

# Hochauflösende Optoakustische Bildgebung

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II  
- Physik und Mechatronik -  
der Universität des Saarlandes

von

Wolfgang Bost

Saarbrücken  
2012

**Tag des Kolloquiums:** 13.11.2012

**Dekan:** Prof. Dr. Christian Wagner

**Mitglieder  
des Prüfungsausschusses:** Prof. Dr. Günter R. Fuhr  
Prof. Dr. Uwe Hartmann  
Prof. Dr. Karin Jacobs  
Prof. Dr. Helmut Ermert  
Dr. Andreas Tschöpe

### **Zusammenfassung:**

Die Optoakustik stellt ein innovatives Verfahren dar, welches die Vorteile zweier bildgebender Modalitäten kombiniert. Um die optoakustische Technologie im Hinblick auf ihren präklinischen und klinischen Einsatz weiterzuentwickeln, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Systeme zur hochauflösenden *in-vitro* sowie *in-vivo* Bildgebung entwickelt und aufgebaut:

Zur Gewinnung genauerer Kenntnisse über die Wirkungsmechanismen von nanoskaligen Biomarkern für die makroskopisch angestrebte Kontrasterhöhung wurde eine konfokale Mikroskopieplattform für *in-vitro* Untersuchungen auf Einzelzellebene aufgebaut, die eine Auflösung von wenigen  $\mu\text{m}$  erreicht. Mit diesem System gelang der optoakustische Nachweis der spezifischen Bindung von Chlorotoxin funktionalisierten Gold-Nanopartikeln an einer Glioblastom-Zelllinie.

Daneben wurde ein *in-vivo* einsetzbares optoakustisches Diagnosesystem entwickelt. Die zunächst konzeptionell vorherrschende tiefenabhängige Auflösung konnte mittels synthetischer Fokussierungstechniken und Filteralgorithmen optimiert werden, wodurch die Empfindlichkeit sowie die laterale Auflösung deutlich verbessert und die Punktantwort tiefenunabhängig auf weniger als 100  $\mu\text{m}$  reduziert wurde.

Am Mausmodell wurde die Machbarkeit der optoakustischen Darstellung eines subkutanen Tumors *in-vivo* erfolgreich nachgewiesen. Des Weiteren erfolgten erste *in-vivo* Versuche an Probanden zur hochauflösenden und kontrastreichen Darstellung der subkutanen Mikrovaskularisierung der menschlichen Haut.

### **Summary:**

Optoacoustic imaging is an innovative technique that combines the advantages of two modalities. In order to improve optoacoustics with respect to preclinical and clinical use, in the presented work two systems for high-resolution *in-vitro* and *in-vivo* imaging have been developed and built up:

To obtain better knowledge about the mechanisms of action of nanoscaled biomarkers for the macroscopic contrast enhancement, a confocal microscopy platform for *in-vitro* diagnostics on a single cell level with a resolution of a few microns was set up. This system was used for optoacoustic visualization of the specific binding of chlorotoxin functionalized gold nanoparticles on a glioblastoma cell line.

On the other hand, an *in-vivo* optoacoustic diagnostic system was developed. To enhance the depth-dependent resolution of the developed *in-vivo* system, synthetic aperture focusing techniques and filter algorithms have been optimized for the optoacoustic imaging. As a result, the sensitivity as well as the lateral resolution was improved and the point-spread-function could be reduced independent of depth to less than 100 microns.

A proof of concept experiment for optoacoustic imaging of a subcutaneous tumor has been successfully performed *in-vivo* in a mouse model. Furthermore, first *in-vivo* tests on volunteers have shown the suitability of optoacoustics for high contrast and high resolution imaging of the subcutaneous microvascularisation in human skin.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
<b>2</b>	<b>Stand der Technik</b> .....	11

---

## Teil I Grundlagen

---

<b>3</b>	<b>Physikalische Grundlagen</b> .....	21
3.1	Optische Grundlagen .....	21
3.1.1	Endogene Chromophore im Gewebe .....	21
3.1.2	Lichtausbreitung im Gewebe .....	22
3.2	Akustische Grundlagen .....	24
3.2.1	Entstehung optoakustischer Drucktransienten .....	24
3.2.2	Ausbreitung optoakustischer Drucktransienten .....	25
3.2.3	Lösung der Wellengleichung .....	26
3.3	Signalverändernde Einflüsse .....	29
3.3.1	Einfluss der Laserparameter .....	29
3.3.2	Einfluss des Ultraschallwandlers .....	30

---

## Teil II Material und Methoden

---

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	35
4.1	Konzeptionierung eines hochauflösenden Systems zur optoakustischen <i>in-vitro</i> Bildgebung .....	35
4.1.1	Akustisches Detektionssystem .....	37
4.1.2	Optische Anregungsquelle .....	39
4.1.3	Gesamtsystem .....	40
4.2	Konzeptionierung eines hochauflösenden Systems zur optoakustischen <i>in-vivo</i> Bildgebung .....	43
4.2.1	Akustisches Detektionssystem .....	43
4.2.2	Optische Anregungsquelle .....	45
4.2.3	Gesamtsystem .....	47
4.2.4	Klassifizierung des Lasersystems .....	49

<b>5</b>	<b>Simulationen und Rekonstruktionsalgorithmen</b> .....	51
5.1	Optoakustisches Schallfeld .....	51
5.1.1	Grenzen der Auflösung im konfokalen Modus .....	53
5.2	Rekonstruktionsalgorithmen .....	54
5.2.1	Synthetic Aperture Focussing Technique (SAFT) .....	55
5.2.2	SAFT-Rekonstruktion unter Berücksichtigung der Wandlergeometrie ..	60
5.2.3	Vaskularisierungsfiter .....	62
<b>6</b>	<b>Kontrastmittel</b> .....	67
6.1	Plasmonenresonante Partikel .....	67
6.2	Eisenoxidpartikel .....	69
6.3	Farbstoffbeladene Polymerpartikel .....	70

---

### Teil III Experimentelle Ergebnisse

---

<b>7</b>	<b>Messungen</b> .....	75
7.1	Hochaufgelöste optoakustische <i>in-vitro</i> Bildgebung .....	75
7.1.1	Charakterisierung des Auflösungsvermögens .....	75
7.1.2	Charakterisierung von Detektionsschwellen nanopartikulärer Kontrastmittel .....	78
7.1.3	Nachweis intrinsischer Zellchromophore .....	80
7.1.4	Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikel <i>in-vitro</i> .....	81
7.1.5	Nachweis funktionalisierter Gold-Nanopartikel <i>in-vitro</i> .....	82
7.2	Hochauflösende optoakustische <i>in-vivo</i> Bildgebung .....	87
7.2.1	Charakterisierung des Auflösungsvermögens .....	87
7.2.2	Experimentelle Validierung der SAFT-Rekonstruktion.....	88
7.2.3	Charakterisierung von Detektionsschwellen nanopartikulärer Kontrastmittel .....	90
7.2.4	Phantommessungen zur Evaluierung der Abbildungstreue.....	91
7.2.5	Erste <i>in-vivo</i> Untersuchungen eines subkutanen Tumors .....	93
7.2.6	Optoakustische Visualisierung von humanen Blutgefäßen <i>in-vivo</i> ....	95
7.2.7	Optoakustische Visualisierung eines Naevus <i>in-vivo</i> .....	98

---

### Teil IV Zusammenfassung der Ergebnisse

---

<b>8</b>	<b>Diskussion</b> .....	105
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	109

---

### Teil V Anhang

---

<b>A</b>	<b>Danksagung</b> .....	115
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	117
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	121

## Einleitung

Bildgebende Verfahren sind fester Bestandteil der modernen medizinischen Diagnostik. Insbesondere im klinischen Alltag sowie in der präklinischen Grundlagenforschung sind nichtinvasive und kostengünstige Systeme für die hochauflösende Untersuchung morphologischer und anatomischer Fragestellungen unabdingbar. Im Hinblick auf Diagnostik und Therapie haben in den letzten Jahren immer mehr technische Errungenschaften Einzug gehalten. Untersuchungstechniken wie Röntgen, Ultraschall oder Endoskopie gehören längst zum klinischen Alltag. Einen großen Fortschritt bieten Schnittbildverfahren wie z. B. die Magnetresonanztomographie, die Computertomographie oder die optische Kohärenztomografie. Als Vorteil der optischen Bildgebungstechnologien ist insbesondere die Nutzung des hohen optischen Kontrasts zwischen verschiedenen Gewebetypen zu sehen. Nachteilig wirkt sich bei diesem Verfahren jedoch aus, dass Licht im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich einer starken Streuung in biologischem Gewebe unterliegt. Die daraus resultierende Schwierigkeit der lokalen Zuordnung der gemessenen Signale begrenzt die Eindringtiefe dieser rein optischen Verfahren auf den Submillimeterbereich. Optische Bildgebungsverfahren erlauben daher lediglich Untersuchungen oberflächennaher, äußerer oder innerer Gewebeschichten.

Die Anwendung von Ultraschall in der nichtinvasiven Diagnostik ist die am häufigsten verwendete Bildgebungsmodalität. Dabei werden Schallwellen ins Gewebe ausgesendet, die in den Gewebeschichten unterschiedlich stark reflektiert und gestreut werden. Im Gegensatz zu den rein optischen Bildgebungsverfahren werden die Ultraschallwellen in biologischem Gewebe nur schwach gestreut, was das Erzielen von höheren Eindringtiefen zum Vorteil hat. Zudem sorgt die Skalierbarkeit der Ultraschalltechnologie für ein bis heute ständig wachsendes Spektrum von Anwendungen. Klassische bildgebende Systeme in der klinischen Routine arbeiten im niederfrequenten Bereich zwischen 1 und 15 *MHz*. Hochfrequente Systeme für die präklinische Forschung am Kleintier bis hin zur Abbildung einzelner Zellen im Bereich der akustischen Mikroskopie sind Gegenstand aktueller Forschung. Nachteilig wirkt sich in der akustischen Bildgebung insbesondere der schwache akustische Kontrast zwischen verschiedenen Gewebearten aus. Während der optische Absorptionskoeffizient verschiedener Biostrukturen zum Teil um Größenordnungen variiert, unterliegen die für die rein akustische Bildgebung relevanten mechanischen Eigenschaften nur geringen Variationen.

Neuere Ansätze gehen daher zu immer höher integrierten, hochauflösenden Systemen und zur Kombination unterschiedlicher, sich ergänzender Technologien über. Eine hybride

Bildgebung stellt die Optoakustik dar, welche sich von der reinen Ultraschallbildgebung primär durch den Erzeugungsmechanismus der Ultraschallwellen unterscheidet. Die Optoakustik kombiniert die laserinduzierte Schallerzeugung mit herkömmlichen Ultraschall-Empfangsmechanismen [1]. Während bei konventionellem Ultraschall eine akustische Welle in das zu untersuchende Gewebe gesendet und der reflektierte Signalanteil gemessen wird, ist die Quelle der Schallwellen bei der optoakustischen Bildgebung das Gewebe selbst. Die Entstehung der optoakustischen Signale basiert darauf, dass Strahlungsenergie an Gewebestrukturen mit hohem Absorptionskoeffizienten aufgenommen und in Wärme umgewandelt wird, was zu einer lokalen Temperaturerhöhung führt. Diese Erwärmung führt zu einer Ausdehnung des Gewebes gemäß seinem Volumenausdehnungskoeffizienten, wodurch ein Überdruck entsteht. Dieser wandert als Schallwelle durch das Gewebe und kann an dessen Oberfläche mit Hilfe geeigneter Sensoren zeitaufgelöst aufgenommen werden. Um hochfrequente akustische Signale zu erzeugen, erfolgt die Applikation elektromagnetischer Strahlung in gepulster Form. Die Signalerzeugung ist direkt proportional zu den lokalen optischen Eigenschaften des Gewebes, sodass die Optoakustik aufgrund der hohen Variation des Absorptionskoeffizienten verschiedener Gewebetypen einen viel höheren Kontrast als die reine akustische Bildgebung zeigt. In der Optoakustik werden somit die Vorteile der optischen Verfahren mit hoher Auflösung und starken Kontrasten einerseits und die akustischen Methoden mit ihrer großen Nachweistiefe andererseits kombiniert.

Als Anwendungsbeispiel der Optoakustik sei hier die Untersuchung endogener Chromophore in biologischen Geweben, wie z. B. Melanin oder Hämoglobin zu nennen, welche definierte und bekannte Absorptionsspektren besitzen. Durch die Anregung mit Licht verschiedener Wellenlänge wird eine Differenzierung und Quantifizierung der Chromophore im Gewebe ermöglicht. Die gewonnenen Ergebnisse können zur hochauflösenden Untersuchung und Analyse optischer Gewebeparameter, insbesondere zur Diagnose maligner Hautveränderungen, genutzt werden. Eine Verbesserung der Diagnostik auf diesem Bereich ist aufgrund der speziell in Europa, den USA und Australien rapide ansteigenden Zahl der Hautkrebskrankungen wünschenswert.

Im Durchschnitt entwickelt jeder fünfte Mensch im Laufe seines Lebens eine Hautkrebsvariante, wobei das Melanom die häufigste Form darstellt [2]. Zur Früherkennung bösartiger Tumore wird heutzutage in der Hautdiagnostik in den meisten Fällen die Methode der Dermatoskopie eingesetzt. Sie basiert auf der rein visuellen Beobachtung mit dem bloßen Auge bzw. auf der Beurteilung des Bildes nach der klinischen „ABCD-Regel“. Die Dermatoskopie dient als Grundlage für die Unterscheidung von Melanomen und gutartigen pigmentierten Hautveränderungen nach den Klassifizierungskriterien der Asymmetrie, Begrenzung, Farbe und Durchmesser. Derzeit werden verdächtige Hautveränderungen in der Regel vorsorglich entfernt und histopathologisch untersucht. Von den entnommenen Biopsien werden dünne histologische Schnitte angefertigt und gefärbt. Der Pathologe analysiert den Gewebeschnitt unter einem Mikroskop und sichert so die Diagnose.

Um Hautanomalien bereits im Anfangsstadium identifizieren zu können, ist eine signifikante Verbesserung der gegenwärtigen Diagnosewerkzeuge zwingend erforderlich. Statistiken belegen, dass Melanome teilweise als gutartige Läsionen diagnostiziert und gutartige Läsionen wie Melanome behandelt werden, was zu unnötigen Biopsien führt [3]. Mit einer gesicherten Hautdiagnostik könnte sich die Anzahl vorsorglicher Operationen verringern

lassen. Nichtinvasive hochauflösende Methoden sollten es ermöglichen, malignes Gewebe von gesundem sicherer abzugrenzen. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde mit der Einführung der Dermatoskopie auf Basis digitaler 2D-Bilder getan. Sie gestattet zwar eine Einordnung der Pigmentmale nach allgemein anerkannten Kriterien, beschränkt sich jedoch zwangsläufig auf die Beurteilung der Hautoberfläche. Zur Erfassung der Ausdehnung der Hautveränderung in den darunterliegenden Schichten werden nichtinvasive hochauflösende bildgebende Systeme benötigt. So könnten zusätzlich eine subkutane Gewebecharakterisierung und eine Darstellung des Gefäßbaumes wenige Millimeter unterhalb der Hautoberfläche als neue Diagnoseparameter hinzukommen.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines hybriden Bildgebungssystems mit der Fähigkeit der nichtinvasiven hochaufgelösten akustischen und optoakustischen Bildgebung. Die nichtinvasive hybride Hautuntersuchung sollte bei erforderlicher Tiefendarstellung den Zugang zu Informationen unter physiologischen *in-vivo* Bedingungen sowie eine Durchführung von Langzeitstudien der gleichen Hautregion ermöglichen.

Ein weiteres Ziel war es, den natürlichen optischen Kontrast durch den gezielten Einsatz von funktionalisierten Kontrastmitteln zu verstärken. Im Rahmen der Optoakustik bieten sich als Kontrastmittel nanoskalige Partikel an, welche eine starke Absorption im Spektralbereich zwischen  $800\text{ nm}$  und  $1200\text{ nm}$  aufweisen [4]. Dieser Wellenlängenbereich zeichnet sich durch eine große Eindringtiefe elektromagnetischer Strahlung aus. Versehen mit bestimmten biologischen Molekülen reichern sich diese Nanopartikel gezielt an bestimmten Zellen im Körper an. Definierte Biostrukturen wie z. B. Blutgefäße, Tumore oder entzündete Bereiche können gezielt adressiert werden, was zu einer höheren Spezifität der Diagnostik führt. Um die Bindungsvorgänge auf zellulärer Ebene zu untersuchen, sind mikroskopische Verfahren notwendig. Allerdings sind diese Nanopartikel mit konventionellen Methoden wie der optischen Mikroskopie nicht mehr sichtbar, sodass eine Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften schwierig ist. Ebenso sind sie nicht fluoreszent, wodurch auch eine Betrachtung mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie nur unzureichend möglich ist.

Um dennoch Erkenntnisse über die Bindungsmechanismen an lebenden Zellen gewinnen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Ultraschall-Mikroskop zur *in-vitro* Aufnahme akustischer und optoakustischer Signale an Zellkulturen entwickelt. Mit diesem System ist die Evaluierung der optoakustischen Eignung verschiedenster absorbierender Partikel möglich. Basierend auf den Ergebnissen lassen sich die für *in-vivo* Untersuchungen am Menschen benötigten Kontrastmittelmengen abschätzen.

Nachfolgend wird in Kapitel 2 der aktuelle Stand der Technik dargestellt. Die bei der Erzeugung und Ausbreitung ablaufenden thermoelastischen Prozesse der optoakustischen Methode werden in Kapitel 3 behandelt sowie die Möglichkeiten der Signaldetektion beschrieben. Ausgehend von den Anforderungen an das experimentelle System wird dessen Realisierung in Kapitel 4 diskutiert. Zur erforderlichen Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und des lateralen Auflösungsvermögens werden Filter und Bildrekonstruktionsalgorithmen entwickelt (Kapitel 5). Die Charakterisierung verschiedener in der Optoakustik einsetzbarer Kontrastmittel erfolgt im 6. Kapitel. Kapitel 7 beinhaltet schließlich die Beschreibung der durchgeführten *in-vitro* und *in-vivo* Experimente. Eine

zusammenfassende Diskussion der erzielten Messergebnisse ist Gegenstand des 8. Kapitels. Zuletzt werden mögliche weitere Einsatzgebiete der entwickelten optoakustischen Systeme diskutiert (Kapitel 9).

## Stand der Technik

Zur medizinischen Diagnostik wird zunehmend eine Gewebedarstellung mit mikroskopischer Auflösung benötigt. Gerade die Untersuchung von oberflächennahem Gewebe, wie etwa in der Dermatologie, verlangt hohe Anforderungen an die systembedingte Auflösung. Die herkömmlichen klinischen Ansätze, wie beispielsweise Nuklearmedizin, Computertomographie und Magnetresonanztomographie, sind in ihrer Auflösung auf den Millimeterbereich beschränkt. Die Auflösung optischer Bildgebungstechnologien liegt in gleicher Größenordnung und sinkt bei zunehmender Eindringtiefe aufgrund der hohen Streuung des Lichts im Gewebe. Bei verschiedenen Gewebetypen variiert jedoch der optische Absorptionskoeffizient um mehr als eine Größenordnung, woraus ein hoher intrinsischer Kontrast resultiert.

Im Bereich der optischen Bildgebungssysteme hat sich die Entwicklung auf die Gebiete der konfokalen Mikroskopie und in jüngerer Zeit der optischen Kohärenztomographie (OCT) konzentriert. Die OCT ist ein nichtinvasives, berührungslos arbeitendes Verfahren, welches im Vergleich zur Mikroskopie die Bildgebung um eine zusätzliche Dimension erweitert und Tiefenschnittbilder des Gewebes liefert. Hierbei wird ein Lichtstrahl in das Gewebe fokussiert, von der zu untersuchenden Zielstruktur reflektiert und vom Messsystem wieder erfasst. Um das Tiefenprofil der Probe zu erhalten, wird bei der OCT die Überlagerung von Referenzlicht und rückgestreutem Licht aus der Probe gemessen. Zum Erzielen einer möglichst großen Eindringtiefe werden Lichtquellen mit Wellenlängen im nahen infraroten Spektralbereich (NIR) eingesetzt. Aktuelle OCT-Systeme erreichen Tiefenauflösungen von  $1\ \mu\text{m}$  bis  $15\ \mu\text{m}$  und Eindringtiefen im Gewebe von etwa  $1\ \text{mm}$ . In der Dermatologie bietet als jüngere Entwicklung die Zwei-Photonen-Tomographie die Möglichkeit der dreidimensionalen hochauflösenden *in-vivo* Bildgebung auf zellulärer Ebene. NIR Femtosekunden-Laserpulse werden genutzt, um auf Basis der Detektion von fluoreszierenden endogenen Biomolekülen wie Melanin Informationen über die Zellen *in-vivo* zu erhalten. Solche Geräte eignen sich dazu, zelluläre Veränderungen in einem kleinen Bereich von  $300 \times 300\ \mu\text{m}^2$  bei einer maximalen Aufnahmetiefe von  $200\ \mu\text{m}$  untersuchen zu können [5][6]. Die nichtinvasive optische Bildgebung von biologischen Geweben ist in ihrer Abbildungstiefe limitiert. Mit zunehmender Wegstrecke im Gewebe steigt die Wahrscheinlichkeit eines optischen Streueignisses, wodurch optische Verfahren in der *in-vivo* Diagnostik nicht für Anwendungen im tieferen Gewebe herangezogen werden können.

In diesem Bereich hat sich die Sonografie etabliert, welche die Aufnahme von Gewebeschnittbildern und 3D-Volumendatensätzen ermöglicht. Im Gegensatz zu sichtbarer elektromagnetischer Strahlung ist die Streuung einer akustischen Welle im Gewebe um mehrere Größenordnungen geringer. Ultraschall ist in der klinischen Bildgebung vorwiegend in der Weichgewebediagnostik etabliert, lässt aber durch dessen Skalierbarkeit auch eine hohe Auflösung zu. Die Auflösung des Systems ist dabei direkt von der Frequenz der eingestrahlten Schallwelle abhängig. In klinischen Ultraschallsystemen werden typischerweise Ultraschallarrays im Frequenzbereich von 1 bis 15 *MHz* verwendet. Sie liefern Echtzeit-Graustufenbilder von anatomischen Details mit einer Auflösung im Submillimeterbereich. Die hohe Eindringtiefe des Ultraschalls erlaubt die Visualisierung von tiefergelegenen Schichten, welche mit optischen Techniken unzugänglich sind. Neben der Echtzeitfähigkeit bieten dabei die Nichtinvasivität, die hohe erzielbare Auflösung und die geringen Kosten einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu den Standardverfahren der Radiologie.

Besonders für klinische Anwendungen besteht Bedarf nach immer höher auflösenden Geräten. Hochfrequenz-Ultraschall-Scanner finden in der Ophthalmologie Anwendung und im Frequenzbereich von mehr als 20 *MHz* auch in der dermatologischen Forschung. Sehr häufig bestehen solche Systeme aus einem einzelnen Ultraschallwandler in Kombination mit einer mechanischen Abtasteinheit. Die Bildauflösung und das Eindringen der Schallwelle in das Gewebe sind weitestgehend von der Frequenz und der Geometrie des Ultraschallwandlers abhängig. Ihre axiale Auflösung beträgt je nach geometrischer Auslegung des Ultraschallwandlers zwischen 10 und 100  $\mu\text{m}$  und ihre laterale Auflösung zwischen 30 und 300  $\mu\text{m}$  [7]. Mit solchen Systemen ist es möglich, die geometrische Ausdehnung von Hautveränderungen zu untersuchen. Diese Informationen können in der präoperativen Diagnostik von Hautanomalien und bei der Überwachung der Reaktion auf therapeutische Maßnahmen für bestimmte Erkrankungen nützlich sein. Obwohl akustische Messungen gut mit der Histologie übereinstimmen [8][9], kann Ultraschall bei der Differenzierung von benignen und malignen Hautveränderungen nur bedingt helfen [10]. Kleinere Strukturen wie z. B. die Mikrovaskularisierung, welche als Differenzierungskriterium herangezogen werden kann, sind aufgrund ihrer Größe und des geringen Kontrasts nicht darstellbar. Zudem birgt die akustische Bildgebung den Nachteil, dass die für den Kontrast verantwortlichen lokalen Änderungen der mechanischen Eigenschaften nur sehr gering sind. Somit wird die diagnostische Aussagekraft der heute verwendeten Ultraschallbildgebung durch die Abbildung anatomischer Strukturen mit begrenztem Zugang zu funktionellen Informationen gemindert.

Die unter dem Namen der Optoakustik eingeführte Bildgebungsmodalität liefert durch die Kombination zweier Technologien entscheidende Vorteile gegenüber den zuvor genannten, rein akustischen und rein optischen Verfahren. Sie verknüpft die geringe Streuung der Ultraschallwellen mit dem hohen optischen Kontrast. Die Entdeckung des optoakustischen Effekts geht auf Alexander Graham Bell zurück. Im Jahre 1880 führte er Experimente mit modulierter Sonnenstrahlung durch, welche auf eine Selenzelle fokussiert wurde. Die Widerstandsänderung derselben moduliert ein elektrisches Signal, welches durch Lautsprecher wieder in Schall umgewandelt wird. Obwohl die Grundlagen dieser Technologie schon seit mehr als einem Jahrhundert bekannt sind, verzeichnete die Optoakustik erst mit der Entwicklung der Lasertechnologie zur Erzeugung energiereicher Nanosekundenpulse

einen Aufschwung. Für diagnostische Zwecke wird in der Regel Licht einer Wellenlänge zwischen 800 und 1200  $nm$  eingesetzt. Die Absorption im Gewebe weist in diesem Spektralbereich ein lokales Minimum auf, wodurch die optische Anregung von Strukturen in Tiefen von mehreren Zentimetern ermöglicht wird. Zur Erzeugung optoakustischer Signale sind hohe optische Strahlungsdichten erforderlich, wobei die für eine rein optische Bildgebung relevanten Parameter wie Kohärenz und Parallelität irrelevant sind. Die Detektion der Signale erfolgt auf rein akustischem Wege. Somit lässt sich in der optoakustischen Bildgebung eine im Vergleich zu anderen optischen Methoden deutlich erhöhte Beobachtungstiefe bei gleichzeitig hohem optischen Kontrast erreichen.

Auf dem Gebiet der optoakustischen Bildgebung sind derzeit zahlreiche nationale wie auch internationale Forschungsaktivitäten zu verzeichnen. Die entwickelten Geräte unterscheiden sich grundlegend in ihrem Aufbau und ihrer Funktionsweise. Aus Kostengründen und der Praxistauglichkeit wurden oftmals Einkanalösungen bevorzugt. Dabei können Einzel-elementwandler, aber auch eine Vielzahl piezoaktiver Elemente genutzt werden. Ein solches mehrkanaliges System wurde in der Biophysical Engineering Group der University of Twente konzipiert [11][12]. Der Forschungsschwerpunkt dieser Gruppe lag in der Früherkennung von Brustkrebs mittels optoakustischer Bildgebung. Für den hohen Kontrast des Bildes ist das Protein Hämoglobin verantwortlich, welches sich durch eine sehr hohe optische Absorption im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich auszeichnet. Das von der Arbeitsgruppe entwickelte, aus 590 Elementen bestehende 1  $MHz$  Ultraschall-Matrix-Array kann mittels eines Multiplexers gezielt angesteuert werden. Durch das Aussenden von 590 Laserpulsen und der sukzessiven Aufnahme der Signale eines jeden Piezoelementes können dreidimensionale Datensätze gewonnen werden. Der Nachteil dieser Systemkonfiguration liegt in der langen Aufnahmedauer von etwa 30 Minuten und der durch die Wandlergeometrie bedingten geringen Auflösung von 3,9  $mm$ .

Die Rotation eines Einzelelementwandlers um die Probe und eine anschließende mathematische Rekonstruktion der Signale zu einem zweidimensionalen Schnittbild ist eine alternative Möglichkeit des Bildaufbaus. Ein solches System wurde an der South China Normal University aufgebaut und die Vaskularisierung eines Brusttumors im Frühstadium über einen Zeitraum von 20 Tagen beobachtet [13]. Dazu wurden Brustkrebszellen subkutan auf dem Rücken einer Maus injiziert und die Gefäßneubildung im Tumorbereich optoakustisch untersucht. Ein Hydrophon in orthogonaler Anordnung diente zur Aufnahme der optoakustischen Signale. Ein 6  $mm$  x 9  $mm$  großer Bereich in der Tumorregion wurde zum Zwecke der qualitativen Analyse der morphologischen Merkmale der entwickelten Gefäße im Tumorbereich ausgewählt. In diesem Bereich konnten Veränderungen der durchschnittlichen optoakustischen Signalstärke der Blutgefäße, der durchschnittlichen Gefäßgröße und der Gefäßdichte während des Tumorwachstums als Funktion der Zeit aufgezeichnet und ausgewertet werden. Die Auflösung des Systems ist zwar mit 80  $\mu m$  für die Darstellung der Blutgefäße ausreichend, allerdings beträgt die Messzeit durch die Verwendung eines einzelnen Wandlerelementes in Kombination mit einem langsam repetierenden Lasersystem etwa 18 Minuten pro Bild.

Zu nennen sind ebenfalls die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Paul Beard in London [14][15]. Mit ihrem neuesten optoakustischen System kann die Vaskularisierung des Gehirns einer Maus dargestellt werden. Im Experiment wurde dazu ein transparentes Fabry-Perot-

Polymerfilm-Interferometer direkt mit dem Schädel der Maus in Kontakt gebracht. Ein unfokussierter Lichtstrahl beleuchtete die gesamte zu untersuchende Region gleichermaßen. Mit Hilfe eines zweiten fokussierten Laserstrahls wurde die Oberfläche des transparenten Films abgetastet und ein dreidimensionales Bild der schallerzeugenden Strukturen mit einer Auflösung von  $50 \mu\text{m}$  rekonstruiert. Nachteilig wirkt sich auch in diesem Aufbau die geringe Repetitionsrate der verwendeten Laserquelle aus, was sich in der Messzeit von 15 Minuten pro Volumendatensatz widerspiegelt.

Zur Verringerung der Aufnahmezeit haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von Ultraschallarrays für die optoakustische Bildgebung beschäftigt. An der Washington University in St. Louis wurde ein optoakustisches Bildgebungssystem auf Arraybasis entwickelt, dessen laterale Auflösung  $70 \mu\text{m}$  beträgt [16]. Zudem lässt sich das Array in der elevationalen Richtung bewegen, wodurch die Erzeugung von 3D-Datensätze ermöglicht wird. Zur Beleuchtung des Gewebes über einen Bereich von  $6 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  unterhalb des Arrays wird ein Nd:YLF-Laser verwendet, welcher  $7 \text{ ns}$  Lichtimpulse einer Energie von mehreren Millijoule bei gleichzeitig hoher Repetitionsrate von  $1 \text{ kHz}$  liefert. Durch diese hohe Repetitionsrate ist es möglich, einen Volumendatensatz einer Fläche von  $1 \text{ cm}^2$  und einer Tiefe von  $2 \text{ mm}$  innerhalb einer Sekunde aufzunehmen. Leider beträgt das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) lediglich  $6 \text{ dB}$ , was auf die geringe Sensitivität des Ultraschallarrays zurückzuführen ist.

Eine weitere Alternative bietet die Verwendung galvanischer Scanner, die es erlauben, einen fokussierten Lichtstrahl über die zu untersuchende Probe zu bewegen und die entstehenden Drucktransienten mittels eines unfokussierten Ultraschallwandlers zu detektieren. Dieser Ansatz wurde von der University of Wisconsin-Milwaukee in Kooperation mit der University of Southern California realisiert [17]. In ihrem optoakustischen Mikroskop wird für die Dauer der Messung lediglich das Laserlicht mittels eines Galvanometers über die Probe gerastert und der schräg angeordnete unfokussierte Ultraschallwandler in seiner Position nicht verändert. Ein Lasersystem mit einer Pulswiederholrate von  $1024 \text{ Hz}$  dient als optische Anregungsquelle, sodass die Aufnahmezeit für ein Bild von  $6 \text{ mm}$  im Durchmesser lediglich 2 Minuten beansprucht. Die laterale Auflösung beträgt  $7,8 \mu\text{m}$ , wobei dieser Wert mit zunehmender Gewebetiefe aufgrund der Lichtstreuung abnimmt. Die Leistungsfähigkeit des Systems wurde durch die Darstellung der Blutgefäße eines Mäuseohrs demonstriert. Venen und Arterien konnten mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von  $30 \text{ dB}$  dargestellt werden. Dieser Wert kann durch den Einsatz eines fokussierten Ultraschallwandlers verbessert werden, was jedoch zu einer drastischen Verringerung des Bildfeldes führt.

In der Reflexionsgeometrie gestaltet es sich zunehmend schwierig, das zur Signalerzeugung benötigte Licht im Fokusbereich des Ultraschallwandlers zu applizieren. Eine Möglichkeit zur Überlagerung des optischen und akustischen Fokusbereichs bietet die Aufweitung des Lichtes und anschließender Fokussierung mittels konzentrisch um den Ultraschallwandler angeordneter Spiegel. Nach diesem Ansatz gelang in jüngster Vergangenheit die Entwicklung eines echtzeitfähigen optoakustischen Bildgebungssystems [18]. Das System ist mit einem Tauchspulenmotor ausgestattet und in der Lage, 20 Querschnittsbilder pro Sekunde einer Breite von  $9 \text{ mm}$  aufzunehmen. Auch in diesem Aufbau wird die hohe laterale Auflösung von  $3,4 \mu\text{m}$  durch eine hohe Fokussierung des mit  $4 \text{ kHz}$  ausgesendeten Lichtimpulses erreicht. Zur Detektion wird eine  $75 \text{ MHz}$  Ultraschalllinse verwendet, welche eine Bildtiefe von  $1,2 \text{ mm}$

ermöglicht. Somit ist die Bildaufnahmezeit deutlich verringert, sodass dynamische Prozesse untersuchbar und Bewegungsartefakte reduziert sind.

Für die Bildgebung von größeren Strukturen, bei denen die Bildfeldgröße eine Verwendung von mechanischen Scannern einschränkt, sind elektronisch scannende Ansätze basierend auf Ultraschallarrays in Kombination mit einer Mehrkanal-Elektronik besser geeignet [19]. Die für die optoakustische Bildgebung am Fraunhofer IBMT entwickelte und optimierte Plattform „DiPhAS“ wurde zur Aufnahme erster *in-vivo* Daten an Probanden genutzt. Die laterale Auflösung des Systems ist durch das verwendete 7,5 MHz Lineararray in den Submillimeterbereich begrenzt. Basierend auf dieser Plattform wurden im Rahmen der Dissertation von Marc Fournelle Methoden zur Optimierung der Sensitivität und der Spezifität untersucht [20]. Unter Vorhersage der Frequenzen optoakustischer Signale wurden optoakustische Signale mit optimalem Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) durch den Einsatz von spektral abgestimmten Wandlern aufgenommen. Darüber hinaus konnten das SRV und die Auflösung von optoakustischen Bildern durch die Entwicklung von angepassten Beamforming-Algorithmen signifikant verbessert werden. Optoakustische Signale von Blutgefäßen wurden *in-vivo* detektiert und dreidimensionale Ansichten der Vaskularisierung rekonstruiert.

Nicht nur die Systementwicklungen, sondern auch die Nutzung von biologisch funktionalisierten Kontrastmitteln in der optoakustischen Bildgebung ist Gegenstand aktueller Forschung. Präklinisch werden derzeit vor allem Gold-Nanopartikel als optoakustische Kontrastmittel eingesetzt [21], wobei aber auch in ersten Arbeiten alternative Kontrastmittel bestehend aus z.B. Kohlenstoffnanoröhrchen verwendet werden [22]. Die molekulare optoakustische Bildgebung ist unter Hinzunahme exogener Kontrastmittel zur funktionellen wie auch anatomischen Bildgebung für die frühe Detektion von Tumoren und deren Überwachung nutzbar. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten an der Texas A&M University zu erwähnen. Im angegliederten Department of Biomedical Engineering wurde ein *in-vivo* System für die kontrastverstärkte optoakustische Bildgebung an Kleintieren aufgebaut [23][24]. Abgebildet wurde die dynamische Verteilung von Gold-Nanopartikeln im Gehirn einer lebenden Ratte mit einer lateralen Auflösung von etwa 60  $\mu\text{m}$ . Zur Kontrasterhöhung kamen in diesem Fall sogenannte Nanoshells zum Einsatz. Sie bestehen aus einem Siliziumdioxid-Nanopartikel, welcher mit einer dünnen Goldhülle überzogen ist. Durch die Anpassung der Größe des Nanopartikel-Kerns in Bezug auf die Dicke der Gold-Schale kann die optische Resonanz über ein breites Spektrum bis ins nahe Infrarot geändert werden. Im Experiment erhöhte die Zugabe exogener Kontrastmittel die optische Absorption des Blutes wodurch der Kontrast zwischen den Gefäßen und dem Hirngewebe im Hintergrund verbessert wurde. Auch in diesem System ist die Messzeit ein limitierender Faktor. Die Aufnahme eines Volumendatensatzes erfolgte in 24 Minuten.

Die Verknüpfung von Nanopartikeln und bioaktiven Materialien bietet großes Potential in der molekularen Bildgebung und Therapieüberwachung. Durch den Einsatz von hochauflösender Optoakustik ist es möglich, die Anhäufung exogener Kontrastmittel *in-vivo* zu überwachen und somit die Detektion von Tumoren im Frühstadium zu optimieren. Um die spezifische Anlagerung der Kontrastmittel auf zellulärer Ebene zu untersuchen und deren Bindungseffizienz zu charakterisieren, ist ein optoakustisches System mit hoher axialer und lateraler Auflösung erforderlich. Die Entwicklung eines solchen Systems ist und bleibt

weiterhin eine schwierige Aufgabe, vor allem wenn die optische Anregung und akustische Detektion auf derselben Seite der Probe platziert sind [25].

Zur nichtinvasiven Abbildung von Zellen *in-vitro* und *in-vivo* wurde kürzlich an der Washington University ein optoakustisches Mikroskop aufgebaut [26]. Der Laserstrahl wird durch einen ringförmigen fokussierten Ultraschallwandler einer Mittenfrequenz von 50 MHz auf die Probe gelenkt und die generierten akustischen Wellen werden im Reflexionsmodus empfangen. Die Auflösung des Systems beträgt  $0,7 \mu\text{m}$ , was auf die starke Fokussierung des UV-Lasers zurückzuführen ist. Durch die zeitaufgelöste Aufnahme kann eine tiefenabhängige Auswertung der Zellzahl erfolgen. Nachteilig wirkt sich die Verwendung eines UV-Lasers aus, welcher die Eindringtiefe in den Submillimeterbereich begrenzt. Daneben ist durch den Aufbau des Systems keine Möglichkeit einer optischen Kontrollaufnahme des untersuchten Bereichs gegeben.

Ein konfokales aufgebautes optoakustisches Mikroskopiesystem vereint die optoakustische Bildgebung mit den klassischen optischen Bildgebungsmodalitäten [27]. In dem Aufbau von Maslov et. al. wird das Laserlicht durch ein Objektiv zu einem beugungsbegrenzten Brennfleck mit einem Durchmesser von  $3,7 \mu\text{m}$  gebündelt. Eine akustische Empfangsfokussierung wird durch eine plan-konkave Linse erreicht, wobei das optische Objektiv und der 75 MHz Ultraschallwandler koaxial und konfokal ausgerichtet sind. Durch diese Art der Anordnung beträgt die laterale Auflösung des Systems  $10 \mu\text{m}$ . Dieses System wurde in den letzten Jahren nochmals optimiert, sodass derzeit die Größe der optischen Anregung und somit die Auflösung unterhalb der Wellenlänge des verwendeten optischen Lichtes liegt [28]. Zur Bündelung des Lichtes wird ein stark fokussierendes Objektiv verwendet, wodurch eine Auflösung von  $220 \text{ nm}$  bei Verwendung eines  $532 \text{ nm}$  Nd:YVO<sub>4</sub> Lasers erreicht wird. Erste Messungen belegen, dass Blutgefäße und Melanome im Frühstadium kontrastreich dargestellt werden können. Durch Austauschen des Objektivs kann zwar die Eindringtiefe zu Lasten der Auflösung an die jeweilige Aufgabenstellung angepasst werden, jedoch ist die Dicke der zu untersuchenden Gewebeprobe durch die Transmissionskonfiguration limitiert.

In diesem Kapitel wurde eine Übersicht über die internationalen Forschungsaktivitäten der letzten Jahre im Bereich der hochauflösenden optoakustischen Bildgebung gegeben. Die hier vorgestellten Systeme erlauben es, optoakustische Bilder in Abhängigkeit der verwendeten Systemkomponenten mit zum Teil sehr hoher Auflösung zu generieren. Insbesondere bei mechanisch scannenden Geräten, deren Bildgebung zudem auf einer blitzlampengepumpten optischen Anregung beruht, ist die Möglichkeit eines späteren klinischen Einsatzes jedoch durch lange Aufnahmezeiten beschränkt. Mehrkanalsysteme weisen meist eine verglichen mit den Einzelelementsystemen schlechtere Sensitivität auf, was sich nicht zuletzt bei der Detektion der meist schwachen optoakustischen Signale als limitierend erweist. Um diesen Nachteil zu kompensieren, die Signalamplituden und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen, können zumindest theoretisch energiereichere Laserpulse eingesetzt werden. Jedoch ist aus Gründen der Lasersicherheit eine Erhöhung der Laserleistung oftmals nicht möglich. Zum anderen gibt es die Möglichkeit, die Messungen mehrfach durchzuführen und die lokal aufgenommenen Drucktransienten zu mitteln, was wiederum eine erhebliche Erhöhung der Aufnahmezeit zur Folge hat.

An diesem Punkt setzt diese Arbeit an, bei der durch ein verbessertes Systemkonzept die Bildwiederholrate einer *in-vivo* Plattform bei gleichbleibend guter Auflösung erhöht wurde, was den klinischen Einsatz des Gerätes ermöglicht. Ausgehend von den physikalischen Grundlagen erfolgte die Validierung der Systemparameter durch die Nutzung verschiedener Simulationsmethoden. Basierend auf der Punktquellensynthese wurden die zu erwartenden Signale im *in-vitro* und *in-vivo* Kontext simuliert und zur Konzeption des akustischen Detektionssystems genutzt. Wie zuvor erwähnt müssen bei der Konzeption der optischen Anregungseinheit die Einhaltung der Grenzwerte für den optischen Lichteintrag berücksichtigt werden. Im Hinblick auf den klinischen Einsatz dieses Gerätes wurden die zugänglichen Bestrahlungswerte gemessen und mit den in der Norm DIN EN 60825-1 zusammengefassten Grenzwerten verglichen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Abbildungseigenschaften hochfrequenter optoakustischer Bildgebungssysteme untersucht. Bedingt durch den geometrischen Aufbau des hochfrequenten Ultraschallwandlers treten Bildartefakte auf, welche die Bildqualität reduzieren. Daher wurden die Möglichkeiten der Nutzung von Rekonstruktions-Algorithmen zur Verbesserung der Abbildungseigenschaften eines optoakustischen Systems untersucht. Als neue Bildgebungsmodalität ist die Optoakustik in dem klinischen Einsatz noch nicht etabliert. Um dem Anwender die Interpretation der Bilder zu erleichtern, ermöglicht das in der vorliegenden Arbeit entwickelte System zudem eine rein akustische Bildgebung. Somit können die aufgenommenen optoakustischen Daten in den bekannten anatomischen Kontext gesetzt werden, welcher durch eine konventionelle Ultraschallaufnahme zu Verfügung gestellt wird. Ein weiterer Schwerpunkt war der Machbarkeitsnachweis der optoakustische Darstellung von subkutanen Blutgefäßen unter realitätsnahen klinischen Bedingungen durchgeführt.

Neben dem Aufbau und Evaluierung verschiedener Systemkonzepte wurden verschiedene Kontrastmitteltypen untersucht. In den vorgestellten Publikationen wurden zur Kontrasterhöhung meist Nanopartikel mit hoher Absorption im nahen infraroten Spektralbereich genutzt bei denen nur wenige teure und komplexe Laser verfügbar sind. Am Fraunhofer IBMT wurden Kontrastmittel synthetisiert, welche eine hohe Absorption im Wellenlängenbereich medizinischer Standardlaser wie z. B. Nd:YAG Lasern aufweisen [20]. Nach der Modifikation mit biologischen Markermolekülen können diese Nanopartikel zur gezielten Bindung an einer Zelllinie eingesetzt werden. Zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von nanoskaligen Biomarkern für die makroskopisch angestrebte Kontrasterhöhung *in-vitro* ist ein hochauflösendes Mikroskopiesystem notwendig, welches ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Um die zur *in-vitro* Bildgebung notwendige Auflösung zu erzielen war es von Nöten, die fokussierte akustische Detektion und die beugungsbegrenzte optische Anregung exakt zu positionieren und in einem konfokalen Aufbau zur Deckung zu bringen. Mit diesem konfokalen System wurden die Bindungsmechanismen funktionalisierter Nanopartikel an einer Zelllinie *in-vitro* untersucht.

Bevor in Kapitel 4 die für die *in-vivo* und *in-vitro* Bildgebung entwickelten Systeme vorgestellt werden, sollen die zum Verständnis der Arbeit notwendigen physikalischen Grundlagen erarbeitet werden. Dabei werden die theoretischen Grundlagen des optoakustischen Effektes ebenso betrachtet wie die Ausbreitung der Schallwellen im Gewebe. Darüber hinaus wird auf die in Abhängigkeit der Strukturgröße erzeugten spektralen Signalanteile eingegangen,

um diese Erkenntnisse in Abschnitt 4 für die spektrale Anpassung der Detektionssysteme einzusetzen.

**Grundlagen**



## Physikalische Grundlagen

Der folgende Abschnitt behandelt die grundlegenden Mechanismen der optoakustischen Schallerzeugung mittels elektromagnetischer Strahlung im optischen und nahen infraroten Spektralbereich. Bei der Erzeugung und Ausbreitung einer Druckwelle können verschiedene Einflussfaktoren zur Signalveränderung führen, deren Beschreibung in Abschnitt 3.3 erfolgt. Des Weiteren werden die technischen Randbedingungen eines hochauflösenden optoakustischen Systems definiert.

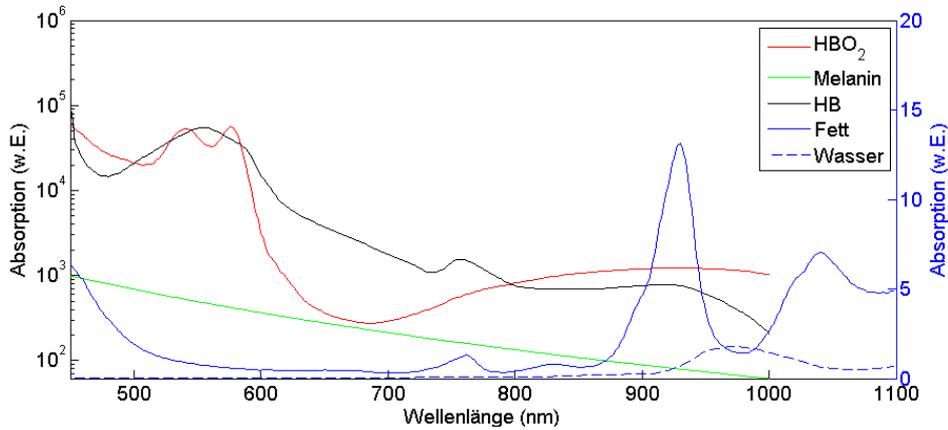
### 3.1 Optische Grundlagen

Die optischen Eigenschaften von Gewebe bestimmen die Eindringtiefe des Lichtes sowie den Kontrast bei der optoakustischen Bildgebung, da die akustischen Signale durch die Absorption von Licht erzeugt werden. Dabei korreliert die Signalamplitude direkt mit der lokal absorbierten Lichtenergie. Daher ist bei der Konstruktion eines bildgebenden Systems darauf zu achten, dass das eingestrahlte Licht in erster Linie von den zu untersuchenden Strukturen wie z. B. Blutgefäßen oder Kontrastmitteln absorbiert wird und nicht von dem umgebenden Gewebe. Nachfolgend werden die Absorptionsspektren einiger endogener Chromophore betrachtet.

#### 3.1.1 Endogene Chromophore im Gewebe

Biologisches Gewebe besteht zum überwiegenden Teil aus Wasser, Fett, Proteinen sowie verschiedenen Chromophoren, die in der Summe den Absorptionskoeffizienten beeinflussen. Mit Ausnahme von Wasser und Fett nimmt das Absorptionsspektrum der anderen Bestandteile im Wellenlängenbereich oberhalb von 700 nm ein lokales Minimum an. Die Absorption des Wassers und des Fettes hingegen ist im Vergleich zu den anderen hier betrachteten Chromophoren wesentlich geringer und nimmt im Bereich zwischen 300 nm und 900 nm den kleinsten Wert an. Es ergibt sich daraus ein als „optisches Fenster“ benannter Wellenlängenbereich, in dem der Absorptionskoeffizient des Gewebes, welcher sich aus der Summe der Einzelkomponenten ergibt, ein Minimum annimmt. Bei kürzeren Wellenlängen wird das Licht stark durch das Hämoglobin im Blut ( $HBO_2$  Oxyhämoglobin und  $HB$  Desoxyhämoglobin) absorbiert, während bei längeren Wellenlängen das Wasser sehr stark

für die Absorption des infraroten Lichtes verantwortlich ist. Daraus folgt, dass je nachdem welches endogene Chromophor bei der optoakustischen Untersuchung von Gewebe adressiert werden soll, die Wellenlänge der verwendeten elektromagnetischen Strahlung entsprechend angepasst werden muss.



**Abb. 3.1.** Absorptionsspektrum verschiedener endogener Chromophore in Abhängigkeit der Wellenlänge [29]

Für die Beschreibung der Lichtverteilung im Gewebe stehen analytische und numerische Methoden zur Verfügung, welche basierend auf wenigen optischen Gewebeparametern (Absorptions-, Streu- und Anisotropiekoeffizient) eine Berechnung erlauben. Aus diesen lässt sich die Lichtverteilung in Form der Strahlungstransportgleichung angeben. Aufgrund der im Gewebe ausgeprägten Mehrfachstreuung kann bei Beschränkung auf Absorption und Streuung eine Diffusionsnäherung hergeleitet werden, die einen exponentiellen Abfall der Strahlungsintensität mit zunehmender Tiefe im Gewebe beschreibt.

### 3.1.2 Lichtausbreitung im Gewebe

Die Bestrahlung von Gewebe mit einer elektromagnetischen Welle kann prinzipiell eine Absorption, Reflexion oder Streuung des Lichts zur Folge haben. Die Lichtabsorption wird durch den Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  [ $cm^{-1}$ ] charakterisiert, der die Abschwächung der Lichtintensität pro Weglänge durch Absorption beschreibt und somit zur Menge der in Wärme umgewandelten Energie proportional ist. Unter ausschließlicher Berücksichtigung von Absorptionsprozessen ergibt sich nach dem Lambert-Beer Gesetz die Strahlungsdichte in Abhängigkeit der Tiefe zu

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_a z) \quad (3.1)$$

Folglich nimmt die Intensität des einfallenden Lichtes beim Durchtritt durch das Medium exponentiell ab. Eine solche vereinfachte Darstellung trägt jedoch nicht der starken Streuung der Photonen im Gewebe durch mikroskopische Inhomogenitäten des Brechungsindex Rechnung. Diese wird über den Streukoeffizienten  $\mu_s$  charakterisiert, der in Analogie zur Definition des Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines

Streueignisses pro zurückgelegter Wegstrecke angibt. Eine Addition beider Koeffizienten  $\mu_a$  und  $\mu_s$  ergibt den Extinktionskoeffizienten.

Die Streuung im Gewebe ist nicht allein durch den Streukoeffizienten  $\mu_s$  bestimmt, vielmehr zeichnen sich biologische Gewebe durch eine räumliche Streucharakteristik aus. Diese wird durch die normierte Streuphasenfunktion  $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$  angegeben und bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon aus Richtung  $\mathbf{s}$  kommend in Richtung  $\mathbf{s}'$  gestreut wird. Eine Normierung erfolgt derart, dass das Integral der Phasenfunktion über den gesamten Raumwinkel 1 ergibt. Zur mathematischen Beschreibung der Phasenfunktion verschiedener Streuer hat sich gezeigt, dass in guter Näherung die Henyey-Greenstein-Phasenfunktion angenommen werden kann [30].

$$p_{HG}(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g\cos(\theta))^{\frac{3}{2}}} \quad (3.2)$$

Die Henyey-Greenstein-Phasenfunktionen hängt nur vom Streuwinkel  $\theta$  ab. Die Variable  $g$  bezeichnet den Anisotropiefaktor, welcher als Erwartungswert des Kosinus des Streuwinkels definiert ist:

$$g = \langle \cos\theta \rangle = \int_{4\pi} p(\cos\theta) \cos\theta d\Omega \quad (3.3)$$

Der Anisotropiekoeffizient  $g$  kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Für  $g = 0$  führt die Henyey-Greenstein-Phasenfunktion zu einer isotropen Verteilung. Für  $g < 0$  liegt eine dominante Rückwärtsstreuung, für  $g > 0$  eine dominante Vorwärtsstreuung vor. Die Effektivität der Streuung lässt sich durch die Kombination des Streukoeffizienten  $\mu_s$  mit dem Anisotropiefaktor  $g$  zum reduzierten Streukoeffizienten  $\mu'_s$  beschreiben.

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (3.4)$$

Für Medien, in denen die Ausbreitung von Licht durch Streuung und Absorption dominiert wird, lässt sich nach der Diffusionstheorie der effektive Schwächungskoeffizienten  $\mu_{eff}$  wie folgt definieren [31].

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + (1 - g)\mu_s)} \quad (3.5)$$

Der Kehrwert des Schwächungskoeffizienten  $\mu_{eff}$  ist als optische Eindringtiefe  $\delta_{eff}$  bekannt und gibt die Tiefe im Gewebe an, in der die Lichtintensität auf  $1/e$  des ursprünglichen Wertes abgefallen ist.

$$\delta_{eff} = \frac{1}{\mu_{eff}} \quad (3.6)$$

Basierend auf diesen Gleichungen lässt sich die Strahlungsdichte in Abhängigkeit der Tiefe unter Berücksichtigung der optischen Gewebeparameter berechnen. Die absorbierte Energiedichte  $H$  [ $J/m^3$ ] ergibt sich zu

$$H(z) = \mu_a I_0 \exp(-\mu_{eff} z) \quad (3.7)$$

Der durch die Lichtabsorption erzielte Energieeintrag führt zu einer lokalen Temperaturerhöhung und der Entstehung einer akustischen Druckwelle, auf deren Ausbreitung im nachfolgenden Abschnitt eingegangen wird.

## 3.2 Akustische Grundlagen

Im vorangegangenen Kapitel wurden die grundlegenden Gleichungen für die Absorption des Lichtes im Gewebe hergeleitet. Nachfolgend wird die Druckentstehung und -ausbreitung basierend auf der Absorption elektromagnetischer Strahlung beschrieben. Die so entstandene Druckwelle breitet sich im Gewebe kugelförmig aus. Dieser Prozess kann durch die inhomogene Wellengleichung beschrieben werden, deren Lösungsmöglichkeit im Falle symmetrischer Absorber aufgezeigt wird.

### 3.2.1 Entstehung optoakustischer Drucktransienten

Wie in Abschnitt 3.1.2 erläutert, kann das auftreffende Licht absorbiert, reflektiert oder gestreut werden. Zur Entstehung einer lichtinduzierten Schallwelle in einem absorbierenden Medium trägt jedoch lediglich der absorbierte Anteil zur Schallgenerierung bei. Die Umwandlung von Lichtenergie in eine Schallwelle wird als thermoelastischer Effekt bezeichnet. Als Folge des Energieeintrages kann die relative Volumenexpansion des erhitzten Gewebes durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{\Delta V}{V} = -\kappa p_0(\mathbf{r}) + \beta T(\mathbf{r}) \quad (3.8)$$

Die Variable  $\kappa$  bezeichnet die isotherme Kompressibilität,  $\beta$  den thermischen Volumenausdehnungskoeffizienten,  $p_0$  bezeichnet den zur Zeit  $t = 0$  durch Absorptionsprozesse aufgebauten Druck und  $T$  die Änderungen der Temperatur in Bezug auf den Ausgangszustand [32]. Die isotherme Kompressibilität  $\kappa$  ist mit den spezifischen Wärmekapazitäten  $C_p$  und  $C_V$ , der Massendichte  $\rho$  und der Schallausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  durch folgende Beziehung gegeben:

$$\kappa = \frac{C_P}{\rho c^2 C_V} \quad (3.9)$$

Im Falle infinitesimal kurzer Beleuchtung ist die relative Volumenexpansion vernachlässigbar, sodass der instantane lokale Druckanstieg aus Gleichung 3.8 abgeleitet werden kann.

$$p_0(\mathbf{r}) = \frac{\beta T(\mathbf{r})}{\kappa} \quad (3.10)$$

Unter der Annahme, dass die gesamte absorbierte Energie in Wärme und nicht in nichtthermische Relaxation wie z. B. Fluoreszenz umgewandelt wird, beträgt die lokale Temperaturerhöhung durch den kurzen Lichtimpuls

$$T(\mathbf{r}) = \frac{H(\mathbf{r})}{\rho C_V} \quad (3.11)$$

Die Kombination der vorangegangenen Gleichungen ergibt eine mathematische Beziehung zwischen der lokalen Druckerhöhung  $p_0(\mathbf{r})$  und der absorbierten Energiedichte  $H(\mathbf{r})$ .

$$p_0(\mathbf{r}) = \frac{\beta}{\kappa \rho C_V} H(\mathbf{r}) = \Gamma H(\mathbf{r}) \quad (3.12)$$

Aus Gleichung 3.12 wird deutlich, dass eine lineare thermoelastische Umwandlung der deponierten Energie in Druck erfolgt. Der dimensionslose Grüneisenkoeffizient  $\Gamma$  beschreibt somit die Effizienz der Umwandlung der deponierten Wärme in mechanische Energie. Als Produkt temperaturabhängiger Größen ist er ebenfalls von der Temperatur abhängig. Im Falle von biologischem Weichgewebe lässt sich der Grüneisenkoeffizient durch den des Wassers approximativ annähern. Grund dafür ist der mit etwa 70 % hohe Wasseranteil von biologischem Weichgewebe.

Die Ergebnisse aus Gleichung 3.12 gelten allerdings nur für das erzeugte Druckprofil zum Zeitpunkt der optischen Anregung ( $t = 0$ ). Die Beschreibung der zeitlichen Druckverteilung  $p(\mathbf{r}, t)$  an einem Ort  $\mathbf{r}$  zur Zeit  $t$  erfolgt im nachfolgenden Abschnitt 3.2.2.

### 3.2.2 Ausbreitung optoakustischer Drucktransienten

Im vorherigen Abschnitt wurde die Erzeugung optoakustischer Drucktransienten behandelt, die bei Verwendung hinreichend kurzer Laserpulse aus der Verteilung der absorbierten Energiedichte folgt. Diese Berechnung liefert jedoch keine Aussage über die zeitliche Ausbreitung der anfänglichen Druckverteilung im umliegenden Gewebe. Zur mathematischen Beschreibung des Propagationsverhaltens der Ultraschallwelle bedarf es einer Lösung der inhomogenen Wellengleichung [32].

$$\left( \nabla^2 - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\mathbf{r}, t) = \frac{-\beta}{C_p} \frac{\partial H(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \quad (3.13)$$

Die linke Seite dieser Gleichung beschreibt die Wellenausbreitung, wohingegen die rechte Seite den Quellterm repräsentiert. Die Variable  $H(\mathbf{r}, t)$  wird als Aufheizfunktion bezeichnet, welche den Wärmeeintrag pro Volumen und Zeit beschreibt. Da der Quellterm auf der rechten Seite von Gleichung 3.13 von der ersten Ableitung der Aufheizfunktion abhängt, führt lediglich zeitvariantes Aufheizen zur Schallerzeugung. Zur Berechnung der Lösung der Wellengleichung müssen die akustischen und optischen Eigenschaften sowie die Anfangs- und Randbedingungen des Systems bekannt sein. Lediglich unter Verwendung vereinfachter Annahmen der Aufheizfunktion  $H(\mathbf{r}, t)$  ist die Wellengleichung analytisch lösbar. Im Folgenden wird dies am Beispiel einer sphärischen und einer zylindrischen Struktur durchgeführt. Beide symmetrische Strukturen lassen sich auf die hochauflösende Bildgebung

übertragen, da sie als Modelle für intrazelluläre Vesikel einerseits und Mikrovaskularisierung andererseits dienen.

### 3.2.3 Lösung der Wellengleichung

Eine Lösung der inhomogenen Wellengleichung 3.13 findet sich mit Hilfe des Konzepts der Green Funktion. Im Falle einer infinitesimal kurzen Beleuchtungsdauer kann von einer instantanen Wärmeabgabe ausgegangen werden. Unter diesen Bedingungen erhält man eine Gleichung, die das zeitliche und räumliche Verhalten der erzeugten Schallwelle beschreibt [32].

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{4\pi c} \frac{\partial}{\partial t} \int_{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|=ct} \frac{p_0(\mathbf{r}, t - |\mathbf{r}-\mathbf{r}'|/c)}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} dA \quad (3.14)$$

Diese Gleichung kann zur Berechnung der optoakustisch generierten Druckwellen einer beliebig geformten heterogen absorbierenden Struktur verwendet werden. Gleichung 3.14 wird als Poissongleichung bezeichnet und beschreibt die Druckänderung an einem Ort  $\mathbf{r}$  zu einer Zeit  $t$  durch die Anfangsdruckverteilung  $p_0$ . Dabei wird das Signal eines Drucktransienten am Ort  $\mathbf{r}$  berechnet, indem der zur Zeit  $t = 0$  durch Absorptionsprozesse aufgebaute Druck  $p_0$  über Kugeloberflächen um den Punkt  $\mathbf{r}$  mit Radius  $ct$  zu jedem Zeitpunkt  $t$  integriert wird. Mit Hilfe der Gleichung 3.14 lassen sich auch bei komplizierten Absorbergeometrien die generierten Drucktransienten berechnen. Die Integration über Kugeloberflächen ist jedoch mit einem hohen rechnerischen Aufwand verbunden. Reduzieren lässt sich dieser unter der Annahme, dass der Abstand des Empfängers viel größer ist als die Abmessung der absorbierenden Struktur. Dadurch können die rechenintensiven Integrale über Kugeloberflächen durch Ebenenschnitte approximiert werden.

Die Kenntnis der spektralen Verteilung der generierten akustischen Wellen hat eine praktische Auswirkung auf die Auslegung der optoakustischen Bildgebungssysteme zur *in-vitro* und *in-vivo* Diagnostik. Eine typische Größe eines intrazellulären Absorbers liegt im Bereich mehrere hundert Nanometer bis in den Mikrometerbereich. Durch die Lösung des Poissonintegrals können die emittierten akustischen Wellen abgeschätzt und die akustische Detektionseinheit dementsprechend angepasst werden. Daher wird im nächsten Abschnitt das Poissonintegral für sphärische Absorber mit Radien zwischen 1 und 10  $\mu\text{m}$  gelöst. Im Falle von *in-vivo* Untersuchungen am Menschen sind die Mikrogefäße die für den Kontrast relevanten Strukturen. Eine typische Größe dieser Absorber liegt im Bereich von etwa 50  $\mu\text{m}$  im Radius. Blutgefäße können durch zylindrische Strukturen approximiert werden, sodass bei der Auslegung der Detektionseinheit in Kapitel 4.2.1 auf die hier erzielten Ergebnisse zurückgegriffen werden kann.

#### sphärische Absorber

Das Poissonintegral eines kugelsymmetrischen Absorbers mit Radius  $R$  kann für den Fall eines ausreichend großen Beobachtungsabstandes ( $r \gg R$ ) analytisch gelöst werden. In diesem Beispiel bezeichnet  $r$  den Abstand des Detektors vom Kugelmittelpunkt und  $p_0$  die durch

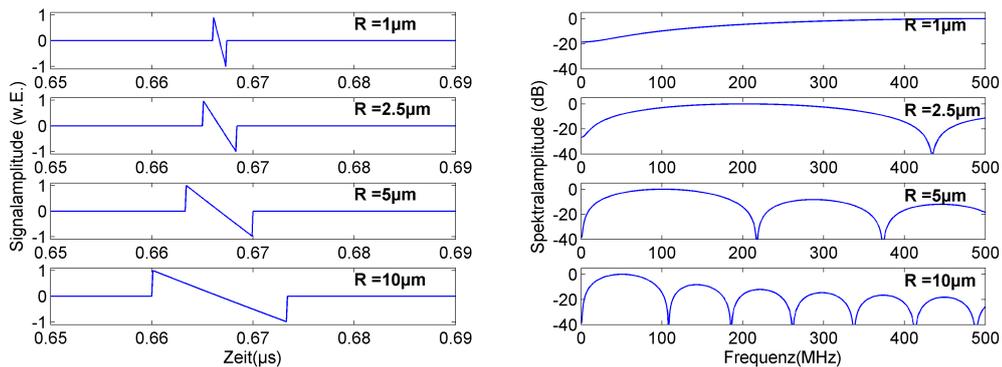
Absorptionsprozesse generierte Druckerhöhung zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Die Integration über die Kreisflächen führt bei einer Quelle mit Durchmesser  $R$  zu folgendem Druckverlauf im Zeitbereich zwischen  $r - R < ct < r + R$ .

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{4\pi c} \frac{\partial}{\partial t} \frac{\pi(R^2 - (ct - r)^2)}{ct} p_0(ct - (r - R)) \quad (3.15)$$

Liegt zudem die geometrische Abmessung der absorbierenden Struktur im Größenbereich der optischen Eindringtiefe, so kann von einer homogenen Erwärmung derselben ausgegangen werden. Somit kann  $p_0$  als räumlich konstant angesehen werden und das im Abstand  $r$  zur Zeit  $t$  detektierte Drucksignal ist durch nachstehenden Term gegeben.

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{p_0}{4} \left( \frac{1}{(ct)^2} (r^2 - R^2) - 1 \right) \quad (3.16)$$

Um den Einfluss der Absorbergröße auf die thermoelastisch generierten Druckwellen zu veranschaulichen, sind in Abbildung 3.2 die generierten akustischen Drucktransienten sowie die korrespondierenden Frequenzspektren verschiedener homogen beleuchteter, sphärischer Absorber mit Radien zwischen  $1 \mu\text{m}$  und  $10 \mu\text{m}$  gezeigt.



**Abb. 3.2.** Drucktransienten als Funktion der Zeit (links) sowie spektrale Verteilungen (rechts) verschieden großer sphärischer Absorber

Gemäß Gleichung 3.16 führt eine infinitesimal kurze Beleuchtungszeit eines sphärischen Absorbers zur Ausbreitung eines N-förmigen Drucksignals. Die Breite des bipolaren Drucksignals ist proportional zur Strukturgröße und liegt für die gewählten Absorbergeometrien im Bereich zwischen  $1,3$  und  $13 \text{ ns}$ . Spektral betrachtet führt eine Vergrößerung des Absorberdurchmessers zu einer Verschiebung des ersten Maximums zu niedrigeren Frequenzen. Diese Erkenntnis ist bei der Konzeption eines hochauflösenden optoakustischen Bildgebungssystems im subzellularen Bereich von großer Bedeutung, da die Mittenfrequenz des Ultraschallwandlers optimal an die erzeugten Schallsignale angepasst werden kann. Für die *in-vitro* Diagnostik ist demnach ein hochfrequenter Ultraschallwandler einer Mittenfrequenz von mehr als  $100 \text{ MHz}$  einzusetzen.

### Zylindrische Absorber

Zur Berechnung der optoakustisch erzeugten Signale von Gefäßen können diese als zylindrische absorbierende Strukturen mit Radius  $R$  approximiert werden, welche sich im Abstand  $r$  zum Beobachtungspunkt befinden. In der Veröffentlichung von Hoelen et al. wird der Druckverlauf als zeitliche Ableitung des Geschwindigkeitspotentials  $\Phi$  berechnet [33].

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{\partial}{\partial t} \Phi(r, t) \quad (3.17)$$

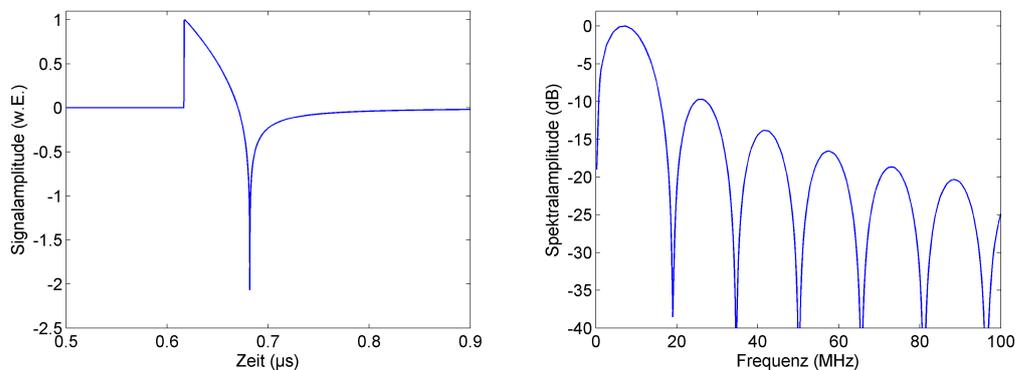
Das Potential eines homogen erwärmten Kugelabsorbers mit Radius  $R$  wird genutzt, um das Geschwindigkeitspotential  $\Phi$  der zylindrischen Quelle zu berechnen. Befindet sich der Beobachtungspunkt  $r$  im Fernfeld der Quelle ( $r \gg R$ ), kann das Geschwindigkeitspotential durch die nachfolgende Gleichung berechnet werden.

$$\Phi(R, r, t) = \frac{1}{4\pi} \int_{r-R}^b \sqrt{\frac{R^2 - (x-r)^2}{(ct)^2 - x^2}} dx \cdot p_0(ct - (r-R)) \quad (3.18)$$

Die obere Grenze  $b$  des Integrals ist zeitabhängig und wie folgt definiert:

$$b = \begin{cases} ct, & \text{falls } r-R < ct < r+R \\ r+R, & \text{falls } ct > r+R \end{cases} \quad (3.19)$$

Für Werte von  $ct < r-R$  hat der erzeugte akustische Transient den Beobachtungspunkt noch nicht erreicht und das Geschwindigkeitspotential  $\Phi(R, r, t)$  ist demnach Null. Übersteigt die Eindringtiefe des Lichtes im Zylinder dessen geometrische Ausdehnung, so kann dieser als homogener Absorber in einer transparenten Umgebung angesehen werden. Die Funktion  $p_0$  in Gleichung 3.18 kann in diesem Fall als Heaviside-Stufenfunktion angenommen werden. Der erzeugte Drucktransient eines homogenen Zylinders mit Radius  $R = 50 \mu\text{m}$  sowie das Frequenzspektrum der emittierten Druckwelle bei infinitesimal kurzer Beleuchtungsdauer sind in Abbildung 3.3 dargestellt.



**Abb. 3.3.** Drucktransient als Funktion der Zeit (links) sowie spektrale Verteilung (rechts) eines zylindrischen Absorbers mit Radius  $R = 50 \mu\text{m}$

Im Vergleich zu den zuvor betrachteten sphärischen Absorber liegt das spektrale Maximum im Falle dieses Mikrogefäßes bei *in-vivo* Untersuchungen im niedrigeren Frequenzbereich. Aufgrund der größeren Absorberstruktur liegen die zu erwartenden spektralen Anteile zwischen 10 und 100 *MHz*.

### 3.3 Signalverändernde Einflüsse

Die im letzten Abschnitt durchgeführten Berechnungen haben gezeigt, dass die Mittenfrequenzen der optoakustisch generierten Signale von der Geometrie des Absorbers abhängen. Basierend auf der Annahme einer infinitesimalen Beleuchtungsdauer sind die nach Gleichungen 3.16 und 3.18 berechneten akustischen Transienten sphärischer und zylindrischer Absorberstrukturen in Abbildung 3.2 und 3.3 gegeben. Jedoch beeinflussen die Pulslänge der Laseranregung sowie die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers die aufgezeichneten Signale.

#### 3.3.1 Einfluss der Laserparameter

Der effektiv in Volumenexpansion umgewandelte Anteil der absorbierten Wärmemenge hängt nicht allein vom Grüneisenkoeffizienten  $\Gamma$ , sondern von den akustischen und thermischen Dissipationseffekten im beleuchteten Volumenbereich ab, welche im Zeitintervall des Lichtpulses  $\tau_L$  auftreten. Das laserinduzierte Temperaturprofil in der Zone optischer Anregung unterliegt einem stetigen Wärmeabfluss in das umgebende Probenvolumen. Ein Kriterium für den Energieverlust ergibt sich durch einen Vergleich der Pulslänge des Lichtes  $\tau_L$  mit der thermischen Relaxationszeit  $\tau_{therm}$  sowie mit der akustischen Relaxationszeit  $\tau_{ak}$  [34]. Man spricht in diesen Fällen vom thermal- bzw. stress-confinement. Sie definieren die Zeitintervalle, in denen die Diffusionslänge die Größe der optischen Eindringtiefe  $\delta_{eff}$  erreicht hat.

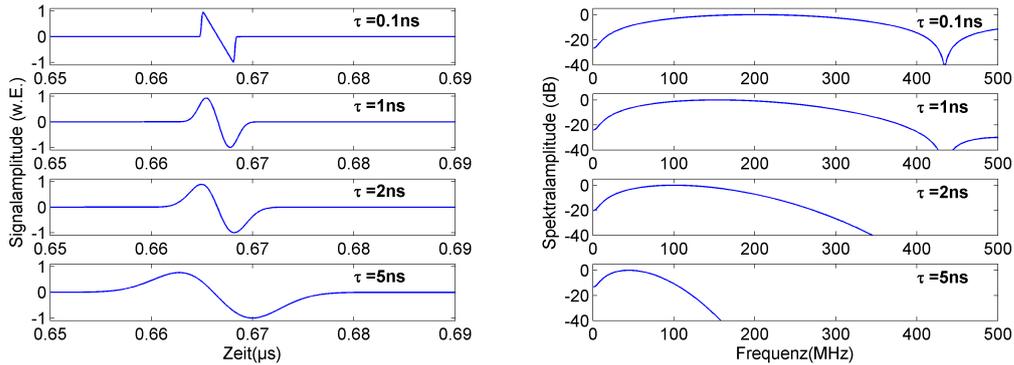
$$\tau_L \ll \tau_{therm} = \frac{\delta_{eff}^2}{4\alpha} \quad (3.20)$$

$$\tau_L \ll \tau_{ak} = \frac{\delta_{eff}}{c} \quad (3.21)$$

Dabei ist  $c$  die Schallgeschwindigkeit und  $\alpha$  die Temperaturleitfähigkeit des beleuchteten Gewebes. Überschreitet die Beleuchtungsdauer diese Relaxationszeit, so ist bereits ein Großteil der absorbierten Wärme aus dem bestrahlten Volumen herausdiffundiert und lediglich eine geringere Wärmeenergie steht für die Umwandlung in akustische Energie zur Verfügung. Explizite Berechnungen der beiden Relaxationszeiten zeigen, dass die thermische Relaxationszeit im Gewebe um mehrere Größenordnungen über der akustischen Relaxationszeit liegt. Die Bedingung des thermal-confinements ist somit durch die Erfüllung des stress-confinements abgedeckt. Nimmt man wie in den zuvor durchgeführten Berechnungen eine Absorbergröße von 5 bzw. 50  $\mu m$  im Radius an, so beträgt die akustische Relaxationszeit 6 bzw. 60 *ns*. Unterschreitet die Laserpulsdauer beide Grenzwerte, so können

die thermischen wie auch akustischen Verlustprozesse während des Entstehungsprozesses des Drucktransienten vernachlässigt werden.

Nun beeinflusst aber nicht nur die Pulslänge, sondern auch die Zeitform  $f(t)$  des Laserpulses das Drucksignal. Um den tatsächlichen Druckverlauf unter Berücksichtigung der zeitlichen Ausdehnung des Laserpulses zu erhalten, muss mathematisch betrachtet das berechnete Zeitsignal mit dem Zeitprofil des Laserpulses gefaltet werden. Dies wird im Folgenden am Beispiel einer homogen erwärmten  $5 \mu\text{m}$  großen Kugel veranschaulicht, welche mit gaußförmigen Laserpulsen unterschiedlicher Halbwertsbreiten beleuchtet wird.



**Abb. 3.4.** Drucktransienten als Funktion der Zeit (links) sowie spektrale Verteilungen (rechts) eines  $5 \mu\text{m}$  großen Kugelabsorbers in Abhängigkeit der Laserpulsbreite

Ein Lichtpuls endlicher Breite hat eine zeitliche Verbreiterung des bipolaren Druckprofils zur Folge. Wird der zeitliche Verlauf des Lichtpulses als eine Gaußglocke der Breite  $\tau_L$  angenommen, so entspricht die Fouriertransformierte ebenfalls einer Gaußverteilung mit der Breite  $\frac{2}{\tau_L}$ . Somit ist das erzeugte Frequenzspektrum direkt von der zeitlichen Dauer des Lichtpulses abhängig, was in Abbildung 3.4 verdeutlicht wird. Eine Verlängerung der Beleuchtungsdauer führt allgemein zu einer Verschiebung des spektralen Maximums hin zu niedrigeren Frequenzen. Die Zeitfunktion, welche den Verlauf des Laserpulses beschreibt, kann daher als Tiefpassfilter für das Drucksignal angesehen werden. Die resultierende Abschneidefrequenz ist direkt proportional zum Kehrwert der Pulslänge.

$$f_{cut} = \frac{1}{2\tau_L} \quad (3.22)$$

### 3.3.2 Einfluss des Ultraschallwandlers

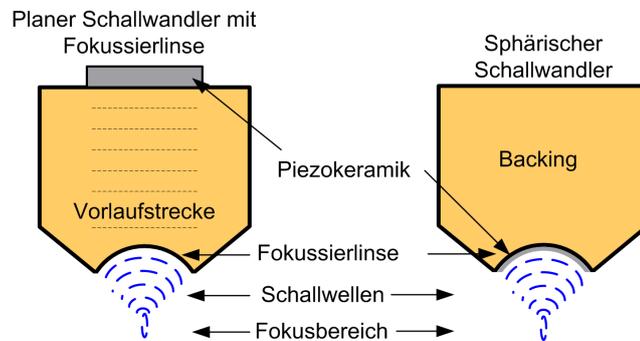
Nicht nur der zeitliche Verlauf des Laserpulses, sondern auch die spektrale Sensitivität des Ultraschallwandlers beeinflusst das an der Probenoberfläche zeitaufgelöst detektierte Drucksignal. Als Detektoren zur Aufnahme der Druckwellen werden piezoelektrische Messwertwandler verwendet, welche die auftreffenden akustischen Wellen in elektrische Spannungen umwandeln. Das gemessene zeitabhängige optoakustische Signal entspricht jedoch nicht direkt der von der Probe ausgesendeten Schallwelle. Bedingt durch die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers  $S_W(t)$  entspricht es einer Faltung derselben mit dem tatsächlich emittierten Schallsignals  $S_E(t)$ .

$$S(t) = \int_0^t S_E(t') S_W(t-t') dt' = S_E(t) \otimes S_W(t) \quad (3.23)$$

Das Frequenzspektrum des gemessenen Drucksignals  $S(f)$  ergibt sich demnach aus der Fouriertransformierten des Drucksignals bei infinitesimal kurzer Anregung  $S_I(f)$ , multipliziert mit der Fouriertransformierten des Laserstrahlprofils  $S_L(f)$ , sowie der zu berücksichtigenden spektralen Sensitivität des Empfangssystems  $S_W(f)$ .

$$S(f) = S_I(f) \cdot S_L(f) \cdot S_W(f) \quad (3.24)$$

Nicht nur die Sensitivität, sondern auch die Abbildungseigenschaften des Systems hängen in hohem Maße von der Wahl des Ultraschallwandlers ab. Seine Geometrie und Mittenfrequenz definieren die Fokussierungseigenschaften und sind somit für die Auflösung des Systems verantwortlich. Die laterale Auflösung ist auf Seiten der akustischen Detektion durch die Breite des Schallfeldes im Fokuspunkt gegeben. Als Fokusbreite bezeichnet man den Abstand zwischen zwei Punkten, an denen sich der Schalldruck im Vergleich zum Maximalwert um die Hälfte (-6 dB) verringert hat. Analog zu den Gesetzen der Optik können Ultraschallwellen fokussiert werden. Daher werden im Falle hochauflösender bildgebender Systeme oftmals fokussierte Einzelelementwandler verwendet. Die einfachste Art der Fokussierung stellen sphärisch geformte piezoaktive Elemente dar (Abbildung 3.5 rechts). Alternativ lässt sich auch durch die Verwendung akustischer Linsen in Kombination mit planen Piezoschwingern eine Fokussierung erzielen (Abbildung 3.5 links). Als piezoaktive Materialien werden häufig Blei-Zirkonat-Titanat (PZT) oder Zinkoxid (ZnO) verwendet.



**Abb. 3.5.** Schematischer Aufbau von fokussierten Ultraschallwandlern zur Detektion akustischer Wellen

In beiden Fällen liegt der Bereich maximaler Sensitivität auf der Zentralachse des Ultraschallwandlers und wird in Größe und Abstand durch die Wellenlänge  $\lambda$ , sowie durch das Verhältnis von Brennweite  $q$  und Schwingerdurchmesser  $D$  definiert. Der -6 dB Puls/Echo-Strahldurchmesser im Fokus kann mit nachstehender Gleichung berechnet werden [35].

$$a_F(-6dB) = 1,02 \frac{q}{D} \lambda \quad (3.25)$$

Ein weiterer Parameter in Analogie zur Optik ist die Tiefenschärfe. Mit Tiefenschärfe bezeichnet man die Zone, in der ein Objekt vor und hinter dem eigentlichen Fokus noch scharf dargestellt werden kann. Sie wird als Fokusslänge bezeichnet und definiert den axialen Bereich, in dem der Schalldruckabfall innerhalb der  $-6\text{ dB}$  Grenze liegt. Die Länge der Fokuszone  $d_F$  ist gegeben durch

$$d_F(-6\text{dB}) = 7,02 \left(\frac{q}{D}\right)^2 \lambda \quad (3.26)$$

Beide Gleichungen sind nur im Falle einer rein akustischen Bildgebung gültig, in der der Wandler zugleich als Sender und Empfänger fungiert. In der optoakustischen Bildgebung dient der Ultraschallwandler lediglich der Detektion der Signale. Auf die Berechnung der Empfangscharakteristik wird in Kapitel 5 eingegangen.

In diesem Kapitel wurden die theoretischen Ansätze eingeführt, die für diese Arbeit von Bedeutung sind. Ausgehend von der Lichtausbreitung im Gewebe wurde die Ausbreitung der optoakustisch generierten Druckwellen als Lösung der inhomogenen Wellengleichung behandelt. Die Wellengleichung konnte für verschiedene Geometrien approximativ gelöst werden, die sich in hinreichend großen Abständen zum Detektor befinden. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Lichtquelle und Ultraschallwandler auf die gemessene Signalamplitude und Frequenz betrachtet. Diese signalverändernden Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Konzeption eines hochauflösenden optoakustischen Systems. Im nachfolgenden Kapitel werden verschiedene Wege der Systemauslegung aufgezeigt. Dabei steht vor allem die Optimierung des Auflösungsvermögens und der Sensitivität des Gerätes im Vordergrund.

**Material und Methoden**



## Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Systeme für die hochauflösende optoakustische *in-vitro* und *in-vivo* Bildgebung konzipiert und aufgebaut. Im Rahmen der optoakustischen Bildgebung stehen verschiedene Möglichkeiten des Aufbaus der Messapparatur zur Erzeugung und Aufnahme von laserinduzierten Ultraschallsignalen zur Verfügung. Allgemein kann zwischen Transmissions- und Reflexionsmessungen unterschieden werden. Bei Transmissionsmessungen befinden sich die Lichtquelle und der für den Signalempfang verwendete Ultraschallwandler auf den gegenüberliegenden Seiten des Untersuchungsobjekts. Dieser Aufbau eignet sich vor allem für mikroskopische Untersuchungen, bei denen nur geringe Schichtdicken an zu untersuchenden Materialien durchdrungen werden müssen. Hingegen ist die Reflexionsgeometrie im klinischen *in-vivo* Einsatz unumgänglich, da die optische Anregung und der akustischer Empfänger auf der gleichen Seite angeordnet sind. Die einzelnen Komponenten der beiden hybriden Systeme werden in den folgenden Abschnitten behandelt.

### 4.1 Konzeptionierung eines hochauflösenden Systems zur optoakustischen *in-vitro* Bildgebung

In den vergangenen Jahren wurde am Fraunhofer IBMT ein rein akustisches Mikroskop zur zeitaufgelösten akustischen Mikroskopie an individuellen Zellen entwickelt und aufgebaut [36]. Basierend auf diesen Vorarbeiten und gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung konnte in dem Projekt „POLYSOUND“ ein hochauflösendes optoakustisches Mikroskopiesystem für Untersuchungen an einzelnen Zellen im Transmissionsmodus realisiert werden [37]. Durch die konfokale Anordnung einer optischen Anregungsquelle und einer akustischen Detektionseinheit werden nur die Objektbereiche abgebildet, die sich im Fokusvolumen befinden. Zur Erzeugung eines Bildes wird der zu untersuchende Bereich punktweise abgetastet. Basierend auf der Laufzeitauswertung der erzeugten Druckwelle können zudem dreidimensionale Ansichten der Probe erstellt werden. Der schematische Aufbau und die Interaktion der einzelnen Systemkomponenten ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

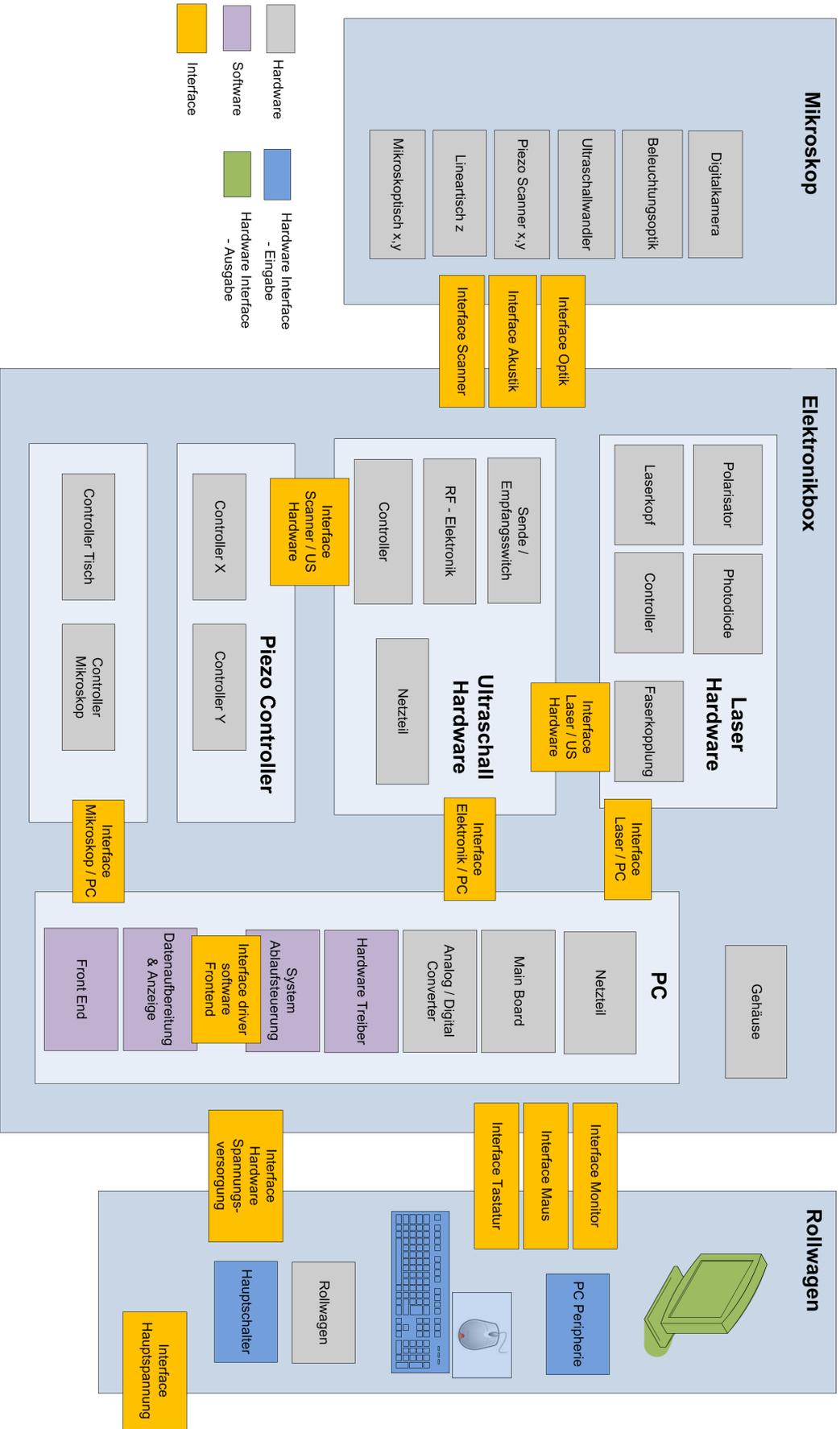
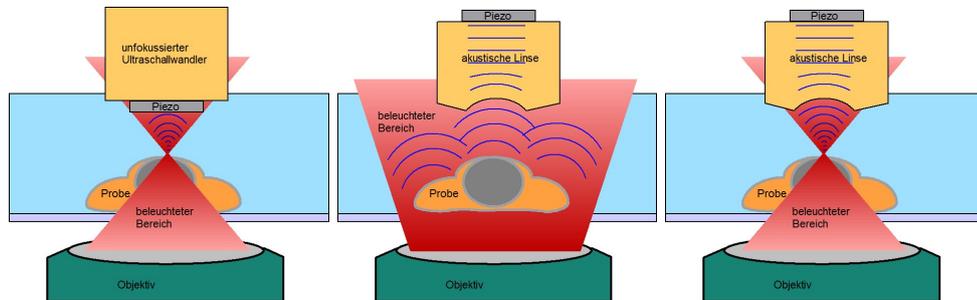


Abb. 4.1. Schematischer Aufbau der optoakustischen *in-vitro* Mikroskopieplattform

Eine hohe Auflösung kann sowohl durch den Einsatz von fokussierten Einzelelementwandlern als auch durch eine fokussierte optische Beleuchtung erzielt werden. Die Größe der lateralen Auflösung ist durch den jeweiligen Messmodus bestimmt. Abbildung 4.2 verdeutlicht die geometrische Anordnung von Optik und Akustik und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten der Bildaufnahme.



**Abb. 4.2.** Verschiedene Betriebsmodi der Mikroskopieplattform: akustische Weitfelddetektion, optische Weitfeldanregung und konfokale optoakustische Bildgebung (von links nach rechts)

Im ersten Modus wird die Probe mit einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet und das erzeugte Signal von einem unfokussierten Ultraschallwandler empfangen. Somit werden lediglich im Fokalvolumen der optischen Anregung optoakustische Signale erzeugt, welche von der unfokussierten Detektoreinheit in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Diese Art des Empfängers lässt sich sehr einfach herstellen, da keine mikromechanische Bearbeitung des Trägermaterials notwendig ist. Die Auflösung ist in diesem Modus lediglich durch die Größe der optischen Anregung definiert. Alternativ bietet sich die Möglichkeit, einen fokussierten Ultraschallwandler zur Signaldetektion zu verwenden und eine Fläche zu beleuchten, welche viel größer als der Brennpunkt der akustischen Linse ist. Die Druckwellen, welche außerhalb des Fokusvolumens des Ultraschallwandlers erzeugt werden, sind durch dessen ortsabhängige Sensitivität ausgeblendet. Dadurch tragen lediglich Strukturen aus einem kleinen Probenbereich im Fokus des Detektors zur Signalgenerierung bei. In diesem Modus ist die laterale Auflösung des Systems durch die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers gegeben. Darüber hinaus können die Vorteile beider Bildgebungsmodi vereint werden, in dem der akustische und der optische Fokus zur Deckung gebracht wird. Dieser Modus zeichnet sich im Vergleich zu den beiden anderen Modi durch die beste Auflösung aus. In diesem konfokalen optoakustischen Modus kann zudem eine verbesserte Sensitivität erreicht werden. Daher werden alle nachfolgenden Messungen ausschließlich im konfokalen Modus durchgeführt.

#### 4.1.1 Akustisches Detektionssystem

In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass die erzeugten Signale bei der optoakustischen Bildgebung sehr breitbandig sind, jedoch in Abhängigkeit der Strukturgröße charakteristische spektrale Maxima aufweisen. Diese Erkenntnis kann nun bei der Konzeption des zum Empfang eingesetzten Wandlers genutzt werden, um ihn hinsichtlich seiner spektralen Eigenschaften optimal an die Bandbreite der entstehenden optoakustischen Signale anzupassen und eine Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses der gemessenen Signale zu erreichen.

Um die Mittenfrequenz des Wandlers an das von der Probe emittierte Schallspektrum bestmöglich anzupassen, werden in der optoakustischen Bildgebung oftmals sogenannte Monte-Carlo-Simulationen verwendet, welche die Ausbreitungsrichtung der eingestrahnten Photonen im Gewebe mittels Zufallszahlen berechnen [38]. Im Bereich der optoakustischen Mikroskopie kann auf solch aufwendige numerische Berechnungen der Lichtverteilung innerhalb des zu untersuchenden Bereichs verzichtet werden. Die Eindringtiefe des Lichtes übersteigt die geringe Probendicke oftmals um ein Vielfaches, sodass von einer homogenen Ausleuchtung ausgegangen werden kann. Daher ist lediglich die Berechnung der akustischen Wellen notwendig, um die entstehenden Signale abschätzen zu können.

Im Falle hochsymmetrischer Strukturen ist, wie in Kapitel 3.3 gezeigt, eine analytische Berechnung der Druckwellen möglich. Die optoakustisch generierten Signale sphärischer Absorber zeigen eine breite spektrale Verteilung. Bei kurzpulsiger Anregung kleiner Strukturen im Mikrometerbereich sind optoakustische Signale bis in den Bereich mehrerer hundert  $MHz$  zu erwarten (Abbildung 3.4). Da die laterale Auflösung einer akustischen Linse nach Gleichung 3.25 linear mit der Frequenz zunimmt liegt es nahe, einen Ultraschallwandler zu verwenden, dessen Mittenfrequenz im oberen Bereich des optoakustisch erzeugten Frequenzspektrums liegt. Somit wird ein Kompromiss zwischen einerseits der erzielbaren Auflösung und andererseits bestmöglicher Sensitivität bezüglich der erzeugten optoakustischen Signalamplituden angestrebt.



**Abb. 4.3.** Photographie der entwickelten 400  $MHz$  Linse zur konfokalen optoakustischen Mikroskopie

Bezeichnung	ZnO 400MHz
Mittenfrequenz	375 $MHz$
Bandbreite	60 %
Krümmungsradius	350 $\mu m$
Öffnungswinkel	60 °
Fokusbreite	6,1 $\mu m$
Fokuslänge	35,7 $\mu m$

**Tabelle 4.1.** Charakteristika des verwendeten Ultraschallwandlers zur optoakustischen *in-vitro* Bildgebung

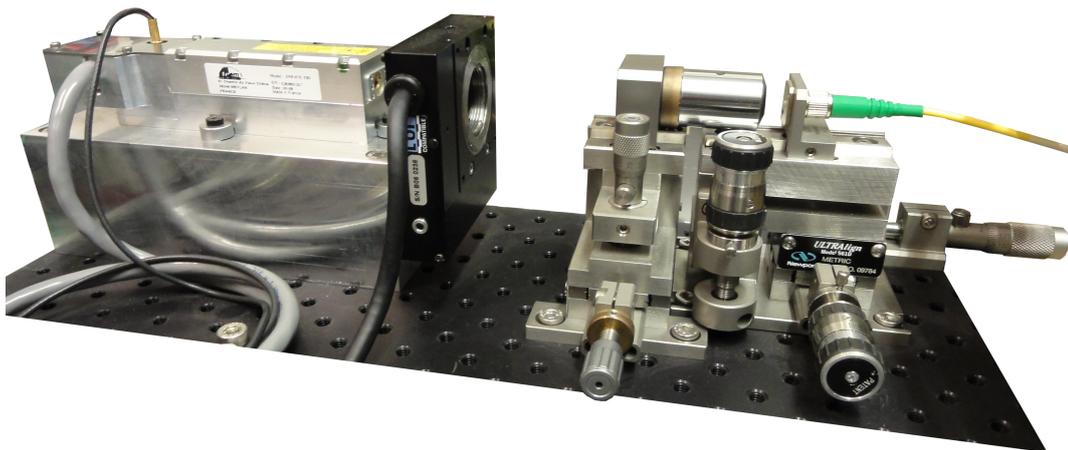
Bei den in den nächsten Kapiteln vorgestellten Experimenten wird daher eine am Fraunhofer IBMT eigens für die hochauflösende akustische und optoakustische Mikroskopie entwickelte Linse der Mittenfrequenz 400  $MHz$  verwendet (Abbildung 4.3). Bei der Herstellung wird Zinkoxid (ZnO) als piezoelektrischer Dünnschicht durch epitaktisches Wachstum auf der planen Seite eines Saphir-Zylinders abgeschieden. Aus der Dicke der piezoaktiven Schicht ergibt sich die Arbeitsfrequenz des Ultraschallwandlers. Der Saphirzylinder selbst dient dabei als Vorlaufstrecke, sodass die Kavität in das Fernfeld des piezoaktiven Elementes rückt. Der Impedanzunterschied zwischen Saphir ( $Z_{Saphir}=44,3 \text{ MRayl}$ ) und dem Kopplungsmedium Wasser ( $Z_{Wasser}=1,5 \text{ MRayl}$ ) ist hoch, wodurch die Schallwellentransmission an der Saphir-Wasser-Grenzschicht mit ca. 6 % sehr gering ausfällt. Um die bestmögliche Schalltransmission in das Koppelmedium zu erreichen, wird auf die Kalotte zusätzlich eine Anpassschicht aus Quarz ( $Z = 12,1 \text{ MRayl}$  [39]) aufgebracht. Eine optimale Transmission wird erreicht, wenn diese Schicht eine Impedanz aufweist, welche dem geometrischen

Mittelwert der Impedanzen beider angrenzender Medien entspricht. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der verwendeten Ultraschalllinse. Die berechnete laterale Fokusbreite des 400 MHz Wandler entspricht mit  $6,1 \mu\text{m}$  nahezu der Größe der optischen Beleuchtung (Abschnitt 4.1.3), sodass konfokale Messbedingungen vorliegen.

#### 4.1.2 Optische Anregungsquelle

In Abschnitt 3.3 wurde der Einfluss der optischen Anregungsquelle auf den zeitlichen Verlauf und somit die Mittenfrequenz der erzeugten Druckwellen gezeigt. Um hochfrequente optoakustische Signale subzellulärer Strukturen im Bereich mehrerer hundert MHz zu erzeugen, ist ein sehr kurzer Laserpuls von Nöten. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass Pulsbreiten im Bereich weniger Nanosekunden das Spektrum der emittierten akustischen Druckwellen nur geringfügig beeinflussen. Zudem sind auch bei der Anregung absorbierender Strukturen im Mikrometerbereich die Bedingungen des stress- und thermal-confinements (Gleichungen 3.20 und 3.21) erfüllt.

Um die Ergebnisse auch auf den *in-vivo* Einsatz von Kontrastmitteln übertragen zu können, soll die Wellenlänge des emittierten Lichtes zum einen im Bereich des optischen Fensters liegen, zum anderen einfach verfügbar sein. Die Messzeit ist nicht zuletzt von der Pulswiederholrate des Lasersystems abhängig. Daher erlaubt eine hohe Repetitionsrate des Lasers eine schnelle punktweise Aufnahme der Daten. Für optisch beugungsbegrenzte Anregung ist die Einkopplung des Lasers in eine Singlemode-Faser notwendig. Aufgrund der hohen Strahldivergenz von Laserdioden sind diese nicht einsetzbar. Eine Alternative bieten passiv gütegeschaltete Festkörperlaser (Teem Photonics, Meylan, Abb. 4.4) mit einer Wellenlänge von 1064 nm, deren hohe Strahlqualität eine effiziente Einkopplung in eine Singlemode-Faser erlauben. In Tabelle 4.2 sind die Spezifikationen des verwendeten Lasers (Abbildung 4.4) zusammengefasst.

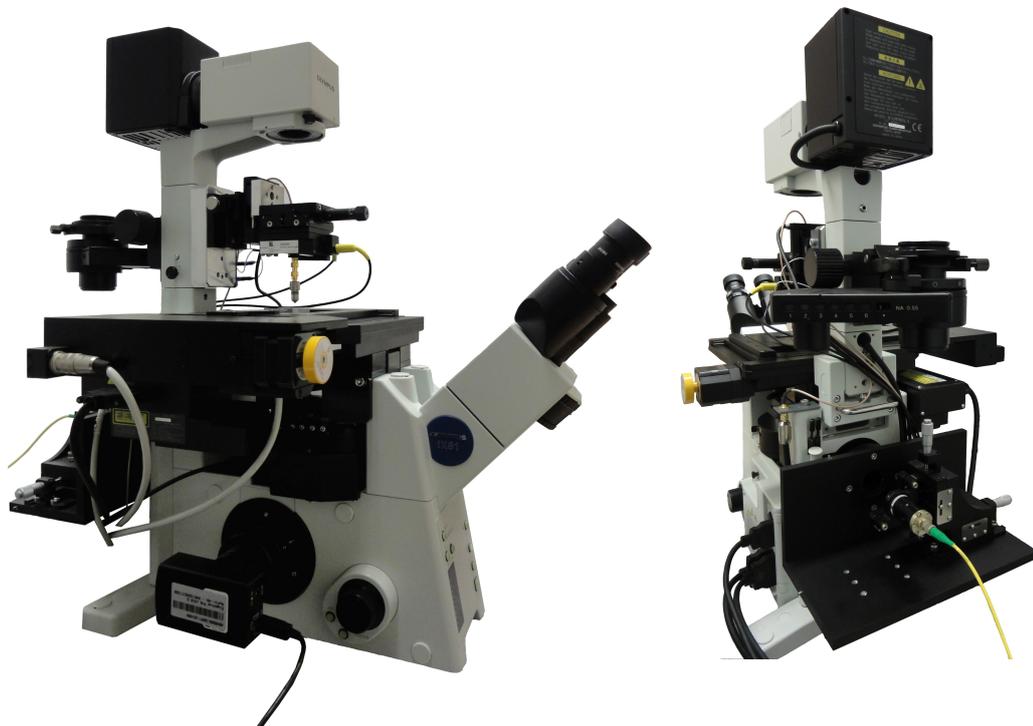


**Abb. 4.4.** 1064 nm passiv gütegeschalteter Nd:YAG Laser zur optoakustischen Signalgenerierung

Zur Durchführung zeitaufgelöster optoakustischer Messungen ist es notwendig, die Aufnahme der Drucktransienten beim Aussenden des Lichtpulses zu beginnen. Ermöglicht wird dies durch eine in den Laserkopf integrierte Photodiode, welche eine Synchronisation



geschieht wahlweise über eine CCD-Kamera am seitlichen Port des Mikroskops oder durch das Binokular. Um Augenschäden vorzubeugen, sind die Okulare mit Schutzfiltern (BG39) ausgestattet. Über den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskops wird das Laserlicht auf die zu untersuchende Probe appliziert. In diesem beleuchteten Volumen findet die Anregung akustischer Druckwellen statt. Auf Seiten der akustischen Detektion ist eine ebenfalls in alle drei Raumrichtungen flexible Fassung angebracht, mit deren Hilfe unterschiedliche Ultraschallwandler aufgenommen und im optischen Strahlengang positioniert werden können. Diese Detektionseinheit lässt sich durch ihre rotierbare Aufhängung reproduzierbar gegen den Kondensator des Mikroskops tauschen, welcher zur visuellen Beobachtung der Probe benötigt wird. Die erzeugte akustische Welle wird durch die konfokal angeordnete Detektionseinheit aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt.



**Abb. 4.6.** Photographie des entwickelten Mikroskopiesystems zur hochauflösten optoakustischen Bildgebung auf zellulärer Ebene

Eine große Schwierigkeit in der konfokalen optoakustischen Mikroskopie ist der Abgleich von optischem und akustischem Fokus bei der Verwendung stark fokussierender akustischer Linsen und Singlemode-Optik. Beide Fokusse liegen im Bereich weniger Mikrometer und müssen exakt in zu untersuchenden Probenbereich positioniert werden. Der vertikale Abstand des Ultraschallwandlers zur Probe kann im rein akustischen Betriebszustand durch eine Puls/Echo-Messung eingestellt werden. Dazu wird der empfangene Anteil der ausgesendeten Ultraschallwelle in Abhängigkeit des Abstandes des Ultraschallwandlers zur Probe ausgewertet und auf das Maximum optimiert. Die Ausrichtung des Ultraschallwandlers in der optischen Achse ist bedeutend schwieriger. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass weder der akustische, noch der optische Fokus des verwendeten infraroten Laserlichtes sichtbar sind. Aus diesem Grund wurde eine skriptbasierte automatisierte Feinausrichtung

entwickelt. Hardwareseitig gelang dies durch die zusätzliche Integration eines zweiachsigen Piezoscanners in die Halterung des akustischen Wandlers. Nach manuellen Grobjustagen wird mittels des detektorseitig angebrachten Piezoscanners und eines Referenztargets aus Gold, welches zuvor mittels eines Sputterprozesses in die Probenkammer eingebracht wurde, die Signalamplitude ortsabhängig dargestellt. Aufgrund der geringen Dicke von wenigen hundert Nanometern und der hohen optischen Absorption erzeugt diese Goldschicht ein breitbandiges optoakustisches Signal mit großem SRV. Danach wird der akustische Fokus des Ultraschallwandlers automatisiert auf dem Signalmaximum positioniert. Dadurch ist eine bestmögliche horizontale Ausrichtung des Ultraschallwandlers im optischen Strahlengang gewährleistet. Der eigentliche optoakustische Bildaufbau erfolgt durch Scannen der Probe gegenüber ruhendem optischem und akustischem Fokus. Die Probe wird Zeile für Zeile in einem zweidimensionalen Muster mechanisch abgerastert. Dabei wird das hochfrequente akustische Signal aufgezeichnet, nachbearbeitet und in ein Graustufen-Bild konvertiert. Im Gegensatz zu den literaturbekannten Systemen ist in der hier beschriebenen Mikroskopieplattform der maximal abbildbare Bereich theoretisch unbegrenzt, da er nicht über die Ablenkung des Lichtstrahls, sondern nur über den Verfahrensweg des Mikroskopisches bestimmt ist.

Die hier vorgestellte optoakustische Mikroskopieplattform bietet die Möglichkeit der Darstellung von Vorgängen auf der Einzelzellebene. Im Gegensatz dazu stellt die Optoakustik auf der mesoskopischen und makroskopischen Ebene eine neue Bildgebungsmethode in der präklinischen und klinischen Forschung dar. Im folgenden Abschnitt wird auf das Konzept und den Aufbau des bildgebenden Systems zur *in-vivo* Diagnostik eingegangen.

## 4.2 Konzeptionierung eines hochauflösenden Systems zur optoakustischen *in-vivo* Bildgebung

Abbildung 4.8 zeigt schematisch den Aufbau des Systems, welches in Kooperation mit der Firma kiberio (kiberio GmbH, Saarbrücken) im Rahmen des europäischen Forschungsprojektes „SKINSPECTION“ realisiert wurde [40]. Das anvisierte Einsatzgebiet des optoakustischen Systems ist die Aufnahme hochaufgelöster akustischer und optoakustischer Bilder ausgewählter Bereiche für die *in-vivo* Diagnostik z. B. in der Dermatologie.

Das System besteht im Wesentlichen aus einem handgehaltenen Messkopf sowie einer speziell für die kombinierte akustische und optoakustische Bildgebung entwickelten Ultraschallelektronik. In den Messkopf ist ein fokussierender hochfrequenter Ultraschallwandler integriert, welcher mittels einer mechanischen Bewegungseinheit in drei Raumrichtungen über den zu untersuchenden Bereich bewegt werden kann. Der zur optoakustischen Signalerzeugung notwendige Laser ist zusammen mit der Ultraschallelektronik, den Achsensteuerungen und einem Computer in einem gemeinsamen Gehäuse untergebracht. Zur Gewährleistung der Mobilität ist das Gesamtsystem auf einem Rollwagen montiert, um so eine Untersuchung nahe am Patienten zu ermöglichen. Im Folgenden werden der verwendete Ultraschallwandler sowie die Lichtquelle betrachtet, da beide für die Erzeugung hochauflösender optoakustischer Bilder maßgeblich sind.

### 4.2.1 Akustisches Detektionssystem

Die Auflösung und die maximale Abbildungstiefe im optisch angeregten Bereich sind in diesem *in-vivo* System aufgrund der unfokussierten Beleuchtung und der zudem hohen Streuung des Lichts im Gewebe lediglich durch die Abbildungseigenschaften des Ultraschallwandlers bestimmt. Daher wird ein fokussierender hochfrequenter Ultraschallwandler mit einer hohen lateralen Auflösung eingesetzt.



**Abb. 4.7.** Photographie des Ultraschallwandlers zur *in-vivo* Bildgebung

Bezeichnung	PZT 35MHz
Mittenfrequenz	35 MHz
Bandbreite	100 %
Krümmungsradius	5,5 mm
Öffnungswinkel	29 °
Fokusbreite	107,9 $\mu$ m
Fokuslänge	2,4 mm

**Tabelle 4.3.** Charakteristika des verwendeten Ultraschallwandlers zur *in-vivo* Bildgebung

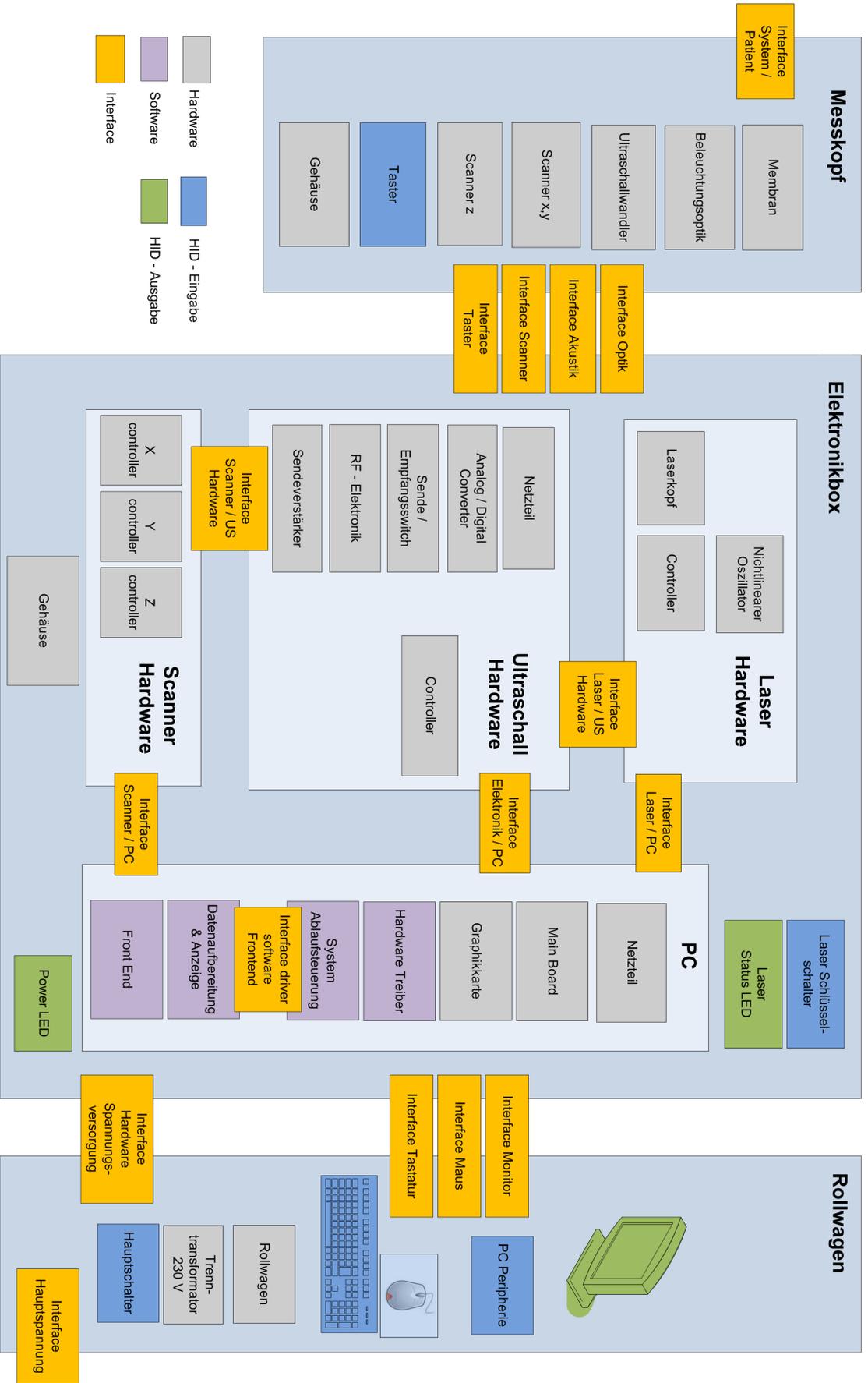


Abb. 4.8. Schematischer Aufbau des entwickelten Systems zur hochauflösenden optoakustischen *in-vivo* Bildgebung

Wie schon in Abschnitt 3.2.3 gezeigt, muss die Mittenfrequenz des Wandlers an die optoakustisch erzeugten Signale der zu untersuchenden Strukturen angepasst werden. Gerade bei Untersuchungen der menschlichen Haut sind aufgrund der Strukturgröße Signale im Frequenzspektrum von mehr als 50 *MHz* lediglich gering ausgeprägt (siehe Abbildung 3.2). Zudem soll die Abbildungstiefe des Systems im Millimeterbereich liegen, was bei gegebener Dämpfung im Medium die maximal mögliche Mittenfrequenz limitiert. Für die rein akustischen Messungen sowie zur Detektion optoakustisch erzeugter Drucktransienten wird ein speziell an diese Anforderungen angepasster Ultraschallwandler eingesetzt (Abbildung 4.7). Als piezoaktives Material dient Blei-Zirkonat-Titanat (PZT), welches mittels eines Siebdruckverfahrens direkt in die sphärische Kalotte eingebracht ist. Die geometrischen Abmessungen sowie die Mittenfrequenz des Ultraschallwandlers sind in Tabelle 4.3 aufgeführt und liegen der Schallfeldberechnung in Kapitel 5.1 zu Grunde.

#### 4.2.2 Optische Anregungsquelle

Für die *in-vivo* Diagnostik kann das in der mikroskopischen Plattform eingesetzte Lasersystem nicht verwendet werden. Aufgrund der Größe des zu beleuchtenden Hautareals muss die Pulsenergie des hierbei eingesetzten Lasers wesentlich höher sein. Gleichzeitig sind die gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte für die Bestrahlung der Haut zu beachten [41]. Ebenso muss die Wellenlänge des emittierten Lichtes den Absorberstrukturen der Haut angepasst werden.

Speziell für die Untersuchung pigmentierter Hautveränderungen samt umgebender Vaskularisierung muss die Wellenlänge des verwendeten Lichtes an das Absorptionsspektrum der zu untersuchenden Chromophore angepasst werden. Wie in Abbildung 3.1 gezeigt liegt das Absorptionsmaximum von Desoxyhämoglobin (*HBO*) bei etwa 555 *nm* und von Oxyhämoglobin (*HBO*<sub>2</sub>) bei etwa 576 *nm*. Der Absorptionskoeffizient von Melanin hingegen nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab. Frequenzverdoppelte Nd:YAG Laser emittieren Licht einer Wellenlänge von 532 *nm*. Bei dieser Wellenlänge besitzen beide Formen des Hämoglobins nahezu identische und zudem sehr hohe molare Extinktionskoeffizienten. Aus diesem Grund ist die Signalamplitude unter Verwendung von Licht einer Wellenlänge von 532 *nm* proportional zur absoluten Hämoglobinkonzentration. Um den daraus resultierenden geringen Eindringtiefen bei melaninhaltigem Gewebe entgegenzuwirken, kann zusätzlich infrarotes Licht einer Wellenlänge von 1064 *nm* eingesetzt werden, welches die unterschiedlichen Hautschichten aufgrund der reduzierten optischen Absorption von Blut und Melanin durchdringen und Informationen aus tiefer gelegenen Hautschichten generieren kann.

Aus diesen Gründen wird ein Laser eingesetzt, der mit einem Frequenzverdopplungskristall ausgestattet ist. Dadurch kann wahlweise Licht einer Wellenlänge von 1064 *nm* oder 532 *nm* emittiert werden (CryLaS Crystal Laser Systems GmbH, Berlin, Abb. 4.9). Die Spezifikationen des Lasers sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Der Vorteil dieses Lasersystems liegt in der kurzen Laserpulsdauer, sodass dissipative Effekte zu vernachlässigen sind.

Bei der Verwendung von fokussierten Ultraschallwandlern zur optoakustischen Bildgebung ist die Wahl der Beleuchtungsgeometrie von besonderer Wichtigkeit. Um die Amplituden der



**Abb. 4.9.** Diodengepumpter passiv gütegeschalteter Nd:YAG Laser zur optoakustischen Signalgenerierung

Bezeichnung	Laser
Wellenlänge	1064 nm & 532 nm
Pulsdauer	1,5 ns
Pulsenergie	77 $\mu J$ & 37 $\mu J$
Repetitionsrate	1 kHz

**Tabelle 4.4.** Charakteristika des verwendeten Lasers zur *in-vivo* optoakustischen Bildgebung

erzeugten Signale zu maximieren und unnötige Beleuchtung des Gewebes zu vermeiden, muss der Bereich der maximalen akustischen Sensitivität des sich bewegenden Ultraschallwandlers mit dem Bereich übereinstimmen, in dem der Großteil des Laserlichtes absorbiert wird. Dazu ist, wie in Abbildung 4.7 ersichtlich, der Wandler mit einem Gewinde versehen, an welchem die nachfolgend beschriebene Beleuchtungseinheit befestigt werden kann. Der Ultraschallwandler dient somit als Träger der optischen Beleuchtungseinheit, welche konfokal angeordnet ist. Somit ist eine optimale Ausleuchtung des Fokusbereichs des Wandlers zu jedem Zeitpunkt sichergestellt.



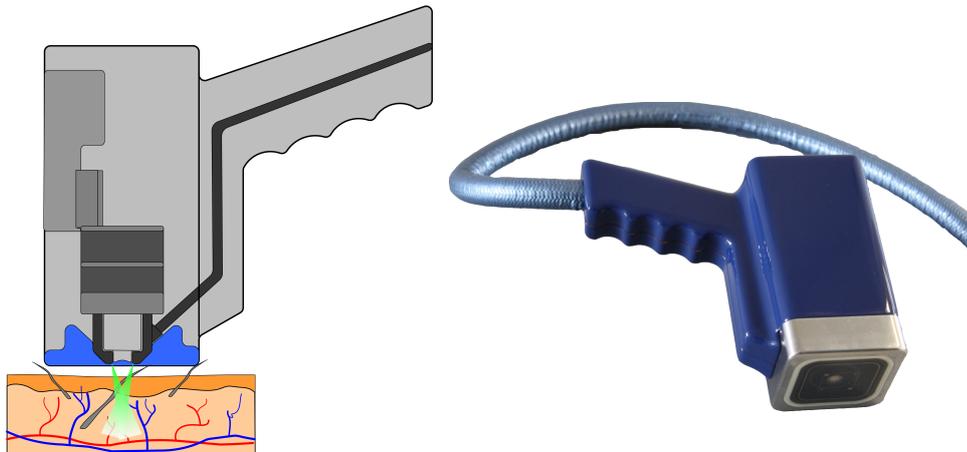
**Abb. 4.10.** Prototyp des Lichtwellenleiters für die Beleuchtung des Fokusbereichs des Ultraschallwandlers

Zur Erzeugung eines hochfrequenten akustischen Transienten mittels Laserbestrahlung muss die Einstrahlgeometrie in Bezug auf die erzeugte lokale Lichtintensität optimiert werden. Hierbei wird das notwendige Laserlicht mit Hilfe eines Faserbündels zur Haut geführt. Das optische Bündel besteht aus einer Vielzahl einzelner Multimodefasern mit einem Kerndurchmesser von 45  $\mu m$  bei einem Öffnungswinkel von 22°, welche konzentrisch um den Ultraschallwandler angeordnet sind. Der Anstellwinkel der Fasern zur Normalen ist so gewählt, dass sich die Mittelpunktstrahlen der Lichtfasern im Fokuspunkt des Wandlers überlagern. Durch diese Art der Anordnung kommt es zu einer koaxialen Überlappung des akustischen Fokus und des Bereichs maximaler Lichtabsorption. Die in Abbildung 4.10

gezeigte kombinierte akustische und optische Einheit dient der Erzeugung und Detektion optoakustischer Signale und ist in das nachfolgend beschriebene Handstück integriert.

### 4.2.3 Gesamtsystem

Neben den zuvor beschriebenen Bauteilen beinhaltet der handgehaltene Messkopf zusätzlich die Komponenten zur Bewegung des Ultraschallwandlers in allen drei Raumrichtungen. Der maximal mögliche Aufnahmebereich hat eine Größe von  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  und wird durch die maximal mögliche Auslenkung der verwendeten piezogetriebenen Linearachsen (Physik Instrumente, Karlsruhe) im Gehäuse begrenzt (Abbildung 4.11). Zudem kann der Abstand des Ultraschallwandlers zur Hautoberfläche variiert werden, um unterschiedlich tief liegende Gewebeschichten adressieren zu können. Aufgrund der Notwendigkeit einer akustischen Kopplung ist die Integration des Ultraschallwandlers in ein mit Wasser gefülltes Gehäuse unumgänglich. Der Boden des Behälters ist mit einer akustisch und optisch transparenten Polyethylenfolie wasserdicht verschlossen. Zur Untersuchung wird auf den betroffenen Hautbereich Ultraschallgel gleichmäßig aufgetragen und in Kontakt mit der Folie gebracht (Abbildung 4.12). Die geringe Dicke der Folie von lediglich  $25 \mu\text{m}$  ermöglicht ein Anschmiegen der selbigen an die zu untersuchende Hautpartie. Nachfolgend sind die schematische Zeichnung sowie ein Bild des handgehaltenen Scankopfes beigefügt.



**Abb. 4.11.** Handgehaltener Messkopf inklusive aller mechanischer Achsen, optischer und akustischer Komponenten

Die aufgenommenen Daten werden an einen Computer übermittelt und in einem speziell dafür entwickelten Programm visualisiert. Abbildung 4.12 zeigt die Benutzeroberfläche der Software zur Steuerung des Systems und Visualisierung der Messdaten. Die Programmoberfläche zeigt im linken oberen Teil das zuletzt aufgenommene Querschnittsbild in Empfangsrichtung (B-Scan). Rechts daneben ist das Projektionsbild in einer zur Empfangsrichtung senkrechten Ebene (C-Scan) angezeigt. Bereits zuvor aufgenommene Datensätze sind im unteren Teil der Benutzeroberfläche aufgelistet und können von einer Datenbank zur weiteren Verarbeitung geladen werden. Darüber hinaus speichert das Programm alle relevanten Informationen zum Patienten sowie alle technischen Scan-Parameter, die für die Nachbearbeitung der Daten notwendig sind.

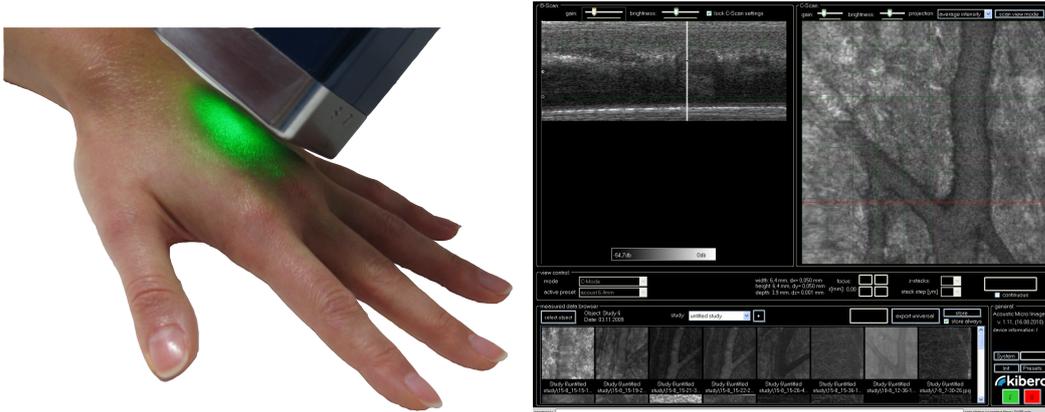


Abb. 4.12. Ankopplung des Messkopfes an der Haut und Visualisierung der aufgenommenen Daten

Im Falle handgehaltener Systeme ist insbesondere die Aufnahmezeit für einen Untersuchungsbereich entscheidend, da Bewegungsartefakte die Bildqualität beeinträchtigen können. Die Messzeit hängt von mehreren Faktoren ab, einschließlich der erforderlichen Bildqualität und des gewählten Scan-Modus (Optoakustik oder Ultraschall). Im rein akustischen Modus geschieht der Bildaufbau in der Regel schneller als im optoakustischen Modus, da die elektrischen Anregungspulse mit einer maximalen Wiederholrate von bis zu  $100\text{ kHz}$  appliziert werden können. Im optoakustischen Modus ist die Aufnahmezeit durch die Pulswiederholrate des Lasers mit  $1\text{ kHz}$  begrenzt.



Abb. 4.13. Photographie des entwickelten Systems zur hochaufgelösten *in-vivo* optoakustischen Bildgebung

Für die Nutzung des Systems in der klinischen Routine kann ein schneller Übersichtsscan zum Auffinden interessanter Strukturen hilfreich sein. Ein solches Übersichtsbild mit nicht optimaler Auflösung kann in circa 30 Sekunden aufgenommen werden. Für die Bildgebung des gleichen Bereichs im Ultraschall-Modus mit optimaler Auflösung sind etwa 90 Sekunden erforderlich. Durch die Verwendung des hochrepetierenden Lasersystems beträgt die Aufnahmezeit eines kompletten dreidimensionalen Volumens von  $10 \times 10 \times 4 \text{ mm}^3$  im optoakustischen Modus lediglich drei Minuten. Über diese Zeitdauer muss der Handscanner ruhig auf der zu untersuchenden Hautregion gehalten werden. Kleinere Bewegungsartefakte werden durch ein leichtes Anhaften der mit Ultraschallgel versehenen Hautpartie an dem Messkopf kompensiert. Somit bleibt die zu untersuchende Hautpartie in Bezug auf den Ultraschallwandler ortsfest.

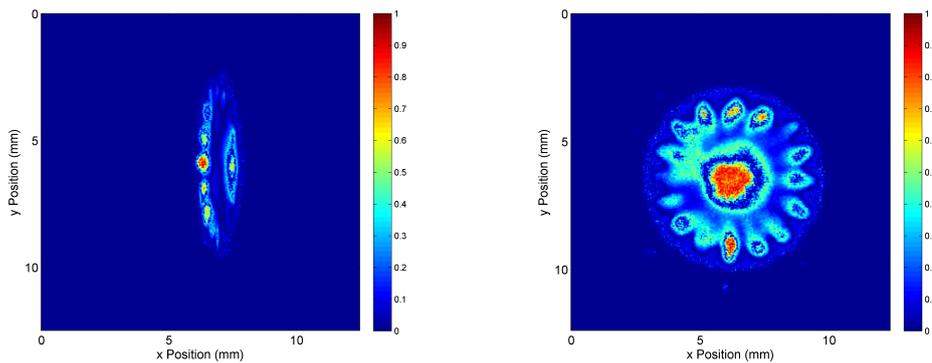
Wie in der Abbildung 4.8 und 4.13 zu erkennen, sind alle elektronischen Komponenten sowie die Laserquelle in einem abgeschirmten Metallgehäuse integriert, wodurch die Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen elektromagnetischen Verträglichkeit (EMV) unterstützt wird. Die wechselseitige Beeinflussung der im klinischen Alltag nebeneinander eingesetzten Untersuchungsgeräte mittels ungewollter elektrischer oder elektromagnetischer Felder wird durch diese Maßnahme reduziert. Des Weiteren muss sichergestellt sein, dass beim Einsatz gepulster Laserstrahlung die geltenden Grenzwerte nicht überschritten werden. Aus diesem Grunde wurde die zugängliche Bestrahlungsstärke gemessen.

#### 4.2.4 Klassifizierung des Lasersystems

Die Anwendung lichtemittierender Geräte am Menschen unterliegt strengen Regularien, welche in der Norm DIN EN 60825-1 zusammengefasst sind. Nach dieser Vorschrift werden die Lasergeräte in Klassen entsprechend ihrer Gefährlichkeit für Auge und Haut eingeteilt. Das eingesetzte Lasersystem wurde vom Hersteller nach vorgenannter Norm als Klasse 3B System gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass die zugängliche Laserstrahlung für das Auge und für die Haut gefährlich ist. Bei der anvisierten Applikation war, bedingt durch die Einkopplung des Lichtes in eine Vielzahl von Einzelfasern, der Anordnung derselben um den Ultraschallwandler und die lichtstreuende Polyethylenfolie im Bereich des Lichtaustritts, eine erneute Klassifizierung notwendig. In Kooperation mit einem akkreditierten Prüflabor für optische Bestrahlung (Seibersdorf Laboratories, Wien), wurde die im System integrierte optische Anregungseinheit gemäß obiger Norm neu klassifiziert.

Bedingt durch den hohen Öffnungswinkel der Fasern und des streuenden Verhaltens der Folie ist das austretende Laserlicht nicht mehr kollimiert. Im Falle divergenter Lichtquellen müssen die Werte für die maximal zulässige Bestrahlung um den sogenannten  $C_6$ -Faktor vergrößert werden.  $C_6$  ist ein Korrekturfaktor für Quellen, deren Winkelausdehnung größer als  $1,5 \text{ mrad}$  ist. Dieser wurde im grünen Spektralbereich zu  $26,4 \text{ mrad}$  und im Infraroten zu  $20,2 \text{ mrad}$  gemessen, woraus sich ein  $C_6$ -Faktor von 17,6 bzw. 13,5 ergibt. Abbildung 4.14 zeigt das Abbild des Lichtrings in einem Abstand von  $10 \text{ cm}$  bei einem Anstellwinkel von  $30^\circ$  bzw.  $90^\circ$ .

Die zugänglichen Bestrahlungswerte wurden gemessen und mit den zulässigen Grenzwerten verglichen [41]. Durch die spezielle Beleuchtungsgeometrie der entwickelten optischen Einheit



**Abb. 4.14.** Abbild der Quelle für einen Anstellwinkel kleiner als  $30^\circ$  (links) und  $90^\circ$  (rechts) in einer Entfernung von  $10\text{ cm}$  bei einer Wellenlänge von  $532\text{ nm}$

werden die Grenzwerte der Laserklasse 1 um mehr als einen Faktor 50 unterschritten. Somit ist die zugängliche Laserstrahlung ungefährlich für das Auge und es kann auf die Verwendung von Laserschutzbrillen verzichtet werden. Zusätzlich wurde die auf die Haut applizierten Intensitäten mit den Grenzwerten der Norm verglichen. Die Lichtintensität auf der Hautoberfläche liegt bei beiden Wellenlängen unterhalb der maximal zulässigen Bestrahlungsstärke. Da die Exposition die maximal zulässigen Grenzwerte ebenfalls um mehr als einen Faktor 50 unterschreitet, kann das Gerät als sicher für die Haut angesehen werden. Somit wurde eine Zulassung als Laserprodukt der Klasse 1 erreicht.

In diesem Kapitel wurde der Aufbau zweier Systeme zur hochauflösten optoakustischen Bildgebung auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene beschrieben. In beiden Systemen kommen zur Erhöhung der lateralen Auflösung fokussierte akustische Detektoren zum Einsatz. Durch die geometrische Auslegung des Ultraschallwandlers kommt es jedoch bei der Darstellung von Gewebe im Nah- und Fernfeld zu Bildartefakten. Mit Hilfe verschiedenster Rekonstruktionsalgorithmen können diese Artefakte verringert werden, worauf im nachfolgenden Kapitel eingegangen wird.

## Simulationen und Rekonstruktionsalgorithmen

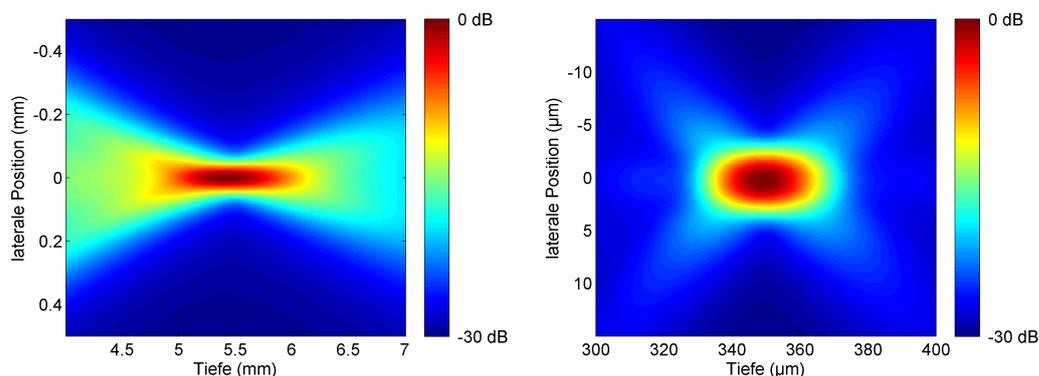
In diesem Kapitel werden die im ersten Teil der Arbeit vorgestellten physikalischen Grundlagen zur Beschreibung des optoakustischen Effekts genutzt, um das Auflösungsvermögen und die Abbildungstreue eines beliebig geformten, fokussierenden Ultraschallwandlers in einem optoakustischen Messaufbau zu simulieren. Die Motivation hinter der Entwicklung des Modells war es, ein Werkzeug für die Visualisierung von Empfangsschallfeldern akustischer Linsen zu schaffen. Somit ist eine Beurteilung der Eignung eines bestimmten Systemaufbaus für die Anwendung in der Optoakustik möglich. Zudem kann bei der geometrischen Auslegung der Ultraschalllinse mit Hilfe der Simulation sichergestellt werden, dass die Parameter bestmöglich gewählt wurden, um die optimalen Feldeigenschaften zu erzielen. Die Kalibrierung von Ultraschalldetektoren ist nicht nur für die Beurteilung der Bildtreue wichtig. Vielmehr kann die Kenntnis des Schallfeldes auch mittels angepassten Rekonstruktionsalgorithmen zur Verbesserung der Auflösung benutzt werden. Somit können speziell an die Wandlergeometrie angepasste Rekonstruktionsalgorithmen entwickelt und das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) der gemessenen Signale verbessert werden. Im nachfolgenden Kapitel werden die Schallfelder der beiden eingesetzten Einzelelementwandler simuliert und verschiedene Rekonstruktionsalgorithmen zur Verbesserung der Bildqualität werden verglichen.

### 5.1 Optoakustisches Schallfeld

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Vielzahl von Modellen zur Berechnung des Schallfeldes eines elektrisch angeregten piezoaktiven Elementes entwickelt [42][43][44]. Im Grunde dienen sie alle zur Bewertung des Schalldrucks eines elektrisch angeregten Ultraschallwandlers. Das Schallfeld vor der Sonde kann mit Hilfe des Huygensschen Prinzips beschrieben werden. Elementarwellen der gleichen Frequenz und Phase werden als Kugelwelle von jedem Punkt der Wandleroberfläche ausgesendet und interferieren in dem Raum vor dem Wandler. Durch die Summation vieler Wellen mit unterschiedlichen Phasenwinkeln ergeben sich Bereiche unterschiedlichen Druckes. Auf diese Weise lässt sich die Stärke des Feldes an jedem beliebigen Punkt vor der Sonde berechnen. Dient der Wandler wie in allen optoakustischen Systemen lediglich zur Signaldetektion, so kann auf diese Weise das reine Empfangsschallfeld nicht berechnet werden. Gleiches gilt für die experimentelle Kalibrierung von Ultraschallwandlern in optoakustischen Aufbauten.

Ein schon vor mehr als 50 Jahren entwickeltes Verfahren zur Kalibrierung von Ultraschallsensoren beruht auf der Verwendung des Wandlers gleichermaßen als Quelle und als Detektor [45][46][47]. Der Ultraschallwandler wird mittels eines breitbandigen Pulses angeregt und sendet infolge dessen einen Ultraschallimpuls aus. Dieser durchläuft ein Koppelmedium und wird an einem im Vergleich zur Wellenlänge kleinen kugelförmigen Reflektor rückgestreut. Die zurücklaufende Welle wird vom Wandler wieder empfangen und in ein elektrisches Signal umgesetzt. Die Position des Reflektors im Raum wird variiert und man erhält ein dreidimensionales Abbild der Schalldruckverteilung. Einer der Vorteile dieser Methode ist es, dass lediglich der Wandler selbst und kein weiterer akustischer Detektor mit bekannter Charakteristik erforderlich ist. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass in dem Messergebnis sowohl die Empfangs- als auch die Sendecharakteristik des Wandlers enthalten, jedoch keine Differenzierung möglich ist. In der Optoakustik fungiert der Ultraschallwandler jedoch nur als Empfänger, sodass die laterale Auflösung lediglich durch dessen Empfangscharakteristik gegeben ist.

Ein möglicher Weg zur Kalibrierung akustischer Sensoren in optoakustischen Messaufbauten ist die Verwendung des optoakustischen Effektes selbst zur Erzeugung breitbandiger akustischer Felder. Die erzeugten Felder müssen sich durch ein einheitliches Spektrum im Frequenzband des Ultraschallwandlers auszeichnen. Die akustischen Quellen können zum Beispiel durch Beleuchtung einer großen Fläche bestehend aus einer hoch absorbierenden Substanz geschaffen werden [48]. Wegen der hohen Absorption kann das Licht nicht tief in das Medium eindringen, was zu einer Energieaufnahme an der Oberfläche und zur Erzeugung eines breitbandigen akustischen Signals führt. Durch die Größe der beleuchteten Fläche sind die erzeugten akustischen Quellen eher ebene Strahler als Punktquellen. Somit ist diese Technik meist zur Kalibrierung unfokussierter akustischer Detektoren geeignet. Alternativ kann ein punktförmiger Absorber als Schallquelle dienen. Dieser Absorber emittiert eine optoakustisch generierte Ultraschallwelle, deren zeitliche Ausdehnung und Amplitude proportional zur Größe und zu der an diesem Ort vorherrschenden Lichtintensität ist (vgl. Kapitel 3.2.3).



**Abb. 5.1.** Optoakustisches Schallfeld eines fokussierten 35 MHz (links) sowie eines 375 MHz (rechts) Ultraschallwandlers nach den in Tabelle 5.1 angegebenen Parametern

Ausgehend von diesen Annahmen wurden zunächst die Empfangscharakteristika der in den Systemen verwendeten Ultraschallwandler simuliert. In Abhängigkeit der Laufzeit

detektiert jedes Element der diskretisierten Wandleroberfläche die lokal ausgesendete optoakustische Welle. Die Amplitude des empfangenen Signals wird phasenrichtig über die Wandleroberfläche integriert und als Funktion des Ortes aufgetragen. Bedingt durch die Krümmung der Wandleroberfläche kristallisieren sich Bereiche konstruktiver und destruktiver Interferenzen heraus.

Abbildung 5.1 zeigt die simulierten Empfangsschallfelder der in beiden Systemen eingesetzten Ultraschallwandler. Die Halbwertsbreite der Druckkurve im Fokus dient als Maß für das laterale Ortsauflösungsvermögen, wohingegen die Fokuslänge die Bildtiefe des Systems beschreibt. In Tabelle 5.1 sind die für die Simulation notwendigen Eingabeparameter sowie deren Ergebnisse zusammengefasst.

	Mittenfrequenz (MHz)	Krümmungsradius (mm)	Öffnungswinkel (°)	Bandbreite (%)	Fokusbreite ( $\mu\text{m}$ )	Fokuslänge ( $\mu\text{m}$ )
PZT 35 MHz	35	5,5	29	100	107,9	2400
ZnO 400 MHz	375	0,35	60	60	6,1	35,7

**Tabelle 5.1.** Parameter der simulierten fokussierten Ultraschalllinsen

Für die theoretisch erzielbare Auflösung der Mikroskopieplattform bedeutet dies, dass die laterale Schallfeldbreite der eingesetzten akustischen Linse im Fokus  $6,1 \mu\text{m}$  beträgt. Die axiale Fokuslänge wird numerisch zu  $35,7 \mu\text{m}$  bestimmt. Im niederfrequenten *in-vivo* Systems hat das Empfangsschallfeld eine Größe von  $107,9 \mu\text{m}$  lateral und  $2400 \mu\text{m}$  axial. Diese simulierten Werte werden in Kapitel 7 experimentell überprüft. Im Falle des Mikroskopiesystems ist die Auflösung nicht nur durch die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers sondern auch durch die Größe der optischen Beleuchtung definiert, worauf im Folgenden eingegangen wird.

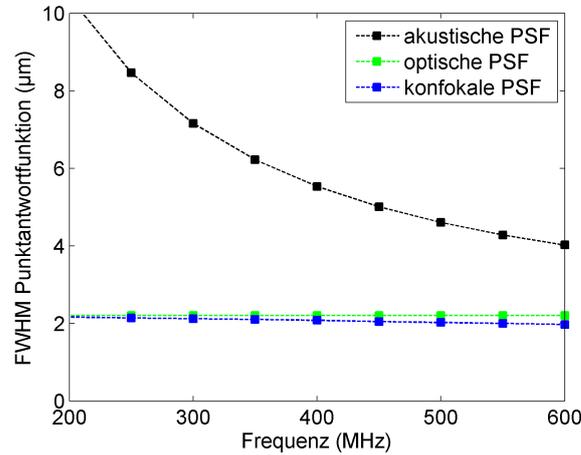
### 5.1.1 Grenzen der Auflösung im konfokalen Modus

Um die Leistungsmerkmale eines konfokalen optoakustischen Mikroskops zu verstehen, ist es notwendig, die grundsätzlichen optischen und akustischen Phänomene genauer zu betrachten. Das wesentlichste Merkmal ist die punktförmige Beleuchtung und Beobachtung. Aus diesem Grund beeinflusst die Größe des Beleuchtungsflecks ebenso wie die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers die Auflösung des gesamten Systems. Für klassische optische Systeme ist die beste erreichbare Auflösung durch die Beugungsgrenze gegeben. Um zwei Punkte lokal trennen zu können, darf nach dem Rayleighschen Auflösungskriterium ihr Abstand nicht kleiner sein als

$$\Delta x_{min} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (5.1)$$

Dabei ist  $\lambda$  die Wellenlänge des verwendeten Lichtes und  $NA$  die numerische Apertur der verwendeten Optik. Daher wird in dieser Simulation die Halbwertsbreite des Beleuchtungsflecks nach den Systemvorgaben zu  $2,2 \mu\text{m}$  festgelegt ( $\lambda = 1064\text{nm}$ ,  $NA = 0,3$ ). Unter Verwendung des zuvor beschriebenen Verfahrens der Schallfeldsimulation wird

die optoakustische Punktantwortfunktion (PSF) berechnet. Dazu wird die Geometrie des Ultraschallwandlers als konstant angenommen und entspricht der in der mikroskopischen Plattform eingesetzten akustischen Linse (Bandbreite 100%, Krümmungsradius  $0,35\text{ mm}$ , Öffnungswinkel  $60^\circ$ ). In Abbildung 5.2 ist die erzielbare Auflösung eines bildgebenden Systems in Abhängigkeit von der Ultraschallfrequenz dargestellt.



**Abb. 5.2.** Simulation der Halbwertsbreite der Punktantwort in Abhängigkeit der Mittenfrequenz des Wandlers in den drei Aufnahmemodi (vgl. Abbildung 4.2)

Die PSF des Ultraschallwandlers ( $PSF_{Det}$ ) zeigt einen hyperbolischen Verlauf, was im Einklang mit der Gleichung 3.25 steht.  $PSF_{Bel}$  entspricht der Halbwertsbreite des Beleuchtungsflecks, welche von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs abhängig ist. Die Abbildungseigenschaften eines konfokalen optoakustischen Mikroskops ( $PSF_{ges}$ ) werden durch die Wechselwirkung zwischen der PSF des Beleuchtungsstrahlengangs und der PSF des Detektors bestimmt. Mathematisch kann dieser Zusammenhang wie folgt beschrieben werden:

$$PSF_{ges} = PSF_{Bel} \cdot PSF_{Det} \quad (5.2)$$

In Abhängigkeit der Mittenfrequenz des Ultraschallwandlers verringert sich die Breite der  $PSF_{ges}$  des konfokalen Gesamtsystems. Im konzipierten Mikroskopiesystem beträgt unter Verwendung einer  $375\text{ MHz}$  Linse die laterale Auflösung im konfokalen Modus idealerweise  $2,1\ \mu\text{m}$ . Auch dieser Wert wird im späteren Teil der Arbeit experimentell überprüft.

## 5.2 Rekonstruktionsalgorithmen

Das fundamentale Problem bei der Konzeption eines hochauflösenden Systems ist, einen Kompromiss zwischen hoher Auflösung und erforderlicher Bildtiefe zu finden. Ein fokussierter Ultraschallwandler mit hoher Bandbreite und hoher numerischer Apertur erfüllt die Anforderungen weitestgehend. Nachteilig wirkt sich in dieser Anordnung die durch die starke Fokussierung des Ultraschallwandlers limitierte Bildtiefe aus, wodurch sich mit

zunehmender Entfernung zum Fokusbereich die Bildqualität drastisch reduziert. Kleine sphärische Absorber werden außerhalb des Fokusbereichs nicht mehr als Punkt, sondern bogenförmig dargestellt. Ihre Form und Krümmung ist durch die geometrische Auslegung der Kalotte des Ultraschallwandlers bestimmt.

Im Folgenden wird eine Möglichkeit aufgezeigt, dieses Artefakt durch einen angepassten Rekonstruktionsalgorithmus zu minimieren. Somit kann die darstellbare Bildtiefe synthetisch erhöht und tiefenunabhängig dieselbe laterale Auflösung wie im Fokus des Wandlers erreicht werden.

### 5.2.1 Synthetic Aperture Focussing Technique (SAFT)

Im Jahre 1995 wurde von Ermert und Passmann erstmalig die unter dem Namen Synthetic Aperture Focussing Technique (SAFT) bekannte Methode zur Verbesserung der Bildqualität und des Signal-Rausch-Verhältnisses außerhalb der Fokuszone stark fokussierender Einzelelementwandlers vorgestellt [49][50]. Bedingt durch die Krümmung einer akustischen Linse konvergieren die Schallwellen im akustischen Modus vom Ort der Entstehung zum Fokuspunkt hin, wogegen sie im Fernfeld als Kugelwelle mit begrenztem Öffnungswinkel divergieren [51][52][53]. In einer vereinfachten Annahme wird der Konvergenzwinkel und der Divergenzwinkel der Schallwellen als identisch angenommen. Betrachtet man den Verlauf der Wellenfronten, so lässt sich das Schallfeld ebenso durch einen Kugelstrahler im Fokuspunkt beschreiben. Die maximale Energieabstrahlung, wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, wird in beide Richtungen entlang der akustischen Achse emittiert. Dieser Ansatz lässt sich auch auf die optoakustische Bildgebung übertragen.

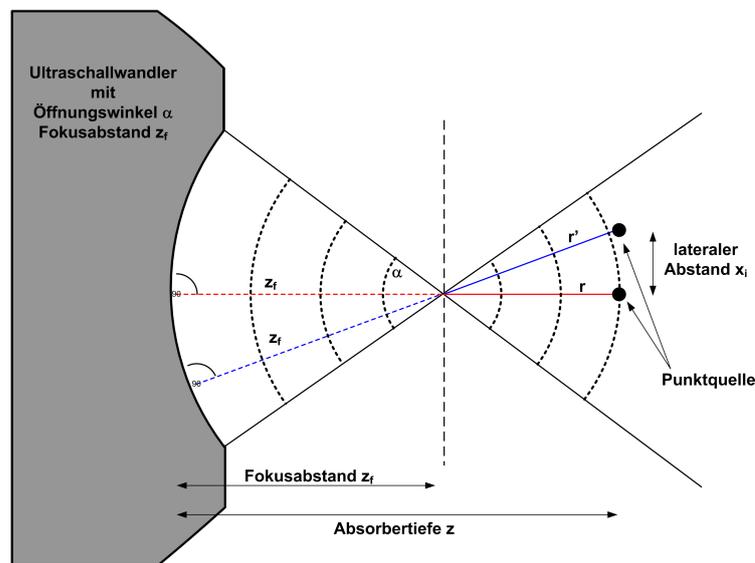


Abb. 5.3. Graphische Veranschaulichung der SAFT-Technologie

In Abbildung 5.3 werden die für das Verständnis des Algorithmus notwendigen Parameter definiert. Dabei bezeichnet  $z$  die Tiefe des synthetischen Fokuspunkts,  $z_f$  den Fokuspunkt des Ultraschallwandlers,  $r$  die axiale Entfernung und  $r'$  den Abstand des geometrischen und

synthetischen Fokuspunkts. Berechnet wird die Laufzeit der senkrecht auf der Wandleroberfläche einfallenden Wellenfront, welche von einer optoakustischen Punktquelle abgestrahlt wird. Die Laufzeit der Schallwelle vom Ort der Entstehung bis zur Wandleroberfläche ist von der lateralen Position der Punktquelle in Bezug auf die Strahlachse des Wandlers abhängig. Bei gegebenem lateralen Abstand  $x_i$  zur Hauptstrahlachse des Ultraschallwandlers beträgt die Laufzeit der senkrecht auftreffenden Wellenfront

$$t_1 = \frac{(z_f + r')}{c} \quad (5.3)$$

Befindet sich der Absorber in gleicher Tiefe, jedoch auf der akustischen Achse, so beträgt die Laufzeit der Schallwelle

$$t_2 = \frac{(z_f + r)}{c} \quad (5.4)$$

Die zu berücksichtigende Laufzeitdifferenz der Linie  $i$  im Abstand  $x_i$  beträgt

$$\Delta t_i = \text{sgn}(z - z_f) \cdot \frac{(r' - r)}{c} \quad (5.5)$$

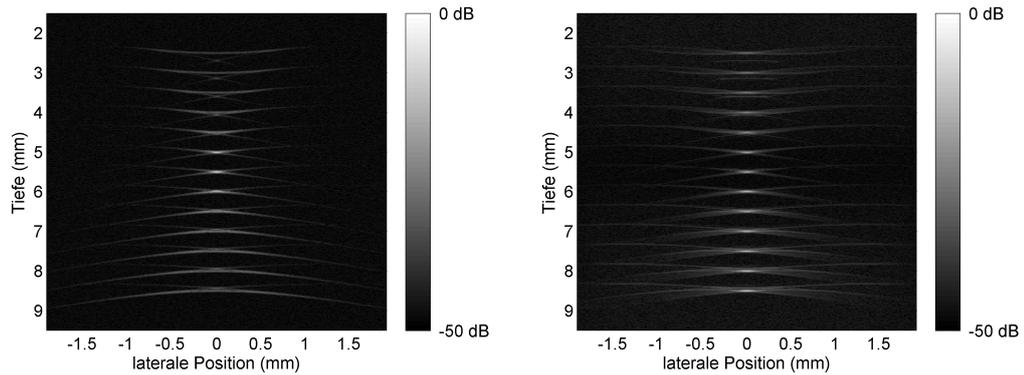
Je nachdem, ob sich die Quelle im Nah- oder im Fernfeld des Ultraschallwandlers befindet, ist der Zeitversatz positiv oder negativ. Für jedes Pixel im rekonstruierten Bild wird das Signal  $S_{SAFT}(t)$  berechnet, indem über eine Apertur aus  $N$  benachbarten Elementen summiert wird. Der Öffnungswinkel des Schallfeldes definiert die Anzahl  $N$  der Elemente, die zur Summenbildung beitragen. Die Variable  $i$  bezeichnet hierbei die  $i$ -te Scanlinie.

$$S_{SAFT}(t) = \sum_{i=0}^{i=N-1} S(i, t - \Delta t_i) \quad (5.6)$$

Zur Evaluierung der Eignung dieses Algorithmus wurden Phantomdatensätze erzeugt und basierend auf dieser Rechenvorschrift rekonstruiert. Als optische Absorber dienten in diesem digitalen Phantom  $7 \mu m$  kleine Kugeln, welche sich in einem axialen Abstand von  $500 \mu m$  befanden. Der zuvor beschriebene  $35 MHz$  PZT Wandler, welcher im *in-vivo* System eingesetzt wird, detektierte die optoakustisch erzeugten Druckwellen. Idealerweise sollten sie im Querschnittsbild als kreisrunde helle Absorber entlang der Mittelachse erscheinen. Zur verbesserten Darstellung wurden die Bilddaten zusätzlich nach Gleichung 5.7 logarithmisch komprimiert.

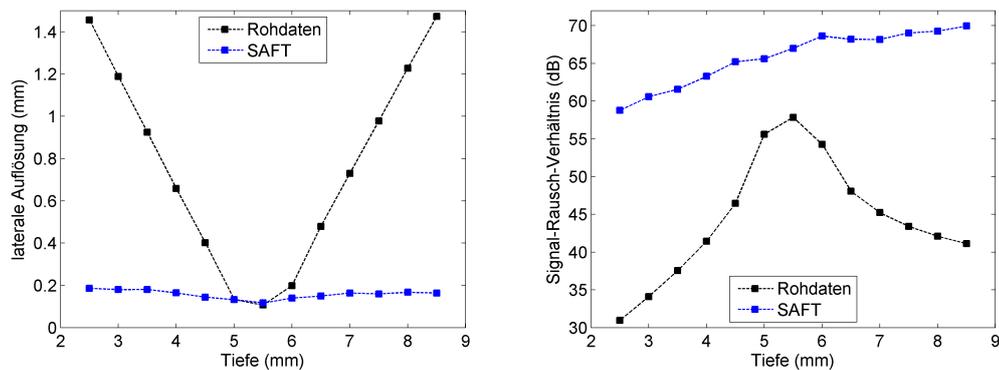
$$S_{combined}(t) = |S(t)| + \max(S(t)) \cdot \frac{\log(|S(t)| + 1)}{\max(\log(|S(t)| + 1))} \quad (5.7)$$

Abbildung 5.4 zeigt ein Querschnittsbild des Phantoms vor und nach der SAFT-Rekonstruktion. Im linken Bild ist deutlich zu erkennen, dass die Absorberstrukturen außerhalb der Fokuszone als sichelförmige Verbreiterung dargestellt werden, was auf die in Gleichung 5.5 berechnete Laufzeitdifferenz zurückzuführen ist. Durch den Einsatz der synthetischen Fokussierungstechnik ist es möglich, die laterale Auflösung in Tiefen



**Abb. 5.4.** B-Bilder eines optoakustischen Phantoms mit in unterschiedlichen Tiefen positionierten sphärischen Absorbieren: (links) Rohdaten, (rechts) SAFT rekonstruiertes Bild

außerhalb des Fokusbereichs des Ultraschallwandlers zu optimieren und die sichelförmigen Verbreiterungen zu reduzieren.



**Abb. 5.5.** Simulation der laterale Auflösung und des Signal-Rausch-Verhältnisses des *in-vivo* Systems vor und nach der SAFT Rekonstruktion

Um die rekonstruktionsbedingte Verbesserung zu quantifizieren ist in der Abbildung 5.5 die laterale Auflösung vor und nach der Rekonstruktion in Abhängigkeit der Tiefe aufgetragen. Dabei definiert die  $-6$  dB Halbwertsbreite des Punktabsorbers die erzielte laterale Auflösung. Sie liegt in Anhängigkeit der Tiefe zwischen  $100$  und  $200$   $\mu m$ . Im Vergleich zu den Rohdaten entspricht dies einer Auflösungsverbesserung im Nah- und Fernfeld etwa um den Faktor sieben. Zusätzlich kann durch die Rekonstruktion das Signal-Rausch-Verhältnis um mehr als  $20$  dB erhöht werden. Bei der SAFT-Rekonstruktion treten allerdings, bedingt durch die sphärische Krümmung des Ultraschallwandlers noch weitere Artefakte auf, welche die Bildqualität negativ beeinflussen [54]. Der Grund dafür sind die auf die Randbereiche der Kalotte auftreffenden Wellenfronten. Besonders deutlich zu erkennen sind diese Bildartefakte bei vergrößerter Betrachtung eines einzelnen Punktabsorbers. Im linken oberen Bild der Abbildung 5.6 ist exemplarisch der am weitesten entfernte Absorber nach der SAFT-Rekonstruktion vergrößert dargestellt. Der helle Bereich in der Bildmitte zeigt den optischen Absorber, welcher von rekonstruktionsbedingten bogenartigen Artefakten umgeben ist. Minimiert werden können diese Artefakte durch eine signalabhängige Gewichtung  $A(i, t)$  der Bilddaten, was in der Literatur unter dem Namen Apodisierung bekannt ist.

### Apodisierung und Kohärenzfaktor

Wird zur Datenaufnahme ein Einzelementwandler genutzt, so können die nach Gleichung 5.6 aufsummierten Signalanteile mit einem vom Öffnungswinkel des akustischen Schallfeldes abhängigen Faktor  $A(i, t)$  multipliziert werden.

$$S_{SAFT}(t) = \sum_{i=0}^{i=N-1} S(i, t - \Delta t_i) A(i, t) \quad (5.8)$$

Mehrere Apodisierungsfunktionen  $A(i, t)$  wurden untersucht und bezüglich ihrer Eignung bewertet. Die Charakteristika dieser Funktionen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Der Faktor  $B(t)$  bezeichnet dabei die  $-6 \text{ dB}$  Breite des Schallfeldes in Abhängigkeit des Abstandes zur Wandleroberfläche.

Apodisierungsfunktion $A(i, t)$	Beschreibung
Heaviside	1, wenn $\frac{-B(t)}{2} < \Delta x < \frac{B(t)}{2}$
Gauß	$\exp\left(\frac{-\ln(2)}{\left(\frac{B(t)}{4}\right)^2} (\Delta x)^2\right)$
Cosinus	$\cos\left(\frac{\pi \Delta x}{B(t)}\right)$
Hamming	$0.54 - 0.46 \cos\left(\frac{2\pi\left(\Delta x + \frac{B(t)}{2}\right)}{B(t)}\right)$

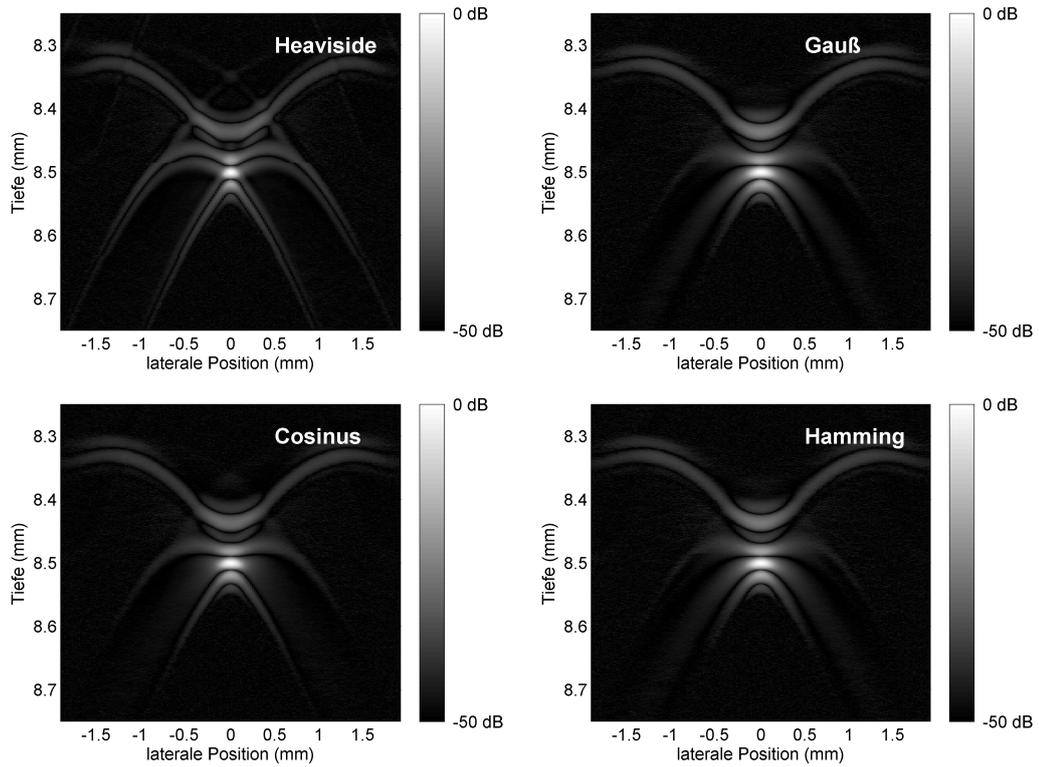
**Tabelle 5.2.** Abstandsabhängige Gewichtungsfunktionen  $A(i, t)$  bei der Rekonstruktion.

Um die Artefaktbildung zusätzlich zu verringern, können die rekonstruierten Bilddaten zusätzlich mit einem ortsabhängigen Kohärenzfaktor gewichtet werden. Bei dieser Methode wird jedem Bildpunkt ein Koeffizient im Wertebereich zwischen 0 und 1 zugeordnet, welcher die Wahrscheinlichkeit darstellt, dass der betrachtete Punkt eine Quelle von kohärenten Schallwellen ist [55]. Der Kohärenzfaktor ist als das Verhältnis der kohärent aufsummierten Empfangssignale zu den inkohärent aufsummierten Empfangssignalen definiert.

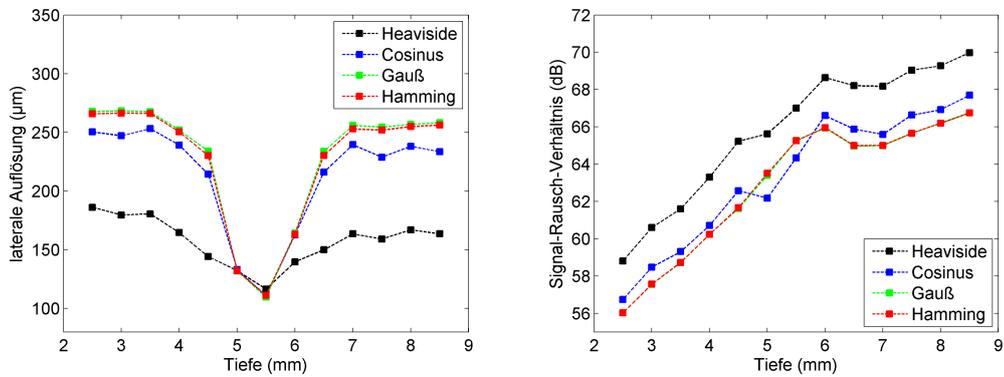
$$C(t) = \frac{|\sum_{i=0}^{i=N-1} S(i, t - \Delta t_i)|^2}{\sum_{i=0}^{i=N-1} |S(i, t - \Delta t_i)|^2} \quad (5.9)$$

Unter Verwendung dieser Apodisierungsfunktionen und des Kohärenzfaktors wurde die im vorangegangenen Abschnitt durchgeführte Rekonstruktion wiederholt. Exemplarisch sind in Abbildung 5.6 die verschiedenen rekonstruierten B-Bilder im Fernfeld des Wandlers in einer Tiefe von  $8,5 \text{ mm}$  aufgezeigt. Zur Bewertung der Eignung der verschiedenen Filterfunktionen wurden die Simulationsergebnisse in Hinblick auf die erzielte laterale Auflösung, das Signal-Rausch-Verhältnis sowie auf Rekonstruktionsartefakte tiefenabhängig ausgewertet (Abbildung 5.7).

Die Heaviside-Apodisierung, welche mit der klassischen SAFT-Rekonstruktion gleichzusetzen ist, erzeugt unabhängig von der Tiefe die Bilder mit der besten lateralen Auflösung und dem besten Signal-Rausch-Verhältnis. Jedoch sind die Bildartefakte im Nah- und Fernfeld im Vergleich zu den anderen Apodisierungsfunktionen ebenfalls am stärksten ausgeprägt. In



**Abb. 5.6.** Rekonstruiertes B-Bild unter Verwendung des Kohärenzfaktors und verschiedenen Apodisierungsfunktionen

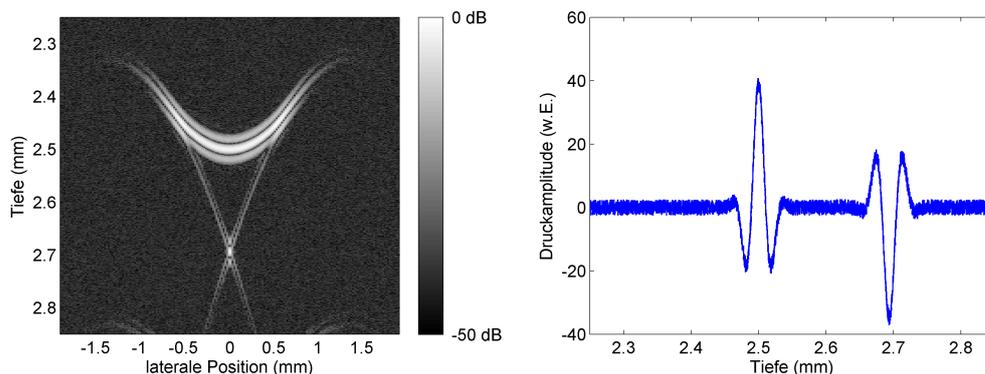


**Abb. 5.7.** Einfluss des Kohärenzfaktors auf die  $-6$  dB Schallfeldbreite und das Signal-Rausch-Verhältnis unter Verwendung verschiedener Apodisierungsfunktionen

Bezug auf die Bildartefakte führen alle anderen Apodisierungen zu einer Verbesserung. Die Ergebnisse der Gauß- und Hamming-Apodisierung sind vergleichbar und erzeugen die Bilder mit der schlechtesten lateralen Auflösung. Die Cosinus-Apodisierung liefert in Bezug auf die PSF, das SRV und die Rekonstruktionsartefakten die besten Ergebnisse. Unabhängig von der Wahl der Apodisierung führen alle untersuchten Gewichtungsfunktionen zu einer deutlich verringerten lateralen Auflösung, sodass sie trotz der geringfügigen Artefaktunterdrückung keine wirkliche Alternative zur konventionellen SAFT-Rekonstruktion bieten.

### 5.2.2 SAFT-Rekonstruktion unter Berücksichtigung der Wandlergeometrie

Im vorangegangenen Abschnitt 5.2.1 konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe der SAFT-Technologie die Bildqualität im Hinblick auf die erzielbare laterale Auflösung und das SRV außerhalb des Fokusbereichs deutlich verbessert. Jedoch bringt diese Art der SAFT-Rekonstruktion den Nachteil mit sich, dass lediglich der senkrecht auf der aktiven Fläche auftreffende Anteil der Druckwelle in die Rekonstruktion einfließt. Da die von der optisch angeregten Absorberstruktur ausgesendeten Wellenfronten aufgrund der unterschiedlichen Wegstrecke zeitversetzt auf die dreidimensionale Wandleroberfläche treffen und sich dort überlagern, führt dies zu sowohl konstruktiven als auch destruktiven Interferenzen. Überlagert man die auf der Oberfläche des Wandlers auftreffenden Wellenfronten unter Berücksichtigung des Phasenwinkels, so stellt man fest, dass vorwiegend der Zentralstrahl sowie die Randbereiche zur Signalgenerierung beitragen. Besonders gut erkennbar ist dieser Effekt in Abbildung 5.8, welche das unrekonstruierte Abbild eines Punktabsoberers im Nahfeld darstellt. Befindet sich der Absorber im Nahfeld, so ist die Entfernung zum Rand des Wandlers größer als der Abstand zum Mittelpunkt der aktiven Fläche. Speziell unterhalb des Scheitelpunktes der sichelförmigen Wellenfront ist ein Bildpunkt mit vergleichbar hoher Signalamplitude zu erkennen, welcher durch die am Rand der Piezokeramik auftreffenden Wellenfront erzeugt wird (Abbildung 5.8 rechts).

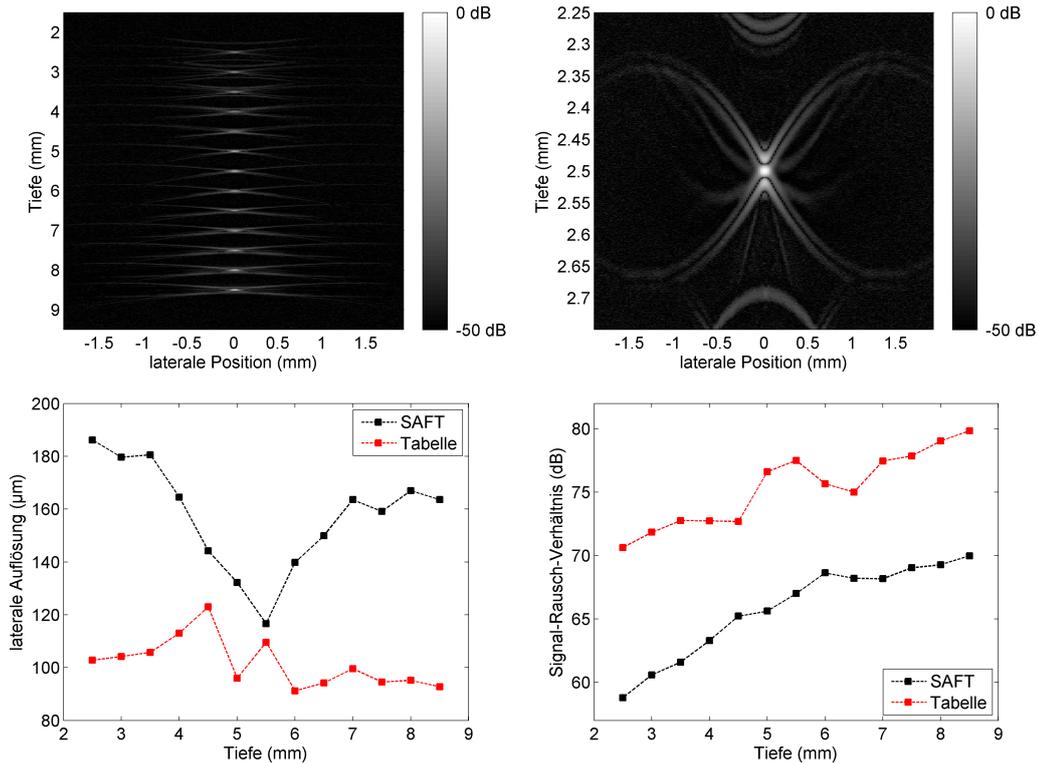


**Abb. 5.8.** B-Bild und A-Scan eines optoakustischen Absorbers im Nahfeld eines fokussierten Ultraschallwandlers

Besonders im Hinblick auf die Optimierung der Auflösung und der Bildqualität eines hochauflösenden optoakustischen Bildgebungssystems muss dieser Effekt bei der Rekonstruktion berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wird nachfolgend ein neuartiger Rekonstruktionsalgorithmus vorgestellt, welcher die Dreidimensionalität des Ultraschallwandlers berücksichtigt.

Dazu wurde für jeden Abstand des optischen Absorbers zur Wandleroberfläche die Punktantwortfunktion berechnet. Als Absorber diente auch in diesem Fall ein  $7 \mu\text{m}$  großer sphärischer Absorber, welcher durch einen infinitesimal kurzen Lichtpuls zum Aussenden akustischer Wellen angeregt wurde. Dieser Absorber strahlt die entstehenden Wellenfronten konzentrisch in alle Raumrichtungen ab, welche von dem in Tabelle 5.1 aufgeführten  $35 \text{ MHz}$  Ultraschallwandler detektiert werden. Dabei erfolgt die Summation der auf den Ultraschallwandler auftreffenden Wellenfronten in Abhängigkeit des Auftreffwinkels

und der Phasenlage. Entsprechend der spektralen Empfindlichkeit des Ultraschallwandlers wird zusätzlich das Summensignal gewichtet und bezüglich Laufzeit und Gesamtamplitude charakterisiert. In einem iterativen Prozess wird die wandlerspezifische PSF für jede Tiefe berechnet und in einer Tabelle abgelegt. Die Kenntnis der tiefenabhängigen PSF ermöglicht eine Optimierung der Summationsvorschrift für die nachfolgenden Rekonstruktionen. Die Signale werden nicht mehr gemäß der Gleichung 5.5 addiert, sondern entsprechend den in der Tabelle gespeicherten tiefenabhängigen und wandlerspezifischen Kennlinien summiert.



**Abb. 5.9.** Rekonstruiertes optoakustisches B-Bild unter Verwendung der optimierten SAFT-Rekonstruktion

Der Einfluss der optimierten SAFT-Rekonstruktion auf die Bildqualität wird in Abbildung 5.9 deutlich. Dabei wurden die im linken Teil der Abbildung 5.4 dargestellten Signale des digitalen Phantoms nochmals unter Berücksichtigung der zuvor berechneten Tabellenwerten rekonstruiert. Exemplarisch ist auch hier wiederum ein vergrößertes Bild des Absorbers in einer Tiefe von  $8,5\text{ mm}$  dargestellt. Es zeigt sich, dass die laterale Auflösung im Vergleich zu den apodisierungs- und kohärenzgewichteten Bildern nochmals verbessert werden konnte. Ebenso findet eine Verringerung der Rekonstruktionsartefakte statt. Im Vergleich zu der konventionellen SAFT-Rekonstruktion kann eine weitere deutliche Verbesserung der lateralen Auflösung erzielt und tiefenunabhängig auf etwa  $100\ \mu\text{m}$  reduziert werden. Die laterale Auflösung im Nah- und Fernfeld ist nach der optimierten SAFT-Rekonstruktion mit der Schallfeldbreite im Fokus vergleichbar. Zusätzlich verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur konventionellen SAFT-Rekonstruktion um mehr als  $10\text{ dB}$ .

In diesem Abschnitt wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, mit Hilfe eines angepassten Rekonstruktionsalgorithmus die durch die Verwendung eines fokussierten akustischen

Detektors auftretenden Bildartefakte zu verringern und die Auflösung zu verbessern. Eine experimentelle Validierung des entwickelten Algorithmus erfolgt in Kapitel 7.2.2.

Wie schon zuvor angedeutet, gehört die Bildgebung von Blutgefäßen zu den vielversprechendsten Anwendungen der Optoakustik. Die präzise Visualisierung und Quantifizierung des menschlichen Gefäßsystems ist eine wichtige Voraussetzung für eine Reihe von klinischen Verfahren wie z. B. Untersuchungen von Erkrankungen der Haut oder die Detektion von arthritischen Entzündungsreaktionen. Mit Hilfe der Optoakustik könnte es möglich sein, ihre Veränderungen während einer Therapie zu überwachen und zu dokumentieren. Im nachfolgenden Abschnitt wird ein Algorithmus vorgestellt, der eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und der größenabhängigen Gefäßsegmentierung zur quantitativen Auswertung zum Ziel hat.

### 5.2.3 Vaskularisierungsfiler

Orkisz et al. [56] stellten eine Methode zur Gefäßverstärkung vor, welche auf einer dreidimensionalen Glättung basiert. Der in dieser Publikation beschriebene Algorithmus errechnet zuerst die lokale Orientierung eines Gefäßes und führt dann eine Glättung in Gefäßrichtung aus, wodurch ein Verwischen der Ränder vermieden wird. Leider ist es mit diesem Ansatz nicht möglich, Gefäße verschiedener Größe zu unterscheiden. Ermöglicht wird dies jedoch durch den multiskaligen Ansatz, welcher im Folgenden diskutiert wird [57][58]. Dabei konzentriert sich die Filterung auf die Suche tubusähnlicher geometrischer Strukturen auf Basis eines Bilddatensatzes. Zur Analyse des lokalen Verhaltens eines Bildes  $B$  wird die Taylorentwicklung in der Umgebung eines Punktes  $\mathbf{x}_0$  betrachtet.

$$B(\mathbf{x}_0 + \delta\mathbf{x}_0, s) \approx B(\mathbf{x}_0, s) + \delta\mathbf{x}_0^T \nabla_{\mathbf{x}_0, s} + \delta\mathbf{x}_0^T H_{\mathbf{x}_0, s} \delta\mathbf{x}_0 \quad (5.10)$$

Dieser Ausdruck approximiert die Struktur des Bildes bis zur zweiten Ordnung. Da der Gefäßdurchmesser in einem bestimmten Größenintervall variiert, wird ein variabler Skalenfaktor  $s$  eingeführt.  $\nabla_{\mathbf{x}_0, s}$  und  $H_{\mathbf{x}_0, s}$  sind der Gradientenvektor und die Hessematrix des Bildes am Ort  $x_0$  bei gegebener Variable  $s$ . Statt der tatsächlichen Berechnung der Differentialoperatoren des Bildes  $B(\mathbf{x}_0, s)$  wird die Ableitung in die jeweilige Raumrichtung durch Faltung mit einer Gaußfunktion approximiert [59].

$$\frac{\partial}{\partial x} B(\mathbf{x}_0, s) = B(\mathbf{x}_0) \otimes \frac{\partial}{\partial x} G(\mathbf{x}_0, s) \quad (5.11)$$

Die D-dimensionale Gaußfunktion ist definiert als

$$G(\mathbf{x}_0, s) = \frac{1}{\sqrt{2\pi s^2}^D} e^{-\frac{|\mathbf{x}|^2}{2s^2}} \quad (5.12)$$

Die Hessematrix gibt die Krümmung des Bildes an und kann ebenso approximativ berechnet werden. Dazu wird die zweite Ableitung der Gaußfunktion berechnet, welche einen Faltungskern erzeugt, wobei der Parameter  $s$  dessen Sensitivität definiert. Der Algorithmus sucht nach Strukturen der Breite  $2s$ , welche einen hohen Kontrast zwischen

dem Innenbereich  $(-s, s)$  und dem Außenbereich haben. Ein Gefäß zeichnet sich dadurch aus, dass sich der Kontrast entlang der Hauptachse nicht ändert, senkrecht dazu jedoch stark. Der Vaskularisierungsfiter basiert also auf der Verwendung von Hessematrizen zum Auffinden von Regionen mit starker Krümmung in eine Raumrichtung und einer geringen Krümmung orthogonal dazu. Die Berechnung der Krümmung in jede Raumrichtung ist rechnerisch sehr aufwendig. Aus diesem Grund werden die Eigenwerte und Eigenvektoren der Hessematrizen pixelweise berechnet. In nachfolgender Gleichung 5.13 bezeichnet  $\lambda_{k,s}$  den Eigenwert entsprechend dem  $k$ -ten normierten Eigenvektor  $u_{k,s}$  der Hessematrix. Aus der Definition der Eigenwerte geht hervor, dass diese folgende Gleichung lösen:

$$H_{\mathbf{x}_0,s} \mathbf{u}_{k,s} = \lambda_{k,s} \mathbf{u}_{k,s} \quad (5.13)$$

Ein Pixel des Bildes gehört zu einer Gefäßstruktur, wenn der kleinste Eigenwert sehr klein und idealerweise null ist und die anderen beiden Eigenwerte einen großen Wert gleichen Vorzeichens besitzen. Allgemein wird über die Hessematrix ein Gleichungssystem beschrieben, dessen Lösungsmenge ein Kegelschnitt ist. Im Falle eines Gefäßes wird diesem Bildpunkt über die Hessematrix eine Ellipse zugeordnet. Die Eigenvektoren und Eigenwerte der Ellipse definieren die Lage und Länge der beiden Halbachsen. Falls ein Eigenwert null, ein anderer aber groß ist, so bedeutet dies, dass eine Halbachse unendlich lang ist, wohingegen die andere einen festen Wert hat. In einem solchen Fall kann die Ellipse durch einen Zylinder approximiert werden. Da dies direkt die Richtung der kleinsten Krümmung und somit die Ausbreitungsrichtung des Gefäßes angibt, kann die Anwendung von mehreren Filtern in mehreren Raumrichtungen vermieden werden. Die Berechnung der lokalen Gefäßausrichtung erfolgt somit über die Eigenwertanalyse der Hessematrix.

In der optoakustischen Bildgebung erscheinen Gefäße als helle röhrenförmige Strukturen in einer dunkleren Hintergrundumgebung. Die Hintergrundpixel haben die Eigenschaft, dass die Größenordnung der Ableitungen und damit die Eigenwerte klein sind. Dieser Sachverhalt wird dazu ausgenutzt, die einzelnen Bildpunkte zu gewichten.

$$A = \sqrt{\sum_{k \leq D} \lambda_k^2} \quad (5.14)$$

Dieser Wert  $A$  nimmt ein Minimum an, wenn keine Gefäßstruktur vorhanden ist. In Regionen mit hohem Kontrast im Vergleich zum Hintergrund wird die Norm größer, da mindestens einer der Eigenwerte groß wird. Bei zweidimensionalen Bildern kann, unter Verwendung der Eigenwerte der Hessematrix, eine rein empirische Funktion definiert werden, welche in Abhängigkeit des Parameters  $s$  jedem Pixel einen Wahrscheinlichkeitswert  $V_{\mathbf{x}_0,s}$  für das Vorhandensein einer Gefäßstruktur zuweist.

$$V_{\mathbf{x}_0,s} = e^{-\frac{R^2}{2\beta^2}} \left( 1 - e^{-\frac{A^2}{2c^2}} \right) \quad (5.15)$$

$\beta$  und  $c$  sind Schwellwerte, die die Empfindlichkeit des Filters beeinflussen und  $R$  ist der Quotient der beiden Eigenwerte  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$ . In den nachfolgenden Berechnungen werden die Variablen  $\beta$  und  $c$  an den Maximalwert des Ausgangsbildes angepasst. Die

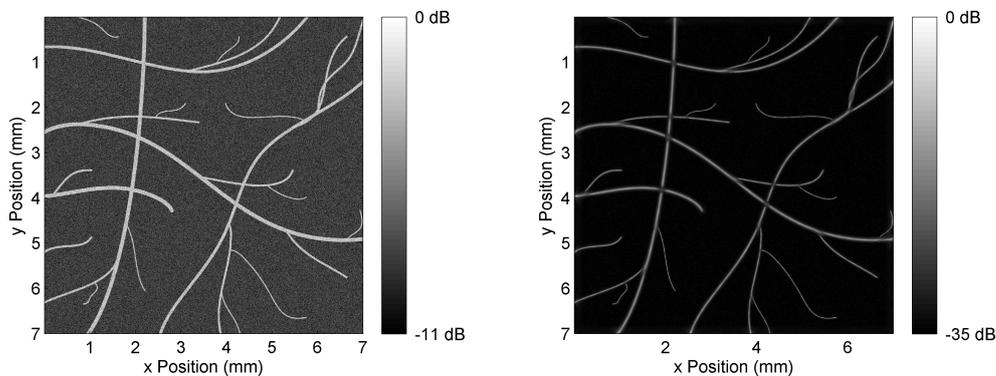
Filterfunktion  $V_{\mathbf{x}_0,s}$  in Gleichung 5.15 wird in Abhängigkeit der Variable  $s$  analysiert. Sie nimmt dabei ihr Maximum an, wenn die Größe der Variablen  $s$  der halben Größe der zu detektierenden Strukturen entspricht. Die erhaltenen Ergebnisse werden als maximale Amplitudenprojektion dargestellt, wodurch ein Bild entsteht, welches die segmentierten Gefäße widerspiegelt. Trägt man zum Maximalwert der Funktion  $V_{\mathbf{x}_0,s}$  den korrespondierenden Parameter  $s$  auf, so kann die Gefäßgröße quantitativ ausgewertet werden.

$$V_{\mathbf{x}_0} = \max_{(-s,s)} V_{\mathbf{x}_0,s} \quad (5.16)$$

Im folgenden Abschnitt wird der vorgestellte Vaskularisierungsfiler in Hinblick auf die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei der Darstellung von Blutgefäßen getestet.

### Evaluierung des Vaskularisierungsfilters am digitalen Phantom

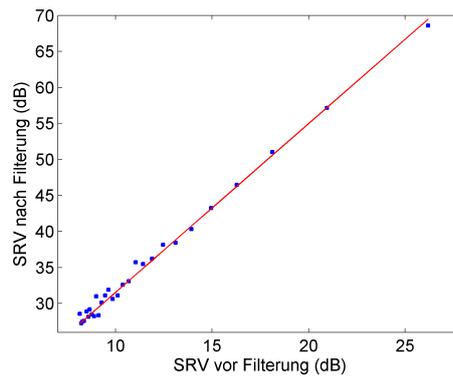
Um die Effizienz des Filteralgorithmus zu charakterisieren wurde ein digitales Phantom verwendet. Dieses besteht aus einer zweidimensionalen Projektion eines Gefäßbaumes, wobei der initiale Signal-Rausch-Verhältnis stufenlos reguliert werden kann. Der Einfluss des Filters auf die Qualität der rekonstruierten Bilder wird in Abbildung 5.10 deutlich. Im Ausgangsbild grenzt sich der Gefäßbaum mit einem SRV von  $-11 \text{ dB}$  vom Hintergrundsignal ab. Nach der Filterung werden die Gefäße mit einem um  $20 \text{ dB}$  erhöhten SRV dargestellt.



**Abb. 5.10.** Simulierte Gefäßstrukturen vor (linkes Bild) und nach der Anwendung (rechtes Bild) des Vaskularisierungsfilters

Trägt man das Signal-Rausch-Verhältnis des Ausgangsbildes gegen das SRV nach der Filterung doppellogarithmisch auf, so ist eine lineare Abhängigkeit zu erkennen (Abbildung 5.11). In Abhängigkeit der Bildqualität des ursprünglichen Bildes steigt das SRV des Ausgangsbildes um mehr als das Doppelte an. Eine solch hohe Bildverbesserung kann jedoch nur erzielt werden, solange der SRV des Ursprungsbildes einen Wert von etwa  $8 \text{ dB}$  übersteigt. Wird dieser unterschritten, ist die Abgrenzung einer Gefäßstruktur durch den Algorithmus nicht mehr möglich.

Der vorgestellte Filteralgorithmus eignet sich sehr gut, den Kontrast der im Projektionsbild befindlichen Gefäße zu verstärken und in Abhängigkeit der Größe zu segmentieren. Er ist



**Abb. 5.11.** Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Verwendung des Vaskularisierungsfilters

jedoch nicht dazu geeignet, autark Gefäße in einem aufgenommenen Volumen zu detektieren. Eine Analyse der Phantomdaten im Vergleich zu echten Messdaten verdeutlicht die Gefahr der Artefaktbildung bei der Rekonstruktion. In dieser Simulation wurde als Phantombild eine ideale Gefäßstruktur verwendet. Die Signalamplitude des Rauschens war stets kleiner als die Amplitude der Gefäße, sodass jeder helle Pixel dem Gefäßbaum zugeordnet werden kann. Im Gegensatz dazu sind bei echten *in-vivo* Messungen oftmals Bildpunkte vorhanden, die sich durch eine hohe Signalamplitude auszeichnen. Durch Anwendung des Algorithmus können diese fälschlicherweise zu einer Gefäßstruktur gehörend identifiziert werden. Als Erweiterung des Filteralgorithmus zur Reduzierung dieser Artefaktbildung ist eine Untersuchung der Nachbarschaft eines jeden Pixels möglich. Im Falle eines Gefäßes liegen die Orte maximaler Rekonstruktionsamplituden entlang einer Linie. Im Falle von Artefakten ist diese Bedingung nicht gegeben, sodass diese Fehlstellen eliminiert werden können.

Der Fokus dieses Kapitels lag auf der Entwicklung und der Evaluierung von neuen Filteralgorithmen zur Verbesserung des SRV optoakustischer Bilder. Die vorgestellten Rekonstruktionsalgorithmen erlauben die tiefenunabhängige Verbesserung der Auflösung des optoakustischen Bildgebungssystems. Bildartefakte bedingt durch die Geometrie des Ultraschallwandlers können durch die SAFT-Rekonstruktion deutlich verringert werden. Des Weiteren wurde ein Filteralgorithmus zur Verbesserung der Sensitivität des Systems bei der Darstellung von Blutgefäßen vorgestellt. Ein Filterverfahren basierend auf der Analyse der Hessematrix des Projektionsbildes kann die Empfindlichkeit des *in-vivo* Systems signifikant verbessern. Im Hinblick auf den Einsatz bei der Darstellung von Blutgefäßen ist dies mit einem bedeutsamen Fortschritt bei der Quantifizierung der Gefäßgrößen verbunden. Beide in diesem Kapitel vorgestellten Rekonstruktionsmethoden werden im Kapitel 7.2 der Arbeit an experimentellen Daten evaluiert.

Eine weitere Möglichkeit, den Kontrast in der optoakustischen Bildgebung zu verbessern, bietet der Einsatz von Kontrastmitteln. In der Optoakustik basiert der Bildkontrast auf Unterschieden zwischen den Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  verschiedener Strukturen. Daher eignen sich Kontrastmittel, welche sich durch einen sehr hohen Absorptionskoeffizienten im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich auszeichnen. Durch ihren gezielten Einsatz kann der natürliche optische Kontrast verstärkt sowie eine Verbesserung der Selektivität

erzielt werden. Im folgenden Kapitel werden verschiedene Kontrastmitteltypen vorgestellt und ihre Eignung als optoakustisches Kontrastmittel diskutiert.

## Kontrastmittel

In Kombination mit geeigneten nanoskaligen biologisch funktionalisierten Kontrastmitteln kann die Optoakustik auch zur molekularen Bildgebung eingesetzt werden. Die molekulare Bildgebung erlaubt es, das Vorkommen von biologischen Markermolekülen *in-vivo* zu visualisieren. Neben der Möglichkeit biologischer Funktionalisierung bieten nanoskalige Partikel Vorteile in Bezug auf die Biodistribution. So können ausreichend kleine Partikel das Gefäßsystem verlassen, Zellmembranen passieren, sich im Zellinneren anlagern und somit gezielt zur Markierung einzelner Zelltypen und Proteingruppen eingesetzt werden.

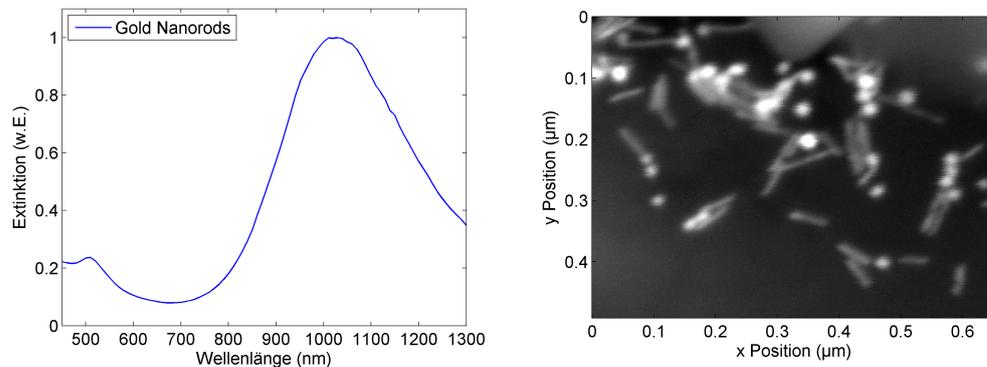
Seitens der Kontrastmittel stehen verschiedene Partikeltypen zur Verfügung. Der für die Eignung als Kontrastmittel relevante Parameter ist der Absorptionskoeffizient. Aufgrund der starken Plasmonenresonanz sind verschiedenartige Goldkolloide die zur Zeit effizientesten optoakustischen Kontrastmittel. Des Weiteren werden derzeit Eisenoxidpartikel sowie farbstoffbeladene polymere Nanopartikel als Kontrastmittel verwendet. Bevor im experimentellen Teil der Arbeit die Wirkungsmechanismen der verwendeten Nanopartikeln *in-vitro* untersucht werden, erfolgt in diesem Kapitel die Charakterisierung der Partikel bezüglich ihres Absorptionsverhaltens.

### 6.1 Plasmonenresonante Partikel

Metallische Nanopartikel zeigen im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich eine starke Absorption durch den Effekt der Plasmonenanregung. Ein Plasmon ist die kollektive kohärente Schwingung aller Leitungsbandelektronen, dem so genannten Elektronengas oder Plasma, gegenüber dem positiven Ionengitter. Die Anregung der Plasmonenschwingung äußert sich in einem stark erhöhten Absorptions- und Streuvermögen bei der entsprechenden Wellenlänge, welche mehrere Größenordnungen über denen eines gleichgroßen Teilchens aus anderen Materialien liegen. Die Resonanzfrequenz dieser Schwingungsmode kann in sphärischen Goldpartikeln von Licht der Wellenlänge  $530\text{ nm}$  angeregt werden. Sie ist jedoch insbesondere von der Form der Partikel abhängig. Bei zylinderförmigen Partikeln, den sogenannten Nanorods, kann die Lage des Absorptionsmaximums über das Verhältnis der Halbachsen variiert werden. Eine Vergrößerung dieses Verhältnisses führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums [60]. Liegt das Absorptionsmaximum im unteren spektralen Bereich des optischen Fensters, so gestaltet sich die Erzeugung optoakustischer

Signale als schwierig. Lediglich kostenintensive und technisch komplexe Lasersysteme sind hierfür nutzbar. Eingesetzt werden derzeit Alexandrit-Laser oder auch Rubin-Laser, welche Licht der Wellenlänge  $755\text{ nm}$  bzw.  $694\text{ nm}$  emittieren. Ebenso werden optisch parametrische Oszillatoren (OPO) eingesetzt, mit deren Hilfe die Wellenlänge des Lichtes in einem weiten Bereich vom sichtbaren bis in den nahen infraroten Spektralbereich variiert werden kann. Im Gegensatz zu diesen kostenintensiven OPO-Systemen sind Nd:YAG Lasersysteme, welche Licht einer Wellenlänge von  $1064\text{ nm}$  emittieren, in der Forschung, Medizin und Industrie sehr weit verbreitet. Sie werden z. B. bei der Behandlung von Hämangiomen oder in der Augenheilkunde eingesetzt. Um diese Laser zur optoakustischen Bildgebung nutzen zu können, müssen die optischen Absorptionseigenschaften der Kontrastmittel derart optimiert werden, dass deren Absorptionsmaximum der emittierten Laserwellenlänge entspricht. Um Gold-Nanorods mit hoher Absorption bei der Wellenlänge des Nd:YAG Lasers zu erhalten, wurden in den letzten Jahren am Fraunhofer IBMT der literaturbekannte zweistufigen Syntheseprozesses optimiert, sodass das spektrale Absorptionsmaximum bis in den nahen infraroten Spektralbereich gezielt eingestellt werden kann [61][62][20].

Bei dieser Synthese werden in einem ersten Schritt kleine Gold-Kolloide einer mittleren Größe von  $2\text{-}4\text{ nm}$  durch die Reduktion von Tetrachloridogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) in Cetyltrimethylammoniumbromid- (CTAB) und Natriumborhydratlösung ( $\text{NaBH}_4$ ) hergestellt. Dabei wirkt die Hinzugabe von CTAB als grenzflächenaktive Substanz [63][64]. In einem zweiten Schritt erhält man die gewünschten Goldstäbchen durch anisotropes Wachstum des Goldkolloids. Die Wachstumslösung besteht aus Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), CTAB, Butyldimethylammoniumchlorid (BDAC),  $\text{HAuCl}_4$  und einer Ascorbinsäurelösung ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ ). Der Wachstumsprozess wird durch die Hinzugabe der Kolloidlösung initiiert.



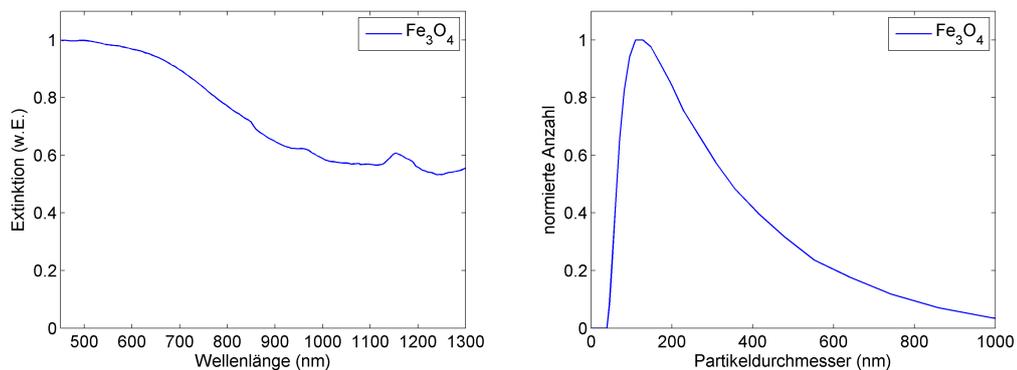
**Abb. 6.1.** Absorptionsspektrum und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der synthetisierten Goldnanorods

In Abbildung 6.1 ist das Spektrum sowie eine an der Universität des Saarlandes durchgeführte rasterelektronische Aufnahme der so gewonnenen Gold-Nanorods gezeigt. Das Halbachsenverhältnis beträgt etwa 6:1 bei einer mittleren Länge von  $60\text{ nm}$ . Da die Absorption der Partikel im Bereich der Lichtemission des Nd:YAG Lasers ihr Maximum erreicht, können diese als Kontrastmittel in den nachfolgenden Experimenten verwendet werden.

## 6.2 Eisenoxidpartikel

Aufgrund der Biokompatibilität von Magnetit-Nanopartikel ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) werden sie in einer Vielzahl von Anwendungen wie Magnet-Resonanz-Bildgebung, Verabreichungssysteme für Arzneimittel, Zellseparation, Biosensorik und Hyperthermie verwendet [65][66][67][68]. Ihre starke magnetische Eigenschaft erlaubt es, sie über die Blutgefäße durch ein externes magnetisches Feld zur gewünschten Position zu lenken [69]. Ebenso wie die Goldpartikel weisen auch sie die Möglichkeit der Funktionalisierung auf. Durch das Ankoppeln spezifischer Antikörper an die magnetischen Partikel ist die verstärkte Anlagerung an Zielstrukturen wie z. B. Tumoren möglich. Die Machbarkeit der kontrastverstärkten optoakustischen molekularen Bildgebung mittels Eisenoxidpartikeln wurde bereits im Kleintierexperiment nachgewiesen [70][71].

Alternativ zur Antikörperkopplung sind in der Literatur verschiedene Beschichtungen der Partikeloberfläche beschrieben, welche die selektive zelluläre Aufnahme der Nanopartikel beschleunigen [72][73]. Diese Beschichtungen umfassen verschiedene funktionelle Moleküle wie z. B. Polyethylenglykol oder Folsäure. Eine Alternative bietet die Anbindung eines positiv geladenen Ions an die Oberfläche der Nanopartikel. Solche Beschichtungen verstärken die Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran, wodurch Nanopartikel angezogen und von der Zelle aufgenommen werden.



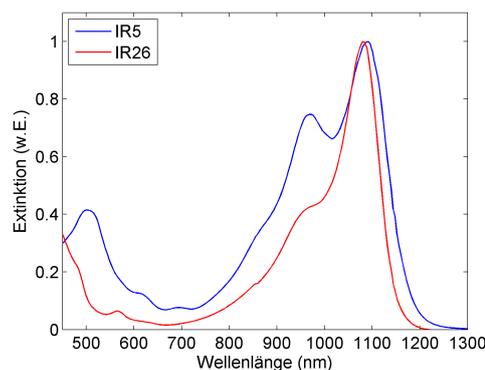
**Abb. 6.2.** Absorptionsspektrum und Größenverteilung der synthetisierten Magnetitpartikel

Daher erfolgte am Fraunhofer IBMT die Synthese oberflächenbeladener Magnetit-Nanopartikel, welche nach der Vorschrift von Osaka et al. durch eine kontrollierte Hydrolyse einer wässrigen Eisenchlorid Lösung und dem Polyamin Spermin synthetisiert wurden [74]. Zur Herstellung wird einer 50 mM Eisenchloridlösung ( $\text{FeCl}_2$ ) tropfenweise eine wässrige Sperminlösung (163 mM) im Verhältnis 3:1 hinzugefügt. Die zunächst dunkelgrüne basische Lösung geht unter kontinuierlichem Rühren in eine trübe schwarze Lösung über. Mit Hilfe eines Magneten wird das entstandene  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  separiert, pH-neutralisiert und mit einer 70 %igen Ethanollösung gewaschen. Die entstandenen Magnetitpartikel werden mittels Zentrifugation separiert und in eine wässrige Phase überführt. Sie zeigen eine sehr breite Absorption bis in den infraroten Spektralbereich, wodurch auch sie sich sehr gut als Kontrastmittel für optoakustische Untersuchungen bei einer Laseranregung von 1064 nm eignen (Abbildung 6.2). Eine Größenverteilung der Nanopartikel wurde mit der Technik der

dynamischen Lichtstreuung an der Universität des Saarlandes ermittelt. Abbildung 6.2 zeigt die gemessene Größenverteilung mit einem Maximum bei  $130\text{ nm}$  und einer Halbwertsbreite von etwa  $300\text{ nm}$ . Der Wert des Zeta-Potentials (Zetasizer Nano, Malvern Instruments) wurde in einer Dreifachmessung zu  $10,63 \pm 0,41\text{ mV}$  bestimmt. Dieser Wert belegt, dass eine positive Oberflächenladung vorliegt.

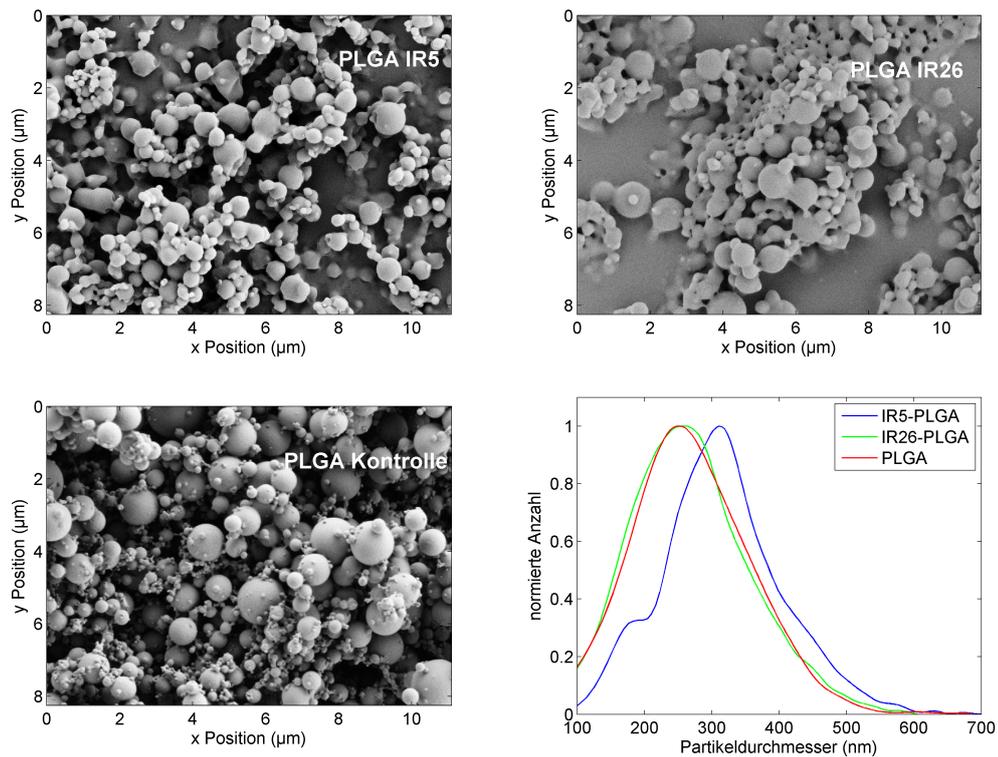
### 6.3 Farbstoffbeladene Polymerpartikel

Ebenso besteht die Möglichkeit, Farbstoffmoleküle als optoakustische Absorber einzusetzen, welche das eingestrahlte Licht effektiv in Wärme umwandeln. In Kooperation mit dem GKSS Forschungszentrum in Teltow wurden im Projekt „POLYSOUND“, durch Verkapselung von geeigneten NIR Farbstoffen in abbaubaren Polymeren, Nanopartikel hergestellt [37]. Bei der Auswahl der Polymerkomponenten werden Bausteine verwendet, deren Bioverträglichkeit bereits nachgewiesen wurde. Daher dient das resorbierbare Copolymer Polylaktid-co-glykolid (PLGA) als polymere Trägermatrix für die Nanopartikel [75][76][77]. Die bisher angewandten Herstellungsverfahren beruhen auf der Verkapselung des NIR-Farbstoffes Indocyaningrün (ICG) in bioverträgliches Polymermaterial als Trägermatrix [78][79]. Indocyaningrün ist ein wasserlöslicher, klinisch zugelassener Farbstoff, der eine starke Absorption um  $800\text{ nm}$  aufweist und als Indikatorsubstanz bei Herz-, Kreislauf-, Leber- und Augenerkrankungen eingesetzt wird [80][81][82]. Um das Absorptionsmaximum weiter ins nahe Infrarot zu verschieben, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe IR5 und IR26 (Radiant Dyes Laser & Accessories GmbH, Wermelskirchen) auf deren Eignung als optoakustisches Kontrastmittel untersucht. Beide Farbstoffe besitzen hohe Absorptionseigenschaften im Wellenlängenbereich zwischen  $950$  und  $1100\text{ nm}$  (Abbildung 6.3).



**Abb. 6.3.** Absorptionsspektren der beiden Farbstoffe IR5 und IR26

Für die Verkapselung der Farbstoffe kristallisierte sich die Sprühtrocknung als Methode der Wahl heraus [83][84][85]. Im Sprühprozess wird Dichlormethan eingesetzt, das sowohl für PLGA als auch für beide Farbstoffe ein gutes Lösungsmittel ist. Diese organische Polymer-Farbstofflösung verdampft durch Einsprühen unter hohem Druck in heißer Luft, wodurch sich feste partikuläre Bestandteile abscheiden, welche durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Die Partikelgröße kann durch gezielte Variation der Prozessparameter wie Polymerkonzentration, Zulauftrate der Polymerlösung und Sprühdruck gesteuert werden.



**Abb. 6.4.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der synthetisierten, farbstoffbeladenen Polymerpartikel vor Fraktionierung und Größenverteilung nach Separation [37][86][87]

Durch Optimierung der Prozessparameter in der Sprühtrocknung konnten sphärische Partikel im Größenbereich von  $100\text{ nm}$  bis  $1\text{ }\mu\text{m}$  hergestellt werden (Abbildung 6.4). Die sphärischen Partikel zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Größenverteilung zwischen farbstoffbeladenen und -unbeladenen PLGA-Partikeln, welche als Kontrollpartikel dienen. Für die geplanten Anwendungen in der Optoakustik werden die sprühtrockneten, hydrophoben PLGA-Polymerpartikel zunächst durch eine Ultraschallbehandlung in wässriger Emulgatorlösung (1% PVA) in eine stabile Suspension überführt. Die im Sprühtrocknungsprozess ebenfalls gebildeten Mikropartikel können in einem Fraktionierungsprozess abgetrennt werden. Dazu werden größere Partikel und unvollständig dispergiertes Polymermaterial durch Zentrifugieren im Bereich geringer Drehzahlen ( $1000\text{ U/min}$ ) abgeschieden. Durch Zentrifugieren des Überstandes im Bereich höherer Drehzahlen ( $8500\text{ U/min}$ ) können kleinere Partikelfractionen erhalten werden, die nur noch einen geringen Anteil an Mikropartikeln enthalten (Abbildung 6.4). Beide Farbstoffe sind unter den Prozessbedingungen der Sprühtrocknung stabil. Ein Vergleich der Absorptionsspektren der reinen Farbstoffe IR5 und IR26 mit den Kurvenverläufen der in Chloroform gelösten Partikel zeigt keinen signifikanten Unterschied. Somit konnte die Herstellung resorbierbarer, farbstoffbeladener Polymerpartikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa  $250\text{ nm}$  unter Einsatz der Sprühtrocknung und anschließender Fraktionierung reproduzierbar realisiert werden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Nanopartikel zeichnen sich alle durch eine hohe Absorption im nahen infraroten Spektralbereich aus, was aufgrund der in den Systemen verfügbaren Laserwellenlängen von  $1064\text{ nm}$  Grundvoraussetzung zur Nutzung der Partikel

als optoakustisches Kontrastmittel ist. Ihre optoakustische Effizienz wird im nächsten Kapitel quantifiziert. Dazu werden optoakustische Phantommessungen durchgeführt, um Schwellwerte für die detektierbaren Nanopartikelkonzentrationen zu ermitteln. Für die molekulare optoakustische Bildgebung können solche Partikel zusätzlich mit biologischen Liganden funktionalisiert werden, worauf ebenso nachfolgend eingegangen wird. Zudem werden im nächsten Abschnitt beide Geräteplattformen bezüglich ihrer Abbildungseigenschaften untersucht, bevor Messungen an verschiedenen Zelllinien sowie erste *in-vivo* Untersuchungen am Kleintier und an Probanden durchgeführt werden.

**Experimentelle Ergebnisse**



## Messungen

Im Kapitel 4 wurden zwei unterschiedliche Systeme zur Aufnahme optoakustischer Datensätze bereits vorgestellt. Zur Überprüfung und Evaluierung der Abbildungseigenschaften der bildgebenden Geräte werden zunächst die Punktantwortfunktionen beider Systeme bestimmt. Zur Charakterisierung der optoakustischen Eignung der synthetisierten Nanopartikel werden diese in Phantome eingebettet und die Schwellwerte für detektierbare Partikelkonzentrationen ermittelt. Des Weiteren wird die optoakustische Mikroskopie zur hochaufgelösten Bildgebung verschiedener Zelllinien validiert. Dabei werden Zellen sowohl basierend auf dem intrinsischen Kontrast als auch nach Inkubation mit funktionalisierten Nanopartikeln dargestellt. Außerdem werden *in-vivo* Messungen an humaner Haut zur Abbildung der Mikrovaskularisierung durchgeführt. Zusätzlich werden die in Kapitel 5 beschriebenen Rekonstruktions- und Filteralgorithmen an experimentellen Daten evaluiert.

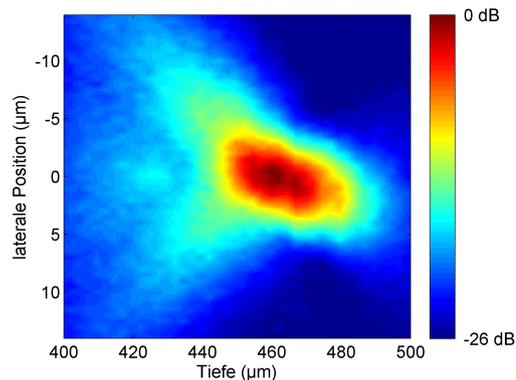
### 7.1 Hochaufgelöste optoakustische *in-vitro* Bildgebung

#### 7.1.1 Charakterisierung des Auflösungsvermögens

Um die Abbildungseigenschaften des *in-vitro* Systems zu charakterisieren, wurden zunächst die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers, die Größe des optischen Fokus sowie die im konfokalen Aufbau erzielbare Auflösung quantifiziert und mit den in Abschnitt 5.1 erzielten Simulationsergebnissen verglichen.

In der Simulation wurde die Quelle der akustischen Druckwellen als punktförmig angenommen. In der Realität ist es jedoch nicht möglich, eine ideale Punktquelle zu erzeugen. Zur Erzeugung breitbandiger akustischer Punktquellen mit Hilfe des optoakustischen Effektes wurden sphärische Partikel eingesetzt, deren Durchmesser wesentlich kleiner als die erreichbare Auflösung des optoakustischen Systems sind. Verglichen mit der Größe des zuvor berechneten Fokusbereichs des Ultraschallwandlers können diese Mikrokügelchen als breitbandige Punktquellen angesehen werden, was den Einfluss der Absorbergröße auf die Messwerte minimiert. In dem experimentellen Aufbau wurden  $1,6 \mu\text{m}$  kleine Goldpartikel in einer Polystyrolmatrix immobilisiert und durch die gepulste optische Anregung zur Aussendung akustischer Schallwellen angeregt. Aufgrund der geringen Partikeldichte war es im konfokalen Modus möglich, lediglich ein einzelnes Partikel optisch anzuregen, sodass es

zu keiner Beeinflussung der Messung durch andere parasitäre optoakustischen Quellen kam. Dieses einzelne Partikel emittierte eine optoakustisch generierte Ultraschallwelle, welche ortsaufgelöst vom Ultraschallwandler detektiert wurde. Die Amplitude des empfangenen Signals und somit die Empfangscharakteristik des Ultraschallwandlers ist als Funktion des Ortes in Abbildung 7.1 dargestellt. Die Werte für die Fokusbreite und Fokusslänge lassen sich aus den Messdaten zu  $7,6 \mu\text{m}$  und  $41,3 \mu\text{m}$  ermitteln. Vergleicht man die in 5.1 errechneten Werte mit der Messung, so zeigt sich, dass die erzielte Auflösung mit  $7,6 \mu\text{m}$  lediglich geringfügig über der theoretisch erzielbaren Auflösung liegt. Auch die gemessene Fokusslänge ist mit  $41,3 \mu\text{m}$  nur unwesentlich größer als der zuvor errechnete Wert (Tabelle 7.1).

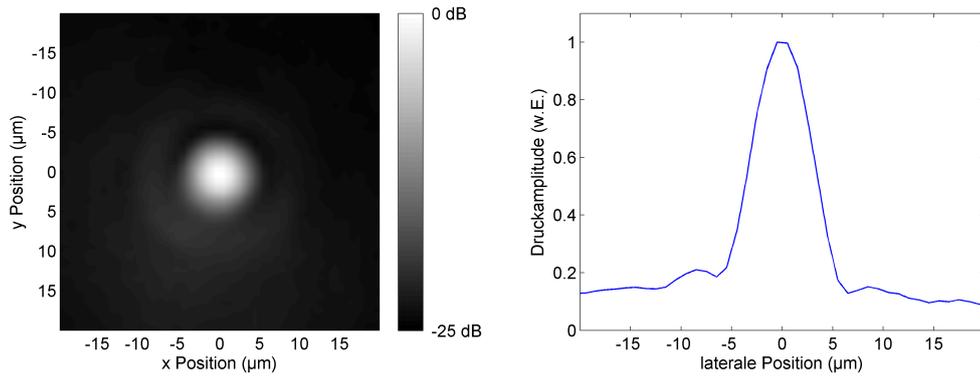


**Abb. 7.1.** Gemessenes optoakustisches Schallfeld der entwickelten  $400 \text{ MHz}$  Saphirlinse

Nicht nur die Auflösung des Ultraschallwandlers selbst, sondern auch die Größe des Beleuchtungsflecks beeinflusst entscheidend die Auflösung des Gesamtsystems. Durch die Verwendung infraroten Lichtes ist die direkte Messung und Quantifizierung der optischen Beleuchtung mittels konventioneller CCD Kameras nur unzureichend möglich, da die Pixelgröße des CCD-Chips in gleicher Größenordnung liegt wie der zu erwartende Lichtfleck. Unter Verwendung eines 10-fach Objektivs mit einer numerischen Apertur von 0,3 und Licht einer Wellenlänge von  $1064 \text{ nm}$  beträgt nach Gleichung 5.1 die Größe der optischen Beleuchtung lediglich  $2,1 \mu\text{m}$ . Vergleicht man diesen Wert mit der Größe des zuvor verwendeten Goldpartikels, so kann auch durch die fokussierte Beleuchtung einer homogen absorbierenden Schicht eine nahezu punktförmige Quelle optoakustischer Signale erzeugt werden.

Um dies experimentell nachzuweisen wurde auf ein Deckglas reinstes Gold homogen abgeschieden. Wird diese Schicht durch einen kurzen Laserpuls angeregt, emittiert sie aufgrund ihrer Dicke von wenigen hundert Nanometern sehr breitbandige optoakustische Signale, welche von der hochfrequenten akustischen Linse detektiert werden können. Die Signalstärke hängt dabei von der lokalen Lichtintensität ab. Mit Hilfe einer Rasterbewegung des akustischen Detektors kann ein ortsaufgelöstes Abbild der Amplitude der erzeugten Drucktransienten generiert werden (Abbildung 7.2).

Die gemessene Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung beträgt  $7,25 \mu\text{m}$ . Vergleicht man die berechneten Werte aus Kapitel 5.1 mit den Ergebnissen beider vorangegangener Messungen, so ist eine klare Übereinstimmung zu erkennen (Tabelle 7.1). Die Abweichungen von



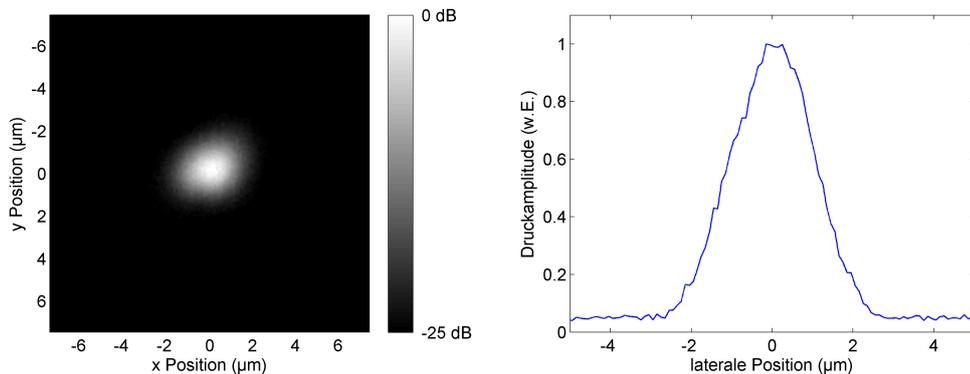
**Abb. 7.2.** Amplitudenprojektion und Querschnittsbild der lokal erzeugten Drucktransienten bei fokussierter optischer Anregung aufgenommen mit dem 400 MHz Ultraschallwandler

Simulation und Experiment sind primär durch die Toleranz bei der Linsenfertigung und der damit verbundenen Abweichung von der idealen Kugelform zu erklären. Anhand der gemessenen Halbwertsbreiten wird deutlich, dass die Größe des optischen Beleuchtungsflecks und der Durchmesser der Goldkugel vergleichbar sind.

ZnO 400 MHz	Halbwertsbreite simuliert	Halbwertsbreite Goldkugel	Halbwertsbreite Lichtfleck
Fokusbreite	6,1 $\mu\text{m}$	7,6 $\mu\text{m}$	7,25 $\mu\text{m}$
Fokuslänge	35,7 $\mu\text{m}$	41,3 $\mu\text{m}$	

**Tabelle 7.1.** Schallfeldkenngrößen der 400 MHz ZnO Ultraschalllinse

Zur Bestimmung der PSF des optoakustischen Mikroskops im konfokalen Modus wurden die zuvor schon erwähnten, in Polystyrol immobilisierten Goldmikrokugeln, optoakustisch vermessen. Nach konfokaler Ausrichtung des optischen und akustischen Fokus wurde die zu untersuchende Probe in einem zweidimensionalen Raster durch das Fokolvolumen bewegt. An jeder Position erfolgte zur Erhöhung des SRV eine 100-fache Mittelung.



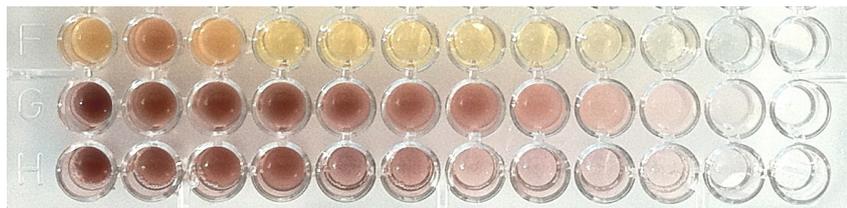
**Abb. 7.3.** Gemessene laterale Punktantwortfunktion (PSF) des Mikroskopiesystems im konfokalen Modus

Durch die zweidimensionale Projektion der lokal gemessenen Signalamplituden ergibt sich ein Projektionsbild des Mikropartikels (Abbildung 7.3 links). Um die erreichbare

laterale Auflösung zu bestimmen, wurde die Halbwertsbreite der Helligkeits- und somit Amplitudenverteilung entlang einer Geraden durch den hellsten Bildpunkt ausgewertet (Abbildung 7.3 rechts). Unter Verwendung des 400 MHz Ultraschallwandlers beträgt die Halbwertsbreite des Amplitudenprofils etwa  $2,5 \mu\text{m}$ , welche mit der lateralen Auflösung des konfokalen Systems gleichzusetzen ist. Somit sind die systemischen Voraussetzungen für die optoakustische Bildgebung auf zellulärer Ebene geschaffen.

### 7.1.2 Charakterisierung von Detektionsschwellen nanopartikulärer Kontrastmittel

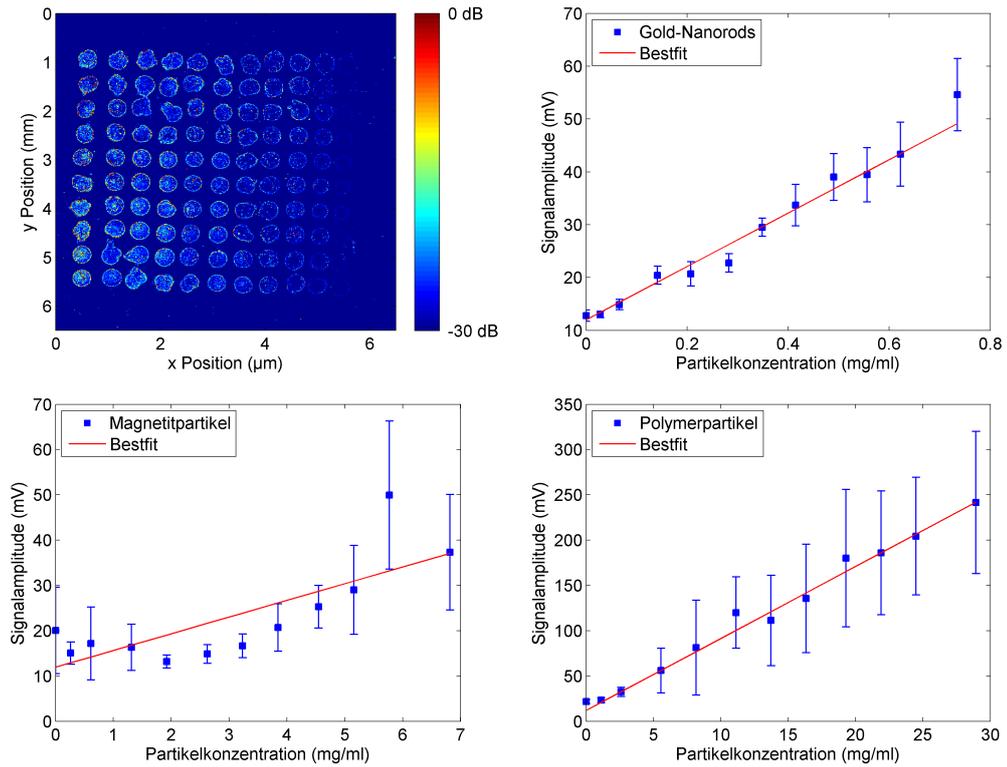
Im Kapitel 6 wurden verschiedene Nanopartikelsysteme vorgestellt (Gold-Nanorods, Magnetit und Polymerpartikel). Sie zeichnen sich alle durch ein Absorptionsmaximum bzw. eine allgemein hohe Absorption im Bereich der Anregungswellenlänge des Nd:YAG Lasers aus. Entscheidender für die Einsetzbarkeit der Partikel als optoakustisches Kontrastmittel ist aber vielmehr die Umwandlungseffizienz des Lichtes in optoakustische Signale. Aus diesem Grund wurden Phantome unterschiedlicher Partikelkonzentrationen hergestellt und mit Hilfe des optoakustischen Mikroskops die Detektionsschwelle für die drei verschiedenen Partikeltypen experimentell untersucht.



**Abb. 7.4.** Optisches Bild der zur Phantomherstellung verwendeten Kontrastmittellösung (von oben nach unten: Magnetitpartikel, IR5-Polymerpartikel, Goldnanorods)

Zur Phantomherstellung wurden die Partikel in unterschiedlicher Konzentration einer am Fraunhofer IBMT hergestellten Alginatlösung zugesetzt (extrahiert aus *Lessonia Nigrescens* und *Lessonia Trabeculata*, 0,5 % in NaCl-Lösung [88]), im Ultraschallbad homogenisiert und in eine 96 Well-Platte pipettiert (Abbildung 7.4). Mittels einer piezoelektrischen Mikropipette (Nanoplotter, GeSiM, Grosserkmannsdorf) gelang es kleine Alginattropfen in regelmäßigem Muster auf einem mit Polylysin beschichteten Deckglas aufzubringen und anschließend mit Bariumchlorid ( $\text{BaCl}_2$ ) zu vernetzen. Dadurch entstand ein schachbrettartiges Muster adhäsiver kontrastmittelbeladener Alginatpunkte absteigender Partikelkonzentration. Zur Bestimmung der Detektionsschwelle der verschiedenen Partikeltypen wurden die optoakustischen Signale der verschiedenen Alginatpunkte aufgenommen und die Signalamplitude in Abhängigkeit der Konzentration ausgewertet. Um die Signale auch bei geringen Konzentrationen auswerten zu können, wurden die Daten 100-fach gemittelt. Die in Graphik 7.5 aufgeführten Werte übertreffen das SRV bei Messungen ohne Mittelung daher um den Faktor von 20 dB.

Um die Effizienz der Signalerzeugung bei der Verwendung verschiedener Partikel miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Umrechnung der Messwerte auf gleiche Massenkonzentrationen. In Abbildung 7.5 sind zu jeder gemessenen Partikelkonzentration die mittlere



**Abb. 7.5.** Vergleich der optoakustischen Eignung verschiedener nanopartikulärer Kontrastmittel

Signalamplitude sowie deren Standardabweichung bei einer verwendeten Pulsenergie von  $160 \text{ nJ}$  im Falle der Gold- und Polymerpartikel und  $800 \text{ nJ}$  im Falle der Magnetitpartikel aufgetragen. Die Steigung der Bestgerade ist ein Indikator für die Effizienz des jeweiligen Kontrastmittels.

Zunächst lässt sich feststellen, dass unabhängig vom Partikeltyp die zur Auswertung notwendigen optoakustischen Signale detektiert werden können. Jedoch verdeutlichen die Ergebnisse des Experiments die großen Unterschiede in der Umwandlungseffizienz von Licht in ein optoakustisches Signal verschiedener Partikeltypen. Um die einzelnen Partikeltypen besser vergleichen zu können sind in Tabelle 7.2 die notwendigen Massenkonzentrationen bei identischer optischer Anregung von  $160 \text{ nJ}$  pro Puls und identischem SRV von  $20 \text{ dB}$  dargestellt.

Konzentration bei SRV=20 dB	Goldnanorods	Polymer IR5	Magnetit
$c_m$ (mg/ml)	2,13	13,58	146,5
$c_n$ (NP/ml)	$2,26 \cdot 10^{13}$	$7,06 \cdot 10^{11}$	$1,96 \cdot 10^{13}$

**Tabelle 7.2.** Vergleich der Effizienz verschiedener Partikelsysteme anhand der experimentell ermittelten Daten. Berechnung der benötigten Massen und Partikelkonzentrationen für ein SRV von  $20 \text{ dB}$

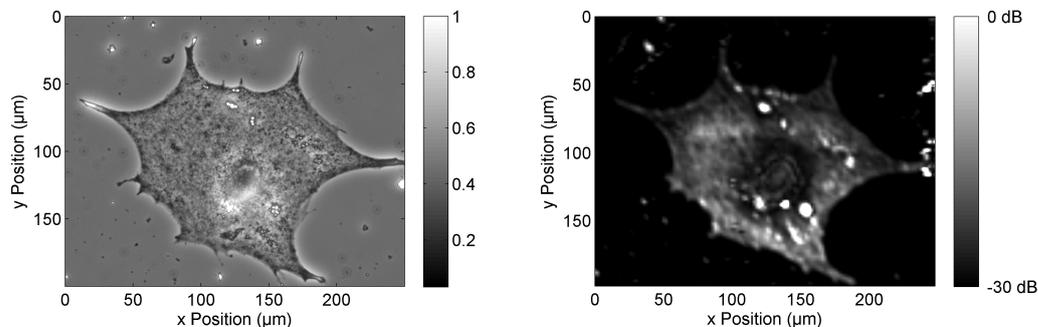
Goldnanorods können schon bei geringer Partikelkonzentration von etwa  $0,1 \text{ mg/ml}$  detektiert werden. Um das gleiche Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, muss die Konzentration an Polymerpartikeln 6-mal höher sein. Magnetitpartikel hingegen zeigen eine

deutlich geringere Effizienz und können erst bei einer 14-fach erhöhten Konzentration und gleichzeitig 5-fach erhöhter Pulsenergie mit vergleichbarem SRV detektiert werden.

Die in Tabelle 7.2 aufgelisteten Messwerte verdeutlichen, dass die benötigte Massenkonzentration bei Magnetitpartikeln und Polymerpartikeln am höchsten ist, um das gewünschte SRV von 20 dB zu erreichen. Zudem bestätigt sich, dass von Seiten der Signalerzeugung die plasmonenresonanten Goldpartikel die effizientesten optoakustischen Kontrastmittel darstellen.

### 7.1.3 Nachweis intrinsischer Zellchromophore

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Aufnahme hochfrequenter optoakustischer Signale nanoskaliger Partikel gezeigt, welche zur selektiven Erhöhung des Kontrasts eingesetzt werden können. Weist die zu untersuchende Probe eine hohe optische Absorption im Bereich des optischen Fensters auf, so kann auf den Einsatz von Kontrastmitteln verzichtet werden. Durch die gezielte Wahl der verwendeten Laserwellenlänge ist es möglich, intrazelluläre Chromophore anzuregen, welche ihrerseits akustische Druckwellen emittieren. Der experimentelle Nachweis gelang durch die Visualisierung einzelner Melanomzellen der Maus (B16F1, ATCC), wobei der Bildkontrast durch die intrazelluläre Melanineinlagerung gegeben war. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter Verwendung des Nährmediums DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit fetalem Kälberserum (FBS) im Verhältnis 9:1. Die Messung erfolgte 48 Stunden nach dem Aussähen der Zellen in der Probenkammer.



**Abb. 7.6.** Optische und optoakustische Visualisierung intrinsischer Chromophore in einer B16F1 *in-vitro* Zellkultur

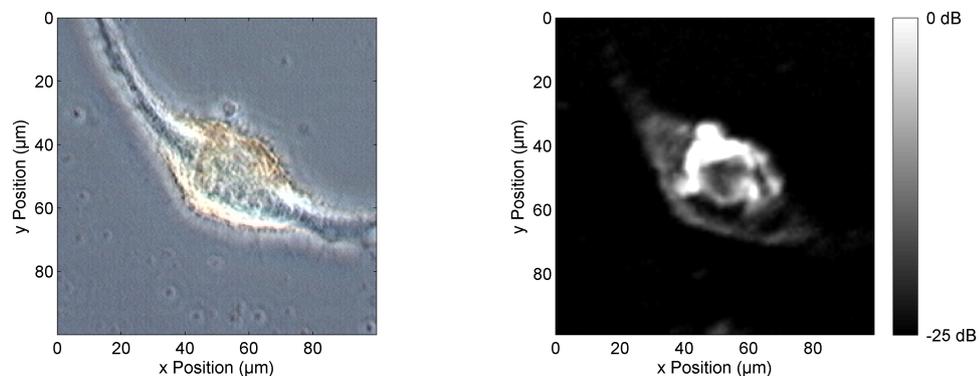
Ein optisches Bild der gemessenen Melanomzelle ist im linken Bereich der Abbildung 7.6 gezeigt. Daneben ist das optoakustische Bild des gleichen Bereichs dargestellt. Im Inneren der Melanomzelle können starke optoakustische Signale nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit den Phasenkontrastbildern bestätigt, dass die Bereiche hoher optoakustischer Signale mit den Orten großer Melanineinlagerungen korrelieren. Allerdings hat nicht jedes detektierte Signal eine offensichtliche strukturelle Korrelation mit der optischen Mikroskopie. Dies kann der Tatsache geschuldet sein, dass neben Melanin andere absorbierende Strukturen innerhalb der Zelle zur Signalerzeugung beitragen, welche im optischen Bild nicht zu sehen

sind. Nachdem die optoakustische Darstellung intrinsischer Chromophore mit subzellulärer Auflösung gezeigt wurde, werden im nächsten Abschnitt Messungen an Zellen nach Inkubation mit Nanopartikeln durchgeführt.

#### 7.1.4 Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikel *in-vitro*

In Abschnitt 7.1.2 wurde gezeigt, dass Goldnanopartikel aufgrund des Effektes der Plasmonenresonanz die effektivsten optoakustischen Kontrastmittel darstellen. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass eine Inkubation der unfunktionalisierten Goldpartikel zu keiner bzw. einer lediglich geringfügigen Aufnahme in die Zelle führen würde, welche mit Hilfe des optoakustischen Mikroskops nicht detektiert werden kann. Aus diesem Grund wurde in dem nachfolgend beschriebenen Experiment die Bindung der in Kapitel 6.2 hergestellten Magnetitpartikel an einer Zelllinie optoakustisch untersucht, welche aufgrund ihrer positiven Oberflächenladung verstärkt aufgenommen werden.

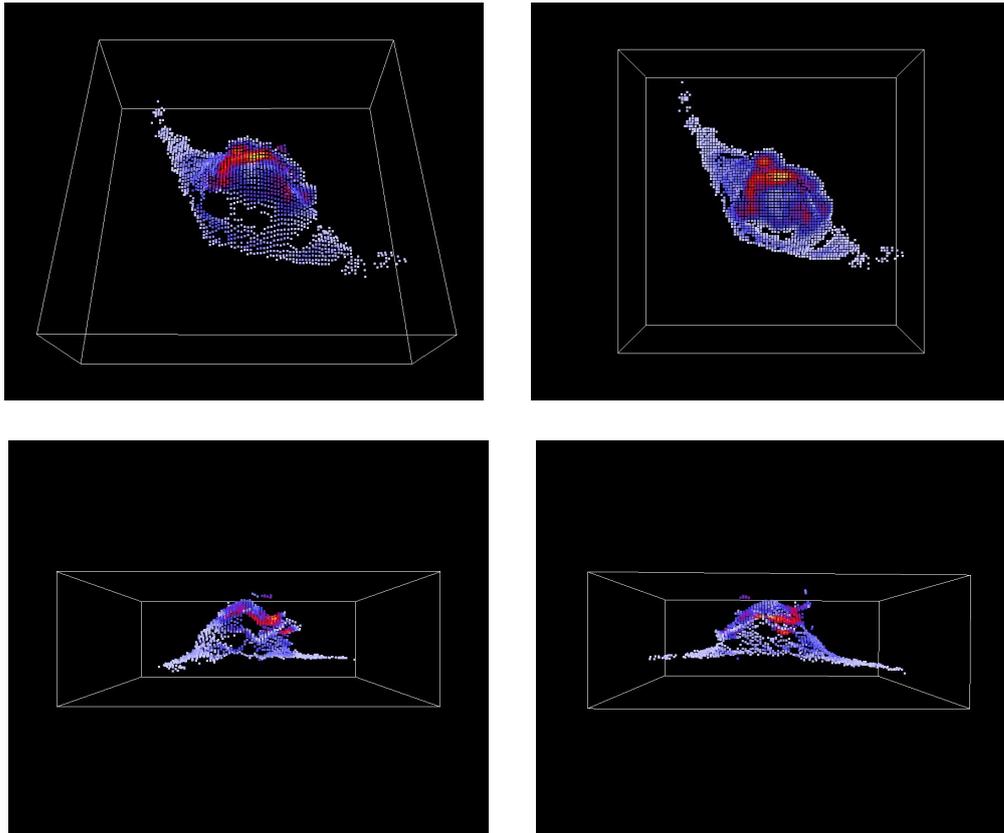
Dazu wurden humane Lungenkrebszellen (A549) einer Konzentration von 20.000 Zellen pro *ml* Nährmedium im Kulturgefäß ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit einem Gemisch aus Nährmedium und Spermin-modifizierten Magnetit-Nanopartikeln einer Partikelkonzentration von 2 *mg/ml* versetzt und über weitere 24 Stunden inkubiert. Im Vergleich dazu dienten Zellen ohne Nanopartikelzugabe als Kontrolle, welche unter gleichen Randbedingungen inkubiert wurden. Um überschüssige Partikel zu entfernen wurden die Zellen vor der Messung dreimal mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen.



**Abb. 7.7.** Optische und optoakustische Visualisierung der Anlagerung von Magnetit-Nanopartikeln an humanen Lungenkrebszellen

Abbildung 7.7 zeigt ein Phasenkontrastbild sowie ein optoakustisches Bild einer einzelnen magnetitbeladenen Zelle. Im Falle der unbehandelten Kontrollzellen liegen die erzeugten Signale unterhalb des Rauschpegels des Mikroskopiesystems und können nicht detektiert werden. Bedingt durch die positive Oberflächenladung der Partikel kommt es zu einer Anhaftung der Partikel an der Zelle. Diese Bindung der Magnetitpartikel führt zu einer lokalen Verstärkung des optoakustischen Kontrastes. Trägt man die Signalamplitude gegen den Ort auf, so erhält man ein Projektionsbild der Zelle, dessen Grauskalierung die lokale Partikeldichte darstellt. Gerade im Bereich des Zellkerns ist die Partikeldichte wesentlich

höher als an den Randbereichen der Zellmembran. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Magnetit-Nanopartikel an humanen Lungenkrebszellen anlagern, jedoch kann durch diese Art der Visualisierung keine Aussage über die Internalisierung der Partikel getroffen werden. Basierend auf der Laufzeitanalyse der Schallwelle vom Ort der Erzeugung zum Ultraschallwandler kann bei bekannter Schallgeschwindigkeit des Koppelmediums der Abstand zum Ultraschallwandler berechnet werden. Somit können die Daten, wie in nachstehender Abbildung 7.8 gezeigt, dreidimensional dargestellt werden.



**Abb. 7.8.** Dreidimensionale Rekonstruktion einer kontrastmittelbeladenen Zelle basierend auf der Laufzeit der Schallwellen

Die dreidimensionale Auswertung der Daten belegt, dass im Falle der Magnetitpartikel diese in der Mehrzahl nicht von der Lungenkrebszelle aufgenommen werden, sondern vielmehr an der Oberfläche der Zellmembran haften. Für eine Bindung mit höherer Spezifität müssen Nanopartikel eingesetzt werden, die durch Kopplung mit Antikörpern oder Peptiden eine Bindung an definierten Zelltypen ermöglichen. Dies wird im Folgenden am Beispiel der Gold-Nanostäbchen gezeigt.

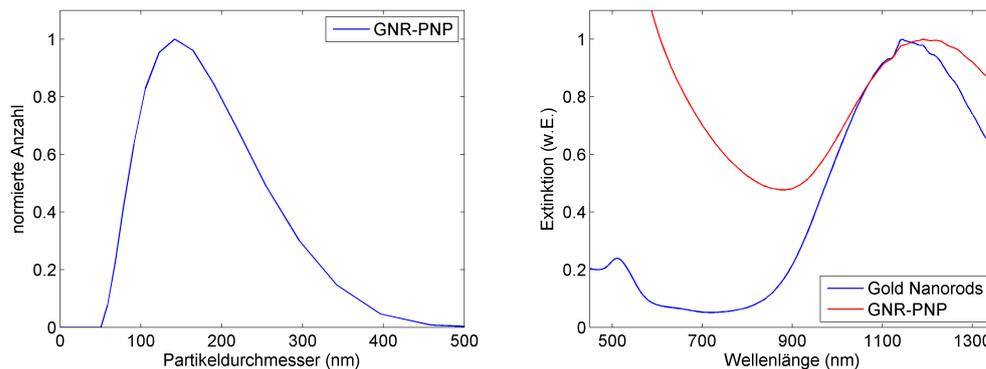
#### 7.1.5 Nachweis funktionalisierter Gold-Nanopartikel *in-vitro*

Neben den Vorteilen in Bezug auf die allgemeine Erhöhung der Signalamplitude bieten Kontrastmittel auch die Möglichkeit zur Steigerung der Selektivität der Bildgebung. Die aktiven Targeting-Strategien nutzen hochspezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

aus. Dies wird nachfolgend am Beispiel einer Gehirntumorzelllinie gezeigt. Glioblastome sind die häufigsten, schwersten und meist tödlich verlaufenden Formen von Hirntumoren [89]. Untersuchungen in der Molekularbiologie haben ergeben, dass Chlorid-Ionenkanäle zahlreich in Glioblastom-Zelllinien exprimiert werden, welche jedoch in normalem Hirngewebe nicht vorkommen. Um Goldnanopartikel gezielt an diese Zelllinie zu koppeln, werden sie mit dem Peptid Chlorotoxin versehen. Chlorotoxin ist ein 36-Aminosäuren-Peptid, welches ursprünglich aus Skorpiongift (*Leiurus quinquestriatus*) isoliert wurde. Untersuchungen haben gezeigt, dass Chlorotoxin eine hohe Spezifität für die Bindung an Gliomzellen besitzt [90]. Durch die Bindung an den Gliom-spezifischen Chlorid-Ionenkanal ist Chlorotoxin ein mögliches Therapeutikum gegen Gliome. Um diese Bindung optoakustisch nachzuweisen, wurden als Kontrastmittel die in Kapitel 6 vorgestellten Gold-Nanorods modifiziert und das Bindungsverhalten auf zellulärer Ebene nachgewiesen.

Die Oberflächenfunktionalisierung der am Fraunhofer IBMT hergestellten Partikel wurde von der Arbeitsgruppe um Mauro Comes Franchini an der Universität von Bologna in einem zwei-Phasen-Prozess durchgeführt [91][92]. Der erste Transferschritt zielte auf die Gewinnung CTAB-freier Goldnanorods ab, um die biologische Verträglichkeit durch das Entfernen der CTAB-Oberflächenbeschichtung zu verbessern. In einer Ligandenaustauschreaktion wurden die oberflächenbindenden Tenside in wässriger Alkohollösung durch Thiole ersetzt. Dazu wurden Goldnanorods mit Thiolliganden in 20-fachem molarem Überschuss in einer 50 %igen Ethanolösung über 24 Stunden bei 20°C inkubiert. Die hohe Löslichkeit von CTAB in Ethanol und die hohe chemische Affinität zwischen Gold und den Thiolgruppen begünstigte diese Reaktion. Um die gewünschte Wasserlöslichkeit für medizinische Anwendungen zu erreichen, wurden in einem zweiten Transferschritt die Partikel in eine Polymermatrix eingebettet [93]. Dazu wurde PLGA-PEG-COOH (PLGA 7 kDa, PEG 3 kDa) zusammen mit den thiolierten Partikeln in Dichlormethan aufgenommen und über eine Dauer von 2 Minuten mit einem Ultraschallgerät emulgiert. Dabei kam es unter Ausnutzung des hydrophoben PLGA's zu einem Einschluss der Goldnanorods in das Polymer. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck durchliefen die so erhaltenen Gold-Polymer-Nanopartikel (GNR-PNP) mehrere Reinigungszyklen. Durch Waschen mit Reinstwasser und anschließender Sterilfiltration (Porendurchmesser 200 nm) wurden große Partikelagglomerate zurückgehalten. Danach erfolgte die Modifikation der Partikel mit dem Peptid Chlorotoxin. Abschließend wurde die für die anschließenden biologischen Messungen benötigte Partikelkonzentration mittels Zentrifugation eingestellt.

Nach erfolgreicher Funktionalisierung wurden die Partikel hinsichtlich ihrer Größe und ihres Absorptionsspektrums charakterisiert. Wie in Abbildung 7.9 zu sehen beträgt der mittlere Durchmesser des hergestellten Kontrastmittels 140 nm. Die relevanten Absorptionseigenschaften der Goldnanorods bleiben auch nach Einbettung in die Polymermatrix erhalten. Die geringfügige Rotverschiebung des Absorptionsmaximums ist auf die Änderungen des Brechungsindex des umgebenden Mediums von Wasser zu Polymer zurückzuführen. Des Weiteren ist ein starker Anstieg der Extinktion im Bereich kleinerer Wellenlängen zu verzeichnen. Ausschlaggebend dafür ist die Einbettung der Goldpartikel in die Polymermatrix, wodurch sich der mittlere Durchmesser der Partikel vergrößert. Durch diese Vergrößerung kommt es zu einer erhöhten Streuung der elektromagnetischen Wellen.



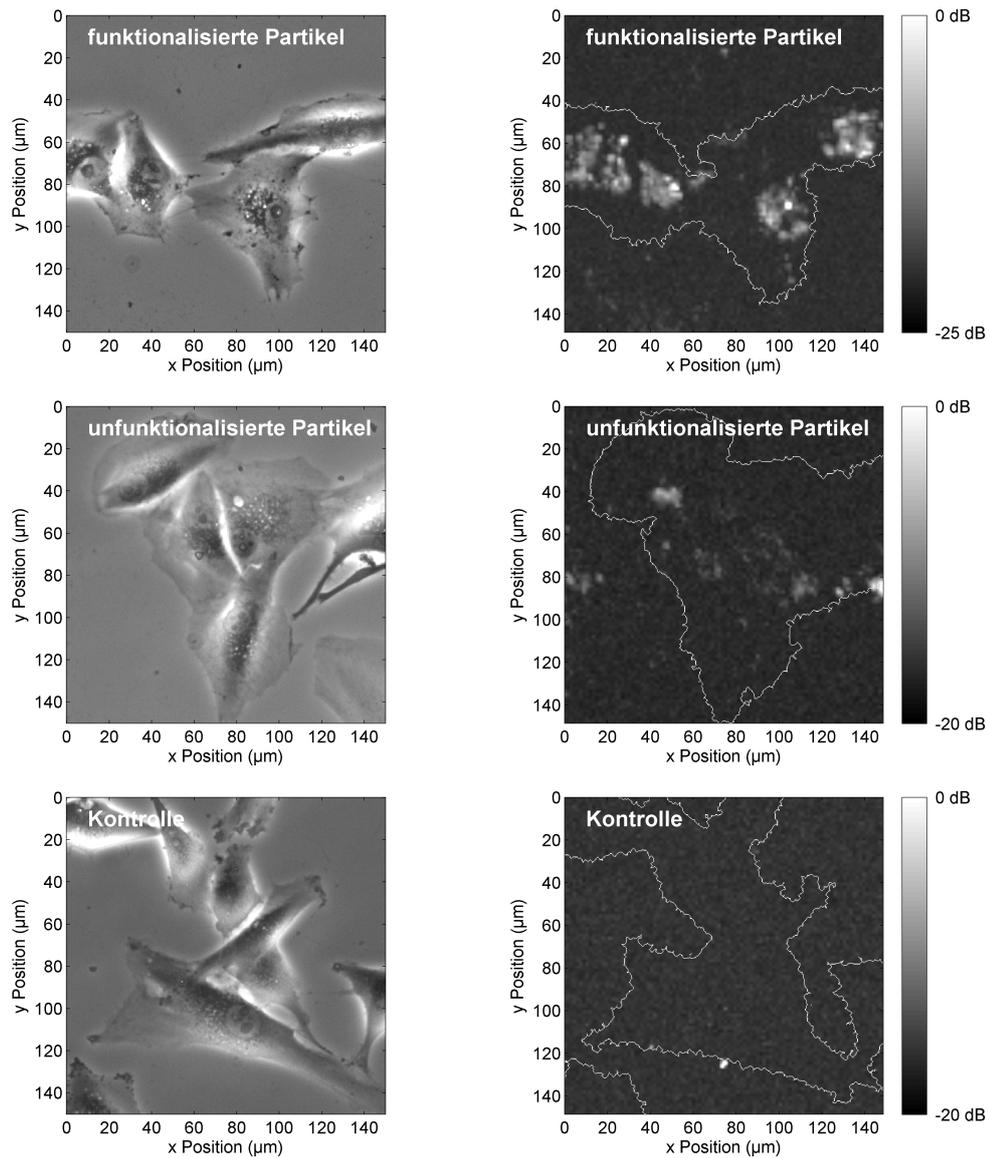
**Abb. 7.9.** Größenverteilung und Absorptionsspektrum der Goldnanorods nach der Einbettung in die Polymermatrix

Das lokale Absorptionsmaximum liegt jedoch weiterhin im nahen infraroten Spektralbereich, wodurch die Anregung mittels eines Nd:YAG Lasers weiterhin möglich ist.

Zur Validierung der hochauflösten optoakustischen molekularen Bildgebung wurden *in-vitro* Versuche zur zielgerichteten Aufnahme des konjugierten Partikelsystems an der humanen Glioblastom-Zelllinie U87MG durchgeführt. In diesem Experiment wurden U87MG Zellen in einer Konzentration von 40.000 *Zellen/ml* ausgesät und unter physiologischen Bedingungen kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach dem Anwachsen der Zellen erfolgte die Zugabe von Goldnanopartikel einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ . Nach 24 stündiger Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Zellen zweimal gewaschen, um die nichtgebundenen Partikel zu entfernen. Die Zugabe von partikelfreiem Medium zu den Zellen gewährleistete die akustische Kopplung. Unbehandelte Zellen einerseits und unfunktionalisierte GNR-PNP andererseits dienten als Kontrolle.

In der linken Spalte der Abbildung 7.10 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der untersuchten Bereiche gezeigt. Rechts daneben ist jeweils die Anhäufung und Verteilung von Chlorotoxin konjugierter Gold Nanopartikel an den U87MG Zellen mit Hilfe der konfokalen optoakustischen Mikroskopie visualisiert. Um die Orte der Signalentstehung mit den optischen Bildern besser vergleichen zu können, sind in den optoakustischen Bildern die Silhouetten der Zellen als weiße Linien überlagert. Ein Vergleich der Bilder zeigt eine deutlich erhöhte Signalamplitude nach Inkubation mit den Chlorotoxin funktionalisierten Partikeln im Vergleich zu den unfunktionalisierten Partikeln. Im Falle der Kontrollzellen ist kein optoakustisches Signal zu verzeichnen. Um die spezifische Bindung der modifizierten Partikel zu quantifizieren, können die optoakustischen Signalamplituden als Histogramm dargestellt werden (Abbildung 7.11).

Ein Vergleich beider Histogramme zeigt deutlich, dass im Falle der funktionalisierten Partikel die mittlere Signalamplitude im Vergleich zu den unfunktionalisierten Partikeln erhöht ist. Bedingt durch die Bindung der Partikel und der daraus resultierenden verstärkten optoakustischen Signalgenerierung, zeigen mehrere Bildpunkte eine erhöhte Signalamplitude. Die Kontrollzellen zeigen keine optoakustischen Signale, sodass diese als optische Absorber ausgeschlossen werden können. Wie zu erwarten ist die Aufnahme der funktionalisierten Partikel wesentlich höher als die der Kontrollpartikel. Vergleicht man die mittlere Amplitude, so stellt man fest, dass bei zellulärer Aufnahme der mit Chlorotoxin



**Abb. 7.10.** Optische (links) und optoakustische Visualisierung (rechts) der spezifischen Bindung Chlorotoxin modifizierter Goldnanopartikel an einer U87MG *in-vitro* Zellkultur

beladenen Partikel diese etwa um  $20\text{ dB}$  gegenüber den Kontrollpartikeln erhöht ist. Folglich ermöglicht eine Funktionalisierung durch das Peptid Chlorotoxin eine selektive Bindung der Kontrastmittel an definierte Zelltypen.

In diesem Kapitel wurden die Abbildungseigenschaften der entwickelten Mikroskopieplattform charakterisiert und die Eignung des Systems zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen der Nanopartikel an lebenden Zellen gezeigt. Nachdem die Leistungsdaten der Mikroskopieplattform analysiert und Experimente auf zellulärer Ebene durchgeführt wurden, wird im nächsten Abschnitt das Auflösungsvermögen des *in-vivo* Bildgebungssystems charakterisiert.

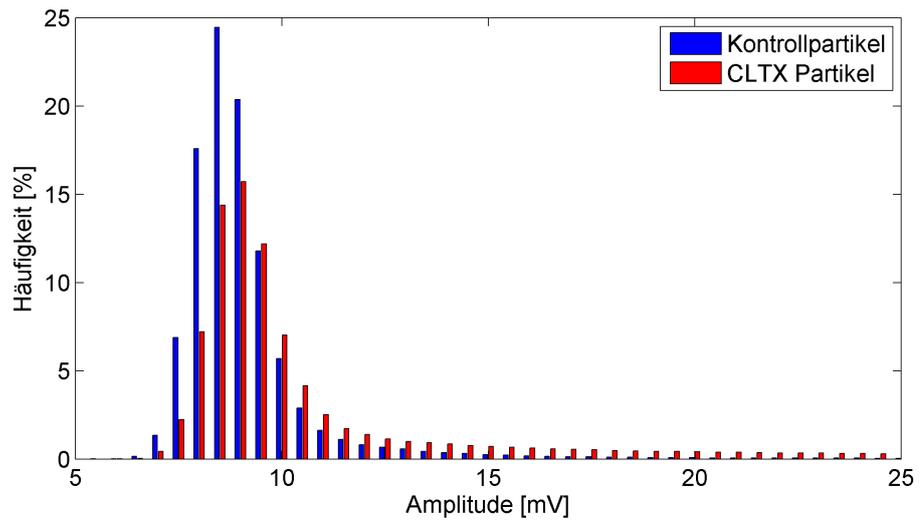


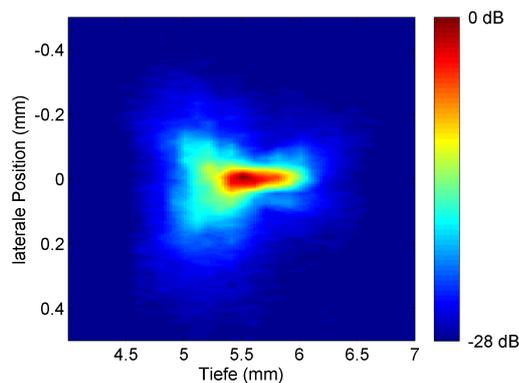
Abb. 7.11. Quantitative Auswertung der selektiven Zellbindung funktionalisierter Goldnanopartikel

## 7.2 Hochauflösende optoakustische *in-vivo* Bildgebung

Im Kapitel 4.2 wurde das entwickelte System zur Aufnahme von optoakustischen Signalen vorgestellt, dessen Einsatzgebiet die *in-vivo* optoakustische Bildgebung an humaner Haut ist. Bevor jedoch dieses System zur Aufnahme von *in-vivo* Daten in der Praxis eingesetzt wird, werden analog zur mikroskopischen Plattform die PSF zwecks Charakterisierung der Auflösung bestimmt. Weiterhin werden die Abbildungstreue und die Effizienz der in Abschnitt 5.2 beschriebenen Rekonstruktionsalgorithmen an experimentellen Daten überprüft. Zuletzt wird die Eignung des Gerätes zur quantitativen Bestimmung des Vaskularisierungsgrades sowie zur Untersuchung von Hautveränderungen getestet.

### 7.2.1 Charakterisierung des Auflösungsvermögens

Um die Ergebnisse der Schallfeldsimulation aus Kapitel 5.1 zu verifizieren, wurde das Schallfeld des Ultraschallwandlers experimentell vermessen. Zur bestmöglichen Übertragung der Ergebnisse auf den späteren Einsatz an humaner Haut wurde als Koppelmedium eine Mischung aus Intralipidlösung und Wasser verwendet, welches die optischen Streueigenschaften von humanem Gewebe nachahmt [94]. Als Absorber diente eine einzelne  $7\ \mu\text{m}$  Kohlenstofffaser, welche das emittierte Licht absorbierte und in ein breitbandiges optoakustisches Signal umwandelte. Die Bewegung des Ultraschallwandlers erfolgte senkrecht zur Faser und die entstehenden akustischen Signale wurden in einem Bereich von  $1\ \text{mm} \times 3\ \text{mm}$  um den Fokuspunkt des Ultraschallwandlers aufgenommen. Unter Verwendung einer maximalen Amplitudenprojektion wurden die detektierten Signale auf den Spitzenwert normiert, um die relative Empfindlichkeit in der Bildebene darzustellen.



**Abb. 7.12.** Gemessenes Schallfeld des optoakustischen *in-vivo* Messsystems

Abbildung 7.12 zeigt die gemessene Punktantwort des Systems im optoakustischen Modus. Die laterale Halbwertsbreite der PSF beträgt im Fokus  $94,2\ \mu\text{m}$  und die axiale Fokusslänge  $848,4\ \mu\text{m}$ . Vergleicht man die Ergebnisse der Messungen mit denen der Simulation in Kapitel 5.1, so zeigt sich im Bereich der lateralen Fokussbreite eine gute Übereinstimmung. Der gemessene Wert von  $94,2\ \mu\text{m}$  liegt nur geringfügig unterhalb des theoretischen Wertes von  $107,9\ \mu\text{m}$ . Die Diskrepanz zwischen der Theorie und den tatsächlich gemessenen Werten ist wie auch bei der hochfrequenten Saphirlinse in den fertigungsbedingten Toleranzen

und den damit verbundenen Abweichungen von der Kugelform sowie dem angenommenen Öffnungswinkel zu sehen. Größere Unterschiede sind jedoch in der Fokuslänge zu verzeichnen (Tabelle 7.3).

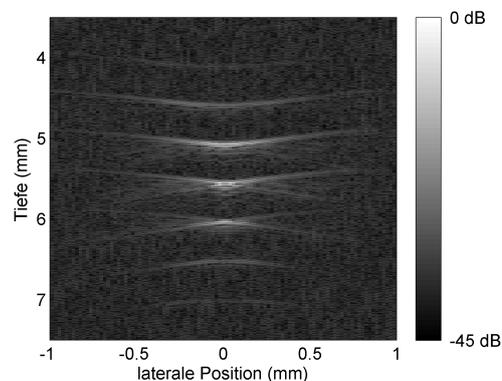
PZT 35 MHz	Halbwertsbreite simuliert	Halbwertsbreite gemessen
Fokusbreite	107,9 $\mu m$	94,2 $\mu m$
Fokuslänge	2400 $\mu m$	848,4 $\mu m$

**Tabelle 7.3.** Schallfeldkenngrößen des 35 MHz PZT Wandlers im optoakustischen Modus im Vergleich zu den berechneten Werten des Kapitels 5.1

Der Grund dafür ist die konzentrische Anordnung der Lichtfasern um den Ultraschallwandler. Durch diese Art der seitlichen Beleuchtung stimmt zwar der Ort maximaler Lichtintensität mit dem Bereich maximaler Sensitivität des Ultraschallwandlers überein, jedoch nimmt aufgrund der optischen Streuung der Probe die Lichtintensität im Nah- und Fernfeld des Ultraschallwandlers stark ab. Diese verringerte Lichtintensität außerhalb des Fokusbereichs ist zur Erzeugung detektierbarer thermoelastischer Drucktransienten nicht ausreichend. Aus diesem Grunde ist die gemessene im Vergleich zu der berechneten optoakustischen Fokuslänge um mehr als einen Faktor zwei kleiner. Die Verkürzung des Fokusbereichs schlägt sich in einer reduzierten Tiefenschärfe nieder, was jedoch bei den zu untersuchenden oberflächennahen Strukturen wie z. B. Blutgefäßen keinen störenden Einfluss hat.

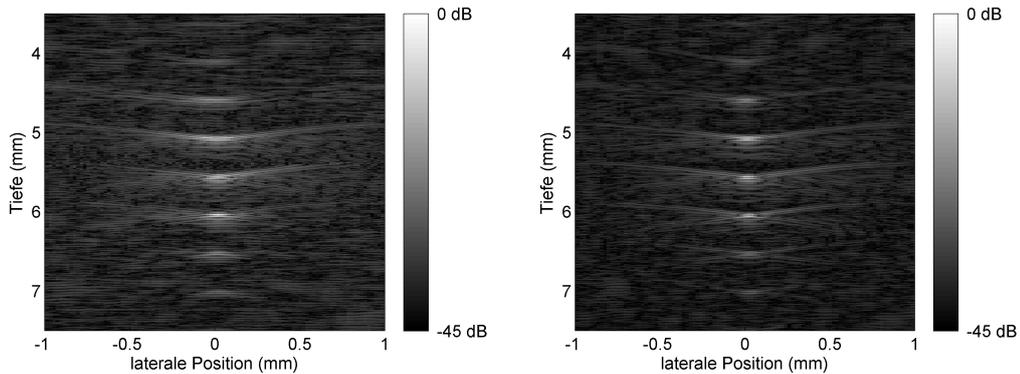
## 7.2.2 Experimentelle Validierung der SAFT-Rekonstruktion

Anhand synthetischer Daten konnte durch den Einsatz der vorgestellten SAFT-Rekonstruktionsalgorithmen bereits gezeigt werden, dass die erzielbare laterale Auflösung im Bereich von etwa 100  $\mu m$  liegt. Zur experimentellen Validierung des Verfahrens wurden mehrere Messungen mit der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen 7  $\mu m$  Kohlenstofffaser als Absorber in verschiedenen Abständen durchgeführt und nachträglich zu einem einzigen Bild überlagert.



**Abb. 7.13.** Unrekonstruiertes optoakustisches Querschnittsbild eines Fadenphantoms

Abbildung 7.13 zeigt das unrekonstruierte Querschnittsbild aus acht Kohlenstofffasern, welche senkrecht zur Scanebene im Abstand von  $500 \mu\text{m}$  angeordnet sind. Die schon im theoretischen Teil beschriebenen, typischen bogenförmigen Verbreiterungen des PunktabSORBERS mit unterschiedlicher Krümmung im Nah- und Fernfeld des Wandlers, sind auch experimentell zu finden. Jede helle gebogene Linie entspricht somit dem tiefenabhängigen Querschnittsbild einer einzelnen Faser. Das geringe SRV des Bildes außerhalb der Fokuszzone ist der Tatsache geschuldet, dass die Strahlungsdichte der Laserstrahlung aufgrund der Einstrahlungsgeometrie im Nah- und Fernfeld des Ultraschallwandlers gering ist, was zur Erzeugung von Drucktransienten mit einer geringen Amplitude führt (vgl. Abschnitt 7.2.1). Zudem trägt im Fernfeld die Dämpfung der Schallwelle im Wasser zur Verringerung der Signalamplitude bei. Die Rekonstruktion erfolgte analog zu den beiden in Kapitel 5.2 vorgestellten Methoden. Es wurde zum einen die klassische SAFT-Technologie verwendet, zum anderen aber auch die aufgrund der dreidimensionalen Ausdehnung des Ultraschallwandlers berechneten Rekonstruktionstabelle. Beide rekonstruierten Bilder sind in nachstehender Abbildung 7.14 dargestellt.



**Abb. 7.14.** Optoakustischer B-Scan von Punktquellen in unterschiedlichen Tiefen zwischen  $3,5 \text{ mm}$  und  $8 \text{ mm}$  im Abstand von  $500 \mu\text{m}$  nach der klassischen (links) und erweiterter SAFT-Rekonstruktion (rechts)

Die quantitative Auswertung der Bilder ermöglicht einen Vergleich der PSF und des SRV nach Anwendung der Rekonstruktionsalgorithmen (Abbildung 7.15). Obwohl die Signale der absorbierenden Fäden, die sich weit außerhalb der Fokuszzone des Wandlers befinden, mit einem SRV von nur etwa  $16 \text{ dB}$  aufgenommen wurden, konnte das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Anwendung der SAFT-Rekonstruktion mit zusätzlicher Kohärenzgewichtung um  $12 \text{ dB}$  erhöht werden. Durch die Anwendung der erweiterten SAFT-Rekonstruktion, welche die Geometrie des Wandlers berücksichtigt, kann eine Erhöhung des Kontrastes um  $20 \text{ dB}$  auf insgesamt  $36 \text{ dB}$  erreicht werden.

Außerdem erlaubt der Algorithmus, Strukturen in Regionen außerhalb der Fokuszzone des Wandlers mit verbesserter lateraler Auflösung darzustellen. In Abbildung 7.15 ist dazu die PSF in Abhängigkeit der Tiefe aufgetragen. Beide Algorithmen führen zu einer tiefenunabhängigen Verbesserung der lateralen Auflösung, wobei auch hier die Rekonstruktion unter Berücksichtigung der gesamten Wandlergeometrie die besten Ergebnisse liefert. Vergleicht man die experimentell gewonnenen Ergebnisse mit den zuvor numerisch berechneten Werten (Abbildung 5.9), so ist eine gute Übereinstimmung zu erkennen. Durch Verwendung des

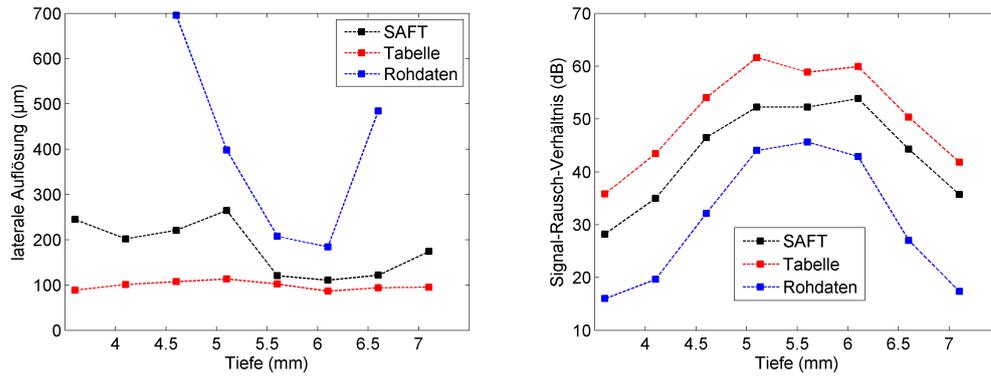


Abb. 7.15. Vergleich beider SAFT Rekonstruktionsalgorithmen anhand von gemessenen Phantomdaten. Die Auflösung und das Signal-Rausch-Verhältnis sind in Abhängigkeit der Tiefe aufgetragen

optimierten Rekonstruktionsalgorithmus kann auch experimentell eine tiefenunabhängige Auflösung von etwa  $100 \mu m$  erzielt werden. Lediglich im Fernfeld des Ultraschallwandlers weicht das gemessene SRV von der Theorie ab, was ebenfalls auf die Einstrahlgeometrie und die im Fernfeld geringere Lichtintensität zurückzuführen ist. Nach der Validierung des Algorithmus am Phantom wird in Kapitel 7.2.5 die rekonstruktionsbedingte Verbesserung der Bildqualität an einem *in-vivo* Datensatz gezeigt.

### 7.2.3 Charakterisierung von Detektionsschwellen nanopartikulärer Kontrastmittel

Analog zu den Messungen in Kapitel 7.1.2 wurden die gleichen, mit Nanopartikeln beladenen, Alginatproben untersucht um die Sensitivität des Systems in Bezug auf die Detektion von Nanopartikeln zu bestimmen. Zu jeder gemessenen Partikelkonzentration wurden die mittlere Signalamplitude sowie die Standardabweichung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Grafik 7.16 dargestellt.

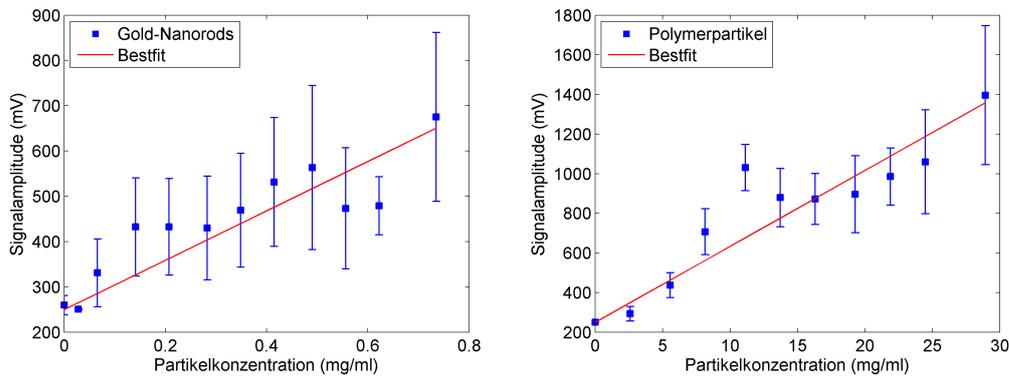


Abb. 7.16. Vergleich der optoakustischen Eignung verschiedener nanopartikulärer Kontrastmittel

Wie schon bei der mikroskopischen Messung festgestellt, ist die Effizienz der Magnetitpartikel gegenüber den anderen Kontrastmitteln am geringsten. Trotz 50-facher Mittelung liegt die Signalamplitude der Magnetitpartikel unterhalb des Rauschpegels, sodass eine

quantitative Auswertung nicht möglich ist. Bei den Gold- wie auch Polymerpartikeln ist dies nicht der Fall. Die Signalamplitude liegt über dem Rauschpegel und kann auch bei kleinen Partikelkonzentrationen ausgewertet werden. Für beide Partikeltypen kann ein linearer Zusammenhang zwischen Signalamplitude und Massenkonzentration festgestellt werden. Analog zu den Ergebnissen der mikroskopischen Messung sind in der Tabelle 7.4 die notwendigen Massenkonzentrationen bei identischem SRV von 20 dB zusammengefasst. Es bestätigt sich, dass die Goldpartikel im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Partikeltypen die effizientesten Kontrastmittel sind. Um das gleiche Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, muss die Massenkonzentration an Polymerpartikel 14-mal höher sein.

Konzentration bei SRV=20 dB	Goldnanorods	Polymer IR5
$c_m$ (mg/ml)	4,12	58,74
$c_n$ (NP/ml)	$4,37 \cdot 10^{13}$	$3,06 \cdot 10^{12}$

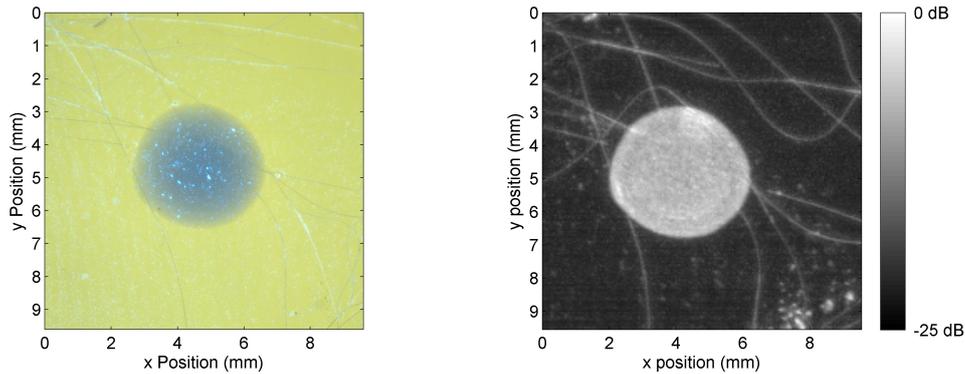
**Tabelle 7.4.** Vergleich der Effizienz verschiedener Partikelsysteme im *in-vivo* System

Legt man die experimentell ermittelten Werte bezüglich der Sensitivität beider Systeme und des kontrastverstärkenden Potentials der Gold-Nanopartikel zugrunde, so lässt sich anhand der Messergebnisse und unter verschiedenen Annahmen die zur *in-vivo* Diagnostik am Menschen notwendige Menge an Goldpartikeln abschätzen. In Kapitel 7.1.5 erfolgte der Nachweis funktionalisierter Gold-Nanopartikel am Zellsystem. Anhand der erzielten Signalamplitude und der zuvor bestimmten Sensitivität des Bildgebungssystems kann auf die in der Zelle vorherrschende Partikelkonzentration von etwa 0,5 mg/ml geschlossen werden. Legt man diesen Wert den nachfolgenden Abschätzungen zugrunde, so kann die mittlere Anzahl an Partikeln pro Tumor berechnet werden. Geht man davon aus, dass im Falle eines Tumors alle Zellen die gleiche Anzahl an Partikeln aufnehmen, so würden an einem Tumor einer Größe von 1 mm<sup>3</sup> etwa 0,5 µg Partikel binden, woraus sich nach Abbildung 7.16 eine Kontrastverstärkung von etwa 6 dB ergibt. Bei intravenöser Verabreichung der Partikel wird ein Großteil der Partikel von der Leber herausgefiltert und nur ein Bruchteil gelangt bis zum Tumor. Unter der vereinfachten Annahme, dass sich 90% der Partikel in der Leber anreichern, und lediglich 30% der Restpartikel an den Tumorzellen binden, so sind dem Patienten etwa 18 µg an funktionalisierten Partikeln zu injizieren. Die Endkonzentration der synthetisierten Partikel beträgt etwa 900 µg/ml, sodass nach dieser Abschätzung ein Volumen von 20 µl der Partikelsuspension zur intravenösen Injektion und somit zur Diagnostik ausreichen würde.

#### 7.2.4 Phantommessungen zur Evaluierung der Abbildungstreue

Zur Demonstration der Nutzbarkeit des hochauflösenden Systems zur optoakustischen Bildgebung von Melanomen wurden Phantome mit definierten optischen und akustischen Eigenschaften hergestellt. Verschiedene Materialien wurden für diesen Zweck untersucht und Phantome aus Agar-Agar, Alginat, Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylchlorid-Plastisol (PVCP) gefertigt. In Vorversuchen zeigte sich, dass PVCP für die Verwendung als

Phantommaterial am besten geeignet ist. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass die optischen und akustischen Eigenschaften durch Zugabe von Farbstoffen oder akustisch Streupartikel angepasst werden können und dadurch ein realitätsnahes Abbild einer Hautveränderung hergestellt werden kann. Zusätzlich weist PVCP, verglichen mit den anderen Phantommaterialien, eine höhere Stabilität auf. Abbildung 7.17 zeigt ein optisches Bild des hergestellten Melanomphantoms eingebettet in ein PVCP basiertes gewebesimulierendes trübes Medium.



**Abb. 7.17.** Optisches (links) und optoakustisches Projektionsbild (rechts) eines melanomähnlichen PVCP-Phantoms bestehend aus  $7\ \mu\text{m}$  Kohlenstofffasern,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Mikropartikeln und schwarzer Plastikfarbe

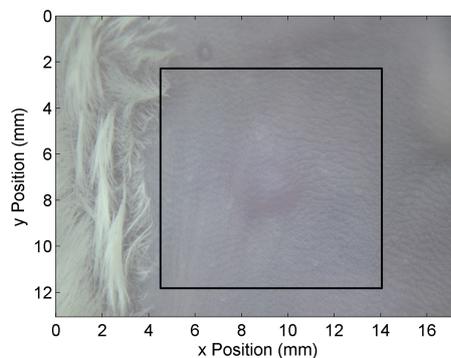
PVCP Phantome werden durch Erhitzen der Flüssigkeit PVCP erzeugt. Die anfänglich trübe Flüssigkeit klart auf, sobald eine Temperatur von  $200^\circ\text{C}$  erreicht ist. Die Flüssigkeit wird in hitzebeständige Formen gegeben und erstarrt beim Abkühlen auf Raumtemperatur. Zur Fertigung eines melanomähnlichen Phantoms wurden kleine kugelförmige Strukturen aus PVCP hergestellt, in denen zusätzlich Aluminiumoxidpartikel ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) einer mittleren Größe von  $9\ \mu\text{m}$  zur Erhöhung der akustischen Streuung beigemischt wurden. Die zusätzliche Zugabe einer geringen Menge schwarzer Kunststofffarbe erhöhte zudem die optische Absorption und soll die Pigmentierung der Hautveränderung nachbilden. Danach erfolgte die Einbettung dieser Kugeln in eine PVCP-Matrix, welche ihrerseits ebenfalls durch die Zugabe einer geringen Menge an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Partikeln die generierten Schallwellen in Analogie zu biologischem Gewebe streut. Zusätzlich wurden dem Phantom Kohlenstofffasern mit einem Durchmesser von  $7\ \mu\text{m}$  zugegeben, welche ein Adergeflecht nachahmen sollen. Die Ergebnisse der optoakustischen Untersuchung des Phantoms sind als Amplitudenprojektion in Abbildung 7.17 grafisch dargestellt. Die dunkle kreisrunde Struktur in der Fotografie kann aufgrund der erhöhten optischen Absorption mit hohem Kontrast vom umgebenden Material unterschieden werden. Die Signale der einzelnen  $7\ \mu\text{m}$  Kohlenstofffasern können mit hohem SRV detektiert werden, da sie das einfallende Licht in großem Maße absorbieren.

Die vorangegangenen Experimente an Phantomen haben gezeigt, dass stark absorbierende Strukturen mit hoher Auflösung und hohem SRV optoakustisch abgebildet werden können. Nachfolgend werden Untersuchungen der Haut und subkutaner Tumore unter natürlichen physiologischen *in-vivo* Bedingungen durchgeführt.

### 7.2.5 Erste *in-vivo* Untersuchungen eines subkutanen Tumors

Eine Anwendungsmöglichkeit der optoakustischen Technologie liegt in der präklinischen Forschung, in der Methoden für die hochaufgelöste Kleintierbildgebung notwendig sind. Ein möglicher Einsatz liegt dabei in der onkologischen Forschung, bei der unter anderem die Gefäßversorgung von Tumoren untersucht wird. Die Quantifizierung von Tumor- und Gefäßgröße ist eine zentrale klinische Fragestellung, die sich bei Diagnose, Therapieplanung und Therapiekontrolle ergibt.

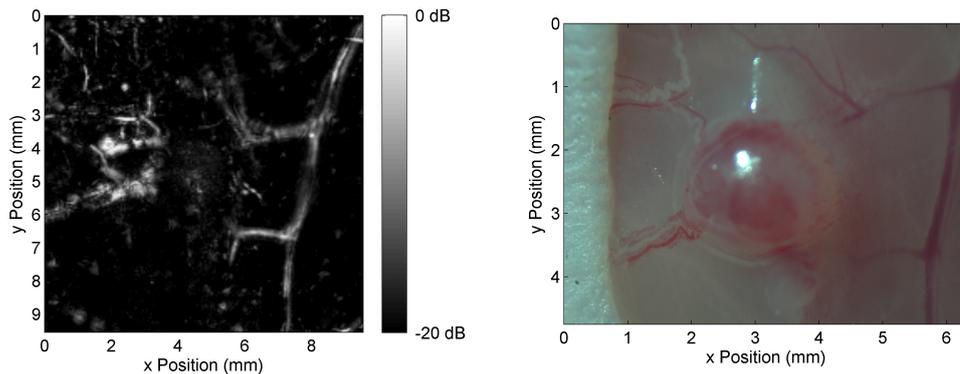
Diesbezüglich wurden *in-vivo* Versuche am Mausmodell (Mausstamm Balb/c) in Kooperation mit dem Institut für Biochemie II der Universität Köln durchgeführt, um die Detektierbarkeit von Gefäßen und Gewebeveränderungen in einer realistischen Messumgebung nachzuweisen. Das Ziel war es, die Gefäßneubildung nach subkutaner Injektion von Maus-Brusttumorzellen (CRL-2539, ATCC) zu detektieren. Sechs Tage nach der Implantation von  $5 \cdot 10^5$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) erfolgte die Aufnahme der optischen wie auch optoakustischen Daten im Bereich des Tumors. Während der Messung wurde die Maus durch die Verabreichung eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches in Narkose gehalten und mit einer Infrarot-Wärmelampe beleuchtet, um ein Auskühlen zu verhindern. Um den Kontrast der Gefäße zum umliegenden Gewebe zu maximieren, wurde eine Wellenlänge von  $532 \text{ nm}$  verwendet. In Abbildung 7.18 ist der etwa  $1 \text{ cm}^2$  große, optoakustisch untersuchte Bereich des Brustgewebes markiert. Der in der Bildmitte befindliche, etwa  $3 \text{ mm}$  große Tumor, hebt sich vom umgebenden Gewebe geringfügig ab, wohingegen subkutane Blutgefäße im optischen Bild nicht zu erkennen sind.



**Abb. 7.18.** Optische Aufnahme des untersuchten Tumorbereichs am Kleintier

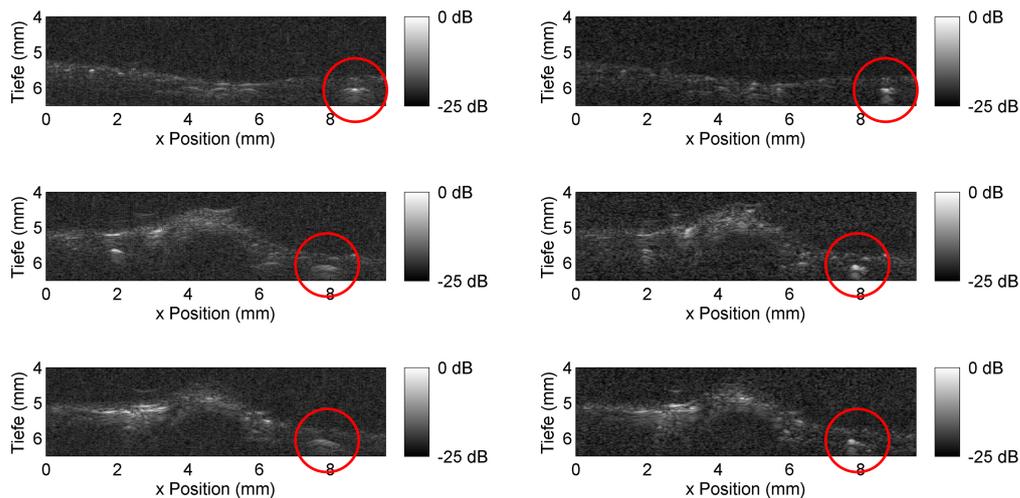
In Abbildung 7.19 ist ein Projektionsbild der aufgenommenen Signale gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass die Blutgefäße um den Tumor starke optoakustische Druckwelle generieren. Ein größeres Blutgefäß, welches im rechten Teil des Bildes zu erkennen ist, verzweigt sich in feine Gefäße, die den Tumor mit Nährstoffen versorgen. Um die aufgenommenen Daten mit den wahren Gegebenheiten abzugleichen, wurde Post Mortem nach dem Entfernen der Bauchdecke ein optisches Bild aufgenommen und mit den optoakustischen *in-vivo* Bildern verglichen. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung beider Aufnahmen.

Außerdem kann zur Bildverbesserung der in Kapitel 5.2.1 eingeführte SAFT-Rekonstruktionsalgorithmus genutzt werden. Um die Vorteile des Algorithmus an realen



**Abb. 7.19.** Optoakustisches Projektionsbild eines Brustkrebstumors nach 6 Tagen des Heranwachstums im Vergleich zu einem optischen Bild der untersuchten Region nach Entfernung des Bauchfells

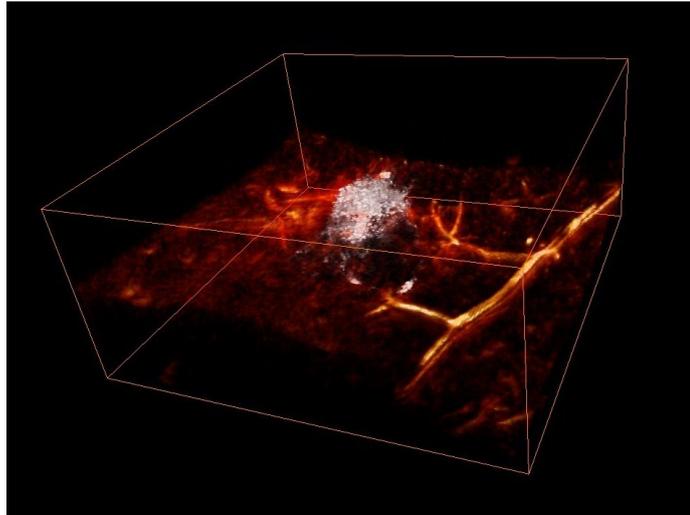
Daten zu verdeutlichen, sind im linken Teil der Abbildung 7.20 beispielhaft mehrere Schnittbilder des untersuchten Bereichs dargestellt. In allen unrekonstruierten Querschnittsbildern sind subkutane bogenförmige Strukturen zu finden, die auf Blutgefäße zurückzuführen sind. Diese Artefaktbildung kann durch Anwendung des Algorithmus reduziert werden.



**Abb. 7.20.** Bildsequenz von subkutanen Blutgefäßen vor (links) und nach (rechts) Anwendung der SAFT-Rekonstruktion

In der rechten Spalte der Abbildung 7.20 sind die korrespondierenden SAFT-rekonstruierten Bilder gezeigt. Die B-Bild basierte Rekonstruktion führt sowohl zu einer Erhöhung des SRV als auch zu einer verbesserten lateralen Auflösung außerhalb des Fokusbereichs des Ultraschallwandlers. Optoakustische Schnittbilder der Blutgefäße können nach der Rekonstruktion mit höherem Kontrast dargestellt werden. Der dynamische Bereich der Rohdaten beträgt  $38 \text{ dB}$  und kann durch die SAFT-Rekonstruktion um  $10 \text{ dB}$  erhöht werden.

Die Morphologie des Gefäßnetzwerkes, welches den Tumor versorgt, ist in Abbildung 7.21 dreidimensional dargestellt. Im Gegensatz zu den Blutgefäßen, die eine sehr hohe Absorption des Lichts bei der verwendeten Wellenlänge von  $532 \text{ nm}$  aufweisen, absorbiert das Tumorgewebe selbst einen geringen Anteil der auftreffenden elektromagnetischen Strahlung,

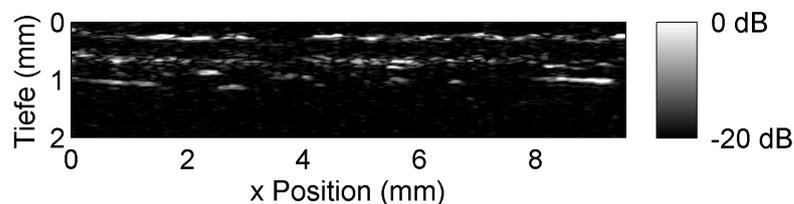


**Abb. 7.21.** Dreidimensionale Visualisierung der optoakustischen Daten eines subkutanen Tumors ( $9,6 \times 9,6 \times 2,5 \text{ mm}^3$ )

sodass nur geringe optoakustische Signalamplituden resultieren. Um diesen dennoch in einer dreidimensionalen Ansicht von den stark absorbierenden Blutgefäßen unterscheiden zu können, wurde der Tumorbereich segmentiert und die Signale in diesem Bereich verstärkt. Der Tumor ist in Abbildung 7.21 als helle Punktwolke zu erkennen.

### 7.2.6 Optoakustische Visualisierung von humanen Blutgefäßen *in-vivo*

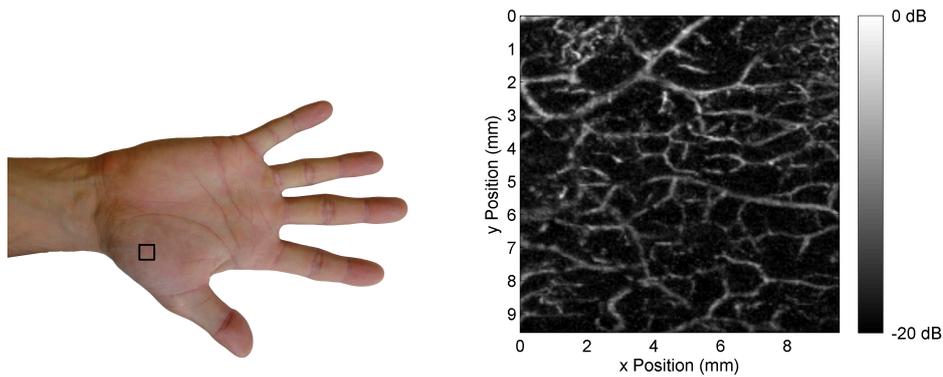
Um die Nutzbarkeit des Systems zur Visualisierung von humanen Blutgefäßen zu demonstrieren, wurde in einem weiteren *in-vivo* Experiment die Mikrovaskularisierung eines Hautelements an der Innenseite der Daumenwurzel der menschlichen Hand optoakustisch aufgenommen. Im linken Teil der Abbildung 7.23 ist ein optisches Bild der Hand gezeigt, worin der untersuchte Bereich farblich gekennzeichnet ist. Die optoakustischen Signale wurden durch Scannen des Sensors auf einer Fläche von  $9,6 \text{ mm} \times 9,6 \text{ mm}$  in Schritten von  $50 \mu\text{m}$  bei einer vierfachen Mittelung aufgenommen. In Abbildung 7.22 ist exemplarisch ein aufgenommenes optoakustisches Schnittbild gezeigt.



**Abb. 7.22.** Optoakustischer B-Scan der Mikrovaskularisierung an der Innenseite der Daumenwurzel der menschlichen Hand

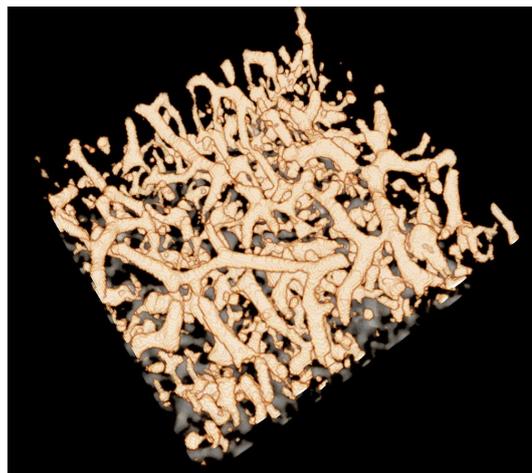
Als Folge der starken optischen Absorption des Blutes bei der verwendeten Wellenlänge von  $532 \text{ nm}$  ist die Vaskularisierung sehr gut vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden.

Wie schon im obigen Querschnittsbild zu sehen, sind in den optoakustischen Daten die Hautoberfläche sowie mehrere subkutane Blutgefäße sichtbar. Diese verlaufen vornehmlich in Schichten parallel zur Hautoberseite, wobei sich die tiefsten beobachtbaren Gefäße etwa  $1\text{ mm}$  unterhalb der Hautoberfläche befinden. Eine Projektion der maximalen Signalamplituden aus Tiefen zwischen  $400\ \mu\text{m}$  und  $700\ \mu\text{m}$  unterhalb der Hautoberfläche zeigt das Gefäßnetzwerk des untersuchten Bereichs (Abbildung 7.23).



**Abb. 7.23.** Optisches Bild der untersuchten Handregion und optoakustischer C-Scan der Mikrovaskularisierung

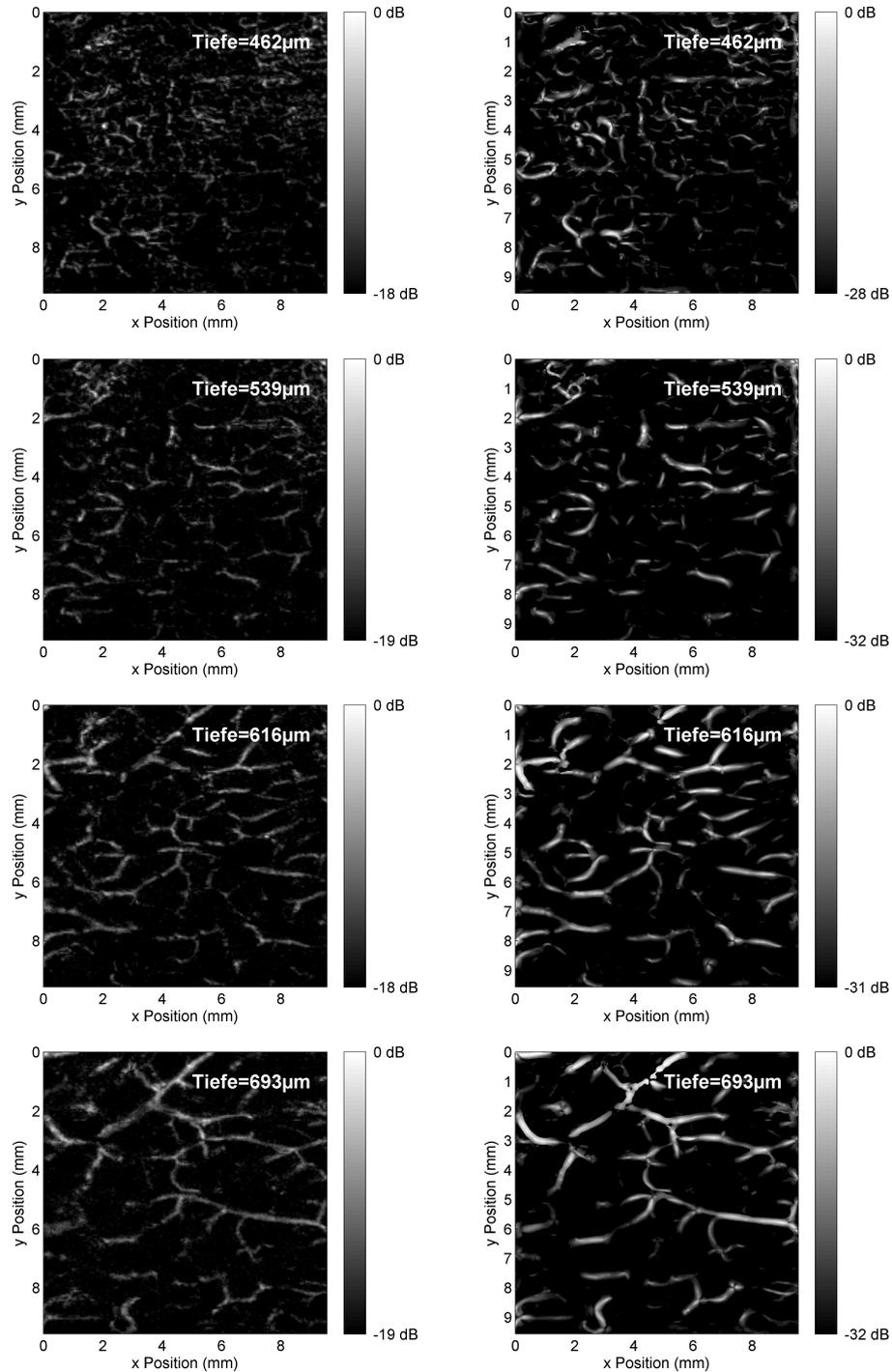
Da es sich bei den aufgezeichneten Daten um Volumendatensätze handelt, ist auch in diesem Fall eine dreidimensionale Visualisierung des Gefäßbaumes möglich. Die optoakustischen Signalquellen der Blutgefäße sind als beige Voxel dargestellt, wohingegen die Signale der darüber befindlichen Hautoberfläche semitransparent dargestellt sind. Um das Gefäßnetzwerk besser zu erkennen, ist das Volumen in Abbildung 7.24 rotiert und von unten betrachtet.



**Abb. 7.24.** 3D-Rekonstruktion der Mikrovaskularisierung eines Hautelements von  $9,6 \times 9,6 \times 1\text{ mm}^3$  an der Innenseite der Daumenwurzel der menschlichen Hand ( $180^\circ$  rotiert)

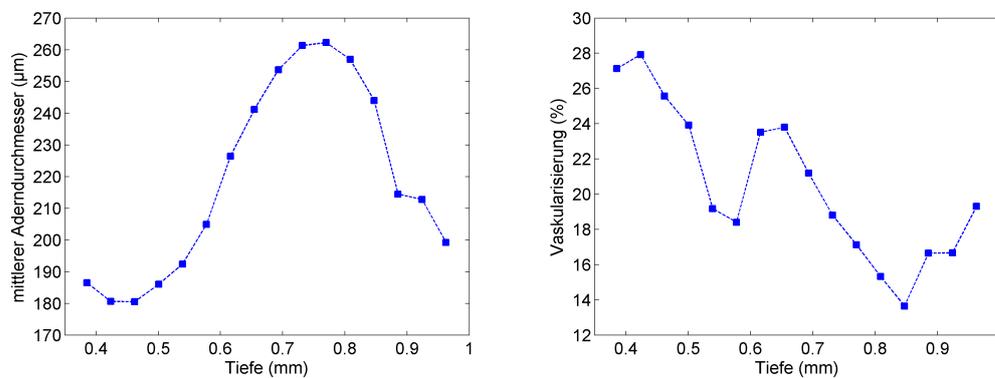
Um die Ausbreitung des Adergeflechtes in den verschiedenen Hautschichten zu visualisieren, wurden mehrere horizontale Schnitte einer Dicke von etwa  $100\ \mu\text{m}$  durchgeführt und durch eine Amplitudenprojektion in zweidimensionale Bilder überführt. In der linken Spalte der

Abbildung 7.25 sind vier Projektionsbilder gezeigt, welche die gemessenen optoakustischen Signale in der jeweiligen Tiefe darstellen. Beginnend in einer Tiefe von  $462\ \mu\text{m}$  unterhalb der Hautoberfläche beträgt der axiale Abstand der einzelnen Schichten  $77\ \mu\text{m}$ .



**Abb. 7.25.** Projektionsbilder ( $9,6\ \text{mm} \times 9,6\ \text{mm}$ ) der tiefenabhängigen Mikrovascularisierung eines Hautelementes an der Innenseite der Daumenwurzel einer menschlichen Hand bei einer Schichtdicke von etwa  $100\ \mu\text{m}$ : vor (links) und nach Verwendung des Vaskularisierungsfilters (rechts)

Schon in der Bildsequenz ist deutlich zu erkennen, dass die mittlere Gefäßgröße mit zunehmender Tiefe im Gewebe zunimmt. Um dies quantitativ auszuwerten, wurde der in Kapitel 5.2.3 beschriebene Vaskularisierungsfiter auf die Daten angewendet. Dieser verstärkt speziell die Gefäße im Kontrast, wodurch sie sich stärker vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Die Evaluierung der Eignung des Filters basiert auf drei sich ergänzenden Kriterien: Verbesserung des Kontrasts sowie der tiefenabhängigen Auswertung des mittleren Gefäßdurchmessers und des Vaskularisierungsgrades. In der rechten Spalte der Abbildung 7.25 sind die gefilterten Daten den Rohdaten gegenübergestellt. Durch die Filterung verbessert sich der Kontrast des Bildes in Abhängigkeit der Tiefe und des dort vorherrschenden SRV um 9-13 dB, was mit den in Kapitel 7.2.6 erhaltenen Simulationsergebnissen übereinstimmt.



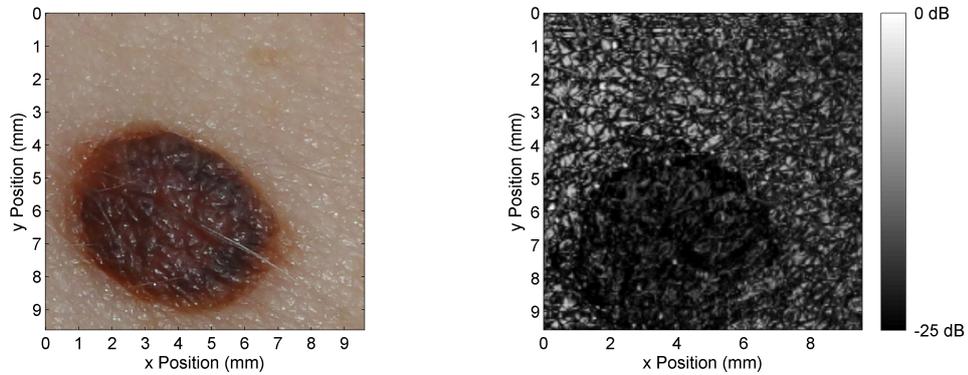
**Abb. 7.26.** Mittlerer Gefäßdurchmesser und Vaskularisierungsgrad an der Innenseite der Daumenwurzel einer menschlichen Hand in Abhängigkeit der Tiefe

Neben der grafischen Darstellung erlaubt auch die statistische Auswertung der dreidimensionalen Datensätze eine Aussage über die Größenverteilung der Gefäße. Zu diesem Zweck wurde in dem dreidimensionalen optoakustischen Datensatz nach der Filterung der Anteil an Voxeln ausgewertet, die einer Gefäßstruktur zuzuordnen sind. Somit kann der Vaskularisierungsgrad, als prozentualer Anteil des von den Gefäßen eingenommenen Volumens quantifiziert werden. Des Weiteren lassen sich durch Auswertung des Skalierungsfaktors  $s$  bei der Filterung Rückschlüsse auf die Gefäßgröße ziehen. Nachfolgend sind in Abbildung 7.26 der mittlere Gefäßdurchmesser und der Vaskularisierungsgrad in Abhängigkeit der Tiefe grafisch dargestellt. Diese Analyse bestätigt die tiefenabhängige Variation des Vaskularisierungsgrades sowie die mit der Tiefe zunehmende Vergrößerung des Gefäßdurchmessers.

### 7.2.7 Optoakustische Visualisierung eines Naevus *in-vivo*

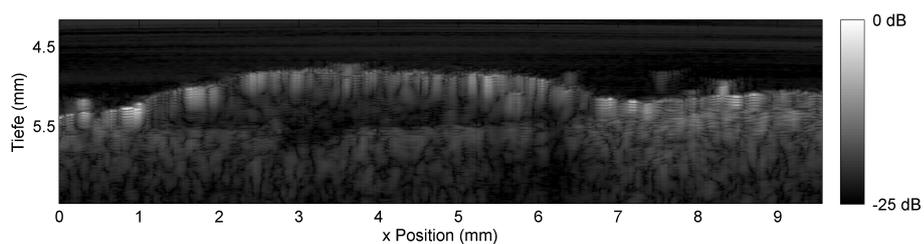
Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, ist das entwickelte hybride *in-vivo* System sowohl für die Aufnahme von optoakustischen als auch rein akustischen Signalen geeignet. Durch die schnelle Bildaufnahme ist es möglich, beide Messungen nacheinander durchzuführen, ohne die Position auf der Haut zu verändern. Die Ultraschalldaten liefern Informationen zur Anatomie, wohingegen die optoakustische Bildgebung die Bereiche hoher optischer

Absorption kontrastreich darstellt. Durch die Überlagerung beider Bilder wird dem Mediziner ein Werkzeug zur Verfügung gestellt, welches die optoakustisch gewonnenen Daten in den gewohnten akustischen Kontext integriert.



**Abb. 7.27.** Optische Aufnahme und akustischer C-Scan ( $9,6 \text{ mm} \times 9,6 \text{ mm}$ ) des untersuchten Naevus

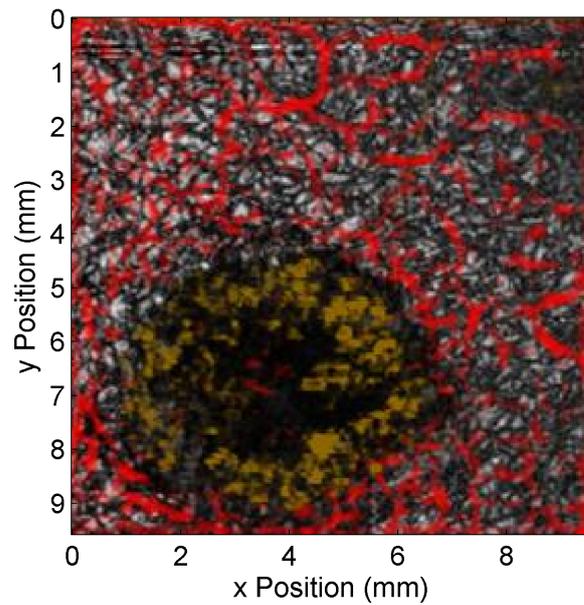
Zur Validierung der kombinierten Bildgebung wurden *in-vivo* Versuche an Hautveränderungen durchgeführt. Dazu wurde in beiden Modalitäten ein Naevus am Rücken eines Probanden untersucht. Abbildung 7.27 zeigt das optische wie auch das akustische Bild des untersuchten Bereichs. Anhand der Ultraschalldaten lässt sich dieser Naevus durch sein verringertes Streuvermögen sehr gut vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung eines Querschnittsbildes durch den Naevus (Abbildung 7.28). Die axiale Größe des echoarmen Bereiches ist ein Maß für die Ausdehnung der Hautveränderung in die Tiefe. Umliegende Blutgefäße jedoch sind aufgrund ihrer geringen Größe und der geringen Rückstreuung in den Ultraschalldaten kaum zu erkennen.



**Abb. 7.28.** Akustischer B-Scan in der Mitte des untersuchten Naevus

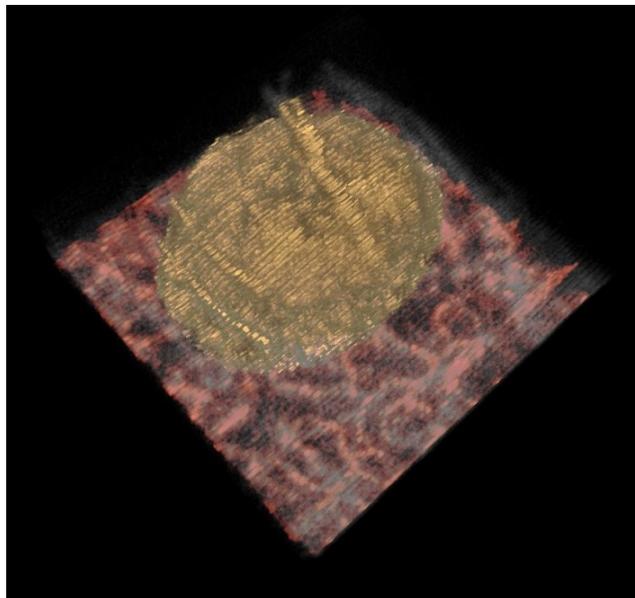
Im Gegensatz dazu stammen in der optoakustischen Aufnahme die stärksten Signale von den Blutgefäßen bzw. von der starken Pigmentierung des Naevus. Eine hybrides C-Scan-Bild als Überlagerung der optoakustischen und akustischen Signale ist in Abbildung 7.29 gezeigt. Die starke Pigmentierung der untersuchten Hautregion und die daraus resultierenden starken optoakustischen Signale sind in Brauntönen, Blutgefäße hingegen sind in Rot dargestellt.

Die Signale der umgebenden Vaskularisierung können mit einem SRV von  $25 \text{ dB}$  detektiert werden. Unterhalb des pigmentierten Bereichs können lediglich geringe optoakustische



**Abb. 7.29.** Optoakustischer C-Scan ( $9,6 \times 9,6 \text{ mm}^2$ ) eines Naevus

Signale aufgenommen werden. Dies ist auf die starke optische Absorption des melaninhaltigen Gewebes zurückzuführen, was dazu führt, dass lediglich wenige Photonen in tiefere Schichten vordringen. Dieser Effekt unterbindet signifikant die Erzeugung optoakustischer Signale unterhalb des Naevus.



**Abb. 7.30.** Dreidimensionale hybride Darstellung von optoakustischen und akustischen Daten eines Naevus ( $9,6 \times 9,6 \times 2 \text{ mm}^3$ )

Um die Vaskularisierung zusammen mit der Hautoberfläche zu visualisieren, wurden die aufgenommenen akustischen und optoakustischen Daten in einer dreidimensionalen Rekonstruktion vereint. Die optoakustischen Signalquellen unterhalb der Hautoberfläche

sind in Abbildung 7.30 als rote Voxel, die Signale des pigmentierten Bereichs in beige dargestellt. In dieser hybriden Ansicht sind die aufgenommenen Ultraschalldaten semitransparent überlagert. Die pigmentbildenden Zellen der Haut grenzen sich aufgrund der starken Absorption und der damit einhergehenden hohen Signalamplituden eindeutig von der Vaskularisierung ab. Durch diese Art der Darstellung und der Möglichkeit der quantitativen Analyse morphologischer Gewebeparameter steht dem Mediziner eine Vielzahl neuer Parameter bei der Diagnose zur Verfügung, wodurch mittelfristig die Anzahl der heute vorgenommenen Biopsien reduziert werden kann.



**Zusammenfassung der Ergebnisse**



## Diskussion

Zur Erforschung der Wirkungsmechanismen nanoskaliger Biomarker wurde im Rahmen der Dissertation eine Mikroskopieplattform für *in-vitro* Untersuchungen auf Einzelzellebene entwickelt und aufgebaut. Die bestmögliche Auflösung konnte durch die konfokale Anordnung der beugungsbegrenzten optischen Anregung und der fokussierten akustischen Detektion erzielt werden. Die anhand vorausgegangener Simulationen gewonnene Kenntnis der spektralen Anteile eines optisch erzeugten Ultraschallsignals erlaubte es, den zur Signalerzeugung verwendeten Laser sowie den zur Detektion eingesetzten Ultraschallwandler optimal anzupassen. Die am Fraunhofer IBMT aufgebaute piezoelektrische Linse erfüllt die Anforderungen eines empfindlichen und gleichzeitig hochauflösenden Systems. Durch die Nutzung eines fokussierten Ultraschallwandlers entsprach die akustische Fokusbreite näherungsweise der Größe der optischen Anregung, sodass konfokale Messbedingungen vorherrschen. In Kombination mit einem hochrepetierenden Nanosekundenlaser ist eine schnelle Bildgebung mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis möglich. Die Abbildungseigenschaften der entwickelten Bildgebungsplattform wurden anhand mehrerer Phantommessungen charakterisiert. Durch die konfokale Anordnung der akustischen Detektionseinheit und des optischen Anregungssystems konnte eine laterale Auflösung von  $2,5 \mu\text{m}$  erzielt werden.

Verschiedene Nanopartikelsysteme wurden im Hinblick auf ihr Kontrastpotential untersucht. Maßgebendes Kriterium bei der Auswahl war neben der möglichst hohen Absorption elektromagnetischer Strahlung auch die spektrale Lage des Absorptionsmaximums. Idealerweise liegt dieses im Spektralbereich um  $1064 \text{ nm}$ . Die Eignung dieser Wellenlänge basiert auf der im nahen Infrarot reduzierten optischen Absorption im Gewebe als auch auf der Emissionswellenlänge des zur Schallerzeugung eingesetzten Lasersystems (Nd:YAG Laser). Drei verschiedene nanopartikuläre Systeme (Gold-Nanorods, Magnetit-Nanopartikel, PLGA-Nanopartikel) wurden bezüglich ihres Absorptionsspektrums und ihres Kontrastpotentials untersucht. Dazu wurden die Detektionsschwellen der drei nanopartikulären Systeme in Phantomexperimenten erfasst. In eine Alginatmatrix eingebettete Partikel konnten schon bei Konzentrationen von wenigen hundert Mikrogramm pro Milliliter mit hinreichendem Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden. Insbesondere die Goldnanopartikel stellten sich durch den Effekt der Plasmonenresonanz als die effizientesten Kontrastmittel heraus und gelten daher als der Gold-Standard in der präklinischen Forschung.

Die Eignung magnetitbasierter Partikel als optoakustisches Kontrastmittel konnte in einem *in-vitro* Experiment bildgebend belegt werden, wobei im Gegensatz zur konventionellen

optischen Mikroskopie eine räumliche Darstellung erreicht wurde. Basierend auf der Laufzeitanalyse der Schallwelle vom Ort der Erzeugung bis zum Ultraschallwandler konnte die Bindung der Partikel untersucht und als dreidimensionale Repräsentation der lokalen Absorption dargestellt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrzahl der polyaminbeschichteten Magnetitpartikel von Lungenkarzinomzellen (A549) nicht internalisiert wird, sondern vielmehr an der Oberfläche der Zelle bindet. Da die synthetisierten Partikel lediglich mit einer Oberflächenbeschichtung, nicht jedoch mit einem spezifisch bindenden Antikörper versehen sind, eignen sie sich weniger für die molekulare optoakustische Bildgebung. Aus diesem Grund erfolgten weitere Experimente zur Untersuchung der spezifischen Bindung von funktionalisierten Gold-Partikeln.

Dazu wurden Gold-Nanorods in eine Polymermatrix eingebettet und mit Polyethylenglykolen (PEG) beschichtet. Die reaktiven Gruppen des PEG dienten als Schnittstelle zur weiteren Bindung an biologische Liganden. Das Modellsystem, welches bei den Versuchen zur optoakustischen Darstellung biologisch modifizierter Partikel zum Einsatz kam, bestand aus dem Peptid Chlorotoxin, welches bevorzugt an Glioblastomzellen bindet. Durch die Funktionalisierung der Oberfläche der Partikel mittels Chlorotoxin konnten diese als molekulare Kontrastmittel eingesetzt werden. Die Glioblastom-Zelllinie U87MG wurde über 24 Stunden mit den funktionalisierten wie auch mit Kontrollpartikeln inkubiert. Die anschließende optoakustische Bildgebung zeigte, dass die detektierten Signale im Falle der Inkubation mit funktionalisierten Partikeln die Signalintensität der Kontrollmessung um ein Vielfaches übersteigen. Somit konnte mit Hilfe des entwickelten optoakustischen Bildgebungssystems gezeigt werden, dass eine hochauflösende Visualisierung der spezifischen Bindung von biologisch modifizierten Nanopartikel an einer Zelllinie möglich ist. Gerade in Bezug auf die präklinische Validierung von Kontrastmitteln ermöglicht die entwickelte *in-vitro* Mikroskopieplattform die Charakterisierung der Wirkmechanismen und Bindungseffizienzen der Partikel auf Einzelzellebene.

Neben der Anwendung zur mikroskopischen Bildgebung an Zellkulturen wurde die hochauflösende Optoakustik auch unter klinischen Bedingungen getestet. Für eine klinisch anwendbare Diagnostik wurde eine kombinierte akustische und optoakustische Bildgebungsplattform entwickelt. Sie erlaubt eine dreidimensionale klinische Diagnostik von oberflächennahem Gewebe auf Basis hochauflösender hybrider Bildgebung. Dieser multimodale Ansatz bildet die dermatologischen Veränderungen mit quantitativer Tiefeninformation sowohl im reinen akustischen Kontext wie auch die Mikrovascularisierung durch eine optische Anregung ab. Durch die Optimierung der Einstrahlgeometrie und der Sensitivität konnte zur optischen Anregung mit Lasersystemen der Klasse 1 gearbeitet werden. Um die für den klinischen Einsatz benötigte Benutzerfreundlichkeit zu gewährleisten, wurde das System handgehalten aufgebaut. Eine optimierte Messwerterfassung erlaubt eine optoakustische Untersuchung eines Bereichs von etwa  $1\text{ cm}^2$  in weniger als drei Minuten. Im rein akustischen Modus wird dieser Wert durch die hohe Pulswiederholrate der Ultraschallelektronik nochmals unterboten.

Die Empfindlichkeit des *in-vivo* Systems bezüglich der Detektion nanopartikulärer Kontrastmittel wurde getestet. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der mikroskopischen Messungen zeigte, dass die Detektionsschwellen der nanopartikulären Kontrastmittel im gleichen Bereich liegt. Im Hinblick auf die Nutzung der Nanopartikel als optoakustisches

Kontrastmittel ließ sich anhand der Messergebnisse die notwendige Partikelmenge für die *in-vivo* Diagnostik am Menschen abschätzen. Dazu wurden die experimentell ermittelten Werte bezüglich der Sensitivität beider Systeme und des kontrastverstärkenden Potentials der Nanopartikel zugrunde gelegt. Unter sehr vereinfachten Annahmen aller Prozesse, denen die Partikel im Körper unterliegen, konnte in dieser Kalkulation die zur Diagnostik notwendige Partikelmenge in den Mikroliterbereich eingeordnet werden. Nach intravenöser Verabreichung der funktionalisierten Kontrastmittel sollte diese Menge an der Zielstruktur zu einer Kontrasterhöhung von 6 *dB* führen.

Während der Einsatz der vorgestellten funktionalisierten Goldnanorods in der präklinischen Forschung zur molekularen Bildgebung möglich ist, sind diese für die klinische Diagnostik bislang noch nicht zugelassen. Die Frage nach dem Verbleib der Partikel im Organismus ist noch ungeklärt und die Forschungsarbeit bezüglich der Toxizität metallischer Nanopartikel steht noch an ihrem Anfang [95]. Daher sind weiterführende Untersuchungen vor allem im Bereich der biologischen Verträglichkeit der verschiedenen Partikeltypen von Nöten. Erste Untersuchungen der synthetisierten Partikeltypen gemäß standardisierter Protokolle wurden von den Mitarbeitern der Abteilung „Zellbiologie und angewandte Virologie“ am Fraunhofer IBMT durchgeführt [86][87]. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die synthetisierten Gold- wie auch Polymerpartikel bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  keine zytotoxischen Effekte auf die untersuchten Zelllinien zeigen. Obwohl sich in diesem Versuch sowohl die Gold- als auch die Polymerpartikel als nicht zytotoxisch erwiesen haben, scheint der Ansatz von polymerbasierten und somit metabolisierbaren Partikeln jedoch die höheren Aussichten auf einen klinischen Einsatz zu bieten.

Des Weiteren wurden die Abbildungseigenschaften der entwickelten *in-vivo* Bildgebungsplattform an Phantomen getestet. Bei der Charakterisierung der Auflösung musste festgestellt werden, dass aufgrund des konzeptionellen Aufbaus des Ultraschallwandlers die Auflösung des Systems und somit die Bildqualität tiefenabhängig sehr stark variiert. In Abhängigkeit des Abstandes zum Fokuspunkt des verwendeten Ultraschallwandlers verringerte sich die Auflösung um mehr als das Zehnfache. Um diesen Missstand zu beheben, wurden Rekonstruktionsverfahren zur Verbesserung der Bildqualität entwickelt. Dazu wurde die Synthetic Aperture Focussing Technique (SAFT) an die optoakustische Bildgebung angepasst und um unterschiedliche Filter erweitert, welche sowohl die laterale Auflösung als auch das SRV verbessern. Unter Verwendung des optimierten Rekonstruktionsverfahrens konnte die Halbwertsbreite der Punktantwort und somit die laterale Auflösung tiefenunabhängig um den Faktor 10 auf weniger als 100  $\mu\text{m}$  reduziert werden. Es verzeichnete sich zusätzlich eine Verbesserung des Kontrastes um mehr als 20 *dB*.

Darüber hinaus wurden erste *in-vivo* Versuche mit dem Ziel des Nachweises subkutaner Tumore durchgeführt. Unter *in-vivo* Bedingungen am Kleintier konnte die Vaskularisierung im Bereich um den Tumor dargestellt werden. Ein Abgleich der optoakustischen Daten mit den optischen Bildern des freigelegten Tumors zeigte eine gute Übereinstimmung. Während in der Vergangenheit häufig histologische Versuche zur Darstellung von mikroskopisch kleinen Gefäßen herangezogen werden mussten, erlaubt die optoakustische Bildgebung nichtinvasive Langzeitstudien, wodurch die Dynamik der Vaskularisierung untersucht und die Anzahl der Versuchstiere reduziert werden kann.

In der klinischen Anwendung am Menschen ist eines der Anwendungsfelder des entwickelten Systems die Untersuchung von Hautveränderungen. Die Praxistauglichkeit des Systems wurde an ersten *in-vivo* Messungen von subkutanen Blutgefäßen in der menschlichen Hand belegt. Dazu wurde die Mikrovaskularisierung eines Hautelements an der Innenseite der Daumenwurzel optoakustisch dargestellt. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung von Gefäßstrukturen werden die Vorteile der Optoakustik deutlich. Während im konventionellen Ultraschall die kleinen Gefäße nicht zu sehen sind, liegt der optoakustische Kontrast um Größenordnungen über dem des Ultraschalls. Verschieden große Gefäßstrukturen, Gefäßkreuzungen oder Verästelungen konnten in unterschiedlichen Tiefen in dreidimensionalen Ansichten mit sehr hohem Kontrast dargestellt werden. In diesem Zusammenhang wurden zur Selektion potenziell diagnostisch relevanter Gewebestrukturen Algorithmen entwickelt und an experimentellen *in-vivo* Daten validiert, die quantitative Aussagen über den untersuchten Bereich treffen. Diese erlauben es einerseits, das SRV des gesamten Volumendatensatzes nochmals zu verbessern, andererseits können tubusähnliche Strukturen erhöhter optischer Absorption, wie z. B. Blutgefäße herausgefiltert werden. Somit kann der Grad der Vaskularisierung bestimmt und eine tiefen- und größenabhängige Verteilung der Blutgefäße erstellt werden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass das realisierte Diagnosesystem eine Quantifizierung der Mikrovaskularisierung in der Haut erlaubt und quantitative Parameter für die Verbesserung der Diagnostik von Hautanomalien bereitstellt.

Außerdem wurden akustische wie auch optoakustische Daten eines Naevus an einem Probanden aufgenommen. Anhand der Ultraschalldaten lässt sich dieser durch sein verringertes Streuvermögen sehr gut vom umliegenden Gewebe abgrenzen und seine axiale Ausdehnung bestimmen. Umliegende kleine Blutgefäße sind jedoch aufgrund ihrer geringen Größe und der geringen Rückstreuung in den reinen Ultraschalldaten nicht zu erkennen. In der optoakustischen Darstellung sind die stärksten Signale den Blutgefäßen sowie der starken Pigmentierung des Naevus zuzuordnen. Durch die hybride dreidimensionale Darstellung und der Möglichkeit der quantitativen Analyse morphologischer Gewebeparameter wird dem Mediziner eine Vielzahl neuer Parameter zur Diagnose bereitgestellt.

Zur Übertragung der Ergebnisse in die klinische Diagnostik ist es notwendig, den entwickelten Prototyp in einer klinischen Studie zu evaluieren. Nach lediglich zwei Jahren Entwicklungszeit wurde das neuentwickelte Bildgebungssystem durch eine von der Europäischen Kommission benannte Prüf- und Zertifizierungsstelle für Medizinprodukte (EUROCAT Institute for Certification and Testing GmbH, Darmstadt) für eine klinische Studie am Patienten freigegeben. In der dermatologischen Abteilung der Universitätsklinik in Modena (Italien) sowie im Hammersmith Hospital in London (Großbritannien) werden derzeit hybride *in-vivo* Datensätze erhoben, zusätzliche Parameter zur Diagnostik extrahiert und mit den histologischen Befunden verglichen.

## Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die hochauflösende optoakustische Bildgebung unter verschiedenen Gesichtspunkten erörtert. Zunächst erfolgte die theoretische Betrachtung der Randbedingungen hochauflösender Systeme zur optoakustischen *in-vitro* wie auch *in-vivo* Bildgebung. Mit den daraus abgeleiteten Parametern wurden zwei hybride Systeme für die Anwendung im Labor und die klinische Erprobung aufgebaut und evaluiert.

Für die *in-vitro* Experimente wurde ein am Fraunhofer IBMT vorhandenes Ultraschallmikroskop um eine optoakustische Einheit erweitert. Die Integration erfolgte durch eine konfokale Anordnung der optischen Anregung und des fokussierenden Einzelelementwandlers, wodurch eine Auflösung von  $2,5 \mu\text{m}$  erreicht wurde. Mit Hilfe dieses Systemkonzepts gelang die *in-vitro* Untersuchung der Wirkungsmechanismen biologisch funktionalisierter Kontrastmittel auf Einzelzellebene.

Das Potential einer funktionellen Diagnostik mit selektiver Kontrasterhöhung wurde mit drei nanopartikulären Kontrastmitteln aus Gold, Magnetit und PLGA untersucht. Nach der Einbettung in Alginatphantomen wurden die Partikelsysteme hinsichtlich ihres Kontrastpotentials charakterisiert. Partikelkonzentrationen im nanomolaren Bereich waren für eine klare Anhebung des Signal-Rausch-Verhältnisses ausreichend. Am Beispiel der Lungenkarzinom-Zelllinie (A549) und der Glioblastom-Zelllinie U87MG gelang es das Bindungsverhalten der Kontrastmittel orts aufgelöst zu charakterisieren. Bei den positiv geladenen Magnetitpartikeln bestätigte sich eine Anlagerung an der Zellmembran. Die Modifikation der Goldnanorods mit dem Peptid Chlorotoxin ermöglichte eine spezifische Bindung der Goldpartikel an einer U87MG Zelllinie. Am Beispiel der beiden Zellkulturen konnte eindrucksvoll aufgezeigt werden, dass nanoskalige Kontrastmittel durch Nutzung der optoakustischen Technologie mit molekularem Kontrast detektiert werden können. Des Weiteren erfolgte auf Basis dieser Ergebnisse eine Abschätzung der für die Diagnostik am Menschen benötigten Kontrastmittelmengen.

Für Untersuchungen am Kleintier und klinische Messungen wurde ein optoakustisches *in-vivo* Diagnosesystem entwickelt. Die Empfindlichkeit des Systems konnte mittels Algorithmen zur Bildrekonstruktion optimiert und Abbildungsfehler korrigiert werden. Insbesondere konnte die zunächst konzeptionell vorherrschende tiefenabhängige Auflösung selbst außerhalb der Fokuszone des Ultraschallwandlers um den Faktor 10 auf weniger als  $100 \mu\text{m}$  reduziert werden. Mit diesem System war es möglich, feinste subkutane Blutgefäße mit hoher Auflösung und hohem Kontrast darzustellen. Darüber hinaus konnte

das neu entwickelte System erfolgreich eingesetzt werden, um das Gefäßnetzwerk eines Tumors am Mausmodell kontrastreich von dem umliegenden gesunden Gewebe abzugrenzen. Zur Evaluierung der medizinischen Eignung erfolgte die akustische und optoakustische Aufnahme eines pigmentierten Naevus eines Probanden. Unter Verwendung verschiedener Rekonstruktionsalgorithmen wurden in dieser hybriden Darstellung neben der quantitativen Analyse der Vaskularisierung auch morphologischen Gewebeparameter der stark pigmentierten Hautveränderung tiefenaufgelöst untersucht. Das zur klinischen Erprobung zugelassene Gerät wird derzeit in der dermatologischen Abteilung der Universitätsklinik in Modena (Italien) sowie im Hammersmith Hospital in London (Großbritannien) in einer Studie evaluiert.

Neben der Darstellung von anatomischen Strukturen mit intrinsischem Kontrast, stellt die molekulare optoakustische Bildgebung ein weiteres Anwendungsfeld der Technik dar. Dabei ist der Mangel an biologisch abbaubaren Kontrastmitteln jedoch eine der Hürden für den Transfer von der präklinischen Forschung in den klinischen Alltag. Die in der vorliegenden Arbeit experimentell validierten PLGA-Partikel stellen diesbezüglich einen aussichtsreichen Kandidaten dar um die molekulare optoakustische Bildgebung auch klinisch zu validieren. Verglichen mit den Goldpartikeln könnte eine Zulassung der PLGA-Partikel als Kontrastmittel aufgrund der biologischen Abbaubarkeit vergleichsweise einfach erreicht werden. Nun liegt es daran, das Konzept der Funktionalisierung auf die PLGA-Partikel zu übertragen. Dazu sind die freien Bindungsstellen an der Partikeloberfläche zu charakterisieren und entsprechende Ansätze zur Bindung spezifischer Antikörper oder Peptide zu entwickeln. Des Weiteren sind bis zur Zulassung des Kontrastmittels Untersuchungen zur Pharmakokinetik notwendig, um die Verweildauer der Partikel im Blutkreislauf und somit das nutzbare Zeitfenster zu erforschen.

Eine weitere Nutzung der hochauflösenden Optoakustik ist beispielsweise in der Pharmaindustrie denkbar. Die Wirksamkeit neuartiger Medikamente zur Wundheilung könnte mittels der optoakustischen Bildgebung nichtinvasiv validiert werden. Des Weiteren bietet sie sich zur Bestimmung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und Cremes an, die äußerlich aufgetragen werden. Mit Hilfe der Optoakustik könnte unter Zugabe von Kontrastmitteln das Eindringen der Inhaltsstoffe in die Haut nachgewiesen werden.

Um die Einsatzmöglichkeiten des Systems auf Felder zu erweitern, in denen höhere Bildwiederholraten erforderlich sind, kann als Alternative zum Einzelelementwandler ein hochfrequentes Ultraschallarray zur Signaldetektion eingesetzt werden. Zur Kompensation des tendenziell schlechteren SRV bei der Verwendung von Arrays kann die radiale Abstrahlcharakteristik der thermoelastischen Drucktransienten als Kugelwellen ausgenutzt werden. Da sich in der optoakustischen Bildgebung die thermoelastisch erzeugten Druckwellen radial ausbreiten, könnte die Sensitivität des Systems z. B. durch eine ringförmige Anordnung der Empfangselemente verbessert werden. Liegt der Innendurchmesser des Arrays im Zentimeterbereich, so können insbesondere im Bereich der Kleintierforschung hochaufgelöste kontrastreiche Schnittbilder mittels tomographischer Rekonstruktionsalgorithmen erstellt werden. Doch gerade im Frequenzbereich über 30 MHz stellt die zu entwickelnde Ansteuerelektronik für ein mehrkanaliges Array eine große Herausforderung dar.

Für eine zukünftige kommerzielle Nutzung der optoakustischen Technologie stehen zwei Vermarktungsstrategien zur Verfügung. Kurz- und mittelfristig stellt die Optoakustik ein innovatives Werkzeug für die biologische und präklinische medizinische Forschung dar, welche zur Untersuchung von Vorgängen in lebenden Organismen auf hochauflösende und sensitive Bildgebungsverfahren angewiesen ist. Die Optoakustik zeichnet sich gegenüber den etablierten molekularen Bildgebungsverfahren wie z. B. PET/SPECT vor allem durch eine aus den niedrigeren Kosten resultierende breitere Verfügbarkeit aus. Gleiches gilt auch für den klinischen Alltag, in dem die optoakustische Technik in naher Zukunft zum Einsatz kommen kann. Langfristig, insbesondere im Bereich der molekularen Bildgebung, sind die Einsatzfelder aufgrund komplizierter Zulassungsverfahren der Kontrastmittel limitiert. Neben den bereits durchgeführten Studien in der Dermatologie soll in einem Folgeprojekt das Anwendungsspektrum der optoakustischen Bildgebung auf weitere Krankheitsbilder ausgedehnt werden. Dabei soll die hochauflösende Optoakustik erstmals zur Diagnose von Arthritis eingesetzt werden. Dort stellt sie dem Mediziner eine Reihe zusätzlicher Parameter zur Diagnostik bereit.



**Teil V**

---

**Anhang**



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter R. Fuhr für die Möglichkeit, meine Promotion am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) anzufertigen sowie die Betreuung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Robert Lemor für die Überlassung des Themas und die Gelegenheit, an dieser interessanten und abwechslungsreichen wissenschaftlichen Thematik forschen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich meinen Kollegen in der Hauptabteilung „Ultraschall“ sowie der Abteilung „Zellbiologie und angewandte Virologie“ für Anregungen und Diskussionen danken.

Saarbrücken,

Wolfgang Bost



# B

---

## Lebenslauf

### Wolfgang Bost

Geboren am	3. Juni 1982
Familienstand	ledig
Staatsbürgerschaft	deutsch
Adresse	Herzstraße 20 D-66557 Illingen
Ausbildung	
Aug. 1988 - Juli 1992	Grundschule Humes
Sept. 1992 - Juni 2001	Illtal-Gymnasium Illingen
Berufserfahrung	
Aug. 2005 - Aug. 2006	Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sankt Ingbert
Jan. 2007 - aktuell	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Sankt Ingbert

### Studium und Weiterbildung

Okt. 2002 - Juli 2004	Studium der Mathematik an der Universität des Saarlandes
Okt. 2002 - Jan. 2008	Studium der Physik an der Universität des Saarlandes
Jan 2008	Abschluss Diplom-Physiker (Dipl. Phys.),  Diplomarbeit: „Photoakustische Mikroskopie - Entwicklung und Evaluierung von Verfahren der gekoppelten optischen und akustischen Mikroskopie zur Untersuchung biologischer Proben“

## Publikationen und Vorträge

- 2008
- Bost W., Lemor R.: *High-resolution photoacoustic microscopy platform*, Vortrag anlässlich der *Acoustics 2008*, Paris, Frankreich
- Fournelle M., Bost W., Lemor R.: *Sensing nanogold with laser-induced ultrasound*, Poster anlässlich der *Nano2Life Conference*, Kreta, Griechenland
- Bost W., Stracke F., Fournelle M., Lemor R.: *Developing a high-resolution photoacoustic microscopy platform*, Vortrag und Proceedings Paper anlässlich des *4<sup>th</sup> European Congress for Medical and Biomedical Engineering*, Antwerpen, Niederlande
- 2009
- Fournelle M., Bost W., Wagner S., Stracke F., Lemor R.: *Contrast enhanced optoacoustics for molecular imaging*, Proceedings Paper anlässlich der *International Conference on Acoustics*, Rotterdam, Niederlande
- Bost W., Stracke F., Kohl Y., Fournelle M., Henkel A., Kaiser C., Schroeter M., Sönnichsen C., Kratz K., Lemor R.: *Nanoparticulate contrast agents for high resolution photoacoustics imaging*, Vortrag anlässlich des *4<sup>th</sup> European Molecular Imaging Meetings*, Barcelona, Spanien
- Bost W., Kohl Y., Stracke F., Fournelle M., Lemor, R.: *High resolution optoacoustic detection of nanoparticles on living cells*, Vortrag und Proceedings Paper anlässlich des *IEEE International Ultrasonics Symposium*, Rom, Italien
- Bost W., Fournelle M., Kohl Y., Stracke F., Wagner S., Lemor R.: *Optoacoustic molecular imaging from microscopic to macroscopic*, Vortrag anlässlich der *NanoTech Europe*, Berlin, Deutschland
- Fournelle M., Welsch H.J., Fonfara H., Hewener H., Guenther C., Bost W., Lemor R.: *High-contrast real-time optoacoustic imaging of subcutaneous blood vessels*, IFMBE Proceedings, Vol. 25/2, 352-355
- Kohl Y., Bost W., Henkel A., Kaiser C., Schroeter M., Fournelle M., Sönnichsen C., Kratz K., Thielecke H., Lemor R.: *Biocompatibility and functional evaluation of nanoparticulate contrast agents for photoacoustic imaging*, Poster anlässlich der *Nanobio-Europe 2009*, Grenoble, Frankreich
- Bost W., Stracke F., Weiss E.C., Narasimhan S., Kolios M.C., Lemor R.: *High frequency optoacoustic microscopy*, Proceedings Paper anlässlich der *31<sup>st</sup> Annual International Conference of the IEEE*, Minneapolis, USA

Stracke F., Bost W., Kohl Y., Henkel A., Sönnichsen C., Kaiser C., Schroeter C., Kratz K., Lemor R.: *Nano-particulate contrast agents for molecular photoacoustic imaging and microscopy*, Vortrag anlässlich der 6<sup>th</sup> *International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology*, Berlin, Deutschland

Bost W., Fournelle M., Kohl Y., Stracke F., Lemor R.: *Optoacoustic imaging of nanoprobess*, Vortrag anlässlich des 51<sup>th</sup> *Symposium of the Society for Histochemistry*, Mieders, Österreich

Bost W., Stracke F., Kohl Y., Fournelle M., Lemor R.: *High frequency photoacoustic microscopy for high resolution imaging*, Vortrag und Proceedings Paper anlässlich des *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, München, Deutschland

2010

Bost W., Lemor R.: *Polysound, Nanopolymere Kontrastmittel für die Photoakustik*, Vortrag anlässlich des *BMBF-Projektforum Biotechnologie* im Rahmen der Biotechnica, Hannover, Deutschland

Bost W., Fournelle M., Motzki F., Lemor R.: *Optoacoustic techniques for high contrast vasculature imaging with resolution from millimeters to micrometers*, Vortrag und Proceedings Paper anlässlich der 44. *Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE*, Rostock, Deutschland

Kohl Y., Kaiser C., Bost W., Henkel A., Schroeter M., Sönnichsen C., Thielecke H., Kratz K., Lemor R.: *Evaluation of nanoparticles as contrast agent for photoacoustic imaging in living cells*, Poster und Proceedings Paper anlässlich der 34<sup>th</sup> *International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites*, Daytona, USA

Fournelle M., Bost W., Weiss E.C., Dinser R., Lemor R.: *Fast reflection-mode scanning system for 3D in-vivo optoacoustic molecular imaging*, Poster anlässlich des *World Molecular Imaging Congress*, Kyoto, Japan

Rui M., Narasimhan S., Bost W., Stracke F., Weiss E.C., Lemor R., Kolios M.C.: *Gigahertz optoacoustic imaging for cellular imaging*, Proceedings of Spie, Vol. 7564

Rui M., Bost W., Weiss E.C., Lemor R., Kolios M.C.: *Photoacoustic microscopy and spectroscopy of individual red blood cells*, Biomedical Optics, OSA Technical Digest (CD) (Optical Society of America, 2010), paper BSuD93.

2011

Kohl Y., Kaiser C., Bost W., Stracke F., Fournelle M., Wischke C., Thielecke H., Lendlein A., Kratz K., Lemor R.: *Preparation and biological evaluation of multifunctional PLGA-nanoparticles desi-*

*gned for photoacoustic imaging*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Vol. 7/2, 228-237

Kohl Y., Kaiser C., Bost W., Stracke F., Thielecke H., Wischke C., Lendlein A., Kratz K., Lemor R.: *Near-infrared dye-loaded PLGA nanoparticles prepared by spray drying for photoacoustic applications*, The international journal of artificial organs, Vol. 34, 249-252

Bost W., Kohl Y., Fournelle M., Lemor R.: *Contrast enhanced optoacoustic microscopy*, Poster und Proceedings Paper anlässlich der 4<sup>th</sup> *European-Conference for Clinical Nanomedicine*, Basel, Schweiz

Fournelle M., Bost W., Weiss E., Dinser R., Lemor R.: *In-vivo molecular imaging of rheumatoid arthritis using optoacoustic techniques*, Vortrag und Proceedings Paper anlässlich der 4<sup>th</sup> *European-Conference for Clinical Nanomedicine*, Basel, Schweiz

Fournelle M., Bost W., Heimann A., Mpoukouvalas K., Charalampaki C., Lemor R.: *High resolution ultrasound and optoacoustic imaging for in-vivo imaging of glioma*. Vortrag und Proceedings Paper anlässlich der 45. *Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE*, Freiburg, Deutschland

Fournelle M., Bost W., Tarner I.H., Lehmborg T., Weiß E., Lemor R., Dinser R.: *Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibody-coupled gold nanorods as nanoprobe for molecular optoacoustic imaging in arthritis*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine (in press)

---

## Literaturverzeichnis

- [1] V. Gusev and A. Karabutov. Laser optoacoustics. *American Institute of Physics*, 1993.
- [2] Europäische Kommission. research eu: Mantel und Organ. *Magazin des europäischen Forschungsraums*, 58:10, 2008.
- [3] A. Blum, J.F. Kreusch, J. Bauer, and C. Garbe. Dermatoskopie von hauttumoren: Auflichtmikroskopie-dermoskopie-digitale bildanalyse. *Steinkopff*, 2003.
- [4] C.F. Bohren and D.R. Huffman. Absorption and scattering of light by small particles. *Wiley, New York*, 1983.
- [5] K. König and I. Riemann. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics*, 8:432–439, 2003.
- [6] E. Dimitrow, M. Ziemer, M.J. Koehler, J. Norgauer, K. König, P. Elsner, and M. Kaatz. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for *in-vivo* and *ex-vivo* diagnosis of malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 129:1752–1758, 2009.
- [7] S.Q. Wang, H. Rabinovitz, A.W. Kopf, and M. Olivier. Current technologies for the *in-vivo* diagnosis of cutaneous melanomas. *Clinics in Dermatology*, 22:217–222, 2004.
- [8] C.C. Harland, J.C. Bamber, B.A. Gusterson, and P.S. Mortimer. High frequency, high resolution B-scan ultrasound in the assessment of skin tumours. *British Journal of Dermatology*, 128:525–532, 1993.
- [9] N. Lassau, A. Spatz, M.F. Avril, A. Tardivon, A. Margulis, G. Mamelle, D. Vanel, and J. Leclere. Value of high-frequency US for preoperative assessment of skin tumors. *RadioGraphics*, 17:1559–1565, 1997.
- [10] B.D. Fornage, M.H. McGavran, M. Duvic, and C.A. Waldron. Imaging of the skin with 20-MHz US. *Radiology*, 189:69–76, 1993.
- [11] S. Manohar, A. Kharine, J.C.G. van Hespren, W. Steenbergen, and T.G. van Leeuwen. The twente photoacoustic mammoscope: system overview and performance. *Physics in Medicine and Biology*, 50:2543–2557, 2005.

- [12] S. Manohar, A. Kharine, J.C.G. van Hespén, W. Steenbergen, and T.G. van Leeuwen. Initial results of *in-vivo* non-invasive cancer imaging in the human breast using near-infrared photoacoustics. *Optics Express*, 15:12277–12285, 2007.
- [13] Y. Lao, D. Xing, S. Yang, and L. Xiang. Noninvasive photoacoustic imaging of the developing vasculature during early tumor growth. *Physics in Medicine and Biology*, 53:4203–4212, 2008.
- [14] J. Laufer, E. Zhang, G. Raivich, and P. Beard. Three-dimensional noninvasive imaging of the vasculature in the mouse brain using a high resolution photoacoustic scanner. *Applied Optics*, 48:299–306, 2009.
- [15] E. Zhang, J. Laufer, and P. Beard. Backward-mode multiwavelength photoacoustic scanner using a planar fabry perot polymer film ultrasound sensor for high resolution three-dimensional imaging of biological tissues. *Applied Optics*, 47:561–577, 2008.
- [16] L. Song, K. Maslov, R. Bitton, K.K. Shung, and L.V. Wang. Fast 3-d dark-field reflection-mode photoacoustic microscopy *in vivo* with a 30-mhz ultrasound linear array. *Journal of Biomedical Optics*, 13:1–10, 2008.
- [17] Z. Xie, S. Jiao, H.F.Zhang, and C.A.Puliafito. Laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy. *Optics Letters*, 34:1771–17773, 2009.
- [18] L. Wang, K. Maslov, J. Yao, B. Rao, and L.V. Wang. Fast voice-coil scanning optical-resolution photoacoustic microscopy. *Optics Letters*, 36:139–141, 2011.
- [19] J.J. Niederhauser, M. Jaeger, R. Lemor, P. Weber, and M. Frenz. Combined ultrasound and optoacoustic system for real-time high-contrast vascular imaging *in vivo*. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 24:436–440, 2005.
- [20] M. Fournelle. Optoakustische Molekulare Bildgebung - Untersuchung von nanoskaligen Kontrastmitteln und angepassten Rekonstruktionsalgorithmen für die molekulare optoakustische Bildgebung. *Dissertation, Fakultät 7 - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät II, Universität des Saarlandes*, 2010.
- [21] P.C. Li, C.R.C. Wang, D.B. Shieh, C.W. Wei, C.K. Liao, C. Poe, S. Jhan, A.A. Ding, and Y.N. Wu. *In vivo* photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody conjugated gold nanorods. *Optics Express*, 16:18605–18615, 2008.
- [22] A. de la Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B.R. Smith, T. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B.T. Khuri-Yakub, and S.S. Gambhir. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nature Nanotechnology*, 3:557–562, 2008.
- [23] Y. Wang, X. Xie, X. Wang, G. Ku, K.L. Gill, D.P. O’Neal, G. Stoica, and L.V. Wang. Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the *in-vivo* rat brain. *Nano Letters*, 4:1689–1692, 2004.

- [24] X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica, and L.V. Wang. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural function *in-vivo* imaging of the brain. *Nature Biotechnology*, 21:803–806, 2003.
- [25] G. Maguluri, L. Sui, R.A. Roy, and T.W. Murray. Modeling of optoacoustic signal generation for high resolution near-surface imaging with experimental verification. *Proceedings of SPIE*, 5697:224–232, 2005.
- [26] D.K. Yao, K. Maslov, K.K. Shung, Q. Zhou, and L.V. Wang. In vivo label-free photoacoustic microscopy of cell nuclei by excitation of DNA and RNA. *Optics Letters*, 35:4139–4141, 2010.
- [27] K. Maslov, H.F. Zhang, H. Song, and L.V. Wang. Optical-resolution confocal photoacoustic microscopy. *Proceedings of SPIE*, 6859:68561I–1–7, 2008.
- [28] C. Zhang, K. Maslov, and L.V. Wang. Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption in vivo. *Optics Letters*, 35:3195–3197, 2010.
- [29] Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.ogi.edu/spectra/>. 2011.
- [30] L.G. Henyey and J.L. Greenstein. Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophysical Journal*, 93:70–83, 1941.
- [31] M.J.C van Gemert A.J. Welch. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. *Plenum Press, New York*, 1995.
- [32] L.V. Wang. Tutorial on photoacoustic microscopy and computed tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 14:171–179, 2008.
- [33] C.G.A. Hoelen and F.F.M. de Mul. A new theoretical approach to photoacoustic signal generation. *Journal of the Acoustical Society of America*, 106:695–706, 1999.
- [34] J.L. Boulnois. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science*, 1:47–66, 1986.
- [35] A. Briggs. Acoustic microscopy. *Oxford University Press*, 1992.
- [36] E.C. Weiß. Zeitaufgelöste akustische Mikroskopie an individuellen Zellen. *Dissertation, Fakultät 7 - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät II, Universität des Saarlandes*, 2007.
- [37] POLYSOUND - Nanopolymere Kontrastmittel für die Photoakustik. BMBF Förderkennzeichen 0312029A.
- [38] S.A. Prahl, M. Keijzer, S.L. Jacques, and A.J. Welch. A monte carlo model of light propagation in tissue. *SPIE Proceedings of Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology*, 5:102–111, 1989.
- [39] ONDA Corporation. Tables of acoustic properties of materials. [www.ondacorp.com/tecref\\_acoustictable.shtml](http://www.ondacorp.com/tecref_acoustictable.shtml).

- [40] SKINSPECTION - multimodal skin inspection with hybrid acoustic & optical spectroscopic imaging. FP7 grant agreement no. HEALTH-F5-2008-201577.
- [41] T. M. Savino. Safety considerations for pulsed lasers. *Conformity*, 2002.
- [42] B.D. Steinberg. Principles of aperture and array system design: Including random and adaptive arrays. *John Wiley and Sons*, 1976.
- [43] B.D. Tylkowski. Rechnergestütztes Ultraschall-Phased-Array-Design mittels Punktquellensynthese und Evolutionsstrategie. *Dissertation, Universität des Saarlandes*, 1994.
- [44] P.K. Weber, R.M. Schmitt, B.D. Tylkowski, and J. Steck. Optimazation of random sparse 2-D transducer arrays of 3-D electronic beam steering and focusing. *IEEE Ultrasonic Symposium Proceedings*, 3:481–484, 1994.
- [45] W.R. MacLean. Absolute measurement of sound without a primary standard. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 12:140–146, 1941.
- [46] R.J. Bobber. General reciprocity parameter. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 39:680–687, 1966.
- [47] G. Ludwig and K.Brendel. calibration of hydrophones based on reciprocity and time delay spectrometry. *IEEE Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Society*, 35:16–174, 1988.
- [48] A. Conjusteau, S.A. Ermilov, R. Su, H.P. Brecht, M.P. Fronheiser, and A.A. Oraevsky. Characterization of optoacoustic transducers through the analysis of angular-dependent frequency response. *Proc. SPIE*, 7177:71770U, 2009.
- [49] C. Passmann and H. Ermert. *In-vivo* imaging of the skin in the 100 MHz region using the synthetic aperture concept. *IEEE Ultrasonics Symposium*, 31:1287–1290, 1995.
- [50] C. Passmann and H. Ermert. A 100-MHz ultrasound imaging system for dermatologic and ophthalmologic diagnostics. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 43:545–552, 1996.
- [51] M.L. Li, W.J. Guan, and P.C. Li. Improved synthetic aperture focusing technique with applications in high-frequency ultrasound imaging. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 51:63–70, 2004.
- [52] C.K. Liao, M.L. Li, and P.C. Li. Optoacoustic imaging with synthetic aperture focusing and coherence weighting. *Optics Letters*, 29:2506–2508, 2004.
- [53] M.L. Li, H.F. Zhang, K. Maslov, and G. Stoica L.V. Wang. Improved *in-vivo* photoacoustic microscopy based on a virtual-detector concept. *Optics Letters*, 31:474–476, 2006.
- [54] C.H. Frazier and W.D. O’Brien Jr. Synthetic aperture techniques with a virtual source element. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 45:196–207, 1998.

- [55] K.W. Hollmann, K.W. Rigby, and M. O'Donnell. Coherence factor of speckle from a multi-row probe. *IEEE Ultrasonics Symposium*, 2:1257 – 1260, 1999.
- [56] M.M. Orkisz, C. Bresson, I.E. Magnin, O. Champin, and P.C. Douek. Improved vessel visualization in MR angiography by nonlinear anisotropic filtering. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37:914–919, 1997.
- [57] C. Lorenz, I. Carlsen, T. Buzug, C. Fassnacht, and J. Weese. A multi-scale line filter with automatic scale selection based on the hessian matrix for medical image segmentation. *Lecture Notes in Computer Science*, 1252:152–163, 1997.
- [58] Y. Sato, S. Nakajima, N. Shiraga, H. Atsumi, S. Yoshida, T. Koller, G. Gerig, and R. Kikinis. Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. *Medical Image Analysis*, 2:143–168, 1998.
- [59] A.F. Frangi, W.J. Niessen, K.L. Vincken, and M.A. Viergever. Multiscale vessel enhancement filtering. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 98*, 1496:130–137, 1998.
- [60] S.S. Chang, C.W. Shih, C.D. Chen, W.C. Lai, and C.R.C. Wang. The shape transition of gold nanorods. *Langmuir*, 15:701–709, 1999.
- [61] B. Nikoobakht and M.A. El Sayed. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*, 15:1957–1962, 2003.
- [62] S. Pierrat, I. Zins, A. Breivogel, and C. Sönnichsen. Self-assembly of small gold colloids with functionalized gold nanorods. *Nano Letters*, 7:259–263, 2007.
- [63] H.J. Park, C.S. Ah, W.J. Kim, I.S. Choi, K.P. Lee, and W.S. Yun. Temperature-induced control of aspect ratio of gold nanorods. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 24:1323–1326, 2006.
- [64] X. Kou, S. Zhang, C.K. Tsung, Z. Yang, M.H. Yeung, G.D. Stucky, L. Sun, J. Wang, and C. Yan. One-step synthesis of large-aspect-ratio single-crystalline gold nanorods by using CTPAB and CTBAB surfactants. *Chemistry - A European Journal*, 13:2929–2936, 2007.
- [65] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, and T. Kobayashi. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100:1–11, 2005.
- [66] U. Schröder and K. Mosbach. Intravascularly administrable, magnetically responsive nanosphere or nanoparticle, a process for the production thereof, and the use thereof. *United States Patent US4501726*, 1985.
- [67] A. Malaiya and S.P. Vyas. Preparation and characterization of indomethacin magnetic nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 5:243–253, 1988.

- [68] D. Pouliquen, J.J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, and P. Jallet. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging*, 9:275–283, 1991.
- [69] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, and J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36:167–181, 2003.
- [70] D.B. Shieh, F.Y. Cheng, C.H. Su, C.S. Yeh, M.T. Wu, Y.N. Wu, C.Y. Tsai, C.L. Wu, D.H. Chen, and C.H. Chou. Aqueous dispersions of magnetite nanoparticles with  $NH_3^+$  surfaces for magnetic manipulations of biomolecules and MRI contrast agents. *Biomaterials*, 26:7183–7191, 2005.
- [71] L.X. Tiefenauer, G. Kühne, and R.Y. Andres. Antibody-magnetite nanoparticles: *In-vitro* characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 4:347–352, 1993.
- [72] P.A. Dresco, V.S. Zaitsev, R.J. Gambino, and B. Chu. Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles. *Langmuir*, 15:1945–1951, 1999.
- [73] Y. Zhang and J. Zhang. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283:352–357, 2005.
- [74] T. Osaka, T. Nakanishi, S. Shanmugam, S. Takahama, and H. Zhang. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71:325–330, 2009.
- [75] J. Herrmann and R. Bodmeier. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous evaporation methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45:75–82, 1998.
- [76] S.W. Choi, H.Y. Kwon, W.S. Kim, and J.H. Kim. Thermoelastic parameters on poly(d,l-lactide-co-glycolide) particle size emulsification-diffusion process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 201:283–289, 2002.
- [77] C.X. Song, V. Labhassetwar, H. Murphy, X. Qu, W.R. Humphrey, R.J. Shebuski, and R.J. Levya. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 43:197–212, 1997.
- [78] G. Kim, S.W. Huang, K.C. Day, M. O'Donnell, R.R. Agayan, M.A. Day, R. Kopelman, and S. Ashkenazi. Indocyanine-green-embedded pebbles as a contrast agent for photoacoustic imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 12:044020, 2007.
- [79] V. Saxena, M. Sadoqi, and J. Shao. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in-vitro* release. *International Journal of Pharmaceutics*, 278:293–301, 2004.

- [80] T. Iijima, T. Aoyagi, Y. Iwao, J. Masuda, M. Fuse, N. Kobayashi, and H. Sankawa. Cardiac output and circulating blood volume analysis by pulse dye-densitometry. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 13:81–89, 1997.
- [81] T. Nonami, A. Nakao, T. Kurokawa, H. Inagaki, Y. Matsushita, J. Sakamoto, and H. Takagi. Blood loss and icg clearance as best prognostic markers of post-hepatectomy liver failure. *Hepato-Gastroenterology*, 46:1669–1672, 1999.
- [82] W.R. Freeman, D.U. Bartsch, A.J. Mueller, A.S. Banker, and R.N. Weinreb. Simultaneous indocyanine green and fluorescein angiography using a confocal scanning laser ophthalmoscope. *Archives of Ophthalmology*, 116:455–463, 1998.
- [83] P. Johansen, H. P. Merkle, and B. Gander. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50:413–417, 2000.
- [84] B. Gander, E. Wehrli, R. Alder, and H.P. Merkle. Quality improvement of spray-dried, protein-loaded d, l-pla microspheres by appropriate polymer solvent selection. *Journal of Microencapsulation*, 12:83–97, 1995.
- [85] M.D. Blanco, R.L. Sastre, C. Teijón, R. Olmo, and J. M. Teijón. 5-fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(d,l-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: Characterization and drug release. *Journal of Microencapsulation*, 22:671–682, 2005.
- [86] Y. Kohl, C. Kaiser, W. Bost, F. Stracke, M. Fournelle, C. Wischke, H. Thielecke, A. Lendlein, K. Kratz, and R. Lemor. Preparation and biological evaluation of multifunctional PLGA-nanoparticles designed for photoacoustic imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7:228–237, 2011.
- [87] Y. Kohl, C. Kaiser, W. Bost, F. Stracke, H. Thielecke, C. Wischke, A. Lendlein, K. Kratz, and R. Lemor. Near-infrared dye-loaded PLGA nanoparticles prepared by spray drying for photoacoustic applications. *The international journal of artificial organs*, 34:249–252, 2011.
- [88] H. Zimmermann, F. Wählich, C. Baier, M. Westhoff, R. Reuss, D. Zimmermann, M. Behringer, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, C. Giese, U. Marx, V.L. Sukhorukov, J.A. Vasquez, P. Jakob, S.G. Shirley, and U. Zimmermann. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, 28:1327–1345, 2007.
- [89] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114:97–109, 2007.
- [90] L. Soroceanu, Y. Gillespie, M.B. Khazaeli, and H. Sontheimer. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Research*, 58:4871–4879, 1998.
- [91] D. Gentili, G. Ori, and M.C. Franchini. Double phase transfer of gold nanorods for surface functionalization and entrapment into PEG-based nanocarriers. *Chemical Communications*, 39:5874–5876, 2009.

- [92] M.C. Franchini, J. Ponit, R. Lemor, M. Fournelle, F. Broggi, and E. Locatelli. Polymeric entrapped thiol-coated gold nanorods: cytotoxicity and suitability as molecular optoacoustic contrast agent. *Journal of Materials Chemistry*, 20:10908–10914, 2010.
- [93] J. Yanga, S.B. Park, H.G. Yoon, Y.M. Huh, and S. Haam. Preparation of poly  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 324:185–190, 2006.
- [94] H.J. van Staveren, C.J.M. Moes, J. van Marie, S.A. Prahl, and M.J.C. van Gemert. Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range of 400 nm - 1100 nm. *Applied Optics*, 30:4507–4514, 1991.
- [95] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, and J.J. Schlager. *In-vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 19:975–983, 2005.