

# Fluoreszenzspektroskopische Gewebeidentifikation zur gezielten Gewebsabtragung mit dem Excimerlaser (308 nm)

R. Jahn<sup>1</sup>, W. Neu<sup>2</sup>, M. Dressel<sup>3</sup>, B. Körber<sup>2</sup>, H.U. Langendorff<sup>1</sup>,  
R. Nyga<sup>2</sup> und K.H. Jungbluth<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universitäts-Krankenhaus Hamburg-Eppendorf, Chirurgische Klinik, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Prof Dr. K.H. Jungbluth), Martinistraße 52, D-W-2000 Hamburg 20

<sup>2</sup> Laser-Laboratorium Göttingen e.V., Im Hassel 21, D-W-3400 Göttingen

<sup>3</sup> University of British Columbia, Department of Physics, Canada

## Einleitung

Während des Abtragungsvorganges (Ablation) mit dem Excimerlaserstrahl entsteht bei jedem Laserschuß eine bläuliche Fluoreszenzstrahlung. Die Auslösung erfolgt dadurch, daß das auftreffende UV-Licht die Elektronen der äußeren Atomshale (Bohr'sches Atommodell) anregt und damit in einen energetisch höheren (aber labileren) Zustand versetzt. Nach ca.  $10^{-8}$  s fallen die Elektronen unter Aussendung von Lichtstrahlung (Fluoreszenzstrahlung) in den (stabilen) Grundzustand zurück. Die emittierte Strahlung ist stets energieärmer als die absorbierte, daher befindet sich die Fluoreszenzstrahlung immer in einem langwelligeren Bereich als die induzierende Laserstrahlung. Für den Excimerlaser betrachtet, der Strahlung im nicht sichtbaren UV-Spektrum (308 nm) aussendet, bedeutet das, daß die Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich stattfindet. Bei der spektrographischen Aufzeichnung finden sich an biologischem Gewebe, welches aus einer Vielzahl von Atomen und Molekülen besteht, Fluoreszenzspektren mit breiter Bande.

Die Intensität des Fluoreszenzlichtes hängt dabei von der Anzahl der angeregten Elektronen ab. Gewebespezifische Fluoreszenzspektren resultieren nicht nur aus dem unterschiedlichen Kalksalzgehalt verschiedener Gewebe. Auch Proteine führen durch Strahlungsabsorption und dementsprechende Elektronenanregung zu eigenständigen, spezifischen Fluoreszenzspektren.

## Material und Methode

Der zur Ablation an biologischem Gewebe und gleichzeitigen Detektion der laserinduzierten Fluoreszenz verwendete optische Aufbau muß zwei Voraussetzungen erfüllen. Zum einen ist eine optimale Einkopplung des Laserstrahls am proximalen Ende der Ablationsfaser notwendig, um am distalen Faserende Energiedichten zu erhalten, die eine Ablation ermöglichen. Zum anderen ist zur gleichzeitigen Detektion der Fluoreszenzstrahlung eine Trennung von Laserstrahl und Fluoreszenzlicht notwendig. Die Fluoreszenzstrahlung ist dabei mit möglichst geringen Intensitätsverlusten in eine zweite Quarzfaser

einzukoppeln, die eine flexible Übertragung zum Detektionssystem gewährleistet.

Als Laser wird der Excimerlaser (308 nm) EMG 101 (Lambda Physik) verwendet. Der mit einer Quarzlinse (Brennweite 190 mm) auf die Ablationsfaser fokussierte Laserstrahl wird durch eine Irisblende und die zentrale Bohrung ( $d=4$  mm) eines Hohlspiegels geführt. Mittels spezieller Ausrichtung der Blende wird eine Beleuchtung der Rückseite des Hohlspiegels und somit auch eine Fluoreszenz des Spiegelmateriale verhindert.

Das bei der Laserablation entstehende Fluoreszenzlicht wird in die gleiche Faser eingekoppelt und zum Hohlspiegel zurückgeleitet. Ein kleiner Winkel ( $7,5^\circ$ ) zwischen der optischen Achse des Hohlspiegels und der optischen Achse der Laserstrahleinkopplung bedingt die Separation des auf den Hohlspiegel auftreffenden Fluoreszenzlichtes. Dieses wird durch Justierung des Hohlspiegels in die Analysefaser eingekoppelt und zum Detektionssystem geleitet.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren dient ein Optical-Multichannel-Analyzer (OMA) (EG & G PAR OMA III, Modell 1460) mit UV-Detektor (Modell 1420 mit Silizium-Photodioden Array, 1024 Pixel), der direkt mit einem Polychromator (AMKO Metrospec) verbunden ist. Direkt hinter dem Eingangsspalt des Polychromators befinden sich Blockungsfilter (WG 335  $d=2$  mm) und zwei 5 mm starke Glasfilter, die die Absorption der ebenfalls retrograd durch die Ablationsfaser geleiteten Excimerlaserstreustrahlung übernehmen.

Die Analyse der Fluoreszenzspektren pro Laserschuss erfolgt innerhalb von 30 ms per Computer.

## Ergebnisse

Es wurden mehrere Arten von Knochen, hyaliner Gelenkknorpel, Meniskus, Sehne, Muskulatur und Spinalmark spektroskopiert. Die aufgezeichneten Spektren von Knochen, gleich welcher Lokalisation (Femur, Tibia, Wirbel, Talus) zeigten immer wieder ein typisches Profil mit nur geringen Intensitätsabweichungen. Das Spektrum läßt neun Emissionen mit einer Halbwertsbreite von 25 nm bis 35 nm erkennen. Die maximale Intensität weist die Emission bei 442 nm auf. In Relation dazu stehen die Intensitäten bei 395 nm mit 85%, bei 426 nm mit 90%, bei 527 nm 40%, bei 558 nm 47%, bei 615 nm 50% und bei 644 nm und 486 nm 30%.

Hyaliner Gelenkknorpel weist Peaks im Bereich von 390 nm, 400 nm, 410 nm, 440 nm, 450 nm bis 460 nm auf, um dann, im Gegensatz zum Knochen, zu einem kontinuierlichen Kurvenabfall überzugehen.

Muskel zeigt nach einigen Peaks im Bereich von 340 nm bis 400 nm bereits ab 430 nm einen kontinuierlichen Kurvenabfall. Die relativ harmonische Kurve des Meniskus zeigt von 390 nm bis 480 nm einen bogenförmigen Kurvenan- und -abstieg. Die Patellarsehne im engeren Spitzenbereich von 390 nm bis 440 nm weist eine höhere Intensität auf.

Spinalmark, mit einer ebenfalls zweigipfligen Kurve wie Knochen, verhält sich spiegelverkehrt. Seine Maxima befinden sich in den Bereichen, in denen das Knochenspektrum sein Minimum aufweist.

Diese Untersuchungen sind an Luft durchgeführt worden. Sowohl für eine effektive Ablation als auch unter normalen endoskopischen Operationsbedingungen ist ein Vorgehen im wäßrigen Medium von Nöten.

Hier treten vorläufig noch Schwierigkeiten auf, indem die Spektren sich wesentlich undeutlicher darstellen.

## **Diskussion**

Es ist möglich, während der Excimerlaserablation aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzspektren nicht nur kalzifizierte und nichtkalzifizierte Gewebe zu unterscheiden, sondern auch Gewebe mit differierendem Proteingehalt (Muskel, Sehne, Knorpel, Spinalmark).

Die aufgezeichneten Spektren an Luft zeigen deutliche Unterscheidungsmerkmale, die ausreichen, um nach systematischer Ermittlung von Referenzbereichen einen Computer auf die Bearbeitung eines bestimmten Gewebes zu programmieren. Die Umsetzung des ankommenden Signals in Form des Fluoreszenzspektrums erfolgt innerhalb von 30 ms, so daß rechtzeitig, beim Abweichen der Faser auf nichtprogrammiertes Gewebe (z.B. bei Präparationen in Narbengebieten), per Computer die Abgabe des nächsten Laserschusses verhindert werden kann.

Limitiert ist die Methode jedoch noch bei Applikationen in flüssigen Medien wie z.B. Wasser, Kochsalz und Blut.

An Luft können die Ablationsprodukte schneller expandieren. Unter Flüssigkeit baut sich in der Ablationswolke ein wesentlich höherer Druck auf als an Luft. Werden die durch den Laser angeregten Moleküle und Atome des Gewebes jedoch unter Druck gesetzt, dann wird die Anregungsenergie beim Übergang in den Grundzustand der Elektronen nicht mehr ausschließlich in Form einer Lichtemission freigesetzt, sondern kann durch Stoßdesaktivierung umgesetzt werden. Diese Stoßrelaxation verhindert das Auftreten der Linienspektren.

Um diese Spektren auch in Flüssigkeit aufzeichnen zu können, bedarf es daher einer Verstärkung der Fluoreszenz. Wir arbeiten derzeit an einer neuen Methode, bei der mittels der resonanten Anregung durch einen Dylaser, die für das jeweilige Gewebe typischen Ablationsprodukte schmalbandige Spektren ergeben.

Mit diesen hochselektierten Spektren wird eine Differenzierung biologischer Gewebe auch in Flüssigkeit oder Blut erfolgen, so daß ein computergesteuerter präziser Einsatz des Excimerlasers in unzugänglichen und unübersichtlichen Operationsregionen möglich werden kann.

## **Zusammenfassung**

Während des Ablationsvorganges entsteht bei jedem Laserschuß eine Fluoreszenzstrahlung, deren Spektrum von der chemischen Zusammensetzung des bestrahlten Gewebes bestimmt wird. Die Fluoreszenzstrahlung wird durch die

gleiche Faser in umgekehrter Richtung geleitet, durch die orthograd der Laserstrahl geführt wird. Ein optischer Vielkanalanalysator speichert die gewebetypischen Kurven und stellt die Spektren gleichzeitig auf einem Monitor dar. Damit wird es möglich, über die charakteristische Fluoreszenzstrahlung eine gezielte Laserablation durchzuführen, wobei ein Computer die Arbeit des Lasers überwacht und steuert, um so eine ungewollte Bestrahlung (z.B. von Nerven, Gefäßen oder Spinalmark) zu verhindern. Wir spektroskopierten simultan zur Ablation mit dem Excimerlaser (308 nm) Knochen, hyalinen Gelenknorpel, Meniskus, Sehnen, Muskulatur und Spinalmark. Es stellten sich für jedes Gewebe spezifische Kurven dar, die nicht nur vom Kalkgehalt, sondern auch von den jeweiligen Proteinanteilen bestimmt waren. Der Einfluß des umgebenden Mediums wurde an Luft, in Kochsalzlösung und in Blut getestet. An der Weiterentwicklung dieser Methode mit Hilfe eines durchstimmbaren Farbstofflasers zur Resonanzfluoreszenzspektroskopie im „Ablationsplasma“ arbeiten wir zur Zeit.