

Optoakustische Bildgebung – Licht rein, Schall raus?

Optoacoustic Imaging – from Light to Sound?

Autoren

B. Hindelang^{1,*}, C. Schönmann^{1,2,3,*}, J. Aguirre^{2,3}, V. Ntziachristos^{2,3}, T. Biedermann¹, U. Darsow¹

Institute

- 1 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München
- 2 Lehrstuhl für biologische Bildgebung, Technische Universität München
- 3 Institute of Biological and Medical Imaging, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-1072-7195> |

Online-Publikation: 5.3.2020 |

Akt Dermatol 2020; 46: 171–178

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0340-2541

Korrespondenzadresse

Dr. Benedikt Hindelang, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Biedersteinerstr. 29, 80802 München
benedikt.hindelang@tum.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die optoakustische Bildgebung ist eine neuartige Bildgebungsmodalität, welche auf der Aufzeichnung und Verarbeitung von Ultraschallsignalen basiert, die im Gewebe durch Absorption von Laserlicht entstehen. Die Methode vereint guten, auf Lichtabsorption beruhenden Kontrast mit hoher Eindringtiefe und ermöglicht sowohl morphologische als auch molekulare und funktionelle Bildgebung. Sie kann mit oder ohne Kontrastmittel eingesetzt werden und ist frei von ionisierender Strahlung. Darüber hinaus ist die Technik skalierbar und kann somit zur makroskopischen, mesoskopischen und mikroskopischen Bildgebung verwendet werden.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe verschiedener Systeme zur optoakustischen Bildgebung entwickelt und in vielfältigen Bereichen der präklinischen und klinischen Forschung eingesetzt. In der Dermatologie zeigten sich vielversprechende Anwendungsgebiete der Optoakustik insbesondere in der Untersuchung von Melanomen, Wächterlymphknoten und nicht-melanozytärem Hautkrebs sowie in der Charakterisierung von entzündlichen Hauterkrankungen. In diesem Review sollen die technischen Grundlagen der optoakustischen Bildgebung erläutert sowie der derzeitige Stand der Forschung hinsichtlich Anwendungsbereiche makroskopischer, mesoskopischer und mikroskopischer optoakustischer Systeme beschrieben und diskutiert werden.

ABSTRACT

Optoacoustic imaging is a novel imaging modality based on the acquisition and processing of ultrasound signals generated by absorption of laser light within tissue. This method combines optical absorption contrast with high contrast deep in tissue and allows for morphological as well as molecular and functional imaging. Optoacoustic imaging can be performed label free or with contrast dyes and is non-ionizing. The technique is furthermore scalable which means that it can be used for macroscopic, mesoscopic, and microscopic imaging.

In recent years several optoacoustic systems have been developed and used in a variety of fields in both preclinical and clinical research. Promising fields of application in dermatology include the examination of melanomas, sentinel lymph nodes and non-melanoma skin cancer as well as the characterization of inflammatory skin diseases.

In this review we explain the technical basics of optoacoustic imaging and describe and discuss the current state of research in macroscopic, mesoscopic, and microscopic optoacoustic systems.

Funktionsweise der optoakustischen Bildgebung

Auf optischen Prinzipien beruhende Bildgebungsmethoden, etwa die konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM), die Multiphotonentomografie (MPT) oder die optische Kohärenztomografie

(OCT), sind in ihrer Eindringtiefe grundlegend durch die starke Lichtstreuung im Gewebe begrenzt, welche eine Bildgebung tiefer als 300 µm (KLSM und MPT) bzw. 1 mm (OCT) massiv beeinträchtigt. Ultraschall-basierte Methoden haben eine größere Eindringtiefe, sind allerdings fundamental auf Unterschiede in der akustischen Impedanz der darzustellenden Strukturen angewiesen, was zu schwachen Kontrasten innerhalb von akustisch weitgehend homogenen Geweben wie der Dermis führt.

* Gleichwertiger Beitrag

Optoakustische Bildgebung basiert auf der Aufzeichnung und Verarbeitung von Ultraschallwellen, welche durch Beleuchtung des Gewebes mit gepulsten Lasern erzeugt werden, und kombiniert damit die starke lichtabsorptionsbedingte Kontrastabbildung mit dem guten Auflösungs- zu Eindringtiefe-Verhältnis der Ultraschallbildgebung. Das Laserlicht wird in Abhängigkeit von der verwendeten Wellenlänge von verschiedenen Biomolekülen absorbiert, z. B. grünes Laserlicht von Hämoglobin. Die Strukturen, die diese Absorber enthalten, wie z. B. kleinste Blutgefäße, werden so lokal erwärmt, was zu einer kurzzeitigen Gewebeausdehnung führt. Dieser Effekt nennt sich thermoelastische Expansion. Wenn sehr kurze Laserpulse (meist wenige Nanosekunden) verwendet werden, entstehen durch die thermoelastische Expansion Druckwellen im Ultraschallbereich. Dies wird als optoakustischer oder auch photoakustischer Effekt bezeichnet. Die Ultraschallwellen können an der Körperoberfläche aufgezeichnet und mittels tomografischen Rekonstruktionsalgorithmen zu 2- oder 3-dimensionalen Bildern verarbeitet werden, welche die Verteilung der Absorber im Gewebe abbilden [1].

Bei Beleuchtung mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums können Chromophore wie Hämoglobin oder Melanin abgebildet werden, mit langwelligerem Licht im nahinfraroten Bereich auch Lipide und Proteine. Unter Verwendung mehrerer Wellenlängen (Multispektralmodus) kann mithilfe von sog. spectral unmixing-Algorithmen die Verteilung und relative Konzentration der verschiedenen Absorber dargestellt werden. Somit können neben morphologischen auch molekulare und funktionelle Informationen gewonnen werden [2]. Meist wird optoakustische Bildgebung kontrastmittelfrei eingesetzt, da endogene Absorber wie Hämoglobin, Melanin oder Lipide verwendet werden. Zur Markierung und Charakterisierung einzelner Strukturen (bspw. Krebszellen) können jedoch auch spezifische Kontrastmittel wie Indocyaningrün oder Goldnanopartikel zum Einsatz kommen [3,4].

Optoakustik kann für mikro-, meso- oder makroskopische Bildgebung eingesetzt werden. Diese verschiedenen Modalitäten unterscheiden sich technisch und in Bezug auf Eindringtiefe und Auflösung.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe verschiedener optoakustischer Modalitäten hinsichtlich ihres Potenzials für einen Einsatz in der Klinik in verschiedenen Fachrichtungen insbesondere der Dermatologie untersucht. [5] Im Folgenden gehen wir auf die technischen Grundlagen sowie einzelne Anwendungen in der Makro-, Meso- und Mikroskopie näher ein.

Optoakustische Makroskopie

Technische Grundlagen

Für die makroskopische optoakustische Bildgebung wird das Untersuchungsareal breit beleuchtet. Ein Transducer-Array detektiert die Ultraschallwellen, die zu einem Bild verrechnet werden, welches i. d. R. ein 2D-Schnitt durch das Gewebe repräsentiert.

► **Abb. 1 b** zeigt eine schematische Darstellung eines optoakustischen Makroskopiegeräts. Die optoakustische Makroskopie weist eine im Vergleich zu anderen optoakustischen Modalitäten hohe Eindringtiefe (bis ca. 1–3 cm), aber nur eine mittlere

Auflösung (ca. 100–300 µm) auf [5]. Ein kommerziell erwerbbares und zu Forschungszwecken CE-zertifiziertes Verfahren für makroskopische optoakustische Bildgebung ist die multispektrale optoakustische Tomografie (MSOT). Dieses System arbeitet mit Wellenlängen im Bereich 680–980 Nanometer, ermöglicht Bildgebung in Echtzeit und kann je nach Ausführung auch konventionelle Ultraschallbilder parallel zu den optoakustischen Bildern aufnehmen [6].

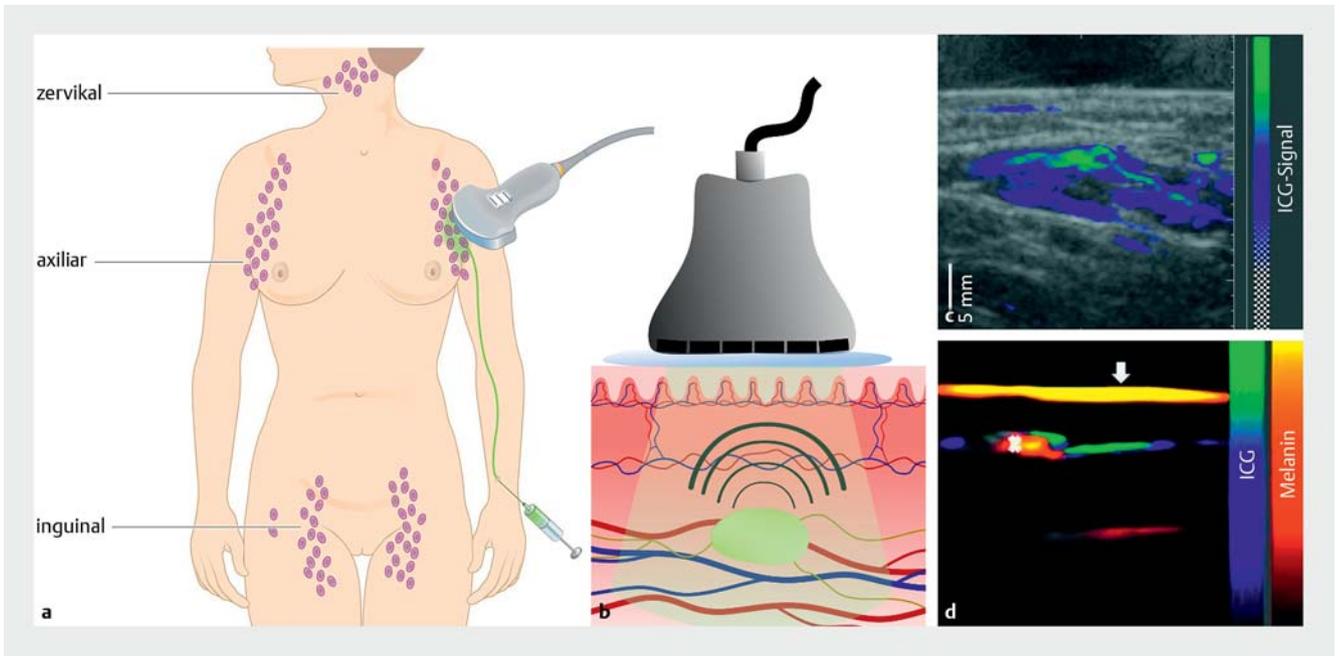
Anwendungsbeispiele für MSOT in der Dermatologie

Auf MSOT-Bildern gesunder menschlicher Haut können die epikutane Melaninschicht (► **Abb. 1**), das Hämoglobin in der gefäßreichen Dermis und Lipide des subkutanen Fettgewebes abgegrenzt werden [7].

In mehreren Pilot-Studien wurde MSOT für die Bestimmung der Ausdehnung von non-melanoma Skin Cancer verwendet. Zuletzt verglichen Chuah et al. (2019) MSOT-Messungen der Tumordicke mit histologischen Messungen. Obgleich die gemessenen Werte der beiden Methoden in vielen Fällen nicht exakt übereinstimmten, fanden die Autoren doch eine gute Korrelation zwischen der optoakustischen und der histologischen Messung ($r^2 = 0,90$, $p < 0,0001$). In den Augen der Autoren zeigt MSOT das Potenzial, durch eine exaktere präoperative Bestimmung der notwendigen Exzisionsgrenzen Nachexzisionen zu vermeiden [8].

Da MSOT eine Messung des Hämoglobingehalts des subkutanen Gewebes ermöglicht, wurde es bei Erkrankungen, die mit vaskulärer Dysfunktion einhergehen, eingesetzt. Masthoff et al. (2018) untersuchten Finger von Sklerodermie-Patienten ($n = 8$ von 7 Patienten) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ($n = 8$) und zeigten signifikant geringere Hämoglobinkonzentrationen bei den Patienten sowie signifikant geringere Werte bei Patienten mit progressivem Verlauf gegenüber Patienten mit stabilem Verlauf. Die Autoren schlossen daraus, dass die Messung der Gefäßdysfunktion mittels MSOT zur Quantifizierung der Krankheitsaktivität beitragen könnte und MSOT Potenzial birgt, frühzeitig ein Therapieansprechen zu beurteilen [6].

Eine sehr interessante dermatologische Anwendung der optoakustischen Technik am Menschen stellt die Ortung und Untersuchung von Wächterlymphknoten bei Melanom-Patienten dar. Aufgrund ihrer Eigenschaft, fast immer das endogene Chromophor Melanin zu exprimieren, sind Melanome prädestiniert für den Einsatz der optoakustischen Technik. Nachdem vorangegangene Studien in Ex-vivo-Untersuchungen und Tierexperimenten das Potenzial der Technik insbesondere zur Untersuchung von Lymphknoten-Metastasen aufgezeigt hatten, demonstrierten Stoffels et al. (2015) im Rahmen einer klinischen Studie, dass MSOT signifikante Verbesserungen gegenüber den gegenwärtig verfügbaren Methoden aufweist. Derzeit werden Wächterlymphknoten (Sentinel Lymph Nodes, SLN) durch Injektion eines radioaktiven Tracers, z. B. Technetium-99m (^{99m}Tc), im Areal des Primärtumors markiert, dann exstirpiert und hinsichtlich möglicher Metastasen histologisch untersucht (► **Abb. 1**). Die Autoren zeigten anhand von 506 SLNs von 214 Patienten mit Melanom zum einen, dass MSOT ex vivo die Erkennungsrate von Metastasen in exzidierten SLN ge-



► **Abb. 1** Anwendungsbeispiel für optoakustische makroskopische Bildgebung. **a** Schematische Darstellung einer Indocyaningrün-Injektion zur Markierung eines Wächterlymphknotens. **b** Schemazeichnung eines optoakustischen Makroskopiegeräts: Schallkopf mit Ultraschalltransducer-Array (schwarze Rechtecke) und breite Illumination des Gewebes mit Laserlicht (grüner Kegel, Laser selbst nicht dargestellt). Vom Indocyaningrün-markierten Lymphknoten werden Ultraschallwellen emittiert. **c** Overlay eines MSOT-Bildes eines mit Indocyaningrün markierten Lymphknotens mit Sonografiebild. **d** MSOT-Bild eines Melanin (markiert durch Kreuz) und Indocyaningrün enthaltenden Lymphknotens. Der Pfeil kennzeichnet das Melanin in der Kutis. Der Nachweis von Melanin im Wächterlymphknoten weist auf eine Melanometastase hin. Nachdruck der Panels **a**, **c** und **d** mit freundlicher Genehmigung von Klode J. Technik. In: Stolz W, Hänßle H, Sattler E et al., Hrsg. Bildgebende Diagnostik in der Dermatologie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. doi:10.1055/b-006-149538.

genüber dem Standardprotokoll erhöhen kann (22,9% gegenüber 14,2%), wenn die Schnittführung zur histologischen Untersuchung anhand der mittels MSOT-Bildgebung erfolgten Lokalisation von Melanin-Signalen in den Lymphknoten gewählt wurde. Weiterhin konnten die SLN mittels MSOT nach Injektion des Chromophors Indocyaningrün in bis zu 5 cm Tiefe (durch Kompression des Gewebes mit dem Schallkopf) zuverlässig identifiziert werden. Dabei wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit der ^{99m}Tc -basierten SLN-Lymphoszintigrafie erreicht, welche im Unterschied zur Markierung mit Indocyaningrün eine radioaktive Belastung für den Patienten bedeutet. Besonders vielversprechend ist zudem, dass auch ohne den Einsatz eines Kontrastmittels mittels MSOT Lymphknotenmetastasen mit einer Sensitivität von 100% erkannt werden konnten, anhand des Nachweises von Melanin in den Lymphknoten. Die Spezifität lag mit 48,6% niedriger, da andere Chromophore wie Tätowierungspigmente oder Melanophagen in den Lymphknoten nicht von den Tumorzellen unterschieden werden konnten. Insgesamt könnten angesichts der sehr hohen Sensitivität evtl. zukünftig bei fehlendem Melanin-Nachweis im MSOT SLN-Markierungen und -Exstirpationen und die damit verbundenen Risiken und Kosten vermieden werden [9, 10].

Limitationen des MSOT

Die Auswertung der MSOT-Daten ist derzeit noch recht zeitintensiv und erfordert ein umfassendes Training. Eine technische Herausforderung stellt zudem die Beurteilung tiefer gelegener

Strukturen dar, da Lichtstreuung und Signalverlust hier die quantitative Auswertung der Bildgebungsdaten mittels *spectral unmixing* erschweren. Hierfür befinden sich derzeit Korrekturalgorithmen in Entwicklung. Bez. der Anwendung zur Detektion und Beurteilung der Sentinel-Lymphknoten ist zu beachten, dass melaninfreie Mikrometastasen nicht nachgewiesen werden können.

Optoakustische Mesoskopie

Technische Grundlagen

Die in den letzten Jahren entwickelte mesoskopische Bildgebung nimmt in Bezug auf Eindringtiefe und Auflösung eine Mittelstellung zwischen Mikro- und Makroskopie ein. Optoakustische Raster-Scan-Mesoskopie (RSOM) ist zur Zeit das Verfahren mit dem besten Verhältnis von Auflösung zu Eindringtiefe aller kontrastmittelfreien dermatologischen Bildgebungsmethoden [11]. Ihre Bildgebungstiefe beträgt etwa 1,5 mm (unter Verwendung von grünem Licht; bis 5 mm unter Verwendung von Infrarotlicht) und die laterale und axiale Auflösung liegen im Bereich von 20 – 30 bzw. 5 – 10 Mikrometer, abhängig vom verwendeten Transducer. RSOM arbeitet analog zur optoakustischen Makroskopie mit breiter Beleuchtung des Untersuchungsareals, aber unterscheidet sich von dieser durch die Nutzung eines einzelnen fokussierten Breitbandtransducers anstelle eines Transducer-Arrays. ► **Abb. 2a** zeigt eine schematische Darstellung von RSOM. Das Untersuchungsareal wird von RSOM in einem Raster

abgetastet, weswegen keine Echtzeitbildgebung möglich ist. Durch die große Detektionsbandbreite (10–180 MHz) des Transducers können sowohl die winzigen Kapillarschlingen, welche sehr hochfrequente Signale erzeugen, als auch tieferliegende, größere dermale Gefäße, die tiefe Frequenzen erzeugen, detektiert werden. Somit kann u. a. der gesamte Mikrogefäßbaum der Haut hochauflösend und 3-dimensional abgebildet und analysiert werden [11, 12].

Anwendungsbeispiele für RSOM

Ihre im Vergleich zu anderen hochauflösenden Verfahren hohe Eindringtiefe, welche eine Bildgebung durch die gesamte Tiefe der Haut erlaubt, und ihre Fähigkeit, Chromophore wie Hämoglobin und Melanin in dieser hohen Auflösung darzustellen, prädisponiert die optoakustische Mesoskopie für eine Anwendung in der Dermatologie. In den letzten Jahren wurden bereits erste vielversprechende Ergebnisse klinischer dermatologischer Studien publiziert. Ein typisches RSOM-Bild gesunder Haut (► **Abb. 2b**) zeigt unter Verwendung von grünem Laserlicht die Melanin-haltige Epidermis, die Spitzen der in die dermalen Papillen ziehenden Kapillarschlingen, den subepidermalen und den dermalen Gefäßplexus. Messwerte zur Epidermisdicke aus den RSOM-Bildern zeigten eine gute Übereinstimmung mit histologischen Messungen [11]. Wird ein RSOM-Bild unter Verwendung mehrerer Laser-Wellenlängen erzeugt (multispektrales RSOM), so kann u. a. die Verteilung von Wasser und Lipiden untersucht werden. Letzteres ermöglicht z. B. die Darstellung von Talgdrüsen und des Unterhautfettgewebes [13]. Auch ermöglicht der Multipektralmodus die Bestimmung der relativen Konzentrationen von Melanin, Oxy- und Desoxyhämoglobin und somit die Bestimmung des Oxygenierungsstatus bis auf die Ebene einzelner Mikrogefäße [14]. Ein solches multispektrales RSOM-Bild ist in ► **Abb. 2**, Panel **h** dargestellt. Vielversprechende zukünftige Einsatzgebiete, welche derzeit im Rahmen von Studien untersucht werden, stellen Erkrankungen dar, die mit lokaler Hypoxie assoziiert sind (z. B. Sklerodermie, chronische Wunden oder maligne Hauttumoren) [12, 14].

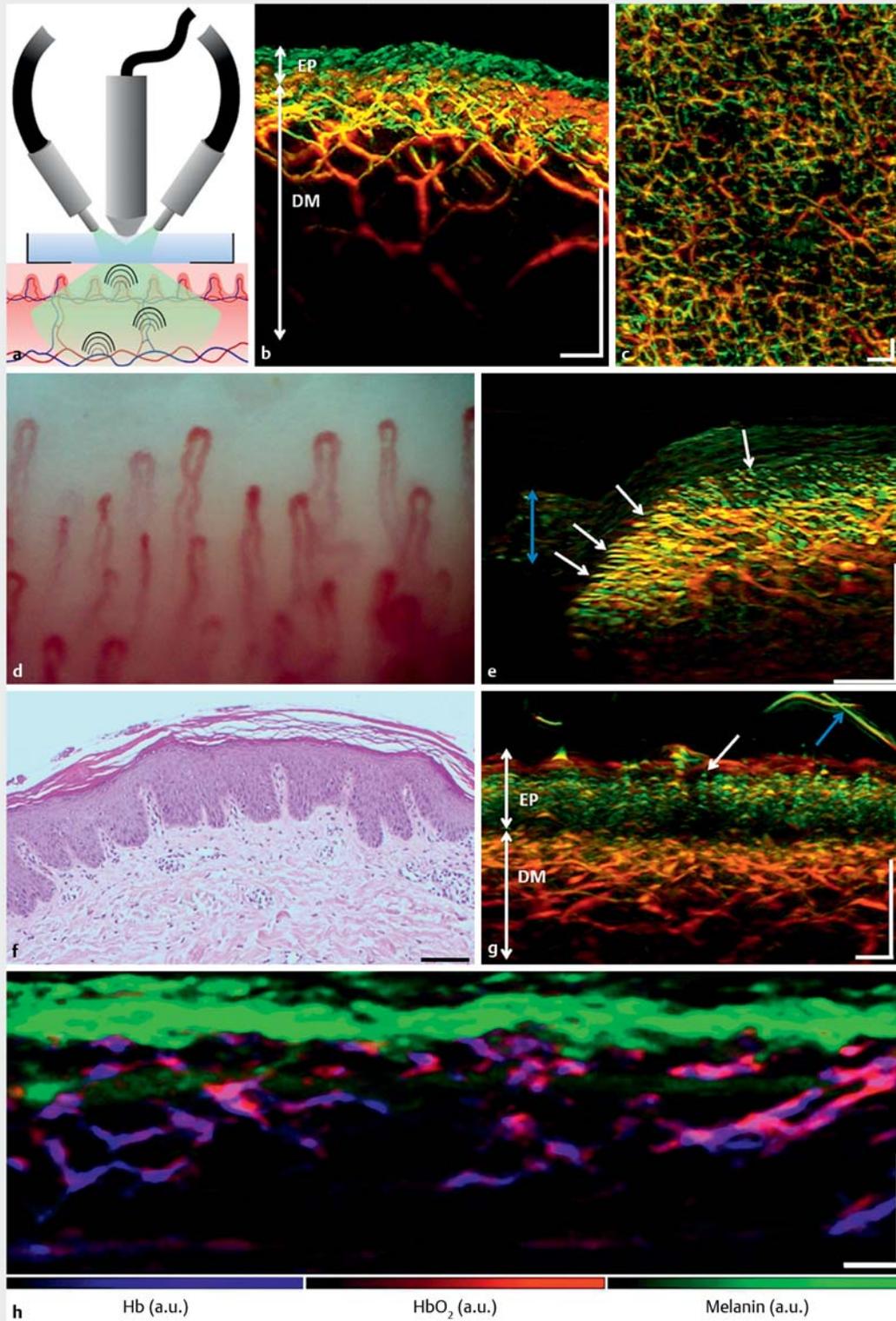
Li et al. (2018) beschrieben nach der Untersuchung verschiedener Hauttypen nach Fitzpatrick, dass die Intensität des Melaninsignals in der RSOM-Bildgebung annähernd linear mit dem mittels Kolorimetrie bestimmten Melanin-Index korreliert ist [15].

Die Fähigkeit der optoakustischen Mesoskopie, die Morphologie und Funktionalität der Mikrogefäße der Haut bis hinunter auf Kapillarebene abzubilden, hat weiterhin das Potenzial, die Evaluation einer Vielzahl dermatologischer Krankheitsbilder zu verbessern. Die objektive und genaue Quantifizierung der Schwere einer Psoriasis-erkrankung etwa ist von entscheidender Bedeutung für die Wahl der angemessenen Therapie, für das Therapiemonitoring und nicht zuletzt auch für vergleichende Wirksamkeitsstudien während der Medikamentenentwicklung. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden zu diesem Zweck klinische Scores, v. a. der Psoriasis Area and Severity Index (PASI), verwendet. Schwächen des PASI liegen in mangelnder Objektivität und Präzision, Inter-Observer-Variabilität und der Tatsache, dass der Score nur auf der oberflächlichen Erscheinung basiert und die innere Struktur der Plaques nicht abbilden kann.

Dabei sind Psoriasis-Plaques durch eine typische pathologische Binnenstruktur und Gefäßarchitektur charakterisiert (► **Abb. 2f**), und die Angiogenese stellt einen wichtigen Marker für ein Fortschreiten der Erkrankung dar. Aguirre et al. (2017) zeigten, dass RSOM in der Lage ist, wichtige Biomarker der Psoriasis darzustellen und zu quantifizieren. Im Vergleich zu gesunder Haut lassen sich ausgeprägte Akanthose, erweiterte und verlängerte Kapillarschlingen sowie ein vergrößerter Durchmesser der Gefäße des dermalen Gefäßplexus klar abbilden (► **Abb. 2g**). Die gemessenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit histologischen Messungen im untersuchten Areal. Die Autoren postulierten einen optoakustischen Index (OPIND) zur objektiven Quantifizierung der Schwere der Erkrankung basierend auf quantitativen Merkmalen aus optoakustischen Bildern – im Einzelnen die Dicke der Epidermis, das gesamte Blutvolumen in der Dermis, die Fraktalzahl als Maß der Komplexität der Gefäßstruktur sowie Dichte und mittlerer Durchmesser der Kapillarschlingen. Es zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem OPIND und dem lokalen PASI. Durch das Potenzial einer objektiven Quantifizierung der Krankheitsaktivität von Psoriasis-Plaques könnte RSOM zukünftig im Monitoring einzelner Krankheitsverläufe oder des Therapieansprechens eine Rolle spielen [11, 12].

Analog zur psoriatischen Haut lassen sich auch bei Ekzemen charakteristische Biomarker der Entzündungsaktivität mittels optoakustischer Mesoskopie darstellen und quantifizieren. In von atopischem Ekzem oder allergischem Kontaktekzem betroffener Haut wurden Elongation und Dilatation der Kapillarschlingen beschrieben [11]. Bei Kontaktekzemen zeigt sich die Verteilung der dilatierten Kapillarschlingen weniger homogen als in Psoriasis-Plaques [12]. Yew et al. (2019) berichteten in einem Case Report über einen Patienten mit atopischem Ekzem unter Therapie mit dem Interleukin-4/13-Inhibitor Dupilumab, welcher vor Beginn und nach 4 Wochen Behandlung untersucht wurde. Während der den gesamten Körper miteinbeziehende Eczema Area and Severity Index (EASI) des Patienten einen Rückgang von 12,9 auf 3,3 zeigte, hatte sich in diesem Zeitraum im Messareal am Unterarm klinisch noch keine sichtbare Verbesserung ergeben. Mittels RSOM ließ sich demgegenüber eine Abnahme der Epidermisdicke um 32%, eine Abnahme des Gesamtblutvolumens um 10% und des Durchmessers dilatierter Gefäße um 26% feststellen [16]. Zwar handelt es sich hier nur um eine Untersuchung an einem einzelnen Patienten und es besteht Bedarf nach weitergehenden Studien, aber die genannte Untersuchung zeigt das Potenzial der optoakustischen Mesoskopie, den Schweregrad von Ekzemen auch an internen strukturellen Veränderungen der Haut zu beurteilen und hierdurch evtl. subklinische Veränderungen messen zu können.

Veränderungen der Nagelfalzkapillaren sind wertvolle Marker zur frühzeitigen Diagnose einer systemischen Sklerodermie, wofür die Hellfeldmikroskopie etabliert ist. Sie erlaubt allerdings lediglich die Beurteilung der oberflächlichsten Kapillaren und kann durch Trockenheit und Verdickung der Epidermis deutlich beeinträchtigt sein. Mit RSOM kann der gesamte Mikrogefäßbaum der Nagelfalz, einschließlich der tief liegenden Kapillaren 3-dimensional und unabhängig vom Zustand



► **Abb. 2** Anwendungsbeispiele für optoakustische Mesoskopie. **a** Schemazeichnung der Funktionsweise von RSOM: Über 2 Glasfaserbündel wird die Haut breit mit Laserlicht beleuchtet (grüne Fläche), durch den optoakustischen Effekt entstehen Ultraschallwellen der Absorber enthaltenden Strukturen. Ein fokussierter Breitbandtransducer (grauer Zylinder in Bildmitte) detektiert diese Ultraschallwellen. **b** RSOM-Bild (532 nm) gesunder Haut zeigt die melaninhaltige Epidermis (EP) und stellt den gesamten Mikrogefäßbaum der Dermis (DM) dar. **c** RSOM-Bild (532 nm) der dermalen Gefäße gesunder Haut von oben betrachtet. **d** Kapillarschlingen des Nagelbetts in der Nagelfalzmikroskopie. **e** RSOM-Bild (532 nm) der Kapillaren der Nagelfalz. Die Spitzen der Kapillarschlingen sind durch weiße Pfeile markiert. Der blaue Doppelpfeil zeigt die Kutikula.

der Epidermis beurteilt werden (► **Abb. 2 d, e**). RSOM-Messungen der Gefäßdichte und des Kapillardurchmessers der oberflächlichen Kapillaren – 2 weit verbreitete Biomarker zur Evaluation der Sklerodermie – stimmten sehr gut mit Messungen mittels konventioneller Mikroskopie überein. RSOM könnte somit zur Untersuchung sonst nicht darstellbarer Gefäße eingesetzt werden und eine umfassendere Untersuchung in der Frühphase der Erkrankung erlauben [17].

Die optoakustische Mesoskopie eröffnet durch ihre Fähigkeit, melanozytäre Strukturen und Mikrogefäße mit hoher Auflösung 3-dimensional darzustellen, weiterhin neue Möglichkeiten in der Melanomforschung. Nävuszellnävi erscheinen in der RSOM-Bildgebung als melaninreiche Abschnitte der Epidermis ohne Auffälligkeiten im umgebenden Gefäßsystem [11]. Omar et al. (2015) zeigten im Mausmodell, dass RSOM die Angiogenese, die mit dem Melanomwachstum innerhalb weniger Tage auftritt, mit hoher Präzision darstellen kann [18].

Die optoakustische Mesoskopie eignet sich zudem zur funktionellen Diagnostik: Bereznoi et al. (2018) zeigten, dass RSOM als bis dato einziges Bildgebungsverfahren die Reaktivität des dermalen Gefäßnetzes gegenüber lokaler Erwärmung unter bildlicher Auflösung einzelner Mikrogefäße darstellen kann [19]. Damit eröffnen sich potenzielle Anwendungsfelder in der Untersuchung und Risikobewertung u. a. von Pathologien, die sich in dermalen Gefäßen widerspiegeln, wie Sklerodermie oder chronischen Wunden [12].

Limitationen von RSOM

Insbesondere in von Atembewegung betroffenen Körperregionen (z. B. Thorax und Rücken) kann die Bildqualität durch Bewegungsartefakte deutlich reduziert sein. Deshalb werden derzeit neue Algorithmen zur Bewegungskorrektur und neue Detekortechnologien mit kürzeren Scanzeiten implementiert [12, 20]. Bei Patienten mit dunkler Hautfarbe (v. a. Fitzpatrick-Hauttypen V und VI) kann zudem aufgrund der starken Absorption des Melanins in der Epidermis die Darstellung tiefer dermalen Gefäße erschwert sein [15].

Optical Resolution optoakustische Mikroskopie

Technische Grundlagen

Die optical Resolution optoakustische Mikroskopie arbeitet mit Beleuchtung der Probe mit stark fokussiertem Laserlicht und Verwendung eines einzelnen (meistens fokussierten) Ultraschalltransducers. ► **Abb. 3 a** zeigt eine schematische Darstellung eines optoakustischen Mikroskops. Die Fokussierung des Laserlichts definiert die laterale Auflösung. Daher ist das Auflösungs- zu Eindringtiefe-Verhältnis im Prinzip ähnlich zu dem von KLSM und MPT: Die Auflösung bewegt sich im Bereich von einigen 100 Nanometern, bei einer Eindringtiefe von einigen 100 Mikrometern [12]. Dies ermöglicht die Darstellung von Kapillaren und z. T. auch von subzellulären Strukturen. ► **Abb. 3 c** zeigt exemplarisch die Kapillaren eines Mausohrs mit optoakustischer Mikroskopie und ► **Abb. 3 b** das entsprechende Areal in der Hellfeldmikroskopie.

Anwendungsbeispiele der optoakustischen Mikroskopie

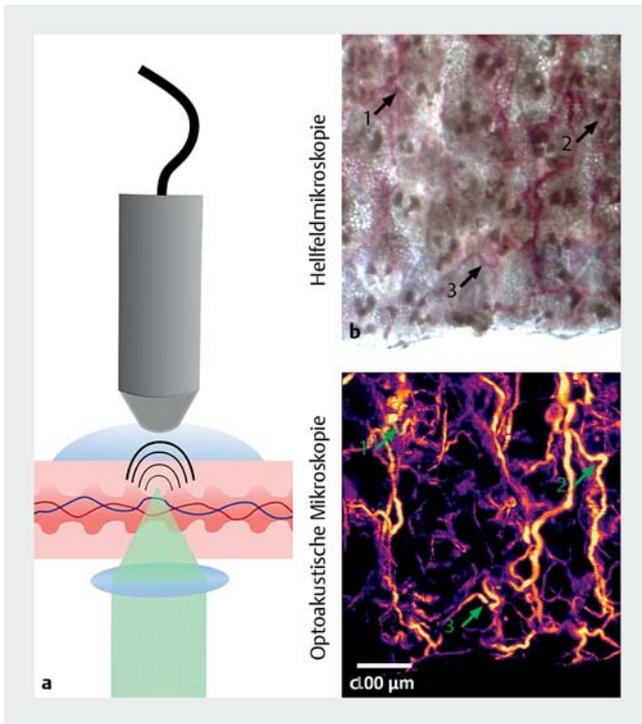
Die optoakustische Mikroskopie wird derzeit hauptsächlich in Ex-vivo- oder Tier-Experimenten angewandt und wurde hier v. a. im Bereich der Ophthalmologie, Neurowissenschaften und Krebsforschung eingesetzt. Bspw. wurden Neoangiogenese in der Retina von Hasen nach VEGF-Injektion [21], retinales Pigmentepithel [22], hochauflösende konturangepasste Darstellung der Kortex-Gefäße eines Mausgehirns [23], Darstellung von Mikrogefäßen, Keratinozyten und Talgdrüsen in einem Mausohr [24], Veränderungen der Mikrogefäße in humanen Ovarialtumoren ex vivo [25] und der Effekt von Anti-Neoangiogenese-Therapien in einem Prostatakarzinom-Modell untersucht [26]. Potenziell spannende Anwendungen der optoakustischen Mikroskopie in der Dermatologie lassen sich aus der Arbeit von Jin et al. (2017) und der Arbeit von Moothanchery et al. (2017) ableiten. Erstere stellten mit einem neu entwickelten handheld optoakustischen Mikroskop Neoangiogenese in einem Tumormodell in Mäusen dar und zeigten, dass mit ihrem Gerät die hochauflösende Darstellung der Mikrogefäße der Lippe und Zunge von Menschen in vivo abgebildet werden können. Die Autoren sehen den Einsatzbereich dieses neuen optoakusti-

Fortsetzung ► **Abb. 2**

f Exemplarisches histologisches Bild (HE-Färbung) eines Psoriasis-Plaques. Man sieht Akanthose und verlängerte Kapillarschlingen in den dermalen Papillen. **g** RSOM-Bild (532 nm) eines Psoriasis-Plaques. Es zeigen sich eine deutlich verbreiterte Epidermis sowie verlängerte Kapillarschlingen (EP). Der weiße Pfeil markiert exemplarisch die Spitze einer Kapillarschlinge. Der blaue Pfeil markiert ein Haar. Der dermale Gefäßplexus zeigt eine erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zu gesunder Haut. Die RSOM-Messung wurde im gezeigten Bild nicht an derselben Stelle wie die histologische Untersuchung durchgeführt, daher unterscheiden sich die Längen der Kapillarschlingen zwischen den beiden Modalitäten in diesem Beispiel. In Untersuchungen der gleichen Stelle konnte eine gute Übereinstimmung von Histologie und RSOM gezeigt werden [11]. **h** RSOM-Bild (Multispektralmodus) gesunder Haut, die melaninhaltige Epidermis stellt sich in Grün dar, in der Dermis erkennt man Mikrogefäße mit unterschiedlichen Oxygenierungsstatus. Nachdruck der Panels **f** mit freundlicher Genehmigung von Schwarz M. Anwendungsgebiete in der Dermatologie. In: Stolz W, Hänßle H, Sattler E et al., Hrsg. Bildgebende Diagnostik in der Dermatologie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. doi:10.1055/b-006-149538.

Maßstabskala: Panels **b, c, e** und **g**: 500 µm; Panel **f**: 100 µm; Panel **h**: 250 µm

Abkürzungen: RSOM: RasterScan Optoacoustic Mesoskopie, EP: Epidermis, DM: Dermis, Hb: Hämoglobin, HbO₂: oxygeniertes Hämoglobin, a. u.: Arbitrary Units



► **Abb. 3** Anwendungsbeispiel der optoakustischen Mikroskopie. **a** Schemazeichnung des Prinzips der optical Resolution optoakustischen Mikroskopie: Fokussiertes Laserlicht (grüner Strahl) regt Absorber im Untersuchungsareal (hier schematisch ein Mausohr) an. Über thermoelastische Expansion entstehen Ultraschallwellen. Diese werden vom Transducer (dargestellt in Grau) detektiert. Die Anordnung des Transducers und der Lichtquelle unterscheiden sich zwischen verschiedenen optoakustischen Mikroskopen deutlich, diese Schemazeichnung stellt den Licht-Transmissions-Typ da, es gibt auch Systeme mit Beleuchtung von oben. **b** zeigt eine Hellfeldmikroskopie der Gefäße in einem Mausohr und **c** das entsprechende Bild mit optoakustischer Mikroskopie. Mit schwarzen Pfeilen sind sehr feine Gefäße in der Hellfeldmikroskopie gekennzeichnet, die sich in der optoakustischen Mikroskopie deutlich besser darstellen lassen (grüne Pfeile). Credits Panels **b–c**: Markus Seeger, Institut für Biologische Bildgebung, Technische Universität München.

schen Mikroskops in der Früherkennung von oralen Karzinomen anhand der tumorbedingten Neoangiogenese [27]. Moothanchery et al. (2017) untersuchten das Eindringen von Goldnanopartikeln durch Microneedling in vivo an einem Mausohr als Modell für transdermale Medikamentenapplikation durch Microneedling [28]. Sie konnten zeigen, dass die Goldnanopartikel bis zu einer Tiefe von ca. 150 μm durch das Microneedling in die Haut eingebracht werden können und dass es ca. 90 min dauerte, bis keine signifikante Signalreduktion durch Diffusion der Nanopartikel mehr gemessen werden konnte.

Limitationen der optoakustischen Mikroskopie

Derzeit wird die optoakustische Mikroskopie hauptsächlich für präklinische Ex-vivo- und In-vivo-(Tier-)Experimente eingesetzt, es gibt bis dato nur wenige Untersuchungen zur Anwendung am Menschen [5, 27, 29]. Optoakustische Mikroskope sind meist noch große Systeme mit komplexer technischer

Konfiguration. In den letzten Jahren wurden zunehmend auch handheld Systeme vorgestellt. Diese sind aber noch nicht kommerziell erhältlich oder CE-zertifiziert und weisen teilweise noch technische Limitationen wie längere Scanzeiten auf [5].

Zusammenfassung und Ausblick

Die morphologische, molekulare und funktionelle Bildgebung mittels Optoakustik ermöglicht neuartige Einblicke in Forschung und Klinik. Die Technik besitzt großes Potenzial in vielen Bereichen der Medizin, insbesondere in der Dermatologie. Gegenwärtig handelt es sich bei optoakustischer Bildgebung um ein experimentelles Verfahren, das noch nicht routinemäßig in der Patientenversorgung eingesetzt wird, aber weltweit in einer Vielzahl von klinischen Studien zur Anwendung kommt.

Die optoakustische Makroskopie, die eine hohe Eindringtiefe und Bildgebung in Echtzeit bietet, ist derzeit das technisch am weitesten ausgereifte und in der Klinik am besten untersuchte Verfahren. Sie kann als Hybridverfahren mit konventionellem Ultraschall kombiniert werden und wird voraussichtlich in den kommenden Jahren Einzug in die Routine der Patientenversorgung finden, etwa für das Auffinden und die Untersuchung von Sentinel-Lymphknoten bei Melanom-Patienten.

Die optoakustische Mesoskopie kombiniert eine hohe Auflösung mit einer mittleren Eindringtiefe. Ihr Potenzial, insbesondere für das Monitoring von chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen sowie in der Früherkennung von Hautkrebs, wird derzeit umfassend untersucht. Erste Ergebnisse sind vielversprechend.

Die optoakustische Mikroskopie wird derzeit hauptsächlich ex vivo und tierexperimentell eingesetzt, aber die zunehmende Entwicklung neuer handheld Systeme bietet großes Potenzial für mehr humane In-vivo-Studien.

Danksagung

Wir danken Markus Seeger für Abbildungen der optoakustischen Mikroskopie.

Funding

Die Autoren wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Gottfried Wilhelm Leibniz Preises (NT3/10-1) und des Sonderforschungsbereichs SFB824, Teilprojekt B10, gefördert.

Interessenkonflikt

Prof. Vasilis Ntziachristos ist Shareholder der iTheraMedical GmbH. Die anderen Autorinnen/Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nature Methods* 2010; 7: 603–614
- [2] Ntziachristos V, Razansky D. Molecular imaging by means of multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT). *Chem Rev* 2010; 110: 2783–2794
- [3] Steinberg I, Huland DM, Vermesh O et al. Photoacoustic clinical imaging. *Photoacoustics* 2019; 14: 77–98
- [4] Weber J, Beard PC, Bohndiek SE. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nature Methods* 2016; 13: 639–650
- [5] Schellenberg MW, Hunt HK. Hand-held optoacoustic imaging: A review. *Photoacoustics* 2018; 11: 14–27
- [6] Masthoff M, Helfen A, Claussen J et al. Multispectral optoacoustic tomography of systemic sclerosis. *J Biophotonics* 2018; 11: e201800155
- [7] Diot G, Metz S, Noske A et al. Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) of Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 6912–6922
- [8] Chuah SY, Attia ABE, Ho CJH et al. Volumetric Multispectral Optoacoustic Tomography for 3-Dimensional Reconstruction of Skin Tumors: A Further Evaluation with Histopathologic Correlation. *J Invest Dermatol* 2019; 139: 481–485
- [9] Stoffels I, Jansen P, Petri M et al. Assessment of Nonradioactive Multi-spectral Optoacoustic Tomographic Imaging With Conventional Lymphoscintigraphic Imaging for Sentinel Lymph Node Biopsy in Melanoma. *JAMA network open* 2019; 2: e199020
- [10] Stoffels I, Morscher S, Helfrich I et al. Metastatic status of sentinel lymph nodes in melanoma determined noninvasively with multi-spectral optoacoustic imaging. *Sci Transl Med* 2015; 7: 317ra199
- [11] Aguirre J, Schwarz M, Garzorz N et al. Precision assessment of label-free psoriasis biomarkers with ultra-broadband optoacoustic mesoscopy. *Nat Biomed Eng* 2017; 1: 496
- [12] Hindelang B, Aguirre J, Schwarz M et al. Non-invasive imaging in dermatology and the unique potential of raster-scan optoacoustic mesoscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33: 1051–1061
- [13] Bereznoi A, Aguirre J, Hindelang B et al. Optical features of human skin revealed by optoacoustic mesoscopy in the visible and short-wave infrared regions. *Opt Lett* 2019; 44: 4119–4122
- [14] Schwarz M, Buehler A, Aguirre J et al. Three-dimensional multispectral optoacoustic mesoscopy reveals melanin and blood oxygenation in human skin in vivo. *J Biophotonics* 2016; 9: 55–60
- [15] Li X, Dinis US, Aguirre J et al. Optoacoustic mesoscopy analysis and quantitative estimation of specific imaging metrics in Fitzpatrick skin phototypes II to V. *J Biophotonics* 2019; 12: e201800442
- [16] Yew YW, Dinis US, Choi ECE et al. Investigation of Morphological, Vascular and Biochemical Changes in the Skin of an Atopic Dermatitis (AD) Patient in Response to Dupilumab Using Raster Scanning Optoacoustic Mesoscopy (RSOM) and Handheld Confocal Raman Spectroscopy (CRS). *J Dermatol Sci* 2019; 95: 123–125
- [17] Aguirre J, Hindelang B, Bereznoi A et al. Assessing nailfold microvascular structure with ultra-wideband raster-scan optoacoustic mesoscopy. *Photoacoustics* 2018; 10: 31–37
- [18] Omar M, Schwarz M, Soliman D et al. Pushing the optical imaging limits of cancer with multi-frequency-band raster-scan optoacoustic mesoscopy (RSOM). *Neoplasia* 2015; 17: 208–214
- [19] Bereznoi A, Schwarz M, Buehler A et al. Assessing hyperthermia-induced vasodilation in human skin in vivo using optoacoustic mesoscopy. *J Biophotonics* 2018; 11: e201700359
- [20] Aguirre J, Bereznoi A, He H et al. Motion Quantification and Automated Correction in Clinical RSOM. *IEEE T Med Imaging* 2019; 38: 1340–1346
- [21] van Nguyen P, Li Y, Aaberg M et al. In Vivo 3D Imaging of Retinal Neovascularization Using Multimodal Photoacoustic Microscopy and Optical Coherence Tomography Imaging. *J Imaging* 2018; 4. doi:10.3390/jimaging4120150
- [22] Xiao M, Dai C, Li L et al. Evaluation of Retinal Pigment Epithelium and Choroidal Neovascularization in Rats Using Laser-Scanning Optical-Resolution Photoacoustic Microscopy. *Ophthalmic Res* 2019; 1–13. doi:10.1159/000502800
- [23] Xu Z, Sun N, Cao R et al. Cortex-wide multiparametric photoacoustic microscopy based on real-time contour scanning. *Neurophotonics* 2019; 6: 35012
- [24] Seeger M, Westmeyer G, Ntziachristos V. In-vivo hybrid microscopy of small model organisms. In: Ntziachristos V, Zemp R, Hrsg. *Opto-Acoustic Methods and Applications in Biophotonics IV*. 24–25 June 2019, Munich, Germany. Bellingham, Washington: SPIE; 2019: 21
- [25] Rao B, Leng X, Zeng Y et al. Optical Resolution Photoacoustic Microscopy of Ovary and Fallopian Tube. *Sci Rep* 2019; 9: 14306
- [26] Zhou H-C, Chen N, Zhao H et al. Optical-resolution photoacoustic microscopy for monitoring vascular normalization during anti-angiogenic therapy. *Photoacoustics* 2019; 15: 100143
- [27] Jin T, Guo H, Jiang H et al. Portable optical resolution photoacoustic microscopy (pORPAM) for human oral imaging. *Opt Lett* 2017; 42: 4434–4437
- [28] Moothanchery M, Seeni RZ, Xu C et al. In vivo studies of transdermal nanoparticle delivery with microneedles using photoacoustic microscopy. *Biomed Opt Express* 2017; 8: 5483–5492
- [29] Park K, Kim JY, Lee C et al. Handheld Photoacoustic Microscopy Probe. *Sci Rep* 2017; 7: 13359