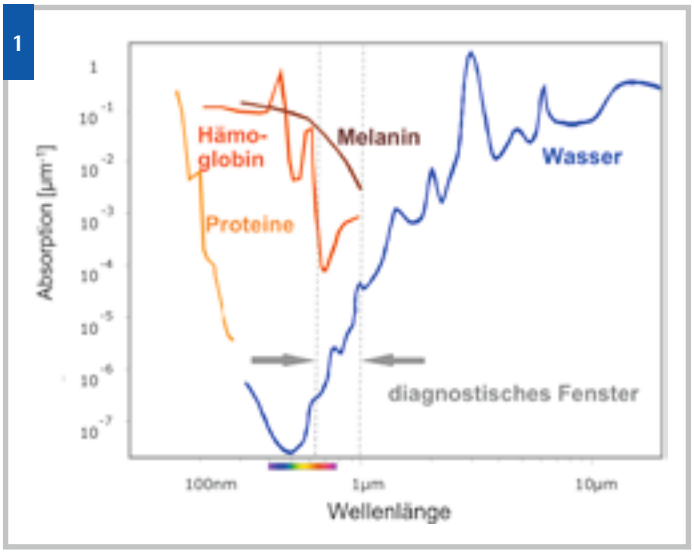
Bilder aus Licht

OPTISCHE BILDGEBUNG IN DER BIOMEDIZINISCHEN TECHNIK

Mikroskopische Bilder sind unverzichtbar für die Interpretation von Gewebe- und Zellreaktionen in der biomedizinischen Technik. Gemeinsam mit Wissenschaftlern aus Aachen und Rostock arbeiten Forscher des Instituts für Quantenoptik am Einsatz von Mikro- und Nanosystemen in der Medizin. Innerhalb des Querschnittsprojekts »Zelluläre Lasermikroskopie« werden verschiedene Ansätze zur hochauflösenden lasergestützten Bildgebung untersucht.

1



Eine Arbeitsgruppe am Laser Zentrum Hannover forscht gemeinsam mit dem Institut für Quantenoptik an den Möglichkeiten zur optischen Bildgebung auf verschiedenen Skalen. Im Transregio 37 werden zusammen mit Kollegen der Universität Rostock mögliche Bildgebungsmethoden auf zellulärer Ebene untersucht. Auch innerhalb des Exzellenzclusters REBIRTH sind Anwendungen für eine optische Bildgebung, insbesondere mit zellulärer Auflösung, gefragt, die in der AG Cell Surgery innerhalb des Clusters mit der Möglichkeit zur Lasermanipulation verknüpft werden.

Limitierende Faktoren bei der Nutzung von optischen Wellenlängen (im Bereich von 400 bis 1000 Nanometern) zur Darstellung und Analyse von biologischen Proben sind Absorption und Streuung. Abbildung 1 stellt die Eindringtiefe beziehungsweise die Absorption von verschiedenen Gewebebestandteilen in Abhängigkeit der Wellenlänge des Lichts dar. Im Infraroten und im UV-Bereich dominiert die Wasserabsorption und beschränkt die Eindringtiefe von Licht auf wenige Mikrometer. In dem sichtbaren Spektralbereich weist Wasser zwar kaum Absorption auf, jedoch absorbieren hier Blut oder Gewebebestandteile wie Melanin. Die Streuung im Gewebe nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab. Um demzufolge die höchste Eindringtiefe zu erreichen, eignen sich insbesondere nahinfrarote Wellenlängen, im Bereich von 600 bis 1000 Nanometer, da die Streuung deutlich reduziert und die Absorption von Wasser und den anderen Absorbern vergleichsweise gering ist. Strahlung dieses Spektralbereichs erreicht Eindringtiefen von 1 bis 2 Millimeter im Gewebe, weshalb dieser Bereich auch als diagnostisches Fenster bezeichnet wird.

Am Laser Zentrum Hannover wird diese Strahlung einerseits auf mikroskopischer Ebene angewandt, andererseits, um mittels interferometrischer Aufnahmen Übersichtsbilder und Schnittbilder von Gewebe zu erhalten.

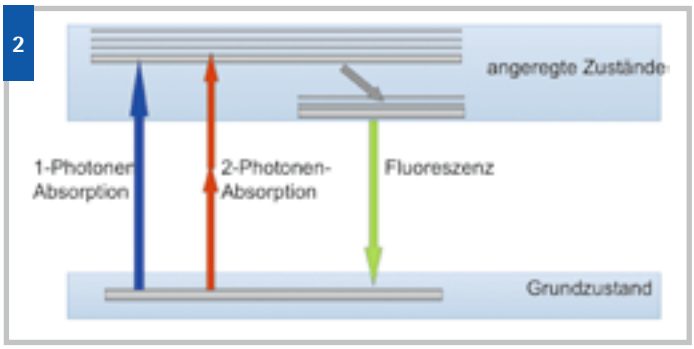
Der Einsatz von Lasern in der Mikroskopie erlaubt die sehr präzise Fokussierung des Lichtes auf einen beugungsbegrenzten Fleck. In diesem Bereich können dann Farbstoffe gezielt angeregt werden, um über Fluoreszenz bestimmte Strukturen oder Zellen im Gewebe sichtbar zu machen. Für einen Einblick auch in tiefer liegenden Gewebeschichten, bietet sich als Laser ein Titan-Saphir-Laser an, da er zwischen 600 und 1000 Nanometer Laserlicht emittieren kann. Eine effiziente Anregung von herkömmlichen Farbstoffen ist dann jedoch nicht ohne weiteres möglich, da die meisten kommerziellen Farbstoffe eine hohe Absorption nur im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Wird ein Photon absorbiert, siehe Abbildung 2, regt es das Farbstoffmolekül

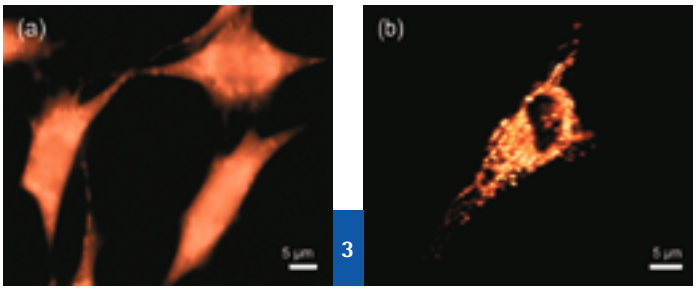
an, welches im Folgenden eine gewisse Energie strahlungslos abgibt und dann fluoresziert und somit wieder in den Grundzustand relaxiert. Durch Verwendung von ultrakurzen Laserpulsen lassen sich zwei Photonen des Laserlichts synchron verwenden, um ein Farbstoffmolekül anzuregen. Zwei Lichtteilchen müssen so die Arbeit von einem übernehmen, da die Energie des längerwelligen Lichtes entsprechend geringer ist, siehe Abbildung 2. Normalerweise ist die Wahrscheinlichkeit, einen solchen Vorgang zu erreichen, verschwindend gering: Das Farbstoffmolekül Rhodamin macht beispielsweise im hellen Sonnenlicht der Mittagssonne einen linearen Absorptions- und Fluoreszenzvorgang pro Sekunde durch. Ein entsprechender Zwei-Photonenprozess würde hingegen nur einmal innerhalb von 10 Millionen Jahren stattfinden.

Um diese so genannten nichtlinearen Prozesse der Zwei-Photonenanregung trotzdem nutzen zu können, werden sehr kurze Laserpulse im Bereich von etwa hundert Femtosekunden (0,0000000000001 Sekunden) verwendet. Steckt man ein Quäntchen Energie in diese kurzen Pulse, so wird die Spitzenleistung (= Energie pro Zeit) enorm groß. Dies führt dazu, dass die eigentlich unwahrscheinlicheren Zwei-Photonenprozesse dominant werden und so eine Fluoreszenzbildgebung innerhalb von Sekundenbruchteilen ermöglichen.

Im Rahmen dieser Zwei-Photonen-Laser-Mikroskopie werden ultrakurze Laserpulse durch die zu untersuchende Probe gescannt und gestatten eine hochauflösende dreidimensionale Mikroskopie auf zellulärer Ebene. In Abbildung 3 sind einzelne lebende Zellen dargestellt, deren Mitochondrien mittels *Mitotracker Orange* angefärbt wurden. Die linke Seite zeigt die Aufnahme einzelner Rattenzellen (Granulosa) über herkömmliche Fluoreszenz-Mikroskopie, Abbildung 3a. Die Zellen sind deutlich zu erkennen; da das Licht vom Farbstoff jedoch aus verschiedenen Tiefen der Zellen sich überlagert, können subzelluläre Strukturen der Zellen nicht ausgemacht werden. Bei Nutzung der Zwei-Photonen-Mikroskopie lässt sich die Absorption der Farbstoffe auf den oben genannten kleinen Fleck begrenzen, so dass selbst subzelluläre Bestandteile erfasst werden können, ohne dass störende Effekte das Signal überlagern. Abbildung 3b zeigt eine 3D-Rekonstruktion der gleichen Zellen.

Innerhalb des Forschungsprojektes Transregio 37 werden unter anderem künstliche Gewebestrukturen geschaffen, auf denen anschließend verschiedene Zelltypen angesiedelt werden, um im Rahmen des Tissue Engineerings künstliche Gewebe herstellen zu können. Die Abbildungen 4a und 4b zeigen laser-mikroskopische Aufnahmen von nativen arteriellen Gewebeproben (a) und Gewebe-Konstrukten (b), die mittels Tissue Engineering Techniken hergestellt wurden (Kooperation AG Wilhelmi, MH Hannover, AG Chichkov, LUH/LZH). Die laser-mikroskopisch erfassten Gewebestrukturen der nativen





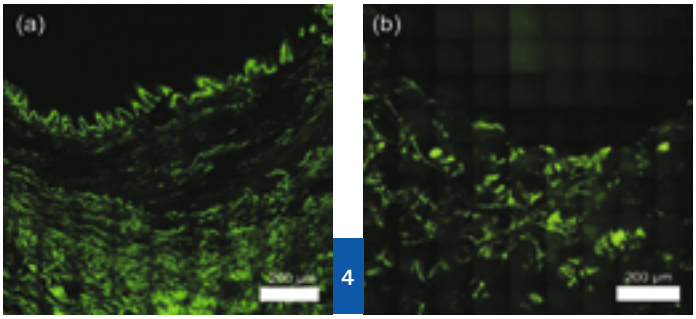


Abbildung 1
Absorption von Licht im Bereich von 200 Nanometer bis zu 10 Mikrometer in biologischem Gewebe. Dargestellt sind die Hauptbestandteile von biologischem Gewebe. Die höchste Eindringtiefe beziehungsweise die geringste Absorption ergibt sich im so genannten diagnostischen Fenster, zwischen 600 und 1000 Nanometer. • *Quelle: G. M. Hale, M. R. Querry, Optical constants of water in the 200 nm to 200 m wavelength region, Appl. Opt., 12, 555, 1973*

Abbildung 2
Energiediagramm, welches die Ein-Photonen- und Zwei-Photonenabsorption an einem Fluoreszenzmolekül beschreibt. Bei entsprechend hohen Laserintensitäten können zwei Photonen anstelle von einem ein Molekül in einen angeregten Zustand anheben, um Fluoreszenz zu erzeugen. • *Quelle: LZH*

Abbildung 3
Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Granulosa-Zellen der Ratte in Zellkultur (Anfärbung der Mitochondrien mittels Mitotracker Orange). In der herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskopie überlagert sich die Fluoreszenzstrahlung aus verschiedenen Tiefen und reduziert so die Auflösung (a). Durch Zwei-Photonenabsorption wird die Fluoreszenz nur in einem sehr kleinen Volumen angeregt, selbst subzelluläre Bestandteile werden so sichtbar (b). • *Quelle: LZH*

Abbildung 4
Zwei-Photonenaufnahme von nativen Arterienwänden. Gut sichtbar sind die kollagenhaltigen Strukturen in der Gefäßwand, sowie die Epithelzellschichten an der Innenwand der Arterie (a). Im Rahmen des Tissue Engineerings werden Trägerstrukturen zur Zellbesiedlung erstellt, die die nativen Gewebe möglichst gut imitieren und eine Zellbesiedlung erlauben (b). Über laser-mikroskopische Techniken lassen sich sowohl die nativen Proben als auch die hybriden, besiedelten Konstrukte analysieren. • *Kooperation AG Wilhelmi, MHH, AG Chichkov LUH/LZH* • *Quelle: LZH*

Arterien dienen hierbei als Vorlage für die nachfolgend erstellten Trägerstrukturen, die anschließend mit Zellen besiedelt werden und so einen hybriden Gefäßersatz bilden. In den beiden gezeigten Mikroskop-Bildern erkennt man, dass die jeweiligen Aufnahmen aus aneinander gesetzten hochauflösenden Bildern bestehen, so genanntes Mosaicing, um relativ großflächige Übersichtsaufnahmen zu erhalten.

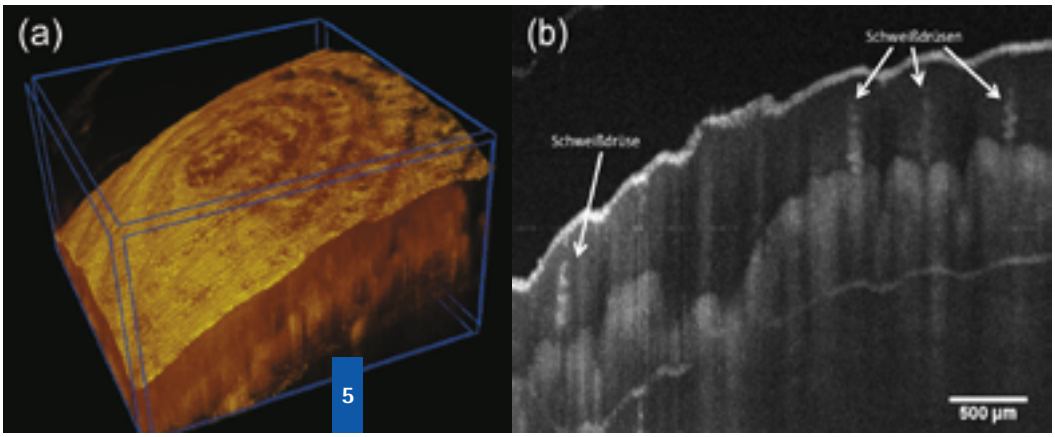
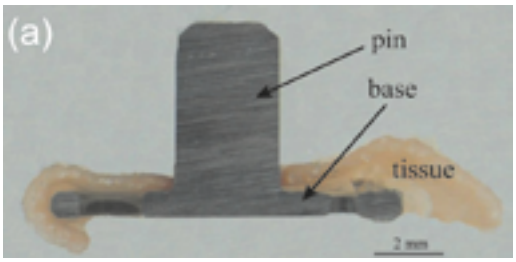


Abbildung 5
Optische Kohärenz Tomographie (OCT) einer Fingerkuppe. Gut erkennbar ist die Oberflächenstruktur des Fingerabdrucks (a). Tiefenscan aus der gleichen Aufnahme (b); gut sichtbar sind einzelne Schweißdrüsen, die bis zur Oberfläche der Haut reichen. • *Quelle: LZH*

Da die Lichtgeschwindigkeit jedoch bedeutend höher als die der im Echolot verwendeten Schallwellen ist, wird in der OCT ein ausgeklügeltes interferometrisches Messverfahren angewandt. Im Wesentlichen wird das Licht vor dem Einstrahlen ins Gewebe in zwei Teile aufgeteilt, ein Lichtstrahl durchläuft einen Referenzarm, der Messstrahl wird in die Probe fokussiert. Das aus der Probe zurückgestreute Licht wird anschließend mit dem Licht aus dem Referenzarm überlagert.



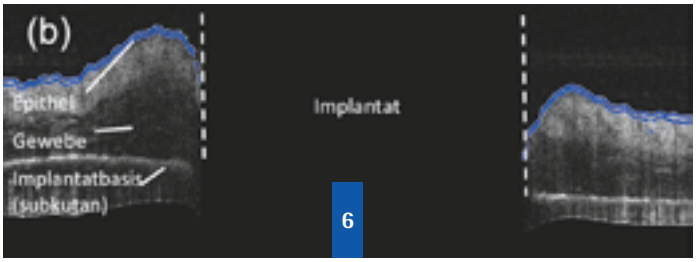


Abbildung 6
Bewertung perkutaner Implantate mittels herkömmlicher Hartschnitthistologie-Technik (a) und über optische Methoden (b), die eine dreidimensionale Tiefenbildgebung in-vivo erlauben. • *Kooperation AG Witte, CrossBIT* • *Quelle: PD Dr. Frank Witte, Annastift Hannover / CrossBit Institut (a); LZH (b)*

Um noch größere Strukturen oder Proben erfassen zu können, lässt sich eine weitere optische Technik nutzen, in der Licht ähnlich eines Echolot-Verfahrens genutzt wird: In der optischen Kohärenz-Tomographie (engl.: *optical coherence tomography*, kurz OCT) wird Licht in die Probe gestrahlt und das reflektierte Licht detektiert. Um rückschließen zu können, aus welcher Tiefe das detektierte Signal stammt, könnte man die Laufzeit des Lichts messen und wie im Echolot so die Tiefe errechnen.

Am Computer lassen sich dann Tiefenschnittbilder aus dem Gewebe erstellen, die einerseits eine genaue Vermessung der Probenoberfläche, anderseits eine Darstellung von den Gewebeschichten in der Tiefe erlauben. Abbildung 5 gibt die Aufnahmen einer Fingerkuppe mittels der OCT-Technik wieder. Gut ist die Struktur und Oberfläche des Fingerabdrucks zu erkennen, Abbildung 5a, im Schnittbild sind jedoch auch tiefer liegende Hautschichten sowie einzelne Schweißdrüsen sichtbar, Abbildung 5b.

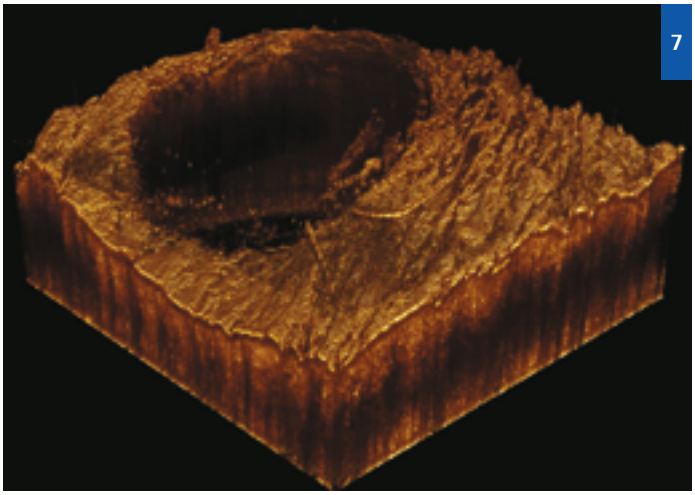
Ein Problemfeld, in dem es um Erfassung der Oberfläche bei gleichzeitiger Analyse der Schichtstruktur des Gewebes geht, stellt die Implantologie dar. So genannte perkutane Implantate stellen eine feste Verbindung von Prothesen durch die äußeren Hautschichten mit knöchernen Strukturen her. Eine Anwendung stellen beispielsweise Unterschenkelprothesen dar, die mit den Oberschenkelknochen fest verbunden werden können. Im Gegensatz zu anschnallbaren Prothesen weisen diese keine Probleme mit einem Verrutschen oder möglichen Druckstellen am Stumpf auf. Jedoch stellt bei perkutanen Implanta-

ten die Grenzfläche zwischen Implantat und Haut eine ideale Angriffsfläche für Infektionen dar. Die Unterdrückung dieser Infektionen durch Beschichten und Strukturieren der Implantatoberfläche ist ein Forschungsschwerpunkt des Verbundinstituts CrossBIT. Um die Gewebereaktion an den genannten perkutanen Implantaten zu vermessen, wird herkömmlicherweise ein Gewebeschnitt der Haut am Implantat angefertigt, siehe Abbildung 6a. Der Nachteil dieser Methode ist augenscheinlich: Man erhält lediglich ein zweidimensionales Schnittbild der am Implantat angrenzenden Hautschichten zu einem festen Zeitpunkt. Eine Nachverfolgung der Gewebereaktion über verschiedene Zeitpunkte an einer lebenden Probe kann nur durch optische Verfahren erfolgen. In Abbildung 6b ist eine Schnittbildaufnahme gezeigt, die mittels OCT aufgenommen wurde. Sehr gut lassen sich verschiedene Gewebestrukturen erfassen, auch die Implantatbasis ist im OCT-Bild erkennbar.

Prof. Dr. Alexander Heisterkamp
Jahrgang 1972, ist Professor für Biophotonik am Institut für Quantenoptik der Leibniz Universität Hannover. Er forscht in seinen Laboren am Laser Zentrum Hannover und dem CrossBIT Institut an dem Einsatz von optischen Technologien in der regenerativen Medizin und der Biomedizintechnik. Kontakt: a.heisterkamp@lzh.de

Dr. Alexander Krüger
Jahrgang 1970, ist Mitarbeiter am Laser Zentrum Hannover. Sein Hauptarbeitsgebiet sind die hochauflösende Mikroskopie und die OCT. Kontakt: a.krueger@lzh.de

Dipl.-Ing. (FH) Sabine Donner
Jahrgang 1986, führt ihre Doktorarbeit am Laser Zentrum Hannover im Bereich der Zwei-Photonen-Mikroskopie durch. Kontakt: s.donner@lzh.de



7

Abbildung 7
Dreidimensionale Darstellung der Grenze zwischen Implantat und Haut (haarlose Maus). Das Implantat selbst gibt in der optischen Bildgebung kein Signal und ist daher nicht sichtbar. Gut ist die Oberflächenstruktur erkennbar, an den Rändern wird sichtbar, dass die OCT-Bildgebung auch Bilder aus den obersten Hautschichten liefert. • *Kooperation AG Witte, CrossBIT* • *Quelle: LZH*

Abbildung 7 zeigt eine 3D-Darstellung des Gebietes um ein perkutanes Implantat, welches einer Nacktmaus eingesetzt wurde. Das Implantat selbst ergibt im OCT-Bild kein Signal und wird daher nicht dargestellt. Sehr genau lassen sich nun die möglichen Einwachsungen oder Schwellungen des Gewebes erfassen und elektronisch auswerten. Insbesondere können tiefer liegende Schichten der Haut erfasst und vermessen werden. Eine genauere Auswertung der Gewebereaktion wird so ermöglicht, die es gleichzeitig erlaubt, die Anzahl der Versuchstiere für entsprechende Versuche deutlich zu reduzieren.

In zukünftigen Studien sollen diese Techniken kombiniert und durch weitere Bildgebungsmodi ergänzt werden, um die hochauflösende Bildgebung der Lasermikroskopie in einem breiten Gebiet, sowohl in der Charakterisierung von Biomaterialien als auch der Bewertung von Implantaten zu etablieren.