

Redaktion

M. Löning, Lübeck
 P. Hillemanns, Hannover
 D. Wallwiener, Tübingen
 K. Diedrich, Lübeck

G. Hüttmann¹ · M. Löning²

¹ Institut für Biomedizinische Optik, Universität zu Lübeck

² Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum
 Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Der Weg in die Zukunft: In-vivo-Pathologie durch Laserscan-Mikroskopie

In der bildgebenden klinischen Diagnostik hat es in den letzten Jahren große Fortschritte gegeben. Ultraschall, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Verfahren der Nuklearmedizin ermöglichen eine Diagnostik benigner und maligner Gewebeeränderungen mit einer Auflösung im Zentimeter- bis Millimeterbereich. Trotzdem ist der operativ tätige Arzt bei der endoskopischen oder intraoperativen Gewebebeurteilung im Wesentlichen immer noch auf sein geschultes Auge und die zeitaufwändige histologische Bewertung von Gewebeproben durch den Pathologen angewiesen [8]. Gleichzeitig werden wissenschaftlicher Fortschritt und ökonomische Rahmenbedingungen die Diagnostik und Therapie verändern. Zum Beispiel werden Ärzte im Bereich der Tumorerkrankungen durch verbesserte Screeningverfahren und Fortschritte bei minimal-invasiven Verfahren mit einer steigenden Anzahl von Tumorvor- und -frühstadien konfrontiert werden. Diese sollten am schonendsten und ökonomischsten in einer Sitzung diagnostiziert und therapiert werden. Neue Fluoreszenzverfahren helfen zwar heute schon, Proben gezielter zu entnehmen, aber die prinzipiellen Nachteile von Biopsien und deren histologischer Befundung bleiben. Optische Methoden mögen hier in Zukunft eine bessere interoperative Diagnostik ermöglichen.

Die histologische Diagnose beruht im Wesentlichen auf morphologischen Kriterien, die durch eine Anfärbung der ver-

schiedenen Gewebestandteile (Zellkern, Zytoplasma, Bindegewebe) sichtbar gemacht werden. Eine intraoperative Visualisierung von Zellstrukturen könnte im Prinzip intraoperative Diagnostik mit der Therapie zu einer Einheit verbinden.

■ **Neben dem Zeitgewinn ist auch eine Verbesserung der Intervention durch exakte Darstellung der Ränder der pathogenen Veränderungen zu erwarten.**

Voraussetzungen für eine *intraoperative Pathologie* sind, wie bei der Histologie, die Erzeugung von Schnittbildern aus dem Inneren des Gewebes mit ausreichender Auflösung und Kontrastierung. Dies können die klassischen bildgebenden Verfahren Ultraschall, MRT und CT mit einem für die breite Anwendung vertretbaren Aufwand nicht leisten. Obwohl Gewebe auf Grund starker Streuung und Absorption weitgehend intransparent für Licht ist, können spezielle Verfahren eine Bildgebung mit subzellulärer Auflösung in Tiefen von 100–200 µm ermöglichen. Diese ist ausreichend zur Beurteilung vieler epithelialer Veränderungen. Integriert in Sonden, die ins Gewebe gestochen werden, sind sogar tiefere Areale zugänglich.

Technische Realisierungen der In-vivo-Mikroskopie

Da eine Abbildung dreidimensionaler Gewebestrukturen erfolgen soll, muss sicher-

gestellt werden, dass nur die Bildinformation aus einer Tiefenebene dargestellt wird und dass das Abbildungsverfahren unscharfe Bilder aus darüber und darunter liegenden Ebenen sowie das im Gewebe gestreute Licht ausgeblendet. Verschiedene optische Verfahren wurden bisher für eine mikroskopische Bildgebung *in vivo* realisiert und an Haut, Auge und endoskopisch zugänglichen Geweben klinisch erprobt. Alle Verfahren tasten das Gewebe mit einem stark fokussierten Laserstrahl in variabler Tiefe ab, um eine Darstellung subzellulärer Strukturen mit hoher Auflösung zu ermöglichen [4].

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie benutzt eine spezielle Blende vor dem Detektor, die so eingerichtet ist, dass sie nur Strahlung, die aus dem Fokusvolumen stammt, passieren lässt (■ **Abb. 1**). Sie ermöglicht Echtzeitdarstellung von Schnittbildern parallel zur Gewebeoberfläche. Der Kontrast wird durch Variation der Brechzahl der unterschiedlichen zellulären Strukturen erzeugt. Das Zytoplasma erscheint hell und körnig, die Kerne und Zellumrisse dunkel. Besonders starke Signale werden von Melanosomen erzeugt, die eine wesentlich größere Brechzahl als das umgebende Gewebe besitzen. Es kann auch eine Kontrastierung durch exogene Farbstoffe, wie Fluoreszein, Acriflavin, Tetracycline oder Kresolviolett erfolgen, die topisch aufgetragen bzw. ins Gewebe unterspritzt werden. In diesem Fall wird nicht das an den Zellen reflektierte Licht, sondern die Fluoreszenz der Farbstoffe dargestellt, die eine sehr kontrastreiche

Abbildung des Gewebes liefert. Die konfokale Mikroskopie ist wie die klassische Histologie nur in der Lage, morphologische Informationen darzustellen.

➤ **Mit der Zweiphotonenmikroskopie lassen sich Schnittbilder des Gewebes erzeugen**

Mit moderner Lasertechnik kann auch die Gewebeeigenfluoreszenz, die zusätzliche funktionelle oder molekulare Information enthält, bildgebend dargestellt werden. Extrem kurze Laserpulse erlauben es, die Dichte der Photonen im Gewebe so stark gegenüber einer kontinuierlichen Laserbestrahlung zu erhöhen, dass bei Fokussierung auf weniger als einen Mikrometer 2 Photonen aus vergleichsweise gewebstransparenten Wellenlängenbereich zwischen 700 und 800 nm eine Gewebeeigenfluoreszenz auslösen. Da die hierfür notwendigen Photonendichten nur im Laserfokus herrschen, schafft die Zweiphotonenmikroskopie in einfacher Weise die Möglichkeit, Schnittbilder des Gewebes zu erzeugen [3].

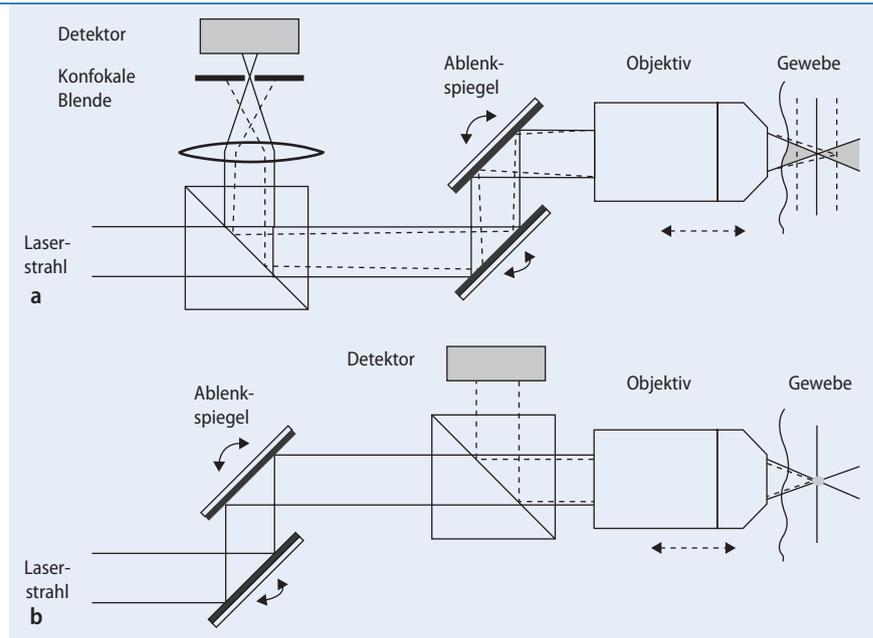


Abb. 1 ▲ Laserscan-Mikroskopie. **a** Die konfokale Mikroskopie nutzt die konfokale Blende vor dem Detektor zur Beschränkung der Bildgebung auf eine Ebene. **b** Bei der Zweiphotonenmikroskopie erzeugen extrem kurze Pulse nur im Laserfokus, der das Gewebe schichtweise abtastet, eine Gewebeeigenfluoreszenz

Die Autofluoreszenz liefert nicht nur morphologische Bilder über die Gestalt einzelner Zellen, sondern trägt Informa-

tionen, die für unterschiedliche Zelltypen und Stoffwechselzustände spezifisch sind [6, 10, 11, 12, 19]. Eine besonders klare Un-

Hier steht eine Anzeige.



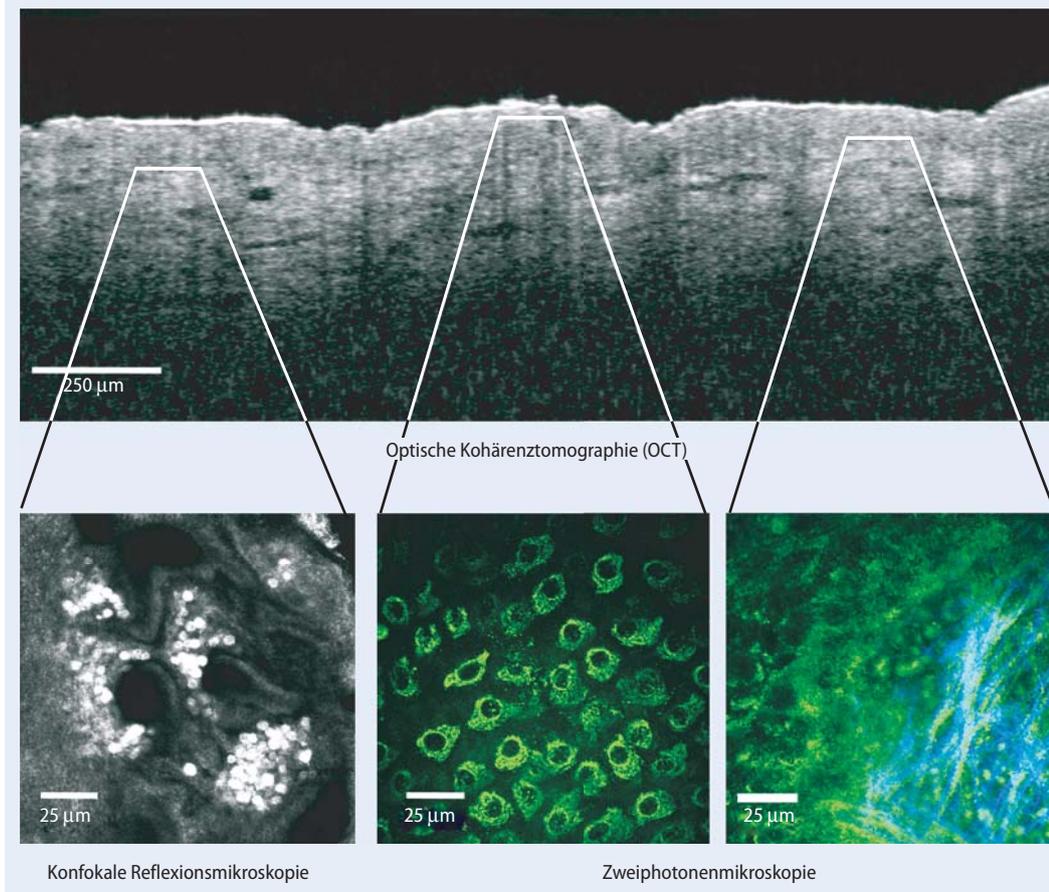


Abb. 2 ◀ In-vivo-Bildgebung der Haut mit OCT (oben), konfokaler Reflexionsmikroskopie (links unten) und Zweiphotonenmikroskopie (Mitte und rechts unten). Während die OCT, die die Haut von der Oberfläche bis zur Subkutis darstellen kann, keine zelluläre Auflösung liefert, können konfokale und Zweiphotonenmikroskopie einzelne Zellen in Ebenen parallel zur Geweboberfläche darstellen. Melaninhaltige Zellen geben bei der konfokalen Mikroskopie ein besonders starkes Signal (links unten). Die Zweiphotonenmikroskopie kann Zellen und subzelluläre Strukturen wie Zellkerne und Mitochondrien (Mitte unten) mit gutem Kontrast abbilden. Sie kann auch zwischen zellulären Strukturen (grün) und Kollagen (blau) unterscheiden (rechts unten)

terscheidung gelingt zwischen Kollagen und zellulären Strukturen bzw. auch Elastin (■ **Abb. 2**). Neben all diesen Vorteilen besitzt die Zweiphotonenmikroskopie den Nachteil, dass sie langsam ist und nur relativ kleine Bildfelder mit typischerweise $200 \times 200 \mu\text{m}$ Größe darstellen kann. Je nach Bildqualität werden hierfür 1–60 Sekunden benötigt.

Klinische Anwendungen und Ausblick

Traditionell sind Dermatologie und Ophthalmologie Vorreiter bei der Anwendung optischer Verfahren. Die Netzhaut des Auges ist eine komplexe anatomische Struktur mit wichtigen Funktionen, die optisch leicht, direkt jedoch schwer zugänglich ist. Das Auge nimmt deshalb eine prädestinierte Stellung für diagnostische und therapeutische optische Verfahren ein. Allerdings ist bei der Darstellung der Retina der Fokussierungswinkel und damit die Auflösung auf etwa $10 \mu\text{m}$ begrenzt, sodass dort eine Darstellung zellulärer Strukturen nicht möglich ist [3]. Klinisch sind sowohl

die konfokale Reflexionsmikroskopie als auch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszein oder Indocyanin-grün etabliert. Für den vorderen Augenabschnitt, Kornea, Sklera und Bindehaut besteht keine Einschränkung bezüglich des Fokussierungswinkels, und es können einzelne Zellen mit subzellulärer Auflösung sichtbar gemacht werden [5].

Auch die Haut ist optisch leicht zugänglich und die Betrachtung ihrer Oberfläche ist die Grundlage für die Diagnostik vieler Erkrankungen. Zur In-vivo-Mikroskopie an der Haut werden zur Zeit einige klinisch zugelassene Geräte angeboten. Die konfokale In-vivo-Mikroskopie wird seit 1997 erfolgreich klinisch erprobt [14, 15, 18] und wurde von den Firmen Lucid und Optiscan kommerzialisiert. Inzwischen wird auch für die Zweiphotonenmikroskopie der Haut ein kommerzielles Gerät von der Firma JenLab angeboten [9]. Der große Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie, die Verbindung von morphologischer Bildgebung ohne Kontrastmittel mit der empfindlichen Darstellung von fluoreszierender exogener Stoff-

fe und der Gewinnung funktioneller Information wurde u. a. für Penetrationsstudien mit Nanopartikeln [16] und zur Quantifizierung von Hautalterung eingesetzt [7].

Die Zweiphotonenmikroskopie verbindet morphologische mit funktionellen Informationen

Im Bereich der Gynäkologie wurde die konfokale Mikroskopie bisher nur mit dem Ziel eingesetzt, zervikale Dysplasien in vivo beurteilen zu können [1, 2, 13, 17]. Hierfür wurden entweder spezielle Sonden entwickelt oder Systeme verwendet, die für endoskopischen Einsatz im Darmbereich konzipiert waren. Es konnten prinzipiell zelluläre Strukturen dargestellt und normale von veränderten Geweben unterschieden werden [2].

Die In-vivo-Mikroskopie kann Gewebestrukturen mit einer der Histologie vergleichbaren Auflösung darstellen. Auch der Kontrast ist in der Regel ausreichend, um sowohl Zell- und Zellkerngrößen als auch deren Formen bis hin zu ei-

ner Tiefe von 100 µm beurteilen zu können. Die Zweiphotonenmikroskopie kann darüber hinaus auch Zellen und Zellzustände aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden. Großer Nachteile aller Verfahren sind die kleinen Bildfelder und der zum Teil noch hohe technische Aufwand. Sicher wird der technologische Fortschritt die Geräte in Zukunft kostengünstiger und leichter anwendbar machen. Das Problem, große Volumina mit Submikrometerauflösung in begrenzter Zeit abtasten zu müssen, bleibt aber prinzipiell bestehen. Die konfokale Mikroskopie ist heute in der Lage, etwa 25 Bilder eines Feldes von 250×250 µm in einer Sekunde zu erzeugen. Für die komplette Abbildung eines 5×5 cm großen Gewebeareals bis zu einer Tiefe von 100 µm würden damit über 40 Stunden benötigt, wenn eine Auflösung von einem Mikrometer gewünscht wird. Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die Verbindung verschiedener bildgebender Verfahren, die mit unterschiedlicher Auflösung arbeiten. Fluoreszenzbildgebung oder die Kolposkopie an der Portio uteri können genutzt werden, um verdächtige Läsionen zu identifizieren und so das zu untersuchende Areal einzuengen. Die optische Kohärenztomographie kann für eine weitere Auswahl bestimmter Gewebeareale – vor allem auch in der Tiefe – genutzt werden und die Bereiche, die in hoher Auflösung darstellt werden müssen, stark reduzieren.

Die prinzipiellen diagnostischen Möglichkeiten der hochauflösenden optischen Gewebedarstellung sind heute für die verschiedenen Gewebe bekannt. Anwendungen werden in der gynäkologischen Diagnostik am äußeren Genitale und der Portio uteri sowie im Rahmen der Laparoskopie gesehen. Vor einem breiten klinischen Einsatz stehen jedoch noch umfangreiche technische Entwicklungen, speziell auch in der Kombination verschiedener Abbildungsverfahren und natürlich der Nachweis des klinischen Nutzens.

Korrespondierender Autor

Dr. rer. nat. G. Hüttmann
Institut für Biomedizinische Optik,
Universität zu Lübeck
Peter-Monnik-Weg 4, 23562 Lübeck
huettmann@bmo.uni-luebeck.de

Gynäkologie 2007 · 40:372–376 DOI 10.1007/s00129-007-1987-6
© Springer Medizin Verlag 2007

G. Hüttmann · M. Löning

Der Weg in die Zukunft: In-vivo-Pathologie durch Laserscan-Mikroskopie

Zusammenfassung

Die mikroskopische Begutachtung ist der Goldstandard zur Beurteilung pathogener Gewebeveränderungen. Nachteile sind Invasivität, eine Limitierung der Diagnostik auf den Bereich, aus dem die Gewebeprobe entnommen wurde, und eine Verzögerung zwischen Probenentnahme und Diagnosestellung. Zur Zeit wird an optischen Verfahren gearbeitet mit den Zielen, die intraoperative Diagnostik zu verbessern und Biopsien einzusparen bzw. eine gezieltere Entnahme zu ermöglichen. Besonders auf die In-vivo-Mikroskopie wird große Hoffnung gesetzt. Klinische Erfahrungen an Haut, Darm und anderen Organen sind ermutigend, wenn auch

die In-vivo-Mikroskopie noch nirgends als klinischer Standard etabliert werden konnte. Noch ist die Technik zu aufwändig und kostenintensiv, es können nur kleine Areale begutachtet werden. Dennoch ist zu erwarten, dass technische Fortschritte und die Kombination mit Fluoreszenzdiagnostik und optischer Kohärenztomographie (OCT) zu interessanten Anwendungen in der Gynäkologie führen werden.

Schlüsselwörter

Optische Diagnostik · Optische Kohärenztomographie · In-vivo-Mikroskopie · Multiphotonenmikroskopie

The way into the future: in vivo pathology using laser scan microscopy

Abstract

Microscopy of histological sections is the gold standard for the assessment of pathological tissue changes. Its disadvantages are invasiveness, the limited field of examination, and a certain time lag between the initial procedure, i.e. when the sample is taken, and the actual diagnosis. Some current research is dedicated to procedures to improve the intraoperative diagnosis, reduce the number of biopsies, or at least allow a more targeted collection of tissue samples. In particular, in vivo microscopy is being investigated for the histology-like imaging of superficial tissues. Clinical results with skin, colon and other tissues are promising, although in vivo micros-

copy has still not become a standard diagnostic procedure. The technology is still complex and expensive. In addition, only limited areas can be visualized in an acceptable time. However, it is expected that in vivo microscopy, possibly in conjunction with fluorescence diagnosis and optical coherence tomography, will find applications in gynecology in the future.

Keywords

Optical diagnosis · Optical coherence tomography · In vivo microscopy · Multiphoton microscopy

Interessenkonflikt. Der Autor ist Aufsichtsratsmitglied der Thorlabs HL AG, die OCT-Geräte für den wissenschaftlichen Bedarf entwickelt. Trotz des möglichen Interessenkonflikts ist der Beitrag unabhängig und produktneutral.

Literatur

- Bott EM, Young R, Jenkin G, McLaren WJ (2006) Detection of morphological changes of the ovine cervix in response to sex steroids using a fluorescence confocal endomicroscope. *Am J Obstet Gynecol* 194: 105–112
- Carlson K, Pavlova I, Collier T et al. (2005) Confocal microscopy: imaging cervical precancerous lesions. *Gynecol Oncol* 99: S84–S88
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73–76
- Diaspro A (ed) (2001) *Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances*. John Wiley & Sons, New York
- Guthoff R, Stave J, Baudouin C (eds) (2006) *Atlas of confocal laser scanning in-vivo microscopy in ophthalmology*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
- Kantelhardt SR, Leppert J, Krajewski J et al. (2007) Imaging of brain and brain tumor tissue by time-resolved multiphoton excitation microscopy. *Neurooncol*: Epub ahead of print
- Koehler MJ, König K, Elsner P et al. (2006) In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography *Opt Lett* 31: 2879–2881
- Koenig F, Knittel J, Stepp H (2001) Diagnosing cancer in vivo. *Science* 292: 1401–1403
- König K, Riemann I (2003) High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt* 8: 432–439
- Laiho LH, Pelet S, Hancewicz TM et al. (2005) Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J Biomed Opt* 10: 024016
- Leppert J, Krajewski J, Kantelhardt SR et al. (2006) Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue. *Neurosurgery* 58: 759–767
- Levitt JM, Baldwin A, Papadakis A et al. (2006) Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells. *J Biomed Opt* 11: 064012
- McLaren W, Tan J, Quinn M (2003) Detection of cervical neoplasia using non-invasive fibre-optic confocal microscopy. In: Monson J (ed) *5th International Multidisciplinary Congress EUROGIN 2003*. Moduzzi, Bologna, pp 213–217
- Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM et al. (1999) In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 113: 293–303
- Rubinstein G, White W, Rajadhyaksha M, González S (1997) Real time in vivo confocal microscopy: A powerful imaging tool in dermatology. *Dermatología & Cosmética* Dezember: 274–277
- Stracke F, Weiss B, Lehr CM et al. (2006) Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. *J Invest Dermatol* 126: 2224–2233
- Sung K-B, Richards-Kortum R, Follen M et al. (2003) Fiber optic confocal reflectance microscopy: a new real-time technique to view nuclear morphology in cervical squamous epithelium in vivo. *Opt Express* 11: 3171–3181
- Swindle L, Delaney P, Thomas S, Freemann M (2002) View of human skin in vivo as observed using fluorescence confocal microscopy imaging. In: *World Congress of Dermatology 2002*, Paris, France
- Zhuo S, Chen J, Luo T, Zou D (2006) Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multi-channel mode and Lambda mode. *Opt Express* 14: 7810–7820

Hier steht eine Anzeige.