

Aus dem Institut für Klinische Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schönberg)

Weiterentwicklung der optischen Tomographie zur Verstärkung von
Weichteilkontrasten als Unterstützung multimodaler bildgebender Verfahren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades Doctor scientiarum humanarum
(Dr. sc. hum.)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Andreas Hien, M.Sc.

aus Speyer

2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Björn Wängler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multimodale Bildgebung.....	1
1.2	Fluoreszenzbildgebung	3
1.3	Medizinische Relevanz	4
2	Zielsetzung und struktureller Aufbau der Arbeit	6
2.1	Zielsetzung	6
2.2	Vorgehensweise und Struktur der Arbeit	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Aufbau und optomechanische Ausführung der Beleuchtungs- und Detektionseinheit zur Gewebeanalyse	8
3.1.1	Auslegung und Abbildung der optischen Anregungsbeleuchtung.....	9
3.1.2	Optische Filtereinheit der Detektionsoptik.....	10
3.1.3	Lichtfalle	11
3.1.4	Photonenflussanalyse des optischen Systems.....	14
3.2	Automatisiertes Scannen von großen Gewebeproben	21
3.2.1	Positionierungssystem	22
3.2.2	Bediensoftware	22
3.2.3	Bildspeicherung.....	24
3.2.4	Registrierung der Bildserien.....	24
3.2.5	Algorithmische Korrektur störender Bildartefakte	25
3.2.6	Auswertung der gescannten Proben.....	27
3.3	Versuche am Tierorganismus.....	27

3.4	Detektion von Fluoreszenz aus tiefen Gewebeschichten.....	28
3.5	Schnelle Fluoreszenzdetektion	29
3.6	In vivo Evaluierung des entwickelten Aufnahmesystems und Vergleich mit einem planaren Bildgebungssystem	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Technische Ergebnisse	31
4.1.1	Vermessung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	31
4.1.2	Auslegung der optischen Eigenschaften des Nachweissystems	33
4.1.3	Probenbeleuchtung zur Anregung der Fluoreszenz.....	35
4.1.4	Integration des Gesamtsystems.....	36
4.2	Ergebnisse der in vitro Untersuchungen	37
4.2.1	In vitro Gewebeuntersuchungen und Systemvalidierung	37
4.2.2	Systemvalidierung mit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen für in vivo Experimente	47
4.3	In vivo Tumoruntersuchung.....	51
4.3.1	Pilotmessungen	51
4.3.2	Tumor Untersuchungen	54
5	Diskussion	61
5.1	Bildgebungssystem zur Fluoreszenzdetektion und Gewebeanalyse.....	61
5.2	Lichtwegstruktur und optische Anordnung für Fluoreszenzmessungen.....	63
5.3	In vivo Tiermodell Untersuchungen.....	65
5.4	Technologische Systembetrachtung.....	68
5.5	Erweiterte Applikationsmöglichkeiten.....	70
6	Ausblick.....	71

7 Zusammenfassung	73
8 Verzeichnisse	74
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	74
8.2 Formelzeichenverzeichnis.....	77
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	79
9 Literaturverzeichnis.....	85
10 Lebenslauf	93
11 Danksagung	99

1 Einleitung

Aus dem World Cancer Report 2014 der International Agency for Research on Cancer (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht hervor, dass Krebs eine der häufigsten Todesursachen weltweit darstellt. Die IARC schätzt, dass alleine im Jahr 2014 bis zu 14,1 Millionen Menschen an Krebs erkrankten [1, 2]. Aufgrund des demografischen Trends des steigenden Durchschnittsalters der Gesellschaft und der daraus resultierenden Krebsinzidenz werden bis 2030, basierend auf Schätzungen der Vereinten Nationen, jährlich 20,3 Millionen neue Krebsfälle auftreten [3]. Um den negativen Auswirkungen dieses Trends entgegenzuwirken, ist die Erforschung der Krankheit die Basis für eine mögliche Heilung der Erkrankung. Gerade eine frühe Erkennung von bösartigen Tumoren ist sehr wichtig, da dies die Chance auf eine Heilung der Krankheit stark verbessert [4–6]. Die Veränderungen im Gewebe aufgrund einer Krebserkrankung können durch nicht-invasive Verfahren wie Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Magnetresonanztomographie (MRT), optische Bildgebung oder Palpation bildgebend dargestellt werden [7–11].

1.1 Multimodale Bildgebung

Generell gewinnen im Bereich der Medizintechnik bildgebende Verfahren, mit denen spezifische Organeigenschaften dargestellt werden können, zunehmend an Bedeutung. Die bisherigen bildgebenden Verfahren zur Darstellung konzentrieren sich derzeit auf CT, MRT und PET einschließlich deren Kombinationen [12, 13]. Durch die Kombination der verschiedenen Modalitäten werden die Vorteile der einzelnen Verfahren addiert und erlauben so eine bessere Beurteilung sowie Auswertung der erzeugten Bilddaten [14, 15]. Darüber hinaus werden komplementäre Bildinformationen der einzelnen Modalitäten synergetisch verknüpft [12, 13]. Zudem wird die diagnostische Sicherheit gesteigert und auch die Absicherung gegen einen falschen Befund erhöht [13].

Dennoch gibt es noch erhebliche Verbesserungsmöglichkeiten im Bereich der hybriden Bildgebung. Ein Hauptansatz zur Verbesserung findet sich in der Bildgebung von

Weichteilgewebe beziehungsweise in der Kontrastierung dieser Bilder [16, 17]. Beispielsweise zeichnen sich bei der Mammographie zur Detektion von Brustkrebs lediglich geringe Kontraste ab [18]. Das Krebsgewebe lässt sich dadurch nur sehr schwer von gesundem Gewebe unterscheiden, wodurch sich das Risiko einer möglichen Fehldiagnose erhöht [4, 16, 19].

Aus diesem Grund gibt es Bestrebungen und Ansätze, die strahlenbasierten Bildgebungstechniken additiv mit strahlungsneutralen optischen Verfahren zu ergänzen, um eine zusätzliche Kontrastverstärkung zu erhalten [16]. Bei den optischen Verfahren ist zu bedenken, dass die Eindringtiefe von Licht in Haut beziehungsweise in Gewebe limitiert ist [16, 17]. In der klinischen Bildgebung gibt es infolgedessen derzeit nur wenige Anwendungen, die auf Fluoreszenzmesstechniken zurückgreifen. Vornehmlich zu nennen ist hier die Fluoreszenzangiographie des Augenhintergrundes, aber auch die Überprüfung der Gefäßperfusion beispielsweise nach Gefäßrekonstruktionen [20, 21, 21]. Zur Verbesserung der Eindringtiefe wird versucht in Wellenlängenbereiche auszuweichen, welche eine möglichst geringe Gewebestreuung und -absorption mit noch hinreichender Bildinformation aufweisen [22, 23]. Der aktuelle Stand der Technik zeigt, dass die Durchstrahlung von Versuchstieren wie Mäusen und die Aufnahme der Nahinfrarot (NIR) Streuung mit verschiedenen bildgebenden Verfahren gelingen [24–26]. Hinsichtlich der durchstrahlbaren Dicke des Gewebes treten Limitierungen auf, insbesondere im Bereich der Bildauflösung, der Kontrastierung oder den absoluten Intensitäten des gestreuten beziehungsweise transmittierten Lichtes [25, 27, 28]. In der fluoreszenzbasierten Bildgebung wird das Licht der Anregungswellenlänge und der emittierten Nachweiswellenlänge, welche das Gewebe durchstrahlen, durch Streuungs- und Absorptionsvorgänge gedämpft [22, 29]. Dadurch kommt es zu einem verminderten Austritt von Licht aus dem Gewebe auf den Detektor. Zudem verursacht die Streuwirkung des Gewebes eine Verwischung der Bilder. Die zusätzlich auftretenden Mehrfachstreuvorgänge führen zu Problemen in der Detektion [17, 22, 27]. Im ungünstigen Fall wird das Licht aus dem Primärstrahl gestreut und von dem angrenzenden Gewebe erneut gestreut, sodass die Strahlung nochmals auf den Detektor auftrifft. Die verwendeten flächigen bildgebenden Detektoren nehmen das mehrfach gestreute Licht wahr. Dies führt zu einer Verfälschung des eigentlich zu beobachteten Messsignals. Mit zunehmendem Durchmesser der Gewebeschnitte beziehungsweise der Gewebeschichten

sinkt die Signalintensität. Umgekehrt proportional wird das Bild verwaschener durch vermehrt auftretende Mehrfachstreuvorgänge im Gewebe [30].

1.2 Fluoreszenzbildgebung

Bei der Fluoreszenzbildgebung handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, welches zu den Verfahren der optischen Bildgebung zählt [31]. Dabei wird inelastisch gestreutes Licht genutzt um innere Strukturen in Gewebe sichtbar darzustellen [32, 33]. Bevorzugt wird im medizinischen Bereich Licht im Nahinfraroten Bereich eingesetzt, da in diesem Bereich die Eindringtiefe in Gewebe am größten ist [34, 35]. Diese Eigenschaft ist der substantiellen Gewebezusammensetzung geschuldet und nennt sich „optisches Fenster“. Dieses liegt im Wellenlängenbereich von 650 nm bis 850 nm [36]. In anderen Wellenlängenbereichen ist der Absorptionsgrad von Licht in Gewebe um ein Vielfaches höher, wodurch das Eindringen in tiefere Gewebeschichten verhindert wird [22, 23]. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissions- und Absorptionsbereiche definiert sind, kann eine spezifische Kontrastierung bestimmter Gewebe (z.B. des Tumors) durch die Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen [20, 24, 37]. Dies liegt an dem für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich in dem dieser Licht absorbiert, sowie an dem längerwelligen typischen Emissionsbereich des Farbstoffes [38, 39]. Die Farbstoffe können, durch gezielte chemische Derivatisierung, für den jeweiligen Anwendungsfall an Target spezifische Moleküle gekoppelt werden [37, 40]. Diese Targets, vorzugsweise Tumorrezeptoren, können so ausgewählt werden, dass es auf diese Weise möglich ist, Tumore beziehungsweise tumoröses Gewebe zu markieren [24, 40].

Wird der mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Tumor oder das markierte Gewebe mit Photonen des Wellenlängenbereichs in dem für den Farbstoff charakteristischen Absorptionsbereich wie in Abbildung 1 dargestellt bestrahlt, entsteht eine nachweisbare spezifische Fluoreszenzmission. Durch den selektiven Nachweis von Biomolekülen im Körper ist die optische Bildgebung für das Auffinden von Fluoreszenzanreicherungen innerhalb von Weichteilgewebe geeignet [38, 41, 42].

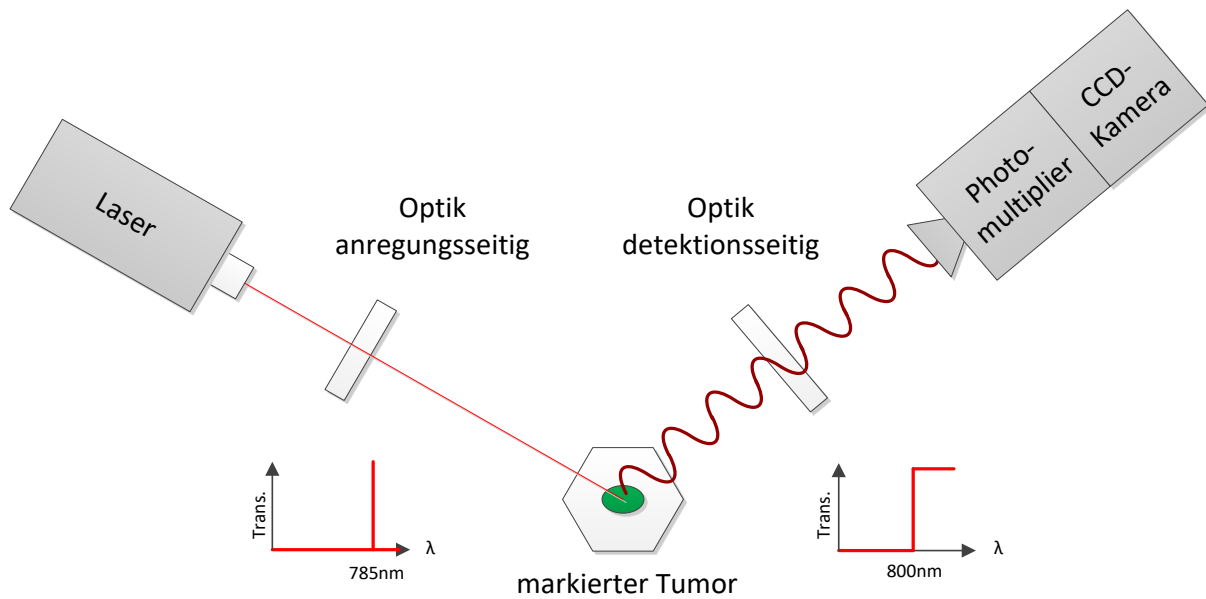


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzbildgebung

1.3 Medizinische Relevanz

Die Fluoreszenzbildgebung eignet sich aufgrund der hohen Spezifität für die Untersuchung von Weichgewebe. Mögliche interessante Anwendungsbereiche liegen in der Untersuchung und Früherkennung von Mammakarzinomen [7, 19]. Der herkömmliche Vorgang zur Diagnose kann durch den Einsatz von optischen Verfahren, die auf den Einsatz von ionisierender Strahlung verzichten, additiv im Verdachtsfall unterstützt werden. Die Anwendung unterstützend zur Mammographie würde die Qualität der Diagnose erhöhen und das Risiko einer Fehldiagnose mindern [43]. Die Technik ist nicht auf den Einsatz der Detektion des Mammakarzinoms beschränkt. Durch eine spezifische Derivatisierung der entsprechenden Fluoreszenzmarker ist das Verfahren potentiell auch für die Detektion anderer Tumorarten geeignet. Unter ökonomischen Gesichtspunkten betrachtet, bestehen weitere Vorteile gegenüber den etablierten Verfahren wie CT, PET oder MRT. Diese liegen in den geringeren Beschaffungskosten der optischen Messtechnik. Zudem fallen keine hohen Betriebs- und Wartungskosten an [7–9]. Die optische Bildgebung bietet eine hochsensible und kosteneffektive Bildgebungstechnik für Gewebeeränderungen [4, 9, 10, 44, 45]. Insbesondere die Fluoreszenzbildgebung ist ein hochempfindlicher und funktioneller

Bildgebungsprozess, der eine hohe Kontrastverstärkung zwischen Tumoren und dem umgebenden gesunden Gewebe ermöglicht [26, 46].

Unter physikalischen Gesichtspunkten betrachtet, basiert das Verfahren auf der laserinduzierten Fluoreszenz [18, 47–50]. Generell ist bei optischen Methoden die Lichteindringtiefe in Haut oder Gewebe durch Absorptionseffekte begrenzt [25, 27, 28]. Derzeit können mit auf Fluoreszenz basierenden Methoden nur oberflächennahe Läsionen nachgewiesen werden, sofern diese nicht intraoperativ genutzt werden [28, 51]. Aus diesem Grund basieren derzeit nur wenige Anwendungen in der klinischen Bildgebung auf Fluoreszenzmesstechniken [51–55]. Die optische Ganzkörperbildgebung wird infolgedessen derzeit nur präklinisch eingesetzt [47, 56–58]. Die Nachteile der verfügbaren optischen Bildgebungssysteme sind die Notwendigkeit einer hohen Fluoreszenzfarbstoffkonzentration und/oder einer hohen Laserleistung in Kombination mit einem empfindlichen CCD-Detektor (Charge Coupled Device) oder einem CMOS-Detektor (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor), die für einen Nachweis durch Bildgebung in tieferen Gewebeschichten erforderlich sind [40, 56, 59]. Die benötigten hohen Anregungsintensitäten können zu einer Überhitzung des Gewebes führen, aufgrund dessen es zu ernsthaften Gewebeschädigungen kommen kann [60]. Um Schäden zu verhindern ist eine Reduktion der notwendigen Laserleistung erforderlich. Aus diesen Gründen beträgt die Eindringtiefe von CW-Bildgebungssystemen oft weniger als 1,5 cm [19, 26, 61–65]. Ein weiterer Nachteil der CW in vivo Bildgebungssysteme besteht in der niedrigen Signalintensität, die lange Belichtungszeiten des Detektors notwendig macht, um verwertbare Bilder mit ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnissen (SNR) zu erzeugen [64].

2 Zielsetzung und struktureller Aufbau der Arbeit

2.1 Zielsetzung

Die Fluoreszenzbildgebung ermöglicht es in vivo nicht-invasiv funktionelle und molekulare Informationen über Gewebe zu erhalten. Die Implementierung der Fluoreszenzbildgebung in den präklinischen und den klinischen Bereich bietet vielversprechende Ansätze für die Verbesserung der personalisierten Medizin. Die Haupteinschränkungen der Fluoreszenzbildgebung sind die Eindringtiefen und die langen Belichtungszeiten in Weichgewebe zum Erhalt aussagekräftiger Bildinformationen [24, 28, 61]. Derzeit gibt es nur wenige Applikationen mit validierten und standardisierten Fluoreszenzbildgebungssystemen im klinischen Umfeld [24]. Auch die Integration in konventionelle medizinische Bildgebungsverfahren hat sich bisher nicht etabliert, obwohl die multimodale Bildgebung eine innovative Diagnosetechnik darstellt, welche gegenüber dem Stand der Technik nochmals Fortschritte bringen sollte. Die Gründe liegen durchaus an der Komplexität der momentan kommerziell erhältlichen Fluoreszenzbildgebungssysteme sowie deren Leistungsfähigkeit und der nicht trivialen Interpretation der erhaltenen Daten.

Aus diesen Gründen konzentrieren sich die Forschungsschwerpunkte der vorliegenden Arbeit auf die Verbesserung der Fluoreszenzbildgebungstechnologie von Weichgewebe hinsichtlich der Eindringtiefe und Kontrastverbesserung. Vorabuntersuchungen sollen zeigen, ob es auch möglich ist, die Fluoreszenzbildgebung als in vitro Werkzeug zu verbessern und in die diagnostische Prozesskette zu integrieren. Hierbei soll die notwendige Anregungsleistung gesenkt und die Nachweisempfindlichkeit sowie die maximale Abtastrate gesteigert werden. Das zu entwickelnde Detektionssystem, welches auf der laserinduzierten Fluoreszenzbildgebung basieren soll, soll in zukünftigen in vivo-Applikationen eingesetzt werden können. Im Zuge der Arbeit soll ein System für optische Messungen, zur Detektion und zur Lokalisation von karzinogenem, mit Fluorophoren markiertem Gewebe entwickelt werden. Das System soll zur Durchführung von in vitro als auch für in vivo Messungen ausgelegt und konstruiert werden. Das entwickelte System soll mit biologischem Material validiert werden. Danach steht eine erforderliche in vivo Validierung der Methode an.

2.2 Vorgehensweise und Struktur der Arbeit

Im Folgenden werden der strukturelle Aufbau und die Gliederung der durchgeführten Forschungsarbeit erläutert. Die Arbeit ist in zehn Kapitel unterteilt. Im ersten Kapitel erfolgt zunächst eine Einführung in das Themengebiet, in welchem die Ausgangssituation und der aktuelle Stand der Technik beschrieben sind. Darauffolgend werden im zweiten Kapitel die Zielsetzung und der strukturelle Aufbau der Arbeit erläutert. Im anschließenden Kapitel Material und Methoden werden der Messaufbau, die eingesetzten Methoden die zur Auswertung benutzt wurden, die Entwicklung der optischen Strukturen und Verfahren in Bezug auf die Entwicklung des Systems sowie dessen Umsetzung ausgeführt. Im Zuge der Arbeit werden die Systemeigenschaften der vorgestellten technischen Umsetzungen untersucht und validiert. Das Leistungsvermögen speziell für den Einsatz im präklinischen Umfeld wird erprobt. Während des Validierungsprozesses erfolgte zunächst eine Erprobung an Messphantomen mit den Eigenschaften humanen Gewebes. Im vierten Kapitel erfolgt die Beschreibung der Experimente für die *in vitro* Validierung. Nach der *in vitro* Validierung erfolgten die *in vivo* Untersuchungen. Diese wurden am Bruker Preclinical Imaging Reference Center Mannheim des Instituts für Klinische Radiologie und Nuklearmedizin durchgeführt. Dies ermöglichte einen Gerätevergleich unter den erforderlichen Bedingungen für *in vivo* Versuche. Es wurden mehrere Anwendungen untersucht, um das Potenzial des entwickelten bildgebenden Analysesystems zu demonstrieren. Dabei handelte es sich um die Eindringtiefe in Gewebe und tiefer liegende Gewebsschichten, Die Untersuchung und Detektion von Fluorophoren in großflächigen Probenvolumen sowie die schnelle Detektion von Tumoren im Bereich der Echtzeitbildgebung am Tiermodell. Die durchgeführten Versuchsergebnisse finden sich im Kapitel Ergebnisse. In den folgenden Kapiteln befindet sich die Diskussion der erarbeiteten Ergebnisse wie auch die daraus resultierenden Schlussfolgerungen. Diese bilden zusammen mit den vorhergehenden Kapiteln die Voraussetzung für den Ausblick auf zukünftig mögliche Entwicklungsstufen beziehungsweise Applikationsmöglichkeiten. Im Anhang an den Lebenslauf sind unter Veröffentlichungen alle im Rahmen der Arbeit publizierten Ergebnisse gelistet.

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau und optomechanische Ausführung der Beleuchtungs- und Detektionseinheit zur Gewebeanalyse

Zum Nachweis von Fluorophoren aus tieferen Gewebeschichten wurde der in Abbildung 2 schematisch dargestellte Messaufbau entwickelt. Für die Anregung der Fluoreszenz wurde eine stabilisierte Monomode-Laserdiode (RLT785-100MGS, Roithner Laser Technik GmbH, Österreich) mit einer Wellenlänge von 785 nm und einer Ausgangsleistung von 100 mW ausgewählt. Das fasergekoppelte Licht wird mittels einer plankonvexen Linse (LA1908-B, Thorlabs GmbH, Deutschland) kollimiert und durch einen 785 nm Laser-Clean-Up-Filter (68-947, Edmund Optics GmbH, Deutschland) geleitet. Der schmale Bandpassfilter eliminiert mögliches Signalrauschen und stellt sicher, dass nur die gewünschte Emissionswellenlänge von 785 nm die Probe erreicht. Durch die Verwendung einer Plankonvexlinse (LA1464-B, Thorlabs GmbH, Deutschland) wird das Anregungslicht mit einer Spotgröße von circa 1 mm und einer optischen Ausgangsleistung von annähernd 17 mW punktförmig auf die Probe fokussiert. Zur Reduktion von Streulicht und direkten Reflektionen der Proben sind die Wände im Inneren der bildgebenden Analyseeinheit mit einer schwarzen auf Kohlenstoff basierenden Beschichtung versehen. Die Detektionseinheit besteht aus einer 12 Bit CCD-Kamera (Manta G-145, Allied Vision Technologies GmbH, Deutschland) und einem Bildverstärker (BV-1882-NZ, ProxiVision GmbH, Deutschland). Dazu ist die Fotokathode des Bildverstärkers an ein Objektiv mit fester Brennweite von 35 mm (35 mm Serie C, Edmund Optics GmbH, Deutschland) gekoppelt, um die von den Proben erfassten Bilder auf die Fotokathode zu fokussieren. Die Bildverstärkung wird durch eine Mikrokanalplatte im Inneren der Bildverstärkereinheit erreicht. Daraufhin werden die Bilder auf einen Phosphorbildschirm projiziert, der unter Verwendung eines faseroptischen Tapers (ProxiKit, ProxiVision GmbH, Deutschland) an den CCD-Sensor der Kamera gekoppelt ist. Der Bildsensor der CCD-Kamera ist in der Lage ein vertikales und horizontales Binning durchzuführen, wodurch ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht wird und eine Verbesserung der Signalverarbeitungsgeschwindigkeit erreicht wird [46].

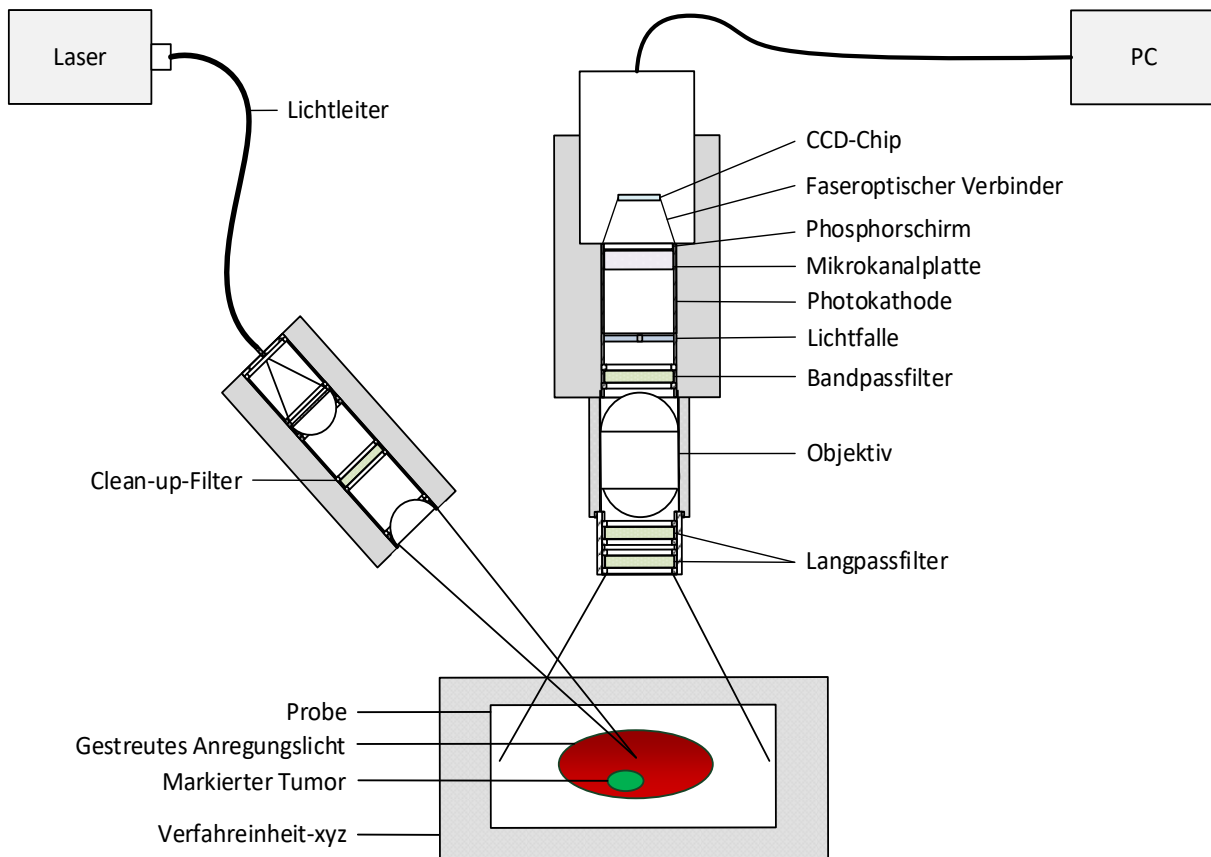


Abbildung 2: Messaufbau für Gewebescanning zur Detektion von Fluorophoren aus tieferen Gewebeschichten

3.1.1 Auslegung und Abbildung der optischen Anregungsbeleuchtung

Die Anregungsbeleuchtung ist dahingehend ausgelegt, dass Unebenheiten in der zu beleuchtenden Oberfläche zu möglichst geringen Strahlaufweitungen des Anregungslichtflecks führen. Bedingt durch die Brennweite f der Plankonvexlinse von 500 mm und einem Linsendurchmesser d von 25,4 mm in Abbildung 3 wurde ein Kompromiss zwischen dem Abstand der Anregungsbeleuchtung zur Probe und einer Minimierung der Aufweitung des Anregungslichtstrahls getroffen.

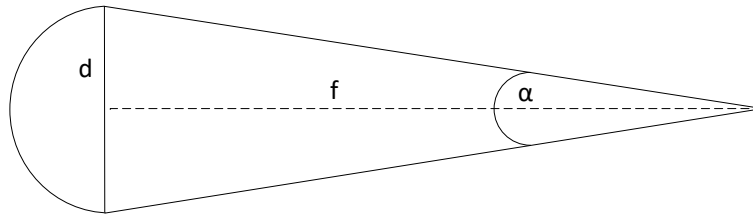


Abbildung 3: Schematische Darstellung der optischen Abbildung des Anregungslichtflecks der Anregungsbeleuchtung

Die Formel 3.1 zeigt die Abhängigkeit des Öffnungswinkels α vom Brennpunkt auf der optischen Achse und dem Durchmesser der Fokuslinse der Anregungsbeleuchtung. Der Abstand zwischen der Fokuslinse und dem Brennpunkt wird dabei durch die Brennweite f beschrieben.

$$\alpha = 2 * \arctan\left(\frac{d}{2*f}\right) \quad (3.1)$$

Die gewählte Optik der Anregungsbeleuchtung besitzt eine optische Strahlaufweitung von 1 mm bei einer Verschiebung von 20 mm des Objekts aus der Fokusebene. Unter der Berücksichtigung der zu erwartenden planaren strukturellen Unebenheiten der zu betrachtenden Objekte wurde eine hinreichend gute Kollimierung für die optische Auslegung der Anregungsbeleuchtung getroffen.

3.1.2 Optische Filtereinheit der Detektionsoptik

Um die gewünschten schwachen Fluoreszenzsignale auf der Detektionsseite zu extrahieren, wird ein Filterstapel verwendet, welcher zwei 810 nm Langpassfilter (F76-787, Semrock Inc., USA) und einen Bandpassfilter (F39-834, Semrock Inc., USA) umfasst. Der Filterstapel besitzt eine optische Gesamtdichte (OD) von 18. Die OD berechnet sich indem der dekadische Logarithmus des Verhältnisses der eingestrahnten Leistung P_i zu der übertragenen Leistung P_t , wie in der nachfolgenden Formel 3.2 beschrieben, gesetzt wird.

$$OD(\lambda) = \log_{10}\left(\frac{P_i(\lambda)}{P_t(\lambda)}\right) = -\log_{10}\tau(\lambda) \quad (3.2)$$

Der Blockingfilterstapel ist notwendig, da auch auftretende Reflexionen, Hintergrundlicht und andere fluoreszierende Substanzen, die natürlicherweise im Körper vorkommen wie beispielsweise Porphyrine durch den Bildverstärker intensiviert werden. Durch die spezielle Anordnung der Filter, wie in Abbildung 5 dargestellt, wurde die Detektion von störenden Signaleinflüssen durch die oben beschriebenen Effekte minimiert. Die Abbildung 4 zeigt die spektralen Eigenschaften des Detektionssystems. Das System ist im Spektralbereich von 810 nm bis 870 nm sensitiv und ermöglicht eine Signaldetektion mit einer hohen Transmission in diesem Bereich.

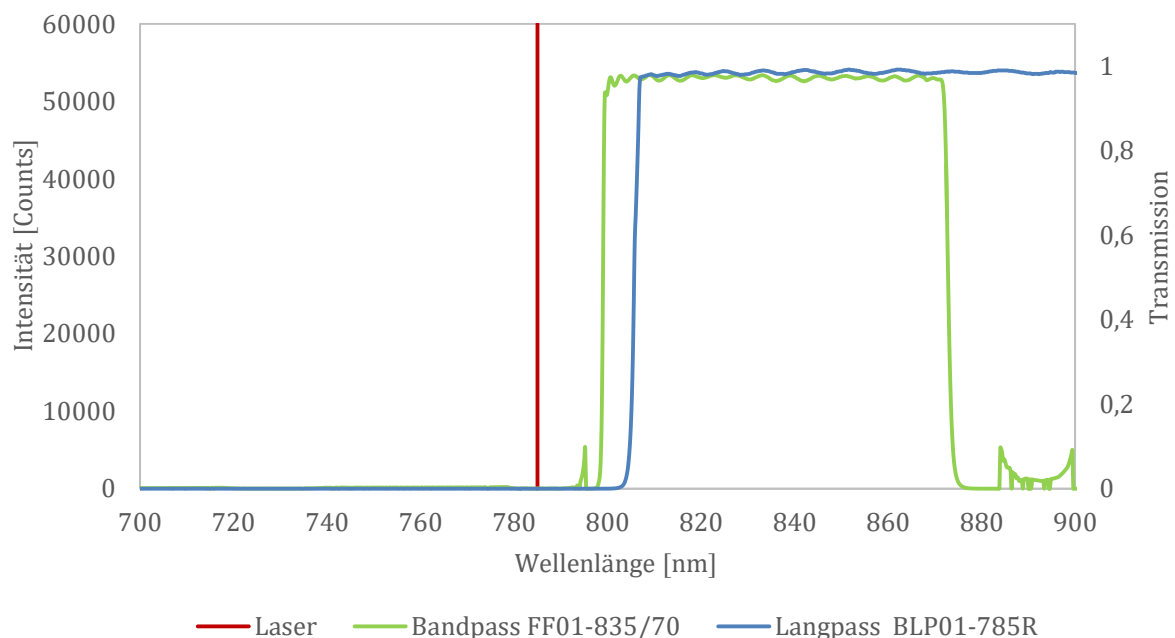


Abbildung 4: Sensitiver spektraler Bereich des Detektionssystems

3.1.3 Lichtfalle

Zum Verbergen des elastischen Remissionsflecks des Lasers auf der Probenoberfläche wird eine künstliche Lichtfalle verwendet. Diese verhindert eine Überbelichtung und die daraus folgende Zerstörung des Bildverstärkers. Die verwendete invertierte Iris ist eine miniaturisierte Lichtfalle, die speziell entwickelt wurde und direkt in den Lichtweg nahe der Mitte in der Fokusebene des Bildverstärkers integriert ist. Die kreisförmige Blende ist aus einem Polymermaterial mit einer matten Oberfläche und einem hohen

Absorptionskoeffizienten gefertigt. Die Reflexion der monochromatischen Anregungsbeleuchtung wird dadurch minimiert. Da sich die Lichtfalle direkt vor der aktiven Fläche des Bildverstärkers befindet und dessen Ausgang mit dem CCD-Sensor verbunden ist, kann angenommen werden, dass sich die Lichtfalle quasi auf dem CCD-Sensor befindet (Abbildung 5). Die Abmessungen der Lichtfalle lassen sich durch die Division aus dem Produkt der Pixelgröße des CCD-Sensors in Mikrometer, dem Durchmesser der Lichtfalle im Bild in Pixel und dem gewählten Binningfaktor mit dem Divisor von 1000 berechnen (Formel 3.3).

$$\text{Lichtfalle (mm)} = \frac{\text{Pixelgröße CCD } (\mu\text{m}) \times \text{Lichtfalle (px)} \times \text{Binningfaktor}}{1000} \quad (3.3)$$

Abhängig von dem Durchmesser der Lichtfalle und der Schärfentiefe können strukturell bedingte Unebenheiten in positiver und negativer Richtung zum Detektor auf der optischen Achse kompensiert werden. Durch die Änderung des Höhenprofils der Probe entsteht eine Größenänderung des Anregungslichtflecks und eine Verschiebung der scharfen Abbildung eines Objekts auf dem Detektor. Für die Kompensation der Unebenheiten der Probe müssen zwei wesentliche Bedingungen erfüllt sein. Zum einen muss die Abbildung des Objekts im Bereich der optisch bedingten zulässigen Schärfentiefe liegen, zum anderen darf der Anregungslichtfleck nicht die Abschattung der Lichtfalle überschreiten.

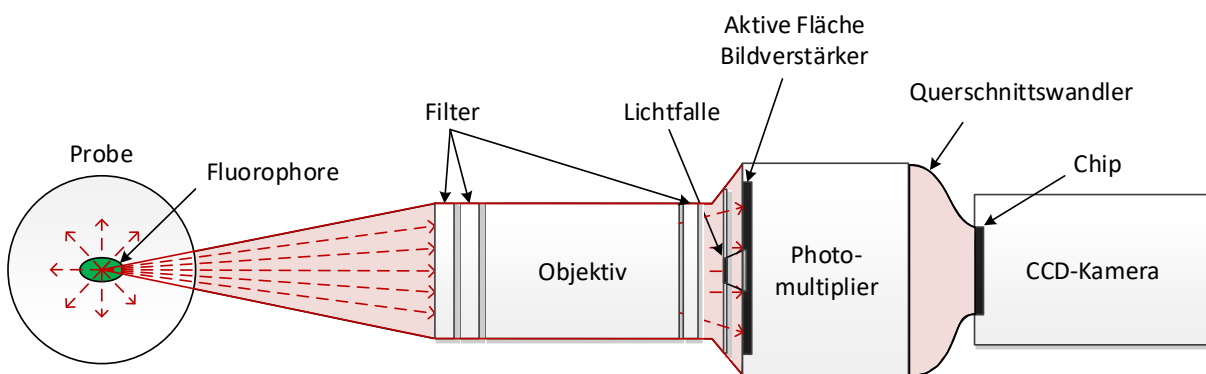


Abbildung 5: Lichtwegstruktur des Detektionssystems

Die Höhe der maximalen strukturellen Unebenheiten der Probe, die kompensiert werden können, lässt sich aus den folgenden mathematischen Zusammenhängen zur Berechnung der

Tiefenschärfe Formeln 3.5 und 3.6 aus Pedrotti et al. ableiten [66]. Zunächst wird hierfür die Berechnung der Tiefenschärfe herangezogen. Bei der Abbildung einzelner Objektpunkte auf die Detektorebene werden diese idealerweise scharf abgebildet. Objekte, die sich vor oder hinter der Detektorebene befinden, werden nicht mehr als scharfe Punkte, sondern als Unschärfekreis in der Detektorebene abgebildet. Durch die begrenzte Auflösung des Kamerasensors werden Objekte nur bis zu einem bestimmten Durchmesser des Unschärfekreises u' als scharf in der Bildebene abgebildet wahrgenommen. Die Blendenzahl k beschreibt die Lichtmenge, welche das Objektiv passiert. Das Maß für die Lichtstärke des Objektivs berechnet sich, wie in der Formel 3.4 beschrieben, aus dem Quotienten der Brennweite f' und dem Blendendurchmesser d .

$$k = \frac{f'}{d} \quad (3.4)$$

Die Distanz zwischen der Schärfenebene und dem Objektiv ist durch den Abstand a_0 definiert. Die Begrenzungen der Schärfentiefe entspricht der Entfernung vom Objektiv zu der vorderen Grenze a_v beziehungsweise hinteren Grenze a_h des beobachteten Objekts.

$$\text{vordere Grenze:} \quad a_v = \frac{a_0 f'^2}{f'^2 - u' k (a_0 + f')} \quad (3.5)$$

$$\text{hintere Grenze:} \quad a_h = \frac{a_0 f'^2}{f'^2 + u' k (a_0 + f')} \quad (3.6)$$

Die daraus resultierende Schärfentiefe berechnet sich aus der Differenz zwischen der hinteren Grenze und der vorderen Grenze (Formel 3.7).

$$\text{Schärfentiefe} = a_h - a_v \quad (3.7)$$

Durch Substitution des Unschärfekreises u' durch den Durchmesser der Lichtfalle l' in den Formeln 3.5 und 3.6 ergeben sich die Formeln 3.8 und 3.9. Dadurch lassen sich die Grenzwerte für die maximale Kompensation der Unebenheiten der Probenoberfläche in positiver Richtung k_p und negativer Richtung k_n wie folgt berechnen:

$$\text{vordere Grenze:} \quad k_p = \frac{a_0 f'^2}{f'^2 - l' k (a_0 + f')} \quad (3.8)$$

$$\text{hintere Grenze:} \quad k_n = \frac{a_0 f'^2}{f'^2 + l' k (a_0 + f')} \quad (3.9)$$

Wie in der Abbildung 6 zu sehen ist, entsprechen die mittels der Formeln 3.8 und 3.9 berechneten Entfernungen k_p und k_n der minimalen und maximalen Entfernung unter der Berücksichtigung der Größenänderung des Anregungslaserspots, bis die detektorseitige Abschattung durch die Lichtfalle überschritten wird. Der Sektor, in dem eine Kompensation stattfindet, berechnet sich aus der Differenz der minimalen und maximalen Entfernung k_p und k_n entsprechend der Formel 3.10.

$$\text{Kompensationssektor} = k_n - k_p \quad (3.10)$$

In der folgenden Abbildung 6 ist der Durchmesser der Lichtfalle für eine optimale Auslegung der Optik dargestellt. Die Grenzen des Schärfentiefenbereichs entsprechen hier dem Kompensationssektor.

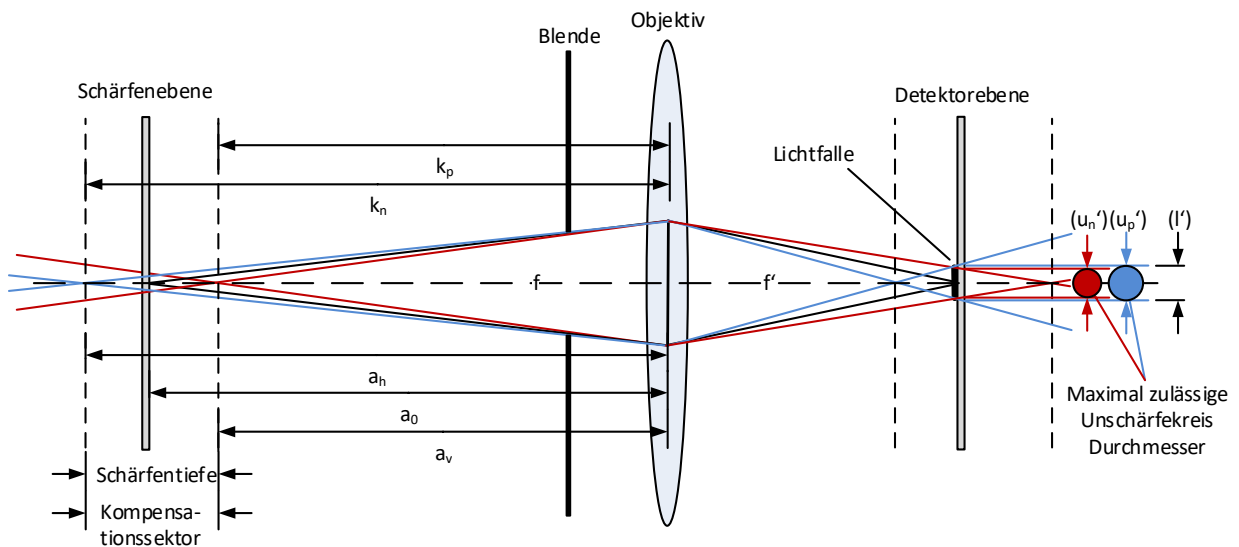


Abbildung 6: Physikalische Abbildungseigenschaften und Profilkompensation der Probenoberfläche

3.1.4 Photonenflussanalyse des optischen Systems

Zur Auslegung der optischen Eigenschaften wurde eine Photonenflussanalyse des entwickelten Systems für den Anregungs- und den Detektionslichtweg erarbeitet. Für die Berechnung wurden unter Zuhilfenahme der Software OptiCAD (OptiCAD Corporation, USA)

entsprechende Simulationen mittels Raytracing durchgeführt, die den Strahlengang des Systems näherungsweise abbilden und eine spezifische Auslegung der optischen Eigenschaften unter Berücksichtigung verschiedenster Quereinflüsse erlauben.

Im Folgenden ist die Simulation der Abbildung des Anregungslichtwegs dargestellt (Abbildung 7). Durch die Simulation lässt sich die Abbildung des Strahlprofils in, vor und hinter der Fokusebene untersuchen. Hinsichtlich der Kompensationseigenschaften des Laserscanningsystems ist die Betrachtung zur Auslegung der Brennweite anregungsseitig notwendig.

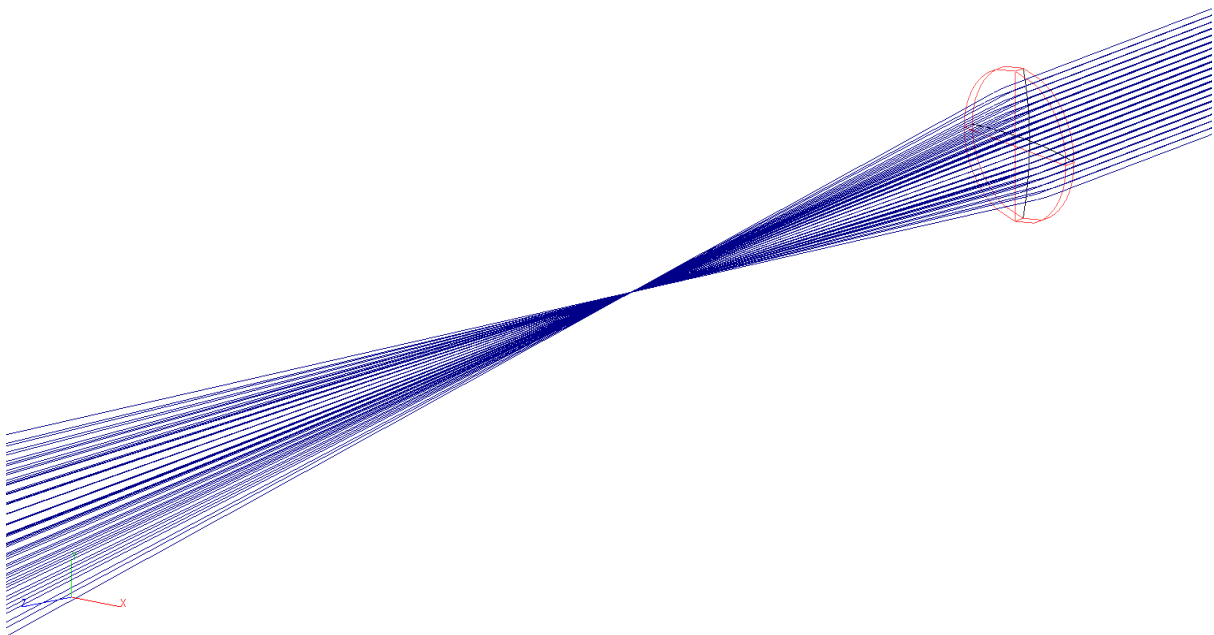


Abbildung 7: Simulation der Anregungsbeleuchtung

Mit einer Brennweite der Anregungsbeleuchtung von 500 mm wurde ein Kompromiss zwischen der Strahlprofilbeschaffenheit und der damit verbundenen Strahlaufweitung hinsichtlich des Arbeitsabstandes gewählt. Durch die minimale Begrenzung in der Fokusebene, bedingt durch die Glasfaser zwischen Laser und Anregungsoptik mit einem Durchmesser von 200 μm , kommt es näherungsweise bei ± 20 mm relativen Abstands zur Fokusebene zu einer maximalen radialen Strahldeformierung von näherungsweise 800 μm . In der Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Strahlaufweitung der Anregungsbeleuchtung für den

Bereich der Fokusebene und bis 20 mm vor und hinter der Fokusebene in verschiedenen Abständen illustriert. An den spezifischen Abständen ist der Mittelwert des Strahlprofiles sowie die statistische Verteilung der Einzelphotonen bezogen auf den Durchmesser des Anregungslichtflecks dargestellt.

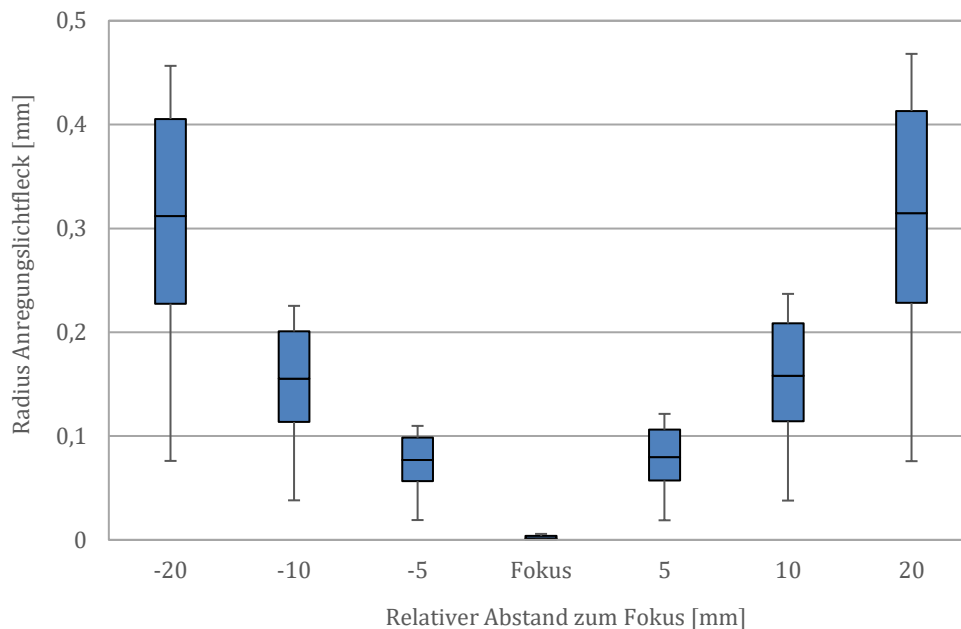


Abbildung 8: Strahlaufweitung der Anregungsbeleuchtung bei relativen Abständen zur Fokusebene, dargestellt für die Abstände von ± 0 mm, ± 5 mm, ± 10 mm und ± 20 mm vor und hinter der Fokusebene

Nachfolgend sind die Simulationsergebnisse (Abbildung 9) der Photonverteilungen als Punktwolken in verschiedenen Abständen zur Fokusebene visualisiert. Zur übersichtlicheren Veranschaulichung ist die Abbildung mit einer reduzierten Photonanzahl dargestellt. Durch diese Ansicht lässt sich die Strahlaufweitung als Schnittbilder in der z-Ebene bei spezifischen Abständen veranschaulichen und vergleichen.

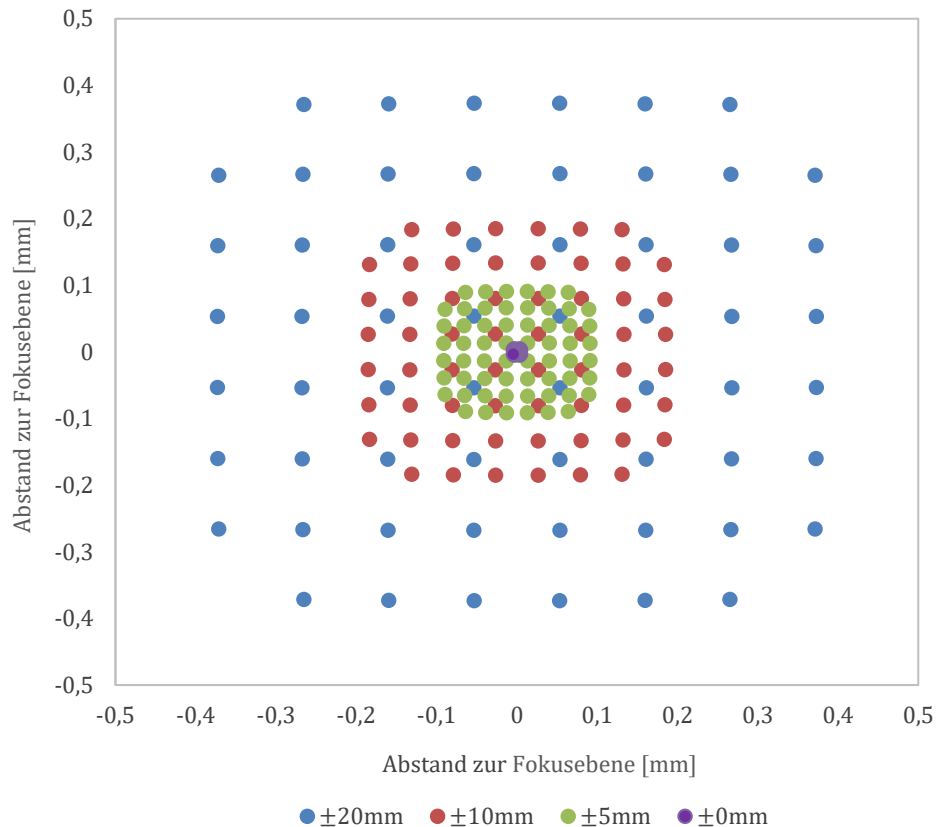


Abbildung 9: Simulation der punktwolkenförmigen Anregungsbeleuchtung bei relativen Abständen zur Fokusebene, dargestellt für die Abstände von ± 0 mm, ± 5 mm, ± 10 mm und ± 20 mm vor und hinter der Fokusebene

Zur Auslegung und Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Detektionssystems wurde die Lichtwegstruktur der Detektionseinheit mittels Raytracing untersucht und optimiert. Durch die numerische Simulation wurde die optimale Position sowie die geeigneten Geometrien der Lichtfalle ermittelt, um eine vollständige Unterdrückung der Anregungsbeleuchtung zu erreichen. Hinsichtlich der Auslegung der Detektionsoptik wurde die Abbildung des Anregungslichtflecks auf dem Detektor berechnet. Die Simulation, welche in Abbildung 10 dargestellt ist, zeigt eine vereinfachte Visualisierung der Lichtwegstruktur der optischen Abbildung des Anregungslichtflecks auf den Detektor des Detektionssystems.

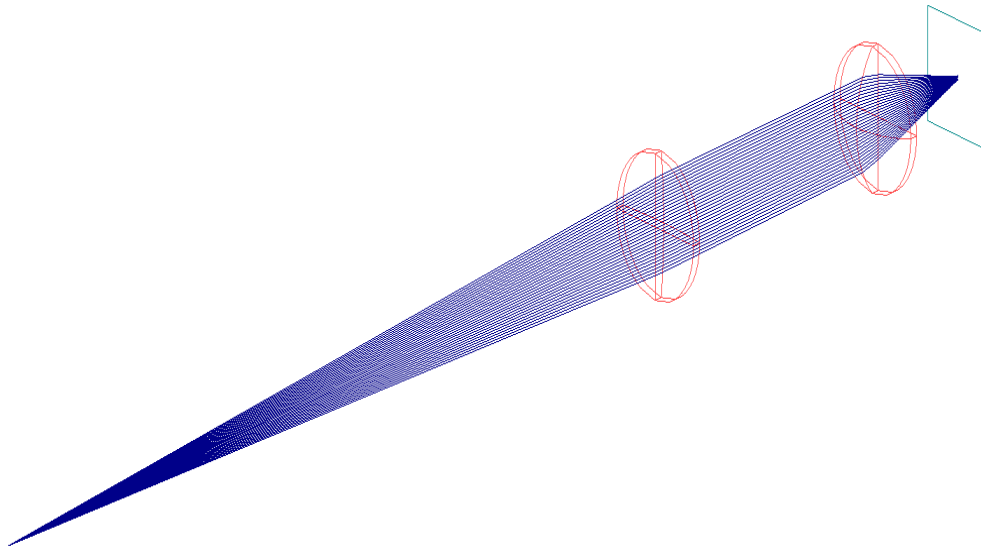


Abbildung 10: Raytracing Simulation zur Auslegung und Optimierung der Lichtwegstruktur der Detektionseinheit

Die Darstellung in Abbildung 11 zeigt die vergrößerte Abbildung des Anregungslichtflecks aus Abbildung 10. Durch die Vergrößerung wird ersichtlich, dass die Lichtfalle sämtliche Photonen der Anregungsbeleuchtung absorbiert und dadurch eine Detektion durch den Empfänger verhindert wird.

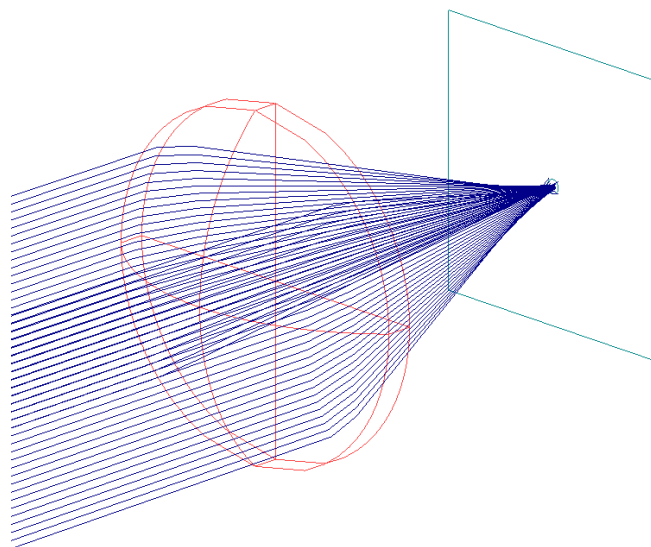


Abbildung 11: Visualisierung der Abbildung des Strahlengangs des Anregungslichtflecks auf dem Detektor

In der folgenden Abbildung 12: Photonenverteilung der Anregungsbeleuchtung mit einem Durchmesser von $800\ \mu\text{m}$ ist die Darstellung der Simulation der Photonenverteilungen zur besseren Veranschaulichung mit einer reduzierten Anzahl von 1000 Photonen dargestellt. Bei dem Durchmesser der Anregungsbeleuchtung von $800\ \mu\text{m}$ und einem Durchmesser der Lichtfalle von $1\ \text{mm}$ ist eine statistische Absorption von über 99 % aller Photonen gegeben.

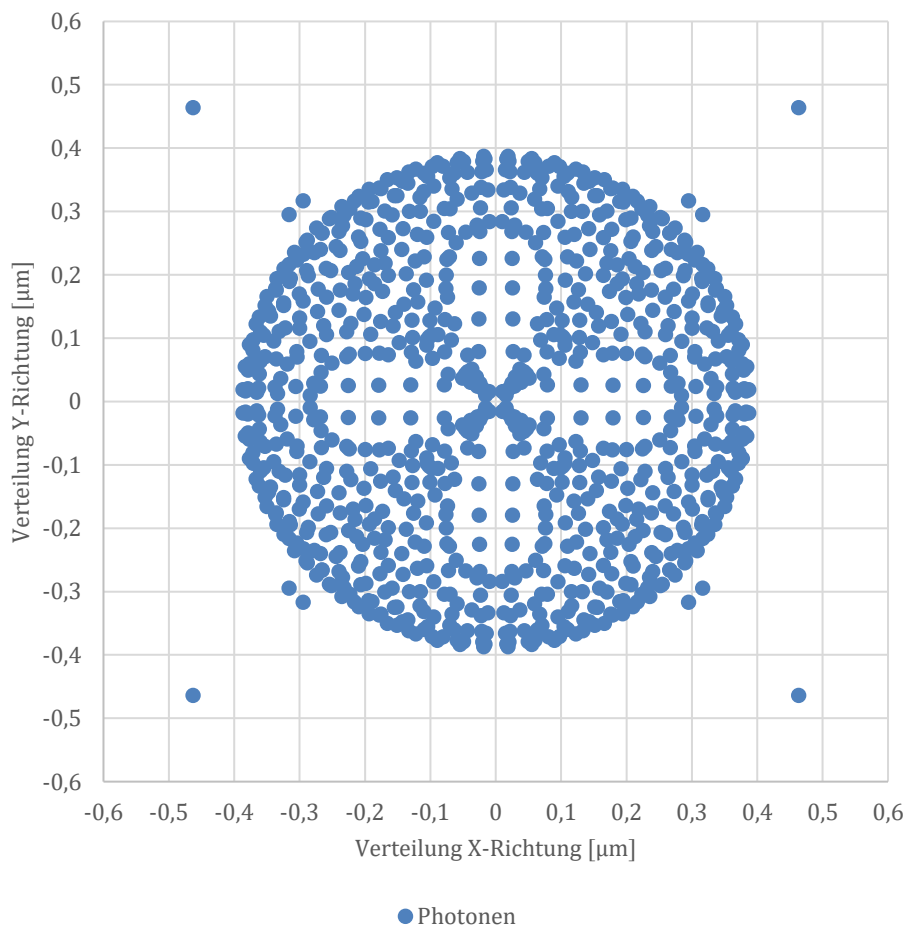


Abbildung 12: Photonenverteilung der Anregungsbeleuchtung mit einem Durchmesser von $800\ \mu\text{m}$

Zur Untersuchung des Absorptionsgrades der Lichtfalle hinsichtlich der gesamten Detektionsfläche des Empfängers, wurde eine Betrachtung der optischen Photonenverteilungen mit und ohne Lichtfalle durchgeführt. Für die Raytracing Berechnung wurde eine radial symmetrische Ausleuchtung des Detektors mit 10.000 Photonen zu Grunde

gelegt (Abbildung 13:). Jedes Photon und dessen zurückgelegte Wegstrecke ist in der Abbildung als blaue Linie dargestellt.

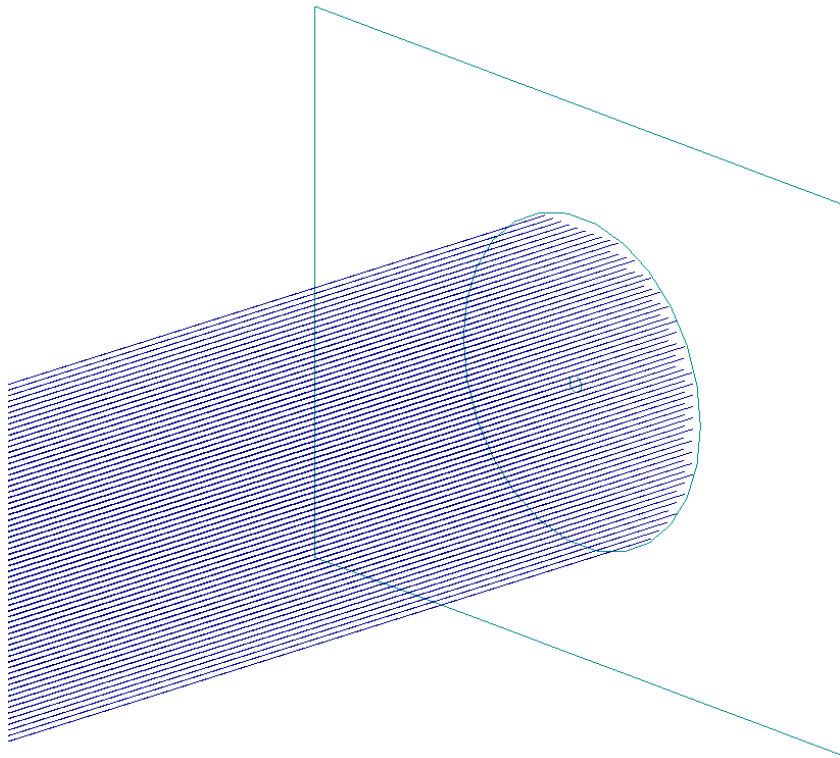


Abbildung 13: Raytracing Modellierung des Detektors bei radialsymmetrischer Ausleuchtung

Bezogen auf die gesamte Detektionsfläche liegt die Absorption der Lichtfalle bei unter 0,2 %. Die auftretende Absorption des Lichts, bezogen auf die gesamte Detektionsfläche, wurde als Kompromisslösung zwischen der Größe des Anregungslichtflecks und dem Durchmesser der Lichtfalle gewählt. Die Abbildung 14 zeigt die Draufsicht der Photonenverteilung auf dem Detektor. In der Bildmitte ist der vernachlässigbar kleine Anteil an Detektionsfläche zu sehen, an welcher keine Detektion, hervorgerufen durch die Lichtfalle, stattfindet.

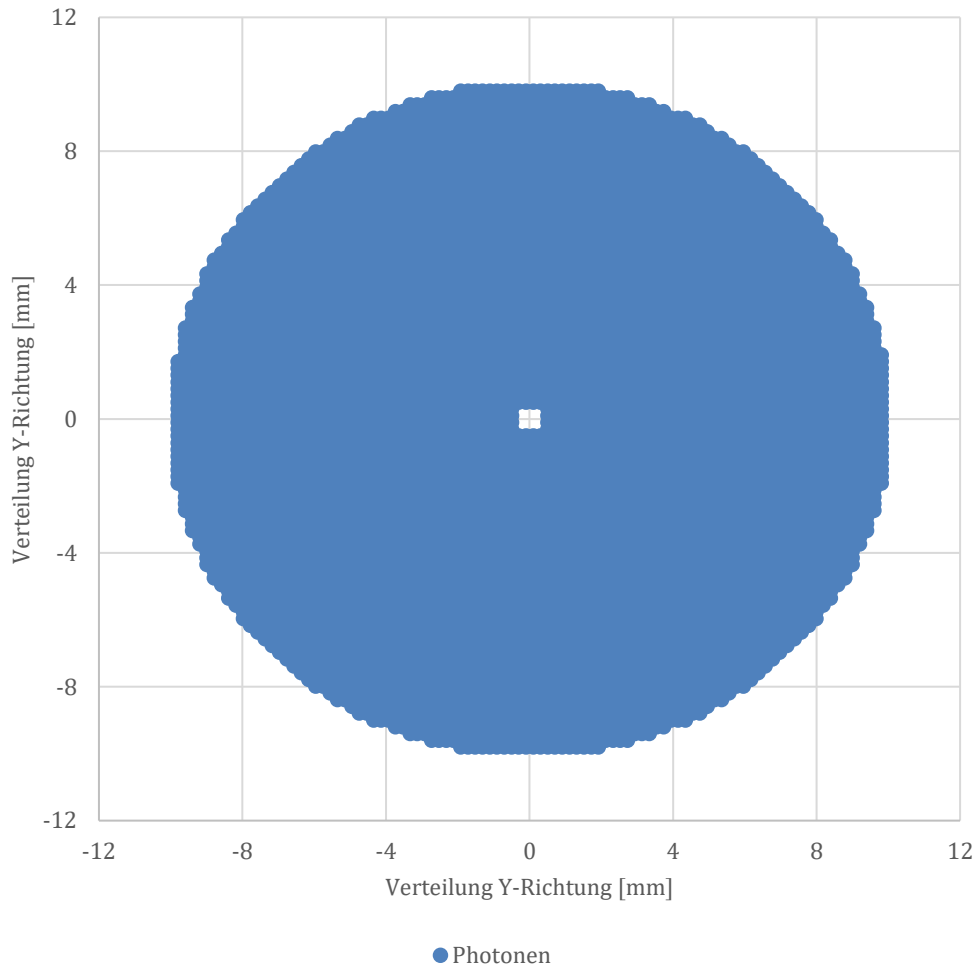


Abbildung 14: Raytracing Modellierung der Strahlverteilung auf dem Detektor bei radialsymmetrischer Ausleuchtung

3.2 Automatisiertes Scannen von großen Gewebeproben

Um die Reproduzierbarkeit bei der Durchführung von Gewebeanalysen von größeren Proben zu gewährleisten, werden das Detektionssystem und die Anregungsoptik mechanisch auf einer Aluminiumplatte gehalten. Durch die feste Montage des optomechanischen Moduls kann eine Montage an das Linearsystem zum Verfahren oder Bewegen des Detektionsmoduls beziehungsweise der Probe erfolgen, ohne Veränderungen der optischen Systemeigenschaften vornehmen zu müssen.

3.2.1 Positionierungssystem

Zum Scannen und Analysieren von Gewebeproben wurde das Detektionssystem an ein Positionierungssystem, welches aus der Kombination von drei motorisierten Lineareinheiten (drylin E, IGUS GmbH, Deutschland) basiert, montiert. Die Lineareinheiten folgen einer mechanischen Anordnung, die Bewegungen in alle drei Raumrichtungen (x-, y-, z-Richtung) erlauben. Die Motoren der Linearachsen können über die jeweils zugehörige Schrittmotorsteuerung (SMCI33, Nanotec, Deutschland) der einzelnen Motoren die spindelgetriebenen Schlitten der Lineareinheiten mit einer Wiederholgenauigkeit von $\pm 5 \mu\text{m}$ positionieren. Die nachfolgende Abbildung 15 zeigt das Positionierungs- sowie das Detektionssystem.

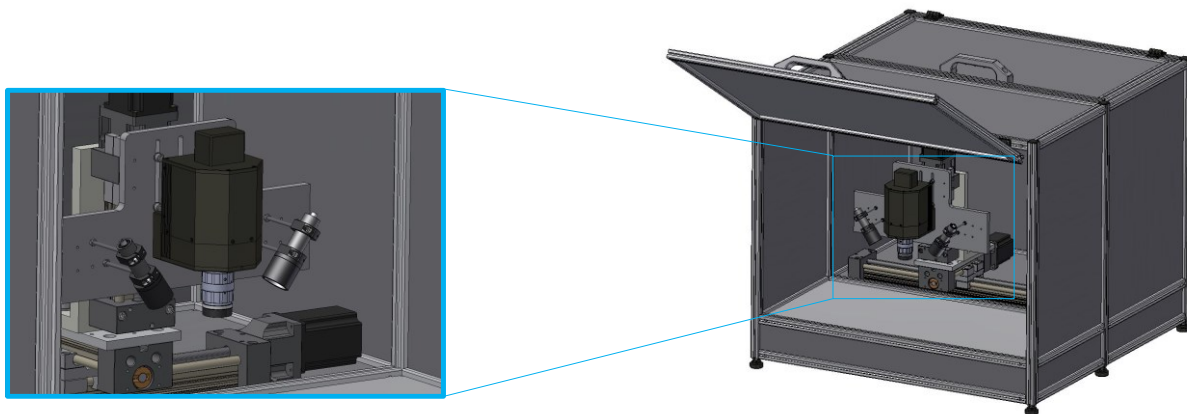


Abbildung 15: Positionierungs- und Detektionssystem

3.2.2 Bediensoftware

Für das automatisierte Scannen und die Datenerfassung wurde ein speziell für die Anwendung entwickeltes LabVIEW-Programm (National Instruments LabVIEW 2017) erstellt. Die Software führt eine automatisierte Positionierung und Bildaufnahme des Detektionssystems über der Probe durch. Die Probe wird mittels einer Rasterung einzelner Bildbereiche gescannt. Die Programmstruktur der Bediensoftware ist durch den nachfolgenden Ablaufplan (Abbildung

16) beschrieben und zeigt die Beziehungen zwischen den einzelnen Zuständen und den Transitionsbedingungen im Programm.

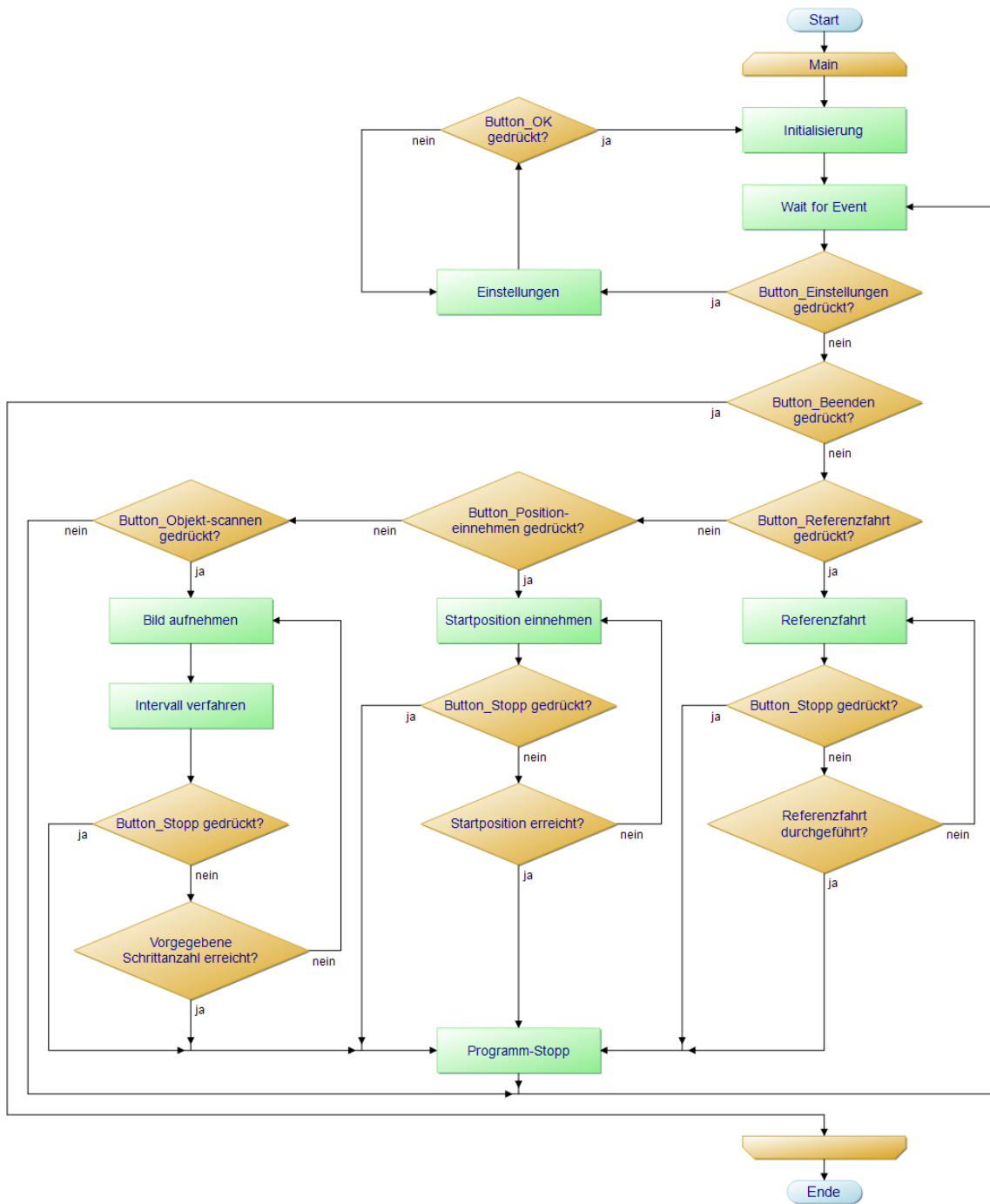


Abbildung 16: Flussdiagramm der Bediensoftware

3.2.3 Bildspeicherung

Die Bildaufnahmefunktion ist in die Bediensoftware des Bildaufnahmesystems integriert. In den Einstellungen wird die Größe des Probenvolumens bestehend aus der Anfangs- und Endposition der Messstrecke sowie die Anzahl der Aufnahmen hinterlegt, aus denen das abgebildete Gegenstandsfeld der einzelnen Bilder berechnet wird. Die Kantenlänge ϕ der einzelnen Bilder der jeweiligen Raumrichtung errechnet sich wie in Formel 3.11 beschrieben, aus dem Quotienten der Messstrecke und der Anzahl der Bilder in dieser Raumrichtung.

$$\phi = \frac{(\text{Ende Messstrecke} - \text{Anfang Messstrecke})}{\text{Anzahl der Bilder in Raumrichtung}} \quad (3.11)$$

Weitere Parameter wie die Belichtungszeiten des CCD-Chips und die Kameraverstärkung werden in den Einstellungen im Vorfeld hinterlegt.

Die aufgenommene Bildserie wird zunächst im Tiff-Format auf die Festplatte des Bedienrechners gespeichert. Die Bildserien werden dadurch dokumentiert und stehen jederzeit für eine Weiterverarbeitung bereit. Das Tiff-Format ist ein weit verbreitetes Datenformat für Grafiken mit einer verlustfreien Komprimierung. Zudem ist die Abspeicherung von Grafiken mit 16 Bit in diesem Format möglich. Die Aufnahme von Bildserien kann mit Standardlabor- oder Bürorechnern (Intel Core i7-4790 CPU, 3,6 GHz, 32 GB-Arbeitsspeicher, Windows 8.1) durchgeführt werden.

3.2.4 Registrierung der Bildserien

Zur Registrierung der Bildserien werden die einzelnen, translatorisch versetzten Bilder eines mäanderförmigen Gewebescans (Abbildung 17) mittels eines Bildverarbeitungsalgorithmus nach Preibisch et al. unter Zuhilfenahme der Software ImageJ 1.51r, zu einem Gesamtbild zusammengefügt [67]. Die einzelnen Bilder werden dabei mit einem Bildflächenüberlapp aufgenommen.

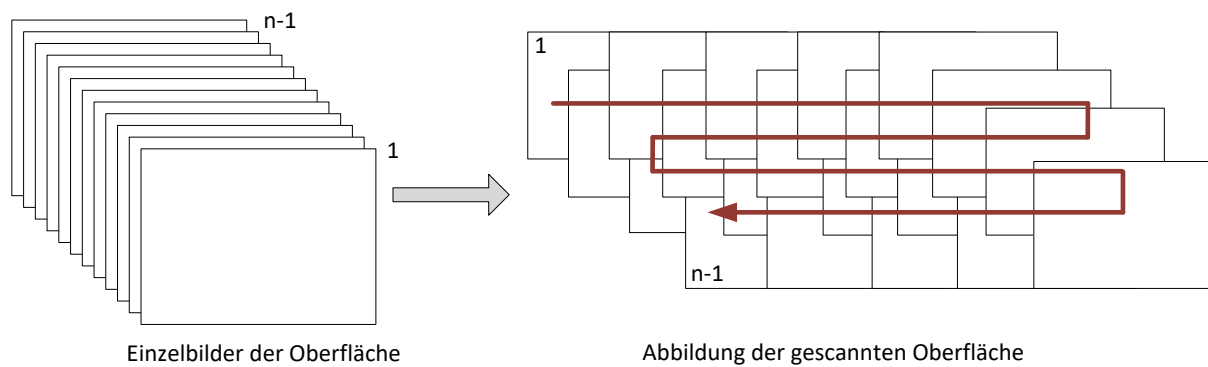


Abbildung 17: Registrierung der Bildserien

3.2.5 Algorithmische Korrektur störender Bildartefakte

Die auftretenden Bildartefakte, resultierend aus der Lichtfalle, können durch eine geschickte mehrfache Belichtung der Probe bei ausreichender Anzahl an Bildinformationen eliminiert werden. Die zusätzlich benötigten Bildinformationen werden bei der Durchführung des Gewebescans durch eine Bildflächenüberlappung gewonnen.

Eine Untersuchung der Beleuchtungshomogenität wie in Abbildung 18 mittels einer linearen Regressionsanalyse zeigt, dass eine homogene Beleuchtung mit einer Standardabweichung von 7,7 % relativ zum mittleren Beleuchtungsdurchschnitt der Probe bei einer prozentualen Bildüberlappung von 80 % auftritt. Eine Betrachtung der Graustufenintensitäten des Histogramms bestätigt dies. Der Grad für eine ausreichende homogene Beleuchtung der Probe lässt sich durch den prozentualen Bildüberlapp beliebig skalieren. Mit zunehmendem Bildüberlapp sinkt die Standardabweichung und die Homogenität des Anregungslichts nimmt zu [46].

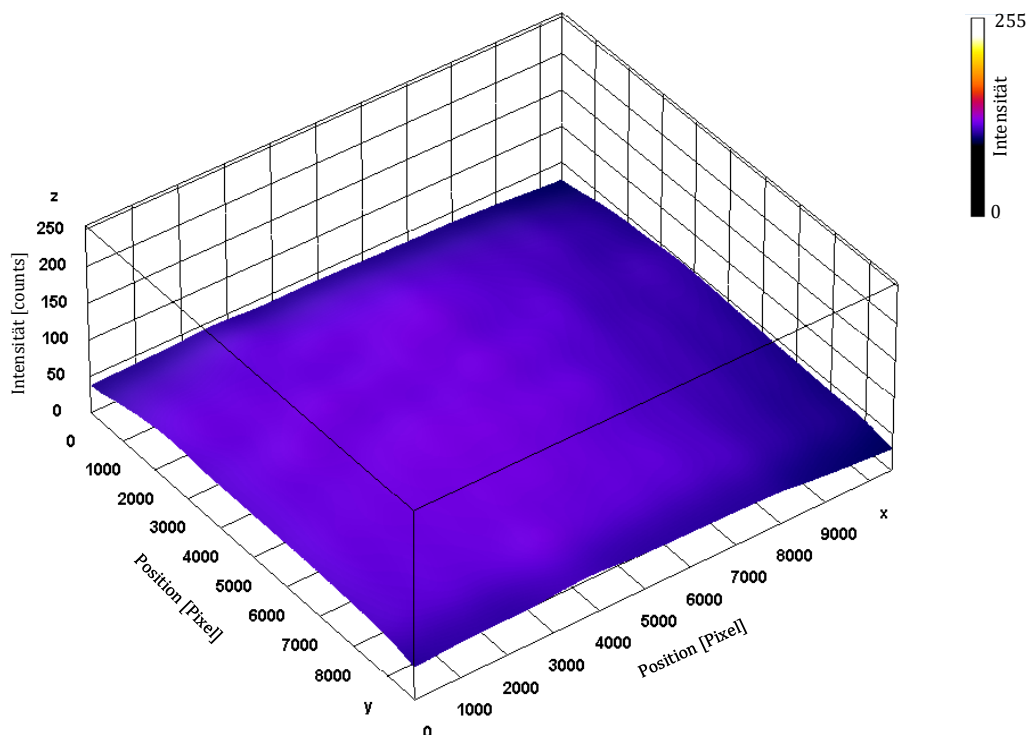


Abbildung 18: Visualisierung einer homogenen Blindmessung zur Untersuchung der Beleuchtungshomogenität des Anregungslichtpfads

Durch eine statistische Betrachtung der gemessenen Intensitäten jedes einzelnen Pixels lässt sich mittels eines Histogramms (Abbildung 19) die Häufigkeitsverteilung der Pixel mit gleichen Intensitätswerten darstellen. Durch die Summation der Pixel mit identischen Intensitäten der Blindmessung (BM) im unteren Wertebereich der Abszisse lässt sich die Homogenität der Anregungsbeleuchtung visualisieren. Zur Verdeutlichung wurde im Histogramm zusätzlich die Messung mit einer markierten Probe (RK) mit aufgetragen. Diese weist eine weite Verteilung der einzelnen Pixel mit Intensitäten über den gesamten Intensitätsbereich auf [46].

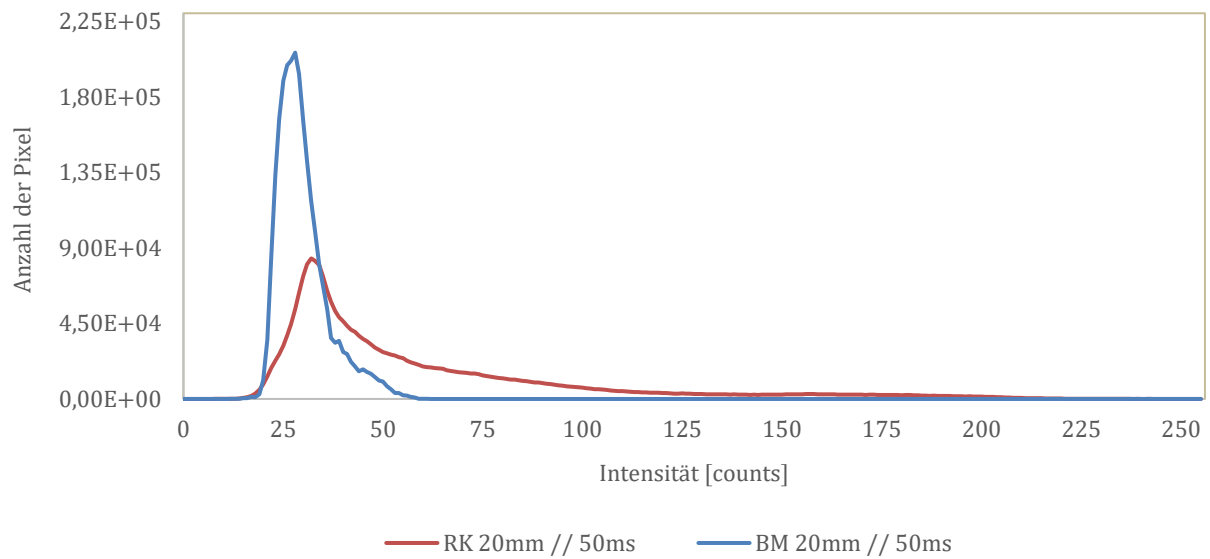


Abbildung 19: Histogramm zur Darstellung der Intensitätsverteilung der Grauwerte über den gesamten Detektionsbereich

3.2.6 Auswertung der gescannten Proben

Die Auswertung der Proben erfolgte mittels einer linearen Regressionsanalyse. Hierzu wurden mittels einer in LabVIEW geschriebenen Software die gescannten Bilder ausgewertet. Für den Fluoreszenznachweis in spezifischen Gewebetiefen wurde der jeweils maximale detektierte Intensitätswert der Regressionsgeraden herangezogen. Die Nachweisgrenze der gemessenen Fluoreszenzintensität in den ausgewerteten Bildern wurde auf das Dreifache des Grundrauschens festgelegt, um eine ausreichend sichere Detektion zu gewährleisten.

3.3 Versuche am Tierorganismus

Die *in vivo* Experimente wurden unter Verwendung männlicher SHO-Mäuse (Crl:SHO-*Prkdc^{scid}Hr^{hr}*), bezogen von den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland), durchgeführt [43, 44]. Alle Experimente wurden gemäß den örtlichen Vorschriften für die Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt (Zulassungsnummer 35–9185.81/G-206/15, Regierungspräsidium Karlsruhe). Zur Tumorzucht wurden $4\text{--}5 \times 10^6$ Zellen (GRPR-positive PC3 oder PSMA-positive LNCaP-Zellen) in sterilem PBS (100 μL) in den linken

Oberschenkel injiziert, als die Mäuse sechs bis acht Wochen alt waren. Die Gesundheit der Tiere und das Tumorwachstum wurden täglich überprüft, bis die Tumore einen Durchmesser von 4 mm bis 5 mm erreichten (zwei bis drei Wochen für PC3, bis zu acht bis zwölf Wochen für LNCaP). Alle Injektionen und Messungen von Mäusen wurden unter Anästhesie und konstanter Temperatur durchgeführt (1,5–3 % Isofluran/O₂, 2–3 l/min). Zu diesem Zweck wurde das entwickelte optische Messsystem mit einem Anästhesiesystem und einem Wärmekissen ausgestattet. Zudem wurden zu den *in vitro* Untersuchungen begleitend biologische Materialien vom Schwein eingesetzt. Auch hier wurde für alle Experimente gemäß den örtlichen Vorschriften für die Pflege und Verwendung von Labortieren gehandelt [46].

3.4 Detektion von Fluoreszenz aus tiefen Gewebeschichten

In den *in vitro* Experimenten zum Nachweis von Fluoreszenz aus tieferen Gewebeschichten wurden Reiskörner als Tumorphantome verwendet. Die Autofluoreszenz von Reiskörnern ist vernachlässigbar gering. Die Phantomgrößen lagen bei circa 7 mm × 2 mm. Die Reiskörner wurden durch Einlegen in eine Indocyaningrün (ICG) -Lösung (PULSION Medical Systems SE, Deutschland) [Absorption: 785 nm / Emission: 830 nm] mit einer Konzentration von 3,125 µg ICG/mL H₂O für 24 Stunden in einer dunklen und kühlen Umgebung eingefärbt [57]. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben sind die Absorptionskoeffizienten von Hämoglobin, Lipiden und Wasser bei etwa 700 nm bis 900 nm am niedrigsten [45, 68]. Daher wurden die Versuche in diesem optischen Wellenlängenbereich durchgeführt [44]. Um die maximale Eindringtiefe in Gewebe (*in vitro*) zu bestimmen, wurden die Phantome in definierten Abständen von der Oberfläche in Gewebeproben vom Schwein implantiert. Die Streukoeffizienten von Muskelgewebe, veröffentlicht von Jacques et al. liegen bei einer Wellenlänge von 500 nm zwischen 9,8 cm⁻¹ und 13,0 cm⁻¹ [19, 23]. Die Anregungsoptik wurde auf die Oberfläche der Proben in unterschiedlichen Winkeln eingestrahlt und jeweils mit der Detektionsoptik nachgewiesen. Es ergab sich ein Optimum bei einem Winkel von 35° relativ zur Detektionsoptik. Gemessen wurde die Fluoreszenz mit einem Arbeitsabstand des Objektivs von 210 mm von der Probenoberfläche. Die Belichtungszeit betrug 100 ms. Binning wurde auf 2 × 2 Pixel eingestellt und die Verstärkung der CCD-Kamera wurde auf null gesetzt. Bei der CMOS-Kamera (Orca Flash 4.0 Hamamatsu, Japan), die für die Referenzmessungen verwendet

wurde, wurden die gleichen Parameter wie bei dem entwickelten Laserscanner eingestellt [46].

3.5 Schnelle Fluoreszenzdetektion

Im folgenden Experiment wurde die Geschwindigkeit des Nachweises der Fluorophore in tieferen Gewebeschichten untersucht. Um eine schnelle in vitro Fluoreszenzbildgebung mit einer Frequenz von 20 Hz durchzuführen, wurde die Fluoreszenz von Tumorphantomen in Tiergewebe unter Verwendung einer Belichtungszeit von 50 ms bei einer Eindringtiefe von bis zu 32 mm entsprechend Echtzeit-Bildgebungsbedingungen gemessen. Die Phantome wurden wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben mit ICG markiert. Die mechanischen Eigenschaften sowie die Phantomgrößen waren die gleichen wie im Versuch zur Detektion von Fluoreszenz aus tiefen Gewebeschichten. Die Kameraeinstellungen unterschieden sich nur in Bezug auf die Belichtungszeit. Zum Vergleich mit planaren Bildgebungssystemen, die üblicherweise ein großes Sichtfeld erfassen, wurde ein Oberflächenscan einer in vitro Probe durchgeführt, um die Vorteile und den Umfang des entwickelten Designs zu veranschaulichen. Aufgrund der kurzen Belichtungszeiten der Einzelbilder mit kleinen Bildfeldern, die zu einem Gesamtbild verrechnet werden ist es möglich große Proben schnell zu scannen. Eine homogene Beleuchtung der Probe ist notwendig, um eine quantitative Aussage über die Anwesenheit von Fluorophoranreicherungen zu treffen. Dies wurde durch die Vermessung von Blindproben untersucht.

3.6 In vivo Evaluierung des entwickelten Aufnahmesystems und Vergleich mit einem planaren Bildgebungssystem

Die in vivo Evaluierung des entwickelten Systems wurde am Bruker Preclinical Imaging Reference Center in Mannheim durchgeführt, um das Potenzial unter in vivo Bedingungen zu evaluieren und mit einem präklinischen Fluoreszenzbildgebungssystem dem In Vivo Xtreme (Bruker, Ettlingen, Deutschland) zu vergleichen. In den Experimenten wurden zwei tumorspezifische fluoreszenzmarkierte Kontrastmittel verwendet, die verschiedene tumorspezifische Moleküle beinhalten: Bombesin₇₋₁₄ (BBN₇₋₁₄), das an den Gastrin-Releasing Peptide-Receptor (GRPR) bindet und ein Derivat mit dem Bindungsmotiv Glu-Urea-Lys,

welches das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) adressiert. Diese Moleküle waren auf der Oberfläche von Gold-Nanopartikeln (AuNPs) [42] zusammen mit dem Farbstoff SIDAG konjugiert und ermöglichten so (Absorption: 600 nm bis 800 nm / Emission: 750 nm bis 850 nm) die Visualisierung von GRPR- und PSMA-positiven Tumoren. Diese AuNPs wurden intravenös in die Schwanzvene injiziert, und die Verteilung der Marker im Gewebe wurde nach 1, 3, 6, 24 und 48 h mittels optischer Bildgebung kontrolliert und bestätigt. Das beobachtete Tumor-Muskel-Verhältnis von 2,5:1 reichte aus, um den Tumor zuverlässig vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden [42]. Für die in vivo Untersuchungen mit dem Laserscanner, wurde dieser mit einem Anästhesiesystem ausgestattet. Zusätzlich wurde ein Wärmekissen verwendet um die Körpertemperatur der Tiere während der Scans zu stabilisieren [46].

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse gliedern sich in zwei Unterkapitel. Unter dem ersten Gliederungspunkt werden die technischen Ergebnisse, die zur Entwicklung des bildgebenden Systems notwendig waren, erläutert. Die Messergebnisse aus den experimentellen Anwendungen, welche mit dem entwickelten Messsystem gemessen wurden, sind im zweiten Unterkapitel näher ausgeführt.

4.1 Technische Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse beschrieben, die zur Entwicklung und Optimierung des in Kapitel 3 beschriebenen bildgebenden Systems geführt haben.

4.1.1 Vermessung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Das Ziel dieser Experimente war es, das Verhalten der Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffe, beschrieben in der Veröffentlichung von Pretze et al., in biologischen Medien zu untersuchen sowie der Vergleich mit der unter gleichen Rahmenbedingungen getesteten Referenzsubstanz Indocyaningrün (ICG) [24]. Die Ergebnisse aus der Untersuchung des Fluoreszenzfarbstoffs bildeten die Grundlage für das Auslegen der optischen Eigenschaften des entwickelten Gerätes.

Der hydrophile, anionische Cyaninfarbstoff Indocyaningrün (Abbildung 20) wurde in den Experimenten dieser Arbeit als Vergleichs- und Referenzsubstanz (Positivkontrolle) verwendet.

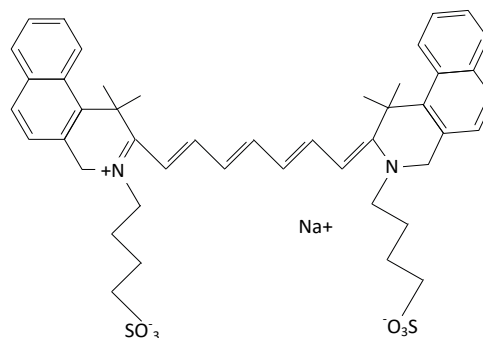


Abbildung 20: Strukturformel Indocyaningrün (ICG)

Die von Pretze et al. entwickelten und verwendeten Fluoreszenzmarker auf Sulfobutyl-indotricarbocyanine-dicarboxylic-acid-diglucamide monosodium salt (SIDAG) Basis wurden von der Arbeitsgruppe für Molekulare Bildgebung mit Schwerpunkt Radiochemie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt [24, 69]. Im Hinblick auf eine potentielle präklinische Applikation in Verbindung mit den genannten Fluoreszenzmarkern war es zunächst notwendig, die spektralen Eigenschaften der Substanzen zu untersuchen. Die Vermessung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde mittels eines VIS/NIR Spektrometers durchgeführt.

Die untersuchten Farbstoffe zeigten in der Absorptionsmessung hinsichtlich des Kurvenverlaufs ähnliche Eigenschaften mit einer Absorption im Bereich von 600 nm bis 850 nm auf. Das Absorptionsmaximum liegt bei Indocyaningrün bei einer Wellenlänge von 785 nm. Das Maximum der Emission liegt bei einer Wellenlänge von 830 nm hervorgerufen durch den Stoke's-Shift.

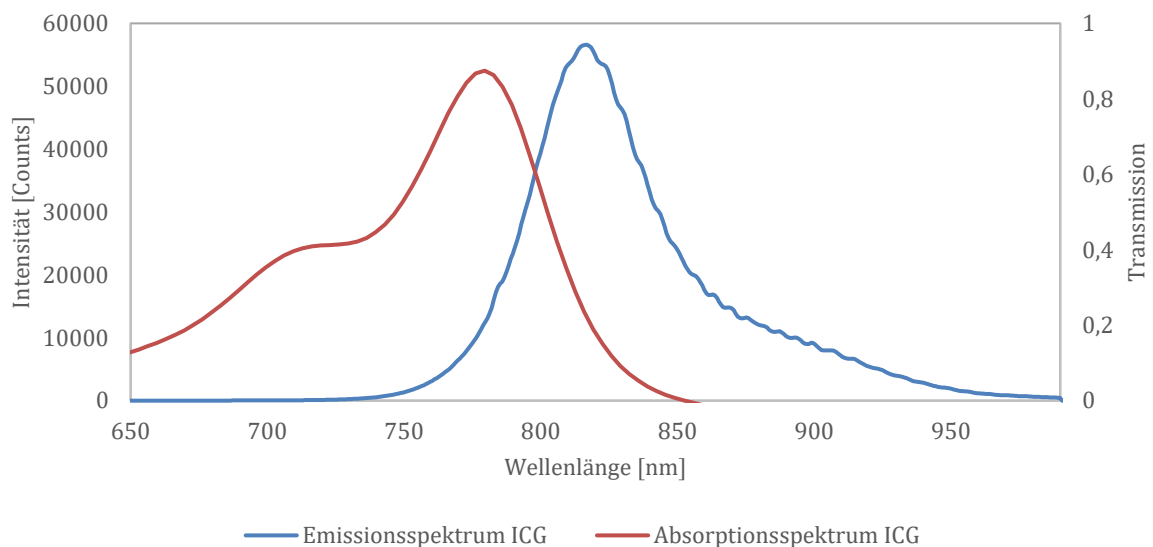


Abbildung 21: Spektrale Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes ICG (3,125 $\mu\text{g/ml}$ H_2O , gemessen mit MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Deutschland)

Im Vergleich zu Indocyaningrün weist das SIDAG basierte Fluorophor ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge um 750 nm auf. Die Emission liegt in einem Wellenlängenbereich zwischen 750 nm bis 850 nm. Das Emissionsmaximum ist bei 785 nm.

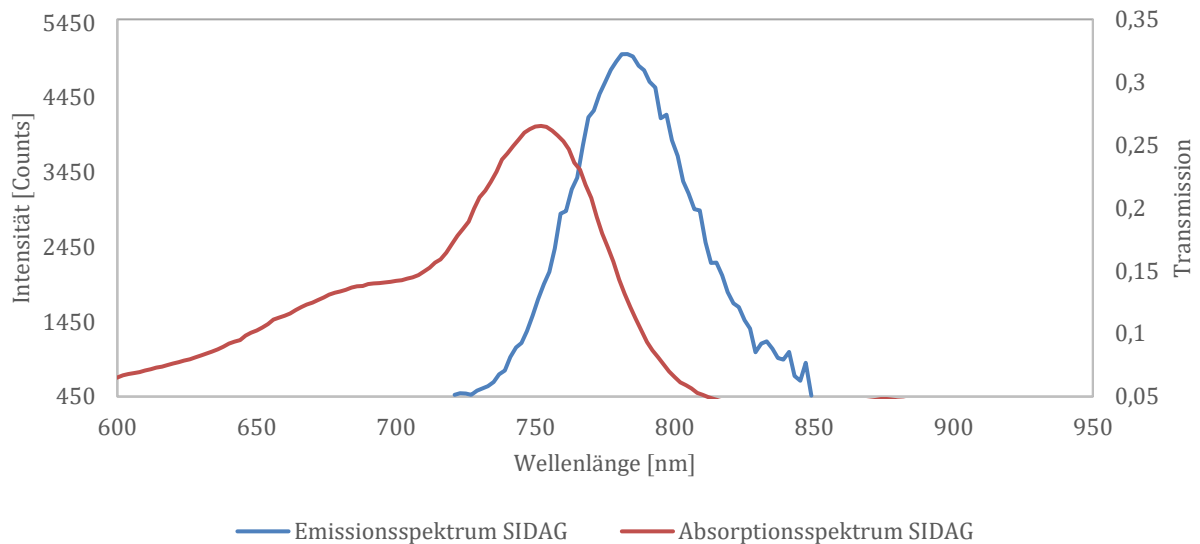


Abbildung 22: Spektrale Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes SIDAG (8,333 μg SIDAG/ml H_2O , gemessen mit infinite 200, Tecan AG, Schweiz)

4.1.2 Auslegung der optischen Eigenschaften des Nachweissystems

Zur Abbildung der zu untersuchenden Probe auf dem Detektor wurde ein Objektiv mit einer Brennweite mit 35 mm und einer numerischen Apertur von 1,65 verwendet. Die Auswahl des Objektivs ermöglicht einen hohen Arbeitsabstand zur Gegenstandsebene bei ausreichend hoher Lichtstärke. Der abgebildete reale Bildausschnitt auf einem Pixel wurde mit einem Maßstab unter Verwendung der Software ImageJ 1.51r bestimmt. Der Maßstab wurde in der Applikation unter dem Detektionssystem des Laserscanners platziert. Mittels der Software ImageJ wurde der abgebildete Bildausschnitt bestimmt. Die Messung ergab, dass ein Pixel im digitalen Bild, ein Quadrat mit einer Seitenlänge von 28,9 μm in der Objektebene abbildet. Bei einer Bildauflösung von 1388 x 1038 Pixel wird eine Fläche von 30 mm x 22,44 mm in der Aufnahme abgebildet.

Um bei der Durchführung sicherzustellen, dass nur der gewünschte Spektralbereich detektiert wird, muss die Detektion von Störsignalen verhindert werden. Die Optik wurde daher für einen spektralen Bereich von 810 nm bis 850 nm ausgelegt. Außerhalb dieses spektralen Bereichs wird die Detektion durch eine spektrale Filterung unterdrückt. Das spektrale Messfenster wird durch die Kombination von zwei Langpass- und einem Bandpassfilter

erzeugt. Die Filter sind folgendermaßen angeordnet: Zunächst wurde direkt vor die aktive Fläche des Detektors ein Bandpassfilter positioniert, der einen transmittierenden Spektralbereich von 800 nm bis 870 nm aufweist (Abbildung 23).

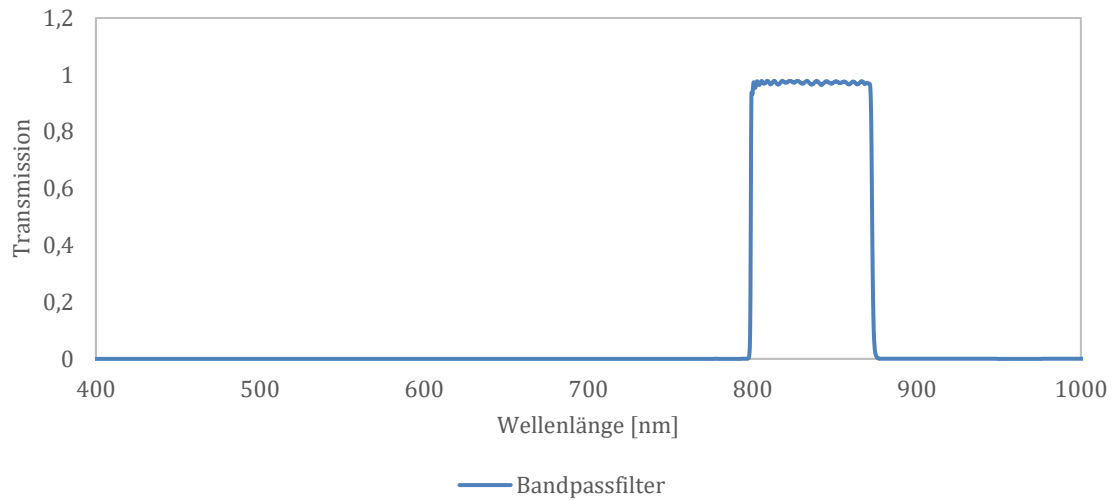


Abbildung 23: Optischer Spektralbereich des verwendeten Bandpassfilters

Aufgrund der hohen Sensitivität und Signalverstärkung der Detektionseinheit im visuellen Bereich sind vor das Objektiv zwei zusätzliche Langpassfilter angeordnet worden, deren Transmission wie in Abbildung 24 bei 805 nm einsetzt. Der Filterstapel besitzt, berechnet nach Formel 3.2, bei 800 nm eine optische Dichte (OD) von 18.

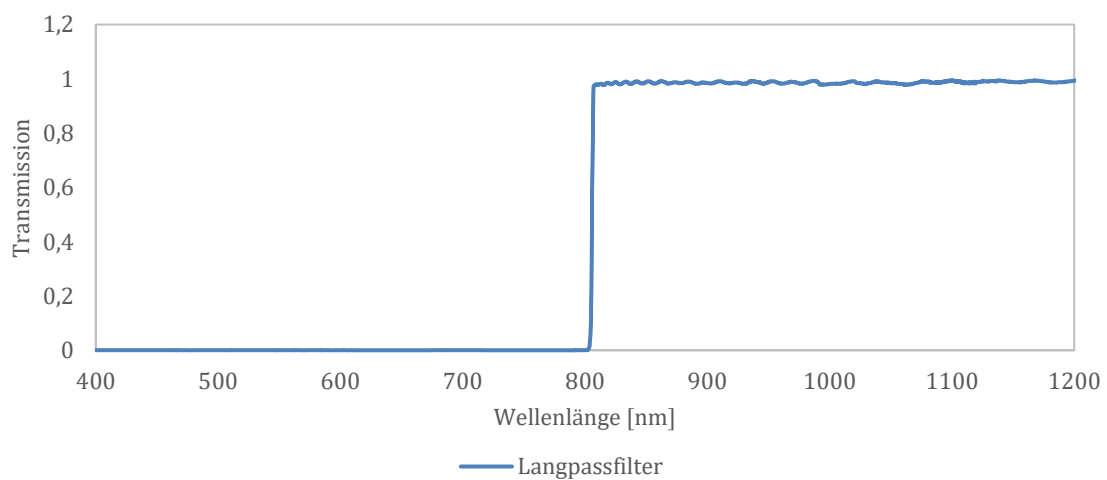


Abbildung 24: Optischer Spektralbereich der verwendeten Langpassfilter

Zur Unterdrückung des Reflexes der Anregungsbeleuchtung, der trotz des Filterstapels durch den Detektor detektiert wird und zu einer Überbelichtung des Bildes führt, wurde eine miniaturisierte Lichtfalle in den Strahlengang direkt vor der aktiven Detektorfläche des Bildverstärkers integriert. Die in der Photonenflussanalyse beschriebenen optischen Eigenschaften zeigen die veränderte Strahlengangführung, welche zur Unterdrückung der Reflexionen führte. Die Auslegung der Lichtfalle wurde mit Hilfe der Formeln 3.8 bis 3.10 durchgeführt. Der Durchmesser wurde so gewählt, dass eine Laserspotsize von 800 μm und eine Kompensation von Oberflächenunebenheiten bis zu 20 mm durchgeführt werden kann. Das linke Bild der Abbildung 25 zeigt die Anregungsstrahlung, welche nicht von der Lichtfalle überdeckt wird. In der rechten Darstellung der Abbildung 25 ist die Anregung durch die Lichtfalle abgedeckt [46].

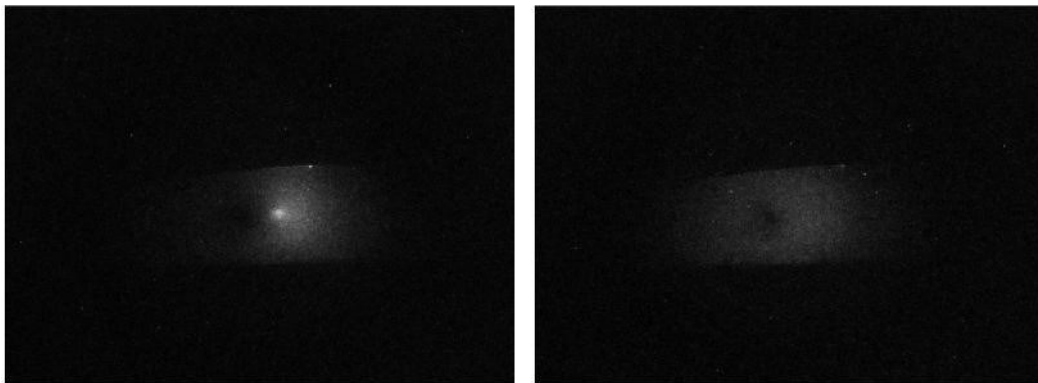


Abbildung 25: Anregungsstrahlung nicht von der Lichtfalle überdeckt (links), Anregung durch die Lichtfalle abgedeckt (rechts)

4.1.3 Probenbeleuchtung zur Anregung der Fluoreszenz

Im Gegensatz zu dem Referenzsystem In Vivo Xtreme wurde bei dem entwickelten bildgebenden System keine planare Beleuchtung, sondern eine punktuell fokussierte Auflichtbeleuchtung zur Anregung der Fluoreszenz gewählt. Die punktuelle Beleuchtung ermöglichte den Einsatz der Lichtfalle. Die Ergebnisse der Untersuchung zur homogenen Beleuchtung der Proben beschrieben in Kapitel 3.2.5 zeigen, dass eine ausreichend homogene Beleuchtung bei entsprechender Mehrfachbelichtung mit dem System erreicht wird. Durch die mechanisch feste Anordnung und dadurch gleichzeitige Bewegung auf den abzubildenden

Probenausschnitt entsteht kein Versatz oder Verzerrung des Anregungsspotts auf der Probe. Dementsprechend wurde auch ein Winkel von 35° zur optischen Achse für die Anregungsbeleuchtung gewählt.

Bei der gewählten Konstellation wird eine räumliche Ausdehnung des Anregungsspotts von $800\ \mu\text{m}$ Durchmesser in der Fokusebene erreicht. Der Kompromiss zwischen Reduzierung des direkten Reflexes und der daraus resultierenden Verzerrung der Größe des Anregungslichtflecks wurde so bestimmt, dass die Beleuchtung auf den theoretischen Grenzbereich zwischen Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung gelegt wurde, sodass gerade noch eine Beleuchtung aus dem Hellfeld möglich war.

4.1.4 Integration des Gesamtsystems

In der nachfolgenden Abbildung 26 ist das Gesamtsystem bestehend aus dem Untersuchungsraum, der Scanningeinheit, dem Detektionssystem, der Anregungsoptik, dem Laser und der Steuerungssoftware, dargestellt.

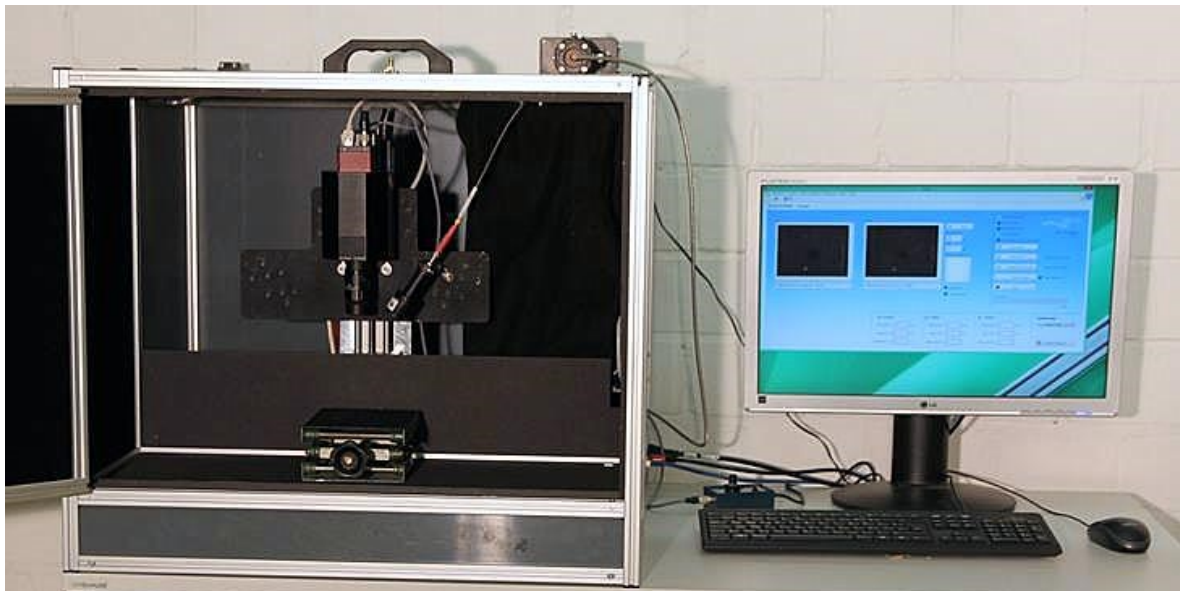


Abbildung 26: Gesamtsystem zur Durchführung von Fluoreszenzmessungen

Das System wurde speziell für die Anwendung angepasst und optimiert. Das gesamte System ist durch die entwickelte Steuerungssoftware bedienbar. Um die vollständige Datenerfassung zu ermöglichen, musste ein neuer Untersuchungsraum geplant und ausgestattet werden. Mit dem Gesamtsystem war die Durchführung der geplanten Experimente möglich.

4.2 Ergebnisse der in vitro Untersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen beschrieben, die mit dem in Kapitel 3 beschriebenen bildgebenden System durchgeführt wurden.

4.2.1 In vitro Gewebeuntersuchungen und Systemvalidierung

Für die Validierung des entwickelten Systems zum Nachweis von Fluoreszenz aus tieferen Gewebeschichten wurden verschiedene Versuche hinsichtlich der Eindringtiefe, der Laserleistung, der Farbstoffkonzentration und der Belichtungszeit durchgeführt.

Zur Bestimmung der maximalen Eindringtiefe in Gewebe wurden in vitro Gewebeproben nach den in Abschnitt 3.5 und 3.6 beschriebenen, experimentellen Bedingungen vermessen. Die Validierung an in vitro Proben wurde mit dem entwickelten System und einem Referenzsystem mit einer 16 Bit Kamera durchgeführt. Die Nachweisgrenze des 16 Bit Referenzkamarasystems (CMOS) betrug 16 mm. Mit der intensivierten CCD-Kamera (ICCD) war eine Detektion in einer Gewebetiefe von bis zu 32 mm möglich. Das durchschnittliche SNR der Phantome in verschiedenen Tiefen unter der Oberfläche ist in Abbildung 27 dargestellt. Das SNR wurde als Verhältnis von Signalelektronen zu Rauschelektronen berechnet. Die Nachweisgrenze ist erreicht, wenn das SNR die dreifache Standardabweichung einer leeren Probe unterschreitet [46].

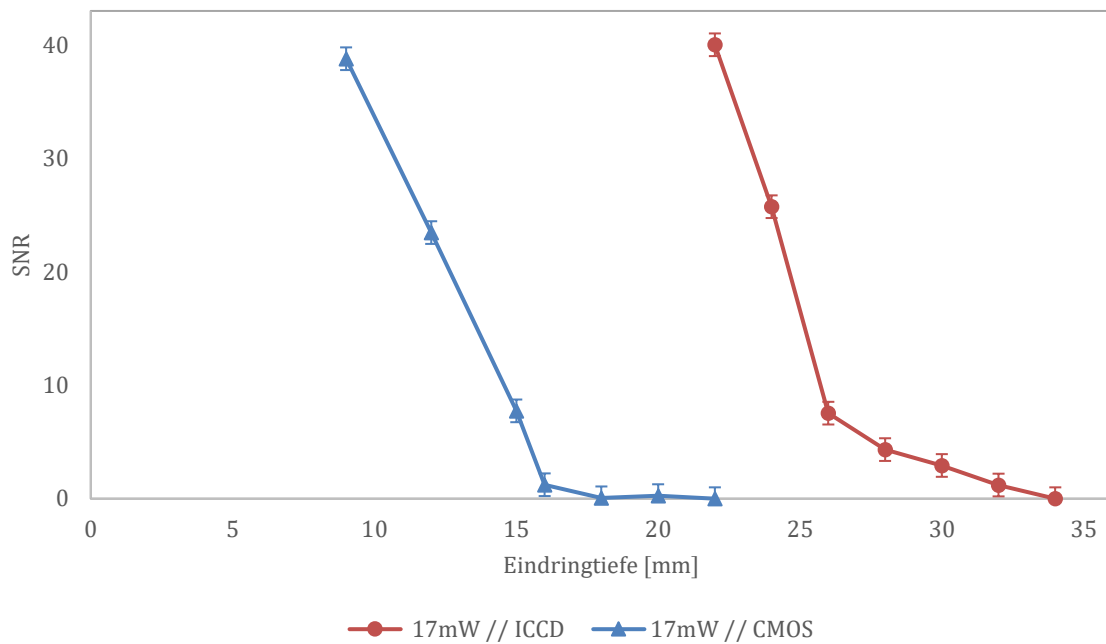


Abbildung 27: Ergebnisse und Vergleich der SNR zwischen dem 16 Bit Referenzkamarasystems (CMOS) und dem entwickelten intensivierten CCD-Kamarasystem (ICCD) für unterschiedliche Phantompositionen.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der eingebrachten Laserleistung wurde in dem nachfolgenden Versuch untersucht. Dabei wurde die Laserleistung sequentiell, bei konstanter Belichtungszeit (20 ms, 50 ms, 200 ms) und einem Verstärkungslevel von zehn des Bildverstärkers, erhöht. Die Abbildung 28 zeigt die Verläufe der verschiedenen Belichtungszeiten. Die Ergebnisse zeigen einen näherungsweise linearen Verlauf bei zunehmender Laserleistung [46].

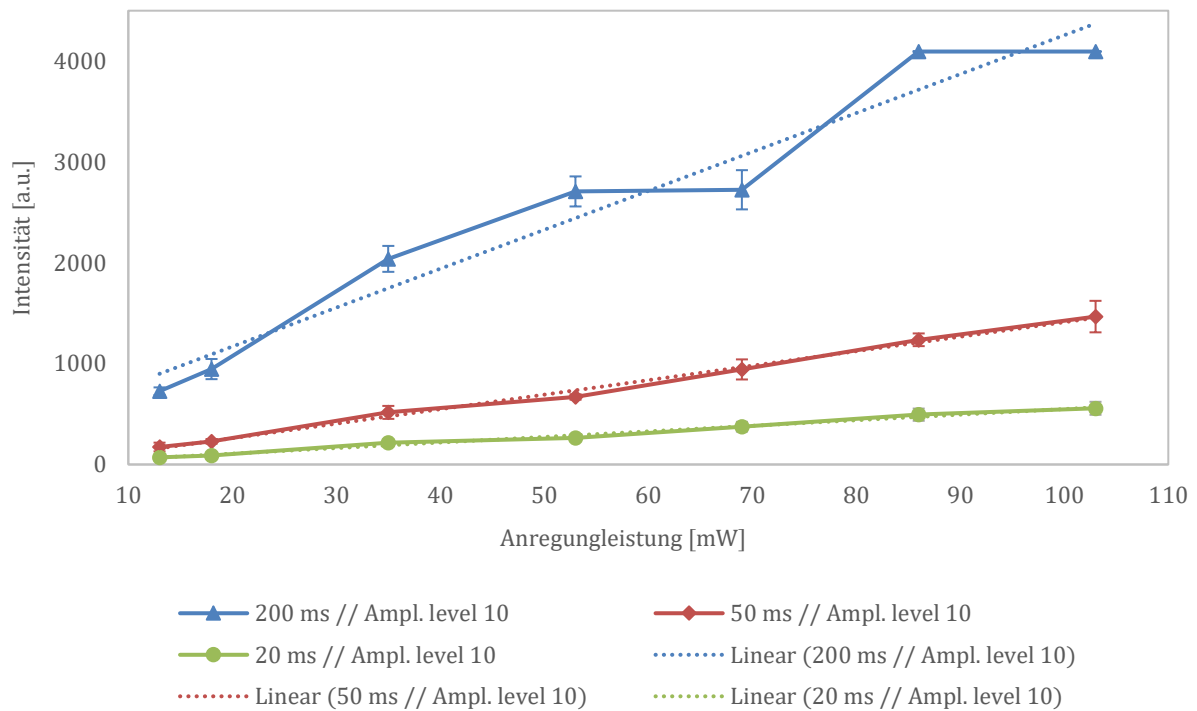


Abbildung 28: Linearitätsbetrachtung der Intensitätsverläufe bei unterschiedlichen Anregungslaserleistungen (20ms, 50ms, 200ms)

Die zeitlichen Abhängigkeiten der Belichtung des Detektors wurden untersucht und sind in Abbildung 29 dargestellt. Es wurde dazu die Intensität bei zunehmender Belichtungszeit betrachtet. Im Diagramm sind die Ergebnisse bei einer Anregungsleistung von 0 mW und 17 mW bei einer Tumorphantomtiefen von 22 mm zu sehen. Das Bildverstärker-Verstärkungslevel von zehn wurde konstant beibehalten. Die Graphen zeigen jeweils einen linearen Anstieg der Intensität mit zunehmender Belichtungszeit des Detektors [46]. Bedingt durch das Grundrauschen des Detektors ist bereits bei einer Anregungsleistung von 0 mW ein linearer Signalanstieg mit zunehmender Belichtung des Detektors zu erkennen.

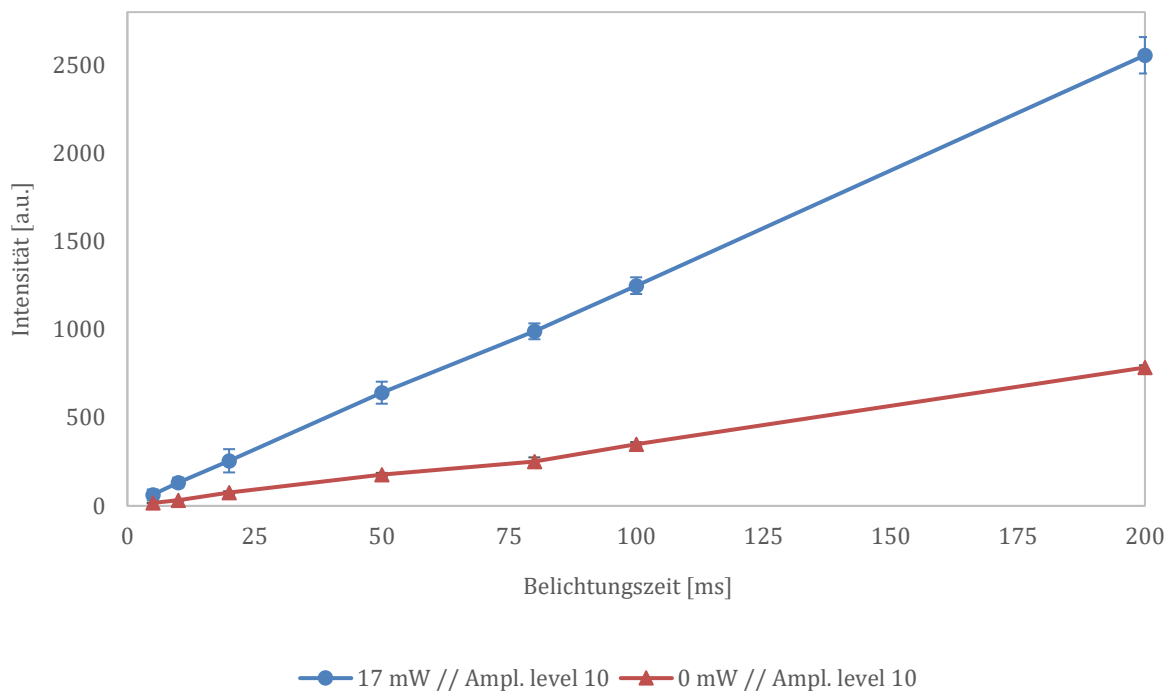


Abbildung 29: Betrachtung der Linearitätsverläufe der Intensitäten bei unterschiedlichen Belichtungszeiten des Detektionssystems

Zur Durchführung der vorangegangenen Versuche wurde die Farbstoffkonzentration untersucht. Die Phantome wurden dazu in verschiedene ICG Farbstoffkonzentrationen eingelegt und bei einer Laserleistung von 17 mW, in 22 mm Gewebetiefe, bei konstanter Belichtungszeit und konstantem Verstärkungslevel des Bildverstärkers vermessen. Zu beobachten ist in der Abbildung 30 ein Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmendem Farbstoffgehalt. Bei einer Massenkonzentration von $3,125 \mu\text{g ICG/ml H}_2\text{O}$ ist das Intensitätsmaximum der Messreihe zu beobachten. Der weitere Kurvenverlauf zeigt, dass ab dieser Konzentration Eigenabsorptionseffekte auftreten und die messbare Fluoreszenzintensität wieder abnimmt [46, 70].

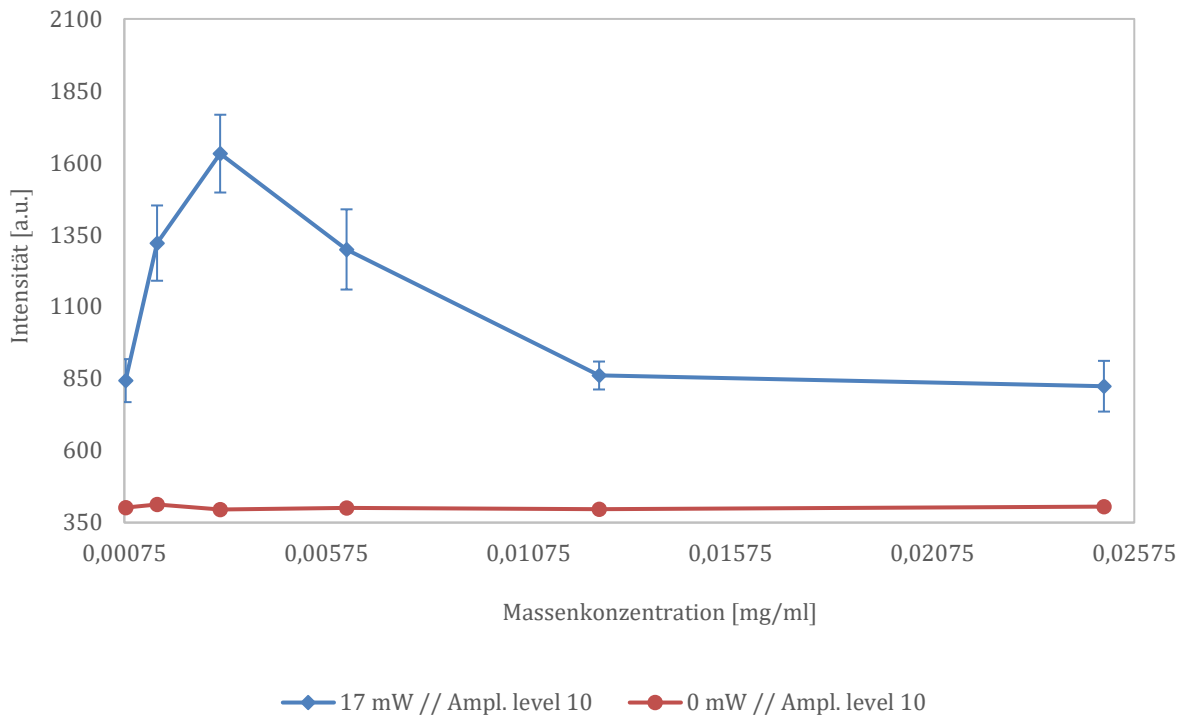


Abbildung 30: Intensitätsverlauf von ICG bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen mit konstanter Laserleistung und Belichtungszeit

Die Nachweisgrenze des Fluorophors in der Tiefe des Gewebes hängt auch mit der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs zusammen. Daher wurden die Detektionsgrenzen bei verschiedenen Fluorophorkonzentrationen ermittelt. Hierfür wurden Glaskapillare mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen bei definierten Eindringtiefen in Gewebe vermessen. Der Vergleich der verschiedenen Fluorophorkonzentrationen zeigt, dass bei einer Massenkonzentration von 3,125 $\mu\text{g/ml}$ H₂O die beste Eindringtiefe erreicht wird. Die Abbildung 31 gibt einen Überblick über die Eindringtiefen in Gewebe bei einer Anregungsleistung von 17 mW und verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Diese sind bei einer Anregungsleistung von 17 mW zu sehen. Das Bildverstärker-Verstärkungslevel von zehn wurde dabei konstant beibehalten [46].

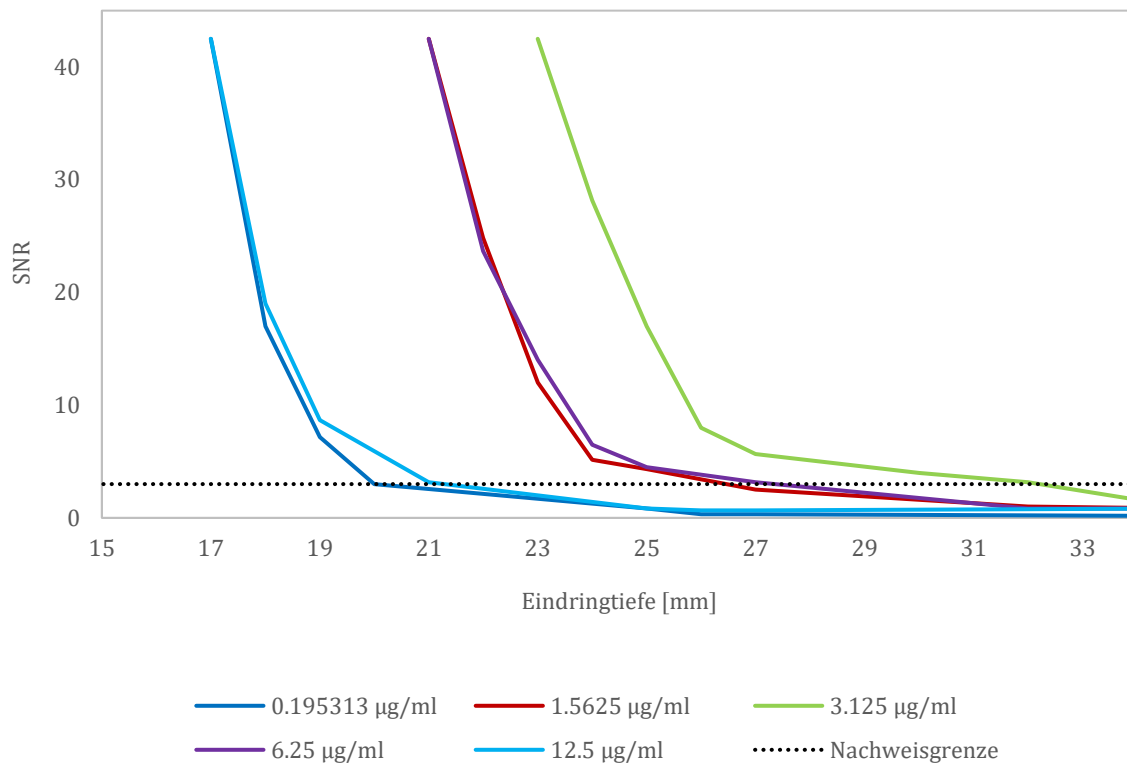


Abbildung 31: SNR für Phantome in unterschiedlicher Implantationstiefe in Gewebe bei verschiedenen Fluorophorkonzentrationen mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 200 ms

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur schnellen Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Die Detektionsgeschwindigkeiten lagen im Bereich der Echtzeitbildgebung. Die Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen, bei denen eine schnelle Fluoreszenzdetektion unter Echtzeitbedingungen durchgeführt wurde [46].

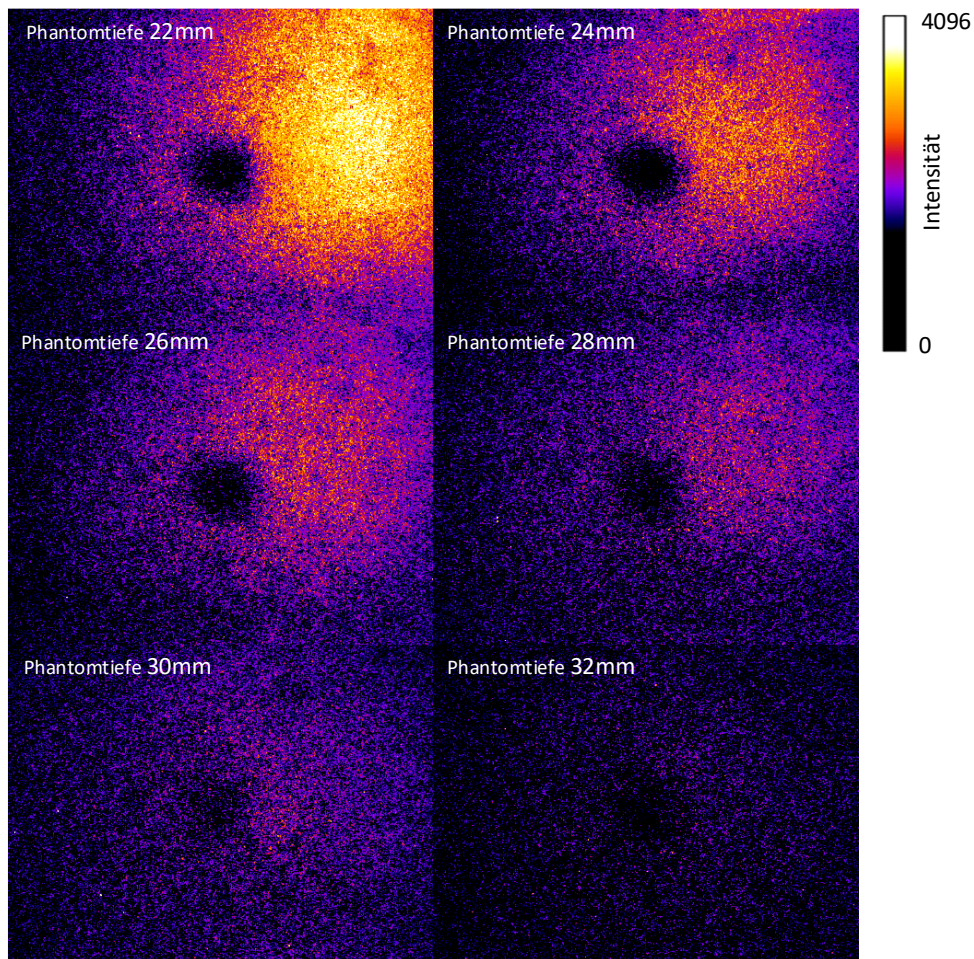


Abbildung 32: ICG-markierte Tumorphantome, die unter Echtzeitbedingungen im Tiergewebe mit Eindringtiefen von bis zu 32 mm mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Anregungsleistung von 17 mW unter Verwendung des im Vorfeld beschriebenen Messaufbaus gemessen wurden

Für die Experimente wurden die zuvor beschriebenen mit ICG-markierten Tumorphantome in tierischem Gewebe bei einer Belichtungszeit von 50 ms mit einer Eindringtiefe von bis zu 32 mm detektiert. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde der Anregungslaser auf einen Bereich neben den Tumorphantomen fokussiert. Durch die räumliche Verteilung des Laserlichts, hervorgerufen durch Mehrfachstreuungseffekte innerhalb des Gewebes, entstand eine Fluoreszenzemission des markierten Tumorphantoms in der Probe [46]. Zur Untersuchung der Fluoreszenzausbreitung im Gewebe wurde eine Simulation der Intensitätsverteilung auf Basis der gemessenen Intensitäten mit der Software ImageJ in Gewebe durchgeführt. Die Bilder

wurden dafür in z-Richtung in einem dreidimensionalen Datenwürfel angeordnet. Zur visuellen Darstellung der Fluoreszenzausbreitung in den Gewebeprobe bis zur Probenoberfläche wurden die Bilder in den spezifischen Abständen, in denen diese vermessen wurden, im Datenwürfel positioniert. Die Voxelgröße lag bei $6,45\ \mu\text{m}$ Kantenlänge. Die Abbildung 33a zeigt die einzelnen Bilder in z-Richtung unter einem Projektionswinkel von 70° um die y-Achse. Die Abbildung 33b zeigt den interpolierten Verlauf der Fluoreszenzintensität. Die Eindringtiefe und der Verlauf der Fluoreszenzausbreitung ins Gewebe hinein ist in der Abbildung 33c zu sehen.

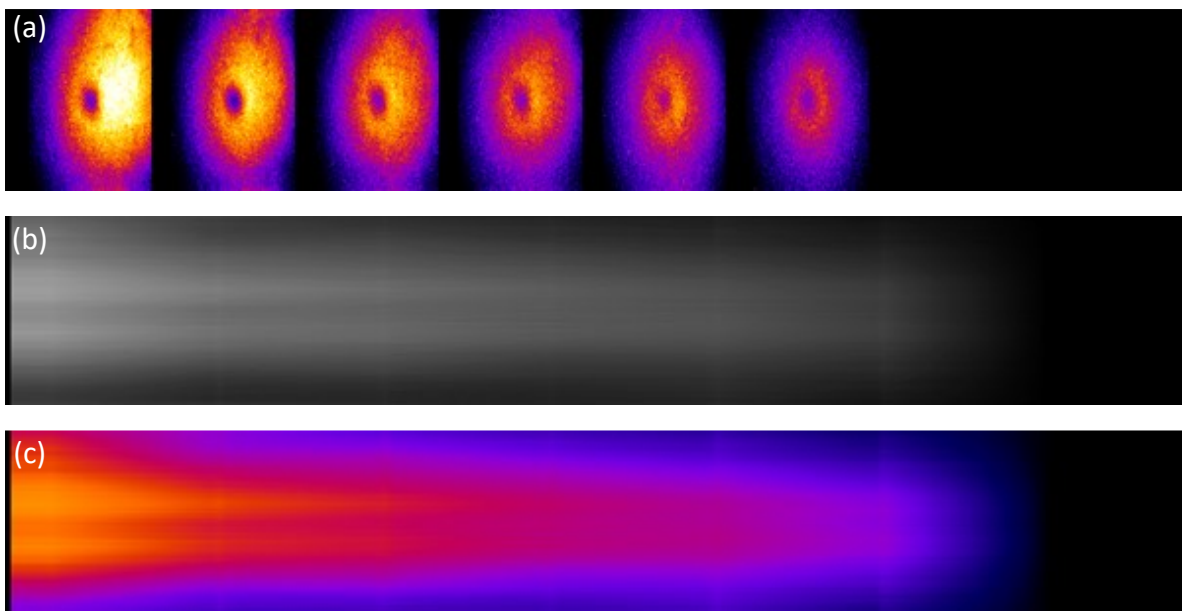


Abbildung 33: (a) Darstellung der Bilder mit einer Drehung von 70° um die y-Achse. (b) Darstellung des berechneten Fluoreszenzverlaufs in die Tiefe (c) Veranschaulichung des Fluoreszenzverlaufs in die Tiefe als Falschfarbenbild

Der schwarze Bereich in der Bildmitte wird durch die Lichtfalle erzeugt, die zur Absorption des reflektierten Anregungslichts auf der Probenoberfläche dient. Die schwarzen Bildartefakte beeinträchtigen nicht die Bildqualität, wenn die Probe mehrmals aus verschiedenen Perspektiven abgeleitet wird. Trotz der dadurch erforderlichen zusätzlichen Zeit ist das entwickelte Gerät wesentlich schneller als das Vergleichsgerät (In Vivo Xtreme), welches zur Validierung der nachfolgenden in vivo Untersuchungen verwendet wurde. In dem folgenden Abschnitt wird dies anhand der Durchführung eines Oberflächenscan einer Gewebeprobe

deutlich. Jeder Punkt der Probe wurde mehrmals von verschiedenen Positionen aus vermessen. Dadurch sind an jeder Stelle ausreichend viele Bildinformationen verfügbar. Mit einer Zunahme der Anzahl der Einzelaufnahmen kann der Informationsgehalt weiter erhöht werden.

Abbildung 34 zeigt einen Gewebsscan einer Fläche von 10 cm × 6,6 cm mit vier unterschiedlich großen Tumorphantomen (Phantomgrößen: Position 1: 7 mm × 2 mm; Position 2: 7 mm × 4 mm; Position 3: 7 mm × 6 mm; Position 4: 7 mm × 8 mm). Die Belichtungszeit betrug 100 ms bei einer Detektionstiefe von 22 mm. Die detektierten Phantome, beschrieben durch die Signal-Rausch-Verhältnisse an den spezifischen Bereichen, wurden wie folgend aufgeführt gemessen: Position 1: 82; Position 2: 100,5; Position 3: 178,2; und Position 4: 202,2. Der Gewebescan bestand aus einer Vielzahl von Einzelbildern mit einer Fläche von jeweils 3 cm × 2 cm. Diese Bilder wurden mit einer Bildflächenüberlappung aufgenommen und zu einem Bild mit anschließender Bildfilterung verrechnet. Aufgrund der Überlappung und der Bildinformation der einzelnen Bilder sind die Fehlstellen, hervorgerufen durch die Lichtfalle, im Bild nicht mehr sichtbar. Die im Bild auftretenden Inhomogenitäten, die deutlich an Pos. 3 und Pos. 4 zu sehen sind, werden durch die Gewebestrukturen der Phantome verursacht und sind dadurch im bildgebenden System sichtbar. Die Berechnung der Bilder in Abbildung 34 wurde unter Verwendung von ImageJ v1.51r durchgeführt. Das Falschfarbenbild in Abbildung 35 veranschaulicht die detektierten Tumorphantome. Das dreidimensionale Oberflächendiagramm (Abbildung 36) weist deutlich die erwartete Fluoreszenzlichtemission an den erwarteten Positionen der Tumorphantome im Bild auf [46].

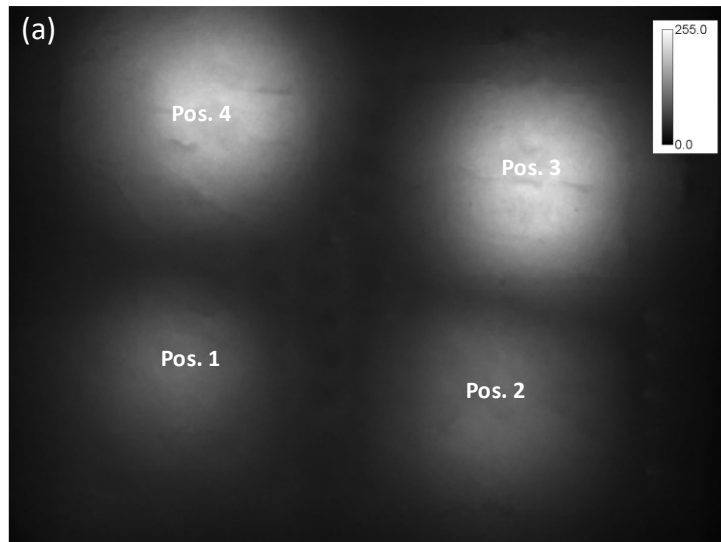


Abbildung 34: In vitro Untersuchung einer Fläche von 10 cm × 6,6 cm mit vier unterschiedlich großen Tumorphantomen (Phantomgrößen: Position 1: 7 mm × 2 mm; Position 2: 7 mm × 4 mm; Position 3: 7 mm × 6 mm; Position 4: 7 mm × 8 mm) mit einer Belichtungszeit von 100 ms in einer Tiefe von 22 mm

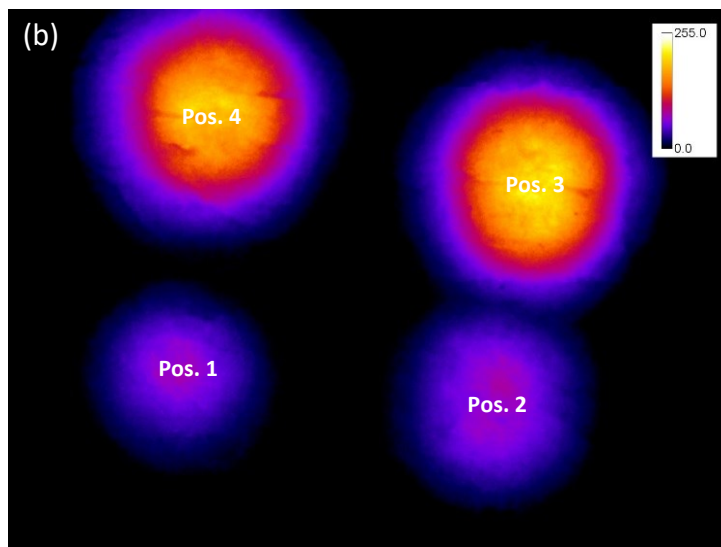


Abbildung 35: Falschfarnebild der gescannten in vitro Gewebeprobe, das unter Verwendung des entwickelten bildgebenden Systems aufgezeichnet wurde

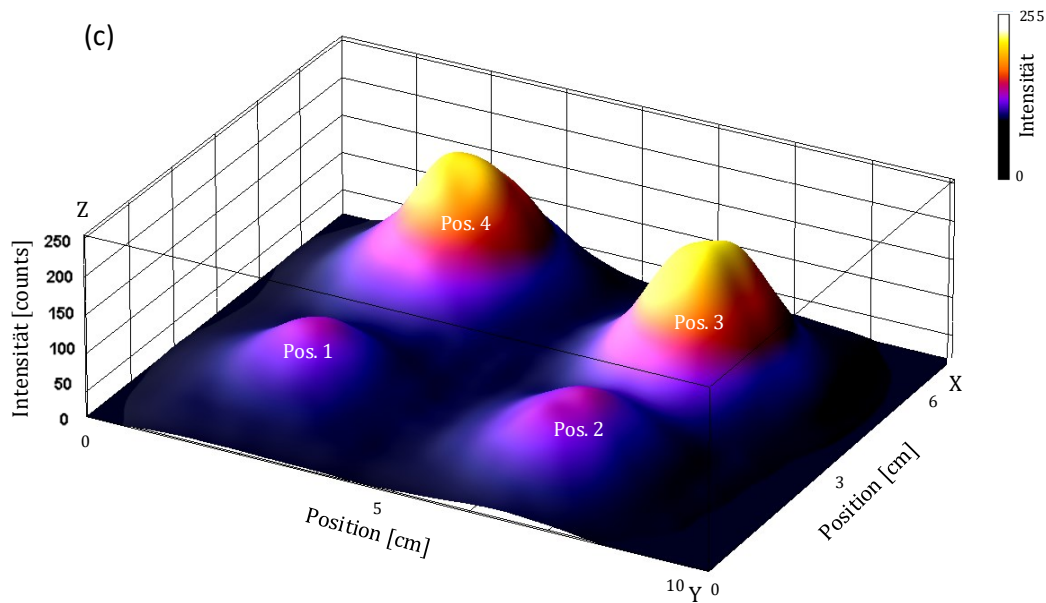


Abbildung 36: Dreidimensionales Oberflächendiagramm der detektierten Tumorphantome

4.2.2 Systemvalidierung mit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen für in vivo Experimente

Im Vorfeld der in vivo Systemvalidierung wurden die verwendeten Farbstoffe der spezifischen Fluoreszenzmarkierten optischen Kontrastmittel einer umfangreichen Validierung unterzogen: Zur Bestätigung der Kompatibilität der Farbstoffe mit dem entwickelten System wurden verschiedene Versuche hinsichtlich der Möglichkeit zur Detektion in verschiedenen Gewebetiefen, der Laserleistung, Farbstoffkonzentration und Belichtungszeit an Messphantomen durchgeführt.

Zur Bestimmung des Detektionslimits in Gewebe wurden Messungen mit den auf SIDAG basierenden Fluoreszenzmarkern zur Ermittlung der Eindringtiefe in Gewebe durchgeführt. Die Validierung wurde mit dem entwickelten System durchgeführt. Mit diesem war eine Detektion in einer Gewebetiefe von bis zu 32 mm möglich. Das durchschnittliche SNR der Phantome in verschiedenen Tiefen unter der Oberfläche ist in der Abbildung 37 dargestellt. Für die Versuche wurden die Reiskornphantome wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben präpariert. Die Nachweisgrenze gilt als erreicht, wenn das SNR die dreifache Standardabweichung einer leeren Probe unterschreitet. Für die Untersuchungen wurden die Phantome mit einer Massenkonzentration von 8,333 μg SIDAG/ml H_2O präpariert.

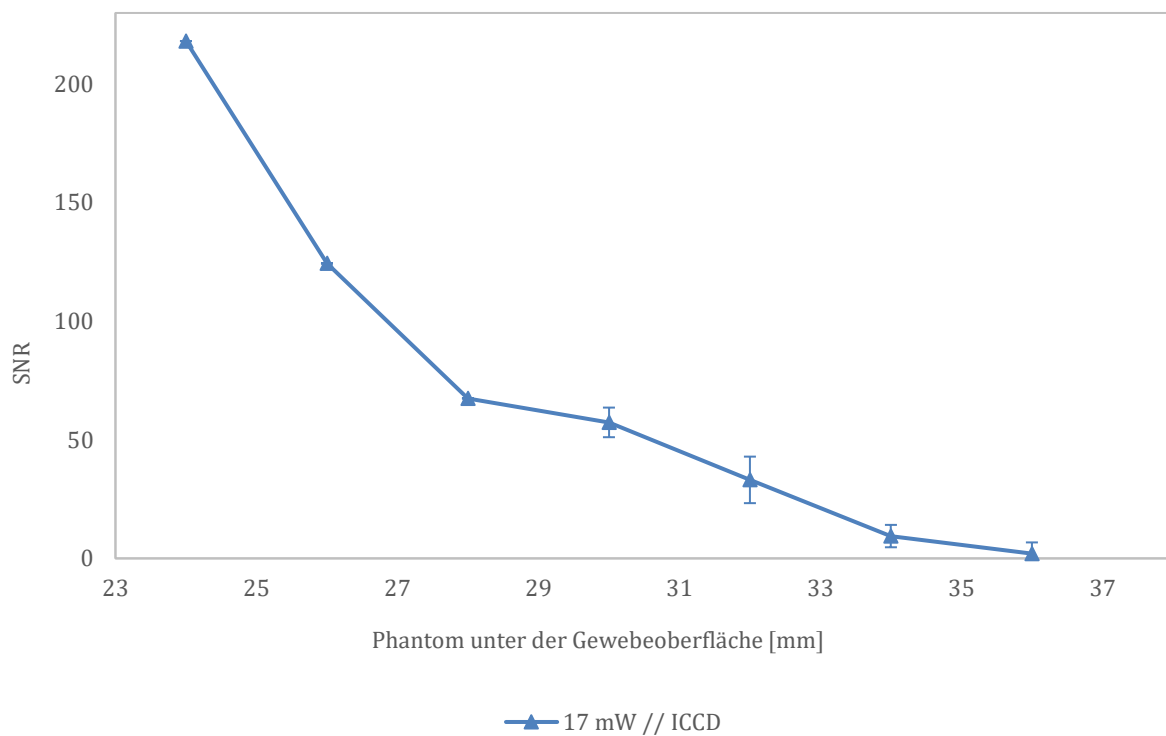


Abbildung 37: Ergebnisse der Detektion der Tumorphantome unter der Gewebeoberfläche mittels der verwendeten Fluoreszenzmarker für die in vivo Experimente bei einer Belichtungszeit von 100ms und einer Massenkonzentration des Fluoreszenzmarkers von 8,333 μg SIDAG/ml H_2O . Gemessen mit dem entwickelten System

Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der eingebrachten Laserleistung wurde in dem nachfolgenden Versuch untersucht. Dabei wurde die Laserleistung aufeinanderfolgend, bei konstanter Belichtungszeit (10 ms, 20 ms, 100 ms) erhöht. Die Verstärkungsniveaus des Bildverstärkers wurden individuell für die verschiedenen Messreihen angepasst. Die Abbildung 38 zeigt die Verläufe bei verschiedenen Belichtungszeiten. Die Ergebnisse weisen einen linearen Verlauf bei zunehmender Laserleistung auf.

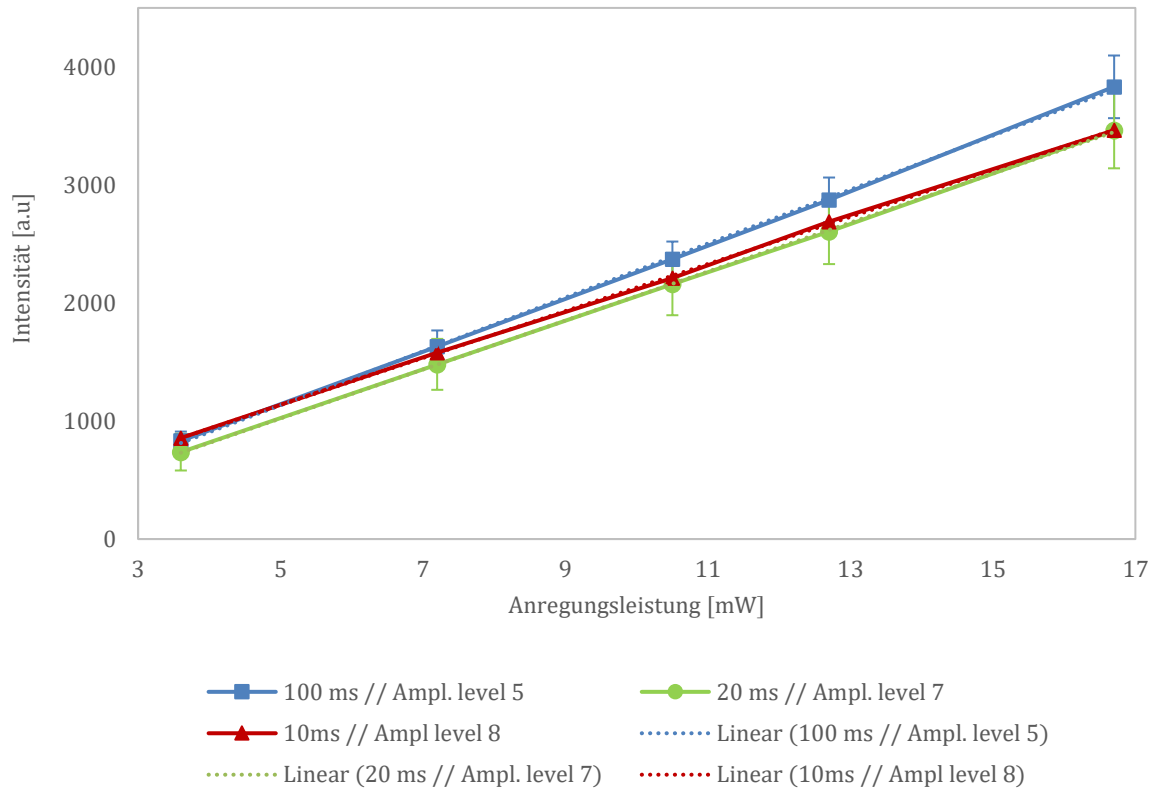


Abbildung 38: Linearitätsbetrachtung der Intensitätsverläufe bei unterschiedlichen Anregungslaserleistungen (20 ms, 50 ms, 200 ms) der verwendeten Fluoreszenzmarker für die in vivo Experimente mit dem entwickelten intensivierten CCD-Kamerasystem (ICCD)

Im Folgenden wurden die Zusammenhänge zwischen der Belichtungszeit des Detektors und der detektierbaren Signalintensität mit den neuen Kontrastmitteln untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 39 dargestellt. Dazu wurde die Intensität bei zunehmender Belichtungszeit beobachtet. Die Ergebnisse im Diagramm, die bei einer Anregungsleistung von 0 mW und 17 mW zu sehen sind, wurden bei einer Tumorphantomtiefen von 22 mm aufgenommen. Das Bildverstärker-Verstärkungslevel von zehn wurde konstant beibehalten. Im Diagramm ist ein linearer Anstieg der Intensitäten mit zunehmender Belichtungszeit zu beobachten.

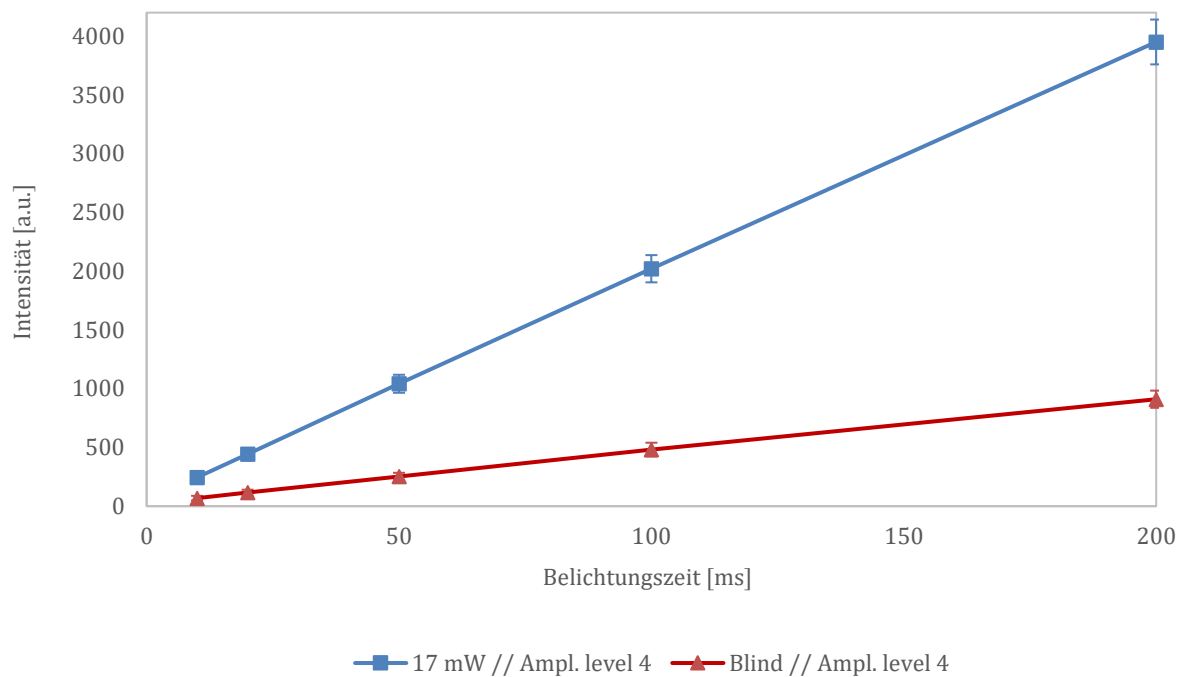


Abbildung 39: Betrachtung der Linearitätsverläufe der Intensitäten bei unterschiedlichen Belichtungszeiten des Detektionssystems

Zur Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Farbstoffkonzentrationen auf die Signalintensität wurden verschiedene Phantommessungen mit unterschiedlichen SIDAG Farbstoffkonzentrationen durchgeführt. Die Messungen wurden bei einer Laserleistung von 17 mW in 26mm Gewebetiefe bei konstanter Belichtungszeit und konstantem Verstärkungslevel des Bildverstärkers durchgeführt. Die Ergebnisse der entsprechenden Messungen sind in der Abbildung 40 dargestellt. Zunächst ist ein Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmendem Farbstoffgehalt zu erkennen. Bei einer Konzentration von 8,333 μg SIDAG/ml H_2O ist das Intensitätsmaximum der Messreihe, das einem Konzentrationsverhältnis von 1:72 entspricht, zu sehen. Ab diesem Konzentrationsverhältnis treten Eigenabsorptionseffekte auf [70]. Die messbare Fluoreszenzintensität nimmt im Folgenden wieder asymptotisch ab [70].

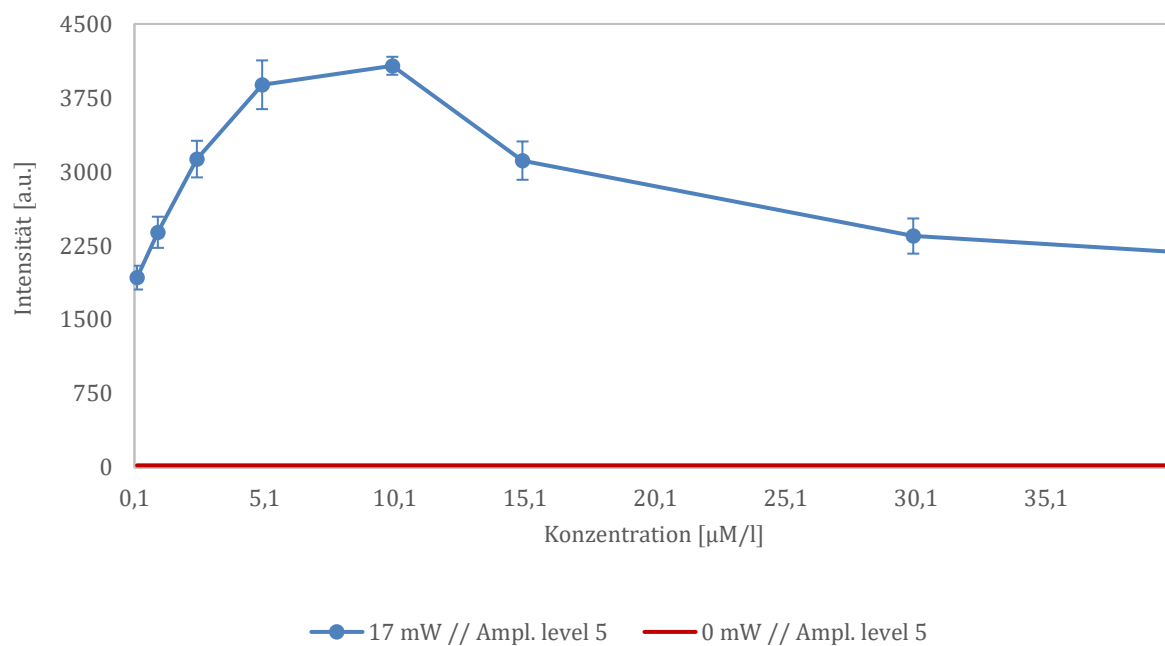


Abbildung 40: Intensitätsverlauf von SIDAG bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen mit konstanter Laserleistung und Belichtungszeit

4.3 In vivo Tumoruntersuchung

Für die in vivo Tumoruntersuchungen und die Validierung des optischen Aufbaus wurde ein Vergleich mit einem kommerziellen präklinischen Fluoreszenzbildgebungssystem (In Vivo Xtreme, Bruker, Ettlingen) durchgeführt.

4.3.1 Pilotmessungen

Zunächst wurden Pilotmessungen an Mäusen ohne Tumor mit den oben genannten spezifischen AuNP-Kontrastmitteln durchgeführt. Ein schneller Abbau der Substanzen durch die Niere wurde beobachtet und ist in Abbildung 41c und 41d gezeigt. Der größte Teil der injizierten fluoreszenzmarkierten Verbindungen befindet sich in der Blase. Dies ist in der Abbildung 41c erkennbar. In der Abbildung 41d ist zu sehen, dass bereits eine Stunde nach der Injektion der Fluoreszenzmarker mit dem Urin ausgeschieden wurde. Die Röntgenbilder derselben Tiere werden in der Abbildung 42 dargestellt, die ebenfalls unter Verwendung des

In Vivo Xtreme Systems erzeugt wurden. Die Abbildung 43a und 43b zeigen die Vergleichsmessung der Maus aus Abbildung 41c unter Verwendung des entwickelten bildgebenden Analysesystems. Um verwertbare Bilder mit dem In Vivo Xtreme System zu erhalten, war eine Belichtungszeit von 60 Sekunden und einem Pixel Binning von 2 x 2 notwendig. Die Messungen mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten System, unter der Verwendung einer um das 1200fache kürzeren Belichtungszeit von 50 ms ohne Pixel Binning (Abbildung 43), bestätigt die zu erwarteten Fluorophoranreicherungen in der Blase aus Abbildung 41c. Die Bilder 41a und 41b sowie 43b lassen sich über die prozentuale Detektorausleuchtung quantitativ in Beziehung setzen. In Abbildung 41a und 41b ist der Detektor lediglich im Bereich der unteren 15 % angesteuert. Es ist keine Fluorophor Detektion ohne Anpassung der Helligkeit und des Kontrasts, wie in Abbildung 41c und 41d zu sehen, möglich. In Abbildung 43b ist eine deutliche Fluorophor Anreicherung im Bereich der Blase mit einer Detektorausleuchtung bis zu 95 % zu beobachten.

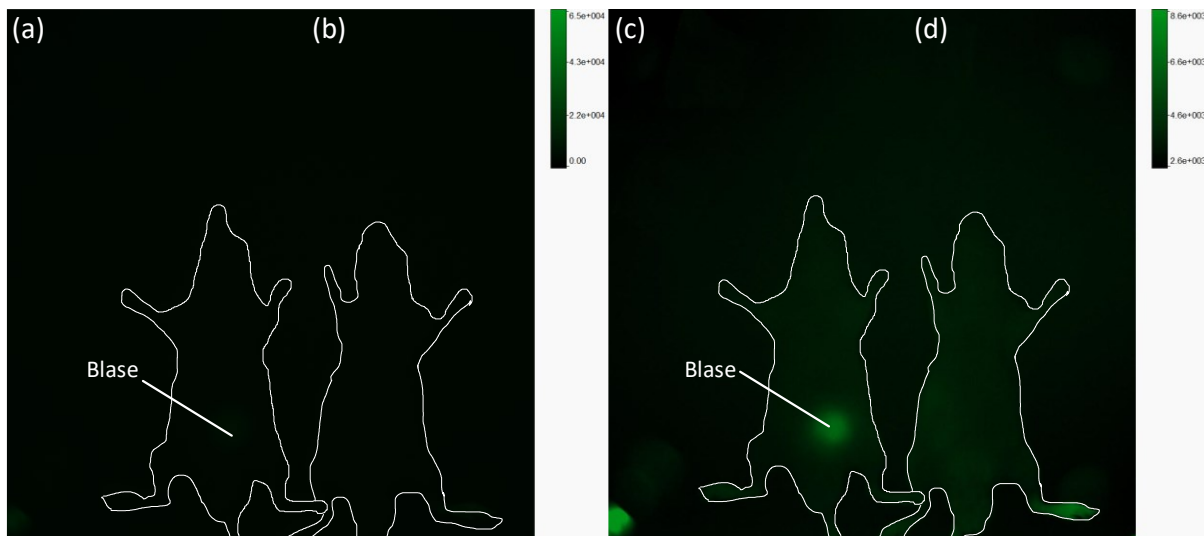


Abbildung 41: Pilotmessung mit AuNP-Kontrastmitteln unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems 1 h nach der Injektion (p.i.), (a und b) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten, (c und d) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur bessern Visualisierung des Fluorophors

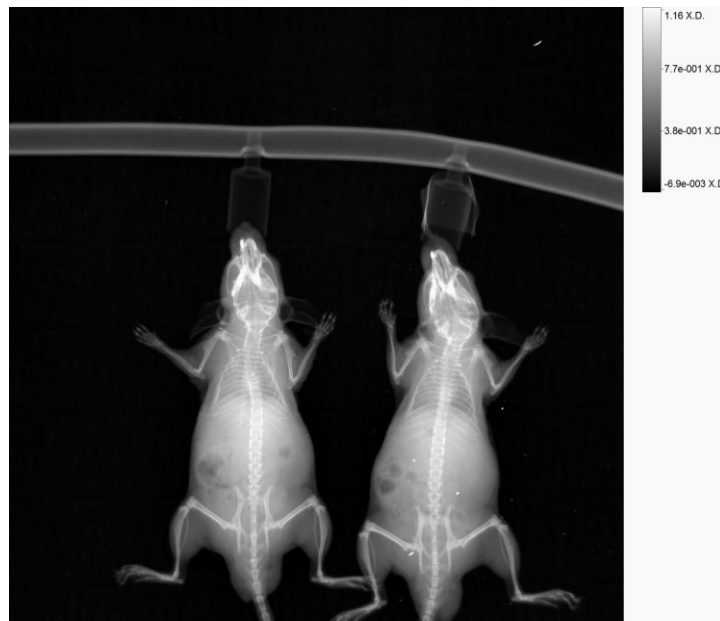


Abbildung 42: Röntgenbilder der Tiere aus Abbildung 41, erzeugt unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems 1 h p.i. der AuNP-Kontrastmittel

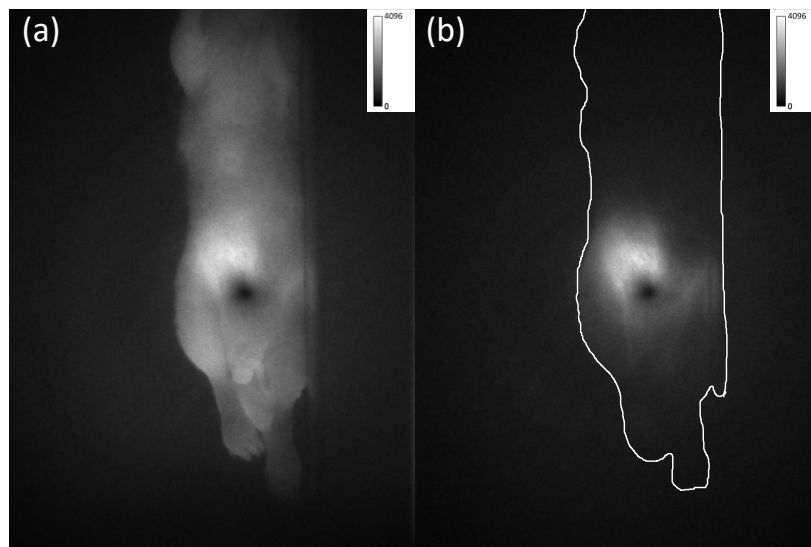


Abbildung 43: Pilotmessung mit AuNP-Kontrastmitteln 1 h p.i. unter Verwendung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten bildgebenden System. Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung

4.3.2 Tumor Untersuchungen

Die Untersuchungen durch Pretze et al. mit fluoreszierenden AuNPs in tumortragenden Mäusen zeigen, dass eine Akkumulation der Fluoreszenz innerhalb des Tumors frühestens drei Stunden nach der Injektion zu beobachten ist [24, 46]. Daher wurden Vergleiche der verschiedenen Fluoreszenzbildgebungssysteme mit den LNCaP-tumortragenden Mäusen nach 3 h, 6 h, 24 h und 48 h nach der Injektion des Fluorophores durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse zuerst mit dem Referenzsystem In Vivo Xtreme und anschließend mit dem selbst entwickelten Gerät untersucht [24].

In der folgenden Abbildung 44a ist ein Bild eines Versuchstiers während der Untersuchung bei Weißlichtbeleuchtung zu sehen. Die zweite Abbildung 44b zeigt das entsprechende Fluoreszenzbild. In der Abbildung 44c ist die Überlagerung des Weißlicht- und Fluoreszenzbildes von AuNP-SIDAG-LUG an der Tumorstelle im in dieser Arbeit entwickelten System zu sehen [46].

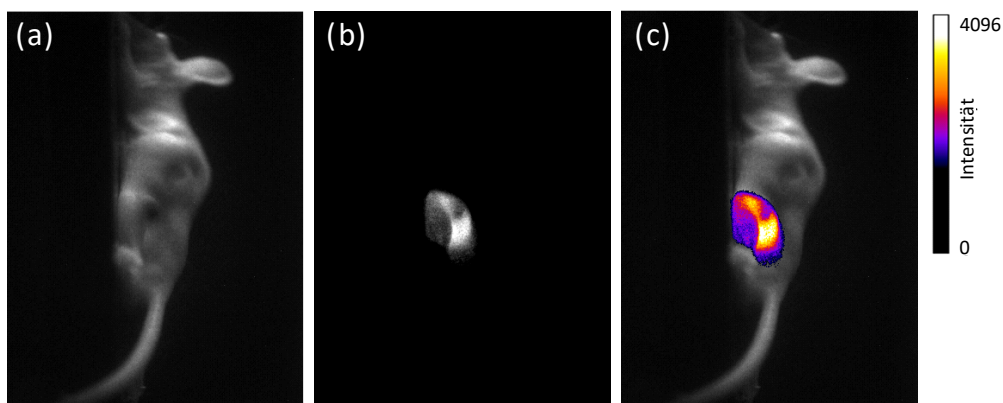


Abbildung 44: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG an der Tumorstelle, (c) Overlay. 3 h nach der intravenösen (i.v.) Injektion (p.i.) des Kontrastmittels. Gemessen im entwickelten bildgebenden System mit einer Laserleistung von 17 mW

In Abbildung 44, aufgenommen 3 h nach der Injektion des Fluorophores, wird der größte Teil der Fluoreszenz in der Blase beobachtet. Bis zu diesem Zeitpunkt findet keine Anreicherung im Tumor statt. Die gleichen Beobachtungen wurden mit dem Referenzsystem gemacht,

welche in Abbildung 45 bis 48 zu sehen sind. Die Bilder zeigen, die Ergebnisse unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems: Weißlichtaufnahme (Abbildung 45a), Röntgenbild (Abbildung 4b), Fluoreszenzbild mit einer Anregungsbeleuchtung von 750 nm bis 790 nm (Abbildung 46a absolute Intensitäten, Abbildung 46b relative Intensitäten). Die Abbildung 47a zeigt die Hellfeldabbildung von der linken Seite der Maus. In der Abbildung 47b ist das Röntgenbild von der linken Seite der Maus zusehen. Die Abbildung 48a zeigt das Fluoreszenzbild der linken Seite der Maus mit absoluten Intensitäten. Abbildung 48b zeigt die gleiche Bild mit relativen Intensitäten bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm.

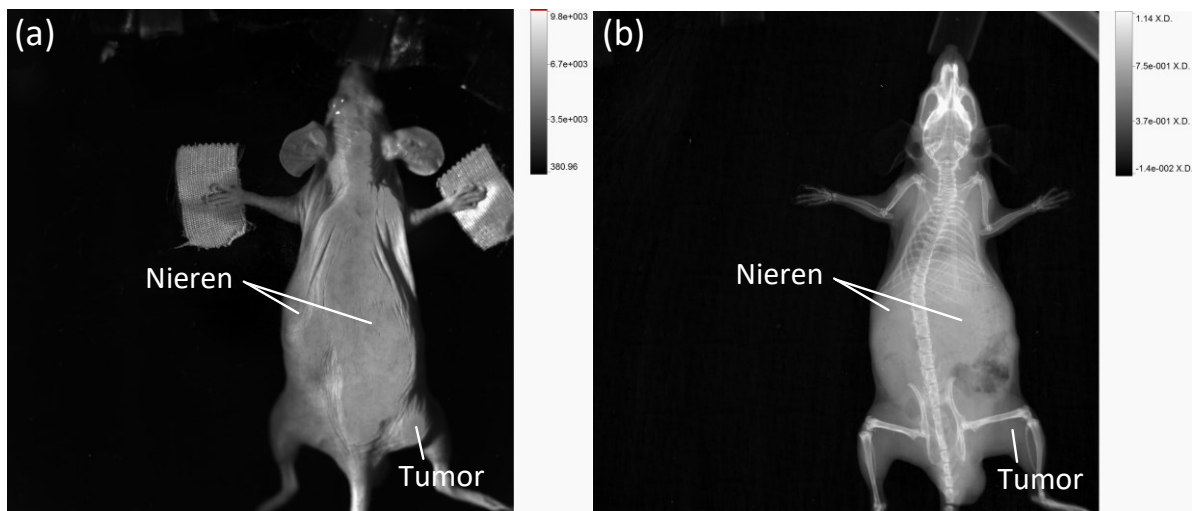


Abbildung 45: (a) Weißlicht Abbildung einer Maus mit AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems (b) Röntgenbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems

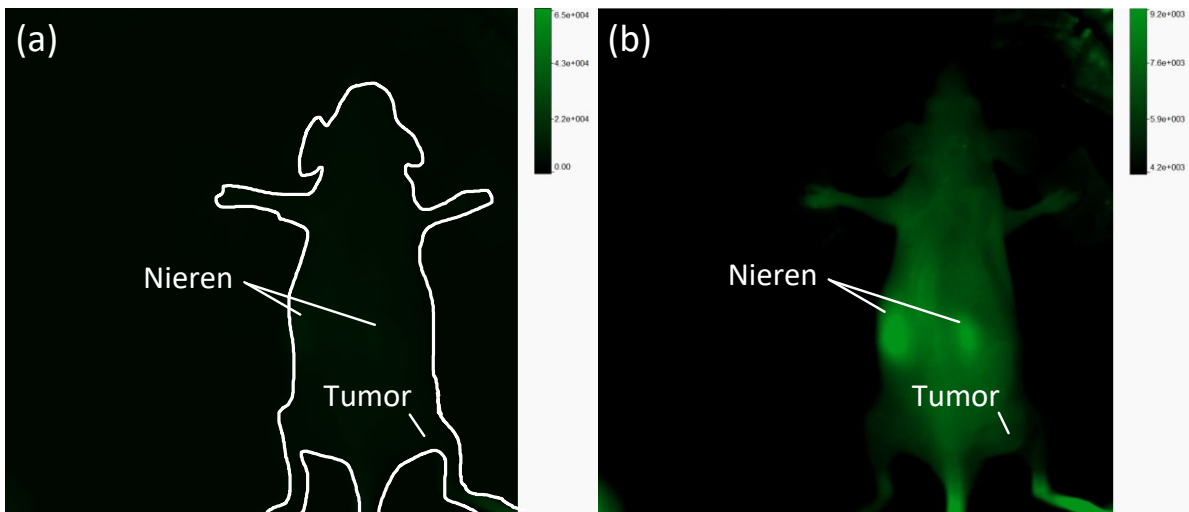


Abbildung 46: Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm mit einer Belichtungszeit von 60 sek., (a) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten (b) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur besseren Visualisierung des Fluorophors

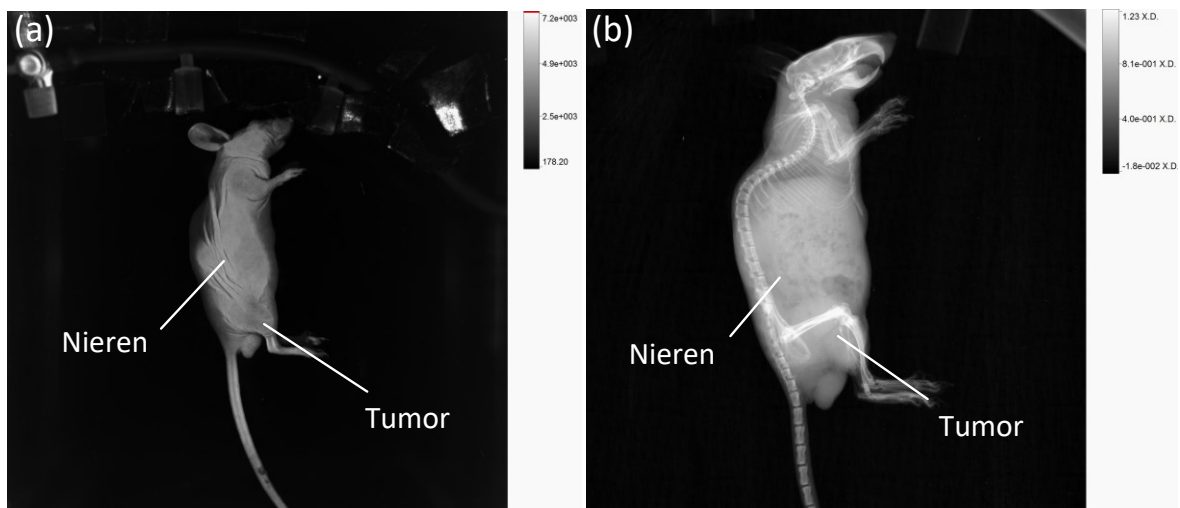


Abbildung 47: (a) Hellfeldabbildung von der linken Seite der Maus mit AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems (b) Röntgenbild von der linken Seite der Maus 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems

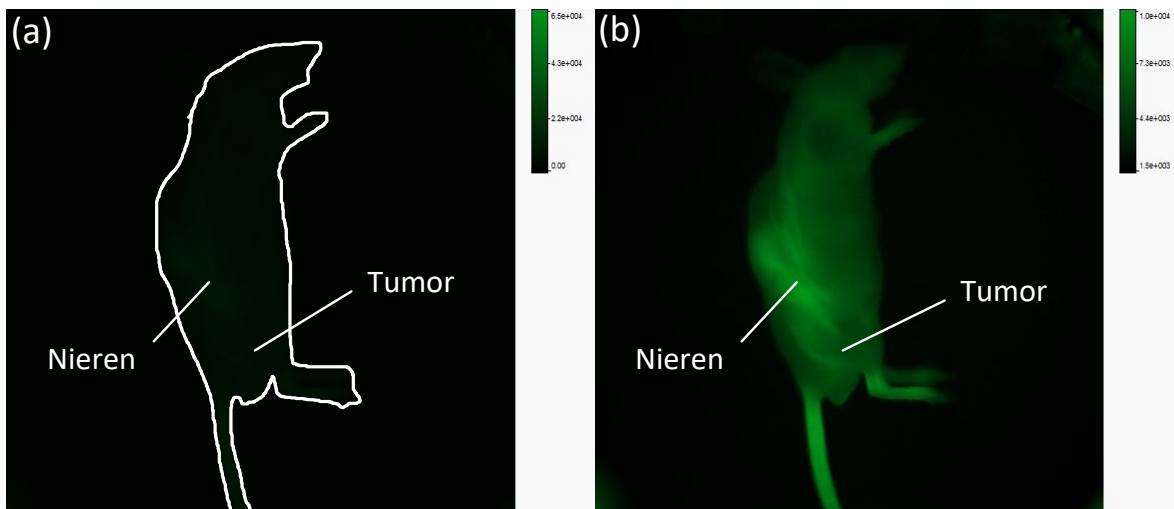


Abbildung 48: Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm mit einer Belichtungszeit von 60 sek. von der linken Seite, (a) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten (b) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur besseren Visualisierung des Fluorophors

In den folgenden Abbildungen 49 und 50 (6 h p.i.) und (24 h p.i.) ist eine Abnahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Eine signifikante Akkumulation von fluoreszierenden Partikeln an der Tumorstelle ist 48 h nach der Injektion nachweisbar (Abbildung 51).

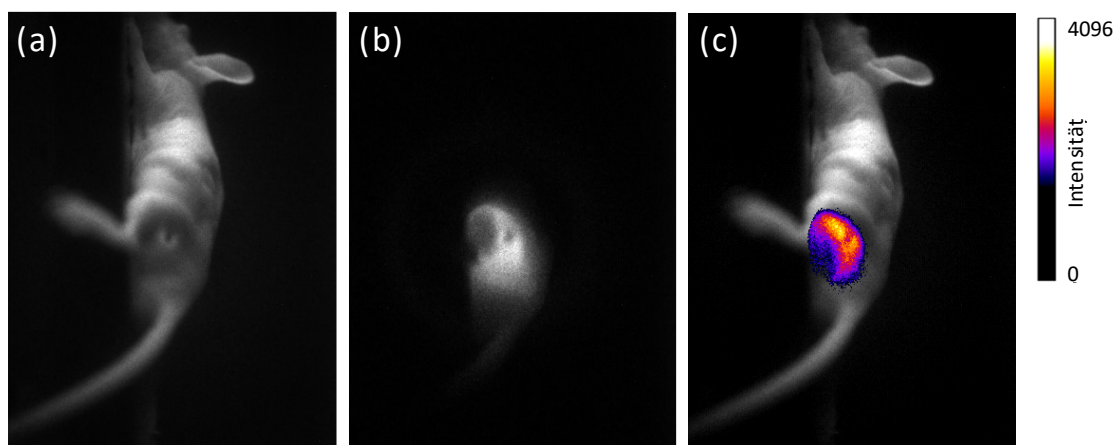


Abbildung 49: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im entwickelten System, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer

Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay. 6 h p.i. Gemessen im entwickelten System.

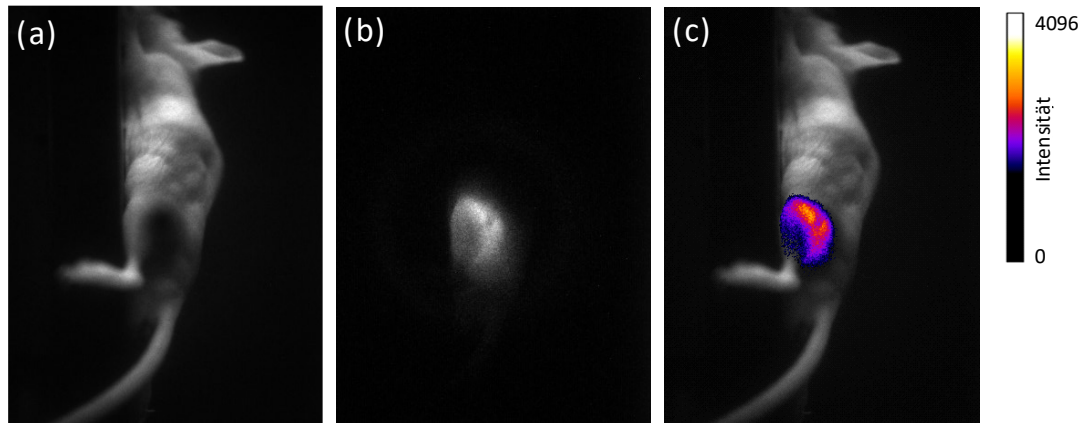


Abbildung 50: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay 24 h p.i. Gemessen im entwickelten Laserscanner.

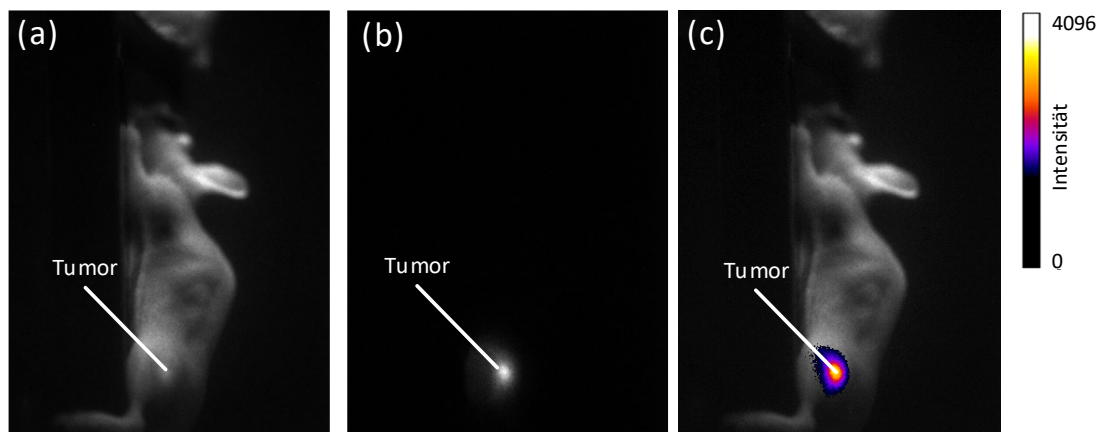


Abbildung 51: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay 48 h p.i. gemessen im entwickelten Laserscanner

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse des Referenzsystems In Vivo Xtreme. Abbildung 52a zeigt die Überlagerung von Röntgen- und Fluoreszenzbild 48 h p.i., welche mit einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm durchgeführt wurden. In Abbildung 52b ist die Überlagerung von Röntgen- und Fluoreszenzbild 48 h p.i. und einer etwas breitbandigeren Fluoreszenzanregung in einem Bereich von 690 nm bis 790 nm zu sehen. Abbildung 52c zeigt das Weißlichtbild des untersuchten Versuchstiers. Abbildung 52d zeigt ein Fluoreszenzbild 48 h p.i. bei der Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm von der linken Seite der Maus. Abbildung 52e zeigt das Fluoreszenzbild 48 h p.i. bei der Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm von der linken Seite der Maus. Abbildung 52f zeigt die Überlagerung des Röntgen- und Fluoreszenzbild 48 h p.i. von AuNP-SIDAG-LUG bei einer Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm von der linken Seite der Maus [46].

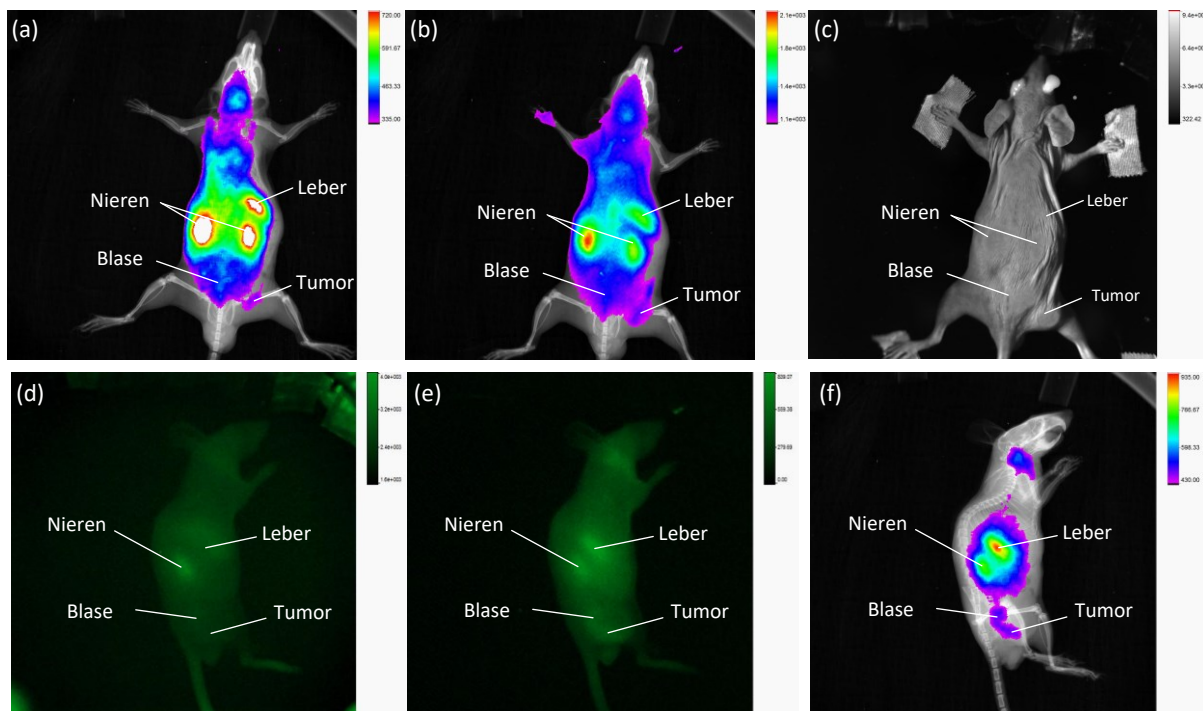


Abbildung 52: Überlagerung des Röntgen- und Fluoreszenzbild 48 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme-Systems mit einer Belichtungszeit von 60 sek. (a) Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm, (b) 690 nm bis 790 nm, (c) Weißlichtbild, (d) Fluoreszenzbild, bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm von der linken Seite der Maus, (e) Fluoreszenzbild bei einer Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm der linken Seite der Maus, (f) Überlagerung des Röntgen- und Fluoreszenzbild von

AuNP-SIDAG-LUG, bei einer Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm der linken Seite der Maus

Zu beobachten ist, dass sowohl der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Laserscanner als auch das Referenzsystem die gleiche erwartete Akkumulation des Kontrastmittels im Tumor 48 h nach seiner Injektion aufweisen [42]. Dies bestätigt die erwarteten Systemeigenschaften unter in vivo Bedingungen. Die entsprechenden Bilder wurden auf der Basis der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der Fluoreszenzbilder verglichen. Das Signal-Rausch-Verhältnis des Tumors nach 48 h p.i. mit dem entwickelten Scanner lag bei $SNR = 56$. Im Gegensatz dazu lagen die SNRs beim Referenzsystem bei einer Fluoreszenzanregung von 750 nm bis 790 nm bei $SNR = 5,8$ und bei einer Anregung von 690 nm bis 790 nm bei $SNR = 9,3$ [46].

5 Diskussion

Die Lokalisierung von Kontrastmitteln auf Cyanin- und SIDAG-Farbstoff-Basis in vitro unter Zuhilfenahme von Tumorphantomen, beziehungsweise in vivo an Tumoren, mit unterschiedlichen bildgebenden Systemen werden im Folgenden interpretiert und diskutiert. Weiterhin werden die Vor- und Nachteile der verglichenen bildgebenden Systeme analysiert und Grenzen beziehungsweise weitere mögliche Applikationen in medizinischen und industriellen Bereichen betrachtet. Die gewonnenen Erkenntnisse sowie der wissenschaftliche Fortschritt werden beschrieben und hinsichtlich der jeweiligen Messeffekte validiert und verifiziert.

5.1 Bildgebungssystem zur Fluoreszenzdetektion und Gewebeanalyse

Das wesentliche Kernelement dieser Arbeit ist die Entwicklung eines auf dem Prinzip der laserinduzierten Fluoreszenz beruhenden bildgebenden Systems mit höchstmöglicher Empfindlichkeit [71]. Die ebenfalls entwickelte Bildakquisition und Datenerfassung erlaubt das automatisierte Scannen von Proben. Eine nachgeschaltete Bildverarbeitung und Auswertemethodik erlaubt ein zusätzliches Quantifizieren von spezifischen Fluorophoren in großen Probevolumen. Im Folgenden werden mögliche Vor- und Nachteile des Konzeptes diskutiert.

Ein elementarer Vorteil liegt in der Einfachheit des technischen Aufbaus und der robusten Systemarchitektur des entwickelten Scanners. Durch die starre konstruktive mechanische Befestigung der Anregungsbeleuchtung und dem Detektionssystem an einer Aluminiumhalterung wird das System sehr robust gegenüber Schwingungen, die hauptsächlich durch die mechanische Bewegung des Positionierungssystems verursacht wird. Es sind dadurch keine durch filigrane mechanische Gelenke bewegte aufwendige Spiegelhalterungen, wie bei der „Flying-spot-Scanner“ Technologie, notwendig. Dies führt zu einer exakten Positionierung und stets gleichbleibenden Fokussierung der Anregungsbeleuchtung und des Detektionssystems.

Die Untersuchungen zur Systemvalidierung bestätigen die wesentlichen Abhängigkeiten des Systems von der Anregungsleistung des Lasers, der Belichtungszeit des Detektors und der Konzentration des Fluorophors. Wie in den Abbildungen 29 und 39 dargestellt, steigen die gemessenen Intensitäten mit längerer Belichtungszeit linear an. Durch die hohe Sensitivität des Detektorsystems ist eine schnelle Untersuchung mit sehr kurzen Belichtungszeiten möglich. Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Intensität der Anregungsbeleuchtung. Die Messungen (Abbildung 28 und 38) weisen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingestellten Laserleistung und der gemessenen Intensität auf. Durch die punktuelle Anregungsbeleuchtung ist eine sehr hohe örtliche Exposition mit der Anregungswellenlänge von 785 nm an der zu untersuchenden Stelle im Gewebe möglich. Dies resultiert aus der Strahlungsintensität, die durch den Quotienten aus Strahlungsleistung und Raumwinkel definiert ist [66, 72, 73]. Der kleine Durchmesser des Anregungslichtflecks ermöglicht somit eine höhere Bestrahlungsstärke im Vergleich zu größeren Punktdurchmessern, da die absolute Energie der Lichtquelle des Systems auf eine kleinere Fläche konzentriert ist. Es wurde jedoch auf eine sehr geringe Laserleistung von 17 mW zurückgegriffen, da es durch den hohen punktuellen Energieeintrag nicht zu Hautirritationen oder Verbrennungen des Gewebes kommen darf. Die Grenzwerte für die maximal zulässige Bestrahlung der Haut mit einer Wellenlänge von 785 nm bei einer Fläche größer $0,1 \text{ m}^2$ liegen bei einem Zeitraum von mehreren Minuten laut Berufsgenossenschaftlicher Vorschrift bei 100 W/m^2 . Die gewählte Laserleistung liegt daher unter der maximal zulässigen Bestrahlungsstärke für Gewebe durch Laserlicht [74]. Durch das hochsensitive Detektionssystem ist die Laserleistung jedoch völlig ausreichend für die durchgeführten Untersuchungen. Für die Systemvalidierung wurde die Fluorophorkonzentration mit der höchsten Quantenausbeute von $3.125 \text{ } \mu\text{g ICG/mL H}_2\text{O}$ verwendet. Höhere Konzentrationen führen zu den literaturbekannten Selbstabsorptionseffekten, welche die Quanteneffizienz wieder reduzieren [70, 75, 76]. Auch durch die Art der Anregungsbeleuchtung kann die Bilddarstellung beeinflusst werden. Ähnlich der Hell- und Dunkelfeldmikroskopie können Konturen, Strukturhügel und schräge Kanten abhängig vom Winkel der Beleuchtung dunkler oder sogar heller zu sehen sein. Es galt eine ovale Anregungsfleckvergrößerung bei einem zu flachen Einfallswinkel zu vermeiden, da dies die Größe der Lichtfalle beeinflusst. Der gewählte Einfallswinkel der Anregungsbeleuchtung ist ein Kompromiss zwischen der Vermeidung der auf den Detektor einfallenden direkten Reflexion und der noch vorhandenen Beleuchtung aus dem Hellfeld. Die Beleuchtung von der

Seite in einem Winkel von 35° bewirkt, dass die direkten Reflexionen, die auf den Detektor treffen, reduziert werden. Es gibt jedoch immer noch eine relativ vertikale Beleuchtung aus dem Hellfeld des Objekts [66].

Die Untersuchungen der maximalen Eindringtiefe in Gewebe wurden unter den in Kapitel drei beschriebenen System Einstellungen im Vergleich zu einem hochauflösenden Referenzsystem, beschrieben in Kapitel 4.2, durchgeführt. Die Vergleichsmessungen mit dem Referenzsystem zeigen eine maximale Eindringtiefe von 16 mm in Gewebe. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte bildgebende System besitzt durch den Einsatz des Bildverstärkers zwar eine geringere Auflösung als das Referenzsystem. Der Vorteil des Bildverstärkers liegt jedoch in der gesteigerten Sensitivität des Gesamtsystems. Der Bildverstärker wirkt als Vorverstärker und erhöht die Dynamik des Detektionssystems. Daher können extrem schwache Lichtsignale detektiert werden. Die Sensitivitätssteigerung bildet die Grundlage für die Detektion von Fluorophoren auch in tieferen Gewebeschichten. Die Nachweisgrenze mit dem modifizierten Bildgebungssystem lag unter sonst gleichen Bedingungen bei einer Gewebetiefe von 32 mm, also um 16 mm höher als beim Referenzsystem mit 16 Bit Detektor ohne Bildverstärker. Die Eindringtiefe konnte mit dem entwickelten bildgebenden System um 100 % gesteigert werden.

5.2 Lichtwegstruktur und optische Anordnung für Fluoreszenzmessungen

Aufgrund der hohen Sensitivität können selbst sehr schwache Lichtsignale detektiert werden. Käme es dauerhaft zu einer Überbelichtung des Detektors, würde dieser an der entsprechenden Stelle zerstört. Um dies zu verhindern ist eine miniaturisierte Lichtfalle entwickelt und in den Strahlengang integriert worden. Die Lichtfalle unterdrückt die Detektion des Anregungslichts vollständig. Die Anregungsbeleuchtung ist folglich in der Detektionseinheit nicht sichtbar. Zwar birgt der Einsatz der Lichtfalle den Nachteil, dass es einen kleinen Bereich auf dem Detektor gibt, der nicht zur Detektion genutzt werden kann. Dieser Nachteil kann jedoch durch eine geschickte Mehrfachbelichtung mit einem lateralen Versatz des Detektionssystems kompensiert werden. Ein weiterer Vorteil der Lichtfalle ist der Umstand, dass nur Licht, welches das Gewebe passiert hat, auch detektiert wird. Die Unterdrückung durch das lokalisierte Abschatten des Anregungslichtflecks, löste die Probleme

der Überbelichtung und der damit verbundenen resultierenden Verstärkungsgrenze. Dies ermöglichte eine Erhöhung der Verstärkungsspannung des Bildverstärkers, was folglich die Signalverstärkung und somit das SNR erhöhte.

Aus physikalischen Gründen werden Reflexionen, Hintergrundlicht und andere optische Störungen durch den Bildverstärker mit verstärkt und als störende Artefakte zusätzlich zu dem zu detektierenden Signal auf den CCD-Chip abgebildet. Um dies zu verhindern, wurden die störenden Effekte durch einen massiven Sperrfilterstapel vor dem Detektionssystem minimiert. Aufgrund der hohen Verstärkung des Detektors kommt der Lichtverlust beim Durchstrahlen der Filter für den gewünschten, zu detektierenden, Wellenlängenbereich nicht zum Tragen.

Anders als bei anderen Ansätzen, die sich mit der Fluoreszenzbildgebung [18,34] befassen, wird für diese Applikation keine flächige, sondern eine fokussierte Anregungsbeleuchtung verwendet. Durch die Fokussierung mittels einer Linse tritt ein hoher Energieeintrag bei einem kleinen Probenvolumen auf. Es wurde eine Linse, mit einer langen Brennweite (500 mm) zum Fokussieren der Anregungsbeleuchtung, verwendet. Durch den physikalisch bedingten Tiefenschärfenbereich der Linse können geringe Unterschiede in der Höhe, die eine Verschiebung des Fokuspunktes verursachen, kompensiert werden. Der Durchmesser des Anregungslichtflecks auf der Probe misst circa 1 mm. Bei einer Differenz von ± 20 mm aus der Fokusebene heraus beträgt der Durchmesser des Anregungslichtstrahls auf der Probe circa 2 mm. Eine detektionsseitige Kompensation von Höhenunterschieden der zu untersuchenden Proben ist durch die Veränderung des Lichtfallendurchmessers möglich wie in Kapitel 3 beschrieben. Je nach Auslegung der Lichtfalle können die Kompensationseigenschaften verändert und angepasst werden. Eine Vergrößerung führt zu einer größeren beleuchtbaren Fläche, eine Verkleinerung, verringert zwar die beleuchtbare Fläche, vergrößert jedoch die sensitive Detektorfläche.

Die im Zuge der Entwicklung durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der schnellen Fluoreszenzdetektion zeigten, dass die Belichtungszeiten mit dem entwickelten Detektionsmodul gegenüber dem Vergleichsgerät erheblich gesteigert werden konnten. Die Belichtungszeiten konnten dabei problemlos bis in den Echtzeitbildgebungsbereich reduziert werden. So könnte eine Probenfläche von 3 cm x 2 cm alle 50 ms gescannt und somit eine

Bildfrequenz von 20 fps erreicht werden. Diese schnellen Belichtungszeiten sind möglich durch die Kombination der fokussierten Anregungsbeleuchtung und den optischen Eigenschaften des Detektionssystems.

Um quantitative Aussagen über das Vorhandensein von Tumoren treffen zu können, ist eine homogene Beleuchtung der Probe notwendig. Eine Untersuchung der Oberflächenabtastung und die anschließende Berechnung der einzelnen Bilder zeigen, dass die Probenbeleuchtung bei einer hohen Bildüberlappung von mehr als 80 % als homogen angenommen werden kann. Die Homogenität kann weiter erhöht werden, indem die Anzahl der während eines Scans aufgenommenen Bilder erhöht wird und diese zu einem einzigen Bild verrechnet werden. Es werden dadurch mehr Bildinformationen gewonnen, wodurch die Homogenität der Ausleuchtung des Gesamtbildes steigt.

5.3 In vivo Tiermodell Untersuchungen

Nach der erfolgreichen technischen Validierung des entwickelten Systems wurde dieses im Tiermodell getestet. Bedingt durch den Stoffwechsel kommt es bei der in vivo Gewebeuntersuchung zu einigen Besonderheiten, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Die durchgeführten Untersuchungen waren notwendig, um das Verhalten der biologischen Strukturen und die Veränderung der Fluoreszenz im lebenden Organismus zu analysieren und validieren. Durch den intakten und zirkulierenden Blutkreislauf werden die Absorption und Emission sowie die Ausbreitung von Licht im Gewebe durch die im Blut enthaltenen natürlichen Substanzen und Nährstoffe beeinflusst. Generell kommt es bei Krebs zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen und einem übermäßigen Umsatz von Nährstoffen. Dies begünstigt eine schnelle Massezunahme der wuchernden Zellen. Ein Überblick über den Metabolismus von Krebszellen wird in der Veröffentlichung von DeBerardinis und Chandel gegeben [77]. Bei der Klassifikation von benignem und malignem Gewebe mittels der optischen Tomographie am lebenden Organismus stellt der Blutfarbstoff Hämoglobin durch seine rote Farbe, wie in Abbildung 53 dargestellt, einen der Hauptabsorber im unteren und mittleren visuellen Spektralbereich dar.

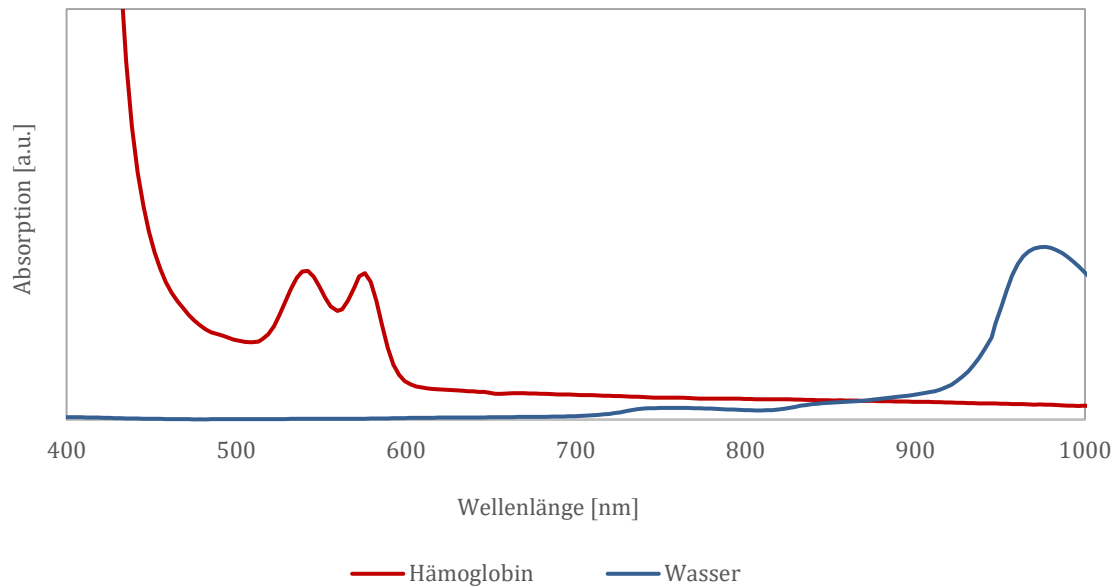


Abbildung 53: Absorption von Hämoglobin und Wasser im unteren und mittleren visuellen Spektralbereich

Auch andere im Körper vorhandene Substanzen absorbieren Licht bei spezifischen Wellenlängen im unteren visuellen Bereich. Dazu zählen Stoffe wie Enzyme, Lipide, Strukturproteine oder auch Aminosäuren. Viele dieser Stoffe weisen fluoreszierende Eigenschaften auf, wenn sie mit Licht im unteren Spektralbereich des visuellen Spektrums angeregt werden. Die Emission dieses körpereigenen Stoffs liegt auch meist im unteren und mittleren Spektralbereich des visuellen Spektrums. In Bezug auf die Wellenlänge ist bekannt, dass längerwellige Strahlung in tiefere Gewebeschichten vordringen kann, was hinsichtlich der optischen Tomographie einen Vorteil darstellt, um auch tiefer gelegene Gewebestrukturen zu identifizieren und darstellen zu können [78]. Ein weiterer enormer Absorptionseffekt tritt bei 900 nm durch das im Gewebe vorhandene Wasser auf. Daher liegt der für in vivo Untersuchungen optimale Spektralbereich bei 700 nm und 850 nm. Das entwickelte Laserscanningsystem wurde mit einem sensitiven Spektralbereich von 805 nm bis 870 nm entwickelt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt dabei außerhalb des Detektionsbereichs bei 785 nm und wurde, wie beschrieben, mittels einer speziellen Lichtfalle ausgeblendet. Der verwendete Fluoreszenzmarker auf Basis des Farbstoffes SIDAG, der für die in vivo Untersuchung zum Einsatz kam, weist ein Emissionsmaximum von 750 nm auf. Dies stellt

jedoch keinen Nachteil dar. Die emittierte Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers reicht weit bis in den sensitiven Bereich des Detektionssystems hinein. Aufgrund der hohen Sensitivität des Detektors könnte bei einer Verlagerung des sensitiven Bereichs die Detektionsgeschwindigkeit weiter reduziert werden. Die Belichtungszeit liegt jedoch schon im Bereich der Echtzeitbildgebung, was daher in dieser Applikation keinen weiteren Vorteil darstellen würde.

Die in vivo Vergleichsuntersuchungen zwischen dem Referenzsystem, das zur Validierung verwendet wurde und dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten System bestätigt die Messungen mit dem entwickelten Laserscanner. Es stellte sich dabei heraus, dass die fokussierte Anregung Vorteile in den Detektionseigenschaften gegenüber der großflächigen Ausleuchtung der Probe aufweist. Herkömmliche Beleuchtungssysteme von Fluoreszenzbildgebungssystemen sind auf die homogene Ausleuchtung möglichst großer Objektfelder abgestimmt. Für das verwendete Referenzgerät In vivo Xtreme von Bruker ist das Objektfeld 19 cm x 13 cm. Die Fluoreszenzemission wird dabei ganzheitlich über dem Ganzen zu untersuchendem Objekt zeitgleich angeregt. Zur Vermeidung von Informationsverlusten wird die Belichtungszeit (Abbildung 50) auf den Bereich mit der höchsten Fluoreszenzemission wie Leber und Niere eingestellt. In diesem Fall verlieren Bereiche mit geringer Fluoreszenzemission viel von ihrer Dynamik. Der Dynamikbereich der erzeugten Bilder mittels In Vivo Xtreme liegt dabei im unteren Drittel, welcher durch die Fluoreszenzeinflüsse aus anderen Bereichen resultiert. Durch die maßgeschneiderte Spotbeleuchtung kann die Dynamik an beliebige Interessengebiete angepasst werden und Quereinflüsse durch Fluoreszenzemissionen aus anderen Bereichen vermieden werden. Die Selektivität bei der Tumordetektion wird dadurch erhöht. Deutlich wird dies in den durchgeführten Untersuchungen. Bei der In vivo Xtreme Systemuntersuchung (Abbildung 54) ist der Tumor in diesem Fall sehr schwer zu erkennen. Dies liegt an Nieren und Leber, die den Tumor stark überstrahlen, da sich auch in ihnen der Fluoreszenzmarker angereichert hat. Betrachtet man die Ergebnisse zu der Untersuchung mit dem entwickelten Bildgebungssystem kann der Tumor durch die in Kapitel 3 Abbildung 2 gezeigte fokussierte Anregung der Fluoreszenz klar erkannt werden. Die Anregungsbeleuchtung wird durch die Fokussierung gezielt auf das kleine Bildfeld gerichtet. Dies bietet den Vorteil, dass die Fluoreszenz nur an dem zu beobachtenden Bildausschnitt angeregt wird. Dadurch werden Überstrahlungen aus anderen

fluoreszierenden Bildbereichen, wie beispielsweise in den verstoffwechselnden Geweben vermieden.

Um großflächige Proben untersuchen zu können, muss eine Bildbearbeitung erfolgen, welche die einzelnen Bilder zu einem großen Bild verrechnet. Dies bietet jedoch den Vorteil, dass die räumliche Auflösung gegenüber planaren Bildgebungssystemen mit einem großen Bildfeld, die nur ein Bild erzeugen, um ein Vielfaches erhöht werden kann. Die Bilddetails auf der Probe in den einzelnen Bildern können durch eine Anpassung des Bildfeldes und eine Vergrößerungsoptik bis zur Beugungsgrenze heran vergrößert werden, was die Auflösung gegenüber planaren Bildgebungssystemen enorm steigert.

5.4 Technologische Systembetrachtung

Auf der technologischen Seite soll in dieser Arbeit ferner ein kostengünstiges und einfach zu bedienendes Messsystem für die *in vitro* und *in vivo* Analyse von Gewebe mit hoher Eindringtiefe und schnellen Detektionszeiten entwickelt werden. Damit verbunden sind Kompromisse bei der Konstruktion, der Detektionseinheit, der optischen Anordnung und der Datenverarbeitung der erzeugten Bilder innerhalb des Entwicklungsprozesses, die zum Erreichen des Ziels in Kauf genommen werden mussten. Aus ökonomischen Gesichtspunkten wurde bei der Systementwicklung auf das Verfahren mit einer kontaktlosen Echtzeit-Laserinduzierten Fluoreszenzbildgebung mit Niedrigleistungs-CW-Lasern gesetzt. Verschiedene andere mikroskopische und makroskopische Methoden die sich mit der Fluoreszenzbildgebung beschäftigen, beinhalten die Verwendung von Zeitbereichstechniken, wie beispielsweise Time-Domain Photon Migration (TDPM) oder Frequency-Domain Photon Migration (FDPM) [28, 44, 65, 79, 80]. Diese Techniken beruhen auf der Kenntnis der angeregten elektronischen- und Schwingungszustände der fluoreszierenden Moleküle. Bei diesen Verfahren müssen die Anregungslichtquellen mit Frequenzen in der Größenordnung von Pico- beziehungsweise Femtosekunden gepulst werden. Die Verfahren nutzen dabei die Time-of-Flight Technologie um das elastisch gestreute Licht von der Fluoreszenzemission zu trennen [28, 44, 81]. Mit diesen Techniken kann zwar eine genauere und höhere Eindringtiefe im Vergleich zu den CW-Methoden erreicht werden, jedoch wird eine Vielzahl von Pulsen benötigt. Die notwendige Belichtungszeit steigt dadurch auf 5 bis 120 Sekunden an [28, 65,

79]. Ein Nachteil bei der Verwendung von TDPM- und FDPM-Verfahren ist, dass weder normale CCD-Kameras noch kontinuierliche CW-Laser verwendet werden können [28, 63, 81]. Es werden aufwendige Lasermodulations- und Synchronisationsverfahren benötigt, die auf gepulsten Lasern und schnellen Detektoren basieren. Darüber hinaus werden die elektronischen Bauteile der Kamera nicht nur durch thermisches Rauschen, sondern auch durch Ausleserauschen gestört, da sehr viele Werte gemessen werden müssen. Dies verursacht zusätzliche Unsicherheiten, die eine Datenerfassung der detektierten Signale beeinträchtigt [80]. Zudem sind für die Anwendung der TDPM- und FDPM-Verfahren weitere erhebliche technische Anstrengungen gegenüber CW-Verfahren notwendig [44, 63, 65, 81]. Ein weiteres Argument, warum sich diese Verfahren bisher nicht etablieren konnten sind die hohen Betriebskosten. Es gibt bisher keine technisch einfache und kostengünstige Kombination von Lasern und synchronisierbaren Detektoren am Markt, die in der preislichen und technischen Aufwendung vergleichbar mit CW-Systemen sind.

Im Gegensatz zu TDPM- und FDPM-Techniken erfordert das in dieser Arbeit entwickelte Design keine aufwendige Elektronik, die für ein Pulsen des Lasers benötigt würde [80]. Es kann zudem auf ein schnelles Gating des Bildverstärkers verzichtet werden. Darüber hinaus werden im Gegensatz zu den zeitbasierten Detektionsverfahren keine elektronischen Komponenten für die Synchronisation von Laser und Bildverstärker benötigt. Der Ansatz des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Bildgebungssystems beschränkt sich bewusst auf den Einsatz der einfachsten Technologie auf dem Gebiet der Fluoreszenzforschung und die Kombination eines kontaktlosen CW-Fluoreszenz-Bildgebungssystems mit einer neuartigen optischen Lichtwegstruktur, die das SNR und die Detektionsfrequenz signifikant erhöht.

Für die in vivo Untersuchung wurde eine Peripherie um das bildgebende System gebaut, die eine Untersuchung nach den ethischen Richtlinien erlaubte. Der in der Arbeit entwickelte Laserscanner kann, wie gezeigt, sowohl alleine als auch in Kombination mit bestehenden Systemen arbeiten. Durch die kompakte Bauweise ist das Scanningsystem leicht zu transportieren und benötigt keine weitere Infrastruktur.

5.5 Erweiterte Applikationsmöglichkeiten

Der entwickelte Ansatz zur Fluoreszenzbildgebung bietet auch auf anderen Gebieten eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten, weshalb das System nicht nur für die Tumordetektion genutzt werden kann. Auch ein Einsatz im intraoperativen Bereich ist denkbar. Weitere Ansätze gibt es im Bereich der Untersuchung der aktiven Gehirnareale von Neugeborenen bezüglich deren motorischer und sensorischer Aktivität, was aufgrund der noch relativ lichtdurchlässigen Schädelknochen in diesem Fall möglich ist [38]. Eine andere Art der Anwendung könnte eine regelmäßige therapiebegleitende Untersuchung sein, um den Verlauf einer Behandlung besser beurteilen zu können. Hierbei gibt es Ansätze bei denen Gelenkknorpel beziehungsweise Finger durchleuchtet und hinsichtlich rheumatischer Erkrankungen untersucht worden sind [82].

Rückblickend lassen sich mit dem entwickelten System Tumore im lebenden Organismus im unteren nahen Infrarotbereich, basierend auf einer spezifischen Markierung mit Fluorophoren, mittels Fluoreszenzemissionssignalen sowohl schnell als auch in tieferen Gewebeschichten als mit den bisher verfügbaren Systemen detektieren und quantifizieren.

6 Ausblick

Mit dem Prototyp des Laserscanners konnte die Detektion von Fluorophoren in Gewebe gezeigt werden. Nach den Erfahrungen mit dem Prototyp gibt es an dieser Stelle mehrere Ansätze für Verbesserungsmöglichkeiten. Im aktuellen Prototyp ist das Positionierungssystem an drei linearen Achsen orthogonal zu einander montiert. In einer zukünftigen überarbeiteten Version des Laserscanners sollte dieses durch ein Portalsystem ersetzt werden. Dies kann durch eine weitere Achse in z-Richtung erfolgen und verhindert eine Neigung des Detektionssystems.

Der aktuell eingesetzte Bildverstärker ist für den visuellen Spektralbereich ausgelegt und besitzt in diesem Bereich seine höchste Quantenausbeute. Durch den Einsatz, eines Bildverstärkers für den Nahinfrarot Bereich könnten die Ergebnisse und die Stabilität des Messsystems noch erheblich verbessert werden.

Zudem vermindert eine integrierte Kühlung das Bildrauschen. Bei hohem Rauschen kann ein großer Dynamikbereich nicht ausgenutzt werden. Je höher der effektive Dynamikbereich ist, desto besser können später feine Kontraste und Strukturen wahrgenommen werden. Die Kühlung des CCD-Chips vermindert das Grundrauschen. Daher ist eine Kühlung zukünftig empfehlenswert.

Im jetzigen Stadium ist das Messverfahren noch nicht praktikabel für einen langfristigen Einsatz mit in vivo Untersuchungen in klinischen Studien. Für den Einsatz muss das provisorische Narkosesystem für die Untersuchungen an Tieren professionalisiert in den entwickelten Prototyp integriert werden. Dies würde die Versuchsdurchführung erheblich erleichtern.

Auch eine Optimierung der Benutzersoftware sollte für den Studienbetrieb durchgeführt werden und durch eine leicht verständliche Benutzeroberfläche anwenderfreundlicher gestaltet werden.

Weitere Verbesserungen sind die Farbstoffoptimierung sowie die Unterdrückung der Streuung, die durch das Licht außerhalb der Fokusebene und die Sekundäremissionen aus dem Gewebe verursacht wird.

Die Tiefe innerhalb des Gewebes aus der die Fluoreszenz berührungslos unter Verwendung des entwickelten Bildgebungssystems gemessen werden kann, erlaubt präklinische in vivo Untersuchungen nicht nur in Mäusen, sondern unter Verwendung eines Tierrotationssystems auch in größeren Nagern.

Hinsichtlich der Entwicklung des Prototypen gab es zwei wesentliche Hauptziele bei der Realisierung des beschriebenen Laserscanners: die Sicherstellung der Einfachheit der verwendeten Technologie und deren Benutzerfreundlichkeit. Insgesamt handelt es sich um ein einfach zu bedienendes, energieeffizientes, kostengünstiges und kompaktes System im Vergleich zu den etablierten Bildgebungsmodalitäten. Dennoch ist es nicht beabsichtigt diese zu ersetzen, sondern zu ergänzen. Die Vorteile des entwickelten Detektionssystems im Vergleich zu anderen optischen Scannern sind das hohe SNR und die Möglichkeit, die räumliche Auflösung zu erhöhen. Weitere mögliche Einsatzfelder sind beispielsweise die Verwendung dieser Systeme für die intraoperative Bildgebung. Die vorgestellte Technik ermöglicht die schnelle Messung der Fluoreszenz. Daher könnte der Laserscanner auch verwendet werden, um ohne eine Belastung durch ionisierende Strahlung gezielt spezifisch markierte, oberflächennahe Tumore am Menschen in Echtzeit zu untersuchen. Weitere mögliche Anwendungsgebiete sind der Nachweis von oberflächennahem Brustkrebs, aber auch die Untersuchung von Weichteilkarzinomen sowie von Metastasen befallenen Lymphknoten.

Zusätzliche Anwendungen können für die Detektion chemischer und biologischer Prozesse in Betracht gezogen werden, die lumineszierende oder fluoreszierende Substanzen beinhalten. So könnte die Detektion von Konzentrationsprofilen in flüssigen Filmen oder pathogenen Keimen in Wunden und Nahrungsmitteln analysiert werden. Darüber hinaus ermöglicht die hohe Messgeschwindigkeit neue Anwendungen der Fluoreszenzbildanalyse aufgrund der Realisierung von Echtzeitüberwachung.

7 Zusammenfassung

Die Erforschung speziell von einfachen und kostengünstigen Verfahren zur nicht-invasiven Krebsdiagnosestellung, welche zudem ohne ionisierende Strahlung auskommen, ist von besonderer Wichtigkeit. Im Rahmen der Arbeit wurde daher ein neuartiges automatisiertes Messsystem auf Basis der laserinduzierten Fluoreszenz zur nicht-invasiven Detektion von Fluorophor markierten Tumoren entwickelt. Das quantitative Fluoreszenzmessverfahren, das in Kombination mit einer neuartigen optischen Lichtwegstruktur entwickelt wurde, bietet einen vielversprechenden Ansatz für einen Einsatz in der Gewebe- und Tumordiagnostik. Die Charakterisierung und quantitative Analyse von fluoreszenzmarkiertem Gewebe im unteren Nahinfrarotbereich ist mit diesem Laserscanningsystem kontaktlos in Echtzeit möglich. Darüber hinaus ist das entwickelte Bildgebungssystem im Gegensatz zu anderen klinisch etablierten Systemen wie CT oder MRT, die routinemäßig in der Tumorbildgebung zum Einsatz kommen, bedeutend einfacher aufgebaut und kostengünstiger. Im Zuge der Validierung wurde das System zunächst an Phantomen und anschließend *in vitro* getestet. Nach der erfolgreichen *in vitro* Validierung erfolgte auch eine *in vivo* Validierung des entwickelten Scanners. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Identifikation von fluoreszenzmarkierten Tumoren auch in tieferen Gewebeschichten mit Hilfe des entwickelten Systems durchgeführt werden kann. Zudem ist eine sehr schnelle Bildgebung im Bereich der Echtzeitbildgebung mit dem entwickelten System möglich. In dieser Arbeit wurden somit die Grundlagen für eine kontaktlose Echtzeitbildgebung für Gewebeanalysen mittels Fluoreszenz geschaffen. Die beschriebene Methode ist unabhängig von anderen diagnostischen Verfahren einsetzbar, kann aber auch additiv im Verbund zur weiteren Untersuchung verdächtiger Gewebeveränderungen zum Einsatz kommen. Sie kommt ohne langwierige Laborarbeiten aus und es werden keine radioaktiven Substanzen benötigt. Mit einer solchen nicht-invasiven diagnostischen Methode wäre die Durchführung von humanen Früherkennungsuntersuchungen im Verdachtsfall oder bei Risikogruppen denkbar, die dazu beitragen könnten, bösartige Gewebeveränderungen frühzeitig zu diagnostizieren, wodurch sich die Heilungschancen erheblich steigern könnten.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abs	Absorption
AuNP	Gold-Nanopartikel
BBN	Bombesin
BM	Blindmessung
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauelement (charged coupled device)
cm	Zentimeter
CMOS	Komplementärer Metalloxid-Halbleiter (complementary metal-oxide semiconductor)
CPU	Zentrale Verarbeitungseinheit (central processing unit)
CT	Computertomographie
CW	Elektromagnetische Welle mit gleichbleibender Frequenz und Amplitude (continuous wave)
EM	Emission
FDPM	Frequency-domain photon migration
GB	Gigabyte
GHz	Gigahertz
GRPR	Gastrin-freisetzender Peptidrezeptor
h	Stunde (hour)

IARC	International Agency for Research on Cancer
ICCD	Intensified charge coupled device
ICG	Indocyaningrün
i. v.	intravenös
LabView	Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench
LUG	Lys-Harnstoff-Glu
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomografie
mm	Millimeter
NIR	Nahinfrarot
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSMA	Prostata-spezifische Membran-Antigen
px	Pixel
p. i.	Nach der Injektion (past injection)
sek	Sekunde
SIDAG	Sulfobutyl-indotricarbocyanine-dicarboxylic-acid-diglucamide monosodium salt

SNR	Signal to noise ratio
TDPM	Time-domain photon migration
TIFF	Tagged image file format
UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
VIS	Sichtbarer Lichtbereich (visible)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

8.2 Formelzeichenverzeichnis

a_0	Distanz zwischen Schärfeebene und Objektiv
a_v	Vordere Grenze der Schärfeebene
a_h	Hintere Grenze der Schärfeebene
α	Öffnungswinkel
d	Durchmesser
f	Brennweite
f'	Brennweite in der Abbildungsebene
k	Blendenzahl
k_p	Vordere Grenze des Kompensationssektors
k_n	Hintere Grenze des Kompensationssektors
l'	Durchmesser der Lichtfalle
\log	Logarithmus
P_i	eingestrahltene Leistung
P_t	übertragene Leistung
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
T	Transmissionsgrad

u'	Unschärfekreis
u_p'	Durchmesser Unschärfekreis vor der Schärfeebene
u_n'	Durchmesser Unschärfekreis hinter der Schärfeebene
λ	Wellenlänge
Φ	Kantenlänge Bild

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzbildgebung	4
Abbildung 2: Messaufbau für Gewebescanning zur Detektion von Fluorophoren aus tieferen Gewebeschichten	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der optischen Abbildung des Anregungslichtflecks der Anregungsbeleuchtung	10
Abbildung 4: Sensitiver spektraler Bereich des Detektionssystems	11
Abbildung 5: Lichtwegstruktur des Detektionssystems	12
Abbildung 6: Physikalische Abbildungseigenschaften und Profilkompensation der Probenoberfläche.....	14
Abbildung 7: Simulation der Anregungsbeleuchtung	15
Abbildung 8: Strahlaufweitung der Anregungsbeleuchtung bei relativen Abständen zur Fokusebene, dargestellt für die Abstände von ± 0 mm, ± 5 mm, ± 10 mm und ± 20 mm vor und hinter der Fokusebene	16
Abbildung 9: Simulation der punktwolkenförmigen Anregungsbeleuchtung bei relativen Abständen zur Fokusebene, dargestellt für die Abstände von ± 0 mm, ± 5 mm, ± 10 mm und ± 20 mm vor und hinter der Fokusebene.....	17
Abbildung 10: Raytracing Simulation zur Auslegung und Optimierung der Lichtwegstruktur der Detektionseinheit	18
Abbildung 11: Visualisierung der Abbildung des Strahlengangs des Anregungslichtflecks auf dem Detektor	18
Abbildung 12: Photonerverteilung der Anregungsbeleuchtung mit einem Durchmesser von $800 \mu\text{m}$	19
Abbildung 13: Raytracing Modellierung des Detektors bei radialsymmetrischer Ausleuchtung	20

Abbildung 14: Raytracing Modellierung der Strahlverteilung auf dem Detektor bei radialsymmetrischer Ausleuchtung	21
Abbildung 15: Positionierungs- und Detektionssystem	22
Abbildung 16: Flussdiagramm der Bediensoftware	23
Abbildung 17: Registrierung der Bildserien	25
Abbildung 18: Visualisierung einer homogenen Blindmessung zur Untersuchung der Beleuchtungshomogenität des Anregungslichtpfads	26
Abbildung 19: Histogramm zur Darstellung der Intensitätsverteilung der Grauwerte über den gesamten Detektionsbereich	27
Abbildung 20: Strukturformel Indocyaningrün (ICG)	31
Abbildung 21: Spektrale Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes ICG (3,125 µg/ml H ₂ O, gemessen mit MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Deutschland)	32
Abbildung 22: Spektrale Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes SIDAG (8,333 µg SIDAG/ml H ₂ O, gemessen mit infinite 200, Tecan AG, Schweiz)	33
Abbildung 23: Optischer Spektralbereich des verwendeten Bandpassfilters	34
Abbildung 24: Optischer Spektralbereich der verwendeten Langpassfilter	34
Abbildung 25: Anregungsstrahlung nicht von der Lichtfalle überdeckt (links), Anregung durch die Lichtfalle abgedeckt (rechts)	35
Abbildung 26: Gesamtsystem zur Durchführung von Fluoreszenzmessungen	36
Abbildung 27: Ergebnisse und Vergleich der SNR zwischen dem 16 Bit Referenzkamarasystems (CMOS) und dem entwickelten intensivierten CCD-Kamarasystem (ICCD) für unterschiedliche Phantompositionen.....	38
Abbildung 28: Linearitätsbetrachtung der Intensitätsverläufe bei unterschiedlichen Anregungslaserleistungen (20ms, 50ms, 200ms)	39

Abbildung 29: Betrachtung der Linearitätsverläufe der Intensitäten bei unterschiedlichen Belichtungszeiten des Detektionssystems	40
Abbildung 30: Intensitätsverlauf von ICG bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen mit konstanter Laserleistung und Belichtungszeit	41
Abbildung 31: SNR für Phantome in unterschiedlicher Implantationstiefe in Gewebe bei verschiedenen Fluorophorkonzentrationen mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 200 ms.....	42
Abbildung 32: ICG-markierte Tumorphantome, die unter Echtzeitbedingungen im Tiergewebe mit Eindringtiefen von bis zu 32 mm mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Anregungsleistung von 17 mW unter Verwendung des im Vorfeld beschriebenen Messaufbaus gemessen wurden	43
Abbildung 33: (a) Darstellung der Bilder mit einer Drehung von 70° um die y-Achse. (b) Darstellung des berechneten Fluoreszenzverlaufs in die Tiefe (c) Veranschaulichung des Fluoreszenzverlaufs in die Tiefe als Falschfarbenbild	44
Abbildung 34: In vitro Untersuchung einer Fläche von 10 cm × 6,6 cm mit vier unterschiedlich großen Tumorphantomen (Phantomgrößen: Position 1: 7 mm × 2 mm; Position 2: 7 mm × 4 mm; Position 3: 7 mm × 6 mm; Position 4: 7 mm × 8 mm) mit einer Belichtungszeit von 100 ms in einer Tiefe von 22 mm.....	46
Abbildung 35: Falschfarbenbild der gescannten in vitro Gewebeprobe, das unter Verwendung des entwickelten bildgebenden Systems aufgezeichnet wurde.....	46
Abbildung 36: Dreidimensionales Oberflächendiagramm der detektierten Tumorphantome	47
Abbildung 37: Ergebnisse der Detektion der Tumorphantome unter der Gewebeoberfläche mittels der verwendeten Fluoreszenzmarker für die in vivo Experimente bei einer Belichtungszeit von 100ms und einer Massenkonzentration des Fluoreszenzmarkers von 8,333 µg SIDAG/ml H ₂ O. Gemessen mit dem entwickelten System.....	48

Abbildung 38: Linearitätsbetrachtung der Intensitätsverläufe bei unterschiedlichen Anregungslaserleistungen (20 ms, 50 ms, 200 ms) der verwendeten Fluoreszenzmarker für die in vivo Experimente mit dem entwickelten intensivierten CCD-Kamerasystem (ICCD)	49
Abbildung 39: Betrachtung der Linearitätsverläufe der Intensitäten bei unterschiedlichen Belichtungszeiten des Detektionssystems	50
Abbildung 40: Intensitätsverlauf von SIDAG bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen mit konstanter Laserleistung und Belichtungszeit	51
Abbildung 41: Pilotmessung mit AuNP-Kontrastmitteln unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems 1 h nach der Injektion (p.i.), (a und b) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten, (c und b) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur bessern Visualisierung des Fluorophors	52
Abbildung 42: Röntgenbilder der Tiere aus Abbildung 41, erzeugt unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems 1 h p.i. der AuNP-Kontrastmittel.....	53
Abbildung 43: Pilotmessung mit AuNP-Kontrastmitteln 1 h p.i. unter Verwendung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten bildgebenden System. Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung	53
Abbildung 44: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG an der Tumorstelle, (c) Overlay. 3 h nach der intravenösen (i.v.) Injektion (p.i.) des Kontrastmittels. Gemessen im entwickelten bildgebenden System mit einer Laserleistung von 17 mW.....	54
Abbildung 45: (a) Weißlicht Abbildung einer Maus mit AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems (b) Röntgenbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems.....	55
Abbildung 46: Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm mit einer Belichtungszeit von 60 sek., (a) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten	

Intensitäten (b) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur besseren Visualisierung des Fluorophors 56

Abbildung 47: (a) Helfeldabbildung von der linken Seite der Maus mit AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems (b) Röntgenbild von der linken Seite der Maus 3 h p. i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems 56

Abbildung 48: Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, 3 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme Systems bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm mit einer Belichtungszeit von 60 sek. von der linken Seite, (a) Darstellung der Rohdaten der Messung mit absoluten Intensitäten (b) Darstellung mit relativen Intensitäten und veränderten Kontrast- und Helligkeitswerten zur besseren Visualisierung des Fluorophors 57

Abbildung 49: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im entwickelten System, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay. 6 h p.i. Gemessen im entwickelten System. 57

Abbildung 50: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay 24 h p.i. Gemessen im entwickelten Laserscanner..... 58

Abbildung 51: Überlagerung von Weißlicht- und Fluoreszenzbildern an der Tumorstelle im Laserscanner, (a) Weißlicht, (b) Fluoreszenzbildgebung von AuNP-SIDAG-LUG mit einer Laserleistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 100 ms, (c) Overlay 48 h p.i. gemessen im entwickelten Laserscanner..... 58

Abbildung 52: Überlagerung des Röntgen- und Fluoreszenzbild 48 h p.i. unter Verwendung des In Vivo Xtreme-Systems mit einer Belichtungszeit von 60 sek. (a) Fluoreszenzbild von AuNP-SIDAG-LUG, bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm, (b) 690 nm bis 790 nm, (c) Weißlichtbild, (d) Fluoreszenzbild, bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm bis 790 nm von der linken Seite der Maus, (e) Fluoreszenzbild bei einer Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm der linken Seite der Maus, (f) Überlagerung des Röntgen- und Fluoreszenzbild

von AuNP-SIDAG-LUG, bei einer Anregungswellenlänge von 690 nm bis 790 nm der linken Seite der Maus..... 59

Abbildung 53: Absorption von Hämoglobin und Wasser im unteren und mittleren visuellen Spektralbereich 66

9 Literaturverzeichnis

- [1] McGuire S 2016 World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015 *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **7** 418–9
- [2] J F and al e *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.* - PubMed - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Estimates+of+the+worldwide+incidence+and+mortality+from+27+major+cancers+and+for+all+cancers+combined> (accessed 24 Jul 2017)
- [3] Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J and Forman D 2012 Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): A population-based study *The Lancet Oncology* **13** 790–801
- [4] D. G. Kieback, C. C. Kieback und K. H. Pfeiffer Häufigkeit und Ursache mammasonographischer Fehldiagnosen
- [5] ZfKD and Robert Koch-Institut 2017 *Krebs - Jährliche Krebsneuerkrankungen und Todesfälle in Deutschland nach Geschlecht 2014 | Statistik* <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/30563/umfrage/jaehrliche-krebserkrankungen-und-todesfaelle-in-deutschland/> (accessed 25 Jun 2018)
- [6] Statistisches Bundesamt Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015
- [7] Ntziachristos V, Yodh A G, Schnall M and Chance B 2000 Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** 2767–72
- [8] Attarwala A A, Karanja Y W, Hardiansyah D, Romanó C, Roscher M, Wängler B and Glatting G 2017 Investigation of the imaging characteristics of the ALBIRA II small animal PET system for (18)F, (68)Ga and (64)Cu *Zeitschrift fur medizinische Physik* **27** 132–44
- [9] Grosenick D, Rinneberg H, Cubeddu R and Taroni P 2016 Review of optical breast imaging and spectroscopy *Journal of biomedical optics* **21** 91311

- [10]Schellenberger E 2005 Optische Bildgebung: Anwendungen *Zeitschrift für Medizinische Physik* **15** 187–91
- [11]Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Hull W-E, Wängler C, Mier W, Haberkorn U and Eisenhut M 2012 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging *Bioconjugate chemistry* **23** 688–97
- [12]Martin P, Schmidt K, Reimold M, Bender B and Focke N K 2018 Multimodale Bildgebung *Z. Epileptol.* **31** 128–33
- [13]Pfluger T, La Fougère C, Stauss J, Santos R, Vollmar C and Hahn K 2004 Kombinierte Hybridsysteme (PET/CT, SPECT/CT) versus multimodale Bildgebung mit getrennten Systemen *Der Radiologe* **44** 1105–12
- [14]Ruiz J, Nouizi F, Cho J, Zheng J, Li Y, Chen J-H, Su M-Y and Gulsen G 2017 Breast density quantification using structured-light-based diffuse optical tomography simulations *Applied optics* **56** 7146–57
- [15]Lee D-E, Koo H, Sun I-C, Ryu J H, Kim K and Kwon I C 2012 Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis *Chemical Society reviews* **41** 2656–72
- [16]Vavadi H and Zhu Q 2016 Automated data selection method to improve robustness of diffuse optical tomography for breast cancer imaging *Biomedical optics express* **7** 4007–20
- [17]Boas D A 1997 A fundamental limitation of linearized algorithms for diffuse optical tomography *Optics express* **1** 404
- [18]Das B B, Yoo K M, Liu F, Cleary J, Prudente R, Celmer E and Alfano R R 1993 Spectral optical-density measurements of small particles and breast tissues *Applied optics* **32** 549–53
- [19]Hawrysz D J and Sevick-Muraca E M 2000 Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents *Neoplasia (New York, N.Y.)* **2** 388–417
- [20]Krause L, Bechrakis N E, Kreusel K-M, Servetopoulou F, Heinrich S and Foerster M H 2002 Indocyaningrün-Angiographie bei Aderhautmetastasen *Der Ophthalmologe* **99** 617–9

- [21]Holm C, Mayr M, Höfter E, Becker A, Pfeiffer U J and Mühlbauer W 2002 Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green *British Journal of Plastic Surgery* **55** 635–44
- [22]Braun F, Schalk R, Heintz A, Feike P, Firmowski S, Beuermann T, Methner F-J, Kränzlin B, Gretz N and Rädle M 2017 NADH-fluorescence scattering correction for absolute concentration determination in a liquid tissue phantom using a novel multispectral magnetic-resonance-imaging-compatible needle probe *Meas. Sci. Technol.* **28** 75903
- [23]Jacques S L 2013 Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review *Phys. Med. Biol.* **58** 5007–8
- [24]Pretze M, Hien A, Raedle M, Schirmacher R, Wängler C and Wängler B 2018 GRPR- and PSMA-specific ultra-small gold nanoparticles for characterization and diagnosis of prostate carcinoma via fluorescence imaging *Bioconjugate chemistry* 1525–33
- [25]Rao J, Dragulescu-Andrasi A and Yao H 2007 Fluorescence imaging in vivo: recent advances *Current opinion in biotechnology* **18** 17–25
- [26]Li M, Zhang Y and Bai J 2010 In Vivo Diffuse Optical Tomography and Fluorescence Molecular Tomography *Journal of Healthcare Engineering* **1** 477–507
- [27]Keijzer M, Jacques S L, Prahl S A and Welch A J 1989 Light distributions in artery tissue: Monte Carlo simulations for finite-diameter laser beams *Lasers Surg. Med.* **9** 148–54
- [28]Gurfinkel M, Ke S, Wen X, Li C and Sevick-Muraca E M 2003-2004 Near-infrared fluorescence optical imaging and tomography *Disease markers* **19** 107–21
- [29]Bigio I J and Mourant J R 1997 Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: Fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy *Phys. Med. Biol.* **42** 803–14
- [30]Choy G, Choyke P and Libutti S K 2003 Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research *Molecular imaging* **2** 303–12
- [31]Weiß D and Brandl H 2013 Fluoreszenzfarbstoffe in der Natur *Chemie in unserer Zeit* **47** 50–4

- [32]Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B and Semmler W 2000 Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: Synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization *Photochem Photobiol* **72** 392–8
- [33]Philip R, Penzkofer A, Bäuml W, Szeimies R M and Abels C 1996 Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **96** 137–48
- [34]Bashkatov A N, Genina E A, Kochubey V I and Tuchin V V 2005 Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38** 2543–55
- [35]Zaheer A, Lenkinski R E, Mahmood A, Jones A G, Cantley L C and Frangioni J V 2001 In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity *Nature biotechnology* **19** 1148–54
- [36]Volynskaya Z, Haka A S, Bechtel K L, Fitzmaurice M, Shenk R, Wang N, Nazemi J, Dasari R R and Feld M S 2008 Diagnosing breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy and intrinsic fluorescence spectroscopy *Journal of biomedical optics* **13** 24012
- [37]Licha K, Hessenius C, Becker A, Henklein P, Bauer M, Wisniewski S, Wiedenmann B and Semmler W 2001 Synthesis, characterization, and biological properties of cyanine-labeled somatostatin analogues as receptor-targeted fluorescent probes *Bioconjugate chemistry* **12** 44–50
- [38]Dössel O 2016 *Bildgebende Verfahren in der Medizin: Von der Technik zur medizinischen Anwendung (Lehrbuch)* 2nd edn (Berlin, Heidelberg: Springer Vieweg)
- [39]cbrown@sun10 Hydrophilic Cyanine Dyes as Contrast Agents for Near-infrared Tumor Imaging: Synthesis, Photophysical Properties and Spectroscopic In vivo Characterization ¶
- [40]Ballou B, Fisher G W, Waggoner A S, Farkas D L, Reiland J M, Jaffe R, Mujumdar R B, Mujumdar S R and Hakala T R 1995 Tumor labeling in vivo using cyanine-conjugated monoclonal antibodies *Cancer Immunol Immunother* **41** 257–63
- [41]Ogawa M, Regino C A S, Choyke P L and Kobayashi H 2009 In vivo target-specific activatable near-infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies *Molecular cancer therapeutics* **8** 232–9

- [42]Simpson N 2004 *Functional Imaging of Early Markers of Disease* Teil 2 (IOS Press)
- [43]Corlu A, Choe R, Durduran T, Rosen M A, Schweiger M, Arridge S R, Schnall M D and Yodh A G 2007 Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans *Optics express* **15** 6696
- [44]Gibson A P, Hebden J C and Arridge S R 2005 Recent advances in diffuse optical imaging *Phys. Med. Biol.* **50** R1-R43
- [45]Ntziachristos V, Bremer C and Weissleder R 2003 Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging *European radiology* **13** 195–208
- [46]Hien A *et al.* 2018 Noncontact recognition of fluorescently labeled objects in deep tissue via a novel optical light beam arrangement *PloS one* **13** e0208236
- [47]Imaging the body with diffuse optical tomography - IEEE Signal Processing Magazine
- [48]Kapadia C R, Cutruzzola F W, O'Brien K M, Stetz M L, Enriquez R and Deckelbaum L I 1990 Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa. Detection of adenomatous transformation *Gastroenterology* **99** 150–7
- [49]Schomacker K T, Frisoli J K, Compton C C, Flotte T J, Richter J M, Nishioka N S and Deutsch T F 1992 Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential *Lasers in surgery and medicine* **12** 63–78
- [50]Silveira L, Betiol Filho J A, Silveira F L, Zângaro R A and Pacheco M T T 2008 Laser-induced fluorescence at 488 nm excitation for detecting benign and malignant lesions in stomach mucosa *Journal of fluorescence* **18** 35–40
- [51]Ogata F, Narushima M, Mihara M, Azuma R, Morimoto Y and Koshima I 2007 Intraoperative lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling in lymphedema *Annals of plastic surgery* **59** 180–4
- [52]Sieron A, Sieron-Stoltny K, Kawczyk-Krupka A, Latos W, Kwiatek S, Straszak D and Bugaj A M 2013 The role of fluorescence diagnosis in clinical practice *OncoTargets and therapy* **6** 977–82
- [53]Dohrmann J, Lommatzsch A, Spital G and Pauleikhoff D 2001 Die Pathogenese der zentralserösen Chorioretinopathie *Der Ophthalmologe* **98** 1069–73

- [54]Jitsuo Usuda MD P *et al.* Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers
- [55]Stefan Andersson-Engelsdag, Claes af Klintebe, K. Svanbergdag, S. Svanbergdag In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics
- [56]Amoozegar C B, Wang T, Bouchard M B, McCaslin A F H, Blaner W S, Levenson R M and Hillman E M C 2012 Dynamic contrast-enhanced optical imaging of in vivo organ function *Journal of biomedical optics* **17** 96003-1
- [57]Becker A, Hessenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedenmann B and Grotzinger C 2001 Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands *Nature biotechnology* **19** 327–31
- [58]*Self-illuminating in vivo lymphatic imaging using a bioluminescence resonance energy transfer quantum dot nano-particle - Kosaka - 2010 - Contrast Media & Molecular Imaging - Wiley Online Library* <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmml.395/pdf> (accessed 31 Jan 2017)
- [59]Ntziachristos V, Tung C-H, Bremer C and Weissleder R 2002 Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo *Nature medicine* **8** 757–60
- [60]Hischemoller A *et al.* 2012 Labeling of anti-MUC-1 binding single chain Fv fragments to surface modified upconversion nanoparticles for an initial in vivo molecular imaging proof of principle approach *International journal of molecular sciences* **13** 4153–67
- [61]Frangioni J 2003 In vivo near-infrared fluorescence imaging *Current Opinion in Chemical Biology* **7** 626–34
- [62]Fujii M and Nakayama K 2009 Signal filtering algorithm for depth-selective diffuse optical topography *Physics in medicine and biology* **54** 1419–33
- [63]Sevick-Muraca E M, Houston J P and Gurfinkel M 2002 Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents *Current Opinion in Chemical Biology* **6** 642–50
- [64]Welsher K, Sherlock S P and Dai H 2011 Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 8943–8

- [65]Godavarty A, Eppstein M J, Zhang C, Theru S, Thompson A B, Gurfinkel M and Sevick-Muraca E M 2003 Fluorescence-enhanced optical imaging in large tissue volumes using a gain-modulated ICCD camera *Phys. Med. Biol.* **48** 1701–20
- [66]Pedrotti F L 2005 *Optik für Ingenieure: Grundlagen ; mit 28 Tabellen* 3rd edn
- [67]Preibisch S, Saalfeld S and Tomancak P 2009 Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions *Bioinformatics (Oxford, England)* **25** 1463–5
- [68]Schulz R B, Ripoll J and Ntziachristos V 2004 Experimental fluorescence tomography of tissues with noncontact measurements *IEEE transactions on medical imaging* **23** 492–500
- [69]National Center for Biotechnology Information (US) 2006 *1,1'-bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanine-5,5'-dicarboxylic acid diglucamide monosodium salt* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23226/> (accessed 27 Aug 2018)
- [70]Ogawa M, Kosaka N, Choyke P L and Kobayashi H 2009 In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green *Cancer research* **69** 1268–72
- [71]Schomacker K T, Frisoli J K, Compton C C, Flotte T J, Richter J M, Nishioka N S and Deutsch T F 1992 Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: Basic biology and diagnostic potential *Lasers Surg. Med.* **12** 63–78
- [72]Michael Schmidt 2016 *Lichtmessung: Labor Technische Physik, Hochschule Technik und Wirtschaft des Saarlandes*
- [73]Naumann H 2014 *Handbuch Bauelemente der Optik: Grundlagen, Werkstoffe, Geräte, Messtechnik* 7th edn (München, Wien: Hanser)
- [74]Foth H-J 2008 Maximal zulässige Bestrahlung durch Laserlicht *LTI* **5** 47–50
- [75]Egly D, Geörg D, Rädle M and Beuermann T 2012 A compact multi-channel fluorescence sensor with ambient light suppression *Meas. Sci. Technol.* **23** 35702
- [76]Mordon S, Devoisselle J M, Soulie-Begu S and Desmettre T 1998 Indocyanine green: Physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo *Microvascular research* **55** 146–52

- [77]DeBerardinis R J and Chandel N S 2016 Fundamentals of cancer metabolism *Science advances* **2** e1600200
- [78]Klug K I 2009 *Charakterisierung des Zellmetabolismus bei Fermentationen und biomedizinischen Anwendungen mit Hilfe eines miniaturisierten faseroptischen Fluoreszenzmessaufbaus*
- [79]Reynolds J S, Troy T L, Mayer R H, Thompson A B, Waters D J, Cornell K K, Snyder P W and Sevick-Muraca E M 1999 Imaging of Spontaneous Canine Mammary Tumors Using Fluorescent Contrast Agents *Photochem Photobiol* **70** 87–94
- [80]Pogue B, Testorf M, McBride T, Osterberg U and Paulsen K 1997 Instrumentation and design of a frequency-domain diffuse optical tomography imager for breast cancer detection *Optics express* **1** 391
- [81]Zhu B and Godavarty A 2016 Near-Infrared Fluorescence-Enhanced Optical Tomography *BioMed research international* **2016** 5040814
- [82]Fischer T, Ebert B, Voigt J, Macdonald R, Schneider U, Thomas A, Hamm B and Hermann K-G A 2010 Detection of rheumatoid arthritis using non-specific contrast enhanced fluorescence imaging *Academic radiology* **17** 375–81

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Andreas Hien

Geboren: 11. Dezember 1984, in Speyer

Nationalität: deutsch

Ausbildung

04.2012 – 11.2013 Studium der Automatisierungs- und Energiesysteme
Hochschule Mannheim
Abschluss: Master of Science

09.2006 – 02.2012 Studium der Automatisierungstechnik
Hochschule Mannheim
Abschluss: Bachelor of Science

08.2005 – 07.2006 Fachhochschulreife
Johann-Joachim-Becher-Schule, Speyer

08.2001 – 02.2005 Ausbildung zum Elektroinstallateur
Firma Heiss Elektrotechnik, Speyer

Berufliche Erfahrungen

Seit 01.2014 Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme,
Hochschule Mannheim
Tätigkeitsfeld: Optische Messtechnik / Entwicklung Elektronik

09.2010 – 11.2010 Praktische Studienarbeit im Institut für Leistungselektronik und
Antriebstechnik, *Hochschule Mannheim*

- 09.2009 – 02.2010 Praxisphase bei der Firma SEW-EURODRIVE Bruchsal
Abteilung: Entwicklung Elektronik innerhalb des Fachkreises
„Signalelektronik und Sensorik“
- 02.2005 – 07.2005 Tätigkeit bei der Firma SEW-EURODRIVE Bruchsal
Abteilung: Entwicklung Elektronik innerhalb der Gruppe „Zentrale
Dienstleistungen“

Veröffentlichungen

A customized multispectral needle probe combined with a virtual photometric setup for in vivo detection of Lewis lung carcinoma in an animal model Braun Frank; Schalk Robert; Nachtmann Marcel; Hien Andreas; Frank Rudolf; Beuermann Thomas; Methner Frank-Jürgen; Kränzlin Bettina; Rädle Matthias; Gretz, Norbert; (2019) In *Measurement Science and Technology*, Article reference: MST-108415 (under Review)

Noncontact recognition of fluorescently labeled objects in deep tissue via a novel optical light beam arrangement. Hien Andreas; Pretze Marc; Braun Frank; Schäfer Edgar; Kümmel Tim; Roscher Mareike; Daniel Schock-Kusch; Jens Waldeck; Bernhard Müller; Carmen Wängler, Matthias Rädle, Björn Wängler (2018): In *PloS one* 13 (12), e0208236. DOI: 10.1371/journal.pone.0208236.

Nahinfrarot-Bildanalyse als Werkzeug zur Verfolgung verfahrenstechnischer Vorgänge. Kübel-Heising Felix; Kunkel Sven; Medina Isabel; Hien Andreas; Schmitt Lukas; Scholl Stephan; Repke Jens-Uwe; Rädle Matthias. (2018a) In *Chemie Ingenieur Technik* 90 (6), pp. 842–851. DOI: 10.1002/cite.201700123.

GRPR- and PSMA-specific ultra-small gold nanoparticles for characterization and diagnosis of prostate carcinoma via fluorescence imaging. Pretze Marc; Hien Andreas; Raedle, Matthias; Schirmmacher Ralf; Wängler Carmen; Wängler Björn (2018) In *Bioconjugate chemistry*, pp. 1525–1533. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00067.

Near-Infrared Image Analysis as Tool for Monitoring Process Activities. Kübel-Heising Felix; Kunkel Sven; Medina Isabel; Hien Andreas; Schmitt Lukas; Scholl Stephan; Repke Jens-Uwe; Rädle Matthias. (2018b) In *ChemBioEng Reviews* 5 (5), pp. 334–342. DOI: 10.1002/cben.201800013.

Discrete element method (DEM) simulation and validation of a screw feeder system. Kretz Dominik; Callau-Monje Simon; Hitschler Michael; Hien Andreas; Rädle Matthias; Hesser Jürgen. (2016): In *Powder Technology* 287, pp. 131–138. DOI: 10.1016/j.powtec.2015.09.038.

Konferenzbeiträge

Bildgebendes System zur nichtinvasiven optischen Untersuchung von Gewebe in der Tiefe

Ahlers, Rolf; Braun, Frank; Hien, Andreas; Rädle, Matthias (2018) on 3/6/2018. App. no. 102018105067. Patent no. DE102018105067A1.

Bestimmung der lokalen Fettverteilung in tierischem Gewebe mit Hilfe einer Raman-

Scanning-Technologie; Heintz, Annabel; Braun, Frank; Hien, Andreas; Kümmel, Tim; Riecker, Nico; Medina, Malineth et al. (2018): Proof of Concept; ProcessNet - Jahrestreffen der Fachgruppe Lebensmittelverfahrenstechnik. Berlin, 3/5/2018.

Efficient modification of GRPR-specific gold nanoparticles for fluorescence imaging of prostate carcinoma

Marc, Pretze, Andreas, Hien, Mareike, Roscher, Karsten, Richter, Matthias, Rädle, Carmen, Wängler, Björn, Wängler; Poster Präsentation (2017). In *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 60 Suppl 1, pp. 111–640. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3508>

Efficient modification of PSMA-specific gold nanoparticles for fluorescence imaging of prostate carcinoma

Pretze, Marc, Hien, Andreas, Rädle, Matthias, Wängler, Carmen, Wängler, Björn (2017) 12th European Molecular Imaging Meeting; http://esmi-insight.eu/emim2017/contxt/programme/default_session.asp?node=34&day=&sessionID=39&bySearch=true&search=pretze#447

MRT-kompatible multispektrale Analysennadel zur in-vivo Point-of-Care Gewebediagnostik; Braun, Frank; Schalk, Robert; Hien, Andreas; Frank, R.; Scholl, Stephan; Beuermann, Thomas et al. (2017) ANAKON 2017. Tübingen, 4/3/2017.

Fast Raman measurements for liquid film observations in chemical process optimization;

Deuerling, Julian; Braun, Frank; Kapoustina, Viktoria; Hien, Andreas; Nachtmann, Marcel; Beuermann, Thomas; Rädle, Matthias (2017) In DECHEMA e.V. (Ed.): EuroPACT 2017. 4rd

European Conference on Process Analytics and Control Technology. EuroPACT. Potsdam, 10.-12.05.2017. Frankfurt am Main, p. 56.

Untersuchung von lokalen Konzentrationsprofilen in bewegten Fluidfilmen mittels Raman-Spektroskopie; Deuerling, Julian; Schmitt, Lukas; Braun, Frank; Kapoustina, Viktoria; Hien, Andreas; Nguyen, Anh et al. (2017): ProcessNet - Jahrestreffen Fachgruppe Fluidverfahrenstechnik. Köln, 3/10/2017.

Analysis of local concentration profiles in dynamic fluid films using Raman spectroscopy, Deuerling, Julian; Schmitt, Lukas; Braun, Frank; Kapoustina, Viktoria; Hien, Andreas; Nguyen, Anh et al. (2017) EuroPACT 2017. EuroPACT 2017. Potsdam, 5/11/2017.

Fluoreszenztomographie zur Verstärkung von Weichteilkontrasten als Unterstützung Molekularer bildgebender Verfahren; Hien, Andreas; Braun, Frank; Nachtmann, Marcel; Schalk, Robert; Wängler, Björn; Rädle, Matthias (2017) ANAKON 2017. Tübingen, 4/3/2017.

Basisuntersuchungen zur Verwendung eines Raman-Photometers zur Überwachung chemischer Prozesse; Nachtmann, Marcel; Braun, Frank; Hien, Andreas; Herdt, Deborah; Schalk, Robert; Beuermann, Thomas et al. (2017); ANAKON 2017. Tübingen, 4/3/2017.

Anbindung eines Embedded Raman-Photometers in die Industrie 4.0; Nachtmann, Marcel; Braun, Frank; Keck, Shaun; Hien, Andreas; Eckhardt, H.-S.; Mattolat, C. et al. (2017); 13. Herbstkolloquium des Arbeitskreises Prozessanalytik. Esslingen, 11/22/2017.

Kompakter Mittelinfrarot-Sensor zur Inline-Überwachung von chemischen und biotechnologischen Prozessen; Schalk, Robert; Braun, Frank; Nachtmann, Marcel; Hien, Andreas; Keck, Shaun; Scholl, Stephan et al. (2017) ANAKON 2017. Tübingen, 4/3/2017.

Entwicklung eines neuartigen Simulatorsystems für die minimalinvasive Implantation von Herzklappen; Hien, Andreas; Hitschler, Michael; Teumer, Tobias; Kornmesser, Ulrike; Höfer, Kathrin; Rädle, Matthias (2016) Innovationstag Mittelstand des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie. Berlin, 6/2/2016.

Anwendungspotenzial der Nah-Infrarot-Bildanalyse in der Fluidverfahrenstechnik; Kübel-Heising, Felix; Kunkel, Sven; Geörg, Daniel; Hien, Andreas; Medina, Isabel; Scholl, S. et al. (2016) ProcessNet - Jahrestreffen der Fachgruppe FVT. Garmisch-Partenkirchen, 3/17/2016.

Optische Tomographie zur Verstärkung von Weichteilkontrasten als Unterstützung multimodaler bildgebender Verfahren; Hien, Andreas; Wängler, Björn; Kapoustina, Viktoria; Rädle, Matthias (2015): M²OLIE Project: M²oBiTE. 2nd Image Guided Interventions Conference. Mannheim, 2015.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in Kooperation des Fachbereichs Molekulare Bildgebung und Radiochemie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg und dem Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme der Hochschule Mannheim im Zeitraum von August 2014 bis September 2018.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Björn Wängler für die Vergabe des Themas, die Betreuung über den gesamten Zeitraum und die konstruktiven Diskussionen in zahlreichen Projekttreffen. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Rädle für das entgegengebrachte Vertrauen, die stets hilfreichen Vorschläge und die intensive Unterstützung bedanken.

Meinen Kollegen vom Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima im Institut. Die hohe Hilfsbereitschaft in fachlichen Belangen wie auch der Umgang im privaten gab mir das nötige Umfeld für die lange und angenehme Zusammenarbeit. Besonders erwähnen möchte ich: Viktoria Kapoustina, Frank Braun, Patrick Dörnhofer, Andreas Ziegler, Shaun Keck, Daniel Schock-Kusch, Annabell Heintz, Sebastian Sonnack und Edgar Schäfer.

Den Mitarbeitern der Fachbereiche Molekulare Bildgebung & Radiochemie und Biomedizinische Chemie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg im besonderen Marc Pretze, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Weiterhin gilt den Beschäftigten des Bruker Preclinical Imaging Reference Centers Mannheim, die an der Durchführung der Experimente beteiligt waren, ebenso mein Dank.

Ich danke meinen Eltern und Tatjana Zenker, die mich während all meinen Vorhaben immer unterstützt haben.