

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 529**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10734059 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2443503**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones de tejidos biológicos**

30 Prioridad:

17.06.2009 DE 102009029831

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.03.2016

73 Titular/es:

**W.O.M. WORLD OF MEDICINE GMBH (100.0%)
Salzuffer 8
10587 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

SCHÖNBORN, KARL-HEINZ

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 564 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones de tejidos biológicos

5 La invención se refiere a un dispositivo para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico según el preámbulo de la reivindicación 1 así como a un procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica.

10 Un dispositivo de este tipo presenta una unidad de láser para generar una radiación de excitación, una unidad óptica, que está diseñada para formar la radiación de excitación para generar una señal óptica y enfocarla a diferentes sitios en o sobre un objeto que va a examinarse, un módulo de detección para registrar la señal óptica desde la zona del objeto así como un módulo de control y procesamiento de señales para el procesamiento algorítmico y técnico de señales de las señales ópticas mencionadas, para su conversión en una señal de imagen evaluable mediante diagnóstico y para el control de toda la instalación.

15 En la microscopía de fluorescencia multifotónica (abreviado: microscopía multifotónica) se utilizan los denominados microscopios multifotónicos, en cuyo caso se trata de microscopios ópticos especiales del grupo de los microscopios de escaneo láser. Las imágenes microscópicas de alta resolución se generan a este respecto mediante el uso de la denominada fluorescencia multifotónica (principalmente fluorescencia bifotónica) o la generación de armónicos superiores, por ejemplo el duplicado o triplicado de la frecuencia y resultantes de la generación de los segundos o terceros armónicos (SHG: *second harmonic generation*; THG: *third harmonic generation*) de la luz de excitación irradiada.

25 En la microscopía multifotónica, con ayuda de una radiación de excitación intensa, enfocada, principalmente generada por un láser, se generan efectos ópticos no lineales en un tejido que va a examinarse, que se basan en la interacción de varios fotones (partículas de luz) que llegan al mismo tiempo a una molécula. La intensidad de la señal generada, a este respecto, no aumenta linealmente con el número de los fotones irradiados por unidad de tiempo, sino con el cuadrado (en el caso de efectos bifotónicos) o la tercera potencia (en el caso de efectos trifotónicos). El modo de trabajo de un microscopio multifotónico se asemeja al de un microscopio de escaneo de láser confocal con respecto a la irradiación de la radiación de excitación en el tejido. En el microscopio confocal, a diferencia de en el microscopio multifotónico, se usa radiación primaria remitida y no radiación secundaria para la generación de imágenes. El primer aparato presenta además, a diferencia del último, en el canal de detección de señales, un "Pin-Hole" (diafragma estrecho para la eliminación de radiación remitida desde el exterior del foco de láser). Mientras que, debido a las particularidades mencionadas anteriormente los microscopios de escaneo de láser confocales presentan una profundidad de penetración, según el preparado, de 50-80 μm , con la microscopía multifotónica pueden representarse zonas más profundas, por ejemplo hasta 200 μm , en casos muy favorables incluso hasta 1000 μm , de modo que son posibles tomas de imágenes relevantes o más relevantes de tejido vivo, por ejemplo de capas de la piel de un ser humano.

40 El procedimiento más extendido para la microscopía multifotónica es la microscopía de fluorescencia bifotónica (abreviado: microscopía bifotónica). Mientras que en la microscopía de fluorescencia (monofotónica) convencional, en una molécula fluorescente se excita un electrón mediante la absorción en cada caso de un fotón, es decir, se desplaza a un estado energético superior, en la microscopía de fluorescencia bifotónica la excitación del electrón se provoca por la absorción simultánea o casi simultánea de dos fotones (absorción bifotónica).

En la microscopía trifotónica, la excitación tiene lugar, de manera correspondiente, mediante tres fotones que inciden al mismo tiempo o casi al mismo tiempo.

50 La fluorescencia se genera cuando colorantes absorben fotones (de excitación) incidentes y, posteriormente emiten de nuevo otro fotón. Mediante los fotones de excitación un electrón sube a un nivel energético superior y, con ello, almacena de manera intermedia la energía fotónica. En la microscopía de fluorescencia normal, esta excitación se produce mediante exactamente un fotón. El electrón permanece durante algunos cientos de picosegundos hasta varios nanosegundos en el nivel energético superior, antes de que caiga de nuevo y, a este respecto, emita un nuevo fotón, de menor energía, de mayor longitud de onda. Cuando se excita, por ejemplo, con luz azul, se genera por ejemplo fluorescencia verde, por ejemplo en el caso de la fluoresceína. En la microscopía bifotónica la excitación de un electrón tiene lugar exactamente mediante dos fotones que, en total, presentan la misma energía que el fotón de excitación de la microscopía de fluorescencia normal. Sin embargo, una condición previa para la excitación es que los dos fotones lleguen al mismo tiempo, en el plazo de attosegundos (10^{-18} s), dado que no existe ningún nivel energético intermedio estable del electrón que va a excitarse.

65 En la microscopía de fluorescencia normal, el fotón excitado tiene una longitud de onda más corta y, por lo tanto más energía que el fotón emitido. A diferencia de esto, en la excitación multifotónica se excita con fotones que presentan una longitud de onda claramente mayor y por lo tanto menos energía por fotón que los fotones emitidos. Por ejemplo, de esta manera, puede utilizarse luz infrarroja o de color rojo oscuro para la excitación, para generar fluorescencia verde. Esto es posible porque dos o más fotones de excitación sólo llevan a la generación de un fotón

emitido. En la excitación bifotónica, la longitud de onda de excitación asciende aproximadamente al doble de la longitud de onda de excitación usada normalmente, en la excitación trifotónica asciende al triple, etc.

5 El concepto fundamental de la microscopía de fluorescencia bifotónica se describe en la publicación W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science, Vol. 248, páginas 73-76 (6 de abril de 1990).

10 Por el documento US 5.034.613 se conoce un dispositivo para la microscopía de fluorescencia multifotónica en el que una radiación de excitación generada por un láser se dirige a través de un espejo móvil que se encuentra en la trayectoria del haz hasta un objeto que va a examinarse. A este respecto, para conseguir una excitación en diferentes sitios del objeto y, de esta manera, generar una imagen excitada píxel a píxel, se modifica la longitud del haz de excitación mediante orientación del espejo móvil, de modo que el punto de enfoque de la radiación de excitación se mueve por el objeto, lo excita sitio por sitio y de esta manera genera señales sitio por sitio en el objeto. La radiación secundaria generada de esta manera (compuesta por una radiación de fluorescencia y posiblemente armónicos superiores generados de la radiación de excitación) se recoge y se detecta para generar una imagen completa en uno o varios planos del objeto por medio de las señales de los sitios individuales.

20 Con el dispositivo conocido por el documento US 5.034.613 pueden generarse esencialmente solo imágenes en sección de un pequeño corte del objeto que va a examinarse. Esto se debe a que en la microscopía bifotónica, debido a las altas intensidades necesarias para la excitación, que hacen necesario un enfoque de la radiación de excitación hasta un diámetro de foco de $0,5 \mu\text{m}$ a, como máximo, aproximadamente $3 \mu\text{m}$, son necesarias grandes aberturas de la óptica usada (esto resulta de la ley de conservación de productos de rayos en la formación de imágenes óptica de rayos láser). Estos aparatos presentan una abertura numérica de $NA=0,4$ a $NA=1$ (o en el caso del uso de un fluido de inmersión hasta $NA=1,45$), lo que corresponde a un ángulo de cono completo del haz enfocado de aproximadamente 50° a 135° . Tales haces de rayos de gran abertura pueden enfocarse solamente por objetivos de microscopio de gran aumento u ópticas complejas comparables, que presentan inevitablemente solo campos de visibilidad relativamente pequeños con un diámetro de aproximadamente $0,5 \text{ mm}$ a 1 mm (por un campo de visibilidad se entiende en este caso el campo máximo que puede cubrir un haz de excitación desviado). Es decir, con otras palabras: en los grandes aparatos necesarios para la microscopía bifotónica, para enfocar la radiación de excitación hacia el objeto está forzosamente limitada la superficie que puede cubrir la radiación de excitación mediante la desviación del haz. Mediante la excitación del haz, con el uso de espejos giratorios y orientables, pueden excitarse solamente campos con un diámetro de, como máximo, 1 mm , de modo que las imágenes que pueden captarse están limitadas a longitudes de canto de, como máximo, 1 mm .

35 Para utilizar la microscopía bifotónica por ejemplo para el examen de una capa de piel para detectar alteraciones patológicas, tales imágenes son, con frecuencia, demasiado pequeñas.

40 Convencionalmente, en la microscopía bifotónica se lleva a cabo en primer lugar un escaneo lateral de un plano (capa de piel) y a continuación se ajusta de nuevo la profundidad de foco para la toma de imágenes de otras capas de piel, por ejemplo más profundas. De esta manera se registra sucesivamente una sucesión de capas superpuestas a través de la piel. De manera deseable, por el contrario, desde el punto de vista del usuario, en el caso del uso médico, serían imágenes en sección verticales a través de la piel, que corresponden a la posición de corte habitual en histopatología, que son habituales para el examinador médico y que corresponden a su vista de diagnóstico.

45 En conjunto, serían deseable por consiguiente, imágenes de la piel en posición de corte vertical, que pueden representar completamente por ejemplo una lesión que se extiende a lo largo de una longitud de varios mm o incluso cm.

50 Por el documento EP 1 929 939 A2 se conoce un dispositivo que puede utilizarse por vía endoscópica para la microscopía multifotónica, en el que la punta de una fibra óptica que sirve como conductor de luz puede moverse en un endoscopio con una óptica de enfoque miniaturizada dispuesta en la misma, para dirigir hacia un objeto una radiación de excitación generada por un láser. Debido a que en la punta del conductor de luz puede utilizarse únicamente una óptica de pequeñas dimensiones y, por consiguiente, también puede utilizarse una pequeña abertura, está limitada la resolución espacial alcanzable, dado que solamente pueden conseguirse diámetros de foco relativamente grandes con respecto a la excitación espacial. Además, la disposición del documento EP 1 929 939 A2 usa para la introducción de la radiación de excitación y el retorno de las señales ópticas tomadas del objeto usa el mismo conductor de luz, lo que representa por un lado altos requisitos en cuanto al conductor de luz (transmisión de radiación láser de pulso ultracorto de alta calidad de haz, es decir, en el modo TEM₀₀) y, por otro lado, es desventajoso para la calidad y el rendimiento de transmisión de las señales recibidas. La calidad de la radiación de excitación transmitida se empeora adicionalmente por la dispersión de fibras, por ejemplo mediante prolongación de la duración de pulso o el denominado "Chirping". Además, durante el movimiento de la óptica de enfoque para la toma de imagen completa se mueve conjuntamente siempre el conductor de luz, lo que hace necesario y al mismo tiempo limita el movimiento espacial, dado que no pueden tomarse imágenes en sección de gran extensión lateral.

65 En el documento EP 1 929 939 A2 se genera una radiación de excitación mediante un láser de femtosegundos y se

suministra a través de un obturador, un debilitador y un espejo divisor dicróico de una fibra. En este se suministra directamente al objeto la radiación de excitación con la verdadera frecuencia de excitación a través de la fibra óptica.

5 El documento WO 2007/054495 A1 se refiere a una estructura mecánica para el escaneo de un objeto, en la que no está prevista una transmisión de una radiación de excitación generada por una unidad de láser por medio de una fibra. Una estructura similar se conoce también por el documento US 5.459.325.

10 En el caso de un dispositivo conocido por el documento DE 100 65146 A1, se genera una radiación de excitación mediante un láser de femtosegundos con una longitud de onda de 800 nm y se suministra a través de un brazo articulado óptico con elementos reflectantes de una óptica de escáner.

15 El documento US 6.249.630 describe una transmisión entre una fuente óptica y un aparato óptico, en el que antes del acoplamiento en una fibra óptica está prevista una extensión de pulsos ópticos en un denominado extensor, para obtener pulsos ópticos ampliados con una potencia pico reducida ("*chirped optical pulses*"). Estos pulsos han de comprimirse a su vez a la salida de las fibras, para deshacer la extensión y devolver los pulsos a su forma de salida. Para ello está previsto un denominado compresor.

20 La presente invención se basa en el objetivo de crear un dispositivo y un procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico, que en un gran campo visual permiten la toma de imágenes en sección en particular verticales en un objeto y a este respecto están construidas de manera sencilla y tienen un funcionamiento fiable. A este respecto, no se empeorarán o solo mínimamente las propiedades de haz temporales, espectrales y relativas a la polarización de la radiación de excitación con respecto a su trayectoria del haz, y se mejorarán la manipulación (ergonomía) y la capacidad de uso.

25 Este objetivo se resuelve mediante un objeto con las características de la reivindicación 1.

De acuerdo con la invención está previsto a este respecto que la unidad óptica para generar la señal óptica en diferentes sitios en o sobre el objeto esté diseñada y prevista para moverse al menos en una dirección con respecto al objeto.

30 La invención parte de la idea fundamental de usar una denominada óptica volante. La unidad óptica para enfocar la radiación de excitación y para excitar una radiación secundaria en un sitio en o sobre el objeto no está dispuesta de manera fija, sino que se mueve en conjunto, para excitar diferentes sitios de un objeto, uno tras otro en el tiempo. Por lo tanto, la excitación espacial no tiene lugar mediante desviación del haz con el uso de espejos giratorios y orientables, sino mediante un movimiento unidimensional o multidimensional de la unidad óptica en su conjunto. De manera ventajosa, durante el movimiento de la unidad óptica para generar la señal óptica, a este respecto, no debería cambiar el eje óptico de la radiación de excitación que incide sobre el objeto, de modo que, a diferencia de un uso de espejos giratorios y orientables, la radiación de excitación siempre incide con el mismo ángulo sobre el objeto.

40 Debido a que se prescinde de una desviación del haz por medio de espejos giratorios y orientables, pueden conseguirse grandes campos visuales. Esto significa que pueden excitarse teóricamente campos de cualquier tamaño, para generar de esta manera imágenes con grandes longitudes de canto del objeto que va a examinarse. Esto permite por ejemplo, tomar imágenes en sección de la piel humana, que pueden representar completamente lesiones.

50 De acuerdo con la invención, la unidad óptica puede moverse en dirección horizontal y/o en dirección vertical con respecto a una superficie del objeto dirigida a la unidad óptica. Para la toma de una imagen en sección se desplaza la unidad óptica, por un lado, a lo largo de la superficie del objeto, por ejemplo a lo largo de la superficie de la piel de un paciente, pudiendo tener lugar el movimiento también de manera bidimensional en dirección X e Y a lo largo de la superficie de la piel y, al mismo tiempo, en dirección Z verticalmente con respecto a la superficie de la piel para generar señales en un espacio tridimensional. Durante el procedimiento se excitan uno tras otro diferentes sitios del objeto, y la radiación secundaria generada en el objeto, compuesta por radiación de fluorescencia generada en el objeto y armónicos generados por efectos no lineales de la radiación de excitación (SHG: *second harmonic generation* = generación de la primera onda armónica), se recoge como señal óptica.

60 Para conseguir de manera sencilla un movimiento del foco en dirección vertical, puede estar previsto no perfeccionar de manera móvil toda la unidad óptica (que comprende por ejemplo un elemento dicróico para la separación de radiación de excitación y señales ópticas recibidas), sino únicamente un objetivo. El objetivo, que puede presentar por ejemplo una lente óptica para enfocar, es por lo tanto móvil con respecto al resto de la unidad óptica al menos en dirección vertical, para mover en dirección vertical el foco dentro del objeto que va a excitarse y generar señales en forma de una radiación secundaria en diferentes sitios, desplazados verticalmente.

65 Para la generación píxel a píxel de una imagen en sección vertical, la unidad óptica puede ser desplazable al menos por secciones de manera continua en dirección horizontal y/o en dirección vertical con respecto al objeto. La unidad óptica se mueve a lo largo de líneas de toma predefinidas (líneas de escaneo) y escanea el objeto a lo largo de

estas líneas de toma, excitándose uno tras otro, por ejemplo mediante desencadenamiento de la radiación de excitación para la exposición dependiente del tiempo, sitios a lo largo de la línea de toma dentro del objeto para la emisión de radiación secundaria y recibándose señales desde estos sitios. Las señales desde un sitio dan como resultado entonces un pixel de la imagen que va a tomarse, tramándose por medio de las líneas de toma (líneas de escaneo) el objeto a lo largo de un plano que va a observarse, de modo que resulta una imagen completa, por ejemplo evaluable para el diagnóstico médico.

El dispositivo se utiliza para la microscopía multifotónica y está construido a este respecto de manera modular. Como unidad central, el dispositivo presenta una unidad de control y de procesamiento, que está conectada a través de un brazo de soporte con un denominado módulo de paciente. Por "brazo de soporte" se entiende en este caso y en lo sucesivo, un dispositivo de sujeción mecánico que permite una movilidad de marcha suave del módulo de paciente, dado el caso con compensación de peso, mientras que permite el posicionamiento del equipo de medición en relación con el paciente o la muestra así como una fijación durante el periodo de tiempo de la toma de fluorescencia. La unidad de control y de procesamiento está diseñada de manera estacionaria, sirve para el control central del dispositivo y el procesamiento de las señales recibidas y presenta también la unidad de láser para generar la radiación de excitación. El módulo de paciente es móvil a través del brazo de soporte con respecto a la unidad de control y de procesamiento y puede colocarse sobre un objeto que va a examinarse de modo que la radiación de excitación incide de manera adecuada sobre el objeto, por ejemplo la piel de un paciente, y pueden recogerse las señales generadas. La unidad óptica es parte del módulo de paciente y puede moverse dentro del mismo, presentando el módulo de paciente una sección de contacto permeable para la radiación de excitación y la señal óptica (por ejemplo un disco de vidrio dispuesto en una carcasa del módulo de paciente), que para examinar el objeto ha de ponerse en contacto con el objeto. Mientras que la sección de contacto durante una toma se apoya de manera estacionaria contra el objeto que va a examinarse (por ejemplo con el uso de un fluido de inmersión), la unidad óptica puede moverse en dirección horizontal y/o en dirección vertical con respecto a la sección de contacto y por lo tanto también con respecto al objeto.

La unidad de láser es parte de la unidad de control y de procesamiento y por lo tanto está separada espacialmente del módulo de paciente. La radiación de excitación generada por la unidad de láser se transmite a través de una fibra óptica hacia el módulo de paciente y hacia la unidad óptica para la irradiación sobre el objeto. La fibra óptica puede instalarse a este respecto a lo largo del brazo de soporte o también dentro del brazo de soporte con respecto al módulo de paciente.

Para conseguir para la microscopía bifotónica o multifotónica una llegada simultánea de dos o más fotones en el punto de foco y de esta manera excitar las moléculas dentro del objeto, son necesarias densidades fotónicas muy altas en la radiación de excitación. Estas pueden conseguirse por ejemplo utilizándose un láser pulsado (láser de pulso ultracorto) para generar pulsos de láser en el intervalo de femtosegundos en particular con acoplamiento de modo. Láseres de este tipo envían pulsos de láser intensos, muy cortos (con longitudes de pulso en el intervalo de femtosegundos, por ejemplo 80-140 fs), que se repiten por ejemplo 80-120 millones de veces por segundo, de modo que resultan pausas entre los pulsos con una longitud de 8 a 12,5 ns (= 8000000-12500000 fs) y la energía generada en el láser total se emite de esta manera en forma pulsada con alta intensidad en una fracción del tiempo.

La unidad de láser genera una radiación de excitación de una primera longitud de onda, por ejemplo 1560 nm. En el módulo de paciente está dispuesto entonces un doblador de frecuencia conectado aguas arriba de la unidad óptica (por ejemplo en forma de un cristal de duplicado de frecuencia), que reduce a la mitad la longitud de onda de la radiación de excitación (por ejemplo de 1560 nm a 780 nm) y con ello dobla la frecuencia de la radiación de excitación. Esto tiene la ventaja de que la radiación de excitación puede transmitirse con una longitud de onda relativamente grande de por ejemplo 1560 nm a través de una fibra óptica adecuada desde la unidad de láser hacia el módulo de paciente, estando disponibles para un intervalo de longitud de onda de este tipo fibras, que permiten una transmisión, también manteniendo la polarización ("fibras unimodales de mantenimiento de la polarización"), sin menoscabo notable de la calidad del haz. El doblador de frecuencia genera entonces la primera onda armónica de la radiación de excitación transmitida (por ejemplo 780 nm), que se usa para la excitación del objeto.

La unidad de láser puede estar realizada también como un denominado láser de fibra de femtosegundos con fibra de láser a su través, que se extiende hasta el módulo de paciente. De esta manera, puede prescindirse de un denominado "Pre Chirp" (una predistorsión de la radiación de excitación para la compensación de los efectos de dispersión, sobre todo de la dispersión de la velocidad de grupo, en la trayectoria óptica desde la fuente de haz de láser hasta el tejido), porque el extremo de la fibra de láser representa el sitio de salida de la radiación de excitación del resonador de láser y con ello la fuente de radiación de láser primaria. En el módulo de paciente tiene lugar entonces el duplicado de frecuencia de la radiación de excitación o la reducción a la mitad de la longitud de onda desde 1560 nm hasta 780 nm.

La idea de usar una unidad de láser, que genera una radiación de una primera longitud de onda, que se convierte entonces posteriormente en una radiación de excitación con otra longitud de onda y en la que la fuente de radiación primaria, (genera la primera longitud de onda) está montada en una unidad de aparato y transmite su radiación a través de una fibra óptica a una segunda unidad de aparato separada, donde la radiación mediante conversión se convierte en la longitud de onda de excitación y entonces se reutiliza, representa en este contexto también un

concepto independiente, que puede utilizarse en los más diversos dispositivos para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico. Un dispositivo de este tipo puede presentar por ejemplo, en general, las siguientes características:

- 5 - una unidad de láser para generar una radiación de excitación,
- una unidad óptica, que está diseñada para enfocar la radiación de excitación para generar una señal óptica a diferentes sitios en o sobre un objeto que va a examinarse, y
- 10 - un módulo de detección para registrar la señal óptica desde la zona del objeto, generando la unidad de láser una radiación de una primera longitud de onda y transmitiendo a través de una fibra óptica hasta la unidad óptica, donde se convierte entonces a continuación en la radiación de excitación con una segunda longitud de onda diferente de la primera longitud de onda.

De esta manera, la unidad de láser puede generar por ejemplo una radiación con una longitud de onda de 1560 nm, que se convierte entonces en una radiación de excitación con una longitud de onda reducida a la mitad de 780 nm y se suministra a la unidad óptica para la excitación del objeto.

También el concepto del escaneo lineal mediante el movimiento de la unidad óptica a lo largo de una línea de toma predeterminada (línea de escaneo) para generar una imagen en sección bidimensional o de una imagen volumétrica tridimensional es independientemente de la generación de haz en dos etapas mencionada anteriormente un concepto de la invención independiente.

El rayo láser de la radiación de excitación puede estar polarizado linealmente por ejemplo originalmente de manera correspondiente a un modo fundamental transversal (TEM₀₀), pudiendo polarizarse circularmente para compensar las inhomogeneidades del haz antes de alcanzar la unidad óptica por ejemplo mediante incorporación de una placa de cuarto de onda.

De manera ventajosa, la unidad óptica está diseñada, por un lado, para enfocar la radiación de excitación hacia el objeto y por otro lado para captar la señal óptica excitada bifotónica. La unidad óptica puede estar conectada a este respecto con una fibra óptica, a través de la que se transmite la señal óptica recogida al módulo de detección para el procesamiento adicional. Para esta fibra óptica (también denominada "fibra de recogida") se usa preferentemente una fibra multimodal o un haz de fibras de una pluralidad de fibras individuales, que están cogidas en los extremos y así forman en cada caso una superficie de entrada o de salida compacta de la radiación de fluorescencia.

En el módulo de detección, que está integrado ventajosamente en la unidad de control y de procesamiento, pero también puede estar incorporado directamente en el módulo de paciente, tiene lugar el procesamiento de señales y el tratamiento de imágenes. Para poder obtener a este respecto tanto informaciones de intensidad como informaciones espectroscópicas, puede tener lugar en varios canales el procesamiento de señales, dividiéndose la señal recibida en el módulo de detección en varias fracciones de señal diferentes con diferentes intervalos de longitud de onda, que entonces pueden procesarse por separado unas de otras. De esta manera, la señal se divide en diferentes bandas de señal con diferentes longitudes de onda, pudiendo seleccionarse de manera adecuada las bandas en función de las informaciones buscadas. Si se debe determinar por ejemplo donde presenta aproximadamente un máximo, entonces, la relación de las fracciones espectrales puede representarse en una banda superior (con longitudes de onda más largas) y en una banda inferior (con longitudes de onda más cortas). Si deben detectarse determinadas sustancias fluorescentes, entonces una banda puede abarcar de manera dirigida el intervalo de longitudes de onda, en el que la sustancia investigada emite una radiación de fluorescencia. Por ejemplo, pueden detectarse de esta manera para el fin del diagnóstico fotodinámico (abreviado PDD) o terapia fotodinámica (abreviado PDT) porfirina (en particular la protoporfirina IX, PP IX) en células que con la excitación emiten radiación de fluorescencia en determinados intervalos de longitud de onda (PP IX por ejemplo, entre otras, a aproximadamente 630 nm). De la presencia de la porfirina puede deducirse entonces el estado del tejido, en particular las neoplasias de tejido patológicas tal como por ejemplo en el cáncer, pudiendo usarse esta información a su vez para el control en el marco de la terapia fotodinámica para el daño o la destrucción celular dirigida.

El dispositivo puede utilizarse para la representación tanto de sustancias propias del organismo como de sustancias fluorescentes ajenas al organismo (los denominados fluoróforos). Fluoróforos naturales que aparecen en la piel humana son a este respecto por ejemplo NAD(P)H, colágeno, elastina, triptófano, flavinas, lipo-pigmentos, queratina, HPD (hematoporfirina y derivados) así como PP IX, que fluorescen en diferentes intervalos de longitud de onda y por lo tanto pueden registrarse mediante la elección adecuada de las bandas consideradas en cada caso.

Para descomponer la señal recibida en fracciones de señal, el módulo de detección presenta uno o varios elementos de filtro dicróicos, que reflejan o transmiten en función de la longitud de onda la radiación incidente y con ello descomponen en función de la longitud de onda.

Para poder analizar de manera sencilla diferentes bandas espectrales, puede estar previsto a este respecto configurar de manera intercambiable uno o varios elementos de filtro dicróicos a modo de un sistema modular. Si se considera la señal recibida en determinadas bandas, entonces se selecciona el conjunto adecuado para ello de elementos de filtro dicróicos, por ejemplo espejos o prismas dicróicos y se inserta en el módulo de detección. Si se

consideran otras bandas, puede usarse otro conjunto de elementos de filtro y se repite de manera correspondiente la medición. Este cambio de filtro puede realizarse manualmente o a modo de un revólver de filtro que se mueve a motor o cargador de cambio de filtro.

5 En este contexto puede concebirse también llevar a cabo con el dispositivo espectroscopía de alta resolución, es decir, registrar píxel a píxel un espectro completo. Una condición previa para ello es que desde cada sitio se reciba un número suficientemente grande de fotones para una señal suficientemente intensa, evaluable. Opcionalmente, pueden integrarse para ello señales de varios sitios excitados.

10 Para la detección de las diferentes fracciones de señal, el módulo de detección presenta por ejemplo, en función del número de las bandas consideradas, uno o varios detectores, que están diseñados por ejemplo como los denominados multiplicadores de electrones secundarios (Photo Multiplier Tube, PMT), como línea CCD, como campo CCD o como SiPMT ("Silicon Photo Multiplier", es decir, elementos constructivos con campos de detector de fotodiodos de avalancha conectados de manera aditiva de fotoseñal) y sirven para la conversión de la señal óptica recibida o de su fracciones de señal individuales en señales de datos electrónicas.

15 Para el procesamiento de imágenes, el módulo de detección puede generar a partir de las diferentes fracciones de señal, por un lado, una información de claridad y, por otro lado, una información espectroscópica y emitir como imagen en sección mediante el objeto que va a examinarse con una información adicional espectroscópica y por ejemplo visualizarse en un monitor. A este respecto, por ejemplo a partir de la totalidad de las fracciones de señal, puede derivarse una información de claridad, que proporciona informaciones estructurales por medio del contraste de imagen. Pueden superponerse mediante un usuario de manera seleccionable y ajustable informaciones adicionales espectrales, que se han obtenido a partir de las fracciones de señal individuales y con ello diferentes bandas de longitudes de onda. Por ejemplo, a la imagen de claridad puede superponerse la información y se representan en colores alterados, sitios en los que está presente una sustancia fluorescente determinada o sitios en los que aparecen ondas armónicas de señal (por ejemplo SHG) mediante propiedades de tejido estructurales (por ejemplo mediante la presencia de colágeno en determinadas capas de piel).

20 El objetivo se resuelve además mediante un procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 9 en el que una unidad de láser genera una radiación de excitación, una unidad óptica la radiación de excitación para generar una señal óptica enfoca a diferentes sitios en o sobre un objeto que va a examinarse y un módulo de detección registra la señal óptica desde la zona del objeto. En el marco del procedimiento está previsto que la unidad óptica para generar la señal óptica se mueva en o sobre el objeto al menos en una dirección con respecto al objeto.

35 Las ventajas y configuraciones descritas anteriormente para el dispositivo pueden transmitirse de manera análoga al procedimiento.

40 A partir de las señales ópticas recibidas, puede generarse en diferentes sitios del objeto píxel a píxel una imagen en sección del objeto, exponiéndose para la excitación píxel a píxel el objeto de manera desencadenada a la radiación de excitación. Con otras palabras, la unidad óptica se desplaza con respecto al objeto a lo largo de una línea de toma adecuada, previamente establecida (línea de escaneo), y a este respecto el objeto se excita y por lo tanto se expone sucesivamente en sitios individualmente, que corresponden en cada caso precisamente al sitio del foco momentáneo de la unidad óptica, pudiendo controlarse el desencadenamiento en función del sitio y pudiendo ajustarse el tiempo de exposición, es decir, el tiempo de la irradiación de un sitio determinado, de manera adecuada.

50 El desencadenamiento de la radiación de excitación sirve, entre otras cosas, para establecer el tamaño de píxel. El tamaño de píxel de la imagen obtenida a partir de señales recibidas, dependientes de sitio, está determinado en dirección horizontal mediante la anchura de foco de la radiación de excitación y mediante el ajuste del desencadenamiento, mientras que en dirección vertical el tamaño de píxel está dado mediante la longitud de talle de la radiación de excitación enfocada. Mediante un ensanche del haz de la radiación de excitación y ajuste del desencadenamiento puede ajustarse entonces el tamaño de píxel, pudiendo usarse por ejemplo para la espectroscopía píxeles relativamente grandes, para obtener una señal relativamente intensa, mientras que para la microscopía de alta resolución pueden utilizarse preferentemente píxeles pequeños. A este respecto, la generación de imágenes (microscopía) y la espectroscopía transcurren en paralelo en el tiempo durante el mismo proceso de escaneo.

60 En este contexto puede concebirse desplazar el tamaño de píxel de manera escalonada o no escalonada, cambiando por un lado el ensanche del haz por medio de un cambio de aumento o de un ZOOM en un telescopio de ampliación y con ello se ajusta la longitud de talle y con ello la extensión vertical del píxel y, por otro lado, mediante el cambio del desencadenamiento se varía de manera correspondiente la extensión lateral del foco.

65 En la microscopía bifotónica se enfoca la radiación de excitación tal como se describió anteriormente en forma de un rayo láser con una alta apertura en el objeto (por regla general, un tejido), para conseguir un pequeño diámetro de foco y una baja profundidad de campo y con ello un pequeño volumen de excitación de fluorescencia, es decir una alta resolución espacial lateral y axial. Distanciándose de esto, puede usarse como alternativa una denominada

“excitación de fluorescencia homogeneizada”, en la que el objetivo es excitar una zona lateralmente delimitada, pero axialmente (verticalmente) extendida del objeto, de modo que en dirección axial, capas del objeto contribuyen en su mayor parte de manera equilibrada al menos a lo largo de un intervalo de profundidad determinada a la señal óptica. Esta señal óptica se recoge entonces y se integra y puede evaluarse y reprocesarse como valor medio individual, como espectro o en varios canales con bandas espectrales separadas (“espectroscopía de banda”).

Para la toma se mueve la unidad óptica exclusivamente en dirección horizontal (lateral) (en dirección X o en dirección X e Y) hacia la superficie del objeto, y la señal óptica se integra en dirección vertical. Se genera un cambio de valores de medición, que no representa ninguna imagen de objeto (imagen de tejido) como en la microscopía bifotónica convencional, sino que proporciona en conjunto una información de resolución de sitio lateral a lo largo del estado del objeto.

La excitación de fluorescencia homogeneizada puede conseguirse por que la radiación de excitación se irradia con una abertura relativamente pequeña en el tejido y se enfoca hasta una profundidad determinada. El haz de excitación enfocado por un objetivo de la unidad óptica, por ejemplo una lente esférica, se define en este sentido a través de la abertura, la profundidad de foco y el diámetro de foco. La profundidad de foco se ajusta para la excitación de fluorescencia homogeneizada de manera ventajosa a un valor entre 100 μm y 450 μm , preferentemente de 200 μm a 350 μm (medido en aire, antes de la colocación del sistema de medición sobre la piel, es decir sin corrección del índice de refracción del tejido), el diámetro de foco a un valor entre 6 μm y 10 μm , preferentemente entre 7 μm y 9 μm , y la abertura a un valor entre 50 y 80 mrad (de manera correspondiente al seno de la mitad del ángulo de abertura del cono de abertura en aire, es decir sin corrección del índice de refracción del tejido).

Sorprendentemente se muestra que mediante este ajuste de los parámetros para la excitación de fluorescencia homogeneizada pueden compensarse y nivelarse efectos indeseados. Normalmente, la radiación de excitación se debilita en un tejido mediante dispersión y absorción, de modo que zonas de tejido en mayor profundidad se excitan más débilmente para la fluorescencia que zonas cercanas a la superficie. Además, la señal óptica de zonas cercanas a la superficie, en su trayectoria desde el sitio de excitación hasta el sistema de medición se debilita menos que señales ópticas de mayores profundidades. Estas dos cosas llevan a que la señal óptica medida se determine normalmente con demasiado peso por parte de las zonas cercanas a la superficie (en el caso de la piel, por ejemplo, esto significa que la capa de queratina, que se ve afectada considerablemente por sustancias extrañas tal como cosméticos, y que, de todos modos, puede observarse adecuadamente desde el exterior, eclipsa la señal óptica deseada desde la profundidad). Con los parámetros seleccionados en este caso para el ajuste de la profundidad y anchura de foco así como la abertura, debido a la excitación bifotónica, en la que la probabilidad de excitación crece proporcionalmente con respecto al cuadrado de la intensidad, aumenta la probabilidad de excitación en una medida tal como los efectos de profundidad mencionados anteriormente debilitan las señales ópticas. Con ello se genera una contribución principalmente equilibrada en conjunto de todas las capas de tejido para la señal óptica medida.

La profundidad de integración para la señal óptica en el objeto (tejido) se limita principalmente por que el efecto bifotónico ya no actúa después de alcanzar la profundidad de foco. Mediante medidas ópticas tal como la previsión de un diafragma en la óptica de recogida (limitación de la eficiencia de recogida) puede reforzarse aún más este efecto de corte.

Como una ventaja adicional se muestra que oscilaciones de la profundidad de foco en el caso de parámetros por lo demás constantes de la radiación de excitación enfocada, solo influyen ligeramente en la señal óptica medida (integrada a lo largo de la profundidad). La medición es por lo tanto relativamente insensible frente a oscilaciones del acoplamiento del sistema de medición con la piel.

Ha de señalarse en este punto que el principio de la óptica volante como también la excitación de fluorescencia homogeneizada mediante la elección adecuada de diafragmas y enfoque puede emplearse de manera ventajosa también en la microscopía confocal y la microscopía de fluorescencia confocal (monofotónica).

La idea en la que se basa la invención se explicará en detalle a continuación por medio de los ejemplos de realización representados en las Figuras. Muestran:

- 55 la Figura 1 una representación de vista de conjunto de un dispositivo para la microscopía de fluorescencia multifotónica, que presenta una unidad de control y de procesamiento central, que está conectada a través de un brazo de soporte con un módulo de paciente que va a disponerse en un paciente;
- 60 la Figura 2 una representación esquemática de una toma de imagen en sección vertical (sagital);
- la Figura 3 una vista de conjunto esquemática de un dispositivo para la microscopía de fluorescencia multifotónica con sus componentes individuales;
- 65 la Figura 4 una vista esquemática de un módulo de paciente;

	la Figura 5	una vista esquemática de una unidad óptica que se mueve en horizontal y en vertical del módulo de paciente para la toma de una imagen en sección;
	la Figura 6	una vista esquemática de un módulo de detección para la detección de señales recibidas;
5	la Figura 7	una representación gráfica de dos espectros de ejemplo;
	la Figura 8	una representación en diagrama de un procedimiento para el procesamiento de señales;
	la Figura 9	una representación de una forma de realización alternativa de un módulo de paciente;
10	la Figura 10	un diagrama esquemático de una excitación de fluorescencia homogeneizada y
	las Figuras 11A, 11B	representaciones gráficas de un factor de peso dependiente de la profundidad en función de la profundidad de tejido sin corte de profundidad (Figura 11A) y con corte de profundidad (Figura 11 B).
15		

La Figura 1 muestra en una representación de vista de conjunto un dispositivo 1 para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico, que presenta una unidad de control y de procesamiento 12, que está conectada a través de un brazo de soporte 11 con un denominado módulo de paciente 10. Mientras que la unidad de control y de procesamiento 12 como unidad central, estacionaria se encarga por un lado del dispositivo y por otro lado del procesamiento de las señales recibidas y emite resultados de manera adecuada a través de un monitor 13, el módulo de paciente 10 está diseñado como módulo cuya posición puede adaptarse, que puede disponerse en un paciente, que presenta principalmente componentes ópticos para el acondicionamiento, la transmisión y modificación óptica de una radiación de excitación incidente, generada por una unidad de láser de la unidad de control y de procesamiento 12 y transmitida a través de una fibra óptica al módulo de paciente 10 por un lado, y para la recogida de una señal óptica recibida, por otro lado.

El módulo de paciente 10 representa por lo tanto un cabezal de medición que puede moverse libremente y detenerse con precisión a través del brazo de soporte 11 de varios ejes, de modo que después del posicionamiento preciso del módulo de paciente 10 con respecto a un paciente pueden prepararse tomas con resolución microscópica. El módulo de paciente 10 está conectado a través de conexiones de eléctricas y ópticas de fibra de manera flexible con la unidad de control y de procesamiento 12.

Para el posicionamiento del módulo de paciente 10 puede estar previsto un interruptor de pedal para el control de un movimiento a motor del brazo de soporte 11.

El dispositivo 1 está realizado de manera amortiguada frente a la vibraciones con la minimización de la masa que se mueve. La carcasa del módulo de paciente 10 debe ser opaca para evitar radiación perturbadora exterior.

Es parte de la unidad de control y de procesamiento 12 también un PC de control, a través del que pueden conectarse aparatos de entrada y salida de usuario (ratón, teclado, palanca de mando, pantalla).

El dispositivo 1 puede clasificarse funcionalmente en

- 45 - un sistema óptico, compuesto por ejemplo por un objetivo, una óptica de formación de haz y una óptica de recogida, un número de detectores ópticos por ejemplo en forma de los denominados *Photo Multiplier Tubes* (PMT), filtros y elementos de filtro dicroicos correspondientes, fibras de cuarzo para la transmisión de la luz, un láser de pulso ultracorto, un debilitador de haz en forma de un polarizador, un dispositivo de exposición para el control de la exposición de láser y una cámara de imágenes reales con sistema de iluminación correspondiente,
- 50 - un sistema mecánico, compuesto por ejemplo por el brazo de soporte 11, motores piezo-lineales con unidades de control y sistema de mesa correspondiente, un motor paso a paso para el debilitador de haz, un cambiador de óptica para el cambio a motor o manual entre óptica de microscopía y cámara de imágenes reales y un adaptador de paciente para fijar la óptica al paciente,
- 55 - un sistema de procesamiento de señales, compuesto por ejemplo por amplificadores, una electrónica para la conversión y la evaluación de las señales recibidas y para el almacenamiento de datos, fotodiodos para el control de la potencia y supervisión de la luz del entorno y convertidores correspondientes, así como
- un sistema de procesamiento de datos, compuesto por ejemplo por una superficie gráfica de usuario con funciones de gestión de datos y un sistema de control electrónico, que coordina todas las funciones del sistema óptico, del sistema mecánico y del sistema de procesamiento de señales.

60 El dispositivo 1 está diseñado para la microscopía de fluorescencia multifotónica, en particular para la microscopía bifotónica. El dispositivo 1 servirá a este respecto como sistema no invasivo para el apoyo diagnóstico de un médico, que utilizando procesos bifotónicos proporciona en particular imágenes en corte transversal *in vivo* de la piel humana con informaciones adicionales espectrales, debido a la que un médico obtienen informaciones complementarias con respecto a una imagen de superficie pura para el apoyo de su decisión de diagnóstico.

En principio, el dispositivo 1 puede utilizarse para el diagnóstico de aplicaciones de apoyo de todas las degeneraciones de la piel, que se reflejan en cambios estructurales del tejido. El dispositivo 1 puede a este respecto

- proporcionar información de profundidad que proporciona imágenes con resolución microscópica de capas de piel epidérmicas / dérmicas,
- generar representaciones en corte sagita de la piel de manera correspondiente a los cortes delgados histopatológicos,
- proporcionar mediante el uso de diferentes canales espectrales, informaciones espectrales en el sentido de una espectroscopía de banda de longitud de onda con resolución espacial y
- proporcionar funciones para el apoyo del diagnóstico, por ejemplo medios auxiliares de evaluación a máquina.

El dispositivo 1 es adecuado para pacientes de cualquier edad con lesiones cutáneas que no se diagnosticarán solamente mediante inspección clínica, sino por ejemplo deberán biopsiarse. Mediante la aplicación del dispositivo 1 puede evitarse opcionalmente una biopsia (invasiva) o incluso encontrarse una preselección dirigida al objetivo para biopsias. Como lesiones se tienen en cuenta en particular partes de la piel con sospecha de enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o queratosis actínica. El manejo del aparato tiene lugar a este respecto por personal entrenado, que proporciona y, dado el caso prepara, el material de imágenes para el médico encargado, o por el propio médico.

Con el dispositivo 1 pueden tomarse en particular imágenes en sección verticales (sagitales) a través de la piel de un paciente. Esto tiene lugar, tal como se representa esquemáticamente en la Figura 2, excitándose en el marco de la microscopía bifotónica en un plano de imagen sagital 3 a lo largo de una línea de toma 31 el tejido de piel en sitios individuales 32. El sitio excitado 32 corresponde a este respecto en cada caso a una zona alrededor del punto de foco de una radiación de excitación con una extensión en dirección X (horizontal) de por ejemplo $0,5 \mu\text{m}$ y en dirección Z (vertical) de por ejemplo $2 \mu\text{m}$ y se selecciona mediante desplazamiento del punto de foco a lo largo de la línea de toma 31.

En el caso del dispositivo 1 el desplazamiento del punto de foco, tal como está representado en las Figuras 3 a 5 y se explicará a continuación, se consigue mediante una unidad óptica 103 del módulo de paciente 10 que se mueve en al menos dos direcciones.

La Figura 3 muestra en una representación de vista de conjunto esquemática una forma de realización del sistema óptico del dispositivo 1 y la Figura 4 una vista esquemática de la estructura óptica del módulo de paciente 10.

El sistema óptico se compone esencialmente de un microscopio bifotónico compacto, que presenta una unidad de láser en forma de un láser de pulso ultracorto 120 (láser de fibra fs), un sistema de detección en forma de un módulo de detección 121 y una cámara de imágenes reales 111 junto con iluminación para la toma de una imagen real.

Para la microscopía bifotónica el láser de pulso ultracorto 120 dispuesto en o sobre la unidad de control y de procesamiento 12 genera una radiación de excitación A con una longitud de onda fundamental de $1560 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, que se suministra a través de una fibra óptica 122 en forma de una fibra unimodal al módulo de paciente 10.

En el módulo de paciente 10 se conduce la radiación de excitación A en primer lugar a un dispositivo para el acondicionamiento del haz 100, en cuyo marco, tal como está representado en la Figura 4, la longitud de onda de la radiación de excitación A se reduce a la mitad hasta 780 nm mediante un doblador de frecuencia 1001 en forma de un cristal adecuado (es decir, se dobla la frecuencia). A continuación, la radiación de excitación A atraviesa un filtro 1002, que filtra la longitud de onda fundamental (1560 nm), el tercer armónico (520 nm) y el cuarto armónico (390 nm) y por lo tanto únicamente deja pasar la radiación de excitación A de frecuencia doblada con una longitud de onda de 780 nm . En un dispositivo de ajuste y medición de potencia 1003 se regula la potencia de radiación, pudiendo estar previsto por ejemplo un debilitador para debilitar la potencia de radiación de excitación. El debilitador sirve para la reducción de la potencia de láser después de duplicarse la frecuencia desde un valor de por ejemplo aproximadamente 100 mW hasta un valor del 0% al 100% de la potencia de emisión permitida (de manera correspondiente a la potencia irradiada por la óptica sobre el objeto 2, por ejemplo, como máximo 50 mW) en el sitio de la excitación bifotónica. El debilitador es preciso y puede ajustarse con precisión de repetición a través de un motor, pudiendo controlarse el motor por ejemplo a través de una interfaz de usuario. Por medio de medición óptica (por ejemplo a través de un fotodiodo PIN) se supervisa la potencia IST después del debilitador.

Por último, la radiación de excitación A atraviesa un telescopio 1004, que ensancha el rayo láser y lo conforma de manera adecuada.

Los datos característicos del láser de pulso ultracorto 120 pueden ser por ejemplo:

- longitud de onda fundamental: $1560 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$;
- longitud de onda tras duplicado de frecuencia: $780 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$;
- anchura espectral (780 nm): $8,8 \text{ nm}$;
- diámetro del haz (780 nm): $1,3 \text{ mm}$;

- divergencia del haz (780 nm): 3,8 mrad;
- M2 (780 nm): 1,07;
- frecuencia de repetición de pulsos: 100 MHz;
- duración de pulso (780 nm): <150 fs;
- potencia media (780 nm): >100 mW.

La radiación de excitación A (con una longitud de onda de 780 nm) puede generarse en una solución alternativa también directamente en la unidad de control y de procesamiento 12 y transmitirse al módulo de paciente 10 a través de una fibra óptica 122 adecuada, en particular una denominada fibra fotónica.

En lugar de una fibra 122 puede utilizarse también un brazo articulado de espejo para la transmisión flexible.

La radiación de excitación bifotónica A puede generarse en una solución alternativa adicional directamente en el módulo de paciente 10, en el que está integrado un láser. Puede suprimirse entonces una fibra óptica para transmitir la radiación de excitación A desde la unidad de control y de procesamiento 12 hasta el módulo de paciente 10.

Como fuente de haces puede usarse en todos los casos también un láser en forma de un láser de femtosegundos, tal como por ejemplo un láser de titanio – zafiro, que (en lugar de la radiación a 1560 nm para generar la radiación de excitación a 780 nm) genera una radiación de excitación en el intervalo de 700 a 900 nm, que se utiliza entonces sin duplicado de frecuencia directamente para la excitación.

Después de tener lugar el acondicionamiento del haz se desvía la radiación de excitación A a través de espejos 101, 102 hacia la unidad óptica 103, allí se desvían a través de un espejo dicróico 104 hasta un objetivo 105, se enfoca a través de una lente esférica 106 y se irradia sobre un objeto 2, por ejemplo la piel de un paciente.

El módulo de paciente 10 presenta una sección de contacto 107 permeable para la radiación de excitación A en forma de un disco de vidrio, que se encuentra en contacto con la piel por ejemplo con el uso de un fluido de inmersión para mejorar la resolución microscópica de manera estacionaria.

Para ajustar el sitio del foco puede ajustarse la unidad óptica 103. La unidad óptica 103 puede moverse a este respecto para el movimiento lateral del punto de foco con respecto a la sección de contacto 107 al menos en dirección X (de manera correspondiente a un movimiento lateral BX), de manera ventajosa también en dirección Y, es decir bidimensionalmente a lo largo de la superficie del objeto 2. Al mismo tiempo, el objetivo 105 de la unidad óptica 103 puede desplazarse en dirección Z (de manera correspondiente a un movimiento axial BZ), para mover verticalmente de esta manera el punto de foco también en dirección Z (como alternativa puede concebirse también configurar de manera móvil toda la unidad óptica 103 en dirección Z). Mediante movimiento del punto de foco dentro del objeto 2 pueden generarse imágenes en sección, haciendo posible la movilidad lateral de la unidad óptica 103 la generación de imágenes en sección con grandes longitudes de canto laterales de por ejemplo varios mm o también cm.

La Figura 5 muestra esquemáticamente el movimiento de la unidad óptica 103 durante el proceso de registro de una imagen en sección vertical (sagital). Para registrar señales en diferentes sitios 32 desplazados lateralmente, se desplaza la unidad óptica a lo largo de la línea de toma 31 (véase la Figura 2) en primer lugar de manera continua a lo largo de la dirección X y con ello se mueve horizontalmente con respecto al objeto 2 (y la sección de contacto 107 dispuesta de manera estacionaria en el objeto 2 en forma del disco de vidrio del módulo de paciente 10). Durante el movimiento de la unidad óptica 103 se excitan diferentes sitios 32 mediante una exposición desencadenada en función del sitio con la radiación de excitación A, y se recoge la señal excitada. De esta manera se recoge un número de puntos de imagen (por ejemplo varios cientos o también miles) en una línea. Si se alcanza el extremo de la fila, se desplaza el objetivo 105 de la unidad óptica 103 en dirección Z y con ello se mueve el foco en dirección Z. La unidad óptica 103 se desplaza de vuelta entonces a lo largo de la dirección X, se registra la línea siguiente, etc., hasta que se ha registrado finalmente toda la imagen.

Este orden de exploración (primero lateralmente, entonces en la profundidad) puede producirse, naturalmente, también en orden inverso (primero en la profundidad, entonces lateralmente).

A este respecto, la exploración perpendicular a la superficie (“exploración Z”) puede provocarse mediante una suspensión oscilante en vertical del objetivo 105, que se excita o acciona periódicamente y así realiza el movimiento Z. Para la suspensión oscilante se toman en consideración en particular muelles de láminas, articulaciones de muelle de lámina, muelles anulares o muelles neumáticos, que se accionan de manera piezoeléctrica, electromagnética o a motor a través de un mecanismo de transmisión de levas o de excéntrica. El movimiento lateral de la unidad óptica 103 tiene lugar entonces de manera continua en solo un pase por imagen en sección, es decir de manera correspondiente más lenta. La ventaja de esta disposición se basa en que el objetivo 105 tiene una masa claramente menor que la unidad óptica 103 como un todo, por lo tanto puede moverse rápidamente con menores fuerzas de masa y con ello genera menos vibraciones del dispositivo 1.

Además, la exploración no solo puede tener lugar bidimensionalmente ("2D"), sino también tridimensionalmente ("3D"), efectuándose en cualquier orden uno tras otro dos escaneos laterales (X e Y) y un escaneo de profundidad (Z).

5 La unidad óptica móvil 103 del módulo de paciente 10 permite un movimiento motorizado de la óptica de representación a lo largo del objeto 2, pudiendo seleccionarse libremente por el usuario la dirección (0° - 180°), posición lateral y longitud lateral. El movimiento de la unidad óptica 103 puede tener lugar en el plano en paralelo a la superficie del objeto por ejemplo mediante dos motores piezo-lineales, que se acoplan y coordinan mecánicamente. Como alternativa a un movimiento a motor coordinado, puede estar previsto también solamente un
10 motor lineal para un movimiento unidimensional a lo largo de la superficie de la piel, girándose y orientándose manualmente por el usuario, para establecer la dirección de escaneo, todo el módulo de paciente 10 junto con la unidad óptica 103, para determinar la dirección de escaneo.

15 Uno de los movimientos laterales puede producirse también (en el sentido de una exploración en coordenadas polares) como movimiento de giro alrededor del eje de rotación R representado en la Figura 3. Un primer motor mueve entonces la unidad óptica 103 linealmente (en dirección radial), mientras que un segundo motor gira la unidad óptica 103 alrededor del eje de rotación R.

20 La resolución de la imagen tomada se determina mediante el tamaño de sus puntos de imagen (píxeles). En el caso de la fluorescencia bifotónica, estos se establecen mediante el tamaño de foco de la radiación de excitación A, utilizándose ventajosamente un tamaño de foco de $0,5 \mu\text{m}$ en dirección lateral (dirección X) y $2 \mu\text{m}$ en dirección axial (dirección Z), para conseguir una resolución celular. Para mantener tan baja como sea posible la masa de la unidad óptica 103 que va a moverse, se usa para enfocar una lente esférica 106 individual, lo que es posible por que el eje óptico O de la radiación de excitación A irradiada sobre el objeto 2, no cambia en su posición angular durante la
25 toma de una imagen (a diferencia por ejemplo del uso de espejos giratorios y orientables) y por lo tanto solamente se necesitan propiedades de foco óptimas en la zona inmediata del eje óptico O. La lente esférica 106 puede presentar por ejemplo distancia focal geométrica óptica de $f = 8 \text{ mm}$, una distancia de trabajo (definida como la anchura de corte en el lado del foco, es decir la distancia del punto de foco desde la superficie óptica de la lente situada a continuación) de 6 mm y una apertura numérica de $NA = 0,55$.

30 Por medio de la radiación de excitación A se excita radiación secundaria en sitios individuales de manera correspondiente al punto de foco de la radiación de excitación A en el objeto 2. La radiación secundaria puede componerse a este respecto, por un lado, por una radiación de fluorescencia, generada por sustancias propias del organismo o ajenas al organismo y, por otro lado, por ondas armónicas generadas en el objeto en estructuras, en particular el segundo armónico (SHG: *second harmonic generation*). La radiación secundaria se recoge como señal S por la unidad óptica 103 y se acopla a través de la lente 106, el espejo dicroico 104, un filtro de bloqueo 108 para la supresión de la radiación de excitación A y una lente 109 en una segunda fibra óptica 110 y se transmite al módulo de detección 121 de la unidad de control y de procesamiento 12. Las lentes 106 y 109 pueden estar
35 realizadas preferentemente como no esferas, pero como alternativa también, en una elección independiente en cada caso, como lente individual esférica o grupo de lentes, (por ejemplo como objetivo acromático u objetivo de microscopio) o como disposición de espejos de representación.

40 Las señales recibidas se transmiten al módulo de detección 121 de la unidad de control y de procesamiento 12 (véase la Figura 3). Una vista detallada de una forma de realización de la estructura óptica del módulo de detección 121 está representada en la Figura 6. El módulo de detección 121 está construido a este respecto con tres canales y presenta tres detectores en forma de multiplicadores de electrones secundarios 1221, 1222, 1223 (Photo Multiplier Tube, PMT). La señal S suministrada al módulo de detección 121 a través de la fibra óptica 110 se descompone mediante una lente esférica 1210, mediante un filtro de bloqueo 1211 en forma un filtro de paso corto para la supresión adicional de la radiación de excitación A reflejada o dispersada, mediante elementos de filtro dicroicos
45 1212, 1213 en tres fracciones de señal S1, S2, S3 en diferentes bandas de longitudes de onda y se suministra a través de filtros de bloqueo 1214, 1215, 1216 y lentes 1218, 1219, 1220 a los detectores 1221, 1222, 1223.

50 En el caso de una estructura de cuatro o más canales, pueden estar previstos también más filtros, lentes y detectores de manera correspondiente al número de los canales.

55 Como detectores 1221, 1222, 1223 se usan PMT con sensibilidad espectral adecuada (fotocátodos), que a través de los elementos de filtro 1212, 1213 dicroicos que sirven como divisor de haz, obtienen bandas parciales del espectro visible a partir de la luz fluorescente suministrada a través de la fibra 110. Todo el sistema se encuentra en una carcasa totalmente opaca y ennegrecida en el interior, para suprimir reflejos y luz parásita perturbadores. Las señales eléctricas generadas por los PMT se intensifican en primer lugar, estando dispuestos los amplificadores en
60 el entorno de los PMT, para minimizar perturbaciones electromagnéticas, y entonces se digitalizan.

65 Como magnitudes de medición para la detección sirven las cargas por píxel procedentes de los diferentes canales, que se obtienen por detector 1221, 1222, 1223 a partir de la integración de la corriente fotoeléctricas a lo largo de una duración de integración de píxel. A partir de estas señales, se crea con ayuda de parámetros adecuados (por ejemplo valores de calibración por canal, corrección de claridad y de contraste, función de color alterado y similares)

una imagen de fluorescencia. Las cargas se convierten para ello en una tensión en un ciclo de píxeles predeterminable por ejemplo mediante integración de una corriente mediante los detectores 1221, 1222, 1223, y esta tensión se digitaliza con por ejemplo 12 bits.

5 Los PMT, en la incidencia de luz, no generan ninguna corriente en el intervalo de nA a μ A, que deba procesarse adicionalmente de manera correspondiente. Aguas debajo de cada PMT está conectado un amplificador de corriente, que presenta por ejemplo un ancho de banda de 200 kHz a 8 MHz, un factor de amplificación $\leq 10^5$ y una impedancia de entrada igual a la impedancia del PMT (50 Ohm) y a este respecto está realizado de manera estable frente a derivas y de poco ruido. Aguas debajo de cada amplificador está conectado un circuito de integración, que se desencadena externamente (mediante un ciclo de codificador, que se conduce desde la óptica que se mueve) y convierte la señal de corriente del PMT asociado en un valor de tensión. Esta tensión se convierte por medio de un convertidor analógico - digital en un valor de 12 bits y se almacena en un almacenamiento intermedio, a partir del cual se envían los datos a una interfaz de cálculo para el procesamiento adicional.

15 Los PMT o SiPMT pueden usarse, en el caso de bajas velocidades de flujo de señales – fotones, como alternativa también en el funcionamiento de recuento de fotones individuales. Como señales digitales de salida se generan en este caso por píxel y canal, respectivamente, un número de sucesos registrados, el “recuento de fotones”.

20 Durante la toma de una imagen en sección de microscopía, la unidad óptica 103 (véanse la Figura 3 y la Figura 5) se desplaza con una velocidad lineal constante de manera continua a lo largo de la dirección X. A este respecto se determina el ciclo de medición mediante un desencadenador de resolución temporal, en concreto, el ciclo de descodificador del motor lineal. Dado que debe medirse con precisión microscópica (resolución $< 1 \mu\text{m}$), son altos los requisitos en cuanto a la precisión del proceso de exploración para la unidad óptica 103 que se mueve. Si el proceso de integración de los detectores 1221, 1222, 1223 se controla por el ciclo de codificador del motor lineal, las oscilaciones de la velocidad de movimiento no repercuten como distorsiones de imagen, no debiendo superar las desviaciones en las posiciones inicial o final de las líneas individuales, la anchura de un píxel, es decir, por ejemplo $0,5 \mu\text{m}$. La integración para todos los canales debe tener lugar de manera exactamente simultánea, para obtener datos del mismo sitio en cada uno de los canales.

30 Para el control de la exposición del objeto a la radiación de excitación se utiliza un denominado obturador, que está diseñado como elemento opaco a la luz y se cierra para el apantallamiento y la interrupción de la radiación de excitación en la trayectoria del haz de la radiación de excitación. El obturador se abre solamente durante una toma y está cerrado en particular durante la verificación del sistema, durante una parada de emergencia, en el caso de un contacto fallido con el paciente, siempre que no se lleve a cabo ninguna toma y en los puntos de inflexión de una línea de toma para minimizar la irradiación de láser en la piel del paciente. El obturador puede controlarse mediante un software de control, pudiendo estar previsto en un caso de fallo un cierre automático e independiente del software. El obturador se conecta para la exposición de cada uno de los sitios del objeto para generar cada una de las señales de píxel durante una toma con velocidad de ciclo relativamente alta (en el intervalo de menos ms), pudiendo estar previsto opcionalmente un obturador principal y un obturador de medición, de los que el obturador principal está fundamentalmente abierto durante una toma y el obturador de medición se desencadena mediante el desencadenador.

45 En el caso de la estructura de acuerdo con la Figura 6, están previstos tres canales para registrar tres bandas espectrales. Entre ellos pueden figurar:

- un canal de SHG en una banda de longitudes de onda de $390 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$,
- un primer canal de onda corta en una banda de longitudes de onda de $450 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ y
- un segundo canal de onda corta en una banda de longitudes de onda de $550 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$.

50 A este respecto, el canal de SHG detectará exclusivamente la SHG de tejido de banda estrecha, generada de manera no resonante, mientras que los dos canales de onda corta detectan la señal de auto-fluorescencia con la posibilidad, para determinar una formación de relación espectral con resolución espacial.

55 Adicionalmente, en una estructura ampliada, puede estar previsto un cuarto canal en una banda de longitudes de onda de $625 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$, que es apropiado para registrar señales de fluorescencia, que se deben a marcadores tal como PP IX o ALA.

60 Dos espectros de ejemplo están representados en la Figura 7, una vez para un espectro N de una piel normal y una vez para un espectro L de una lesión, es decir, una piel modificada por una patología. Puede apreciarse claramente en los dos espectros L, N por ejemplo un pico de señal debido a la generación del segundo armónico (SHG) de 390 nm así como una evolución espectral con un máximo marcado en aproximadamente 480 nm (N) o 500 nm (L). El pico de señal a 390 nm puede registrarse mediante el canal de SHG, mientras que mediante la formación de relación de las señales de los dos canales de onda corta puede cerrarse de nuevo a la posición del máximo en un espectro L, N.

65

En la Figura 8 está representado un esquema de procesamiento de diferentes fracciones de señal S1, S2, S3 en la configuración de varios canales del módulo de detección 121. Las diferentes fracciones de señal S1, S2, S3 se detectan a este respecto mediante en cada caso un detector D1, D2, D3 (por ejemplo un PMT, véase la Figura 6) y se convierte en cada caso en una señal de datos electrónica, que se amplifica a continuación mediante amplificadores V1, V2, V3. Las señales electrónicas así obtenidas pueden procesarse adicionalmente ahora para la obtención de información. Por ejemplo, mediante la adición Σ pueden combinarse las fracciones de señal S1, S2, S3 para dar una señal completa, de la que se obtiene una información de claridad. La imagen resultado E1 puede visualizarse en un monitor por ejemplo como imagen en blanco y negro y proporcionar a un usuario un mensaje sobre qué distribución de intensidad de señal resulta en el tejido considerado. Al mismo tiempo, cada una de las fracciones de señal S1, S2, S3 pueden procesarse adicionalmente después de la amplificación también por separado, para generar imágenes resultado E2, que proporcionan por ejemplo informaciones sobre la presencia de un fluoróforo en sitios determinados en el tejido y pueden superponerse a la imagen de claridad E1 en colores alterados. Resulta una imagen en la que la información de claridad en blanco y negro e informaciones espectrales adicionales de cada una de las bandas de señal, se visualizan en colores alterados.

Las informaciones de imagen combinadas mencionadas (imágenes resultado E1, E2 etc.) pueden generarse de manera análoga a tal como se representa, a partir de las señales S1, S2 etc. Como alternativa, también justo después de los amplificadores V1, V2 etc. se convierten de manera analógica – digital, para obtener a continuación las imágenes resultado E1, E2 mencionadas mediante procesamiento de señales digital o cálculo.

Diferentes señales de las diferentes bandas pueden superponerse a la imagen de claridad E1 en diferentes colores. Por ejemplo, la señal que corresponde a PP IX puede visualizarse en rojo y la señal que corresponde al segundo armónico (SHG) puede visualizarse en azul, pudiendo estar previsto que un usuario, para la optimización relacionada con problemas de la representación y para la representación de informaciones de diagnóstico dirigidas pueda ajustarse por medio de un instrumento de entrada tal como un palanca de mando, de un regulador de disco o opcionalmente por medio de control de voz el nivel de señal de las señales individuales para la superposición.

Opcionalmente, puede efectuarse también una corrección de claridad logarítmica o una optimización de contraste automática.

La Figura 9 muestra una configuración de un módulo de paciente 10', en el que un espejo orientable de dos ejes 107' se usa para desplazar el punto de foco de la radiación de excitación A y por lo tanto el sitio de la excitación. La radiación de excitación A conducida a través de la fibra óptica 122 se colima a este respecto en primer lugar mediante una lente 100', se reduce a la mitad la longitud de onda a través del doblador de frecuencia 101' (por ejemplo de 1560 nm a 780 nm), se polariza circularmente mediante un polarizador 102' y se desvía una placa de cuarto de onda 103' (la radiación de excitación A transmitida por la fibra óptica 122 está originalmente polarizada linealmente), mediante una lente 104' sobre un primer espejo adaptivo 105' y desde este a través de una lente 106' sobre el espejo orientable de dos ejes 107'.

Los espejos 105', 107' puede estar fabricados por ejemplo como elementos constructivos de MEMS (MEMS: sistemas microelectromecánicos). El primer espejo 105' sirve a este respecto para la variación del frente de onda, mientras que el segundo espejo 107' mediante la orientación de dos ejes desvía la radiación de excitación A con respecto al movimiento espacial del punto de foco.

La radiación de excitación A así desviada se dirige mediante un telescopio para el ensanche del haz 108', una lente 109', un divisor de haz dicróico 110', un objetivo 116' con una lente esférica 117' sobre un objeto 2, por ejemplo la piel de un paciente, y excita el tejido para la emisión de una radiación secundaria, que se conduce a su vez a través del objetivo 116' y el divisor de haz 110' a través de una lente 111' hacia un detector 112', que recibe la radiación secundaria como señal óptica y la convierte en señales de datos electrónicas.

Para la evaluación de las señales de datos así como para el control de cada uno de los grupos constructivos, el módulo de paciente 10' presenta una electrónica de excitación 113' (en particular para el control de un movimiento vertical del objetivo 116'), una electrónica de detección 114' para el control del detector 112' y para el procesamiento adicional de las señales recibidas y una electrónica de control 115' para el ajuste de los espejos 105', 107'.

Como una medida adicional en todos los ejemplos de realización descritos anteriormente del dispositivo 1, el foco de la radiación de excitación bifotónica A puede moverse ("tambalearse") mediante medios adecuados rápidamente a través de una pequeña desviación alrededor de su posición central, para que la excitación de fluorescencia pueda promediarse durante el tiempo de toma (= tiempo de integración) a lo largo de un volumen adecuado. El volumen de toma así obtenido ("volumen de integración"), del que proceden las señales S excitadas de dos fotones, es mayor que el volumen correspondiente al punto de foco y proporciona una señal evaluable, suficientemente intensa para la espectroscopía. Además de una homogeneización de la señal S se consigue por lo tanto el fin de no cargar innecesariamente la muestra o el tejido examinado mediante irradiación de larga duración del mismo volumen de foco microscópico.

De manera especialmente ventajosa, este micromovimiento del foco puede realizarse de tal manera que los volúmenes de excitación, es decir aquellas zonas de los focos, cuya intensidad es suficiente para la excitación multifotónica, no solapan directamente pulsos de láser sucesivos. La ventaja de un modo de proceder de este tipo consiste en que se reduce significativamente el riesgo de un daño óptico del tejido. En el caso de solapamiento, el pulso de secuencia incide sobre zonas de tejido ya ópticamente excitadas por el pulso previo. Dado que la distancia de pulso temporal en el caso de los láseres de pulso ultracorto usados se encuentra en el orden de magnitud de 10 ns, es decir, en el orden de magnitud de los tiempos de relajación de la fluorescencia, existe una probabilidad no despreciable para transformar moléculas excitadas en el tejido en un estado energético superior, que entonces lleva a modificaciones permanentes de las moléculas.

Para el micromovimiento rápido ("tambaleo") de la radiación de excitación A para la espectroscopía bifotónica puede usarse por ejemplo un elemento constructivo óptico oscilante o giratorio, por ejemplo una lente, un espejo, un prisma o similares.

Una forma de realización ventajosa representa un espejo basculante, es decir un espejo, que está montado sobre un eje de rotación accionado a motor para un movimiento de giro rápido, de modo que entre el eje de rotación y la normal del espejo existe un pequeño ángulo (por ejemplo de $0,5^\circ$ a $2,5^\circ$). El haz reflejado gira por lo tanto alrededor de su eje, lo que lleva a un pequeño movimiento circular del foco y por lo tanto a un movimiento de foco libre de solapamiento.

Una realización ventajosa adicional es un espejo que oscila en dos ejes, en particular un MEMS, en el que las frecuencias de oscilación de los dos ejes de oscilación principales situados en perpendicular entre sí en una relación uno con respecto a otro, que corresponde a un número racional como fracción de dos números primos. Si esta oscilación de dos ejes del espejo se excita mediante un accionamiento por ejemplo electromagnético o electrostático, entonces el haz reflejado y por lo tanto el foco de láser, realiza figuras de Lissajous, en las que en el punto de inversión de oscilación de un eje de oscilación el otro no tiene velocidad cero, sino un valor finito. Por lo tanto, durante este movimiento nunca resulta una parada del foco, que llevaría de hecho al solapamiento indeseado de los volúmenes de excitación de los pulsos de secuencia.

La Figura 10 muestra en una representación esquemática (no a escala), una excitación de fluorescencia homogeneizada, en la que se excita una zona lateralmente delimitada, pero axialmente (verticalmente) extendida ("FMV" = volumen de medición de fluorescencia) del objeto 2, de modo que en dirección axial el objeto 2 contribuye principalmente de manera equilibrada al menos a lo largo de una determinada zona de profundidad determinada a la señal óptica S. Esta señal óptica S se recoge y se integra y puede evaluarse y procesarse adicionalmente como valor de medición individual, como espectro o en varios canales con bandas espectrales separadas ("espectroscopía de bandas").

Para la toma se mueve la unidad óptica 103 (véase por ejemplo la Figura 3) exclusivamente en dirección horizontal (lateral) (en dirección X o en dirección X y dirección Y) con respecto a la superficie del objeto 2 (un movimiento en dirección vertical (Z) no es necesario porque la señal óptica S se integra a lo largo de la profundidad).

Para obtener una excitación de fluorescencia homogeneizada en una zona designada como volumen de medición de fluorescencia FMV, se ajustan los parámetros para la abertura del objetivo 106, el diámetro de foco Dfoc y la profundidad de foco Zfoc a valores dentro de intervalos de parámetros determinados. Así se selecciona una abertura relativamente pequeña entre 50 y 80 mrad (de manera correspondiente al seno de la mitad del ángulo de abertura del cono de abertura en aire, es decir sin corrección del índice de refracción del tejido). La profundidad de foco Zfoc se ajusta de manera ventajosa a un valor entre $100\ \mu\text{m}$ y $450\ \mu\text{m}$, preferentemente de $200\ \mu\text{m}$ a $350\ \mu\text{m}$ (medido en aire, antes de la colocación del sistema de medición sobre la piel, es decir sin corrección del índice de refracción del tejido) y el diámetro de foco Dfoc a un valor entre $6\ \mu\text{m}$ y $10\ \mu\text{m}$, preferentemente entre $7\ \mu\text{m}$ y $9\ \mu\text{m}$.

El volumen de medición de fluorescencia FMV se extiende desde la superficie de tejido o de muestra GPO (objeto 2) axialmente hacia la profundidad hasta una profundidad de integración Zmax. La profundidad de foco Zfoc es mayor (más profunda) que la profundidad de integración Zmax.

Normalmente, la radiación de excitación A en un tejido (objeto 2) se debilita mediante dispersión y absorción, de modo que se excitan zonas de tejido en mayor profundidad más débilmente con respecto a la fluorescencia que zonas cercanas a la superficie. Además, la señal óptica S, a partir de zonas cercanas a la superficie se debilita en su trayectoria desde el sitio de excitación hasta el sistema de medición, menos que las señales ópticas S procedentes de profundidades mayores. Estas dos cosas llevan a que la señal óptica S medida se determine normalmente con gran peso por parte de las zonas cercanas a la superficie.

Sorprendentemente se ha mostrado que con los parámetros seleccionados en este caso para el ajuste de la profundidad de foco Zfoc y la anchura de foco Dfoc así como la abertura, se obtiene una contribución en conjunto principalmente equilibrada de todas las capas de tejido dentro del volumen de medición de fluorescencia FMV con una profundidad de integración Zmax con respecto a la señal óptica medida S. Esto se provoca por que la regla de escalonamiento de la excitación bifotónica con la intensidad (a la que la probabilidad de excitación crece

proporcionalmente al cuadrado de la intensidad) compensa en su mayor parte la debilitación de la radiación de excitación A y de la señal óptica S en el tejido.

5 La Figura 11A muestra cualitativamente el factor de peso dependiente de la profundidad, que indica en qué medida contribuyen determinadas zonas de profundidad a la señal óptica S medida. En este caso, la profundidad de foco Zfoc está ajustada a 300 μm , la profundidad de integración asciende a $Z_{\text{max}} = 200 \mu\text{m}$. Para profundidades menores que la profundidad de integración seleccionada en este caso (200 μm) la contribución es esencialmente constante. Zonas situadas a mayor profundidad contribuyen por el contrario solamente de manera reducida a la señal óptica S.

10 La profundidad de integración Z_{max} para la señal óptica S en el objeto 2 (tejido) se limita principalmente por que el efecto bifotónico después de alcanzar la profundidad de foco ya no actúa de manera que amplifica la señal (la profundidad de integración Z_{max} máxima, hasta la que la contribución de señal es aproximadamente constante independientemente de la profundidad, es a este respecto menor que la profundidad de foco Zfoc). Mediante medidas ópticas tal como la previsión de un diafragma en la óptica de recogida (limitación de la eficiencia de recogida) puede amplificarse aún más este efecto de corte. La Figura 11B muestra una representación cualitativa del factor de peso dependiente de la profundidad en el caso del uso de un diafragma dispuesto en la trayectoria del haz de la señal óptica S para cortar señales ópticas S de mayores profundidades.

20 El proceso de examen de una lesión en un paciente con el uso del dispositivo 1 se divide fundamentalmente en dos secciones:

1. toma de una imagen real de la superficie por medio de la cámara de imágenes reales 111 (Figuras 3 y 4) y decisión sobre los volúmenes parciales que van a examinarse en detalle, inclusive establecimiento de la línea de toma (carril de escaneo) en la imagen de la superficie de la piel;
- 25 2. realización del proceso de medición para la verdadera toma de corte de microscopía a lo largo del o de los carriles de escaneo establecidos en la imagen real

30 La imagen real sirve a este respecto como toma de visión general inicial, para permitirle a un usuario la elección de una línea de toma adecuada, y proporciona al mismo tiempo información clínica de documentación adicional en el sentido de la dermatoscopia habitual.

Un examen de un paciente con el uso del dispositivo 1 puede transcurrir por ejemplo de la siguiente manera.

35 Un examen comienza con la colocación precisa en el paciente del módulo de paciente 10 (cabezal de medición) fijado al am brazo de soporte 11. A este respecto se usa la cámara de imágenes reales 111 para la búsqueda, que proporciona las imágenes en movimiento de la superficie de la piel. Esta imagen de búsqueda de vídeo se visualiza continuamente en una superficie de usuario sobre el monitor 13 (Figura 1). Después de detenerse el módulo de paciente 10 se realiza una toma de visión general individual y se almacena en el marco de un conjunto de datos de lesión.

40 Para facilitarle a un usuario el establecimiento del plano para la imagen en sección que va a tomarse, en la toma de visión general de la superficie de usuario, puede insertarse de manera superpuesta un campo de selección, que corresponde al campo real de la siguiente toma de microscopía y puede adaptarse y definirse por el usuario en longitud y posición lateral. Adicionalmente, el usuario debe indicar la profundidad axial para establecer un campo bidimensional para la imagen en sección que va a tomarse.

50 Después de la definición de la posición de la imagen en sección puede efectuarse en primer lugar una toma de calibración para el ajuste automático de la potencia de láser en función de la profundidad axial; solamente a continuación tiene lugar entonces la verdadera toma microscópica. Durante la toma de la imagen en sección se actualiza continuamente a este respecto la imagen ya obtenida, para poder interrumpir a tiempo tomas fallidas. Después de la toma de la imagen en sección, el usuario puede tomar otras imágenes y añadirlas al conjunto de datos de lesión.

Los siguientes datos pueden recaudarse por ejemplo para el examen de una lesión de un paciente:

- Imagen real: resolución de 4 megapíxeles en el modo fotográfico cualitativamente valioso; como mínimo 1 megapíxel de resolución en el modo de vídeo, frecuencia de imagen 25 fps; tiempo de exposición (en el modo fotográfico) 50 ms o menor.
- Imagen de microscopio: el usuario define un tramo de 1-10 mm lateralmente con una profundidad máxima de 20 a 150 μm axialmente, comenzando una medición siempre en la superficie de la piel (a una profundidad de 0 μm). Para una lesión, el usuario puede llevar a cabo cualquier cantidad de tomas de microscopía.
- Para poder reconocer posibles diferencias con respecto a la primera imagen real, se toma una segunda imagen real después de la verdadera toma de corte de microscopía y se compara con la primera (la denominada "imagen de pre-escaneo" e "imagen de post-escaneo").

65

Un proceso de medición puede transcurrir por ejemplo en orden lógico y temporal de la siguiente manera:

1. Inicialización del dispositivo 1:
 - 5 - se enciende el dispositivo 1,
 - el motor lineal que mueve la unidad óptica 103 se lleva a la posición inicial,
 - el dispositivo 1 se prepara para una toma (se preparan tensiones, se prueban e inicializan componentes, se prepara y señala la disponibilidad de servicio);
- 10 2. Inicio del proceso de examen:
 - dado el caso el operador introduce datos del paciente,
 - dado el caso se aplica un conjunto de datos de medición por el operador;
- 15 3. Selección de la zona de examen y colocación del módulo de paciente 10:
 - el operador prepara una condición adecuada para una toma,
 - se visualiza una imagen de vídeo de la superficie de la piel;
- 20 4. Toma de una imagen real ("imagen de pre-escaneo"):
 - en cuanto queda fijada la colocación (el brazo de soporte 11 está parado y se visualiza la detención), se desencadena la toma y se muestra visualmente el resultado al usuario,
 - el operador acepta o rechaza la imagen (en el último caso repetición),
 - 25 - la imagen aceptada se almacena como "imagen de pre-escaneo", sirviendo los datos registrados al mismo tiempo para una valoración clínica de la lesión por el médico y para la determinación del campo de medición;
5. Establecimiento de la línea de toma (carril de escaneo) en la imagen real de la superficie de la piel:
 - 30 - en la imagen real se representa la línea de toma (= línea de corte del campo de escaneo X-Z con la superficie de la piel) como línea insertada,
 - la línea de toma puede modificarse por el usuario en su orientación y longitud, para determinar la longitud de escaneo lateral (extensión en dirección X) y la posición de escaneo,
 - la profundidad de escaneo axial (extensión en dirección Z) se ajusta a través de un elemento de mando (por ejemplo un controlador de corredera de una interfaz de usuario gráfica), pudiendo ajustarse por ejemplo valores entre 0 y 150 μm ;
- 35 6. Calibración de la potencia de láser:
 - 40 - después de establecerse los datos de escaneo, puede determinarse automáticamente la adaptación de la potencia de láser en función de la profundidad de escaneo o también puede definirse manualmente por el propio usuario;
- 45 7. Realización de la rutina de escaneo:
 - al pulsarse un botón de "inicio" se inicia el escaneo microscópico, es decir:
 - en primer lugar se lleva la cámara de imágenes reales 111 (manual o automáticamente) a una posición de desviación,
 - en el punto inicial de la línea de toma comienza la unidad óptica 103 con la exploración del tejido,
 - 50 - durante todo el transcurso de escaneo se supervisan continuamente funciones de seguridad (interrupción, parada de emergencia, supervisión de potencia) y se adapta continuamente la potencia de láser de acuerdo con la función predefinida (calibración),
 - simultáneamente se construye una imagen de escalas de grises de la señal de medición en una o en varias ventanas (que están asociadas a los diferentes canales espectrales) en el monitor 13,
 - 55 - la rutina de escaneo termina regularmente de manera automática con exploración completa del campo de escaneo y mensaje de acabado en el monitor 13 (más en el punto 8) o
 - en caso de fallo con terminación y mensaje de fallo (más en el punto 10);
- 60 8. Terminación de la rutina de escaneo en el caso normal:
 - tras finalizar el proceso de escaneo se conecta el modo de imagen real, la cámara de imágenes reales 111 se lleva a una posición de toma y se toma una imagen real adicional; esta "imagen post-escaneo" se compara con la "imagen de pre-escaneo" almacenada correspondiente, en la que solamente en el caso de una congruencia suficientemente precisa la verdadera imagen de escaneo está "no movida" y puede usarse;
 - 65 - en el caso de una salida positiva del examen se ofrece al usuario almacenar los datos o dotarlos de comentarios (más con el punto 9) o realizar otra toma en otro o en el mismo sitio (retorno al punto 3);

9. Finalización del proceso de examen:

- si ya no deben realizarse más escaneos o procesarse datos, se pasa el dispositivo 1 a un estado de reposo (en el que los motores están en posición inicial, el obturador está cerrado y los PMT no tienen tensión) y se finaliza el programa de aplicación.

El control de mando puede realizarse mediante un software que puede estar implementado en un programa de aplicación con una interfaz de usuario gráfica (GUI) y presenta las siguientes funciones lógicas:

- inicialización de todo el sistema, en particular autocomprobación de los componentes de HW y visualización del estado del sistema y fallos; funciones de supervisión (potencia de láser; estado de láser);
- funciones para la gestión de los datos del paciente, en particular una estructura de carpetas y banco de datos, que permite la entrada estructurada de datos referidos al paciente así como funciones administrativas correspondientes, tal como búsqueda, modificación, impresión y borrado de conjuntos de datos;
- funciones para la gestión de datos de medición (imagen real; imagen de microscopio) y su asociación a conjuntos de datos del paciente;
- funciones para la representación gráfica de los datos de medición a partir de diferentes canales espectrales y funciones para el procesamiento adicional de los datos de medición (por ejemplo representación en colores alterados, elección de la zona, formación de relación, reconocimiento de cantos, etc.);
- funciones para el control del sistema óptico y el sistema mecánico;
- funciones para el control de la evolución general, por ejemplo asistentes para la guía del usuario en los escaneos.

La unidad de control y de procesamiento 12 (véase la Figura 1) presenta para el control y procesamiento de señales preferentemente un circuito electrónico, que tiene, por un lado, control sobre todos los subsistemas conectados a la misma y, por otro lado, controla la comunicación con el software de usuario instalado en un ordenador de la unidad de control y de procesamiento 12. Mediante la bipartición por un lado del control de los componentes conectados sobre el circuito electrónico y, por otro lado, la instalación del software de aplicación en un ordenador separado (PC), existe la posibilidad de realizar tareas sencillas de procesamiento de señales y el control de los componentes conectados tal como fotodiodos, obturadores y motores paso a paso o sus módulos de control en lados del circuito electrónico en tiempo real, mientras que tareas más complejas se realizan sin requisito de tiempo real y relevancia de seguridad por el programa de aplicación en el ordenador. Para una flexibilidad suficiente, la unidad de control y de procesamiento 12 deberá diseñarse de manera programable.

Para proteger los detectores 1221, 1222, 1223 (por ejemplo realizados como PMT) del módulo de detección 121, puede estar previsto medir la claridad fuera del módulo de paciente 10 por medio de un fotodiodo. Si esta se encuentra por encima de un valor fiable, es decir se transporta potencialmente demasiada luz a través de la fibra óptica 110, se regula por disminución una tensión de control para los detectores 1221, 1222, 1223 y se envía un mensaje de fallo al programa de aplicación.

Para eliminar una exposición del ojo humano a la luz láser, puede estar previsto abrir el obturador previsto para el control de la exposición solamente cuando un dispositivo mecánico (conmutador) u óptico (barrera fotoeléctrica) señalice un contacto íntimo del módulo de paciente 10 con el objeto 2 que va a examinarse. Si existe o no un contacto, puede transmitirse al programa de aplicación.

El dispositivo 1 como sistema médico de formación de imágenes representa gráficamente los datos obtenidos, haciéndose disponibles o representándose los datos tan próximos en el tiempo como sea posible (idealmente en tiempo real). Estados del sistema tal como mensajes de fallo pueden apreciarse a este respecto en visualizaciones correspondientes.

En el lado de entrada, puede estar diseñado un software de aplicación a este respecto para procesar entradas de usuario de manera intuitiva y referidas al objeto respectivo. Esto significa en particular que la colocación de un campo de medición (Region of Interest, ROI) puede tener lugar directamente en la imagen real tomada por adelantado y que una elección de la zona en una imagen (imagen real o imagen de microscopio) se soporta con funciones de zoom y de desplazamiento así como arrastrar y soltar. Además, pueden estar previstas herramientas que reducen los cálculos necesarios para el usuario y apoyan la evaluación de las imágenes (medición de tamaños y distancias). Un examen puede interrumpirse o detenerse en cualquier momento a través del software de aplicación por un usuario. En función del tipo de funcionamiento (escaneo o evaluación) el software proporciona máscaras de mando correspondientes.

En el lado de salida el software de aplicación está diseñado para señalar cualquier cambio del sistema y realizar inmediatamente una actualización de imagen. A esto pertenece por ejemplo el estado de funcionamiento en general, el estado de movimiento de los motores, el progreso de un programa de medición y la formación próxima en el tiempo de imágenes reales y de microscopio. Debido a la geometría de las imágenes en sección tomadas (en las que la anchura de imagen es un múltiplo de la altura de imagen, por ejemplo con una relación de aproximadamente 1:50) es necesario que una imagen de microscopio se representa o bien en tiras parciales adyacentes o como corte

(lo más largo posible).

La invención no está limitada a los ejemplos de realización expuestos anteriormente. En particular, los procedimientos y dispositivos expuestos no están limitados a la excitación bifotónica, sino que pueden utilizarse también para la microscopía o espectroscopía trifotónica o multifotónica.

Lista de símbolos de referencia

	1	dispositivo
10	10, 10'	módulo de paciente
	100	dispositivo para el acondicionamiento del haz
	1001	doblador de frecuencia
	1002	filtro de longitud de onda
	1003	dispositivo de ajuste y de medición de potencia
15	1004	telescopio para la adaptación del haz
	101, 102	espejo
	103	unidad
	104	elemento dicroico
	105	objetivo
20	106	lente
	107	disco
	108	filtro de bloqueo
	109	lente
	110	fibra óptica
25	100'	lente
	101'	doblador de frecuencia
	102'	polarizador
	103'	placa de cuarto de onda
	104'	lente
30	105'	espejo adaptativo
	106'	lente
	107'	espejo orientable de dos ejes
	108'	telescopio
	109'	lente
35	110'	divisor de haz
	111'	lente
	112'	detector
	113'	electrónica de excitación
	114'	electrónica de detección
40	115'	electrónica de excitación
	116'	unidad óptica
	117'	lente
	11	brazo de soporte
	12	unidad de control y de procesamiento
45	120	unidad de láser
	121	módulo de detección
	1210	lente
	1211	filtro de bloqueo
	1212, 1213	espejo dicroico
50	1214, 1215, 1216	filtro de bloqueo
	1218, 1219, 1220	lente
	1221, 1222, 1223	detector
	122	fibra óptica
	13	monitor
55	2	objeto
	3	plano de imagen
	31	línea de toma
	A	haz de excitación
	BX, BZ	movimiento
60	C	conversión
	D1, D2, D3	detección
	Dfoc	diámetro de foco
	E1, E2	imagen resultado
	FMV	volumen de medición de fluorescencia
65	GPO	superficie de tejido o de muestra
	L	espectro de una lesión

ES 2 564 529 T3

N	espectro de la piel normal
O	eje óptico
R	eje de rotación
S, S1, S2, S3	señal
5 Σ adición	
V, V1, V2, V3	amplificación
Zfoc	profundidad de foco
Zmax	límite de profundidad del volumen de medición de fluorescencia

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico, con

- 5 - una unidad de láser (120) para generar una radiación de excitación (A),
- una unidad óptica (103), que está diseñada para enfocar la radiación de excitación (A) para generar una señal óptica (S) a diferentes sitios en o sobre un objeto que va a examinarse (2), y
- 10 - un módulo de detección (121) para registrar la señal óptica (S) desde la zona del objeto (2), en donde la unidad óptica (103) para generar la señal óptica (S) en diferentes sitios en o sobre el objeto (2) puede moverse al menos en una dirección (X, Y, Z) con respecto al objeto (2),

caracterizado por que

- 15 - el dispositivo (1) presenta una unidad de control y de procesamiento (12) y un módulo de paciente (10) conectado a la unidad de control y de procesamiento (12), que para examinar el objeto (2) puede colocarse con respecto al objeto (2), siendo la unidad óptica (103) parte del módulo de paciente (10),
- la unidad de láser (120) genera una radiación de excitación (A) con una primera longitud de onda y aguas arriba de la unidad óptica (103) está conectado en el módulo de paciente un doblador de frecuencia (1001) para reducir a la mitad la longitud de onda de la radiación de excitación (A),
- 20 - el módulo de paciente (10) presenta una sección de contacto (107) permeable para la radiación de excitación (A) y la señal óptica (S), que para examinar el objeto (2) ha de ponerse en contacto con el objeto (2), estando presentes medios que mueven la unidad óptica (103) en dirección horizontal (X, Y) con respecto a la sección de contacto (107) dentro del módulo de paciente (10) para generar imágenes en sección con longitud de canto dada,
- 25 - la unidad de láser (120) es parte de la unidad de control y de procesamiento (12), conectando una fibra óptica (122) la unidad de láser (120) con el módulo de paciente (10) para transmitir la radiación de excitación (A) hacia la unidad óptica (103), y
- 30 - la unidad óptica (103) puede moverse independientemente de la fibra óptica (122) para transmitir la radiación de excitación (A).

2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** durante un movimiento de la unidad óptica (103) para generar la señal óptica (S) no cambia la posición angular del eje óptico (O) de la radiación de excitación (A) que incide sobre el objeto (2).

3. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** la unidad óptica (103) puede moverse en dirección horizontal (X, Y) y/o en dirección vertical (Z) con respecto a una superficie del objeto (2) dirigida a la unidad óptica (103).

4. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la unidad óptica (103) presenta un objetivo (105) para enfocar la radiación de excitación (A) a un sitio en o sobre el objeto (2), pudiendo moverse el objetivo (105) en dirección vertical (Z) con respecto a la superficie del objeto (2).

5. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la unidad óptica (103), para generar píxel a píxel una imagen en sección vertical, puede desplazarse al menos por secciones de manera continua en dirección horizontal (X, Y) y/o en dirección vertical (Z) con respecto al objeto (2).

6. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la unidad de láser (120) presenta un láser de pulso ultracorto para generar pulsos de láser en el intervalo de femtosegundos.

7. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la unidad óptica (103) está diseñada para captar la señal óptica (S) y está conectada a través de una fibra óptica (110) con el módulo de detección (121) para transmitir la señal óptica recogida (S) al módulo de detección (121).

8. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la fibra óptica (110) para transmitir la señal óptica recogida (S) al módulo de detección (121) se diferencia de una fibra óptica (122) prevista para transmitir la radiación de excitación (A).

9. Procedimiento para la microscopía de fluorescencia multifotónica para la obtención de informaciones a partir de tejido biológico, en el que

- una unidad de láser (120) genera una radiación de excitación (A),
- una unidad óptica (103) enfoca la radiación de excitación (A) para generar una señal óptica (S) a diferentes sitios en o sobre un objeto que va a examinarse (2) y
- 65 - un módulo de detección (121) registra la señal óptica (S) desde la zona del objeto (2), moviéndose la unidad óptica (103) para generar la señal óptica (S) en o sobre el objeto al menos en una

dirección (X, Y, Z) con respecto al objeto (2),

caracterizado por que

- 5 - el dispositivo (1) presenta una unidad de control y de procesamiento (12) y un módulo de paciente (10) conectado a la unidad de control y de procesamiento (12), que para examinar el objeto (2) puede colocarse con respecto al objeto (2), siendo la unidad óptica (103) parte del módulo de paciente (10),
- 10 - la unidad de láser (120) genera una radiación de excitación (A) con una primera longitud de onda y aguas arriba de la unidad óptica (103) está conectado en el módulo de paciente un doblador de frecuencia (1001) para reducir a la mitad la longitud de onda de la radiación de excitación (A),
- 10 - el módulo de paciente (10) presenta una sección de contacto (107) permeable para la radiación de excitación (A) y la señal óptica (S), que para examinar el objeto (2) se pone en contacto con el objeto (2), moviéndose la unidad óptica (103) en dirección horizontal (X, Y) con respecto a la sección de contacto (107) dentro del módulo de paciente (10) para generar imágenes en sección con longitud de canto dada,
- 15 - la unidad de láser (120) es parte de la unidad de control y de procesamiento (12), conectando una fibra óptica (122) la unidad de láser (120) con el módulo de paciente (10) para transmitir la radiación de excitación (A) hacia la unidad óptica (103), y
- 20 - la unidad óptica (103) puede moverse independientemente de la fibra óptica (122) para transmitir la radiación de excitación (A).
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** a partir de las señales ópticas recibidas (S) en diferentes sitios del objeto (2) se genera píxel a píxel una imagen en sección del objeto (2).
- 25 11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado por que** para generar píxel a píxel la imagen en sección, el objeto (2) se expone de manera desencadenada a la radiación de excitación (A), estando el tamaño de píxel determinado
- 30 - en dirección horizontal (X, Y) por el enfoque de la radiación de excitación (A) y por el ajuste del desencadenamiento y
- en dirección vertical (Z) por la longitud de talle de la radiación de excitación (A) enfocada, pudiendo ajustarse el tamaño de píxel mediante un ensanche del haz de la radiación de excitación (A) y ajuste del desencadenamiento.

FIG 1

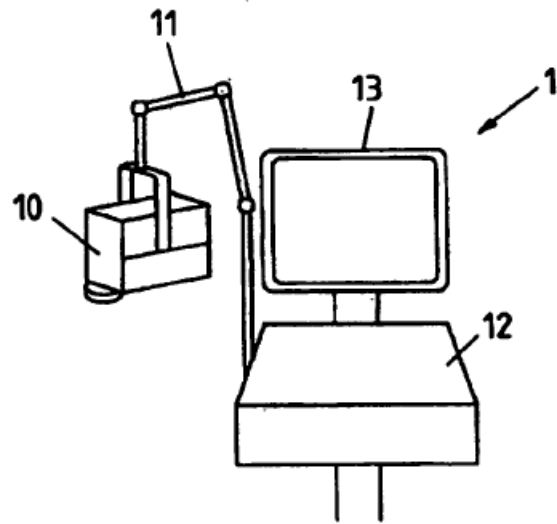
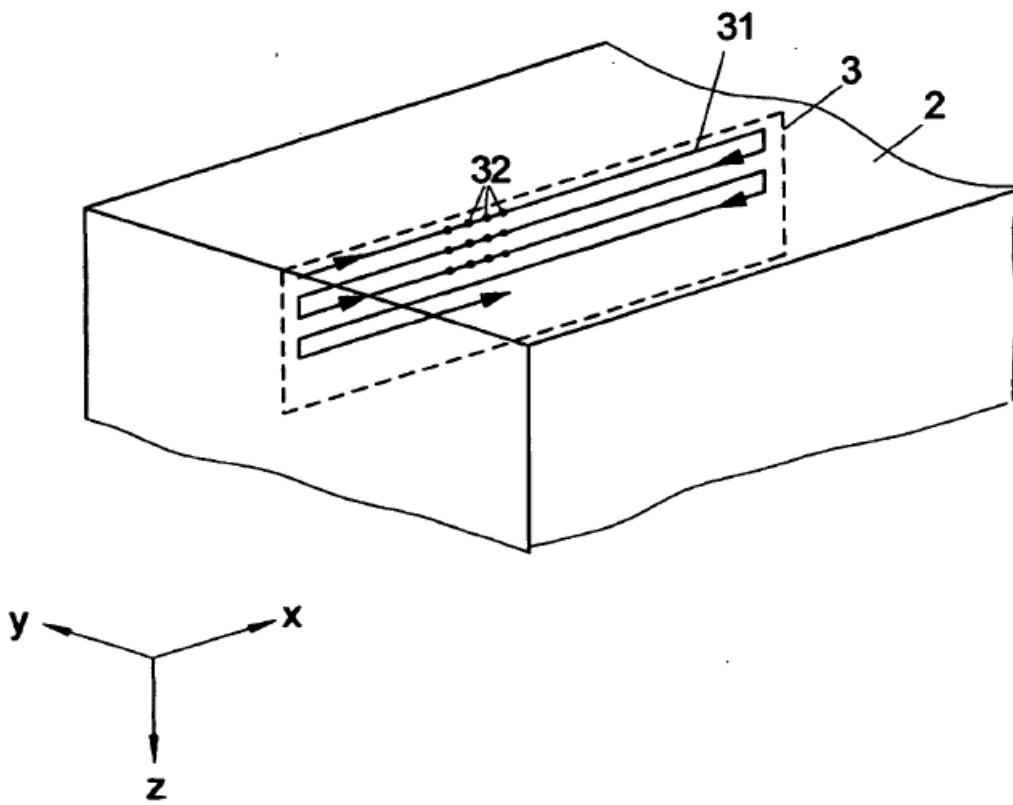
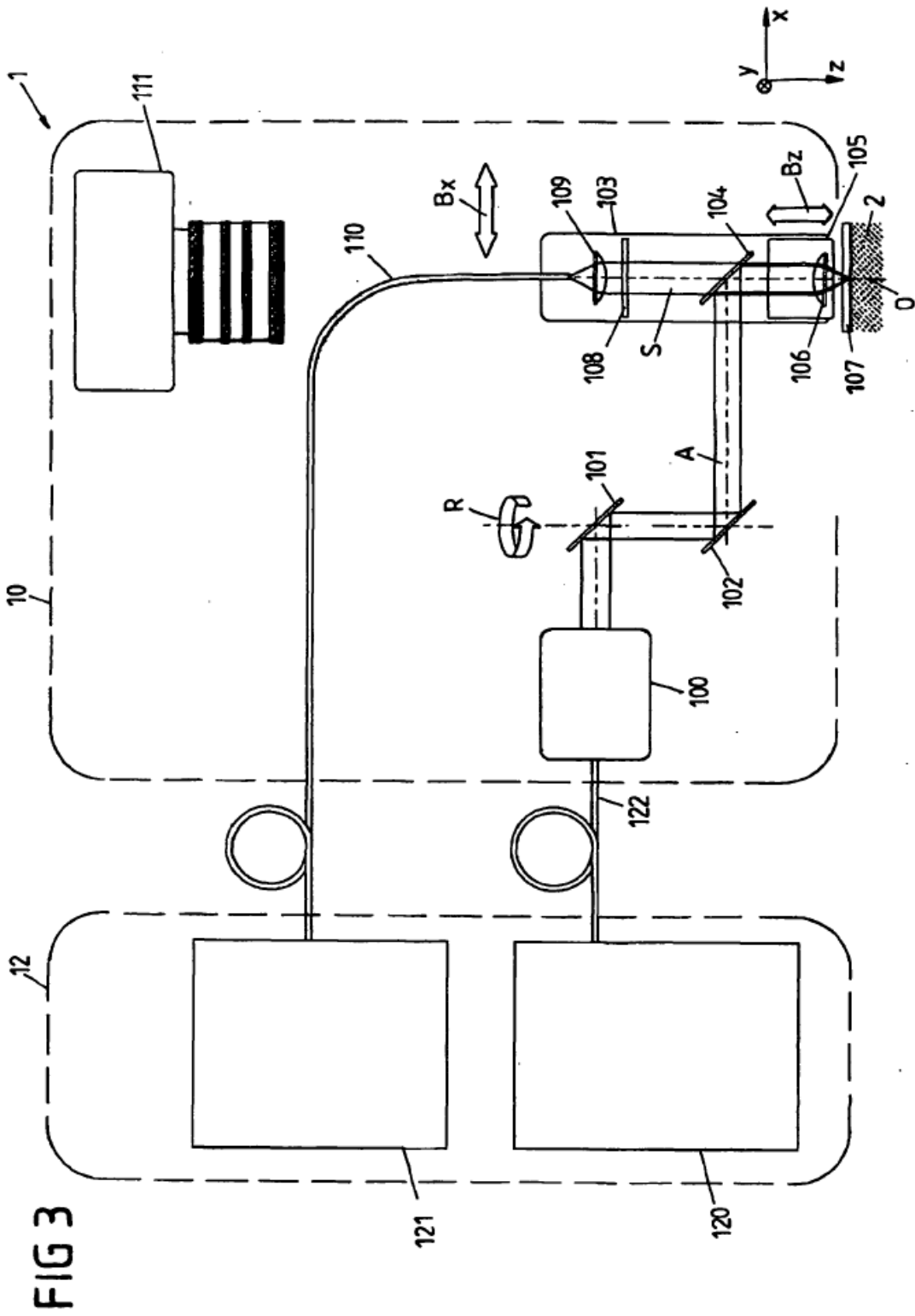


FIG 2





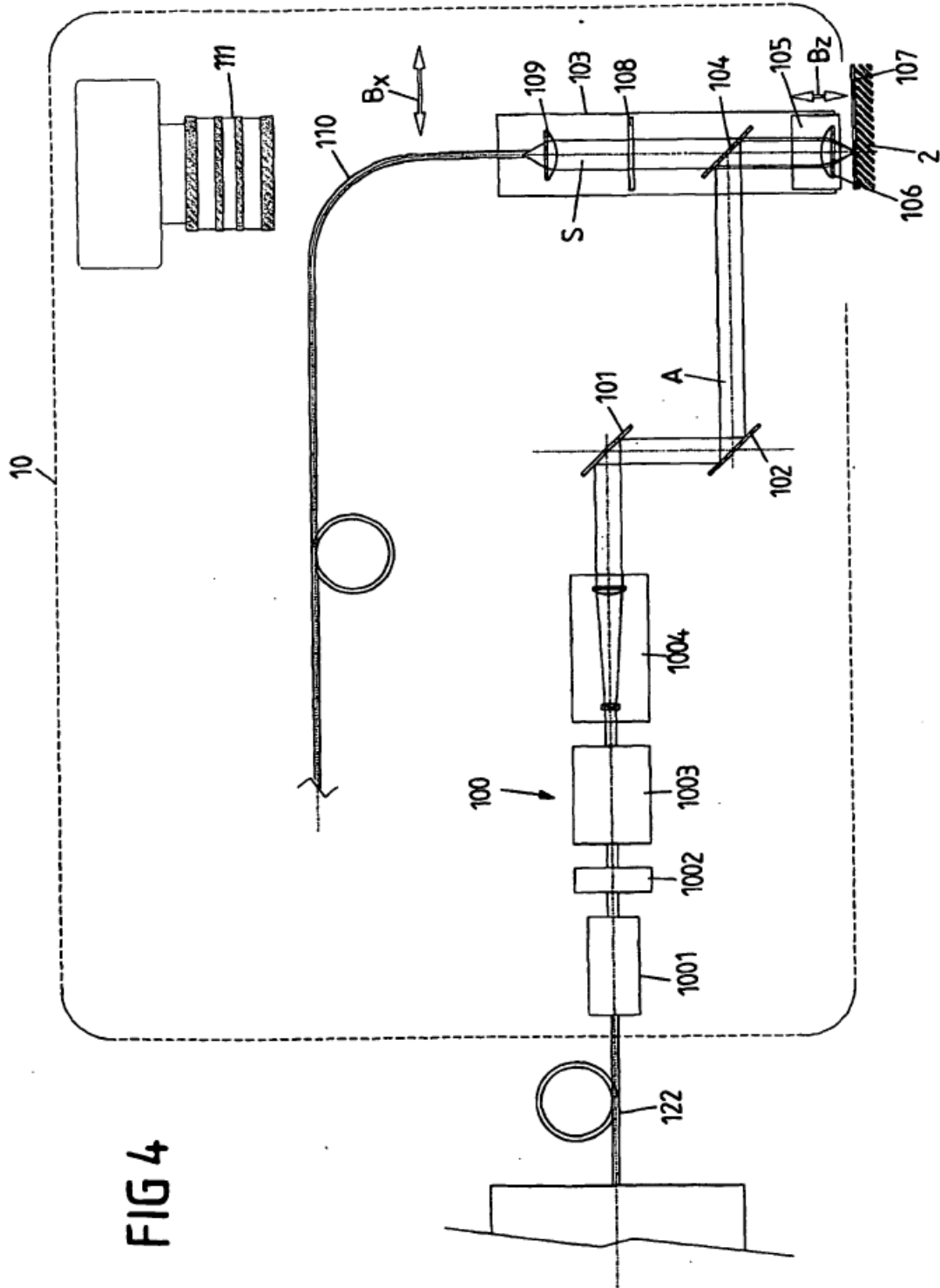
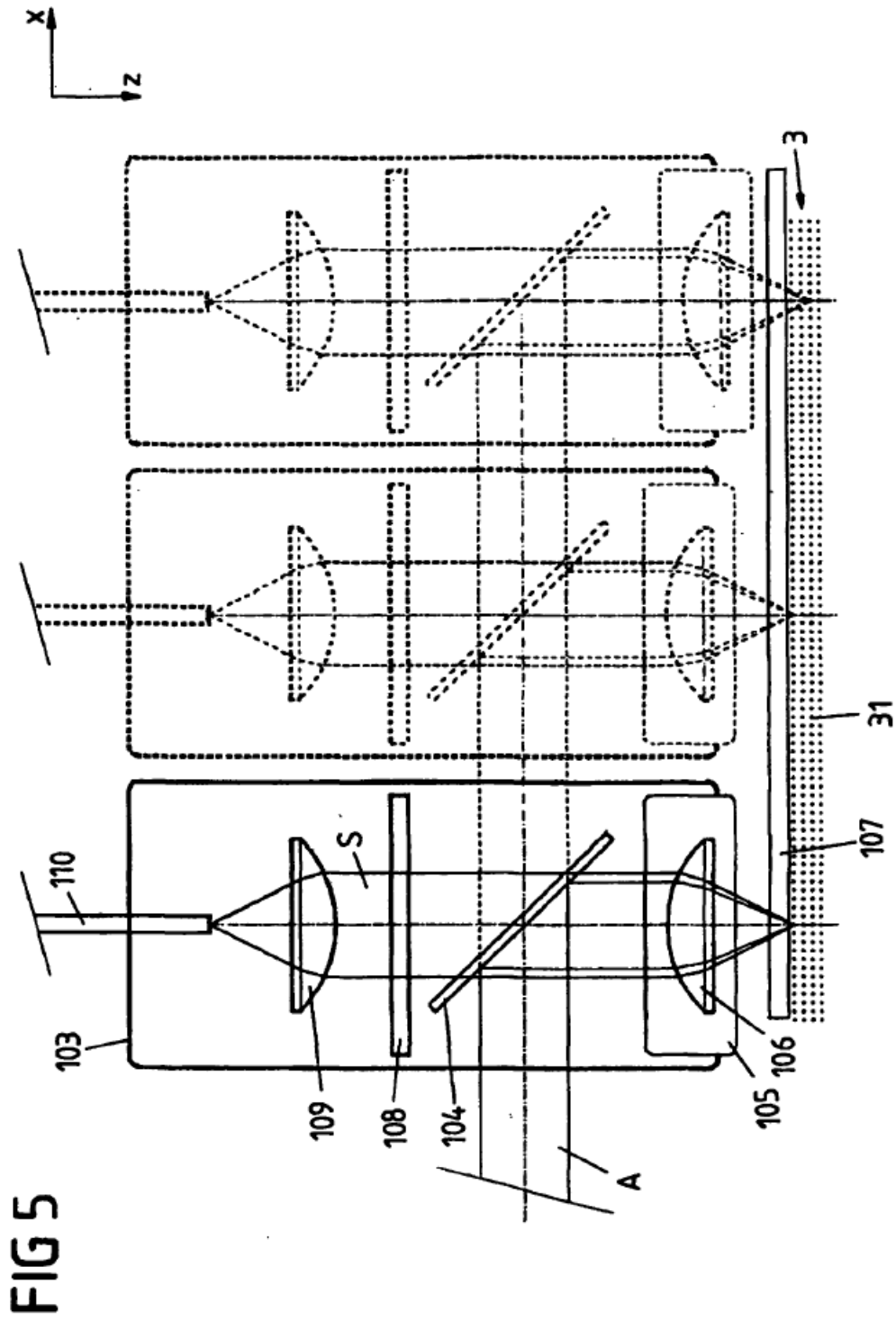


FIG 4



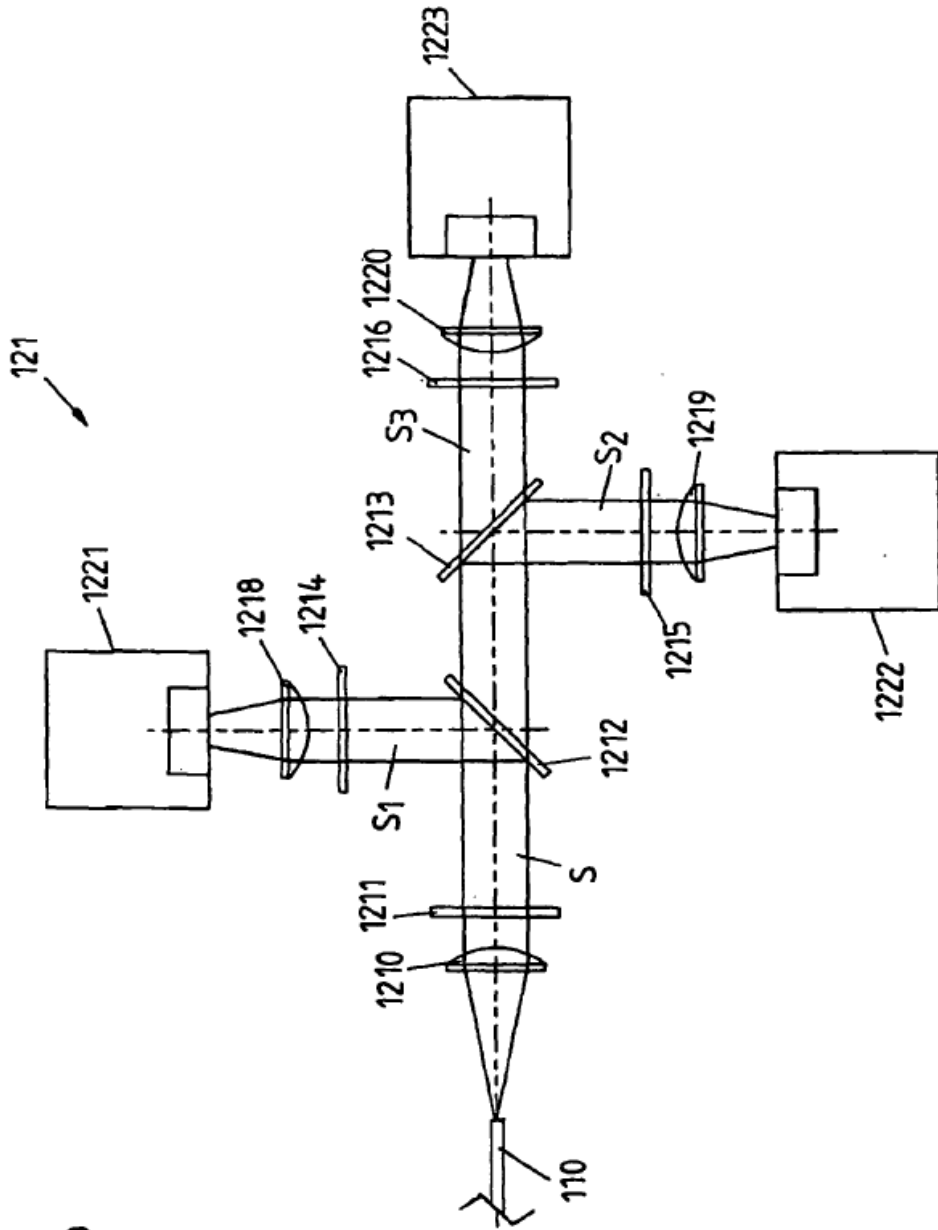


FIG 6

FIG 7

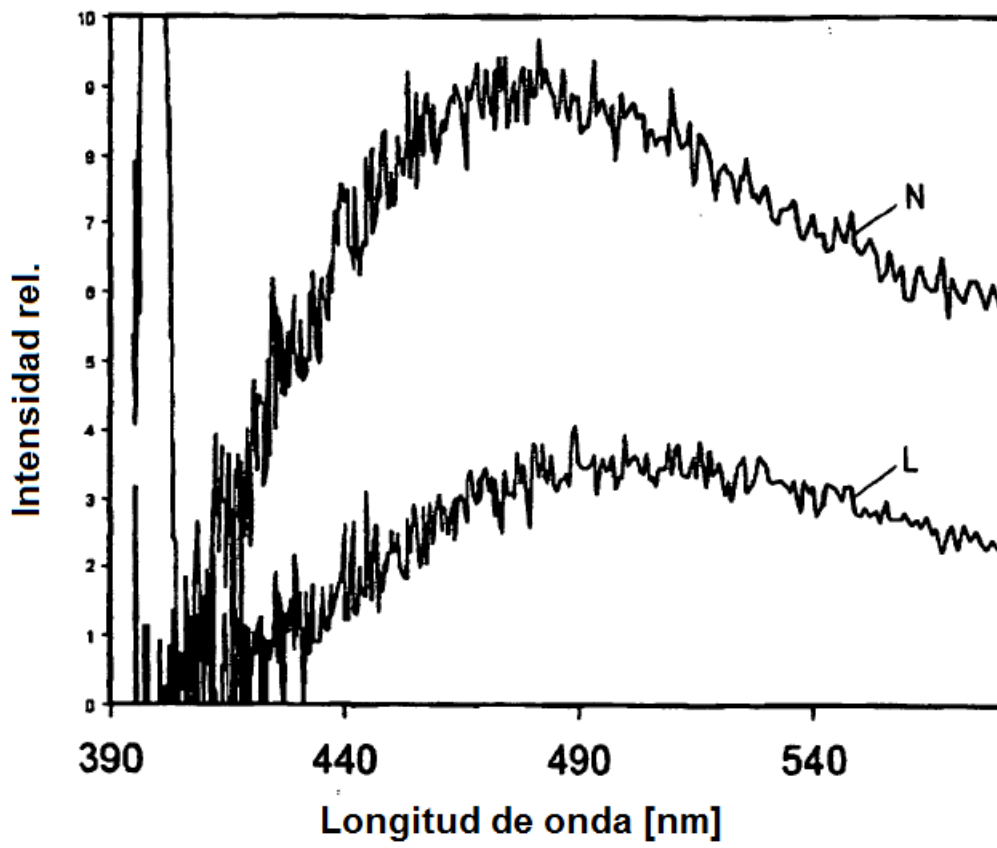


FIG 8

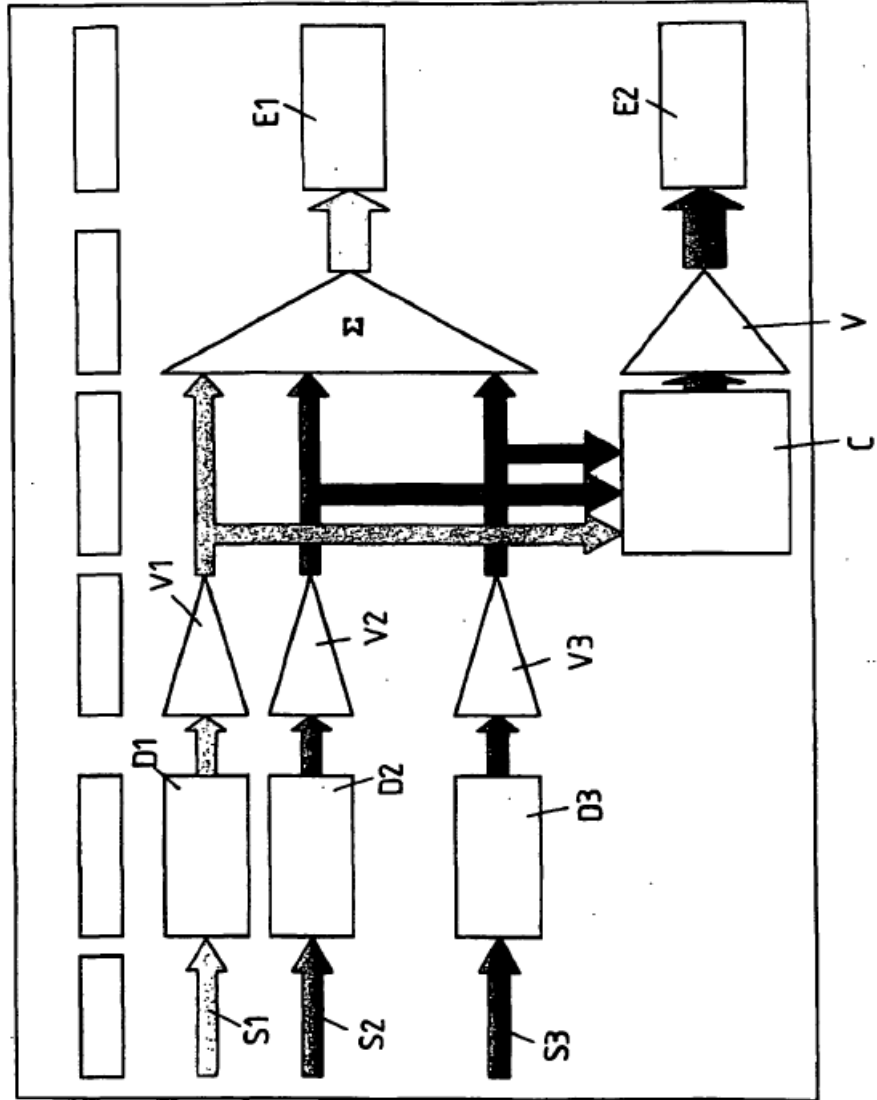


FIG 9

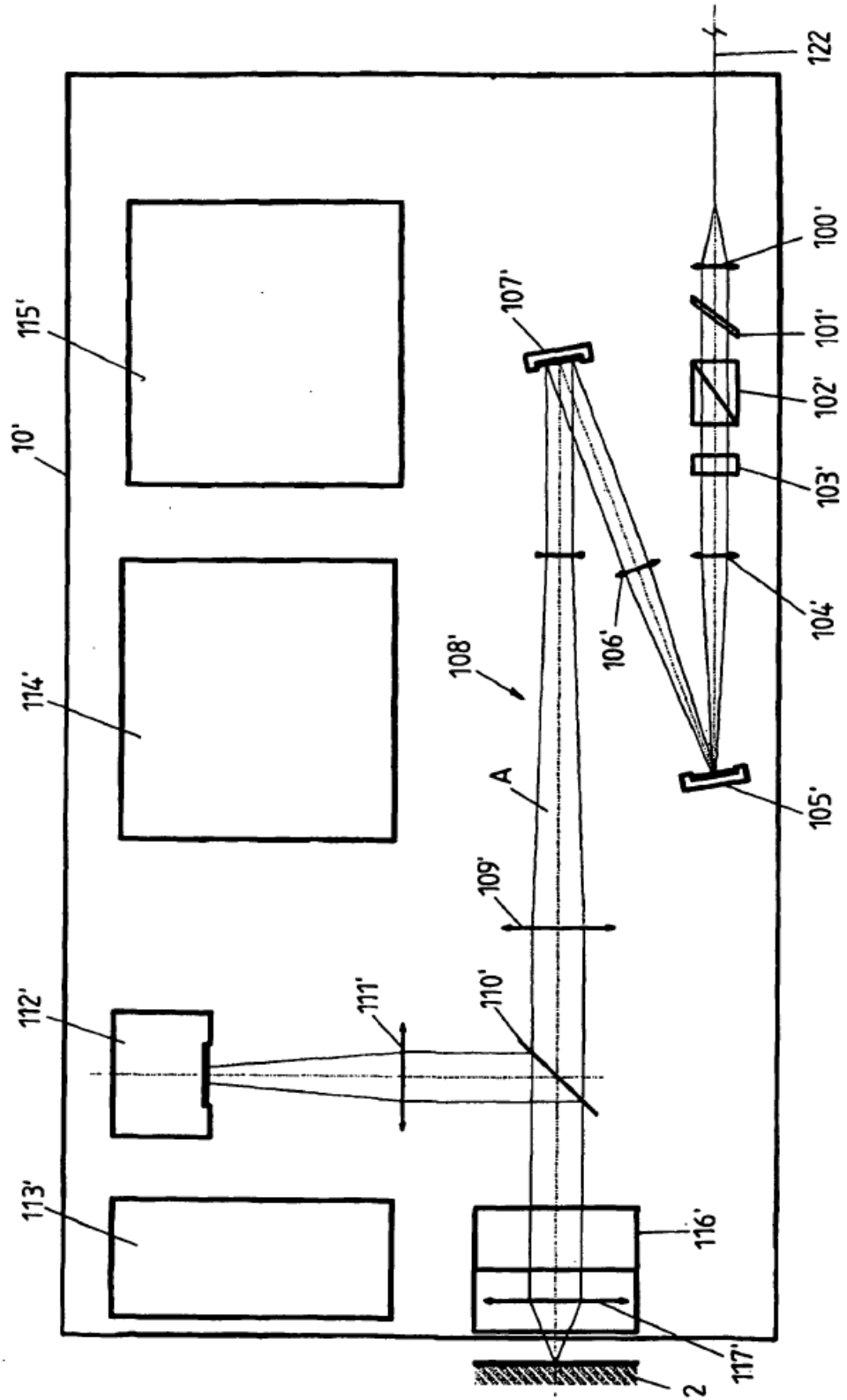


Fig. 10

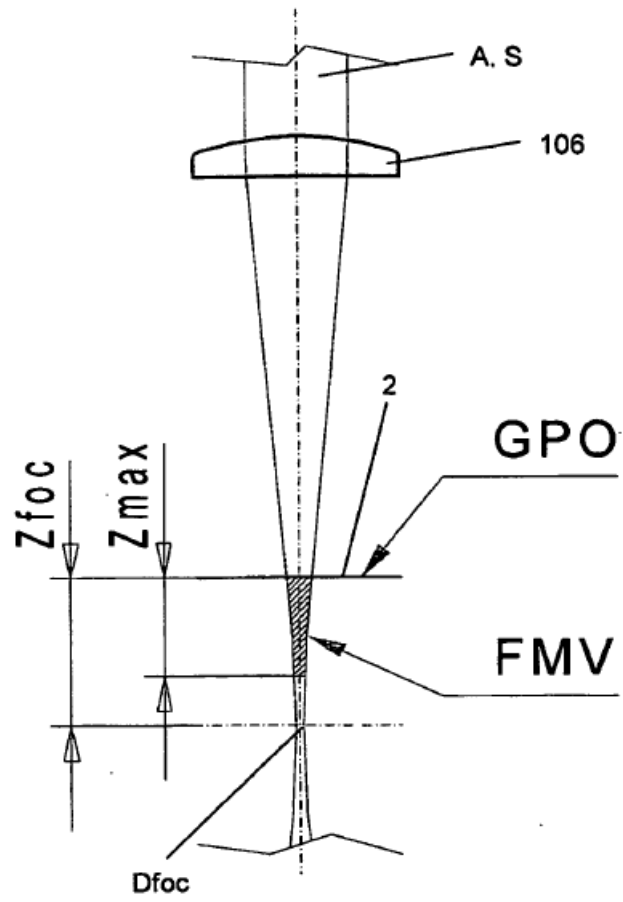


Fig. 11A

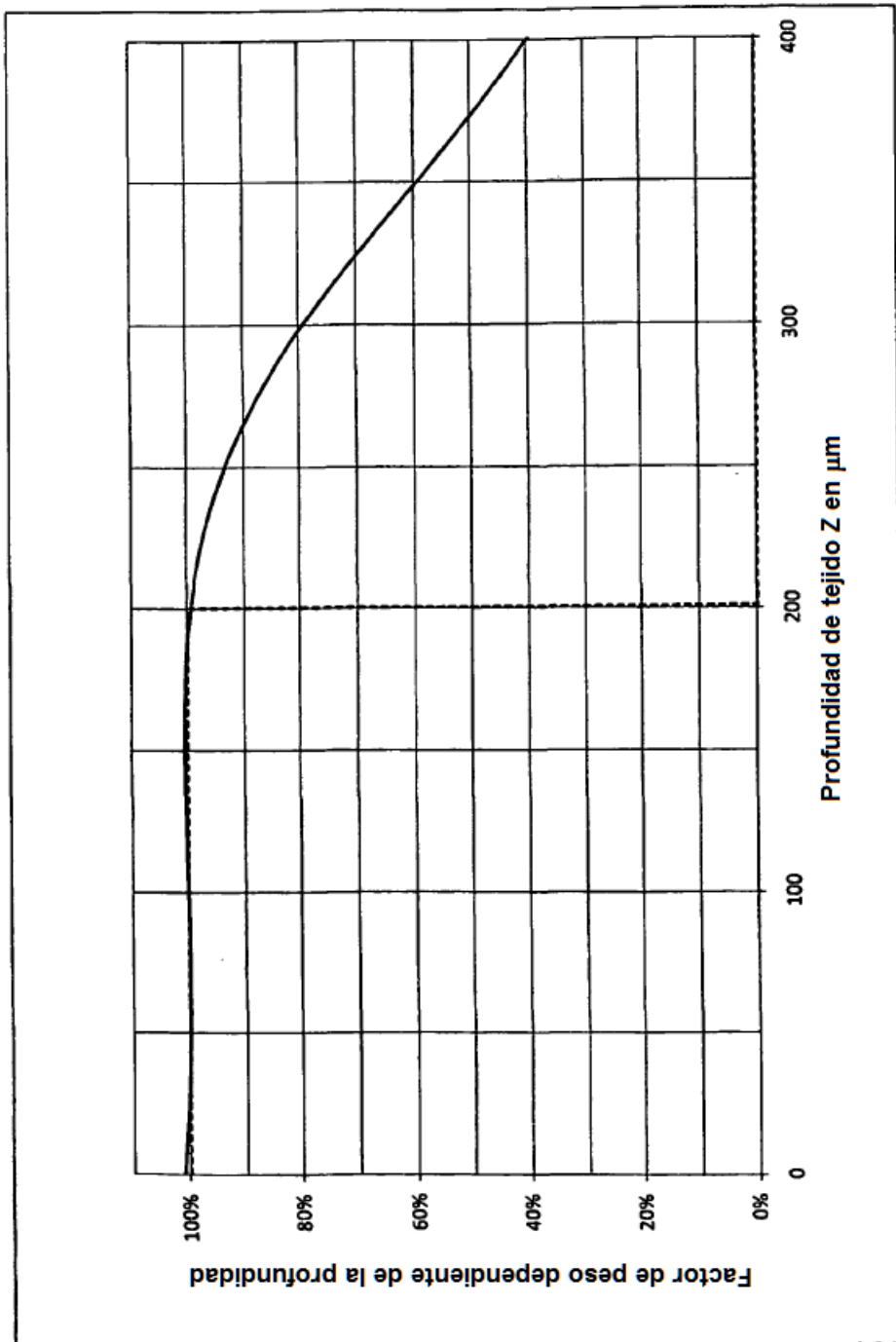


Fig. 11B

