

# Laserinduzierte Mikro- und Nanoeffekte – von der selektiven Photothermolyse zu molekularen Nanoeffekten

## Laser-induced micro and nano effects – from selective photothermolysis to molecular nano effects

Gereon Hüttmann\*, Benno Radt, Reginald Birngruber

Eingang 23. Dezember 1999

### Key words

Laser medicine, thermal laser effects, selective photothermolysis, photo-induced nano effects, thermal protein denaturation.

### Abstract

Selective destruction of tissue structures, with a higher absorption than the surrounding tissue, is possible when using pulsed irradiation of a suitable wavelength and pulse duration. Matching the pulse duration to the thermal relaxation time of the absorbing structure prevents thermal damage to the surrounding tissue. This principle of selective photothermolysis is used for laser treatment of various diseases, using haemoglobin or melanin as the primary absorber. With microsecond laser pulses, even a selective destruction of a single cell layer in the eye is possible. An extension of the selective thermolysis to submicrometer structures or even macromolecules is currently being investigated.

### Kurzfassung

Durch die Verwendung gepulster Laserstrahlung geeigneter Wellenlänge und Pulsdauer können Gewebestrukturen, die eine höhere Absorption als ihre Umgebung besitzen, gezielt zerstört werden. Die Anpassung der Pulslänge an die thermische Equilibrierungszeit der absorbierenden Strukturen verhindert dabei eine thermische Schädigung des umgebenden Gewebes und erlaubt eine selektive Therapie. Dieses Prinzip wird selektive Photothermolyse genannt und wird bereits bei der Therapie einer Reihe von Erkrankungen eingesetzt, bei denen Gefäße oder pigmentierte Zellen selektiv zerstört werden sollen. Mit Laserpulsen von einigen Mikrosekunden Länge ist es sogar möglich, eine einzelne Zelle im Auge selektiv zu zerstören. Inwieweit es mit diesem Prinzip auch möglich ist, Strukturen im Submikrometerbereich oder sogar einzelne Makromoleküle durch exogene absorbierende Nanopartikel zu zerstören, wird im Moment intensiv erforscht.

### Inhaltsverzeichnis

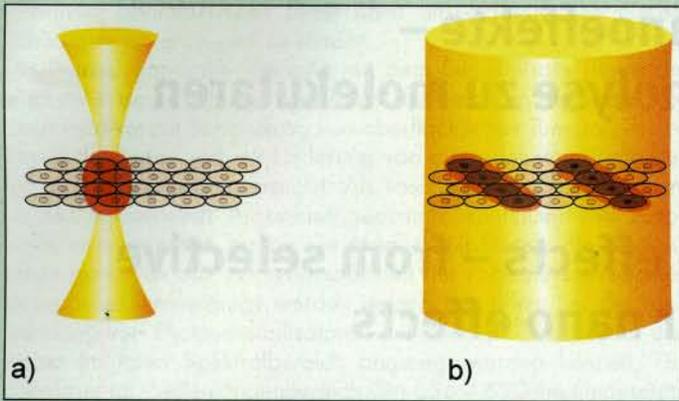
- 1 Einleitung
- 2 Prinzip der selektiven Photothermolyse
- 3 Klinische Anwendungen
  - 3.1 Dermatologische Anwendungen
  - 3.2 Ophthalmologische Anwendungen
    - 3.2.1 Selektive Zerstörung des retinalen Pigmentepithels
    - 3.2.2 Selektive Lasertrabekuloplastik
- 4 Molekulare thermische Effekte
- 5 Zusammenfassung und Ausblick
- 6 Literatur

### 1 Einleitung

Biologisches Gewebe ist ein hoch organisiertes Gebilde mit Strukturen, deren Abmessungen sich über mehrere Größenordnungen erstrecken. Organe mit Abmessungen im Millimeter- bis Dezimeterbereich besitzen Substrukturen wie Gefäße, Drüsen oder Epithelien mit Dimensionen von 10  $\mu\text{m}$  bis 1 mm. Grundbausteine aller Gewebe sind Zellen mit Abmessungen von 1 bis 10  $\mu\text{m}$ , die wieder aus Zellorganellen (100 nm bis 1  $\mu\text{m}$ ) und schließlich Membranen, Proteinen und anderen Makromolekülen (1 bis 10 nm) aufgebaut sind.

Ziel der Anwendung des Lasers in der Medizin ist eine möglichst gezielte Modifikation oder Zerstörung von Geweben oder Gewebestrukturen, deren Größen sich über diesen weiten Bereich von Nanometern bis Dezimetern erstrecken können. Dies kann durch einen entsprechend gebündelten Laserstrahl, der auf die Zielstruktur gerichtet wird, wie zum Beispiel bei der klassischen Laserchirurgie oder der Zellchirurgie mit Mikrostrahlapparaturen, bewerkstelligt werden. Die räumliche Präzision ist dabei durch die Fokussierbarkeit der Laserstrahlung begrenzt und liegt unter günstigsten Umständen bei ungefähr 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  (Abb. 1a). Ein alternatives Verfahren besteht darin, eine stärkere Absorption der Zielstruktur auszunutzen, um begrenzte Gewebseffekte zu erzielen. Die Laserstrahlung muss dabei nicht ausschließlich auf die Zielstruktur gerichtet werden, sondern es kann großflächig bestrahlt werden (Abb. 1b). Der Hauptvorteil bei diesem Verfahren besteht darin, dass die Selektivität nicht durch „Zielen“ mit dem Laserstrahl erreicht wird, sondern durch die Absorption des Gewebes und durch die Wahl geeigneter Bestrahlungsparameter. Somit können im Zielgewebe gleichzeitig an vielen Stellen Veränderungen erzeugt werden. Neben natürlichen Unterschieden in der Gewebsabsorption können auch gezielt Farbstoffe an die Zielstrukturen gebracht werden. Nur die Größe der absorbierenden Struktur und die Aus-

\* Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann, Dipl. Phys. Benno Radt, Prof. Dr. phil. nat. Reginald Birngruber, Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH, Peter-Monnik-Weg 4, D-23652 Lübeck. E-mail huettmann@mll.mll.mu-luebeck.de, Web <http://www.mll.mu-luebeck.de>



**Abb. 1** Erzeugung laserinduzierter Mikroeffekte durch direkte Fokussierung des Laserstrahls (a) und mittels selektiver Photothermolyse unter Ausnutzung einer höheren Absorption der Zielstruktur (b)

**Fig. 1** Generation of laser-induced micro effects by direct focussing of the laser beam (a) and by selective photothermolysis utilizing a higher optical absorption of the target structure (b)

dehnung der erzeugten Gewebseffekte begrenzen bei diesem Verfahren, das im weiteren als selektive Photothermolyse bezeichnet wird, die räumliche Präzision.

## 2 Das Prinzip der selektiven Photothermolyse

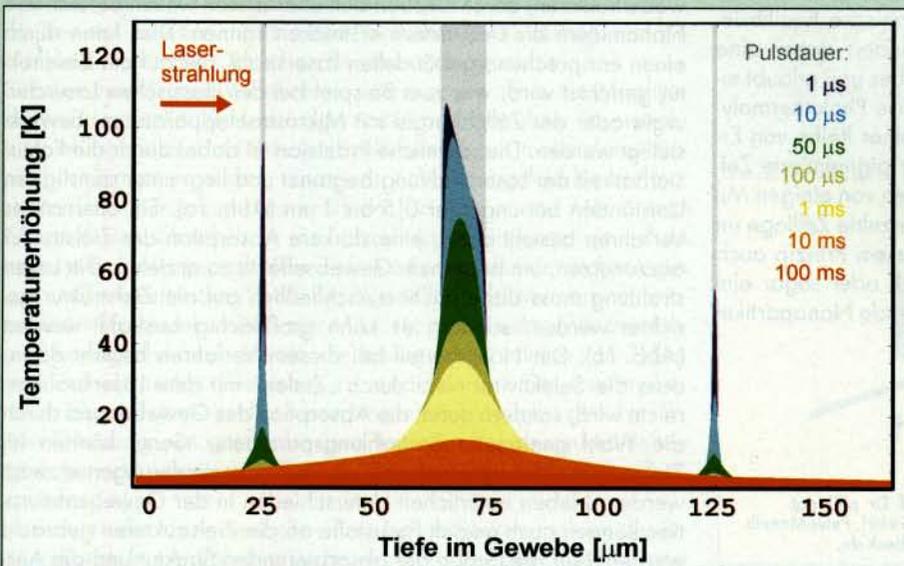
Die Gewebseffekte können nach Absorption des Bestrahlungslichtes in den Zielstrukturen durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Eine deutliche Erhöhung der Temperatur über die Körpertemperatur kann zu thermischer Gewebszerstörung durch Denaturierung wichtiger Zellproteine oder anderer Makromoleküle führen. Oberhalb einer Temperatur von 100 °C kann das Wasser des Gewebes verdampfen. Bei Bestrahlung mit kurzen Laserpulsen führt dies zu einer schlagartigen Volumenvergrößerung, die die Gewebestrukturen zerreißt. Sind die Heizzeiten kürzer als es für den akustischen Einschluß erforderlich ist, können Stoßwellen entstehen, die ebenfalls Gewebsschäden hervorrufen können.

Die Voraussetzung dafür, dass die Lasereffekte auf die absorbierenden Strukturen und ihre unmittelbare Umgebung begrenzt bleiben, ist ein thermischer Einschluß, realisiert durch die Wahl einer ausreichend kurzen Bestrahlungszeit, um den Abfluss thermischer Energie in die Umgebung zu minimieren. Dies ist in *Abbildung 2* dargestellt, in der Temperaturen in drei absorbierenden Schichten unter Bestrahlung mit unterschiedlich langen Pulsen berechnet wurden. Für sphärische absorbierende Strukturen skalieren die für den thermischen Einschluß notwendigen Zeiten  $\tau$  quadratisch mit dem Durchmesser  $d$  und können mit folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$\tau = \frac{d^2}{27\alpha} \quad (1)$$

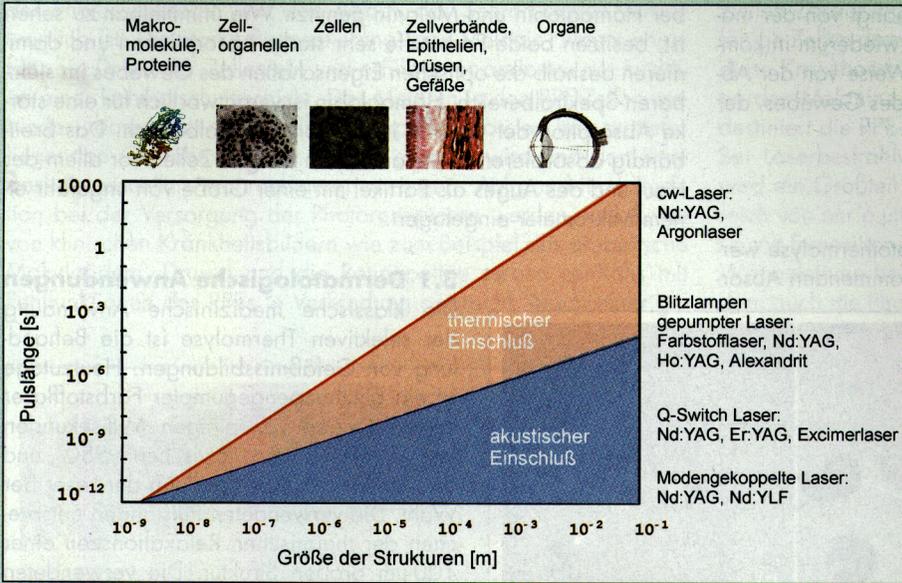
Wie in *Abbildung 3* dargestellt, sind im Gewebe, dessen thermische Diffusivität  $\alpha$  ungefähr der von Wasser entspricht, Heizdauern, d. h. Pulslängen, von weniger als einer Sekunde für eine Präzision im Millimeterbereich angemessen. Für eine selektive Zerstörung von Gefäßen oder anderen Gewebestrukturen mit Durchmessern im Bereich von 30 bis 300  $\mu\text{m}$  sollten die Pulslängen 0,2 bis 20 ms betragen. Zum selektiven Erhitzen von Strukturen mit einer Abmessung von einigen Mikrometern ist eine Pulslänge von einigen Mikrosekunden notwendig. Wesentlich kürzer als  $\tau$  sollte die Bestrahlungszeit nicht gewählt werden, da, falls die Zeiten für einen akustischen Einschluß unterschritten werden, photomechanische Schäden durch Stoßwellen auftreten können. Zudem können dann, wie in *Abbildung 2* demonstriert, Schäden durch Absorber, die wesentlich kleiner als die Zielstruktur sind, verhindert werden. Dieses Prinzip lokalisierter thermischer Schäden wurde unter dem Namen „selective photothermolysis“ von Anderson und Parrish 1983 vorgestellt und die mögliche Selektivität an Blutgefäßen und melaninhaltigen Zellen mit Pulsdauern von Mikrosekunden beziehungsweise Nanosekunden demonstriert [1].

Mit kleiner werdendem Zielvolumen, d. h. mit stärkerer Lokalisierung der Schäden, nimmt die Zeit, die für einen thermischen Schaden zur Verfügung steht, immer weiter ab. Dies begrenzt die Möglichkeit selektiver thermischer Gewebseffekte, da neben der Temperatur auch die Zeit, für die die Biomoleküle, Zellen oder Gewebe erhöhter Temperatur ausgesetzt sind, einen Einfluss auf die Schädigung hat. Je höher die Temperatur, desto schneller tritt der Schaden ein. Die Abhängigkeit der Schadenszeit  $t$  von der Tem-



**Abb. 2** Selektive thermische Wirkung gepulster Laserstrahlung. Temperaturverteilung in einem Gewebe mit drei absorbierenden Schichten (Absorptionskoeffizient  $50 \mu\text{m}^{-1}$ ), die eine Dicke von  $1 \mu\text{m}$  beziehungsweise  $10 \mu\text{m}$  besitzen. Die Bestrahlung betrug  $1 \text{ J/cm}^2$ . Die Pulslängen wurden in den Berechnungen von  $1 \mu\text{s}$  bis  $0,1 \text{ s}$  variiert.

**Fig. 2** Selective thermal effects caused by pulsed laser irradiation. Temperature distribution in tissue with three absorbing layers (absorption coefficient  $50 \mu\text{m}^{-1}$ ) of  $1 \mu\text{m}$  and  $10 \mu\text{m}$  thickness after irradiation with  $1 \text{ J/cm}^2$ . For the calculations, the pulse width was varied between  $1 \mu\text{s}$  and  $0.1 \text{ s}$ .



**Abb. 3** Pulslängen, die bei verschiedenen großen absorbierenden Strukturen für den thermischen und akustischen Einschluß notwendig sind

**Fig. 3** Pulse width necessary for thermal and acoustic confinement in absorbing structures of different sizes

peratur folgt in erster Näherung einem Gesetz, das von Arrhenius vor 110 Jahren entdeckt wurde:

$$t = \frac{1}{A_0} e^{\frac{E_a}{k_B T}} \quad (2)$$

Bei Zimmertemperatur führt die vergleichsweise hohe Aktivierungsenergie  $E_a$ , die im Bereich von 200 bis 800 kJ/mol liegt, zu einer sehr starken Abhängigkeit der Zeit, die für einen thermischen Schaden benötigt wird, von der Temperatur. Temperaturerhöhungen im Bereich von 0,5 bis 2,5 K führen je nach Höhe der Aktivierungsenergie zu einer Halbierung von  $t$ . Eine Verkürzung der Heizdauern über mehrere Größenordnungen kann deshalb durch eine Erhöhung der Temperatur ausgeglichen werden. Ist die Temperatur nicht über die Zeit konstant, kann das Ausmaß eines thermischen Schadens durch das sogenannte Schadensintegral  $\Omega$  beschrieben werden:

$$\Omega = \int A_0 e^{-\frac{E_a}{k_B T(t)}} dt \quad (3)$$

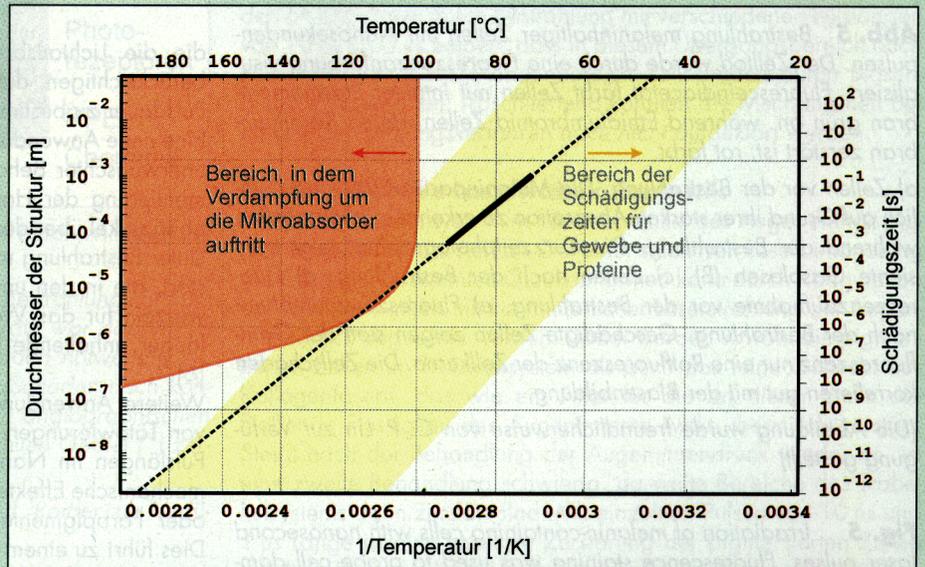
Der Integrand ist die reziproke Schädigungszeit  $\tau$ , die auch Schädigungsrate genannt wird. Die Integration wird über den zeitlichen Temperaturverlauf durchgeführt. Diese Formulierung zeigt auch eine wichtige Eigenschaft thermischer Schäden: sie addieren sich.

Gut untersucht wurde die Abhängigkeit thermischer Schäden von Zeit und Temperatur bei Netzhautkoagulationen im Auge und

bei Untersuchungen der Mechanismen von Netzhautschäden durch Laserstrahlung [2]. Bei Bestrahlung des Augenhintergrundes wurden thermische Schäden, die sich durch die Arrheniusgleichung (2) beschreiben lassen, bis in den Submillisekundenbereich beobachtet. Kürzere Pulse mit Pulslängen im Bereich von Mikro- und Nanosekunden verursachten dagegen mechanische Gewebezzerstörungen. Abschätzungen mit Hilfe der Arrheniusgleichung zeigen, dass die Temperatur in den bestrahlten Bereichen bei Submikrosekundenpulsen deutlich über 100 °C liegen muß.

Dies zeigt eine prinzipielle Grenze von thermischen Mikro- und Nanoeffekten. Bei sehr kleinen Strukturen und den hieraus folgenden kurzen Heizzeiten können die für thermische Schäden notwendigen Temperaturen so hoch werden, dass es durch Verdampfung von Wasser in der Umgebung der Absorber zu einer schlagartigen Volumenvergrößerung kommt, die Gewebsstrukturen zerreißen kann. Ein derartiger photodisruptiver Mechanismus kann aber durchaus präzise Gewebsschäden erzeugen und deshalb auch für Mikroeffekte genutzt werden. Zellexperimente haben gezeigt, dass Zellen, die Absorber von einigen Mikrometern Größe enthalten, mit Nanosekundenpulsen selektiv zerstört werden können [3, 4] (Abb. 5). Unter Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen bilden sich um die Absorber rasch expandierende transiente Gasblasen, die auf die Zellen begrenzt sind und nach wenigen Mikrosekunden wieder zusammenfallen. Benachbarte Zellen ohne absorbierende Mikropartikel werden da-

bei Untersuchungen der Mechanismen von Netzhautschäden durch Laserstrahlung [2]. Bei Bestrahlung des Augenhintergrundes wurden thermische Schäden, die sich durch die Arrheniusgleichung (2) beschreiben lassen, bis in den Submillisekundenbereich beobachtet. Kürzere Pulse mit Pulslängen im Bereich von Mikro- und Nanosekunden verursachten dagegen mechanische Gewebezzerstörungen. Abschätzungen mit Hilfe der Arrheniusgleichung zeigen, dass die Temperatur in den bestrahlten Bereichen bei Submikrosekundenpulsen deutlich über 100 °C liegen muß. Dies zeigt eine prinzipielle Grenze von thermischen Mikro- und Nanoeffekten. Bei sehr kleinen Strukturen und den hieraus folgenden kurzen Heizzeiten können die für thermische Schäden notwendigen Temperaturen so hoch werden, dass es durch Verdampfung von Wasser in der Umgebung der Absorber zu einer schlagartigen Volumenvergrößerung kommt, die Gewebsstrukturen zerreißen kann. Ein derartiger photodisruptiver Mechanismus kann aber durchaus präzise Gewebsschäden erzeugen und deshalb auch für Mikroeffekte genutzt werden. Zellexperimente haben gezeigt, dass Zellen, die Absorber von einigen Mikrometern Größe enthalten, mit Nanosekundenpulsen selektiv zerstört werden können [3, 4] (Abb. 5). Unter Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen bilden sich um die Absorber rasch expandierende transiente Gasblasen, die auf die Zellen begrenzt sind und nach wenigen Mikrosekunden wieder zusammenfallen. Benachbarte Zellen ohne absorbierende Mikropartikel werden da-



**Abb. 4** Arrheniusdarstellung der Schädigungszeit für thermische Gewebsschäden am Augenhintergrund (rechte Ordinate). Die Gerade wurde aus Messungen, die in dem fett gezeichnetem Bereich zwischen  $10^{-3}$  und 1 s durchgeführt wurden, extrapoliert. Zum Vergleich wurde die nach Gleichung (4) abgeschätzte Verdampfungstemperatur in Abhängigkeit von der Größe der erhitzten Struktur eingezeichnet (linke Ordinate).

**Fig. 4** Arrhenius diagram showing the time necessary for thermal damage of the retina (right ordinate). For drawing the line, the Arrhenius parameters  $A_0$  and  $E_a$ , calculated from measurements between  $10^{-3}$  and 1 s (bold part), were used. For comparison, the boiling temperature, estimated from equation (4) for different sizes of the heated volume, was plotted (left ordinate).

bei nicht geschädigt. Die Schadensreichweite hängt von der maximalen Größe der entstehenden Blase ab, die wiederum in komplexer und noch nicht vollständig untersuchter Weise von der Absorbergröße, den mechanischen Eigenschaften des Gewebes, der Pulslänge und der Pulsenergie abhängt.

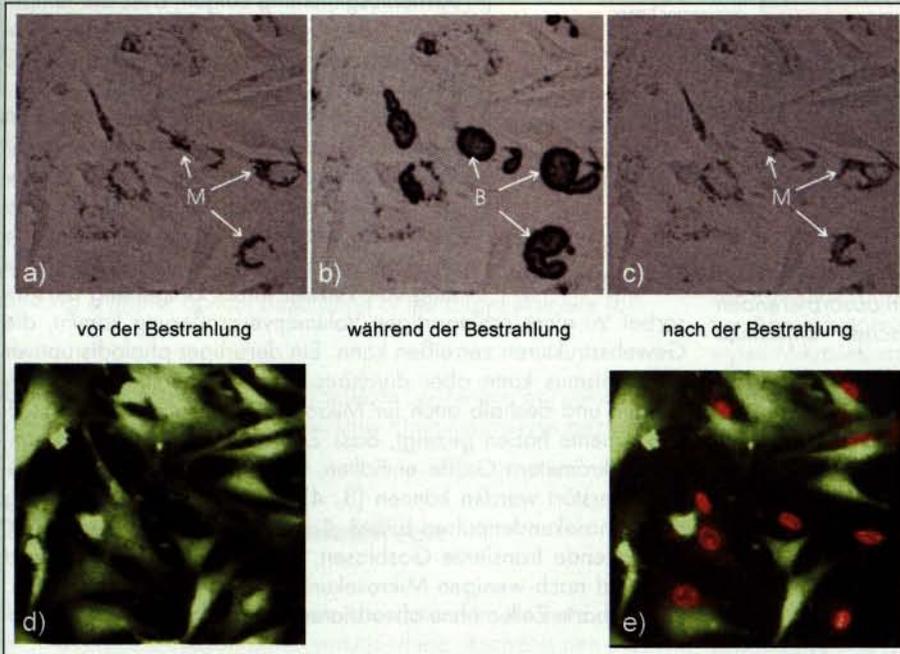
### 3 Klinische Anwendungen

Bei klinischen Anwendungen der selektiven Photothermolyse werden meist die natürlicherweise im Gewebe vorkommenden Absor-

ber Hämoglobin und Melanin genutzt. Wie unmittelbar zu sehen ist, besitzen beide Farbstoffe sehr starke Absorptionen und dominieren deshalb die optischen Eigenschaften des Gewebes im sichtbaren Spektralbereich. Hämoglobin ist verantwortlich für eine starke Absorption der Gefäße im grünen Spektralbereich. Das breitbandig absorbierende Melanin ist in einigen Zellen vor allem der Haut und des Auges als Partikel mit einer Größe von ungefähr einem Mikrometer eingelagert.

#### 3.1 Dermatologische Anwendungen

Die klassische medizinische Anwendung der selektiven Thermolyse ist die Behandlung von Gefäßmissbildungen. Heutzutage ist ein blitzlampengepumpter Farbstofflaser mit Pulsängen von einigen Millisekunden und Wellenängen zwischen 580 und 595 nm für diese Behandlung der Laser der Wahl. Die verwendeten Pulsängen entsprechen der thermischen Relaxationszeit einer 100 µm großen Struktur. Die verwendeten Wellenängen sind ein Kompromiss aus einer hohen Absorption in den Gefäßen und einer hohen Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe. Bei kürzeren Wellenängen steigt die Blutabsorption zwar noch weiter an, aber wegen der gleichzeitigen Zunahme der Gewebestreueung können nur sehr oberflächliche Gefäße behandelt werden. Oberhalb von 600 nm sinkt die Absorption des Blutfarbstoffes um mehr als eine Größenordnung. Der Absorptionsunterschied zwischen Gefäßen und dem umliegenden Gewebe wird geringer. Zur Optimierung der Selektivität wurden umfangreiche Berechnungen,



**Abb. 5** Bestrahlung melaninhaltiger Zellen mit Nanosekundenpulsen. Der Zelltod wurde durch eine Fluoreszenzgefärbung visualisiert. Fluoresceindiaceetat färbt Zellen mit intakter Plasmamembran grün an, während Ethidiumbromid Zellen, deren Kernmembran zerstört ist, rot färbt.

a) Zellen vor der Bestrahlung. Die Melaninpartikel (M) sind deutlich auf Grund ihrer starken Absorption zu erkennen. b) Die Zellen während der Bestrahlung. Die Kurzzeitphotographie zeigt transiente Gasblasen (B). c) Zellen nach der Bestrahlung. d) Fluoreszenzaufnahme vor der Bestrahlung. e) Fluoreszenzaufnahme nach der Bestrahlung. Geschädigte Zellen zeigen statt der Grünfluoreszenz nur eine Rotfluoreszenz der Zellkerne. Die Zellschäden korrelieren gut mit der Blasenbildung.

(Die Abbildung wurde freundlicherweise von C. P. Lin zur Verfügung gestellt)

**Fig. 5** Irradiation of melanin-containing cells with nanosecond laser pulses. Fluorescence staining was used to probe cell damage. Fluorescein diacetate induces a green fluorescence in cells with functioning plasma membrane, whereas ethidium bromide stains DNA red in cells with a defect membrane of the nucleus.

a) Cells before irradiation. Melanin particles (M) can be seen due to their strong absorption. b) Flash photography of transient gas bubbles (B) in the cells during irradiation. c) Cells after irradiation. d) Fluorescence image before irradiation. e) Fluorescence image after irradiation. Cells in which bubble formation was observed were damaged, as seen by the red fluorescence.

(Images were provided by C. P. Lin)

die die Lichtausbreitung und die Wärmeleitung im Gewebe berücksichtigen, durchgeführt, um die optimale Wellenlänge und Pulsdauer zu bestimmen [5].

Eine neue Anwendung der selektiven Thermolyse ist die Entfernung unerwünschter Behaarung. Als Absorber wird entweder die Pigmentierung der Haarwurzeln ausgenutzt, oder es werden Graphitpartikel über den Haarschaft in die Haarwurzeln eingerieben. Unter Bestrahlung mit Millisekundenpulsen werden die Zellen zerstört, die in den ungefähr einen halben Millimeter großen Haarwurzeln für das Wachstum der Haare verantwortlich sind. Eine länger anhaltende Entthaarung ist mit diesem Verfahren möglich [6].

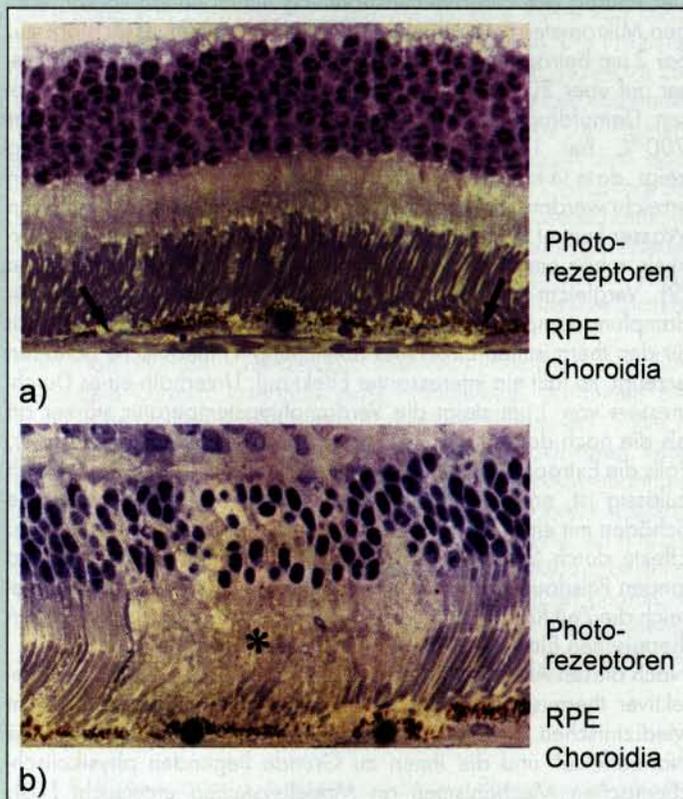
Weitere Anwendungen selektiver Lasereffekte sind Entfernungen von Tätowierungen und Pigmentflecken der Haut. Hierzu werden Pulsängen im Nanosekundenbereich verwendet. Durch thermomechanische Effekte werden die absorbierenden Partikel (Melanin oder Farbpigmente) beziehungsweise ihre Umgebung zerstört. Dies führt zu einem biologischen Abbau der Partikel.

#### 3.2. Ophthalmologische Anwendungen

##### 3.2.1 Selektive Zerstörung des retinalen Pigmentepithels

Hochpräzise Lasereffekte sind besonders interessant für ophthalmologische Anwendungen, da im Auge funktionell differenzierte Zellverbände sehr eng beieinander liegen. So liegt zum Beispiel zwischen der neuronalen Netzhaut mit den Photorezeptoren und der Aderhaut das retinale Pigmentepithel (RPE), eine einlagige Schicht aus sehr stark pigmentierten Zellen, die für die Versorgung

der Photorezeptoren und den Abbau des Sehfärbstoffes verantwortlich ist. Die starke Pigmentierung, das Melanin, nimmt ungefähr ein Drittel der Zellen ein und erfüllt unter anderem die Funktion einer Lichtschutzschicht. Das Melanin in den RPE-Zellen verhindert, dass Licht, das die Photorezeptoren passiert hat, an tiefer liegenden Gewebeschichten zurück gestreut wird und den Kontrast der visuellen Wahrnehmung verringert. Aufgrund ihrer Funktion bei der Versorgung der Photorezeptoren werden eine Reihe von klinischen Krankheitsbildern wie zum Beispiel das diabetische Makulaödem, Drusen und die Retinopathie serosa centralis mit Fehlfunktionen des RPEs in Verbindung gebracht. Nach einer ge-



**Abb. 6** Selektive Zerstörung von RPE-Zellen durch Mikrosekundenpulse.

a) Mikroskopische Aufnahme der Retina nach Bestrahlung mit 500 Pulsen einer Pulslänge von 5  $\mu$ s. Die Pulsenergie war doppelt so hoch, wie für angiographisch sichtbare Schäden notwendig ist. Die Pfeile zeigen die bestrahlten Gebiete. b) Schäden nach kontinuierlicher Bestrahlung (1 sec) an der angiographischen Schwelle. Die Photorezeptoren sind im bestrahlten Gebiet (\*) zerstört.

(Die Abbildung wurde freundlicherweise von J. Roider zur Verfügung gestellt)

**Fig. 6** Selective destruction of RPE cells by microsecond laser pulses.

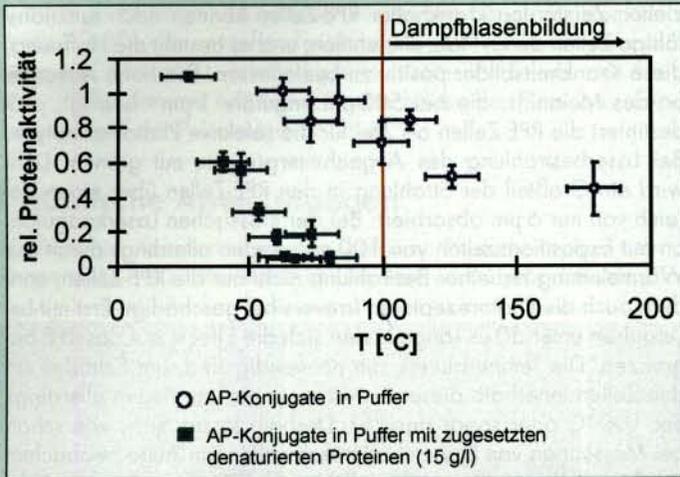
a) Microscopic image of the retina after irradiation with 500 pulses at a pulse duration of 5  $\mu$ m. The pulse energy was twice the energy needed for damage visible by fluorescence angiography. Arrows show the irradiated areas of the RPE. b) Damage by cw irradiation (1 s) at the angiographic threshold. In the irradiated areas the photoreceptors are destroyed.

(Images were provided by J. Roider)

zielten Zerstörung krankhafter RPE-Zellen können noch funktionsfähige Zellen deren Platz einnehmen, und es besteht die Hoffnung, diese Krankheitsbilder positiv zu beeinflussen. Die hohe Absorption des Melanins, die bei 500 nm ungefähr  $1 \mu\text{m}^{-1}$  beträgt, prädestiniert die RPE-Zellen als Ziel für die selektive Photothermolyse. Bei Laserbestrahlung des Augenhintergrundes mit grünem Licht wird ein Großteil der Strahlung in den RPE-Zellen über einen Bereich von nur 6  $\mu$ m absorbiert. Bei der klassischen Laserkoagulation mit Expositionszeiten von 100 ms werden allerdings durch die Wärmeleitung bei einer Bestrahlung nicht nur die RPE-Zellen, sondern auch die Photorezeptoren irreversibel geschädigt. Erst mit Laserpulsen unter 50  $\mu$ s Länge lassen sich die Effekte auf das RPE begrenzen. Die Temperaturen, die notwendig sind, um Schäden an den Zellen innerhalb dieser Zeiten zu erreichen, liegen allerdings bei 100 °C oder sogar darüber. Deshalb lassen sich, wie schon bei Messungen von Laserschadensschwellen am Auge beobachtet wurde, mit Einzelpulsen Mikroeffekte am RPE ohne disruptive Nebenwirkungen, die sich in Blutungen oder der Bildung von makroskopischen Gasblasen äußern, nicht erzielen. Einen Ausweg bietet die Verwendung von Pulsserien, deren Wiederholrate so bemessen ist, dass zwischen den Pulsen die Temperatur fast vollständig auf den Ausgangswert absinkt. Während der Spitzentemperatur wird jeweils mit hoher räumlicher Auflösung ein Bruchteil des Zellschadens bewirkt, der sich über den Pulszug dann aufsummiert. Tierexperimente und Behandlungen von Patienten belegen, dass mit Pulsserien von 500 Pulsen und einer Pulslänge von einigen Mikrosekunden eine selektive Zerstörung des retinalen Pigmentepithels möglich ist [7] (Abb. 6). Das Potential dieser repetierenden Photokoagulation mit Mikrosekundenpulsen wird im Moment in klinischen Studien untersucht. Die Pulslänge für dieses Behandlungsverfahren wurden so lang gewählt, dass eine thermische Zerstörung der RPE-Zellen erwartet werden konnte. Neuere In-vitro-Untersuchungen zum Mechanismus laserinduzierter Schäden an RPE-Zellen durch Bestrahlung mit verschiedenen Pulsängen von 10 ns bis 5  $\mu$ s zeigen, dass in diesem Übergangsbereich auch Pulsängen im Mikrosekundenbereich Zellschäden durch Blasenbildung hervorrufen. Abschließend konnten die Mechanismen bei diesem Behandlungsverfahren noch nicht aufgeklärt werden.

### 3.2.2 Selektive Lasertrabekuloplastik

Auch das Trabekelsystem im Kammerwinkel des Auges enthält pigmentierte Zellen, die sich als Ziel einer selektiven Laserbehandlung anbieten. Bei bestimmten Glaukomformen kann durch Koagulation des Kammerwinkels mit kontinuierlicher Laserstrahlung der Augeninnendruck abgesenkt werden. Dabei werden sowohl die pigmentierten Zellen im Trabekelsystem als auch das feine Geflecht aus Kollagenfasern, das wie ein Filter für die an dieser Stelle abfließende Flüssigkeit des Augeninneren wirkt, thermisch zerstört. Steigt nach der Behandlung der Augeninnendruck wieder an, ist eine zweite Behandlung schwierig, da weite Bereiche des Trabekelsystems dann zerstört sind. Mit einzelnen Pulsen von 10 ns und 1  $\mu$ s Länge ist eine selektive Zerstörung der pigmentierten Zellen möglich. Dies wurde an konfluenten Zellkulturen aus pigmentierten und nichtpigmentierten Zellen des Trabekelsystems gezeigt. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden dabei Zerreißungen der die Melaninpartikel umgebenden Membranen beobachtet. Wahrscheinlich werden deshalb die Zellen durch laserinduzierte Blasenbildung, wie in Abbildung 5 dargestellt, und nicht durch thermische Effekte zerstört. Eine klinische Studie mit Glaukompatienten zeigt, dass durch Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen eine Senkung des Augeninnendruckes erreicht werden kann [8]. Den Erfolg dieses neuen Verfahrens werden aber erst Langzeituntersuchungen zeigen.



**Abb. 7** Messung der Aktivität der an Absorber gekoppelten Proteine mittels eines Chemolumineszenzverfahrens nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Pulsenergien. Die Bestrahlung wurde jeweils mit 1000 Pulsen von 3 µs Länge durchgeführt.

**Fig. 7** Activity of proteins coupled to absorbing spheres after irradiation with different pulse energies. Samples were irradiated with 1000 pulses of 3 µs pulses duration.

#### 4 Molekulare thermische Effekte

Diese Beispiele klinischer Anwendungen zeigen, dass die selektive Photothermolyse eine große Präzision bis hinunter auf die zelluläre Ebene ermöglicht. Es stellt sich natürlich die Frage, ob durch eine noch weitere Verfeinerung der Präzision selektiv einzelne Zellorganellen, Proteine oder sogar Teile der DNA zerstört werden könnten. Das ultimative Ziel der selektiven Thermolyse wäre die Zerstörung von Strukturen mit Abmessungen von 1 bis 10 nm. Voraussetzung für derart kleine Schadensradien sind ultrakurze Laserpulse. Der zur Vermeidung thermischer Schädigungen der Umgebung notwendige thermische Einschluss wird bei einem wenige Nanometer großen Volumen erst mit Pulsdauern von einigen Piko-sekunden erreicht (Abb. 3). Wie schon dargestellt, sind Lasereffekte derart kurzer Pulse in der Regel mit starken mechanischen Schäden durch Zerreibungen oder Druckwellen verbunden. Es gibt jedoch zwei Effekte, die thermische Schäden im Nanometerbereich dennoch ermöglichen können. Durch die Additivität thermischer Wirkung kann die notwendige Spitzentemperatur gesenkt werden, ohne dass die räumliche Präzision leidet. Werden 10<sup>9</sup> Nanosekundenpulse appliziert, so sollte sich der gleiche thermische Effekt wie bei einem Puls mit einer Länge von 100 µs ergeben. Mit hochrepetitiven Lasersystemen können derart hohe Pulszahlen in vertretbarer Zeit appliziert werden. Verdampfung von Wasser begrenzt die maximale Temperatur, die ohne mechanische Schäden im Gewebe erzeugt werden kann, und legt damit auch die minimale Zeit fest, in der Gewebe mit hoher Ortsauflösung thermisch zerstört werden kann. Bei Partikeln mit Durchmessern im Submikrometerbereich können jedoch auf der Partikeloberfläche sehr hohe Temperaturen erreicht werden, ohne dass es zur Verdampfung von Wasser kommt. Während für makroskopische Strukturen die Verdampfungsschwelle im Gewebe bei ungefähr 100 °C liegt, steigt die Verdampfungstemperatur bei mikroskopischen Absorbieren durch den Einfluss der Oberflächenspannung stark an, da für die Entstehung von Gasblasen im Wasser Nukleationskeime notwendig sind. Ohne diese Keime ist eine Überhitzung möglich. Ex-

perimentell wurden 280 °C erreicht [9]. Die theoretische Grenze liegt bei etwa 300 °C. Mit einer einfachen Betrachtung wird plausibel, dass mit kleiner werdendem Durchmesser des erhitzten Volumens die Verdampfungstemperatur ansteigen muss. Entsteht an einem Nukleationskeim eine Blase mit dem Durchmesser *d*, so muss, damit sie weiter wachsen kann, der Dampfdruck *P<sub>D</sub>* des erhitzten Wassers größer sein als die Summe aus hydrostatischem Druck *P<sub>h</sub>* und dem Druck, der durch die Oberflächenspannung *σ* des Wassers in der Blase erzeugt wird.

$$P_D > P_h + \frac{4\sigma}{d} \quad (4)$$

Der Beitrag der Oberflächenspannung nimmt unterhalb von einigen Mikrometern mit abnehmendem Blasendurchmesser stark zu. Bei 2 µm beträgt er bereits 1 bar und steigt bei 10 nm Durchmesser auf über 200 bar. Die Temperatur, die notwendig ist, um diesen Dampfdruck zu erzeugen, steigt damit ebenfalls auf über 200 °C bei 100 nm Partikeldurchmesser. Diese Abschätzung zeigt, dass in kleinen Volumina durchaus sehr hohe Temperaturen erreicht werden können, ohne dass es zu einer Verdampfung von Wasser kommt. Experimentell wurde an 2 µm großen Melaninpartikeln schon eine Verdampfungstemperatur von 150 °C gemessen [9]. Vergleicht man für eine bestimmte Absorbergröße die Verdampfungstemperatur mit der Temperatur, die innerhalb der Zeit für den thermischen Einschluss (Gleichung 1) thermische Schäden erzeugt, so fällt ein interessanter Effekt auf. Unterhalb eines Durchmessers von 1 µm steigt die Verdampfungstemperatur stärker an als die nach der Arrheniusgleichung (2) extrapolierte Temperatur. Falls die Extrapolation des Arrheniusgesetzes in diesen Zeitbereich zulässig ist, ergibt sich hier ein weiteres Fenster für thermische Schäden mit einer räumlichen Ausdehnung im Nanometerbereich. Effekte durch Stoßwellen können durch Wahl einer ausreichend langen Pulsdauer verhindert werden, da bis in den Nanometerbereich die Zeit für den akustischen Einschluss geringer ist als für den thermischen Einschluss.

Nach diesen Abschätzungen besteht durchaus die Möglichkeit selektiver thermischer Effekte mit makromolekularer Präzision. Am Medizinischen Laserzentrum Lübeck werden deshalb „thermische Nanoeffekte“ und die ihnen zu Grunde liegenden physikalisch-chemischen Mechanismen an Modellsystemen untersucht [10]. Wegen ihrer Rolle bei thermischen Zellschäden und ihrer Bedeutung für den Zellstoffwechsel werden die thermischen Effekte an Proteinen, die an stark absorbierende Eisenoxid- oder Goldpartikel gekoppelt sind, untersucht. Derartige Partikel werden für magnetische Aufreinungsverfahren oder für Antikörpermarkierungen in der Elektronenmikroskopie verwendet. Eisenoxidpartikel decken einen Größenbereich von 100 nm bis 6 µm ab, während Goldpartikel in Größen von einigen Nanometern bis 80 nm erhältlich sind. Für das Modellsystem werden Enzyme ausgewählt, deren Funktion einfach und empfindlich mit spektroskopischen Verfahren (Absorption, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz) nachweisbar sind. Die Abnahme der Enzymaktivität der an die Absorber gekoppelten Proteine wird nach Bestrahlung mit verschiedenen Pulsängen und Pulsenergien gemessen. Mittels Temperaturrechnungen kann so auf die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Oberflächentemperatur und der Heizzeit geschlossen werden. Parallel dazu wird die Denaturierungskinetik direkt mit einem Temperatursprungexperiment bestimmt, bei dem die thermische Denaturierung der Proteine zeitaufgelöst durch Absorptionsmessungen verfolgt wird. Eine Zeitauflösung von 300 µs wurde bisher verwirklicht, angestrebt wird 1 µs. Mit diesen Messungen soll die Arrheniusgleichung der Denaturierungsraten bei den untersuchten Proteinen direkt verifiziert werden. Bisherige Experimente mit al-

kalischer Phosphatase, für die ein einfaches und sehr empfindliches Funktionsassay zur Verfügung steht, zeigen, dass mit 3 µm großen Absorbieren eine Inaktivierung mit einzelnen Pulsen, deren Dauer wenige Mikrosekunden beträgt, nicht möglich ist. Die erreichbaren Oberflächentemperaturen, die bei diesen Partikeln nur wenig über 100 °C liegen, sind nicht ausreichend für eine Inaktivierung in Mikrosekunden. Erst nach Bestrahlung mit Pulsereihen von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> Pulsen sinkt die Aktivität der Phosphatase (Abb. 7).

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Prinzip der selektiven Photothermolyse erlaubt eine selektive Zerstörung von Gewebsstrukturen, die für eine Reihe von therapeutischen Anwendungen ausgenutzt werden kann. Die Präzision ist ausreichend, um einzelne Zellen im Zellverband gezielt zu zerstören, sofern starke Absorber eingelagert sind. Neben etablierten Verfahren zur Behandlung von Gefäßmissbildungen und Pigmentstörungen sowie der Entfernung von Tätowierungen sind auch neue medizinische Anwendungen in der klinischen Erprobung. Dabei stellen sich auch eine Reihe neuer technisch-wissenschaftlicher Probleme. Wie lassen sich Mikrosekundenpulse mit einer Wiederholrate von einem kHz mit für die Klinik tauglichen Lasern erzeugen? Wie ist eine Visualisierung von Effekten mit Einzelzellpräzision möglich, um die Behandlung zu steuern?

Die Frage nach den Grenzen der selektiven Photothermolyse führte zu dem Konzept laserinduzierter Nanoeffekte, die mittels ziel-spezifischer exogener Absorber erzeugt werden sollen. Sollte es sich als möglich erweisen, einzelne Proteine zu inaktivieren, könnten sich völlig neue medizinische oder biologische Anwendungen ergeben, bei denen die Nanopartikel mittels geeigneter Trägersysteme, wie zum Beispiel Antikörper oder Lipoproteine, an entsprechende Zielstrukturen gebracht werden. Eine Zerstörung bestimmter Rezeptoren oder Proteine in Zellen, die sich in größeren Zellverbänden oder im Gewebe befinden, eröffnet Möglichkeiten, nicht nur Zellen zu zerstören, sondern auch gezielt ihre Funktionen zu modifizieren.

## 6 Literatur

- [ 1 ] R. R. ANDERSON, J. A. PARRISH: *Selective Photothermolysis: Precise Microsurgery by Selective Absorption of Pulsed Radiation*. Science **220** (1983) 524-527
- [ 2 ] R. BIRNGRUBER, F. HILLENKAMP, V. P. GABEL: *Theoretical Investigations of Laser Thermal Retinal Injury*. Health Phys. **48** (1985) 781-796
- [ 3 ] M.A. LATINA, C. PARK: *Selective Targeting of Trabecular Meshwork Cells: In Vitro Studies of Pulsed and CW Laser Interactions*. Exp. Eye Res. **60** (1995) 359-371
- [ 4 ] C.P. LIN, M. W. KELLY, S. A. B. SIBAYAN, M. A. LATINA, R. R. ANDERSON: *Selective Cell Killing by Microparticle Absorption of Pulsed Laser Radiation*. IEEE J. Selec. Topics Quant. Electr. **5** (1999) 963-968



**HANNOVER  
MESSE**  
20.-25. MÄRZ 2000  
HALLE 4 STAND G42



**GUNTER  
GEITHNER**  
Mechanische Fertigung

Gunter Geithner GmbH  
Göschwitzer Straße 20  
D-07745 Jena  
Telefon: 0 36 41 - 60 77 42  
Telefax: 0 36 41 - 60 77 55  
E-Mail: gunter-geithner-gmbh@t-online.de  
URL: www.gunter-geithner.de

## Erfolg hat gute Gründe:

# 1. Präzision 2. Vertrauen



- [ 5 ] M. J. C. VAN GEMERT, A. J. WELCH, J. W. PICKERING, O. T. TAN: *Laser Treatment of Port Wine Stains*. In: A.J. Welch, M.J.C. van Gemert (ed.): *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. Plenum Press, New York (1995)
- [ 6 ] C. DIERICKX, M. B. ALORA, J. S. DOVER: *A Clinical Overview of Hair Removal Using Lasers and Light Sources*. Dermatol. Clin. **17** (1999) 357-366
- [ 7 ] J. ROIDER, F. HILLENKAMP, T. FLOTTE, R. BIRNGRUBER: *Microphoto-coagulation: Selective Effects of Repetitive Short Laser Pulses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) 8643-8647
- [ 8 ] M.A. LATINA, S.A. SIBAYAN, D.H. SHIN, R.J. NOECKER, G. MARCELLINO: *Q-switched 532-nm Nd:YAG Laser Trabeculoplasty (Selective Laser Trabeculoplasty)*. Ophthalmology **105** (1998) 2082-2088
- [ 9 ] M.W. Kelly: *Intracellular Cavitation as a Mechanism of Short-Pulse Laser Injury of the Retinal Pigment Epithelium*, Dissertation, Tufts University Boston (1997)
- [ 10 ] G. HÜTTMANN, R. BIRNGRUBER: *On the Possibility of High-Precision Photothermal Microeffects and the Measurement of Fast Thermal Denaturation of Proteins*. IEEE J. Selec. Topics Quant. Electr. **5** (1999) 954-962

Forschungs- und Entwicklungsprojekte  
Auftragsforschung

- Lasermedizin
- Biophotonik
- Medizintechnik
- Lasermaterialverarbeitung

## Medizinisches Laserzentrum Lübeck GmbH

Wissenschaftliche Einrichtung an der  
Medizinischen Universität zu Lübeck



Peter-Monnik-Weg 4  
23562 Lübeck

Tel.: 0451/500-6500  
e mail: mail@mil.mu-luebeck.de

Fax: 0451/50 54 86  
www: http://www.mu-luebeck.de

