operationstisch wird genutzt, um eine absolute Position des Zielvolumens in den Ortsraum zu übertragen. So können beispielsweise externe Strahlenfelder zielgenau aus verschiedenen Richtungen auf vorausbestimmte Zielpunk-

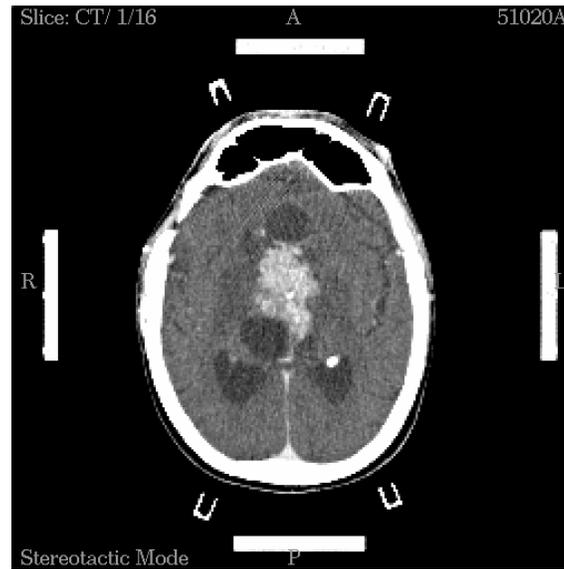


Abbildung 2.2: Tomogramm einer Schädelschicht, aufgenommen mit einem Computer-Tomographen. In der Schädelmitte ist ein Tumor angesiedelt [Tre95]

te appliziert werden. Dieses Verfahren der sogenannten Konformations-Strahlentherapie wurde tatsächlich erst in Kombination mit Stereotaxie möglich.

Am Grundring können auch Zielsysteme angebracht werden, die die präzise Führung von verschiedenen Instrumenten erlauben. Auch mit solchen Geräten haben sich mittlerweile verschiedene stereotaktische Standardverfahren etabliert. Wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt, können mit Hilfe dünner Nadeln radioaktive Präparate ausgewählter Dosis stereotaktisch implantiert werden. Als intrakavitäre Kontaktbestrahlung von zystischen Kraniopharyngeomen wurde die interstitielle Radiotherapie erstmals bekannt. Weit häufiger werden heutzutage auch in Kliniken, die in der Regel nur offene neurochirurgische Eingriffe durchführen, dünne Biopsienadeln unter stereotaktischer Führung in auffällige Gewebereiche eingestochen, um schonend Proben zur Untersuchung ihrer Histologie zu entnehmen.

Von immenser Bedeutung für die Methode der Stereotaxie sind die bildgebenden Verfahren als Grundlage der Operationsplanung. Deshalb sollen zumindest die physikalischen Prinzipien der wichtigsten Verfahren, der Computertomographie (CT) und der Kernspintomographie (MRT), im folgenden kurz beschrieben werden.

Die Computertomographie basiert auf der Absorption von Röntgenstrahlung im durchstrahlten Gewebe. Da bei klassischen Röntgentechniken zweidimensionale Projektionen des dreidimensionalen menschlichen Körpers aufgenommen werden, erhält man nur in Strahlrichtung gemittelte Intensitätswerte, so daß nur sehr große Kontrastunterschiede, wie die zwischen Knochen und Weichteilen, sichtbar werden.

Die CT-Technik ist dagegen in der Lage, einzelne Schichten in Röntgenstrahlrichtung aufzunehmen. Dazu wird der Röntgenstrahl auf diese Ebene begrenzt und hinter dem Meßobjekt ebenfalls in dieser Ebene mit mehreren Detektoren erfaßt und digitalisiert. Durch gemeinsame Rotation der Röntgenquelle und der Detektoren sind Projektionen aus verschiedenen Winkeln möglich, aus denen anschließend durch eine *Radon-Transformation* die zweidimensionalen Dichtewerte berechnet werden können. Der Vorteil gegenüber den klassischen Techniken ist nun, daß diese Werte nur die Absorption des einzelnen Bildpunktes widerspiegeln und keine Integration über den ganzen Strahlweg beinhalten. Dadurch können wesentlich geringere Kontrastunterschiede detektiert werden, die eine Differenzierung von Strukturen innerhalb der Weichteile, wie z.B. im Gehirn, ermöglichen.

Verschiebt man das Objekt senkrecht zur Schichtebene, kann ein dreidimensionaler Datensatz des Meßvolumens erzeugt werden, in dem neben der Diagnose von krankhaften Prozessen auch die dreidimensionale Planung eines stereotaktischen Eingriffs erfolgen kann. Abbildung 2.2 zeigt einen Schnitt durch den Schädel eines Tumorpatienten, der mit einem CT erstellt wurde. Der Tumor ist in der Mitte des Schädels zu erkennen, ebenfalls sichtbar ist die Verdrängung der Seitenventrikel und deren Asymmetrie. Um die Meßpausen beim Verschieben des Patienten zu umgehen, wird beim Spiral-CT während der Rotation der Aufnahmeeinheit der Patient kontinuierlich verschoben.

Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung dreidimensionaler Schnittbilder des Körperinneren stellt die Kernspintomographie dar. Ausgenutzt wird hierbei die Tatsache, daß die Kernspins in einem äußeren Magnetfeld mit einem Hochfrequenzpuls der genau passenden Larmorfrequenz angeregt werden können. Die Relaxation dieser Spins hängt sehr stark von der magnetischen Kopplung des zugehörigen Atoms mit der direkten Umgebung ab, so daß die gleichen Atome, in unterschiedlichen Molekülen gebunden, jeweils andere Relaxationszeiten zeigen. Dies ermöglicht eine Unterscheidung verschiedener Gewebearten und damit einen Weichteilkontrast, der mit Röntgenstrahlung nicht erreichbar ist. Zum Aufbau von Schnittbildern ist es nötig, die Kernspinsignale im Raum zu lokalisieren. Durch Überlagerung des homogenen äußeren Magnetfeldes mit Gradienten im Ort und in der Zeit kann erreicht werden, daß die Larmorbedingung nur an einzelnen Raumpunkten erfüllt ist, wodurch die detektierten elektromagnetischen Signale diesen Raumpunkten zugeordnet werden können. In Abbildung 2.3 ist ein solches Schnittbild zu sehen. Es ist eine Aufnahme desselben Patienten und in etwa derselben Schicht wie in Abbildung 2.2. Hier ist der Tumor noch besser zu erkennen, es sind sogar noch Unterstrukturen im Tumor zu finden.

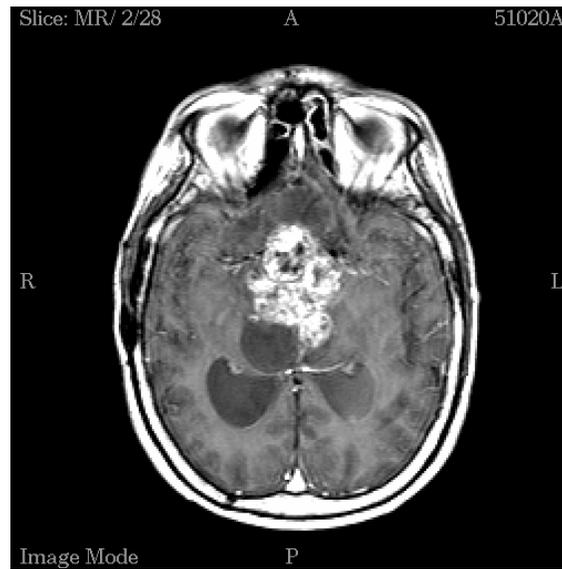


Abbildung 2.3: Tomogramm einer Schädelschicht, aufgenommen mit einem Magnetresonanztomographen. Zu sehen ist in etwa dieselbe Schicht wie in Abb. 2.2 [Tre95]

## 2.2 Lasergewebewechselwirkungen

Wechselwirkungen von Laserlicht mit Gewebe fallen sehr unterschiedlich aus, wenn man verschiedene Laserparameter zugrunde legt. Wichtige Parameter sind dabei die Wellenlänge, da sie die Absorptions- und Streuungseigenschaften bestimmt, und die Pulsdauer, da sie nach Boulnois [Bou86] den prinzipiellen Wirkungsmechanismus beeinflusst. Die Wechselwirkungszeit allein erlaubt schon eine grobe Klassifizierung der unterschiedlichen Lasergewebewechselwirkungen. In Abbildung 2.4 sind die einzelnen Formen aufgetragen. In dem Diagramm wurden zahlreiche publizierte medizinische Laseranwendungen und die zugrundeliegenden Phänomene zusammengestellt. Es ist klar ersichtlich, daß die Energiedichten bei allen klinisch relevanten Lasern in einem Band zwischen  $1$  und  $1000 \text{ J/cm}^2$  liegen. Entsprechend kann man sämtliche Wechselwirkungsarten gleichbedeutend in Abhängigkeit von der Pulsdauer oder der Leistungsdichte beschreiben. Der Pulsdauerbereich variiert dabei zwischen vielen Minuten und einigen Femtosekunden, die Leistungsdichten also zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{14} \text{ W/cm}^2$ .

Bei langen Einwirkzeiten und sehr niedrigen Leistungsdichten findet man ausschließlich *photochemische Wechselwirkungen*. Das Standardbeispiel dieses Wirkungsmechanismus ist die photodynamische Therapie, die zur Zerstörung von Tumorzellen eingesetzt wird. Hier werden Farbstoffe injiziert, die sich zu einem geringen Prozentsatz vermehrt in Tumorzellen anreichern und bei Anregung mit Licht bestimmter Wel-

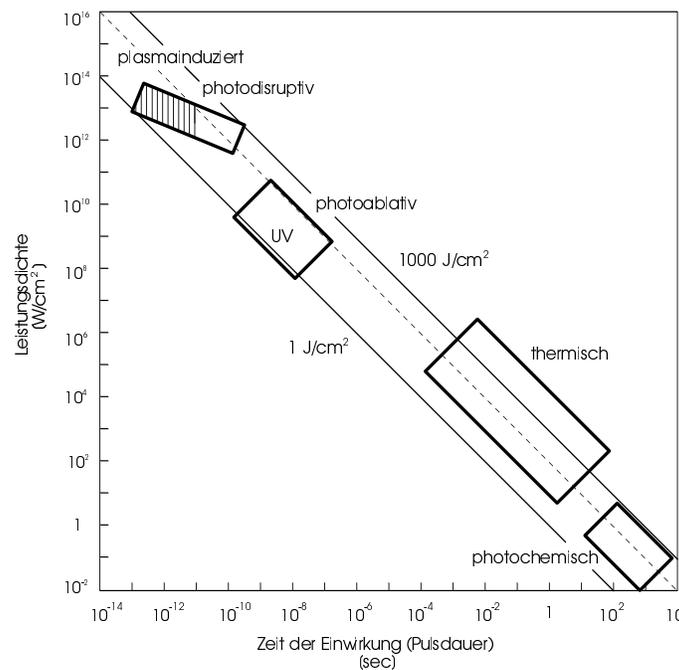


Abbildung 2.4: Lasergewebewechselwirkungen in Abhängigkeit von Pulsdauer und -leistung nach [Bou86]

lenlängen cytotoxisch werden. Beispiele für intensiv untersuchte Farbstoffe sind verschiedene Hämatoporphyrinderivate (HpD) und Phthalocyanine.

Bei kürzeren Bestrahlungszeiten mit kontinuierlichen Lasern bis hin zu Lasern im Millisekundenbereich und entsprechend erhöhten Leistungsdichten treten *thermische Effekte* in den Vordergrund. Je nach erzielter Temperatur wird das Gewebe in verschiedener Weise geschädigt. Tabelle 2.1 zeigt die bei verschiedenen Temperaturen eintretenden Gewebeeränderungen.

| Temperatur | Gewebeeränderungen                                |
|------------|---|
| 43-45°     | Hyperthermie, Membranveränderungen und Schrumpfen |
| 50°        | Abnahme der Enzymaktivität                        |
| 62°        | Proteindenaturierung und Koagulation              |
| 80°        | Karbonisation                                     |
| 100°       | Vaporisation und Ablation                         |

Tabelle 2.1: Thermische Gewebeerwirkungen nach [Bou86]

Klinisch eingesetzt werden vor allem CO<sub>2</sub>- und Nd:YAG-Laser mit langen Pulsdauern, die sich in ihrer Wellenlänge und damit ihrer Eindringtiefe stark unterscheiden. Mit CO<sub>2</sub>-Lasern wird in der Regel Gewebe verdampft, mit Nd:YAG-Lasern, die weniger lokal absorbiert werden, wird ein größerer Gewebereich koaguliert.

Auch mit Lasern kürzerer Pulsdauern werden Temperaturerhöhungen beobachtet, wenn sie ihre Energie nicht in andere Energieformen umwandeln und über eine gewisse Zeit einwirken können. Die entstehende Schädigung variiert mit der deponierten Energie, d.h. mit der Dauer der Applikation und der Wiederholfrequenz der Laserpulse.

Bei Pulsdauern im Nanosekundenbereich gibt es eine besondere Wechselwirkungsart, bei der hauptsächlich Excimer-Laser mit Wellenlängen im Ultravioletten zum Einsatz kommen. Bei dieser *photoablativen Wechselwirkung* werden aufgrund der hohen Photonenenergie Molekülbindungen direkt aufgebrochen, so daß lokal Gewebe abgetragen wird. Excimer-Laser haben sich besonders in der Ophthalmologie zur refraktiven Hornhautchirurgie bewährt [SBW87, L'E89]. Wegen des nichtthermischen Charakters ist die photoablativ Wechselwirkung vergleichsweise schonend für das umliegende Gewebe.

Die Wechselwirkung von Piko- und Femtosekundenlaserpulsen mit Gewebe ist ebenfalls durch eine hohe Genauigkeit mit geringen Schädigungszonen charakterisiert. Den zugrundeliegenden Mechanismus nennt man *plasma-induzierte Ablation*, da durch die hohen Intensitäten im Fokus ein Plasma gezündet wird [PS84]. Ausgehend von diesem Plasma bildet sich eine Schockwelle, die schon in kürzester Entfernung zu einer gewöhnlichen Schallwelle relaxiert. Die Ausbreitung der Schockwelle wird von der Entstehung einer Kavitationsblase begleitet. Alle drei Prozesse tragen gemeinsam zur Abtragung bei. Das geringe Abtragungsvolumen eines einzelnen Laserpulses erfordert das Scannen vieler Laserpulse über die Gewebeoberfläche, um ein größeres Volumen zu entfernen. Da Piko- und Femtosekundenlaser mit hohen Wiederholfrequenzen betrieben werden können, sind makroskopische Abtragungen möglich.

Das Abtragungsvolumen eines Laserpulses ergibt sich aus der lateralen Ausdehnung und der Tiefe des erzeugten Einschußkraters. Die Abtragungstiefe liegt für Energien nicht weit über der Ablationsschwelle von rund  $20 \pm 4 \text{ J/cm}^2$  bei etwa  $100 \mu\text{m}$  [FDG<sup>+</sup>94]. Typische Durchmesser der Kavitäten betragen etwa  $100 \mu\text{m}$ . In histologischen Begutachtungen konnten in Nachbarschaft zur Laserlesion keinerlei thermische Schädigungen nachgewiesen werden [SGF<sup>+</sup>96]. Die mechanischen Nebenwirkungen sind, wie in Probenstrahlexperimenten gezeigt wurde, auf Bereiche von maximal  $300 \mu\text{m}$  begrenzt [JHLB94, FJB95]. Die gezielte Platzierung vieler Laserpulse erlaubt aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften die Abtragung vorgegebener Volumina mit hoher Genauigkeit und geringen Nebeneffekten.

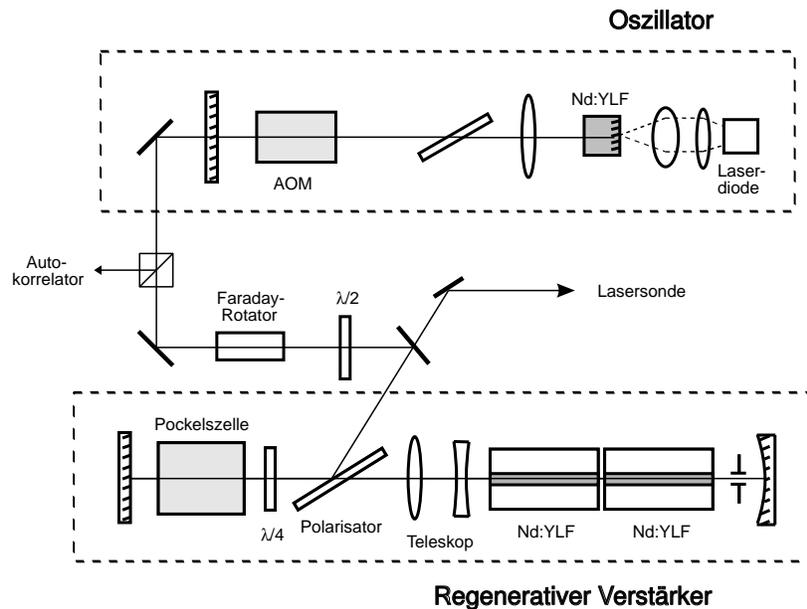


Abbildung 2.5: Aufbau des Nd:YLF-Pikosekundenlasers [Göt96]

## 2.3 Pikosekunden-Lasersystem

Im Gesamtsystem der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie nimmt der Laser eine zentrale Funktion ein. Das hier zum Einsatz kommende Lasersystem ist ein zweistufiger Nd:YLF-Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 1053 nm. Um energiereiche ultrakurze Laserpulse mit hoher Repetitionsrate zu erzeugen, besteht es aus einer pulsenerierenden Komponente, dem Oszillator, und einer pulsverstärkenden Komponente, dem regenerativen Verstärker [FDG<sup>+</sup>94, BBS87]. Eine Übersicht über das System zeigt Abbildung 2.5.

Im Oszillator wird ein kleiner Nd:YLF-Kristall von 4 mm Länge von einer Laserdiode longitudinal gepumpt. Die Rückseite des Laserkristalls ist hochreflektierend verspiegelt und dient als Resonatorspiegel. Der zweite Resonatorspiegel besitzt einen Reflektionsgrad von 90%. Zur Erzeugung von Pikosekundenpulsen wurde ein akustooptischer Modulator in den Resonator gebracht, der von einem externen Frequenzgenerator mit einer Frequenz angesteuert wird, die der halben Umlauffrequenz eines Pulses im Resonator entspricht<sup>1</sup>. Das Prinzip des akustooptischen Modulators beruht darauf, daß durch eine leistungsstarke akustische Stehwelle in einem LiNbO<sub>3</sub>-Kristall ein Brechungsindexgitter sinusförmig ein- und ausgeblendet wird, an dem der transmittierte Lichtstrahl gegebenenfalls gebeugt wird. Durch die Synchronisation mit dem umlaufenden Lichtfeld entstehen über aktive Modenkopplung [Sie86] ultrakurze Laserpulse,

<sup>1</sup>Entscheidend für die Modulation sind die Nulldurchgänge. Da pro Periode zwei Nulldurchgänge genutzt werden können, genügt die halbe Frequenz.

deren Pulsdauer u.a. von der Verstärkungsbandbreite des Lasermediums abhängt. Mit dem hier verwendeten Nd:YLF-Oszillator konnten Pulsdauern bis hinunter zu 20 ps erzielt werden [Lös92, Göt93]. Das Brewsterfenster im Resonator dient der Selektion einer definierten Polarisationsrichtung, was bei dem Lasermedium Nd:YLF gleichzeitig einer Auswahl der Wellenlänge entspricht, die bei orthogonaler Orientierung bei 1047 nm liegen würde. Der elektrische Feldvektor schwingt parallel zur Papierebene.

Der Oszillator liefert einen Ausgangspulszug von energieschwachen (ca. 0.2 nJ) Pikosekundenpulsen mit einer Repetitionsrate von etwa 160 MHz, was gerade der Umlauffrequenz im Resonator entspricht.

Durch geschicktes Schalten der Pockelszelle im Resonator des regenerativen Verstärkers können mit variabler Wiederholfrequenz einzelne Pulse aus diesem Pulszug in den regenerativen Verstärker eingefangen und in mehreren Umläufen verstärkt werden. Die Pockelszelle enthält einen LiNbO<sub>3</sub>-Kristall, der bei Anlegen einer Spannung von etwa 1.5 kV wie ein  $\lambda/4$ -Plättchen wirkt und ohne Spannung keinen Einfluß auf den Polarisationszustand hat.

Bei zunächst noch ausgeschalteter Pockelszellenspannung kann ein am Faraday-Rotator und  $\lambda/2$ -Plättchen in die vertikale Polarisationsrichtung gedrehter Laserpuls über den Polarisator in den regenerativen Verstärker eingekoppelt werden. Der zweimalige Durchgang durch das  $\lambda/4$ -Plättchen dreht den Polarisationszustand um 90°, so daß das Licht durch den Polarisator in die rechte Resonatorhälfte gelangen kann. Da ein erneutes zweimaliges Passieren des  $\lambda/4$ -Plättchens das sofortige Auskoppeln des Pulses nach nur einem einzigen Durchlauf durch die Laserkristalle bewirken würde, wird nun die Pockelszelle ebenfalls auf  $\lambda/4$ -Spannung geschaltet. Ein Puls durchläuft insgesamt vier optische Elemente mit  $\lambda/4$ -Phasenverschiebung, so daß seine Polarisations-eigenschaften effektiv erhalten bleiben und er stets am Polarisator transmittiert wird. Der Puls bleibt solange gefangen, wie die Spannung anliegt. Das Ausschalten der Spannung führt zum Auskoppeln des Pulses. Der Vorgang des Ein- und Auskoppelns kann bis zu 1500 mal pro Sekunde wiederholt werden.

Als Verstärkungsmedium im regenerativen Verstärker dienen zwei 7.6 cm lange und 4 mm dicke, lampengepumpte Nd:YLF-Laserstäbe. Die beiden Resonatorspiegel weisen einen Reflektionsgrad von nahezu 100% auf. Die Krümmungsradien wurden gemeinsam mit den Brennweiten des resonatorinternen Teleskops so bestimmt, daß durch Anpassung der Strahldurchmesser an keiner Stelle im Resonator die Zerstörschwellen überschritten werden [Gro96]. Zur Modenselektion befindet sich vor dem rechten Resonatorspiegel eine Lochblende. Durch Variation des Blendendurchmessers kann der TEM-00-Mode gegenüber höheren Moden bevorzugt werden.

In Tabelle 2.2 sind die typischen Kenndaten des beschriebenen Lasersystem zusammengestellt.

|                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| LasermEDIUM                 | Nd:YLF            |
| Wellenlänge                 | 1053 nm           |
| Pulsdauer                   | >30 ps            |
| Pulsenergie                 | 1.5 mJ            |
| Repetitionsrate             | 0–1 kHz, variabel |
| Mittlere Leistung bei 1 kHz | 1.5 W             |

Tabelle 2.2: Typische Kenndaten des Lasersystems

## 2.4 Stereotaktische Lasersonde

Zur gezielten Applikation des Pikosekundenlasers wurde eine spezielle Sonde entwickelt, die an einem stereotaktischen Zielsystem direkt in das Zielvolumen geführt werden kann. Primär mit der Ablation verbunden sind zwei unterschiedliche Aufgaben dieser Lasersonde. Zum einen wird mit Hilfe eines Spiegels und einer Linse der Fokus des Lasers über das Gewebe im Zielgebiet bewegt. Zum anderen werden die abgetragenen Gewebefragmente in Spülflüssigkeit aufgeschwemmt und aus der Operationshöhle entfernt. Diese Aufgaben wurden durch die Konstruktion der Sondenspitze mit drei ineinanderliegenden Rohren verwirklicht, die in sich und gegeneinander verschoben werden können. Die dritte Aufgabe ist die Überwachung des Operationsverlaufs mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten konfokalen Mikroskop. Da der detaillierte Aufbau der einzelnen Komponenten auch wesentlichen Einfluß auf das optische und mechanische Design des Mikroskops hat, wird die Lasersonde gemeinsam mit diesem in Kapitel 4 ausführlicher vorgestellt. An dieser Stelle sollen jedoch wenige Aspekte vorweggenommen werden.

Das konfokale Laserscanning-Mikroskop wurde in Form einer kompakten optischen Bank realisiert, die unmittelbar über dem etwa faustgroßen Sondenkopf angebracht wurde. Die gesamte Sonde ist in Abbildung 2.6 in einer etwas ungewöhnlichen Einstellung am stereotaktischen Zielbügel montiert. Die Sonde ist insgesamt etwa 60 cm lang und 2.6 kg schwer. Um ein schlankes Design zu erhalten, wurden der Großteil der elektronischen Zubehöerteile und die der Bewegung der Optiken dienenden Schrittmotoren nicht direkt an der Sonde befestigt. Auch die Laserdiode des Mikroskops steht abseits der Sonde und wird über eine Glasfaser zugeführt. Die Sondenspitze, die letztendlich in das Gehirn des Patienten eindringen muß, weist einen Außendurchmesser von 5.5 mm

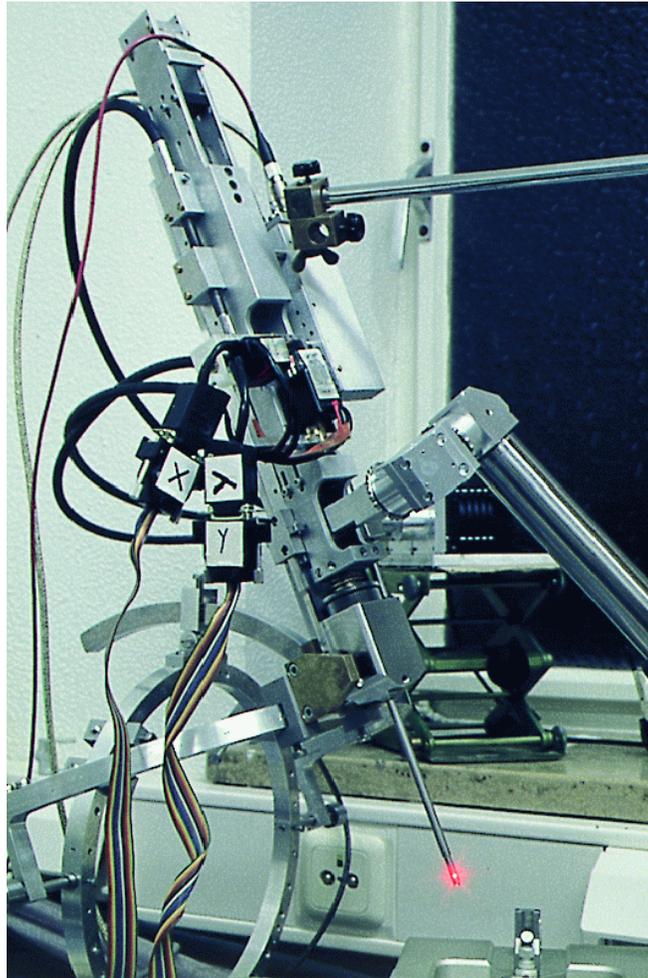


Abbildung 2.6: Die Lasersonde

auf. Bei Berücksichtigung der Wandstärken der einzelnen Rohre sowie der Spülkanäle verbleibt im Innern ein optischer Kanal mit einem Durchmesser von 2.8 mm, über den nicht nur der Ablationslaser geführt sondern in dem auch die gesamte Bildgebung ausgeführt wird.

Entsprechend der geringen Dimensionen der Sondenspitze müssen miniaturisierte optische Komponenten eingesetzt werden. Eine Auswahl dieser Komponenten ist in Abbildung 2.7 zusammengestellt.

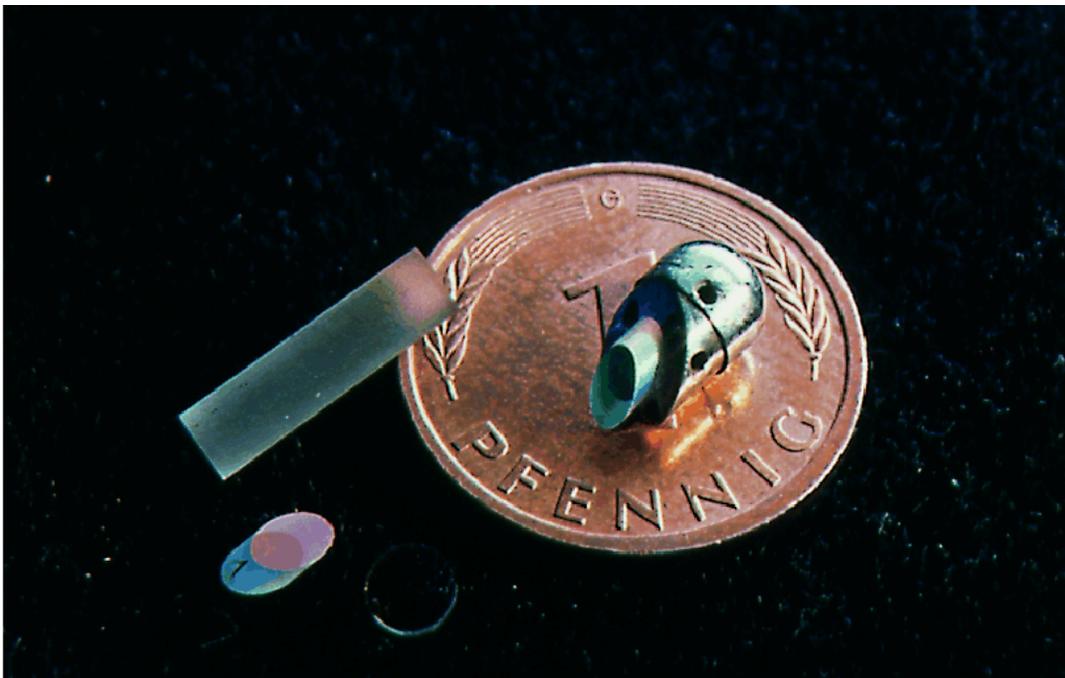


Abbildung 2.7: Die Optiken der Sondenspitze mit Größenvergleich. Links ist die Linse mit 33 mm Brennweite zu sehen, darunter ein Umlenkspiegel und eine 26 mm Linse. Ein auf der Sondenspitze montierter Spiegel ist rechts abgebildet.

# Kapitel 3

## Konfokales

## Laserscanning-Mikroskop

Ein Laserscanning-Mikroskop ist ein optisches System, das Bilder von kleinen Objekten punktweise aufnimmt. Im Gegensatz zum normalen Lichtmikroskop wird nicht ein zweidimensionales Gesamtbild aufgenommen, sondern jeder Punkt des Objekts wird einzeln gemessen und danach wieder zu einem zweidimensionalen Bild zusammengesetzt. Dabei überstreicht der Beleuchtungsstrahl das Objekt, er „scannt“ es ab.

Um dieses Scannen zu erreichen, muß entweder das Objekt unter dem Laserstrahl bewegt oder der Laserstrahl über das feststehende Objekt bewegt werden. Die erste Möglichkeit kann nur bei kleinen Objekten angewandt werden, die noch leicht zu bewegen sind. Im Falle der Neurochirurgie kommt selbstverständlich nur das Bewegen des Lasers in Betracht.

Einfaches Bewegen eines Laserstrahls ist mit Drehspiegeln zu erreichen. In diesem Aufbau werden auch noch andere Verfahren eingesetzt, wie das Verschieben des gesamten Mikroskops und das Drehen des letzten Umlenkspiegels, die aber erst später erläutert werden.

### 3.1 Scanner

Scanner haben die Aufgabe, mit Hilfe eines optischen Elements wie z.B. einem Spiegel die Richtung des Laserstrahl zu ändern. Mit einem drehbaren Spiegel kann man einen Strahl in einer Richtung in ein fächerförmiges Strahlenbündel umwandeln. Die Bewegung des Spiegels kann dabei auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- Galvanometer-Scanner: Die drehbare Achse eines Elektromotors ist mit einer Drehstabfeder fixiert. Wird auf die Spule des Motors ihr eigenes Bewegungssi-

gnal zurückgekoppelt, arbeitet er als *resonanter Scanner* mit großer Amplitude bei hoher Frequenz.

Steuert man den Strom des Motors über eine Regelungsschaltung, die ein Positionssignal des Scanners mit der Sollposition vergleicht, kann man sehr genau bestimmte Positionen oder Bewegungsmuster einstellen.

- **Drehspiegel:** Hier rotieren ein oder mehrere Spiegel eines Polygons mit hoher Drehzahl, so daß hohe Frequenzen und eine hohe Linearität erreicht werden können.
- **Akustooptische Deflektoren:** Licht einer Wellenlänge wird am Brechungsindexgitter akustischer Kristallschwingungen gebeugt. Über die Frequenz der Schwingung kann der Ablenkwinkel eingestellt werden.

Um aus der Drehung eines Spiegels eine Ortsbewegung zu erhalten, muß man die Winkeldrehung des Strahls in eine laterale, möglichst in einer Ebene fokussierte Bewegung umsetzen.

## 3.2 Definition von Scan und Strahl

Bei der Abbildung eines gescannten Strahls muß man sowohl den Strahl selbst, als auch seine Ausbreitungsrichtung berücksichtigen. Deshalb bietet es sich an, für diese Strahleigenschaften die folgenden Begriffe zu definieren (Abb. 3.1):

- der Strahl ist die Einhüllende des elektromagnetischen Feldes zu einem bestimmten Zeitpunkt,
- der Scan ist die Einhüllende der Symmetrieachsen aller Strahlen im Scanbereich.

Die Wirkung eines optischen Systems muß sowohl auf den Strahl selbst, als auch auf den Scan, berücksichtigt werden. Der Strahl muß unter Berücksichtigung der physikalischen Optik (Gauß'sche Strahlausbreitung) berechnet werden. Im Gegensatz dazu kann der Scan mit Methoden der geometrischen Optik berechnet werden, denn er beschreibt nur die Eigenschaften der Symmetrieachsen der Einzelstrahlen und kann deshalb einen infinitesimalen Schnittpunkt im Fokus erreichen, ohne physikalischen Gesetzen zu widersprechen.

### 3.2.1 Abbildung des Scans

Will man den Strahl in mehreren Richtungen scannen, muß man die scannenden Elemente an ortsfesten Punkten des Strahls positionieren. Solche Punkte bilden jeweils

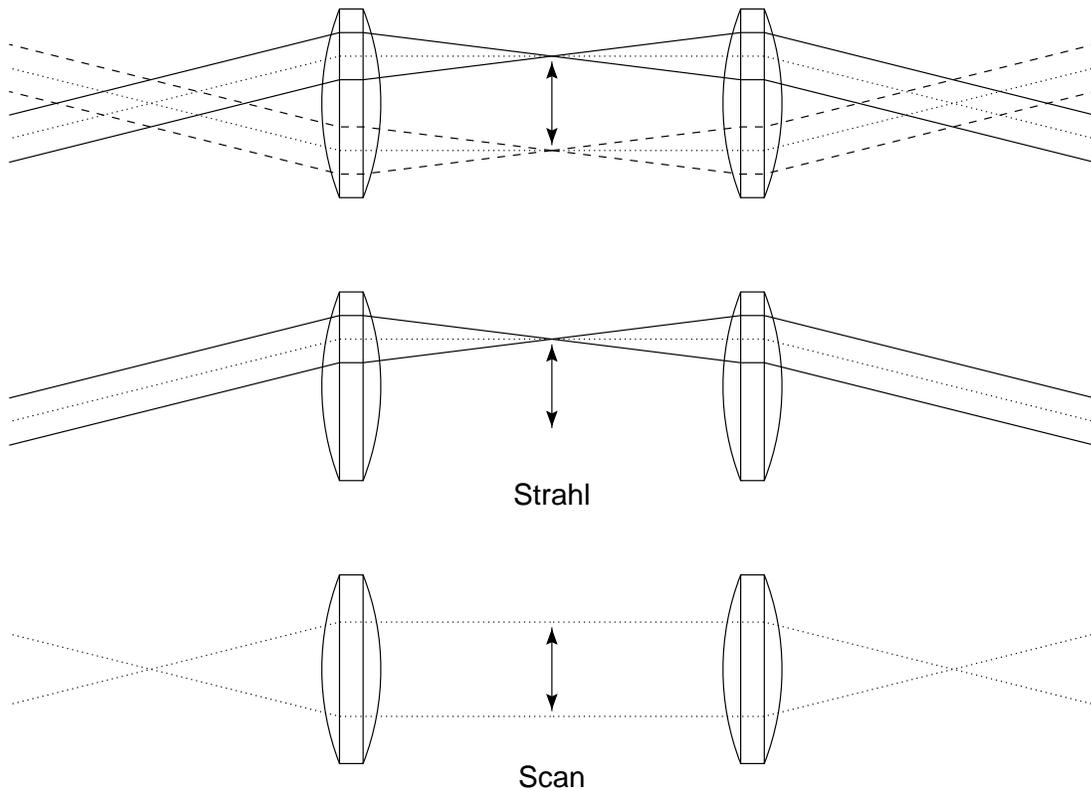


Abbildung 3.1: Definition von Strahl und Scan

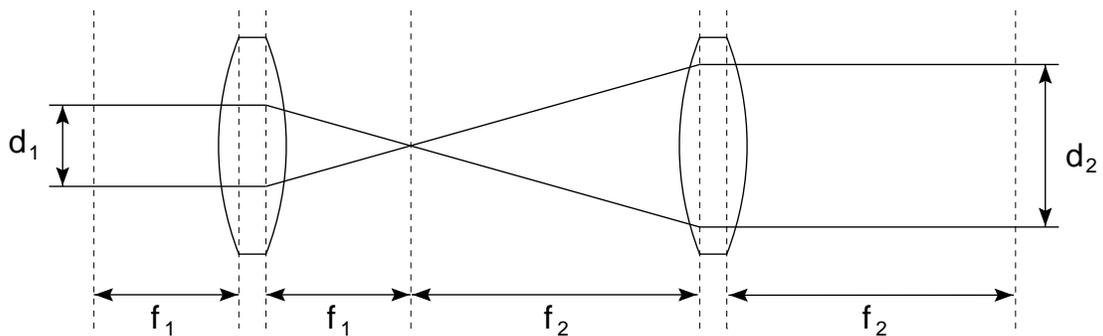


Abbildung 3.2: Transformation des Strahl- oder Scandurchmessers mit einem Teleskop

die Pupillen des Scans, d.h. die Orte, in denen sich alle Symetrieachsen schneiden. Idealerweise erfüllen die Brennpunkte von Linsen diese Anforderungen (siehe Abb. 3.1). Ordnet man Linsen im Abstand  $d=f_1+f_2$  an, so erhält man ein *afokales* oder *4-f-System*, das sich durch die Transformation einer Scanpupille vor den beiden Linsen auf eine Pupille dahinter auszeichnet. Wie in Abb. 3.1 zu sehen, werden durch diese Anordnung parallele Strahlen wieder in parallele Strahlen transformiert. Abhängig von den Brennweiten der Linsen werden dabei Scanwinkel und Strahldurchmesser wie folgt verändert (siehe Abb. 3.2):

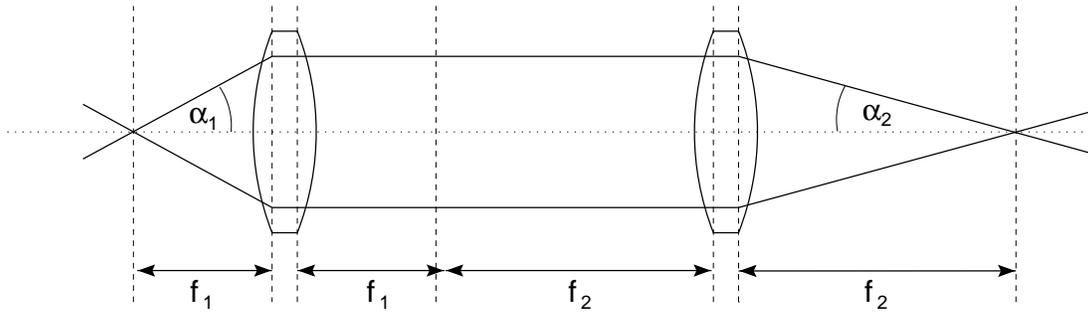


Abbildung 3.3: Transformation des Scanwinkels

$$d_2 = d_1 \frac{f_2}{f_1} \quad (3.1)$$

$$\alpha_2 = \arctan \left( \frac{f_1}{f_2} \tan \alpha_1 \right) \quad (3.2)$$

Für kleine Winkel gilt näherungsweise (vgl. Abb. 3.3):

$$\alpha_2 = \frac{f_1}{f_2} \alpha_1 \quad (3.3)$$

### 3.2.2 Abbildung des Strahls

Die Abbildung des Strahls kann nicht einfach geometrisch berechnet werden, da hierbei keine Beugungseffekte berücksichtigt würden. Zur Beleuchtung in konfokalen Mikroskopen kommen wegen ihrer Leistungsstärke und Strahlqualität meist Laser zum Einsatz. Im TEM-00-Mode erzeugen Laser einen Strahl mit Gauß'scher Intensitätsverteilung, der sich entsprechend der Gesetze für Gauß'sche Strahlen transformiert. Aus der Gauß'schen Optik folgt insbesondere, daß der Fokus eines Strahls nicht, wie aus der geometrischen Betrachtung folgt, unendlich klein ist. Durch Beugungseffekte des Strahls selbst, der nicht unendlich weit ausgedehnt ist, und Beugungseffekte an der Linsenöffnung ist die Fokusgröße beugungsbegrenzt. Für den Fokus eines Gaußstrahls gilt:

$$w_0 = \frac{\lambda f}{\pi w} \quad (3.4)$$

mit:  $w_0$  = halber Fokusbuchmesser

$w$  = halber Strahldurchmesser

Durch unterschiedliche Anordnung der Transformationslinsen lassen sich die folgenden Schemaschemata erzeugen (siehe Abb. 3.4):

- Winkelscan: Die letzte Linse steht in der Pupille des Scans, die Symmetrieachse des Einzelstrahls wird nicht von der Linse beeinflusst, so daß der Ablenkwinkel erhalten bleibt. Der Fokus des zuvor parallelen Strahls bewegt sich im Idealfall in der Fokalebene.
- Parallelscan: Der Strahl wird um den vorderen Brennpunkt der Linse gedreht. Somit sind alle Scans hinter der Linse parallel zueinander.

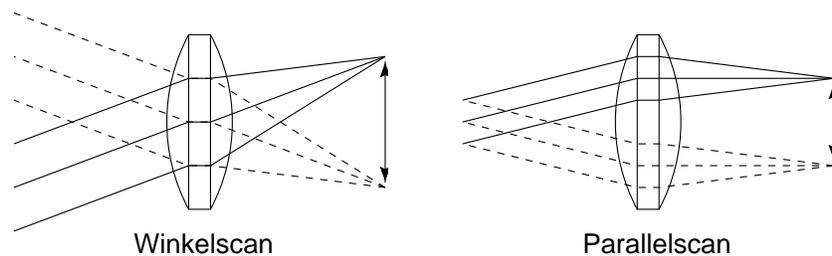


Abbildung 3.4: Prinzip des Winkelscans und des Parallelscans

In beiden Fällen bewegt sich zwar der Fokus in der Fokalebene, beim Parallelscan ist jedoch die Symmetrieachse des Scans parallel zur optischen Achse. Licht, das von einer Ebene senkrecht zur optischen Achse reflektiert wird, kann auf dem gleichen Weg durch die Linse und die restlichen Komponenten zurückkehren. Beim Winkelscan wird das reflektierte Licht einer solchen Oberfläche nicht wieder aufgenommen, sondern verläßt den Strahlengang. Nur Oberflächen, die zufälligerweise senkrecht zum Strahl sind, oder Streulicht ergeben ein Signal.

### 3.3 Konfokale Detektion

Nachdem das Objekt beleuchtet ist, muß das zurückreflektierte Licht detektiert werden. Wie oben dargestellt, kann dieses Licht bei einem Parallelscan den gleichen Weg zurück nehmen. Somit ist es nach der Scaneinrichtung wieder *descannt*, d.h. weder Richtung noch Ort des Strahls ändern sich. Wird an dieser Stelle ein Strahlteiler in den Strahlengang eingefügt, kann das zurückreflektierte Licht ausgekoppelt und detektiert werden. Auf den Detektor fällt so prinzipiell alles Licht, das entlang der Achse des Mikroskops reflektiert wird, nur begrenzt durch die Aperturen der Abbildungslinsen und die Detektorgröße.

Bringt man vor den Detektor eine weitere Linse in den Strahlengang und bildet das Licht auf eine Lochblende ab, erhält man ein konfokales Mikroskop (siehe Abb. 3.5). Nur Licht, das aus der Fokusebene reflektiert wird, kann durch die Lochblende auf den Detektor gelangen. Licht aus darüber- und darunterliegenden Schichten wird

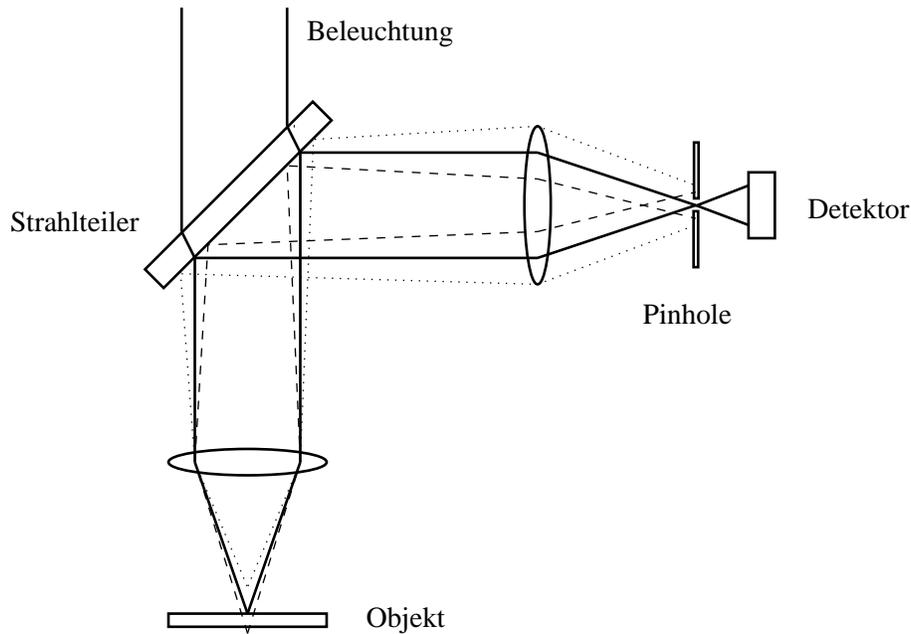


Abbildung 3.5: Das konfokale Prinzip

vor oder hinter der Lochblende fokussiert, so daß durch die Blende nur ein geringer Teil transmittiert wird.

### 3.3.1 Tiefendiskriminierung

Die Intensität entlang der optischen Achse des Beleuchtungsstrahls ist nach [Wol51, CCK86, Gri92]:

$$I(u) = \left( \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^2 I_0 \quad , \quad (3.5)$$

wobei für  $u$  gilt:

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} \left( \frac{a}{f} \right)^2 z \quad . \quad (3.6)$$

Abbildung 3.6 zeigt diese Funktion in Abhängigkeit der dimensionslosen Größe  $u$ . Im normalen Mikroskop ist die an einem Punkreflektor reflektierte Intensität proportional der Beleuchtungsintensität an der Stelle des Punktes, also proportional dieser Funktion. Bestimmt man mit

$$I_{1/2} = I(u_{1/2}) = 1/2I_0$$

die Halbwertsbreite dieser Funktion, so erhält man ein Maß für die Tiefenauflösung eines Mikroskops. Die numerische Lösung dieser transzendenten Gleichung ergibt den

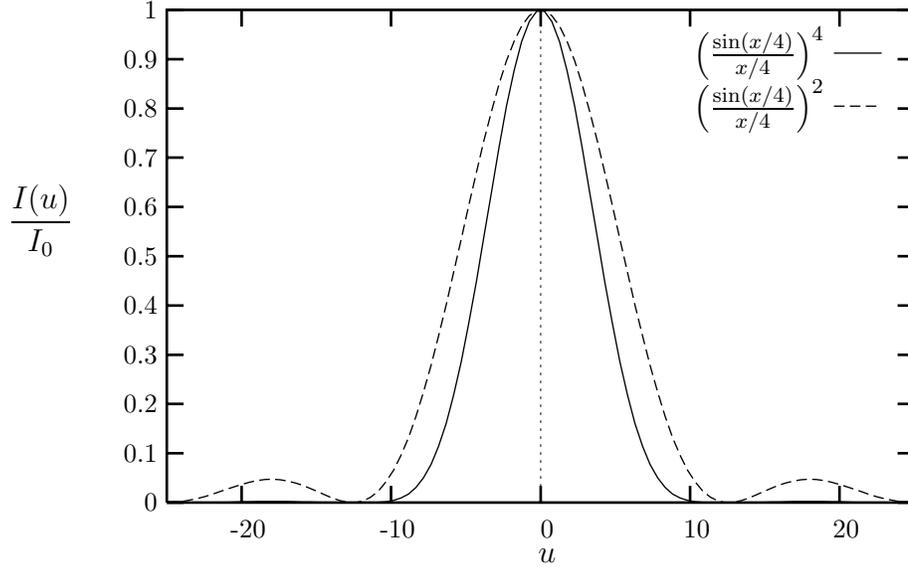


Abbildung 3.6: Tiefentransferfunktion von einfachem und konfokalem Scanningmikroskop

Wert  $u_{1/2} = 5.566$  und mit Gleichung (3.6) kann  $z_{1/2}$  aus der Brennweite  $f$  der Linse und dem Strahldurchmesser  $a$  berechnet werden:

$$z_{1/2} = \frac{2\lambda}{\pi} \left( \frac{f}{a} \right)^2 u_{1/2} \quad (3.7)$$

Im Unterschied dazu bildet ein konfokales Mikroskop den Beleuchtungsfokus noch einmal auf die Lochblende vor dem Detektor ab. Die resultierende Tiefentransferfunktion ist ebenfalls in Abb. 3.6 zu sehen (durchgezogene Linie). Sie unterscheidet sich von der des einfachen Mikroskops in der Potenz des  $\sin x/x$ -Terms. Durch die erneute Abbildung des beleuchteten Punktes auf das Pinhole wird die Punktbildfunktion quadriert, und man erhält für die Tiefentransferfunktion des konfokalen Mikroskops:

$$I(u) = \left( \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^4 I_0 \quad (3.8)$$

wobei  $u$  hier wieder wie in Gleichung (3.6) definiert ist. Bestimmt man die Halbwertsbreite von  $I(u)$ , erhält man für den Parameter  $u_{1/2}$

$$u_{1/2} = 4.008$$

und kann ebenfalls die Tiefenauflösung mit Gleichung (3.7) berechnen. Die Werte für  $u_{1/2}$  unterscheiden sich nicht sehr stark, allerdings gelten diese Berechnungen nur für die Übertragungsfunktion eines einzelnen Punktes. Betrachtet man ein dreidimensionales Objekt, muß auch die Umgebung dieses Punktes berücksichtigt werden. Im Falle

des normalen Mikroskops wird von einer unscharfen Oberfläche genau so viel Licht detektiert wie von einer scharf abgebildeten. Das unscharfe Bild enthält jedoch keine Information des Objekts.

Das konfokale Mikroskop detektiert nur Licht aus dem Fokuspunkt, ist dort kein reflektierendes Objekt, fällt auch kein Licht auf den Detektor. Objekte außerhalb des Fokuspunktes werden nicht unscharf, sondern gar nicht abgebildet.

# Kapitel 4

## Aufbau des verwendeten Mikroskops

Das in dieser Arbeit entwickelte konfokale Mikroskop wurde speziell für den Einbau in eine stereotaktische Neurochirurgiesonde konzipiert, so daß sein Design sehr stark von Aufbau und Aufgabe der Sonde beeinflusst wurde. Wesentliche Aufgabe des Mikroskops ist die intraoperative Überwachung des stereotaktischen Einsatzes der Lasersonde in einer neurochirurgischen Operation. Wichtig ist die Erkennung der Oberflächenbeschaffenheit der Ablationshöhle und die Erkennung von Blutgefäßen.

Durch die Kombination von Ablations-, Spül- und Detektionsfunktionen in eine einzige Sonde ergeben sich sowohl geometrische als auch optische Randbedingungen, die vom Mikroskop eingehalten werden müssen.

### 4.1 Geometrische Anforderungen

Ein stereotaktisch geführtes Instrument für die Neurochirurgie muß möglichst lang und dünn sein. Die entwickelte Sonde hat deshalb eine Arbeitslänge von 120 mm und einen maximalen Außendurchmesser von 5.5 mm. Der gesamte Teil der Sonde, der in einer Operation in den Schädel eines Patienten eingeführt wird, ist aus Edelstahl gefertigt, um eine gute Sterilisierbarkeit zu gewährleisten. Einzige Ausnahme bilden die verwendeten Optiken in diesem Bereich. Sie sind natürlich aus Glas und mit einem medizinisch zugelassenen UV-härtenden Klebstoff befestigt.

Um mit der Sonde Tumoren mit einem Durchmesser von 5 cm behandeln zu können, muß der Laser in diesem Volumen dreidimensional positionierbar sein. Deshalb besteht die Sondenspitze, die in Abbildung 4.1 dargestellt ist, aus drei konzentrisch angeordneten Rohren. Mit einem Spiegel am Ende des mittleren Rohres wird der Laser an der Sondenspitze um 90° abgelenkt. Das Rohr ist von außen drehbar, so daß durch Ro-

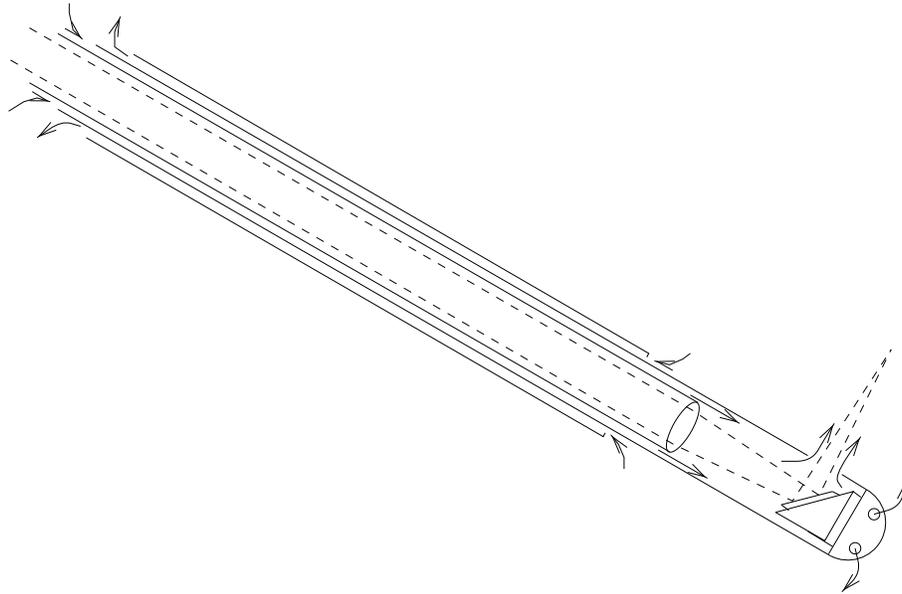


Abbildung 4.1: Sondenspitze

tation des Spiegels eine Kreisbewegung des Laser möglich ist. Um ein Mitdrehen des Hirngewebes an diesem Rohr zu vermeiden und um das Rohr zu stabilisieren, ist es von dem äußeren feststehenden Rohr umgeben. Dieses Rohr hat einen Außendurchmesser von 5.5 mm und bestimmt den Durchmesser der gesamten Sonde.

Damit der Pikosekundenlaser das Gewebe abtragen kann, muß er mit einer Linse fokussiert werden. Die Linse befindet sich an der Spitze eines weiteren Rohres, das in die beiden anderen Rohre gesteckt ist. Es stehen Linsen der Brennweiten 35 und 45 mm in Wasser zur Verfügung. In Abb. 4.2 ist die zerlegte Sonde zu sehen. Von oben nach unten sind das Linsenrohr, das Spiegelrohr und das Führungsrohr abgebildet.

Durch Verschieben der Linse gegen den Spiegel kann der Laserstrahl in variablem Abstand zur Sondenachse fokussiert werden. Die letzte Bewegung wird durch eine gemeinsame Verschiebung der beiden inneren Rohre erreicht, so daß der Ablationslaser innerhalb eines Vollzylinders positioniert werden kann. Alle Bewegungen werden von rechnergesteuerten Schrittmotoren ausgeführt, deren Rotation über flexible Wellen auf den Sondenkörper übertragen werden [Kap95]. Hier übersetzen Zahnstangen, Zahnräder und Gewinde die Wellendrehungen in Translations- und Rotationsbewegungen der Sondenoptiken.

Die Zwischenräume, die die drei Rohre bilden, dienen der Einkopplung der Laserstrahlung und dem Spül- und Absaugsystem. Zwischen dem äußeren und dem mittleren Rohr ist der Absaugkanal, zwischen dem mittleren und dem inneren der Zufluß, und im inneren Rohr werden die Laser geleitet.

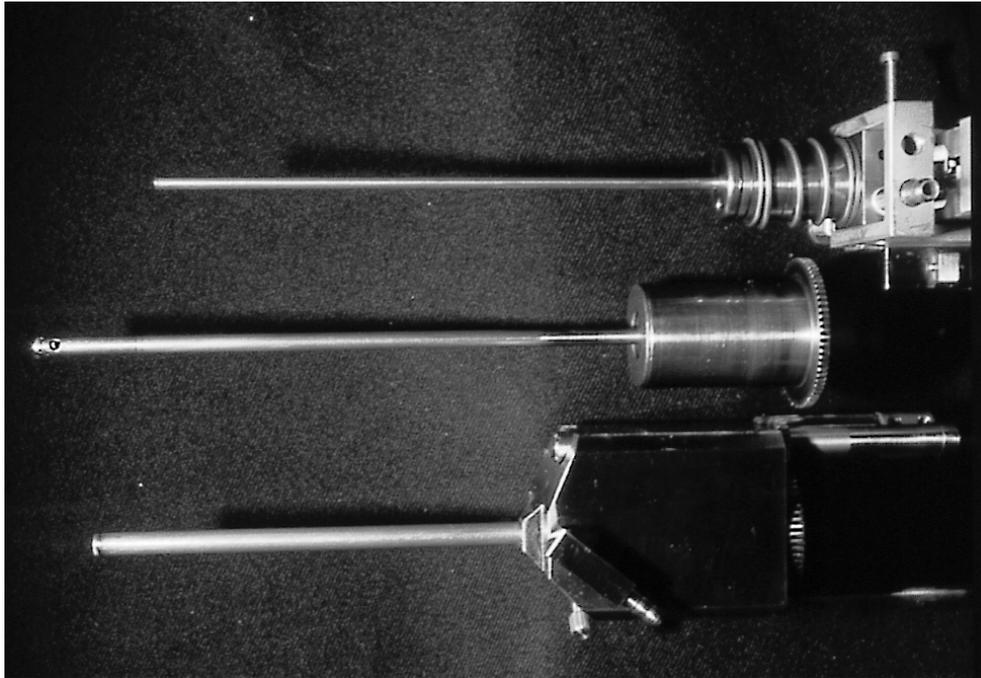


Abbildung 4.2: Die Einzelteile des Sondenkopfes

Sowohl um die Stabilität der Rohre zu gewährleisten, als auch um die Spülkanäle groß genug zu halten, wurden für die Rohrdurchmesser die folgenden Maße gewählt:

| Rohr            | Innendurchmesser | Außendurchmesser |
|-----------------|------------------|------------------|
| Äußeres Rohr:   | 5.2 mm           | 5.5 mm           |
| Mittleres Rohr: | 4.0 mm           | 4.3 mm           |
| Inneres Rohr:   | 2.8 mm           | 3.0 mm           |

Somit bleibt für die Laser im Innern des Linsenrohres ein Kanal von 2.8 mm Durchmesser frei, in dem der Mikroskoplaser noch gescannt werden muß.

## 4.2 Optischer Aufbau

Wie im Kapitel 3 beschrieben, werden zum Aufbau eines konfokalen Mikroskops diverse optische Elemente wie Strahlteiler, Scanner, Scantransformationslinsen, Fokussierlinsen und Detektoren benötigt. Durch die Integration zweier Laser in die Sonde müssen Optiken im Strahlengang beider Laser für beide Wellenlängen ent- bzw. verspiegelt sein.

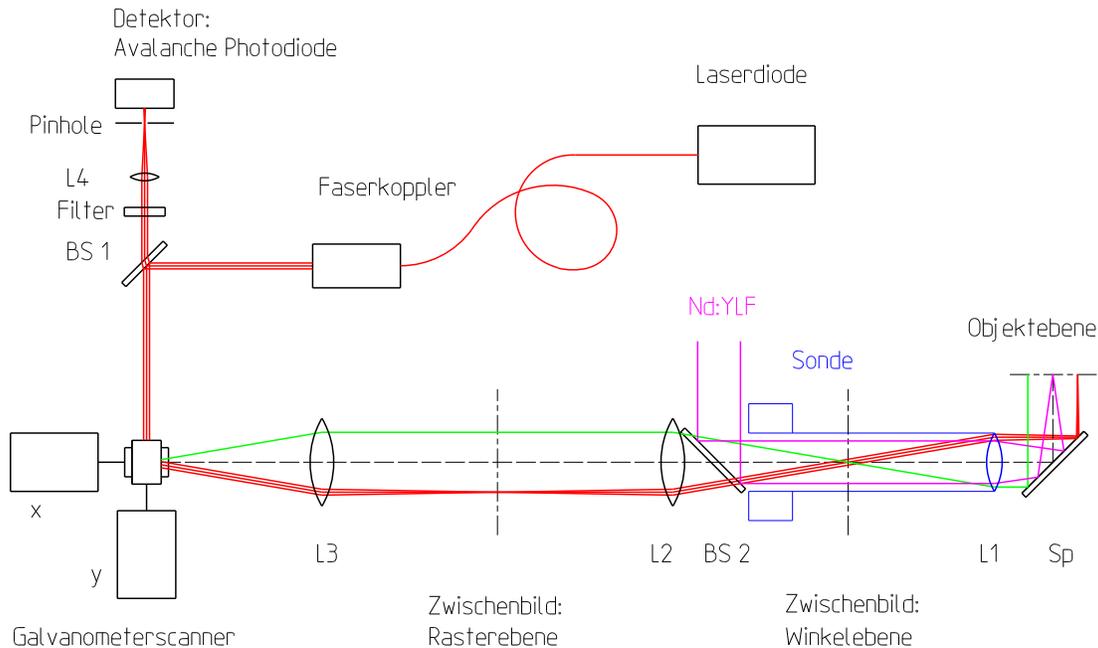


Abbildung 4.3: Schema des eingesetzten konfokalen Mikroskops

### 4.2.1 Auswahl der optischen Elemente

Die Aufgabe der Sonde, Zylinder in einem Durchmesser von 5 cm zu erreichen, bedingt eine Brennweite der Linse von 45 mm in Wasser. Da die Linse gleichzeitig den optischen Kanal vom Spülkanal trennt, befindet sich die Rückseite der Linse in Luft und ihre Brennweite ist hier um das Brechungsindexverhältnis 1.3 kürzer und beträgt 35 mm. Ihre Oberflächen müssen optimal für die Wellenlänge  $\lambda=1053$  nm des Nd:YLF-Lasers entspiegelt sein. Ebenso muß der Umlenkspiegel für diese Wellenlänge maximale Reflexion erreichen.

Die Einkopplung des Mikroskoplasers muß mit einem Strahlteiler erfolgen, der dem Ablationslaser keine Verluste zufügt. Leider sind die optimalen Ent- und Verspiegelungen für beide Wellenlängen nicht möglich, so daß jeweils beim Mikroskoplaser Verluste hingenommen werden müssen.

Eine weitere Konsequenz betrifft die Position der ersten Linse der Scantransformation (L2 in Abb. 4.3). Sie muß hinter dem Einkoppelspiegel des Ablationslasers angebracht werden, damit sie seine Strahlform und Intensität nicht beeinflußt. Der Abstand dieser Linse von der Fokussierlinse bestimmt aber auch ihre Brennweite. In die Berechnung gehen die Länge des Linsenrohres von 135 mm, die Länge des Linsenrohrhalters von 45 mm und die Brennweite der Fokussierlinse in Luft von 35 mm ein. Weiterhin muß genügend Platz für den Einkoppelspiegel und den Verschiebeweg für das Linsenrohr berücksichtigt werden. Man erhält somit für die Mindestbrennweite der

Linse:

|   |                |
|---|----------------|
| Länge des Linsenrohres:                             | 135 mm         |
| Länge des Linsenrohrhalters:                        | 45 mm          |
| Montageraum und Verschiebeweg für Einkoppelspiegel: | 35 mm          |
| Brennweite der Fokussierlinse L1 in Luft:           | <u>- 33 mm</u> |
| ⇒ Abstand Zwischenbild im Sondenrohr und Linse L2   |                |
| = Mindestbrennweite von L2:                         | 182 mm         |

Die nächstgrößere erhältliche Linse mit möglichst kleinem Durchmesser war eine Linse mit einer Brennweite von  $f = 196$  mm.

Für Linse L3 würde man nun gerne eine sehr kurze Brennweite wählen, um die Gesamtlänge des Aufbaus zu reduzieren. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, daß beide Linsen neben der Scantransformation auch als Teleskop auf den Strahl wirken. Eine sehr kurze Brennweite für L3 bedeutet deshalb auch eine Aufweitung des Strahls um den Faktor  $f_2/f_3$ . Verwendet man beispielsweise eine Linse mit der Brennweite  $f_3 = \frac{1}{4}f_2$ , und will man im Linsenrohr einen Strahl mit 0.8 mm Durchmesser erzielen, muß der Strahldurchmesser vor den Linsen L3 und L2 0.2 mm betragen. Ein so dünner Strahl ist leider nur auf Kosten der Divergenz zu erreichen. Für diese gilt nämlich nach [Yar89]

$$\theta \approx \frac{\lambda}{\pi w_0} \quad , \quad (4.1)$$

wobei  $w_0$  der halbe Durchmesser der Strahltaile ist. Damit beträgt die Divergenz eines 0.8 mm Strahls 0.5 mrad, die eines 0.2 mm Strahls dagegen schon über 2 mrad. Die einfachste Lösung ist eine symmetrische, d.h. beide Linsen haben die gleichen Brennweiten, also  $f_3 = 196$  mm.

Im rückseitigen Fokus von L3 können nun die Scanspiegel platziert werden. Für die Gesamtlänge des Aufbaus ist der Abstand zwischen Fokussierlinse und Scannerspiegel entscheidend. Er beträgt mit den obengenannten Werten für die Brennweiten und der  $4f$ -Anordnung von L2 und L3:

$$d = 4 \cdot 196 \text{ mm} + 33 \text{ mm} = 817 \text{ mm} \quad .$$

Die Länge von über 80 cm ist zu groß, um in einer linearen Anordnung der Optiken realisiert werden zu können; der Strahlengang muß gefaltet werden. Der Nachteil einer Faltung ist, daß weitere optische Elemente, wie Spiegel oder Prismen, in den Strahlengang eingebracht werden müssen, die zusätzliche Verluste erzeugen, die Justierung erschweren und die Langzeitstabilität erniedrigen. Eine mehrfache Faltung würde daher

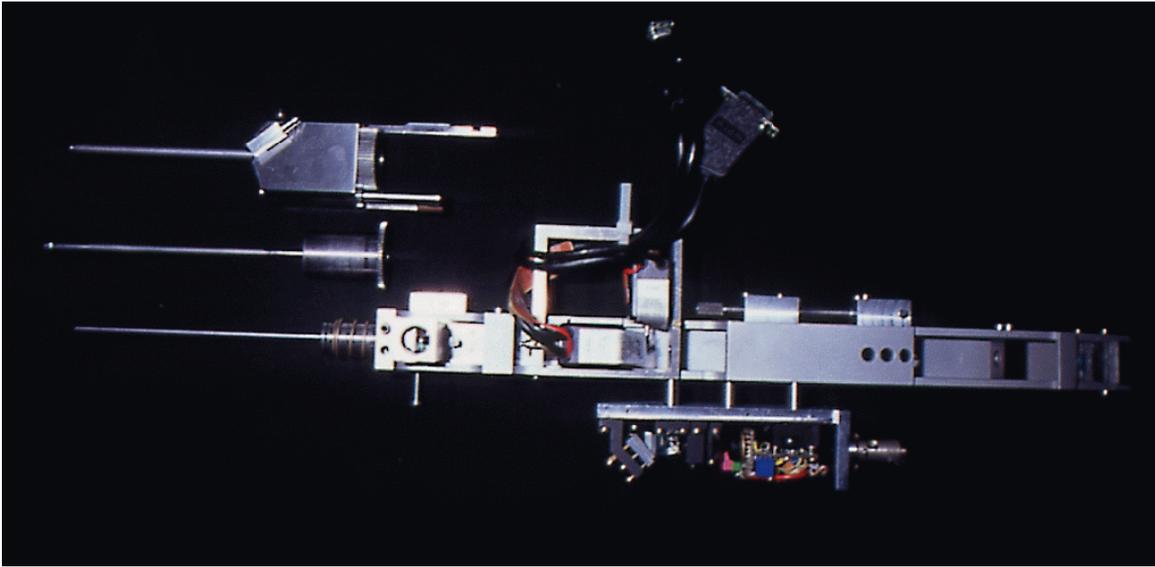


Abbildung 4.4: Photo des aufgebauten Mikroskops

nur den Aufwand erhöhen und die optischen Eigenschaften des Mikroskops verschlechtern. Eine einfache Faltung des Strahlengangs hat zudem den Vorteil, daß die schweren Bauteile des Mikroskops, wie die Scanner, nicht am Ende, sondern in der Mitte des Aufbaus angebracht werden können. Dies sorgt für eine stabilere Positionierung am stereotaktischen Bogen, auf den nur ein geringes Drehmoment wirkt. Abbildung 4.3 zeigt den schematischen Aufbau des konfokalen Mikroskops, integriert in die Sonde, und Abb. 4.4 zeigt eine Photographie des realisierten Aufbaus.

### 4.2.2 Scanfeldgröße

Die gewählte Geometrie der Sondenspitze, insbesondere die Länge und der Durchmesser, beeinflusst die erreichbare Scanfeldgröße.

Mit Hilfe des Strahlensatzes läßt sich diese Größe geometrisch berechnen. Entscheidend sind der Durchmesser der oberen Öffnung des inneren Rohres, der Abstand dieser Öffnung vom Drehpunkt des Strahls und der Strahldurchmesser. Je nach Geometrie könnte auch die untere Öffnung eine Rolle spielen, hier jedoch wird sich zeigen, daß diese Öffnung keine weitere Einschränkung mehr darstellt.

Es gilt (siehe Abb. 4.5):

$$\frac{a_1}{r_1} = \frac{a_2}{r_2} \quad . \quad (4.2)$$

Die obere Öffnung des Sondenrohres hat einen Durchmesser von 2.8 mm und ist

$$135 \text{ mm} - 33 \text{ mm} - 9 \text{ mm} = 93 \text{ mm}$$

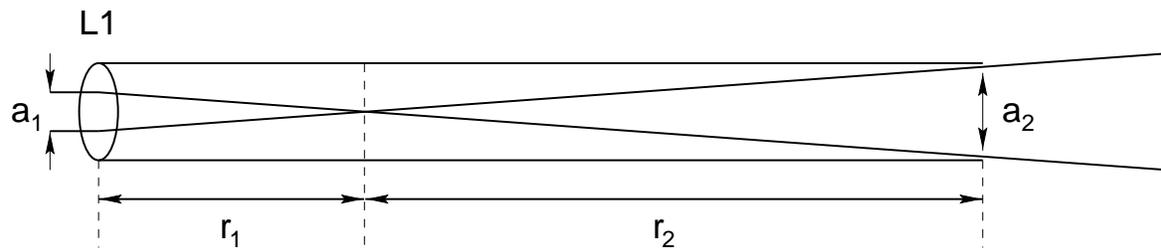


Abbildung 4.5: Skizze zu Gleichung (4.2)

von der hinteren Fokalebene der Fokussierlinse L1 entfernt. Nur innerhalb dieser Öffnung kann der Diagnostiklaser gescannt werden. Für die maximale Scandiagonale gilt also:

$$dia = a_1 = a_2 \frac{r_1}{r_2} \quad (4.3a)$$

$$= (2.8 \text{ mm} - d) \cdot \frac{33 \text{ mm}}{93 \text{ mm}} \quad (4.3b)$$

Die Größe des Scanbereichs hängt vom Durchmesser  $d$  des Strahls in dieser Rohröffnung ab. Gleichzeitig beeinflusst der Strahldurchmesser die Fokusgröße auf dem Objekt und damit die Auflösung des Mikroskops. Aus der Wellenlänge  $\lambda = 685 \text{ nm}$ , der Brennweite  $f = 33 \text{ mm}$  und dem Strahldurchmesser  $d$  kann mit Gleichung (3.4)

$$d_0 = 4 \cdot \frac{685 \text{ nm} \cdot 33 \text{ mm}}{\pi \cdot d} \quad (4.4)$$

der Durchmesser des Beleuchtungsfokus berechnet werden. Zwischen Scanfeldgröße und Auflösung muß ein Kompromiß gefunden werden. Ziel hierbei ist es, das Scanfeld in 20 Bildpunkte zu unterteilen, während Fokusdurchmesser und Punktabstand etwa übereinstimmen. In Abbildung 4.6 sind dazu beide Bedingungen aufgetragen. Der Schnittpunkt beider Kurven ist der optimale Strahldurchmesser, und man erhält  $d = 0.82 \text{ mm}$ . Damit beträgt der Fokusdurchmesser  $35 \mu\text{m}$  und die Scandiagonale  $0.7 \text{ mm}$ . Wie sich zeigte, ist dieser Durchmesser sehr gut ohne weitere Optik im Beleuchtungsstrahlengang zu erreichen, da der Laserstrahl hinter dem Kollimator des Faserkopplers den Durchmesser  $d = 0.8 \text{ mm}$  besitzt.

### 4.2.3 Fokus in der Pinholeebene

Um die Größe der Lochblende vor dem Detektor festzulegen, ist der theoretische Fokus des Detektionsstrahls in der Ebene der Lochblende zu bestimmen. Nimmt man an, das reflektierte Licht, das den Rückweg bis in den Detektionszweig findet, hat den gleichen Durchmesser wie der Beleuchtungsstrahl und ist ebenso parallel, kann man die Größe

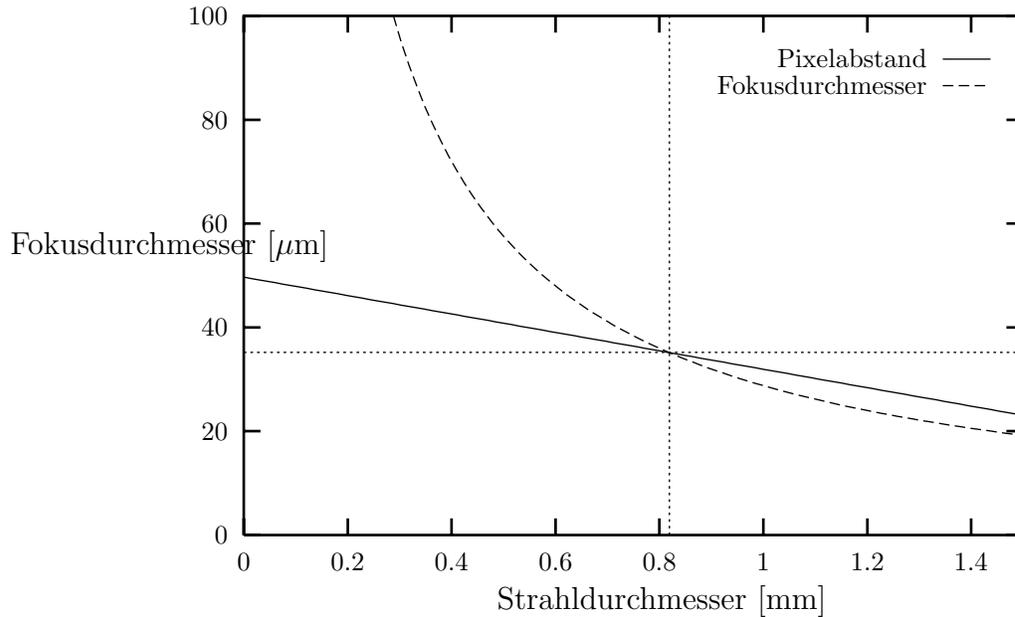


Abbildung 4.6: Bestimmung des optimalen Strahlquerschnitts

des Fokus dieses Strahls in der Lochblendenebene vor dem Detektor bestimmen. Da die Brennweite der Detektionslinse (L4 in Abb. 4.3) 10 mm beträgt, gilt für die Radien

$$w_0 = \frac{685 \text{ nm} \cdot 10 \text{ mm}}{\pi \cdot 0.4 \text{ mm}} = 5.5 \mu\text{m} \quad (4.5)$$

und damit für den Durchmesser des Fokus

$$d_0 = 2w_0 = 11 \mu\text{m}. \quad (4.6)$$

Außerhalb dieses Durchmessers befindet sich noch  $1/e^2$  der Intensität des als gaußförmig angenommenen Strahls. Um möglichst die gesamte Intensität mit dem Detektor aufzufangen, muß das Pinhole zwei bis drei mal größer als dieser Durchmesser sein. Das nächstgrößere und verfügbare Pinhole hat eine Öffnung von  $50 \mu\text{m}$  und wurde hier verwendet.

### 4.3 Mechanischer Aufbau des Mikroskops

Um die Sonde mit dem Mikroskop unter stereotaktischer Führung einsetzen zu können, muß der gesamte Aufbau mit einem stereotaktischen Zielsystem positionierbar sein. Da diese Systeme in der Regel zur Führung dünner und leichter Nadeln konstruiert sind, mußten die Sonde und das Mikroskop möglichst leicht und kompakt aufgebaut werden. Wie in Abschnitt 4.2.1 auf Seite 38 beschrieben, war die Länge des Lichtweges nicht beliebig wählbar, sondern auf etwa 80 cm festgelegt. Um die Sonde dennoch handhabbar

zu machen und besonders um sie am Zielsystem drehmomentarm befestigen zu können, war ein linearer Aufbau der optischen Elemente nicht möglich, der Strahlengang mußte gefaltet werden.

Das schwerste Bauteil stellen die Galvanometerscanner mit ihrer Halterung dar. Wird der Strahlengang einmal gefaltet, so befinden sie sich sehr nahe am Verbindungspunkt der Sonde zum Stereotaxiesystem und die Hebel werden möglichst kurz gehalten. Eine dreifache Faltung würde dies wieder zunichte machen, erst eine vierfache würde diesen Vorteil wieder mit sich bringen, allerdings wäre der Längengewinn nur marginal, da durch die Montage der nötigen Umlenkspiegel der Aufbau wieder länger würde. Zusätzlich wird eine solche Konstruktion wesentlich empfindlicher gegen Störungen und der Justieraufwand würde stark vergrößert.

Zur Gewichtsreduktion sind alle Bauteile aus Aluminium gefertigt und in einem Vierkantrohr angebracht. An diesem Rohr ist ebenfalls das Linsenrohr der Sonde befestigt, so daß die Linse und das Mikroskop immer den gleichen Abstand besitzen. Zur Verschiebung des Fokus ist das gesamte Mikroskop auf kugelgelagerten Verschiebetischen geführt und mit der Führungsschiene verbunden.

Da die beiden Galvanometerspiegel den Strahl um  $90^\circ$  ablenken, sind die Einkopplung der Laserdiode und der Detektionszweig seitlich am Vierkantrohr befestigt.

## 4.4 Elektronik

Neben den optischen Komponenten sind zur Gewinnung digitaler gescannter Bilder auch diverse elektronische Schaltungen nötig. Zum einen müssen das Mikroskop und die Sonde gesteuert werden, und zum andern muß das Lichtsignal des Mikroskops in ein elektrisches Signal umgewandelt und aufbereitet werden, damit es vom Rechner digitalisiert werden kann.

### 4.4.1 Steuerung des Mikroskops

Zentrale Bauteile des Scanning-Mikroskops sind die beiden Galvanometer-Scanner. Ihre Auslenkung wird über die Regelung des Stroms durch ihre Spulen bestimmt. Um bei unterschiedlichen Frequenzen der Scanner und damit auch unterschiedlichen Auslenkungen bei gleichem Strom die Position sehr genau einstellen zu können, besitzen sie einen integrierten Positionsdetektor, der es ermöglicht, während einer Bewegung die Position zu überwachen und nachzuregeln. Mit Hilfe einer analogen PID-Regelschaltung kann der Spulenstrom so geregelt werden, daß die Galvanometerspiegelauslenkung über einen weiten Frequenzbereich proportional zur Eingangsspannung ist. Erst weit oberhalb der

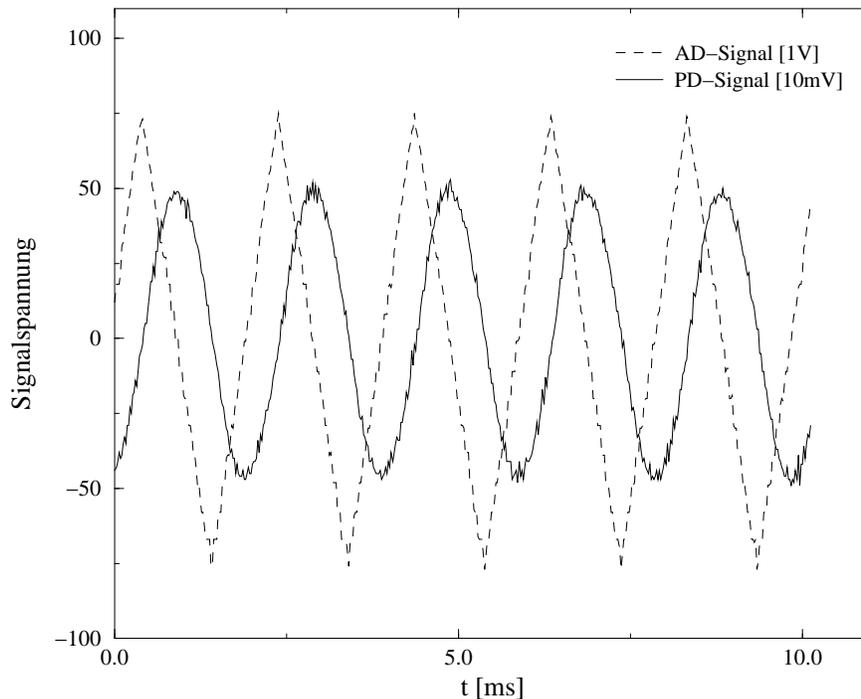


Abbildung 4.7: Galvanometeransteuerung (AD) und Positionssensorsignal (PD)

physikalischen Resonanzfrequenz von 50 Hz bricht die Amplitude ein, aber auch Frequenzen von 500 Hz sind noch mit ausreichender Amplitude zu erreichen. Bei der hier verwendeten Maximalfrequenz von 500 Hz werden die Galvanometerspiegel zwar noch ausreichend ausgelenkt, ihre Bewegung folgt allerdings nicht mehr direkt dem Ansteuersignal; sie führen nahezu eine Sinusschwingung aus und haben zum Eingangssignal eine Phasenverschiebung von  $90^\circ$ . Durch die Ansteuerung mit einem Dreieckssignal ist diese Bewegung im Bereich des Nulldurchgangs sehr linear und zum Scannen geeignet. In Abbildung 4.7 sind das Signal des Analogausgangs der ADWIN8-Karte und das Positionssignal des Sensors im Galvanometerscanner aufgetragen.

Bei der Bildaufnahme muß allerdings die Phasenverschiebung berücksichtigt werden, damit die digitalisierten Intensitätswerte den richtigen Ortskoordinaten zugeordnet werden können. Da die Position der Spiegel über analoge Ausgänge der später in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Transputerkarte gesteuert wird, ist diese Korrektur während der Bildaufnahme möglich.

#### 4.4.2 Lichtquelle

Als Lichtquelle des Mikroskops dient eine Laserdiode Toshiba TOLD-9150 mit einer Wellenlänge von 684.6 nm und einer Nennausgangsleistung von 30 mW. Um ihre Le-

bensdauer zu verlängern, wird sie jedoch nur mit  $\frac{2}{3}$  ihrer Nennleistung betrieben. Zur Regelung der Laserdiodenleistung wird ein Netzteil SK9710 der Firma Schäfer & Kirchhoff eingesetzt. Seine Aufgabe ist es, die Leistung der Laserdiode möglichst konstant zu halten. Die Leistung wird mit der in das Diodengehäuse integrierten Monitordiode gemessen und nachgeregelt. Dies ermöglicht ein besseres Einschaltverhalten, d.h. ein schnelleres Erreichen einer konstanten Ausgangsleistung, und den automatischen Ausgleich von Alterungsprozessen in der Laserdiode.

Zu beachten sind hierbei Rückreflexe der optischen Bauteile vor der Laserdiode, da diese Reflexe auch als Intensität mitgemessen werden, und eine Veränderung der Reflexe die Regelung dazu veranlaßt, den geänderten Ist-Wert nachzuregeln, obwohl sich die tatsächliche Ausgangsleistung nicht verändert hat.

Treffen diese Reflexe nicht nur auf die Monitordiode, sondern auch auf den aktiven Bereich der Laserdiode, wird ihre eigene optische Leistung über die externe Oberfläche zurückgekoppelt und man erhält einen parasitären zweiten Resonator. Die Konkurrenz der beiden Resonatoren führt zu Modenoszillationen und so zu starken Intensitätsschwankungen. Nur durch starkes Verkippen des Kollimators und der Strahlformungsoptiken ist eine Reduktion dieses Intensitätsrauschens möglich.

### 4.4.3 Signalaufbereitung

Nach dem Beleuchten des Objekts muß das reflektierte Licht auch wieder detektiert werden. Dazu wird es von einer Avalanche-Photo-Diode<sup>1</sup> (APD) aufgefangen und in elektrischen Strom umgewandelt. Eine solche Diode ist im Prinzip genauso aufgebaut wie eine gewöhnliche Photodiode, allerdings kann an sie eine Vorspannung von mehreren Hundert Volt<sup>2</sup> angelegt werden, ohne daß sie durchbricht. In der Diode erzeugte Ladungsträger werden im Feld der äußeren Spannung beschleunigt und können lawinenartig weitere Ladungsträger freisetzen.

Ein integrierter Vorverstärker wandelt den Photostrom in eine Spannung um, die weiter verstärkt werden kann. Ebenfalls integriert ist eine Temperaturmeßdiode, deren Vorwärtsspannung proportional zur Photodiodentemperatur ist. Sie dient der Korrektur des thermischen Offsetdrifts und der Änderung der Durchbruchspannung. Besonders die Offsetregelung ist für die Weiterverarbeitung notwendig, da nachfolgende Verstärker die durch diesen Drift erzeugte Spannung ohne Korrektur so stark verstärken würden, daß sie die Sättigungsspannung ausgeben würden. Die Temperaturabhängigkeit der Durchbruchspannung bewirkt eine Änderung der Verstärkung des Avalanche-Effektes und somit auch eine Temperaturabhängigkeit des Ausgangssignals.

---

<sup>1</sup>EG&G C30950E

<sup>2</sup>hier bis zu 340 V

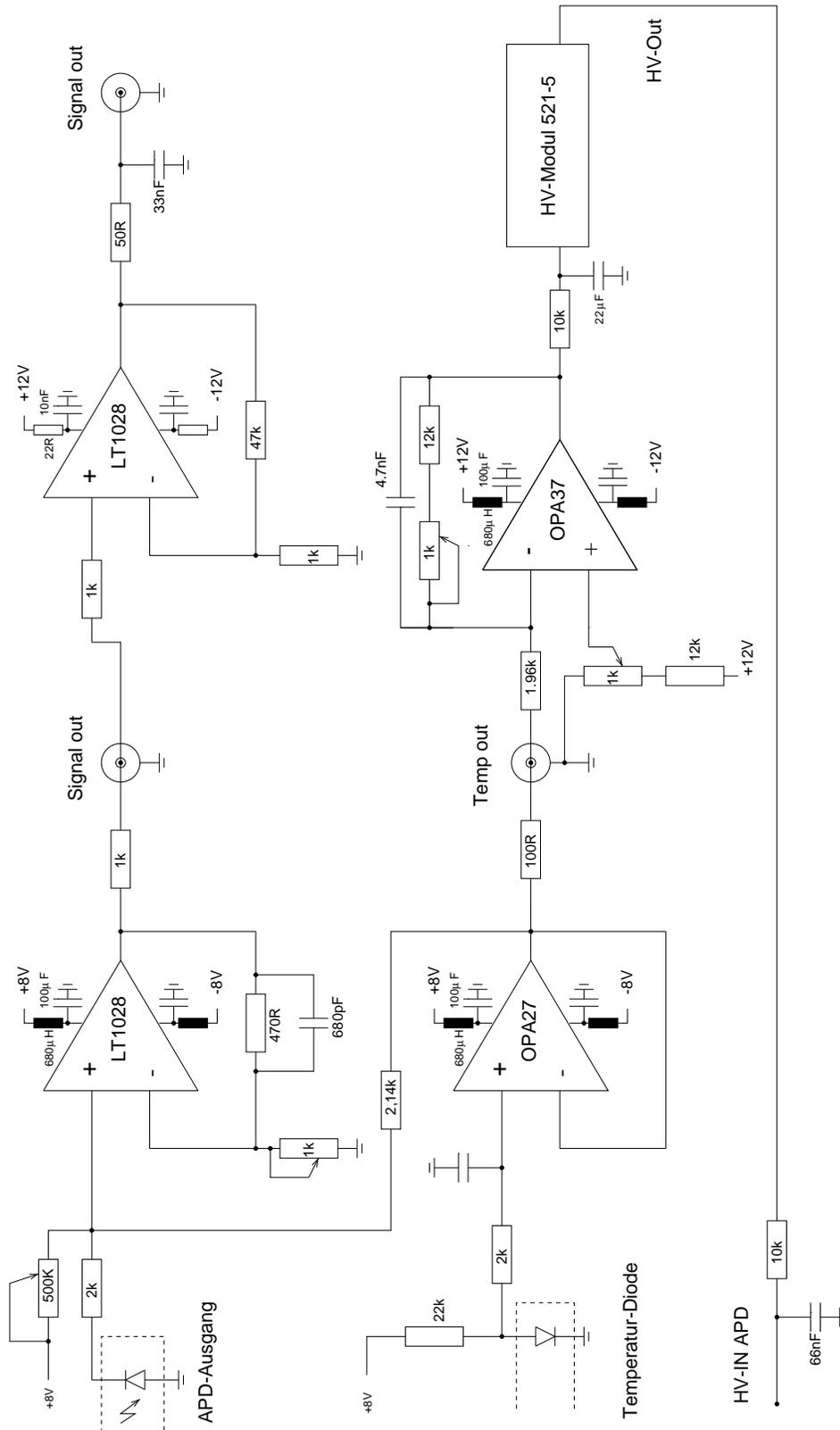


Abbildung 4.8: APD-Schaltung

In Abbildung 4.8 ist der Schaltplan der externen APD-Elektronik zu sehen. Die Temperaturdiode wird über einen Vorwiderstand mit 8 Volt Spannung versorgt, die an ihr abfallende Spannung wird mit einem als Spannungsfolger geschalteten Operationsverstärker impedanzangepaßt. Das so vorbereitete Signal wird über einen abgestimmten Widerstand auf die Ausgangsspannung der APD aufaddiert. An diesem Additionspunkt wird zusätzlich eine regelbare Spannung hinzuaddiert, um eine absolute Verschiebung des Nullpunktes zu ermöglichen.

Ein weiterer Ausgang des Temperaturverstärkers wird der externen Stromversorgung zugeführt, die die Hochspannung  $+0.7 \text{ Volt}/^\circ\text{C}$  nachregelt. Erreicht wird dies mit einem weiteren Operationsverstärker, dessen Verstärkung so eingestellt ist, daß er zusammen mit dem regelbaren HV-Modul 521-5 den Temperaturgang der Diode zu  $0.7 \text{ Volt}/^\circ\text{C}$  erzeugt.

Das eigentliche Signal kann, nachdem es von Temperaturdrifts und Offset befreit ist, mit einem noch am Mikroskop angebrachten rauscharmen und schnellen Operationsverstärker vom Typ LT1028 um den Faktor 50 verstärkt werden [Lin]. Nach einer weiteren extern angebrachte Stufe wird das APD-Signal mit einer Gesamtverstärkung von 2500 an die Analogdigitalwandler der Steuerkarte übergeben.

#### 4.4.4 Auswertung mit intelligenter AD-Karte und PC

Zur Echtzeitsteuerung der Sondenbewegung und der Galvanometerscanner sowie zur Bildgewinnung wird eine ADWIN8-Karte der Firma Jäger verwendet. Diese Karte besitzt neben digitalen und analogen Ein- und Ausgängen einen Inmos T 805 Transputer als eigenen Prozessor. Dieser ermöglicht die quasiparallele Abarbeitung mehrerer Prozesse unter Echtzeitbedingungen. Die Parallelverarbeitung wird vom Transputer durch eine Hardwareimplementierung des Schedulers, der die Prozeßzeit vergibt, unterstützt. Somit sind sehr kurze Umschaltzeiten zwischen Prozessen hoher Priorität möglich. Bei dem verwendeten T 805 mit 25 MHz Taktfrequenz beträgt die maximale Verzögerung 78 Takte [RS91], was einer Zeit von  $3.12 \mu\text{s}$  entspricht. Der ebenfalls on-chip eingebaute Timer mit einer Auflösung von  $1 \mu\text{s}$  ermöglicht so eine Synchronisation verschiedener Prozesse mit einer absoluten Genauigkeit von  $4 \mu\text{s}$ . Mit dieser Auflösung ist es möglich, frequenzkritische Prozesse wie die Schrittmotorsteuerung bei einer Frequenz von 2 kHz mit einem Fehler von 0.8 % anzusteuern, so daß eine gleichmäßige Bewegung ausgeführt wird. Noch kritischer ist die Ansteuerung der Galvanometerscanner, da diese über der Resonanzfrequenz betrieben werden. Werden sie nicht mit einer gleichbleibenden Frequenz angesteuert, ändert sich die Amplitude und die Phase im Vergleich zum Ansteuersignal und ihre Position ist nicht mehr genau genug bekannt.

Die Bilddaten werden über einen AD-Wandler der Karte mit 12-Bit Auflösung digitalisiert und in einem FIFO-Speicher<sup>3</sup> zwischengespeichert.

#### 4.4.5 Schrittmotoransteuerung

Über die digitalen Ausgänge steuert die ADWIN8-Karte die Schrittmotoren, die für die Bewegungen der Sonde zuständig sind. Aufgrund der unterschiedlichen Übersetzungen der Zahnräder ergeben sich für die einzelnen Bewegungen verschiedene Geschwindigkeiten; so entspricht eine Umdrehung des Spiegelrohres 2000 Motorschritten, eine Verschiebung des Spiegels um 1 mm 1500 Schritten und die gleiche Verschiebung der Linse 500 Schritten. Alle Bewegungen können gleichzeitig durchgeführt werden, so daß während der Rotation Linse und Spiegel verschoben werden können; ebenso ist eine gemeinsame synchrone Bewegung von Spiegel und Linse möglich, was einer Verschiebung der Tiefe des Ablationspunktes entspricht.

Um beim Anfahren und Stoppen der Schrittmotoren keine Schritte zu verlieren, werden die Bewegungen gleichförmig beschleunigt und abgebremst.

Aus der bekannten Formel für gleichförmig beschleunigte Bewegungen

$$s = \frac{1}{2}at^2 \quad (4.7)$$

folgt für die Zeit  $t$ :

$$t = \sqrt{\frac{2s}{a}} \quad (4.8)$$

und damit für die Ableitung der Zeit  $t$  nach dem Ort  $s$

$$\frac{dt}{ds} = \sqrt{\frac{1}{2as}} \quad (4.9)$$

Nimmt man als natürliche Schrittweite der Wegstrecke  $s$  gerade einen Motorschritt, gilt für die Zeit zwischen zwei Schritten

$$\Delta t = \sqrt{\frac{1}{2a}} \sqrt{\frac{1}{s}} \Delta s \quad (4.10)$$

Damit hängt diese Zeit nur noch vom Ort, d.h. der Anzahl der bereits zurückgelegten Schritte, ab. Der Faktor  $\sqrt{1/2a}$  ist eine Konstante, die die Länge des ersten Zeitintervalls bestimmt und die Länge der Beschleunigungsrampe beeinflusst. Das Zeitintervall  $\Delta t$  wird solange verkleinert, bis es gleich dem gewünschten Schrittimtervall während der Bewegung ist.

---

<sup>3</sup>First in first out: zuerst geschriebene Daten werden auch zuerst wieder ausgelesen

## 4.5 Programm zur Steuerung, Bildgewinnung und -darstellung

Die exakte Steuerung der Schrittmotoren übernimmt ein Programm auf der ADWIN8-Karte. Über Timer-Aufrufe können die Schrittingtervalle auf ca.  $4 \mu\text{s}$  genau eingehalten werden. Während der Zeit zwischen den Pulsen ist der Transputer frei und wird zur Bildaufnahme benutzt. Auch dieser Prozeß ist sehr zeitkritisch und muß deshalb mit hoher Präzision vom Transputer abgearbeitet werden.

Den dritten Prozeß auf der Transputerkarte stellt der Datenaustausch mit dem PC dar. Er ist insofern nicht zeitkritisch, da die Daten nicht zu exakten Zeiten übertragen werden müssen, allerdings muß der Transfer der anfallenden Daten in der gleichen Zeit bewältigt werden, in der sie digitalisiert werden, um eine unterbrechungsfreie Darstellung zu gewährleisten.

Die unterschiedliche zeitliche Priorität dieser Prozesse kann sehr gut auf dem Transputer nachgebildet werden. Er bietet nämlich zwei Prioritätsstufen an, die genau diesen Anforderungen entsprechen.

- Prozesse mit hoher Priorität können alle anderen Prozesse unterbrechen, sobald ein Ereignis eintritt, auf das sie warten. Solche Ereignisse sind das Erreichen einer bestimmten Zeit (Timerevents) oder Signale am Eventeingang der Karte.
- Prozesse mit niedriger Priorität können Prozesse mit hoher Priorität nicht unterbrechen, aber erhalten Rechenzeit, sobald diese nicht aktiv sind. Existieren mehrere Prozesse niedriger Priorität, so wird ihnen Rechenzeit in Zeitscheiben von je mindestens 1 ms zugeteilt.

Um den Prozessor optimal auszunutzen und das erforderliche Zeitverhalten der Programmteile zu erhalten, ist es erforderlich, in Prozessen hoher Priorität nur das unbedingt notwendige zu erledigen und alle zeitintensiven Tätigkeiten entweder im voraus oder in niedriger Priorität auszuführen.

### 4.5.1 Steuerung der Sondenbewegung

Das Modul zur Steuerung der Sondenbewegung hat die Aufgabe, die Schrittmotoren so anzusteuern, daß ihre Bewegung möglichst gleichmäßig und mit den Vorgaben aus Abschnitt 4.4.5 erfolgt. Die nötigen Zeitabstände können berechnet werden, und anschließend wird der Steuerprozeß in einen Wartezustand entsprechender Dauer versetzt. An Bewegungen sind neben den Einzelbewegungen der Komponenten, wie Spiegelrohrdrehung und -verschiebung, sowie Linsenrohrverschiebung, auch kombinierte Bewegungen

implementiert. Erstere dienen dem Anfahren bestimmter Anfangspunkte und der Eichung der Sondenposition, letztere der Bewegung des Fokus über die Gewebeoberfläche, um Gewebe abzutragen und um Bilder aufzunehmen.

Die kombinierten Bewegungen orientieren sich sehr am Abtragsverhalten des Ablationslasers, da dies die Hauptaufgabe der Sonde darstellt. So muß der Fokus möglichst schnell über das Gewebe bewegt werden, um die Überlagerung zu vieler Pulse an einer Stelle zu vermeiden. Andernfalls würden das Gewebe erwärmt und die Ablationseffizienz reduziert, da Pulse in bereits entfernte Volumina träfen. Es muß also die schnellste Bewegung der Sonde als Grundbewegung dienen. Dies ist die Rotation des SONDENSPIEGELS. Da der Durchmesser der Ablationszone eines einzelnen Laserpulses nach [Fis95] mindestens  $100\ \mu\text{m}$  beträgt, sollten die Pulse zum Erreichen einer flächendeckenden Ablation mit einem Abstand von  $50\ \mu\text{m}$  auf dem Gewebe plazierte werden. Ist die Frequenz der Laserpulse fest, muß dazu die Rotationsgeschwindigkeit des Spiegels dem Abstand des Fokus von der Sondenachse angepaßt werden. Bei einer Pulsfrequenz von  $1\ \text{kHz}$ , wie sie für den klinischen Einsatz vorgesehen ist, muß deshalb die Rotationsfrequenz zwischen  $3.2\ \text{Hz}$  bei Ablation direkt am Sondenrohr und  $0.4\ \text{Hz}$  bei einem Radius von  $20\ \text{mm}$  variiert werden.

Bisher sind zur Ablation zwei Bewegungsformen implementiert. Die erste ist die Abtragung von Zylindermänteln, deren Höhe und Dicke, sowie der Vorschub der Höhe während der Rotation gewählt werden können. Dieser Vorschub bestimmt, nach welchem Drehwinkel die Höhe weitergestellt wird. Wird die maximale Höhe erreicht, wird der Fokus um die Ablationstiefe nachgefahren und die Höhenbewegung in umgekehrter Richtung fortgesetzt. Diese Bewegung eignet sich auch sehr gut zur Bildaufnahme, da sie sehr ruhig verläuft und eine große Fläche pro Zeit überstrichen werden kann.

Die zweite Bewegungsform zur Ablation ist die Abtragung von Segmenten. Dazu wird die Sonde nur in einem Segment gedreht, um in dieser Richtung gezielt Gewebe abzutragen. Ebenso wie bei ganzen Rotationen werden Höhe und Fokusabstand jeweils an den Umkehrpunkten nachgestellt. Diese Bewegungsform erfordert allerdings in den Umkehrpunkten der Rotation sehr starkes Abbremsen und Wiederbeschleunigen, wodurch Vibrationen erzeugt werden und im Mittel eine geringere Fläche pro Zeit überstrichen werden kann. Durch die Art des Antriebs, der, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, über biegsame Wellen erfolgt, ergeben sich zusätzliche Pausen der Rotation, da das Spiel der Wellen erst überwunden werden muß. Für den Bildaufbau ist dies natürlich störend, da die Sondenposition nicht mit der Schrittzahl der Motoren übereinstimmt. Berücksichtigt man jedoch diese Rotationspausen, kann auch in diesem Fall ein einigermaßen zusammenhängendes Bild erzeugt werden. Zur Kommunikation mit

den übrigen Prozessen dienen gemeinsame Variablen, die sowohl die Bewegung unterbrechen können, als auch der Scanroutine die aktuelle Position der Sonde mitteilen.

### 4.5.2 Bildaufnahme

Das zweite zeitkritische Modul stellt die Bildaufnahme dar. Aufgabe dieser Routine ist es, die Galvanometerscanner anzusteuern und an genau definierten Positionen der Scannerspiegel die Intensität der Avalanche-Photodiode zu digitalisieren.

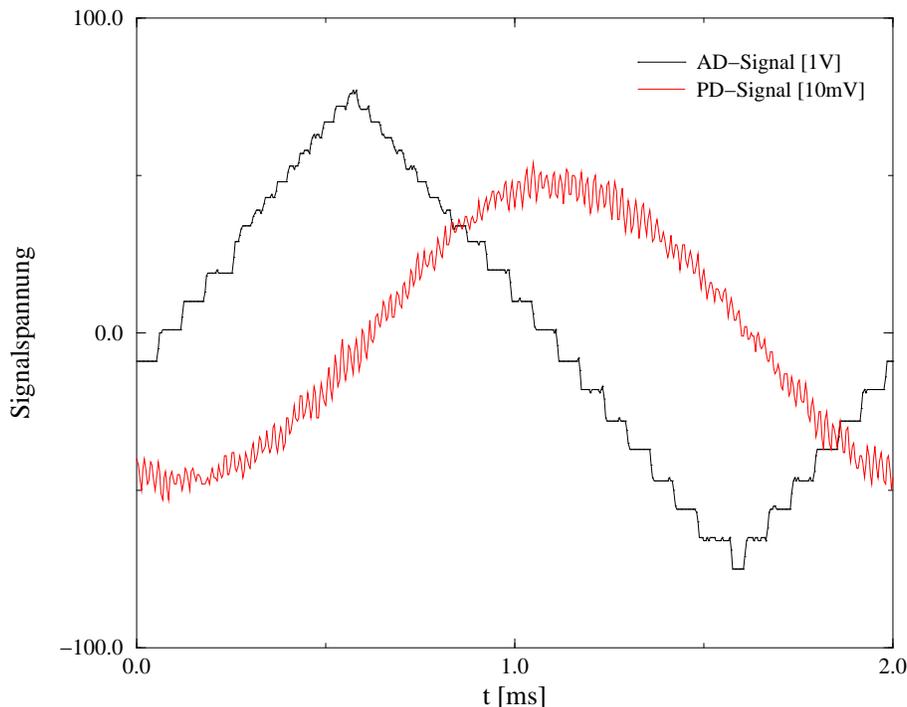


Abbildung 4.9: Galvanometersteuerung (AD) und Positionssensorsignal (PD)

In Abbildung 4.9 ist das Signal dargestellt, das die Galvanometerbewegung steuert. Es handelt sich um eine Dreiecksfunktion, die mit einer Treppenfunktion einzelner Digitalwerte erzeugt wird. Um Prozessorzeit zu sparen, wird außerhalb des Digitalisierungsintervalls (zwischen 0.25 und 0.75 ms im Diagramm) mit Intervallen doppelter Dauer angesteuert. Die eigentlichen Datenaufnahme erfolgt also nur in einem Viertel der Schwingungsdauer. Dies ist erforderlich, da zum einen nur in einer Richtung gescannt werden kann — Hin- und Rückweg stimmen nicht mit ausreichender Genauigkeit überein. Zum anderen kann nicht die gesamte Bewegung ausgenutzt werden, da aufgrund der Trägheit die Spiegelbewegung eher sinusförmig ist. Die Bereiche an den Umkehrpunkten sind nicht linear, um gleiche Pixelabstände zu gewährleisten. Darum wird nur in der Nähe des Nulldurchgangs digitalisiert, die restliche Bewegung dient nur

der Richtungsumkehr dem sogenannten Overscan. Die 20 Digitalwerte werden also innerhalb von  $500 \mu\text{s}$  aufgenommen, was einer Aufnahme­frequenz von 40 kHz entspricht. Zur Zwischenspeicherung werden die Werte in einen FIFO-Speicher geschrieben, von wo aus ein unabhängiger Prozeß niedriger Priorität die Daten wieder ausliest und an den PC weitergibt. Zusätzlich zu den eigentlichen Daten werden die Sondenpositionen wie Rotationswinkel und Höheneinstellung mit jeder Scanzeile aufgezeichnet.

a) Ohne Rotationsausgleich:



b) Mit Rotationsausgleich:

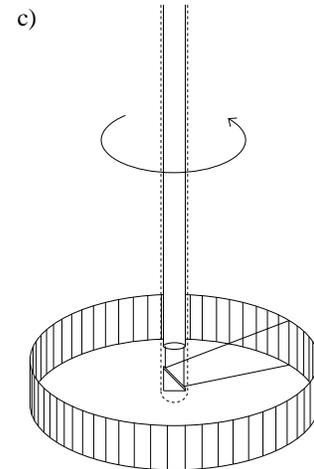


Abbildung 4.10: Rotationsausgleich beim Linienscan

Um die Sondenrotation auszugleichen, muß die jeweilige Position des Spiegels berücksichtigt werden. In Abbildung 4.10 ist in a) der Verlauf der Scanlinien auf der Objekt­ebene dargestellt, wenn die Sonde rotiert und die Scanlinie in einer festen Richtung zum Sonden­grundkörper schwingt.

Wird die Scanlinie nun ihrerseits mit der Spiegeldrehung mitgedreht, kann erreicht werden, daß die Scanlinie immer in Richtung der Sondenachse zeigt und so ein möglichst großer zweidimensionaler Streifen digitalisiert werden kann (Abb. 4.10 b)).

Die Information über die Stellung des Spiegels erhält das Scanmodul direkt vom Steuermodul der Sondenbewegungen. Aus diesem Winkelwert kann die entsprechende Ansteuerung der Scannerspiegel wie folgt für die erste Viertel­periode berechnet werden:

$$x_{\text{pos}} = \cos(\alpha_r) \cdot \left(0.5 - \frac{n}{20}\right) \quad (4.11a)$$

$$y_{\text{pos}} = \sin(\alpha_r) \cdot \left(0.5 - \frac{n}{20}\right) \quad (4.11b)$$

Um nicht bei jedem neuen Winkel Sinus und Cosinus erneut ausrechnen zu müssen, bietet es sich an, die Werte zu tabellieren. Noch besser ist es die für die DA-Wandler benötigten Werte selbst zu tabellieren. Da die Bewegung für eine Winkelstellung jeweils mit Geraden angesteuert wird, reicht es aus, jeweils die  $x$ - und  $y$ -Abschnitte der Steigung zu speichern, aus denen dann jeweils die nächste Position durch einfache Addition

oder Subtraktion berechnet werden kann. Dies ist noch schneller als das Auslesen von fertig berechneten Werten, da Zugriffe auf den Hauptspeicher mehr Zeit benötigen, als Additionen von Registerwerten.

Das dritte Modul ist für die Kommunikation mit dem PC zuständig. Es empfängt Befehle des PC's und führt die entsprechenden Routinen auf dem Transputer aus. Entsprechend wartet es in einer Schleife immer auf einen Befehl des PC's, während der Prozessor frei für Prozesse hoher Priorität ist. Wichtigste Aufgabe ist allerdings die asynchrone Übertragung der Bilddaten des Scanmoduls an den PC. Da zur Darstellung der Daten 256 Farben ausreichen, können die Meßdaten von 12 Bit auf 8 Bit reduziert werden, wodurch die notwendige Datenübertragungsrate bei minimalem Informationsverlust halbiert werden kann.

### 4.5.3 Bilddarstellung

Auf dem PC angekommen, werden die Daten auf dem Bildschirm dargestellt. Dazu wird den digitalisierten Werten entsprechend ihrer Größe eine Farbe oder ein Grauwert zugeordnet. Um diese Zuordnung möglichst schnell auszuführen, wird eine Farbtabelle benutzt, die diese Umwandlung ohne weitere Berechnung ermöglicht. Als Farbtabelle stehen neben einer Grauwertskala verschiedene Glühskalen zur Verfügung, die sich etwas im Farbverlauf unterscheiden und so unterschiedliche Kontrastdarstellung ermöglichen.

Zur Anpassung der Intensitätswerte kann sowohl ein Offsetwert subtrahiert werden, als auch die Breite des dargestellten Intensitätsintervalls variiert werden.

Um Reflexe zu berücksichtigen, kann für jeden Bildpunkt der Untergrundwert einzeln gemessen und gespeichert werden, so daß nur die vom Objekt reflektierte Intensität berücksichtigt wird.

Mit einem weiteren Eichprozeß kann der Bildbereich bestimmt werden, der durch das Sondenrohr abgeschattet wird. Dazu wird das Bild eines optimal streuenden Objekts, wie z.B. eines weißen Papiers, aufgenommen. Die abgeschatteten Bereiche werden nicht die maximale Intensität erreichen und sind damit zu erkennen. Bei der Darstellung werden Werte aus diesen Bereichen einfach nicht dargestellt, so daß sie Werte aus vorherigen Messungen nicht überschreiben.

Zur Darstellung wird eine Bildschirmauflösung von  $1024 \times 768$  Pixeln gewählt, da so jeweils eine halbe Rotation von 1000 Winkeleinstellungen als Streifen auf dem Bildschirm in  $x$ -Richtung dargestellt werden kann. Die zweite Hälfte der Rotation wird in der unteren Bildschirmhälfte angezeigt. In  $y$ -Richtung ist die Höhe der Pixelposition im Gehirn kodiert. Die Information über die aktuelle Position des Fokus wird in der rechten unteren Ecke in Form der Koordinaten von Höhe und Fokustiefe angezeigt.

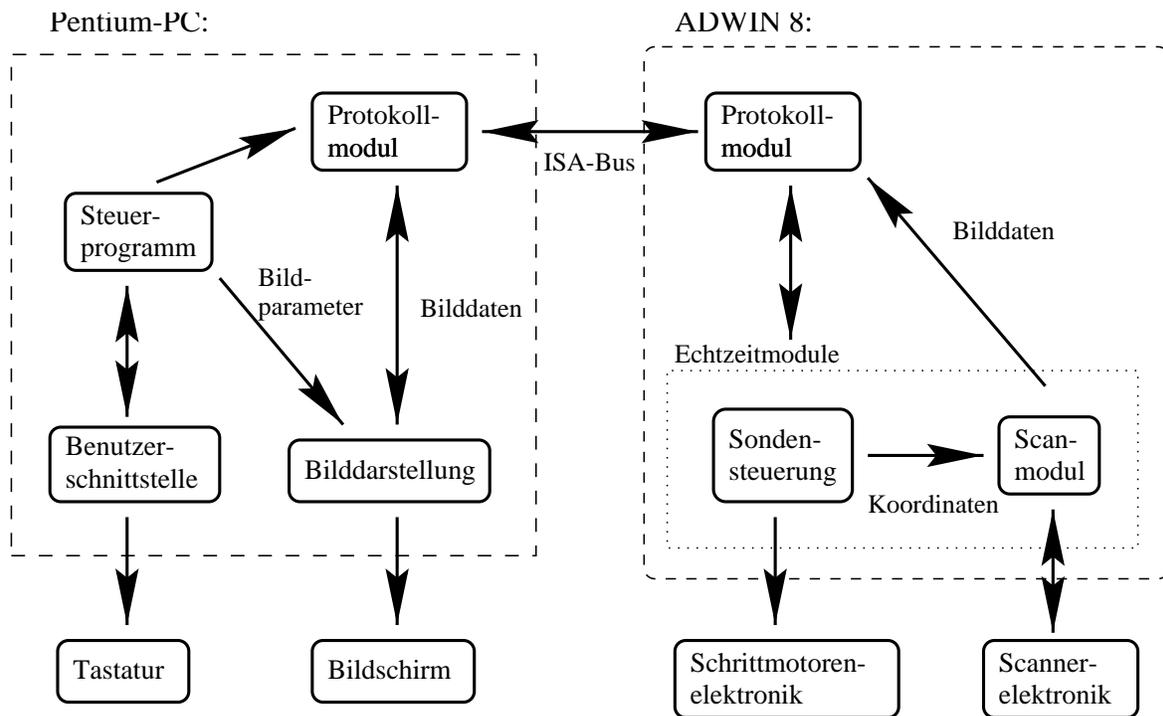


Abbildung 4.11: Verteilung der Programmfunktionen

Zu sehen ist ein solcher Bildschirmaufbau in Abbildung 6.11 auf Seite 71. Am unteren Bildrand ist zusätzlich jeweils die Farbskala dargestellt.

Die Kommunikation des Benutzers mit dem Programm wird alleine auf dem PC durchgeführt. Hier können sowohl die Bewegungen, als auch die Scanmuster und Bild-darstellungsparameter eingestellt werden. Anschließend werden die entsprechenden Befehle an die Transputerkarte übergeben und ausgeführt. In Abbildung 4.11 ist das Zusammenspiel der einzelnen Programmkomponenten mit den zwischen ihnen ausgetauschten Daten dargestellt.

# Kapitel 5

## Messungen

### 5.1 Vermessung der Apparatur

Zur Charakterisierung der Eigenschaften des Mikroskops und zu seiner Justierung wurden verschiedene Messungen und Tests durchgeführt.

#### 5.1.1 Fokusmessung

In Abschnitt 4.2.2 wurde mit der Bestimmung des optimalen Strahldurchmessers auch der daraus resultierende Fokus des Mikroskopstrahls berechnet. In Abbildung 5.1 ist

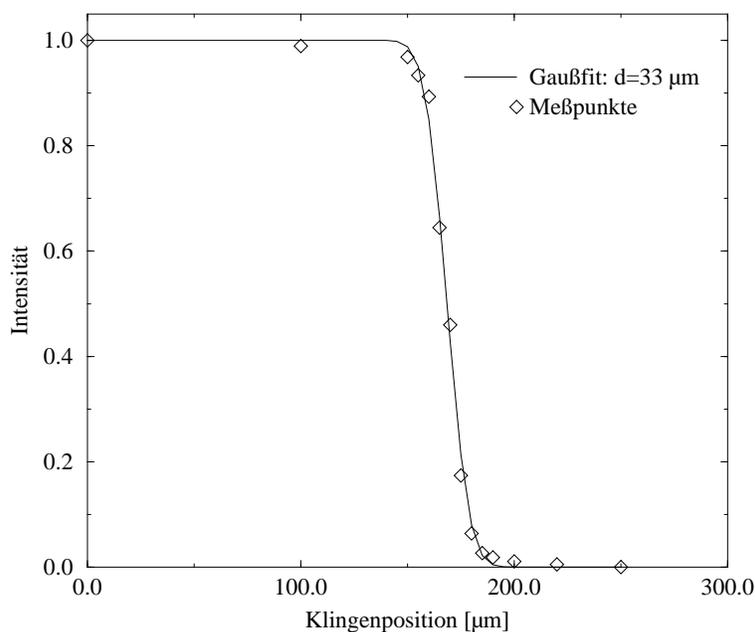


Abbildung 5.1: Messung des Fokusdurchmessers in der Brennebene, 36 mm vor der Fokussierlinse

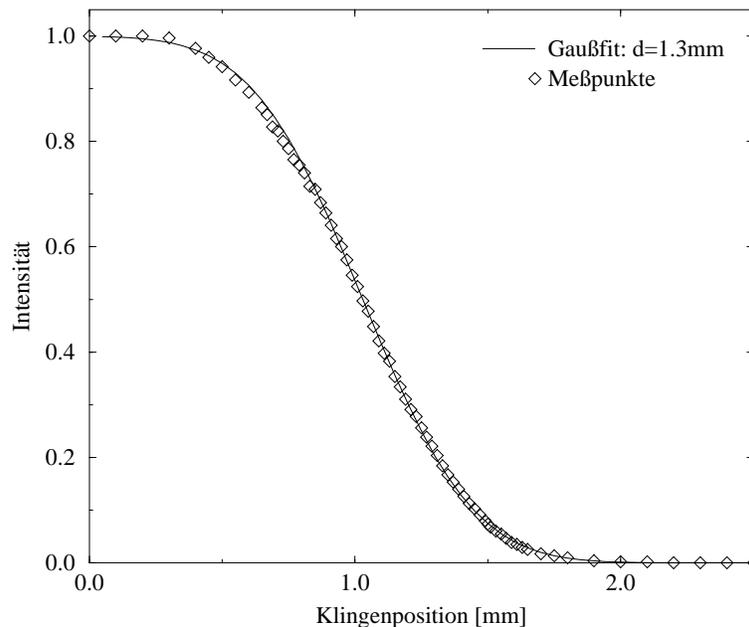


Abbildung 5.2: Messung des Strahldurchmessers vor der Fokussierlinse

die Messung des tatsächlich realisierten Fokus zu sehen. Die Messung wurde mit der Rasierklingenmethode ausgeführt, d.h. eine Rasierklinge wurde schrittweise seitlich in den Fokus geschoben und hinter der Klinge mit einer Diode die noch nicht verdeckte Leistung gemessen. Nimmt man an, es handle sich bei dem Strahl um einen Gaußstrahl, so ist das Einschieben der Klinge gerade eine eindimensionale Integration über die Intensitätsverteilung des Strahls. Durch Anpassung der Strahlparameter kann der Strahlquerschnitt bestimmt werden. Aus der Messung ergibt sich ein Fokusdurchmesser von  $33\ \mu\text{m}$ , der sogar noch kleiner als berechnet ist. Ursache hierfür könnte eine Dejustierung des Strahlquerschnitts sein, da dieser stark von der Position des Glasfaserendes direkt vor dem Einkoppelkollimator des Mikroskops abhängt. Änderungen dieser Position ergaben sich nach Neuberechnen des Faserendes, das nach Zerstörung der Faseroberfläche nötig wird. In Abbildung 5.2 ist eine Messung des Strahldurchmessers zu sehen, bei der der Strahldurchmesser vor der Linse mit 1.3 mm zu groß eingestellt ist.

### 5.1.2 Testmessungen

Zur Justierung des Mikroskops war es notwendig, genau bekannte Objekte aufzunehmen, um die Abbildungsqualität zu beurteilen. Dies stellt auch die einzige Möglichkeit dar, zu kontrollieren, wie gut der gescannte Laserstrahl durch das innerste Sondenrohr gelangt, oder ob er durch den Rand des Rohres verdeckt wird. Weiterhin kann so

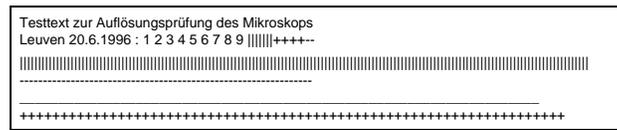


Abbildung 5.3: Gedrucktes Testobjekt in Originalgröße

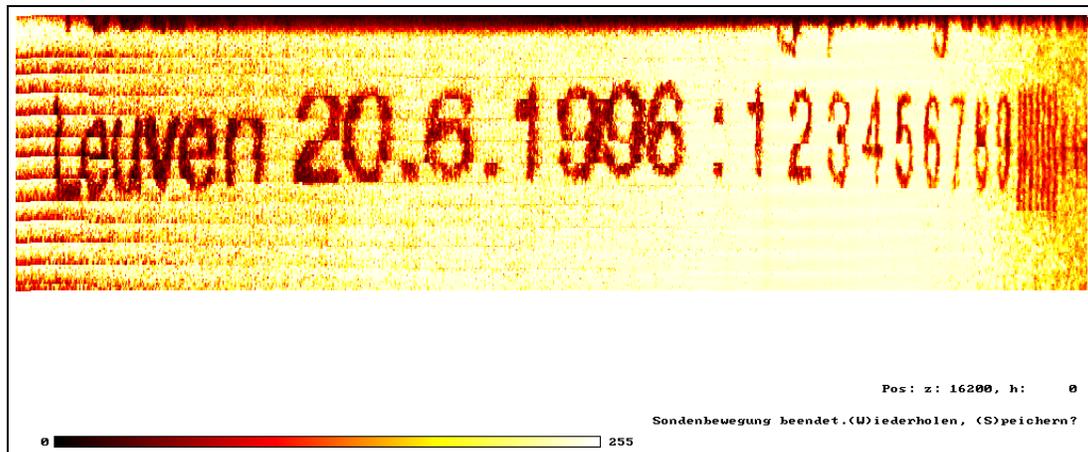


Abbildung 5.4: Testtext, mit dem Mikroskop aufgenommen

die Einstellung der Phasenverschiebung zwischen Scanneransteuerung und Signaldigitalisierung kontrolliert werden. Dazu wurde beispielsweise ein Text ausgedruckt und anschließend mit dem Mikroskop betrachtet. Abbildung 5.3 zeigt ein solches Testobjekt in Originalgröße, in Abbildung 5.4 ist das zugehörige Mikroskopbild zu sehen. Es zeigt einen Ausschnitt des Testobjekts, und zwar die zweite Zeile. Der gebogene Verlauf der Schrift ist darauf zurückzuführen, daß das Objekt nicht exakt in der Rotationsebene des Fokus ausgerichtet war, die Änderung des Abbildungsmaßstabs am rechten Ende des Ausschnitts wird durch den unterschiedlichen Abstand des Objekts von der Rotationsachse der Sonde hervorgerufen. Am linken Bildrand erkennt man noch die Streifenstruktur der Bildaufnahme, hier ist am unteren Ende der einzelnen Streifen eine Abschattung durch das Sondenrohr aufgetreten. Die Schrift ist gut lesbar, was zeigt, daß die einzelnen Streifen sehr gut zusammengesetzt werden können. Am unteren Bildrand ist die Farbkodierung des Bildes abgebildet, hier ist es eine Glühskala mit 256 verschiedenen Farben, die allerdings in diesem Ausdruck nicht alle dargestellt werden können.

# Kapitel 6

## in-vivo-Messungen

### 6.1 Experimente an Ratten

#### 6.1.1 Tierversuche in Köln

Das entscheidende Kriterium für die Funktionalität des konfokalen Laserscanning-Mikroskops ist die dem Arzt zur Verfügung gestellte Bildqualität, die einerseits durch die tatsächliche mikroskopische Bildauflösung, andererseits aber auch durch den Gesamteindruck des Monitorbildes bestimmt wird. Die mikroskopische Bildgüte wird dabei nicht allein von den physikalischen Parametern, die in Kapitel 5.1.2 ausführlich dargestellt wurden, sondern vor allem von den morphologischen Bedingungen bestimmt. Bei der Hauptaufgabe des Mikroskops, der Erkennung von Blutgefäßen, ist der detektier- und darstellbare Blutgefäß/Gewebe-Kontrast von besonderem Interesse. Realistische Abschätzungen des Potentials des Mikroskops sind mit einfachen Labormodellen kaum möglich. Deshalb müssen bereits in der Entwicklungsphase Tierversuche durchgeführt werden, wobei zum Test der grundsätzlichen Eigenschaften des Mikroskops zur Erkennung von Blutgefäßen Versuche an kleineren Tieren wie Ratten ausreichen. So wurden die ersten in-vivo Experimente mit dem Nd:YLF-Pikosekundenlaser und der stereotaktischen Lasersonde genutzt, um solche ersten Vorversuche an realistischen Strukturen durchzuführen.

Während eines Forschungsaufenthalts an der Neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik in Köln standen vierzig ausgewachsene Wistar-Ratten für erste Tests von einzelnen Komponenten des in Abschnitt 1.4 vorgestellten Gesamtsystems zur stereotaktischen Laser-Neurochirurgie zur Verfügung. Der gemeinsam mit den Ärzten in Köln erstellte Versuchsplan sah als einen Schwerpunkt die Abtragung von Hirngewebe mit dem Pikosekundenlaser und die histologische Bewertung der Schädigungszonen vor. Dabei war aufgrund der geringen Größe der Rattengehirne geplant, zunächst nur

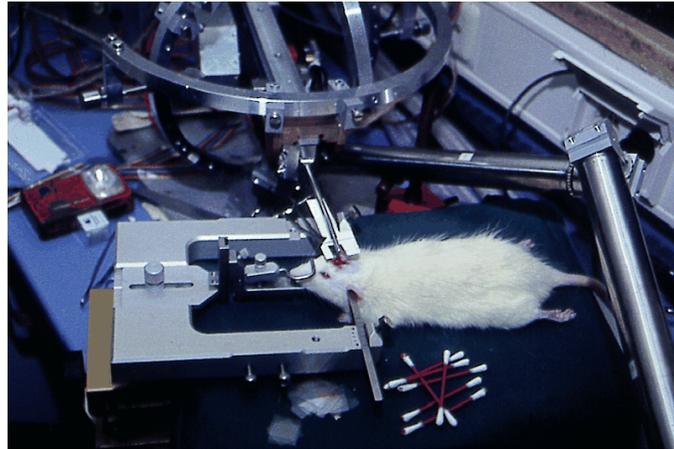


Abbildung 6.1: Aufnahme des Arbeitsbereichs im Tierlabor mit einer im Positioniersystem vorbereiteten Ratte

oberflächliche Ablationen – ohne Einstechen der Lasersonde in das Gewebe – vorzunehmen [Göt96]. Die Bewertung der Funktionalität der Lasersonde war jedoch auch von Bedeutung und konnte im Hinblick auf Positioniermöglichkeiten und klinische Einsetzbarkeit von den Ärzten, die die Möglichkeiten der neuen Operationsmethode beurteilen müssen, erstmals über einen längeren Zeitabschnitt getroffen werden. Einen anderen Schwerpunkt bildeten Druckmessungen des Hirninnendrucks bei Einführen des Drucksensors in das Gehirn. Weiterhin war aber auch vorgesehen, Bildsequenzen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufzunehmen und als zusammengesetzte Linien darzustellen.

Die Ratten wurden vor den Versuchen mit Nembutal betäubt und in einem speziellen Positioniersystem fixiert. Durch eine großflächige Entfernung des Schädelknochens wurde das Gehirn teilweise freigelegt. Die Lasersonde mit dem konfokalen Mikroskop wurde ohne genauere Orientierung an einem Stereotaxierahmen geführt und konnte in verschiedene Lagen relativ zur Schädelöffnung gebracht werden. Abbildung 6.1 zeigt die Lasersonde und das Positioniersystem und gibt einen Eindruck des Arbeitsbereichs auf dem Labortisch. Bei dem dargestellten Experiment handelt es sich um einen der letzten beiden Versuche, bei denen die Sonde möglichst tief in das Gehirn der Ratten eingeführt wurde. Bei gleichzeitiger Rotation der Sonde wurde der Druck gemessen, um die Einflüsse von Puls und Atmung der Ratte sowie der Spülung und der Sondenrotation auf diese Größe zu ermitteln.

In allen vorausgegangen Experimenten war die Sonde so positioniert worden, daß die Austrittsöffnung der Lasersonde quer zur Oberfläche bewegt werden konnte, um sowohl flächige Abtragungen als auch oberflächliche Bildaufnahmen realisieren zu können. Bei dieser Geometrie war ein Einsatz der Spülung nur sehr schwer möglich, da

das optische Design der Lasersonde erfordert, daß sich nach der Fokussierlinse nur noch entweder ein flüssiges Medium oder Luft, jedoch kein Gemisch mit unkontrollierbaren Brechungsindexübergängen befindet. Da dieser Raum nicht vollständig mit Wasser aufgefüllt werden konnte, blieb nur noch der Verzicht auf Spülung und Absaugung.

Nach den jeweiligen Versuchen wurden die Ratten durch Gabe einer Überdosis Nembutal getötet. Um die mit dem Laser bzw. durch den Sondeneinstich zugefügten Läsionen histologisch bewerten zu können, wurden sie zuvor perfundiert, um die Blutgefäße freizuwaschen.

### 6.1.2 Laserablation und histologische Bewertung

Da die in-vivo Experimente zur Laserablation im Mittelpunkt der Untersuchungen des Aufenthalts in Köln standen, sollen die Ergebnisse hier kurz zusammengefaßt werden. Ein in dieser Form nicht erwartetes Problem, das in ähnlicher Weise auch im Zusammenhang mit der Bildaufnahme mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop auftrat (siehe Abschnitt 6.1.3), stellte ein stets vorhandener dünner Blutfilm im Operationsgebiet dar.

Wegen des Verzichts auf die Spülung ergab sich für den Lasereinsatz die Anforderung, die Optik auf andere Weise vor aufspritzenden Blutströpfchen zu schützen. Dies war sowohl bei ersten Versuchen mit Einsatz der Lasersondenoptik notwendig, als auch bei späteren Experimenten mit einer frei aufgebauten Optik. Als beste Methode, die Optik sauberzuhalten, hat sich die Verwendung von Folienrollen erwiesen, die kontinuierlich zwischen der Fokussierlinse und der Schädelöffnung vorbeibewegt wurden. Außerdem wurden eine Spritze und ein gewöhnlicher Operationssauger benutzt, um die Gewebeoberfläche möglichst von Blut zu befreien. Dennoch beeinflußte das Blut die Fokussierung auf die Gewebeoberfläche so stark, daß eine quantitative Betrachtung der Ablationseffizienz kaum möglich war.

Im Vordergrund stand deshalb die histologische Bewertung der Schädigungen durch die Bestrahlung und den Gesamteingriff. Abbildung 6.2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts durch die Ablationszone. Die Probe wurde zur besseren Abgrenzung der Schädigungszone mit Hämalaun-Eosin (HE) eingefärbt, einem Farbstoff, der eine Übersichtsanfärbung mit besonderer Betonung der Zellkerne bewirkt. Entlang der Ablationskavität ist eine deutlich veränderte Zone zu erkennen, die als Reaktion des lebenden Gewebes auf den Eingriff gewertet werden muß, da solche Schädigungen in in-vitro Experimenten nicht nachgewiesen worden waren. Diese Ödemzonen, die bei allen Ratten in ähnlicher Ausprägung auftraten, waren innerhalb von etwa fünf Stunden, die die Ratten nach dem eigentlichen Eingriff am Leben belassen wurden, entstanden. Die Ausdehnung der Zone lag im Bereich von circa 300  $\mu\text{m}$ .



Abbildung 6.2: Histologischer Schnitt durch ein Rattengehirn, die Ablationszone ist links oben

Es kann nicht sicher gesagt werden, ob und inwieweit sich dieser Ödemsaum durch Heilungsprozesse wieder zurückbilden könnte.

### 6.1.3 Bildaufnahme

Das konfokale Laserscanning-Mikroskop wurde hauptsächlich an der Oberfläche der Rattengehirne eingesetzt. Da das Operationsgebiet in der Regel durch die Schädelöffnung bereits Blut enthielt, erwies es sich hierbei als schwierig, das Mikroskop gezielt auf eventuelle Blutgefäße auszurichten. Außerdem war aus dem selben Grund nur ein geringer Kontrast zu erwarten. In Abbildung 6.3 ist ein typisches Bildbeispiel einer

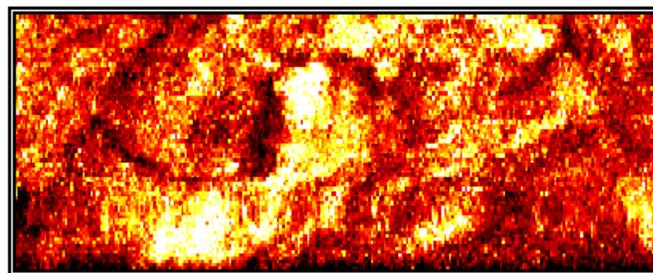


Abbildung 6.3: Mikroskopische Aufnahme einer Hirnoberfläche

solchen Aufnahme wiedergegeben. Es wurde nur ein Teil der Rotation zur Bildaufnah-

me benützt, da der Rest der Drehung nicht auf das Gewebe zeigte. Der Ausschnitt ist 3.2 mm hoch und überstreicht einen Winkel von  $72^\circ$ , was bei dem Abstand zur Oberfläche von 8 mm etwa einer Breite von 10 mm entspricht. Die Interpretation des Bildes hat sich im direkten Vergleich mit dem visuellen Eindruck als schwierig erwiesen. Die beiden dunklen Linien am linken und rechten Bildrand, die nach oben zur Mitte verlaufen, konnten als Rand der Schädelöffnung identifiziert werden, die Strukturen in der Mitte des Bildes waren dagegen nicht eindeutig im visuellen Bild identifizierbar. Insbesondere die Tatsache, daß im konfokalen Bild helle Stellen spekularen Reflexen an zum Laser senkrechten Oberflächen bedeuten und nicht unbedingt helle Strukturen selbst, macht einen solchen Vergleich schwierig. Deshalb muß man sich bei der Betrachtung der Bilder immer bewußt machen, daß weniger die Farbe des Objekts als vielmehr die Oberflächentopographie abgebildet wird.

Die ersten Ergebnisse der oberflächlichen Bildaufnahmen waren nicht sehr befriedigend, insofern sie keine eindeutig zuzuordnenden Blutgefäße erkennen ließen. Deshalb wurde an einem einzelnen Tier die etwa 1 mm dicke Halsschlagader freipräpariert und mit dem Mikroskop beobachtet. Das Ergebnis dieser Aufnahme ist in Abbildung 6.4 zu sehen.

Der Bildwinkel beträgt wie im vorherigen Bild  $72^\circ$ , kann aber nicht direkt in eine Breite umgerechnet werden, da sich das Objekt in unterschiedlichen Tiefen befand. Die Höhe ist 5.8 mm. Zum Vergleich ist in Abbildung 6.5 der Blick durch ein konventionelles Operationsmikroskop auf den gleichen Ausschnitt zu sehen. Die Halsschlagader ist das senkrechte verlaufende Gefäß in der Tiefe. Außerhalb des Bildes zweigt die von oben in der Mitte nach links unten verlaufende Schilddrüsenarterie ab. Rechts ist schlauchförmiges Fettgewebe erkennbar. Deulich wird, daß durch die geringe Tiefenschärfe des Mikroskops auch Objekte weit außerhalb des Fokus noch hell genug abgebildet werden, so daß sie indentifiziert werden können.

Der Blutgefäßkontrast ist also noch verbesserungsbedürftig, aber die optische Auflösung des Mikroskops ist groß genug, um die wichtigen Blutgefäße zu erkennen.

## 6.2 Experimente an größeren Tieren

Während eines dreiwöchigen Aufenthalts im Laboratorium für Experimentelle Neurochirurgie und Neuroanatomie der Katholischen Universität Leuven (Belgien) konnte die Lasersonde erstmals in tiefere Hirnareale eingeführt werden, um die Funktionalität verschiedener Systemkomponenten zu erproben. Hierbei wurden sowohl die stereotaktische Führung der Sonde mit Hilfe eines speziellen Positioniersystems für Hunde als auch ihre Sterilisierbarkeit getestet. Schwerpunktmäßig sollte die Verträglichkeit der Sondenbe-

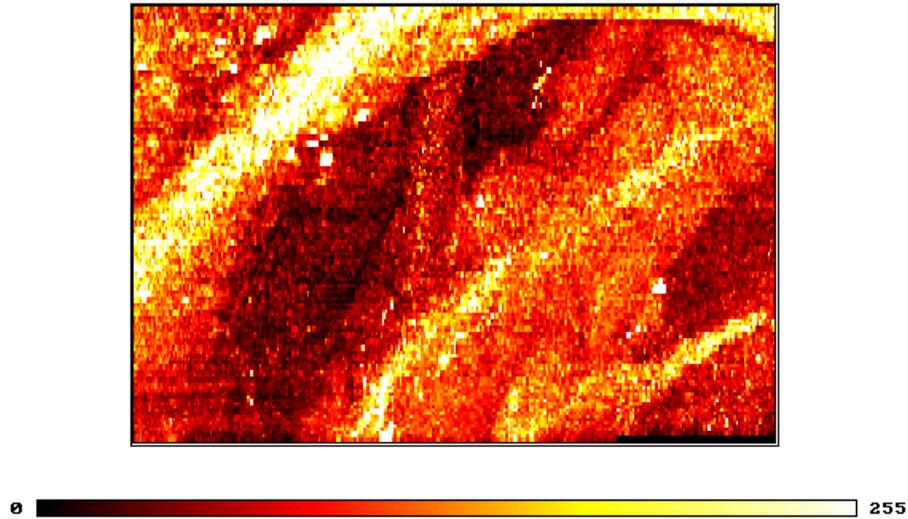


Abbildung 6.4: Mikroskopische Aufnahme der freipräparierten Halsschlagader

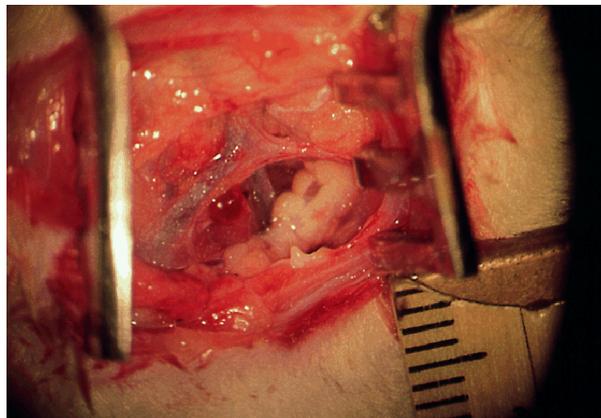


Abbildung 6.5: Aufnahme der freipräparierten Halsschlagader durch ein konventionelles Operationsmikroskop

wegung im Innern des Gehirns sowie der Spülung und Absaugung bei verschiedenen Flußraten und gleichzeitiger Messung des Hirninnendruckes untersucht werden. Gleichzeitig bestand jedoch die Möglichkeit, erste Bilder einer tiefliegenden Operationshöhle aufzunehmen.

Vor einem klinischen Einsatz der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie müssen die einzelnen Komponenten wie auch das Gesamtsystem unter möglichst realistischen Bedingungen getestet werden. Speziell muß die Lasersonde im Innern eines größeren Volumens eingesetzt werden, da sowohl die Laserablation als auch das integrierte Spül-/Saugsystem innerhalb abgeschlossener Operationshöhlen andere Eigenschaften zeigen als im oberflächlichen Einsatz. Zur Eingrenzung von Atmungs- und Pulsschlagar-

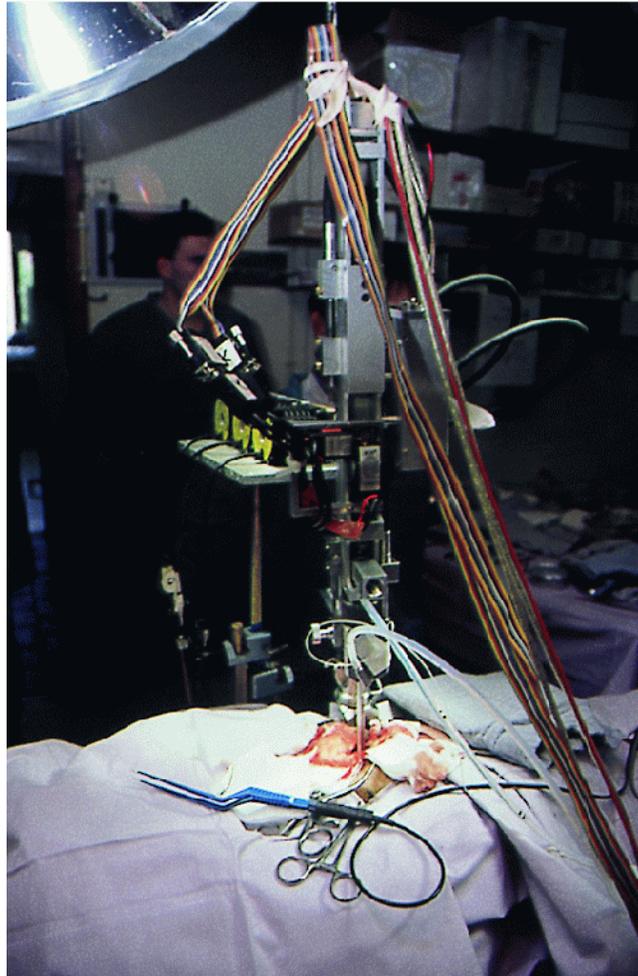


Abbildung 6.6: Ansicht des Tierlabors in Leuven

tefakten bei der Druckmessung ist die Erprobung an lebendigen Tieren mit großem Schädel unvermeidlich.

Die Entwicklung einer intraoperativen Blutgefäßerkennung setzt ebenfalls eine Erprobungsphase an größeren Tieren voraus. Einerseits müssen im Versuch dem menschlichen Gehirn vergleichbare Blutgefäßstrukturen existieren, andererseits sollten die physikalischen Eigenschaften des umliegenden Gewebes den beim klinischen Einsatz am Menschen zu erwartenden Bedingungen entsprechen. Diese ersten Experimente sollten dazu beitragen, die Mitbewegung des Gewebes bei der Sondenrotation zu bestimmen, um den Einfluß von Gewebeverschiebungen auf den Gesamteindruck des Mikroskopbilds abzuschätzen.

Ein etabliertes Versuchstier für solche Experimente stellen Beagles dar. In Leuven sind speziell Labors für stereotaktische Operationen an Hunden eingerichtet. Desweiteren existieren sehr gute anatomische Atlanten [DSSJ70] des Gehirns dieser Hunderasse,

so daß gezielte Eingriffe durchgeführt werden können. Bei diesem ersten Aufenthalt wurden zunächst nur zwei Beagles operiert. Sie wurden mit Nembutal in Vollnarkose versetzt und zusätzlich mit Xylokain lokal betäubt. Anschließend wurden sie in einem Fixierahmen positioniert. Während der gesamten Operation wurden die Beagles beatmet. Bei dem ersten Hund wurde mit einem Handbohrer ein einzelnes Loch mit einem Durchmesser von etwa 10 mm in den Schädel gebohrt, bei dem zweiten wurden vier Zugänge geschaffen. Vor dem Einführen der Lasersonde wurde die *dura mater* in der Größe des Bohrlochs ausgeschnitten, weil sie nur unter großem Druck von der Lasersonde durchdrungen werden könnte.

### 6.2.1 Sterilisierbarkeit

Die Operationen an den Hundehirnen wurden unter weitgehend realistischen Bedingungen durchgeführt. Für die Anwendung der Lasersonde bedeutete dies unter anderem die Notwendigkeit der Sterilisierung. In Leuven standen hierzu zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, die beide getestet wurden. Für die erste Operation wurde die Methode der *Hitzesterilisierung* gewählt, bei der auf die Geräte 30 Minuten lang eine Temperatur von 160° einwirkt. Da das konfokale Mikroskop sowohl aus elektronischen als auch aus Kunststoffteilen besteht, die diesen Bedingungen nicht ausgesetzt werden sollten, wurde nur der Sondenrundkörper mit den in das Gehirn einzuführenden Röhrchen sterilisiert. Dagegen wurde für die zweite Operation die gesamte Sonde in Ethylenoxid *gassterilisiert*; dieses Verfahren benötigt drei Tage.

In beiden Fällen wurde während der Operation so vorgegangen, daß zunächst der Hund auf dem OP-Tisch vorbereitet und erst nach der Schädelöffnung die Lasersonde über den Mikromanipulator an den Fixierahmen befestigt wurde. Um die Operationszeit möglichst kurz zu halten, sollten die Operationseinleitung durch das medizinische Personal und die Justierung und Eichung der Lasersonde durch das technische Personal sehr gut koordiniert werden. Bei der zweiten Operation ist es gelungen, beide Tätigkeiten parallel auszuführen.

Probleme bei der Hitzesterilisierung bereitete die nötige Montage des sterilen Linsenrohrs an den nicht sterilisierten Teil des Mikroskops, die nur in Zusammenarbeit einer sterilen und einer nicht sterilen Person unmittelbar vor der Operation vorgenommen werden konnte. Positiv ist zu vermerken, daß sowohl die Klebstoffverbindungen<sup>1</sup> als auch die Beschichtungen der Linse und des Umlenkspiegels nach der Sterilisierung keinerlei Schäden zeigten. Einen ausgesprochenen Vorteil hat dieses Verfahren darüber hinaus für kleine unabhängige Teile und für das benötigte Werkzeug, weil es in kurzer Zeit mit wenig Aufwand durchgeführt werden kann.

---

<sup>1</sup>med. zugelassener UV-Kleber Loctite 3345

Die Gassterilisation hingegen ermöglicht die Sterilisation der kompletten Sonde in justiertem Zustand. Beim Testen unmittelbar vor der Operation zeigte sich allerdings eine Verschiebung des Nullpunktes beider Galvanometerscanner, die jedoch leicht nachjustiert werden konnte. Zurückzuführen ist diese Verschiebung eventuell auf die oxidierende Wirkung des Sterilisationsgases Ethylenoxid. Es zeigte sich nämlich, daß alle nicht aus Edelstahl gefertigten Teile oberflächlich oxidierten. Dies könnte auch mit elektronischen Bauteilen des Positionssensors der Galvanometer geschehen sein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Sterilisation der Lasersonde mit beiden Methoden keine größeren Probleme aufzuweisen scheint. Über das langfristige Verhalten der Sonde bei wiederholten Sterilisationen kann allerdings noch keine abschließende Aussage gemacht werden, ebensowenig wie über die tatsächliche Güte der optischen Beschichtungen, die nur bei Einsatz des Ablationslasers beurteilt werden kann.

### 6.2.2 Positionierung der Lasersonde

Die Festlegung des stereotaktischen Zugangs wurde anhand von anatomischen Atlanten des Beaglegehirns getroffen. Um die unterschiedlichen Auswirkungen der Umgebung auf das Spül-/Saugsystem zu ermitteln, wurde bei der ersten Operation versucht, bei senkrechtem Einführen der Lasersonde sowohl einen Ventrikel als auch homogene Strukturen durchdringen zu können. Als günstiges Zielgebiet wurde der *nucleus caudatus* gewählt. Bei der zweiten Operation mußten in jeder Hemisphäre zwei Zugänge definiert werden.

Die Hunde wurden in einem speziellen Positioniersystem fixiert. Dieses legt die stereotaktischen Koordinaten mit zwei Ohrenstiften und einer Kieferklemme bezüglich zweier Schienen fest. Die quadratisch geformten Schienen dienen der Montage von Mikromanipulatoren, mit denen Operationswerkzeuge stereotaktisch geführt werden können. Um flexibel den Zugang wählen zu können, bietet der Mikromanipulator drei Translations- und zwei Rotationsfreiheitsgrade. Da seine eigentliche Aufgabe das Führen dünner und leichter Nadeln ist, kann er die Sonde nicht alleine tragen. Deshalb wurde das auf dem Manipulator lastende Gewicht der Sonde mit einem an der Decke befestigten Gegengewicht reduziert. Die Anordnung ist in Abb. 6.6 zu sehen.

Wie zu erkennen ist, mußten die Schrittmotoren, die zur Bewegung der Sonde nötig sind, noch neben der Sonde am OP-Tisch befestigt werden, so daß sie den Zugang zum Operationsbereich einschränkten. Zukünftig können aber auch die Schrittmotoren über dem Operationsgebiet angebracht werden, um dem Chirurgen mehr Raum zu bieten.

Das Einführen der Sonde erfolgte zunächst mit Hilfe des Mikromanipulators, indem die Sonde mit dem in Richtung der Sondenachse zeigenden Schlitten vorwärts bewegt wurde. Einen Eindruck der Operationssituation vermittelt Abbildung 6.7. Zur

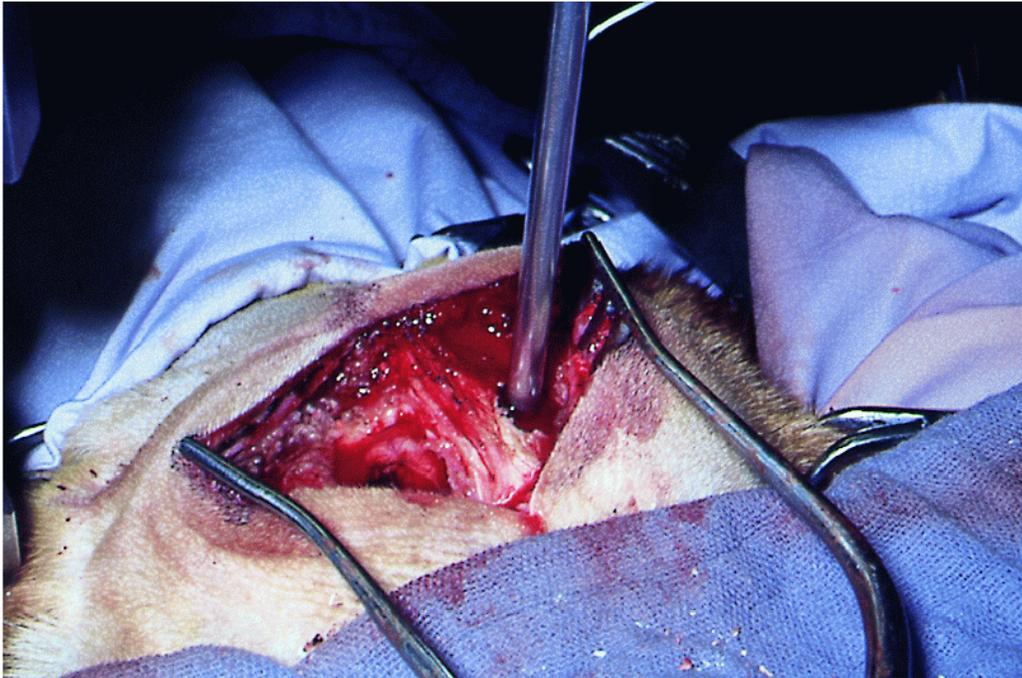


Abbildung 6.7: Einführen der Lasersonde

Festlegung des Nullpunkts wurden durch vorsichtiges Berühren des Cortex mit der Sondenspitze die Koordinaten der Oberfläche bestimmt, so daß im weiteren Verlauf der Operation stets die Tiefe des Einstichs überwacht werden konnte. Nach weiterem Einführen bis ins Zielgebiet konnten weitere Bewegungen mit den in die Sonde integrierten Verstellmöglichkeiten durchgeführt werden.

Zum Einführen wurde das mittlere Spiegelrohr weitestmöglich zurückgefahren. Diese Stellung erlaubte den frühesten Kontakt des Drucksensors mit dem Gewebe.

### 6.2.3 Durchführung der Experimente

Bei der Operation des ersten Hundes wurde zunächst ein Eindruck vom Eindringverhalten der Sonde in Gehirngewebe erhalten. Beim ersten Versuch, die Sonde einzuführen, wurde das Gehirn zur Seite gedrängt, weil die runde Sondenspitze die *pia mater* nicht durchstoßen konnte und in einen *sulcus* eindrang. Deshalb wurde die *pia mater* geöffnet und die Sondennullstellung erneut geeicht. Beim zweiten Einführen trat die Sonde durch die *pia mater* ein und bewegte sich in das Gehirn. Bis zur ersten Rotation wurde die Sonde 16 mm tief eingeführt, damit die seitlich angebrachte, dann 6 mm tief im Gehirn liegende Drucksonde Flüssigkeitskontakt zur Operationshöhle hatte. In dieser Position wurden insgesamt 30 Umdrehungen des Sondenrohres mit einer Frequenz von 0.75 Hz ausgeführt. Gleichzeitig wurden Druckkurven bei einer durchschnittlichen

Spülmenge von 30 ml/min aufgezeichnet. Im weiteren Verlauf der Operation wurde die Sondenspitze durch Weiterführen der gesamten Sonde und durch Auswärtsbewegen des Spiegelrohres bis zu einer maximalen Tiefe von 24 mm ins Gehirn eingeführt. Bei den Tiefen 20 mm und 24 mm wurde das Spiegelrohr nochmals rund 80 beziehungsweise 170 mal rotiert. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug dabei 0.2 Hz. Auch hier wurde kontinuierlich gespült. Die Beobachtung der Absaugflüssigkeit zeigte keinerlei Verfärbung, so daß es wahrscheinlich zu keinen Blutungen durch den Sondeneinstich und deren Rotation gekommen ist. Ebenso zeigten sich im Filter des Absaugkanals sichtbare Gewebestücke.

Bei der Position der Sondenspitze von 21 mm, bei der sich die Absaugöffnung in einer Gewebetiefe von 10 mm befand, strömte durch diese Öffnung kurzzeitig Luft und zuvor abgesaugte Kochsalzlösung mit großem Druck in die Operationshöhle zurück. Die Ursache dieses Zwischenfalls war ein Überdruck im Absauggefäß, der sich beim Abschalten der Pumpen durch den Absaugkanal entspannte.

Bei der Operation des zweiten Hundes sollte mit verschiedenen Einstichen der Laser-sonde der Einfluß der durch die Sonde selbst, durch die zusätzliche Rotation und durch die kontinuierliche Spülung hervorgerufenen Schädigungen ermittelt werden. Deshalb wurde in einem ersten Bohrloch die Sonde bei vernachlässigbarer Spülflußrate, die lediglich der Benetzung der Sondenspitze diente, bis zu einer Tiefe von 25 mm eingeführt und nach etwa 2 Minuten ohne weitere Aktionen wieder herausgenommen. In einem anderen Bohrloch wurde die Sonde genauso tief ohne jegliche Spülung eingeführt. Als dritte Variation wurde die Sonde in Tiefen von 12 mm und 22 mm jeweils etwa 10 Minuten lang mit 0.2 Hz rotiert; gleichzeitig wurde mit Flußraten von 20 beziehungsweise 30 ml/min gespült. Abschließend wurde eine sehr hohe Flußrate eingestellt. Aufgrund eines starken Ödems konnte der Einfluß der Spülung allein, d.h. ohne Rotation des Sondenrohres, nicht mehr getestet werden, so daß das vierte Bohrloch ungenutzt blieb. Auch hier war die abgesaugte Spülflüssigkeit blutfrei, allerdings zeigten sich beim dritten Einstich sichtbare Gewebefragmente.

#### 6.2.4 Histologie

Zur histologischen Auswertung wurde der erste Hund zwei Tage nach dem Eingriff perfundiert. Bis dahin war er beobachtet worden und hatte keine Verhaltensstörungen gezeigt. Der zweite Hund wurde aufgrund des aufgetretenen Ödems noch in Narkose perfundiert. Von beiden Hirnen wurden histologische Schnitte erstellt, die in Abb. 6.8 und 6.9 zu sehen sind. Der AP-Schnitt<sup>2</sup> von Hund 1 zeigt im oberen Einstichbereich (erster cm) nahezu keine Schädigung des durchstochenen Gewebes, erst in der Tiefe ist

---

<sup>2</sup> *anterior-posterior*: Schnitt von vorne nach hinten

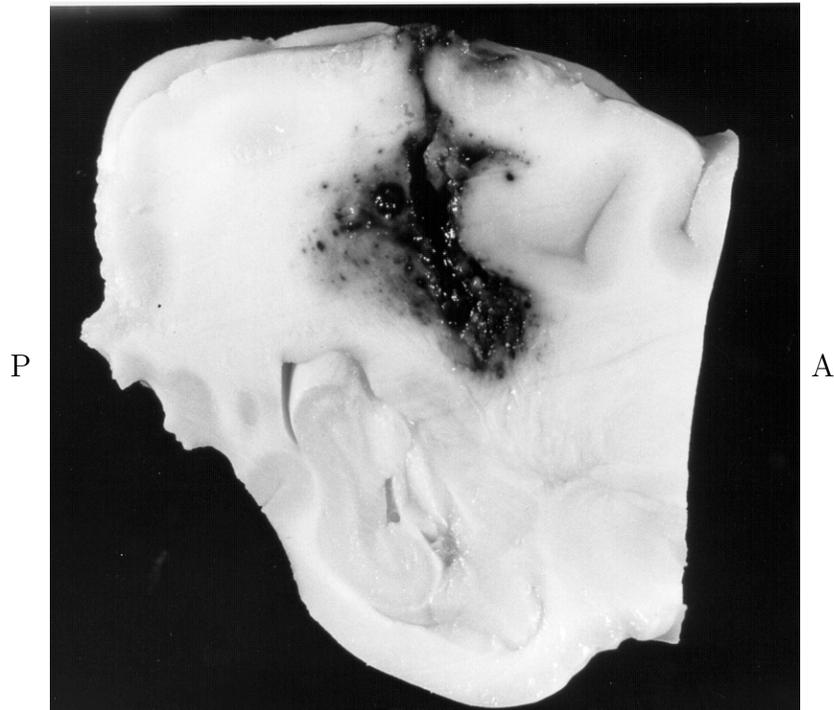


Abbildung 6.8: AP-Schnitt durch das Hirn des 1. Hundes

eine Ödemzone mit größeren Ausläufern zu sehen. Die Ursache dieses Ödems konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden, aber eventuell ist der Überdruck infolge des Zwischenfalls (s.o.) verantwortlich.

Auch beim zweiten Hund wurde das Gehirn anschließend fixiert und an den interessanten Stellen geschnitten. Ein Schnitt durch die Region des 2. Einstichs ist in Abbildung 6.9 dargestellt. Zu sehen ist der 25 mm tiefe Einstich, der auch in der Tiefe nur eine geringe Schädigung zeigt, die über die ganze Länge nahezu gleich ausgeprägt ist. Allerdings kann die genaue Bewertung erst nach der histologischen Auswertung erfolgen.

### 6.2.5 Bildaufnahme

Während der Operation des ersten Hundes wurde auch das Konfokale Mikroskop getestet. Jeweils bei Rotationen, die der in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Bewegung für die Ablation mit dem Pikosekunden-Laser entsprechen, wurden Bilder aufgenommen, angezeigt und abgespeichert. Bei einer Tiefe der Sonden Spitze von 19 mm wurde die erste Bildgebung gestartet und bis 20.1 mm aufgenommen. Hierbei war der Fokus des Mikroskops auf 11 mm Abstand zur Sondenachse eingestellt, obwohl das Sondenrohr Kontakt zur Gewebeoberfläche hatte. Aus diesem Grunde war das gewonnene Bild dun-

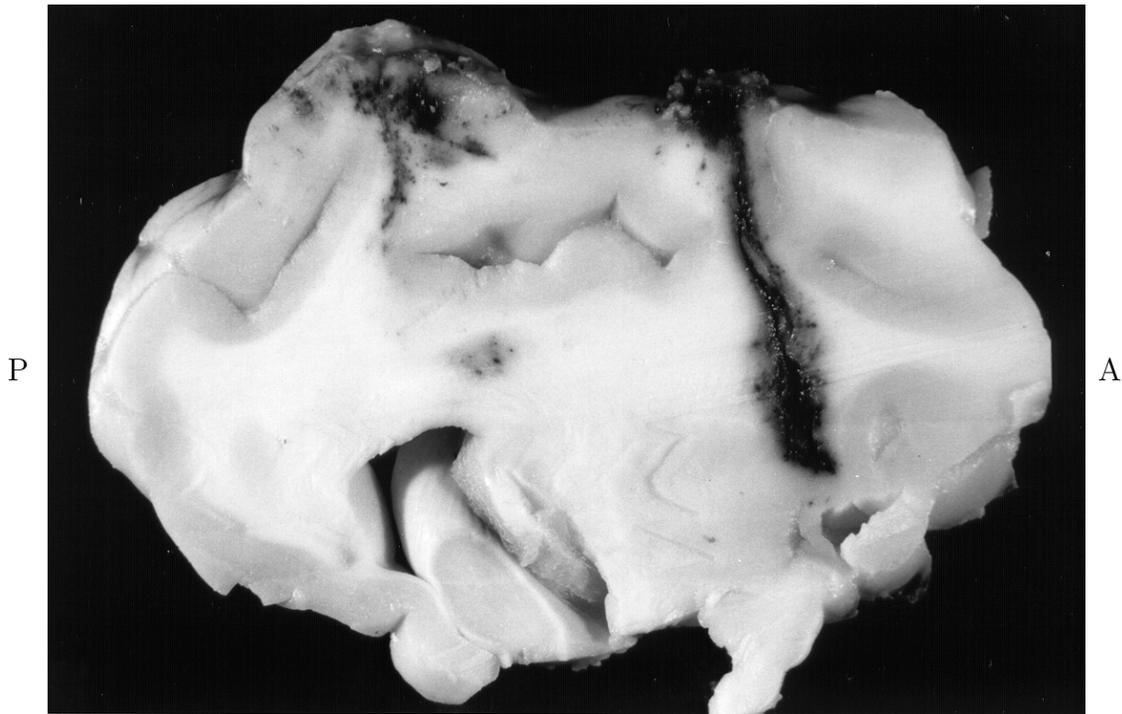


Abbildung 6.9: AP-Schnitt durch das Hirn des 2. Hundes

kel und vor allem unscharf, so daß keine Strukturen erkennbar sind. Im Moment der Bildaufnahme erforderte die Druckmessung einen geringen Abstand der Sondenöffnung zu dem am Außenrohr angebrachten Drucksensor. Die aktuelle Konstruktion des Sondenkopfes verhindert, daß diese Einstellung bei Einsatz im Spülmedium keine kleineren Fokusabstände erlaubt.

Die nächste Bildserie wurde in 21 mm Tiefe mit einem Fokusabstand von 9 mm und einem Höhenvorschub von  $50 \mu\text{m}$  je  $360^\circ$  durchgeführt. Eine Aufnahme dieser Einstellung ist in Abb. 6.10 zu sehen. Im mittleren Streifen – das ist der zuletzt aufgenommene – sind Strukturen erkennbar, jedoch zeigt sich, daß bei aufeinanderfolgenden Umdrehungen der Sonde die Streifen nicht aneinander anschließen, sondern jeweils etwas versetzt sind. Zu erklären ist diese Versetzung durch eine Mitbewegung des Gewebes bei der Rotation. Das in der Abbildung zu erkennende Muster von vertikalen Streifen trat in nahezu allen Bildern, zum Teil jedoch in regelmäßigerer Form, auf. Auch in der weiter unten folgenden Abb. 6.11 ist ein solcher Bereich zu sehen. Dieses Phänomen spiegelt den Wechsel zwischen Haft- und Gleitreibung des Gewebes direkt an der Rohrwand wieder. Deshalb ist es bei diesem Abstand des Gewebes nicht möglich, ein größeres zusammenhängendes Bild zu erzeugen. Erst wenn das Gewebe nicht mehr die Sonde berührt, also ein geschlossener Spülflüssigkeitsfilm um die Sonde besteht, sollten

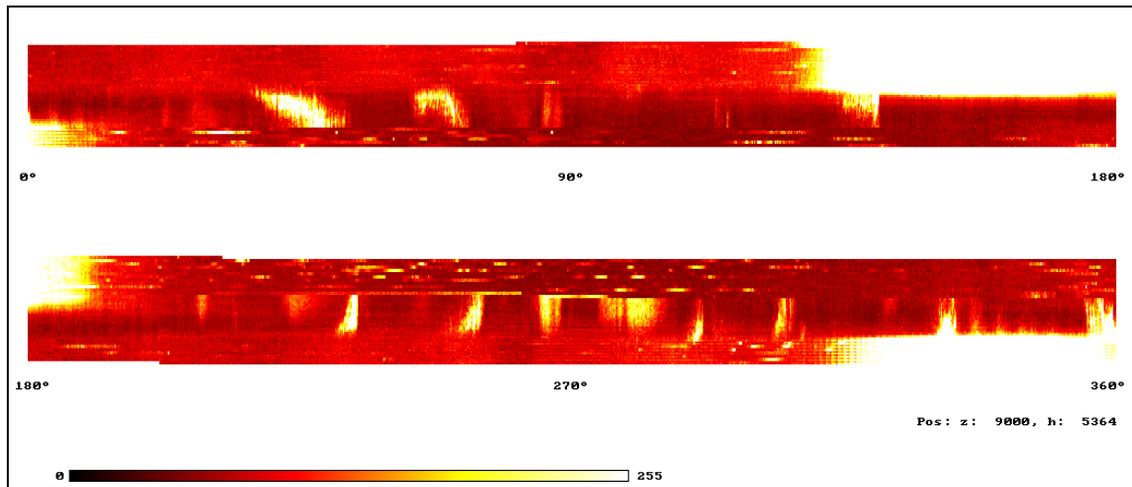


Abbildung 6.10: Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop in 21 mm Tiefe

größere Bilder zusammengesetzt werden können. Weiterhin wird das Gewebe vor der Sondenöffnung durch die ausstömende Spüllösung bewegt.

Eine Abschätzung der Versetzung aus Abb. 6.10 ergibt etwa 30 Pixel, die einem Winkel von

$$\frac{30}{2000} \cdot 360^\circ = 5.4^\circ$$

entsprechen, da nach Abschnitt 4.5 eine Umdrehung gerade 2000 Pixel ergibt. Liegt das Gewebe, wie anzunehmen, direkt an der Sonde an, hat es also den Abstand 2.2 mm von der Rotationsachse, gilt für den Versatz

$$d = 2\pi \cdot 2.2 \text{ mm} \cdot \frac{30}{2000} \approx 0.2 \text{ mm}.$$

Dies macht deutlich, daß in direkter Umgebung des Sondenrohres die durch den Abstand zweier Pixel gegebene Auflösung des Mikroskops von  $7 \mu\text{m}$  im Vergleich zum Fokusdurchmesser von  $40 \mu\text{m}$  viel zu hoch ist und so die Versetzung überbetont.

In Abb. 6.11 ist eine Aufnahme zwischen 21 mm und 24 mm Tiefe zu sehen. Der Fokusabstand betrug hierbei 7 mm und die Übersetzung Rotation zu Tiefe war  $40^\circ$  zu  $50 \mu\text{m}$ . Auffällig ist der plötzliche Intensitätsanstieg nach zweieinhalb Umdrehungen (Darstellung von unten nach oben), der vermutlich von einem Gewebestück herrührt, das die Sondenöffnung verstopfte und ab diesem Zeitpunkt leider keine sinnvollen Aufnahmen mehr zuließ. Die nachfolgenden Messungen bei Fokuseinstellungen von 7 und 5 mm waren daher nicht mehr sehr aussagekräftig, obwohl bei 5 mm der Fokus schon nahe an der Gewebeoberfläche gewesen wäre. Nach dem Herausziehen der Sonde war das Gewebestück in der Sondenspitze zu sehen (Abb. 6.12).

Aufnahmen vom zweiten Hund konnten leider nicht durchgeführt werden, da unmittelbar vor dem Einstich der Sonde die Glasfaser der Mikroskopbeleuchtung brach und

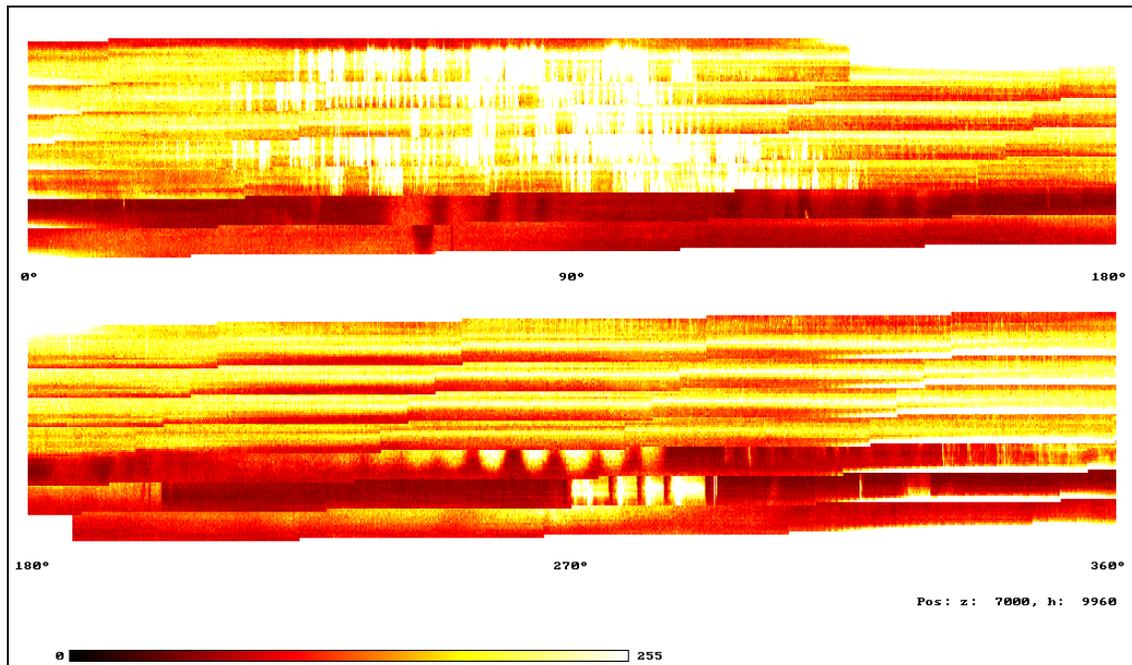


Abbildung 6.11: Mikroskopaufnahme in der Tiefe 21-24 mm

die Bildaufnahme verhinderte. Da während dieses Aufenthalts in Leuven keine weiteren Operationen mehr geplant waren, können in der vorliegenden Arbeit nur diese vorläufigen Ergebnisse vorgestellt werden. In den bereits geplanten nächsten Experimenten soll das Mikroskop wieder eingesetzt werden.

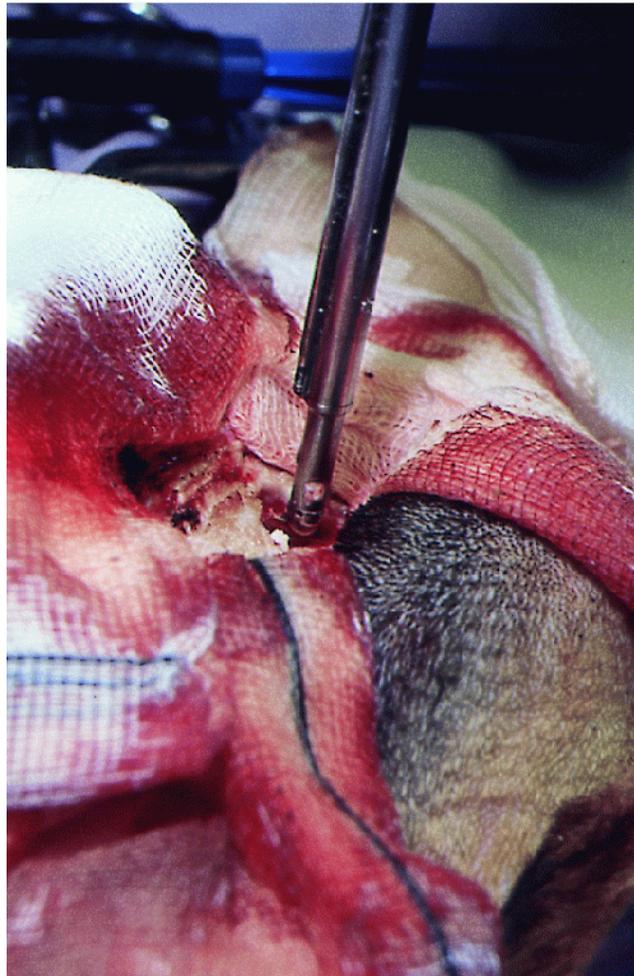


Abbildung 6.12: Gewebestück, das die Sonde verstopfte

# Kapitel 7

## Diskussion und Ausblick

Als Grundlage für eine Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit müssen die in den Kapiteln 5 und 6 dargestellten Messungen herangezogen werden. Während Abbildung 5.4 durchaus die Möglichkeit der Aufnahme hochaufgelöster und kontrastreicher Bilder aufzeigt, sind die in in-vivo Messungen an Ratten und Hunden erzielten Resultate noch nicht zufriedenstellend. Dies macht deutlich, daß auch bei zukünftigen Verbesserungen die im Labor erreichten Bildqualitäten in Tierversuchen überprüft werden müssen, da die dort auftretenden komplexen Randbedingungen nur schwer simuliert werden können.

In nachfolgenden Arbeiten sollen einige mögliche Weiterentwicklungen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops aufgegriffen werden:

- Wie sich in den bisherigen in-vivo Experimenten zeigte, ist der Blutgefäßkontrast noch nicht ausreichend, um eine sichere Erkennung der Gefäße zu gewährleisten. Die Bildaufnahmen an Rattengehirnen ließen zwar eindeutige Oberflächenstrukturen erkennen, doch eine zuverlässige Zuordnung von Blutgefäßen war nur im Falle der freipräparierten Halsschlagader möglich. Es ist davon auszugehen, daß nicht etwa die Größe der Gefäße sondern tatsächlich der durch das Hirngewebe bewirkte Reflektionsuntergrund für den unterschiedlichen Kontrast verantwortlich war. Bei den Versuchen an Hunden erlaubte die ausschließliche Betrachtung des Monitorbildes noch weniger eine Aussage über das Vorhandensein von Blutgefäßen. Auch hier wird vermutet, daß der zu geringe Unterschied im Reflektionsverhalten des roten Laserlichts an Blutgefäßen und Hirngewebe keine deutlich besseren Ergebnisse erlaubt.

Es soll deshalb untersucht werden, ob durch die Wahl anderer Beleuchtungswellenlängen, bei denen die Blutgefäße eine höhere Absorption aufweisen, ein stärkerer Kontrast erzielt werden kann. So bietet sich beispielsweise im grünen

Spektralbereich ein Argonionenlaser an, da hier Hämoglobin wesentlich stärker absorbiert als Hirngewebe. Es könnte sich allerdings herausstellen, daß der Hauptteil des Lichtes bereits an der Gefäßwand reflektiert wird und gar nicht erst in das Blutgefäß eindringt. In diesem Fall wären nur marginale Verbesserungen zu erwarten.

Eine weitere Möglichkeit bietet sich dadurch, daß man für die Darstellung auf dem Monitor auch die Information von verschiedenen Farben verwenden kann. Es ist sogar an die Bereitstellung von optimierten Differenzbildern zu denken.

- In der Augenheilkunde haben sich Fluoreszenztechniken zur kontrastreichen Darstellung von Durchblutungsvorgängen am Augenhintergrund bewährt. Eventuell können die dort entwickelten Methoden auch in die Neurochirurgie übertragen werden. Zur Anregung der Fluoreszenz von Farbstoffen, die im Blutkreislauf transportiert werden, kommen vor allem grüne bis blaue Laser in Betracht, die problemlos über die Lasersonde eingekoppelt werden können. Sofern diese Farbstoffe über die lange Operationszeit dem Patienten verabreicht werden können, sollte die Fluoreszenz auf jeden Fall für eine Kontrastverstärkung sorgen. Der Einfluß der Bluthirnschranke auf die Farbstoffverteilung zwischen Blut und Hirngewebe ist ein weiterer Untersuchungsgegenstand.
- Eine andere Einschränkung der Bildqualität, die insbesondere in den Aufnahmen von Hundehirnen deutlich wurde, stellt die geringe Höhe des Scanfeldes dar. Verbunden hiermit ist die Abschattung der Scanfeldränder durch die Sondenlänge und deren Durchmesser. Um diese Einschränkung zu entschärfen, kann eine Zwischenabbildung im Linsenrohr benutzt werden, wie sie auch bei konventionellen Endoskopen üblich ist (vgl. Abb. 1.4). Wie in Abbildung 7.1 skizziert, kann durch den Einsatz zweier zusätzlicher Linsen einerseits das Scanfeld optimal ausgenutzt werden. Andererseits ermöglicht ein derartiger Aufbau eine deutliche Verkürzung der Mikroskoplänge dadurch, daß dann auch die Brennweite der Linse L2 in Abbildung 4.3 auf unter 5 cm verringert werden kann. Die Gesamtlänge der Sonde könnte dadurch um bis zu 15 cm verkürzt werden. Es bleibt noch zu

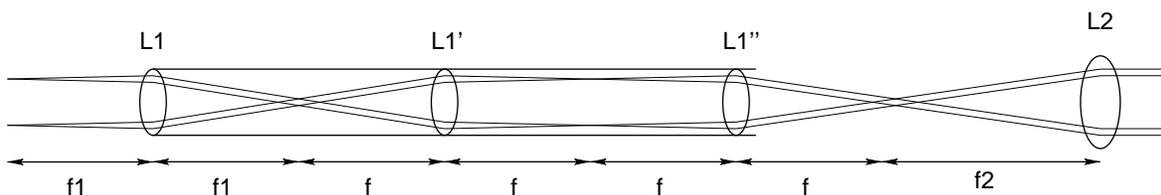


Abbildung 7.1: Vergrößerung des Scanfeldes durch Zwischenabbildung im Sondenrohr

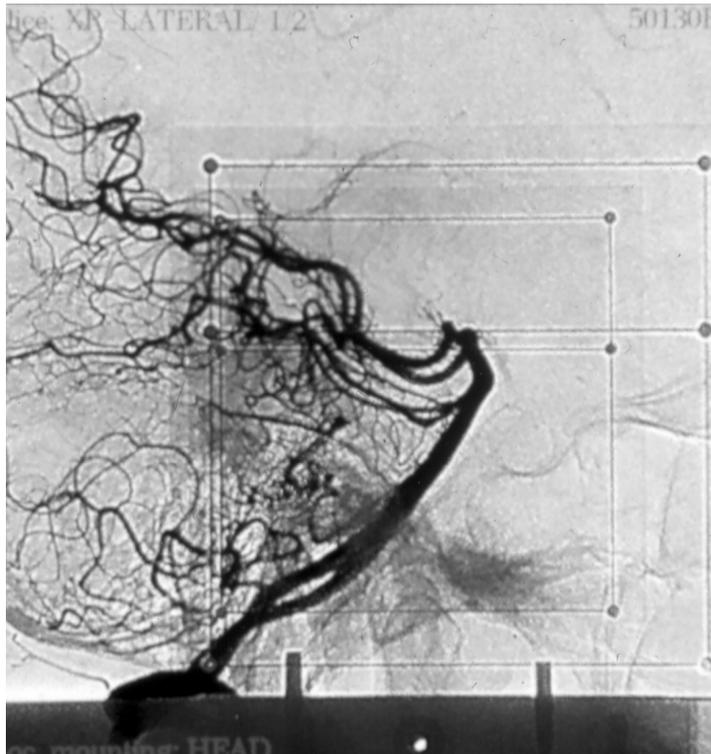


Abbildung 7.2: Subtraktionsangiographie der von einer Hirnarterie versorgten Gefäße

klären, ob diese Zwischenabbildung ohne Verschlechterung der Fokussierung des Ablationslasers realisiert werden kann.

Diese Verbesserungen sollen eine Bildqualität ermöglichen, die das gezielte Auffinden von Blutgefäßen und möglichst sogar deren Zuordnung in einem anatomischen Atlas erlaubt. Während der Operation stellt die Gefahr von Blutungen das größte Operationsrisiko dar. Erkannte Blutgefäße sollen deshalb vor der Ablation mit dem Piko-sekundenlaser mit einem Koagulationslaser, der über den gleichen optischen Kanal eingekoppelt wird, verschlossen werden. Möglicherweise müssen Blutgefäße, die für die Versorgung großer Hirnareale zuständig sind, geschont werden, d.h. die Ablation muß um diese Gefäße herum erfolgen. In der Subtraktionsangiographie in Abbildung 7.2 ist zur Veranschaulichung der Versorgungsbereich einer einzelnen Hirnarterie dargestellt. Daraus wird deutlich, daß es Blutgefäße gibt, die nicht durch benachbarte Gefäße ersetzt werden können.

Für die Funktionalität der Koagulation ist von Bedeutung, inwieweit das Mikroskop in der Lage ist, einerseits bereits koagulierte Blutgefäße zu erkennen und andererseits den eigentlichen Koagulationsvorgang sichtbar zu machen. Es wurde bisher noch nicht untersucht, ob die Koagulation mit Hilfe des Mikroskops überwacht und gesteuert werden kann.

Großen Einfluß auf diese Überwachung, aber auch auf die Koagulation selbst wird voraussichtlich die Verschmutzung der Spülflüssigkeit mit Blut haben. Da auch bereits durch das Einführen der Sonde kleinere Blutungen auftreten könnten, die zwar keine Gefahr für den Patienten darstellen, aber die Spülflüssigkeit trüben können, soll der Einfluß von Blut auch auf die allgemeine Bildqualität untersucht werden.

Unabhängig von der Blutgefäßerkennung könnte im weiteren Verlauf des Projekts dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop eine weitere Aufgabe zukommen. Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Anwendung fokussierter Laserstrahlung stellt die Tiefenpositionierung dar. Der Einsatz im Innern des Gehirns erfordert eine automatische Detektion der aktuellen Oberfläche, um die Laserpulse optimal auf dem Gewebe zu verteilen. Die ungefähre Lage kann mit dem Mikroskop bestimmt werden; diese Information kann zur Regelung der Fokustiefe verwendet werden.

Von fundamentaler Bedeutung für das Gesamtprojekt ist die Frage, ob die durch die kontinuierliche Abtragung des Tumorgewebes veränderte Geometrie des Zielvolumens, das vor der Operation mit tomographischen Verfahren bestimmt wurde, während der Operation verfolgt werden kann. Insbesondere ist die Kontrolle der Lage der Tumorgrenzen von Interesse. Durch die stereotaktische Führung der Sonde und die damit erzielte absolute Orientierung der Mikroskopbilder sollte es möglich sein, den Operationsverlauf in Form der jeweils aktuellen Gewebeoberfläche in die off-line gewonnenen Aufnahmen einzublenden. Auf diese Weise sollte eine grobe Kontrolle der Tumorgrenzen realisierbar sein.

Darüberhinaus könnte durch den Einsatz tumorspezifischer Fluoreszenzmarker eventuell eine direkte on-line Erkennung der Tumorzellen möglich sein, Dies würde eine hochinteressante Unterstützung der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie mit Pikosekunden-Laserpulsen darstellen. Die sehr lokale Wirkung des Lasers bei der vorgeschlagenen Operationstechnik bietet die Chance, ausgereifte Methoden der Tumordetektion auf zellulärer Ebene zu nutzen, wie sie in Kombination mit anderen Verfahren nur schwer einsetzbar sind, da dort auch das umliegende Gewebe stark in Mitleidenschaft gezogen wird. Für den Transfer grundlegender Erkenntnisse in die klinische Anwendung im Zusammenhang mit diesem Projekt fehlen noch umfangreiche Studien.

Nach erfolgreichen Tests der einzelnen Systemkomponenten und insbesondere des konfokalen Laserscanning-Mikroskops an Tieren bieten sich als erste Indikation für den Einsatz der Operationsmethode am Menschen Strahlennekrosen an (vgl. Abschnitt 1.2). Diese sind deshalb für erste Erprobungen besonders interessant, weil zum einen bereits ihre teilweise Entfernung erheblichen Nutzen für den Patienten hat, so daß auf eine Erkennung der Zielvolumengrenzen verzichtet werden kann, zum anderen keine

Blutungsgefahr besteht, so daß eine noch nicht optimale Bildqualität des Mikroskops in Kauf genommen werden kann.

# Literaturverzeichnis

- [Ana84] Analog Devices. *Data-Acquisition databook, Volume I Integrated Circuits*, 1984.
- [BBS87] P. Bado, M. Bouvier, and J. Scott Coe. Nd:YLF mode-locked oscillator and regenerative amplifier. *Optics Letters*, 12:319–321, 1987.
- [Bou86] J.-L. Boulnois. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science*, 1:47–66, 1986.
- [Bur86] Burr-Brown Corporation. *Analog-IC's, Wandler-IC's*, 1986.
- [Bur89] Burr-Brown Corporation, Tucson, AZ. *Integrated circuits data book*, 1989.
- [CCK86] T. R. Corle, C.-H. Chou, and G. S. Kino. Depth response of confocal optical microscopes. *Optics Letters*, 1986.
- [Dam96] Jürgen Dams. Planung, Simulation und Optimierung der Positionierung einer neuartigen Sonde in der stereotaktischen Laser-Neurochirurgie. DGMP-Tagung, Graz, September 1996.
- [DSSJ70] S. Dua-Sharma, K. N. Sharma, and H. L. Jacobs. *The canine brain in stereotaxic coordinates; full sections in frontal, sagittal and horizontal planes*. MIT Press, 1970.
- [DUW82] H. Dietz, W. Umbach, and R. Wüllenweber, Herausgeber. *Klinische Neurochirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1982.
- [EG&] EG&G. *Datenblatt zur Avalanche-Photodiode C30950E*.
- [FDG<sup>+</sup>94] J. P. Fischer, J. Dams, M. H. Götz, E. Kerker, F. H. Loesel, C. Messer, N. Suhm, M. H. Niemz, and J. F. Bille. Plasma-mediated ablation of brain tissue with picosecond laser pulses. *Applied Physics B*, 58:493–499, 1994.

- [Fis95] Jörg Fischer. *Plasma, Schockwelle und Kavitation bei der photodisruptiven Gewebeablation mit Pikosekunden-Laserpulsen*. Dissertation, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, Mai 1995.
- [FJB95] J. P. Fischer, T. Juhasz, and J. F. Bille. Time-resolved imaging of the surface ablation of soft tissue with ir picosecond laser pulses. *eingereicht bei Applied Physics B*, 1995.
- [Gob87] Heinrich Gobrecht, Herausgeber. *Bergmann, Schäfer: Lehrbuch der Experimentalphysik: Band III Optik*. Walter de Gruyter, Berlin, 8. Auflage, 1987.
- [Gri92] Bernhard Grimm. *Entwicklung eines schnellen konfokalen z-Scanners zur Vermessung der Tiefenauflösung des Laser-Augentomographen in der Fovea Centralis*. Dissertation, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, Februar 1992.
- [Gro96] Burkhard A. Groh. *Aufbau eines kompakten und stabilisierten Nd:YLF-Pikosekundenlasers für eine erste in-vivo Anwendung in der Hirnchirurgie*. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, 1996.
- [Göt93] Marcus H. Götz. *Autokorrelation und parametrische Verstärkung von Pikosekunden-Laserpulsen*. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, 1993.
- [Göt96] Marcus H. Götz. *Entwicklung eines leistungsverstärkten Pikosekunden-Festkörperlasers und Anwendung in der stereotaktischen Neurochirurgie*. Dissertation, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, Februar 1996.
- [GWD<sup>+</sup>96] A. E. Guber, P. Wieneke, T. Doczi, G. Fries, U. Gabbert, F. Gallyas, N. Hüwel, U. Lauschke, W. Menz, U. Neuhäuser, A. Perneckzy, M. Reindl, F. Schmidt, and K. Vogler. Miniaturisiertes neuroendoskopisches Operationssystem. *Minimal Invasive Medizin*, 7(1):23–31, 1996.
- [Hec89] Eugene Hecht. *Optik*. Addison-Wesley, Bonn, 1989.
- [Hew83] Hewlett-Packard. *Optoelectronics Designer's Catalog*, 1983.
- [HZ82] R. Hohenfellner and E. J. Zingg. *Urologie in Klinik und Praxis*. Band 1. Georg Thieme Verlag, 1982.

- [JHLB94] T. Juhasz, X. H. Hu, T. Laszlo, and Z. Bor. Dynamics of shock waves and cavitation bubbles generated by picosecond laser pulses in corneal tissue and water. *Lasers in Surgery and Medicine*, 15:91–98, 1994.
- [Kap95] Klaus Kappings. *Stereotaktisch geführte Lasersonde für den klinischen Einsatz*. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, 1995.
- [KF88] M.V. Klein and T.E. Furtak. *Optik*. Springer Verlag, Berlin, 1988.
- [KLAO93] J. Koivukangas, Y. Louhisalmi, J. Alkuijala, and J. Oikarinen. Ultrasound-controlled neuronavigator-guided brain surgery. *Journal of Neurosurgery*, 79:36–42, 1993.
- [L'E89] F. A. L'Esperance Jr. et al. Excimer laser instrumentation and technique for human corneal surgery. *Arch. Ophthalmol.*, 107:103, 1989.
- [Lek51] L. Leksell. The stereotactic method and radiosurgery of the brain. *Acta Chirurgica Scandinavia*, 102:316–319, 1951.
- [Lin] Linear Technology. *Datenblatt zum Operationsverstärker LT1028*.
- [Lös92] Frieder Lösel. *Aufbau eines regenerativ verstärkten Nd:YLF-Lasersystems und Entwicklung eines Autokorrelators zur Messung der psec-Laserpulse*. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, 1992.
- [Mar91] GERAL F. MARSHALL, editor. *Optical Scanning*. Marcel Dekker, Inc., New York Basel Hong Kong, 1991.
- [Mel92] Melles Griot. *Optics Guide 5*, 1992.
- [Mor95] H. Morneburg, Hrsg. *Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik*. Publicis MCD Verlag, München, 3. Auflage, 1995.
- [Ott96] Michael H. Ott. *Grundlegende Ablationsexperimente an Ratten- und Rinderhirngewebe mit einem Pikosekunden-Laser und Entwicklung eines Strahlführungssystems für eine stereotaktische Lasersonde*. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg, 1996.
- [PS84] C. A. Puliafito and R. F. Steinert. Short-pulsed Nd:YAG laser microsurgery of the eye: Biophysical considerations. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 20:1442–1448, 1984.

- [RGS<sup>+</sup>87] R. Rosenthal, A. Gamroth, V. Sturm, B. Wowra, and B. van Kaick. Zystische Kraniopharyngiome: Computertomographische prätherapeutische Beurteilung und Kontrolle der Behandlungsergebnisse nach intrazystischer Kontaktbestrahlung. *Strahlentherapie und Onkologie*, 163:621–625, 1987.
- [RS91] Heinrich Reinecke and Josef Schreiner. *Transputerleitfaden*. Carl Hanser Verlag, München Wien, 1991.
- [SBW87] T. Seiler, T. Bende, and J. Wollensack. Astigmatismus-Korrektur mit dem Excimer-Laser. *Klin. Augenbl. Augenheilkunde*, 191:179, 1987.
- [Sch89] M. Schirmer. *Neurochirurgie, Eine Einführung*. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 7. Auflage, 1989.
- [SGF<sup>+</sup>96] N. Suhm, M. H. Götz, J. P. Fischer, F. Loesel, W. Schlegel, V. Sturm, and J. Bille. Ablation of neural tissue by short pulsed lasers: A technical report. *Acta Neurochirurgica*, 138:346–349, 1996.
- [Sie86] A. E. Siegman. *Lasers*. University Science Book, Mill Valley, 1986.
- [SPS<sup>+</sup>83] V. Sturm, O. Pastyr, W. Schlegel, H. Scharfenberg, H.-J. Zabel, G. Netzeband, S. Schabbert, and W. Berberich. Stereotactic computer tomography with a modified Riechert-Mundinger device as the basis for integrated stereotactic neuroradiological investigations. *Acta Neurochirurgica*, 68:11–17, 1983.
- [SSP<sup>+</sup>93] V. Sturm, W. Schlegel, O. Pastyr, H. Treuer, J. Voges, R. P. Müller, and W. J. Lorenz. Linac-accelerator-radiosurgery. *Acta Neurochirurgica Supplements*, 58:89–91, 1993.
- [SSS<sup>+</sup>81] W. Schlegel, H. Scharfenberg, V. Sturm, H. Penzholz, and W. J. Lorenz. Direct visualization of intracranial tumours in stereotactic and angiographic films by computer calculation of longitudinal CT-sections: A new method for stereotactic localization of tumour outlines. *Acta Neurochirurgica*, 58:27–35, 1981.
- [Tre95] H. Treuer. Persönliche Mitteilung und freundliche Überlassung der Bilder. Dezember 1995.
- [VTS<sup>+</sup>93] J. Voges, H. Treuer, W. Schlegel, O. Pastyr, and V. Sturm. Interstitial irradiation of cerebral gliomas with stereotactically implanted iodine-125 seeds. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 58:108–111, 1993.

- [Wol51] E. Wolf. Light distribution near focus in an error-free diffraction image. *Proceedings of the Royal Society A*, 204:533–548, 1951.
- [Yar89] Amnon Yariv. *Quantum Electronics*. Wiley, New York, 3rd. edition, 1989.

# Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Bille für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, und sein großes Interesse am gesamten Projekt;

Herrn Prof. Schlegel für die Übernahme des Zweitgutachtens;

Dr. Stefan Gözl für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit;

Marcus Götz für die hervorragende Zusammenarbeit und Freundschaft und seine Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit;

dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe für das hervorragende Arbeitsklima, die wissenschaftlichen und sozialen Erlebnisse. Mein besonderer Dank geht an Bernhard Pelz für seine moralische und fachliche Begleitung insbesondere durch elektronische Ideen, an Klaus Kappings für seine Unterstützung und Mitarbeit bei der Konstruktion des Mikroskops, an Burkhard Groh und Michael Ott für die Zusammenarbeit insbesondere in Köln, an Jörg Wolf und Volker von Vietsch für die Durchführung der Fokusmessungen;

Herrn Dr. Lehrke, Herrn Dr. Nuttin und Frau Demeulemeester für die Durchführung der Tierexperimente in Köln und Leuven;

Herrn Prof. Terhaag, Frau Dr. Röhn und Frau Kokoscha für die freundliche Aufnahme und Unterstützung im Tierhaus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Köln;

den Mitgliedern der mechanischen Werkstatt für die Fertigung diverser Komponenten der Apparatur;

und nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Familie für die immaterielle und materielle Unterstützung.