

Aus der Abteilung Diagnostische Radiologie

(Prof. Dr. med. J. Lotz)

im Zentrum Radiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Evaluation der Messgenauigkeit des *optix* - Systems

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dennis Eckner

aus

Oberhausen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatterin : Prof. Dr. med. Obenauer
- II. Berichterstatter/in : Prof. Dr. med. Alves
- III. Berichterstatter/in : Priv.-Doz. Dr. Wouters

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2011

I	Einleitung	1
I.1	Stand der Wissenschaft	1
I.2	Optische Bildgebung	3
I.2.1	Allgemeines	3
I.2.2	Das Verhalten von Licht an Grenzflächen	9
I.3	Das CW – Verfahren im Vergleich zur TD – Methode	10
I.3.1	Mathematische Grundlagen	13
I.3.2	Temporal Point Spread Function	14
I.4	Fragestellung	17
II	Material und Methoden	18
II.1	Allgemeines	18
II.2	Optical Molecular Imager „optix“	18
II.2.1	Grundlegender Aufbau des Systems	19
II.3	Software „Art Analysis Workstation“	20
II.3.1	Scanparameter	21
II.4	Flat panel VCT	23
II.4.1	Grundlegender Aufbau des flat panel VCT	23
II.5	Phantom	25
II.6	Messungen an der toten Maus	28
II.7	Der Farbstoff Cy5.5	29
II.7.1	Herstellung der Cy5.5 – Lösung	32
II.8	Grundlagen des Eindeckmittels Paraffin	32
II.9	Versuchsanordnungen	33
II.9.1	Versuche vor Kalibrierung des Systems	33
II.9.1.1	Tiefenmessungen	34
II.9.1.2	Konzentrationsmessungen	35
II.9.2	Versuche nach Kalibrierung des Systems	36

II.9.3	Versuche an der Maus	37
II.10	Auswertung	38
II.10.1	Statistische Auswertung	40
II.10.2	Qualitätsansprüche	40
III	Ergebnisse	42
III.1	Ergebnisse vor Kalibrierung des Systems	42
III.1.1	Tiefenmessungen	42
III.1.1.1	Messreihe mit 50 µl Volumina	42
III.1.1.2	Messreihe mit 80 µl Volumina	44
III.1.2	Konzentrationsmessungen	46
III.2	Ergebnisse nach Kalibrierung des Systems	49
III.2.1	Tiefenmessungen	49
III.2.2	Konzentrationsmessungen	51
III.2.3	Messungen an der Maus	53
III.2.3.1	Ergebnisse der Messungen	53
IV	Diskussion	56
IV.1	Allgemeines	56
IV.2	Continuous - wave versus time - domain - Technik	57
IV.3	Diskussion der Ergebnisse	59
V	Zusammenfassung	66
VI	Anhang: optix - Abbildungen	68
VII	Literaturverzeichnis	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
ART	Advanced Research Technologies
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CCD	charge – coupled – device
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
c_{real}	reale Konzentration
CT	Computertomograph
CW	continuous – wave
Cy5.5	Indodicarbocyanin
3D	Dreidimensional
d	Tiefe
DANN	Desoxyribonucleinsäure
d_{real}	reale Tiefe
enzymat.	enzymatisch
ε	spezifischer Extinktionskoeffizient
et al.	und andere
exp	Exponentialfunktion
Fa.	Firma

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

fp	flat panel
fp VCT	flat - panel Volumen – Computertomograph
GA	Gage
GE	General Electrics
GHz	Gigahertz
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Hr.	Herr
I	Intensität (durch Lösung getretene)
I_0	Intensität
ICG	Indiozyaningrün
I_f	Fluoreszenzintensität, gemessen
Inc.	Incorporation
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
I_x	Anregungsintensität
K	Extinktionskoeffizient
Kap.	Kapitel
K_F	Abklingkonstante durch Fluoreszenz
LIMA	light mammography apparatus
ln	natürlicher Logarithmus
log	Logarithmus
MB	Megabyte
Mittelw.	Mittelwert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
MSCT	Mehrschicht – Spiral – Computertomographie
$\mu_{a,F}$	Absorptionsquerschnitt
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μW	Mikrowatt
mua	milli-unit-absorption
musp	milli-unit-scattering-percent
n	Anzahl
NIR	near – infrared
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	Nanosekunde
o.g.	oben genannt
OCT	optische Kohärenztomographie
od.	Oder
p	P – Wert (statistisch)
PC	Personal Computer
pc	Intensität
π	Fluoreszenzlebensdauer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Pos.	Position
ps	Pikosekunde
r	Korrelationskoeffizient
ROI	Region of interest
s	Sekunde
σ	Standardabweichung
sog.	sogenannt(e)
SPECT	Single photon emission computed tomography
St.	Sankt
Str.	Straße
Tab.	Tabelle
TCSPC	time-correlated single photon counting
TD	time – domain
TPS	temporal – point – spread
TPSF	Temporal – point – spread – function
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
x	Schichtdicke
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	5
Abb. 2:	8
Abb. 3:	11
Abb. 4:	14
Abb. 5:	15
Abb. 6:	16
Abb. 7:	19
Abb. 8:	22
Abb. 9:	24
Abb. 10:	26
Abb. 11:	30
Abb. 12:	38
Abb. 13:	43
Abb. 14:	44
Abb. 15:	45
Abb. 16:	47
Abb. 17:	48
Abb. 18:	48
Abb. 19:	50
Abb. 20:	51
Abb. 21:	52

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 22:	_____	54
Abb. 23:	_____	55
Abb. 24:	_____	61
Abb. 25:	_____	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	_____	12
Tab. 2:	_____	27
Tab. 3:	_____	29
Tab. 4:	_____	34
Tab. 5:	_____	35
Tab. 6:	_____	36
Tab. 7:	_____	37
Tab. 8:	_____	39
Tab. 9:	_____	39
Tab. 10:	_____	43
Tab. 11:	_____	46
Tab. 12:	_____	50

I Einleitung

I.1 Stand der Wissenschaft

In den vergangenen Jahren etablierte sich neben den herkömmlichen Verfahren in der Medizin mehr und mehr die Möglichkeit der molekularen, optischen Bildgebung.

Dies ist nicht zuletzt zurückzuführen auf die Entdeckung der DNA-Struktur durch Watson und Crick im Jahre 1953 (Watson und Crick 1953), das fortschreitende Verständnis des menschlichen Genoms nach dessen Entschlüsselung und Sequenzierung (Lander et al. 2001), Neuerungen auf den Gebieten der Molekular- und Zellbiologie sowie auf den damit verbundenen Wissenszuwachs gerade auch in der onkologischen oder pharmakologischen Disziplin. Gerade hier werden durch das Verständnis von Genfunktionen, deren Veränderung und dem daraus resultierenden Effekt auf die einzelnen Organ- und Körpersysteme große Fortschritte verzeichnet.

Die molekulare Bildgebung gliedert sich in diesen Prozess ein.

Versucht man den Begriff der molekularen Bildgebung zu definieren, so bietet sich eine Umschreibung von Weissleder an, der diese als „in vivo Charakterisierung und Messung von biologischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene“ (Weissleder und Mahmood 2001, S.316) bezeichnet. Ob diese Betrachtungen mit den Mitteln der Magnetresonanztchnik, der nuklearen Bildgebung unter Zuhilfenahme des SPECT oder wie in dieser Arbeit mit optischen Systemen vorgenommen werden, es lassen sich mit all diesen Techniken neue, wichtige Erkenntnisse über die biologischen Abläufe bis auf die molekulare Ebene beobachten und nachvollziehen.

Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms besteht die heutige Aufgabe darin, mit Hilfe von u.a. bildgebenden Verfahren die Übertragung des genetischen Codes in Proteine nachzuvollziehen, da diese eine zentrale Rolle in der Zellfunktion einnehmen. Die Molekularwissenschaftler, die in diese Sparte arbeiten und forschen, nennen sich *Proteomiker*; zusammen mit den *Genomikern* prophezeien sie einen Paradigmenwechsel hin zu einer Neudefinition von Krankheit als eine Form molekularer Abnormität .

So ist die bis heute zu diagnostischen Zwecken durchgeführte Bildgebung zwar in der Lage, anatomische und morphologische Strukturen darzustellen, doch ist sie wenig sensitiv im Hinblick auf Veränderungen auf molekularer Ebene und greift so erst spät in die Krankheitsentstehung bzw. -verhinderung ein.

Die Molekularmedizin und ihre bildgebenden Tochterdisziplinen hingegen zielen darauf ab, spezielle Risikogruppen schon früh durch molekulare Screeningmethoden zu erfassen und so die Krankheit schon vor ihrer Entstehung zu therapieren.

Die Molekularmedizin lässt sich in 3 Säulen einteilen, zu denen die „In – vivo – Screenings“, die „molekulare Bildgebung“ sowie die „molekulare Therapie“ gehören.

Dieses frühe Eingreifen in das Krankheitsgeschehen erhöht nicht nur die Überlebensraten, es senkt zudem die Kosten der Diagnostik und Therapie, was in der heutigen Zeit mit mehr und mehr steigendem Kostendruck von nicht unerheblicher Wichtigkeit zu sein scheint (Lamerichs et al. 2003).

I.2 Optische Bildgebung

I.2.1 Allgemeines

Die optische Bildgebung wird heute vor allem zur Detektion von Genexpressionen und Protein-Ligand-Interaktionen eingesetzt. Nach teilweise noch bestehenden Problemen mit in - vivo - Versuchen blieb sie zunächst auf in - vitro - Messungen beschränkt. Heute rücken allerdings immer mehr in - vivo - Messungen durch Beseitigung von Störfaktoren in den Vordergrund. Kontrastquellen zur Visualisierung von durch optische Bildgebung erfassten Daten sind hierbei die Absorption, Reflexion, Fluoreszenz und Biolumineszenz.

Die heute gebräuchlichen Techniken - wie auch das in dieser Arbeit verwendete *optix* - System - beschränken sich noch auf präklinische, experimentelle Bildgebung an Kleintieren.

Jedoch haben schon mehrere in - vivo - Studien auf dem Gebiet der Mammographie die Vorteile, aber auch die Problematik der optischen Bildgebung dargelegt. So wurde auf der Basis von Transmission mit sinusförmig moduliertem Laserlicht im Frequenzbereich von einigen Megahertz als Bildinformation neben der Amplitude der Lichtimpulse auch die Phasenverschiebung gegenüber der Lichtquelle genutzt (Grosenick et al. 1997; Pogue et al. 1997), zwei Mammographiesysteme von Zeiss und Siemens für die klinische Anwendung entworfen.

Eine Studie mit dem Siemensmammascanner an 200 Patientinnen ergab, dass Tumoren $> 1\text{cm}$ mit einer Sensitivität von 90 % detektiert werden können, wohingegen Tumoren $\leq 1\text{cm}$ eine deutlich niedrigere Sensitivität von 65 % aufwiesen. Inhomogene, mastopathische Veränderungen führten hierbei zu den meisten falsch-positiven Befunden bei einer berichteten Spezifität von nur 28% (Götz et al. 1996; Riefke et al. 1997).

Die Apparatur von Zeiss, *LIMA* („light mammography apparatus“) zeigte in einer Studie mit 37 Tumorpatientinnen, dass 10 Tumoren nicht detektiert, 11 hingegen richtig in Bezug auf die Größe erkannt wurden. Aussagen zur Spezifität dieses Systems wurden aufgrund der geringen Patientinnenzahl nicht getroffen (Kaschke et al. 1994).

Es sei allerdings auch erwähnt, dass die *Fa. Advanced Research Technologies Inc.*, kurz *ART*, momentan in ihrer Produktübersicht auch ein System namens *Softscan*® vermarktet. Das System befindet sich laut Herstellerangaben in der letzten klinischen Entwicklungsphase. Die erste klinische Studie mit diesem 4 Wellenlängen umfassenden NIR – System an 49 Frauen zwischen 24 und 80 Jahren ergab einen signifikanten Messunterschied zwischen gut- und bösartigen Läsionen der Mamma ($p = 0,0184$), welche übereinstimmten mit der konventionellen Mammographie (Intes 2005). Gerade diese Unterscheidung zwischen Gut- und Bösartigkeit der Läsionen schien aufgrund der geringen Unterschiede der optischen Eigenschaften in der Vergangenheit schwierig. Inwieweit Systeme wie *SoftScan*® in Zukunft Einsatz im klinischen Alltag finden werden, bleibt also abzuwarten.

Alle Techniken im Bereich der optischen Bildgebung basieren auf der allgemeinen Idee, definierte Lichtimpulse auf ein zu untersuchendes Medium zu lenken und daraus entstehende Veränderungen der Lichtqualität sowie -quantität zu messen. Dabei spielen wichtige Einflussgrößen wie die Absorption, Streuung, Reflektion oder Extinktion der Lichtimpulse, aber auch die Eigenschaften des Mediums selbst, eine entscheidende Rolle.

So unterteilt man transmittierte Photonen prinzipiell in 3 Anteile: die sog. ballistischen Photonen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie das Gewebe ohne Streuung durchlaufen. Daneben unterscheidet man die nur schwach gestreuten von den diffus gestreuten Photonen. Schwach gestreute Photonen bewegen sich parallel zur Ausbreitung des Lichtes, diffus gestreute hingegen werden stark abgelenkt und sind so für die räumliche Verteilung sowie mitunter geringe Ortsauflösung optischer Bilder verantwortlich (Riefke et al. 1997; Abb. 1).

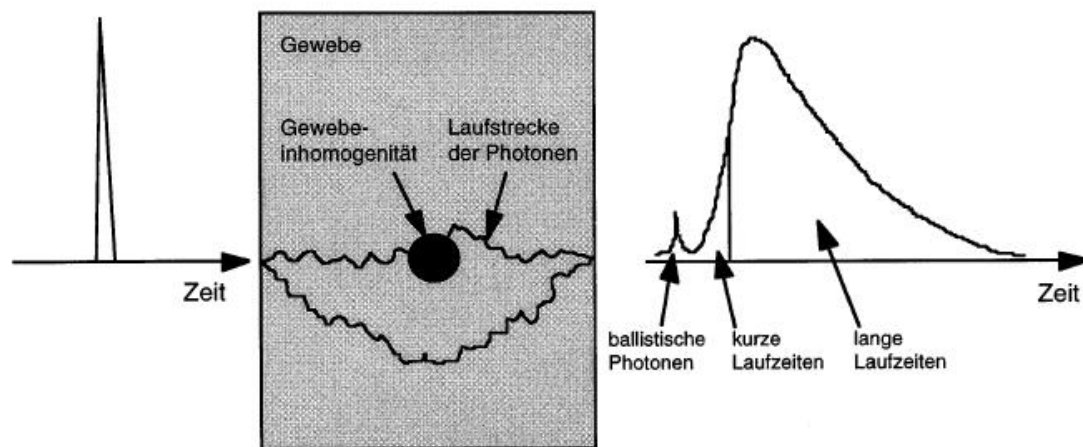


Abb. 1: Durchtritt von kurzen Laserimpulsen durch ein Streumedium in einer schematischen Darstellung. Das Profil der Laufzeitverteilung ist charakteristisch für das Absorptions- und Streuverhalten des durchstrahlten Mediums. Ballistische Photonen sind in dicken Gewebeschichten nicht nachweisbar (Riefke et al. 1997, S.751).

Als Lichtquelle wird heute zumeist Licht aus dem nahen Infrarotbereich (600 – 900nm) gewählt, da dieses aufgrund der relativ niedrigen Absorptionskoeffizienten mehr als 10cm tief in Gewebe eindringen kann. Unter 600 bzw. über 900nm Wellenlänge steigt die Absorption stark aufgrund der hohen Absorption von Hämoglobin bzw. Wasser. Dieser Bereich der größten optischen Transparenz wird daher auch „diagnostisches Fenster“ genannt. Im Falle des *optix* - Systems beträgt die Laserwellenlänge 670nm, die Detektionswellenlängen liegen bei 635, 670, 730 und 780nm. In anderen verwandten Systemen sind auch andere Wellenlängen möglich.

Um mit diesen Systemen eine hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen, müssen zumeist spezifische optische Kontrastmittel verwendet werden, die durch die Lichtimpulse angeregt und deren Fluoreszenz sodann gemessen werden können.

So können Kontrastmittel allgemein in 3 Klassen untergliedert werden; diese sind die unspezifischen, die spezifischen sowie die aktivierbaren Kontrastmittel (Abb. 2).

Schon früh wurde begonnen, mit solchen Fluorochromen zu arbeiten. Einer der ersten Vertreter, der in mehreren Studien sowie klinischen Anwendungen eingesetzt wurde, ist Indiozyaningrün (ICG). Dieser wird heute in der Augenheilkunde zur Angiographie der Retina erfolgreich und nebenwirkungsarm eingesetzt, aber auch bei speziellen Fragestellungen in der Herz-Kreislauf-Physiologie zur Bestimmung des Herzzeit- und Schlagvolumens in der Leberfunktionsdiagnostik oder der experimentellen optischen Brusttumorsuche (Leevy et al. 1967; Flower and Hochheimer 1976; Schad et al. 1977; Slakter et al. 1995; Ntziachristos et al. 2000).

Unter den neueren Fluorochromen wurden in der Vergangenheit bereits hochempfindliche Sonden industriell gefertigt, die in der Lage sind, als „intelligente“ optische Kontrastmittel zu fungieren. Dies geschieht meist durch enzymatisch getriggerte Konformitätsänderungen, wodurch das Kontrastmittel erst in einen fluoreszierenden Zustand versetzt wird. Hier sind die Begriffe „Quenching“ und „Dequenching“ von zentraler Bedeutung. Quenching beschreibt das Phänomen, dass Fluorochrome, die sich in enger räumlicher Nähe befinden, gegenseitig in ihrem Signal auslöschen.

Koppelt man also mehrere Fluorochrome wie das auch in dieser Arbeit verwendete Cy5.5 an ein Makromolekül, kommt es innerhalb dieses Moleküls zu einer annähernd vollständigen Signalauslöschung. Werden die Fluorochrome sodann proteolytisch abgespalten, lässt sich ein optisches Signal detektieren, man spricht vom Dequenching (Bremer et al. 2001).

Dies erscheint deshalb von großem Interesse, da viele Tumoren eine starke Überexpression von Proteasen aufweisen und somit ein deutliches optisches Signal in diesen Regionen zu erwarten ist, welches zu einer guten Tumordetektion führen könnte (Edwards and Murphy 1998; Mahmood et al. 1999; Koblinski et al. 2000).

Die Fluorochromen, die den optisch aktiven Teil eines Kontrastmittels darstellen, müssen bestimmte Eigenschaften erfüllen, um optimale Ergebnisse zu liefern.

Hierzu gehören:

- Emissionsmaximum zwischen 700 und 900nm
- hohe Quanteneffizienz
- geringe Überlappung zwischen Exzitations- und Emissionsspektrum
- Photostabilität
- biologische Verträglichkeit
- Möglichkeit gezielter chemischer Kopplung
- günstige Herstellungswege für die in klinischen Anwendungen benötigten Mengen.

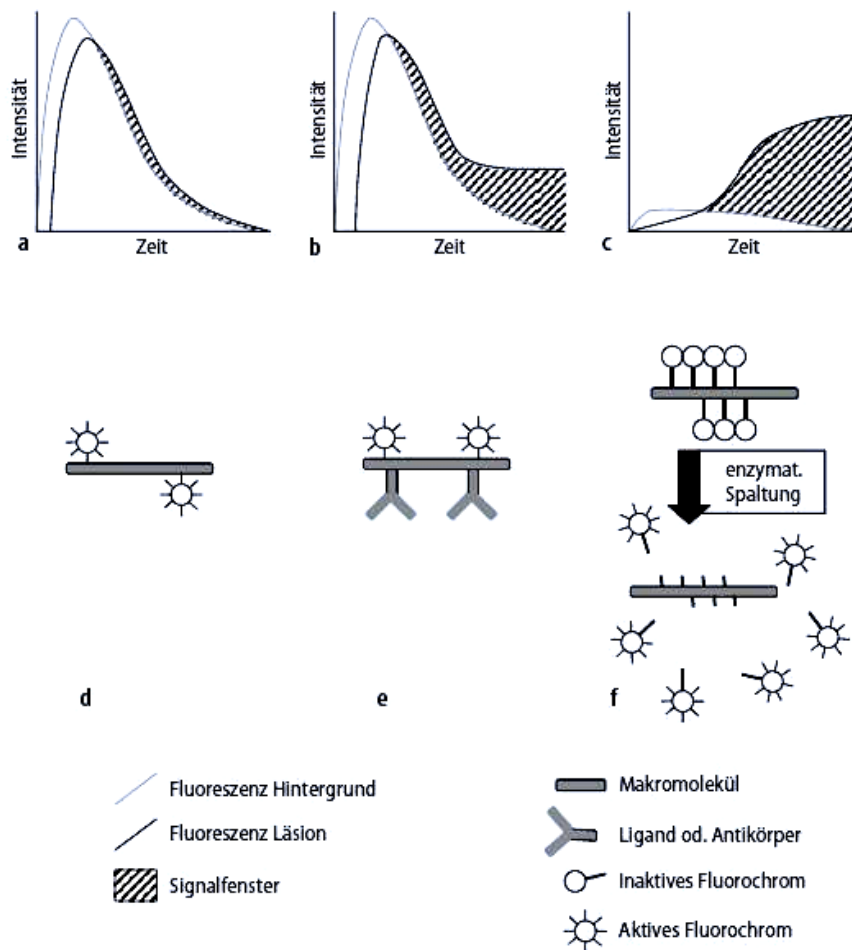


Abb. 2: **a-c** zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von Hintergrund (*graue Linie*) und Läsion (*schwarze Linie*), darunter (**d-f**) die schematische Struktur der jeweiligen Kontrastmittelklasse. **a,d** Unspezifische Kontrastmittel, bei denen das Fluorochrom an ein Makromolekül gebunden ist, zeigen nur eine gering längere und verzögerte Anfärbung in Läsionen mit erhöhter Vaskularisation und Kapillarpermeabilität. Das Signalfenster ist in Höhe und Dauer begrenzt. **b,e** Spezifische Kontrastmittel binden an definierte Zielmoleküle in der Läsion und haben daher dort eine längere Halbwertszeit sowie eine höhere Konzentration als im Plasma. Das diagnostische Fenster ist besonders im zeitlichen Verlauf erweitert. **c,f** Aktivierbare Kontrastmittel haben dank der dichten Anordnung der Fluorochrome im inaktiven Zustand kaum Hintergrundfluoreszenz. Im Gegensatz zu den anderen Kontrastmittelklassen baut sich das Signal erst nach Reaktion mit einem Zielmolekül (z.B. einem Enzym) auf. Das Signalfenster ist sowohl in der Höhe als auch in der Zeit wesentlich erweitert (Funovics 2007, S. 54)

I.2.2 Das Verhalten von Licht an Grenzflächen

Trifft Licht auf ein wie auch immer geartetes Streumedium, sind mehrere Parameter zu bedenken.

Generell umschrieben wird Licht beim Durchtritt durch Materie geschwächt. Dies geschieht zum einen durch die Anregung von Atomen der Substanz, Licht wird folglich absorbiert, zum anderen durch Ablenkung des Lichtes aus der Geradeausrichtung, was als Streuung bezeichnet wird (Abb. 3).

Fasst man die Größen Streuung und Absorption zusammen und interessiert sich für die gesamte Schwächung des Lichtes im Medium bzw. einer Lösung, so spricht man von der Extinktion; diese ist einem Exponentialgesetz unterworfen (Formel 1; Seibt 1999).

$$I = I_0 e^{-Kx}$$

Formel 1 : Intensität (I) einer Lichtquelle in Abhängigkeit von der Schichtdicke (x)
und dem Extinktionskoeffizienten (K)

Die Extinktion ist dabei definiert als dekadischer Logarithmus des Verhältnisses I_0/I , wobei I_0 die Intensität und I die durch die Lösung hindurch gelassene Intensität widerspiegelt. Für Lösungen, wie sie in dieser Arbeit in Form von Farbstofflösungen verwendet werden, zeigt sich des Weiteren, dass der Extinktionskoeffizient K zur Konzentration einer Lösung proportional ist.

Fasst man nun die Größen K sowie den dekadischen Logarithmus von I_0/I zu einer neuen Konstanten zusammen, erhält man den spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ .

In Formel 2 ist dieser spezifische Extinktionskoeffizient im Lambert - Beerschen Gesetz dargestellt. Dieses Gesetz tritt für verdünnte Lösungen in Kraft und gestattet unter anderem die Bestimmung von Konzentrationen, wie sie z.B. in der photometrischen Bestimmung des Blutzuckers eingesetzt werden.

$$E = \varepsilon \times c \times x$$

Formel 2 : Lambert - Beersche Gesetz (bei konstanter Schichtdicke ist die Extinktion proportional zur Konzentration der Lösung)

Durch eben diese bekannten Beziehungen, ergänzt durch weitere spezifische Parameter wie in Kap. I.3.1, wird es in der optischen Bildgebung möglich, Konzentrationen und deren Gewebs- bzw. Organverläufe in vivo zu erfassen.

I.3 Das CW – Verfahren im Vergleich zur TD – Methode

Die bisher geläufigen Messungen auf dem Gebiet der optischen Bildgebung durch Licht erfolgen mit der continuous wave (CW) - Technik oder mit intensitätsmoduliertem Licht. CW-, sowie die hier verwandte time domain (TD) - basierende, Technik beruhen auf der Idee, ausgesandtes Licht in Form von Photonen, die typischerweise durch eine einfache Lichtquelle bzw. einen Laser erzeugt werden durch Gewebe zu detektieren und die Änderungen des Lichtverlaufes festzuhalten (Siegel et al. 1999).

Die CW - Technik ist dabei nicht in der Lage, die Photonen nach ihrer Detektion zeitlich zu differenzieren; gemessen werden somit immer alle dargebotenen Photonen, und das zeitgleich. Dies führt dazu, dass nicht zwischen absorbierten und damit in der Intensität geschwächten und durch das Gewebe gestreuten Photonen unterschieden werden kann (Long und Vernon 2004). Durch diese fehlende Diskriminierung der durch das Gewebe durchtretenden Photonen ist es nicht möglich, auf die Lage der detektierten Struktur zu schließen.

Auch heute werden in der optischen Bildgebung alle 3 genannten Methoden verwendet. Die wohl einfachste ist hierbei wie bereits bezeichnet die Möglichkeit, Licht einer bestimmten Wellenlänge mit konstanter Intensität einstrahlen zu lassen (continuous wave). Die dabei entstehenden Intensitätsabschwächungen sind hierbei Grundlage für die Berechnung des Objektes selbst. Für eine weitere Steigerung des Informationsgehaltes

kann sodann intensitätsmoduliertes, ebenfalls kontinuierliches Licht herangezogen werden, welches sich dadurch auszeichnet, dass es neben der Intensitätsabschwächung auch die Phasenverschiebung zur Bilderzeugung nutzt; so wird es möglich, Streuung und Absorption von Medien getrennt voneinander zu beurteilen.

Zu guter Letzt lassen sich gepulste Infrarotlichtquellen verwenden, welche es ermöglichen, Photonen nach Durchstrahlung eines Gewebes zeitlich differenziert darzustellen (Jarlman et al. 1992; Grosenick et al. 1997; Bremer et al. 2001)

Die benutzte TD - Technik gibt gerade solche kurze, gepulste Lichtimpulse von einer Dauer < 100 Pikosekunden zu der zu untersuchenden und ebenfalls mit passendem Farbstoff markierten Struktur ab.

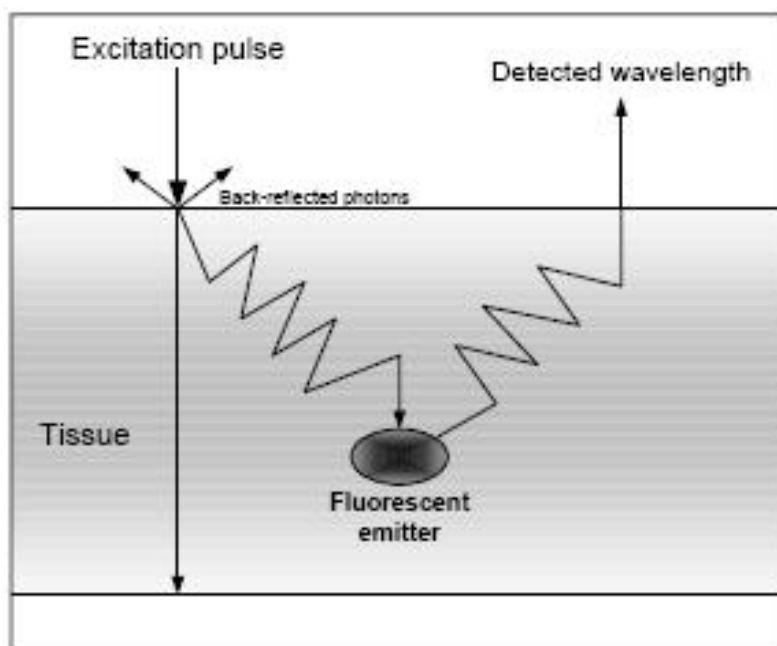


Abb. 3: Lichtverlauf in einem Medium (GE Healthcare 2004, S.25)

Im Gegensatz zum CW - Verfahren werden die wieder am Detektor erscheinenden Photonen zeitlich differenziert dargestellt. Die zeitliche Differenz wiederum ergibt sich aus den beschriebenen Absorptionen bzw. Streuungen im Gewebe. Durch diese Methode ergibt sich die Möglichkeit, einerseits die Tiefe eines eingebrachten Farbstoffes sowie dessen Lebensdauer zu bestimmen, zum anderen aber auch detaillierte Informationen über die Lösung als solches zu erhalten.

Eine Gegenüberstellung der propagierten Vorteile der TD - Technik ergibt sich aus Tab. 1. (Long und Vernon 2004, S.8).

Tab. 1: Gegenüberstellung der CW- mit der TD - Technik

	Continuous wave	Time domain
Fluoreszenzintensität	✓	✓
Biolumineszenzintensität	✓	✓
Nanomolares Detektionslimit	✓	✓
Tomographische Bildgebung	✓	✓
Tiefenmessung		✓
Konzentrationsbestimmung von planarem Scan		✓
Fluoreszenzlebensdauer		✓
Absorptionsmessung		✓
Streuungsmessung		✓

I.3.1 Mathematische Grundlagen

Betrachtet man die mathematischen Grundlagen des CW- und TD - Betriebs, so lassen sich folgende Gleichungen aufstellen.

Für die relative Fluoreszenzintensität im CW - Betrieb gilt:

$$\text{Formel 3:} \quad -\log(I_f / I_x) = k(\mu_{a,F} / \ln 10)k_F \int_0^{\infty} \exp(-t / \tau) dt .$$

Stellt man dieser Gleichung die Intensität im Pulse bzw. TD - Betrieb gegenüber, zeigt sich:

$$\text{Formel 4:} \quad -\log\{I_F(t) / I_x(t = 0)\} = k\varepsilon[F]k_F \int_0^t \exp(-t' / \tau) dt' ,$$

wobei F die Konzentration des Farbstoffes, $\mu_{a,F}$ den Absorptionsquerschnitt des Farbstoffes, k_F die Abklingkonstante durch Fluoreszenz, τ die Fluoreszenzlebensdauer, I_F die gemessene Fluoreszenzintensität, I_x die Anregungsintensität, ε den molaren Extinktionskoeffizienten und k die Konstante für die optische Interaktionslänge darstellt (Long and Vernon 2004).

Mithilfe der in den TD - Betrieb eingehenden zeitlichen Komponente wird es neben der Tiefenmessung und der weiteren propagierten Vorteile (Tab. 1) auch möglich, Streuungs- und Absorptionskoeffizienten zu berücksichtigen und in die Messergebnisse einfließen zu lassen. Welche Auswirkungen Streuung und Absorptionen hierbei auf die Messungen haben können, zeigt Abb. 4. Es wird wie zu erkennen unerlässlich, eben diese gestreuten und absorbierten Photonen in die Berechnung mit einzubeziehen, da ohne diese eine exakte Tiefen-, aber auch Konzentrationsbestimmung nicht möglich ist.

Letztlich lassen sich unter Berücksichtigung dieser mathematischen Grundlagen die Temporal Point Spread Function berechnen und anhand derer alle weiteren Ergebnisse ableiten.

I.3.2 Temporal Point Spread Function

Zur Darstellung der zeitlich diskriminiert gemessenen Photonen, also der Flugzeit der Fluoreszenzphotonen zum Detektor bezogen auf den Zeitpunkt des Anregungspulses, dient die Temporal Point Spread Function, kurz TPSF, ein Histogramm der Photonenlaufzeiten.

Sie beinhaltet Informationen über die Konzentration von Farbstoffen sowie ihre Tiefe in einem Gewebe bzw. einem Phantom und kann sie so mathematisch nutzbar machen.

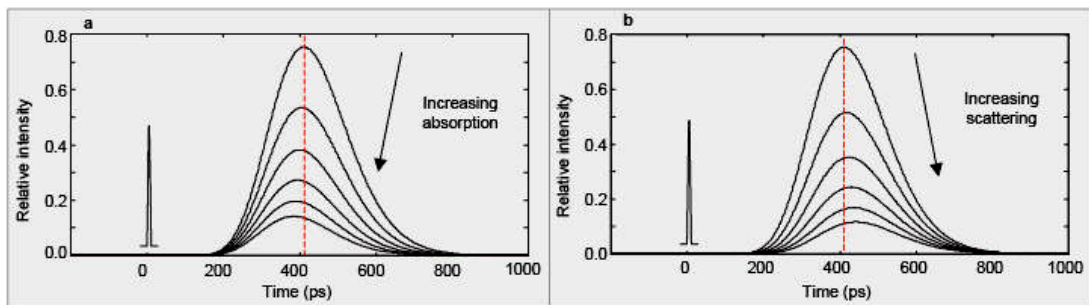


Abb. 4: Effekte der Absorption (a) und Streuung (b) einer theoretischen Photonenbewegung. Die Pfeile zeigen die Peakverschiebungen bei variablen Streuungen an Absorption an (Long und Vernon 2004, S.59)

Ein typischer TPSF - Kurvenverlauf wird in Abb. 5 dargestellt, wobei die gemessene Intensität über die Zeit betrachtet wird. Mit Hilfe dieser Kurve gelingt es, mehrere Parameter direkt aus dem Kurvenverlauf zu bestimmen.

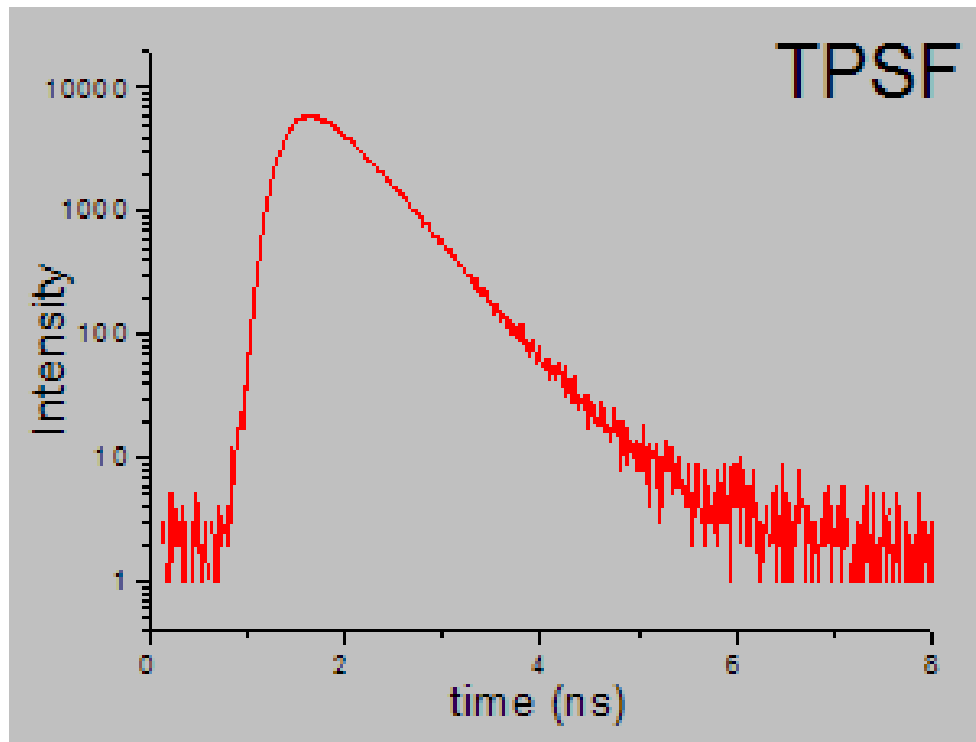


Abb. 5: Typischer TPSF - Kurvenverlauf, wobei die Intensität über die Zeit in ns dargestellt ist

Zunächst ist die Intensität bestimmbar durch die absolute Anzahl der detektierten Photonen, die Tiefe wird geschätzt aus der Position des Peaks der Kurve. Hier zeigt sich bei zunehmender Tiefe eine Peakverschiebung nach rechts, was bedingt ist durch die Verlängerung der Photonenlaufzeiten (Abb. 6). Des Weiteren berechnet sich die Fluoreszenzlebensdauer aus dem Abklingverhalten der Kurve; zudem kann die relative Konzentration bestimmt werden aus der Intensität und Tiefe.

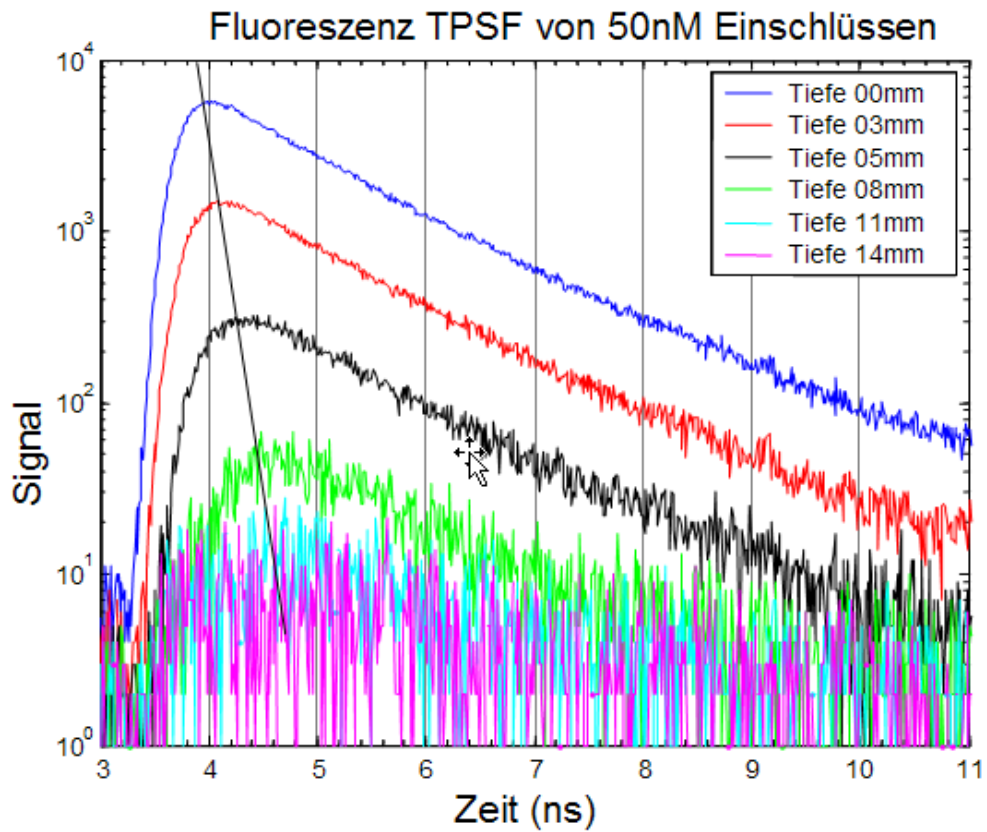


Abb. 6: Einfluss der Peakverschiebungen auf die gemessene Tiefe

Alle in dieser Arbeit bestimmten Messergebnisse leiten sich letztlich aus der TPS – Funktion ab, da diese Grundlage der Berechnungen durch die Software ist.

I.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll ein Optical Imaging System - *optix* - im Hinblick auf mehrere Parameter evaluiert werden.

Betrachtet werden sollen neben den optischen Eigenschaften wie den Konzentrations- und Tiefenmessungsmöglichkeiten des Systems auch dessen Möglichkeiten in der Detektion von Fluorochromen in Organismen (hier einer toten Maus).

Ebenso sollen in exemplarischen Maus- als auch in wiederholten Phantomexperimenten die bestehenden Vor- und Nachteile der optischen Bildgebung mit gepulstem Licht herausgearbeitet und kritisch mit bestehenden Studien verglichen werden.

Explizit soll versucht werden, folgende Fragen zu klären:

- Ist es mit dem benutzten Optical – Imaging – System möglich, Konzentrationen und Tiefen in einem standardisierten Phantom mit bekannten Kontrastmittelkonzentrationen zu erfassen?
- Lassen sich in diesem Phantom auch signifikante Tiefen- bzw. Konzentrationsänderungen feststellen?
- Welche Zusammenhänge bestehen zwischen Konzentrationen und gemessenen Tiefen?
- Lassen sich die in eine tote Maus eingebrachten Kontrastmittelmengen detektieren und decken sich die tomographischen Verhältnisse mit denen einer computertomographischen Messung?

II Material und Methoden

II.1 Allgemeines

Im Folgenden werden alle zur Durchführung der Experimente benötigten Materialien vorgestellt und Hersteller bzw. Quellen eindeutig angegeben. Zudem finden sich zu den durchgeführten Versuchen alle Angaben bezüglich der verwandten Methoden, deren theoretischer Hintergrund sowie deren Durchführung.

II.2 Optical Molecular Imager „*optix*“

Zur Durchführung der Experimente wird ein von der Firma ART, Montreal, CA entwickeltes System verwandt (*ART, Montreal, CA 2006*).

Seit dem ersten Halbjahr des Jahres 2005 verfügt die Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums Göttingen über dieses System.

Innerhalb des Messzeitraums von April 2005 bis Dezember 2007 wurde das System zweimal durch die Fa. General Electrics gewartet. Bei der ersten Wartung standen vor allem Updates, eine neue Software zur Datenauswertung sowie weitere Einstellungen der Messparameter an. Dies sei deshalb erwähnt, da sich hierdurch Ergebnisse der Messungen anders darstellten. Die zweite Wartung führte zum Einbau weiterer, in unterschiedlichen Wellenlängen arbeitender Laser. Hierdurch soll ermöglicht werden, in Zukunft mehrere, unterschiedliche Farbstoffe anzuregen und zu detektieren.

Diese Wartung hat allerdings keinen Einfluss auf die in Kap. III zugrunde liegenden Ergebnisse, da hier lediglich ein Farbstoff angeregt und detektiert werden soll. Trotzdem sei festgehalten, dass alle geschilderten Ergebnisse auf den Zeitraum vor der ersten sowie nach der zweiten Wartung zurückzuführen sind; sie sind jeweils eindeutig als solche gekennzeichnet.

II.2.1 Grundlegender Aufbau des Systems

In diesem Abschnitt soll auf den grundlegenden, technischen Aufbau des Systems eingegangen werden, das in Abb. 7 skizziert ist; grundlegende Überlegungen zu diesem Time – Domain – basierten Messprinzip im Gegensatz zur Continuous Wave Methode sind in Kap. I.3 ausgeführt.

Das in das Gerät eingebrachte Phantom – bzw. in weiteren Versuchsteilen die in Kap. II.6 näher bezeichnete Maus – befindet sich auf einer Messplattform, auf der zum einen die gewünschte Temperatur über die Software einstellbar ist, zum anderen aber bei Versuchen mit lebenden Mäusen diese durch einen Gewichtssensor überwacht werden können. Die Temperatur wird bei allen Messungen auf das softwarebedingte Minimum von 15,5 °C gesenkt. Bei Versuchen mit lebenden Mäusen können an die Messplattform zusätzlich Narkosemasken fixiert werden, um die Tiere während der Messungen zu anästhesieren. Über eine Kamera wird das zu untersuchende Objekt bis zum Beginn der Messung beobachtet. Die Kamera erlaubt dabei eine Aufsicht sowie eine seitliche Sicht auf die Plattform. Neben der optischen Überwachung kann mithilfe der integrierten Kamera die Focuslage des Objektes im Strahlengang justiert werden.

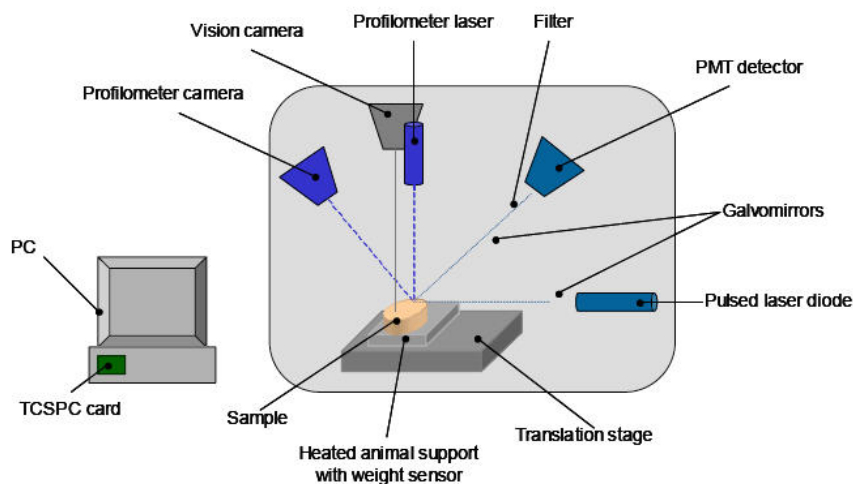


Abb. 7: Übersicht des Aufbaus von *optix* (ART 2004, S.7)

Vor jeder Messung werden außerdem die bestmögliche Laserleistung sowie weitere Parameter programmiert. Zu diesen gehören neben der Laserleistung die Integrationszeit sowie die Auflösung des Abtastrasters und die Höhe der Objektplattform. All diese Parameter sind in Kap. II.3.1 ausführlich dargestellt.

Bei Beginn der Messungen sendet der integrierte Laser mit 670nm Wellenlänge kurze Lichtimpulse an die zuvor definierte „region of interest“. Die dabei im Gewebe gestreuten und absorbierten Photonen werden über galvanische Spiegel zu einem Detektor geleitet, wo sie - zeitlich aufgetrennt - aufgezeichnet werden. Über ein Datenkabel gelangen diese Informationen zu einem handelsüblichen PC (2,80 GHz; 256 MB Ram; 32bit Grafikkarte), an dem die Analysesoftware „Art Analysis Workstation“ der Firma ART Inc. für die Auswertung der Daten bereit steht (GE Healthcare 2004).

II.3 Software „Art Analysis Workstation“

Bei Veröffentlichung dieser Arbeit steht kein offizielles Handbuch zur Bedienung der Analysesoftware zur Verfügung.

Die nachfolgenden Darstellungen zur Konfiguration der Software berufen sich deshalb auf das allgemeine Benutzerhandbuch GE Healthcare: Operator's Manual sowie einen Vortrag von GE - Mitarbeiter Michael Walters, Applikationsspezialist in der Abteilung Vorklinische Bildgebung, am 5. September 2005 in Köln. Dieser Vortrag fand im Rahmen einer *optix* - Userbesprechung statt.

Die Konfiguration zum Erhalt der Rohdaten, die vor der Einspeisung in die Art Analysis Workstation aufgezeichnet werden, ist hingegen mit dem allgemeinen Benutzerhandbuch gut nachvollziehbar.

II.3.1 Scanparameter

Vor jeder Inbetriebnahme des Systems müssen mehrere Parameter speziell auf die durchzuführende Messung programmiert werden. Hierzu zählen:

- Temperatur (°C)
- Laserleistung (μ W)
- Integrationszeit (s)
- Auflösung des Abtastrasters (mm).

Zunächst ist die Temperatur einzustellen. Dies ermöglicht die Software zwischen 15,5 - 42°C. Da in den durchgeführten Versuchen keine lebenden Objekte untersucht wurden, wird die Temperatur bei allen Versuchen auf das Minimum eingestellt.

Nach Einbringen des Objektes auf die Plattform muss diese anhand zweier Hilfslinien für optimale Messergebnisse in der Höhe verändert werden. Um optimale Messergebnisse zu erzielen, ist die Höhe so zu wählen, dass die Oberfläche des Objektes in der Seitenansicht wie in Abb. 8 zu sehen auf einer Höhe mit der grünen Hilfslinie zu liegen kommt. Die rote Linie markiert die maximal mögliche Höhe, die ein Objekt auf der Plattform erreichen darf, ohne Schäden am System hervorzurufen.



Abb. 8: Justierung der Plattformhöhe

Die Annäherung an die optimale Laserpower erfolgt durch initial niedrige Wattzahlen und daraufhin Steigerung der Leistung, ohne einen kritischen Wert von 900.000 Photonen pro Sekunde am Detektor zu überschreiten, was zu einem Abbruch der Messungen führen würde (GE Healthcare 2004).

Die Integrationszeit wird zwischen 0,3 - 1s eingestellt und je nach Fragestellung geändert. So ist diese eher zu vernachlässigen bei zunächst orientierenden Scans, hingegen werden 0,3 - 1s bei Zielscans für eine hohe Qualität verwendet.

Der Rasterpunkt - Abstand wird ebenfalls abhängig von der Messung variiert, wobei bei Zielscans auch hier eine hohe Ortsauflösung durch kleine Sprünge erreicht werden sollte, so dass dort bis zu 0,5cm gewählt werden.

Bei all diesen Parametern ist zu bedenken, dass eine höchstmögliche Auflösung und Qualität zu sehr langen Scanzeiten bis hin zu Stunden führt. Dies stellt allerdings für den sehr lichtsensiblen Farbstoff Cy5.5 dahingehend ein Problem dar, als dass sich seine Fluoreszenzeigenschaften ändern können und sich somit die Ergebnisse verfälschen können. Darum wurde bei allen Messungen versucht, einen Mittelweg zu beschreiten, indem eine Auflösung gewählt wurde, die ein gutes und reproduzierbares Auswerten der Daten ermöglicht, ohne oben beschriebenen Effekt zu beobachten.

Zusätzlich benötigt die Software die Möglichkeit spezielle Objektparameter wie den Absorptionskoeffizienten, Streukoeffizienten sowie den Refraktionsindex, welche zuvor zu definieren sind. Bei den hier durchgeführten Messungen am Phantom wurde

der Absorptionskoeffizient auf $0,02\text{mm}^{-1}$ gesetzt, der Streukoeffizient auf 1mm^{-1} . Bei den Messungen an der Maus wurden die voreingestellten Werte (Absorptionskoeffizient 0,006 $\text{M}\mu\text{a}$, Streuungs-Koeffizient 1 $\text{M}\mu\text{sp}$ sowie Refraktionsindex 1,45) beibehalten (Walters 2005).

II.4 Flat panel VCT

Zur Evaluierung von *optix* wurde neben den Phantommessungen eine weitere Messreihe vorgenommen. Der hierzu untersuchten, toten Maus wurden 6 Injektionen mit Isovist 300 versetztem Cy5.5 in unterschiedliche Tiefen injiziert (Kap. II.9.3). Zur Darstellung der genauen Tiefen wurde die Maus nach Messung durch das *optix* - System per fpVCT untersucht, um die injizierten Farbstoffpositionen genau zu ermitteln. Die Messungen erfolgten durch Christian Dullin, Abt. Diagnostische Radiologie der Universität Göttingen.

Die Validität der Messungen durch das fpVCT ist von mehreren Autoren beschrieben worden (Jaffray and Siewerdsen 2000; Gupta et al. 2006; Knollmann et al. 2006; Obenaus et al. 2007), so dass eine Evaluierung der *optix* - Daten in Hinblick auf die Tiefenbestimmungen mit denen des fpVCT verglichen wurde.

II.4.1 Grundlegender Aufbau des flat panel VCT

Im Gegensatz zu der sonst verwandten CT - Technik mittels Liniendetektoren kommen hier Flächendetektoren zum Einsatz (Abb. 9).

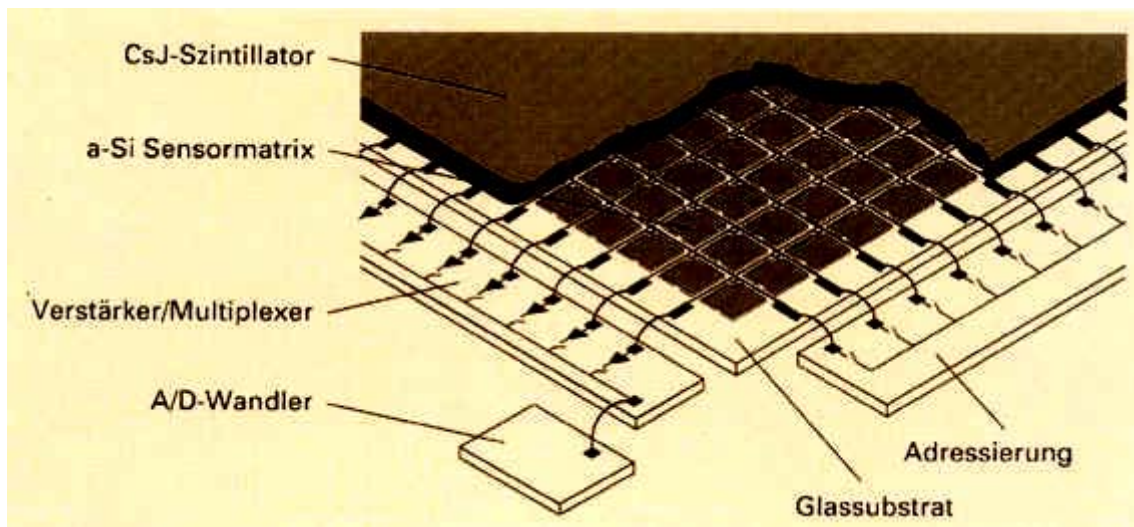


Abb. 9: Schnittbild eines Flächendetektors

Aufgebaut ist ein solcher Flächendetektor aus Photodioden auf einer amorphen Siliziumschicht sowie einer durchgängigen Szintillationsschicht. Vorteil dieser Detektorelemente ist ihre Kleinheit, wodurch wesentlich höhere Ortsauflösungen erreicht werden können. Dabei handelt es sich bei den gewonnenen Daten zudem um „echte“ 3D - Daten, da sie in allen Raumrichtungen isotrop aufgenommen werden.

Diese gegenwärtige Detektortechnik beinhaltet aber auch diverse Nachteile; so kommt es durch die gemeinsame Szintillationsschicht dazu, das Licht umgewandelter Röntgenquanten auch benachbarte Detektorelemente trifft. Dieses Phänomen, das auch als Crosstalk bezeichnet wird, erhöht das Bildrauschen. Weiterhin kann es durch die größeren Datenmengen sowie die niedrigere Datenauslesegeschwindigkeit des Detektors zu vermehrten Bewegungsartefakten kommen. Ein schlechterer Weichgewebekontrast im Gegensatz zu den klinischen MSCT - Geräten rührt vor allem von der heutigen Detektorgeneration mit einem Dynamikbereich von 12 - 14 bit der Quanteneffizienz von nur 50%.

Der klinische Einsatz des fpVCT wird derzeit auch verhindert von der Quanteneffizienz des Detektors. Während dieser bei Liniendetektoren fast alle Röntgenquanten detektiert, ist die Ausbeute des Flächendetektors direkt von den nicht beliebig zu erhöhenden Dicken der Szintillationsschicht abhängig. Die momentane Quanteneffizienz liegt bei 40 -

50 %, was bedeutet, dass bei Aufnahmen mit den gleichen Signal - Rausch - Verhältnissen wie bei einem MSCT - Scan die doppelte bis dreifache Dosis benutzt werden muss.

Das fpVCT stellt also einen Kompromiss zwischen den niedrig dosierten, relativ niedrig ortsauflösenden Aufnahmen der MSCT - Geräte und den überragenden Auflösungen der Micro - CT - Aufnahmen (bis zu 10 μ m) bei allerdings stark erhöhter Dosis und Scanzeit dar.

So findet es heute Einsatz in Tumorverlaufskontrollen in Mausmodellen, in der Detektion von Lungenmetastasen oder auch Knochendichtebestimmungen, aber ist nicht für den klinischen Routinebetrieb zugelassen.

In der vorliegenden Arbeit soll hiermit eine möglichst genaue topographische Darstellung der injizierten Farbstoffmengen vorgenommen werden, um diese mit den Ergebnissen des *optix* - Systems zu vergleichen.

II.5 Phantom

Zur Evaluierung des *optix* - Systems wurde durch freundliche Hilfe der wissenschaftlichen Werkstätten des Universitätsklinikums Göttingen ein Phantom angefertigt (*Wissenschaftliche Werkstätten, Leitung Herr Reinhold Wegener, Robert – Koch – Str. 40, 37075 Göttingen*). Hierbei handelt es sich um einen Plexiglasblock, der eine Länge von 10cm, eine Breite von 5cm und eine Höhe von 2 cm aufweist.

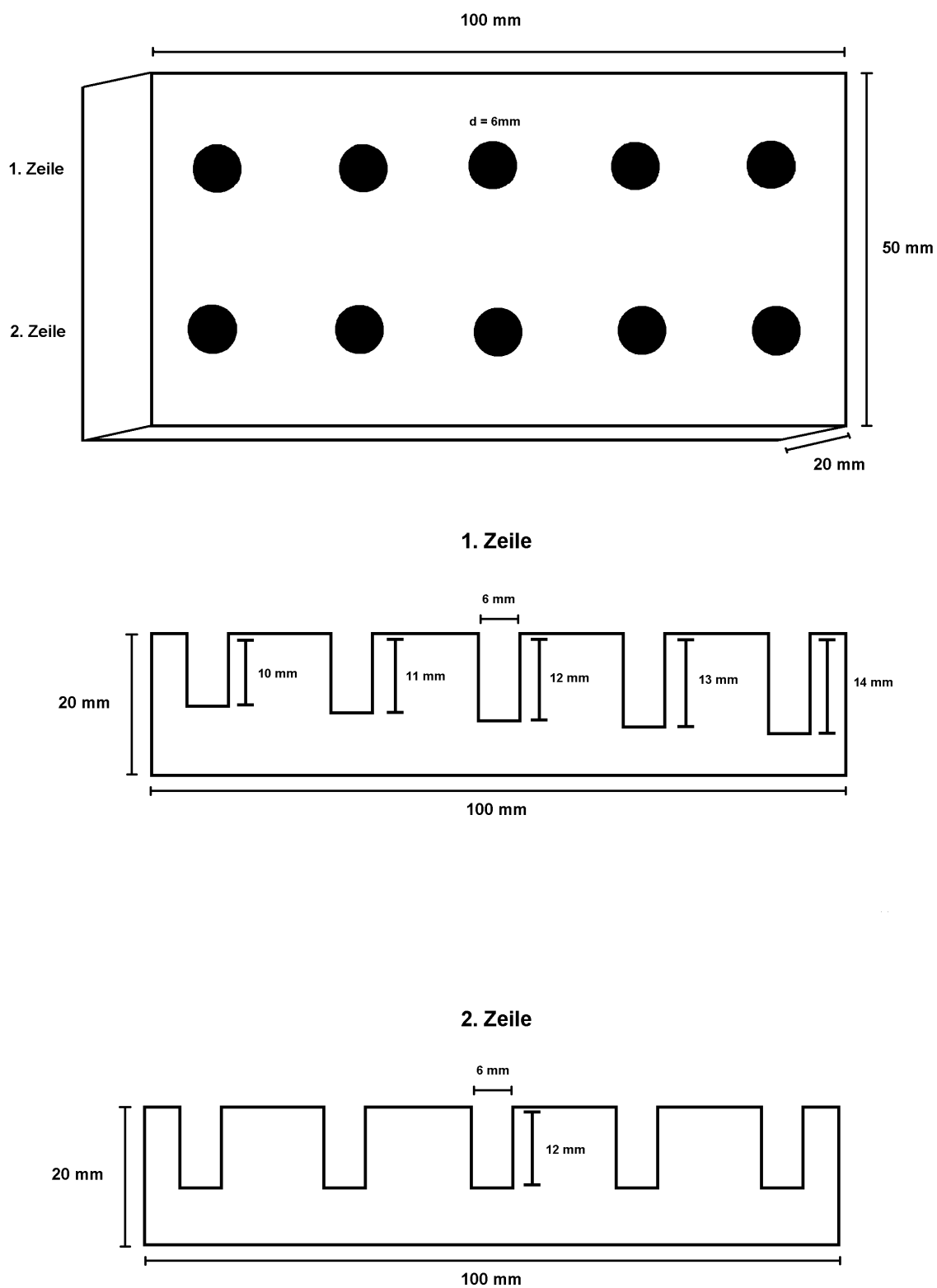


Abb. 10: schematische Darstellung des benutzten Phantoms

Dieser Block wurde auf der Vorderseite wie folgt bearbeitet: Auf der Vorderseite wurden zwei Reihen à 5 Bohrlöcher angelegt. Die Besonderheiten der jeweiligen Reihen ergeben sich in Tab. 2, wobei der Block mit einer Oberfräse bearbeitet wurde, um die angegebenen Tiefen möglichst exakt einzuarbeiten.

Tab. 2: Eigenschaften des angefertigten Phantoms

Zeile	Bohrloch 1	Bohrloch 2	Bohrloch 3	Bohrloch 4	Bohrloch 5	Bemerkungen
1	10mm Tiefe	11mm Tiefe	12mm Tiefe	13mm Tiefe	14mm Tiefe	Alle Bohrlöcher haben einen Durchmesser von 6 mm
2	12mm Tiefe	12mm Tiefe	12mm Tiefe	12mm Tiefe	12mm Tiefe	Alle Bohrlöcher haben einen Durchmesser von 6mm

Zur Reinigung des Phantoms wird Wasser sowie Aceton und handelsübliches Sterilium® verwandt. Zudem folgen vor Beginn einer Messreihe zunächst Leermessungen, um die möglichst rückstandslose Säuberung des Phantoms sicherzustellen.

II.6 Messungen an der toten Maus

Im zweiten Teil der Evaluierung des Systems werden in eine tiefgefrorene Maus, die durch die Tierzucht der experimentellen Medizin über die Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Alves freundlicherweise bereitgestellt wurde, definierte Farbstoffmengen in unterschiedliche Tiefen eingebracht. Um die injizierten Tiefen genau zu ermitteln und sie so mit den Messungen des *optix* - Systems vergleichbar zu machen, wird eine computer - gestützte Rekonstruktion der Injektionsstellen durch eine fpVCT - Aufnahme angefertigt, wie in Kap. II.9.3 ausführlich erläutert.

II.7 Der Farbstoff Cy5.5

Bei den Messungen wird der kurz bezeichnete Farbstoff Cy5.5 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Indodicarbocyanin, welches charakterisiert ist durch eine maximale Absorption bei 675nm und einer maximalen Emission bei 694nm; somit ist er gut geeignet zum Einsatz im *optix* - System, da hier Wellenlängen von 450 - 900nm detektiert werden können. Das Molekulargewicht beträgt 1128,42 mol/l (Tab. 3). Daten über gesundheitsschädliche Effekte von Cy5.5 liegen nicht vor; es sollten jedoch allgemeine Schutzmaßnahmen wie das Tragen von Latexhandschuhen oder das Anlegen von Overalls und Schutzbrillen bei direktem Kontakt bedacht werden.

Tab. 3: Optische Eigenschaften unterschiedlicher Cyanine (Amersham GmbH 2003, S.15)

	Cy3	Cy3.5	Cy5	Cy5.5	Cy7
Molekulargewicht	765,95	1102,37	791,99	1128,42	818,00
Absorption max.	550 nm	581 nm	649 nm	675 nm	747 nm
Extinktion max.	150000 M ⁻¹ cm ⁻¹	150000 M ⁻¹ cm ⁻¹	250000 M ⁻¹ cm ⁻¹	250000 M ⁻¹ cm ⁻¹	200000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Emission max.	570 nm	596 nm	670 nm	694 nm	776 nm

Abb. 11 gibt Aufschluss über die schematische Struktur eines solchen Indodicarbocyaninmoleküls. Der Farbstoff wurde gewählt, da er für Experimente in vivo heute als geeignet erscheint. Zudem muss festgehalten werden, dass er sehr gut wasserlöslich ist. Grundprinzip des heutigen (Amersham GmbH 2003) Einsatzes ist die Kopplung – das *Labeln* - von Cy5.5 an Antikörper, welche möglichst spezifisch an die

zu untersuchende Zielzelle binden sollten. Über photometrische oder andere optische Verfahren, hier auch mit dem *optix* - System, kann daraufhin die Intensität des abgegebenen Farbstoffes im jeweiligen Gewebe detektiert und gemessen werden (Dianova GmbH 2005; Vera et al. 2005), wie es zum Beispiel an Tumoren oder Organsystemen versucht wird.

Des Weiteren lassen sich diverse Trägermoleküle direkt an Cy5.5 binden; hierdurch wird es möglich, z.B. pharmakokinetische Überlegungen durch Detektion des angeregten Farbstoffes anzustellen (Cheng Z et al. 2006; Backer et al. 2006).

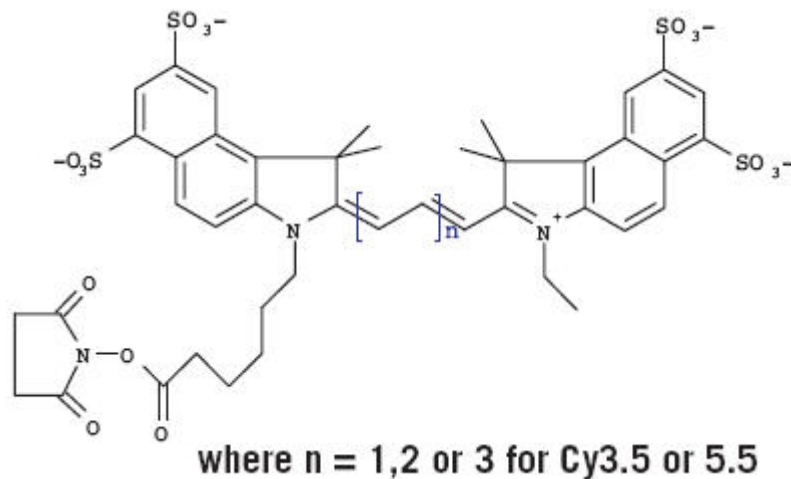


Abb. 11: Struktur eines Cy5.5 - Moleküls

Der für die Experimente am Phantom vor Kalibrierung des Systems verwandte Farbstoff wurde durch freundliche Unterstützung von PD Dr. med. Wunder, Institut für experimentelle Neurologie der Charité Berlin, zur Verfügung gestellt.

Hierbei handelt es sich um in Tris - Puffer (pH = 8) gelösten Cy5.5 in den Konzentrationen 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-15} und 10^{-17} mol / l.

Für die Messungen an der toten Maus sowie für weitere, nach der zweiten Kalibrierung durchgeführte Experimente am Phantom wurde eine eigens hergestellte Cy5.5 - Farbstofflösung verwandt. Diese lag in den Konzentrationen:

- $8,862 \times 10^{-6}$
- 10^{-6}
- $8,862 \times 10^{-9}$
- 10^{-9}
- 10^{-12} mol/l vor.

Der Farbstoff stammt von der Fa. Amersham Biosciences und liegt als Cy5.5 - mono-reactive - NHS - Ester in Reinform vor. Die Herstellung der dafür benötigten Lösung ist Kap. II.7.1 zu entnehmen.

Die Lagerung der verdünnten Farbstoffe erfolgte dunkel und gekühlt im handelsüblichen Kühlschrank bei ca. 6 °C, wobei die optimale Lagerungstemperatur zwischen 2 - 8 °C liegt (Amersham GmbH 2005). In den Experimenten werden unterschiedliche, in Kap. II.9 weiter definierte Volumina der zu untersuchenden Farbstoffkonzentrationen in die Bohrlöcher des Phantoms pipettiert. Hierfür wird der Farbstoff nur so lange wie zwingend erforderlich aus der gekühlten und dunklen Lagerungsumgebung entnommen.

Um die pipettierten Farbstoffmengen vor Verdunstungen durch den Laser des *optix* - Systems zu schützen, werden diese mit handelsüblichem flüssigen Paraffin, dessen Einsatz z.B. in der Polymerasekettenreaktion bekannt ist, überschichtet (Stoffcharakterisierung in Kap. II.8). Dieses Paraffinöl wird freundlicherweise durch das Labor des Arbeitskreises Fr. Prof Dr. med. Alves zur Verfügung gestellt.

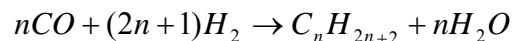
II.7.1 Herstellung der Cy5.5 – Lösung

Bei den für die Messungen an der toten Maus sowie Experimenten nach Kalibrierung des Systems separat hergestellten Farbstofflösungen handelt es sich um Cy5.5 - mono-reactive - NHS - Ester. Durch eine Verdünnungsreihe wurden mehrere Konzentrationen erstellt, die zunächst im Phantomversuch auf ihre Eigenschaften überprüft wurden.

II.8 Grundlagen des Eindeckmittels Paraffin

Um den in das Phantom eingebrachten Farbstoff vor Verdunstungen zu schützen, wurde flüssiges Paraffin als Eindeckmittel ausgewählt (Fa. Merck). Es ist im Gegensatz zu Cy5.5 wasserunlöslich. Hierdurch sollen mögliche Lösungen zwischen dem Eindeckmittel sowie dem eigentlichen Farbstoff vermieden werden. Paraffinöl besitzt eine Siedetemperatur von über 250 °C bei einer Dichte von 0,81 – 0,89 g/cm³.

Die heutige künstliche Herstellung erfolgt aus Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff, welches als Synthesegas Verwendung findet (Fischer - Tropsch - Synthese; Formel 5) (Seilnacht 2006).



Formel 5 : Prinzip der Fischer - Tropsch - Synthese

Vor Beginn der Experimente wird auf den Farbstoff dieses Paraffinöl bis zur Oberfläche des jeweiligen Bohrloches aufpipettiert.

Paraffinöl als Eindeckmittel wurde aufgrund seiner weiten Verbreitung und nicht zuletzt guten Verfügbarkeit in der Medizin gewählt. Zudem sind keine Wechselwirkungen des

Paraffins mit Cy5.5 bekannt, was eine Trennung beider Stoffe bei der Pipettierung sicherstellt und eine Vermischung somit weitestgehend ausschließt.

II.9 Versuchsanordnungen

Im Folgenden sollen die durchgeführten Experimente unter Berücksichtigung aller wichtigen Arbeitsschritte skizziert werden. Hierbei wird wiederum auf die Wartungs- bzw. Kalibrierungsschritte durch GE Healthcare hingewiesen. Die Versuchsanordnungen verliefen stets gleichförmig, um eventuelle Fehlerquellen zu vermeiden.

II.9.1 Versuche vor Kalibrierung des Systems

In das angefertigte Phantom werden in den Positionen 1 - 5 der ersten Phantomzeile in 2 Messreihen 50 bzw. 80 μl des von PD Dr. med. Wunder überlassenen Farbstoffs pipettiert. Diese Phantomzeile, in der die angefertigten Bohrlöcher in unterschiedlichen Tiefen bei gleichen Durchmessern vorliegen, dient der Tiefenmessung.

In Phantomzeile 2 hingegen sollen Farbstoffkonzentrationen ermittelt werden. Die hierzu angefertigten Bohrlöcher in gleicher Tiefe sowie konstantem Durchmesser werden mit unterschiedlichen Konzentrationen befüllt.

Die in den jeweiligen Zeilen verwandten Konzentrationen des Cy5.5 - Farbstoffes sind Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: verwendete Cy5.5 - Konzentrationen in den Phantomzeilen und -positionen

Phantomzeile	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5
1	50µl / 80 µl 10 ⁻¹² mol/l	50µl / 80 µl 10 ⁻¹² mol/l	50µl / 80 µl 10 ⁻¹² mol/l	50µl / 80 µl 10 ⁻¹² mol/l	50µl / 80 µl 10 ⁻¹² mol/l
2	80 µl 10 ⁻¹¹ mol/l	80 µl 10 ⁻¹² mol/l	80 µl 10 ⁻¹³ mol/l	80 µl 10 ⁻¹⁵ mol/l	80 µl 10 ⁻¹⁷ mol/l

II.9.1.1 Tiefenmessungen

Für die Tiefenmessungen wird die erste Reihe des Phantoms benutzt; diese zeichnet sich durch 5 Bohrlöcher aus, die bei gleichem Durchmesser unterschiedliche Tiefen aufweisen (s.Kap.II.5).

Es werden Messreihen mit 2 unterschiedlichen Volumina – 50 und 80µl – angefertigt; diese sind im Folgenden eindeutig als solche gekennzeichnet. Der in Tris – Puffer (pH = 8) gelöste Farbstoff Cy5.5 wird zum Schutz vor möglichen Verdampfungen durch den Laser mit Paraffinöl überschichtet, sodass die Bohrlöcher vollständig gefüllt sind (Kap.II.7).

Leermessungen vor Beginn eines jeden Experimentes stellen zudem eine ausreichende Säuberung des Phantoms sicher und schließen so Fehlerquellen durch das Zurückbleiben von Farbstoffresten weitestgehend aus. Die optimale Einstellung der Höhe der Objektplattform erfolgt sodann optisch über die integrierte Kamera anhand zweier Markierungslinien.

Nach dieser Justierung des Phantoms auf diese optimale Focuslage werden die Laserleistung sowie die weiteren Scanparameter auf bestmögliche Weise programmiert (Kap. II.3.1).

Tab. 5: Pipettierschema zur Tiefenmessung

Volumina und Konzentration (μl / mol/l)	Tiefe in Position 1	Tiefe in Position 2	Tiefe in Position 3	Tiefe in Position 4	Tiefe in Position 5
$50 / 10^{-12}$	10mm (n = 6)	11mm (n = 7)	12mm (n = 8)	13mm (n = 9)	14mm (n = 8)
$80 / 10^{-12}$	10mm (n = 4)	11mm (n = 4)	12mm (n = 4)	13mm (n = 5)	14mm (n = 5)

II.9.1.2 Konzentrationsmessungen

Wie bei der Tiefenmessung werden auch hier paraffinüberschichtete Farbstoffmengen verwendet; zudem dient Reihe zwei des Phantoms mit im Folgenden beschriebenen Eigenschaften der Durchführung der Experimente.

Bei jeder zu pipettierenden Position handelt es sich um drei 6mm im Durchmesser und 12mm in der Tiefe messende Bohrlöcher (Kap.II.5 ; Tab. 2). Die verwendeten Farbstoffkonzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-17} mol/l sind in 5 Stufen in diesen Positionen zu finden.

Tab. 6: Pipettierte Konzentrationen (c) in den Positionen des Phantoms bei insgesamt n =17 Messungen

Volumina (μl)	c in Position 1 (n = 3)	c in Position 2 (n = 5)	c in Position 3 (n = 2)	c in Position 4 (n = 5)	c in Position 5 (n = 2)
80	10^{-11} mol/l	10^{-12} mol/l	10^{-13} mol/l	10^{-15} mol/l	10^{-17} mol/l

Die Focuslage sowie die Scanparameter sind wie bei der Tiefenmessreihe auf optimale Weise eingestellt. Für die Auswertung der Konzentrationsmessungen werden die 17 Experimente verwendet, die den Anforderungen an die in Kap.II.10.2 beschriebenen Ansprüchen an eine jede Messung genügen.

II.9.2 Versuche nach Kalibrierung des Systems

Nach der Kalibrierung des Systems durch GE Healthcare bleibt die Versuchsanordnung erhalten. Verwendet werden nun zur Konzentrations- sowie Tiefenmessung allerdings Cy5.5 - Lösungen, die eigens hergestellt und deren Spezifikationen in Kap. II.7 sowie II.7.1 erläutert sind.

Diese wurden stets mit einem Volumen von 80 μl pipettiert. Tab. 7 gibt Aufschluss über die in die Phantompositionen eingebrachten Farbstoffkonzentrationen sowie Volumina.

Des Weiteren werden die in Kap.II.10.2 dargestellten Qualitätsansprüche an die Messungen eingehalten.

Tab. 7: Pipettierschema der Experimente nach Systemkalibrierung

(d = Tiefe; c =Konzentration)

Volumina und Konzentration (μl / mol/l)	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5
Reihe 1 je $80\mu\text{l}$ $8,862 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$d_{\text{real}} 10\text{mm}$ (n = 12)	$d_{\text{real}} 11\text{mm}$ (n = 12)	$d_{\text{real}} 12\text{mm}$ (n = 12)	$d_{\text{real}} 13\text{mm}$ (n = 12)	$d_{\text{real}} 14\text{mm}$ (n = 12)
Reihe 2 $d_{\text{real}} 12\text{mm}$; je $80\mu\text{l}$	10^{-12} mol/l (n = 11)	10^{-9} (n = 11)	$8,862 \cdot 10^{-9}$ (n = 11)	10^{-6} (n = 11)	$8,862 \cdot 10^{-6}$ (n = 11)

II.9.3 Versuche an der Maus

Für die Versuche an der toten Maus wird Farbstoff in der Konzentration $8,862 \times 10^{-6}$ mol/l verwendet, da sich diese an den vorherigen probatorischen Messungen am Phantom als besonders geeignet erwiesen hat. So erhielt man am Phantom auch in größeren Tiefen und moderaten Laserleistungen eine gute Signalstärke. Dem Farbstoff wird im Verhältnis 50:50 Isovit 300 (Fa. Merck) zugesetzt, um ihn auch computertomographisch mit geläufigen Methoden darstellbar zu machen.

Insgesamt werden an Thorax und Abdomen der Maus 7 Punkte markiert, in die in unterschiedliche Tiefen (0,5 - 1,5cm) jeweils ca. 1ml Farbstofflösung injiziert wird (Abb. 12).

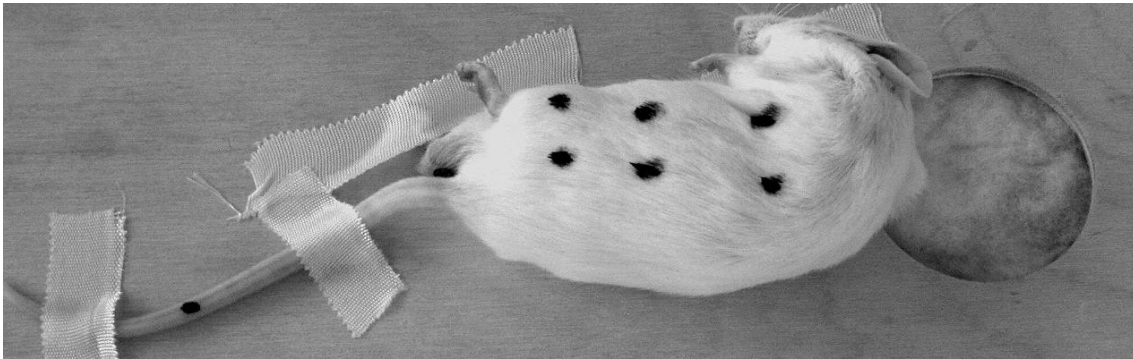


Abb. 12: Versuchsaufbau mit toter Maus (Injektionsstellen farblich markiert)

Die darauf folgenden Messungen dieser markierten Punkte erfolgen sowohl am *optix* - System als auch - um die injizierten Tiefen genau zu lokalisieren - durch eine computer-tomographische Darstellung mittels fpVCT, wobei jede Injektionsstelle mit *optix* sechsmal gescannt wird.

II.10 Auswertung

Die Auswertungen der gewonnenen Rohdaten erfolgt mit der Art Analysis Workstation - Software. Die Rohdaten werden hierfür durch die Software derart aufgearbeitet, dass unter Berücksichtigung und Vernachlässigung des vorhandenen Hintergrundes lediglich die zu untersuchenden Abschnitte berücksichtigt werden; somit lässt sich ein Hintergrundrauschen weitgehend reduzieren. Nach diesem Prozess können die Bilder mit einem „Depth - Tool“, das in die Software integriert ist, ausgewertet werden.

Erfasst werden hiermit die:

- Gemessene Tiefe (mm)
- Totale Konzentration (beliebige Einheit)
- Relative Konzentration (beliebige Einheit)

sowie die detektierten Scanpunkte.

Errechnet wird für die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse der Median aus den jeweiligen relativen Konzentrationen, wobei die relative Konzentration definiert ist als totale Konzentration dividiert durch die Scanpunkte der Messung.

In den Experimenten vor der Kalibrierung des Systems werden die Phantomzeilen eins und zwei auf erläuterte Tiefen- und Konzentrationsgenauigkeit evaluiert.

Nach der Kalibrierung erfolgt ebenfalls diese Evaluation; hinzukommen die Experimente an der Maus.

Tab. 8: Experimente vor Kalibrierung des Systems

Zeile 1	Tiefenbestimmung $c = 10^{-12}$ mol/l mit 50 μ l (n = 38) und 80 μ l (n=22) Volumina
Zeile 2	Konzentrationsbestimmung mit $c = 10^{-11}$ bis 10^{-17} mol/l und 80 μ l Volumina (n=17)

Tab. 9: Experimente nach Kalibrierung des Systems

Zeile 1	Tiefenbestimmung mit $c = 8,862 \times 10^{-6}$ mol/l (n=12)
Zeile 2	Konzentrationsbestimmung mit $c = 8,862 \times 10^{-6}$ bis 10^{-12} mol/l (n=11)
Maus	Tiefenbestimmung mit $c = 8,862 \times 10^{-6}$ mol/l (n = 6) unter Zuhilfenahme des fpVCT

Die von o.g. Depth - Tool ermittelten Parameter werden ergänzt durch die Darstellung der jeweiligen Photonenlaufzeiten der Messungen, die in der „temporal spread function“, im folgenden TPSF genannt, visualisiert werden. Die Berechnungen des Depth – Tools beziehen sich auf diese Kurven (Kap.I.3.2). Bei der Erstellung der hintergrundbe-

reinigten, zur Auswertung aufbereiteten Daten (Kap. II.10) wird zudem die Lebensdauer des verwendeten Farbstoffes mit einbezogen. Hierfür bietet die Software die Möglichkeit, die anhand der TPSF - Kurve errechneten Lebensdauern direkt in die aufbereiteten Daten einzuarbeiten. Neben der Möglichkeit der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bietet die TPSF - Kurve des Weiteren die Möglichkeit die Intensität, Tiefe sowie die relative Konzentration abzuleiten.

II.10.1 Statistische Auswertung

Nach Durchführung der Experimente wie in Kapitel II.10 beschrieben werden die erhaltenen Daten mittels Microsoft® Excel einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Zuvor werden die aus den Rohdaten zu extrahierenden Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Mediane berechnet und graphisch als auch tabellarisch wie in Kap. III zu sehen aufgetragen. Die graphische Darstellung der Tabellen erfolgt hier ebenfalls mittels Microsoft® Excel. Die zur Veranschaulichung enthaltenen Box-Plots werden mit der PAST – Software erstellt.

II.10.2 Qualitätsansprüche

Da zur Auswertung der Ergebnisse wie bereits erläutert kein Benutzerhandbuch zur Verfügung steht, berufen sich die folgenden Einschlusskriterien ebenfalls auf den bereits erwähnten Vortrag von Walters (2005).

All diese aufgelisteten Faktoren werden bei der Durchführung der Experimente nach Kalibrierung des Systems befolgt. Die Experimente vor dieser Aktion sind ebenfalls unter Berücksichtigung vieler dieser Faktoren erstellt worden, doch waren nicht alle zu diesem Zeitpunkt bekannt und konnten so auch nicht vollständig mit einfließen.

Innerhalb dieses Vortrages wurden folgende Kenngrößen benannt, die ein Experiment zu einem guten Messergebnis führen lässt bzw. lassen kann:

- optimale Laserleistung ($\sim 60\%$ der maximalen detektierbaren Intensität/Zeit)
- Integrationszeit von $\sim 300\text{ms}$ (nicht $< 100\text{ms}$)
- Eingrenzen der bekannten, zu messenden Struktur
- Scans nur mit gleicher Abtastgröße (möglichst $0,5\text{mm}$) durchführen
- optimale Fokusslage
- Absorptionskoeffizient $0,02\text{mm}^{-1}$
- Hintergrundberücksichtigung
- Qualitätsfaktor $\geq 10\%$.

Der Qualitätsfaktor gibt hierbei definitionsgemäß die Qualität der TPSF in Bezug auf das Signal-/Rauschverhältnis wieder und ist proportional zur Anzahl der am Detektor gemessenen Photonen.

III Ergebnisse

III.1 Ergebnisse vor Kalibrierung des Systems

III.1.1 Tiefenmessungen

III.1.1.1 Messreihe mit 50 µl Volumina

Zunächst werden die Konzentrationen in den unterschiedlich tiefen Positionen des Phantoms betrachtet (Abb. 13).

Hierbei zeichnet sich eine signifikant gemessene Konzentrationszunahme bei steigenden Tiefen und konstanter realer Konzentration ab ($p < 0,001$). Sollen z.B. nur die beiden Maximalwerte bei 10 und 14 mm betrachtet werden, sieht man eine gemessene Konzentrationszunahme um ca. 276 % von im Median $2,6e+03$ auf $7,18e+03$.

Trägt man nun die eigentlichen, vom „Depth - Tool“ der Analysesoftware gelieferten Tiefen zusammen - in Abb. 13 erkennbar - , kann zunächst festgehalten werden, dass das System wechselnde Tiefen in den hier durchgeführten Experimenten signifikant detektieren kann ($p < 0,001$) und diese zudem positiv korreliert sind ($r = 0,87$). Über die 5 in 1 mm Schritten an Tiefe zunehmenden Phantompositionen wächst der Median der gemessenen Werte von anfangs 8,1 auf 8,69mm an; dies stellt eine Tiefenzunahme um ca. 7,3 % dar, die Änderung der Konzentration über die Positionen hingegen beträgt wie oben beschrieben 276 %, wobei sich hier ebenfalls eine positive Korrelation findet ($r = 0,82$). Dies scheint zunächst nicht vereinbar mit der in Kap. I.3.2 dargestellten Berechnung der Tiefen aus der Änderung der Peakposition der TPS - Funktion.

Betrachtet man zu diesem Zweck willkürlich gewählte Punkte aus allen Messreihen, sieht man, dass abgesehen von denen bei 14mm realer Tiefe nur eine geringe Änderung der Intensität zu verzeichnen ist. Wichtiger für die Tiefenbestimmung lässt sich außerdem unschwer erkennen, dass die Positionen der Peaks nicht unterschiedlich sind, sondern, dass diese sich alle bei 2ns gruppieren, ohne signifikante Abweichungen.

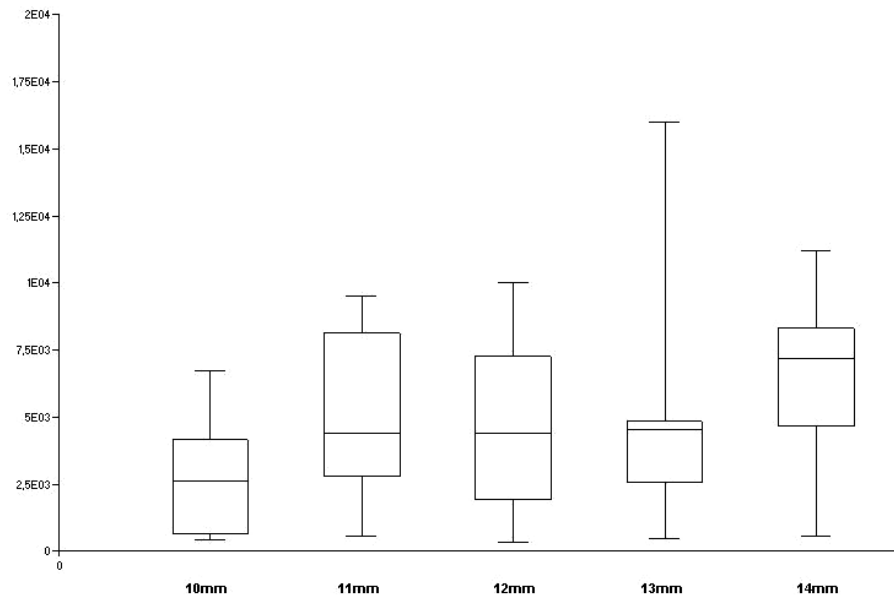


Abb. 13: Konzentrationsmessung der Phantompositionen mit 50 μ l Volumen

[x-Achse mit Phantompositionen, y-Achse mit gemessenen Konzentrationen (dimensionslos)]

Tab. 10: Tiefenmessungen mit 50 μ l Volumen und 10^{-12} mol/l verdünnter Farbstoffkonzentration

c_{real} (mol/l)	d_{real} (mm)	Mittelw. _{Mess} (mm)	σ	min. (mm)	max. (mm)	Median (mm)
10^{-12}	10	8,07	0,67	7,02	9,08	8,10
10^{-12}	11	8,07	0,54	7,26	8,72	8,01
10^{-12}	12	8,10	0,64	7,31	8,95	8,10
10^{-12}	13	8,37	0,58	7,50	9,31	8,38
10^{-12}	14	8,62	0,64	7,76	9,48	8,69

c_{real} = reale Konzentration, d_{real} = reale Tiefe, Mittelw._{Mess} = Mittelwert der Messungen, σ = Standardabweichung, min. = kleinster Messwert, max. = größter Messwert, Median = medianer Messwert

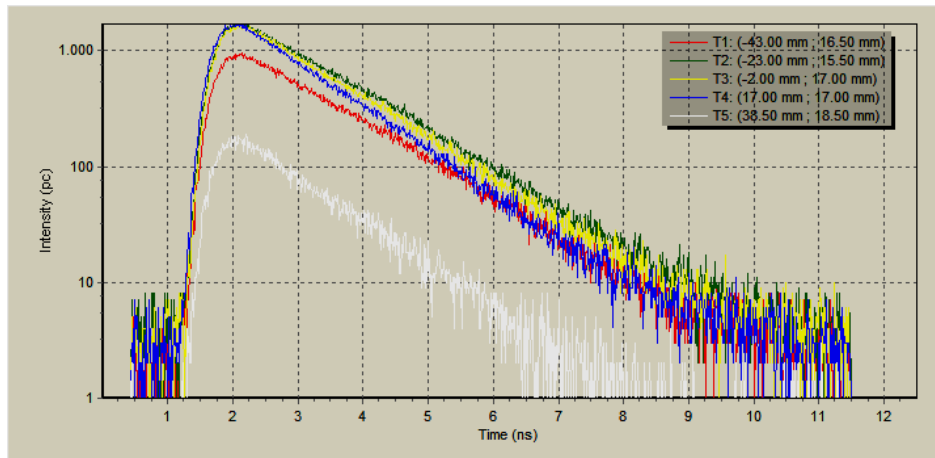


Abb. 14: TPS – Funktionen bei 10 (T1), 11 (T2), 12 (T3), 13 (T4) und 14mm (T5)

III.1.1.2 Messreihe mit 80 μ l Volumina

Hier werden analog zu Kap.III.1.1.1 die Experimente mit 80 μ l Volumina und gleicher Konzentration von 10^{-12} mol/l durchgeführt. Dies wird unternommen, um einen Eindruck zu erhalten, welche Auswirkungen dieses erhöhte Volumen auf die Ergebnisse ausübt.

In diesen Messungen zeichnete sich wie bereits in den Experimenten mit 50 μ l Volumina eine signifikante Konzentrationserhöhung mit steigenden Tiefen ab ($p = 0,001$). Die Konzentrationszunahme, die hier über die 4mm Tiefenzunahme zu verzeichnen ist, lässt sich im Median auf ca. 127% beziffern (10mm = $1,19e+04$, 14mm = $1,51e+04$) und fällt somit milder aus als bei den vorherigen Messungen.

Beim Auftragen der detektierten Tiefen, kann auch mit diesen Experimenten signifikant dargelegt werden, dass das System diese messbar macht ($p = 0,004$). Ebenfalls besteht eine positive Korrelation zwischen den realen und gemessenen Tiefen ($r = 0,84$).

Der gemessene Tiefenzuwachs von 10 auf 14mm Tiefe beziffert sich auf im Median ca. 3,5% (10mm = 9,08mm, 14mm = 9,40mm). Analog zur weniger stark ausfallenden Konzentrationszunahme fällt auch die Tiefenzunahme in dieser Reihe weniger drastisch aus.

Ebenfalls betrachtet werden die TPS - Funktionen, um den Tiefen- und Konzentrationszuwachs nachvollziehen zu können. In diesen rein optisch auswertbaren Kurven zeigt sich allerdings wiederum keine Veränderung des Peaks über die Zeit; auch sind keine gravierenden Intensitätsabnahmen oder - zunahmen zu verzeichnen, was ebenfalls den Versuchen mit niedrigerem Volumen gleichkommt.

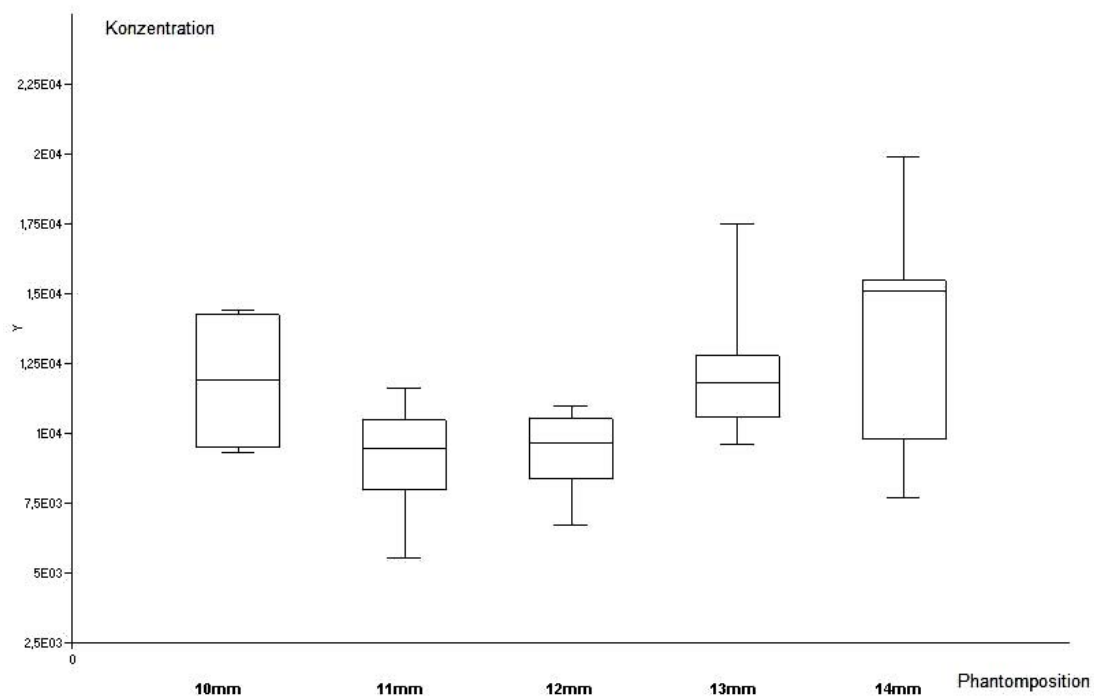


Abb. 15: Konzentrationsmessung der Phantompositionen mit 80µl Volumen

Tab. 11: Tiefenmessungen mit 80 μ l Volumen und 10⁻¹² mol/l verdünnter Farbstoffkonzentration

c _{real} (mol/l)	d _{real} (mm)	Mittelw. _{Mess} (mm)	Σ	min. (mm)	max. (mm)	Median (mm)
10 ⁻¹²	10	9,12	0,48	8,67	9,65	9,08
10 ⁻¹²	11	8,91	0,26	8,65	9,16	8,92
10 ⁻¹²	12	9,13	0,24	8,85	9,35	9,15
10 ⁻¹²	13	9,13	0,22	8,81	9,35	9,23
10 ⁻¹²	14	9,41	0,31	9,03	9,77	9,40

III.1.2 Konzentrationsmessungen

Die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen mit *optix* lassen zunächst erkennen, dass unterschiedliche Konzentrationen von dem System erkannt werden können.

Bei der realen Konzentration 10⁻¹¹ mol/l lag der Ergebnismedian bei 4,63e+03, bei 10⁻¹² mol/l bei 2,26e+003, bei 10⁻¹³ mol/l bei 2,15e+003, bei 10⁻¹⁵ mol/l bei 5,74e+00 und bei 10⁻¹⁷ mol/l lag dieser bei 1,31e-01.

Veranschaulicht werden diese Werte in Abb. 16. Stellt man des Weiteren die gemessenen Tiefen bei unterschiedlichen Konzentrationen gegenüber und betrachtet auch hier die Mediane der Ergebnisse (Abb. 17), so erkennt man, dass die Tiefen zunächst unabhängig von der pipettierten Konzentration konstant zu sein scheinen. Erst bei einer deutlich geringeren Konzentration von 10⁻¹⁷ mol/l verringert sich auch die gemessene Tiefe signifikant. Die reale Tiefe des Bohrloches - 12 mm - wird dabei in keiner Messung erreicht, die durchschnittlich gemessene Tiefe aller Messungen beträgt 7,49 mm.

Beispielhaft können neben den in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellten Ergebnissen auch die TPS - Funktionen der Messungen herangezogen werden, um die Entstehung der Ergebnisse zu veranschaulichen. In Abb. 18 sind hierzu 3 willkürlich gewählte TPS -

Funktionen der Konzentrationen 10^{-12} , 10^{-13} und 10^{-17} mol/l, die den optimalen Scanbedingungen entsprechen, gegeneinander aufgetragen. Hier zeigt sich, dass bei sinkenden Konzentrationen die gemessene Intensität abnimmt; hinzukommt, dass auch die Peaks der Funktionen, mit deren Hilfe die Tiefenbestimmung berechnet wird (Kap.I.3.2), mit sinkenden Konzentrationen eine Linksverschiebung erfahren. Diese Linksverschiebung führt zu den beschriebenen Tiefenabnahmen bei sehr niedrigen Konzentrationen.

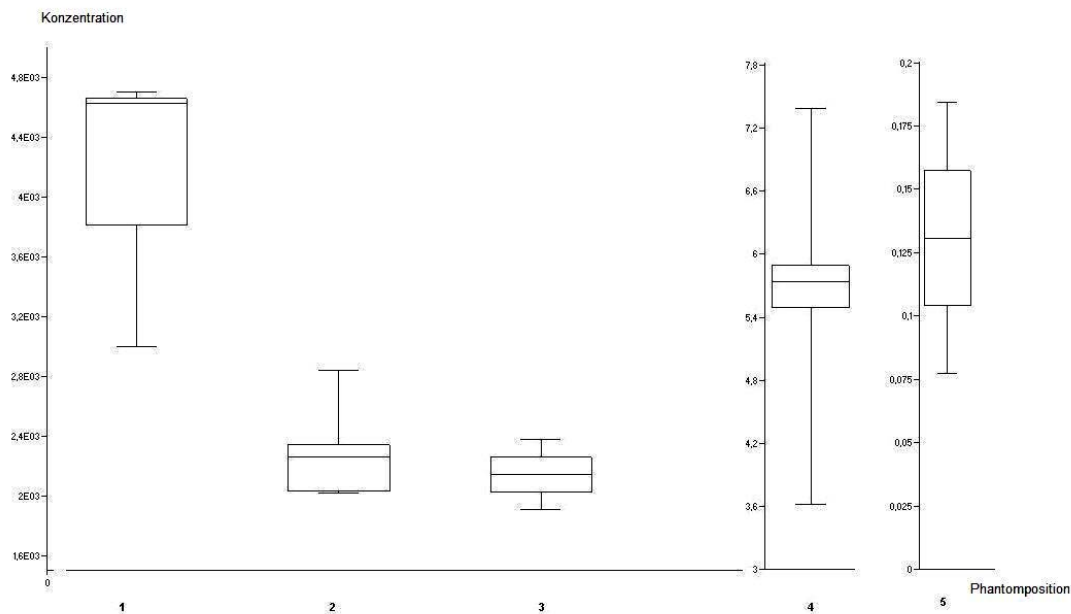


Abb. 16: Ergebnisse der Konzentrationsmessungen [x-Achse: Phantompositionen (1 : 10^{-11} ; 2 : 10^{-12} ; 3 : 10^{-13} ; 4 : 10^{-15} ; 5 : 10^{-17} mol/l); y-Achse: gemessene Konzentration (Einheit dimensionslos)]

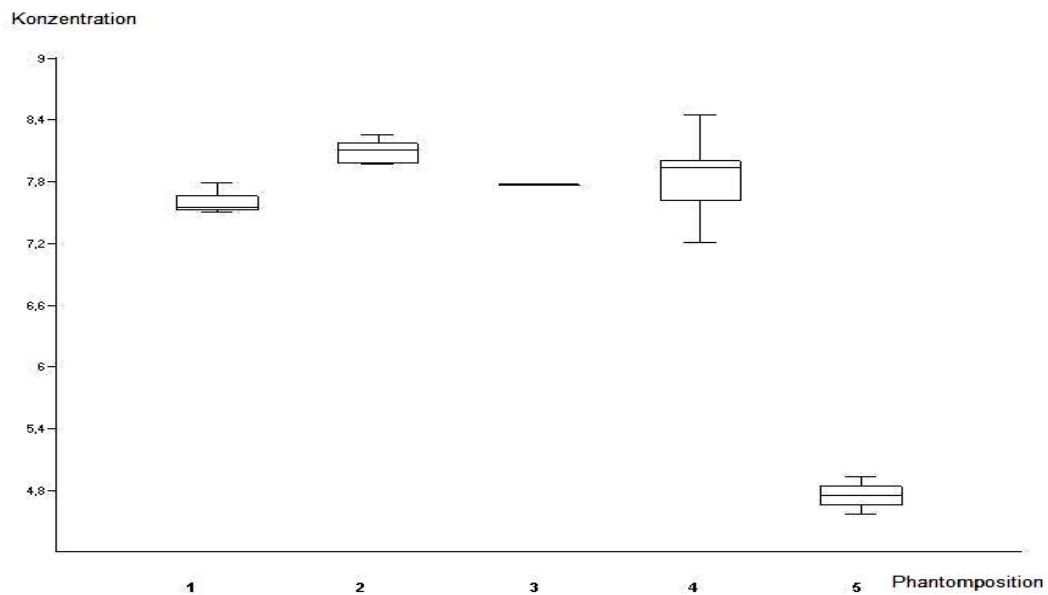


Abb. 17: Abhängigkeit der gemessenen Tiefen von variablen Konzentrationen [x-Achse: Phantompositionen (1 : 10^{-11} ; 2 : 10^{-12} ; 3 : 10^{-13} ; 4 : 10^{-15} ; 5 : 10^{-17} mol/l); y-Achse: gemessene Konzentration (Einheit dimensionslos)]

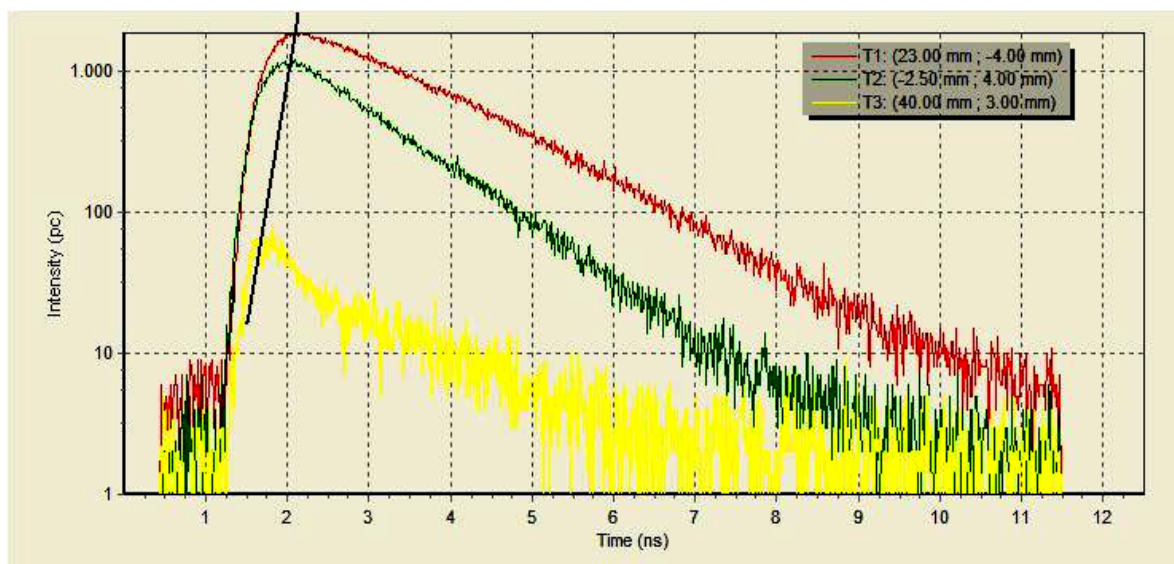


Abb. 18: TPS - Funktionen für $T1 = 10^{-12}$, $T2 = 10^{-13}$ und $T3 = 10^{-17}$ mol/l (die schwarze Gerade beschreibt die Peakverschiebung der Funktionen)

III.2 Ergebnisse nach Kalibrierung des Systems

III.2.1 Tiefenmessungen

Bei den hier durchgeführten Messungen wurden zunächst auch die Konzentrationen in den unterschiedlich tiefen Phantompositionen betrachtet. Auch hier zeigt sich eine signifikante Konzentrationszunahme bei steigenden Tiefen und konstanter realer Konzentration ($p = 0,03575041; r=0,85$). Analog zu den Messungen vor Kalibrierung seien auch hier die Maximalwerte bei 10 und 14mm heranzuziehen, wo eine Konzentrationszunahme von ca. 344 % von im Median 61,75 auf 212,50 zu verzeichnen ist.

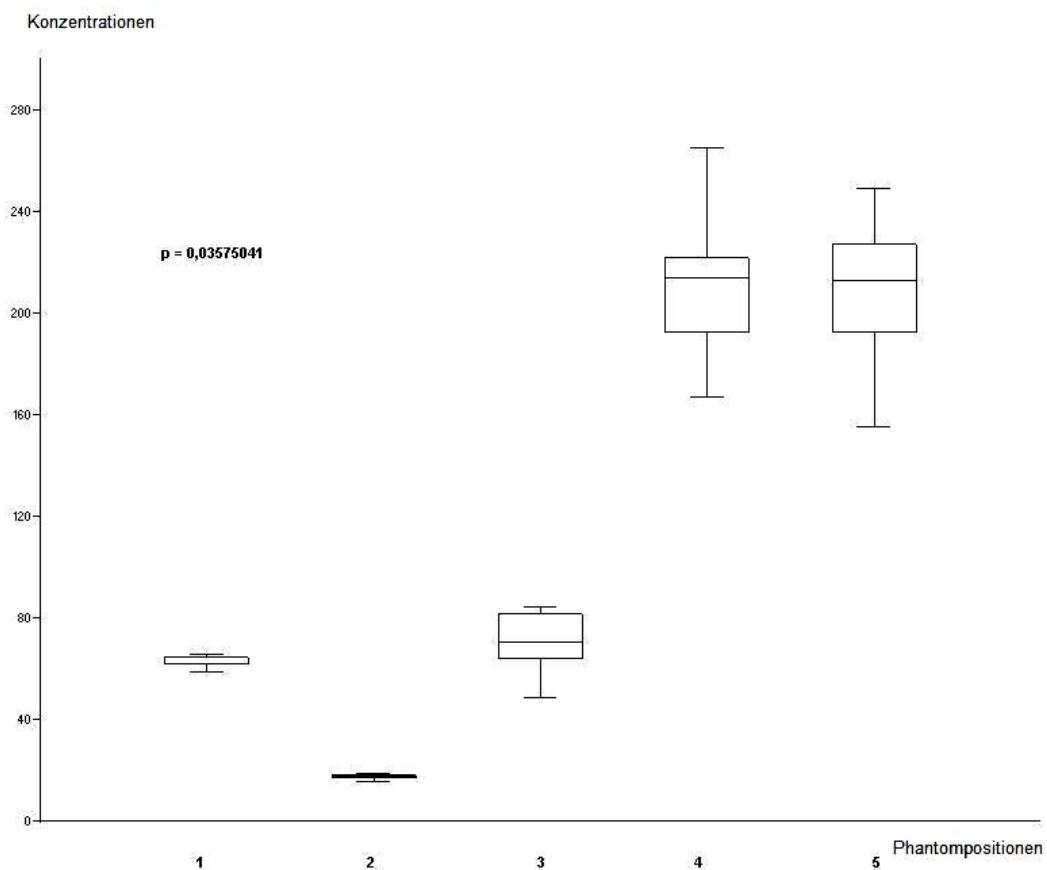
Im zweiten Schritt sollen auch hier die von der Software errechneten Tiefen zusammengetragen werden. Hier zeigte sich ebenfalls, dass das System in der Lage ist, zunehmende Tiefen zu detektieren ($r= 0,97; p<0,001$). Die Tiefenzunahme von im Median 0,83[10mm] auf 3,26 [14mm]mm stellt prozentual einen Zuwachs von ca. 279% da; bei den real bestehenden Tiefen beträgt dieser lediglich 40 %.

Die als Berechnungsgrundlage der Tiefenmessung dienenden TPSF - Kurven zeigen auch nach Kalibrierung keine signifikanten Abweichungen der Peakpositionen.

Zur Klärung der möglichen Ursachen bzw. Fehlerquellen der erhaltenen Ergebnisse wird an dieser Stelle auf Kap.IV verwiesen.

Tab. 12: Konzentrationsmessung der Phantompositionen mit 50 μ l Volumen

c_{real} (mol/l)	d_{real} (mm)	Mittelw.-Mess (mm)	σ	min. (mm)	max. (mm)	Median (mm)
$8,862 \cdot 10^{-6}$	10	0,83	0,00	0,82	0,84	0,83
$8,862 \cdot 10^{-6}$	11	0,82	0,00	0,82	0,83	0,82
$8,862 \cdot 10^{-6}$	12	1,84	0,21	1,42	2,07	1,83
$8,862 \cdot 10^{-6}$	13	2,77	0,14	2,52	3,03	2,78
$8,862 \cdot 10^{-6}$	14	3,28	0,07	3,18	3,43	3,26

Abb. 19: Konzentrationsmessungen mit 80 μ l Volumen je Phantomposition [x-Achse mit Phantompositionen, y-Achse mit gemessenen Konzentrationen (dimensionslos)]

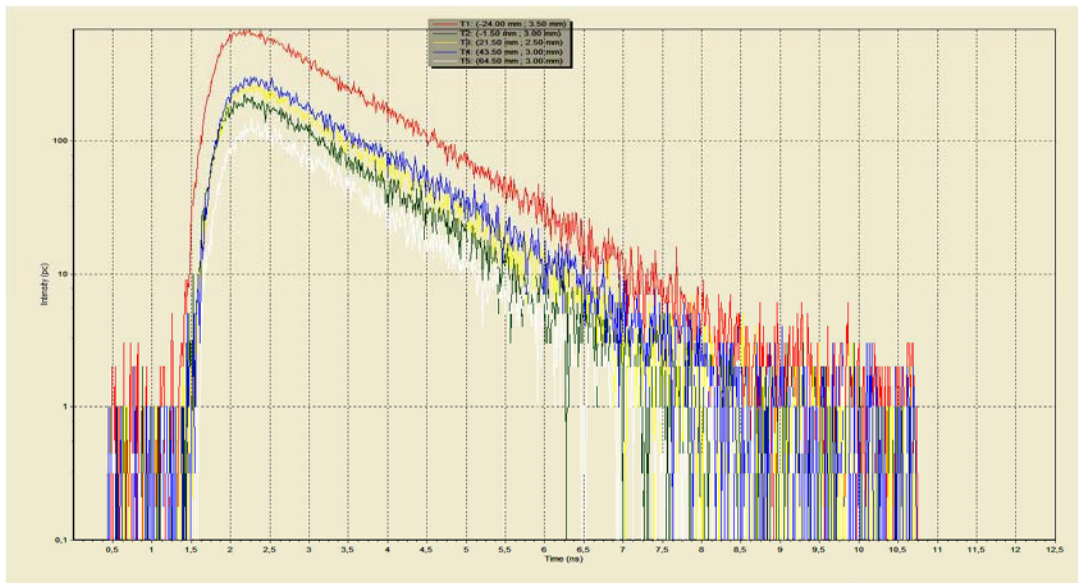


Abb. 20: TPS – Funktionen bei 10 (T1), 11 (T2), 12 (T3), 13 (T4) und 14mm (T5)

III.2.2 Konzentrationsmessungen

Wie bereits in Kap. III.1.2 geschehen, folgen hier analog die Konzentrationsmessungen nach Systemkalibrierung.

Auch hier kann deutlich gemacht werden, dass das System unterschiedliche Konzentrationen als solche detektiert und darstellen kann.

Als Beispiel seien hier die Konzentrationen 10^{-6} und $8,862 \cdot 10^{-6}$ mol/l hinzuzuziehen: Man erkennt bei der realen Konzentration 10^{-6} mol/l einen Ergebnismedian von $2,5e-01$, wohingegen bei $8,862 \cdot 10^{-6}$ dieser bei $4,14e+01$ liegt.

Veranschaulicht finden sich diese Parameter in Abb. 21 wieder; hier ist auch zu ersehen, dass gerade bei geringen Konzentrationen eine scheinbar exakte Wiederholbarkeit der Messungen gegeben ist.

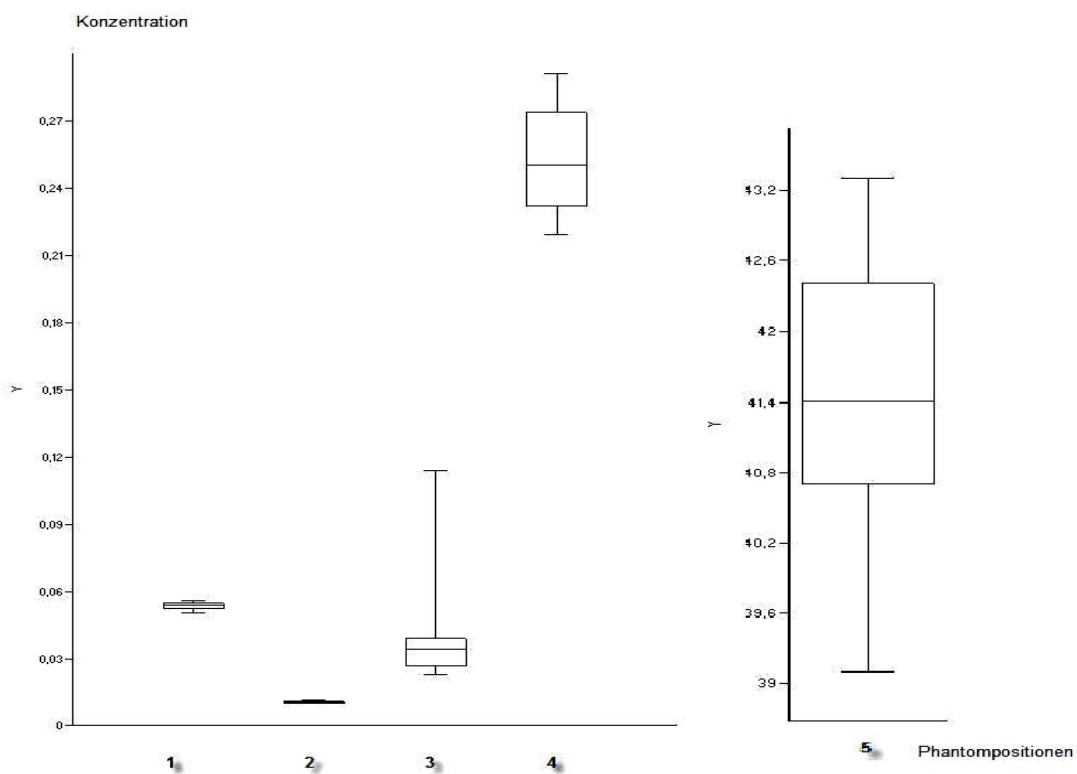


Abb. 21: Ergebnisse der Konzentrationsmessungen

III.2.3 Messungen an der Maus

Bei den Experimenten an der toten Maus handelt es sich, wie bereits in Kap.II.6 erläutert, um Messungen in tierischen Geweben, für welche das *optix* - System entwickelt wurde. Zudem wurde die Maus in einem fpVCT gescannt, um die eingebrachten Farbstoffmengen zu detektieren und mit *optix* vergleichbar zu machen.

Die schon für die Phantommessungen benutzten Fluorochrome wurden hier mit iodhaltigem Kontrastmittel gemischt, um sie im CT detektieren zu können.

III.2.3.1 Ergebnisse der Messungen

Zunächst ist festzuhalten, dass von den 7 markierten und mit Farbstoff penetrierten Körperstellen der Maus drei mit dem fpVCT eindeutig v.a. in Bezug auf die Tiefenmessung detektiert werden konnten. Dies ist vorrangig darauf zurückzuführen, dass die restlichen Farbstoffmengen sich schon kurz nach der Injektion vor allem subkutan und entlang des Stichkanals verteilten oder im Bereich der Bauchhöhle und des Thoraxraumes der Maus ausbreiteten. Die verbleibenden 3 Punkte sind in den Tiefen 1 und 1,5cm lokalisiert. Abb. 22 zeigt diese Positionen an, wobei an Stelle eins und drei 1 cm tief injiziert wurde, an Stelle zwei 1,5cm. Bei den vom fpVCT auf oben genannter Abbildung zu erkennenden Injektionsstellen mit aufgetragenen Tiefen ist zu sehen, dass sich die realen Injektionstiefen an den Positionen eins und zwei gut mit denen der Messung decken. An Position 3 wurden jedoch lediglich 1mm tiefe Kontrastmittelmengen detektiert.

Bei den darauf folgenden Messungen mit *optix* zeigte sich, dass alle 3 verwertbaren Positionen mit einer Tiefe von im Median 0,85mm gemessen wurden (n=18; Standardabweichung Pos. eins 0,007, Pos. zwei 0, Pos. drei 0,003).

Somit lässt sich zunächst festhalten, dass das System bei den hier orientierend durchgeführten Messungen in Geweben nicht in der Lage ist, differente Tiefen zu detektieren.

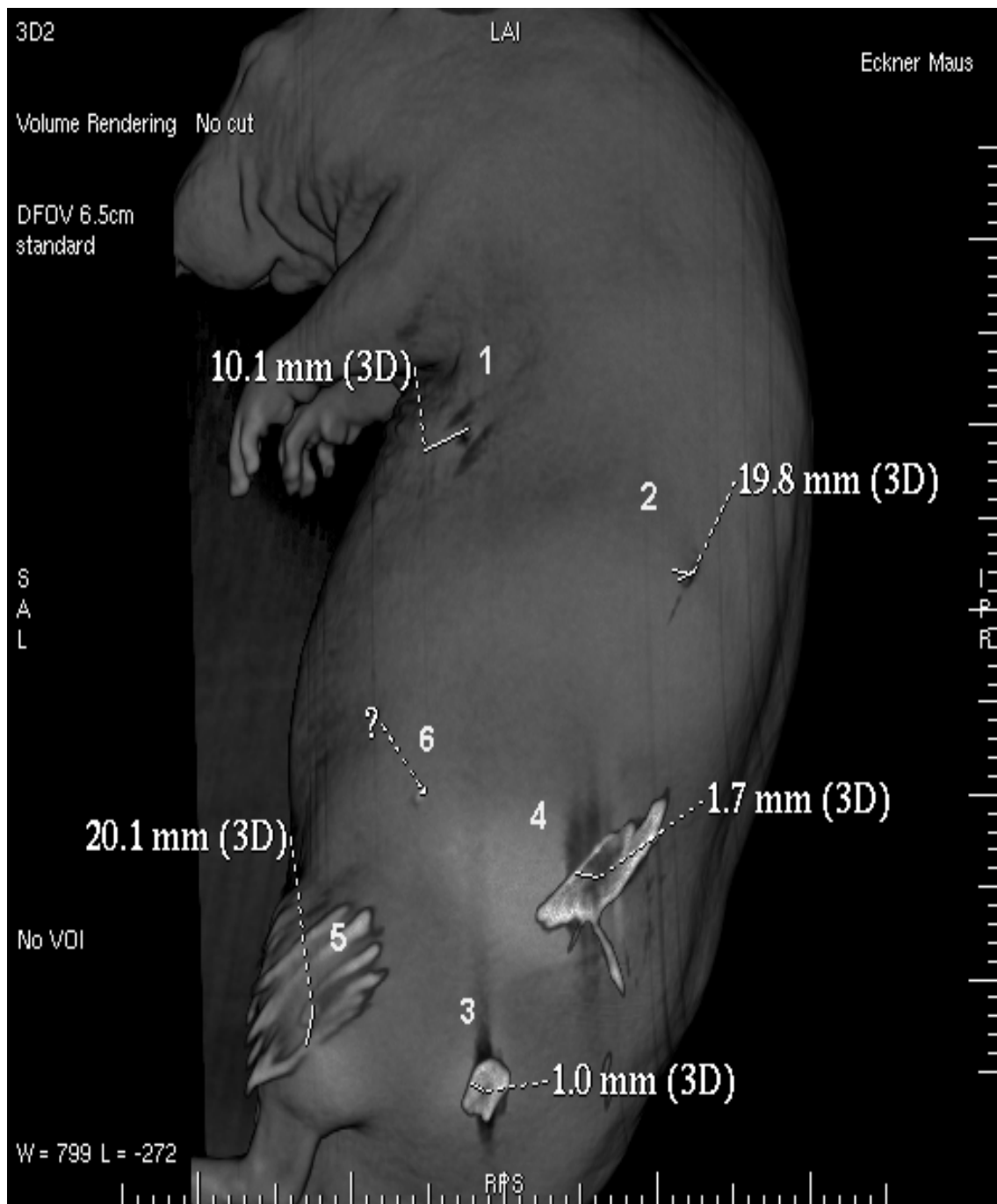


Abb. 22: fpVCT Rekonstruktion der untersuchten Maus mit den detektierten, jodge-
mischten Fluorochromen (Die Stellen 1-3 geben die gut zu detektierenden Injektions-
stellen mit der entsprechenden Tiefe in mm wieder; 4 und 5 zeigen starke oberflächliche
Verteilungen und sind somit nicht verwertbar; 6 ist nicht eindeutig zu detektieren)

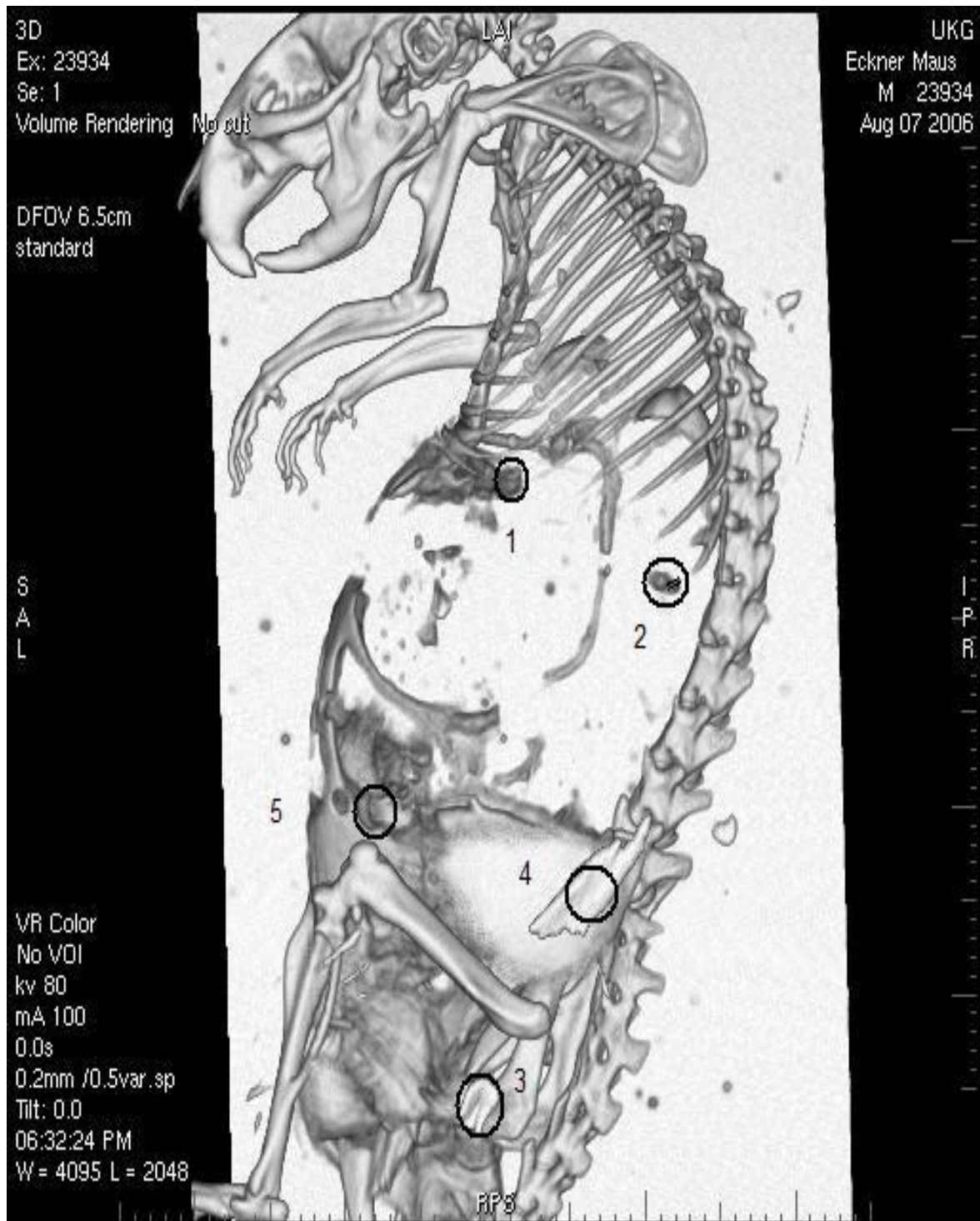


Abb. 23: Knochenfenster im fpVCT zur Kontrastmitteldetektion (detektierte Kontrastmitteleinschlüsse sind mit schwarzen Kreisen zur besseren Anschauung markiert)

IV Diskussion

IV.1 Allgemeines

In den von uns durchgeführten Versuchsreihen sollte untersucht werden, welches Potential eine neuartige Technologie wie die optische bzw. molekulare Bildgebung innehat.

Dies sollte vor allem vor dem Hintergrund neuer Einsatzgebiete wie dem Mamma-Scanner (Intes 2005; Tromberg et al. 2005; Frangioni 2008) oder der Abbildung von Strukturen in tieferen Ebenen als der momentan in der Klinik geläufigen optischen Kohärenztomographie (OCT) geschehen, wie sie heute mehr und mehr im klinischen Alltag Einzug gehalten haben und die Möglichkeit schaffen, optische/molekulare Prozesse in vivo zu detektieren. Die OCT als schnelles, nichtinvasives Verfahren zur Diagnostik und Verlaufskontrolle retinaler Erkrankungen mit der Möglichkeit zu qualitativen als auch quantitativen Aussagen über die Netzhaut und deren Schichten stellt hier ein ideales Beispiel für eine optische Methode dar, welche durch zunehmende Verbesserungen der jeweiligen Systeme zu einer sehr guten Ergebnisqualität geführt hat und durch weitergehende Modifikationen stetigem Zuwachs an diagnostischem Wert unterliegt (Sakata et al. 2009).

Das in dieser Arbeit angefertigte Phantom zur Durchführung der Experimente zielt in seinem Aufbau darauf ab, unterschiedliche Tiefen standardisiert und valide wiederzugeben und so eine Vergleichbarkeit der Messungen zu ermöglichen.

Hierzu orientierten wir uns an geläufigen, gut herzustellenden Phantomen (Pogue und Patterson 2006). Dieses hier aus Plexiglas hergestellte Phantom hat zudem den Vorteil, dass die eingebrachten Tiefen mittels Oberfräse sehr genau abgebildet werden können, was eine zusätzliche Fehlerreduzierung in Bezug auf die Messergebnisse liefert.

Plexiglas wurde vor allem deshalb gewählt, da es aufgrund seiner Oberfläche sehr undurchlässig und gut abwaschbar ist, was gerade bei der Reinigung eine rückstandslose Entfernung der Farbstoffe garantiert.

Ähnlich ist der benutzte Farbstoff Cy5.5 zu bewerten; hier wurde ein oft genutztes und in Lösung stabiles Gemisch verwendet, um eine relative Haltbarkeit zu gewährleisten. Diese ist vor allem durch fehlende photosensibilisierende Eigenschaften noch verlängert. Daneben ging es auch darum, die angefertigten Gemische zuverlässig reproduzieren zu können (Mujumdar et al. 1993; Riefke et al. 1997).

Die oben erwähnte Haltbarkeit auch gegenüber Wärme durch die Laserleistung wurde danach zudem erhöht durch das Aufbringen von handelsüblichem Paraffinöl als Eindeckmittel, welches hier den Vorteil bot, mit den wasserlöslichen Farbstoffen keine Lösung einzugehen und sich so nicht negativ auf die Messungen auszuwirken.

Nicht zuletzt verwendeten wir ein Meßsystem der Firma General Electrics, welches in firmeneigenen Studien zuverlässig arbeitete und reproduzierbare Ergebnisse lieferte (Long and Vernon 2004; GE Healthcare 2004).

Aus der Arbeitsgruppe der optischen Bildgebung der Diagnostischen Radiologie der Universität Göttingen ist hierzu auch bereits eine Dissertationsarbeit hervorgegangen, die sich den technischen Möglichkeiten des *optix* - Systems bediente (Zientkowska 2007).

IV.2 Continuous - wave versus time - domain - Technik

Im Folgenden sollen grundlegende Vorteile der neuerlichen time - domain - Technik im Gegensatz zur bereits in der Vergangenheit diskutierten continuous - wave - Methode dargestellt werden (vgl. Kap.I.3).

Die Grundlagen zur CW - Methodik, wie sie in Kap.I.3 beschrieben wurden, erklären gleichzeitig deren Limitierung.

So liefern vorhandene, reine CW - Systeme keine qualitativen Aussagen in Bezug auf das vorhandene Medium. Streuung, aber auch Absorption und Tiefenmessungen sind hiermit nicht ausreichend ableitbar (vgl. Tab. 1), da die üblicherweise detektierten Photonen nicht zeitlich getrennt aufgezeichnet werden können. Jedoch gab es in der Ver-

gangenheit Unternehmungen, z.B. Tiefeninformationen mittels CW - Systemen zu ermitteln. Hierbei waren bei Phantommessungen allerdings aufwendige Justierungen der Versuchsanordnung und die Kenntnisse der Materialeigenschaften des Phantoms nötig, um korrekte Tiefen wiederzugeben. Ohne diese Eigenschaften Rückschlüsse auf Fluoreszenzeinschlüsse zu gewinnen, ist erst Ergebnis neuerer Studien (Yuan and Zhu 2006). Zudem sind als limitierende Faktoren die fehlende dreidimensionale Volumenwiedergabe von zu untersuchenden Objekten oder die Tatsache, dass Fluoreszenzfarbstoffe, die von einem anderen ebenfalls im Medium vorhandenen Objekt abgeschwächt werden, nicht detektiert werden können, zu nennen.

Diese Ergebnisse wurden von Cheng und Boas als „Pseudo-3D-Images“ bezeichnet (Cheng X und Boas 1998).

Die Vorläufer der continuous - wave - Technik waren bereits im frühen neunzehnten Jahrhundert bekannt und es wurde versucht, über einfaches einfallendes Licht den Schädel, die Hoden oder die Brust zu untersuchen (Bright 1831; Curling 1856; Gibson et al. 2005).

Heute dienen relativ kostengünstige Systeme, z.B. das allseits bekannte Pulsoxymeter, das die Oxygenierungsänderung des Blutes erfassen kann, oder optische Systeme in der Neurologie als Topographiemöglichkeit des Cortex, in vielen Kliniken als Standarduntersuchungen. Hier bestand die Schwierigkeit vor allem darin, menschliches Gewebe mit seinen unterschiedlichen Schichten und damit verbundenen inhomogenen optischen Eigenschaften verstehen zu lernen und soweit aus den Messungen herauszufiltern, bis qualitativ aussagekräftige Ergebnisse entstehen (Chance et al. 1998).

Das Phänomen, Photonen zeitlich getrennt aufzuzeichnen, nutzt die time - domain - basierte Datenaufzeichnung. Die Möglichkeit, gepulst abgegebenes Licht im nahen Infrarotbereich zeitlich getrennt aufzeichnen zu können, erlaubt über die so aufgetragene *time-point-spread-function* (TPSF) Rückschlüsse auf Konzentration und Tiefe des eingebrachten Fluochromes. Über die neuerliche Möglichkeit, dabei mehrere Detektoren einzusetzen, können zudem Streuungsartefakte und Hintergrundrauschen weiter reduziert und so zum einen die Ortsauflösung, zum anderen aber auch mehrere Fluochrome gleichzeitig detektiert werden (Mahmood et al. 2002).

Erste Versuche mit einer solchen Technik führten Hebden et al. bereits in den neunziger Jahren durch (Hebden et al. 1997). Diese initial mit einem Detektor ausgestatteten Systeme hatten den Nachteil, dass vor allem die Scandauer noch mit zwei bis sechs Stunden beziffert wurde. Deutlich schneller wurden die Scanzeiten nach Einführung mehrerer Detektoren, die zwischen 32 - und 64 Channel aufwiesen, weshalb hierdurch auch komplexere Strukturen in hinnehmbarer Zeit untersuchbar wurden (Eda et al. 1999; Schmidt et al. 2000).

Neben diesen die Systeme direkt betreffenden Fortschritten konnten auch die die Daten verarbeitenden Computer weiter verbessert werden, so dass hierdurch weitere Geschwindigkeitsverbesserungen und eine Erhöhung des Auflösungsvermögens erreicht werden konnte (Becker 2005; Gibson et al. 2005).

IV.3 Diskussion der Ergebnisse

In den die Ergebnisse unserer Experimente beschreibenden Kapiteln III.1 und III.2 ist zu sehen, dass die realen Tiefenpositionen des Phantoms nicht exakt dargestellt werden konnten, jedoch bestand zwischen den gemessenen und den realen Tiefen eine klare Korrelation. Zudem zeigte sich ein signifikant zunehmender, gemessener Tiefenzuwachs bei real zunehmenden Tiefen.

Im Folgenden sollen sich Fehlerquellen ableiten lassen, die zur Erklärung des oben genannten Phänomens beitragen.

Eine ungenaue Darstellung der Tiefen sowie der eingebrachten Farbstoffkonzentrationen können durch Fehlerquellen in folgenden Strukturen bedingt sein:

- Im Farbstoff selbst.
- In der Beschaffenheit des Phantoms.
- Durch das Eindeckmittel Paraffin.
- Durch die Geräteeinstellungen an *optix*.

Der Farbstoff Cy5.5, ein Indodicarbocyanin, ist ein in der optischen Bildgebung weit verbreiteter Farbstoff, der sich, wie bereits im Material- und Methodenteil (s. Kap.II.7, S.29) dargestellt, aufgrund seiner Stoffeigenschaften sehr gut für die von uns durchgeführten Experimente eignet. Er ist heute bei der Kopplung an Antikörper ein sehr häufig benutzter Stoff, nicht zuletzt aufgrund fehlender gesundheitsschädlicher Daten und guter Wasserlöslichkeit, was ihn neben praktikabler Herstellung hier auch gut gegen das fetthaltige Eindeckmittel Paraffin abgrenzt (Amersham GmbH 2003, 2005).

Messungen mit Cy5.5 als fluoreszierendem Farbstoff führten in mehreren Studien zu einer guten Ergebnisqualität (Belenkov et al. 2004; Wang et al. 2009; Kim et al. 2009). Eigentliche Fehlerquellen in Zusammenhang mit dem Farbstoff konnten sich also nicht herleiten lassen, gerade auch deshalb, weil sich die verwendeten Konzentrationen als auch die Herstellung nicht von den gebräuchlichen Verfahren unterschieden.

Ein dem *optix* - System beiliegendes Phantom mit Cy5.5 - befüllten Kugeln in einem Kunststoffverbund zeigte gute, reproduzierbare Daten, wie sie von uns auch vor Durchführung der eigentlichen Experimente gesehen wurden (Dullin 2005). Hier wurden in diesem Zusammenhang auch bereits Probleme gerade im Hinblick auf die Messergebnisse dargelegt. So war hier in den Phantommessungen zu sehen, dass obere Anteile der Farbstoffverteilungen mehr Signalintensität lieferten als tief gelegene, obwohl deren reale Tiefe zu jedem Zeitpunkt und zu jeder Position gleich blieb. Dies wurde hier vor allem auf die zugrundeliegenden geringeren Verluste in den oberen Anteilen zurückgeführt, während in Randbezirken der gleichen Tiefe eine vergleichsweise geringe Farbstoffmenge abgebildet wurde (siehe Abb. 24). Zudem konnten wir an dem von der Fa. General Electrics hergestellten, dem *optix* - System beiliegenden Phantom, ebenfalls diese Beobachtungen machen.

Ntziachristos und Weissleder beobachteten in Experimenten zur dreidimensionalen Darstellung von mit Cy5.5 gefüllten Zylindern, dass sich deren Größe vor allem an ihren Enden nicht korrekt abbildete, sondern bis zu 30% abwich, während in der Mitte der Zylinder gute Ergebnisse geliefert wurden. Dies wurde vor allem darauf zurückgeführt, dass gerade in den oberen und unteren Anteilen des Zylinders weniger optische Information enthalten ist, da bei von oben bzw. unten einstrahlendem Licht die größte „virtu-

elle Konzentration“ in der Mitte des Mediums liegt (Ntziachristos and Weissleder 2001).

Daneben zeigte Dullin in seinem Vortrag von 2005 auf, dass die mittlere Tiefe, wie ebenfalls in Abb. 24 zu erkennen ist, zugunsten der oberen Anteile verschoben ist, dass folglich oberflächennahe Strukturen mit eher größerer Tiefe dargestellt werden. Des Weiteren lieferte er einige Einschränkungen bzgl. der allgemeinen Leistungsfähigkeit von *optix*; so wird eine maximale Eindringtiefe von 20mm beschrieben. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit bei keinem der Experimente überschritten. Interessant erscheint jedoch, dass vermutet wird, dass Tiefen- und Konzentrationsmessungen nicht vollständig unabhängig dargestellt werden können. So wurde erkannt, dass sich signifikante Intensitätsänderungen in gleicher Tiefe durch unterschiedliche Konzentrationen auch als unterschiedlich gemessene Tiefen darstellen.

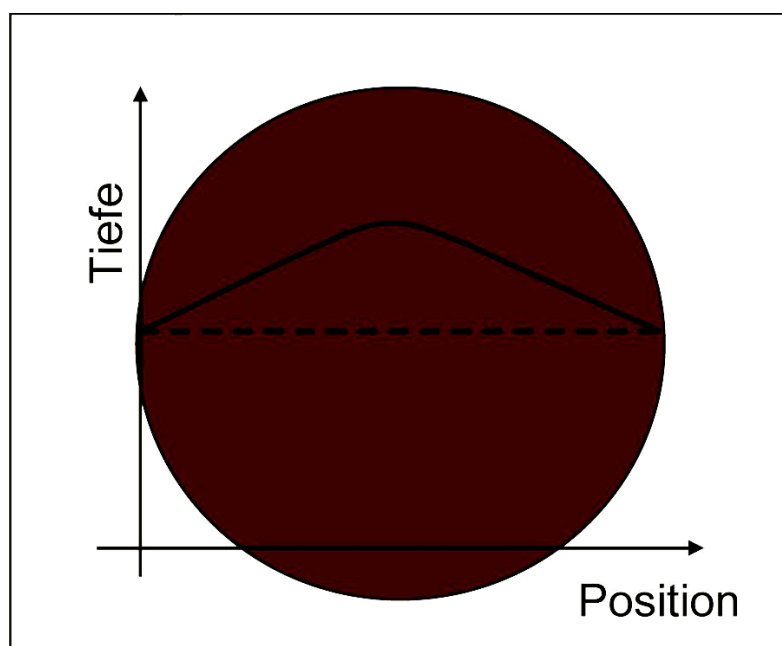


Abb. 24: Schematische Darstellung eines gemessenen Tiefenprofils einer homogenen Farbstoffkugel (Dullin 2005)

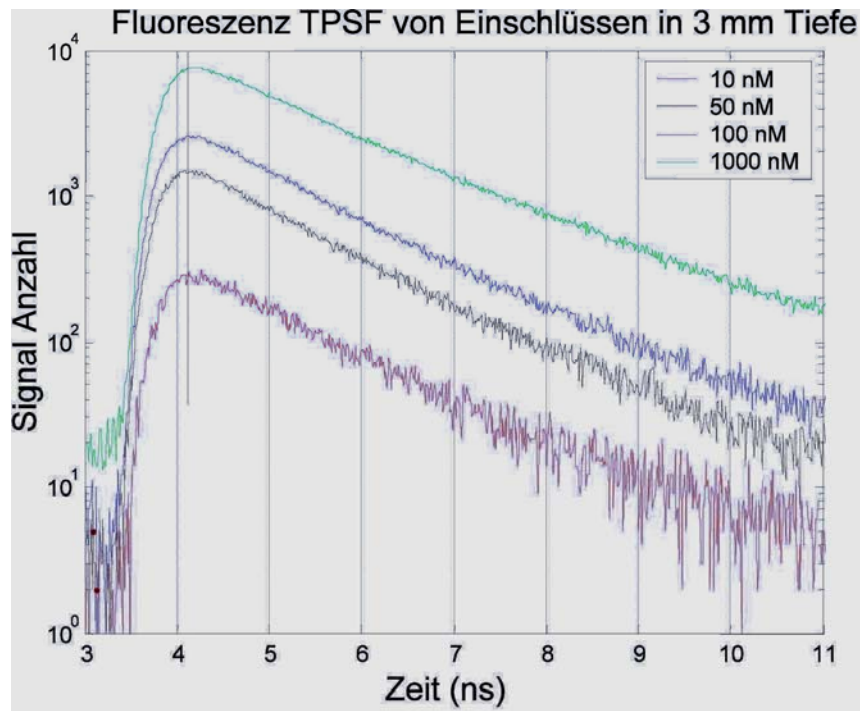


Abb. 25: Temporal – point – spread – function bei unterschiedlichen Konzentrationen (Dullin 2005)

Dies zeigte sich auch in den hier durchgeführten Konzentrationsmessungen, wo steigende Konzentrationen zu einer Zunahme der gemessenen Tiefe und umgekehrt führten (Kap. III.1.2 und III.2.2; Abb. 25), und dies trotz modifizierter Systemeinstellungen als Garant für optimale Messbedingungen (Walters 2005).

Als weiterer Störfaktor für optimale Messergebnisse muss das hier verwendete Phantom und dessen Beschaffenheit in Zusammenschau mit dem Eindeckmittel Paraffin betrachtet werden.

Die gute und genaue Herstellung durch Fräsung definierter Tiefen ist als deutlicher Vorteil zu sehen. Allerdings kann die Grundsubstanz Plexiglas optisch physikalische Probleme bieten. Auftreffendes Licht kann vor allem durch Reflexion und Brechung zu einer verzerrten, zum Teil verlängerten Flugzeit der von der CCD - Kamera des Systems aufgezeichneten Photonen führen. Dieses Problem verstärkt sich durch die Tatsache, dass in den Phantompositionen zudem optisch unterschiedliche Medien und folglich deren

Grenzflächen zum Tragen kommen, welche jede für sich wiederum die aufzuzeichnenden Photonen zum Teil schwächen, brechen, absorbieren oder reflektieren.

Diese Untergrundstrahlung des Messaufbaus, die letztlich alle nicht vom zu untersuchenden Objekt stammende Strahlung bezeichnet, wurde bereits in der Dissertation von Erfle beschrieben. Hier machte er auf die kohärente und inkohärente Untergrundstrahlung aufmerksam, welche durch o.g. unterschiedliche Medien bedingt ist und zu Störfaktoren der Messungen beiträgt (Erfle 2002).

Um zumindest direkte Randreflexe nicht in die vorliegenden Messungen mit einzubeziehen, wurden in der Arbeit zu diesem Zweck stets mehrere Messpunkte aus definierten Experimenten subsummiert und hieraus wiederum Mittelwerte gebildet. So sind Außreisser durch optische Fehler minimiert.

Betrachtet man die Geräteeinstellungen von *optix* und die hieraus ableitbaren Variablen, die sich aus den unterschiedlichen Einstellungsmöglichkeiten ergeben, lassen sich einige von der Fa. General Electrics dargelegten optimalen Bedingungen definieren, deren Einhaltung zu optimalen Messergebnissen führen sollen (Walters 2005).

So können für folgende Parameter klare Handlungsempfehlungen bezüglich der Einstellung gemacht werden:

- Laser power
- Integrationszeit
- Scan step
- Plattformhöhe.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden alle Messungen durchgeführt.

Hierbei sollte die Laser Power so hoch wie möglich gewählt werden, ohne einen Abbruch des Experimentes zu provozieren. Dies dient vor allem zur optimalen quantitativen Ausbeute an messbaren Photonen.

Die Integrationszeit sollte nie unter 100ms betragen, ein niedriger Scan step führt zu höheren, aussagekräftigeren Signalintensitäten.

Dies sei vor allem deshalb erwähnt, da es sich um dezidierte Handlungsempfehlungen des Herstellers handelt, mit denen hier korrekte Messungen möglich gemacht werden sollen.

Im Zusammenhang mit den möglichen Fehlerquellen soll an dieser Stelle nochmals die bereits in Kap.IV.1 beschriebene optische Kohärenztomographie erwähnt werden.

Hier wurden in der Vergangenheit mehrere Studien über Aussagekraft und Fehlerquellen dieses diagnostischen Verfahrens durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Entwicklung von Referenzparametern bzgl. der Messungen schwierig zu realisieren ist, da sich die Scanbedingungen schlecht reproduzieren lassen. Die Validität der Messergebnisse hing hier sehr von der Fixation des Auges sowie der Scanparameter ab. Dies verdeutlicht, wie sensibel auch klinisch in Anwendung befindliche optische Verfahren heute noch sind (Kampik und Grehn 2003; Ray et al. 2005; Strauss et al. 2007).

Betrachtet man Studien, die als Bildgebungssystem *optix* nutzen, sei an dieser Stelle vor allem auf die von der Herstellerfirma ART durchgeführten Untersuchungen zu verweisen. Bereits 2004 zeigte die Studie, dass unterschiedliche Tiefen und Konzentrationen mit hoher Genauigkeit durch das System abgebildet werden können. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls beschrieben, dass *optix* Tiefen- und Konzentrationsinformationen unabhängig voneinander berechnen kann (Art Advanced Research Technologies Inc. 2004). Dies ist in unseren Experimenten ebenfalls zu erkennen, da hier erst bei sehr niedrigen Konzentrationen eine signifikante Tiefenänderung zu erkennen ist. Offen bleibt, wie die so exakten Tiefenbestimmungen von ART evaluiert wurden. Dies ist auch deshalb nicht vollständig zu klären, da in den durchgeführten Experimenten keine genauen Informationen zum benutzten Phantom gemacht wurden. So bleibt hier offen, welches Material benutzt wurde und welche Eigenschaften die Fluoreszenzeinschlüsse in diesem aufwiesen.

Eine ebenfalls von Mitarbeitern der Fa. ART durchgeführte Studie, die vor allem die Eigenschaften von Cy5.5 in unterschiedlichen Lösungen sowie Versuche in vivo (hier an einer Maus) betrachteten, stellte ebenfalls eine gute Ergebnisqualität vor, verwies

aber auch auf mögliche Störfaktoren wie die Autofluoreszenz *in vivo*. Diese ließen sich hier durch entsprechende Parametermodifikationen des Systems sowie Diäten der Versuchstiere vor den Experimenten reduzieren (Belenkov et al. 2004)

In den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimenten wurden hingegen Leer-messungen durchgeführt, um eventuelle Autofluoreszenzen zu erkennen, die z.B. durch Farbstoffverunreinigungen des Phantoms verursacht waren. So konnte sichergestellt werden, dass sich vor der Durchführung der Experimente keine signifikanten Autofluoreszenzen zeigten. Das Phantom selbst wies diese nicht auf.

Weitere Studien im Zusammenhang mit dem hier verwandten *optix* - System zielten auf bestimmte Gewebe-/Organsysteme. So zeigten Brem et al. sowie Minaguchi et al., dass sich bestimmte Kollagen - Arthritiden unter Verwendung mit Cy5.5 als Fluoreszenzfarbstoff im Mausmodell mittels *optix* darstellen und verifizieren lassen. Ein Jahr zuvor hatten bereits Hirai et al. konjugierte Cy5.5 - Lösungen benutzt und zeigten, dass sich Tumorregionen und Entzündungen deutlich signalintensiver abbildeten als unauffälliges Gewebe (Brem et al. 2006; Hirai et al. 2007; Minaguchi et al. 2008).

Neueste Ansätze hinsichtlich der präzisen Darstellung von Strukturen beruhen darauf, konventionell radiologische Verfahren wieder in die Apparaturen mit einzubeziehen und so für eine weitergehende Detailtreue zu sorgen. Daneben kann mittels dieser Idee die optische Bildgebung primär dazu eingesetzt werden, molekulare Prozesse *in vivo* zu erfassen, während mittels Röntgenstrahlen die Lokalisation präzise einzuschätzen ist.

So beschreiben Kepshire et al. im April 2009 ein microCT, welches zum einen auf einem optischen Bildgebungssystem mit 5 Detektoren beruht, zum anderen aber auch die konventionelle Röntgenstrahlung nutzt, um Lokalisationen besser zu erfassen. Gerade durch die Überlappung beider Techniken in einem System soll so eine höherer Ergebnisqualität erzielt werden (Kepshire et al. 2009).

Diese Verknüpfung mehrerer Techniken wurde 2007 auch in einem Review aus den Abteilungen für Nephrologie und Radiologie der Universitätsklinik Göttingen herausgestellt (Wessels et al. 2007).

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist eines in Forschung und Klinik mehr und mehr verbreitetes Verfahren der modernen Bildgebung betrachtet worden.

Die hier durchgeführten Experimente fußten auf einer weiter entwickelten Möglichkeit der optischen Bildgebung, der time - domain - basierten Methode. Hierbei ist es möglich geworden, Photonen von gepulstem Licht zeitlich getrennt zu erfassen und hieraus erstmals auch topographische Aussagen über das untersuchte Objekt zu geben.

Hier wurde das von General Electrics gebaute *optix* - System verwendet, das eben diese time - domain - basierte Technik benutzt. Ein angefertigtes, mit unterschiedlichen Tiefenpositionen ausgefrästes Phantom lieferte den Grundstein für die Experimente. Als Farbstoff wurde das weit verbreitete Indodicarbocyanin Cy5.5 verwendet, welches unter dem Eindeckmittel Paraffinöl vor Austrocknung durch den Laser geschützt wurde.

In den Messreihen, die der Detektion unterschiedlicher Konzentrationen als auch unterschiedlicher Tiefen dienen, sollte evaluiert werden, inwieweit das benutzte System in der Lage ist, diese zu detektieren. Hier zeigte sich, dass *optix* in der Lage ist, unterschiedliche Tiefen als auch Konzentrationen signifikant zu erfassen. Bezüglich der Genauigkeit der Messergebnisse bleibt festzuhalten, dass o.g. Tiefen- als auch Konzentrationsmessungen zwar erfassbar waren, aber nicht die realen Gegebenheiten widerspiegeln.

Das hier eingesetzte, gepulste Laserlicht im Nahinfrarotbereich reagiert wie sichtbares Licht an Grenzflächen mit z.B. Absorption, Reflexion und Streuung. Diese Phänomene sind auch in den hier durchgeführten Experimenten zwangsläufig aufgetreten. Problematisch wirken sie sich aus, wenn Strukturen unterschiedlicher Dichte und Homogenität (wie hier der Farbstoff, das Eindeckmittel Paraffin und das Phantom selbst) direkt aneinander grenzen. Diese Untergrundstrahlung des Messaufbaus führt mitunter zu nichtreproduzierbaren und nichtvorhersehbaren Ergebnissen.

Insgesamt lässt sich allerdings feststellen, dass trotz der beschriebenen Problematik die optische Bildgebung weiter in den Focus moderner Medizin rückt. Im Bereich der Immunologie ist es z.B. möglich geworden, fluoreszierende Farbstoffe an Antikörper zu koppeln und so Bindungen mit deren Antigenen in vivo sichtbar zu machen, was zu einem weiteren Verständnis komplexer immunologischer Vorgänge geführt hat.

Daneben zeigen sich auch auf dem Gebiet der Mammographie große Fortschritte; so sind nach einfachen diaphanographischen Untersuchungen, die erfolglos versuchten, Brusttumore darzustellen (Drexler et al. 1985), in vivo Studien zur Charakterisierung von Mammakarzinomen im Jahre 2000 erfolgreich durchgeführt worden (Bremer et al. 2002). Erst 2005 publizierte Intes die initialen, erfolgsversprechenden Ergebnisse zu einem neuartigen, auf time – domain basierenden System zur optischen Mammographie (Tromberg et al. 2000; Intes 2005).

Dieses, *Softscan*® genannte Mammographiesystem, soll zukünftig in der Lage sein, bösartige Brusttumore mit großer Sicherheit zur Darstellung zu bringen und so z.B. auch falsch positive Ergebnisse zu minimieren (Baker 2004; Art Advanced Research Technologies Inc. 2005).

So rückt durch weitere Fortschritte die optische und molekulare Bildgebung in letzter Zeit näher an die Möglichkeit, diese in Zukunft auch in der klinischen Routine nutzbar zu machen.

VI Anhang: *optix* - Abbildungen

eXplore Optix
Pre-clinical Optical Imaging System



Fluorescence Imaging for *In-vivo* applications

eXplore Optix

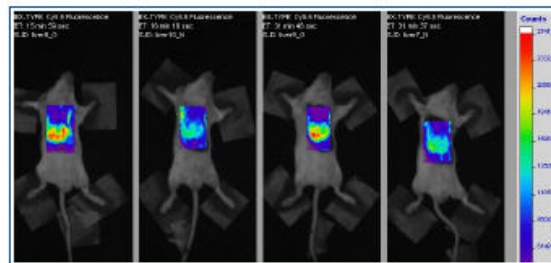
Pre-clinical Optical Imaging System

Product Specifications

Overview

eXplore Optix has been designed to characterize, quantify and visualizes cellular and molecular events in living animals using specific or non-specific fluorescent probes . Non-invasively tracking these events in vivo can dramatically improve the quantity and quality of research information, expedite drug discovery and development, and significantly reduce the cost of animal research.

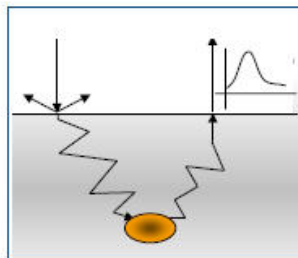
eXplore Optix, In-vivo molecular imaging allows longitudinal studies to be conducted in the same animal. Following a single animal over time allows researchers to more accurately measure the effect of intervention, disease progression and outcome. This ultimately results in more specific and earlier disease diagnosis as well as improved treatment monitoring.



The images above depict uptake of a targeted versus non-targeted agent at two time-points

Technology

eXplore Optix uses a time-correlated single photon counting (TCSPC) technique to measure fluorescence and absorption. This technique measures photon migration of short pulses of light at specific wavelengths. The arrival time distributions, or temporal point spread function (TPSF), are detected and then used to derive and separate absorption and scattering coefficients, quantify the fluorescence emitter, and provide fluorescent lifetime.



© Copyright 2004 General Electric Company

Advantages

- Provides accurate localization of embedded fluorescent material.
- Temporal information enables the system to quantify inclusion depths.
- Through depth, temporal information leads to an accurate estimate of fluorophore concentration.
- Measuring fluorescence lifetime allows distinction between different fluorescent materials.

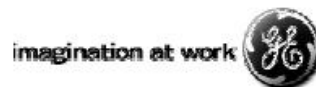
eXplore Optix

Pre-clinical Optical Imaging System

Product Specifications

ILLUMINATION SYSTEM	Pulsed laser diode
<ul style="list-style-type: none"> • Laser Repetition rate • Pulse width • Excitation wavelength¹ • Illumination spot 	80 MHz < 100 ps 600 - 900 nm 1 mm on major axis
DETECTION SYSTEM	Time correlated single photon counting system
<ul style="list-style-type: none"> • Detector • Temporal resolution • Depth Sensitivity • Detection wavelengths¹ • Detection spot 	PMT (photomultiplier tube) 250 ps >10mm at 700nm 450 - 900 nm 1 mm diameter
SPATIAL RESOLUTION	0.5 - 3 mm steps
ANIMAL PLATE	Removable, adjustable height
<ul style="list-style-type: none"> • Size • Temperature setting 	20 x 9 cm Adjustable range 26 - 42°C
ENCLOSURE	Light tight
<ul style="list-style-type: none"> • Dimensions • Weight • Ports for inhalation anesthetic 	114 x 76 x 84 cm (L x W x H) 90 kg
SCANNING PRINCIPLE	Raster scanning
<ul style="list-style-type: none"> • Longitudinal • Transversal 	Linear translation stage 1 galvanometer for scanning detection spot 1 galvanometer for scanning illumination spot
SCAN AREA	20 x 8.4 cm
<ul style="list-style-type: none"> • Region of interest (ROI) 	Any size ROI within selected scan area
SCAN TIME	0.3 - 1 sec. collection at each point in ROI

© Copyright 2004 General Electric Company



GE Medical Systems
 100 Collip Circle, Suite 120
 London, Ontario N6G4X8
 Toll Free 888.725.8285
http://gemedical/preclinical_imaging

instructions

product code

PA13101/2/4/5/6

PA13601/2/4/5/6

PA15100/2/4/5/6

PA15601/2/4/5/6

PA17101/5/6

CyDye™ mono- reactive NHS Esters

Reagents for the labelling of biological
compounds with Cy™ monofunctional dyes

Warning

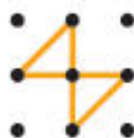
For research use only.

Not recommended or intended
for diagnosis of disease in
humans or animals.

Do not use internally or
externally in humans or
animals.

① PA13101/1/2/3/4/5/6

REV-A2002



Amersham
Biosciences

Components

Foil packs, each containing 1, 5, 10, 25 or 50 mg dried dye (for Cy3, Cy3.5, Cy5 & Cy5.5).

Foil packs, each containing 1, 5 or 25 mg dried dye (for Cy7).

Product specification sheet with instructions for using the dye.

Reconstitute the material to 1mg/ml in anhydrous DMF/DMSO.

Reconstituted material may be stored for up to 2 weeks at -200C in aliquots to avoid repeat freeze thaw cycles.

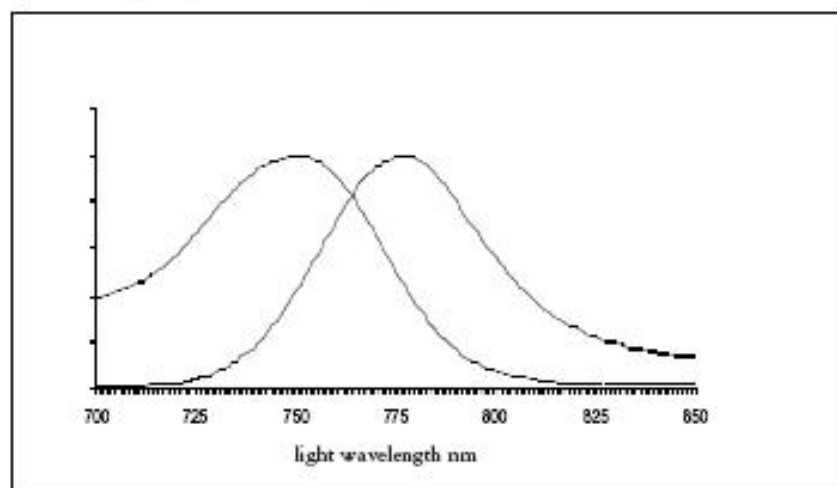
Safety warnings and precautions

Warning: For research only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals. We recommend that this product and components are handled only by those persons who have been trained in the appropriate laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. As all chemicals should be considered as potentially hazardous, it is advisable when handling chemical reagents to wear suitable protective clothing, such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In case of contact with skin or eyes, wash immediately with water.

Caution: These dyes are intensely coloured and very reactive. Care should be exercised when handling the dye vials to avoid staining clothing, skin, and other items.

Note: This article contains example protocols. It is the user's responsibility of the user to design and optimise protocols that are appropriate for the target compound that is being labelled. These example protocols utilise chemicals that may be hazardous, and should only be performed by appropriately qualified and trained persons.

Figure 6. Cy7 dye fluorescence spectra



Monofunctional dye characteristics

	Cy3	Cy3.5	Cy5	Cy5.5	Cy7
Formula weight	765.95	1102.37	791.99 nm	1128.42	818.00
Absorbance max	550 nm	581 nm	649 nm	675 nm	747 nm
Extinction max	150000 M ⁻¹ cm ⁻¹	150000 M ⁻¹ cm ⁻¹	250000 M ⁻¹ cm ⁻¹	250000 M ⁻¹ cm ⁻¹	200000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Emission max	570 nm	596 nm	670 nm	694 nm	776 nm
Quantum yield	>0.15 [*]	>0.15 [*]	>0.28 [*]	>0.28 [*]	-

* for labelled proteins, D/P=2

VII Literaturverzeichnis

Amersham GmbH: CyDye TM monoreactive NHS Ester Instructions. o.Hrsg., o.Verl., o.O., 2003.

Amersham GmbH: Cy5.5 Mono NHS Ester Batch analysis sheet. o.Hrsg., o.Verl., o.O., 2005

Art Advanced Research Technologies Inc.: Pre-Clinical Optical Molecular Imager. 1.Auflage; o.Hrsg., o.Verl., Saint-Laurent, Canada 2004.

Art Advanced Research Technologies Inc.: Technology. o. Hrsg., o.Verl., o.O, Canada 2005.

Backer MV, Patel V, Jehning BT, Backer JM (2006): Self-assembled "dock and lock" system for linking payloads to targeting proteins. *Bioconjug Chem* 17, 912-919.

Baker W (2004): Company Profil - ART. *Med. Techn. Wat Can* 1, 4 .

Becker W: *The bh TCSPC Handbook*. 1.Auflage; o.Verl., Berlin 2005.

Belenkov A, Ma G, Gallant P, McIntosh LM: Fluorescence lifetime imaging in turbid media using a time-domain optical imager. Posterpräsentation am 29.03.2004 in: Annual Meeting of the Academy of Molecular Imaging, Orlando, 27. bis 31. März 2004; o. Hrsg., o.Verl., 2004.

Brem M, Schlechtweg P, MacKenzie J, Winalski C, Lang P (2006): Molekulare Bildgebung: Künftige Anwendungen bei Arthritiden. *Radiologe* 46, 394-402.

Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R (2001): Progress in optical imaging. *Radiologe* 41, 131-137.

-
- Bremer C, Tung C, Bogdanov A, Weissleder R (2002): Imaging of differential protease expression in breast cancers for detection of aggressive tumor phenotypes. *Radiology* 222, 814-818.
- Bright R (1831): Diseases of the brain and nervous system. Longmann London 1831 I, 2431.
- Chance B, Cope M, Gratton E, Ramanujam N, Tromberg B (1998): Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue. *Rev Sci Instrum* 69, 3457.
- Cheng X, Boas D (1998): Diffuse optical reflection tomography using continuous wave illumination. *Opt Express* 3, 118-123.
- Cheng Z, Levi J, Xiong Z, Gheysens O, Keren S, Chen X, Gambhir SS (2006): Near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for tumor optical imaging in cell culture and living mice. *Bioconjug Chem* 17, 662-669.
- Curling TB (1856): A practical treatise on the diseases of the testis, and of the spermatic cord and scrotum. Blanchard & Lea, Philadelphia, USA.
- Dianova GmbH: Fluoreszenz Topics - Ein Handbuch für die Immunfluoreszenz. Version 002; o.Hrsg., o.Verl., Hamburg 2005.
- Drexler B, Davis JL, Schofield G (1985): Diaphanography in the diagnosis of breast cancer. *Radiology* 157, 41-44.
- Dullin C: Das eXplore Optix Projekt am UKG. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrages (gehalten 18.06.2005) in: 9.Fortbildungsseminar der Arbeitsgemeinschaft Physik und Technik in der bildgebenden Diagnostik der DRG, Göttingen, 17. bis 18. Juni 2005, o.Hrsg., o.Verl. 2005.
- Eda H, Oda I, Ito Y, Wada Y, Oikawa Y, Tsunazawa Y, Takada M, Tsuchiya Y, Yamashita Y, Oda M (1999): Multichannel time-resolved optical tomographic imaging system. *Rev Sci Instrum* 70, 3595.

-
- Edwards DR, Murphy G (1998): Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature* 394, 527-528.
- Erfle H: Untersuchung von Membran-DNA Komplexen in äußeren elektrischen Feldern. *Phys Diss Heidelberg* 2002.
- Flower RW, Hochheimer BF (1976): Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. *Johns Hopkins Med J* 138, 33-42.
- Frangioni JV (2008): New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol* 26, 4012-4021.
- Funovics M (2007): Optical imaging of fluorescence in the near infrared. From passive to enzymatically activated contrast medium. *Radiologe* 47, 53-61.
- GE Healthcare: Explore Optix Operator's Manual - Technical Publication. 1.Auflage; o.Hrsg, o.Verlag, o.O., Canada 2004.
- Gibson AP, Hebden JC, Arridge SR (2005): Recent advances in diffuse optical imaging. *Phys Med Biol* 50, 1-43.
- Götz L, Schütz O, Heywang-Köbrunner S, Siebold H, Buchmann J, Lampe D (1996): NIR-Mammographie - erste klinische Nativuntersuchungen mit dem Mammascanner. *Fortschr Röntgenstr* 165, 328.
- Grosenick D, Wabnitz H, Rinneberg H (1997): Time-resolved imaging of solid phantoms for optical mammography. *Appl Opt* 36, 221-231.
- Gupta R, Grasruck M, Suess C, Bartling SH, Schmidt B, Stierstorfer K, Popescu S, Brady T, Flohr T (2006): Ultra-high resolution flat-panel volume CT: fundamental principles, design architecture, and system characterization. *Eur Radiol* 16, 1191-1205.

-
- Hebden JC, Arridge SR, Delpy DT (1997): Optical imaging in medicine: I. Experimental techniques. *Phys Med Biol* 42, 825-840.
- Hirai M, Minematsu H, Kondo N, Oie K, Igarashi K, Yamazaki N (2007): Accumulation of liposome with Sialyl Lewis X to inflammation and tumor region: application to in vivo bio-imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 553-558.
- Intes X (2005): Time-Domain Optical Mammography SoftScan Initial Results. *Acad Radiol* 12, 934-947.
- Jaffray DA, Siewerdsen JH (2000): Cone-beam computed tomography with a flat-panel imager: initial performance characterization. *Med Phys* 27, 1311-1323.
- Jarlman O, Berg R, Svanberg S (1992): Time-resolved transillumination of the breast. *Acta Radiol* 33, 277-279.
- Kampik A, Grehn F: *Augenärztliche Diagnostik*. 1.Auflage; Thieme-Verlag, Stuttgart 2003.
- Kaschke M, Jess H, Gaida G, Kaltenbach J, Wrobel W (1994): Transillumination imaging of tissue by phase modulation techniques. *Adv Opt Imaging Photon Migration* 21, 88-92.
- Kepshire D, Mincu N, Hutchins M, Gruber J, Dehghani H, Hypnarowski J, Leblond F, Khayat M, Pogue BW (2009): A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging. *Rev Sci Instrum* 80, 043701.
- Kim E, Park E, Cheong S, Lee C, Jeong H, Kim DW, Lim ST, Sohn M (2009): In vivo imaging of mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) expression using an optical imaging system. *Bioconjug Chem* 20, 1299-1306.
- Knollmann F, Valencia R, Buhk J, Obenauer S (2006): [Characteristics and applications of a flat panel computer tomography system]. *Rofo* 178, 862-871.

-
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000): Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291, 113-135.
- Lamerichs R, Schäffter T, Hämisch Y, Powers J (2003): Molecular imaging: The road to better healthcare. *Medicamundi* 47, 2-9.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Leevy CM, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM (1967): Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *JAMA* 200, 236-240.
- Liebert A, Wabnitz H, Obrig H, Erdmann R, Möller M, Macdonald R, Rinneberg H, Villringer A, Steinbrink J (2006): Non-invasive detection of fluorescence from exogenous chromophores in the adult human brain. *Neuroimage* 31, 600-608.
- Long W, Vernon M: *Optical Molecular Imaging: Time Domain advantages with eXplore Optix*. o.Verl., o.O., 2004.
- Mahmood U, Tung CH, Bogdanov A, Weissleder R (1999): Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology* 213, 866-870.
- Mahmood U, Tung C, Tang Y, Weissleder R (2002): Feasibility of in vivo multichannel optical imaging of gene expression: experimental study in mice. *Radiology* 224, 446-451.
- Minaguchi J, Oohashi T, Inagawa K, Ohtsuka A, Ninomiya Y (2008): Transvascular accumulation of Sialyl Lewis X conjugated liposome in inflamed joints of collagen antibody-induced arthritic (CAIA) mice. *Arch Histol Cytol* 71, 195-203.
- Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS (1993): Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem* 4, 105-111.

-
- Ntziachristos V, Weissleder R (2001): Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation. *Opt Lett* 26, 893-895.
- Ntziachristos V, Yodh AG, Schnall M, Chance B (2000): Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2767-2772.
- Obenauer S, Dullin C, Heuser M (2007): Flat panel detector-based volumetric computed tomography (fpVCT): performance evaluation of volumetric methods by using different phantoms in comparison to 64-multislice computed tomography. *Invest Radiol* 42, 291-296.
- Pogue BW, Patterson MS (2006): Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *J Biomed Opt* 11, 041102.
- Pogue B, Testorf M, McBride T, Osterberg U, Paulsen K (1997): Instrumentation and design of a frequency-domain diffuse optical tomography imager for breast cancer detection. *Opt Express* 1, 391-403.
- Ray R, Stinnett SS, Jaffe GJ (2005): Evaluation of image artifact produced by optical coherence tomography of retinal pathology. *Am J Ophthalmol* 139, 18-29.
- Riefke B, Licha K, Semmler W (1997): Contrast media for optical mammography. *Radiologie* 37, 749-755.
- Sakata LM, Deleon-Ortega J, Sakata V, Girkin CA (2009): Optical coherence tomography of the retina and optic nerve - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 37, 90-99.
- Schad H, Brechtelsbauer H, Kramer K (1977): Studies on the suitability of a cyanine dye (Viher-Test) for indicator dilution technique and its application to the measurement of pulmonary artery and aortic flow. *Pflugers Arch* 370, 139-144.
- Schmidt F, Fry M, Hillman E, Hebden J, Delpy D (2000): A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography. *Rev Sci Instrum* 71, 256.

Seibt W: Physik für Mediziner. 3., korrigierte Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 1999.

Seilnacht T: Paraffinöl flüssig. o.Verl., http://www.seilnacht.com/Chemie/ch_paraf.htm, Bern 2006.

Siegel A, Marota JJ, Boas D (1999): Design and evaluation of a continuous-wave diffuse optical tomography system. *Opt Express* 4, 287-298.

Slakter JS, Yannuzzi LA, Guyer DR, Sorenson JA, Orlock DA (1995): Indocyanine-green angiography. *Curr Opin Ophthalmol* 6, 25-32.

Strauss RW, Scholz F, Ulbig MW, Kampik A, Neubauer AS (2007): Artifacts in optical coherence tomography (OCT) imaging of the retina. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 224, 47-51.

Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J (2000): Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* 2, 26-40.

Tromberg BJ, Cerussi A, Shah N, Compton M, Durkin A, Hsiang D, Butler J, Mehta R (2005): Imaging in breast cancer: diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 7, 279-285.

Vera DR, Hall DJ, Hoh CK, Gallant P, McIntosh LM, Mattrey RF (2005): Cy5.5-DTPA-galactosyl-dextran: a fluorescent probe for in vivo measurement of receptor biochemistry. *Nucl Med Biol* 32, 687-693.

Villringer A, Chance B (1997): Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends Neurosci* 20, 435-442.

Walters M: Optimizing Scanning and Data Collection Parameters. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrages (gehalten 09.07.2005 auf: eXplore Optix Besprechung UKG, Göttingen).

Walters M: Explore Optix - Fluorescence Optical Imaging. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrages (gehalten am 5.09.2005 auf: eXplore Optix Userbesprechung, Köln).

Wang K, Wang K, Li W, Huang T, Li R, Wang D, Shen B, Chen X (2009): Characterizing Breast Cancer Xenograft Epidermal Growth Factor Receptor Expression by Using Near-Infrared Optical Imaging. *Acta Radiol* 10, 1-9.

Watson J, Crick F (1953): A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737.

Weissleder R, Mahmood U (2001): Molecular imaging. *Radiology* 219, 316-333.

Wessels JT, Busse AC, Mahrt J, Dullin C, Grabbe E, Mueller GA (2007): In vivo imaging in experimental preclinical tumor research--a review. *Cytometry A* 71, 538-539.

Wukitsch MW, Petterson MT, Tobler DR, Pologe JA (1988): Pulse oximetry: analysis of theory, technology, and practice. *J Clin Monit* 4, 290-301.

Yuan B, Zhu Q (2006): Separately reconstructing the structural and functional parameters of a fluorescent inclusion embedded in a turbid medium. *Opt Express* 14, 7172-7187.

Zientkowska M: Evaluierung des Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy-Konzepts im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell. *Biol Diss Göttingen* 2007.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Eckhardt Grabbe danke ich für die Möglichkeit der Durchführung einer Promotionsarbeit auf dem Gebiet der experimentellen Bildgebung in der Abteilung für Diagnostische Radiologie.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. med. Clemens F. Hess, komm. Abteilungsdirektor im Zentrum für Radiologie, sowie im Anschluss Prof. Dr. med. Joachim Lotz für die Möglichkeit der Fortführung der Arbeit nach Emeritierung von Herrn Prof. Dr. med. Grabbe.

Frau Prof. Dr. med. Silvia Obenauer bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da sie mich nicht nur in hervorragender Weise betreute, sondern zu jeder Zeit mit konstruktiver Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Herrn Dipl.-Phys. Christian Dullin danke ich für seine zahlreichen und hilfreichen Anregungen und Tipps sowie Korrekturen auf dem Gebiet der theoretischen Physik als auch bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Stellvertretend für die gesamte Arbeitsgruppe danke ich Frau Prof. Dr. med. Frauke Alves für die geleistete Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Ich wurde am 22.03.1980 als Sohn des Speditionskaufmanns Detlef Eckner und seiner Ehefrau, der Schneiderin Marita Eckner, in Oberhausen geboren. 1986 wurde mein Bruder, David Eckner, geboren.

Meine allgemeine Hochschulreife erlangte ich am Heinrich - Heine - Gymnasium in Oberhausen 1999. Im Anschluss leistete ich meinen Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Oberhausen ab, wo ich nach der Regelzeit ein weiteres halbes Jahr im Rettungsdienst hauptamtlich tätig war.

Im Sommersemester 2001 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg - August - Universität zu Göttingen auf. Den vorklinischen Studienabschnitt konnte ich in der Folge im September 2003 abschließen. Das praktische Jahr absolvierte ich in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie sowie Urologie am Albert - Schweitzer - Krankenhaus in Northeim. Den darauf folgenden zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im Dezember 2007 mit der Gesamtnote 2.

Während des Studiums durfte ich in mehreren Krankenhäusern in den Fächern Radiologie, Innere Medizin sowie Chirurgie famulieren.

Nach dem erfolgreichen Studium begann ich im Dezember 2007 meine Weiterbildung in Innerer Medizin, Chefarzt Prof. Dr. med. Kleine, am Albert – Schweitzer – Krankenhaus in Northeim.

Seit August 2009 bin ich nun am Klinikum Nürnberg in der Abteilung für Kardiologie bei Prof. Dr.med. Pauschinger als Assistenzarzt tätig.