

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2006 (07.12.2006)

PCT

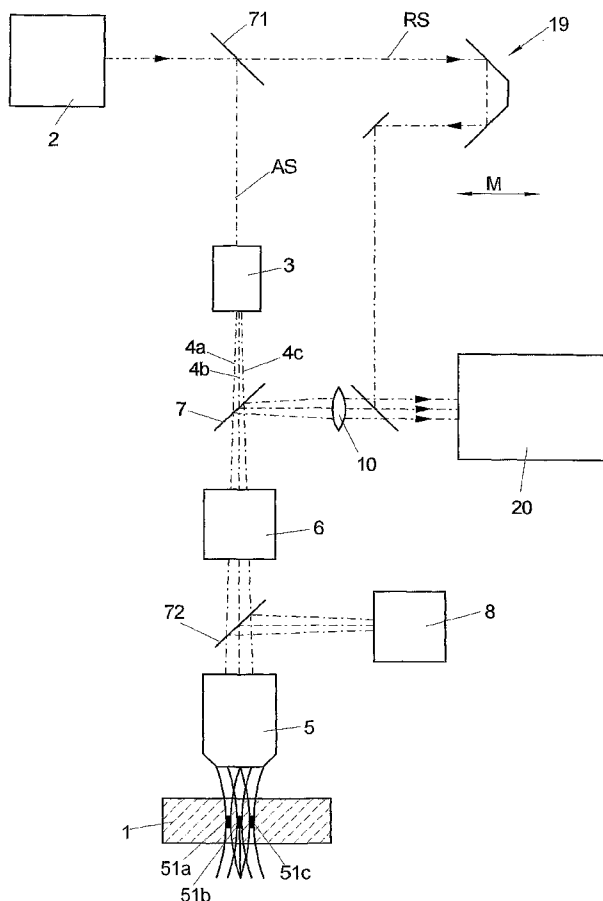
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/128442 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2006/000941
- (22) Internationales Anmeldedatum:
31. Mai 2006 (31.05.2006)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2005 025 243.5 31. Mai 2005 (31.05.2005) DE
10 2005 025 241.9 31. Mai 2005 (31.05.2005) DE
10 2005 025 242.7 31. Mai 2005 (31.05.2005) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): W.O.M. WORLD OF MEDICINE AG [DE/DE]; Alte Poststrasse 15, 96333 Ludwigsstadt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREUDENBERG, Thomas [DE/DE]; Neuenhagener Strasse 42a, 12623 Berlin (DE). SCHÖNBORN, Karl-Heinz [DE/DE]; Fleischerstrasse 12, 12355 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: MÜLLER, Wolfram, H.; Maikowski & Ninnemann, Postfach 15 09 20, 10671 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR VISUAL CHARACTERIZATION OF TISSUE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR OPTISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON GEWEBE



(57) Abstract: The invention relates to a method for visual characterization of human or animal tissue formed from cells, having the following steps: a radiation source for emitting directional electromagnetic radiation is provided; - the tissue to be characterized is irradiated with the radiation, this producing a reflection in the tissue which is characteristic of the tissue, with - the radiation which has penetrated the tissue having, within an excitation region extending transversely with respect to the direction of propagation of the radiation, a sufficient intensity to excite a characteristic reflection in the tissue. In line with the invention, the radiation emitted by the radiation source is impressed with an intensity profile, transversely with respect to its direction of propagation, which is such that the excitation region covers a plurality of cells of the tissue and the excited reflection originates from inter-cell tissue properties. In a second aspect, the invention relates to a method in which the radiation emitted by the radiation source is periodically deflected transversely with respect to the direction of propagation such that the radiation periodically scans a region of the tissue around the measurement point which extends over a plurality of cells of the tissue. The invention also relates to apparatuses for carrying out the methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem menschlichem oder tierischem Gewebe mit den Schritten: - Bereitstellen einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter elektromagnetischer Strahlung; - Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes mit der Strahlung, wodurch im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstrahlung erzeugt wird, wobei - die in das Gewebe eingedrungene Strahlung innerhalb eines sich quer zu

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/128442 A1



KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

ihrer Ausbreitungsrichtung erstreckenden Anregungsbereiches eine ausreichende Intensität aufweist, um im Gewebe eine charakteristische Rückstrahlung anzuregen. Erfindungsgemäß wird der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung ein derartiges Intensitätsprofil quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung aufgeprägt, dass der Anregungsbereich eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes überdeckt und die angeregte Rückstrahlung auf zellübergreifende Gewebeeigenschaften zurückgeht. In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren, bei dem die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung quer zur Ausbreitungsrichtung periodisch so abgelenkt wird, dass die Strahlung einen Bereich des Gewebes um die Messstelle herum periodisch abtastet, der sich über eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes erstreckt. Des Weiteren betrifft die Erfindung Vorrichtungen zur Durchführung der Verfahren.

5

10

Verfahren und Vorrichtung zur optischen Charakterisierung von Gewebe

15

Beschreibung

20 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem menschlichem oder tierischem Gewebe sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

25 Die Diagnostik epidermaler, kutaner, adnexaler und mukosaler Veränderungen erfolgte bis zum Ende des 20. Jahrhunderts überwiegend klinisch. Seit den 80er Jahren haben sich durch die rasante Entwicklung der Technik, vor allem der Rechentechnik, eine Reihe bildgebender Verfahren in der Dermatologie etablieren können.

30 Von spezieller Relevanz ist dabei die Fluoreszenz-basierte Tumordiagnostik. Hier sind bereits mehrere Geräte auf dem Markt, die auf der linearen UV-Anregung mit einer Xenonlampe basieren. Ausgewertet wird in der Regel die Autofluoreszenzintensität in charakteristischen Wellenlängenbereichen (Storz, Richard-Wolf GmbH, Olympus) vor einem Weißlicht-Hintergrundbild.

35 Insbesondere wird von der Arbeitsgruppe H. van den Bergh untersucht, wie durch eine sequenziell mehrfarbige Anregung, Lebensdauerauflösung und spezielle Datenauswertung eine erhebliche Verbesserung der Diagnose erzielt werden kann [H. van den Bergh, Med. Laser Appl. 18 (2003)1, 20 und darin zitierte]. In allen Fällen liegt die laterale Auflö-

sung im Sub-Millimeter-Bereich. Eine Differenzierung in der Tiefe ist aus prinzipiellen Gründen nicht möglich.

5 Dem Ziel, eine dreidimensionale Fluoreszenz-Darstellung des Gewebes mit akzeptablen Lichtausbeuten zu realisieren, kam man erst mit der Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie näher (W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, "2-Photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248** (1990), 73-76). Bei diesem Verfahren wird die orts aufgelöste Fluoreszenzdetektion der konfokalen Mikroskopie, die sehr geringe Fluoreszenzsignale und damit niedrige Abtastraten bedingt, durch die Lokalisierung 10 mittels einer Multiphotonenanregung ersetzt. Außerdem können bei diesem Verfahren Wellenlängen im so genannten optischen Fenster des Gewebes (700nm – 1000nm) für die Anregung eingesetzt werden. Der Fokus der Forschungen auf diesem Gebiet liegt seit dem Beginn der Arbeiten auf der räumlich aufgelösten Darstellung der Konzentrationen verschiedener Biomoleküle im zellulären und subzellulären Bereich (Übersicht W.R. Zipfel et al *Nature Biotechnology* **21** (2003), 11, 1369-1377 und darin zitierte). 15

In das Feld der Multiphotonen-Mikroskopie (-Tomographie) ordnen sich auch die aktuellen Arbeiten der Gruppe von Prof. Karsten König ein (K. König et al *J. Biomed. Opt.* **8** (2003) 3, 432-439). Die mit einer Ortsauflösung im Sub-Mikrometerbereich dargestellten 20 intrazellulären Strukturen erlauben Aussagen bezüglich Zellteilung und Stoffwechselfverhalten einzelner Zellen und damit eine Therapiekontrolle, nicht jedoch die Untersuchung ausgedehnter Gewebsareale. Die diagnostischen Ansätze auf der Basis der Multiphotonenmikroskopie gehen von der Interpretation der intrazellulären Stoffwechselfvorgänge und der zellulären Struktur aus.

25 Für die in relevante orts aufgelöste Darstellung auf der Basis fokussierter Fluoreszenzanregung kann als Stand der Technik auf die seit langem etablierte konfokale Fluoreszenzmikroskopie verwiesen werden. Sie liefert horizontale Schnittbilder mit einer Auflösung im Bereich der verwendeten Wellenlänge. Die Vorteile der Zweiphotonenanregung bei diesem Verfahren, namentlich durch Anregung im ‚optischen Fenster‘, sowie deutlich 30 bessere Ortsauflösung auch in streuendem Gewebe wurden diskutiert und demonstriert [Review: W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *nature biotechnology*, 21/11, November 2003]. Beispielhaft seien hier die Arbeiten von Levene et al. [M. J. Levene et al. *In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. J Neurophysiol* 91: 1908-1912, 2004] und Theer et al. [P. Theer et al., *Two-Photon imaging to a depth of 1000 mm in living brain tissue... Optics Lett. VOL. 28(12), 2003*] erwähnt, in denen Nervenzellen und Blutgefäße von Ratten und Mäusen in vivo in einer Tiefe von 1 mm dargestellt werden konnten. Diese Arbeiten belegen, dass konfokal nichtlinear angeregte Fluoreszenz auch 35 aus großer Tiefe im Gewebe als orts aufgelöste Information erfasst werden kann. Aller-

dings konnten in Bezug auf Tumordiagnostik mit diesen Verfahren bislang nur morphologische und interzelluläre Informationen und keine Aussagen über den Stoffwechselzustand von Gewebebereichen gewonnen werden. Die für die therapeutischen Entscheidungen wichtigen Informationen wie Ausbreitung und Gesamtaktivität eines Tumors konnten bislang nicht geliefert werden.

Mit den Schriften US5034613 und US6166385 und begleitenden Veröffentlichung wurde das Verfahren der Zwei-Photonen-Mikroskopie und später der Mehr-Photonen-Mikroskopie bekannt gemacht. Die Idee dieser Verfahren beruht darauf, dass die dreidimensionale Ortsauflösung durch die enge räumliche Begrenzung einer durch Zwei- oder Mehr-Photonen-Prozesse angeregten Fluoreszenz erreicht wird. Die Bildgewinnung selbst basiert auf der rasternden Abtastung des Untersuchungsgebietes mit dem Anregungsstrahlung.

Die Auslösung von Zwei- oder Mehrphotonen-Prozesse ist an die simultane Absorption von zwei oder mehr Photonen im Anregungsgebiet gebunden. Deshalb sind im Allgemeinen dafür hohe Intensitäten, wie sie gepulste Lasersysteme bereitstellen, erforderlich. Typischerweise sind dies, wenn man zur Vermeidung von Gewebeschädigungen im Anregungsgebiet die mittlere Leistung des Lasers begrenzen muss, Piko- oder Femtosekundenpulse bzw. Folgen von solchen Pulsen.

Die verfahrensimmanente Zwei- oder Mehr-Photonenabsorption bedingt auch eine entsprechende Intensitätsabhängigkeit des Prozesses: Bei einem Zwei-Photonenprozess ist die Ausbeute typischerweise quadratisch von der Intensität abhängig, bei einem Drei-Photonenprozess von der dritten Potenz der Intensität usw.

Die dreidimensionale Ortsauflösung des Verfahrens, für das hier beispielhaft die Zwei- und Mehr-Photonen-Mikroskopie angeführt werden, basiert auf zwei miteinander verknüpften Effekten, die anhand der typischerweise eingesetzten Lasersysteme beschrieben werden:

In der Bildebene der Optik, durch die die Anregungsstrahlung in das Targetmaterial fokussiert wird, ergibt sich die Begrenzung durch die Eigenschaften der Strahlquelle und der verwendeten Optik. Beschrieben wird dies durch den Radius der Strahltaile w_0 , der sich für den häufigen Fall der Grundmode-Strahlung, auf die hier als Beispiel ohne Beschränkung der Allgemeinheit des Erfindungsgedankens Bezug genommen wird, wie folgt näherungsweise berechnet:

$$w_0 \approx \frac{2\lambda \cdot f}{\pi \cdot D}$$

Dabei ist λ die Wellenlänge der Strahlung, f die Brennweite der verwendeten Optik und D der ausgeleuchtete Durchmesser bei Strahlungseintritt in die Optik. Wie man leicht erkennt, lässt sich der Durchmesser des Anregungsgebietes in der Bildebene der Optik beispielsweise durch Wahl des Verhältnisses f/D einstellen.

5

Entlang der Ausbreitungsrichtung der Strahlung (z -Richtung) nimmt der Radius $w(z)$ des – hier wieder beispielhaft betrachteten - Grundmode-Bündels zu:

$$w(z) = w_0 \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{z \cdot \lambda}{\pi \cdot w_0^2} \right)^2}$$

Mit der Zunahme des Radius des Bündels nimmt die Intensität der Anregungsstrahlung und damit die Ausbeute des Prozesses ab.

10

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{z \cdot \lambda}{\pi \cdot w_0^2} \right)^2} \quad \text{Rayleigh-Länge} \quad z_0 = \frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda}$$

Dabei ist I_0 die Intensität im Fokus der Anregung. Charakterisiert wird dieser Tatbestand durch die sogenannte Rayleigh-Länge, die angibt, in welchem Abstand vom Fokus die Intensität auf die Hälfte abgefallen ist.

15

Entsprechend dem oben angeführten, quadratischen oder stärkeren Zusammenhang zwischen der Ausbeute des Prozesses und der Anregungsintensität wird deutlich, dass das Anregungsgebiet auch entlang der hier z -Achse genannten Ausbreitungsrichtung begrenzt ist.

20

Die Beschreibung dieser Zusammenhänge machen auch deutlich, dass es in dieser Anordnung nicht möglich ist, die Dimensionen des Anregungsgebietes unabhängig voneinander durch die Wahl der Anregungsstrahlung und der Optik festzulegen. Die Ausdehnung des Anregungsgebietes in z -Richtung wächst quadratisch mit dem Radius des Anregungsstrahles im Fokus.

25

Auf Grund dieser Tatsache gelingt es beispielsweise für die Multiphotonen-Mikroskopie nicht, Übersichtsmessungen mit verringerter Auflösung – also vergrößertem Fokus - und entsprechend erhöhter Ausbeute durchzuführen, ohne dass dadurch überproportional Auflösung in der Ausbreitungsrichtung der Anregungsstrahlung verloren ginge. Dieser Tatbestand ist insbesondere dann nachteilig, wenn zur Vermeidung unerwünschter Prozesse im Targetmaterial die Intensität der Anregungsstrahlung begrenzt ist.

30

35

Bei der gezielten nichtlinearer Anregung von Prozessen in organischen oder anorganischen Stoffen ist weiterhin Folgendes zu beachten:

5 Der Spot, in dem nichtlineare Prozesse ablaufen, ist als Taille eines Gaußstrahles geformt und bei nicht zu großen Aperturen vergleichsweise langgestreckt. Gewünscht für die Auswertung ist jedoch zumeist eine kompakte Form des Anregungsvolumens, d. h. eine, bei der der Durchmesser dieses Volumens und die Ausdehnung senkrecht zur Strahlsachse in etwa die gleiche Größenordnung haben.

10 Dabei wird grundsätzlich wie bei den genannten Methoden üblich das dreidimensionale Bild durch Scannen erzeugt. Durch zusätzliche, erfinderisch neue Methoden und apparative Einrichtungen, die im Folgenden offenbart sind, wird die im vorgenannten Absatz beschriebene Restriktion aufgehoben

15 Eine weitere, den Einsatz der nichtlinearen Fluoreszenzmethodiken außerhalb der klinischen und biologischen Forschung beschränkende Begrenzung der bisherigen Methodiken ist das geringe Volumen der Methoden gemäß dem Stand der Technik ist die geringe Ausdehnung des untersuchten Gewebsvolumens. Dies liegt in der Größenordnung von lateral 500 x 500 µm und in der Tiefe 200 bis 400 µm. Die Begrenzung ist einerseits
20 wie bereits beschrieben durch die zu hohe Ortsauflösung begrenzt. Andererseits begrenzen auch die Datenmengen und -raten, die bei einer Echtzeitauswertung - wie sie für den Einsatz für die klinische Diagnostik und Früherkennung von Erkrankungen, insbesondere tumoröser Art notwendig ist - den höchst wünschenswerten klinischen Einsatz der Methodik.

25

Der vorliegenden Erfindung liegt das Problem zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur optischen Charakterisierung von Gewebe anzugeben, das eine zuverlässigere Unterscheidung von gesundem und erkranktem Gewebe als bisher möglich erlaubt.

30 Die vorgenannte Problem wrd durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1, durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 33, durch die Vorrichtung gemäß dem Anspruch 46 sowie die Vorrichtung gemäß dem Anspruch 61 gelöst. Besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

35

Danach wird ein Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem menschlichen oder tierischen Gewebe angegeben, das die Schritte aufweist:

- Bereitstellen einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter elektromagnetischer Strahlung;

- 5 - Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes mit der Strahlung, wodurch im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstrahlung erzeugt wird, wobei die in das Gewebe eingedrungene Strahlung innerhalb eines sich quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung erstreckenden Anregungsbereiches eine ausreichende Intensität aufweist, um im Gewebe eine charakteristische Rückstrahlung anzuregen, wobei
- 10 - der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung ein derartiges Intensitätsprofil quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung aufgeprägt wird, dass der Anregungsbereich eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes überdeckt und die angeregte Rückstrahlung auf zellübergreifende Gewebeeigenschaften zurückgeht.

Das erfindungsgemäße Verfahren legt die Grundlage für ein innovatives Fluoreszenzdiagnostisches, bildgebendes, nicht-invasives Tumordiagnoseverfahren, das zur Früherkennung und zum Screening (in vivo und in vitro) geeignet ist. Das Verfahren liefert die
15 Charakterisierung des Gewebe- bzw. Stoffwechszustandes und damit von krankhaften, insbesondere tumorösen Veränderungen mit einer an der klinischen Zielstellung orientierten Aussagekraft und Ortsauflösung, die dem Arzt derzeit nicht zur Verfügung steht. Der Gewebezustand wird aus den spektroskopischen Daten in suprazellulärer Mittelung bestimmt und dem Arzt in einem mehrere Millimeter umfassenden morphologischen
20 Schnittbild dargestellt, das eine Bewertung von Tumoren hinsichtlich ihrer Ausdehnung, Position und Aggressivität erlaubt.

Dem Patienten nutzen vor allem die verbesserte Früherkennung und Diagnostik. Durch diese können operative Eingriffe vermieden oder – im Falle der Lokalisierung von Frühstadien – durch minimal-invasive Methoden deutlich reduziert werden. Die Krankenversicherung spart Behandlungskosten durch im Vergleich zu den bisher unvermeidlichen Biopsien um zwei Drittel verringerte Kosten sowie durch deutliche Reduktion von Zahl und Schwere der operativen Eingriffe. Soweit chirurgische Eingriffe nicht vermieden oder durch minimal-invasive Methoden, wie PDT (Photo-dynamische Therapie) ersetzt werden
30 können, werden die Schwere des Eingriffs und seine heilungsbezogenen und ästhetischen Auswirkungen deutlich verringert, weil die Abgrenzung zwischen gesundem und krankem Gewebe bedeutend exakter erfolgen kann als bisher.

Die neuartige Methode lässt sich aber auch für andere Mess- und Charakterisierungsaufgaben z. B. im Bereich der Pathologie, Biochemie, Biotechnologie, für lebende oder nicht vitale organische sowie für anorganische Stoffe in festem oder flüssigem Zustand vorteilhaft einsetzen. Der besseren Verständlichkeit halber sind im Folgenden alle Spezifika am Beispiel der Fluoreszenzdiagnose von Tumoren dargestellt, ohne damit die Allgemeingültigkeit und Breite des Erfindungsgedankens einschränken zu wollen.

Neben dem zunächst dargestellten Einsatzgebiet im Bereich der Haut sind weitere Anwendungsbereiche im Bereich der zugänglichen Körperhöhlen (HNO, Gynäkologie) und im endoskopisch zugänglichen Körperinneren (Gastro-Entereologie, Urologie, Bronchoskopie) Teil des Anwendungsgebietes der Erfindung.

In der Behandlung bösartiger Erkrankungen ist eine frühzeitige Erkennung, neben den Krebs-Frühestadien, vor allem der Vorstufen, für die Aussichten auf Heilung von ganz entscheidender Bedeutung. Zudem steigt durch die zunehmende Lebenserwartung die Inzidenz solcher Krebs-Vorstufen, was durch die Lebensgewohnheiten, wie z.B. intensive Sonnenbestrahlung, Erkrankungen durch sexuell übertragbare Viren und Umwelttoxene noch verstärkt wird. Als Beispiele seien hier genannt:

- a) die aktinische Keratose, eine durch additive UV-Exposition ausgelöste Erkrankung, die in einen Hautkrebs, das Plattenepithelkarzinom übergehen kann und
- b) die durch HPV-Viren ausgelösten genitalen Feigwarzen, „Condylome“, die nicht nur bei Frauen für die Auslösung des Gebärmutterhalskrebs verantwortlich sind, sondern auch bei Männern und Frauen Krebse der Anogenital-Region induzieren können.

Während eine manifeste Krebserkrankung häufig eindeutig erkannt werden kann („Blickdiagnose“ in ca. 50 % der Erkrankungen), sind deren Vorstufen und ganz frühen Stadien bei der visuellen Diagnose häufig unauffällig. Dies ist ein Grund dafür, weshalb Screening-Untersuchungen nicht den gewünschten Effekt erbringen. Sie können entweder „falsch negativ“ sein, also eine vorhandene Krebserkrankung nicht rechtzeitig erkennen und damit die Chancen einer Heilung durch minimal-invasive Behandlungen verpassen. Ebenso ungünstig sind „falsch positive“ Diagnosen, welche neben der erheblichen psychischen Belastung der Patienten bis zum Ausschluss einer Krebsdiagnose auch viele aufwendige Untersuchungen nach sich ziehen, die nicht nur die Patienten zusätzlich belasten und gefährden, sondern auch erhebliche Folgekosten verursachen.

Andererseits gewinnen in der Behandlung epithelialer Tumoren minimal-invasive Verfahren wie die Cryotherapie sowie die Photodynamische Therapie und neuerdings auch die medikamentöse Behandlung (Wirkstoff Imiquimod) eine immer stärkere Bedeutung. Da diese Behandlungsverfahren aber ohne Herausschneiden („Exzision“) arbeiten, fehlt ihnen die Möglichkeit der histologischen Untersuchung, mit der nicht nur die Diagnose gesichert wird, sondern auch Informationen über die Aggressivität des Tumors („Grading“), und über das Überschreiten der Grenzstrukturen und das Eindringen in das benachbarte

Gewebe („Staging“) erhalten werden. Voraussetzung für ein Screening sind deshalb neben der eindeutigen Diagnosestellung durch die räumliche Zuordnung der Fluoreszenz auch eine Aussage über die Ausbreitung und den Invasionsgrad.

5 Daraus ergibt sich, dass erfindungsgemäße Verfahren die medizinisch-diagnostischen Verfahrensanforderungen nach einer orts aufgelösten Diagnose eingebettet in den morphologischen Rahmen des Untersuchungsgebietes vorteilhaft erfüllt, dessen Dimensionen entsprechend den klinischen Erfahrungen 4 mm lateral und 0,5 mm in der Tiefe nicht unterschreiten sollten.

10

In einer bevorzugten Weiterbildung des Verfahrens besteht das Aufprägen des Intensitätsprofils darin, die Strahlung über ein Objektiv in das Gewebe abzubilden. Dabei besitzt das Objektiv eine numerische Apertur von näherungsweise 0,3 bis 1,5.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausbildung der Erfindung besteht das Aufprägen des Intensitätsprofils darin, die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung in mindestens zwei Teilstrahlen aufzuteilen, wobei der Anregungsbereich durch die Lage der Teilstrahlen festgelegt ist. Vorteilhafterweise werden die Teilstrahlen jeweils so in das Gewebe fokussiert, dass die Fokuspunkte für die Teilstrahlen beabstandet zueinander sind.

20

Der Grundgedanke dieser Weiterbildung der Erfindung besteht darin, dass aus dem von der Strahlquelle generierten Anregungsstrahl mehrere, sich in ihrer Richtung unterscheidende Teilstrahlen geformt werden. Mit einer Fokussierungsoptik entsteht in deren Fokusebene entsprechend der Anzahl und Anordnung der Teilstrahlen ein Bündel von Foki. Wird deren Abstand in der Fokalebene geeignet eingestellt, so ergibt sich entlang der Ausbreitungsrichtung der Anregungsstrahlung eine von der Zahl der Teilstrahlen zumindest annähernd unabhängige Begrenzung des Mehrphotonen-Anregungsgebietes.

25

30

Besonders vorteilhaft ist, wenn die Rückstrahlung ein Fluoreszenzsignal, z.B. eine Zwei- oder Mehr-Photonen-Fluoreszenz ist. Die bisherigen Verfahren der klinischen Fluoreszenzdiagnostik, sowohl der Auto- als auch der Xenofluoreszenz, erfassen nur ein Summenbild oberflächlicher Gewebsschichten. Die Anregung erfolgt mit kurzwelligem UV- bzw. Blaulicht, wobei durch Auslöschung durch darüber liegendes nicht-stoffwechselaktives Nekrosegewebe ein „falsch negativer“ Befund erhoben werden kann, oder bei Tumorausbreitung unter die gesunde Haut die tatsächliche Ausbreitung und damit die Bestimmung der Tumorgöße falsch eingeschätzt wird. Diese Nachteile lassen sich durch enge räumliche Begrenzung einer NIR-Mehrphotonenanregung mit Lasern überwinden.

35

Die in den letzten Jahren entwickelten Verfahren der Multiphotonen-Mikroskopie nutzen diesen Weg der Anregung von Fluophoren im Gewebe. Sie zielen auf hohe Ortsauflösungen ($<1 \mu\text{m}$) zur Untersuchung zellbiologischer Vorgänge in subzellulärer Dimension ab. Die dafür eingesetzten Methoden der scannenden Mikroskopie limitieren das Abtastvolumen auf Gesichtsfeldabmessungen und Scantiefen in der Größenordnung von einigen hundert Mikrometern. Diese Werte lassen sich – anders als beim erfindungsgemäßen Verfahren - prinzipbedingt nicht auf die für den klinischen Einsatz geforderten oben genannten Dimensionen des Scanvolumens ausdehnen.

10 Darüber hinaus erlaubt die subzelluläre Auflösung der konventionellen Verfahren – anders als bei der suprazellulären Auflösung des erfindungsgemäßen Verfahrens – nicht die Ermittlung der Korrelation zwischen den Fluoreszenzspektren endogener Fluophore und den pathologischen Zuständen entsprechender Zellbereiche. Die Multiphotonen-Mikroskopie ist zu einem wirkungsvollen Instrument der zellbiologischen Forschung ge-
15 reift. Der klinische Einsatz zum Tomorstaging ist nicht ihr eigentliches Einsatzgebiet.

Das Verfahren dient im Bereich der Tumordiagnostik dem Zweck, die Zahl der tatsächlich erforderlichen operativen Eingriffe drastisch zu verringern. Zuvorderst sind Hauttumore im Fokus der Behandlung, da diese ohne weiteres von außen zugänglich
20 sind. Weitergehender, z. T. noch bedeutenderer Anwendungen ergeben sich intra- und extrakorporal durch endoskopische und intraoperative Applikatoreinrichtung mit integrierter Scanfunktion.

Bei entsprechender erfindungsgemäß vorgesehener Erweiterung und Miniaturisierung liegen auch in der endoskopische Diagnostik, vor allem für die Gynäkologie und HNO-Heilkunde, weitreichende Zukunfts-Potenziale für die Erfindung. Insbesondere die Differentialdiagnose der Gebärmutterhalserkrankungen und sonstiger durch humane Papillomaviren induzierten Erkrankungen, aber auch oraler Leukoplakien und der lichenoiden Krebsvorstufen sind sehr ernstzunehmende Anwendungsgebiete der Erfindung.

30 Für das Tumorstaging und damit die Indikationsstellung zu minimal-invasiven Verfahren ist neben der Tumorgöße die Ausbreitungstiefe und die Stromainvasion von viel entscheidenderer Bedeutung. Die bisherigen Schnittbildverfahren, wie MRT, sind von ihrer räumlichen Auflösung nicht dazu in der Lage. Die hochauflösende Sonographie mit 100
35 MHz ist mit sehr vielen Störfaktoren behaftet, allein schon dadurch, dass sie als Kontaktverfahren bei unterschiedlichem Schallkopf-Auflagedruck unterschiedliche Dickenmessungen verursacht. Die optische Kohärenz-Tomographie (OCT) könnte aufgrund ihrer hohen Auflösung dafür eine Lösung darstellen. Jedoch haben die bisherigen Erfahrungen mit allen drei Verfahren gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen Schwellung,

Entzündung und kanzerogen-pathologischem Befund („Dignität“) nicht allein anhand morphologischer Information möglich ist.

5 Deshalb ist einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens die fluoreszenzspektroskopische, ortsaufgelöste Funktionaldiagnose in eine morphologische Darstellung des Untersuchungsgebietes eingebunden. Dazu wird die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung zur zusätzlichen Charakterisierung des Gewebes per Kohärenz-Reflektometrie in einen Anregungsstrahl zur Anregung einer Fluoreszenz in dem Gewebe und einen Referenzstrahl aufgeteilt, wobei der Anregungsstrahl zum Teil vom Gewebe zurückreflektiert und der Referenzstrahl mit der vom Gewebe zurückreflektierten Strahlung überlagert wird.

15 Besonders bevorzugt weist das der von der Strahlquelle ausgehenden Strahlung aufgeprägte Intensitätsprofil einen charakteristischen Verlauf mit mindestens zwei Intensitätsmaxima auf. Dieser „Fingerprint“ des Strahls kann dazu genutzt werden, die optischen Weglängen für den Referenzstrahl und des reflektierten Strahls abzugleichen. Dazu wird in vorteilhafter Weise die optische Weglänge für den Referenzstrahl so eingestellt, dass sich die auf die von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung aufgeprägte Intensitätsverteilung im Interferenzdetektor nachweisen lässt, wobei in diesem Fall die optische Weglänge für den Referenzstrahl der vom Anregungsstrahl zurückgelegten optischen Weglänge von der Strahlquelle bis zum Fokus und zurück bis zum Interferenzdetektor entspricht.

25 Will man Mehrphotonen-Anregungsprozesse mit der optischen Kohärenz-Reflektometrie kombinieren, um so zusätzliche Informationen über den Ort der Anregung zu gewinnen, so ergibt sich das Problem der räumlichen Zuordnung der beiden Prozesse bzw. Informationen. Es besteht besonders im Fall von optisch inhomogenen Proben (z.B. Gewebe) darin, dass der inhomogene Brechungsindex des Materials den Ort der Mehrphotonen-Anregung und das Signal optischen Kohärenz-Reflektometrie in unterschiedlicher Weise beeinflusst: In den Weg des Anregungslichtes geht die Brechkraft bis zum Ort der Anregung (Fokus) in die Tiefe des Materials nur einmal ein. Detektiert die rückgestreuten Signale mit der Methode der optischen Kohärenz-Reflektometrie, so geht in deren Strahlengang der Brechungsindex zweimal ein, indem das Licht auf dem Hin- und auf dem Rückweg das Material durchdringen muss. Somit fehlt für die wünschenswerte Kombination von Mehrphotonen-Anregung und optischer Kohärenz-Reflektometrie die räumliche Zuordnung zueinander insbesondere entlang der Ausbreitungsrichtung der Anregungsstrahlung.

35 Zusammenfassend gibt es für die Kombination von Fluoreszenzspektroskopie und Kohärenzspektroskopie insbesondere die bevorzugte Weiterbildung

- Dass die Strahlung eines zur Anregung von Zwei- oder Mehrphotonenprozessen und/oder zur optischen Kohärenz-Reflektometrie geeigneten Lasers in einen Anregungs- und einen Referenzstrahl aufgeteilt wird,
- 5 • Dass dem Anregungsstrahl quer zu seiner Ausbreitungsrichtung eine solche Struktur aufgeprägt wird, dass sich nur in der Fokalebene der nachfolgenden Optik oder in deren unmittelbarer Umgebung quer zur Ausbreitungsrichtung des Anregungslichtes eine Intensitätsstruktur mit mindestens zwei Maxima getrennt durch ein Minimum herausbildet,
- 10 • Dass dieser Fokalebereich mit jener Region übereinstimmt, in der vorrangig die gewünschten Zwei- oder Mehrphotonenprozesse stattfinden,
- Dass der strukturierte Anregungsstrahl mittels einer geeigneten Optik in das anzuregende oder bzw. und zu untersuchende Target fokussiert wird,
- Dass die im Target entstehende rückgestreute Strahlung von der Fokussieroptik aufgefangen und sich der ursprünglichen Ausbreitungsrichtung der Anregungslichtes entgegengesetzt ausbreitet,
- 15 • Dass auf diesem Weg ein geeignetes optisches Umlenkelement eingebracht wird, ohne dass diese rückgestreuten Strahlung erneut jenes Element durchläuft, dass dem Anregungsstrahl seine Struktur quer zu seiner Ausbreitungsrichtung aufgeprägt hat,
- 20 • Dass die rückgestreute Strahlung in einer zur der Fokalebene optisch konjugierten Fläche mit dem Referenzstrahl derart zur Interferenz gebracht wird, dass die zu den beleuchteten Punkten des Targets konjugiert liegenden Punkte vom Referenzstrahl vollständig erfasst werden,
- Dass das dort entstehende Interferenzmuster mit einem ortsauflösenden lichtempfindlichen Detektor erfasst und ausgewertet wird,
- 25 • Dass die optische Weglänge des Referenzstrahles verändert werden kann, und
- dass als Anzeige für die Übereinstimmung des Ortes der Zwei- oder Mehrphotonenanregung mit jenem Ort, von dem die rückgestreuten optischen Signale stammen, das Bild des Interferenzmusters genommen wird, indem sich jene
- 30 Struktur widerspiegelt, die nur im Fokalebereich der Anregungsstrahlung hervortritt.

Der Grundgedanke der Erfindung besteht darin, dass dem Anregungsstrahl eine Struktur aufgeprägt wird, die nur im Fokus – also am Ort der Multiphotonen-Anregung – hervortritt, bzw. sich mit der Ausbreitungslänge derart ändert, dass in der Umgebung des Fokus eine detektierbare Veränderung in dieser Struktur oder genauer ihres Abbildes hervortritt.

35 Die Interferenz des rückgestreuten Lichtes in einer zur Anregungsebene optisch konjugierten Ebene wird genau ein Abbild dieser Struktur aufweisen. Mit einem ortsauflösenden Nachweiselement für das Interferenzsignal kann nun der Referenzstrahlengang in seiner Länge angepasst werden, bis die zu erwartende Struktur im Interferenzmuster

hervortritt. Dies ist der Indikator für die Überlagerung des Ortes der Multiphotonenanregung mit dem der morphologischen Abtastung mittels optischer Kohärenz-Reflektometrie.

5 Zusammenfassend bieten sich insbesondere die folgenden Vorteile:

- Die charakteristisch unterschiedlichen Fluoreszenzkurven von tumorösem und normalem Gewebe erlauben eine Gewebsdiagnose mit signifikanter Selektivität und Spezifität,
- Das Gewebe wird mit einer für das Verfahren dienlichen Fokusgröße im supra-
- 10 zellulären Bereich abgescannt, so dass eine lokale Bewertung des Gewebestoffwechsels in Echtzeit in dienlicher Auflösung möglich wird,
- Als eine vorteilhafte Gruppe von Ausprägungen wird die Größe des abtastenden Fokus von der Größe des einem Scanpunkt zuzuordnenden „Scanvolumens“ entkoppelt. Dadurch werden ungünstige Restriktionen erfindungsgemäß aufgehoben,
- 15 die bei den bisher bekannten optischen Diagnoseverfahren dem hier angestrebten Einsatzzweck im Wege standen.
- Durch besondere Referenzierungsverfahren wird ein lokaler Dignitätskennwert ermittelt („spektraler Fingerabdruck“), der den Stoffwechselstatus, den Grad der Gefäßneubildung oder den Strukturierungsstatus des betrachteten Gewebsareals weitgehend unabhängig von Störgrößen beschreibt und eine automatische präpathologische Bewertung ermöglicht,
- 20
- Die Kombination von räumlich aufgelöster, funktionaler Biostatusbewertung und morphologischer Bildgebung stellt einen qualitativen Sprung in der klinischen Diagnostik der oberen Hautschichten dar,
- 25
- Im Besonderen wird durch Parameterwahl und das spezielle Auswerteverfahren des Verfahrens eine ausreichende Eindringtiefe bis zur Basalmembran erreicht, so dass eine Unterscheidung zwischen unterschiedlich invasiven Formen kanzerogener Erscheinungen möglich wird.

30 Die Strahlquelle wird somit sowohl für die Multiphotonen-Anregung als auch für optische Kohärenz-Reflektometrie eingesetzt. Gegebenenfalls sind die spektralen Eigenschaften der Quelle so zu gestalten, dass sie die gewünschte Tiefenauflösung (Auflösung entlang der Strahlungsausbreitung) ermöglicht. Diese Strahlung wird in einen Anregungsstrahl und einen Referenzstrahl mit einem teildurchlässigen Spiegel geteilt. Beide Strahlen

35 können noch mit Modulatoren versehen werden, die die Intensität nicht jedoch die optische Weglänge zeitlich modulieren.

Eine besonders bevorzugte Variante des Verfahrens sieht vor, dass

- 5
- a) das Bestrahlen des Gewebes mit Strahlung im Wellenlängenbereich von 720-800 nm erfolgt, wodurch im Gewebe eine Zweiphotonen-Fluoreszenz angeregt wird;
 - b) Detektieren der Intensität eines ersten Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge von 460 ± 30 nm und eines zweiten Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge von 550 ± 30 nm;
 - c) Bestimmen des Verhältnisses der Intensitäten des ersten und zweiten Fluoreszenzsignals; und
 - 10 d) in Abhängigkeit von dem in Schritt c) bestimmten Verhältnis ein Signal erzeugt wird.

15 Dabei ist der Wellenlängenbereich bei 460 ± 30 nm signifikant für NAD(P)H und der Wellenlängenbereich bei 550 ± 30 nm signifikant für Flavine. Die Bildung des Verhältnisses der Messwerte aus (a) und (b) dient zur Referenzierung der Störfaktoren und Gewinnung eines Aktivitätssignals für die Stoffwechselaktivität, das sich signifikant zwischen normalem und pathologischen Gewebsvolumina gleicher Art unterscheidet.

Eine weitere, bevorzugte Variante sieht vor, dass

- 20
- a) das Gewebe mit Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 500-550 nm bestrahlt wird, und dabei
 - b) eine erste Intensität einer Zweiphotonen-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 340 ± 40 nm (signifikant für Tryptophan) detektiert wird;
 - c) das Gewebe mit Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 720-800 nm bestrahlt wird, und dabei
 - 25 d) eine zweite Intensität einer Zweiphotonen-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 460 ± 40 nm (signifikant für NAD(P)H) detektiert wird;
 - e) das Verhältnis der in Schritt b) bestimmten ersten Intensität und der in Schritt d) bestimmten zweiten Intensität bestimmt wird (zur Referenzierung der Störfaktoren und Gewinnung eines Kennwertes, der sich signifikant zwischen normalem und pathologischen Gewebsvolumina gleicher Art unterscheidet); und
 - 30 f) Erzeugen eines elektrischen Signals in Abhängigkeit von dem in Schritt c) bestimmten Verhältnis.
 - g) in Abhängigkeit von dem in Schritt f) bestimmten Verhältnis ein elektrisches Signal erzeugt wird.

35

Eine weitere, bevorzugte Variante des Verfahrens sieht die Schritte vor:

- Anregung der Zweiphotonen-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich 720-800 nm und Messung des Fluoreszenzsignals bei 460 ± 40 nm [signifikant für NAD(P)H] als Funktion der Gewebetiefe z erfolgt,
- 5 • Speicherung der Messwerte in einem als gesund bekannten Gewebsareal als Funktion der Tiefe (= „Normalverlauf“ als Funktion von z) und gleichartige Messung in einem Verdachtsareal (= „Verdachtsverlauf“ als Funktion von z),
- wobei anschließend die beiden Signalverläufe ins Verhältnis gesetzt werden (= „Indikatorverlauf“ als Funktion von z), und eine Schranke von 20-40% Abweichung des Indikators vom Wert Eins im Verdachtsareal als Indikationsgrenze für einen anomalen
10 Stoffwechsel verwendet werden, der sich signifikant zwischen normalem und pathologischen Gewebsvolumina gleicher Art unterscheidet.

Des Weiteren kann das Verfahren umfassen:

- 15 • Einstrahlung und Tiefenscan eines fokussierten Kurzpuls laserstrahls im Wellenlängenbereich 720-880 nm oder 980-1080 nm und Messung der remittierten Strahlung bei exakt der halben Einstrahlungswellenlänge [Indikator für Art und Struktur des Kollagens als Strukturmerkmal] als Funktion der Gewebetiefe z in einem in einem als gesund bekannten Gewebsareal als Funktion der Tiefe (= „Normalverlauf“ als Funktion von z) und
- 20 • gleichartige Messung in einem Verdachtsareal (= „Verdachtsverlauf“ als Funktion von z), wobei
- anschließend die beiden Signalverläufe ins Verhältnis gesetzt werden (= „Indikatorverlauf“ als Funktion von z), und eine Schranke von 30-50% Abweichung des Indikators vom Wert Eins im Verdachtsareal als Indikationsgrenze für eine
25 anomale Gewebestrukturierung verwendet werden, der sich signifikant zwischen normalem und pathologischen Gewebsvolumina gleicher Art unterscheidet.

30 Dabei kann der fokussierte Strahl wird mittels einer geeigneten (Abtast-) Einrichtung durch das Gewebe bewegt. Diese Bewegung kann in einer der folgenden Abtastmodi ausgeführt werden

- a) zweidimensional im Sinne einer horizontalen (= zur Gewebeoberfläche parallelen) Abtastebene,
- b) zweidimensional im Sinne einer vertikalen (= zur Gewebeoberfläche senkrechten) Abtastebene („optischer Ultraschall“)
- 35 c) dreidimensional im Sinne eines Abtastvolumens.

Ziel ist insbesondere das Auffinden von Tumoren im Frühstadium („Carcinoma in situ“) und die Abgrenzung gegen weiterentwickelte Stadien (Einwandern von Micro-Gefäßen, Durchbrechen der Basalmembran, Verlust der Gewebestrukturierung). Dabei werden folgende Erkenntnisse genutzt

- 5 a) Micro-Zirkulation wird am erhöhten Hemoglobin-Signal erkannt.
- b) Auflösung der Struktur wird am lokal abweichenden Gehalt an Elastin und/oder Kollagen erkannt.
- c) Das Durchbrechen der Basalmembran wird durch Fehlen der Papillenstruktur durch Bildauswertung erkannt.

10 Zur Unterdrückung von Störungen und zur Kompensation von Einflüssen unbekannter Skalierung einerseits der Messanordnung und andererseits der biologischen Materialien im Anregungs- und Mess-Strahlengang wird mit einer Referenzierung des Mess-Signals gearbeitet, bei der die Messdaten mindestens zweier signifikanter Stoffe herangezogen werden, hier insbesondere der Stoffgruppen NAD(P)H, Flavine und Tryptophan.

15 Als weitere signifikanzsteigernde Information werden morphologische Daten, wie der lokale Gehalt an Elastin oder Kollagen herangezogen, die sich durch eine eigene Fluoreszenzmerkmale (Elastin) oder durch nichtlineare Erzeugung eines Referenzsignals (bevorzugt SHG = Second Harmonic Generation = Frequenzverdoppelung der Anregungsstrahlung, bevorzugt bei Kollagen) nachweisen lassen.

20

Dem Arzt wird ein morphologisches Bild des untersuchten Gewebeareals am Monitor gezeigt. Dieses beruht auf der Auswertung der Signale der Strukturmoleküle (Elastin und/oder Kollagen) und der direkten Rückstrahlung der Anregungsstrahlung (Oberflächen-Reflex und Streuamplitude).

25

Ein „Gewebe-spektroskopischer Fingerabdruck“ wird durch die genannten Referenzierungen ermittelt und vom Rechner automatisch bewertet [zumindest zweiwertig (= „normal“ oder „abweichend“) oder dreiwertig (= „normal“, „abweichend“ oder „unklar/unbestimmt“)]. Die Bereiche abwechselnden Stoffwechsels werden im Monitorbild in

30

Falschfarbendarstellung wiedergegeben.

Geräteaufbau:

Das Gerät besteht aus einem Betriebsgerät mit Netzversorgung, Bedienelementen integriertem Rechner und angeschlossenem Monitor sowie dem Handstück mit Fokussier-
35 Optik und Scanner für die Anregungsstrahlung und den Elementen zum Sammeln der Mess-Strahlung (reflektierte und Streustrahl bei der Anregungswellenlänge, SHG-Strahlung bei der halben Anregungswellenlänge sowie der Fluoreszenzstrahlung).

Die Zuführung der Anregungsstrahlung geschieht entweder mittels Faseroptik, bevorzugt als Photonic Fibers, oder einem Gelenkarm. Dabei können Elemente der Zuführungsoptik für die Fluoreszenz-Anregungsstrahlung auch zum Sammeln der Mess-Strahlung verwendet werden.

5

Als eine besonders vorteilhafte Ausführungsform wird bei dem analog zum bildgebenden medizinischen Ultraschall ausgeprägten Abtastmethodik („Optischer Ultraschall“) eine im Bezug zum Handstück fixe Abtastebene vertikal in das Gewebe gelegt und vom Arzt, wie beim Ultraschall üblich durch das Gewebe bewegt. Das Schnittbild des Gewebes mit den genannten Zusatzinformationen („Fingerabdruck“ mit automatischer Bewertung) wird in Echtzeit im Bildschirm angezeigt.

Bei Betriebszuständen mit hoher Auflösung, wo die händische Positionierungsgenauigkeit nicht ausreicht oder die Unruhe durch die unwillkürliche Handbewegung für das Verfahren zu groß ist, wird das Handstück fest aufgesetzt und die Verschiebung der Abtastebene durch elektromotorische oder mikromechanische Stellelemente ausgeführt.

Als Strahlquelle wird bevorzugt ein Laser, insbesondere ein gepulster Laser eingesetzt. Eine mögliche Anregungsquelle, die mit Pulsen im Pikosekundenbereich arbeitet, erlaubt zudem durch die Verwendung einer photonischen Faser auch die Erzeugung breitbandigen Lichtes zur Anregung bei mehreren Farben. Eine derartige Lichtquelle ist bislang weder in der fluoreszenzbasierten Tumordiagnostik noch in der Mehrphotonenmikroskopie eingesetzt worden.

Das Verfahren grenzt sich von den bekannten Diagnoseverfahren dadurch ab, dass es die Dignität des Gewebezustandes in einem dreidimensionalen Scanbild der Haut bewertet und darstellt. Dabei ist die Auflösung so gewählt, dass -je nach betrachteter Gewebstiefe- eine Anzahl von ca. 20 bis 200000 Zellen zum lokalen Signal beitragen.

Damit grenzt sich das Verfahren von höher auflösenden Verfahren ab, die Gestalt, Teilungsverhalten und Stoffwechsel einzelner Tumorzellen mikroskopisch betrachten. Diese liefern labortechnisch und für die Forschung interessante Ergebnisse, sind jedoch für eine klinische Anwendung am Patienten nur sehr bedingt geeignet. Das für die genannten Laborverfahren notwendige hohe Auflösungsvermögen im Bereich von 1 μm erfordert ein Epi-Fluoreszenzmikroskop mit hoch-aperturiger optische Abbildung, was ohne Immobilisation des Patienten nicht möglich ist. Ferner ist die erreichbare Gewebstiefe deutlich limitiert. Um die hoch-detaillierte Information zu gewinnen und auszuwerten, benötigt man vergleichsweise lange Messzeiten, weshalb ein solches Verfahren für ein klinisches Staging -anders als das erfindungsgemäße Verfahren ungeeignet ist.

Das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren arbeitet vollkommen nicht-invasiv. Die Hautoberfläche wird nicht angetastet, so dass auch bei positivem Befund keine Gefahr besteht, durch das Verfahren das Ausschwemmen von Tochterzellen des Tumors auszulösen.

Die Kombination des Fluoreszenzverfahrens mit einem OCT-System liefert wegen des dreidimensionalen Scanvorgangs ein 3D-OCT, so dass simultan dasselbe Gewebsvolumen („Scan-Volumen“) einerseits in hinreichender Auflösung auf seine Dignität bewertet und andererseits morphologisch abgebildet wird. Der untersuchende Arzt erhält daher eine vollständige dreidimensionale Bild des Gewebes und seines bewerteten Stoffwechszustandes.

Das Verfahren wurde in Bezug auf Haut als relativ leicht zugänglichen Organ dargestellt. Es weist jedoch deutliches Potential zur Weiterentwicklung für andere medizinische und labortechnische Anwendungsgebiete auf.

In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem Gewebe angegeben, das die Schritte aufweist:

- Bereitstellen einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter Strahlung;
- Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes mit der Strahlung an einer Messstelle, wodurch im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstreuung angeregt wird, wobei
- die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung quer zur Ausbreitungsrichtung periodisch so abgelenkt wird, dass die Strahlung einen Bereich des Gewebes um die Messstelle herum periodisch abtastet, der sich über eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes erstreckt.

Häufig ist vorgesehen, die Information zu einem Objektpunkt aus der Integration des Fluoreszenzsignales einer großen Zahl von Anregungspulsen zu entnehmen. Um aus dem langgestreckten Anregungsfokus ein Anregungsvolumen etwa gleicher lateraler Ausdehnung zu bekommen, wird der Strahl lateral in x und y-Richtung (Strahlachse ist in z-Richtung gewählt) mit hoher Geschwindigkeit bewegt, wodurch die Fluoreszenz aus einer hohen Zahl von Anregungspulsen zu einem Objektpunkt kompakt genutzt werden kann.

Da die Frequenz der Repetitionsrate des Lasers üblicherweise im Bereich 80 Mhz liegt, kommen als Mittel für das „Wobbling“ konventionelle mechanische Scanner nicht in Fra-

ge. Vielmehr wird hier auf eine Lösung im Sinne der Mikrosystemtechnik oder Mikromechanik zurückgegriffen.

5 Abweichend zur üblichen Bauform von Mikroscoannern, bei denen ein einachsig oder
zweiachsig kardanisch aufgehängter Spiegel über ein elektromagnetisches Feld gegen
die Rückstellkraft der blattfederartigen Trägerelemente des Spiegels geregelt ausgelenkt
wird, kann hier eine resonante Ansteuerung vorgesehen werden. Dafür wird die mecha-
nische Resonanzfrequenz der Spiegelanordnung durch geeignete Wahl der Torsionsfe-
dermomentes und des Trägheitsmomentes so bestimmt, dass die gewünschte Schwin-
10 gungsfrequenz entsteht. Genau mit dieser dieser Resonanzfrequenz wird auch mit einem
elektrischen oder magnetischen Feld angeregt angeregt. Dadurch entsteht eine sinus-
förmige Schwingung des Spiegels und eine entsprechende Bewegung des Fokus in einer
Achse. Soll in zwei Achsen „gewobbelt“ werden, so werden die Resonanzfrequenzen der
beiden senkrecht zueinander stehenden Schwingungsachsen in unterschiedlichen Torsi-
15 ons- und Trägheitsmomenten ausgelegt, so dass zwei unterschiedliche Resonanzfre-
quenzen in beiden Achsen x und y entstehen. Dabei wird die niederfrequente Achse so
ausgelegt, dass die Schwingung ca. 6- bis 15-mal langsamer erfolgt als in der höherfre-
quenten Richtung.

20 Somit bewegt sich der Scanspot mit einer Lissajous-Figur über das Objektfeld in x- und
y-Richtung und tastet dieses Feld in etwa gleichmäßig ab. Diese resonante Anregung in
eine Achse oder in zwei Achsen wird im weiteren Text „asynchrone zweiachsige harmo-
nische Ansteuerung genannt“. Alternativ sind Ablenkungen unter Nutzung des Pockels-
oder Kerr-Effekt möglich.

25

Eine weitere Variante ist die aktive Phasenmodulation eines Reflexes mit Hilfe eines mik-
romechanischen Aktuators. Dazu wird mikromechanisch ein Feld von freischwingenden
Spiegeln erzeugt, die jeweils in 3 oder 4 Laschenpunkten aufgehängt sind. Die Träger-
bänder dieser einzelnen und untereinander gleichen Phasen-Aktuatoren sind gleichmä-
30 ßig ausgeführt und weisen eine im Vergleich zur Breite geringe Dicke auf. Dadurch las-
sen sie sich senkrecht zur Spiegelfläche leicht auslenken, ohne zu verkippen, so dass
ihre Lage parallel zur Ruhestellung auch bei Auslenkung erhalten bleibt.

In der Substratschicht unter den Spiegelflächen wird ein Elektrodenfeld so angebracht,
35 dass in x-y-Richtung je Spiegelemente eine darunter positionierte Elektroden vorliegt.
Die Spiegel selbst erhalten unterseitig ebenfalls eine leitfähige Kontaktfläche.

Durch Ansteuerung der einzelnen Elektroden wird über elektrostatische Kräfte eine Auf-
und Abbewegung der Spiegelemente ohne Torsion erreicht. Dadurch kann eine effekti-

ve Höhenlage jedes einzelnen Punktes singulär angesteuert werden. Dies ermöglicht bei einer Reflexion eine Phasenschiebung, die ortsabhängig eingestellt werden kann. Die Auslenkung der Spiegel muss zu ihrer optimalen Wirksamkeit bei einer üblichen Wellenlänge im sichtbaren Bereich (400-1500 μm) für eine komplette Phasenauslöschung nur
5 200 bis 750 nm betragen. Dies ist durch eine geeignete Auslegung der Trägerlaschen ohne Probleme zu gewährleisten.

Wesentlich bei der Erzeugung von Teilstrahlen ist, dass in jedem Teilstrahl die Bedingungen derart eingestellt werden, dass mit der gewählten Optik im Fokus die gewünschte
10 te Intensität der Anregungsstrahlung erreicht wird und dass die Teilstrahlen derart eingestellt werden, dass jeder von ihnen mit der gewählten Fokussierungsoptik einen von den Foki der anderen Teilstrahlen getrennten Fokus in der Bildebene der Optik ausbildet. Des Weiteren wird der Abstand dieser mindestens zwei Foki in der Bildebene derart ein-
15 gestellt wird, dass deren Überlagerung entlang der Ausbreitungsrichtung der Anregungsstrahlung insbesondere in der Nähe des Fokus jedes Teilstrahles einen wählbaren Bruchteil der Intensität der Anregungsstrahlung im Fokus nicht überschreitet.

Zusammenfassend ist bevorzugt vorgesehen, dass

- das optische Element zur Aufteilung in die gewünschte Anzahl von Teilstrahlen
20 derart als Stullelement ausgeführt wird, dass die Anzahl der Teilstrahlen und der Abstand ihre Foki gewählt werden kann dass mit einem geeigneten optischen Element die Teilstrahlen oder der Gesamtstrahl in ihrer Intensität derart modifiziert werden können, dass für die Intensitäten im Fokus jedes Teilstrahles entsprechend den Erfordernissen des Zwei- oder Mehrphotonenanregungsprozesses ein
25 geeigneter Wert eingestellt werden kann,
- dass das optische Element zur Aufteilung in die gewünschte Anzahl von Teilstrahlen oder ein zusätzliches optisches Element eine mit der Zeit veränderbare Ablenkung oder Anordnung der Teilstrahlen ermöglicht, die in der Bildebene des Objektivs eine entsprechende mit der Zeit veränderte Variation des Anregungsgebietes oder Teilen davon ermöglicht,
30
- dass durch eine solche Anordnung die entstehende zeitliche Veränderung des Anregungsgebietes dazu genutzt wird, die durch die Anordnung der Teilstrahlen entstehenden Lücken des Anregungsgebietes in der Fokalregion auszugleichen.
- dass die Formgebung des Anregungsvolumens durch „Microwobbling“ erzielt wird
- 35 • dass die gewünschten Bewegungen durch mechanische oder elektromagnetische Effekte, wie Pockels- oder Kerreffekt erzielt wird
- dass mikromechanische Elemente zur schnellen Mikrobewegung des Fokus (oder zur Phasensteuerung verwendet werden.

Für einen sicheren Betrieb einer Vorrichtung zur optischen Gewebeuntersuchung gibt es folgende grundsätzliche Forderungen:

- A. Im regulären Betrieb dürfen keinerlei Schädigungen für den Patienten auftreten
- 5 B. Im „Ein-Fehler-Fall“ dürfen ebenfalls keine Schädigungen für den Patienten eintreten
- C. Für den ungünstigsten anzunehmenden Fall aus der Kombination mehrerer Fehlfunktionen werden die Folgewirkungen diskutiert. Eine Schädigung des Patienten mit Krankheitswert muss ausgeschlossen sein.

10

Die drei Forderungen werden in den folgenden Abschnitten als Risikoanalyse gemäß ISO 14191 separat bewertet. Ein anschließendes Fazit fasst die Sicherheitsbewertung zusammen.

- 15 Beschreibung des regulären Betriebes (Fall A):
Kategorien:

Im Regelbetrieb führt eine erfindungsgemäße Vorrichtung eine Scanbewegung aus, indem der Fokus des Lasers lateral und in der Tiefe durch das Gewebe bewegt und durch
20 eine Intensitätsregelung die Abschwächung des Strahles im Gewebe ausgeglichen und die Intensität im Fokus konstant gehalten wird. Aus Sicherheitsgründen muss gefordert werden, dass einerseits ein Einzelpuls keine Schädigung verursacht. Andererseits darf die überlagerte Wirkung der Folgepulse sowie die während der Anwendung im Gewebe akkumulierte Energie nicht zu Schädigungen führen.

25

Beim Einzelpuls müssen adiabatische thermische Effekte, der Einfluss der Photochemie sowie intra- und intermolekulare Übergangszeiten aufgrund der schnellen energetischen Anregungsvorgänge betrachtet werden. Da die höchste Anregungsintensität im Fokus der Laserstrahlung liegt, sind die kennzeichnenden Größen hier die Volumendichte der
30 absorbierten Pulsenergie und der absorbierten Pulsspitzenleistung im Fokusbereich. Wärmeleitungsvorgänge können ausser Betracht bleiben.

Für die Bewertung der überlagerten Wirkung der Folgepulse ist die absorbierte Energie der Einzelpulse auf das durch die Scanbewegung überstrichene Volumen zu beziehen.

35 Für den Fall, dass sich die Anregungsvolumina der Einzelpulse überlappen, kann es hierbei zu einer höheren Belastung als durch einen einzelnen Puls kommen.

Während in den beiden obigen Fällen die Absorption der Strahlung im Fokusbereich betrachtet wird, muss zur Beurteilung der Wirkung der im Gewebe akkumulierten Ener-

gie die starke Streuung des Gewebes berücksichtigt werden. Sie führt dazu, dass selbst im Wellenlängenbereich des optischen Fensters bei vergleichsweise geringer Absorption die Strahlung ein begrenztes Gewebevolument nicht verlässt und letztlich in diesem Volumen absorbiert wird. Kennzeichnend ist hier die mittlere Leistung sowie Wärmetransportvorgänge im Gewebe, d.h. die Wärmeleitung und Wärmeabtransport durch Blutzirkulation sind zu berücksichtigen.

Nichtthermische Wirkungen:

10 Aufgrund der geringen Photonenenergie ($\sim 10^4 \text{ cm}^{-1}$) und Leistungsdichte ($\sim 10^{11} \text{ W/cm}^2$) können Schädigungen durch Bindungsbruch ausgeschlossen werden. Schädigungen durch Temperaturgradienten bei Erwärmung im ps-Zeitbereich sind nicht bekannt, daher konzentriert sich die Abschätzung der Gewebeschädigung im Folgenden auf die rein thermische Belastung.

15 Abschätzung und Bewertung der thermischen Belastung des Gewebes:

Bei der Bewertung der schädlichen Nebenwirkungen müssen sowohl die Absorptions- als auch die Streueigenschaften des Gewebes berücksichtigt werden. In dem vorgesehenen Wellenlängenbereich der Strahlung ist der Wirkungsquerschnitt für Streuprozesse um ein bis zwei Größenordnungen höher, als der für die Absorption des Lichtes. Für 1064 nm wird ein Absorptionskoeffizient von 4 cm^{-1} für die reine Absorption und 5 cm^{-1} als effektiver Wirkungsquerschnitt für die Kombination aus Absorption und Streuung angegeben. Die Eindringtiefe (Abfall der Intensität auf $1/e$) wird mit 4 mm beziffert. Temperaturänderungen ergeben sich aufgrund der kurzen Pulsdauer ($\sim 1 \text{ ps}$) zunächst adiabatisch aus der absorbierten Energie geteilt durch die Wärmekapazität des Gewebes. Als konservative Abschätzung soll hier der kleinste Wert für die Wärmekapazität ($1930 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für Fettgewebe) angenommen werden. Die Temperaturunterschiede gleichen sich dann für längere Zeiten durch die Wärmeleitfähigkeit des Gewebes wieder aus. Auch hier wird für die Abschätzung der kleinste Wert ($\lambda = 0.3 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ in Fett) angenommen.

30 Für die Abschätzung der adiabatischen Wirkung eines Einzelpulses reicht es, den Ort der maximal auftretenden Intensität zu betrachten. Dieser liegt im Fokus, wo sich die gesamte dort während eines Laserpulses absorbierte Energie adiabatisch, d.h. ohne Wärmeaustausch mit der Umgebung, akkumuliert. Aufgrund der Intensitätsregelung ist diese Intensität für alle Scanpositionen, d.h. für alle Tiefen im Gewebe, identisch. Ein Energieübertrag geschieht nur durch lineare und nichtlineare Absorption; Streuung braucht in der Rechnung nicht berücksichtigt zu werden. Unter der Annahme einer Absorption von 50% pro mm und der o.g. Wärmekapazität ergibt sich aus den vorgesehe-

nen Geräteparametern eine Erwärmung des Fokusvolumens um 2.6 °C durch einen einzelnen Laserpuls.

- 5 Für die Bewertung der überlagerten Wirkung der Folgepulse während des lateralen Scanvorganges ist z.B. die absorbierte Energie aller Pulse zu berücksichtigen, die während 100 µm Scanstrecke auf das Gewebe auftreffen. Diese ist auf das entsprechende Scanvolumen (Breite: Taillendurchmesser, Tiefe: doppelte Rayleighlänge 100 µm) zu beziehen. Als konservative Abschätzung soll auch diese Betrachtung adiabatisch durchgeführt werden, obwohl es in dem Zeitraum zwischen zwei Pulsen zu einer geringfügigen
- 10 Verteilung der eingetragenen Wärme in Gewebe kommt. Die Berechnung mit o.g. Werten ergibt eine Erwärmung des Gewebes um 4.7 °C im Fokalbereich des Lasers bei einmaligem lateralen Überstreichen mit dem Messfleck. Da der Scanvorgang ‚zeilenweise‘ erfolgt, d.h. der Messfleck erst in einer festen Tiefe lateral durch das Gewebe bewegt wird, bevor in einer neuen Tiefe die nächste ‚Zeile‘ gemessen wird, ist die überlagerte
- 15 Wirkung der Pulse in der Tiefe nicht adiabatisch abzuschätzen. In dem Zeitraum zwischen zwei ‚Zeilen‘ findet eine Diffusion der Wärme in ein größeres Volumen statt, so dass die überlagerte Wirkung zweier sagittal benachbarter Pulse durch die im folgenden Abschnitt betrachtete gemeinsame Wirkung aller Pulse bei weitem übertroffen wird.
- 20 Für die Bewertung dieser langfristig (d.h. über mehr als 10^5 Pulse) im Gewebe akkumulierten Energie ist diese auf das Volumen zu beziehen, das die Strahlung aufgrund der starken Streuung nicht verlässt. Als konservative Abschätzung wird die höchste Laserleistung, d.h. für die Messung in größter Tiefe, angenommen. Geht man von einem zylindrischen Streuvolumen mit 2 mm Durchmesser und 4 mm Tiefe aus, dessen Zentrum
- 25 lateral schnell auf einer Linie von 4 mm bewegt wird, ergibt sich eine Erwärmung um 1 °C pro Sekunde in diesem Volumen. Unter stationären Bedingungen, d.h. wenn der Applikator auf der Haut lange nicht bewegt wird, begrenzt der Wärmetransport des Gewebes unter ungünstigsten Bedingungen (Fettgewebe, s.o.) die Temperatur auf 43 °C in der Strahlebene (10 µm Dicke). (Annahme: Diffusive Wärmeleitung, in 5 mm Entfernung wird
- 30 die Körpertemperatur durch Blutzirkulation auf 37 °C gehalten).

Um die sicherheitstechnische Bedeutung einer Temperaturerhöhung im Gewebe zu bewerten, kann auf Literaturergebnisse zurückgegriffen werden (siehe zum Beispiel G. Müller, H. P. Berlien „Angewandte Lasermedizin“, ECOMED-Verlag, Loseblattsammlung,

35 1993 ff., Kapitel 3.3 „Thermische Wirkungen“). Demnach ist eine schädigende thermische Wirkung sowohl von der Temperatur, als auch von deren Einwirkdauer abhängig. Bei den hier betrachteten Zeitskalen sind die Grenztemperaturen für unter 1 bis maximal 10 Sekunden anzusetzen. Schäden treten bei diesen Einwirkdauern gemäß den Literaturdaten erst bei über 57°C ein, also 20K über der Körpertemperatur!

Beschreibung des Ein-Fehler-Falles (Fall B):

Folgende Fehlerquellen sind aus Sicherheitsgründen zu betrachten:

- a) Die Pulsenergie erhöht sich auf den Maximalwert des Lasers durch Fehler der Regelung
- 5 b) Der Scanvorgang unterbleibt, sodass die Folgepulse dieselbe Stelle wiederholt treffen.

Fehlerbehandlung: Als wichtigste Maßnahme gegen die beiden unzulässigen Betriebszustände a) und b) ist in der Konstruktion und Systemlayout eine schnelle Überwachungselektronik vorgesehen, die den Regelbetrieb sowie den augensicheren Kontakt des Applikators auf der Haut ständig überprüft und die ihrerseits unabhängig von der Steuer-
10 elektronik des Gerätes arbeitet. Sobald die Überwachungselektronik einen Fehler erkennt, schaltet sie die Laserquelle ab. Dadurch ist die Gefahr beseitigt. Als zusätzliche Maßnahme wird für den Fall a) eine Hardwarelimitierung in den Laser eingesetzt, die eine Energieabgabe über bestimmte Werte hinaus verhindert.

15

Bewertung des Restrisikos (Fall C):

Eintrittswahrscheinlichkeit der Fehler: Die Eintrittswahrscheinlichkeit der genannten Fehler (Pulsenergie erhöht sich, Scanvorgang unterbleibt) wird durch elektronische Maßnahmen und die unabhängige Überwachungselektronik auf einen akzeptablen Wert ab-
20 gesenkt (genaue Definition kann erst bei Erstellung der Anlage angegeben werden).

Folgewirkung des Mehr-Fehler-Falles:

Sollte trotzdem ein Fehler in der Überwachung auftreten, so sind die Auswirkungen wie folgt zu beurteilen:

25 a) Ausfall der Leistungsregelung: Die Wirkung der Einzelpulse sowie die überlagerte Wirkung der Folgepulse wurde für den Regelbetrieb adiabatisch berechnet. Daher skaliert die Wirkung (unter Vernachlässigung der nichtlinearen Absorption) linear mit der Laserleistung. Damit bleibt die kurzzeitige adiabatische Erwärmung unterhalb 10 °C. Für die Bewertung der im Gewebe akkumulierten Energie wurde bereits für die Abschätzung
30 im Regelfall mit der maximalen Laserleistung gerechnet. Folglich führt ein Ausfall der Leistungsregelung nicht zu einer Schädigung des Patienten.

b) Ausfall der Scanbewegung: Die Einzelpulse werden alle in dem selben Gewebevolumen fokussiert, was zu einer schnellen Temperaturerhöhung führt, bis das Fokusvolumen durch die Wärmediffusion ins umliegende Gewebe eine konstante Temperatur von
35 62 °C erreicht. Für die im Gewebe akkumulierte Leistung bedeutet ein Ausfall der Scanbewegung, dass sich eine maximale Temperatur von 50 °C auf der Achse des Laserstrahles bis in eine Tiefe von ca. 4 mm einstellt. Folglich führt ein Ausfall der Scanbewegung ohne Abschaltung des Lasers zu einem Schmerzreiz bei dem Patienten. Dies deckt

sich mit Selbstversuchen, in denen diese Strahlungsbedingungen an empfindlichen Hautregionen (Ellenbeuge) als „Nadelstiche“ wahrgenommen wurden.

Es ist anzumerken, dass ein Ausfall der Scanbewegung die Bilderzeugung verhindert und der behandelnde Arzt daher die Störung erkennt. Bereits ein Abheben des Applikators von der Haut wird zur sofortigen Abschaltung des Lasers führen.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert. Es zeigen:

10

Fig. 1 schematisch eine Vorrichtung zur optischen Gewebecharakterisierung gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 2 beispielhaft den Verlauf der Intensität für verschiedene Intensitätsprofile;

15

Fig. 3 schematisch eine Vorrichtung zur optischen Gewebecharakterisierung gemäß einer zweiten Ausführungsform;

Fig. 4A, 4B schematisch eine dritte und vierte Ausführungsformen einer Vorrichtung zur optischen Gewebecharakterisierung;

20

Fig. 5 eine fünfte Ausführungsformen einer Vorrichtung zur optischen Gewebecharakterisierung;

25

Fig. 6 Graphische Darstellung eines Ergebnis einer Fluoreszenzmessung;

Fig. 7 Graphische Darstellung der Intensität einer in einem Gewebe angeregten Ein-Photonen-Fluoreszenz;

30

Fig. 8 Graphische Darstellung der Intensität einer in einem Gewebe angeregten Zwei-Photonen-Fluoreszenz;

Fig. 9 eine sechste Ausführungsformen einer Vorrichtung zur optischen Gewebecharakterisierung;

35

Die Fig. 1 zeigt eine Vorrichtung zur optischen Charakterisierung eines menschlichen oder tierischen Gewebes 1. Das Licht eines für die Auslösung von Mehrphotonenprozessen typischerweise eingesetzten Lasers 2 wird mit einem Strahlteiler 3 in Teilstrahlen 4a,

4b, 4c aufgeteilt. Es sind drei Teilstrahlen dargestellt. Es versteht sich jedoch, dass die Erfindung nicht auf drei Teilstrahlen beschränkt ist, sondern eine beliebige Anzahl von Teilstrahlen verwendet werden kann.

5 Deren unterschiedliche Richtungen der Teilstrahlen 4a, 4b, 4c werden durch ein Objektiv 5 in eine entsprechende Anordnung von Foki 51a, 51b, 51c umgesetzt. Auf dem optischen Weg zwischen der Strahlaufteilung und dem Objektiv 5 können einerseits Elemente zur Beeinflussung z.B. der Intensität der Teilstrahlen eingebracht werden (Hier nicht dargestellt) oder - wie in der Fig. 1 beispielhaft dargestellt - ein Scanner 6, der zur abras-

10 ternden Anregung des Targets 1 (Gewebe) benutzt wird.

In den Foki 51a, 51b, 51c der Teilstrahlen 4a, 4b, 4c findet auf Grund der hohen Intensitäten eine Mehrphotonen-Absorption statt, in deren Folge diese Bereiche ein entsprechendes Fluoreszenzsignal aussenden, das zur Charakterisierung des bzw. der Anregungsbereiche(s) herangezogen werden kann. Dieses Fluoreszenzlicht wird zu einem

15 Teil von dem Objektiv 5 erfasst, durch einen dichroidischen Spiegel 7 von dem Anregungslicht spektral und räumlich getrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor 8 nachgewiesen.

20 Die Fig. 1 macht deutlich, dass durch die summarische Erfassung dieses Fluoreszenzsignales der gesamte Bereich („integraler Anregungsbereich“) charakterisiert wird, der von dem Bündel der Anregungsfoki im Target überdeckt wird. Sollte es aus nachweis-technischen Gründen erforderlich sein, auch die Lücken in diesem Anregungsmuster zu erfassen, so kann dies beispielsweise durch minimale Scanbewegungen und die Mit-

25 telung über mehrere Laserpulse erfolgen.

Eine solche Anordnung ist insbesondere dann von Vorteil, wenn zum Beispiel um Schäden zu vermeiden, die Intensität der Anregungsstrahlung nach oben hin begrenzt ist. In der vorgeschlagenen Anordnung kann jeder Teilstrahl mit der maximal zugelassenen

30 Intensität beaufschlagt werden. Entsprechend der Zahl der gewählten Teilstrahlen wächst dann das zu erwartenden Fluoreszenzsignal gegenüber dem von einem Teilstrahl. Dabei kann man jedoch - wie einfürend beschrieben - die räumliche Begrenzung des Anregungsgebietes entlang der Ausbreitungsrichtung des Anregungsstrahles und damit die Verfahrensauflösung weitgehend unverändert beibehalten.

35

Die erfindungsgemäß wichtige Fragestellung der geeigneten Anordnung der Foki im Target wird anhand der Fig. 2 erläutert. Die Fig. 2 zeigt für den ausgewählten Fall der Überlagerung von neun Teilstrahlen gleicher Intensität die Abhängigkeit des normierten Intensitätsverläufe im Zentrum des Bündels über der Achse der Ausbreitungsrichtung der

Strahlung in Vielfachen der Rayleigh-Länge eines Teilstrahles. Für die Fokalebene ist z zu Null gesetzt.

5 Dabei zeigt die durchgezogene Linie A den Verlauf für einen Teilstrahl. Zum Vergleich zeigt die gepunktete Linie B den Intensitätsverlauf für einen Strahl mit gleicher Spitzenintensität wie in A, jedoch – durch entsprechend gewählte Apertur - mit der gleichen Gesamtenergie wie die neun Teilstrahlen. Diese Kurve weist ein deutlich langsames Abklingen der Intensität längs der Ausbreitungsrichtung auf. Dies bedeutet, dass das Anregungsgebiet in dieser Achse deutlich verlängert wäre.

10

Die anderen drei Kurven stellen den Intensitätsverlauf für unterschiedliche laterale Abstände der Foki der Teilstrahlen dar (C: Abstand = 1,5-faches des Taille radius; D: Abstand = Dreifaches des Taille radius; E: Abstand = Fünffaches des Taille radius).

15

Wählt man den Abstand zu klein (z.B. 1,5-fache des Taille radius), so ergibt die Überlagerung etwas höhere Intensitäten im Fokus selbst und das Anregungsgebiet ist entlang der Ausbreitungsrichtung deutlich vergrößert. Man erkennt dies, wenn man beispielsweise den Punkt des Abklingens auf die halbe Fokusintensität als Maßstab nimmt.

20

Stellt man jedoch beispielsweise den drei- oder fünffachen Taille radius in dieser Beispielanordnung ein, so ist die Intensität annähernd im gleichen Abstand vom Fokus auf die Hälfte abgefallen wie im Fall eines Strahles mit gleicher Taille.

25

Das Beispiel macht deutlich, dass es durch erfindungsgemäß vorteilhafte Wahl des Abstandes der Foki gelingt, die Ausdehnung des Anregungsgebietes entlang der Ausbreitungsrichtung nahezu unabhängig von der Zahl der Teilstrahlen und damit von der Größe des Anregungsgebietes zu gestalten.

30

Die Wahl des günstigsten Abstandes der Foki kann von ihrer Anordnung in der Fokusebene des Objektiv, ihrer Zahl und den Eigenschaften der Anregungsstrahlung abhängen. Bevorzugt wird ein Abstand in der Größe des 2,5 – 15-fachen des Taille radius eines Einzelstrahls gewählt.

35

Die Fig. 3 zeigt eine Vorrichtung, in der eine Laser-Strahlquelle 2 sowohl für die Multiphotonen-Anregung als auch für optische Kohärenz-Reflektometrie eingesetzt wird. Gegebenenfalls sind die spektralen Eigenschaften der Quelle so zu gestalten, dass sie die gewünschte Tiefenauflösung (Auflösung entlang der Strahlungsausbreitung) ermöglicht. Diese Strahlung wird in einen Anregungsstrahl AS und einen Referenzstrahl RS mit einem teildurchlässigen Spiegel 71 geteilt.

Beide Strahlen können noch mit Modulatoren versehen werden, die die Intensität nicht jedoch die optische Weglänge zeitlich modulieren. Eine solche Anordnung ist nicht abgebildet.

5

Dem Anregungsstrahl AS wird quer zur Ausbreitungsrichtung in der Strukturierungseinheit 3 eine Struktur aufgeprägt, die infolge der Fokussierung nur in der Nähe der Fokalebene eines Objektivs 5 innerhalb des Targets kontrastreich hervortritt. Für diese Einheit können beispielsweise ein holographisches Element oder Mikrolinsen- oder Mikroprismen-Anordnungen eingesetzt werden. In der Fig. 3 ist als mögliche Ausführung einer solchen Anordnung die Aufteilung in drei Teilstrahlen 4a, 4b, 4c dargestellt, die in dem Target 1 (Gewebe) eng benachbarte Foki ausbilden. Außerhalb der Fokalebene verringert sich der Kontrast zwischen den Foki infolge der Durchmischung der Teilstrahlen. Der so strukturierte Anregungsstrahl AS kann mit einem Scanner 6 zur ortsdefinierten Anregung des Targets 1 relativ zu diesem bewegt werden.

10
15

Dort wo der strukturierte Anregungsstrahl AS das Innere des Targets 1 beleuchtet, findet an Strukturgrenzen Streuung statt. Der rückgestreute Anteil durchläuft das Objektiv 5, in dem er wieder kollimiert wird, und gegebenenfalls den Scanner 6, der die abtastende Strahlbewegung rückgängig macht. Über einen Strahlteiler 7 und gegebenenfalls eine Feldlinse 10 gelangt dieses aus der Tiefe des Targets 1 stammende Licht zur Interferenz mit dem Referenzstrahl RS in einem Interferenzdetektor 20 (z.B. eine CCD-Kamera).

20

Die optische Weglänge des Referenzstrahles RS kann über eine bewegliche Spiegelvorrichtung 19 (Die Bewegungsrichtung ist durch den Doppelpfeil M angegeben) verändert werden. Beobachtet man die Interferenz orts aufgelöst, so wird man dann ein besonders kontrastreiches Interferenzmuster beobachten, wenn die optische Weglänge des Referenzstrahles genau dem Strahlweg des Anregungslichtes bis zum Fokus und des rückgestreuten zurück bis zum Ort der Überlagerung entspricht. In den Interferenzmuster wird sich das Abbild der dem Anregungsstrahl aufgeprägten Struktur zeigen. Dies ist der Indikator dafür, dass die Kohärenz-Reflektometrie den Fokalbereich der Anregung darstellt.

25
30

Als Beispiel ist in der Fig. 3 die Zwei- oder Mehrphotonen-Mikroskopie als möglicher Anwendungsfall dargestellt. In dem hier gezeigten Beispiel wird die Mehrphotonen-Fluoreszenz mittels des dichroitischen Strahlteilers 72 und des Empfängers 8 summa-
risch aus den Fokalbereichen aller drei Teilstrahlen erfasst. Genauso möglich sind jedoch auch Anordnungen, die es erlauben, die Fluoreszenzsignale nur einer ausgewählten Teilregion zu detektieren.

35

Die Fig. 4A, 4B zeigen das Prinzip eines Seriengerätes zur optische Gewebecharakterisierung. Nach der Anregung durch fokussierte IR-Laserpulse (\sim fs bis ps) (Pfeil P) wird das von der Probe / dem Gewebe ausgehende Licht mit einem Spektrometer 11 detektiert. Dieses Spektrometer kann zur Vereinfachung der Auswertung und zur Verbesserung der Kollektionseffizienz des rückgestrahlten Lichtes als Polychromator mit relativ geringer spektraler Auslösung und weiten Spektralfenstern ausgeführt sein. Im letzteren Fall kann auch die Sammellinse vor dem Polychromator 11 ggf. entfallen.

Da nur Licht ausgewertet wird, dessen Photonen eine höhere Energie haben, als die des eingestrahlten Lichtes, ist sichergestellt, dass das Signal aus nichtlinearen Prozessen stammt, die nur im Bereich des Fokus stattfinden können. Aus der Position einer Linse 5 und dem Brechungsindex des Gewebes ist die Lage des Fokus 51 eindeutig bestimmt. Die Tiefenzuordnung kann an einem geeignet präparierten Objekt kalibriert werden.

Die Intensität wird während des Tiefenscans variiert, um die Abschwächung des Anregungslichtes bei der Fokussierung in tiefere Bereiche des Gewebes auszugleichen. Die Regelung basiert auf physikalischen Effekten, die gewebeunabhängig als Funktion der Anregungsintensität im Fokus ausgelöst werden und gleichen somit auch die Abschwächung in unterschiedlichen Gewebetypen aus. Auf diese Weise werden störende Selbstfokussierung sowie quantitative UV-Konvertierung im Gewebe vermieden.

In Fig. 4A und 4B ist ohne Beschränkung der Allgemeinheit die Relativbewegung zwischen Strahl und Fokus jeweils nur in zwei Koordinaten (x lateral, z in die Gewebetiefe) dargestellt. Die zweite Lateralachse y kann erfindungsgemäß in einer der angegebenen Weisen zusätzlich abgefahren werden.

Das Prinzip der Anordnung der Fig. 4B entspricht dem der Fig. 4A, mit dem Unterschied, dass die Probe mit einer Positioniereinheit 12 gegenüber dem fokussierenden Objektiv bewegt werden kann, um verschiedene Punkte der Probe ausmessen zu können. Des Weiteren ist ein Spektrometer oder Polychromator (siehe entsprechende Bemerkung zu Fig. 4A) 11a angeordnet, das zeitaufgelöste Messungen ermöglicht und mit einer Auswerteeinheit 13 verbunden ist. Die Anordnung nach Fig. 4B ist besonders geeignet für in-vitro-Untersuchungen, wie z. B. Zellkulturen, von exzidierten Gewebeproben oder pathologischen Präparaten.

Die Fig. 5 zeigt eine weitere Variante einer Apparatur zur optischen Gewebeuntersuchung mit kombinierten Fluoreszenz- und OCT-System. Das Prinzip dieses Systems ist bereits in Bezug auf die Fig. 3 erläutert worden. Die Apparatur ist nicht mit einem

Spektrometer ausgestattet, sondern wird mit mehreren diskreten Sensoren 15a, 15b betrieben, die durch Filterung mittels vorgeschalteter Filter 16a, 16b spektrale Teilsignale des Fluoreszenzspektrums nutzen.

- 5 Bei den Filtern 16a, 16b handelt es sich nicht ausschließlich um einfach Linien-, Band- oder Kantenfilter. Vielmehr werden mindestens teilweise komplexe Verlaufsfilter eingesetzt werden, die gemäß einer Bewertungsfunktion berechnet und hergestellt sind.

- 10 Beispielhaft seien im Folgenden einige typische Betriebswerte einer derartigen Apparatur tabellarisch dargestellt. In Übertragung der Ergebnisse aus den Vorversuchen lässt sich mit folgenden Geräteparametern eine Bestimmung der angestrebten spezifischen Messergebnisse für die Auswertung in einer Schrittweite von 50 μm lateral wie saggital und einer Bildwiederholrate von 2 Hz auf einem Schnitt von 1.5 x 4 mm^2 erreichen:

| Bezeichnung | | Wert | | Bemerkung |
|----------------------------|---------------------------|-----------|------------------------|---|
| Laserdaten: | | | | |
| Mittlere Leistung | P | 90 | mW | |
| Pulsdauer | τ | 10 | ps | |
| Pulswiederholfrequenz | f_{rep} | 50 | kHz | |
| Strahldaten | | | | |
| Strahldurchmesser im Fokus | D_{fok} | 10 | μm | |
| Rayleigh-Länge | Z_{fok} | 80 | μm | = „Schärfentiefe“ |
| Wirkvolumen | V_{fok} | 12.000 | $(\mu\text{m})^3$ | = $\pi/4 * D_{\text{fok}}^2 * 2 Z_{\text{fok}}$ |
| Intensität im Fokus | | 10^{11} | W/cm^2 | Spitzenleistung im Pulsmaximum, durch Intensitätsregelung festgelegt |
| Scandaten | | | | |
| Scanfrequenz | f_{scan} | 5 | kHz | Mittelung über 10 Laserpulse, die kontinuierlich im Gewebe bewegt werden. |
| Scanschritt lateral | $\Delta x,$ Δy | 50 | μm | = parallel zur Hautoberfläche |
| Scanschritt axial | Δz | 50 | μm | = in die Gewebetiefe |

15

Die Apparatur gemäß der Fig. 5 arbeitet mit nicht-linearer Fluoreszenzanregung. Dies aus folgenden Gründen:

- 20 A. Eine ausreichende Eindringtiefe ist nur innerhalb des „IR-Fensters“ von ca. 750 bis 900 nm möglich.
- B. Durch die nichtlineare Wirkung geschieht die Fluoreszenzanregung praktisch ausschließlich im Focus der Anregung, daher sehr lokalisiert, so dass eine hohe laterale und Tiefenauflösung erreicht wird.
- 25 C. Die durch nicht-lineare Anregung gewonnenen Fluoreszenzspektren unterscheiden sich nach den bisherigen eigenen Messungen grundsätzlich von solchen, die

mittels linearer Anregung , d. h. mit der halben Anregungs-Wellenlänge, gewonnen werden.

Die Ursache liegt darin, dass für den Fluoreszenzvorgang, sowohl die Anregungskinetik, als auch die Abstrahlungskinetik sowie intra-molekulare Energieübertragungsvorgänge wesentlich sind. Diese Erkenntnis ist aus einschlägigen wissenschaftlichen Untersuchungen grundsätzlich bekannt. Die damit verbundene wesentlich verbesserte Spezifität von nichtlinearen laserspektroskopischen Methoden wird inzwischen in einigen technischen und biologisch-medizinischen Applikationen fruchtbringend angewendet.

Im Rahmen von Voruntersuchungen zu dem genannten Punkt C werden Proben herangezogen und in vitro untersucht, die histopathologisch definiert waren (Basaliom/ Haut).

Der neue Ansatz – nichtlineare Spektroskopie in suprazellulärer Mittelwertmessung – hat in den Untersuchungen eine sehr gute Unterscheidbarkeit zwischen Basaliom und normalem Gewebe ermöglicht. Es konnten in den so erzeugten Emissionsspektren Spektralbereiche identifiziert werden, die praktisch eine Ja/Nein-Entscheidung bezüglich normalem oder anomalem Zellstoffwechsel erlauben. In einer Vorstudie wurden mit diesem Verfahren inzwischen insgesamt 26 Messreihen durchgeführt und ausgewertet. Das Ergebnis ist in der Fig. 6 dargestellt.

Die Fig. 6 zeigt eine Auswertung der nichtlinear angeregten Emissionsmessungen an 26 Proben, von denen 11 gesundes und 15 krankes Gewebe darstellen. In der Ordinate ist die Lage einer aus dem Spektrum berechneten charakteristischen Wellenlänge (λ_{char}) und in der Abszisse das Intensitätsverhältnis an zwei festgelegten Wellenlängen $V(\lambda_1/\lambda_2)$ aufgetragen. Die unterbrochene Linie G stellt eine Grenzkurve dar. Es ist erkennbar, dass Basaliome von normaler Haut unterschieden werden können.

Es zeigt sich, dass durch geeignete mathematische Reduzierung der Messergebnisse eine selbstreferenzierte, d.h. von der Gesamtintensität unabhängige, skalare Kenngröße ermittelt werden kann, die im Folgenden als Fluoreszenzoptischer Gewebs Indikator (FGI) bezeichnet werden soll. Der FGI zu einem bestimmten geometrischen Messpunkt im Gewebe kann aus den Intensitätswerten bei einigen charakteristischen Wellenlängen ermittelt werden. Die Auswertung dieser Messungen zeigt, dass es in nahezu eindeutiger Weise möglich ist, krankes von gesundem Gewebe mit dieser nichtlinearen Methode zu unterscheiden. Das genaue Verfahren ist Gegenstand der Patentanmeldung.

Hintergrund für diese neue Methode ist die Tatsache, dass im kranken Gewebe eine Reihe von molekularen Indikatoren vorliegen. Diese können jedoch auf Grund ihrer

spektroskopischen Eigenschaften mit linearen Methoden nicht unterschieden werden, wie die Fig. 7 zeigt.

Die Fig. 7 zeigt eine konventionelle fluoreszenzspektroskopische Untersuchung (UV-
5 induzierte Autofluoreszenz mit Einphotonen-Anregung)) von unterschiedlichen Gewebetypen (Lederhaut mit durchgezogener Linie bzw. Epithelgewebe mit gestrichelter Linie dargestellt). Aus dem Spektrum ist erkennbar, dass keine signifikanten spektroskopischen Unterschiede existieren. Dieses ist nicht verwunderlich, da die in diesem Zusammenhang betrachteten Substanzen sich in ihrem molekularen Aufbau nur sehr wenig
10 unterscheiden. Erfahrungsgemäß ist durch die breiten Absorptionsbanden und die statistische Mittelung dann auch keine Spezifität zu erwarten.

Eine nichtlineare Methode schafft hier Abhilfe, indem die unter nichtlinearen Bedingungen deutlich verstärkten Unterschiede zwischen den verschiedenen molekularen Systemen spektroskopisch auswertbar werden. Wie groß diese Unterschiede sind, ist in der
15 Fig. 8 dargestellt. Die Fig. 8 zeigt das Ergebnis einer nichtlinear angeregten spektroskopische Untersuchung der unterschiedlichen Gewebetypen. Im Gegensatz zu Abb. 7 existieren signifikante Unterschiede.

Diese wenigen Beispiele sollen belegen, dass die nichtlinearen spektroskopischen Methoden einen grundsätzlich neuen Zugang zur Analytik gerade im biologisch-medizinischen Bereich eröffnen. Diese speziellen Beispiele zeigen ohne Einschränkung der Allgemeinheit die Prinzipien der neuartigen Methodik und belegen ihre Realisierbarkeit. Der erfindungsgemäß breitere Ansatz ist in den dargestellte Ansprüchen und Erläuterungen dargestellt.
25

Ein wesentlicher Teil des Ansatzes des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass der FGI mit einer räumlichen Auflösung detektiert wird, die über das Volumen (Fokussierungsvolumen) von 20 bis 200.000 Zellen mittelt. Es handelt sich beim fluoreszenzoptischen Gewebsindikator also um eine suprazellulär gemittelte Größe, die das Gewebe beschreibt,
30 und nicht um eine Kenngröße für eine Zellorganelle oder bestimmte Zellkompartimente. Erst diese Festlegung ermöglicht durch Datenreduktion auf einen dem Diagnosezweck angemessenen Umfang eine zeitliche Auswertung in Echtzeit, ohne Fixierung des Patienten über lange Zeiträume.

35

Die Auftragung des FGI für die bis jetzt durchgeführten Gewebsmessungen gibt eine klare Abgrenzung zwischen gesundem und krankem Gewebe (siehe Abb. 4).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Selektivität durch die Auswertung der Fluoreszenzdaten erzielt wird. Die zeitlich und örtlich deckungsgleiche Kombination dieser

Fluoreszenzdaten mit einem OCT erlaubt die Orientierung des Arztes im Gewebe und liefert die Zuordnung der fluoreszenzoptischen Messungen zur Morphologie des untersuchten Hautareals.

5 Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass mit dem Fluoreszenzgewebeindikator FGI in Verbindung mit charakteristischen Fluoreszenzmaxima bereits bei reiner Intensitätsauswertung und Verhältnisbildung bei zwei Wellenlängen (selbstreferenziert) ein klarer Indikator für pathologische Zustände des Gewebes gefunden werden konnte.

10 Mit der beispielhaft dargelegten Definition des FGI wurde also bereits jetzt ein klar abzugrenzender Indikatorwert gefunden, der durch Schwellwerte eine automatische Unterscheidung zwischen gesund und krank ermöglicht. Die dargestellten erfindungsgemäßen Verfahrensgrundlagen erlauben es, die Selektivität und Spezifität weiter zu erhöhen und an vielfältige Fragestellungen spezifisch anzupassen.

15

So werden erfindungsgemäß zur Erreichung eines optimalen und möglichst aussagekräftigen Diagnoseziels, mit minimalen falsch-negativen und falsch-positiven Aussagen und zur Erhöhung der Diagnoseaussage, wie dargelegt, andere Wellenlängen herangezogen und/oder ein Korrelationsfaktor aus mehr als zwei Wellenlängen berechnet.

20

Es können aus dem Bildpunkt bzw. Fokuspunkt die Intensitätswerte der Fluoreszenzstrahlung bei zwei oder mehr signifikanten Indikator- bzw. Referenz-Wellenlängen bestimmt und ins Verhältnis gesetzt werden. Damit lässt sich die gewünschte Geschwindigkeit der Auswertung erzielen und die Möglichkeit gewinnen, in Echtzeit sowohl die Mess-

25 Signale auszuwerten, als auch die Gut-/ Schlechtentscheidung zu treffen, sowie das Ergebnis im OCT-Bild darzustellen.

Dabei kann zusätzlich

30

a) das Abklingverhalten, d. h. die zeitliche Komponente der Fluoreszenzabstrahlung, sowie

b) der Einfluss der Fluoreszenz-Anregungswellenlänge berücksichtigt werden.

Zu a: Mittels geeigneter schneller Sensoren mit festgelegter Detektionswellenlänge (beispielsweise PMT = Photo Multiplier Tubes) kann der zeitliche Verlauf durch elektronisches Gating ausgewertet werden.

35

Zu b: Durch eine Variation der Anregungswellenlänge wird die Detektionssicherheit und -Schärfe erfindungsgemäß erhöht.

Optionale zusätzliche Verfahren erlauben in ihrer Kombination mit der beschriebenen neuen Methode die Gewinnung zusätzlicher, für den Mediziner nützlicher, Informationen.

Zum einen handelt es sich dabei um die mögliche Kombination mit einem OCT-Verfahren, welches für die Spezifität des beantragten neuen Verfahrens nicht erforderlich ist, dem Mediziner jedoch morphologische Zusatzinformationen gibt, die ihm die weitere Behandlung erleichtern.

5

In Fig. 9 ist eine weitere Ausführungsform einer Vorrichtung zur optischen Gewebeuntersuchung gezeigt. Eine Laserquelle (nicht dargestellt) ist über eine Glasfaser 30 mit einem Messkopf 31 verbunden. Über die Glasfaser 30 und der Messkopf 31 kann das Laserlicht an das zu untersuchende Gewebe heran- und hinweggeführt werden. Somit kann
10 ähnlich einer Ultraschalluntersuchung ein weites Gewebeareal optisch „abgetastet“ werden. Das rückgestreute bzw. im Gewebe angeregte Licht wird über die Glasfaser 30 in eine integrierte Auswerteeinheit geleitet, die aus den bestimmten Daten eine Bildinformation über das Gewebe generiert. Diese Bildinformation wird an einem integrierten Bildschirm 40 angezeigt.

15

Zusätzlich zu einem Fluoreszenzsystem kann ein OCT-System integriert sein, das synchron und örtlich deckungsgleich mit dem Fluoreszenzsystem arbeitet.

Dies lässt sich mit relativ geringem apparativem Aufwand realisieren, da die Optik, der Scanner, die Laserquelle und der Signalweg des Fluoreszenzsystems genutzt werden
20 können.

Dieses OCT liefert als wichtige Zusatzinformation die morphologische Struktur derjenigen Gewebevolumina, für die die genannten Informationen zu abweichendem Stoffwechsel fluoreszenzoptisch bestimmt werden. Damit kann diese Information unmittelbar dem morphologischen Gewebebild zugeordnet werden.

25

Aus der geometrischen Zuordnung zum Messkopf wird so ein Bild erzeugt, das auf Gewebsstrukturen bezogen ist. Der Arzt erhält eine Aussage in welchen gewebsmorphologisch charakterisierten Bereichen im Gewebe die kritischen Areale mit auffälligem Stoffwechsel liegen.

30

Kennzeichen der Apparatur ist ein für den Praxis- bzw. Klinikalltag taugliches Medizingerät zur effizienten, sicheren und reproduzierbaren Tumordiagnostik. Die Wirkprinzipien, Methoden und Algorithmen, die dazu verwendet werden, sind durch die medizinisch-diagnostische Zielsetzung determiniert. Dies betrifft beispielsweise die Fragestellungen von Ein- oder Mehrfarbenanregung und der spektralen und zeitlich aufgelösten Detektion der Fluoreszenz. Aus der klinischen Praxis folgen die Dimensionen des diagnostischen
35 Beobachtungsfeldes: eine Tiefenauflösung von 0,5 - 1,5 mm, Schnittbilddarstellungen mit mehreren Millimetern Kantenlänge (z. B. 4 mm).

Wesentliches Kennzeichen für die diagnostische Interpretation ist dabei die Zusammenführung der fluoreszenzoptischen Daten mit morphologischen Informationen, denn nur

dadurch wird beispielsweise die kanzerogene Durchdringung der Basalmembran erkennbar. Für derartige morphologische Informationen wird erfindungsgemäß das Verfahren des OCT oder die Extraktion entsprechender Fluoreszenzsignale eingesetzt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem menschlichem oder tierischem Gewebe mit den Schritten:
 - 5 - Bereitstellen einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter elektromagnetischer Strahlung;
 - Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes mit der Strahlung, wodurch im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstrahlung erzeugt wird, wobei
 - 10 - die in das Gewebe eingedrungene Strahlung innerhalb eines sich quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung erstreckenden Anregungsbereiches eine ausreichende Intensität aufweist, um im Gewebe eine charakteristische Rückstrahlung anzuregen,

dadurch gekennzeichnet, dass

 - 15 der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung ein derartiges Intensitätsprofil quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung aufgeprägt wird, dass der Anregungsbereich eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes überdeckt und die angeregte Rückstrahlung auf zellübergreifende Gewebeeigenschaften zurückgeht.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Aufprägen des Intensitätsprofils darin besteht, die Strahlung über ein Objektiv in das Gewebe abzubilden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Objektiv eine numerische Apertur von näherungsweise 0,3 bis 1,5 aufweist.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Aufprägen des Intensitätsprofils darin besteht, die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung in mindestens zwei Teilstrahlen aufzuteilen, wobei der Anregungsbereich durch die Lage der Teilstrahlen festgelegt ist.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Teilstrahlen jeweils so in das Gewebe fokussiert werden, dass die Fokuspunkte für die Teilstrahlen beabstandet zueinander sind.
- 35 6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Intensitätsprofil so gewählt wird, dass sich der Anregungsbereich eines einzelnen Teilstrahls quer zur

Ausbreitungsrichtung der von der Strahlquelle ausgehenden Strahlung über näherungsweise 1 bis 2.500 Zellen des Gewebes erstreckt.

- 5 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich der Summenanregungsbereich der erzeugten Teilstrahlen quer zur Ausbreitungsrichtung der von der Strahlquelle ausgehenden Strahlung über näherungsweise 1.000 bis 200.000 Zellen des Gewebes erstreckt.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Rückstrahlung ein Fluoreszenzsignal, eine harmonische Oberwelle der Strahlung der Strahlquelle und/ oder ein Reflexionssignal ist.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Intensität der Strahlung so gewählt wird, dass eine Zwei- oder Mehrphotonenanregung im Gewebe erfolgt.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Rückstreustrahlung die doppelte Frequenz der Strahlung aufweist, mit der das Gewebe bestrahlt wird.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung zur zusätzlichen Charakterisierung des Gewebes per Kohärenz-Reflektometrie in einen Anregungsstrahl zur Anregung einer Fluoreszenz in dem Gewebe und einen Referenzstrahl aufgeteilt wird, wobei der Anregungsstrahl zum Teil vom Gewebe zurückreflektiert und der Referenzstrahl mit der vom Gewebe zurückreflektierten Strahlung überlagert wird.
- 30 12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Referenz- und der Anregungsstrahl in einem ortsauflösenden Interferenzdetektor überlagert werden.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Interferenzdetektor ein ein- oder zweidimensionaler Bildgeber mit mindestens 4 Pixeln, insbesondere ein CCD-Chip, eine CCD-Kamera, eine CCD-Zeile oder eine Zeilenkamera, ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass das der von der Strahlquelle ausgehenden Strahlung aufgeprägte Intensitätsprofil einen charakteristischen Verlauf mit mindestens zwei Intensitätsmaxima aufweist.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 11, 12 und 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die optische Weglänge für den Referenzstrahl so eingestellt wird, dass sich die auf die von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung aufgeprägte Intensitätsverteilung im Interferenzdetektor nachweisen lässt, wobei in diesem Fall die optische Weglänge für den Referenzstrahl der vom Anregungsstrahl zurückgelegten optischen Weglänge von
10 der Strahlquelle bis zum Fokus und zurück bis zum Interferenzdetektor entspricht.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- a) der Interferenzdetektor die Intensität der an ihm eintreffenden Strahlung ortsaufgelöst in einer Ebene senkrecht zur Strahlung bestimmt;
- 15 b) jeweils die Intensitäten an benachbarten Orten miteinander vergleicht, um einen ortsabhängigen Kontrastwert zu ermitteln;
- c) aus den ortsabhängigen Kontrastwerten einen Mittelwert bestimmt, der eine charakteristische, integrale Kontrastgröße für die am Detektor eintreffende Strahlung darstellt;
- 20 d) das aufgeprägte Intensitätsprofil dadurch nachgewiesen wird, dass die integrale Kontrastgröße ein Maximum erreicht.
17. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- a) der Interferenzdetektor die Intensität der an ihm eintreffenden Strahlung ortsaufgelöst in einer Erfassungsebene senkrecht zur Strahlung bestimmt;
- 25 b) aus den bestimmten Intensitätswerten und dem auf die Strahlung der Strahlquelle aufgeprägten Intensitätsprofil einen Korrelationswert bestimmt wird;
- c) das aufgeprägte Intensitätsprofil dadurch nachgewiesen wird, dass der Korrelationswert ein Maximum erreicht.
- 30
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung so abgelenkt wird, so dass ein Bereich des Gewebes, der sich parallel zur Gewebeoberfläche erstreckt, abgetastet wird.
- 35
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fokussierung der von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung in eine Fo-

kusebene zeitlich abhängig erfolgt, so dass die Fokusebene in Ausbreitungsrichtung der Strahlung verschoben wird, wodurch ein Bereich, der sich senkrecht zur Gewe-
beoberfläche erstreckt, abgetastet wird.

- 5 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die im Gewebe angeregte Rückstreustrahlung in einem Detektor nachgewiesen
wird, wobei ihre Intensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge und/oder der Zeit be-
stimmt wird.
- 10 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**,
dass
- 15 a) das Bestrahlen des Gewebes mit Strahlung im Wellenlängenbereich von 720-
800 nm erfolgt, wodurch im Gewebe eine Zweiphotonen-Fluoreszenz angeregt
wird;
- b) Detektieren der Intensität eines ersten Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge
von 460 ± 30 nm und eines zweiten Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge von
 550 ± 30 nm;
- 20 c) Bestimmen des Verhältnisses der Intensitäten des ersten und zweiten Fluores-
zenzsignals; und
- d) in Abhängigkeit von dem in Schritt c) bestimmten Verhältnis ein Signal erzeugt
wird.
- 25 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**,
dass
- a) das Gewebe mit Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 500-550 nm be-
strahlt wird, und dabei
- b) eine erste Intensität einer Zweiphotonen-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von
 340 ± 40 nm detektiert wird;
- 30 c) das Gewebe mit Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 720-800 nm be-
strahlt wird, und dabei
- d) eine zweite Intensität einer Zweiphotonen-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von
 460 ± 40 nm detektiert wird;
- e) das Verhältnis der in Schritt b) bestimmten ersten Intensität und der in Schritt d)
bestimmten zweiten Intensität bestimmt wird; und
- 35 f) in Abhängigkeit von dem in Schritt e) bestimmten Verhältnis ein Signal erzeugt
wird.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- 5 a) das Gewebe mit Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 720-800 nm bestrahlt wird, und dabei
- b) eine Intensität einer Zweiphotonen-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 460 ±40 nm detektiert wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlung über ein
- 10 Objektiv in das Gewebe abgebildet wird und das Objektiv entlang der Ausbreitungsrichtung der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung schrittweise verschoben wird, wobei die Schritte a) und b) für mehrere Objektivpositionen erfolgen, so dass der Fokus in Ausbreitungsrichtung der Strahlung durch das Gewebe geführt und ein Fluoreszenzsignal für mehrere Gewebetiefen bestimmt wird.
- 15 25. Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren an einem gesunden Gewebe durchgeführt wird und die so bestimmten Intensitäten des Fluoreszenzsignals als Referenzwerte gespeichert werden.
- 20 26. Verfahren nach Anspruch 24 und 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- a) das Verfahren gemäß Anspruch 24 an einem zu charakterisierenden Gewebe durchgeführt wird,
- b) die bestimmten Intensitäten für jede Tiefe zu den jeweiligen Intensitäten des gespeicherten Referenzsignals ins Verhältnis gesetzt werden;
- 25 c) in Abhängigkeit von dem in Schritt b) bestimmten Verhältnis ein Signal erzeugt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Signal erzeugt wird, wenn das in Schritt b) bestimmte Verhältnis näherungsweise 30% von dem
- 30 Wert 1 abweicht.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- 35 a) das Bestrahlen des Gewebes mit einem Kurzpuls laserstrahl im Wellenlängenbereich 720-880 nm oder 980-1080 nm erfolgt;
- b) Detektieren der Intensität remittierender Strahlung bei der halben Wellenlänge der gemäß Schritt a) zum Bestrahlen des Gewebes verwendeten Strahlung.

29. Verfahren nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlung über ein Objektiv in das Gewebe abgebildet wird und das Objektiv entlang der Ausbreitungsrichtung der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung schrittweise verschoben wird, wobei die Schritte a) und b) für mehrere Objektivpositionen erfolgen, so dass der Fokus in Ausbreitungsrichtung der Strahlung durch das Gewebe geführt und ein Fluoreszenzsignal für mehrere Gewebetiefen bestimmt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren an einem gesunden Gewebe durchgeführt wird und die so bestimmten Intensitäten des Fluoreszenzsignals als Referenzwerte gespeichert werden.
31. Verfahren nach Anspruch 29 und 30, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- das Verfahren gemäß Anspruch 28 an einem zu charakterisierenden Gewebe durchgeführt wird;
 - die bestimmten Intensitäten für jede Tiefe zu den jeweiligen Intensitäten des gespeicherten Referenzsignals ins Verhältnis gesetzt werden;
 - in Abhängigkeit von dem in Schritt b) bestimmten Verhältnis ein Signal erzeugt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Signal erzeugt wird, wenn das in Schritt b) bestimmte Verhältnis näherungsweise 40% von dem Wert 1 abweicht.
33. Verfahren zur optischen Charakterisierung von aus Zellen gebildetem Gewebe mit den Schritten:
- Bereitstellen einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter Strahlung;
 - Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes mit der Strahlung an einer Messstelle, wodurch im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstreustrahlung angeregt wird,
- dadurch gekennzeichnet**, dass
- die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung quer zur Ausbreitungsrichtung periodisch so abgelenkt wird, dass die Strahlung einen Bereich des Gewebes um die Messstelle herum periodisch abtastet, der sich über eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes erstreckt.

34. Verfahren nach Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlung in das Gewebe fokussiert wird, wobei die Intensität der Strahlung so gewählt wird, dass in einem sich entlang der Ausbreitungsrichtung um den Fokus herum erstreckenden Fokusbereich eine charakteristische Rückstrahlung angeregt wird.
35. Verfahren nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Fokusbereich in dem die charakteristische Rückstrahlung erzeugt wird, entlang der Ausbreitungsrichtung der Strahlung periodisch bewegt wird, um ein bestimmtes Gewebevolumen um eine Messtelle herum abzutasten.
36. Verfahren nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Gewebevolumen eine Ausdehnung quer zur Ausbreitungsrichtung der Strahlung von 2 bis 10 mm aufweist.
37. Verfahren nach Anspruch 35 oder 36, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Gewebevolumen eine Ausdehnung in Ausbreitungsrichtung der Strahlung von 0,3 bis 4 mm aufweist.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 37, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlquelle eine Pulsquelle ist, die gepulste Strahlung aussendet.
39. Verfahren nach Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Pulsquelle eine Pulswiederholffrequenz im Bereich von 35 bis 150 MHz aufweist.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 39, **dadurch gekennzeichnet**, dass das periodische Abtasten um eine Messstelle herum mit einer Wiederholffrequenz von 0,5 bis 2 MHz erfolgt.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 40, **dadurch gekennzeichnet**, dass die von der Strahlquelle ausgehende Strahlung zusätzlich zur periodischen Ablenkung quer zur Ausbreitungsrichtung abgelenkt wird, um das Gewebe an mehreren Messstellen abzutasten.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 41, **dadurch gekennzeichnet**, dass die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung in mindestens zwei Teilstrahlen aufgeteilt wird.

43. Verfahren nach Anspruch 42, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Teilstrahlen in das Gewebe fokussiert werden.
- 5 44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzelnen Teilstrahlen separat oder gemeinsam abgelenkt werden.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 44, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Teilstrahlen so fokussiert werden, dass die Foki benachbarter Teilstrahlen einen Abstand zueinander aufweisen, und die Teilstrahlen um jeweils einen Betrag abgelenkt werden, der diesem Abstand entspricht, so dass Lücken zwischen den Teilstrahlen ausgeglichen werden.
- 10
46. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 33 mit:
- 15
- einer Strahlquelle zum Aussenden gerichteter Strahlung zum Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes, die im Gewebe eine für das Gewebe charakteristische Rückstreustrahlung anregen kann, wobei
 - in das Gewebe eingedrungene Strahlung innerhalb eines sich quer zu ihrer Ausbreitungsrichtung erstreckenden Anregungsbereiches eine ausreichende Intensität aufweist, um im Gewebe eine charakteristische Rückstreustrahlung anzuregen,
- 20
- gekennzeichnet durch**
- 25
- Strahlformungsmittel, mit denen der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung ein derartiges Intensitätsprofil aufprägbar ist, dass der Anregungsbereich eine Mehrzahl von Zellen des Gewebes überdecken kann und die beim Bestrahlen des Gewebes angeregte Rückstreustrahlung auf zellübergreifende Gewebeeigenschaften zurückgeht.
- 30
47. Vorrichtung nach Anspruch 46, **gekennzeichnet durch** Abbildungsmittel zum Fokussieren der von der Strahlquelle ausgesandten Strahlung in das Gewebe.
- 35 48. Vorrichtung nach Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abbildungsmittel von der Strahlquelle aus gesehen vor oder hinter den Strahlformungsmitteln angeordnet sind.

49. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 46 bis 48, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlformungsmittel die von der Strahlquelle ausgesandte Strahlung in mindestens zwei Teilstrahlen aufteilen.
- 5
50. Vorrichtung nach Anspruch 47 und 49, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abbildungsmittel mehrere Objektive umfassen und jeder Teilstrahl mit einem eigenen Objektiv in das Gewebe fokussiert wird.
- 10
51. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 46 bis 50, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abbildungsmittel mindestens ein Objektiv zum Fokussieren der Strahlung sowie eine Verstelleinheit umfassen, mit der das mindestens eine Objektiv entlang der Ausbreitungsrichtung der Strahlung bewegt werden kann, um den Fokuspunkt des Objektivs entlang dieser Richtung zu bewegen und ein Abtasten des Gewebes in einer Ebene,
- 15
52. Vorrichtung nach Anspruch 51, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verstelleinheit und die Objektive in ein Gehäuse integriert sind, das auf das zu untersuchende Gewebe aufgelegt werden kann und parallel zur Gewebeoberfläche verschiebbar ist.
- 20
53. Vorrichtung nach Anspruch 52, **gekennzeichnet durch** elektromotorische und/oder mikromechanische Stallelemente, mit denen das Gehäuse parallel zur Gewebeoberfläche verschoben werden kann.
- 25
54. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 46 bis 53, **gekennzeichnet durch** eine Lichtleitfaser, die die von der Strahlquelle erzeugte Strahlung an das zu charakterisierende Gewebe heranführt.
- 30
55. Vorrichtung nach Anspruch 54, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtleitfaser die Abbildungsmittel und/oder die Strahlformungsmittel aufweist.
56. Vorrichtung nach Anspruch 55, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abbildungsmittel und/oder die Strahlformungsmittel einstückig mit der Lichtleitfaser ausgebildet sind.
- 35
57. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 46 bis 56, **gekennzeichnet durch** einen Detektor zum Detektieren der Rückstreustrahlung, der in Abhängigkeit von der detektierten Strahlung ein elektrisches Signal erzeugt.

58. Vorrichtung nach Anspruch 57, **gekennzeichnet durch** eine Auswerteeinheit zum Auswerten des vom Detektor erzeugten elektrischen Signals.

5 59. Vorrichtung nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswerteeinheit das vom Detektor erzeugte elektrische Signal in ein Bildinformationssignal umsetzt.

60. Vorrichtung nach Anspruch 59, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Auswerteeinheit einen Bildschirm zur visuellen Darstellung des Bildinformationssignals aufweist.

10

61. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 34 bis 45 mit einer Strahlquelle zum Erzeugen gerichteter Strahlung zum Bestrahlen des zu charakterisierenden Gewebes,

15

gekennzeichnet durch

Ablenkmittel zum Ablenken der von der Strahlquelle erzeugten Strahlung, mit denen die Strahlung quer zur Ausbreitungsrichtung periodisch ablenkbar ist, so dass die Strahlung einen Bereich des Gewebes periodisch abtasten kann, der sich über eine
20 Mehrzahl von Zellen des Gewebes erstreckt.

62. Vorrichtung nach Anspruch 61, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Ablenkmittel ein Spiegelement zum Ablenken der Strahlung umfassen, das durch ein elektrisches oder magnetisches Feld in eine periodische Bewegung versetzbar ist.

25

63. Vorrichtung nach Anspruch 61 oder 62, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Spiegelement in einer ersten Richtung quer zur Ausbreitungsrichtung der Strahlung eine erste Resonanzfrequenz aufweist und in einer zur ersten Richtung und zur Ausbreitungsrichtung der Strahlung senkrechten, zweiten Richtung eine zweite Resonanzfrequenz aufweist.
30

64. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strahlquelle ein gepulster Laser ist.

35

65. Vorrichtung nach Anspruch 64, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Laser Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 500 und 1000 nm aussendet.

66. Vorrichtung nach Anspruch 64 oder 65, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Laser Pulse mit einer Pulsdauer zwischen 80 fs und 800 ps erzeugt.

FIG 1

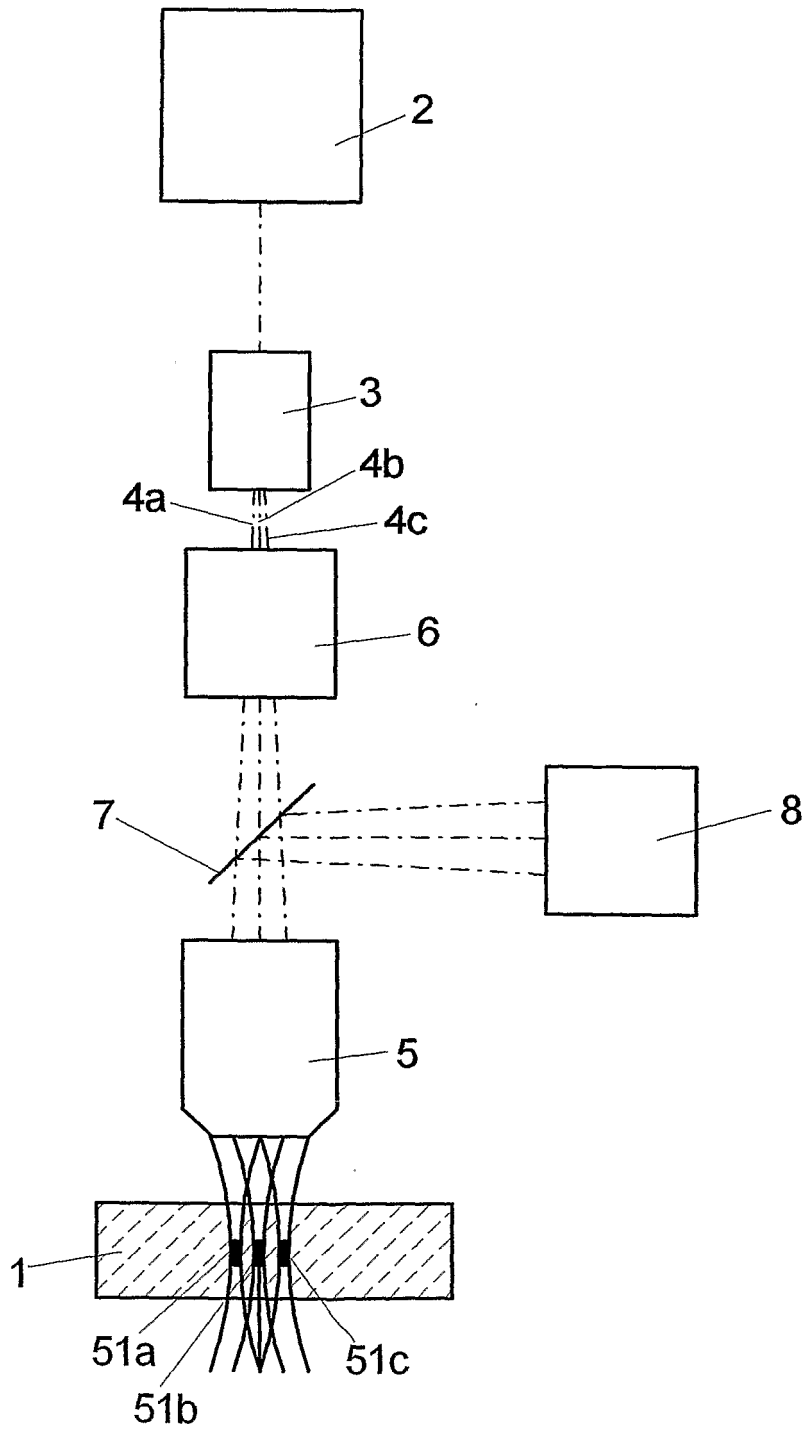
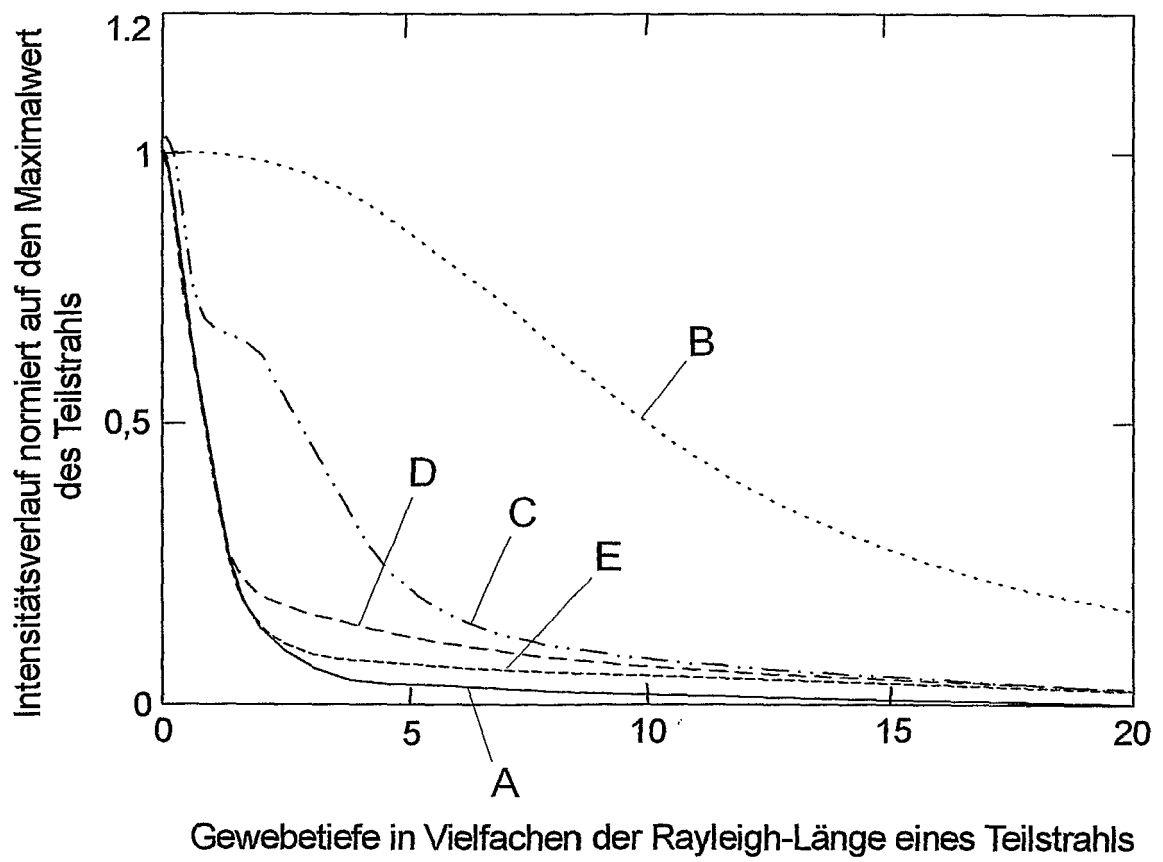


FIG 2



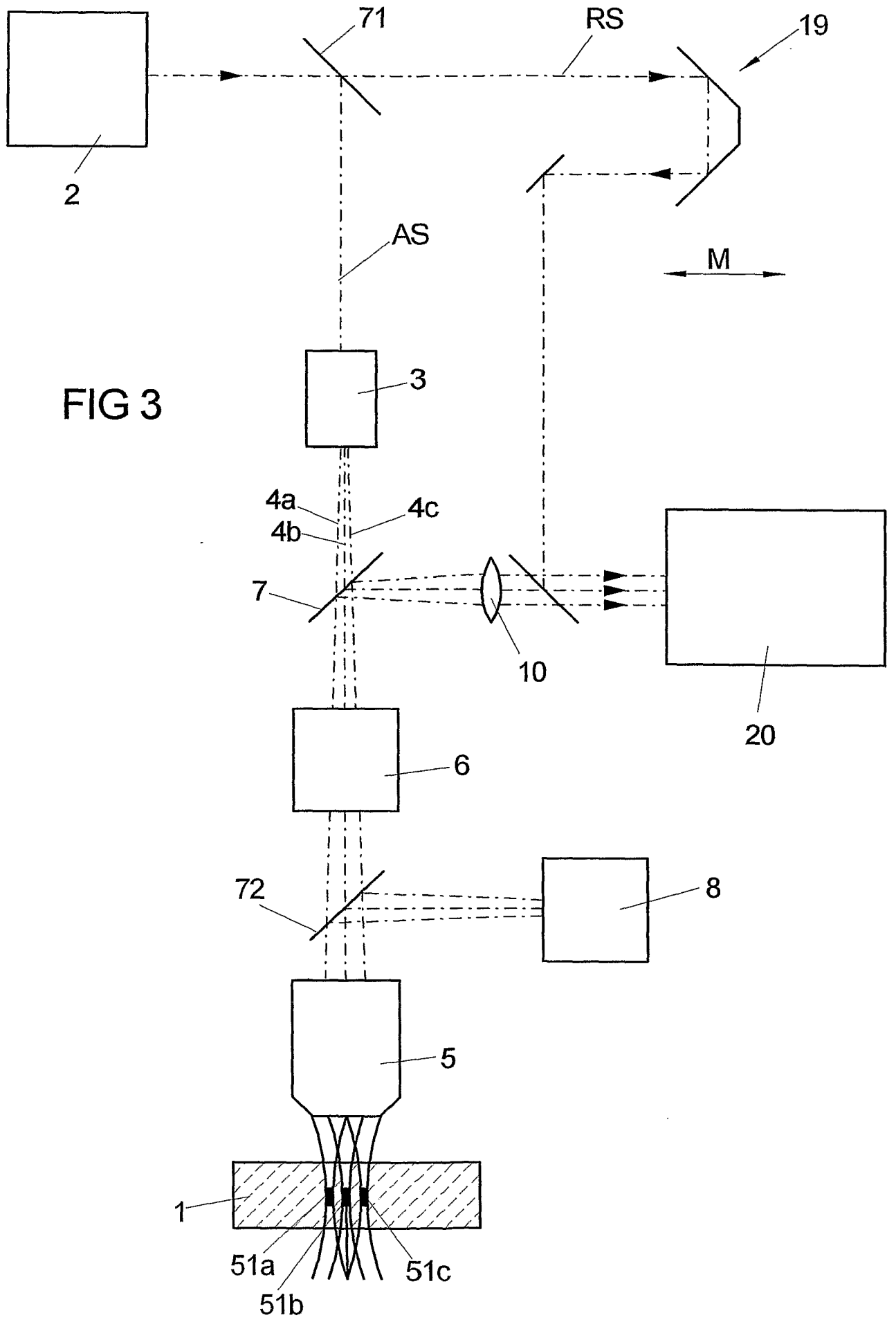


FIG 3

FIG 4A

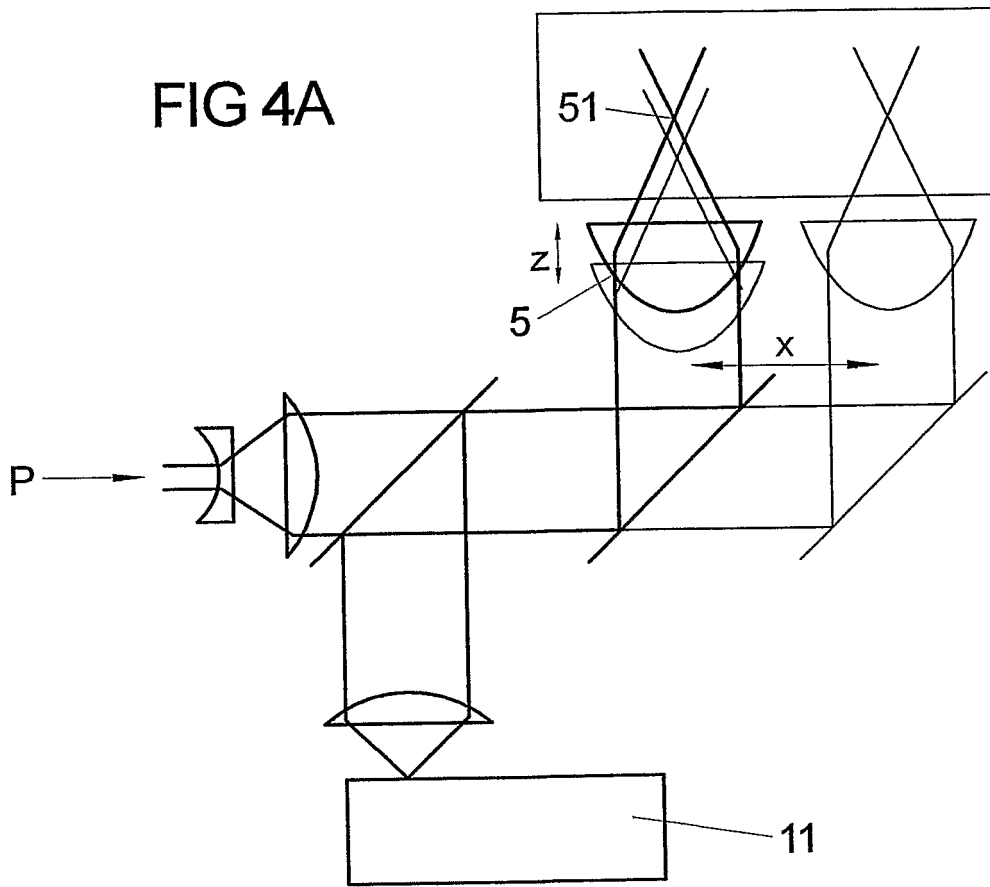
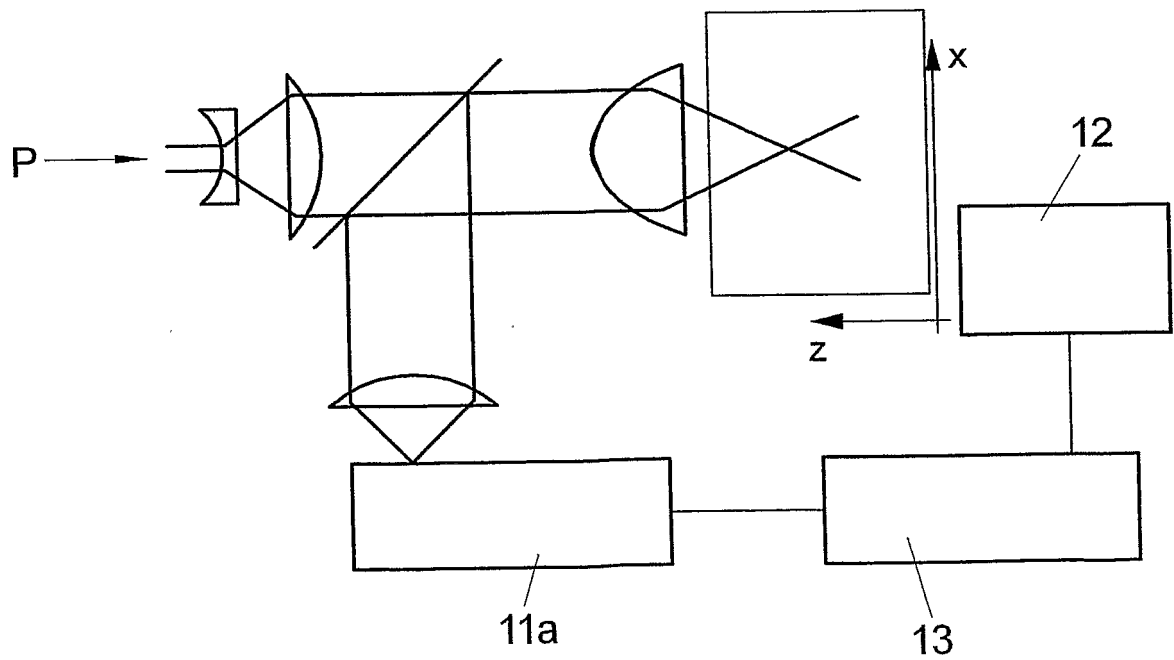


FIG 4B



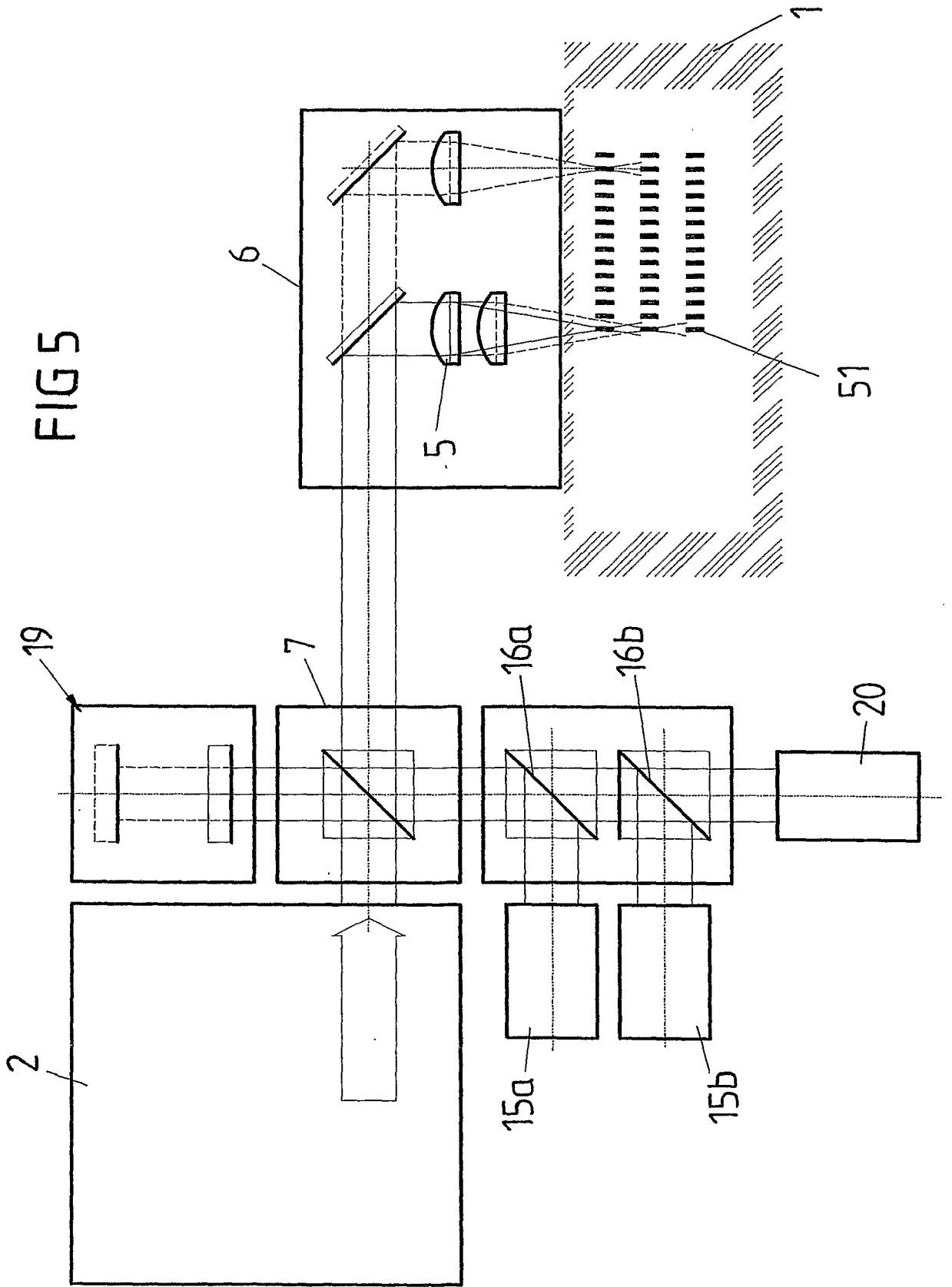


FIG 5

FIG 6

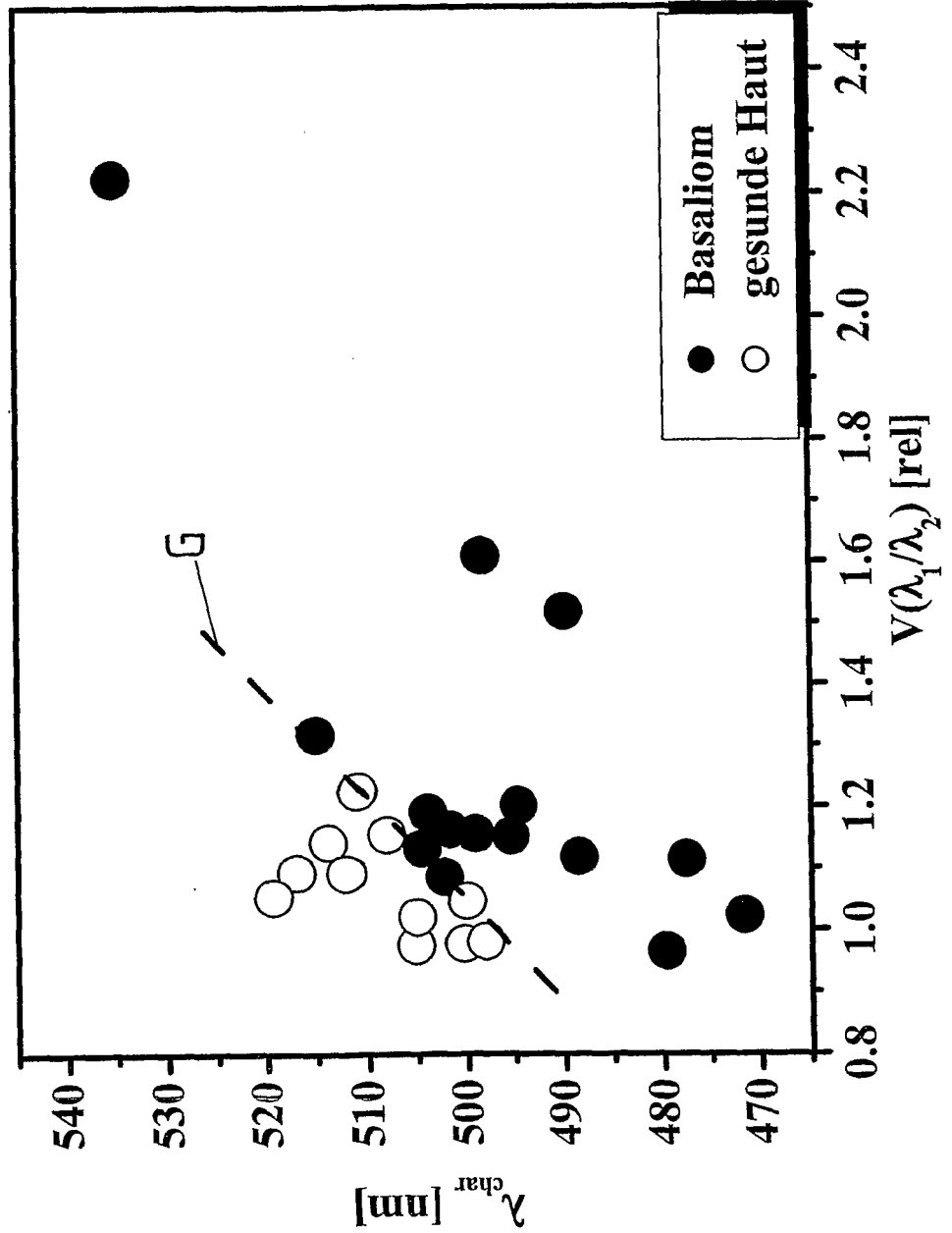


FIG 7

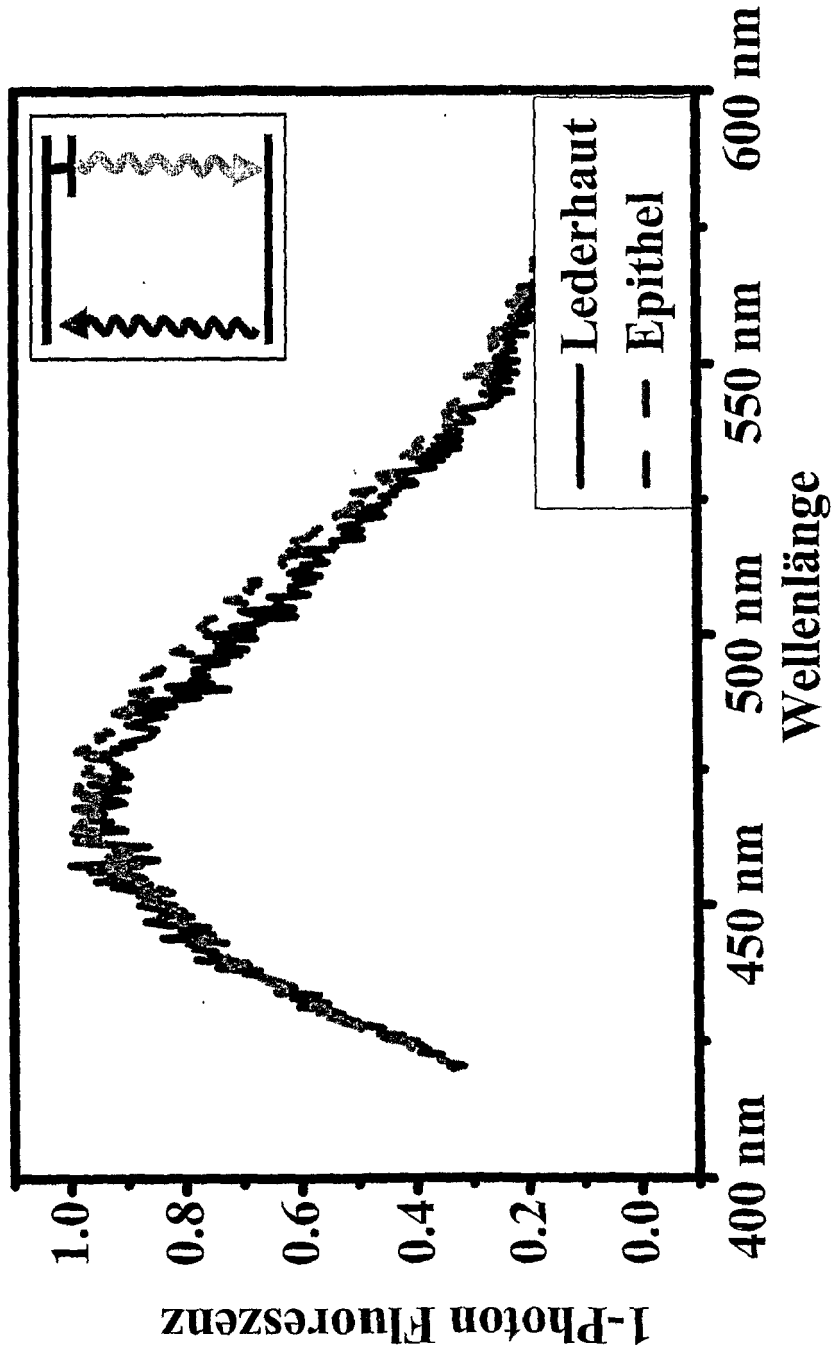


FIG 8

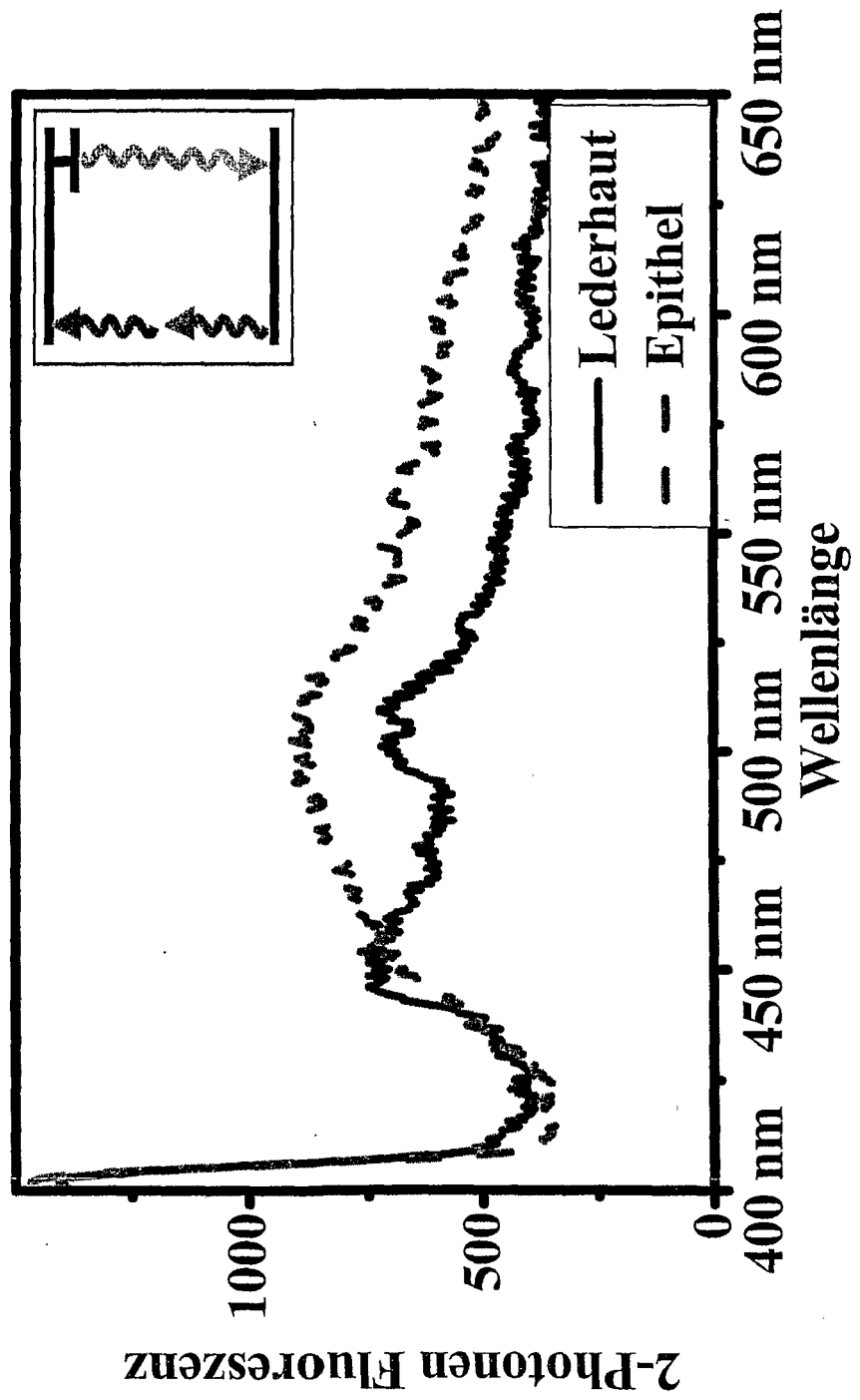
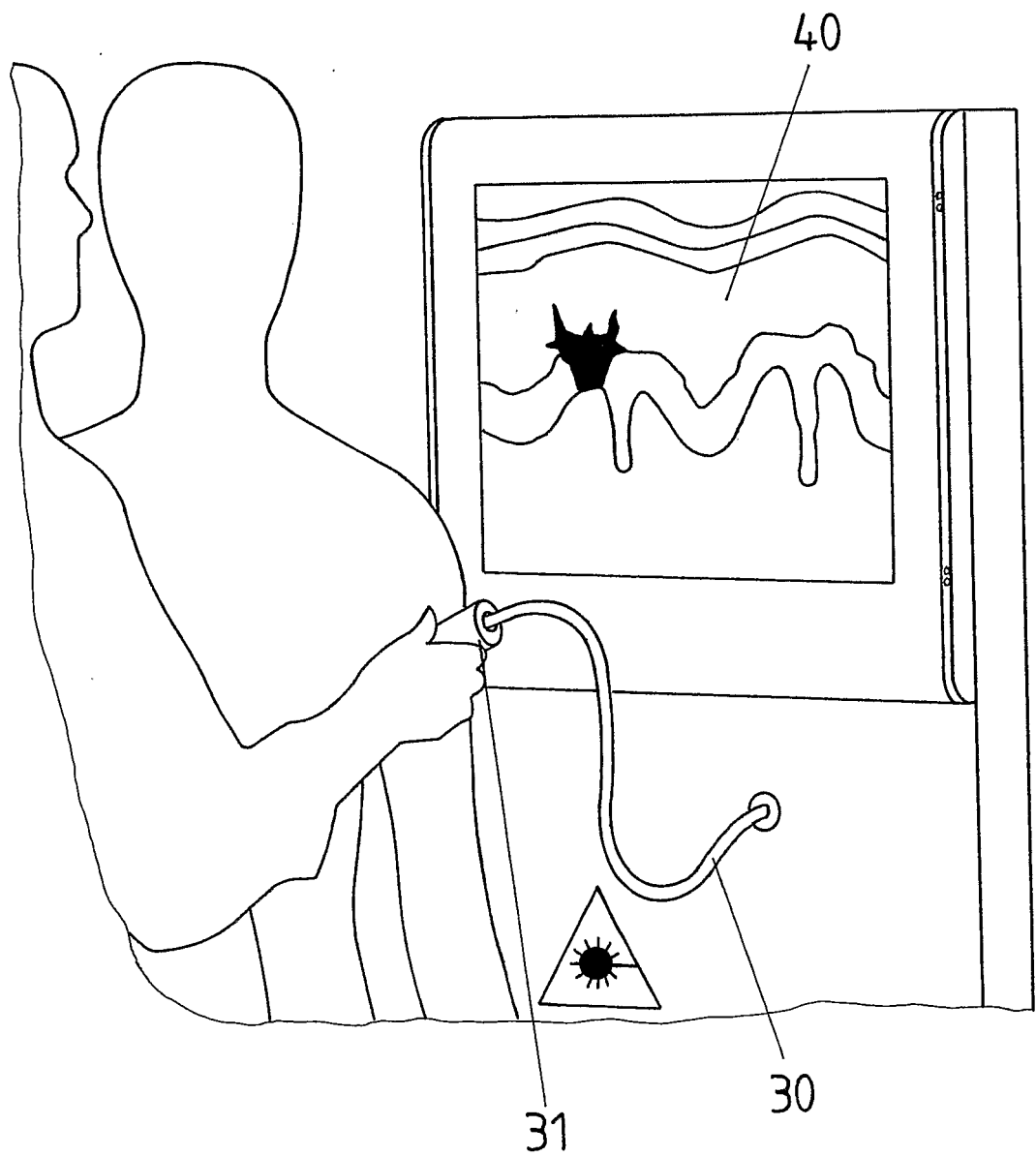


FIG 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2006/000941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/64 A61B5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | US 5 413 108 A (ALFANO ET AL) 9 May 1995 (1995-05-09) column 2, line 10 - line 46 column 4, line 57 - column 5, line 31 ----- | 1,33,46, 61 |
| X | WO 00/07514 A (PHOTOGEN, INC) 17 February 2000 (2000-02-17) page 15, line 1 - page 21, last line ; figures 3-10 ----- | 1,33,46, 61 |
| X | DE 199 27 724 A1 (OPTISCAN PTY LTD., NOTTING HILL) 20 January 2000 (2000-01-20) column 1, line 3 - column 5, line 14; figures 1a-2b ----- | 1,33,46, 61 |
| | ----- -/-- | |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2006

Date of mailing of the international search report

04/09/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Consalvo, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2006/000941

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO 02/28273 A (YANG, VICTOR, X., D; WILSON, BRIAN, C; MULLER, PAUL, J; HERMAN, PETER,) 11 April 2002 (2002-04-11) figures 1,2,9,10 ----- | 1-66 |
| A | US 5 759 767 A (LAKOWICZ ET AL) 2 June 1998 (1998-06-02) column 2, line 14 - last line ; claims 1-11,15-22 ----- | 1-66 |
| A | WO 97/11355 A (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC; WEBB, WATT, W; XU, CHRIS) 27 March 1997 (1997-03-27) page 2, line 28 - page 7, line 25; figure 1 ----- | 1-66 |
| A | US 5 034 613 A (DENK ET AL) 23 July 1991 (1991-07-23) column 2, line 15 - column 4, line 4; figures 1,1A column 9, line 24 - line 56 ----- | 1-66 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/DE2006/000941

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|---|--|
| US 5413108 | A | 09-05-1995 | NONE | |
| WO 0007514 | A | 17-02-2000 | AU 760418 B2 AU 5460799 A BR 9912776 A CA 2339252 A1 CN 1317951 A EP 1100394 A1 JP 2002522110 T | 15-05-2003 28-02-2000 08-05-2001 17-02-2000 17-10-2001 23-05-2001 23-07-2002 |
| DE 19927724 | A1 | 20-01-2000 | GB 2338568 A | 22-12-1999 |
| WO 0228273 | A | 11-04-2002 | AU 9359201 A CA 2424894 A1 | 15-04-2002 11-04-2002 |
| US 5759767 | A | 02-06-1998 | WO 9816656 A1 | 23-04-1998 |
| WO 9711355 | A | 27-03-1997 | AU 700560 B2 AU 6972496 A CA 2231222 A1 DE 69635521 D1 DE 69635521 T2 DE 852716 T1 EP 0852716 A1 JP 10512959 T JP 2002139436 A JP 2006106004 A NO 981032 A NZ 318277 A | 07-01-1999 09-04-1997 27-03-1997 05-01-2006 17-08-2006 19-07-2001 15-07-1998 08-12-1998 17-05-2002 20-04-2006 04-05-1998 25-02-1999 |
| US 5034613 | A | 23-07-1991 | AT 170636 T AT 253727 T DE 69032621 D1 DE 69032621 T2 DE 69034117 D1 DE 69034117 T2 DK 0807814 T3 EP 0500717 A1 ES 2123501 T3 ES 2210414 T3 HK 1010411 A1 JP 2848952 B2 JP 5503149 T WO 9107651 A1 | 15-09-1998 15-11-2003 08-10-1998 25-03-1999 11-12-2003 19-08-2004 15-03-2004 02-09-1992 16-01-1999 01-07-2004 07-04-2000 20-01-1999 27-05-1993 30-05-1991 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2006/000941

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N21/64 A61B5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N A61B

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | US 5 413 108 A (ALFANO ET AL) 9. Mai 1995 (1995-05-09) Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 46 Spalte 4, Zeile 57 - Spalte 5, Zeile 31 ----- | 1, 33, 46, 61 |
| X | WO 00/07514 A (PHOTOGEN, INC) 17. Februar 2000 (2000-02-17) Seite 15, Zeile 1 - Seite 21, letzte Zeile ; Abbildungen 3-10 ----- | 1, 33, 46, 61 |
| X | DE 199 27 724 A1 (OPTISCAN PTY LTD., NOTTING HILL) 20. Januar 2000 (2000-01-20) Spalte 1, Zeile 3 - Spalte 5, Zeile 14; Abbildungen 1a-2b ----- | 1, 33, 46, 61 |
| | -/-- | |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|--|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 28. August 2006 | Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts 04/09/2006 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Consalvo, D |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2006/000941

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | WO 02/28273 A (YANG, VICTOR, X., D; WILSON, BRIAN, C; MULLER, PAUL, J; HERMAN, PETER,) 11. April 2002 (2002-04-11) Abbildungen 1,2,9,10 ----- | 1-66 |
| A | US 5 759 767 A (LAKOWICZ ET AL) 2. Juni 1998 (1998-06-02) Spalte 2, Zeile 14 - letzte Zeile ; Ansprüche 1-11,15-22 ----- | 1-66 |
| A | WO 97/11355 A (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC; WEBB, WATT, W; XU, CHRIS) 27. März 1997 (1997-03-27) Seite 2, Zeile 28 - Seite 7, Zeile 25; Abbildung 1 ----- | 1-66 |
| A | US 5 034 613 A (DENK ET AL) 23. Juli 1991 (1991-07-23) Spalte 2, Zeile 15 - Spalte 4, Zeile 4; Abbildungen 1,1A Spalte 9, Zeile 24 - Zeile 56 ----- | 1-66 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2006/000941

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|----|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5413108 | A | 09-05-1995 | KEINE | |
| WO 0007514 | A | 17-02-2000 | AU 760418 B2 | 15-05-2003 |
| | | | AU 5460799 A | 28-02-2000 |
| | | | BR 9912776 A | 08-05-2001 |
| | | | CA 2339252 A1 | 17-02-2000 |
| | | | CN 1317951 A | 17-10-2001 |
| | | | EP 1100394 A1 | 23-05-2001 |
| | | | JP 2002522110 T | 23-07-2002 |
| DE 19927724 | A1 | 20-01-2000 | GB 2338568 A | 22-12-1999 |
| WO 0228273 | A | 11-04-2002 | AU 9359201 A | 15-04-2002 |
| | | | CA 2424894 A1 | 11-04-2002 |
| US 5759767 | A | 02-06-1998 | WO 9816656 A1 | 23-04-1998 |
| WO 9711355 | A | 27-03-1997 | AU 700560 B2 | 07-01-1999 |
| | | | AU 6972496 A | 09-04-1997 |
| | | | CA 2231222 A1 | 27-03-1997 |
| | | | DE 69635521 D1 | 05-01-2006 |
| | | | DE 69635521 T2 | 17-08-2006 |
| | | | DE 852716 T1 | 19-07-2001 |
| | | | EP 0852716 A1 | 15-07-1998 |
| | | | JP 10512959 T | 08-12-1998 |
| | | | JP 2002139436 A | 17-05-2002 |
| | | | JP 2006106004 A | 20-04-2006 |
| | | | NO 981032 A | 04-05-1998 |
| | | | NZ 318277 A | 25-02-1999 |
| US 5034613 | A | 23-07-1991 | AT 170636 T | 15-09-1998 |
| | | | AT 253727 T | 15-11-2003 |
| | | | DE 69032621 D1 | 08-10-1998 |
| | | | DE 69032621 T2 | 25-03-1999 |
| | | | DE 69034117 D1 | 11-12-2003 |
| | | | DE 69034117 T2 | 19-08-2004 |
| | | | DK 0807814 T3 | 15-03-2004 |
| | | | EP 0500717 A1 | 02-09-1992 |
| | | | ES 2123501 T3 | 16-01-1999 |
| | | | ES 2210414 T3 | 01-07-2004 |
| | | | HK 1010411 A1 | 07-04-2000 |
| | | | JP 2848952 B2 | 20-01-1999 |
| | | | JP 5503149 T | 27-05-1993 |
| | | | WO 9107651 A1 | 30-05-1991 |

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于组织的视觉表征的方法和设备 | | |
| 公开(公告)号 | EP1889039A1 | 公开(公告)日 | 2008-02-20 |
| 申请号 | EP2006753223 | 申请日 | 2006-05-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | W.O.M.药物世界有限责任公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | W.O.M.世界医药股份公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | W.O.M.世界医学GmbH的 | | |
| [标]发明人 | FREUDENBERG THOMAS SCHONBORN KARL HEINZ | | |
| 发明人 | FREUDENBERG, THOMAS SCHÖNBORN, KARL-HEINZ | | |
| IPC分类号 | G01N21/64 A61B5/00 G01N21/17 G01N21/47 | | |
| CPC分类号 | G01N21/6458 A61B5/0059 A61B5/0062 A61B5/0064 A61B5/0066 A61B5/0068 G01N21/4795 G01N21/6486 G01N2021/1787 G01N2021/6478 G01N2021/6482 | | |
| 优先权 | 102005025243 2005-05-31 DE 102005025242 2005-05-31 DE 102005025241 2005-05-31 DE | | |
| 其他公开文献 | EP1889039B1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及一种用于视觉表征由细胞形成的人或动物组织的方法，具有以下步骤：提供用于发射定向电磁辐射的辐射源；- 用辐射照射待表征的组织，这在组织中产生反射，这是组织的特征，- 在相对于传播方向横向延伸的激发区域内穿透组织的辐射辐射的强度足以激发组织中的特征反射。根据本发明，由辐射源发射的辐射被施加强度分布，横向于其传播方向，这使得激发区域覆盖组织的多个细胞，并且激发的反射源自细胞间组织特性。在第二方面，本发明涉及一种方法，其中由辐射源发射的辐射相对于传播方向横向周期性地偏转，使得辐射周期性地扫描在测量点周围的组织区域，该区域在组织的多个细胞。本发明还涉及用于实施该方法的设备。