

# Tumordiagnostiek met behulp van fluorescentiebeeldvorming

*Erwin Dekker en Anne Saarnak,  
AMC Lasercentrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam*

## **Inleiding**

Binnen het lasercentrum van het AMC wordt onderzoek verricht om met behulp van licht methoden en technieken te ontwikkelen die ertoe bij kunnen dragen dat de medische wereld meer instrumenten in handen krijgt om aandoeningen te kunnen bestrijden, danwel de kwaliteit van het leven te verhogen.

Hierbij kunnen we denken aan de (verbetering van de) behandeling van wijnvlekken, het gebruik van licht om bacteriën te doden die resistent zijn tegen antibiotica, maar ook het gebruik van de laser als scalpel. Hoewel op velerlei gebieden door het lasercentrum onderzoek wordt verricht wil ik mij in dit verhaal kort richten op de diagnostiek van tumoren, een onderwerp waaraan een aantal projecten binnen het lasercentrum gewijd zijn.

## **Fluorescentie diagnostiek**

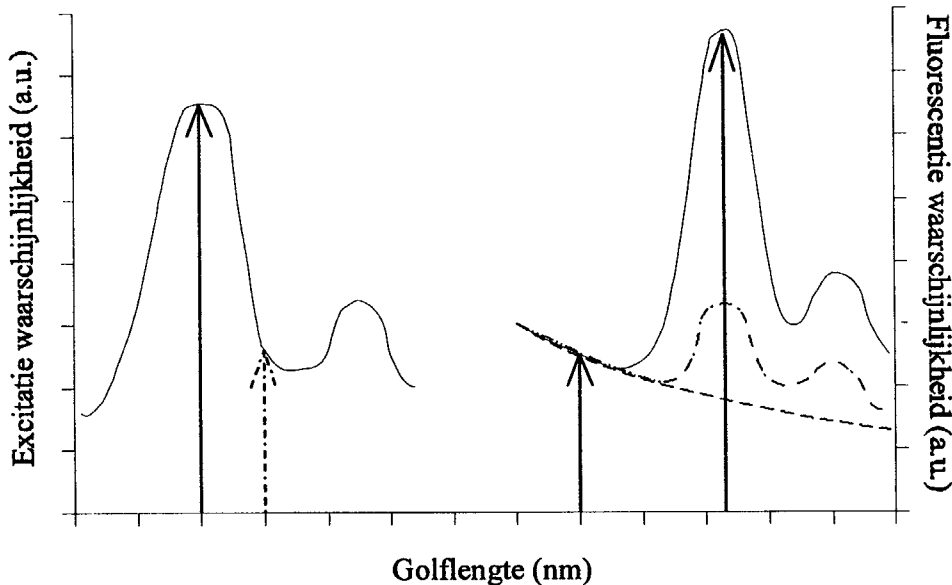
PDT (Photodynamic Therapy) is een betrekkelijk nieuwe, deels nog in een experimentele fase verkerende, methode om tumoren te behandelen met licht<sup>1</sup>. Hiertoe wordt een fotosensitizer (lichtgevoelige stof) aangebracht op de tumor, waarna licht van een bepaalde kleur ervoor zorgt dat de fotosensitizer voor een fototoxische reactie zorgt. Deze fototoxische reactie moet ervoor zorgen dat de tumor verdwijnt. Om PDT zo effectief mogelijk te laten zijn moet de fotosensitizer zich bij voorkeur ophopen in de te behandelen tumor. Daarnaast moet de fotosensitizer te exciteren zijn met een kleur en hoeveelheid licht die niet schadelijk is voor het gezonde, omliggende weefsel. Veel onderzoek is en wordt

verricht om de juiste fotosensitizers te vinden, alsmede de dosimetrie van het excitatielicht te bepalen.

Een aantal fotosensitizers hebben de eigenschap te fluoresceren. Indien de fotosensitizer zich bij voorkeur in een tumor ophoopt (of er langer blijft zitten dan in gezond weefsel), is het mogelijk om met behulp van deze fotosensitizer tumoren op te sporen (diagnostiek). Hierbij is het fluorescentiecontrast tussen gezond en tumorweefsel dus van groot belang. Dit contrast wordt verstoord door verschillen in de optische eigenschappen van het weefsel, door de autofluorescentie en door de geometrische parameters van de meetopstelling. Door gebruik te maken van de dubbele ratio (DR) methode kunnen deze contrastverstoringen gecorrigeerd worden<sup>2,3</sup>.

## **Dubbele ratio (DR) methode**

De DR methode maakt gebruik van twee excitatie- en twee detectiegolflengten (figuur 1). De excitatiegolflengten zijn zo gekozen dat ze een verschillende quantum efficiëncy hebben voor de fotosensitizer fluorescentie. De detectiegolflengten liggen op een piek van de fotosensitizer fluorescentie en op een referentiegolflengte waar alleen autofluorescentie gemeten wordt. Bij elke excitatie wordt een ratio tussen de twee emissiegolflengten berekend. Hierdoor worden variaties in excitatielichtintensiteiten en in de geometrie van de meetopstelling gecorrigeerd. De DR wordt bepaald door de ratio te nemen van beide enkele ratios. Omdat de invloed van de optische eigenschappen van het weefsel ge-



Figuur 1

Schematische presentatie van de DR methode. Links de excitatie waarschijnlijkheid van de fotosensitizer. De twee pijlen representeren de twee excitatiegolflengten die verschillende fluorescentie-intensiteiten genereren van de fotosensitizer, zoals weergegeven rechts. Rechts indiceren de pijlen de keuze van de detectiegolflengten. De onderste stippellijn rechts geeft de auto fluorescentie weer

lijk zijn voor beide enkele ratios is de DR hier dus niet afhankelijk van. Theoretisch geeft de DR, in een niet-lineair verband, een waarde die alleen afhankelijk is van de concentratie van de fotosensitizer.

Om de DR methode te kunnen evalueren is een opstelling ontwikkeld (figuur 2) waarmee met behulp van een fiber het excitatie-licht wordt aangeboden aan het weefsel. Twee detectiefibers leiden het fluorescentielicht naar twee fotomultipliers, waarna de signalen met een computer worden verwerkt tot een DR-waarde. De waarde is een maat voor de concentratie van de gebruikte fotosensitizer.

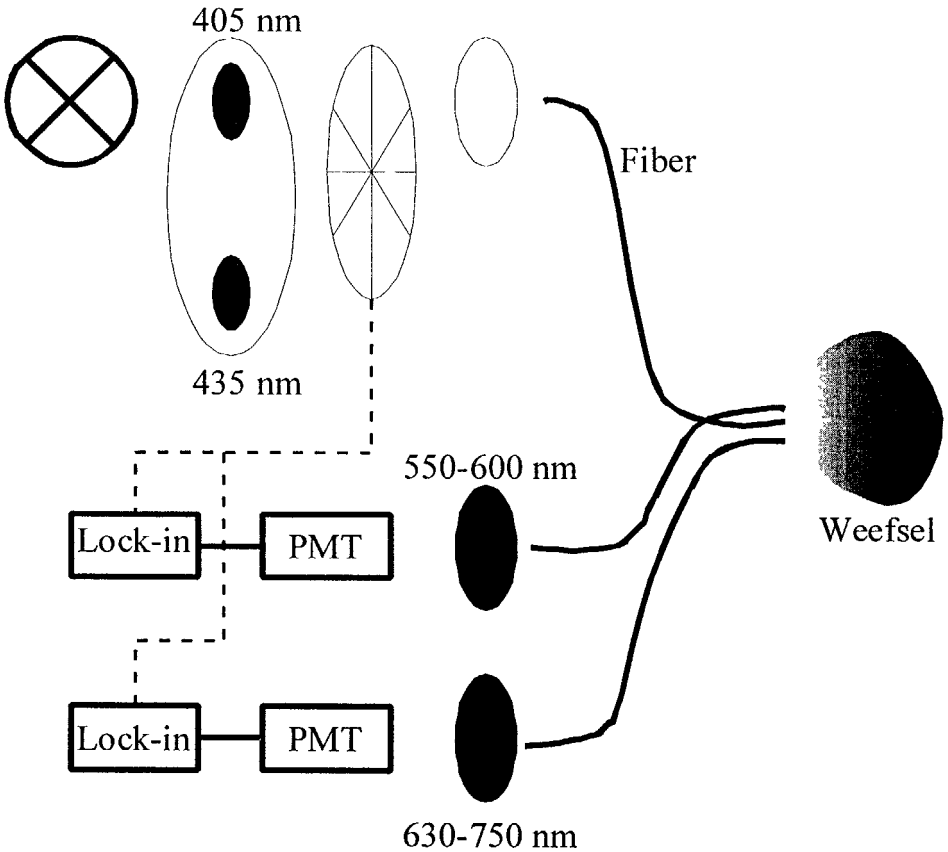
#### Experimenten<sup>4</sup>

*In vitro* experimenten met fantomen waarin de verstrooier Intralipid 10% in verschillende concentraties en de fotosensitizer HpD (hemato porfyriene derivatie) in een vaste

concentratie zijn verwerkt laten zien dat de fluorescentie toeneemt met toenemende verstrooiing (figuur 3). De gemeten fluorescentiewaarden zijn dus geen maat voor de concentratie fotosensitizer. De DR laat wel een gelijke concentratie fotosensitizer zien bij toenemende verstrooiing en corrigeert dus hiervoor.

*In vivo* experimenten op moedervlekken en gezonde huid van 5 gezonde testpersonen met de fotosensitizer ALA (5-amino levulinic acid) laten zien dat de fluorescentie afhankelijk is van de kleur van de huid (figuur 4). De gemeten fluorescentie op de moedervlek is lager dan op de gezonde huid, hetgeen zou impliceren dat er minder fotosensitizer in de moedervlek is opgenomen. Bij een gelijke opname van de ALA zouden de gemeten waarden op de lijn  $x = y$  liggen. De opname is echter gelijk in de moedervlek en in de gezonde huid, hetgeen de be-

Hg-lamp Filterwiel Chopper Lens



Figuur 2

DR meetopstelling. Twee kwiklijnen worden via een fiber aangeboden aan het weefsel, waarna twee detectiefibers het fluorescentielicht naar fotomultiplifiers geleiden, waarbij standaard lock-in technieken worden gebruikt. De signalen van de fotomultiplier worden met de computer verwerkt tot een waarde voor de DR.

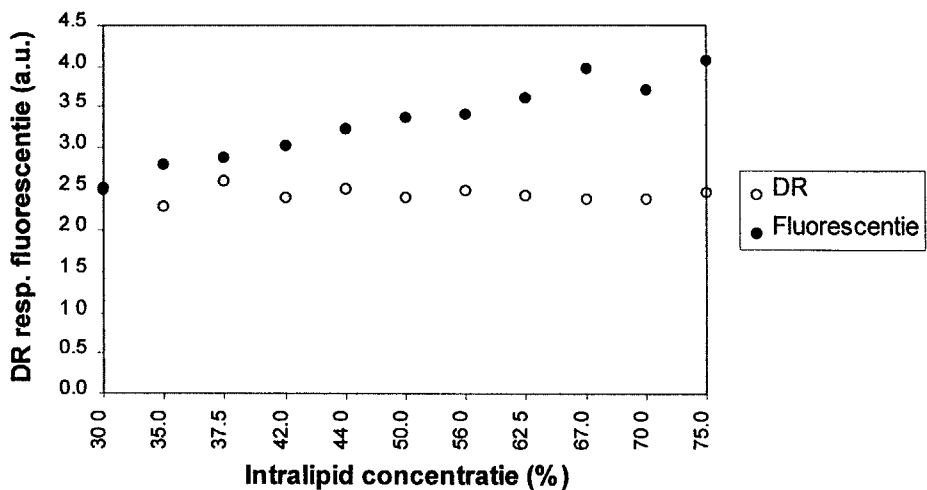
rekende DR ook duidelijk laat zien. Een bewijs dat de DR corrigeert voor absorptie-artefacten is hiermee geleverd.

Ook zijn *in vivo* experimenten verricht op een patiënt met basaal cel carcinoma (BCC). Na i.v. applicatie van de fotosensitizer mTHPC stijgt de DR in de BCC's, terwijl de DR in de gezonde huid ongeveer gelijk blijft (figuur 5). Het verschil wordt sig-

nificant na 20 uur. Met de DR lijkt het dus mogelijk een onderscheid te maken tussen gezonde huid en BCC's.

**Conclusie**

Proeven *in vitro* en *in vivo* laten zien dat de DR de gemeten fluorescentiesignalen corrigeert voor de invloed van variaties in absorptie, verstrooiing en geometrie van de



Figuur 3

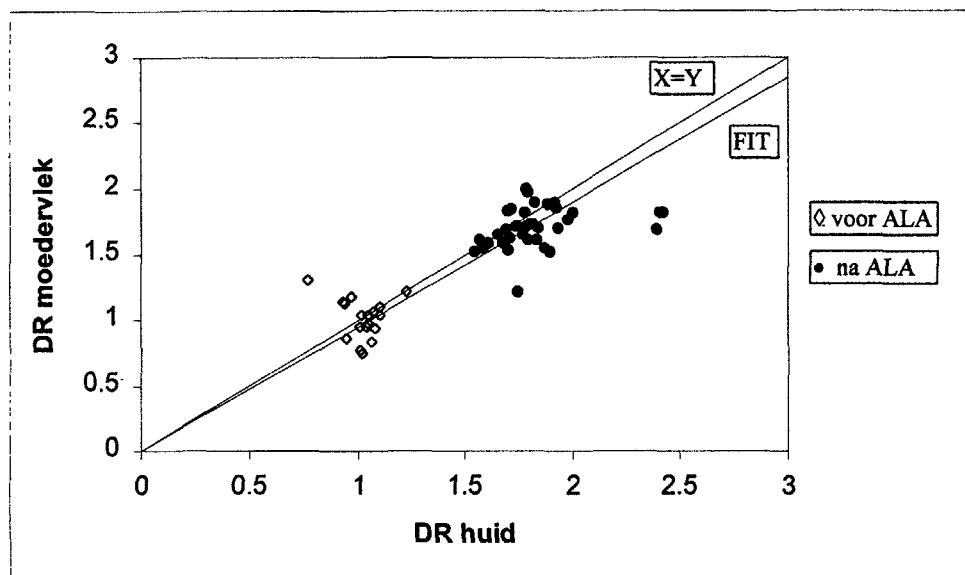
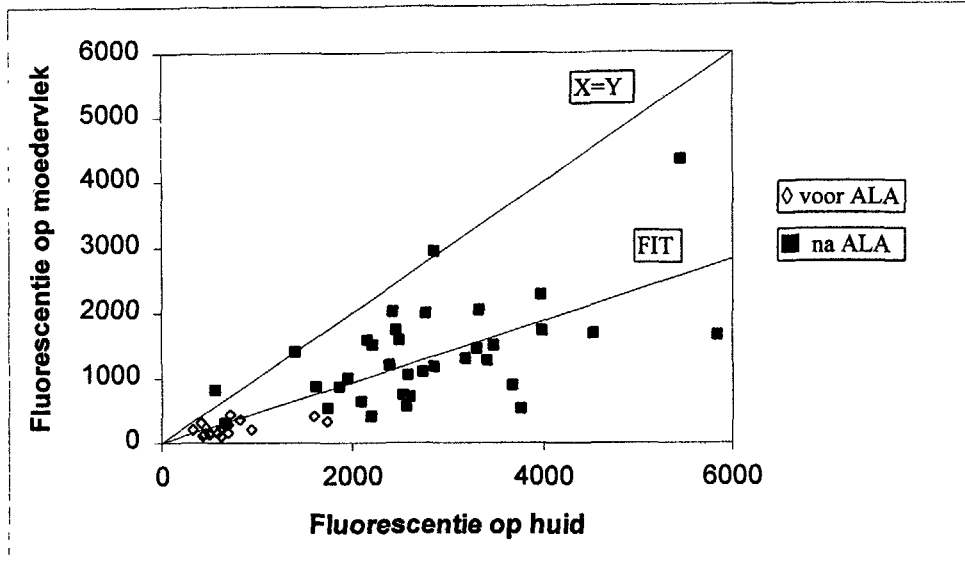
Gemeten fluorescentie-intensiteit van HpD en berekende DR als functie van de concentratie Intralipid 10% in een fantoom bij een vaste concentratie van HpD. Bij een toename van de Intralipid concentratie neemt de verstrooiing toe. Het gemeten fluorescentiesignaal neemt ook toe, terwijl de concentratie HpD gelijk blijft. De berekende DR corrigeert voor de toename van de verstrooiing en laat een gelijke waarde zien voor elke Intralipid concentratie.

meetopstelling. De DR is dus alleen afhankelijk van de concentratie fotosensitizer. Op basis van deze gegevens lijkt de DR methode een goede methode voor vroege tumordetectie.

### Voortgang

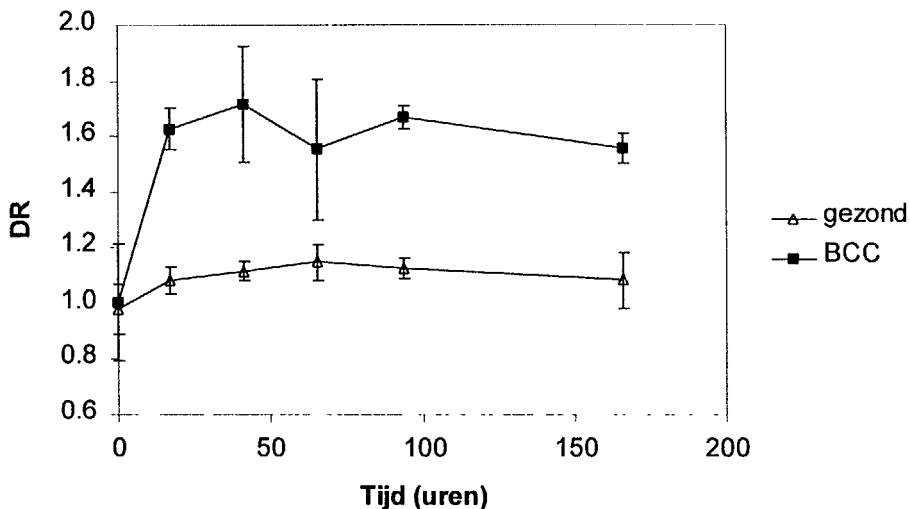
Momenteel is een beeldvormende meetopstelling gerealiseerd. Hiermee kunnen grotere delen weefsel ineens worden bekeken, een voordeel ten opzichte van de puntmetingen met de fiber. Er wordt gebruik gemaakt van een CCD-camera waarmee de vier fluorescentiebeelden in één beeld worden opgenomen. Het technische aspect van deze opstelling en de resultaten van metingen ermee zullen in een volgend artikel later dit jaar aan de orde komen.

Dit onderzoek is gedeeltelijk gesubsidieerd door het STW en de Maurits en Anna de Kock Stichting.



Figuur 4

Absorptie-invloeden van lichte huid en een donkere moedervlek, voor en na applicatie van ALA. In de bovenste figuur is te zien dat de gemeten fluorescentie in de gewone huid harder stijgt dan in de moedervlek, na applicatie van ALA. Dit wordt niet veroorzaakt door een opnameverschil van de ALA, maar door absorptie in de moedervlek. Het gevolg is dat de waarden dus onder de lijn  $x=y$  liggen. In de onderste figuur is te zien dat de berekende DR-waarden op de lijn  $x=y$  liggen. De DR methode corrigeert dus voor de absorptie in de moedervlek. Ook is duidelijk te zien dat de DR is gestegen ten gevolge van een opname van de ALA.



Figuur 5

DR op basaal cel carcinoma en gezonde huid na toediening van mTHPC op tijd = 0 uur. Direct na toediening stijgt de DR in de BCC, maar de DR in de gezonde huid blijft gelijk. Na 20 uur is het verschil significant. Er is dus een contrast te zien tussen BCC en gezonde huid met de DR.

## Literatuur

1. Fotodynamische therapie van maligne tumoren, *WM Star*; Lasers in de geneeskunde onder redactie van M.J.C. van Gemert en T.A. Boon, Samson Stafleu, Alphen a/d Rijn, 1987
2. Quantification of the hematoporphyrin derivative by fluorescence measurement using dual-wavelength excitation and dual-wavelength detection, *M Sinaasappel and HJCM Sterenberg*; Applied Optics, Vol. 32, No. 4, 541-548, 1993
3. Evaluation of spectral correction techniques for fluorescence measurements on pigmented lesions in vivo, *HJCM Sterenberg, AE Saarnak, R Frank and M Motamedi*; J. Photochem. Photobiol. B: Biology 35, 159-165, 1996
4. Enhancement of fluorescence contrast using two wavelength excitation and two wavelength detection, *AE Saarnak, AJL Jongen, E Dekker and HJCM Sterenberg*, poster 18<sup>th</sup> Annual IEEE Conference on Engineering in Medicine and Biology, Amsterdam, 1996.