



Ronald Krebs (Autor)

Entwicklung eines optoakustischen Verfahrens zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von menschlicher Haut *in vivo* mittels eines probabilistischen Ansatzes nach Bayes



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/724>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Kapitel 1

Einleitung

Ein zentrales Thema in der Medizin- und Umweltforschung sind die mannigfaltigen Wirkungen der terrestrischen UV-Strahlung auf die menschliche Haut [1]. Zu der bekanntesten Wirkung zählt die Induzierung von Hautkrebs [2]. Weniger bekannt ist, dass die biologischen Effekte der UV-Strahlung in der Haut stark wellenlängenabhängig sind. Die UV-Strahlung wird bisher in zwei Wellenlängenbereiche kategorisiert, in UVB (280 - 315 *nm*) und UVA (315-400 *nm*).

In den 1930er Jahren führte die Internationale Beleuchtungskommission (CIE), Komitee 41 “Ultra-violette Strahlung” [3] die Begriffe UVA und UVB als Kurzbezeichnung für photobiologische Spektralbereiche ein. Es war jedoch nicht beabsichtigt, die Bedeutung dieser Bereiche auf bestimmte Wirkungen der spektralen Anteile der UV-Strahlung einzuschränken. Dies ist insofern bemerkenswert, da die photobiologischen Effekte dennoch dem UVA/B-Bereichen zugeordnet werden. Die Festlegung der UVA/B-Grenze bzw. der Übergang vom langwelligeren UVA zum UVB-Bereich ist schon seit längerem Gegenstand kontroverser Diskussionen [4]. Wellenlängenabhängige Messungen wie beispielsweise die Minimale-Erythem-Dosis (MED)¹ zeigen, dass eine Verschiebung der UVA/B-Grenze aufgrund der photobiologischen Prozesse als sinnvoll erscheint [5, 6].

Die photobiologischen Auswirkungen umfassen im UVB-Bereich von 280 - 315 *nm* neben Erythemerzeugung (Sonnenbrand) und Pigmentierung² (PPD, Permanent Pigment Darkening) noch weitere photobiologische Effekte wie die Induzierung von Hautkrebs (Photokarzinogenese) und die Schwächung des Immunsystems (Immunsuppression) [7, 8]. Die menschliche DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 *nm*. Dies führt dazu, dass die kurzwelligen Anteile der UVB-Strahlung Mutationen, Zellsterben und Photokarzinogenese verursachen können [9, 10]. Im UVA-Bereich von 315 - 380 *nm* ist neben der möglichen Tumorentstehung, die am Tiermodell untersucht wurde [11, 12], vor allem die Hautalterung [13] sowie die Sofortpigmentierung der Haut (IPD, Immediate Pigment Darkening) zu erwähnen [14, 15]. Im Gegensatz zur UVB- entfaltet UVA-Strahlung ihre photobiologische Wirkung im Wesentlichen durch die Erzeugung von oxidativem Stress. Der UVA-Bereich wird in die UVA-I- und die kurzwelligere UVA-II-Strahlung unterteilt.

¹ anschaulich: die minimale Dosis zum Erzeugen eines Sonnenbrandes

² braune Färbung der Haut nach UV-Exposition

Während die UVA-II-Strahlung im Bereich von 315 - 340 nm sowohl DNA direkt schädigen kann als auch oxidativen Stress hervorruft, scheint die UVA-I-Strahlung im Wellenlängenbereich von 340 - 400 nm ihre Wirkung durch die Generierung von Singulett-Sauerstoff zu entfalten. Hier sind die relevanten Chromophore³ bislang weitgehend unbekannt [16].

Laut der Weltgesundheitsorganisation erkranken jährlich zwei bis drei Millionen Menschen an nicht-bösartigen Hauttumoren und 130.000 an bösartigen Melanomen [2]. Zurückzuführen ist dies unter anderem auf das veränderte Freizeitverhalten der Menschen, das sich in ausgiebigen Sonnenbädern sowie intensiver Nutzung von Sonnenbanken, die sich seit den 1980ern sehr stark etabliert haben, äußert [17]. Eine braune Hautfärbung gilt vielerorts immer noch als gesund und sportlich und motiviert viele Menschen, sich übermäßig lange einer starken Strahlung durch Sonne oder Solarium auszusetzen. Derartiges Verhalten zeigt, dass noch viel Aufklärungsbedarf besteht. Die Belastung des menschlichen Körpers durch ultraviolette Strahlen steigt zusätzlich durch die Verringerung der stratosphärischen Ozonschicht, einem globalen Effekt, der seit längerer Zeit beobachtet wird [18]. Durch den Abbau der Ozonschicht steigt die terrestrische Solarstrahlung im Bereich von 290 - 320 nm auf der Erdoberfläche. Zusätzlich erfolgt eine spektrale Verbreiterung der transmittierten UVB-Strahlung des Sonnenspektrums zu kürzeren Wellenlängen ([19, 20]). Nach einer Schätzung des United Nations Environment Programme (UNEP) könnte eine Verringerung der Ozonschicht um 10% zu einem weiteren Anstieg von 500.000 nicht-malignen Melanomen und 14.500 malignen Melanomen führen [21].

Die UV-Strahlung hat neben negativen auch positive Effekte auf den menschlichen Körper. Ein aktuelles Forschungsthema ist z.B. die Vitamin-D-Synthese, die UVB-Strahlung benötigt [22, 23]. Darüber hinaus wird UV-Strahlung bereits erfolgreich in der Phototherapie zur Behandlung von Hauterkrankungen wie z. B. Psoriasis oder Neurodermitis angewendet [24, 16]. Der therapeutische Einsatz von UV-Licht erfolgt allerdings vorwiegend auf empirischer Basis. Die genaue Analyse dieser photobiologischen Mechanismen ist dementsprechend für die Entwicklung effektiver therapeutischer und protektiver Maßnahmen von entscheidender Bedeutung. Nur durch eine wellenlängenselektive Differenzierung der Chromophore in den oberen Hautschichten kann für einen spezifischen, sogenannten biologischen Endpunkt der zugrunde liegende Mechanismus bestimmt werden.

Die beschriebenen UV-Wirkungen und -Effekte sind bereits intensiv, jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden [19, 1]. Zum besseren Verständnis dieser Effekte bedarf es detaillierter Informationen über die wellenlängenabhängige Lichtausbreitung im Gewebe. D.h., die photobiologischen Wirkungen von UV-Strahlung und insbesondere die karzinogene Wirkung ließen sich besser ein- bzw. abschätzen, wenn die exakte wellenlängenabhängige Eindringtiefe bekannt wäre. Abbildung 1.1 zeigt eine Abschätzung der Eindringtiefen verschiedener UV-Strahlungsbereiche. Es wird vermutet, dass die Hautoberfläche und die obersten Hautschichten Wellenlängen kürzer als die UVB-Strahlung (sog. UVC-Strahlung) fast vollständig absorbieren und zum Teil reflektieren. Bei der UVB-Strahlung wird eine Eindringtiefe bis in den Bereich der Basalzellschicht geschätzt. Die oberste Hautschicht, das *Stratum corneum*, besteht aus abgestorbenen Zellen. Eine Zellmutation kann also erst in den ca. 10-30 μm tiefer gelegenen Hautschichten stattfinden (z.B. in der Basalzellschicht). UVA-Strahlung dringt schätzungsweise, je nach Wellenlänge, bis zu 4 mm

³ Farbstoff bzw. Molekül, das für die Absorption von Licht verantwortlich ist

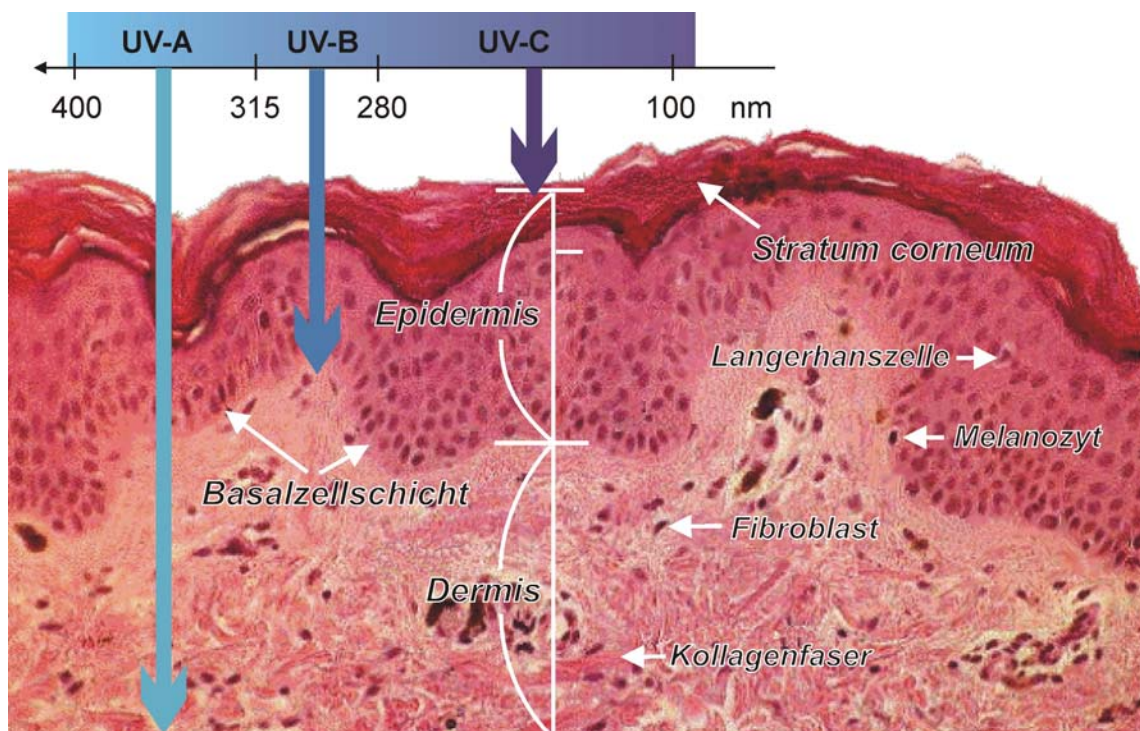


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von menschlicher Haut und die geschätzten Eindringtiefen bei verschiedenen UV-Wellenlängenbereichen [25]

tief in die Haut ein. Die *Epidermis* und *Dermis* sind strukturell sehr unterschiedlich. Aus diesem Grund können die in diesen Schichten stattfindenden UV-Mechanismen nur mit genauer Kenntnis über die Lichtverteilung bei unterschiedlichen UV-Wellenlängen in diesen einzelnen Schichten untersucht werden.

Abgesehen von der Notwendigkeit, die Untersuchungen wellenlängenabhängig durchzuführen, ist es besonders wichtig, Messungen am lebenden Gewebe (*in vivo*) vorzunehmen. Es hat sich gezeigt, dass sich die optischen Eigenschaften einer vom Organismus abgetrennten Hautprobe (*ex vivo*) im Vergleich zu der restlichen, nicht abgetrennten Haut des Probanden stark verändern [26]. Ursachen dafür liegen u.a. in der mechanischen Veränderung des Hautstücks durch die Abtrennung und in der Trennung des Durchblutungssystems von der Hautprobe, die zu einer Austrocknung der Haut führt. Somit erlauben Untersuchungen von entnommenen Hautproben (*ex vivo*) keine zuverlässigen Aussagen bezüglich der photobiologischen Prozesse in lebendem Gewebe. *Deshalb sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Bestimmung optischer Eigenschaften von menschlicher Haut in vivo durchgeführt werden müssen.*

1.1 Methoden zur direkten Bestimmung optischer Eigenschaften

Bisherige Messungen der optischen Parameter von menschlicher Haut im UV-Wellenlängenbereich wurden zum größten Teil an entnommenem Hautgewebe (*ex vivo*) durchgeführt [27, 28, 29, 30, 31,

32, 33, 34, 35, 26]. Hierbei galt es, die Transmissions-, Reflexions- und Streuparameter separierter Hautschichten durch spektroskopische Messungen und Messungen in Ulbrichtkugelsystemen zu ermitteln. Anschließend wurden die Absorptions- und Streukoeffizienten μ_a und μ_s nach der Kubelka-Munk-Theorie bestimmt [29]. Die ermittelten Werte unterscheiden sich nicht nur in ihren Größenordnungen [27, 30, 31, 28], sondern auch der qualitative Verlauf der Koeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist nicht vergleichbar. So dominiert z. B. bei Wan et al.(1981) die Absorption deutlich gegenüber der Streuung [28], während dies bei Tuchin et. al.(1993) umgekehrt der Fall ist [30]. Beide Autoren verwiesen jedoch auf die starke Variation der entnommenen Hautproben in ihren Messungen. Neben der Grundpigmentierung der einzelnen Probanden hat auch die Auswahl des zu untersuchenden Areals Einfluss auf das Untersuchungsergebnis.

Als eine gängige Methode zur Probengewinnung sei das sogenannte “gluestripping” [27, 32, 33, 34] genannt, bei der die *Epidermis* über eine dünne Folie mit einer Klebeschicht separiert wird und so die Trennung der einzelnen Hautschichten (*Stratum corneum*, *Epidermis*, *Dermis*) voneinander erfolgt. Eine andere Methode zur Separation der Haut *ex vivo* ist eine mehrminütige Temperaturerhöhung auf ca. 55°C [35, 28]. Bei beiden Separationsmethoden kommt es zu Veränderungen der Probe, die sowohl die optischen als auch die mechanischen Eigenschaften einschließen [26].

Die in der Literatur verfügbaren Daten, die aus direkten Messungen an der Haut stammen, beruhen größtenteils auf Untersuchungen *ex vivo* und eher weniger auf Untersuchungen *in vivo*. Vorwiegend wurden hierfür reflexions- und transmissionsspektroskopische Techniken eingesetzt [36, 37, 38]. Ergebnisse liegen jedoch entweder nur im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich [36] von 400 bis 1000 nm bzw. bei diskreten Wellenlängen vor [37] oder liefern keine konkreten Werte für die wellenlängenspezifischen Absorptionskoeffizienten μ_a und Streukoeffizienten μ_s [38].

1.2 Verfahren basierend auf dem optoakustischen Effekt

Die Optoakustik ist eine neue und hervorragend geeignete Methode zur Untersuchung wellenlängenaufgelöster optischer Eigenschaften *in vivo*. Diese Methode verwendet einen kurzen Lichtpuls, durch den eine Ultraschallwelle im bestrahlten Medium erzeugt wird. Hierfür wird ein Nanosekunden-Laserpuls auf die zu untersuchende Probe appliziert. Die dabei vom Laserpuls durch Erwärmung erzeugte Schallwelle reproduziert die Lichtverteilung in der bestrahlten Probe. Über die Laufzeit der Schallwelle kann die Tiefe der absorbierenden Schicht und aus dem Verlauf der Schallwelle können die optischen Eigenschaften bestimmt werden.

Optoakustische Methoden finden bereits im Rahmen der Materialprüfung und -bearbeitung nutzbringend Anwendung [39]. In der Regel liegt der Fall vor, dass die bestrahlten Proben als nahezu reine Absorber wirken und ihre Streueigenschaften vernachlässigt werden können [40]. Zur Differenzierung verschiedener Substanzen und insbesondere zur Überwachung von Bearbeitungsvorgängen findet die Interpretation laserinduzierter akustischer Signale bereits vielfältig praktischen Einsatz. Auf diese Weise werden beispielsweise Störstellen und Heterostrukturen in Halbleitern sowie Materialfehler in Werkstoffen charakterisiert [41, 42, 40].

Durch die komplexe Struktur von biologischem Gewebe sind die obigen Verfahren für medizinische Zwecke nicht direkt umsetzbar. Vielmehr sind die zu interpretierenden optoakustischen Signale, bedingt durch die inhomogene Struktur von biologischem Gewebe, zahlreichen Einflüssen unterworfen [43, 44, 45]. Insbesondere die signalverändernden Einflüsse während der Ausbreitung des Ultraschalls müssen für die Anwendung der optoakustischen Gewebsdifferenzierung beachtet werden.

In der Materialforschung wird die Optoakustik fast ausschließlich zur Erzeugung einer Schallwelle verwendet. Die weitere Untersuchung beschränkt sich auf die Vermessung der akustischen Eigenschaften der Probe mit dieser Schallwelle. Es ist vergleichbar mit der diagnostischen Anwendung einer Ultraschalluntersuchung in der Medizin.

Die Nutzung der Optoakustik für biologisches Gewebe erlaubt dagegen, Informationen über die Lichtverteilung im bestrahlten Medium aus der durch die Bestrahlung entstehenden Schallwelle zu ermitteln. Damit ist ein Rückschluss auf die optischen Eigenschaften des Mediums möglich. In der Medizin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen das Potential optoakustischer Methoden zur Gewebsdifferenzierung bereits aufgezeigt. Insbesondere wird die Optoakustik hier für die Bildgebung verwendet, wobei hauptsächlich der infraroten oder sichtbaren Wellenlängenbereich genutzt wird. Ein sehr interessanter neuer Ansatz ist z. B. die multispektrale Analyse von optoakustischen Aufnahmen. So kann aus der Berechnung von mehreren optoakustischen Aufnahmen von Mäusen bei drei Wellenlängen (750, 770 und 790 nm) ein spezifisches Molekül (ein Fluorochrom) mit einer räumlichen Auflösung von 150 μm nachgewiesen werden, das in den einzelnen Messungen nicht sichtbar ist [46]. In anderen Arbeiten konnten die Gewebestrukturen von Kaninchen- und Schweineaugen *ex vivo* reproduziert werden [47, 48, 49]. Thomson et al. z. B. untersuchte mittels Optoakustik den Einfluss von Hitze auf die Haut von Ratten [50] *in vitro*. Mittels der Optoakustik konnten bereits die Blutgefäße in einem Hahnenkamm differenziert werden [51]. Auch Untersuchungen an präparierten Gewebeproben *ex vivo*, u. a. menschlicher Aorta, Hundeprostate und Rinderleber [43] zeigen das Potential der Optoakustik. Messungen an Gewebephantomen, die die Schichtstruktur der menschlichen Haut nachahmen, wurden bei einer Laserwellenlänge von 581 nm durchgeführt, und es konnten anhand dieser die Strukturen nachgewiesen werden [47].

Weitere Untersuchungen wurden an der Haut *in vivo* bei Wellenlängen von 532 und 1064 nm durchgeführt [52]. Dabei konnte das Verfahren an der menschlichen Haut der Hand und an einem Melanom die Wärmeverteilung approximieren. Es ließen sich die Absorptions- und Streukoeffizienten eines Hämatoms an einer Fingerkuppe für die Wellenlänge 581 nm berechnen [47]. Über die Laufzeit des Signals konnte die Tiefe der Absorption bestimmt werden.

Diese und weitere Studien haben gezeigt, dass neben der Vermessung homogener Strukturen auch eine Differenzierung geschichteter Gewebestrukturen *in vivo* mit einer axialen Ortsauflösung im Bereich von 20 μm prinzipiell möglich ist [53, 54, 44, 45]. Am Institut für Experimentalphysik, Karl-Franzen-Universität Graz gelang es, mit optoakustischen Untersuchungen bei zwei verschiedenen Laserwellenlängen (500 und 548 nm) Epidermis und Dermis *in vivo* zu vermessen [55]. Ausgehend von dem Modell, dass die Epidermis vornehmlich Melanin (stärkere Absorption bei 548 nm) und die Kapillargefäße der Dermis Blut (stärkere Absorption bei 500 nm) enthalten, konnten anhand der Amplitudenunterschiede der gemessenen optoakustischen Drucktransienten die Schichten der Haut differenziert werden.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass eine systematische wellenlängenaufgelöste Charakterisierung der optischen Eigenschaften, insbesondere der Absorptionskoeffizienten von menschlicher Haut, im terrestrischen UV-Bereich (290-400 nm) fehlt.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Ein flexibles, optoakustisches System für Messungen optischer Eigenschaften im terrestrischen UV-Wellenlängenbereich an menschlicher Haut *in vivo* wurde bisher noch nicht entwickelt. Außerdem fehlt eine umfassende Beschreibung der Vorgänge, die von der induzierten optoakustischen Druckwelle an bis hin zur elektrischen Spannung am Detektor ablaufen. D.h., der Prozess der initialen Druckerzeugung, die Ausbreitung der Druckwelle im Medium und die Umwandlung dieser Schallwelle in elektrische Spannung am Detektor müssen konkret charakterisiert werden, um die Bestimmung von Absorptionskoeffizienten mittels eines Vergleichs von simulierten Transienten mit Messungen zu ermöglichen.

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines Systems, das laserinduzierte optoakustische Ultraschallwellen, im Folgenden Transienten genannt⁴, im terrestrischen UV-Wellenlängenbereich detektieren, verarbeiten und auswerten kann. Es soll ein Messsystem entwickelt werden, das als Grundlage für zukünftige Untersuchungen dienen soll, um die Wechselwirkung der UV-Strahlung mit der menschlichen Haut besser zu verstehen.

Die bestehende Theorie der Erzeugung von laserinduzierten optoakustischen Ultraschallwellen [56] bietet eine analytische Lösung für die Berechnung einer homogen absorbierenden Schicht, aber keine analytische Lösung zur Berechnung von inhomogenen Absorptionsverteilungen. Die vorhandene Theorie aus der Literatur muss entsprechend an die realen experimentellen Anforderungen angepasst werden. Es wird eine Simulation von optoakustischen Transienten angestrebt, die mittels beliebig modellierten Absorptionsverteilungen der Probe den initialen Druck berechnet, anschließend die Ausbreitung der Druckwelle im Medium beschreibt und zuletzt die Umwandlung der Transiente in Spannung am Ultraschallwandler ermittelt. Insbesondere der letzte Schritt, die Abbildung der berechneten Drucktransiente auf die elektrische Spannung am Detektor mittels der Aufstellung einer Übertragungsfunktion, muss einen zentralen Punkt dieser Arbeit darstellen.

Für Messungen an menschlicher Haut *in vivo* dürfen nur minimale Laserpulsenergien verwendet werden, um die Probanden nicht einer zu hohen Dosis schädlicher UV-Strahlung auszusetzen. Zusätzlich muss für jeden applizierten Laserpuls die Laserpulsenergie aufgezeichnet werden, um die Bestimmung der Absorptionskoeffizienten zu ermöglichen. Die Laserquelle muss durchstimmbar über einen Wellenlängenbereich von 290 - 400 nm sein und Laserpulse mit einer Dauer von nicht mehr als 5 ns zur Verfügung stellen. Es gilt ein Messsystem zu konzipieren und zu realisieren, das diesen Erfordernissen genügt und UV-induzierte optoakustische Transienten *in vivo* erzeugen und detektieren kann.

⁴ Transienten sind von kurzer und impulsartiger Natur und enthalten keine vorherrschenden periodischen Signalanteile

Anschließend muss eine Methode zur Auswertung der Signale und zur Bestimmung der optischen Eigenschaften der Probe entwickelt und implementiert werden. Die aufgenommenen hochdynamischen Signale weisen, ausgehend von der Anregung mit geringen Laserpulsenergien ein sehr kleines Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf und sind zusätzlich mit Störungen überlagert. Zu berücksichtigen ist auch, dass nur wenige Messungen an der Haut des einzelnen Probanden durchgeführt werden können. Um eine zuverlässige Bestimmung von Absorptionskoeffizienten zu ermöglichen, soll ein probabilistischer Ansatz entwickelt werden, der die gerade erwähnten Unsicherheiten explizit modelliert. Die Integration des probabilistischen Ansatzes soll einen weiteren, zweiten zentralen Punkt dieser Arbeit darstellen.

Eine Evaluation des zu entwickelnden Messsystems ist anhand von Messungen an Gewebephantomen mit definierten optischen Eigenschaften durchzuführen. Diese Messungen an Proben *in vitro* dienen der Validierung des verwendeten Ansatzes und sollen die Genauigkeit der entwickelten Methode bestimmen.

Die Leistungsfähigkeit des Systems soll exemplarisch an Messungen von menschlicher Haut unterschiedlicher Probanden an verschiedenen Hautarealen *in vivo* aufgezeigt werden. Um die Flexibilität des Messsystems demonstrieren zu können, werden auch andere biologische Proben untersucht. Somit soll die Auswertung der Messungen *in vitro* und *in vivo* die erfolgreiche Umsetzung des Konzepts aufzeigen.