

Molekulare Endospektroskopie: Neue instrumentell-analytische Methoden zur medizinischen Diagnostik

Kumulative Habilitationsschrift
für das Fachgebiet Analytische Chemie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Herrn Dr. rer. nat. Christoph Krafft
geboren am 8.12.1966 in Bremen

1. Gutachter: Prof. Dr. Reiner Salzer
Institut für Analytische Chemie
Technische Universität Dresden
2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Schackert
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden
3. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Popp
Institut für Physikalische Chemie
Universität Jena

Eingereicht am: 14. März 2007

Wissenschaftlicher Vortrag am: 20. November 2007

VERZEICHNIS DER WISSENSCHAFTLICHEN ORIGINALARBEITEN	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1 EINLEITUNG	1
2 METHODEN DER BIOPHOTONIK	2
2.1 Absorptionsspektroskopie	3
2.2 Fluoreszenzspektroskopie	3
2.3 Biolumineszenz	4
2.4 Reflexionsspektroskopie	5
2.5 Schwingungsspektroskopie	5
2.5.1 Raman-Spektroskopie	5
2.5.2 Infrarot-Spektroskopie	6
3 BIOMEDIZINISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE ANWENDUNGEN	7
3.1 FTIR- und Raman-Imaging in der Neuroonkologie	8
3.1.1 Primäre Hirntumoren [CK2, CK4, CK7, CK8, CK12]	8
3.1.2 Sekundäre Hirntumoren [CK9, CK11, CK14]	18
3.2 FTIR-mikroskopisches Imaging von Gewebedünnschnitten	25
3.2.1 Keimzentren in der Milz [CK3]	25
3.2.2 Gebärmutterhalskrebs [CK6]	27
3.3 FTIR- und Raman-mikroskopisches Imaging einzelner Zellen	29
3.3.1 Raman-Imaging von Lungenfibroblastzellen [CK1, CK5, CK10]	30
3.3.2 FTIR-Imaging von humanen Stammzellen [CK13]	34
4 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	36
LITERATURVERZEICHNIS	39
DANKSAGUNGEN	45
ERKLÄRUNGEN	46
LEBENS LAUF	47

Verzeichnis der wissenschaftlichen Originalarbeiten

In chronologischer Reihenfolge:

- CK1 C. Krafft, T. Knetschke, A. Siegner, R.H.W. Funk, R. Salzer. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* (2003) **32**, 75-83.
- CK2 C. Krafft, S.B. Sobottka, G. Schackert, R. Salzer. Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping. *The Analyst* (2004) **129**, 921-925.
- CK3 C. Krafft, R. Salzer, G. Soff, M. Meyer-Hermann. Identification of B- and T-cells in human spleen samples by infrared microspectroscopic imaging. *Cytometry A* (2005) **64A**, 53-61.
- CK4 C. Krafft, S.B. Sobottka, G. Schackert, R. Salzer. Near-infrared Raman spectroscopic mapping of native brain tissue and intracranial tumors. *The Analyst* (2005) **130**, 1070-1077.
- CK5 C. Krafft, T. Knetschke, R.H.W. Funk, R. Salzer. Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microspectroscopic mapping. *Vibrational Spectroscopy* (2005) **38**, 85-93.
- CK6 W. Steller, J. Einkenel, L.C. Horn, U.D. Braumann, H. Binder, R. Salzer, C. Krafft. Delimitation of a squamous cell carcinoma using infrared microspectroscopic imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006) **384**, 145-154.
- CK7 C. Krafft, S.B. Sobottka, G. Schackert, R. Salzer. Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: a comparative study. *Journal of Raman Spectroscopy* (2006) **37**, 367-375.
- CK8 C. Krafft, K. Thümmler, S.B. Sobottka, G. Schackert, R. Salzer. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopy and linear discriminant analysis. *Biopolymers – Biospectroscopy* (2006) **82**, 301-305.
- CK9 C. Krafft, L. Shapoval, S.B. Sobottka, G. Schackert, R. Salzer. Identification of primary tumors of brain metastases by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Technology in Cancer Research and Treatment* (2006) **5**, 291-298.
- CK10 C. Krafft, T. Knetschke, R.H.W. Funk, R. Salzer. Studies of stress induced changes on the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. *Analytical Chemistry* (2006) **78**, 4424-4429.
- CK11 C. Krafft, L. Shapoval, S.B. Sobottka, K.D. Geiger, G. Schackert, R. Salzer. Identification of primary tumors of brain metastases by SIMCA classification of IR spectroscopic images. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* (2006) **1758**, 883-891.
- CK12 C. Krafft, S.B. Sobottka, K.D. Geiger, G. Schackert, R. Salzer. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) **387**, 1669-1677.
- CK13 C. Krafft, R. Salzer, S. Seitz, C. Ern, M. Schieker. Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by infrared microspectroscopic imaging. *The Analyst* (2007) **132**, 647-653.
- CK14 C. Krafft, M. Kirsch, C. Beleites, G. Schackert, R. Salzer. Methodology for fiberoptic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) **389**, 1133-1142.

Abkürzungsverzeichnis

BK	Hirnmetastasen von Brustkrebs
BLI	Biolumineszenz Imaging
CCD	Charge Coupled Device
CaF ₂	Calciumfluorid
CE	Cholesterinester
CT	Computer Tomographie
DK	Hirnmetastasen von Darmkrebs
IR	Infrarot
FPA	Focal Plane Array
FTIR	Fourier Transform Infrarot
GBM	Glioblastoma multiforme
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IgD	Immunglobulin D
IOUS	Intraoperativer Ultraschall
LCTF	Liquid Crystal Tunable Filter (Flüssigkristall durchstimmbarer Filter)
LDA	Lineare Diskriminanz Analyse
LK	Hirnmetastasen von Lungenkrebs
MIR	Mittleres Infrarot
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MSC	Mesenchymal Stem Cells (Mesenchymale Stammzellen)
NIR	Nahinfrarot
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
NK	Hirnmetastasen von Nierenkrebs
OCT	Optical Coherence Tomography (Optische Kohärenz Tomographie)
PC	Phosphatidylcholin
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PET	Positronen Emissions Tomographie
QD	Quantum Dots
RGD	Arginin Glycin Asparaginsäure
SIMCA	Soft Independent Modeling of Class Analogies
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
UHR	Ultrahigh Resolution
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

Das Wort Endoskop ist abgeleitet von den griechischen Silben „endo“ für „innen“ und „scop“ für „betrachten“. Ein Endoskop ist ein Gerät, mit dem das Innere von lebenden Organismen durch Bildgebung untersucht wird. Ursprünglich für die humanmedizinische Diagnostik entwickelt, wird es heute auch für operative Eingriffe unter minimalinvasiven Bedingungen sowie in der Industrie zur Sichtprüfung schwer zugänglicher, technischer Hohlräume eingesetzt. Der Dresdner Urologe Maximilian Nitze demonstrierte 1879 ein von ihm erfundenes Zytoskop in der Öffentlichkeit, welches als erstes brauchbares Endoskop gilt und die heute bekannte Endoskopie begründete. Die Basiskomponenten bestehen aus einer Lichtquelle, einem Lichtleiter und einem Endoskop, das je nach Anwendung starr oder flexibel ausgeführt ist. Der bildgebende Kontrast beruht auf Beleuchtung mit einer Weißlichtquelle und Erfassung des gestreuten Lichtes mit einem optischen System. Um einen medizinischen Befund zu bestätigen, werden mikro-mechanische Instrumente in einem Arbeitskanal eingeführt und eine Gewebebiopsie wird entnommen, die nachfolgend mit weiteren Methoden analysiert wird wie der Lichtmikroskopie. Die Auswahl einer Biopsie auf Grundlage der visuellen Inspektion ist jedoch oft schwierig, um z.B. Krebsvorstufen oder kleine Krebsherde zu lokalisieren. In der Medizin möchte man diese Gewebeeränderungen so früh wie möglich erfassen, da in einem Frühstadium einer Tumorerkrankung die Heilungsaussichten am höchsten sind. Die Genauigkeit der Endoskopie kann erhöht werden, indem die Technik mit optisch-spektroskopischen Methoden gekoppelt wird. Eine spektroskopische Diagnose von Gewebe wird auch als optische Biopsie bezeichnet. Die Fähigkeit, optische Biopsien mittels Endoskopen durchzuführen, wird in vielen Bereichen der Medizin benötigt um z.B. mikrochirurgische Eingriffe zu führen, verdächtiges Gewebe empfindlicher zu identifizieren und Gewebebiopsien gezielter zu entnehmen. Damit würden unnötige Gewebeentnahmen sowie die mit einer Biopsie verbundene Risiken und Kosten reduziert werden. Darüber hinaus mögen diese Entwicklungen in Zukunft ermöglichen, die Effekte von Therapien unter Echtzeitbedingungen zu überwachen und die Informationen zu nutzen, um die Behandlung zu optimieren.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Projektes Molekulare Endospektroskopie an der Technischen Universität Dresden. Der Titel drückt aus, dass durch Kopplung von Endoskopie und Spektroskopie Gewebe auf molekularer Ebene charakterisiert wird. Infrarot- (IR-) und Raman-Spektroskopie bieten dabei besondere Vorteile, da sie zu den molekülspektroskopischen Verfahren mit dem höchsten Informationsgehalt gehören. Beide Methoden beruhen auf Molekülschwingungen, deren Spektren einen chemischen Fingerabdruck über die Zusammensetzung und Struktur der Proben liefern. Der Autor leitete eine wissenschaftliche Nachwuchsgruppe, die die Grundlagen der schwingungsspektroskopischen Methoden zur Bildgebung von Gewebe und Zellen entwickelte und auf klinische Probleme – vor allem aus dem neuroonkologischen Bereich – anwendete. Diese kumulative Habilitationsschrift fasst vierzehn Veröffentlichungen zusammen, wobei in der letzten die Untersuchung eines Hirntumormodells von Mäusen mit einer faseroptischen Sonde beschrieben wurde. Zunächst werden verschiedene Methoden der Biophotonik verglichen, um die hier eingesetzten Techniken in diesen Kontext zu stellen. Danach werden biomedizinische Anwendungen von Fourier-Transform-Infrarot- (FTIR-) und Raman-Imaging beschrieben. Die eigenen Beiträge sind untergliedert in FTIR- und Raman-Imaging in der Neuroonkologie, FTIR-mikroskopisches Imaging von Gewebedünnschnitten und FTIR- und Raman-mikroskopisches Imaging von einzelnen Zellen. Abschließend wird in den Schlussfolgerungen und dem Ausblick diskutiert, welche Rolle die molekulare Endospektroskopie als neue instrumentell-analytische Methode in der medizinischen Diagnostik übernehmen kann.

2 Methoden der Biophotonik

Das Wort Biophotonik ist zusammengesetzt aus den griechischen Silben „bios“ für „Leben“ und „phos“ für „Licht“. Der Begriff bezeichnet die wissenschaftliche Disziplin, die lichtbasierte Techniken auf Probleme in Medizin und Lebenswissenschaften anwendet. Methoden der Biophotonik können Informationen bezüglich natürlicher optischer Eigenschaften von Zellen und Gewebe sowie der Anwesenheit bzw. Abwesenheit endogener oder exogener Fluorophore liefern. Der optische Nachweis bietet Vorteile hinsichtlich

- (i) räumlicher Auflösung, die im Submikrometerbereich liegt, wobei das Abbe'sche Beugungslimit durch die STED (Stimulated Emission Depletion) Mikroskopie sogar überwunden werden kann [Hell 2004, Westphal 2005];
- (ii) Nichtdestruktivität, da Photonen mit Wellenlängen vom sichtbaren bis in den IR-Bereich biologische Zellen und Gewebe nicht schädigen;
- (iii) Schnelligkeit, da die Datenaufnahme in der Regel nur wenige Sekunden dauert;
- (iv) Kosten, da die instrumentellen Systeme im Vergleich zu medizintechnischen Großgeräten günstig sind.

Diese Vorteile werden in verschiedenen Bereichen der Lebenswissenschaften eingesetzt. Aus der Fülle der Methoden und Anwendungen konzentriert sich dieser Abschnitt wie ein Buchbeitrag [Krafft 2008] auf neuroonkologische Studien, die bildgebende – sog. Imaging – Techniken auf Grundlage von Absorptionsspektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie, Reflexionsspektroskopie und Biolumineszenz einsetzen. IR- und Raman-Spektroskopie als wichtigste Vertreter der Schwingungsspektroskopie bieten einen weiteren Vorteil durch ihre Fähigkeit, detaillierte molekulare Information ohne den Einsatz von zusätzlichen Markierungen zu liefern. Ein genereller Nachteil aller optischen Methoden ist ihre geringe Eindringtiefe, die von Absorptions- und Streueigenschaften des Gewebes abhängt. Hohe Absorption existiert im sichtbaren Bereich (350-700 nm) hauptsächlich aufgrund von Hämoglobin des Blutes und im IR-Bereich (>900 nm) hauptsächlich aufgrund von Wasser und Lipiden. Im Nahinfrarot- (NIR-) Bereich verfügen alle Biomoleküle über minimale Absorption, so dass Verfahren unter Verwendung von NIR-Strahlung von maximaler Eindringtiefe profitieren. Darüber hinaus ist die sog. Autofluoreszenz minimal, die von einer Anregungsstrahlung im NIR-Bereich in endogenen Fluorophoren angeregt wird. Die maximale Eindringtiefe von ca. 1 bis 2 cm ist jedoch immer noch zu gering, um mittels optischer Verfahren nichtinvasiv Hirntumoren zu lokalisieren. Insbesondere der knöcherne Schädel stellt ein großes Hindernis dar. In Kleintiermodellen werden deshalb Hirntumoren unter die Haut implantiert, da in diesem Fall die erforderliche Weglänge der Photonen für optischbasierte Verfahren bedeutend geringer ist. Mit Ausnahme dieses Spezialfalls erfordern klinische Anwendungen den Einsatz von Mikroskopen oder handlichen Sonden am offenen Operationsfeld oder miniaturisierte faseroptische Sonden für minimalinvasive Endoskopie. Die optischen Verfahren können also die nichtinvasiven bildgebenden Verfahren Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), die auf hochfrequenten Magnetfeldern beruht, Computertomographie (CT), die auf Röntgenstrahlen beruht, sowie Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die auf Radionukliden beruht, in den folgenden zwei Anwendungsfeldern ergänzen. Zum einen liefern sie zusätzliche Diagnosen in intraoperativen Situationen, wenn tomographische Methoden nicht eingesetzt werden können. Zum anderen ermöglichen sie nichtinvasives Imaging von Erkrankungen und Monitoring von Therapieeffekten in Kleintiermodellen. Das in diesem Bereich häufig eingesetzte PET auf Grundlage von Radionukliden ist kostenintensiver, leidet unter geringerer räumlicher und zeitlicher Auflösung, erfordert ein Zyklotron, um die kurzlebigen Radionuklide zu erzeugen, und benötigt ein Syntheselabor, um die radioaktiven Präparate zu produzieren.

2.1 Absorptionsspektroskopie

Lichtabsorption kann elektronische Übergänge in Molekülen anregen, die gemäß dem Gesetz von Lambert-Beer chemische Informationen über Chromophore und über ihre Konzentration liefern. Medizinische Anwendungen existieren für die Echtzeitbestimmung des Blutvolumens, des Gesamthämoglobingehalts und des Oxidationszustandes, das auf dem Absorptionsprofil von oxygenierten Hämoglobin im spektralen Bereich von 880-920 nm und von deoxygenierten Hämoglobin im Bereich 740-780 nm beruht [Madsen 1999]. Die Empfindlichkeit der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) für Hämoglobin wurde u.a. in den Neurowissenschaften eingesetzt, um die Stimulation von Hirnfunktionen durch Änderung der Hämoglobinkonzentrationen darzustellen. Mittels nichtinvasiver NIRS wurde die postoperative Wiederherstellung von Hirnfunktionen in 12 Hirntumor-Patienten kontrolliert [Fujiwara 2004]. Intraoperative NIRS wurde in 13 Hirntumor-Patienten eingesetzt, um die Beziehung zwischen Blutvolumen, Sauerstoffgehalt in Tumoren und deren Histologie und Patientenprognose zu untersuchen [Asgari 2003]. Die Limitationen der NIRS-Technologie beinhalten, dass nur oberflächenlokalisierte Tumoren nicht-invasiven Messungen zugänglich sind und das Blutvolumen des gesamten Tumors gewöhnlich nicht bestimmt werden kann, da intraoperative Messungen nur bis zu einer Tiefe von ca. 4 mm eindringen.

2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Nach Absorption von Strahlung können angeregte elektronische Zustände von Molekülen in ihren Grundzustand unter Emission von Photonen zurückkehren. Fluoreszenzspektroskopie kann unterteilt werden in Autofluoreszenz, die Informationen von endogenen Fluorophoren enthält, und in induzierte Fluoreszenz, die zugefügte exogene Fluorophore untersucht. Fluoreszenzbasierte Techniken sind zurzeit die dominierenden biophotonischen Methoden in der Neuroonkologie.

Vorteile von Autofluoreszenz sind, dass keine kontrastverstärkenden Marker oder histologischen Farbstoffe notwendig sind. Autofluoreszenz bei 337 nm Anregung kann Tumoren von normalem Hirngewebe aufgrund ihrer reduzierten Fluoreszenzemission bei 460 nm unterscheiden. Die Selektivität stellt ein allgemeines Problem dieses Ansatzes dar, da nicht alle Bereiche mit reduzierter Fluoreszenz Tumoren sind [Goujon 2003]. Um die Falsch-Positiv-Zuordnungen bei der Detektion von Hirntumoren zu verringern, wurde in klinischen Studien mit faseroptischen Sonden die Autofluoreszenz mit der diffusen Reflexionsspektroskopie kombiniert [Toms 2005].

Multiphotonen angeregte Autofluoreszenz nutzt NIR-Femtosekunden Laserpulse, um dreidimensionale mikroanatomische Images von nativem Gewebe auf subzellulärer Ebene zu rekonstruieren. Multiphotonen Autofluoreszenzmikroskopie konnte den Tumor, den Übergang zu normalem Gewebe und einzelne invasive Tumorzellen in Hirntumoren visualisieren [Leppert 2006]. Die Autoren bestimmten darüber hinaus die Fluoreszenzlebenszeit von natürlichen Fluorophoren als zusätzlichen Parameter in der sog. vierdimensionalen Mikroskopie. Der unterschiedliche Abfall des Fluoreszenzsignals konnte zwischen Tumor und normalem Hirngewebe differenzieren.

Um die Selektivität zur Bestimmung von Hirntumoren zu erhöhen, wurden eine Reihe von Fluoreszenzmarkern vorgeschlagen, wie Indocyanin-Grün [Haglung 1996], Fluorescein [Kabuto 1997], Fluorescein-Albumin [Kremer 2000] und Porphyrine, die nach Zugabe des metabolischen Vorläufers 5-Aminolävulin-Säure in malignen Hirntumoren akkumulieren [Stummer 1998]. Diese Fluorophore werden nicht von normalem Hirngewebe, sondern nur von Hirntumoren aufgenommen, bei denen die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr intakt ist. Die Technik kann ohne großen Aufwand in Operationsmikroskopen integriert werden und die registrierten Fluoreszenz-Images gestatten, die Hirntumoren intraoperativ zu detektieren und sicherer zu entfernen. Eine klinische Studie der Phase III in mehreren Kliniken ergab, dass dieser Ansatz zu einer verlängerten rezidivfreien Überlebenszeit bei

Patienten mit malignen Hirntumoren führt [Stummer 2006]. Probleme dieses Ansatzes liegen in der Identifikation von niedrigmalignen Tumoren und von Tumorgrenzen, in denen die Blut-Hirn-Schranke intakt ist und der Fluorophor nicht von Tumorzellen aufgenommen wird. Die Effektivität der induzierten Fluoreszenz wird außerdem durch Ausbleichen des Fluorophors reduziert. Diese Probleme verringern die Fähigkeit der induzierten Fluoreszenz zur Untersuchung von Hirntumoren.

Ein Sonderfall der induzierten Fluoreszenz ist die Fluoreszenzemission im NIR-Bereich. Häufig wird der Farbstoff Cy5.5 eingesetzt, der ein Absorptionsmaximum bei 675 nm und ein Emissionsmaximum bei 694 nm besitzt. Subnanomolare Konzentrationen des Farbstoffs können in Gewebe bei Eindringtiefen nachgewiesen werden, die optische Imaging-Studien in Kleintieren erlauben. Die menschliche Glioblastom-Zelllinie U87MG, die als Modell für einen hochmalignen Hirntumor eingesetzt wird, exprimiert $\alpha_v\beta_3$ Integrin, das eine wichtige Rolle bei der Regulation von Tumorwachstum, Metastasierung und Tumorangiogenese spielt. Die spezifische Wechselwirkung des zyklischen Peptides Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) mit $\alpha_v\beta_3$ Integrin wurde mit dem NIR-Fluoreszenznachweis von Cy5.5 kombiniert, um die Integrin-Expression und die Wirksamkeit einer Anti-Integrin Behandlung in Tiermodellen darzustellen [Chen 2004, Cheng 2005]. Auf Grundlage von Cy5.5 wurde ebenfalls ein NIR-Fluoreszenzanalogen für Deoxyglucose entwickelt, um Hirntumoren mittels optischem Imaging zu studieren [Cheng 2006]. Die verwandte Verbindung 2-Deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose ist ein weit verbreiteter Tracer für Krebsuntersuchungen mittels PET.

Quantum Dots (QDs) als fluoreszierende Markierungen stellen eine neue Generation von Fluorophoren dar. QDs haben einzigartige optische und elektronische Eigenschaften wie eine Fluoreszenzemission, die abhängig von deren Zusammensetzung und Größe vom sichtbaren bis in den NIR-Bereich reicht, einen großen Absorptionskoeffizienten über einen weiten spektralen Bereich und hohe Photostabilität [Gao 2005]. QDs wurden mit dem Peptid RGD gekoppelt, um Hirntumoren in lebenden Mäusen darzustellen, die durch die Zelllinie U87MG induziert wurden [Cai 2006]. Intravenös injizierte QDs wurden in Hirntumoren von Ratten mittels Fluoreszenz-Imaging nachgewiesen [Toms 2006].

Besonders interessant für klinische Anwendungen ist die Entwicklung von multifunktionellen Nanopartikeln, die sowohl durch MRT als auch durch Fluoreszenz-Imaging detektiert werden können. Sie würden ermöglichen, einen Tumor nichtinvasiv und präoperativ mittels MRT zu bestimmen und die Tumorgrenzen intraoperativ mittels optischem Imaging darzustellen [Kircher 2003, Trehin 2006]. Einer der großen Herausforderungen für die Entwicklung von Markierungen für Hirntumoren ist die Blut-Hirn-Schranke, die die Zugänglichkeit von vielen Substanzen zum Hirngewebe einschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass die Blut-Hirn-Schranke von Partikeln mit einer Größe kleiner als 50 nm oder mittels Polyethylenglycol vermittelten Prozessen überwunden werden kann. Mit Polyethylenglycol gekoppelte Nanopartikel scheinen deshalb besonders vielversprechend, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [Veiseh 2005].

2.3 Biolumineszenz

Biolumineszenz-Imaging (BLI) wurde als empfindliche *in vivo* Imaging-Technik für Kleintiere entwickelt. BLI beruht auf der Emission von Photonen aus einer maximalen Tiefe von 2-3 cm, die von Luciferase katalysierten Reaktionen erzeugt werden. Bei Luciferase handelt es sich um eine Familie von Photoproteinen, die Photonen aus der Umsetzung von Substraten wie Luciferin in Oxyluciferin emittieren. Das Licht aus diesen Reaktionen besitzt ein sehr breites Spektrum, wobei die Komponenten oberhalb von 700 nm wegen der hohen Transmission in Gewebe mittels optischem Imaging am besten nachgewiesen werden können [Review: Shah 2005]. Im Zusammenhang mit der Neuroonkologie wurde BLI in einem gentechnisch erzeugten Tiermodell eingesetzt, um die Tumorentstehung zu verfolgen und die Tumorzellanzahl zu messen [Uhrbom 2004]. Genterapie von Krebs basiert auf dem Transfer und nachfolgender Expression eines

therapeutischen Transgens in Tumorzellen, um eine therapeutische Selektivität zu erreichen. BLI wurde eingesetzt, um die Genexpression des Transgens Cytosin Deaminase aus Hefe (γ CD, yeast cytosine deaminase) in Hirntumoren zu bestimmen [Rehemtulla 2002]. TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ist ein Ligand, der Apoptose – den Prozess des programmierten Zelltods – in neoplastischen Zellen induziert. Der durch Viren vermittelte Transfer und die Effektivität von TRAIL-Varianten bei der Behandlung von Hirntumoren wurden ebenfalls mittels BLI untersucht [Shah 2003].

2.4 Reflexionsspektroskopie

In der Reflexionsspektroskopie wird Gewebe normalerweise mit einer breitbandigen Lichtquelle beleuchtet. Das Licht wird nach direkter Reflexion oder mehrfacher elastischer Streuung detektiert. Diese Prinzipien werden in Ansätzen genutzt, die als optische Tomographie bezeichnet und weiter untergliedert werden in optische Diffraktions-Tomographie, diffuse optische Tomographie und optische Kohärenz-Tomographie (OCT). OCT ist das Analogon zum Ultraschall-Imaging mit der Ausnahme, dass Reflexionen von NIR-Strahlung anstelle von Schallwellen registriert werden. OCT setzt Querschnittsabbildungen aus einer Serie von lateral benachbarten Tiefenprofilen zusammen, wobei Strahlung mit einer geringen Kohärenzinterferenz eingesetzt wird. OCT ermöglicht Imaging von Hirngewebe bis zu einer Tiefe von 2 mm mit einer räumlichen Auflösung von 10-15 μm und im Ultrahigh Resolution (UHR) Modus sogar darunter (0.9 μm axial, 2 μm lateral). OCT grenzte in Hirntumorproben normales Gewebe, die Infiltrationszone und den Tumor auf Grundlage der Gewebemikrostruktur und Signaleigenschaften ein [Böhringer 2006]. UHR-OCT diskriminierte zwischen normalen und pathologischen Hirngewebebiopsien, indem Mikrocalcifizierungen, vergrößerte Zellkerne, kleine Zysten und Blutgefäße visualisiert wurden [Bizheva 2005]. Kontaktloses Imaging von Hirngewebe mittels OCT während neurochirurgischen Eingriffen ist schwierig, weil nach Öffnung der Hirnhaut das Zielvolumen den Zyklen der Atmung und des Herzschlages folgt. Dies resultiert in Bewegungen mit einer Amplitude von mehreren Millimetern. Langsame Scan-Zeiten führen deshalb dazu, dass sich die zu messende Oberfläche aus dem Messfenster bewegt. Schnelle Scan-Zeiten von drei OCT-Images pro Sekunde sind wichtig, um diese Bewegungsartefakte zu unterdrücken. Reflexionsspektroskopie hat ihre Stärken bei der Darstellung der Gewebemorphologie. Jedoch sind für viele Krankheiten, einschließlich Krebs, Diagnosen auf Grundlage dieser morphologischen Merkmale nicht zuverlässig genug, da die wichtigsten diagnostischen Indikatoren molekulare Änderungen sind wie erhöhte Wachstumsrate, lokale Invasion, fehlende Differenzierung, Anaplasie und Metastasen. Spektroskopisches OCT wird deshalb entwickelt, um zusätzliche chemische Informationen zu liefern [Li 2000].

2.5 Schwingungsspektroskopie

Im Allgemeinen werden mehr Banden in Schwingungsspektren aufgelöst als in anderen optischen Spektren, da zahlreiche Schwingungen von Biomolekülen gleichzeitig angeregt und ohne externe Marker detektiert werden. Deshalb enthalten die Spektren mehr Informationen über die Biochemie und Zusammensetzung der zu untersuchenden Proben. Im Prinzip führen Krankheiten und andere pathologische Anomalien zu chemischen und strukturellen Änderungen im Gewebe auf molekularer Ebene. Diese Änderungen ändern auch die Schwingungsspektren und können als empfindliche phänotypische Marker der Krankheit genutzt werden. Da diese spektralen Varianzen sehr spezifisch sind, werden die Spektren auch als Fingerabdruck bezeichnet.

2.5.1 Raman-Spektroskopie

Molekülschwingungen können durch inelastische Streuung von Licht angeregt werden. Dieses ist das zugrunde liegende Prinzip der Raman-Spektroskopie. Biomedizinische Anwendungen wurden in der Vergangenheit erschwert, da die Raman-Signale von

Biomolekülen relativ intensitätsschwach sind, die spektralen Beiträge aller Moleküle überlappen und die Autofluoreszenz von Gewebe die Raman-Signale oft überdeckt. Um die Anregung von Autofluoreszenz zu minimieren und gleichzeitig die Eindringtiefe für die anregende und gestreute Strahlung zu maximieren, wird die Raman-Spektroskopie von Gewebe mit NIR-Lasern durchgeführt. Weitere Anforderungen für die Raman-Spektroskopie von Gewebe beinhalten optische Systeme mit geringen Lichtverlusten und empfindlichkeitsoptimierte Detektoren, die in den letzten zehn Jahren entwickelt wurden. Ein Trendartikel fasste diese Punkte zusammen [Krafft 2004]. Darüber hinaus sind zur Datenaufnahme mit hoher lateraler Auflösung die Kopplung mit Mikroskopen, zur minimalinvasiven Anwendung miniaturisierte faseroptische Sonden sowie zur Auswertung der Spektren multivariate Algorithmen erforderlich. Letztgenannte Punkte waren Gegenstand der hier vorgestellten Forschungsaktivitäten.

Die Raman-Spektren in den zusammengefassten Originalarbeiten wurden mit einem NIR-Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 785 nm und mit Intensitäten von 20-100 mW angeregt. Der Laser wurde mit dem Raman-Mikroskop HoloLab Series 5000 (Kaiser Optical Systems, USA) oder mit einer faseroptischen Sonde (Inphotonics, USA) gekoppelt. Die Raman-Streustrahlung der Proben wurde zum Spektrographen HoloSpec f/1.8 (Kaiser Optical Systems, USA) geleitet und von einem CCD-Detektor (Roper Scientific, USA) registriert. Raman-Images wurden mit einem motorisierten Probenstisch (Prior Scientific, England) im Mapping-Modus aufgenommen. Jedes Raman-Spektrum umfasste den spektralen Bereich von 125 bis 3550 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} . Die Aufnahmesoftware HoloGrams (Kaiser Optical Systems, USA) führte eine automatische Korrektur von Cosmic Spikes, eine Wellenzahlkalibrierung und eine Intensitätsnormierung durch. Weitere Details wie Mikroskopvergrößerung, Schrittweite und Messzeit sind in den Veröffentlichungen angegeben.

2.5.2 Infrarot-Spektroskopie

Molekülschwingungen können auch durch Absorption von Strahlung im mittleren infraroten (MIR) Spektralbereich von 250 bis 4000 cm^{-1} angeregt werden. Als Konsequenz verschiedener physikalischer Mechanismen sind IR- und Raman-Spektren nicht identisch, sondern ergänzen sich. Aufgrund des hohen Wassergehaltes von Gewebe und der starken Absorption von MIR-Strahlung von Wasser ist die Eindringtiefe auf wenige Mikrometer beschränkt. Deshalb werden Gewebeproben für die meisten IR-spektroskopischen Untersuchungen als Schnitte von 5 bis 20 μm Dicke präpariert und nachfolgend getrocknet. Für die Datenaufnahme in Transmission werden die Gewebeschnitte auf IR-transparente Substrate wie Calciumfluorid (CaF_2) oder Bariumfluorid übertragen. FTIR-Spektrometer nutzen das interferometrische Fourier-Transform-Prinzip, das den Multiplex-, den Durchsatz- und den Wellenzahlgenauigkeitsvorteil beinhaltet. Der grundlegende Aufbau besteht aus einer breitbandigen Strahlungsquelle, einem Interferometer, einer Probenkammer oder einem Mikroskop sowie einem MIR-empfindlichen Detektor. In den vergangenen zehn Jahren wurden FTIR-Imaging-Spektrometer entwickelt, die den Multiplex-Vorteil mit einem Vielkanalvorteil bei der Detektion kombinieren. Der grundlegende Ansatz, um mit einem Interferometer zweidimensionale, lateral aufgelöste IR-Spektren aufzunehmen, erfordert, dass die detektierte Strahlung eine spezifische Fläche auf der Probe definiert. Diese laterale Lokalisation wird in zwei optischen Konfigurationen umgesetzt. Mapping-Techniken beschränken die Strahlung in der Probenebene durch eine Blende und Spektren werden nacheinander durch einen Einkanal-detektor aufgenommen. Imaging-Techniken segmentieren die Strahlung ohne Blenden in der Detektionsebene durch Vielkanal-detektoren, die für den IR-Bereich als Focal-Plane-Array (FPA) Detektoren bezeichnet werden. Dieses Detektionsprinzip erlaubt eine parallele Registrierung der IR-Spektren, was einen erheblichen Zeitvorteil bei der Aufnahme von FTIR-Images bietet.

Die IR-Daten in den zusammengefassten Originalarbeiten wurden mit dem FTIR-Spektrometer IFS66/S (Bruker Optik, Deutschland) aufgenommen, das mit dem IR-Mikroskop Hyperion (Bruker) mit 15facher Vergrößerung oder mit der Probenkammer IMAC (Bruker) gekoppelt wurde. Mit einem FPA-Detektor aus 64×64 Pixels auf Basis des Materials Quecksilber-Cadmium-Tellurid wurde im Mikroskop eine Fläche von 270×270 μm^2 mit einer berechneten Auflösung von 4.2 μm pro Pixel erfasst und in der Probenkammer eine Fläche von 4×4 mm^2 mit einer berechneten Auflösung von 62.5 μm . Die Messzeit bei einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Scanzahl von 19 betrug ca. 5 Minuten pro FTIR-Image.

3 Biomedizinische und zellbiologische Anwendungen

IR- und Raman-Spektroskopie sind in den vergangenen Jahren zunehmend auf biomedizinische Probleme angewendet worden. Frühe Studien in der Literatur bezüglich des Einsatzes von Schwingungsspektroskopie zur Charakterisierung von Gewebe basierten auf der Aufnahme von Spektren an einzelnen Punkten ohne mikroskopische Auflösung. Da die natürliche Inhomogenität von Gewebe auf mikroskopischer Ebene nicht berücksichtigt wurde, konnte eine genaue Korrelation zwischen der Histologie und den entsprechenden Spektren nicht erreicht werden. Deshalb sind viele der frühen Ergebnisse zweifelhaft und sind nicht in einem ausführlichen Übersichtsartikel berücksichtigt worden [Krafft 2006]. Bedeutende Fortschritte sind vor allem in den letzten zehn Jahren erzielt worden, seitdem empfindliche und schnelle Instrumente für FTIR- und Raman-mikroskopisches Imaging zur Verfügung standen. Sie ermöglichten, eine große Anzahl von Spektren von vielen Gewebeproben mit mikroskopischer Auflösung aufzunehmen, was die statistische Signifikanz erheblich verbesserte. Die Aufgabenstellungen und Anwendungen dieser Techniken in der Zellbiologie werden in Abschnitt 3.3 beschrieben.

IR-Absorptionsspektren enthalten im Wesentlichen die gleiche Art von Informationen wie Raman-Streuspektren, nämlich die Energie von Molekülschwingungen. Da sich jedoch beide Methoden grundsätzlich in ihren physikalischen Mechanismen unterscheiden, besitzt jede Methode bestimmte Vorteile für biomedizinische Anwendungen. Instrumentelle Systeme sind normalerweise weniger komplex für IR-Spektroskopie als für Raman-Spektroskopie. Die Aufnahme von IR-Daten ist allgemein schneller und führt zu Spektren mit einem Signal-Rausch-Verhältnis, das höher ist als das, was mit modernen Raman-Spektrometern erzielt wird. Nach der Einführung von FTIR-Imaging-Spektrometern bietet die IR-Spektroskopie insbesondere Vorteile als Methode zur Bewertung von getrockneten Gewebedünnschnitten. Da Wasser nur schwache Raman-Signale liefert und faseroptische Sonden für den sichtbaren und NIR-Bereich einfacher zu konstruieren sind als für den MIR-Bereich, bietet die Raman-Spektroskopie Vorteile als Methode zur Analyse von nativen Geweben und zur Kopplung mit Endoskopen.

Die Anwendungen von FTIR- und Raman-Imaging sowie faseroptischen Techniken auf der Grundlage von Schwingungsspektroskopie wurden im Übersichtsartikel [Krafft 2006] eingeteilt in die Gebiete: mineralisiertes Gewebe (Knochen, Zähne), Haut, Gehirn, gastrointestinaler Trakt (Mund, Rachen, Speiseröhre, Darm), Blutgefäße, Brust, Harntrakt (Prostata, Blase), Knorpel, Gebärmutterhals, Lunge, Auge, Leber, Herz und Milz. Die Reihenfolge entspricht der Häufigkeit der Publikationen von 1996-2006 in jedem Gebiet, das heißt über mineralisiertes Gewebe und Haut wurden bis jetzt die meisten Arbeiten publiziert. Fast doppelt so viele Arbeiten wurden über den Einsatz von IR-Spektroskopie (110) als von Raman-Spektroskopie (60) publiziert. Hirngewebe stellt die dritthäufigste Anwendung dar. Die acht Originalarbeiten [CK2, CK4, CK7, CK8, CK9, CK11, CK12, CK14], die in Abschnitt 3.1. und in einem Buchbeitrag [Krafft 2008] zusammengefasst werden, stellen damit einen bedeutenden Beitrag zu einem wichtigen Forschungsgebiet dar. Darüber hinaus werden in Abschnitt 3.2 zwei weitere Beiträge zu Untersuchungen an Gebärmutterhals [CK3] und Milz [CK6] vorgestellt. Beiträge [CK1, CK5, CK10, CK13] demonstrieren in Abschnitt 3.3, wie die Methoden auf einzelnen Zellen in zellbiologischen

Fragestellungen übertragen werden. Das Startjahr 1996 wurde gewählt, weil das erste FTIR-Imaging-Spektrometer 1995 präsentiert und die Technik in den folgenden Jahren zunehmend eingesetzt wurde [Lewis 1995]. Daneben wurden etwa zur gleichen Zeit empfindliche NIR-Raman-Spektrometer für Mapping, Imaging und Kopplung mit faser-optischen Sonden vorgestellt [Schaeberle 1996, Shim 1997]. Die Anzahl von IR-Studien war jedes Jahr größer als von Raman-Studien. Eine Ausnahme bildete das Jahr 2002, in dem eine Sonderausgabe über medizinische Anwendungen von Raman-Spektroskopie im „Journal of Raman Spectroscopy“ erschien. Auch die relativ großen Zahlen von IR-Studien in den Jahren 1998 und 2006 – für das nur Beiträge bis September berücksichtigt wurden – ergaben sich aus Sonderausgaben, die in „Cellular and Molecular Biology“ bzw. „Biochimica et Biophysica Acta“ erschienen. Man erkennt eine klare Tendenz, dass die Publikationszahlen von Jahr zu Jahr steigen. Ein noch deutlicherer Anstieg wird für die Zukunft erwartet, wenn die Methoden als Standardanwendungen in Kliniken und Laboren eingeführt werden. Diese Arbeit soll zu diesem Ziel beitragen.

3.1 FTIR- und Raman-Imaging in der Neuroonkologie

Ein Buchbeitrag [Krafft 2008] beschreibt, wie IR- und Raman-Spektroskopie zu einer besseren Diagnose der häufigsten Hirntumoren eingesetzt werden können. Erste Ergebnisse werden für primäre und sekundäre Hirntumoren präsentiert. Die Methoden sind nicht auf die Neuroonkologie beschränkt, sondern wurden bereits auf neurologische Krankheiten wie Alzheimer [Miller 2006a], Parkinson [Szczerbowska-Boruchowska 2007] und Varianten von Creutzfeld-Jacob [Kretlow 2006] angewendet, die jedoch nicht Gegenstand der hier beschriebenen Untersuchungen sind.

3.1.1 Primäre Hirntumoren [CK2, CK4, CK7, CK8, CK12]

Tumoren, die aus Hirngewebe entstehen, werden als primäre Hirntumoren bezeichnet. Nach einer Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [Kleihues 2000] erfolgt die Klassifikation gemäß den Zelltypen, aus denen sie hervorgegangen sind. Dazu gehören Gliazellen, die Meninges, Zellen der Hypophyse und Zellen der peripheren Nerven. Gliome, die mit einer Häufigkeit von fast 50% aller primären Hirntumoren die größte Gruppe darstellen, bilden eine heterogene Gruppe, da sie aus verschiedenen Gliazellen entstehen können. Die histopathologische Diagnose von Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Gewebedünnschnitten ist der sog. Goldstandard für die Einteilung von Gliomen in Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome als gemischte Gliome und Ependymome. Astrozytome gehören zu den häufigsten Tumoren des Gehirns. Sie haben ihren Ursprung in den Astrozyten, die zum Stützgewebe (Gliazellen) des Zentralnervensystems gehören. Die Malignität wird in steigender Reihenfolge in Grad II (niedrigmaligne Astrozytome), Grad III (anaplastische Astrozytome) und Grad IV (Glioblastoma multiforme, GBM) eingeteilt. Das pilozystische Astrozytom erhielt den Grad I und wird wegen des meist gutartigen Verlaufes und des Vorkommens im Kindes- und Jugendalter von den anderen Astrozytomen getrennt. Die Beurteilung wird dadurch erschwert, dass sie nur eine Momentaufnahme ist. Da viele niedrigmaligne Astrozytome die Neigung besitzen, zu höhermalignen Tumoren zu transformieren, hat eine Diagnose möglicherweise nur für wenige Monate Gültigkeit. Weiterhin ist die Tumormasse nicht einheitlich. Bei einem Tumor von der Größe einer Walnuss kann das Gewebe an verschiedenen Stellen unterschiedlich sein. Da man bei Probeentnahmen (Hirnbioptie) nur eine geringe Menge an Tumorgewebe entnimmt und auch bei der Untersuchung eines Tumorsektates nach einer operativen Entfernung nicht das ganze Gewebe untersucht werden kann, kommt es zu Stichprobenfehlern. Unter Umständen bekommt man nur Gewebe einer Klassifikationsstufe zu Gesicht. Entscheidend für den Verlauf und somit die Prognose ist jedoch der bösartigste Tumoranteil, der bei kleinen Gewebeproben nicht immer enthalten ist. Dies kann fälschlicherweise zur Annahme eines niedrigen Malignitätsgrades führen. Wie sich ein Astrozytom entwickelt, lässt sich zurzeit nicht durch eine histopathologische Beurteilung vorhersagen. Deshalb wurden Anstrengungen

unternommen, mittels MRI-Kriterien [Cha 2005] und genetischer Verfahren [Barbashina 2005] die Diagnose zu ergänzen. Das häufigste erste klinische Symptom von Astrozytomen ist ein epileptischer Anfall, nachdem Tumorzellen benachbarte Neurone infiltrieren und zerstören. Ein Pupillenödem und Kopfschmerzen sind Zeichen eines beginnenden Hirndruckes aufgrund der Volumenzunahme in der engen Schädelhöhle. Der Nachweis, die Bestimmung von Größe und Wachstum erfolgen durch CT oder MRT mit oder ohne Kontrastmittel. Die Behandlung zielt auf eine chirurgische Entfernung des Tumors ab, um aus dem entfernten Tumormaterial den genauen Befund abzuleiten und um den Masseneffekt des Tumors zu reduzieren. Eine Chemotherapie ist bei Astrozytomen nicht wirksam und eine Bestrahlung hilft nur in bestimmten Fällen. Aufgrund der aggressiven Ausbreitung von Gliomen und ihres schnellen, diffusen, infiltrativen Wachstums ist eine Heilung unwahrscheinlich, solange nicht der Tumor vollständig entfernt wurde. Mit den gegenwärtig vorhandenen Methoden ist dies jedoch nicht möglich, so dass von den verbleibenden Tumorzellen ein erneutes Tumorwachstum ausgeht. Trotz aller Fortschritte in den letzten Jahren hat sich die mittlere Überlebensrate von Patienten mit GBM nur geringfügig auf 12 Monate verbessert. Für Grad III-Gliome beträgt sie 2 bis 5 Jahre und für Grad II-Gliome über 5 Jahre. Neue Therapieansätze befinden deshalb in der Entwicklung wie Gentherapie und Immuntherapie [Barzon 2006].

Meningeome sind Tumoren der Meninges und stellen mit ca. 20% nach den Gliomen die zweihäufigste Gruppe aller primären Hirntumoren dar. Es gibt mehrere verschiedene Untergruppen von Meningeomen, von denen die meisten histologisch gutartig sind, langsam wachsen, nicht in Hirngewebe infiltrieren oder Metastasen verursachen. Schwannome sind die dritthäufigsten primären Hirntumoren. Sie entstehen aus Schwann-Zellen, die Myelin produzieren, das die Hirnnerven oder peripheren Nerven schützt. Die meisten von ihnen sind Akustikusneurinome mit einer niedrigen Malignität von Grad I.

Eine operationsbegleitende pathologische Bewertung von Gewebedünnschnitten – auch als Schnellschnittdiagnostik bezeichnet – wird durchgeführt, um Erstdiagnosen und Tumorgrenzen zu bestätigen. Die Ausdehnung von Hirntumoren wird in der Regel vor einer Operation durch CT oder MRT bestimmt. Die Tumorgrenzen können jedoch von den präoperativen Positionen aufgrund von Ödemen oder intraoperativ stattfindenden Masseverschiebungen abweichen. Die Unterscheidung zwischen Tumor und normalem Gewebe ist besonders wichtig in der Neurochirurgie, um die Tumorsektion zu maximieren bei minimalen neurologischen Beeinträchtigungen für den Patienten. Die Dünnschnitte werden von gefrorenen Gewebeproben mit einem Kryotom präpariert, mit den Reagenzien H&E gefärbt und von einem Neuropathologen bewertet. Solch ein Experte ist jedoch nicht immer anwesend. Weitere Probleme, die einer genauen Diagnose im Wege stehen, ergeben sich aus einer unzureichenden Qualität und Quantität der Gewebeprobe sowie aus der Pathologen abhängigen Natur der Befunde, die zu einem gewissen Grade subjektiv beeinflusst sind. Ungefärbte Gewebedünnschnitte können mittels FTIR-Imaging analysiert werden, falls sie auf geeigneten IR-durchlässigen Substraten präpariert wurden. Aus diesem Grund wurde ein Forschungsprogramm initiiert, um FTIR-Imaging zur Diagnose von Hirntumor-Gewebedünnschnitten anzuwenden. Zu den Vorteilen gehören, dass (i) die Probenpräparation einfach in die klinische Routine integriert werden kann, (ii) die Methode schnell und objektiv ist, da die Daten innerhalb von Minuten mit automatisierten Verfahren aufgenommen und interpretiert werden können und (iii) sie nichtdestruktiv ist, so dass die Probe für weitere Analysen wie der Immunhistochemie zur Verfügung steht. Die Ergebnisse aus den FTIR-Untersuchungen wurden auf die Raman-Spektroskopie von Gewebedünnschnitten und von nicht getrockneten Gewebeproben übertragen. Das finale Ziel ist, das Gewebe während der Operation vor der Entnahme mit faseroptischen Raman-Systemen zu bewerten.

IR-Spektren von normalem Hirngewebe, Gliomen und Tumorzellen [CK2]

In der ersten Studie wurden Dünnschnitte von 71 Proben mittels FTIR-Imaging im Mapping-Modus analysiert. Das heißt, die Spektren wurden nicht mit einem FPA-

Detektor, sondern nacheinander mit einem Einkanal-detektor registriert. Bei einer Mikroskopblende von $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ und einer Schrittweite von $90 \mu\text{m}$ wurden rund 2000 IR-Spektren pro Datensatz aufgenommen, so dass die Analyse auf insgesamt rund 150000 IR-Spektren basierte. Untersucht wurden vier normale Proben aus Autopsien, sieben Proben eines Astrozytoms Grad II, neun Proben eines Astrozytoms Grad III, vierzig Proben eines GBM Grad IV und elf Proben von kultivierten Tumorzellen. Die Anzahl der Proben pro Klasse unterschied sich so stark, weil niedrigmaligne primäre Hirntumoren in einem frühen Stadium weniger häufig Symptome verursachen und einen operativen Eingriff erfordern als höhermaligne.

Die größten Beiträge in den IR-Spektren von Hirngewebe werden den Hauptbestandteilen Proteinen und Lipiden zugeordnet. Kleinere spektrale Beiträge liefern Cholesterin und Nukleinsäuren. Intensivste Signale im Intervall 1500 bis 1800 cm^{-1} zeigen die Amid I- und Amid II-Banden von C=O Streck- bzw. N-H Deformationsschwingungen der Peptidgruppe in Proteinen. Bei Banden im Intervall 1300 bis 1500 cm^{-1} handelt es sich überwiegend um Deformationsschwingungen der Alkyl-Gruppen CH_3 und CH_2 . Die symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungen der Phosphodioxygruppen PO_2^- sind die intensivsten Signale im Bereich von 1000 bis 1300 cm^{-1} . Im hohen Wellenzahlenbereich von 2800 bis 3000 cm^{-1} werden in erster Linie Streckschwingungen von Alkyl-Ketten beobachtet. In normalem Hirngewebe dominieren die Gewebeklassen Graue Substanz und Weiße Substanz, die zum großen Teil aus Neuronen bzw. Gliazellen bestehen. Die Differenzen zwischen den IR-Spektren dieser beiden Klassen bestätigen die bekannte Tatsache, dass Weiße Substanz mehr Lipide und Cholesterin enthält als Graue Substanz. Um die spektralen Beiträge genau zuzuordnen, wurden IR-Spektren von reinem Cholesterin, einem Hirnlipidextrakt ohne Cholesterin und von DNA herangezogen. Die Positionen der Banden in IR-Spektren von Hirntumoren sind weitgehend identisch mit den Positionen in IR-Spektren von normalem Hirngewebe. Varianzen treten hauptsächlich als relative Intensitätsunterschiede auf. Die spektralen Differenzen zwischen Astrozytom Grad II und GBM sind qualitativ nahezu identisch mit den Differenzen zwischen Weißer und Grauer Substanz. Die wichtige Schlussfolgerung lautet, dass die Cholesterin- und Lipidkonzentration in der Reihenfolge Weiße Substanz > Graue Substanz > Grad II > Grad III > Grad IV sinkt. Dieser Zusammenhang wird durch unabhängige Untersuchungen von Gliomen mittels Chromatographie [Campanella 1992] und NMR-Spektroskopie [Sijens 1996] unterstützt. Gemäß dem Absorptionsgesetz von Lambert-Beer hängt die Absorption bzw. Transmission von Strahlung nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Probendicke ab, die von Dünnschnitt zu Dünnschnitt leicht variieren kann. Um die Lipidkonzentration zu quantifizieren, ist deshalb eine Bezugsgröße erforderlich. Für die IR-Spektroskopie von Hirngewebe wurde die intensivste Proteinbande als Bezugsgröße gewählt, da sich die Proteinkonzentration in Weißer Substanz, Grauer Substanz und auch in Hirntumoren nur wenig ändert. Die Amid I-Bande bei 1655 cm^{-1} ist das intensivste Proteinsignal in IR-Spektren. Zu den intensivsten Signalen von Lipiden in IR-Spektren gehört die symmetrische Streckschwingung von Methylengruppen bei 2850 cm^{-1} . Beide Banden überlappen nur wenig mit anderen Banden, so dass sie für die Quantifizierung des Lipid-Protein-Verhältnisses herangezogen wurden. Die Verteilung der Lipid-Protein-Verhältnisse wurde für jeden Datensatz berechnet. Das Maximum dieser Verteilung entsprach dem Verhältnis des vorherrschenden Gewebetyps. Es wurde festgestellt, dass der Mittelwert der Maxima für normales Hirngewebe 0.69 ist und die Standardabweichung 0.02 beträgt. Die Maxima sind für Astrozytome Grad II bei 0.27 ± 0.05 zentriert, für Astrozytome Grad III bei 0.17 ± 0.05 und für GBM bei 0.11 ± 0.03 . Diese Werte wurden in folgenden Studien [CK8, CK12] bestätigt. Die Mittelwerte für kultivierte Tumorzellen bei 0.12 ± 0.016 stimmen mit den Werten für das hochmaligne Tumorgewebe überein. Die geringere Standardabweichung deutet darauf hin, dass die Zellkulturen homogener sind als Gewebe. Die Differenzen zwischen den IR-Spektren von Zellen und Gewebe werden Nukleinsäuren zugeordnet und sind konsistent mit einer höheren Proliferationsrate der Zellen.

Im Allgemeinen lassen sich Änderungen in IR-Spektren zwischen normalem und nicht normalem, neoplastischem Gewebe auf mehrere Ursachen zurückführen. Erstens kommen besondere zelluläre Ereignisse, wie Änderungen des genetischen Codes oder die Synthese von mutierten Proteinen, in fast allen Formen einer Neoplasie vor. Es gibt keinen Zweifel, dass diese Änderungen zu den spektralen Differenzen beitragen. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass wenige mutierte Gene oder Proteine ausreichen, um die deutlichen Merkmale in den IR-Spektren zu verursachen. Zweitens können sich Änderungen aus sekundären zellulären Ereignissen ergeben, die zu einem Anstieg oder Absinken von Substanzklassen (DNA, RNA, Lipide, Proteine, Kohlenhydrate) führen. Drittens können die spektralen Differenzen aus unterschiedlichen Mittelungsprozessen resultieren. Das IR-Spektrum ist immer ein Durchschnitt von allen Zellen in dem untersuchten Probenbereich von $90 \times 90 \mu\text{m}^2$. Die Zellpopulationen, die sich in einer gegebenen Phase des Zellzyklus befinden, können zwischen normalem und neoplastischem Gewebe variieren. Insbesondere Nervenzellen als sog. postmitotische Zellen besitzen die ungewöhnliche Eigenschaft, sich nicht weiter zu teilen. Diese Eigenschaft unterscheidet sich grundsätzlich von Tumorzellen, die sich unkontrolliert teilen. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass der zweite und der dritte Grund die größten Beiträge zu den beobachteten Differenzen zwischen den IR-Spektren von normalem Hirngewebe und Hirntumoren liefern.

Überwachtes Klassifikationsmodell für IR-Spektren von Gliomen [CK8]

Allgemeine Probleme für überwachte Klassifikationsmodelle von spektroskopischen Daten sind die natürliche Heterogenität von Gewebe und Varianzen zwischen Proben des gleichen Gewebetyps. Gewebe – auch von normalen Proben – ist aus einer Reihe von verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt. In Tumoren können mehrere Malignitätsgrade, Stroma oder Nekrosen auftreten. Deshalb ist die korrekte Auswahl von Trainingsdaten wichtig, um ein Klassifikationsmodell für gesundes Gewebe und Tumoren von unabhängigen Testdaten zu entwickeln. Für Gliome wurden IR-Spektren von Regionen in Gewebedünnschnitten herangezogen, deren Befund zwei Pathologen unabhängig voneinander bestätigten. Für diese Referenzinformationen wurden parallel zu den Gewebedünnschnitten auf den IR-transparenten CaF_2 -Substraten Gewebedünnschnitte auf standardisierten Glasobjektträgern präpariert und mit H&E gefärbt.

Das Lipid-Protein-Verhältnis aus [CK2] zur Charakterisierung von normalem Hirngewebe und von primären Hirntumoren diente als Grundlage, ein überwachtes Klassifikationsmodell zu entwickeln. Eine Komplikation bestand darin, dass in normalem Hirngewebe zusätzliche Gewebetypen vorhanden sind, die ähnliche Lipid-Protein-Verhältnisse aufweisen wie Tumoren und damit falsch zugeordnet werden, wenn nur dieser Parameter berücksichtigt wird. Ein Lösungsansatz bestand darin, dass zusätzliche Parameter für weitere Gewebetypen definiert werden. Dazu gehören die weiche Hirnhaut, die sog. Leptomeninges, die durch spektrale Beiträge von Kollagen bei 1230 und 1450 cm^{-1} charakterisiert ist, und Einblutungen, die durch spektrale Beiträge von Hämoglobin bei 1545 cm^{-1} charakterisiert sind. Die Größen werden wie zuvor das Lipidsignal bei 2850 cm^{-1} in Bezug zum Proteinsignal bei 1655 cm^{-1} gesetzt. Ein spezielles Problem für Klassifikationsmodelle von Gliomen ist, dass die Malignitätsgrade ein sog. histologisches Kontinuum bilden und die Tumorgrade kontinuierlich ineinander übergehen. Deshalb ist es besonders schwierig, eine scharfe Grenze für spektroskopische Merkmale zu finden, die die Tumorgrade trennt. Ein zusätzliches Problem ist, dass hochmaligne Gliome Regionen mit niedrigerer Zelldichte aufweisen können, die eine ähnliche chemische Zusammensetzung und Erscheinungsform besitzen wie niedrigmaligne Gliome.

Ein Klassifikationsmodell wurde auf Grundlage des Algorithmus Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) entwickelt. Die Berechnungen erfolgten in einer MatLab Programmumgebung unter Verwendung der Discrim Toolbox [Kieft 1999]. LDA-Modelle berechnen (K-1) Diskriminanzfunktionen, die optimal K Klassen trennen. Um das Ergebnis darzustellen, werden die Klassenzugehörigkeiten durch Farben repräsentiert und

farbkodierte Abbildungen werden zusammengesetzt, die von Nichtexperten analog interpretiert werden können wie histologisch gefärbte Gewebedünnschnitte von Pathologen. Es stellte sich heraus, dass drei Variablen auf Grundlage der chemischen Unterschiede von Lipid/Protein (2850/1655), von Kollagen/Protein ((1230+1450)/1655) und von Hämoglobin/Protein (1545/1655) ausreichend sind, um die folgenden sechs Gewebetypen zu klassifizieren: normales Hirngewebe, Astrozytom Grad II, Astrozytom Grad III, GBM, Einblutung und Leptomeninges. Bei der Validierung des Modells in [CK12] wurde festgestellt, dass IR-Spektren von Verunreinigungen ebenfalls zu der letztgenannten Klasse zugeordnet wurden. Deshalb wird die Klasse besser als „anderes Gewebe“ bezeichnet.

Die Publikation [CK8] demonstrierte, wie Trainingspektren für das LDA-Modell ausgewählt wurden und wie das resultierende Klassifikationsmodell angewendet wurde. FTIR-Images wurden im Mapping-Modus mit einer Mikroskopblende von $180 \times 180 \mu\text{m}^2$ und einer Schrittweite von $180 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Blende und die Schrittweite wurden im Vergleich zu [CK2] erhöht, um die Rastergrößen für ausgedehnte Dünnschnitte bis zu $15 \times 15 \text{mm}^2$ auf unter 7000 Punkte zu begrenzen. Die Trainingsdaten stammten von zwei Patienten, von denen mehrere Tumorproben entnommen und mehrere Dünnschnitte präpariert wurden. Ein Trainingssatz wurde erstellt, der jeweils drei IR-Spektren pro Klasse von repräsentativen Bereichen enthielt. Das erste Spektrum entsprach dem Mittelwert, das zweite Spektrum dem kleinsten Wert und das dritte Spektrum dem größten Wert der jeweiligen Klasse. Nach dem Training des LDA-Modells wurden vier FTIR-Images von zwei Patienten klassifiziert. Die Zuordnungen des ersten FTIR-Images des ersten Patienten betrafen GBM (72%), Einblutungen (15%), Astrozytom Grad III (2%) und anderes Gewebe (11%). Das zweite FTIR-Image des ersten Patienten wurde als Astrozytom Grad III (73%) mit Leptomeninges (11%) am Rand zugeordnet. Diese Probe zeigte, dass ein primärer Hirntumor inhomogen sein und verschiedene Malignitätsgrade aufweisen kann. Der höchste Malignitätsgrad bestimmt den Befund, der in diesem Fall als GBM bestätigt wurde. Das erste FTIR-Image des zweiten Patienten stellte den Übergang von normalem Hirngewebe (37%) und einem Astrozytom Grad II (50%) dar. Die Zuordnung des zweiten FTIR-Images des zweiten Patienten unterschied sich wiederum von der ersten Probe, die überwiegend als Astrozytom Grad III (62%) mit Einblutungen (24%) klassifiziert wurde. Ein interessantes Detail ist, dass hier die Erstdiagnose auf Grundlage der präoperativen Untersuchungen Astrozytom Grad II lautete. Der histopathologische Befund des Tumormaterials nach der Operation bestätigte jedoch die FTIR-Klassifikation eines Astrozytom Grad III.

Dieses Ergebnis zeigt, wie die IR-Spektroskopie die Histopathologie ergänzen kann. Die Messzeiten von mehreren Stunden pro FTIR-Image im Mapping-Modus sind jedoch nicht kompatibel mit den Erfordernissen einer Schnellschnittdiagnostik. Anstelle einer vollständigen Untersuchung stellt die Aufnahme von einzelnen IR-Spektren an ausgewählten Positionen eine Möglichkeit dar, die Messzeiten zu reduzieren und den Probendurchsatz zu erhöhen. Dieser Ansatz wurde in [CK8] auf 51 unabhängige Proben von 5 Patienten ohne Hirntumor, 15 Patienten mit Astrozytom Grad III und 31 Patienten mit GBM angewendet. Normale Proben wurden mit einer Genauigkeit von 100% erkannt, Astrozytome Grad III zu 80% und GBM zu 74%. Ein Überlapp existierte zwischen den malignen Gliomen, da 20% der Astrozytom Grad III-Proben zu GBM und umgekehrt 19% der GBM-Proben zu Astrozytom Grad III zugeordnet wurden. Dieser Überlapp hat erstens keine große klinische Bedeutung, da die Therapie für beide Diagnosen ähnlich ist, und zweitens sind die histologischen Unterschiede zwischen den beiden Tumorgaden relativ gering. GBM ist neben Gefäßproliferationen durch die Anwesenheit von Nekrosen charakterisiert. Insgesamt wurden maligne Gliome – dabei handelt es sich um die Sammelbezeichnung für Astrozytome Grad III und GBM – mit einer Genauigkeit von 94% identifiziert. Die verbleibenden 6% wurden Einblutungen und anderem Gewebe zugeordnet, aber nicht normalem Hirngewebe.

Überwachtes Klassifikationsmodell für FTIR-Images von Gliomen [CK12]

Der im letzten Abschnitt genannte Selektionsansatz für die Aufnahme von einzelnen Spektren birgt die Gefahr, dass diagnostisch wichtige Probenbereiche nicht erfasst werden. Ein anderer Ansatz, die Messzeiten für die Untersuchung der gesamten Probe auf wenige Minuten zu reduzieren, bietet FTIR-Imaging mit einem Vielkanaldetektor. Das Klassifikationsmodell kann auf diese Daten übertragen werden, wenn die Datenvorbehandlung für die FTIR-Images in gleicher Weise erfolgt wie für die IR-Spektren, die mit einem Einkanaldetektor aufgenommen wurden. Im ersten Schritt wird der Untergrund durch eine lineare Basislinie korrigiert. Im zweiten Schritt wird die Spektrqualität kontrolliert und Spektren unterhalb bzw. oberhalb einer Intensitätsgrenze werden aus dem Datensatz entfernt. Spektren mit zu geringer Intensität entsprechen Rissen oder Löchern in der Probe. Spektren mit zu hoher Intensität leiden unter Nichtlinearitäten bei der Detektion. Sie treten in Probenbereichen mit zu hoher Schichtdicke auf. Von Hirngewebe wurden Gewebedünnschnitte von 10 µm Schichtdicke präpariert, deren IR-Transmission rund 10% beträgt, was einer Absorption von 1 entspricht. Im dritten Schritt werden die Bandenintensitäten bestimmt, die als Eingangsgrößen für das LDA-Modell benötigt werden. Es wurde in [CK12] gezeigt, dass die so behandelten IR-Spektren von gleichen Probenpositionen, jedoch mit unterschiedlichen Detektoren aufgenommen, nahezu identisch sind. Die Differenzen zwischen den beiden Spektren sind viel kleiner als zwischen verschiedenen Gewebeklassen. Um das LDA-Modell zu validieren, wurden analog zu [CK8] mehrere Proben jeweils aus dem Tumorzentrum und aus der Tumorpheripherie von weiteren geeigneten Hirntumorpatienten entnommen und die Klassifikationsergebnisse wurden mit der histopathologischen Bewertung verglichen. Die Auswahl der Proben erfolgte auf Grundlage von Informationen aus der sog. Neuronavigation, auf die in der Zusammenfassung von Referenz [CK4] detaillierter eingegangen wird. Erste Ergebnisse der LDA-Klassifikation für FTIR-Images von einem GBM-Patienten wurden in [CK12] vorgestellt. Die Ergebnisse von weiteren fünf Patienten (Astrozytom Grad III, 2×Oligoastrozytom Grad III, 2×GBM) werden demnächst in einem separaten Manuskript präsentiert. Wenn die Probenfläche die Größe eines FTIR-Images von 4×4 mm² überstieg, war es erforderlich, mehrere Datensätze aufzunehmen und das finale Image wie ein Mosaik zusammensetzen.

Vom ersten Dünnschnitt wurden zwei FTIR-Images aufgenommen. Das LDA-Modell ordnete durchschnittlich 95% (Image 1: 67% GBM, 27% Astrozytom Grad III, Image 2: 53% GBM, 43% Astrozytom Grad III) aller Spektren einem malignen Gliom und keine Spektren normalem Hirngewebe zu. Die Zuordnung war konsistent mit einer Lokalisation der Probe nahe dem Zentrum eines GBM. Die Histomorphologie eines H&E-gefärbten Parallelschnittes zeigte eine grobe zelluläre, faserige Struktur und hohe Zelldichte, was typisch für einen malignen astrozytären Tumor war. Bei höherer Vergrößerung wurden große polymorphe Tumorzellen mit atypischen Zellkernen und einigen Nekrosen sichtbar, die den Befund eines GBM unterstützten. Vom zweiten Dünnschnitt wurden ebenfalls zwei FTIR-Images aufgenommen. Der größte Teil wurde einem Astrozytom Grad II (Image 1: 76% und Image 2: 50%) und kleinere Teile normalem Gewebe (8% und 7%) sowie Astrozytom Grad III (12% und 34%) zugeordnet. Diese Zuordnungen waren konsistent mit einer Lokalisation der Probe nahe der Peripherie des Tumors. Die Histomorphologie zeigte Hirngewebe mit leicht erhöhter Zelldichte. Bei höherer Vergrößerung waren einige verdächtige Zellen erkennbar, bei denen es sich um astrozytäre Tumorzellen handeln könnte. Vom dritten Dünnschnitt wurden sogar drei FTIR-Images aufgenommen. In jedem Image wurden mehr als 90% aller Spektren zu normalem Hirngewebe und weniger als 0.2% zu malignen Gliomen zugeordnet. Die übrigen Spektren wurden korrekt als Einblutungen und als anderes Gewebe – hier Gewebe kontaminiert mit Gefriermedium am Rand – identifiziert. In Übereinstimmung mit der LDA-Klassifikation zeigte die Histomorphologie weitgehend reguläres Hirngewebe mit einigen Blutgefäßen und eine verdächtige astrozytäre Zelle. Keine Probe wurde zu 100% einer Gewebeklasse zugeordnet. Diese Beobachtung belegt, dass die Gewebedünnschnitte inhomogen sind

und unter Umständen auch Bereiche vorhanden sind, die nicht im Modell enthalten sind wie z.B. das Gefriermedium. Die Ergebnisse weisen auf die hohe Sensitivität und Spezifität des Ansatzes, da in den Images vom ersten Dünnschnitt keine normalen Bereiche – was einer Falsch-Negativ-Zuordnung entsprochen hätte – und in den Images vom dritten Dünnschnitt weniger als 0.2% maligne Tumorbereiche – was einer Falsch-Positiv-Zuordnung entspricht – gefunden wurden.

Im Zusammenhang mit GBM ist es wichtig zu betonen, dass Astrozytom Grad II und Grad III als Begriffe benutzt werden, um die Zelldichte und die morphologische Erscheinung in Analogie zu den morphologischen Parametern für die WHO-Einteilung zu beschreiben. Sie ist jedoch nicht identisch mit der WHO-Klassifikation. In einem Tumor mit Bereichen offensichtlicher Malignität entsprechen Bereiche mit leicht erhöhter Zelldichte und mit einigen Tumorzellen keinem gutartigen Astrozytom Grad II. Trotz der morphologisch gutartigen Erscheinung behalten diese Tumorzellen ihr malignes Potential.

Raman- und FTIR-Images von Hirntumor-Dünnschnitten [CK7]

Gewebedünnschnitte auf CaF₂ können auch mittels Raman-Spektroskopie untersucht werden, wenn die Substrate als VUV-Qualität spezifiziert sind. Die Standardqualität enthält Verunreinigungen, die einen sehr intensiven Untergrund in den Raman-Spektren verursachen, und ist deshalb ungeeignet für Raman-Experimente mit 785 nm Anregung. Für drei Dünnschnitte von primären Hirntumoren wurden sowohl Raman- als auch FTIR-Images mit vergleichbaren lateralen Auflösungen von rund 100 µm aufgenommen, um die Komplementarität der beiden Techniken zu demonstrieren. Die Segmentierung der spektroskopischen Images durch Cluster-Analyse und die Cluster-gemittelten Spektren wurden verglichen. Der spektrale Bereich von IR-Spektren wird vom Substrat auf Wellenzahlen oberhalb von 950 cm⁻¹ beschränkt, weil die Transmission von CaF₂ unterhalb von 950 cm⁻¹ gegen null geht. Dagegen können Raman-Spektren von rund 200 bis 3500 cm⁻¹ registriert werden. Die untere Grenze wird durch die Transmission des Notch-Filters begrenzt, das die intensive elastische Streustrahlung unterdrückt. Die obere Grenze wird bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 785 nm durch die Empfindlichkeit der CCD-Detektoren auf Basis des Materials Silizium bestimmt, deren Quantenausbeute oberhalb einer Raman-Verschiebung von 3500 cm⁻¹ – was einer Wellenlänge oberhalb von 1080 nm entspricht – gegen null geht.

Sowohl im Raman- als auch im FTIR-Image eines Meningeom-Dünnschnitts wurden zwei Gewebetypen an übereinstimmenden Bereichen lokalisiert. Die Spektren ergaben, dass es sich bei dem ersten Typ um Tumorgewebe mit hohem Kollagengehalt und bei dem zweiten Typ um Tumorgewebe mit niedrigem Kollagengehalt handelt. Die beiden übereinstimmenden Gewebetypen in den spektroskopischen Images eines GBM-Dünnschnittes wurden als Tumorgewebe und als Einblutungen identifiziert. Obwohl die größten Beiträge in Raman- und IR-Spektren Proteinen und Lipiden zugeordnet werden, unterscheiden sich die spektralen Informationen erheblich. In Raman-Spektren sind Banden von spezifischen Proteinen wie Kollagen oder Hämoglobin, von spezifischen Lipiden wie Phosphatidylcholin (PC) und von den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aufgelöst. In IR-Spektren überlappen die spektralen Merkmale und ergeben breitere Banden, so dass die direkte Bestimmung von einzelnen Komponenten schwieriger ist. Die spektralen Beiträge unter anderem von Kollagen und Hämoglobin können nur indirekt in IR-Differenzspektren nachgewiesen werden. Eine Gemeinsamkeit von beiden Methoden ist, dass sie einen empfindlichen Fingerabdruck für Gewebe darstellen und seine Identifikation durch geeignete Algorithmen ermöglichen. Insbesondere kollagen- und hämoglobinreiches Gewebe wurden in Gewebeschnitten mittels Raman- und FTIR-Imaging detektiert. Deshalb ist es nicht überraschend, dass die farbkodierten Zuordnungen in Raman- und FTIR-Images gut übereinstimmen. Der Gewebedünnschnitt eines Schwannoms stellte eine Ausnahme dar, weil beide Images sich unterschieden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die spektralen Differenzen innerhalb der Images in diesem Fall kleiner waren. Obwohl Raman und FTIR-Images mit

ähnlicher Schrittweite aufgenommen wurden, werden mehr Details in den Raman-Images aufgelöst. Dazu gehören Cholesterin- und Cholesterinester- (CE-) Mikrokristalle, Calciumsalzablagerungen wie Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat und erhöhte spektrale Beiträge von Zellkernen. Der Nachweis von CE kann als Marker für primäre Hirntumoren betrachtet werden. Während in normalem Hirngewebe nur Spuren von CE vorhanden sind, wurden bis zu hundertfache CE-Konzentrationen in Hirntumoren berichtet [Nygren 1997]. Der Nachweis wird erleichtert durch einen Trocknungsartefakt in den Gewebedünnschnitten, wodurch aus hydrophoben Verbindungen wie Cholesterin und CE Mikrokristalle entstehen. Beide Moleküle können mittels Raman-Spektroskopie eindeutig voneinander aufgrund zusätzlicher spektraler Beiträge der Estergruppe und der Fettsäurereste sowie aufgrund Verschiebungen einiger Raman-Banden des Cholesterin-Ringsystems unterschieden werden. Die Raman-Spektren der zwölf wichtigsten Hirnlipide sind ausführlich in einem Manuskript beschrieben worden [Krafft 2005a]. Kalzifizierung ist kein unübliches Phänomen in pathologischen Geweben. Hydroxylapatit wird gebildet als Ergebnis funktioneller Unregelmäßigkeiten und kann deshalb genutzt werden, um den pathologischen Zustand und den Tumortyp zu unterscheiden. Anhand eines Raman-Spektrums wurde Tricalciumphosphat als weitere Calciumphosphatphase in Dünnschnitten identifiziert. Weder CE-Mikrokristalle noch Kalzifizierungen wurden bis jetzt in FTIR-Images gefunden. Die Geometrien zur Signaldetektion können als Erklärung herangezogen werden. Raman-Spektren werden in Rückstreuung registriert und spektrale Beiträge von Kristallen dominieren, falls der Laser mit einem Durchmesser zwischen 1 und 10 μm auf ihnen fokussiert wird. IR-Spektren werden meistens in Transmission registriert und potentielle spektrale Beiträge von Mikrokristallen überlappen immer mit den darunter liegenden spektralen Beiträgen von Gewebe. Darüber hinaus wurde eine Blende von $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ eingesetzt, um die Probenfläche für jedes Element des FTIR-Images zu definieren. Jedes Spektrum entspricht einem Durchschnitt dieser Fläche. Deshalb ist es schwieriger, kleine Objekte innerhalb der Blendenöffnung zu identifizieren. Dieser Effekt, der auch als spektrale Verdünnung (engl. spectral dilution) bezeichnet wird [Lasch 2006], wurde auch schon beim Nachweis der infektiösen Form des Prion Proteins in Hamstern beobachtet [Kneipp 2004]. Das mit Prionen infizierte Gewebe konnte nur mit einer kleinen Blende von 20 μm Durchmesser detektiert werden. Ein weiterer Grund geht auf ein Konzept von Diem und Mitarbeitern zurück [Diem 1999]. Da kleine, dichte Teilchen wie Zellkerne nahezu die gesamte IR-Strahlung absorbieren, erscheinen sie dunkel und sind im IR-Spektrum nicht sichtbar. Der gleiche Effekt kann auch für Mikrokristalle auftreten.

Ein wesentlicher Nachteil von Raman-Imaging im seriellen Mapping-Modus sind die längeren Messzeiten im Vergleich zum FTIR-Imaging, das inzwischen weit verbreitet ist und kurze Messzeiten erlaubt, wie in der Zusammenfassung von Referenz [CK12] beschrieben wurde. Im Ausblick (Abschnitt 4) wird die Entwicklung neuer Raman-Imaging-Verfahren diskutiert. In [CK7] wurde die Spektrenaufnahme der Raman-Images durch die Aktivierung der Autofokus-Funktion zusätzlich verzögert. Da die Schichtdickenvariationen größer waren als die Tiefenschärfe des eingesetzten Objektivs (100 \times /NA 0.95), musste der Laserfokus vor jeder Spektrenaufnahme in einem automatisierten iterativen Prozess mit einer Genauigkeit von 1 μm optimiert werden. Bei einer Messzeit von 30 Sekunden pro Spektrum konnten auf diese Weise nur 30 Spektren pro Stunde aufgenommen werden. Um die gesamte Probe in einer vertretbaren Zeit von einigen Stunden mittels Raman-Imaging zu erfassen, wurde eine Schrittweite von 100 μm bei einem Laserdurchmesser von 10 μm gewählt. Das sog. Undersampling-Verhältnis kann somit als $100^2/10^2=100$ abgeschätzt werden. Wenn die Schrittweite um einen Faktor 10 auf 10 μm reduziert worden wäre, hätten sich die Spektrenanzahl und die Gesamtmesszeit um Faktor $10^2=100$ erhöht, da sowohl in der x- als auch in der y-Dimension jeweils zehnmal mehr Spektren registriert werden müssen.

Die Ergebnisse der Raman-Images von getrockneten Gewebeschnitten können als Grundlage für Untersuchungen von nativen, nicht getrockneten Gewebeproben heran-

gezogen werden, die wiederum Voraussetzung für potentielle *in vivo* Anwendungen sind. Die Analyse nativer Proben bietet unter anderem den Vorteil, dass keine Trocknungsartefakte wie die Kristallisation hydrophober Bestandteile oder Schrumpfung auftreten.

Raman-Spektroskopie von nativen Gliom-Proben [CK4]

Neurochirurgische Resektion von Hirntumoren ist die am weitesten verbreitete Behandlung von Hirntumorpatienten, weil dadurch der Masseffekt des Tumors auf normales Gewebe reduziert wird und das resezierte Tumormaterial eine genaue histologische Diagnose erlaubt, die als Entscheidungsgrundlage für die folgende Therapie dient. Es ist allgemein akzeptiert, dass eine vollständige Tumorsektion die Überlebenschancen der Patienten erhöht. Um dieses Ziel unter minimaler Beeinträchtigung von Hirnfunktionen zu erreichen, ist eine genaue Identifikation der Hirntumorgrenzen während der Operation erforderlich. Zurzeit bestimmen Neurochirurgen die Tumorgrenzen durch visuelle Inspektion und durch chirurgische Navigationssysteme. Diese sog. Neuronavigation ist eine Technik, die die Informationen aus präoperativen CT, MRT oder aus intraoperativen Ultraschall (IOUS) in das Operationsfeld überträgt und so die Orientierung unterstützt. Zu den Einschränkungen dieser Techniken gehören, dass (i) die wahren infiltrativen Tumorgrenzen in CT- und MRT-Images nicht sichtbar sind, (ii) Fehler bei der Aufnahme und Masseverschiebungen bei der Operation die Genauigkeit der Neuronavigation beeinträchtigen, (iii) primäre Hirntumoren – nicht wie die meisten sekundären Hirntumoren – keine klaren Grenzen besitzen und die Ränder in den IOUS-Images unscharf erscheinen und (iv) es selbst für erfahrene Neurochirurgen schwierig ist, niedriggradige Gliome und deren Tumorgrenzen von normalem Hirngewebe zu unterscheiden. Wegen ihrer instrumentellen Komplexität ist eine kontinuierliche Echtzeitanalyse des Resektionsbereiches mittels IOUS und intraoperatives MRT nicht möglich. Einsatz von IOUS und MRT erfordern eine Unterbrechung des Operationsablaufs, um einzelne Messungen durchzuführen, was nur für eine begrenzte Anzahl von Untersuchungen realistisch ist. Raman-Spektroskopie ist eine der biophotonischen Techniken aus Abschnitt 2, die zur nichtdestruktiven und Echtzeitanalyse von Hirngewebe eingesetzt werden kann und während einer Operation eine Diagnose erlaubt. Prinzipiell kann diese Methode wie die Fluoreszenzspektroskopie mit Endoskopie gekoppelt oder in Operationsmikroskope integriert werden.

Raman-Images in [CK4] von natürlichen, nicht getrockneten Hirngewebeproben wurden erstmalig *ex vivo* mit einem Raman-Spektrometer aufgenommen, das mit einem Mikroskop mit niedriger Vergrößerung (Objektiv 10× /NA 0.25) gekoppelt war. 2×2 mm² große Bereiche von 2 mm dicken Gewebeschnitten wurden mit einem Fenster abgedeckt und mit einer Schrittweite von 100 µm abgerastert. Obwohl Reflexionen am Fenster die Signalintensitäten um ca. 50% verringerten, war die Abdeckung notwendig, um das Austrocknen der Proben während der Messung zu verhindern. Der Laser mit einer Intensität von 60 mW wurde auf einen Durchmesser von ca. 60 µm fokussiert. Fünf Proben wurden untersucht. Darunter waren normales Hirngewebe aus einer Autopsie, Tumoren eines Meningeom-Patienten und dreier Gliom-Patienten. Eine Schädigung des Gewebes während der Messzeit von 20 Sekunden pro Spektrum wurde nicht beobachtet. Die Raman-Spektren in den Datensätzen wurden durch eine Cluster-Analyse im Intervall 1200 bis 1800 cm⁻¹ in zwei Gruppen sortiert. Dieses Intervall wurde gewählt, weil es intensive spektrale Beiträge der Hauptbestandteile Wasser (1635 cm⁻¹), Proteine (1660 cm⁻¹) einschließlich Kollagen (1247 cm⁻¹), Hämoglobin (1566 cm⁻¹) und Lipiden (1440 cm⁻¹) einschließlich Cholesterin (1670 cm⁻¹) enthält. Spektrale Varianzen innerhalb eines Datensatzes und zwischen verschiedenen Proben wurden in Cluster-gemittelten Raman-Spektren charakterisiert. Die beiden Cluster in normalem Hirngewebe wurden analog zu den FTIR-Images von Dünnschnitten [CK2, CK9, CK11] Weißer und Grauer Substanz zugeordnet. Spektrale Beiträge von Lipiden dominierten in den Raman-Spektren von Weißer Substanz im Vergleich zu den geringeren spektralen Beiträgen von Proteinen und Wasser. Während CH-, CC- und CO-Gruppenschwingungen von Lipiden oberhalb von 1000 cm⁻¹ unspezifisch sind und deshalb für die Bestimmung des Gesamtlipidgehalts

herangezogen werden können, wurden unterhalb von 1000 cm^{-1} spezifische Schwingungsbanden der hydrophilen Kopfgruppen von Lipiden aufgelöst. Diese Banden können herangezogen werden, um Änderungen der Lipidzusammensetzung zu untersuchen. Im Raman-Spektrum von Grauem Gewebe sanken die Intensitäten von Lipidbanden und die Intensitäten von Wasserbanden stiegen, was mit dem geringeren Lipidgehalt und dem höherem Wassergehalt in diesem Gewebetyp übereinstimmte. Die Raman-Spektren des Meningeoms wurden verglichen mit dem Raman-Spektrum von Meninges, also normaler Hirnhaut. Im Allgemeinen waren die spektralen Beiträge von Proteinen intensiver als in normalem Hirngewebe. Im Besonderen konnten einige Raman-Banden Kollagen zugeordnet werden, welche zum einen in Meningeomen schwächer waren als in Meninges und zum anderen die Hauptvarianzen zwischen den beiden Cluster-gemittelten Raman-Spektren ausmachten. Kollagen unterscheidet sich von anderen Proteinen durch die Primärstruktur, die reich an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin ist, und durch die Sekundärstruktur, die durch eine dreisträngige Helix charakterisiert ist. In den Raman-Spektren von Astrozytom Grad III und GBM waren die spektralen Beiträge von Lipiden geringer als in den Raman-Spektren von normalem Hirngewebe. Darüber hinaus wurden zusätzliche spektrale Beiträge von Hämoglobin identifiziert, was auf Einblutungen oder eine höhere Durchblutung deutet und typisch für Hirntumoren ist. Die Hauptunterschiede innerhalb der Raman-Images wurden der Hämoglobinkonzentration zugeordnet. Die Hämoglobinbanden werden auf einen Resonanzeffekt des Chromophors Häm zurückgeführt, deren Intensitäten bei der Anregungswellenlänge von 785 nm verstärkt werden [Sato 2001, Wood 2002]. Des Weiteren hängen diese Banden von der Probenvorbehandlung ab. Im Raman-Spektrum einer GBM-Probe, die nicht eingefroren sondern direkt nach der Entnahme untersucht wurde, unterschieden sich die relativen Intensitäten und Positionen der Hämoglobinbanden im Vergleich zu den Raman-Spektren von Proben, die vor der Messung eingefroren, gelagert und wieder aufgetaut wurden. Die spektralen Beiträge von Proteinen und Lipiden änderten sich dagegen nicht signifikant. Ein weiteres spektrales Merkmal der Raman-Spektren von Gliomen ist ein Intensitätsanstieg der Bande bei 717 cm^{-1} . Diese Bande wird der Cholin-Gruppe der Lipide PC und Sphingomyelin zugeordnet. Ein Anstieg ist konsistent mit einer höheren Konzentration von PC in Gliomen, während die Konzentrationen der anderen Lipide sinken. Diese Änderung der Lipidzusammensetzung wurde durch unabhängige Methoden wie NMR-Spektroskopie [Sijens 1996] und Chromatographie [Campanella 1992] belegt.

In den Raman-Spektren wurde eine quantitative Auswertung des Lipid-Protein-Verhältnisses auf Grundlage von einzelnen Banden, was für die IR-Spektren durchgeführt wurde, durch einen starken Überlapp der intensivsten Signale und durch ein geringeres Signal-Rausch-Verhältnis erschwert. Als alternatives Verfahren, um die Zusammensetzung zu bestimmen, wurde der gesamte spektrale Bereich durch eine Linearkombination von Referenzspektren gefittet und die Verhältnisse der Fitparameter anstelle der Bandenintensitäten analysiert. Ähnliche Strategien wurden angewendet, um die Zusammensetzung von Arterien [Brennan 1997] und von Brustgewebe [Shafer-Peltier 2002] zu bestimmen. Es stellte sich heraus, dass die vier Raman-Spektren von Proteinen, Lipiden, Cholesterin und Wasser ausreichend sind, um die wesentlichen Beiträge in die Raman-Spektren von Hirngewebe zu modellieren [Krafft 2003]. Das Raman-Spektrum von Hämoglobin wurde nicht berücksichtigt, weil dessen Signale – wie oben beschrieben – von der Probenvorbehandlung abhängen und dieser Zusammenhang noch nicht genau genug bekannt ist. Die auf diese Weise berechneten Lipid-Protein-Verhältnisse sind 1.2 für Weißes Gewebe, 0.44 für Graues Gewebe, 0.25 für Astrozytom Grad III und 0.22 für GBM. Der beobachtete Rückgang mit steigender Malignität stimmt mit den IR-Daten überein und wird die Basis für ein überwachtetes Klassifikationsmodell bilden, um normales Hirngewebe von malignen Hirntumoren zu unterscheiden. Für das Trainieren und Validieren von Modellen auf Grundlage von Raman-Imaging sind jedoch noch mehr unabhängige Datensätze notwendig. Differenzen zwischen den Raman-Spektren und den gefitteten Spektren deuten auf Unterschiede in den Protein- sowie den Lipidzusammen-

setzungen und auf zusätzliche Bestandteile wie Hämoglobin. Das Fitverfahren kann durch Basisspektren von Proben, die direkt aus Hirngewebe extrahiert wurden, und natürlich durch zusätzliche Basisspektren optimiert werden.

3.1.2 Sekundäre Hirntumoren [CK9, CK11, CK14]

Krebs, der in einem Teil des Körpers beginnt, kann sich in anderen Teilen wie dem Gehirn ausbreiten und sekundäre Hirntumoren verursachen, die auch als Hirnmetastasen bezeichnet werden. Die Angaben zur Häufigkeit von Hirnmetastasen schwanken in der Literatur erheblich. Gemäß eines Übersichtsartikels [Polyzoidis 2005] treten in rund 15 bis 40% aller Krebspatienten Hirnmetastasen auf. In den letzten Jahren stieg dieser Anteil, weil die tomographischen Techniken empfindlicher wurden, um diese Tumoren zu detektieren, und weil sich auch die Lebenserwartung der Krebspatienten erhöhte. Sekundäre Hirntumoren werden in den USA bei ca. 80000 Patienten festgestellt. Damit sind sie die häufigsten Tumoren des zentralen Nervensystems und bilden eine größere Gruppe als die 18000 Patienten mit primären Hirntumoren. Der Sekundärtumor ist verantwortlich für die Erstsymptome in fast 50% der Patienten, die mit einer Hirnmetastase operiert werden. Die Tatsache, dass die Hirnsymptome zuerst auftreten, mag damit zusammenhängen, dass Hirnmetastasen von Ödemen umgeben sind, die in einem früheren Stadium Symptome verursachen können. Dagegen treten andere Erscheinungsformen oft später auf, wie z.B. Lungensymptome bei Lungenkrebs. Tumoren des Respirationstraktes sind mit einem Anteil von 50% die häufigste Primärtumoren von Hirnmetastasen, gefolgt von Brustkrebs (15%), dem malignen Melanom der Haut (11%), Nierenkrebs und Darmkrebs [Kleihues 2000]. Die Diagnose einer Hirnmetastase bei einem Patienten mit einem bekannten Krebsherd ist relativ einfach. Jedoch ist bei bis zu 30% der Hirnmetastasenpatienten der Primärtumor zum Zeitpunkt der Operation nicht bekannt. Deshalb dient der neurochirurgische Eingriff nicht nur dazu, den Tumor zu entfernen, sondern auch um Gewebematerial für eine genaue Diagnose zu sammeln. Die Mehrzahl der Fälle sind schwach differenzierte Adenokarzinome von Drüsenepithelgewebe, die in Hirnmetastasen sogar noch schwächer differenziert sind. Da Epithelgewebe die Oberfläche vieler Organe bedeckt und einer großen Vielfalt von aggressiven chemischen und physikalischen Bedingungen ausgesetzt ist, gehören diese Karzinome zu den häufigsten Krebsformen von Lunge, Brust, Darm, Prostata, Magen, Bauchspeicheldrüse und Gebärmutterhals. Unglücklicherweise weisen Adenokarzinome von verschiedenen Organen eine ähnliche mikroskopische Erscheinungsform auf, die eine histologische Diagnose erschweren und fast unausweichlich die Anwendung zusätzlicher Methoden erfordern. Zur Ergänzung der Histopathologie wird die Immunhistochemie eingesetzt, die zell- und gewebespezifische Antigene durch eine Antikörperreaktion nachweist. Obwohl eine Reihe von Antikörpern verfügbar sind, um den Zelltyp und in einigen Fällen sogar das Organ zu klassifizieren, ist der Nutzen dieser Methode noch beschränkt. Als Konsequenz wird bei bis zu 15% der Patienten mit Hirnmetastasen der Primärtumor trotz umfassender Untersuchungen nicht identifiziert. Aus diesem Grund ist die Anzahl der Hirnmetastasen mit unbekanntem Primärtumor in der gleichen Größenordnung wie die Anzahl der primären Hirntumoren. Da der Primärtumor der limitierende Faktor für die Prognose in ca. 80% der Patienten ist [Schackert 2001], ist eine frühe Identifikation des Primärtumors wichtig, um eine organspezifische Therapie einzuleiten. FTIR-Imaging in Kombination mit multivariater Klassifikation bietet einen neuen Ansatz, den Primärtumor von Hirnmetastasen zu bestimmen. IR-Spektroskopie untersucht chemische und strukturelle Eigenschaften von Gewebe auf molekularer Ebene. Deshalb besitzen die IR-Spektren, die spezifischen Fingerabdrücken entsprechen, das Potenzial, die molekulare Information der Metastasezellen zu erfassen und dem Primärtumor zuzuordnen. Analog zum FTIR-Imaging von Gliomen wurden FTIR-Images von Hirnmetastasen mit einer lateralen Auflösung von 63 μm aufgenommen, um eine Probenfläche von $4 \times 4 \text{ mm}^2$ in wenigen Minuten zu analysieren. Diese laterale Auflösung war ausreichend, um die molekulare Information der Hauptgewebeklassen in heterogenen

Dünnschnitten von 20 Proben zu identifizieren. Darunter waren drei Proben von normalem Hirngewebe aus Autopsien, sieben Hirnmetastasen von Nierenkrebs (NK), vier Hirnmetastasen von Lungenkrebs (LK), drei Hirnmetastasen von Darmkrebs (DK) und drei Hirnmetastasen von Brustkrebs (BK).

LDA-Klassifikationsmodell für FTIR-Images von Hirnmetastasen [CK9]

Die Auswertung der FTIR-Images begann mit einer Cluster-Analyse, um die Probe in mehrere Bereiche mit ähnlichen IR-Spektren zu segmentieren. Anschließend wurden die Cluster-gemittelten Spektren verglichen. Neben den gewebespezifischen Merkmalen in den Spektren können spektrale Varianzen auftreten (i) aufgrund physikalischer Effekte innerhalb der Probe wie Schichtdickenvariationen oder Streuung von IR-Strahlung an den Geweberändern sowie (ii) aufgrund Patienten abhängiger Eigenschaften zwischen verschiedenen Proben gleichen Typs. In [CK9] wurden beispielhaft FTIR-Images beschrieben, in denen innerhalb einer Probe die chemische Zusammensetzung variierte und in denen sich die IR-Spektren von drei Proben des gleichen Gewebetyps geringfügig unterschieden. Ziel der Datenvorbehandlung war, diese Varianzen durch Normierung und eine Untergrundkorrektur zu reduzieren und die gewebetypischen Varianzen zu erhalten. Die zweite Ableitung der IR-Spektren als alternative Methode zur Datenvorbehandlung bietet keine Vorteile, so dass sie in dieser und in keiner anderen Studie eingesetzt wurde. Voraussetzung für ein erfolgreiches Klassifikationsmodell ist, dass die Varianzen innerhalb einer Gewebeklasse kleiner sind als die Varianzen zwischen verschiedenen Gewebeklassen. Die IR-Spektren von Weißer Substanz sind analog zu [CK2] durch maximale spektrale Beiträge von Lipiden bei 1060, 1080, 1235, 1380, 1467, 1740, 2850 und 2922 cm^{-1} charakterisiert. Die Intensitäten von Lipidsignalen sinken in IR-Spektren von Grauer Substanz. Sie sind jedoch immer noch intensiver als die Lipidbanden in den IR-Spektren von Hirnmetastasen. Deshalb scheint das Lipid-Protein-Verhältnis – wie bei den Gliomen – normales Hirngewebe von Hirntumoren zu unterscheiden. In IR-Spektren von NK sind zusätzliche spektrale Beiträge bei 1026, 1080, 1153 und 3290 cm^{-1} sichtbar, die auf Glykogen hinweisen. Da die Expression von Glykogen eine typische Eigenschaft von Nierenzellen ist, sind diese IR-Banden konsistent mit einer Hirnmetastase von Nierenkrebs als Primärtumor. Die IR-Spektren von normalen Hirngeweben, von LK, DK und BK zeigen keinen spektralen Fingerabdruck von Glykogen, was deshalb als molekularer Marker für NK betrachtet werden kann. Die molekularen Marker waren weniger deutlich in LK, DK und BK, und die IR-Spektren waren auf dem ersten Blick ähnlich. Ein genauer Vergleich ergab jedoch signifikante Differenzen. Die Amid II-Bande bei 1542 cm^{-1} ist intensiver und die Amid I-Bande besitzt eine Schulter bei 1625 cm^{-1} in IR-Spektren von LK. Die Intensität bei 1400 cm^{-1} ist minimal in IR-Spektren von DK. Die Intensität bei 1735 cm^{-1} ist minimal in IR-Spektren von BK. Aus diesen spektralen Merkmalen wurden die folgenden acht Intensitätsverhältnisse als Variablen für ein LDA-Modell definiert, um die FTIR-Images von den sechs Gewebetypen Weiße Substanz und Graue Substanz in normalem Hirngewebe sowie von NK, LK, DK und BK zu klassifizieren und den Primärtumor von Hirnmetastasen zu identifizieren: (1030+1153)/1655, 1080/1655, 1400/1655, 1542/1655, 1629/1655, 1735/1655, 2850/1655, 3290/1655. Weil die spektralen Differenzen zwischen den Gewebetypen zum Teil klein sind, waren hier acht Variablen erforderlich, während drei Variablen in einem LDA-Modell ausreichen, um maligne Gliome aufgrund ihrer IR-Spektren zuzuordnen. Das LDA-Modell für Hirnmetastasen wurde mit ausgewählten IR-Spektren trainiert und auf FTIR-Images von drei normalen Hirnproben und von 17 Hirnmetastasen angewendet.

Die FTIR-Images der drei normalen Proben wurden zu mehr als 95% korrekt zu Grauer und Weißer Substanz zugeordnet. Falsch-Positiv-Zuordnungen von 0.2%, 1.3% und 4.6%, die Zuordnungen zu Hirnmetastasen entsprechen, wurden überwiegend in Bereichen mit Grauer Substanz beobachtet. Die FTIR-Images der sieben NK-Proben sind zwischen 100% und 39% zu NK zugeordnet worden. Wenn das Kriterium eingeführt wird, dass die Klasse mit der höchsten Zuordnung den Primärtumor bestimmt, wird der Primärtumor in allen NK-Proben richtig identifiziert. Eine Klassifikationsrate in NK von

weniger als 100% kann durch mehrere Gründe verursacht werden. Zum einen sind in einigen Probenbereichen die spektralen Beiträge von Glykogen geringer. Zum anderen sind in einigen Dünnschnitten Anteile von normalem Hirngewebe oder von Gewebetypen vorhanden, die noch nicht im Klassifikationsmodell enthalten sind. Diese Problematik wurde detailliert für eine NK-Probe diskutiert, die durch die Standardverfahren als „Hirnmetastase mit Verdacht auf Nierenkrebs oder Lungenkrebs als Primärtumor“ diagnostiziert wurde. Das LDA-Modell segmentierte die Probe in 46% NK, 21% normales Hirngewebe und 33% anderes Gewebe. Der Nachweis von Glykogen in den IR-Spektren und die höchste Klassifikationsrate unterstützte die Diagnose von Nierenkrebs als Primärtumor. Die histopathologische Prüfung bestätigte, dass der als normales Hirngewebe zugeordnete Bereich keine Tumorzellen enthielt, sondern aus Ödem und reaktiver Gliose bestand. Die Übergangszone zwischen NK und normalem Gewebe, die anderem Gewebe zugeordnet wurde, war eine Mischung aus Nekrosen, zerebraler Gliose und isolierten Tumorzellen ohne Glykogenakkumulation. Da das Klassifikationsmodell nicht für diese Gewebetypen trainiert wurde, sind diese Bereiche inkorrekt zu LK, DK und BK zugeordnet worden. Die FTIR-Images der vier DK-Proben wurden zwischen 81% und 33% zu DK zugeordnet. Ein signifikanter Überlapp mit BK wurde festgestellt, der in einem Gewebedünnschnitt 53% betrug und für die einzige fehlerhaft zugeordnete Probe innerhalb des Datensatzes verantwortlich war. Der Überlapp kann damit erklärt werden, dass (i) die IR-Spektren von DK und BK sehr ähnlich sind, (ii) die spektralen Merkmale für diesen beiden Klassen im LDA-Modell nur durch jeweils eine Bande bei 1400 und 1735 cm^{-1} beschrieben werden und (iii) diese Banden darüber hinaus relativ schwache Intensitäten besitzen, weshalb sie besonders fehleranfällig sind. Die FTIR-Images der drei BK-Proben wurden zwischen 86% und 89% zu BK zugeordnet. Hier wurde nur ein geringer Überlapp mit DK beobachtet. Die hohe korrekte Klassifikationsrate und der geringe Überlapp deuten daraufhin hin, dass die Gewebedünnschnitte relativ homogen sind. Die FTIR-Images der drei LK-Proben wurden zwischen 70% und 83% zu LK zugeordnet. Der Überlapp mit den anderen Proben zeigt keine klare Tendenz, so dass als Erklärung für die inkorrekten Klassifikationen spektrale Rauscheffekte in Betracht gezogen werden können.

SIMCA-Klassifikationsmodell für FTIR-Images von Hirnmetastasen [CK11]

Die Genauigkeit des LDA-Klassifikationsmodells kann erhöht werden, wenn mehr Variablen zur Beschreibung der molekularen Eigenschaften berücksichtigt werden. Ein verwandter Ansatz zur Erkennung von Prostatagewebe durch FTIR-Imaging nutzte 20 spektrale Merkmale [Fernandez 2005]. Ein anderer überwachter Klassifikationsalgorithmus bietet eine weitere Möglichkeit. Dieser Ansatz wurde in Referenz [CK11] umgesetzt, in dem zum ersten Mal der Algorithmus „Soft independent modeling of class analogies“ (SIMCA) zur Klassifikation von FTIR-Images angewendet wurde. Das Verfahren basiert auf einer Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA), die eine Datenmatrix in ein neues Koordinatensystem projiziert, um die Varianzen innerhalb des Datensatzes durch Hauptkomponenten zu beschreiben, die orthogonal zueinander sind [Wold 1987]. Da die erklärte Varianz pro Hauptkomponente mit steigender Hauptkomponentenzahl sinkt, enthalten die ersten Hauptkomponenten nahezu die gesamte Varianz, während die höheren Hauptkomponenten von Rauschsignalen dominiert sind. PCA ist ein häufig eingesetzter multivariater Ansatz, um FTIR-Images zu analysieren [Lasch 1998, Schultz 2002] oder um das Rauschen in spektroskopischen Daten zu reduzieren [Uzunbajakava 2002]. Eine einzelne Hauptkomponente ist als Variable für ein LDA-Klassifikationsmodell genutzt worden, um Tumorgewebe von Nekrosen mittels Raman-Spektroskopie zu unterscheiden [Koljenovic 2002]. Der SIMCA-Algorithmus, dessen Konzept von Wold entwickelt wurde [Wold 1976], nutzt eine definierte Anzahl von Hauptkomponenten für eine überwachte Klassifikation. Trainingsdaten für jede Klasse repräsentieren die spektralen Eigenschaften und die natürliche Varianz der Gewebetypen. Eine PCA wird für jede Klasse des Trainingsdatensatzes durchgeführt. Ein SIMCA-Modell fasst die Hauptkomponenten aller Klassen zusammen. Das SIMCA-Modell für die Klassifikation von Weißer Substanz, Grauer

Substanz, NK, LK, DK und BK bestand aus 10 Hauptkomponenten pro Klasse im Wellenzahlenbereich von 950 bis 1800 cm^{-1} . Die Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant mit 8 oder 12 Hauptkomponenten, was auf einen geringen Einfluss der höheren Hauptkomponenten deutet. Eine Cluster-Analyse von FTIR-Images diente als Grundlage, um bestimmte Bereiche als Trainingsdaten auszuwählen. Die Auswahl wurde durch eine histopathologische Bewertung eines H&E-gefärbten Paralleldünnschnittes abgesichert. Das Klassifikationsverfahren bestand aus drei Schritten: (1) eine PCA wurde von Testdaten durchgeführt, (2) die Hauptkomponenten wurden in den 10-dimensionalen Datenraum projiziert, der von den Trainingsdaten gebildet wurde, (3) und die Daten wurden der Klasse mit der geringsten Distanz zugeordnet. Der SIMCA-Algorithmus der PLS-Toolbox (Eigenvector Research, USA) wurde unter der Matlab-Programmumgebung eingesetzt.

Die Cluster-gemittelten Spektren von jedem FTIR-Image, das zum Trainieren des SIMCA-Modells herangezogen wurde, wurden verglichen. Einige IR-Spektren besaßen einen erhöhten Untergrund, eine zu niedrigeren Wellenzahlen verschobene Amid II-Bande und eine verbreiterte Amid I-Bande. Da Spektren insbesondere an den Rändern und in der Nähe von Rissen von den Änderungen betroffen waren, wurde dieses Phänomen auf Streu- und Schichtdickeneffekte zurückgeführt und nicht auf chemische oder molekulare Eigenschaften [Romeo 2005]. Ähnliche Effekte traten auch in Gewebebereichen auf, die auf Nekrosen deuteten. Ausgedehnte Nekrosen sind nicht ungewöhnlich in Gewebe von Hirnmetastasen. Die entsprechenden Cluster, in denen diese Effekte auftraten, wurden nicht als Trainingsdaten berücksichtigt. Allerdings blieben die IR-Spektren als Testdaten in den FTIR-Images. Bei der Reklassifikation stellte sich heraus, dass trotz der spektralen Unterschiede das SIMCA-Modell in der Lage war, einen Großteil dieser Spektren genauso wie die Trainingsspektren zur korrekten Klasse zuzuordnen. Das Ergebnis verdeutlicht, dass das Klassifikationsmodell robust gegenüber diesen spektralen Änderungen ist und die zugrunde liegende molekulare Information in den betroffenen Bereichen erkennen kann. Auch die unabhängigen Datensätze von Hirnmetastasen werden ohne Ausnahme vom SIMCA-Modell zur korrekten Klasse zugeordnet, wenn das zuvor eingeführte Kriterium der mehrheitlichen Klassifikationsrate angewendet wird. Überlappende, inkorrekte Zuordnungen traten für LK, BK und DK auf und weniger für Weißes Gewebe, Graues Gewebe und NK. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das LDA-Modell gemacht. Gründe waren wahrscheinlich die deutlicheren spektralen Signaturen von normalem Hirngewebe und von NK, während die spektralen Differenzen zwischen LK, BK und DK schwächer waren.

Qualitativ stimmen die Ergebnisse des SIMCA-Modells mit den Ergebnissen des LDA-Modells gut überein. Beide Modelle scheinen in der Lage zu sein, die diagnostischen Informationen in den Spektren zu beschreiben und für eine Gewebeidentifikation zu nutzen. Quantitativ unterschieden sich die Klassifikationsraten des SIMCA- und des LDA-Modells, weil unterschiedliche Trainingsdaten und unterschiedliche Klassifikationsverfahren eingesetzt wurden. Ein Diagramm in Referenz [Krafft 2008] stellt die Klassifikationswerte der beiden Modelle gegenüber. In 12 von 17 Hirnmetastasen war die Klassifikation mit dem SIMCA-Modell besser als mit dem LDA-Modell. Dieser Vergleich deutet an, dass der SIMCA-Algorithmus die diagnostischen spektralen Merkmale umfassender beschreiben kann. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache eingeschränkt, dass vier FTIR-Images von Hirnmetastasen als Trainingsdaten für das SIMCA-Modell dienten. Diese Datensätze stellen deshalb keine unabhängigen Testdaten dar und die Werte zeigen nur eine Reklassifikationsrate, die gewöhnlich sehr hoch ist. Wenn dieser Umstand berücksichtigt wird, schrumpft der Vorteil des SIMCA-Modells auf 8 höhere Zuordnungsraten von 13 Proben. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, auch die Genauigkeit von anderen Algorithmen zur Mustererkennung wie Artificielle Neuronale Netzwerke oder Support Vector Machines für diese Daten zu prüfen und dann den besten Algorithmus oder eine Kombination von Algorithmen für diese Anwendung zu wählen.

Nachdem zwei multivariate Klassifikationsmodelle die Machbarkeit einer Identifikation des Primärtumors von Hirnmetastasen durch FTIR-Images demonstrierten, ist das Ziel weiterer Studien, die Modelle durch optimierte Trainingsdaten zu verfeinern und mehr unabhängige FTIR-Images zur Validierung aufzunehmen. Im Allgemeinen resultieren inkorrekt zugeordnete IR-Spektren aus der Anwesenheit von unbekanntem Gewebeklassen, so dass die Modelle in dieser Hinsicht erweitert werden müssen. Bis jetzt geben die Verfahren nur sinnvolle Ergebnisse, wenn die Hirnmetastase zu einem Primärtumor gehört, für den das Modell trainiert wurde. Um diese Einschränkung zu überwinden, ist es erforderlich, andere Primärtumoren von häufigen Hirnmetastasen – wie das maligne Melanom der Haut – hinzuzufügen. Zukünftige Studien werden darüber hinaus zeigen, ob auch Varianten von Hirntumoren, z.B. Brustkrebs von glandularen oder lobularen Adenokarzinomen, mit diesem Ansatz unterschieden werden können.

Raman- und FTIR-Images von Metastasen in Mäusehirnen [CK14]

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von neuen diagnostischen Methoden ist ihre Anwendung in Tiermodellen, um die Instrumente und die Strategien zur Datenanalyse zu testen und weiter zu optimieren. In Arbeit [CK14] wurde ein Mausmodell eingesetzt, in dem durch Injektion von Tumorzellen in die Halsschlagader Hirntumoren induziert wurden [Schackert 1988, Kirsch 2005]. Durch die Auswahl der Tumorzellen können auf diese Weise sowohl primäre Hirntumoren (Gliome) als auch sekundäre Hirntumoren (Hirnmetastasen von Lungenkrebs, Darmkrebs, malignes Melanom) erzeugt werden. Nach der Injektion entwickelt sich bevorzugt ein Tumor in einer Hirnhemisphäre, während die andere Hirnhemisphäre tumorfrei bleibt und als interne Kontrollprobe herangezogen werden kann. Dies stellt einen Vorteil im Vergleich zu humanen Hirntumoren dar, die während einer Operation gesammelt werden, da hier normales Gewebe soweit wie möglich geschont wird. Deshalb steht in den meisten Fällen keine normale Probe von diesem Patienten zur Verfügung. Referenz [CK14] vergleicht FTIR- und Raman-Images von normalen Mäusehirnen und Mäusehirnen mit Metastasen von malignen Melanomen. Im Vergleich zur ersten Raman-Imaging-Studie von humanen Hirntumoren in [CK4] waren die Ziele, (i) nicht getrocknete Hirnproben so zu präparieren, dass Referenzinformationen erhalten werden können, (ii) Raman-Images mit einer faseroptischen Sonde aufzunehmen und (iii) die zuvor erhaltenen Ergebnisse auf ein Tiermodell zu übertragen. Damit soll geprüft werden, ob die Methoden robust und empfindlich genug sind, um Hirntumoren in der Gegenwart von verschiedenen normalen Gewebetypen nachzuweisen.

Von vollständigen Mäusehirnen wurden für die IR-Spektroskopie 10 µm dicke, getrocknete Dünnschnitte auf CaF₂-Substraten, für die Raman-Spektroskopie 2 mm dicke, nicht getrocknete Gewebeprobe und für die Histopathologie H&E-gefärbte Dünnschnitte präpariert. Die aufeinander folgende Präparation schuf die Voraussetzung, die Images miteinander zu vergleichen. Die Datenaufnahme unterschied sich im Vergleich zu den übrigen Arbeiten. FTIR-Images mit einer lateralen Auflösung von 25 µm wurden durch das FTIR-Imaging Spektrometer Spotlight 300 (Perkin Elmer, England) aufgenommen, das mit einem Array aus 16 Elementen als Vielkanaldetektor ausgestattet war. Die Probe wurde mit diesem kleinen Array abgerastert. Pro Position wurden lediglich zwei Interferogramme gemittelt, was jedoch zu etwas höheren Signal-Rausch-Verhältnissen in den Spektren führte als die Akkumulation von 19 Scans mit einem 64×64 FPA-Detektor [9]. Die Aufnahmegeschwindigkeiten waren sowohl mit dem kleinen als auch mit dem großen Array in der gleichen Größenordnung. Raman-Images wurden von den Proben auf einem motorisierten Tisch mit einer faseroptischen Sonde (Inphotonics, USA) aufgenommen, die mit dem Raman-Spektrometer (Kaiser Optical Systems, USA) gekoppelt war. Die faseroptische Sonde fokussierte den Laser auf eine Fläche von 60 µm Durchmesser, was identisch ist mit dem Laserfokus unter dem Mikroskop mit dem Objektiv 10×/NA 0.25. Die Messzeit betrug 8 Sekunden pro Spektrum und die Schrittweite 120 µm, was ein Undersampling-Verhältnis von 2 ergab. Während der Datenaufnahme wurden die nativen

Gewebeproben in eine Kammer mit Pufferlösung platziert und mit einem Fenster abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die FTIR-Images von getrockneten Dünnschnitten, die mehr als 100000 IR-Spektren enthielten, wurden mittels Cluster-Analyse im Intervall von 2750 bis 3050 cm^{-1} segmentiert. Dieser Wellenzahlenbereich wurde bereits früher gewählt, um verschiedene Hirngewebetypen zu unterscheiden [Koljenovic 2005 und 2007]. Die Cluster korrelierten mit anatomischen Strukturen eines Mäusehirns. Im Kleinhirn wurden Faserstränge aus Weißer Substanz und die zellreichen Bereiche der *cerebellar gyri* identifiziert. Der Hirnstamm und seine Verlängerung, die *cerebrale peduncle*, befanden sich unterhalb des Kleinhirns. Eine Zisterne war zwischen der linken und rechten Hirnhemisphäre lokalisiert. Ein dünner Ring umgeben von Weißer Substanz wurde einer Ventrikelwand zugeordnet. Kleine Flecken wurden Myelinfasern zugeschrieben, die senkrecht zur Schnittebene verliefen. Ein FTIR-Image eines vollständigen Mäusehirns mit dieser Fülle an Details wurde zum ersten Mal präsentiert. Die Cluster-gemittelten IR-Spektren von Maushirngewebe besaßen die gleichen Eigenschaften wie die IR-Spektren von humanem Hirngewebe. Weiße Substanz enthielt maximale spektrale Beiträge von Lipiden und Cholesterin, während im Mesencephalon und in Grauer Substanz der *cerebellar gyri* die Intensitätsverhältnisse von Lipid- und Proteinbanden geringer waren.

Die Raman-Images von benachbartem, nicht getrocknetem Gewebe wurden ebenfalls im Intervall von 2750 bis 3050 cm^{-1} mittels Cluster-Analyse segmentiert. Die größeren anatomischen Strukturen wie die Faserstränge im Kleinhirn, das Mesencephalon, die Zisterne und von Weißer Substanz umgebende Ventrikel wurden hier ebenfalls identifiziert. Die feineren Strukturen wie die *cerebellar gyri*, die Ventrikelwand oder die Myelinfasern wurden jedoch nicht aufgelöst. Ursache ist wahrscheinlich die geringere laterale Auflösung in den Raman-Images als Folge einer größeren Schrittweite von 120 μm im Vergleich zu der kleineren Pixelgröße von 25 μm in den FTIR-Images. Die Cluster-gemittelten Raman-Spektren von Maushirngewebe stimmten ebenfalls mit den Raman-Spektren von humanem Hirngewebe überein. Nach Normierung der Spektren auf die Intensität von Proteinbanden waren die Banden von Lipiden und Cholesterin in Weißer Substanz der Faserstränge maximal und nahmen im Mesencephalon und in Grauer Substanz ab. Die gute Übereinstimmung der Raman-Images mit den benachbarten FTIR-Images und den benachbarten H&E-gefärbten Dünnschnitten zeigte, dass die Verzerrungen des weichen Hirngewebes durch die Probenpräparation klein waren.

In zwei Raman-Images wurden Metastasen von malignen Melanomen identifiziert. Die Tumorgößen variierten zwischen vier Pixeln, was einer Fläche von $240 \times 240 \mu\text{m}^2$ entsprach, und 90 Pixeln, was einer Fläche von $1.1 \times 1.2 \text{ mm}^2$ entsprach. Die Positionen der Metastasen wurden in H&E-gefärbten Dünnschnitten bestätigt. Der Nachweis der Hirnmetastasen mittels Raman-Spektroskopie wurde durch einen Resonanzeffekt unterstützt. Das Pigment Melanin in den Metastasezellen absorbierte einen Teil der Anregungsstrahlung von 785 nm. Dadurch wurden die Raman-Banden von Melanin im Wellenzahlenbereich von 400 bis 1800 cm^{-1} um mehrere Größenordnungen verstärkt und eine Cluster-Analyse von Raman-Images in diesem Intervall gruppierte diese Raman-Spektren in Tumor- und Nichttumor-Cluster. Da die Banden oberhalb von 2750 cm^{-1} nicht verstärkt wurden, konnten die Tumoren nicht durch eine Cluster-Analyse im hohen Wellenzahlenbereich identifiziert werden. Das Verstärkungsprinzip ist als Resonanz-Raman-Effekt bekannt. Da das Pigment nicht im normalen Hirngewebe vorhanden ist, kann es als Tumormarker betrachtet werden, der sehr empfindlich mittels Raman-Spektroskopie detektiert wird. Neben der größeren Eindringtiefe der Strahlung in native, nicht getrocknete Gewebeproben bietet die Raman-Spektroskopie also als weiteren Vorteil die Möglichkeit, Mechanismen zur Signalverstärkung zu nutzen. Die Absorptionseffekte von Melanin können aber nicht nur zur Diagnose genutzt werden, sondern eröffnen zusätzlich eine Option für eine selektive Behandlung. Längere Bestrahlungszeit

oder höhere Bestrahlungsintensitäten des Lasers können irreversible Schäden in diesen Tumorzellen hervorrufen, während nicht absorbierende normale Zellen intakt bleiben.

Hirnmetastasen der malignen Melanome konnten in den FTIR-Images von den Dünnschnitten nicht nachgewiesen werden, obwohl eine Reihe von Auswerteverfahren in verschiedenen Spektralbereichen angewendet wurden. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Zunächst werden die spektralen Beiträge des Pigmentes Melanin nicht verstärkt, so dass die Unterschiede zwischen den IR-Spektren der in normalem Hirngewebe vorhandenen Zelltypen und den Hirnmetastasen vermutlich zu klein sind. Weiterhin bilden die Tumorzellen keinen soliden Tumor, so dass die laterale Auflösung von $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ pro Pixel wohl zu gering ist, um kleine, einzelne, verstreute Tumorzellen zu detektieren. Dieses als spektrale Verdünnung bezeichnete Phänomen wurde bereits bei der Diskussion über den Nachweis von Mikrokristallen erwähnt [CK7]. Bei ähnlichen FTIR-Untersuchungen, in denen das Protein PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten Hamsterhirnen nachgewiesen wurde, verringerte eine Vergrößerung der Blende von 10 auf 30 μm die Nachweisgrenzen, so dass die PrP^{Sc}-Ablagerungen nicht mehr aufgelöst wurden [Kneipp 2004]. Um die Hypothese in diesem Fall zu prüfen, wären FTIR-mikroskopische Images notwendig. Wenn jedoch die laterale Auflösung um den Faktor vier auf 6.25 μm erhöht wird, würden die Spektrenanzahl und die Messzeit um die Faktor 16 steigen, was extreme große Datensätze für komplette Mäusehirne ergibt. Deshalb ist diese Option nur sinnvoll für kleine Bereiche oder für Proben mit bekannter Tumorposition, wie im nächsten Abschnitt 3.2 dargestellt wird. Um die Effektivität von FTIR-Imaging als Screening-Methode von ausgedehnten Proben zu demonstrieren, scheint die Option jedoch nicht sinnvoll.

Die Ergebnisse dieser Machbarkeitsstudie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. (1) Während die FTIR-Images schon in früheren Arbeiten [z.B. CK6, CK9, CK11, CK12] mit H&E-gefärbten Dünnschnitten verglichen wurden, konnten zum ersten Mal Raman-Images von nicht getrocknetem Hirngewebe anhand von Referenzinformationen validiert werden. Das modifizierte Präparationsverfahren kann auch auf andere weiche Gewebetypen übertragen werden. (2) Erstmals wurden Raman-Images von nicht getrocknetem Hirngewebe mit einer faseroptischen Sonde aufgenommen. Im Vergleich zu dem zuvor genutzten Setup mit einem Mikroskop bietet die Kombination des Spektrometers mit einer Sonde Vorteile im Hinblick auf Flexibilität, Kosten und Empfindlichkeit, weil die Sonde weniger kostet und einen höheren Lichtdurchsatz besitzt. Die eingesetzte Sonde von Inphotonics verfügt über eine Reihe von attraktiven Merkmalen wie effiziente Fokussier- und Filteroptiken in einem kompakten Probenkopf (Durchmesser 13 mm, Länge 76 mm), hohe Rayleigh-Streulichtunterdrückung, Elimination von Untergrundsignalen, die in den faseroptischen Lichtleitern erzeugt werden, und einen weiten spektralen Bereich von 250 bis 3900 cm^{-1} . Die Optik fokussiert den Laser auf einen Durchmesser von rund 60 μm , was eine höhere Auflösung und bessere Signalerfassung ermöglicht als eine kürzlich vorgestellte faseroptische Sonde aus einem einzelnen Lichtleiter von 300 μm Durchmesser [Koljenovic 2007]. Ein weiterer Nachteil dieser ungefilterten Sonde ist der eingeschränkte Wellenzahlenbereich von $2000\text{-}3900 \text{ cm}^{-1}$, was hier den Nachweis von Metastasezellen erheblich erschwert hätte. (3) Obwohl in FTIR-Images mehr morphologische Details bei kürzerer Messzeit aufgelöst wurden, konnten Tumorzellen nur in den Raman-Images detektiert werden. Dies verdeutlicht die Komplementarität von IR- und Raman-Spektroskopie, dass heißt, die Kombination von beiden Methoden ergeben mehr Informationen als jede Methode für sich allein.

In weiteren Experimenten sollen die IR- und Raman-Methoden auf nicht pigmentierte Tumoren in Mausehirnen angewendet werden. Nach positiver Beurteilung der Techniken in diesem Kleintiermodell kann erwartet werden, dass der Transfer auf die größeren humanen Hirntumoren erfolgreich ist. Deshalb waren diese Untersuchungen wichtig, um neue diagnostische Methoden auf Grundlage von Schwingungsspektroskopie zu entwickeln.

3.2 FTIR-mikroskopisches Imaging von Gewebedünnschnitten

FTIR-mikroskopisches Imaging als Untersuchungsmethode für Gewebe ist erforderlich, um kleine Strukturen aufzulösen. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt [CK14] erwähnt, wäre eine vollständige Erfassung ausgedehnter, inhomogener Gewebeproben mit mikroskopischer Auflösung sehr zeitaufwendig und würde sehr große Datenmengen erzeugen, die eine Herausforderung für Analyse und Klassifikation darstellen. Wenn z.B. ein FTIR-Image von 4×4 mm² nicht in der Makrokammer mit einer Pixelauflösung von 60 µm, sondern unter dem Mikroskop bei fünfzehnfacher Vergrößerung mit einer Pixelauflösung von 4 µm aufgenommen werden soll, steigt die Anzahl der Images von 1 auf 15²=225, die Gesamtmesszeit von rund 10 min auf 2250 Minuten=37.5 Stunden und die Gesamtdatenmenge von rund 25 Mb auf 5625 Mb. Für bestimmte Anwendungen ist jedoch eine maximale Auflösung unerlässlich. Dazu gehören die Identifikation von Keimzentren im Milzgewebe und von morphologischen Details bei Gebärmutterhalskrebs, welche in diesem Abschnitt zusammengefasst werden. Die laterale Auflösung hängt zum einen von der Wellenlänge ab und wird zum anderen gemäß den Gesetzen der geometrischen Optik durch Beugung begrenzt. Die Beugungsgrenze d kann gemäß der Abbe'schen Gleichung berechnet werden:

$$d = \frac{0.612 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

Der Ausdruck im Nenner wird auch als numerische Apertur bezeichnet und kann in Luft maximale Werte von 1 erreichen. IR-Strahlung im Bereich 1000 bis 1800 cm⁻¹, die für die Analyse von biologischen Proben am wichtigsten ist, entspricht Wellenlängen von 10 bis 5.5 µm, woraus sich theoretische Beugungsgrenzen von 6.1 bis 3.4 µm ergeben. Praktisch wurde diese Grenze im eingesetzten FTIR-Mikroskop Hyperion (Bruker) nicht erreicht, da die numerische Apertur des 15× Cassegrain-Objektivs 0.4 ist, so dass sich reale Werte von 15 bis 8.5 µm ergeben. Experimentell bestimmte Auflösungen nach dem Rayleigh-Kriterium von 6.5 µm bei einer Wellenlänge von 4.3 µm für ein baugleiches FTIR-System stimmen sehr gut mit diesen Überlegungen überein und bestätigen, dass moderne FTIR-mikroskopische-Imaging-Spektrometer beugungsbegrenzte optische Systeme sind [Lasch 2006].

3.2.1 Keimzentren in der Milz [CK3]

Gegenwärtig sind Keimzentren Gegenstand intensiver Forschung in Medizin und Biologie, da sie ein wichtiger Bestandteil der humoralen Immunantwort sind. Sie sind verantwortlich für die Generierung von Plasmazellen, die hochaffine Antikörper produzieren sowie von B-Gedächtniszellen. Keimzentrenreaktionen finden in den lymphatischen Organen statt, wie Lymphknoten, Mandeln oder Milz. Theoretische [Meyer-Hermann 2002] und experimentelle Ansätze [Steiniger 1997] versuchen, die Dynamik und präzise Anordnung von B- und T-Lymphozyten in den Untereinheiten der Milz aufzuklären. Zum ersten Mal wurde FTIR-mikroskopisches Imaging eingesetzt, um die Mikroanatomie von Keimzentren in Dünnschnitten darzustellen [CK3]. Die Vorteile gegenüber den weit verbreiteten immunhistochemischen Verfahren liegen in der einfacheren Probenpräparation ohne antikörpergekoppelte Markierungen, in der schnelleren Datenaufnahme sowie in der automatisierbaren Auswertung der Daten. Die FTIR-Mikroimages wurden hier im sog. Step-Scan-Modus aufgenommen. Der optimierte sog. Continuous-Scan-Modus, mit dem die übrigen FTIR-Images in dieser Arbeit registriert wurden, wurde erst später im FTIR-Spektrometer installiert. Das bedeutet, dass die FTIR-Mikroimages von dem Milzgewebe-Dünnschnitt bei gleicher Messzeit ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis besaßen. Trotzdem hat die Auswertung mittels Cluster-Analyse die teilweise kleinen spektralen Differenzen zwischen den verschiedenen Gewebe- und Zelltypen identifiziert. Dies verdeutlicht die Empfindlichkeit der Strategie, die in ähnlicher Weise auf die nachfolgenden Anwendungen übertragen wurde.

Eine Milz-Probe von einem 17-jährigen männlichen Patienten wurde unmittelbar nach der Operation ohne jegliche Zusätze in flüssigen Stickstoff eingefroren. Für die IR-Spektroskopie wurde ein 10 µm Dünnschnitt auf einem CaF₂-Objektträger präpariert. Als Referenz diente ein benachbarter 10 µm Dünnschnitt auf einem Glasobjektträger, in denen die B-Zellen von Keimzentren mit Immunglobulin D (IgD) Antikörpern gefärbt wurden. T-Zonen sind IgD-negativ und erscheinen als helle Bereiche nach der Immunhistochemie. Cluster-Analysen eines FTIR-Images, das im Mapping-Verfahren bei einer Mikroskopblende von 90×90µm² und bei einer Schrittweite von 90 µm aufgenommen wurde, lieferten in einem 3.15×3.15 mm² großen Bereich einen Überblick über die Verteilung der anatomischen Merkmale in Milzgewebe wie primäre und sekundäre Follikel, T-Zonen, Arterien und Milzgefäße. In einer ersten Cluster-Analyse des gesamten Datensatzes wurden die Keimzentren von dem umgebenden Gewebe unterschieden. In einer zweiten Cluster-Analyse der Keimzentren erfolgte die Trennung verschiedener B- und T-Zellen. Nachdem die IR-Spektren auf die Intensität der Amid I-Bande normiert waren, zeigte ein Vergleich der Cluster-gemittelten IR-Spektren von Milzgewebe, dass Gefäße eine schwächere Bande bei 1080 cm⁻¹ und intensivere Banden bei 1238, 1454 und 1543 cm⁻¹ besaßen und B- und T-Zellen in Follikeln intensivere Banden bei 964, 1056, 1085, 1238 und 1709 cm⁻¹ besaßen, die spektralen Beiträgen von Nukleinsäuren zugeordnet wurden.

Zwei Follikel, die ein sekundäres Keimzentrum und eine T-Zone enthielten, wurden detaillierter durch FTIR-mikroskopisches Imaging untersucht. Die Dimensionen der Follikel erforderten die Aufnahme von 3×3 bzw. 3×4 FTIR-Mikroimages aus 36864 bzw. 49152 Spektren, die Flächen von 0.8×0.8 mm² bzw. 0.8×1.07 mm² entsprachen. Die T-Zone war charakterisiert durch T-Zellen, die von einem dünnen Ring B-Zellen umgeben waren. Während die T-Zone mittels Cluster-Analysen von FTIR-Mikroimages identifiziert wurde, konnte der dünne Ring nicht aufgelöst werden. In dem sekundären Keimzentrum formten naive B-Zellen einen äußeren Ring – marginale Zone genannt. Ein innerer Ring – Corona genannt – wurde von Keimzentrums B-Zellen gebildet, bei denen es sich um B-Zellen in verschiedenen Differenzierungsphasen handelte. Sowohl die marginale Zone als auch die Corona wurden mittels Cluster-Analyse von FTIR-Mikroimages erkannt. Die Analyse von Zellen in der IgD-negativen Zone in der Mitte des Keimzentrums wurde durch Risse im Dünnschnitt erschwert, die während des Trocknungsprozess entstanden. Dispersionseffekte in der Umgebung dieser Risse verursachten spektrale Beiträge, die mit den spektralen Signaturen überlappten. Die resultierenden Spektren wurden zwei Clustern zugeordnet, die in der ganzen Probe verteilt waren. Um die Einflüsse der Risse auf die Datenauswertung zu verringern, sollte die Probenpräparation so optimiert werden, dass die Entstehung von Rissen minimiert wird. Als Alternative können die Dispersionseffekte in den IR-Spektren korrigiert werden, wofür Romeo und Diem einen Algorithmus vorgeschlagen haben [Romeo 2005].

Zur Bestätigung der spektralen Eigenschaften wurden B- und T-Lymphozyten aus menschlichem Blut immunomagnetisch durch Antikörper CD3 und CD19 isoliert und mittels FTIR-mikroskopischem Imaging untersucht. Intensivere spektrale Beiträge von Nukleinsäuren als IR-spektroskopische Unterscheidungsmerkmale für B- und T-Zellen wurden sowohl in Milz als auch in Lymphozyten bestätigt. Der Anstieg von Nukleinsäurebanden deutet auf eine höhere Zelldichte, d.h. weniger Zytoplasma und mehr Zellkerne pro Fläche, oder höhere Zellteilungsrate, d.h. mehr Zellkerne in einem weniger kondensierten Zustand [Chiriboga 2000]. Ähnliche spektrale Differenzen wurden beim Vergleich von Tumorzellen und Hirntumorgewebe beobachtet [CK2].

Die Identifikation von B- und T-Zellen in verschiedenen Stufen ihrer Differenzierung ist eine wichtige Aufgabe in der Immunologie. Das Hauptergebnis der Studie war, dass FTIR-Imaging im Mapping-Modus und vor allem FTIR-mikroskopisches Imaging diese Aufgabe ähnlich erfüllen wie die etablierten immunologischen Methoden auf Grundlage von Antikörpern. In den letzten Jahren sind viele Färbemethoden entwickelt worden, um

verschiedene zelluläre Eigenschaften hervorzuheben. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche davon ebenfalls durch IR-Spektroskopie aufgedeckt werden können und in welchen Bereichen FTIR-mikroskopisches Imaging die vorhandenen Techniken ergänzen kann.

3.2.2 Gebärmutterhalskrebs [CK6]

Ein Forschungsgebiet, dem in den letzten zehn Jahren besonders viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde, ist die Anwendung von IR-Spektroskopie zur Diagnose von Gebärmutterhalskrebs und zur Bewertung von Zellabstrichen [Dukor 2002]. Seit den ersten Arbeiten von Wong und Mitarbeitern [Wong 1995] sind die meisten Studien an Zellabstrichen durchgeführt worden und ihr Ziel war, die diagnostische Genauigkeit des Papanicolaou Tests zu verbessern. Ziel der Studien an Gewebedünnschnitten ist, deren histopathologische Bewertung zu ergänzen. Da die H&E-gefärbten Präparate nicht alle biologischen Merkmale reflektieren, die die Aggressivität eines Tumors charakterisieren, ist die Aussagekraft bezüglich einer Prognose sehr begrenzt. Dünnschnitte von Gebärmutterhalsgewebe wurden bis jetzt nur zweimal mittels FTIR-Imaging im Mapping-Modus untersucht [Wood 2004, Chang 2003]. Diese Ergebnisse sind jedoch nur bedingt mit den Daten in [CK6] vergleichbar, weil (i) die laterale Auflösung lediglich 20 bis 30 μm betrug, (ii) Normalgewebe und Krebsvorstufen, aber kein Krebs untersucht wurden und (iii) die Gewebeschnitte auf metallbedampften Objektträgern für die Datenaufnahme im Reflexions-Absorptions-Modus aufgetragen wurden, wodurch einige Absorptionsbanden durch physikalische Dispersionseffekte beeinflusst waren [Romeo 2005]. Dagegen wurde in [CK6] ein Dünnschnitt auf einem CaF_2 -Objektträger für FTIR-mikroskopisches Imaging in Transmission mit einer lateralen Auflösung nahe 4 μm untersucht, der normales Gewebe, Krebsvorstufen und Plattenepithelkrebs enthielt. Insgesamt wurden von dieser Probe 122 FTIR-Mikroimages mit 499712 Spektren aufgenommen, die einer Fläche von 8.7 mm^2 entsprachen. Eine spezielle Auswertestrategie wurde für diese große Datenmenge von rund 3 Gb vorgestellt, die zum ersten Mal zehn morphologische Merkmale identifizierte. Die Auswertestrategie setzte zwei sequentielle Cluster-Analysen ein. Eine erste Cluster-Analyse nach dem fuzzy C-means Algorithmus sortierte die Spektren in weniger als 100 Gruppen, so dass jeder Gewebetyp mindestens durch eine Gruppe repräsentiert wurde. Der Vorteil dieses Algorithmus ist, dass auch sehr große Datenmengen analysiert werden können. Die Durchführung für mehr als 100000 Spektren wurde weiterhin optimiert für paralleles Rechnen auf mehreren Prozessoren [Beutlich, 2002]. Die erste Cluster-Analyse reduzierte die Datenmenge und verbesserte das Signal-Rausch-Verhältnis, da jede Gruppe einem Cluster-gemitteltem Durchschnittsspektrum entsprach. Eine zweite hierarchische Cluster-Analyse ordnete die weniger als 100 Gruppen bezüglich ihrer Ähnlichkeit. Der Vorteil dieses Algorithmus ist, dass alle Gruppen in detaillierter Weise miteinander in Beziehung gesetzt werden. Der Nachteil ist, dass die Methode für große Datensätze extrem rechenaufwendig und das resultierende Dendrogramm schlecht darstellbar ist. Durch den sequentiellen Ansatz wurden beide Vorteile kombiniert, um Gewebetypen in FTIR-Mikroimages zu identifizieren. Eine FTIR-Imaging-Studie eines kolorektalen Adenokarzinoms bestätigte, dass eine hierarchische Cluster-Analyse der überlegene Algorithmus gegenüber fuzzy C-means und k-means Cluster-Analysen ist [Lasch 2004].

Von einem ausgedehnten Dünnschnitt wurden sieben repräsentative Bereiche ausgewählt, die die Hauptgewebetypen enthielten. Für die Auswahl wurde als Referenz ein benachbarter H&E-gefärbter Dünnschnitt herangezogen. Zunächst wurde das Auswerteverfahren anhand eines Datensatzes aus 3×4 FTIR-Mikroimages von einem normalen Bereich vorgestellt, der den Übergang vom Bindegewebe zum Plattenepithelgewebe darstellte. Die fuzzy C-means Cluster-Analyse sortierte die rund 45000 IR-Spektren in 35 Gruppen. Die hierarchische Cluster-Analyse ordnete diese Gruppen in einem Dendrogramm. Bei einem Distanzwert von 5.5 erhielt man zehn Cluster, das heißt alle Gruppen mit einer Distanz kleiner als 5.5 wurden zusammengefasst. Die zehn Cluster wurden

histologischen Merkmalen zugeordnet und die Cluster-gemittelten IR-Spektren wurden verglichen. Im IR-Spektrum vom Bindegewebe-Cluster dominierten die spektralen Beiträge von Proteinen. Die beiden Cluster für Entzündungen ähnelten dem Bindegewebe mit Ausnahme einer intensiveren Bande bei 1082 cm^{-1} . Die übrigen sieben Cluster wurden den Schichten des Epithelgewebes zugeordnet, in denen die IR-Banden bei 1537 , 1460 , 1394 und 1239 cm^{-1} schwächer waren und um mehr als zwei Wellenzahlen verschoben waren bezüglich des Bindegewebes. Innerhalb des Epithelgewebes unterschieden sich die IR-Spektren durch spektrale Beiträge bei 1028 , 1081 und 1153 cm^{-1} , die Glykogen zugeordnet wurden. Die Banden waren minimal in der Basalzellschicht und stiegen in der Reihenfolge Parabasalzellschicht, Intermediärzellschicht und Oberflächenzellschicht. Der Anstieg ist konsistent mit einer Akkumulation von Glykogen, wenn die Epithelzellen heranreifen. Die Basalzellschicht besitzt übrigens lediglich eine Ausdehnung von 10 bis $30\text{ }\mu\text{m}$ und kann deshalb bei einer geringen lateralen Auflösung nur unzureichend identifiziert werden.

Anschließend wurde die sequentielle Cluster-Analyse im Intervall 950 bis 1480 cm^{-1} auf alle sieben Datensätze angewendet. Während sieben Cluster von Bindegewebe, Entzündung, Blutgefäßen, Schleim, Parabasalzellschicht, von intermediärer Zellschicht und der Oberfläche des Epithelgewebes unterschieden wurden, überlappten die drei Bereiche von Basalzellen, reversiblen Zellveränderungen (Dysplasie) und Krebs in einem Cluster. Die Basalzellschicht besteht aus den Vorläuferzellen für das Epithelgewebe. Durch Zellteilung produzieren Basalzellen Tochterzellen, die sich zur Oberfläche bewegen und sich dabei weiterentwickeln. Da die Krebszellen aus einer Entartung dieser Vorläuferzellen hervorgehen, ist die Ähnlichkeit ihrer IR-spektroskopischen Signaturen plausibel. In dem H&E-gefärbten Dünnschnitt sind die Basalzellschicht und der Plattenepithelkrebs durch eine intensive Färbung gekennzeichnet, was für beide Gewebetypen eine hohe Zelldichte anzeigt. Sorgfältiger Vergleich der IR-Spektren ergab kleine spektrale Differenzen zwischen diesen drei überlappenden Zelltypen. Die Bande bei 1460 cm^{-1} besitzt maximale Intensität für Basalzellen. Für Dysplasie und Krebs verschiebt sich diese Bande zu 1452 cm^{-1} und wird mit zunehmender Malignität schwächer. Wie im vorherigen Abschnitt für die Milzfollikel [CK3] wurde also eine zweite Cluster-Analyse im Intervall 1420 bis 1480 cm^{-1} durchgeführt, um das überlappende Cluster aus der ersten Analyse in vier Gruppen zu sortieren. Das resultierende erste Cluster wurde korrekt den Basalzellen zugeordnet, das zweite Cluster der Dysplasie und das dritte Cluster Krebs. Das vierte Cluster wurde Bereichen zugeordnet, bei denen es sich weder um Basalzellen noch um Krebszellen handelte, sondern um Gewebe, was in der ersten Cluster-Analyse inkorrekt in diese Gruppe geordnet wurde.

Frühere Studien berichteten über IR-spektroskopische Differenzen zwischen normalem und abnormalem Gebärmutterhalsgewebe, die Änderungen im Glykogen-, Nukleinsäure- oder Proteingehalt zugeordnet wurden (z.B. [Neviliappan 2002] und Kommentar [Chiriboga 2003]). Diese Studien berücksichtigten jedoch nicht, dass die beobachteten spektralen Änderungen weniger auf die Gegenwart von entarteten Zellen als vielmehr auf unspezifische Faktoren zurückzuführen sind wie Entzündungseffekte [Chiriboga 1998, Wood 1998], Schwankungen der Glykogenkonzentration während des Menstruationszyklus [Romeo 2002] oder Schwankungen der Nukleinsäurekonzentration als Funktion des Zellzyklus [Boydston-White 1999]. Deshalb schlugen Diem und Mitarbeiter vor [Diem 1999], dass IR-Spektroskopie Krebsgewebe nicht direkt durch spezifische Tumormarker identifiziert, sondern indirekt durch den Nachweis von Unterschieden zwischen den durchschnittlichen Zuständen des Zellzyklus und dass die wahren spektralen Änderungen zwischen normalen und neoplastischen Zellen klein und schwer aufzulösen sind. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Unterscheidung zwischen der normalen Basalzellschicht, der Dysplasie und dem Plattenepithelkrebs schwieriger war als die Unterscheidung der anderen Zelltypen. Sowohl die Basalzellen als auch die Krebszellen gehen durch die gleichen Zustände des Zellzyklus mit einer ähnlichen Rate. Der wesentliche Unterschied ist, dass Krebszellen diesen Prozess nicht regulieren können,

was zu den Grundgesetzen von Krebs gehört [Hanahan 2000]. Als Konsequenz besitzen beide Zelltypen eine ähnliche chemische Zusammensetzung und die entsprechenden Gewebereiche eine ähnlich hohe Zelldichte mit ähnlichen H&E-Färbeverhalten. Deshalb waren besonders gute Daten und empfindliche Algorithmen wie in Referenz [CK6] notwendig, um erstmalig Basal- und Krebszellen in einer Probe mittels IR-Spektroskopie zu trennen. Die spektralen Merkmale sollen nun in weiteren Studien eingesetzt werden, um Klassifikationsmodelle für Gebärmutterhalsgewebe zu entwickeln. Erste Ergebnisse sind bereits für Proben von vier Patientinnen beschrieben worden [Krafft 2005b].

3.3 FTIR- und Raman-mikroskopisches Imaging einzelner Zellen

Untersuchungen von einzelnen Zellen mittels FTIR- und Raman-Imaging haben zwei Hauptziele. Zum einen dienen sie als Referenz, um die spektroskopischen Signaturen und deren pathologische Änderungen von Geweben, die aus Zellen aufgebaut sind, besser zu verstehen. Zum anderen können die Methoden zellbiologische Techniken ergänzen, um zelluläre bzw. subzelluläre Prozesse und Strukturen zu analysieren oder den Differenzierungsgrad bzw. den Zelltyp zu identifizieren. Die am weitesten verbreiteten Methoden, um einzelne Zellen zu studieren, sind Elektronenmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Autoradiographie. Jedoch sind umfangreiche Präparationen notwendig, um die besonderen Erfordernisse dieser analytischen Methoden zu erfüllen. Darüber hinaus sind die Umgebungen für die Zellen oft weit von physiologischen Bedingungen entfernt wie das Vakuum, das in Experimenten mit Elektronenstrahlen eingesetzt wird. Autoradiographie, Fluoreszenzspektroskopie oder andere optisch-spektroskopische Techniken erfordern in der Regel exogene Fluorophore oder andere kontrastverstärkende Reagenzien, da die meisten natürlichen Biomoleküle nicht direkt nachgewiesen werden können. Im Voraus muss entschieden werden, welche Eigenschaften untersucht werden sollen und welche Marker dafür ausgewählt werden. Die Marker visualisieren jeweils nur eine begrenzte Anzahl subzellulärer Komponenten, zersetzen sich unter bestimmten Umständen oder bleichen aus. Auch die Zugänglichkeit von externen Markierungen zu bestimmten Strukturen kann eingeschränkt sein. Zum Beispiel hängt die Markierung von DNA im Zellkern vom Farbstoff, vom metabolischen Zustand der Zelle und von der Phase des Zellzyklus ab. Im Prinzip können FTIR- und Raman-Imaging viele diese Einschränkungen überwinden. Sie kombinieren molekulare Spezifität mit beugungsbegrenzter Auflösung und sie können unter *in vivo* Bedingungen ohne Färbungen oder anderen Markierungen eingesetzt werden, da die Messsignale auf den natürlichen Schwingungseigenschaften der in den Zellen enthaltenen Biomoleküle beruhen. Darüber hinaus sind die Methoden schnell, weil einzelne Spektren innerhalb von Sekunden registriert werden können. Die Raman-Spektroskopie besitzt gegenüber der IR-Spektroskopie Vorteile in der höheren lateralen Auflösung und bei der Untersuchung von Zellen im wässrigen Medium. Gemäß den Ausführungen in Abschnitt 3.2 beträgt die Auflösungsgrenze in der Raman-Spektroskopie rund 300 nm bei einer Wellenlänge von 500 nm und einer numerischen Apertur von 1, die von Wasserimmersionsobjektiven erreicht wird. Laseranregung von lebenden Zellen im sichtbaren Spektralbereich führt jedoch zum Zelltod, so dass die Untersuchungen Laser mit Wellenlängen oberhalb von 660 nm erfordern [Puppels 1991, Notingher 2002]. Wegen der geringen Intensität der Raman-Signale von Biomolekülen in einzelnen Zellen sind besonders empfindliche Raman-Systeme erforderlich, die erst seit einigen Jahren kommerziell verfügbar sind. Als weitere Voraussetzung für Raman-Spektroskopie an Biomolekülen sind hohe Konzentrationen erforderlich, was jedoch im extrem kondensierten Volumen einer Zelle automatisch erfüllt ist. Konzentrationen von Proteinen im Bereich von 250 µg/µl sowie von DNA und RNA jeweils im Bereich von 100 µg/µl sind berichtet worden [Hilderbrandt 1995], die natürlich vom Zelltyp, von der Phase des Zellzyklus und von der Position innerhalb der Zelle abhängen. Eine Signalverstärkung kann mit speziellen Techniken erzielt werden wie Resonanz-Raman-Spektroskopie, Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS, Surface Enhanced Raman Spectroscopy) oder Kohärente Anti-Stokes Raman-

Spektroskopie (CARS, Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy). Die Bedingungen für die Signalverstärkung schränken jedoch die Anwendungen ein. Deshalb wurden in Abschnitt 3.3.1 speziell konfigurierte kommerzielle Raman-Spektrometer unter Nichtresonanzbedingungen für die Untersuchungen eingesetzt.

In Abschnitt 3.3.2 wird demonstriert, dass FTIR-Imaging bei der Untersuchung von getrockneten Einzelzellen Vorteile im Hinblick auf den Datendurchsatz bietet. Da die Spektren zum Teil erheblich vom Hydratisierungszustand der biochemischen Komponenten abhängen, sind darüber hinaus Anstrengungen unternommen worden, die IR-Spektroskopie auf einzelne Zellen in wässriger Umgebung anzuwenden [Mourant 2003]. Ein Artefakt bei der Messung der Absorption von IR-Strahlung von Zellen wird der Inhomogenität bzw. der ungleichmäßigen Verteilung von Biomolekülen zugeordnet. Diem und Mitarbeiter [Diem 1999, Boydston-White 1999] haben vorgeschlagen, dass die DNA im Zellkern in bestimmten Phasen des Zellzyklus so dicht gepackt ist, dass deren spektralen Beiträge unerwartet niedrig erscheinen, weil außerhalb des Zellkerns die DNA-Konzentration nahezu null ist, während die Strahlung innerhalb des Zellkerns nahezu vollständig absorbiert wird und das Absorptionsverhalten nicht mehr dem Gesetz von Lambert-Beer folgt. Zusätzliche Komplikationen bei den IR-Spektren ergeben sich durch Dispersion [Romeo 2005] und durch Mie-Streuung, da die Wellenlänge der Strahlung in der gleichen Größenordnung liegt wie die Dimension der Zellkerne [Mohlenhoff 2005]. Diese Artefakte spielen eine geringere Rolle bei der Raman-Spektroskopie.

3.3.1 Raman-Imaging von Lungenfibroblastzellen [CK1, CK5, CK10]

Die hohe räumliche Auflösung der konfokalen Raman-Mikroskopie wurde genutzt, um Raman-Images von einzelnen Zellen mit Schrittweiten von 1 μm und in einem Fall sogar von 0.3 μm aufzunehmen. Die ersten Manuskripte auf diesem Gebiet stellten Methoden zur Datenaufnahme und -analyse für getrocknete und lebende Zellen [CK1] sowie für fixierte Zellen vor [CK5]. Eine erste Anwendung fanden diese Methoden bei der Untersuchung von Stress-induzierten Änderungen in Einzelzellen [CK10]. Lungenfibroblastzellen wurden als Modellsystem ausgewählt, weil (i) die Kultivierungsbedingungen relativ einfach kontrolliert werden können, (ii) ihre Geometrie und Morphologie geeignet sind, die Kompartimente lichtmikroskopisch zu unterscheiden, (iii) sie auf Objektträgern anwachsen und (iv) sie ihre Form über einen längeren Zeitraum nach einer Fixierung behalten.

Raman-Imaging von lebenden Einzelzellen [CK1]

Neben Lungenfibroblastzellen wurden in [CK1] auch humane Knochenkrebszellen und Astrozytomzellen untersucht. Unter den experimentellen Bedingungen waren die lebenden Zellen im Medium jedoch nur für einige Stunden stabil. Durchflussküvetten, um die Zellen während der Datenaufnahme mit exakt temperiertem Nährmedium zu versorgen, standen für diese Experimente nicht zur Verfügung. Raman-Images wurden mit einem Raman-mikroskopischen System (Kaiser Optical Systems, USA) bei einer Anregung von 785 nm mit einem Single-Mode Diodenlaser aufgenommen. Die Messung eines Images aus 3876 Raman-Spektren von einer einzelnen getrockneten Astrozytomzelle mit einer Messzeit von 1 Minute pro Spektrum dauerte rund 60 Stunden. In später aufgenommenen Datensätzen wurde die Messzeit bis auf 0.2 Sekunden pro Spektrum reduziert [CK5]. Die längere Messzeit lieferte für die Spektren im Zentrum der Zellen relativ gute Signal-Rausch-Verhältnisse und in den Raman-Spektren konnten 34 Banden Proteinen, Lipiden, Cholesterin und Nukleinsäuren zugeordnet werden. Als Referenzen für diese Zuordnungen dienten überwiegend eigene Untersuchungen an isolierten Proteinen und Nukleinsäuren [Krafft 1998, Krafft 2000]. Auf Grundlage dieser spektralen Informationen wurden der Zellkern und Details im Zytoplasma identifiziert. Die kürzeren Messzeiten erforderten Auswertetechniken, um Mittelwertspektren mit akzeptablem Signal-Rausch-Verhältnis zu erzeugen, was im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Hier wurden die Datensätze mittels PCA analysiert. Im Manuskript wird erläutert, wie die sog.

Loadings einer PCA spektralen Eigenschaften entsprechen und die sog. Score-Plots farblich kodierte Images liefern. Die höheren Signalintensitäten in der Zellmitte wurden auf die größere Dichte bzw. Dicke von rund 7 μm sowie auf den optimal fokussierten Laser zurückgeführt. Die Tiefenschärfe des Objektivs betrug nur $\pm 1 \mu\text{m}$, so dass der Laser am dünneren Zellrand nicht mehr optimal fokussiert war. Die Autofokusooption wie in [CK7] hätte die Messzeit zusätzlich verlängert, so dass sie hier nicht eingesetzt wurde. Die spektralen Differenzen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma waren in der getrockneten Astrozytomzelle geringer als in den lebenden, hydratisierten Zellen im Medium. Diese Beobachtung hängt höchstwahrscheinlich mit der Präparation zusammen, da ähnliche Images auch von Knochenkrebszellen und Fibroblastzellen nach dem Trocknungsprozess erhalten wurden. Unglücklicherweise zeigte eine lebende Knochenkrebszelle während der Messung Anzeichen von osmotischem Stress und Apoptose. Zuerst schrumpfte die Zelle und anschließend expandierte die Zelle durch eindringendes Medium, ohne jedoch zu platzen. Trotzdem enthielten die Raman-Spektren im Bereich des Zellkerns intensive DNA-Banden, wogegen im Bereich des Zytoplasmas nahezu keine Nukleinsäurebanden identifiziert werden konnten. Die Proteinbanden waren in beiden Raman-Spektren sehr ähnlich. Im Bereich der äußeren Zellmembran wurden maximale spektrale Beiträge von Lipiden und Cholesterin registriert. Ein Problem stellten einzelne Bakterien dar, die in den Laserfokus gelangten und darin wie mit einer optischen Pinzette festgehalten wurden, so dass die Raman-Spektren an jeder nachfolgenden Messposition mit spektralen Beiträgen der Bakterien kontaminiert waren. Selbstverständlich liefern verschiedene Bakterien unterschiedliche Raman-Spektren, wie anhand von zwei Beispielen demonstriert wurde. Während ein Bakterium eine Karotenverbindung mit zwei prominenten Banden bei 1160 und 1525 cm^{-1} enthielt, konnten die spektralen Beiträge eines zweiten Bakteriums nicht identifiziert werden. Inzwischen sind systematische Raman-Untersuchungen an einzelnen Bakterien publiziert worden [Schuster 2000, Huang 2004]. Auch das Prinzip von optischen Pinzetten wurde als nützliches Hilfsmittel in der Raman-Spektroskopie erkannt und für Untersuchungen von Zellen angewendet [Geßner 2004, Singh 2005].

Raman-Imaging von fixierten Einzelzellen [CK5]

Um die im vorhergehenden Abschnitt erwähnten morphologischen und chemischen Änderungen in lebenden Zellen während den langwierigen Raman-Experimenten zu vermeiden, wurden Lungenfibroblastzellen mit Formalin fixiert und danach in einem isotonischen Phosphatpuffer bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum einen wurden Raman-Images mit dem zuvor beschriebenen System bei einer Anregung von 785 nm und bei einer Schrittweite von 1 μm registriert. Zum anderen wurden Raman-Images mit dem Raman-Mikrospektrometer CRM200 der Firma Witec (Ulm, Deutschland) bei einer Anregung von 532 nm und mit einer Schrittweite von 0.3 μm aufgenommen. Wegen der kleineren Schrittweite erhöhte sich die Spektrenzahl auf bis zu 18000 pro Datensatz, so dass die Messzeit auf 0.2 Sekunden pro Spektrum reduziert wurde. Damit ergaben sich Gesamtmesszeiten von rund einer Stunde. Die spektralen Beiträge aller Biomoleküle innerhalb einer Zelle überlappen zu komplexen, aber informationsreichen Raman-Spektren. Anstelle einer PCA wie in [CK1] wurden hier eine Cluster-Analyse und ein Fitverfahren zur Datenauswertung eingesetzt. Die Cluster-Analyse sortierte die Spektren hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in Gruppen. Die Mittelwertbildung dieser Cluster ergab Spektren mit verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) und die einzelnen spektralen Beiträge konnten detaillierter interpretiert werden. Während SRV von 387 in Einzelspektren bei 785 nm Laseranregung, 100 mW Intensität und 10 Sekunden Messzeit erhalten wurden, betrug das SRV nur 24 in Einzelspektren bei 532 nm Laseranregung, 20 mW Intensität und 0.2 Sekunden Messzeit. Ohne Mittelwertbildung war eine Spektrenanalyse äußerst schwierig. Nach der Mittelwertbildung erhöhten sich die SRV auf 1450 (785 nm) bzw. 105 (532 nm). Dieses Verfahren funktioniert bei Raman-Images von einzelnen Zellen unter der Annahme, dass sich die spektralen Signaturen innerhalb der einzelnen Kompartimente – wie z.B. dem Zellkern – nur wenig unterscheiden, was im Rahmen der

aktuell erreichbaren Spektrenqualität und lateralen Auflösung gut erfüllt wird. Die Protein- und DNA-Banden waren im Zellkern am intensivsten. Dagegen waren Lipid- und Cholesterinbanden in Vesikeln am intensivsten. Bei den Vesikeln könnte es sich um Peroxisomen und Lysosomen handeln, die bekanntlich viele Lipide enthalten und Cholesterin aufnehmen. Das Zytoplasma und die Bereiche nahe der Zellmembran enthielten Protein-, Lipid- und RNA-Banden in unterschiedlichen relativen Anteilen. Die DNA des Zellkerns, deren helikale Struktur als B-Konformation bezeichnet wird, kann von RNA im Zytoplasma, die keine B-Konformation ausbilden kann, durch Raman-Banden unterschieden werden, deren Intensität und Position von der Geometrie des Zucker-Phosphatrückgrates abhängen. Darüber hinaus ist das Nukleotid Thymidin in RNA durch Uridin ersetzt, was zu weiteren Differenzen in Raman-Spektren führt. Obwohl die Nukleinsäurebanden relativ intensitätsschwach waren, konnten diese spektralen Änderungen in den Raman-Spektren von Zellkern und Zytoplasma identifiziert werden.

Zur weitergehenden Analyse wurden die Cluster-gemittelten Raman-Spektren bei 785 nm Anregung durch Linearkombinationen von Referenzspektren gefittet. Das Verfahren wurde bereits zur Analyse der Raman-Spektren von Hirntumoren eingesetzt [CK4]. Die Fitparameter entsprechen dann den spektralen Beiträgen der einzelnen Komponenten. Als Basisspektren für Zellen wurden Raman-Spektren von Proteinen, von Lipiden, von DNA und von Cholesterin herangezogen. Um die Zusammensetzung der Cluster zu vergleichen, wurden relative Konzentrationswerte berechnet. Auf Grundlage der Zusammensetzung und ihrer Größe wurden sechs Cluster zu Zellkern, RNA-haltigen Einschlusspartikeln, Zytoplasma, endoplasmatischem Reticulum, Vesikeln und der peripheren Zellmembran zugeordnet. Das Fitverfahren konnte nicht für die Cluster-gemittelten Raman-Spektren bei 532 nm Anregung durchgeführt werden, weil die entsprechenden Basisspektren nicht vorhanden waren. Die Positionen und Intensitäten der Raman-Banden in diesen Spektren waren jedoch konsistent mit den Zuordnungen der Banden bei 785 nm Anregung. Bemerkenswert war, dass durch die kleinere Schrittweite die laterale Auflösung so gesteigert wurde, dass einzelne Vesikel aus vier bis neun Pixeln identifiziert wurden, die Durchmesser von 0.6 bis 0.9 μm entsprachen.

Raman-Imaging von Stress-induzierte Änderungen in Einzelzellen [CK10]

Zellstressantwort ist der Ausdruck für die Reaktion einer lebenden Zelle auf Umgebungsänderungen, die potentiell schädlich sind, wie z.B. der Anstieg oder das Absinken von Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration oder die Anwesenheit von Toxinen. Diese mittels Stress induzierten Prozesse verursachen verschiedene Modifikationen innerhalb von Zellen, die sowohl zu morphologischen als auch zu biochemischen Änderungen oder sogar zum Zelltod führen können. Die meisten zellbiologischen Techniken sind invasiv, erfordern mehrere Präparationsschritte und sind nicht in der Lage, die Antwort lebender Zellen auf externen Stress zu untersuchen. Außerdem werden sie auf eine bestimmte Zellpopulation und nicht auf eine einzelne Zelle angewendet. In [CK10] wurde Raman-Spektroskopie zum ersten Mal eingesetzt, um die Morphologie und molekulare Zusammensetzung von normalen, von gestressten und von apoptotischen Zellen zu vergleichen. Grundlage für die experimentellen Methoden und die Datenanalyse bildeten die vorangegangenen Studien [CK1, CK5].

Lungenfibroblastzellen wurden auf Quarzobjektträgern präpariert. Zugabe von 1 mM Glyoxal im Kulturmedium für 24 Stunden induzierte oxidativen Stress. Glyoxal ist für Fibroblasten in Zellkulturen toxisch, da es die DNA- und Proteinsynthese blockiert. Die gestressten Zellen und normale Zellen als Kontrollproben wurden anschließend durch Formalin fixiert und bei 4 °C aufbewahrt. Sechs Raman-Images wurden mit dem zuvor vorgestellten Raman-Mikrospektrometer (Kaiser Optical Systems, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm, bei einer Schrittweite von 1 μm und bei einer Messzeit von 10 Sekunden pro Spektrum aufgenommen. Die Anzahl der Spektren pro Datensatz reichte von 812 bis 3720. Eine Cluster-Analyse sortierte die Spektren in vier bis fünf Gruppen. Das erste Raman-Image zeigte normale Zellen in der sog. Anaphase

der Zellteilung (Mitosis). Die bereits getrennten Zellkerne waren noch durch Mikrotubuli miteinander verbunden. Zwei weitere Raman-Images zeigten vier normale Zellen. Die Größe des Zellkerns konnte aus dem Verhältnis von Zellkernspektren zu Gesamtspektren abgeschätzt werden und betrug für normale Zellen etwa 30% der gesamten Zelle. Weitere Cluster wurden Zytoplasma, Vesikeln und Einschlusspartikeln zugeordnet. Zwei Raman-Images zeigten gestresste Zellen mit signifikant unterschiedlicher Morphologie. Der Zellkern schrumpfte auf weniger als 23% der Zelle, was als Pyknose bezeichnet wird. Es gab keinen Hinweis auf ein Cluster, das lipidreichen Vesikeln zugeordnet werden konnte. Stattdessen wurden mehr Einschlusspartikel nachgewiesen. Eine gestresste Zelle zeigte Bläschen auf der Zelloberfläche, sie nahm eine runde Gestalt an und ihre Größe schrumpfte, was auf einen fortgeschrittenen Stresszustand hinwies. Zwei Zellen in einem weiteren Raman-Image zeigten typische Eigenschaften von Zelltod (Apoptose), obwohl sie im normalen Medium wuchsen. Die Zellkerne von lediglich 13% der Zellgröße waren fragmentiert und auf der Oberfläche befanden sich Bläschen. Apoptose wurde hier nicht durch Glyoxal induziert, sondern durch einen anderen Mechanismus. Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich, da Zellkulturen immer einen kleinen Anteil von toten Zellen enthalten.

Die Analyse der Raman-Images ist nicht auf die Morphologie beschränkt, sondern die Raman-Spektren enthalten auch chemische Informationen. Alle Raman-Spektren wurden für den Vergleich auf die Phenylalaninbande von Proteinen bei 1003 cm^{-1} normiert, weil diese Bande sehr intensiv ist, sie wenig mit anderen Banden überlappt und sie bekanntermaßen unabhängig von Änderungen der Struktur oder Umgebung ist. Nach dieser Normierung war ersichtlich, dass die Intensitäten von DNA-Banden in den Cluster-gemittelten Raman-Spektren der Zellkerne variierten. Da die Änderungen relativ klein waren, wurden Differenzspektren berechnet, in denen alle Banden DNA zugeordnet wurden. Protein- und Lipidbanden zeigten keine signifikanten Varianzen. Um die Änderungen zu quantifizieren, wurden Intensitätsverhältnisse der intensivsten DNA- und Proteinbanden berechnet. Das Ergebnis war, dass die DNA-Protein-Verhältnisse in der Reihenfolge normale Zellen > gestresste Zellen > apoptotische Zellen sinken. Diese Reihenfolge ist konsistent damit, dass die DNA-Gehalte in den geschrumpften Zellkernen von gestressten und apoptotischen Zellen reduziert sind. Der Rückgang kann mit der Zersetzung oder der Kondensation des Chromatins erklärt werden. Höher kondensiertes Chromatin führt zu verstärkten Wechselwirkungen zwischen den DNA-Basen, was geringere Raman-Intensitäten von DNA zur Folge hat. Dieser hypochrome Effekt wurde bereits in Raman-Spektren von isolierter DNA vor über 30 Jahren beschrieben [Erfurth 1975]. In den Raman-Spektren des Zytoplasmas wurde auf analoge Weise eine Reduktion des RNA-Protein-Verhältnis in gestressten und apoptischen Zellen nachgewiesen. Als dritte Gruppe wurden die Raman-Spektren der Zelloberfläche diskutiert. Im Spektrum von normalen Zellen wurden nahe der Zellmembran hohe Intensitäten von Lipid- und Cholesterinbanden beobachtet. Nach Normierung auf die Intensität der Proteinbanden zeigten die Spektren der Bläschen von gestressten und apoptischen Zellen weniger intensive Lipidbanden, während die RNA-Banden intensiver wurden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit apoptotischen Partikeln, in denen DNA und RNA gepackt sind und die auf diesem Weg während der Apoptose aus der Zelle befördert werden [Halicka 2000]. Zusammengefasst stimmen alle Beobachtungen aus den Raman-Images mit den typischen Kennzeichen von Apoptose – die Bezeichnung für den programmierten Zelltod – überein. Dazu gehören Schrumpfung der Zelle, Umordnung der Zellorganellen, Kondensation von Chromatin, Zersetzung der Nukleoli im Zellkern und Fragmentierung des Zellkerns [Robertson 2000]. Die Untersuchung von Zellstress und nachfolgender Apoptose wurde als erste Anwendung für Raman-mikroskopisches Imaging gewählt, weil die Morphologie und molekulare Zusammensetzung sich in definierter und bekannter Weise ändern. Damit konnte demonstriert werden, welche subzellulären Eigenschaften mit dieser neuen Methode zugänglich sind. Standardverfahren in der Zellbiologie sind nicht in der Lage, diese morphologischen und biochemischen Eigenschaften in einzelnen

Zellen unter nichtinvasiven Bedingungen zu identifizieren, zu charakterisieren und zu quantifizieren. Diese Experimente an bekannten Systemen sind Voraussetzungen, bevor die Methode auf unbekannte Probleme – wie toxikologische Studien oder pharmazeutische Tests – angewendet werden können. Die Raman-Spektroskopie stellt somit eine neuartige Ergänzung der vorhandenen zellbiologischen Techniken dar.

3.3.2 FTIR-Imaging von humanen Stammzellen [CK13]

Ein großer Unsicherheitsfaktor in der Zellbiologie und in Studien zur Zellentwicklung ist, dass der Zustand der Zelldifferenzierung nicht exakt bekannt ist. Die bereits etablierten molekularbiologischen und (immun-) histochemischen Methoden zur Bestimmung des Zelltyps sind mit einem hohen Aufwand der Probenvorbereitung verbunden und deren Auswertung ist fehleranfällig, insbesondere wenn die Antigenexpression schwach ist und die Spezifität der Antikörper gering ist. Diese Methoden besitzen als Einschränkungen, dass nur zwei oder drei Zelltypen gleichzeitig in einer Probe analysiert werden können und dass im Voraus entschieden werden muss, welche Zellen nachgewiesen werden sollen. Neue Methoden, die ohne Manipulation und nichtdestruktiv eingesetzt werden, würden einen großen Fortschritt darstellen, da sie einfacher und schneller wären und sogar gemischte Zellpopulationen mit dynamischem Wachstumsverhalten kontinuierlich untersucht werden könnten. Eine wichtige Anwendung ist, die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Zelltypen zu kontrollieren, die aus Stammzellen hervorgehen und die sich in Funktion, Struktur und Zusammensetzung unterscheiden. Die Differenzierung von Stammzellen kann *in vitro* durch externe Reagenzien oder durch den Wechsel der Wachstumsmedien stimuliert werden. Diese Eigenschaft macht Stammzellen attraktiv für innovative medizinische Anwendungen. Stammzelltherapie wird geschätzt für ihr Potenzial, geschädigtes oder degeneriertes Gewebe wiederherzustellen. Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist bereits Routine, um Krankheiten des Blutes oder des Immunsystems zu behandeln [Bordignon 2006]. In anderen erfolgreichen Studien zu Stammzelltherapien wurde über die Behandlung von Herzkrankheiten [Srivastava 2006], neurologischen Störungen [Lindvall 2006] oder Muskeldefekten [Sampaolesi 2006] berichtet. Ein weiteres aussichtsreiches Gebiet ist, Knochen durch knochenbildende, mesenchymale Stammzellen (MSC) zu erzeugen. Knochendefekte, die durch Unfall oder Tumoren verursacht wurden, könnten durch Prothesen ersetzt werden, in denen MSC neues Knochengewebe bilden [Schieker 2006]. Allerdings ist der Nachweis implantierter MSC in Mausmodellen ein häufiges Problem, da die exakte Funktion und Beteiligung der Zellen an der Knochenbildung unklar bleiben. Ein weiteres Problem ist, dass gewebespezifische Stammzellen unter Umständen nicht in die korrekte Richtung differenzieren [Jiang 2002]. Neben der Raman-Spektroskopie bietet auch FTIR-Imaging die Möglichkeit, einige Einschränkungen der Standardmethoden zu überwinden und als neue analytische Methode bei Zellstudien eingesetzt zu werden. Ein Vorteil von FTIR-mikroskopischem Imaging sind kürzere Messzeiten, so dass die IR-Spektren von hunderten einzelnen Zellen in relativ kurzer Zeit gemessen werden können. Das Manuskript [CK13] stellt ein Klassifikationsmodell vor, mit dem vier Zelltypen bestimmt werden. Das Prinzip ist, dass jeder Zelltyp und jeder Zellzustand durch spezifische molekulare Eigenschaften charakterisiert sind, die durch empfindliche IR-Spektren repräsentiert werden. Die Kenntnis der Korrelation zwischen der Zelleigenschaft und ihrem IR-Spektrum erlaubt also eine Klassifikation von Einzelzellen auf Grundlage der IR-Spektroskopie.

MSC wurden gemäß Standardprotokollen kultiviert. In einem Ansatz wurde eine osteogene Differenzierung von MSC induziert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen auf CaF₂-Objektträgern übertragen, in Methanol fixiert, mit Puffer gewaschen und getrocknet. Ein zweiter Ansatz ohne Stimulation der Differenzierung von MSC diente als Kontrolle. Mosaiks von 4×4 FTIR-Mikroimages wurden aufgenommen, die einer Fläche von 1070×1070 µm² entsprachen. Nachdem die Bereiche ohne Zellen aus den FTIR-Images entfernt wurden, sortierte eine Cluster-Analyse die verbliebenden IR-Spektren

der Zellen in Gruppen. Auf diese Weise wurden die zwei häufigsten Zelltypen in jedem Ansatz identifiziert. Die IR-Spektren von nicht stimulierten Zellen unterschieden sich in erster Linie im Intervall 950 bis 1200 cm^{-1} . Eine Gruppe besaß niedrige Intensitäten, eine zweite Gruppe hohe Intensitäten mit Banden bei 1025, 1080 und 1152 cm^{-1} . Diese spektralen Beiträge waren typisch für Glykogen. Die IR-Spektren von osteogen stimulierten Zellen zeigten ebenfalls die größten Unterschiede im Intervall von 950 bis 1200 cm^{-1} . Eine Gruppe besaß niedrige Intensitäten, eine zweite Gruppe hohe Intensitäten mit Maxima bei 987, 1086 und 1112 cm^{-1} . Diese Banden waren typisch für Calciumphosphatsalze, die Vorläufersubstanzen des Knochenminerals Hydroxylapatit sind. Die IR-Spektren von stimulierten und von nicht stimulierten Zellen unterschieden sich durch eine spektrale Komponente nahe 1631 cm^{-1} , die in den beiden Zellpopulationen auf verschiedene Sekundärstrukturen von Proteinen hinwies. Die maximale Absorption innerhalb einzelner Zellen betrug 0.03 bis 0.09, so dass die SRV in einzelnen IR-Spektren nur 50 bis 150 waren. Aus diesem Grund wurden von vier Zellen die intensivsten IR-Banden mit den signifikantesten Varianzen bei 1631, bei 1025 und im Intervall 1086-1112 cm^{-1} ausgewählt. Als Bezugsgröße diente wiederum die Amide I-Bande von Proteinen bei 1655 cm^{-1} , so dass die Verhältnisse von Markerbanden und Amid I als Parameter für ein Klassifikationsmodell nach dem LDA-Algorithmus für vier Zelltypen herangezogen wurden. Damit folgte dieses Verfahren der Strategie, die zuvor für Gliome [CK8] und Hirnmetastasen [CK9] entwickelt wurde. Nicht stimulierte Zellen mit geringer Glykogenakkumulation bildeten die erste Klasse, nicht stimulierte Zellen mit hoher Glykogenakkumulation die zweite Klasse, stimulierte Zellen mit geringer Expression von Calciumphosphatsalzen die dritte Klasse und stimulierte Zellen mit hoher Expression von Calciumphosphatsalzen die vierte Klasse. Das LDA-Modell klassifizierte jeweils etwa 100 Zellen pro Datensatz aus 16 FTIR-Mikroimages. Von zwei Objektträgern ohne Stimulation wurden alle IR-Spektren zu nicht stimulierten MSC zugeordnet. IR-Spektren mit Glykogen-Akkumulation wurden an den Rändern von rund 20% der nicht stimulierten MSC nachgewiesen. Wenige isolierte, nicht zusammenhängende IR-Spektren wurden stimulierten MSC zugeordnet und konnten auf Rauscheffekte zurückgeführt werden. Von den zwei Objektträgern mit Stimulation wurde der größte Teil der IR-Spektren zu stimulierten MSC zugeordnet. IR-Spektren mit Expression von Calciumphosphatsalzen wurden in einer zusammenhängenden Gruppe von Zellen nachgewiesen. IR-Spektren von insgesamt fünf Zellen wurden nicht stimulierten Zellen zugeordnet. Diese Zellen schienen in der Anfangsphase des Differenzierungsprozess zu sein oder diese Zellen traten bereits in den Prozess der Apoptose ein, so dass sie sich nicht mehr differenzieren konnten.

Diese Machbarkeitsstudie demonstrierte, wie FTIR-mikroskopisches Imaging und multivariate Datenanalyse eingesetzt werden können, um die Differenzierung von MSC auf Einzelzellbasis zu charakterisieren. Die Identifikation von mehr Zelltypen und Differenzierungszuständen erfordert mehr unabhängige Proben, mehr Daten, höhere SRV und gegebenenfalls andere Klassifikationsalgorithmen. Es gibt bereits Hinweise in den FTIR-Mikroimages von nicht stimulierten Zellen auf zusätzliche Zelltypen, was konsistent ist mit dem bekannten Problem der Heterogenität von MSC in Zellkulturen. Die Anzahl dieser Zellen, die bis jetzt gefunden wurden, ist jedoch zu gering, um sie in dem Klassifikationsmodell zu berücksichtigen. IR-Spektren von einzelnen Zellen mit höheren SRV können unter Umständen aufgenommen werden, wenn IR-Strahlung aus Synchrotronquellen eingesetzt wird. Diese Strahlung bietet einen Intensitätsvorteil von Faktor 100 bis 1000 in Verbindung mit kleinen Mikroskopblenden in der Größenordnung von 5 μm [Miller 2006]. Allerdings müssen die FTIR-Images hier sequentiell im Mapping-Modus aufgenommen werden, was in der Regel zeitaufwändiger ist. Da die Zahl an IR-Messplätzen an Synchrotronquellen weltweit ständig zunimmt, wäre es sehr interessant, für einzelne Zellen die Datenqualität und den Datendurchsatz von FTIR-Mikroimaging mit konventionellen IR-Strahlungsquellen und mit IR-Strahlung aus Synchrotronquellen zu vergleichen.

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Raman- und FTIR-Imaging wurden in der vorliegenden Arbeit als innovative analytische Methoden zur Untersuchung von Gewebe und Zellen eingesetzt. Die Verbindung von Schwingungsspektroskopie und Bildgebung und deren Anwendung auf biomedizinische und zellbiologische Probleme wurden erst möglich, seit ab 1995 empfindliche und schnelle Spektrometer entwickelt worden sind. Solche Systeme standen für diese Experimente erstmalig in Deutschland ab 2001 zur Verfügung, nachdem sie im Institut für Analytische Chemie an der TU Dresden installiert wurden. Besonders vielversprechende Anwendungen ergeben sich aus der Kopplung von Raman-Spektroskopie mit faseroptischen Sonden, was den Rahmen für das Projekt Molekulare Endospektroskopie darstellte. Um dieses Ziel in Manuskript [CK14] zu erreichen, wurden umfangreiche Grundlagenuntersuchungen durchgeführt. Wie in Abschnitt 3 präsentiert, sind die Methoden zunächst für neuroonkologische Fragestellungen entwickelt worden und anschließend auf diagnostische Problemstellungen für andere Gewebetypen und für einzelne Zellen übertragen worden. Die lateralen Auflösungen variierten zwischen 0.3 und 180 μm . Die hohe Komplexität der Daten ergab sich aus der Tatsache, dass die spektralen Merkmale zum Teil klein waren und in der Regel über einen weiten Spektralbereich verteilt waren. Aus diesem Grund war es erforderlich, spezielle multivariate Algorithmen zur Auswertung zu entwickeln, die in den angefügten Originalarbeiten ausführlich beschrieben sind. In einem Übersichtsartikel wurden die wichtigsten 170 Publikationen von 1995 bis September 2006 zu diesem Themenbereich vorgestellt [Krafft 2006]. Die hier zusammengefassten vierzehn Arbeiten sind somit ein signifikanter Beitrag zu diesem noch relativ jungen Forschungsgebiet.

Das allgemeine Konzept hinter den publizierten Studien zur Gewebeklassifikation war (i) die spektralen Profile von mehreren Gewebetypen zu messen, (ii) die relevanten spektralen Eigenschaften zu identifizieren, (iii) mit diesen Eigenschaften ein Modell zu trainieren und (iv) das Modell durch die Zuordnung von unabhängigen Proben zu validieren. Um die Leistungsfähigkeit von neuen Methoden zu beurteilen, müssen die Ergebnisse schließlich mit Standardmethoden verglichen werden. Für Tumorproben gilt die Histopathologie als Goldstandard, obwohl es darüber auch kontroverse Meinungen gibt, da nicht alle Merkmale zur Beurteilung der Aggressivität eines Tumors erfasst werden können. Diese Problematik rechtfertigt das Ziel dieser Arbeit, neue Methoden zur Ergänzung der etablierten Techniken zu entwickeln. Während der gesamten Phase der Projektarbeit wurde mit Spezialisten zusammengearbeitet, um die spektroskopischen Ergebnisse zu prüfen. Kürzlich wurden in einem Paper von Nature Biotechnology unrealistische Erwartungen an das FTIR-Imaging geweckt [Fernandez 2005]. Darin wurde die histopathologische Erkennung von acht Klassen Prostatagewebe mit AUC-Werten über 95% berichtet, die unter praktischen Bedingungen nicht erwartet werden können. AUC – area under the curve – für ROC-Kurven ist ein populäres Maß für die Genauigkeit eines diagnostischen Tests. In einer ROC – receiver operating characteristic – Kurve ist die Sensitivität eines diagnostischen Tests gegen die Falsch-Positiv-Rate bzw. (1-Spezifität) für alle möglichen Schnittpunkte aufgetragen, die positive und negative Ergebnisse definieren [Hanley 1982]. In Anbetracht der biologischen Variabilität, unvermeidlichen Präparationsartefakten und der natürlichen Heterogenität von Gewebeproben kamen Zweifel auf bezüglich der Auswahl von Trainingsdaten und der unzureichenden histopathologischen Validierung. Deshalb wurde dazu ein kritischer Kommentar veröffentlicht [Einenkel 2007]. Trotz der Kritik gilt, dass das Konzept auf viele diagnostische Anwendungen übertragen werden kann und FTIR-Imaging eine leistungsfähige analytische Methode für die Bewertung von Gewebedünnschnitten ist.

Die Spektrometer für FTIR-Imaging sind bereits auf einem hohen technischen Stand. Die Aufnahme von FTIR-Images von größeren Probenbereichen mit lateralen Auflösungen im Bereich von 50 μm oder von kleineren Probenbereichen mit beugungsbegrenzter lateraler Auflösung im Bereich von 5 μm dauert nur wenige Minuten. Die Studien an Gewebedünnschnitten

schnitten demonstrierten, dass FTIR-Imaging in Kombination mit Klassifikationsmodellen die Pathologie und Immunhistochemie ergänzen kann. Die Anwendungen zur Identifikation von malignen Gliomen sind am weitesten fortgeschritten, weil hier die meisten Proben gesammelt und die meisten FTIR-Images aufgenommen wurden. Wenn ein FTIR-Spektrometer in der Nähe des Operationssaals installiert wird, könnten bereits Schnellschnitte operationsbegleitend anhand der Klassifikationsmodelle bewertet werden. Dies würde die Datenbasis weiter vergrößern, was zur zukünftigen Optimierung der Modelle genutzt werden kann. Ein beabsichtigter Nebeneffekt eines FTIR-Spektrometers in der klinischen Umgebung wäre, dass die Distanz zu potentiellen Anwendern und zu deren Problemen verkleinert wird, was sich als Initialzündung für eine Ausweitung der Methode erweisen könnte. Ein weiteres Klassifikationsmodell wurde für FTIR-Images von Hirnmetastasen vorgestellt, um den Primärtumor zu bestimmen. Am zuverlässigsten werden hier Hirnmetastasen von Nierenkrebs zugeordnet, die Glykogen akkumulieren. Die Untersuchungen wurden bis jetzt an Proben durchgeführt, die bis März 2003 gesammelt wurden. Die Arbeiten sollten also mit den Proben seit April 2003 fortgesetzt werden, um die Modelle zu prüfen und weiter zu entwickeln. Die Klassifikation von Gebärmutterhalskrebs mittels FTIR-Imaging ist Thema einer Dissertation, die in Kürze abgeschlossen wird [W. Steller, TU Dresden]. Von besonderem Interesse ist hier der Zusammenhang zwischen Gewebeproben und Zellabstrichen. Ein Schlüsselexperiment soll zeigen, ob FTIR-Imaging in der Lage ist, Tumorzellen in den Zellabstrichen zuverlässig nachzuweisen. Falls das Klassifikationsmodell erfolgreich ist, kann das zu einem Durchbruch der Methode führen, da Zellabstriche zu den Routineuntersuchungen in der Krebsvorsorge gehören und die Bewertung mit den Standardverfahren relativ unzuverlässig ist. In verschiedenen Statistiken wurde berichtet, dass Falsch-Negativ-Raten – also die fehlerhafte Identifikation abnormaler Zellen – von 1 bis 80% auftreten [Dukor 2002]. Die Untersuchungen an Keimzentren im Milzgewebe und an Stammzellen dienen weniger der Diagnostik als vielmehr der Forschung. Zellen sind besonders geeignete Proben für die IR-Spektroskopie, da sie im Gegensatz zu Gewebeproben relativ homogen sind und ihre Verfügbarkeit nicht eingeschränkt ist, da sie sich reproduzierbar und mit definierten Eigenschaften präparieren lassen.

Die Raman-Spektroskopie ist wegen der schwachen Signalintensitäten und ihrer damit verbundenen höheren Anfälligkeit für Störeffekte eine technisch anspruchsvollere Methode, deren Entwicklung noch nicht abgeschlossen ist. In den ersten biologischen Anwendungen vor über 30 Jahren benötigte man viele Stunden Messzeit, um einzelne Raman-Spektren von hochreinen, konzentrierten Protein- oder Nukleinsäurelösungen aufzunehmen. In modernen Raman-Spektrometern wurde die Empfindlichkeit inzwischen so weit gesteigert, dass die Messzeiten auf Sekunden reduziert werden konnten, um Spektren von unbehandelten Zellen und Geweben zu erhalten. Geringe Messzeiten sind besonders wichtig in Imaging-Anwendungen, da die Spektren gewöhnlich im Mapping-Modus entlang eines zweidimensionalen Rasters registriert werden und die Gesamtmesszeit das Produkt aus der Anzahl der Punkte und der Zeit pro Messpunkt ist. Die Zeit ist auch ein wichtiger Aspekt in *in vivo* Anwendungen, weil die Atmung und der Herzschlag pulsierende Bewegungen des zu untersuchenden Gewebes verursachen. Zukünftige Entwicklungen haben das Ziel, die laterale Auflösung und den Datendurchsatz beim Raman-Imaging zu erhöhen sowie neue faseroptische Sonden zu entwickeln.

Anstatt Raman-Images punktwise zu registrieren, bietet eine linienweise Aufnahme Vorteile im Hinblick auf laterale Auflösung entlang der Linie und im Hinblick auf Messzeit, da nur noch in einer Dimension gerastert wird. Eine Laserlinie auf der Probe kann durch eine Zylinderlinse erzeugt werden. Die laterale Information der ersten Dimension wird auf einem zweidimensionalen CCD-Detektor parallel zur Linie und parallel zum Eintrittspalt registriert, während die spektrale Information senkrecht dazu abgebildet wird. Eine zweite Dimension wird aufgenommen, indem die Probe senkrecht zur Linie bewegt wird. Globales oder Weitfeld-Raman-Imaging ist die vergleichbare Technik zum FTIR-Imaging. Der Ansatz erfordert eine homogene, intensive Bestrahlung der Probe. Das gestreute

Licht wird gesammelt und auf einem zweidimensionalen CCD-Detektor abgebildet. Die spektrale Information erhält man durch schmalbandige Filter, die nur einen kleinen Wellenlängenbereich passieren lassen. Um ein Raman-Spektrum für jedes Detektorelement aufzunehmen, benötigt man mehrere dielektrische Filter oder einen durchstimmbaren Filter. Die derzeit verfügbaren Filter arbeiten nach dem akusto-optischen Prinzip (AOTF, acousto-optic tunable filter) oder dem Flüssigkristallprinzip (LCTF, liquid crystal tunable filter). Obwohl ein Raman-Weitfeld-Imaging-System unter Verwendung eines LCTF von Chemicon (USA) kommerziell angeboten wird, wurden bis jetzt noch keine bioanalytischen Studien publiziert. Raman-Images in [CK7], die mit diesem System aufgenommen wurden, demonstrierten am Beispiel eines Hirntumordünnschnittes hohe laterale Auflösungen von 0.5 μm sowie kurze Messzeiten von 25 Minuten für 21000 Datenpunkte. Raman-Spektroskopie mittels Punkt-Mapping, Linien-Mapping und Weitfeld-Imaging wurde verglichen mit dem Ergebnis [Schlücker 2003], dass Linien-Mapping die beste Kombination aus lateraler Auflösung, Spektrenqualität und Messzeit bietet. Trotzdem wird diese Technik bis jetzt noch selten eingesetzt [Golcuk 2006].

Die Lichtleiter in endoskopischen Systemen sind nicht für Raman-Spektroskopie geeignet, weil die anregende Laserstrahlung im Fasermaterial intensive Raman-Signale erzeugt. Deshalb sind für die Kopplung von Endoskopie und Raman-Spektroskopie spezielle miniaturisierte faseroptische Sonden notwendig, die in den Arbeitskanal von Endoskopen eingeführt werden. Eine Sonde von 1.5 mm Außendurchmesser wurde entwickelt, die aus einer zentralen Faser zur Anregung, sechs Fasern zur Detektion, internen optischen Filtern und abgeschrägten Faserenden bestand [Shim 1999]. Mit dieser Raman-Sonde wurden mehrere biomedizinische Studien durchgeführt, wie im Magen-Darm-Trakt [Shim 2000, Molckovsky 2003], im Rachen von Ratten [Bakker Schut 2000], in Arterien [Buschmann 2000], in der Luftröhre von Ratten [Boere 2003] und in der Blase [Crow 2005]. Nachdem die Produktion dieser Sonde eingestellt wurde, schlossen andere Hersteller die Lücke. Die Raman-Sonde von Inphotonics, die in [CK14] eingesetzt wurde, besteht aus jeweils einer Faser für Anregung und Detektion, optischen Filtern und einer Linse. Obwohl die Empfindlichkeit der Raman-Sonde sehr hoch ist, sind die Abmessungen mit einem Außendurchmesser von 13 mm für einen endoskopischen Einsatz zu groß. Eine Schwierigkeit bei der Entwicklung von Raman-Sonden mit kleinen Abmessungen besteht darin, die Bandpassfilter am Ende der Anregungsfaser und die Notchfilter am Anfang der Detektionsfaser zu verkleinern. Als Alternative sind miniaturisierte faseroptische Sonden ohne optische Filter vorgeschlagen worden, da Siliziumdioxid mit niedrigem OH-Gehalt (engl. low OH silica) als Fasermaterial nur geringe spektrale Beiträge im hohen Wellenzahlenbereich von 2400 bis 3800 cm^{-1} erzeugt [Santos 2005]. Andere Entwicklungen nutzen 15 Fasern und eine Balllinse zur Signaldetektion [Motz 2004], die PhAT-Sonde (Kaiser Optical Systems, USA) globale Beleuchtung und 50 Sammelfasern [Schulmerich 2006], Hohlfasern [Konorow 2006] oder konzentrische Ringe von optischen Fasern in der sog. räumlich versetzten (engl. spatially offset) Raman-Spektroskopie [Matousek 2006]. Diese Zusammenstellung zeigt, dass seit Jahren intensiv auf dem Gebiet der faseroptischen Raman-Spektroskopie geforscht wird. Es ist damit zu rechnen, dass ähnlich wie in der klassischen Endoskopie für verschiedene Anwendungen spezielle Sonden entwickelt werden. Für die Neurochirurgie in einem offenen Operationsfeld sind im Prinzip keine miniaturisierten Raman-Sonden erforderlich, so dass die hier durchgeführten Grundlagenuntersuchungen mit der vorhandenen Technik fortgesetzt werden können.

Die Fortschritte in der Raman- und IR-Spektroskopie als bildgebende Verfahren sowie in der Computertechnik zur Datenanalyse ermöglichten Untersuchungen von Geweben und Zellen, die vor wenigen Jahren noch undenkbar schienen. Die zusammengefassten Originalarbeiten und weitere im Literaturverzeichnis aufgeführten Arbeiten belegen, dass die Methoden einzigartige Informationen über komplexe Proben liefern, die mit den Standardverfahren nicht oder nur unter großem Aufwand gewonnen werden. Damit können die Methoden in naher Zukunft eine bedeutende Rolle in der instrumentellen Analytik und in der medizinischen Diagnostik übernehmen.

Literaturverzeichnis

In alphabetischer Reihenfolge:

- Asgari S, Röhrborn HJ, Engelhorn T, Stolke D (2003) Intra-operative characterization of gliomas by near-infrared spectroscopy: possible association with prognosis. *Acta Neurochir.* **145**, 453-460
- Bakker Schut TC, Witjes MJH, Sterenberg JJCM, Speelman OC, Roodenburg JLN, Marple ET, Bruining HA, Puppels GJ (2000) In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* **72**, 6010-6018
- Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M (2005) Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1119-1128
- Barzon L, Zanusso M, Colombo F, Palu G (2006) Clinical trials of gene therapy, virotherapy, and immunotherapy for malignant gliomas. *Cancer Gene Ther.* **13**, 539-554
- Beutlich T (2002) Hochleistungsrechnen in der Chemometrie: Parallelisierung iterativer Algorithmen zur Analyse chemischer Daten. *Diplomarbeit Technische Universität Dresden*
- Bizheva K, Unterhuber A, Hermann B, Povazay B, Sattmann H, Fercher AF, Drexler W, Preusser M, Budka H, Stingl A, Le T (2005) Imaging ex vivo healthy and pathological human brain tissue with ultra-high-resolution optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* **10**, 11006
- Boere IA, Bakker Schut TC, van den Boogert J, de Bruin RWF, Puppels GJ (2003) Use of fiber-optic probes for detection of Barrett's epithelium in the rat oesophagus by Raman spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* **32**, 47-55
- Böhringer HJ, Boller D, Leppert L, Knopp U, Lankenau E, Reusche E, Hüttmann G, Giese A (2006) Time-domain and spectral-domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue. *Laser Surg. Med.* **38**, 588-597
- Bordignon C (2006) Stem-cell therapies for blood diseases. *Nature* **441**, 1100-1102
- Boydston-White S, Gopen T, Houser S, Bargonetti J, Diem M (1999) Infrared spectroscopy of human tissue. V. Infrared spectroscopic studies of myeloid leukemia (ML-1) cells at different phases of the cell cycle. *Biospectrosc.* **5**, 219-227
- Brennan JF, Romer TJ, Lees RS, Tercyak AM, Kramer JR, Feld MS (1997) Determination of human coronary artery composition by Raman spectroscopy. *Circulation*, **96**, 99-105
- Buschmann HP, Marple ET, Wach ML, Bennet B, Bakker Schut TC, Bruining HA, Brusckhe AV, van der Laarse A, Puppels GJ (2000) In vivo determination of the molecular composition of artery wall by intravascular Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **72**, 3771-3775
- Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cai Q, Wang SX, Gambhir SS, Chen X (2006) Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* **6**, 669-576
- Campanella R (1992) Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J. Neurosurg. Sci.*, **36**, 11-25
- Cha S, Tihan T, Crawford F, Fischbein NJ, Chang S, Bollen A, Nelson SJ, Prados M, Berger MS, Dillon WP (2005) Differentiation of low-grade oligodendrogliomas from low-grade astrocytomas by using quantitative blood-volume measurements derived from dynamic susceptibility contrast-enhanced MR-imaging. *Am. J. Neuroradiol.* **26**, 266-273
- Chang JI, Huang YB, Wu PC, Chen CC, Huang SC, Tsai YH (2003) Characterization of human cervical precancerous tissue through the Fourier transform infrared microscopy with mapping method, *Gynecol. Oncol.* **91**, 577-583
- Chen X, Conti PS, Moats RA (2004) In vivo near infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Research* **64**, 8009-8014
- Cheng Z, Wu Y, Yiong Z, Gambhir SS, Chen X (2005) Near infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in living mice. *Bioconjugate Chem.* **16**, 1433-1441

- Cheng Z, Levi J, Xiong Z, Gheysens O, Keren S, Chen X, Gambhir SS (2006) Near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for tumor optical imaging in cell culture and living mice. *Bioconjugate Chem.* **17**, 662-669
- Chiriboga L, Xie P, Yee H, Vigorita V, Zarou D, Zakim D, Diem M (1998) Infrared spectroscopy of human tissue I: Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. *Biospectroscopy* **4**, 47-53
- Chiriboga L, Yee H, Diem M (2000) Infrared spectroscopy of human cells and tissue VI: A comparative study of histopathology and infrared microspectroscopy of normal, cirrhotic, and cancerous liver tissue. *Appl. Spectroscopy* **54**, 1-8
- Chiriboga L, Yee H, Diem M, Wood B (2003) *Gynecol. Oncol.* **91**, 275-277
- Crow P, Molckovsky A, Stone N, Uff J, Wilson B, Wong Kee Song LM (2005) Assessment of fiberoptic near-infrared Raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer, *Urology* **65**, 1126-1130
- Diem M, Boydston-White S, Chiriboga L (1999) Infrared spectroscopy of human cells and tissues. Shining light onto an unsettled subject. *Appl. Spectrosc.* **53**, 148A-161A
- Dukor RK (2002) Vibrational spectroscopy in the detection of cancer, *In: Chalmers JM, Griffiths PR (eds.) Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 3335-3361
- Einenkel J, Steller W, Horn LC, Braumann UD, Krafft C (2007). Unrealistic expectations for IR microspectroscopic imaging. *Nat. Biotechnol.* **25**, 29-31
- Erfurth SC, Peticolas WL (1975) Melting and premelting phenomenon in DNA by laser Raman scattering. *Biopolymers* **14**, 247-264
- Fernandez DC, Bhargava R, Hewitt SM, Levin IW (2005) Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition, *Nat. Biotechnol.* **23**, 469-474
- Fujiwara N, Sakatani K, Katayama Y, Murata Y, Hoshino T, Fukaya C, Yamamoto T (2004) Evoked-cerebral blood oxygenation changes in false-negative activations in BOLD contrast functional MRI of patients with brain tumors. *Neuroimage* **21**, 1464-1471
- Gao X, Nie S (2005) Quantum dot-encoded beads. *Methods Mol. Biol.* **303**, 61-71
- Golcuk K, Mandair GS, Callender AF, Sahar N, Kohn DH, Morris MD (2006) Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 868-873
- Goujon D, Zellweger M, Radu A, Grosjean P, Weber BC, van den Bergh H, Monnier P, Wagnieres G (2003) In vivo autofluorescence imaging of early cancers in the human tracheobronchial tree with a spectrally optimized system. *J. Biomed. Opt.*, **8**, 17-25
- Haglund MM, Berger MS, Hochman DW (1996) Enhanced optical imaging of human gliomas and tumor margins. *Neurosurgery* **38**, 308-317
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z (2000) Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp. Cell Res.* **260**, 248-256
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
- Hanley JA, McNeil BJ (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **143**, 29-36
- Hell SW (2004) Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit. *Phys. Lett. A* **326**(1-2) 140-145
- Hilderbrandt ER, Cozzarelli NR (1995) Comparison of recombination in vitro and in E. coli cells: measure of the effective concentration of DNA in vivo, *Cell* **81**, 331-340
- Huang WE, Griffiths RI, Thompson IP, Bailey MJ, Whiteley AS, (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Anal. Chem.* **76**, 4452-4458
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow *Nature* **2002**, **418**, 41-49
- Kabuto M, Kubota T, Kobayashi H, Nakagawa T, Ishii H, Takeuchi H, Kitai R, Kodera T (1997) Experimental and clinical study of detection of glioma at surgery using fluorescent imaging by a surgical microscope after fluorescein administration. *Neurol. Res.* **19**, 9-16

- Kieft M (1999) Discriminant analysis toolbox, version 0.3, www.mathworks.com
- Kircher MF, Mahmood U, King RS, Weissleder R, Josephson L (2003) A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Research* **63**, 8122-8125
- Kirsch M, Weigel P, Pinzer T, Carroll RS, Black P, Schackert HK, Schackert G (2005) Therapy of hematogenous melanoma brain metastases with endostatin. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1259-1267
- Kleihues P, Cavenee WK (2000) *Pathology and genetics of tumors of the nervous system*. Lyon: IARC Press
- Kneipp J, Miller LM, Spassov S, Sokolowski F, Lasch P, Beekes M, Naumann D (2004) Scrapie-infected cells, isolated prions, and recombinant prion protein: a comparative study, *Biopolymers* **74**, 163-167
- Koljenovic S, Choo-Smith LP, Bakker-Schut TC, Kros JM, van den Berge HJ, Puppels GJ (2002) Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy, *Lab. Invest.* **82**, 1265-1277
- Koljenovic S, Bakker-Schut TC, Vincent A, Kros JM, Puppels GJ (2005) Detection of meningioma in dura mater by Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* **77**, 7958-7965
- Koljenovic S, Bakker-Schut TC, Wolthuis R, Vincent AJPE, Hendriks-Hagevi G, Santos L, Kros JM, Puppels GJ (2007) Raman spectroscopic characterization of porcine brain tissue using a single fiber-optic probe, *Anal. Chem.* **79**, 557-564
- Konorow SO, Addison CJ, Schulze HG, Turner RF, Blades MW (2006) Hollow-core photonic crystal fiber-optic probes for Raman spectroscopy, *Opt. Lett.* **31**, 1911-1913
- Krafft C, Hinrichs W, Orth P, Saenger W, Welfle H (1998) Interaction of Tet repressor with operator DNA and with tetracycline studied by infrared and Raman spectroscopy. *Biophys. J.* **74**, 63-71
- Krafft C, Diehl A, Laettig S, Behlke J, Heinemann U, Pon CL, Gualerzi CO, Welfle H (2000), The fMet-tRNA binding domain of translational initiation factor IF2: the role of the two Cys residues, *FEBS Letters* **471**, 128-132
- Krafft C, Miljanic S, Sobottka S, Schackert G, Salzer S (2003) Near infrared Raman spectroscopy to study the composition of human brain tissue and tumors. *Proc. SPIE*, **5141**, 230-236
- Krafft C (2004) Bioanalytical applications of Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 60-62
- Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R (2005a) Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim. Acta A* **61/7**, 1529-1535
- Krafft C, Steller W, Salzer R (2005b) Infrared spectroscopic imaging - an analytical tool for tumor diagnostics. In: *Conrad K, Bachmann M, Lehmann W, Sack U (Eds.) Methods, possibilities and perspectives of pre-symptomatic tumor diagnostics*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 335-347
- Krafft C, Sergo V (2006). Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissue. *Spectroscopy Int. J.* **20**, 195-218
- Krafft C, Salzer R (to be published 2008). Neuro-oncological applications of Raman and infrared spectroscopy. In: *Diem M, Chalmers JM, Griffith PR (Eds.) Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Kremer P, Wunder A, Sinn H, Haase T, Rheinwald M, Zillmann U, Albert FK, Kunze S (2000) Laser-induced fluorescence detection of malignant gliomas using fluorescein-labeled serum albumin: experimental and preliminary clinical results. *Neurol. Res.* **22**, 481-489
- Kretlow A, Wang Q, Kneipp J, Lasch P, Beekes M, Miller L, Naumann D (2006) FTIR-microspectroscopy of prion-infected nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 948-959
- Lasch P, Naumann D (1998) FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques, *Cell. Mol. Biol.* **44**, 189-202
- Lasch P, Haensch W, Naumann D, Diem M (2004) Imaging of colorectal adenocarcinoma using FTIR microspectroscopy and cluster analysis, *Biochim. Biophys. Acta* **1688**, 176-186
- Lasch P, Naumann D (2006) Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 814-829

- Leppert J, Krajewski J, Kantelhardt SR, Schlauffer S, Petkus N, Reusche E, Hüttmann G, Giese A (2006) Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue. *Neurosurgery* **58**, 759-767
- Lewis EN, Treado PJ, Reeder RC, Story GM, Dowrey AE, Marcott C, Levin IW (1995) Fourier transform spectroscopic imaging using an infrared focal plane array detector, *Anal. Chem.* **67**, 3377-3381
- Li XD, Boppart SA, Van Dam J, Mashimo H, Mutinga M, Drexler W, Klein M, Pitris C, Krinsky ML, Brezinski ME, Fujimoto JG (2000) Optical coherence tomography: advanced technology for the endoscopic imaging of Barrett's esophagus. *Endoscopy*, **32**, 921-930
- Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* **441**, 1094-1096
- Madsen PL, Secher NH (1999) Near-infrared oximetry of the brain. *Prog. Neurobiol.* **58**, 541-560
- Matousek P, Draper ER, Goodship AE, Clark IP, Ronayne KL, Parker AW (2006) Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo, *Appl. Spectrosc.* **60**, 758-763
- Meyer-Hermann M (2002) A mathematical model for the germinal center morphology and affinity maturation. *J. Theor. Biol.* **216**, 273-300
- Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzirotti A, Miklossy J (2006a) Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease *J. Struct. Biol.* **155**, 30-37
- Miller LM, Dumas P (2006b) Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 846-857
- Mohlenhoff B, Romeo M, Diem M, Wood BR (2005) Mie-type scattering and non-Beer-Lambert absorption behavior of human cells in infrared microspectroscopy. *Biophys. J.* **88**; 3635-3640
- Molckovsky A, Wong Kee Song LM, Shim MG, Marcon NE, Wilson BC (2003) Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps, *Gastrointest. Endosc.* **57**, 396-402
- Motz JT, Hunter M, Galindo LH, Gardecki JA, Kramer JR, Dasari RR, Feld MS (2004) Optical fiber-probe for biomedical Raman spectroscopy, *Appl. Optics* **43**, 542-554
- Mourant JR, Gibson RR, Johnson TM, Carpenter S, Short KW, Yamada YR, Freyer JP (2003) Methods for measuring the infrared spectra of biological cells, *Phys. Med. Biol.* **48**, 243-257
- Neviliappan S, Kan LF, Walter TTL, Arulkumaran S, Wong PTT (2002) Infrared spectral features of exfoliated cervical cells, cervical adenocarcinoma tissue and an adenocarcinoma cell line (SiSo) *Gynecol. Oncol.* **85**, 170-174
- Notingher I, Verrier S, Romanska H, Bishop AE, Polak JM, Hench LL (2002) In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *Spectrosc. Int. J.* **15**, 43-51
- Nygren C, von Holst H, Mansson JE, Fredmann P (1997) Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain, *Br. J. Neurosurg.* **11**, 216-220
- Polyzoidis KS, Miliaras G, Pavlidis N (2005) Brain metastasis of unknown primary: A diagnostic and therapeutic dilemma. *Cancer Treatment Reviews* **31**, 247-255
- Geßner R, Winter C, Rösch P, Schmitt M, Petry R, Kiefer W, Lankers M, Popp J (2004) Identification of biotic and abiotic particles by using a combination of optical tweezers and in situ Raman spectroscopy, *ChemPhysChem* **5**, 1159-1170
- Puppels GJ, Olminkhof JHF, Segers-Nolten IGMJ, Otto C, de Mul FFM, Greve J (1991) Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Exp. Cell Res.* **195**, 361-367
- Rehemtulla A, Hall DE, Stegmann LD, Prasad U, Chen G, Bhojani MS, Chenevert TL, Ross BD (2002) Molecular imaging of gene expression and efficacy following adenoviral-mediated brain tumor gene therapy. *Mol. Imaging* **1**, 43-55
- Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B (2000) Review: nuclear events in apoptosis. *J. Struct. Biol.* **129**, 346-358
- Romeo MJ, Wood BR, McNaughton D (2002) Observing the cyclical changes in cervical epithelium using infrared microspectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **28**, 167-175

- Romeo M, Diem M (2005) Correction of dispersive line shape artefact observed in diffuse reflection infrared spectroscopy and absorption/reflection (transflection) infrared micro-spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* **38**, 129-132
- Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthelemy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella de Angelis MG, Torrento Y, Bordignon C, Bottinelli R, Cossu G (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs, *Nature*, **444**, 574-579
- Santos LF, Wolthuis R, Koljenovic S, Ameida RM, Puppels GJ (2005) Fiber-optic probes for in vivo Raman spectroscopy in the high-wavenumber region, *Anal. Chem.* **77**, 6747-6752
- Sato H, Chiba H, Tashiro H, Ozaki Y (2001) Excitation wavelength-dependence changes in Raman spectra of whole blood and hemoglobin: comparison of the spectra with 514.5-, 720-, and 1064-nm excitation, *J. Biomedical Optics* **6**, 366-370
- Schackert G, Fidler IJ (1988) Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int. J. Cancer* **41**, 589-594
- Schackert G, Steinmetz A, Meier U, Sobottka SB (2001) Surgical management of single and multiple brain metastases: results of a retrospective study. *Onkologie* **24**, 246-255
- Schaeberle MD, Kalasinski VF, Luke JL, Lewis EN, Levin IW, Treado PJ (1996) Raman chemical imaging: histopathology of inclusions in human breast tissue, *Anal. Chem.* **68**, 1829-1833
- Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W (2006) Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering, *Eur. J. Trauma* **32**, 114-124
- Schlücker S, Schaeberle MD, Huffmann SW, Levin IW (2003) Raman microspectroscopy: a comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies, *Anal. Chem.* **75**, 4312-4318
- Schulmerich MV, Finney WF, Fredericks RA, Morris MD (2006) Subsurface Raman spectroscopy and mapping using a globally illuminated non-confocal fiber-optic array probe in the presence of Raman photon migration, *Appl. Spectrosc.* **60**, 109-114
- Schultz CP (2002) The potential role of Fourier transform infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis incorporating complex mathematical methods. *Technol. Cancer Res. Treat.* **1**, 95-104
- Schuster KC, Reese I, Urlaub E, Gapes JR, Lendl B (2000) Multidimensional information on the composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy, *Anal. Chem.* **72**, 5529-5534
- Singh GP, Creely CM, Volpe G, Grötsch H, Petrov D (2005) Real time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy, *Anal. Chem.* **77**, 2564-2568
- Shafer-Peltier KE, Haka AS, Fitzmaurice M, Crowe J, Myles J, Dasari RD, Feld MS (2002) Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo, *J. Raman Spectrosc.* **33**, 552-563
- Shah K, Tang Y, Breakefield X, Weissleder R (2003) Realtime imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene* **22**, 6865-6872
- Shah K, Weissleder R (2005) Molecular Optical Imaging: Applications leading to the development of present day therapeutics. *NeuroRx* **2**, 215-225
- Sijens PE, Levendag PC, Vecht CJ, van Dijk P, Oudkerk M (1996) ¹H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR Biomed.* **9**: 65-71
- Shim MG, Wilson BC (1997) Development of an in vivo Raman spectroscopic system for diagnostic applications, *J. Raman Spectrosc.* **28**, 131-142
- Shim MG, Wilson BC, Marple E, Wach M (1999) Study of fiber-optic probes for in vivo medical Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **53**, 619-627
- Shim MG, Wong Kee Song LM, Marcon NE, Wilson BC (2000) In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy, *Photochem. Photobiol.* **72**, 146-150
- Scrivastava D, Ivey KN (2006) Potential of stem-cell based therapies for heart disease *Nature*, **441**, 1097-1099

- Steiniger B, Barth P, Herbst B, Hartnell A, Crocker PR (1997) The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* **92**, 307-316
- Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz A, Kiefmann R, Reulen HJ (1998) Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* **42**, 518-526
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomized controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **7**, 392-401
- Szczerbowska-Boruchowska M, Dumas P, Kastyak MZ, Chwiej J, Lankosz M, Adamek D, Krygowska-Wajs A (2007) Biomolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **459**, 241-248
- Toms SA, Lin WC, Weil RJ, Johnson MD, Jansen ED, Mahadevan-Jansen A (2005) Intraoperative optical spectroscopy identifies infiltrating glioma margins with high sensitivity. *Neurosurgery*, **57**, 382-381
- Toms SA, Konrad PE, Lin WC, Weil RJ (2006) Neuro-oncological applications of optical spectroscopy. *Technol. Cancer Res. Treatm.* **5**, 231-238
- Trehin R, Figureiredo JL, Pittet MJ, Weissleder R, Joeseephson L, Mahmood U (2006) Fluorescent nanoparticle uptake for brain tumor visualization. *Neoplasia* **8**, 302-311
- Uhrbom L, Nerio E, Holland EC (2004) Dissecting tumor maintenance requirements using bioluminescence imaging of cell proliferation in a mouse glioma model. *Nat. Medicine* **10**, 1257-1260
- Uzunbajakava N, Lenfering A, Kraan Y, Volokhina E, Vrensen G, Greve J, Otto C (2002) Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells. *Biophys. J.* **84**, 3968-3981
- Veisheh O, Sun C, Gunn J, Kohler N, Gabikian P, Lee D, Bhattarai N, Ellenbogen R, Sze R, Hallahan A, Olson J, Zhang M (2005) Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas. *Nano Lett.* **5**, 1003-1008
- Westphal V, Hell SW (2005). Nanoscale resolution in the focal plane of an microscope. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 143903
- Wold S, Esbensen K, Geladi P (1987) Principal component analysis. *Chem. Intell. Lab. Syst.* **2**, 37-52
- Wold S (1976) Pattern recognition by means of disjoint principal components model. *Pattern recognition* **8**, 127-139
- Wong PTT, Lacelle S, Fung Kee Fung M, Sentermann M, Mikhael NZ (1995) Characterization of exfoliated cells and tissues from human endocervix and ectocervix by FTIR and ATR/FTIR spectroscopy. *Biospectroscopy* **1**, 357-364
- Wood BR, Quinn MQ, Tait B, Romeo M, Mantsch HH (1998) A FTIR spectroscopic study to identify potential confounding variables and cell types in screening for cervical malignancies, *Biospectrosc.* **4**, 75-91
- Wood BR, McNaughton D (2002) Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo, *J. Raman Spectrosc.* **33**, 517-523
- Wood BR, Chiriboga L, Yee H, Quinn MA, McNaughton D, Diem M (2004) Fourier transform infrared spectral mapping of the cervical transformation zone and dysplastic epithelium, *Gynecol. Oncol.* **93**, 59-68

Danksagungen

Ich danke Prof. Salzer als Leiter des Instituts für Analytische Chemie für den Projektantrag bei der Volkswagenstiftung, deren Bewilligung die Grundlage für diese Habilitationsschrift war, für die hervorragende instrumentelle Ausstattung, die die Voraussetzung für die Arbeit der Nachwuchsgruppe bildete, und für unzählige wertvolle Hinweise in den vergangenen Jahren der Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Kollegen für die Mitarbeit. Dr. Antje Weber, Dr. Enrico Pigorsch, Dr. Carsten Rogge, Wolfram Steller, Gennadi Gudi und Thomas Knetschke gehörten zur Nachwuchsgruppe. Dr. Gerald Steiner, Dr. Tom Richter, Dr. Larisa Shapaval, Dr. Hakim Abu-Id und Claudia Beileites trugen als Mitarbeiter des Instituts für Analytische Chemie zum Erfolg des Projektes bei. Philippe Gorlier, Lars Neudert, Katja Thümmeler, Milena Köhler und Isabell Dreissig bearbeiten Diplomthemen aus dem Bereich der Projektaufgaben.

Ich danke Prof. Schackert als Leiterin der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie und ihren Mitarbeitern Dr. Stephan Sobottka und Dr. Matthias Kirsch für die langjährige Unterstützung der Nachwuchsgruppe. Ohne ihre Kooperation und Mitwirkung wären die zahlreichen Untersuchungen an Hirntumoren nicht möglich gewesen.

Ich danke folgenden Kooperationspartnern und Koautoren für interessante Untersuchungsobjekte und Zuarbeiten zu den Publikationen: Prof. Funk (Institut für Anatomie, TU Dresden), Prof. Steiniger (Arbeitsgruppe Immunbiologie, Universität Marburg), PD Dr. Geiger (Abteilung für Neuropathologie, TU Dresden), Dr. Einenkel (Abteilung für Gynäkologie, Universität Leipzig), Dr. Meyer-Hermann (Frankfurt Institut for Advanced Studies), Dr. Schieker (Chirurgische Klinik und Poliklinik, LMU München).

Ich danke der Volkswagenstiftung für die finanzielle Förderung der Nachwuchsgruppe. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Fließ als jederzeit hilfsbereite Ansprechpartnerin in bürokratischen Angelegenheiten bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Frau Katrin, die seit Jahren an meiner Seite steht und mich auf dem oft schwierigen, wissenschaftlichen Weg motivierte.

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass die Habilitationsschrift und die vorgelegten wissenschaftlichen Arbeiten von mir selbst angefertigt wurden. Ich habe keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften übernommenen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Als verantwortlicher Autor habe ich die vorgelegten wissenschaftlichen Veröffentlichungen verfasst. Die darin beschriebenen Ergebnisse habe ich selbständig gewonnen, und die experimentellen Daten sind von mir aufgenommen und ausgewertet worden. Die Mitarbeit der Koautoren erstreckte sich auf die Bereitstellung der Zell- und Gewebeproben, auf die Durchführung der Referenzuntersuchungen (Histopathologie, Immunhistochemie) sowie auf die Diskussion der Ergebnisse. Veröffentlichung [CK6] stellt eine Ausnahme dar, bei der die Daten vom Doktoranden Wolfram Steller unter meiner Betreuung aufgenommen und analysiert wurden.

Hiermit erkläre ich, dass ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsgesuch an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Hiermit erkläre ich, dass ein an die Fakultät übersendendes Führungszeugnis nach §30 Abs. 5 Bundeszentralregistergesetz bei der zuständigen Meldebehörde beantragt wurde.

Ort, Datum

Dr. Christoph Krafft

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/-ort: 8.12.1966 / Bremen

Familienstand: Seit 2006 verheiratet mit Katrin Krafft, geborene Köhler

E-Mail: christoph.krafft@gmx.de

Schulbildung

1973-1986 Schulbesuch in Delmenhorst / Niedersachsen

1986 Abitur

Wehrdienst

1986-1987 Fünfzehn Monate Grundwehrdienst in der Bundeswehr

Studium

1987-1994 Physik an der Universität Oldenburg / Niedersachsen

1994 Diplom

Wissenschaftliche Tätigkeit

1994-1998 Promotion am Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin
in Berlin als Stipendiat eines DFG-Graduiertenkollegs

1998-2000 Postdoc an der University of Missouri Kansas City, USA

2000-2006 Leiter der Nachwuchsgruppe Molekulare Endospektroskopie am
Institut für Analytische Chemie, Technische Universität Dresden
gefördert von der Volkswagenstiftung

2006-2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Triest, Italien

seit 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Universität
Dresden im Rahmen eines DFG-Projektes