

Aus dem klinischen Institut für Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schönberg)

Entwicklung eines Mittel-Infrarot-Scanners
zur schnellen Detektion und Abbildung
biochemischer Substanzen in medizinischen Gewebeschnitten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades Doctor scientiarum humanarum
(Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von
Tim Kümmel

aus Hanau

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Björn Wängler

*Sei mutig und entschlossen!
Hab keine Angst und lass dich durch nichts erschrecken;
denn ich, der Herr, dein Gott, bin bei dir,
wohin du auch gehst!*

Josua 1,9

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Gewebeanalyse.....	3
1.2 Medizinische Relevanz.....	5
1.3 Zielsetzung und Struktur der Dissertation	6
1.4 Theoretischer Hintergrund zur Auslegung des entwickelten Messsystems..	8
1.5 Medizintechnische Messprinzipien für dünne Gewebeschnitte	20
1.6 Numerische Methode k-means.....	31
1.7 Bezug zur Problemstellung	36
2 Material und Methoden	37
2.1 Auslegung eines Mittelinfrarot-Scanners zum Detektieren medizinischer Gewebeschnitte	37
2.1.1 Theoretische Beschreibung des Scansystems	38
2.1.2 Versuchsaufbau	44
2.1.3 Durchführung von Messungen, Synchronisierung und Parametrierung des MIR-Scanners.....	46
2.1.4 Steuerung Versuchsstand und Software	50
2.2 Technische Validierung der entwickelten Messmethode.....	51
2.2.1 Einflüsse auf die Spotsize (Messfleck) und deren Nachweis	51
2.2.2 Kalibrierung des Bildfelds und Wiederholgenauigkeit des MIR-Scanners	53
2.2.3 Unterschiedliche Scanauflösungen	55
2.2.4 Detektorverstärkung und Einstellung.....	57
2.2.5 Messbarkeit unterschiedlicher Materialien.....	58
2.2.6 Erläuterung zur H&E-Färbung	61
3 Ergebnisse.....	62
3.1 Kontraststeigerung für dünne Schichten	62
3.1.1 Eindringtiefe des Laserlichts in polymeren Substanzen	63
3.1.2 Detektion von überlagerten Strukturen	64
3.2 Modellierung eines Höhenprofils für bekannte lipidhaltige Strukturen	68
3.2.1 Kalibriermodell für lipidhaltige Substanzen	69

3.2.2	Anwendung des Kalibriermodells auf Messergebnisse mit dem Mittelinfrarot-Scanner.....	71
3.3	Herleitung zur Messung von Gewebeschnitten	72
3.3.1	Übertragung der erlangten Messergebnisse auf medizintechnische Anwendungen	72
3.3.2	Relevanz von Proteinstrukturen.....	73
3.3.3	Erste Messungen an tierischem Gewebe – Proof of Principle.....	74
3.4	Anwendung der Messmethode auf murine Gewebeschnitte	76
3.4.1	Referenzmethode.....	76
3.4.2	Workflow	77
3.4.3	Probenvorbereitung, Trocknung von Gewebeschnitten und H&E-Färbung....	79
3.4.4	Preprocessing und k-means.....	81
3.5	Segmentierung von definierten Gehirnstrukturen eines Mausmodells	82
3.5.1	Tiermodell	82
3.5.2	Segmentierung des murinen hippocampalen Hirnbereichs.....	82
3.6	Detektion eines primären hepatozellulären Karzinoms	87
3.6.1	Tiermodell mit Karzinom.....	88
3.6.2	Versuchsdurchführung am gesunden murinen Leberschnitt.....	88
3.6.3	Untersuchung eines hepatozellulären Karzinoms mit dem MIR-Scanner.....	90
4	Diskussion	93
4.1	Technische Bewertung des MIR-Scanners	93
4.2	Beurteilung der erlangten Messergebnisse	95
4.3	Integration der entwickelten Messmethode in weitere Messprozesse	96
4.4	Theoretische Einsatzfähigkeit der entwickelten Messmethode im klinischen Umfeld.....	98
4.5	Risikobewertung.....	99
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
6	Literaturverzeichnis	105
7	Lebenslauf	126
8	Danksagung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AR	Antireflexion (-Beschichtung)
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Charge Coupled Device
CT	Computertomografie
CW	Continuous wave
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRIFTS	Diffuse-Reflexions-Infrarot-Fourier-Transformations-Spektroskopie
ES	Einkanalspektrum
FPA	Focal Plane Array
FSS	Flying Spot Scanner
FT	Fourier Transformation
FT-IR	Fourier Transform Infrarot
FT-IRM	Fourier Transform Infrarot Mikroskop
FT-IRMS	Fourier Transform Infrarot Mikrospektroskopie
FWHM	Full Width at Half Maximum
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HAS	Human serum albumin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IR	Infrarot
KNN	Künstliche Neuronale Netze
LDA	Linear Diskriminante Analyse
MALDI MSI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Mass Spectrometry Imaging
MIR	Mittelinfrarot
MRT	Magnetresonanztomografie

MS	Massenspektrometrie
MSA	Mouse serum albumin
MSE	Mittlerer quadrierter Fehler (Mean Squared Error)
PCA	Principal Component Analysis
PET	Positronenemissionstomografie
REF	Referenzmessung (Untergrundmessung)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
SSE	Sum of Squared Errors
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Die zweithäufigste Todesursache in Deutschland ist die Erkrankung an Krebs. Das geht aus Zahlen des statistischen Bundesamtes und der WHO (World Health Organization) aus dem Jahr 2020 hervor ¹. Dabei konnte ein eindeutig ansteigender Trend von Krebserkrankungen im untersuchten Zeitraum zwischen den Jahren 2000 und 2019 festgestellt werden ²⁻⁴, der sich auch in den ersten Einschätzungen aus dem Jahr 2020 ⁵ fortsetzt. Durchschnittlich werden 45 % der Krebserkrankten operativ behandelt ⁶. Diverse bildgebende Verfahren, wie die Computertomografie (CT) ⁷⁻⁹ oder die Magnetresonanztomografie (MRT) ¹⁰⁻¹² kombiniert mit der Positronenemissionstomografie (PET) ¹³⁻¹⁶ helfen dabei, den Tumor vor dem chirurgischen Eingriff zu lokalisieren und zu charakterisieren ¹⁷⁻²¹. Während der Operation und der damit verbundenen Tumorsektion sind die Tumorgrenzen nur bedingt sichtbar. Zudem sind die klassischen Bildgebungsverfahren nur sehr begrenzt einsetzbar ²² und zeit- bzw. kostenintensiv ²³. Deshalb wird in diesem Zusammenhang die Analyse von Schnellschnitten eingesetzt, die kosteneffizientere und eindeutigere Ergebnisse zum Grad der Tumorentfernung liefert ²⁴. In dieser Arbeit steht die messtechnische Unterstützung bzw. die Analyse der während des chirurgischen Eingriffs resezierten Gewebeschnitte im Fokus.

1.1 Gewebeanalyse

Im Hinblick auf die steigenden Fallzahlen von Krebserkrankungen steigt auch der gesamtwirtschaftliche Aufwand für die stetig zunehmenden und notwendigen Behandlungen. Letztendlich führt dies auch zur Notwendigkeit während der Eingriffe Analyse- und Operationszeit einzusparen. Mit der steigenden Anzahl von Krebserkrankungen nimmt bei der invasiven Tumorentfernung auch die Bedeutung der Schnellanalyse von Gewebeschnitten und die Erkennung von definierten morphologischen Strukturen, malignen und benignen Bereichen sowie von Tumorrändern in Gefrierschnitten immer weiter zu ²⁵. Gleichzeitig soll die Schnellanalyse an Gefrierschnitten, der sogenannten Schnellschnittuntersuchung, reproduzierbar, zuverlässig und die Messergebnisse eindeutig zu bewerten sein, um eine erfolgreiche Operation zu gewährleisten ^{26,27}. Diese allgemeine Anforderung ist nicht nur auf Laboratorien beschränkt, sondern findet sich

besonders im klinischen Umfeld, z. B. bei der schnellen intraoperativen histologischen Untersuchung von Gewebeschnitten wieder^{25–28}. Für Laboruntersuchungen von Gewebeschnitten, die abseits von klinischen Anwendungen durchzuführen sind, ist die Vorabanalyse des zu untersuchenden Schnitts meist eine hilfreiche oder sogar notwendige Bedingung, um beispielsweise Tumore messtechnisch auf molekularer Ebene zu charakterisieren²⁹. In der Regel handelt es sich dabei um den Einsatz technisch komplexer Messtechniken für die molekulare Analyse, wie z. B. die bildgebende Massenspektrometrie³⁰. Zeitaufwändige Messvorgänge (Messzeit von mehreren Stunden) wie diese können durch die Begrenzung der *Region of Interest* (ROI) durch geeignete additive Messmethoden deutlich reduziert werden und führen damit zu geringeren Datenlasten (von ~ 35 GB auf ~ 750 MB) und reduzierten Rechenzeiten (mehrere Stunden auf unter eine Stunde)³⁰. Daher empfiehlt es sich, vor der eigentlichen Probenanalyse eine Vorabanalyse durchzuführen. Auch wenn die Vorabanalyse meist weniger Informationen liefert, reicht diese meist aus, um die ROI festzulegen^{30–32}. Es sind bereits etablierte Vorabanalyse-Methoden wie die FT-IR (Fourier Transform Infrarot)- Bildgebung³⁰, verschiedene konfokale Mikroskop-Aufbauten^{33–36} oder Raman-basierte Messverfahren^{37,38} kommerziell verfügbar. Diese sind je nach Anwendungsfall markierungsfrei (kein Einsatz von Farb- oder Fluoreszenzstoffen) und zielen meist auf geringe Datenmengen in Kombination mit geringen bzw. reduzierten Messzeiten bei maximalem Informationsgehalt ab. Der Fokus liegt dabei oft auf eingeschränkten Messfrequenzen, die für die jeweilige Anwendung maßgeblich sind. Diese bildgebenden Verfahren benötigen dennoch erhebliche Messzeiten, die sich nur zum Teil durch einen geringen Messbereich auf der Probe (< 1 cm²) kompensieren lässt. Messaufbauten, die auf der Infrarotmikroskop-Technik basieren, bieten derzeit geringe Messzeiten (wenige Millisekunden), sind aber in der Regel für Durchlichtuntersuchungen ausgelegt³⁹.

Konfokale Mikroskope, basierend auf der Messung von Direktreflexionen, erfordern meistens eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) oder den Einsatz verschiedener Fluoreszenzstoffe, um optimale molekülabhängige (Vorab-) Analyseergebnisse zu erzielen⁴⁰. Hinzu kommt, dass die damit verbundene Probenvorbereitung zeit- und arbeitsintensiv ist und die originale Probe durch die Probenpräparation irreversibel verändert wird. Das Messergebnis ist damit unter Umständen verfälscht und entspricht nicht der ursprünglichen Probe. Raman-basierte Gewebescanner weisen eine hohe

Nachweisempfindlichkeit auf und sind für die Analyse von Gewebeschnitten gut geeignet⁴¹. Geringe Messzeiten (hier < 10 min) können jedoch nur für kleine (Scan-) Bereiche, wenige Quadratmillimeter, in Kombination mit einer (für beispielsweise molekularbasierende Strukturuntersuchungen in Gewebeschnitten) unzureichenden Ortsauflösung (mehrere hundert Mikrometer) erreicht werden oder besitzen eine hohe Ortsauflösung (< 20 µm) mit unzureichend kleinem Messfeld. Daher sind die Raman-basierenden Verfahren zu etablierten Scanverfahren (wie die FT-IR-Bildgebung), welche in der Lage sind, ganze Gewebeschnitte mit ausreichender Ortsauflösung in einem effizienteren Zeitrahmen zu analysieren, kaum konkurrenzfähig.^{41–43}

1.2 Medizinische Relevanz

Im klinischen Bereich ist eine sogenannte schnelle Gewebeanalyse (Präparations- und Analysezeit < 20 min) auch bei chirurgischen Eingriffen wünschenswert. Insbesondere bei Tumorresektionen, wie z. B. bei Hautkrebs⁴⁴, erkrankten Lymphknoten^{45,46} oder Lebertumoren^{47–49}, wird während der Operation eine histologische Untersuchung einzelner Gewebeabschnitte durchgeführt, um den Fortschritt der Tumorresektion zu bestimmen. In der Regel erfolgt eine Analyse der Probe mittels H&E-gefärbtem Schnellschnitt und muss von einer ärztlichen Fachkraft für Pathologie beurteilt werden. Ziel ist die Exstirpation des präoperativ diagnostizierten Befundes durch die intraoperative Beurteilung eines Schnellschnittes^{25,50}. Obwohl diese Methode zur Auswertung von Gefrierschnitten zeitaufwändig ist und den laufenden chirurgischen Prozess für einige Zeit (durchschnittlich 20 min) unterbricht, ist sie aufgrund mangelnder Alternativen weit verbreitet^{45,51}. Dabei kann es sein, dass die Gewebeprobe erst noch in eine andere klinische Einrichtung gebracht werden muss^{52,53}. Dies erhöht die zeitliche Unterbrechung des chirurgischen Eingriffs erheblich⁵³. Die pathologische Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten unterliegt einigen Ungenauigkeiten (fehlerhafte Bewertung des Schnittes), dennoch ist dieses Verfahren klinisch mangels geeigneter Alternativen akzeptiert und etabliert^{54–56}. Voneinander unabhängige Studien von Zhu *et al.* 2020, Huang *et al.* 2018 und Yoshida *et al.* 2021 haben bewiesen, dass Gewebeschnitte des gleichen Typs von mehreren Fachkräften für Pathologie subjektiv unterschiedlich bewertet und somit Fehldiagnosen gestellt werden können. In besonderen Fällen kann ein Tumor als maligne oder benigne oder als keines der beiden Klassen

eingestuft werden, was zu einer falschen Behandlung des Patienten führt. Damit führen intraoperative Fehldiagnosen von medizinischen Gewebeschnitten unweigerlich zu einem ungeeigneten Verlauf der Operation mit potentiell weitreichenden Folgen. ⁵⁷⁻⁵⁹

1.3 Zielsetzung und Struktur der Dissertation

Sowohl im klinischen als auch im laboratorischen Umfeld ist nicht immer das Ziel, die grundlegenden Eigenschaften eines Tumors zu bestimmen oder seine genaue molekulare Zusammensetzung vorherzusagen. Vielmehr geht es häufig darum, typische Gewebestrukturen oder Tumorränder zu finden, um damit verdächtige Gewebereiche für weitere und genauere Untersuchungen auszuwählen ^{25,30}. Der Tumor und seine topografische Lage sind in den meisten Fällen durch präoperative Untersuchungen bekannt. Allerdings sind die genauen Grenzen zum gesunden Gewebe oft nicht vollständig definierbar und lassen sich erst vor Ort (z. B. intraoperativ) analysieren.

Zukünftig ist aus den oben genannten Gründen ein zuverlässiges und selektives Messverfahren, welches auf geringen Messzeiten (< 20 s) bei gleichzeitig großen Messbereichen (z. B. das Erfassen der gesamten Probenfläche > 1 cm²) und geringen Datenmengen (< 5 MB) basiert, unerlässlich. Mit diesen Anforderungen geht eine immense notwendige Steigerung des Datendurchsatzes einher. Darüber hinaus sind berührunglose und zerstörungsfreie Verfahren gewünscht, um mehrere Analysen an derselben Probe durchführen zu können. Ein in diesem Promotionsvorhaben zu entwickelndes optisches Messsystem, basierend auf der Mittelinfrarot (MIR)-Photometrie, könnte dabei die oben genannten Anforderungen erfüllen und eine Möglichkeit aufzeigen, um mit der oben skizzierten Problematik umzugehen. Dabei soll nicht das Ziel dieser Arbeit sein, Tumore in Tumortypen zu klassifizieren oder spezifische molekulare Untersuchungen durchzuführen. Vielmehr steht die schnelle Segmentierung von charakteristischen Gewebestrukturen bzw. chemischer Strukturen im Vordergrund. Dazu gehört die schnelle Erkennung von Tumorrändern in Gewebeschnitten auf spektral geringer, aber geeignet ausgewählter Informationsbasis.

Geplant ist diese Dissertation in drei wesentliche Teile. Der erste Teil wird sich mit der theoretischen Aufarbeitung spektroskopischer Grundlagen, die eng im Zusammenhang mit der entwickelten Messtechnik stehen befassen und wird sich direkt im Anschluss von diesem Kapitel befinden. Aus diesem theoretischen Abschnitt soll hervorgehen, welche Frequenzbanden zur spektralen Abbildung von biochemischen Substanzen im Gewebeschnitt relevant sind. Auch aufgezeigte numerische Verfahren, die zur Aufbereitung spektroskopischer Datensätze erforderlich sind, stützen dann den theoretischen Teil dieser Arbeit und bilden das Fundament für die anschließend ausgelegte, entwickelte und realisierte Messmethode. Das hierfür geplante Messgerät, der sogenannte Mittelinfrarot (MIR) -Scanner, wird daraufhin anhand einiger Validierungs- und Optimierungsschritte auf die Scanbarkeit biochemischer Substanzen abgestimmt. In diesem Rahmen werden zusätzlich einige technische Eigenschaften der entwickelten optischen Messtechnik dargestellt.

Der zweite Teil dieser Arbeit wird sich auf die Referenzierung der entwickelten Methode beziehen. Dies lässt sich anhand unterschiedlicher Messphantome, welche aus langkettigen CH-Molekülstrukturen bestehen und im Allgemeinen die Absorptionsunterschiede der verwendeten Wellenlängen darstellen, aufzeigen. Die Absorptionsunterschiede werden dabei ein wichtiger Baustein für die geplante Übertragung der Messtechnik auf medizinische Gewebeschnitte sein. Das Überführen von Messphantom zu Gewebeschnitt wird anhand einer tierischen Probe mit eindeutigen Gewebestrukturen erfolgen. Teil dieser Übertragung ist auch die erfolgreiche Anwendung einer numerischen Clusteranalyse, die zur Segmentierung der einzelnen Gewebestrukturen beitragen wird. Die daraus resultierenden Ergebnisse lassen sich dann auf einen bestehenden Arbeitsablauf, einen sogenannten Workflow, zur spektralen Analyse von Gewebestrukturen übertragen. Eine weitere Validierung des Messsystems wird deshalb unter Integration des MIR-Scanners in den bestehenden Workflow und anhand bekannter muriner Hirnstrukturen erfolgen. Voraussichtlich lässt sich gleichzeitig zeigen, dass die Messmethode mit der bereits kommerziell verfügbaren und etablierten FT-IR-Bildgebung an ausgewählten Beispielen vergleichbar ist. Aufbauend auf den Ergebnissen kann dann gezeigt werden, dass das entwickelte Messsystem in der Lage ist, ein natürlich gewachsenes Leberkarzinom im Mausmodell zu erkennen.

Der abschließende Teil der Arbeit wird eine zusammenfassende technische Bewertung der entwickelten Messmethode und der erlangten Messdaten wiedergeben. Zusätzlich wird eine theoretische Integration des MIR-Scanners in einen übergeordneten Messprozess dargestellt. Hierbei kann der Scanner als Vorab-Analyse-Verfahren für weitere hochmolekülelektive Messverfahren (z. B. für die Massenspektrometrie) dienen. Ergänzend dazu ist ebenfalls das Aufzeigen einer Möglichkeit zur Integration des MIR-Scanners in den klinischen Bereich Bestandteil dieses Abschnitts. Anschließend lassen sich Einflussfaktoren, welche auf das Messsystem und die daraus resultierenden Ergebnisse wirken, aufzeigen und gegenüberstellen. Eine abschließende Zusammenfassung dieser Arbeit wird die wichtigsten Erkenntnisse aufführen und diese auf die Praxis übertragen.

1.4 Theoretischer Hintergrund zur Auslegung des entwickelten Messsystems

Um die Funktionsweise der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mess-Apparatur bzw. die damit verbundenen Messergebnisse besser eingliedern zu können, ist eine theoretische Aufarbeitung der molekularen Schwingungslehre (fokussiert auf die hier notwendigen Erkenntnisse) erforderlich. Daraus soll auch hervorgehen, aus welcher Motivation der verwendete Spektralbereich verwendet wird und weshalb es in diesem Zusammenhang erforderlich ist ein neues Messgerät zu entwickeln. Die Darstellung beginnt deshalb mit der grundlegenden Theorie für die Absorption und reicht bis zu einer Gegenüberstellung von ausgewählten Spektroskopie-Verfahren.

Die Absorption, Transmission sowie die Streuung und Emission bilden die Basis eines jeden spektroskopischen (Infrarot)- Verfahrens. Die aufgezählten Lichtwechselwirkungen helfen, Unterschiede im aufgenommenen Spektralbereich zu beschreiben und zeigen die Messbarkeit eines Messeffekts bei unterschiedlich ausgeprägten Molekülschwingungen. Im Folgenden werden deshalb die Auswirkungen der Absorption bzw. Transmission und die Zusammenhänge zu Molekülschwingungen genauer aufgezeigt und auf den in dieser Arbeit verwendeten spektralen Mittelinfrarotbereich übertragen.

Zusammenhänge zwischen Absorption und Transmission

Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz besagt, dass die Absorption A in erster Linie direkt von den betrachteten Probeneigenschaften abhängt⁶⁰. Diese setzen sich aus dem Produkt der Probendicke d , der spezifischen Materialkonzentration c und des materialspezifischen Extinktionskoeffizienten ε zusammen.^{60,61}

$$A = c * d * \varepsilon \quad 1.1$$

Die Absorption kann auch unter Zuhilfenahme der Transmission T ausgedrückt werden. Diese beschreibt die Änderung der Lichtintensität I der gemessenen Probe in Bezug zur Intensität I_0 zu Beginn der Messung. In dem in dieser Arbeit aufgeführten Anwendungsfall wird die Intensität I_0 unter Zuhilfenahme eines Referenzstandards gemessen und in Bezug zur gemessenen Intensität der Probe I gesetzt. Dies gilt für den idealen Fall, dass sich die Streueigenschaften von I zu I_0 nicht ändern.⁶⁰⁻⁶²

$$T = \frac{I}{I_0} \quad 1.2$$

Daraus ergibt sich die Absorptionsberechnung wie folgt:^{60,63}

$$A = -\log_{10}(T) = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad 1.3$$

Die Änderung der Transmissionseigenschaften lässt sich auch durch eine Umstellung des Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetz ausdrücken. An dieser Stelle wird die differenzielle Schichtdicke der Probe betrachtet. Dies führt zu einer Exponentialfunktion:^{60,64}

$$I = I_0 * 10^{-c*d*\varepsilon} \quad 1.4$$

Aufgrund des Verhältnisses zwischen I und I_0 wirken sich geringe Änderungen in der Transmission deutlich aus (vgl. Gleichung 1.3). Diese Änderung wird durch den Logarithmus nichtlinear gedämpft, sodass ein größerer Messbereich sinnvoll dargestellt werden kann. Die berechneten bzw. gemessenen Stoffeigenschaften lassen sich sowohl in Absorptions- als auch in Transmissionsspektren darstellen. Die Darstellung der logarithmischen Absorption ist jedoch weiter verbreitet als die Darstellung der Transmission, da Konzentrationsänderungen sich im Absorptionsspektrum linear abbilden und dadurch leichter interpretierbar sind. Für diese Betrachtungsweise sind unterschiedliche Streueigenschaften von I zu I_0 nicht berücksichtigt. ⁶⁵

Die spektrale Darstellung der Transmission bzw. der Absorption von Infrarotmessungen erfolgt über das Auftragen der Transmission bzw. der Absorption gegen die Wellenzahl $\tilde{\nu}$. Diese steht hierbei in direktem Bezug zur Energie des elektromagnetischen Wechselfeldes, auf das an dieser Stelle nicht eingegangen wird. Vielmehr ist der Bezug von Wellenzahl zur in der Optik allgemein bekannten Wellenlänge λ von Bedeutung. Die Wellenzahl (cm^{-1}) stellt hierbei den reziproken Wert der Wellenlänge (typischerweise in nm oder μm angegeben) dar und lässt sich wie folgt berechnen: ⁶⁵

$$\tilde{\nu} = \frac{10^4}{\lambda} \qquad 1.5$$

Die Absorption wird häufig über ein Spektrometer erfasst, das auf den zu untersuchenden Wellenlängenbereich ausgelegt ist. Das Auftragen der gemessenen Absorption, in Abhängigkeit von der jeweiligen Wellenzahl/Wellenlänge, führt zu spezifischen und substanz- bzw. konzentrationsabhängigen Spektren. Aus diesen lassen sich einzelne von der Wellenzahl abhängige und molekulspezifische Frequenzbereiche ableiten. Anhand bekannter Referenzspektren (z. B. von Reinstoffen) lassen sich somit unbekannte Substanzen zuordnen und analysieren. ⁶⁶

Schwingungsarten und charakteristische Schwingungsbanden

Moleküle besitzen in der Regel nicht nur ein einzelnes Dipolmoment, sondern mehrere (vgl. Abbildung 2) und diese sind abhängig von den am Valenzelektron beteiligten Partnern. Die damit verbundenen Molekülschwingungen lassen sich in unterschiedliche

Schwingungsarten einteilen. Diese finden sich an unterschiedlichen Stellen im spektralen Bereich wieder und kommen dort mit unterschiedlich ausgeprägten Intensitäten vor. Grundsätzlich wird zwischen

- Valenzschwingung und
- Deformationsschwingung

unterschieden. Dazu kommen weitere energetische Anregungen, wie überlagerte Rotationsanregungen und Ober- bzw. Kombinationsschwingungen. Innerhalb der Schwingungsarten wird zusätzlich zwischen asymmetrischen und symmetrischen Schwingungen unterschieden. Diese Aufteilung gibt explizit an, wie der Massepunkt des Moleküls schwingt und lässt gleichzeitig auf die Kopplungsintensität einer auf das Molekül treffenden elektromagnetischen Welle rückschließen. Die im Molekül schwingenden Atome weisen dabei sogenannte Normalschwingungen auf, die das gesamte Schwingungsverhalten des Moleküls abbilden und die Valenz- bzw. Deformationsschwingung (oder alle anderen Schwingungsarten) ergeben. ⁶⁵⁻⁶⁷

Normalschwingungen

Ein Molekül besitzt grundsätzlich mehrere Atome, welche direkten Einfluss auf die Schwingungsform des gesamten Moleküls nehmen. Jedes einzelne Atom des Moleküls besitzt drei Freiheitsgrade. Die Anzahl der Atome stellt die Anzahl der schwingenden Massepunkte dar und wird als N bezeichnet. Daraus resultieren $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade des Moleküls. Für drei der $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade bewegen sich die Atome gleichzeitig in die gleiche Richtung und verändern somit die Lage des Massenschwerpunkts. Diese Bewegungsart wird auch als Translationsbewegung bezeichnet. Nicht alle Substanzen können mit der hier erläuterten Mittelinfrarot-Molekülspektroskopie beschrieben werden, da sie nicht über Dipolwechselwirkungen mit elektromagnetischer Strahlung in Wechselwirkung treten. Hierunter fallen beispielsweise einige Moleküle im gasförmigen Aggregatzustand. Vorwiegend Festkörper, die im Kristallverband periodische molekulare Translationen aufweisen, sind dazu geeignet, mit langwelliger elektromagnetischer Strahlung angeregt zu werden. Durch die Anregung ergeben sich ausgeprägte Absorptionsbanden, die spektroskopisch erfassbar sind.

Zusätzlich führen drei weitere Bewegungsformen der Atome zu einer Rotationsbewegung um den Massenschwerpunkt des Moleküls. Daraus ergeben sich mit folgender Formel die Schwingungsmoden Z :

$$Z = 3N - 6 \quad 1.6$$

Lineare Moleküle besitzen einen Freiheitsgrad mehr, da keine Rotationsbewegung mit dem Massenschwerpunkt oder einem Atom zusammenhängt.

$$Z = 3N - 5 \quad 1.7$$

Die berechnete Anzahl von Schwingungen Z wird als Anzahl der Normalschwingungen eines Moleküls bezeichnet. Die einzelnen Schwingungen können jedoch unabhängig voneinander angeregt werden. Die Normalschwingungen sind von den jeweiligen Atomen des Moleküls abhängig und schwingen gleichzeitig mit einer festen Phase bzw. Frequenz zueinander, die sich nur durch eine andere Molekülzusammensetzung ändert. Mit jeder Normalschwingung ist eine feste Schwingungsfrequenz verbunden und kann in zwei übergeordnete Schwingungsarten unterteilt werden, die Valenz- und Deformationsschwingung. ⁶⁵⁻⁶⁹

Valenz- und Deformationsschwingung

Lineare dreiatomige Moleküle eignen sich für die Einteilung und Veranschaulichung der Valenz- und Deformationsschwingung besonders gut. In Abbildung 1 sind vier Schwingungsarten eines dreiatomigen Moleküls gegenübergestellt. Die erste Schwingungsart zeigt die symmetrische Bewegung der äußeren Atome, die sich auf das Zentralatom zubewegen. Die Bewegung der äußeren Atome erfolgt hierbei in Valenzrichtung. Das Zentralatom fällt mit dem Massenschwerpunkt zusammen, wenn die äußeren Atome die gleiche Masse besitzen. In diesem Fall erfolgt keine Veränderung der Lage des Massenschwerpunkts. Aufgrund der symmetrischen Bewegung und der unveränderten Lage des Massenschwerpunkts wird diese Schwingungsart „symmetrische Valenzschwingung“ genannt. Die fehlende Veränderung des Dipolmoments lässt keine Anregung durch elektromagnetische Strahlung (Infrarot-Strahlung) zu. Diese Schwingungsform ist in diesem Fall IR (Infrarot) -inaktiv. ⁶⁵⁻⁶⁷

In der zweiten Schwingungsform bewegen sich nicht beide äußeren Atome auf das Zentralatom zu. Ein äußeres Atom bewegt sich vom Zentralatom weg. Dadurch wird der Massenschwerpunkt verändert und führt zu einer Schwingung des Zentralatoms. Dieser Schwingungsfall wird aufgrund der asymmetrischen Bewegung der äußeren Atome „asymmetrische Valenzschwingung“ genannt und ist IR-aktiv.^{65,66}

Eine Änderung des Dipolmoments wird ebenso erreicht, wenn sich die äußeren Atome gleichsinnig und senkrecht zur Valenzrichtung bewegen. Das Zentralatom bewegt sich in diesem Fall in entgegengesetzter Richtung zu den äußeren Atomen. Diese Schwingungsform wird als „Deformationsschwingung“ bezeichnet und ist IR-aktiv. Diese Schwingungsart kommt auch als 90 °-gedrehte Schwingung vor. Hierbei durchläuft die Schwingung, im Gegensatz zu der oben erwähnten Deformationsschwingung, eine unterschiedliche Raumkoordinate und wird daher als eigene Normalschwingung angesehen. Letztendlich werden beide Schwingungsformen den gleichen Frequenzwert annehmen und unterscheiden sich nur in der Bezeichnung (degeneriert oder entartet).^{65–69}

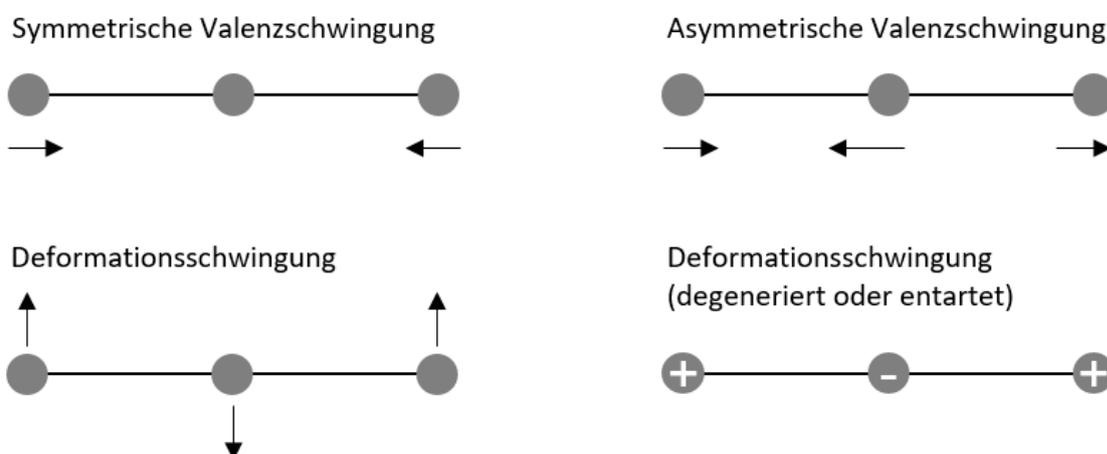


Abbildung 1: Symmetrische und asymmetrische Valenzschwingung.^{65,68,69}

Molekülschwingungen im Infrarot

Die erwähnten Normalschwingungen und damit die Veränderung des Dipolmoments zwischen den Atomen erfolgen durch Energiezufuhr in Form von elektromagnetischer Strahlung. Die Höhe der Energie- bzw. Lichtzufuhr ist abhängig von der Kraftkonstante, die zwischen den Atomen vorliegt. Folglich benötigt eine starke Molekülbindung

eine höhere Energie bzw. elektromagnetische Strahlung, um das Molekül im Mittelinfrarotbereich zum Schwingen zu bringen⁶⁶. Die Energiezufuhr zur Anregung des jeweiligen Moleküls resultiert in einem Absorptionsverhalten der anregenden elektromagnetischen Strahlung. Die elektromagnetische Strahlung besteht in der Praxis aus infrarotem Licht^{65,66}. Die molekülabhängige Absorption des Infrarotlichts ist Grundlage für die Infrarot-Spektroskopie und lässt eine Klassifizierung der einzelnen Molekülbindungen im entsprechenden Spektrum zu. In der IR-Spektroskopie beziehen sich die Spektren auf einen Wellenlängenbereich zwischen 2 μm und 20 μm ⁶⁵⁻⁶⁹. Hierbei werden die Spektren oft in Wellenzahlen angegeben, um den Bezug zur elektromagnetischen Strahlung direkter darzustellen. Der Wellenzahlbereich bezieht sich somit auf Wellenzahlen zwischen 4000 cm^{-1} und 400 cm^{-1} . Dieser spektrale Bereich wird auch als Mittelinfrarot (MIR) bezeichnet^{65,66,69}. Innerhalb des mittelinfraroten Spektralbereichs schwingen überwiegend die funktionellen Gruppen. Eine besonders hohe Dichte an Absorptionsmaxima befindet sich im sogenannten Fingerprintbereich. Vor dem Fingerprintbereich (4000 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1}) schwingen besonders charakteristische Schwingungsbanden einiger funktioneller Gruppen. Aus diesem Grund erfolgt in dieser Arbeit eine Unterteilung des Mittelinfrarotbereichs in den *Bereich der funktionellen Gruppen* und den *Fingerprintbereich*.^{65,66,68,70,71}

In Abbildung 2 sind die einzelnen Schwingungsbereiche im MIR mit den jeweils charakteristischen Schwingungsbanden dargestellt. Im Bereich der funktionellen Gruppen befinden sich überwiegend Valenzschwingungsbanden von $\nu(\text{O-H})$, $\nu(\text{C-H})$ und $\nu(\text{N-H})$, sowie die Banden für die Valenzschwingung von Doppel-, Dreifachbindungen und einiger Aromaten⁶⁵. Demgegenüber befinden sich überwiegend Kombinationschwingungen und Deformations- bzw. weitere Valenzschwingungen im Fingerprintbereich^{65,72}. Für diese Arbeit ist der spektrale Bereich vor dem Fingerprintbereich von besonderer Bedeutung. Speziell die sich dort befindenden OH-, NH- und CH-Schwingungen sind Grundlage für die entwickelte Messmethode zur schnellen Abbildung medizinischer Gewebeschnitte und werden aus diesem Grund genauer beleuchtet.

Charakteristische Infrarot-Schwingungen

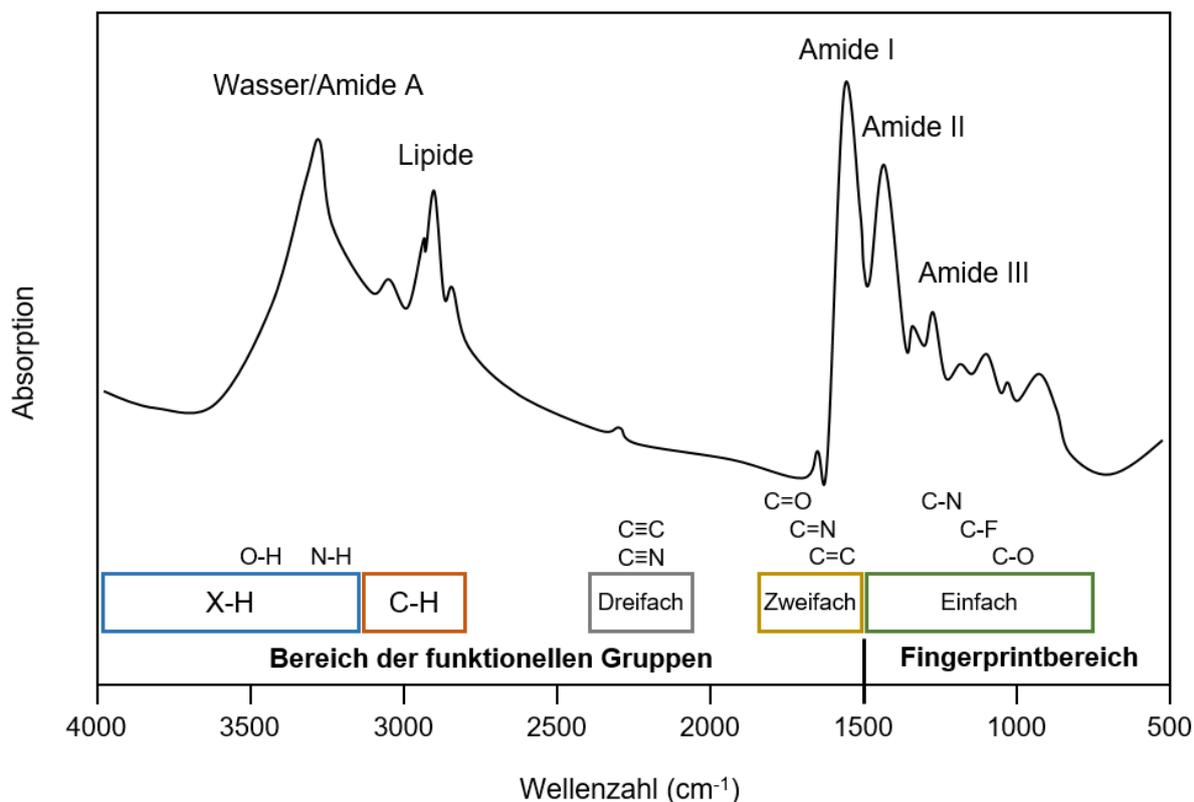


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines beliebigen IR-Spektrums zur Identifizierung charakteristischer Schwingungsbanden und Einteilung in unterschiedliche Schwingungsbereiche. ^{65,66,68}

Bereich der funktionellen Gruppen

Die Absorptionsbanden im Bereich der funktionellen Gruppen, auch Gruppenfrequenzen genannt, sind im Vergleich zu anderen Wellenlängenbereichen (hier speziell zum Fingerprintbereich, siehe Abbildung 2 und folgendes Unterkapitel) deutlich spektral voneinander getrennt und lassen in diesem Zusammenhang eine eindeutige molekülselektive Analyse des Spektrums zu ^{65,73}. Somit kann zwischen einem Ester, einem Keton, einer Säure bzw. einem Aldehyd sowie einem primären, sekundären und tertiären Alkohol spektral unterschieden werden. Der typische spektrale Schwingungsbereich der funktionellen Gruppen bezieht sich auf die Wellenzahlen zwischen 4000 cm⁻¹ und 1500 cm⁻¹. ^{65,70,71,74}

Neben Doppel- und Dreifachbindungen befinden sich auch die OH-, NH- und CH-Einfachbindungen in diesem Bereich. Dies liegt an der geringen Masse des H-Atoms, das

die Schwingungseigenschaft wesentlich beeinflusst und dadurch die Valenzschwingung in einen höheren Wellenzahlbereich verschiebt.^{65,69}

Neben der Valenzschwingung der OH-Gruppe dominieren die NH-Schwingungen mit einer breiten starken Schwingungsbande den Bereich der funktionellen Gruppen. Der Hauptpeak der OH-Gruppe erstreckt sich von 3600 cm^{-1} bis 3150 cm^{-1} . Der gesamte Schwingungsbereich der OH-Gruppe kann sich, je nach Molekülzusammensetzung, auf 2400 cm^{-1} ausbreiten^{65,75}. Diese Bande gibt einen deutlichen Hinweis auf Anteile von Wasser oder Alkoholen in der Probe.

Der Peak der NH-Gruppen befindet sich zwischen 3500 cm^{-1} und 3050 cm^{-1} . Auch dieser Peak kann in diversen Sonderformen bis 2000 cm^{-1} schwingen. Die NH-Gruppen beinhalten in diesem spektralen Bereich symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen von Proteinstrukturen bzw. Amide A. Innerhalb des Peaks kann zwischen primären und sekundären Proteinstrukturen unterschieden werden. Die breite und starke Valenzschwingung der OH- und NH-Gruppe führt unweigerlich zu einer Überlagerung der beiden Schwingungen. Aus diesem Grund ist speziell für die Untersuchung medizinischer Proben darauf zu achten, dass die Probe keinen Wasseranteil mehr besitzt, wenn überwiegend proteinhaltige Strukturen untersucht werden sollen. Die Trocknung der Probe zur spektralen Analyse ist daher ein weit verbreiteter Arbeitsschritt in der Probenvorbereitung von Gewebeschnitten.^{69,76}

Lipidhaltige Moleküle besitzen CH_2 - bzw. CH_3 -Anteile, die im mittelinfraroten Wellenlängenbereich eine besonders starke und scharfe Absorptionsbande ausbilden. Die Peaks für die symmetrische und asymmetrische Valenzschwingung befinden sich zwischen 3000 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} ⁷⁷. Sie geben unter anderem Aufschluss über die Fettverteilung in beispielsweise Gewebeschnitten oder generellen Gewebestrukturen, die einen hohen Konzentrationsanteil von CH_2/CH_3 -Molekülen aufweisen. Neben dem medizinischen Aspekt sind CH_2/CH_3 -Verbindungen auch ein Hinweis auf Polymere oder Zellulose.^{65,75,77}

Zwischen dem Wellenlängenbereich von 2700 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} befinden sich die Schwingungsbanden von Doppel- und Dreifachbindungen. In diesem Schwingungsbereich treten somit einige Aromate-, Nitrile- und Cyanide- (Dreifachbindung C-C und

C-N) Banden mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. Im Wesentlichen sind diese Schwingungspeaks über schmale starke Banden charakterisiert. ^{65,66,77}

Bei der Wellenzahl 1650 cm^{-1} prägen sich Amide aus, speziell Amide I. Diese Bande wird durch das Schwingen von einer CO-Doppelbindung hervorgerufen und gehört zu der stärksten Schwingungsbande im mittelinfraroten Wellenlängenbereich. Dicht an dieser Bande und teilweise überlagernd folgen kleinere Banden, die durch Doppelbindungen von C-N (1750 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1}) und C-C (1700 cm^{-1} bis 1550 cm^{-1}) hervorgerufen werden. ^{66,77}

Fingerprintbereich

Der sogenannte Fingerprintbereich beginnt ab einer Wellenzahl von 1500 cm^{-1} und reicht bis 750 cm^{-1} ⁷⁷. Hier treten unterschiedliche Valenz- und Deformationsschwingungen, hauptsächlich von Einfachbindungen, auf ^{65,66}. Die Überlagerung einer sogenannten Gerüstschwingung, die Schwingung eines ganzen Molekülgerüsts, erschwert die Zuordnung einzelner Schwingungsbanden im Fingerprintbereich. Jedoch führt dies zu einem charakteristischen Strahlungsabsorptionsverhalten, welches eine Substanz-Identifikation von chemischen Verbindungen ermöglicht. Grundsätzlich lassen sich aber mittelstarke und schwache Schwingungen im Fingerprintbereich nur schwer zuordnen. Oft werden diese Schwingungsbanden von den starken und dominanten Banden überlagert. ^{65,66,68}

Im Fingerprintbereich befinden sich unter anderem die Schwingungsbanden von Kohlenhydraten und Nukleinsäuren. Um Deformationsschwingungen der Alkyl-Gruppen CH_3 und CH_2 handelt es sich bei Banden im Intervall von 1300 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} ⁷⁷. Der Bereich zwischen 1350 cm^{-1} und 800 cm^{-1} zeigt die Nukleinsäuren. In diesem Spektralbereich befinden sich auch symmetrische und antisymmetrische CO- und PO-Schwingungen der DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) ^{77,78}. Betrachtet man den komplexeren Spektralbereich von 1200 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} , findet man hier Phosphodiester-Bindungen von Nukleinsäuren und Phospholipiden. Dazu kommen die CO-Absorptionsbanden von Glykogen und diversen Kohlenhydraten. ⁷⁸

Übersicht über relevante Schwingungsbanden im Bereich der funktionellen Gruppen und im Fingerprintbereich

Eine zusammenfassende tabellarische Übersicht über relevante Schwingungsbanden im mittelinfraroten Wellenlängenbereich ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Bandenart der Schwingung gibt hierbei einen Hinweis auf die generelle spektrale Messbarkeit der Bande.

Tabelle 1: Übersicht über relevante Schwingungsbanden der funktionellen Gruppen und dem Fingerprintbereich nach ^{65,66,77,79}. Ergänzende Angabe der Bandenform zur jeweiligen Schwingungsgruppe.

(Funktionelle) Gruppe	Wellenzahlbereich	Bandenform
-O-H	3600-3150 cm ⁻¹	breite Bande
-N-H	3500-3050 cm ⁻¹	breite Bande
-C-H	3000-2800 cm ⁻¹	schmale Bande (meist als Doppelpeak -CH ₂ /CH ₃)
-C≡N	2300-2135 cm ⁻¹	scharfe Bande
-C≡C	2260-2100 cm ⁻¹	scharfe Bande
-C=O	1900-1550 cm ⁻¹	intensive scharfe Bande
-C-N -C-F -S=O -C-O	1450-1000 cm ⁻¹	intensive scharfe Banden
-P-O-C	1260-740 cm ⁻¹	breite Bande

Übertragung der IR-Spektroskopie auf medizintechnische Anwendungen

Die IR-Spektroskopie wird überwiegend zur spektralen Analyse von Festkörpern oder Flüssigkeiten angewendet. Hierbei werden in den meisten Fällen Proben aus wenig unterschiedlichen, also annähernd homogenen, Molekülstrukturen verwendet, um beispielsweise Konzentrationsänderungen innerhalb einer Probecharge nachzuweisen. Auch die Zuordnung unbekannter Substanzen ist mittels der IR-Spektroskopie möglich. Die gemessenen Spektren lassen sich idealerweise mit der Literatur vergleichen

und zuordnen. Medizinische Proben stellen in der Regel einen komplexen Zusammenhang aus Molekülen dar. Zudem sind die biochemischen Prozesse in der Probe nicht immer reproduzierbar oder vergleichbar. Die zeitliche Veränderung, bedingt durch beispielsweise Trocknung unterschiedlicher Substanzen innerhalb des Messobjekts, ist ein wesentlicher Einflussfaktor, der bei der Analyse berücksichtigt werden muss. Gerade bei tierischem oder humanem Gewebematerial kann die Probe stark variieren. Dies liegt unter anderem am Alter, der anatomischen Lage oder dem unterschiedlichen Probenstamm. Üblicherweise werden medizinische Substanzen vor der spektralen Analyse ausreichend getrocknet, damit der Wasseranteil in der Probe auf ein Minimum reduziert wird. Somit lässt sich die Überlagerung der NH-Bande, und teilweise der CH-Bande, durch die OH-Bande des Wassers vermeiden. Anhand der NH-Bande lassen sich zum Beispiel genauere Untersuchungen der Proteinverbindungen und des damit zusammenhängenden Proteingerüsts, dem sogenannten *Backbone der Proteine*, durchführen. Generell lassen sich spektral getrennte Schwingungsbanden mit keiner oder nur geringer Überlagerung mit anderen Banden gut analysieren. Dies trifft überwiegend auf Schwingungsbanden zwischen 4000 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} zu. Im Fingerprintbereich kann die spektrale Überlagerung für medizinische Gewebeproben so komplex sein, dass die Aussagekraft nur mit hinreichenden Referenzmessungen gestützt werden kann. Diese Problematik trifft überwiegend für einzelne Punktmessungen auf der Probe zu.^{65,72}

Im Gegensatz zu einer einzelnen Punktmessung von medizinischen Proben bieten sogenannte spektrale bildgebende Verfahren, wie die FT-IR-Bildgebung, spektrale Informationen, die sich auf einen flächigen Bereich des Gewebematerials beziehen. Dies ermöglicht die spektrale Analyse unterschiedlichster Gewebestrukturen. Die daraus resultierenden einzelnen Messpunkte lassen sich für spezielle Anwendungsfälle, wie die Tumordetektion oder die Segmentation von Strukturen, weiterverarbeiten und durch multivariante Datenanalysen oder diverse andere Clusteranalysen auswerten. Der Einfluss durch die Überlagerung einzelner Schwingungsbanden lässt sich damit numerisch reduzieren⁸⁰. Solche Überlagerungen stellen dennoch im medizintechnischen Kontext eine Herausforderung dar. Besonders bei der Untersuchung von medizinischen Gewebeschnitten kann deshalb im Fingerprintbereich teilweise nur eine ungenaue Aussage über die vorliegende Molekülzusammensetzung getroffen werden.

Weitere molekülselektivere Analysemethoden, wie die Massenspektrometrie (MS), sind dann ergänzend erforderlich. ^{30,33,65,80}

1.5 Medizintechnische Messprinzipien für dünne Gewebeschnitte

Die Schwingungsspektroskopie, speziell die IR-Spektroskopie, ist auf grundlegende und etablierte Messprinzipien zurückzuführen. Jede dieser Messmethoden bietet erhebliche Vorteile für unterschiedlichste Messaufgaben. In den folgenden Abschnitten werden einige grundlegende Messverfahren zur optischen Messung von Molekülschwingungen erläutert und aufgrund ihrer medizintechnischen Relevanz eingeordnet. Des Weiteren erfolgt ein kurzer Überblick über die gängigsten Messarten in der IR-Spektroskopie.

Abgeschwächte Totalreflexions-Spektroskopie

Die abgeschwächte Totalreflexions- (ATR) Spektroskopie eignet sich besonders für die Analyse von

- flüssigem (sehr gut),
- gasförmigem (weniger gut) oder
- festem (weniger gut)

Probenmaterial und setzt eine Berührung der Probe mit dem ATR-Kristall voraus ^{65,66,73}. Generell sind alle Materialien für ATR-Messungen geeignet, die evaneszente Wellen und somit ein Eindringen („depth of penetration“) des verwendeten infraroten Lichts um wenige Mikrometer zulassen und dann eine sichtbare Absorption aufweisen. Evaneszente Wellen entstehen, wenn (Licht-) Wellen aus einem höheren Brechungsindex (z. B. für ZnSe $n = 2,22$ oder Diamant $n = 2,42$) in ein Medium mit geringerem Brechungsindex (z. B. für Luft $n = \sim 1$) überführt werden sollen, dies aber aus energetischen Gründen nicht möglich ist. Dies ist in der Regel bei ATR-Prismen der Fall, da das ATR-Prisma einen höheren Brechungsindex aufweist als das zu untersuchende Medium. ⁸¹

Die Eindringtiefe d_p der über quantenmechanische Überlegungen erklärbar evaneszenten Wellen bzw. IR-Strahlung richtet sich nach dem Brechungsindex des verwendeten Mediums n_1 und nach dem Brechungsindex des Reflexionselements n_2 (ATR-Prisma). Zudem hat die zu untersuchende Wellenlänge λ in Kombination mit dem Einfallswinkel θ direkten Einfluss auf die Eindringtiefe der evaneszenten Welle (siehe Gleichung 1.8).⁶⁵

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad 1.8$$

Nach aktuellem Stand der Technik werden klassische ATR-Systeme mit einem IR-Emitter, einem ATR-Prisma und einem entsprechenden Detektor aufgebaut. Die Geometrie des ATR-Prismas variiert stark mit den gegebenen Baugrößen und der Anordnung von Beleuchtungsquelle und Detektion. Der charakteristische Anschliffwinkel eines ATR-Prismas liegt bei 45° , kann aber je nach Anwendungsfall und der Anzahl von internen Reflexionen deutlich abweichen. Der Anschliffwinkel und die Einkopplung der IR-Strahlung in das ATR-Prisma beeinflussen direkt den Einfallswinkel θ der evaneszenten Wellen und damit auch die Eindringtiefe d_p .⁸²

Eine schematische ATR-Messung eines beliebigen Mediums ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Messbereich des ATR-Systems ist durch die Größe des ATR-Prismas bestimmt. Die Anzahl der Reflexionen innerhalb des ATR-Prismas gibt die Anzahl der Messpunkte an der Probe an. Das Messsignal entspricht somit einer Mittelung aus mehreren Messpunkten. Dies stellt zwar eine höhere Messsicherheit dar, dennoch sinkt die Intensität des Messsignals mit jeder Reflexion. Für die Messung von hoch IR-aktiven Molekülen ist daher eine geringe Reflexionsanzahl zu bevorzugen.⁸³

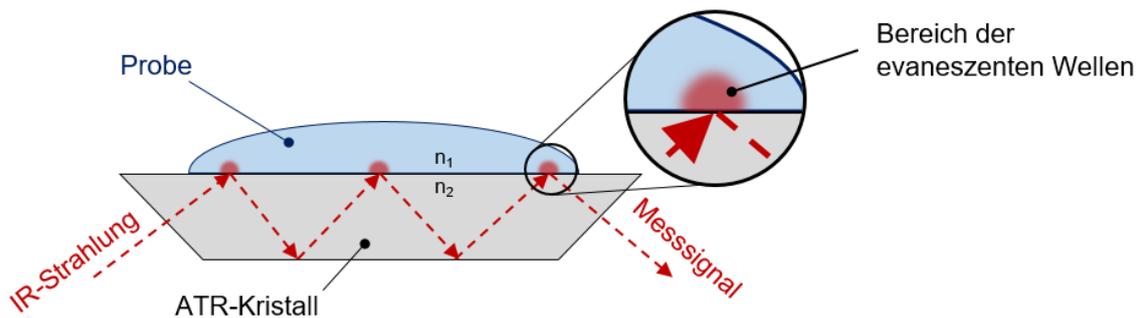


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer ATR-Messung ⁸³.

Diese Technik lässt sich auf medizinische Anwendungen übertragen, sofern es sich um homogene Substanzen bzw. Lösungen handelt. Messungen, die zerstörungsfrei durchgeführt werden müssen, eignen sich für diese Messmethode nicht, da der Kontakt zwischen ATR-Prisma und Messmedium gegeben sein muss.

Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Die FT-IR-Spektroskopie zählt zu einer der meist genutzten Messmethoden in der Infrarotspektroskopie. Das FT-IR-Spektrometer stützt sich überwiegend auf die Verwendung eines (Michelson-) Interferometers ⁷³. Eine thermische Quelle bildet hierbei die Lichtquelle Q für die infrarote Strahlung (vgl. Abbildung 4). Die emittierte Strahlung durchläuft einen Strahlteiler ST , der je nach Ausführungsform die Hälfte der einfallenden Strahlung durchlässt und die andere Hälfte orthogonal zur Lichtquelle reflektiert. Die reflektierte Strahlung wird auf einen feststehenden Spiegel S_1 projiziert und durchläuft somit eine definierte Wegstrecke L . Der feststehende Spiegel reflektiert die Strahlung erneut auf den Strahlteiler. Somit ergibt sich für einen Teil der emittierten Strahlung eine Wegstrecke von $2L$. Die Strahlung, die den Strahlteiler durchläuft, erfährt eine vergleichbare Wegstrecke und wird auch über einen Spiegel S_2 wieder auf den Strahlteiler abgelenkt. Im Vergleich zum Spiegel S_1 , ist Spiegel S_2 nicht feststehend montiert, sondern kann hochfrequent ausgelenkt werden. Somit ergibt sich eine zusätzliche Wegstrecke x durch die Auslenkbewegung des Spiegels S_2 . Daraus resultiert für diesen Lichtweg eine gesamte Weglänge von $2(L+x)$. Der Strahlteiler kombiniert die Lichtstrahlen wieder, wobei sich eine Differenz von $2x$ zwischen den beiden Lichtstrahlen einstellt. Eine bestimmte Wellenlänge λ_b erhält man somit, wenn $2x$ ein ganz-

zahliges Vielfaches von dieser Wellenlänge ist. Für alle anderen eingekoppelten Wellenlängen ergibt sich eine destruktive Interferenz am Detektor. Somit ist einer definierten Position x_b auch eine definierte Wellenlänge λ_b zugeordnet. Der modulierte Lichtstrahl wird somit durch das Interferometer erzeugt und durchläuft anschließend die Probe P . Das dann vom Detektor D erfasste Signal, das Interferogramm, ist von der Strahlungsintensität und der Auslenkung x abhängig. Anhand einer Fourier-Transformation (FT) lässt sich das Messsignal in ein wellenzahlabhängiges Einkanalspektrum ES umrechnen. Das vollständig verrechnete Messsignal ergibt sich dann durch die Verrechnung des ES mit einer Untergrundmessung REF (Referenzmessung). Die Mess- und Verrechnungszeit beträgt für das FT-IR-Spektrometer wenige Millisekunden bis Sekunden und ist damit eine nach aktuellem Stand der Technik sehr effiziente Methode zum Messen von IR-Spektren und kann mit diversen Aufsätzen (bspw. ATR-Aufsätzen) kombiniert werden. ^{65,66,68,84,85}

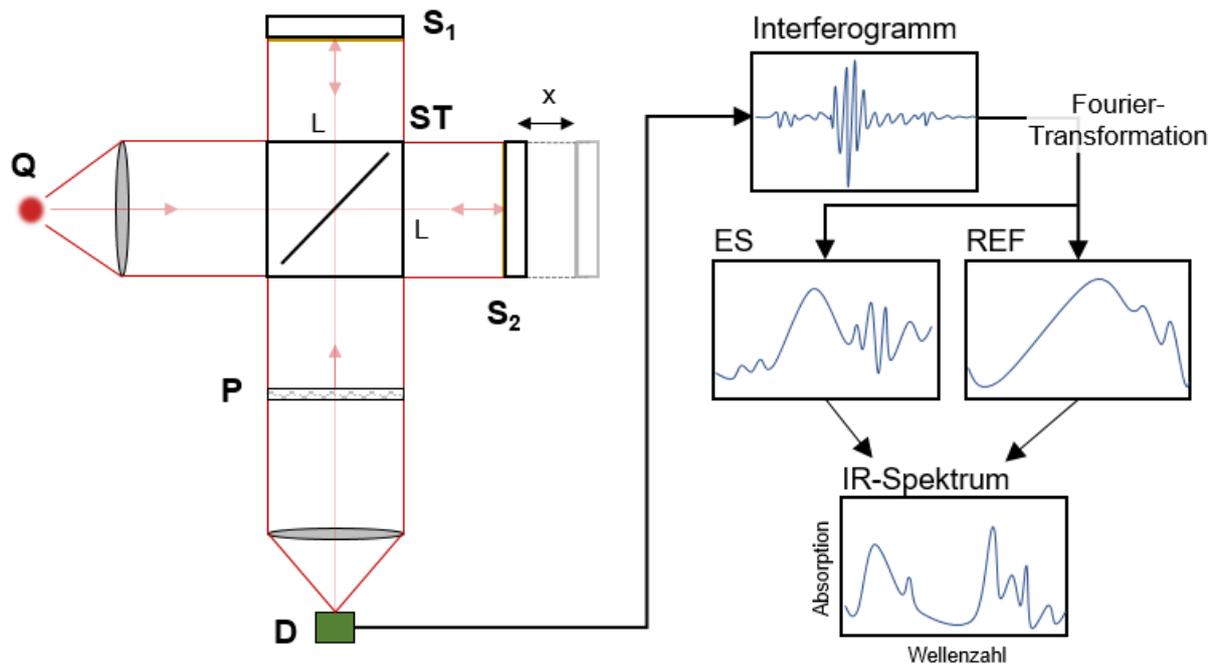


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messprinzips mittels FT-IR-Spektroskopie. ^{65,66,68,84,85}

Diffuse Reflexions-Infrarot-Fourier-Transformations-Spektroskopie

Die Diffuse-Reflexions-Infrarot-Fourier-Transformations-Spektroskopie (DRIFTS) be-
ruht, wie der Name schon andeutet, auf der diffusen Reflexionsmessung. DRIFTS ist

hierbei eine Kombination von diffuser Reflexionsmessung und der schon beschriebenen FT-IR-Spektroskopie und bezieht sich überwiegend auf die Messung von Feststoffen. Der diffuse Messanteil wird durch ein komplexes Spiegelsystem erreicht. Das Spiegelsystem leitet die von der thermischen Quelle Q emittierte Strahlung über einen Spiegel S_1 auf einen Parabolspiegel und fokussiert die Strahlung auf die Probe (siehe Abbildung 5). Die Fokussierung erfolgt durch den Parabolspiegel, der das gemessene Signal über einen Spiegel S_2 wieder auf die Detektoreinheit D abbildet. Das auf die Probe P fallende infrarote Licht wird absorbiert und gestreut. Das Maß der Absorption und Streuung ist abhängig von der Molekülzusammensetzung der Probe. Der Detektor erfasst dabei nur das diffus reflektierte Messsignal. Die Probe befindet sich während des Messprozesses in einer vorgegebenen Halterung. Die Messung bezieht sich auf eine gemittelte Fläche, weshalb sich homogene Zusammensetzungen der Proben anbieten. Alle gemessenen IR-Spektren sind auf eine vorab gemessene Referenzmessung, auf einen Goldstandard, bezogen. ⁶⁸

Mit der DRIFTS-Methode lassen sich beispielsweise unbekannte Stoffe in der Forensik und der Fehler- und Wettbewerbsanalyse identifizieren. Bei Produktdefekten können Verunreinigungen identifiziert oder unbekannte Stoffe bestimmt werden. Für medizintechnische Anwendungen lässt sich diese Methode nur auf annähernd homogene Substanzen anwenden. Der Messpunkt ist je nach Bauform mehrere Millimeter groß. Daraus resultiert eine Mittelung der Messung über die Messfläche. Für die Analyse von beispielsweise Gewebeschnitten ist diese spektrale Messmethode daher nicht geeignet. Das bildgebende Erfassen von strukturellen Unterschieden ist im hier aufgezeigten klassischen Messprinzip somit nicht realisierbar. ^{86,87}

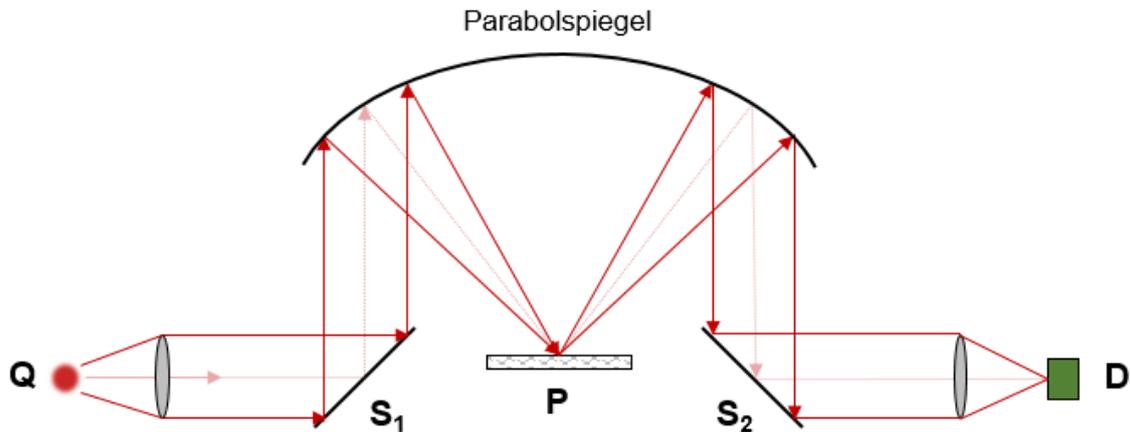


Abbildung 5: Funktionsprinzip eines DRIFT-Spektrometers für die diffuse spektrale Vermessung von festen Proben. ^{65,66,68}

Bildgebende Methoden im Mittelinfrarot

In der Literatur finden sich unterschiedlichste Aufbauten von IR-bildgebenden Verfahren. Da die Datenaufnahme in den meisten Fällen aus ganzen Spektren besteht, beinhalten viele dieser Methoden ein Spektrometer, beispielsweise ein FT-IR-Spektrometer oder andere Aufbauten, die einem Spektrometer gleichen (diverse Sensorchips). Im medizintechnischen Zusammenhang werden oft Mikroskop-Aufbauten in Kombination mit einem FT-IR Spektrometer verwendet ^{88,89}. Aus diesem Grund werden solche MIR-Mikroskope in der Literatur auch als FT-IR-Mikroskop (FT-IRM) und das gesamte Verfahren als FT-IR-Mikrospektroskopie (FT-IRMS) bezeichnet. Die Mikroskope lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- Reflexion ⁸⁸
- Transmission ⁹⁰
- ATR ^{91,92}

Die ersten beiden Kategorien (Reflexion und Transmission) können dabei in einem Gerät integriert sein. ATR-Bildgebung wird meist für flüssige Substanzen verwendet und stellt durch die verwendete ATR-Technik ein separates Messsystem dar, das adaptiv an Reflexions- oder Transmissionsaufbauten gekoppelt werden kann. Oft lässt sich hierbei aber nur die gemeinsame Lichtquelle nutzen und nicht der gesamte optische Messpfad. ^{89–92}

IR-Mikroskope verfügen dabei über eine modulierte (bzw. getaktete) IR-Lichtquelle. Über ein Schwarzschild-Objektiv wird das IR-Licht auf die Probe fokussiert. Für Reflexionsmessungen befindet sich die Probe während der Messung auf einem reflektierenden Untergrund, sodass ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird. Für Transmissionsmessungen befindet sich die Probe auf einem IR-durchlässigen Substrat, wie beispielsweise CaF_2 . Die Probenfixierung bei ATR-basierenden bildgebenden Systemen erfolgt über spezielle Küvetten, die in den Messbereich gesetzt werden. Die Probe befindet sich während der Messung direkt auf dem ATR-Prisma^{91,92}. Messungen mit FT-IR-bildgebenden Verfahren ohne ATR-Aufsatz verlaufen in der Regel zerstörungsfrei und nicht-invasiv. Die Messergebnisse sind dabei hochauflösend und kontrastreich (abhängig von der Wellenzahl). Dies bietet die Grundlage für Messungen mit medizinischen bzw. biologischen Proben, die während des Messprozesses nicht berührt bzw. beschädigt werden dürfen oder sehr kontrastarm im visuellen Wellenlängenbereich sind.^{65,68}

Ein zusätzlicher Vorteil von FT-IRM ist die Einkopplung eines weiteren optischen Pfads, der visuelle Bilder wiedergibt. So ist die visuelle Betrachtung der Probe über CCD (Charge Coupled Device) -Kameras oder ein Okular gegeben^{88,93}. Je nach Anwendung kann die zusätzliche spektrale Information aus dem visuellen Wellenlängenbereich einen erheblichen Mehrwert bieten⁸⁹. Auch eine verbesserte Justierung der Probe unter dem Messsystem ist dadurch gegeben. Dennoch sind nur geringe Messfelder (wenige μm^2) mit einer Messung, je nach Detektorgröße, zu erfassen⁹⁰. Die räumliche Scanauflösung für FT-IRMS variiert je nach Detektor zwischen 6,25 μm und 50 μm . Die Messzeit variiert demnach ebenso und ist stark von der Akkumulation pro Messpunkt und dem gesamten Scanfeld abhängig. Für ein Scanfeld von einem Quadratcentimeter ist eine Scanzeit von 45 min durchaus Stand der Technik, kombiniert mit einer räumlichen Auflösung von 25 μm und einer zweifachen Akkumulation³⁰. Durch Zusammensetzen mehrerer Messpunkte wird ein größeres Messfeld erzeugt. Ein Linearmotor bewegt hierbei die Probe unter dem Messaufbau und erweitert damit den scanbaren Bereich. Die resultierenden Datensätze sind händisch nicht mehr auswertbar und lassen sich nur noch über komplexe Algorithmen auswerten. Numerische Methoden wie Linear Diskriminante Analysen (LDA) oder Künstliche Neuronale Netzwerke (KNN) sind gängige mathematische Verfahren zur Auswertung dieser Datenmengen.^{65,66,68}

Die FT-IR-Bildgebung als mikroskopischer Aufbau im Reflexionsmodus ist eine weit verbreitete Methode zur spektralen Erfassung biologischer und medizinischer Proben. Speziell für die Gewebeschnittanalyse dient die FT-IR-Bildgebung zur Erkennung von Strukturen und Tumoren. Hierbei steht die Analyse der funktionellen Gruppen im Vordergrund, da diese oft eindeutige Indikatoren von Gewebeänderungen sind. Bei der Analyse von Gewebeschnitten bildet die Segmentation und ein sogenanntes Clustering verwandter spektraler Datensätze die Grundlage für aussagekräftige Ergebnisse³⁰. Aufgrund der hohen Relevanz der FT-IR-Bildgebung für medizinische Proben wird dieses Messverfahren auch als Referenzverfahren in dieser Arbeit verwendet. Die Ergebnisse lassen sich somit anhand eines etablierten und kommerziellen Verfahrens vergleichen und stützen zudem die Aussagekraft der entwickelten Messmethode.

Abgewandelte Mikroskop-Aufbauten, die sich auf den mittelinfraroten Wellenlängenbereich beziehen, betrachten größere Flächen (hier wenige mm^2) mit einer räumlichen Auflösung von bis zu $6 \mu\text{m}$ oder geringer. Hierbei werden die Probe bzw. der Bildausschnitt vollständig ausgeleuchtet und auf einen FPA (Focal Plane Array) -Chip abgebildet. Unter Einsatz von Quanten-Kaskaden-Lasern kann damit eine Fläche von ca. 9mm^2 in Transmission spektral vermessen werden. Für eine ausgewählte Anzahl von Wellenlängen im Fingerprintbereich können annähernd spektrale Echtzeit-Messungen durchgeführt werden^{33,39}. In diesem Fall ist die Strahlungsleistung der IR-Lichtquellen im mittelinfraroten Wellenlängenbereich ein einschränkendes Kriterium und maßgeblich für die Begrenzung des Bildfeldes verantwortlich. Mit steigender Bildfeldgröße ist eine entsprechend höhere Flächenleistung der IR-Lichtquelle erforderlich, die durch aktuelle IR-Quellen nur bedingt bereitgestellt werden kann. Zusätzlich sind Mikroskop-Aufbauten aufgrund ihrer hohen optischen Vergrößerung an geringe Arbeitsabstände und damit an geringe Bildfelder gebunden. In teilweise automatisierten MIR-Mikroskopen fährt die Probe sequenziell im Bildausschnitt. Nach vollständiger Abrasterung der Probe lassen sich die erfassten Messbilder zu einem gesamten Messbild zusammenfügen, wodurch das Messfeld zusätzlich vergrößert wird.⁹⁴

Lasergestützte Messaufbauten im MIR fallen meist nicht direkt unter den Sammelbegriff IR-Spektroskopie, da sie kein gesamtes IR-Spektrum erfassen. Sie bedienen sich lediglich einzelner Wellenlängen, für die eine Absorptionsmessung erfolgt. Diese

Messsysteme setzen sich aus einem (oder mehreren) Lasern zusammen. Das Laserlicht wird über anwendungsspezifische Linsensysteme auf die Probe fokussiert und das (Absorptions-) Messsignal konfokal erfasst. Da wie bei der IR-Spektroskopie nur ein Messpunkt aufgenommen wird, muss für die Erfassung einer beliebigen Messfläche eine Bewegung der Probe im Fokus erfolgen. Die Messzeit pro Messpunkt sinkt hierbei, bedingt durch die geringe Anzahl von zu erfassenden Wellenlängen. Dennoch ist das Punkt-für-Punkt-Abmustern der Probe insgesamt zeitintensiv. Die Messzeit pro cm^2 liegt bei ca. 20 min pro Wellenlänge (hier 20 μm Ortsauflösung und Messfleck). Diese Methode bietet dennoch ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis und lässt sich auf die Untersuchung von Gewebeschnitten anwenden.³⁵

Ergänzend zur IR-Spektroskopie wird häufig die Raman-Spektroskopie eingesetzt. Der sogenannte Ramaneffekt ist dabei ein Resultat der monochromatischen Anregung von Materie. Dadurch treten besondere Effekte wie Absorption, Fluoreszenz, Rayleigh- und/oder Raman-Streuung auf. Die Raman-Streuung beinhaltet die inelastische Streuung des zurückfallenden Lichts. Das daraus resultierende Raman-Spektrum kann dann, abhängig von der monochromatischen Anregungswellenlänge, in Stokes- und Anti-Stokes-Linien eingeteilt werden. Stokes erfolgt hierbei für eine langwellige und Anti-Stokes für eine kurzwellige Anregung. Raman-Spektren können in IR-Spektren umgerechnet werden. Somit ist ein Vergleich der beiden Spektroskopiearten möglich.^{65,68}

Die Raman-Spektroskopie zählt zu den hochsensitiven Messmethoden von Molekülen. In Kombination mit der geringen Raman-Streuung sind hohe Integrationszeiten die Folge, die in hohen Messzeiten resultieren. Je nach Probe sind dabei hohe Integrationszeiten (mehrere Sekunden) oder hohe Laserleistungen ($> 100 \text{ mW}$) für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis pro Messpunkt erforderlich. Raman-bildgebende Systeme führen, wie bei der IR-Bildgebung, meist auf Aufbauten zurück, die auf Mikroskopen (sogenannte Raman-Mikroskopen) basieren. Durch die punktuelle Messung mittels Raman muss für ein gesamtes Messbild die Probe abgerastert werden. Je nach räumlicher Scanauflösung sind für Raman-Mikroskope Messzeiten von mehreren Stunden erforderlich. Das Scanfeld bezieht sich dabei auf wenige Quadratmillimeter. In der Medizintechnik wird dieses Verfahren zur ergänzenden Informationsgewinnung ausgewählter und vorselektierter Messbereiche eingesetzt. Im Vordergrund steht hierbei die

Untersuchung von Strukturübergängen in Gewebeschnitten, beispielsweise in der Erforschung von Hirntumoren⁹⁵. Auch die Untersuchung lebender Zellen ist mit dieser Methode möglich.⁹⁶

Eine zusammenfassende Übersicht über die genannten IR-Spektroskopiearten (ergänzt durch die Raman-Spektroskopie) befindet sich in Tabelle 2. Dabei sind die wesentlichen Vor- und Nachteile aufgeführt. Einige der aufgeführten Messtechniken liefern erhebliche Datenmengen (mehrere GB) in Kombination mit einer hohen spektralen Informationsdichte. Um diese Datenmengen auswerten zu können wird sich oft (und auch in dieser Arbeit) auf sogenannte Clusteranalysen gestützt, die im Folgenden Unterkapitel näher beschrieben werden. Diese helfen relevante und zusammenhängende Datensätze auszuwerten.

Tabelle 2: Übersicht über IR-Spektroskopie Verfahren im mittelinfraroten Wellenlängenbereich, ergänzt mit Raman-Spektroskopie

Art der Spektroskopie	Vorteil	Nachteil
ATR (kombiniert mit FT-IR)	<ul style="list-style-type: none"> • Messung von flüssigen Substanzen • Messung inkl. Eindringtiefe 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontaktmessung • Messstelle ist durch ATR-Prisma begrenzt
FT-IR	<ul style="list-style-type: none"> • Schnelle Erfassung einzelner Spektren • Messung über Reflexion und Transmission möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringer Messfleck
DRIFT	<ul style="list-style-type: none"> • Messung von Feststoffen • Mittelung über größeren Messfleck 	<ul style="list-style-type: none"> • Nur für homogene Proben geeignet • Probengröße ist durch Probenhalterung begrenzt
FT-IRMS	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrastreich • Erfassung von gesamter Probe • Reflexions- und Transmissionsmessung möglich (adaptiv ATR) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Messzeiten (abhängig von Messfeld und Akkumulation) • Hohe Kühlleistung des Sensors mit flüssigem Stickstoff erforderlich
Lasergestützte Spektroskopie	<ul style="list-style-type: none"> • Geringer Datenaufwand • (je nach Anwendung) Geringe Messzeiten 	<ul style="list-style-type: none"> • Nur ausgewählte Wellenlängen messbar
Raman-Mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> • Hochsensitiv • Detektion von symmetrischen Molekülen 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Messzeiten • Starke Fluoreszenz bei biologischen Proben

1.6 Numerische Methode k-means

In diesem Kapitel wird insbesondere ein numerisches Verfahren dargestellt, welches für die Datenauswertung im Rahmen dieser Dissertation genutzt wird. Die Datenanalyse bezieht sich in diesem Fall speziell auf die Segmentierung von einzelnen Gewebestrukturen im Gewebeschnitt. Für eine Segmentierung muss eine Clusteranalyse ermitteln, welche Datensätze in Verbindung miteinander stehen und eine zusammenhängende Struktur ergeben. Oft, und das ist in dieser Arbeit auch der Fall, sind anhand der reinen Datensätze keine direkten Zusammenhänge zwischen Spektren, Pixeln oder Messbildern erkennbar. Clusteranalysen suchen nach genau solchen Verbindungen und teilen die teilweise komplexen Datensätze in entsprechende sinnvolle Gruppen bzw. Cluster auf.⁹⁷

Clusteranalysen gehören zum maschinellen Lernen, dem sogenannten Machine Learning. Hierbei zählt die Clusteranalyse zu einer Untergruppe des Machine Learnings und lässt sich in das unüberwachte Lernen eingliedern. Die Besonderheit dieser Art von Machine Learning ist, dass keine konkreten Zielvariablen vorgegeben werden müssen. Das explorative Datenanalyseverfahren soll also Datensätze auf strukturelle Zusammenhänge untersuchen und eine sinnvolle Einteilung der vorgegebenen Datensätze in Untergruppen, den sogenannten Clustern, vornehmen. Dabei beinhalten die Daten eines Clusters bestimmte Eigenschaften, die sich zu anderen Gruppen hinreichend unterscheiden. Unüberwachtes Lernen beruht nicht auf einem zuvor erstellen Trainingsmodell, sondern es trainiert sich in den meisten Fällen während der Analyse von Daten selbst. Dies kann zwar zu etwas längeren Berechnungszeiten führen, bringt aber den wesentlichen Vorteil, dass unbekannte Daten in sinnvolle Gruppen eingeteilt und weiterverarbeitet werden können.^{97,98}

Der k-means-Algorithmus

Der k-means-Algorithmus gehört zu der Untergruppe der Clusteranalysen und damit zum unüberwachten Lernen. Dieser Algorithmus ist die meist genutzte Methode zur Gruppierung von Daten bzw. Objekten in wissenschaftlichen und industriellen Fragestellungen. Hierbei sind die Gruppen bzw. die Daten zweitrangig. In erster Linie geht es um die Klassifizierung der Daten in spezifische eigenschaftsähnliche Cluster bzw. Gruppen. Somit kann der k-means-Algorithmus auf medizinische, biotechnologische

Problemstellungen genauso angewandt werden wie auf die Kundeninteressen eines Unternehmens oder die Einteilung von Filmen, Musik oder Schauspielern in Kategorien.⁹⁷

Der k-means-Algorithmus zählt unter anderem zu der Unterkategorie der partitionierenden prototyp-basierenden Clustering-Verfahren. Hierbei steht das prototypbasierende Clustering für einen (oder mehrere) Cluster, der durch einen Prototyp dargestellt wird. Die Prototypen können sich für kategorisierbare Daten in folgende zwei Varianten aufgliedern:^{97–99}

- Zentroiden: (Mess-) Punkte die in ihren stetigen Merkmalen durchschnittlich sehr ähnlich sind.
- Medoiden: (Mess-) Punkte die am häufigsten vorkommen und am repräsentativsten sind.

Grundsätzlich versucht der Algorithmus kugel- bzw. kreisförmige Cluster, auch sphärische Cluster genannt, zu ermitteln. Damit geht jedoch auch die Vorgabe einer bestimmten Cluster-Anzahl k einher und stellt einen wesentlichen Nachteil des Algorithmus dar. Die Begrenzung von k ist deshalb so wichtig, weil der Algorithmus damit sinnvolle, den Daten entsprechende Zentroiden oder Medoiden setzen kann. Werden zu viele k gesetzt, so werden die Daten in unbrauchbar viele Cluster eingeteilt. Wichtige Informationen und die exakte Einteilung der Cluster sind dabei sehr schnell überdefiniert. Ebenso entsteht eine zu grobe Einteilung der Cluster durch eine zu geringe Cluster-Anzahl k . Wichtige Informationen der Daten gehen in übergeordneten Clustern unter. Die Anzahl der Cluster muss daher sinnvoll gesetzt werden oder durch mehrmaliges Durchlaufen des Algorithmus ermittelt werden. Eine wesentliche Unterstützung zur Ermittlung der optimalen Anzahl von Clustern stellt das sogenannte Ellenbogenkriterium dar. Anhand der Ermittlung der *Summe der quadratischen Abweichung* kann innerhalb eines Clusters die sogenannte Verzerrung ermittelt werden. Die Verzerrung lässt sich dann grafisch für eine beliebige Anzahl von Clustern in einem Diagramm auftragen. Daraus ergibt sich ein Kurvenverlauf, der an einen Ellenbogen erinnert (siehe Abbildung 6).^{97,100}

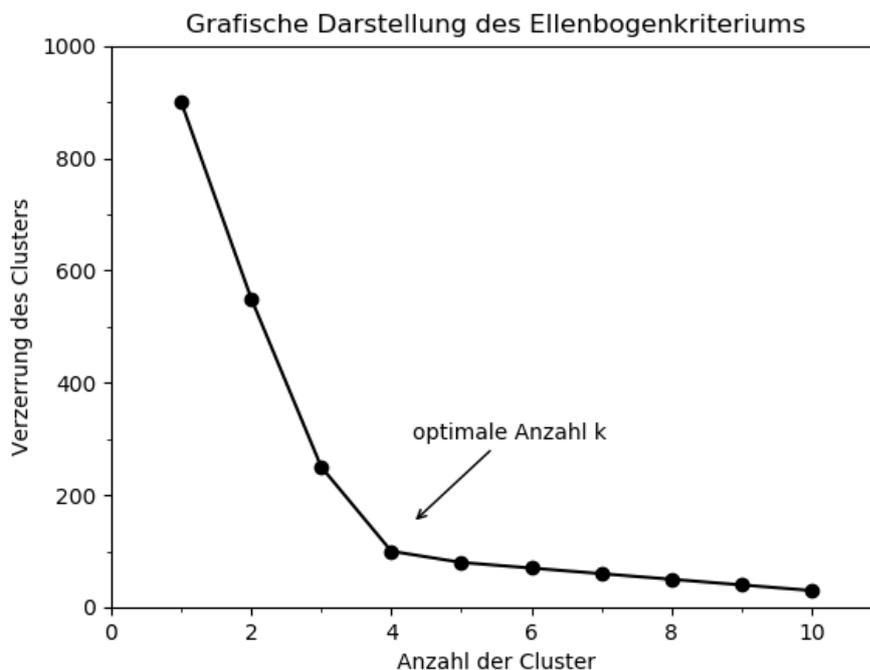


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Ellenbogenkriteriums mit optimaler Cluster-Anzahl k in Abhängigkeit der Summe der quadratischen Abweichung (Verzerrung) je Cluster. ^{97,100,101}

Die optimale Anzahl k von Clustern ergibt sich im Übergang von hohen Verzerrungen bzw. hohen Summen der quadratischen Abweichung zu geringen. Geringe, sich kaum ändernde Verzerrungen weisen auf Cluster hin, deren Daten sehr nah an den jeweiligen Zentren (z. B. Zentroiden) liegen. Eine sinnvolle Clusterung ist für kleine quadratische Abweichungen bzw. Verzerrungen nicht mehr gegeben. In Abbildung 6 ist dies beispielsweise ab $k = 4$ der Fall. Voraussichtlich werden nur für $k \leq 4$ sinnvolle Ergebnisse erzielt. In einzelnen Fällen kann jedoch auch ein höheres k (in diesem Fall $k = 5$) auch noch zu einem sinnvollen Ergebnis führen, trotz der geringen Verzerrungsunterschiede. Dies ist abhängig von den Daten und deren Qualität. Eine weitere Möglichkeit für die Ermittlung der optimalen Anzahl von Clustern könnte auch über sogenannte Silhouettendiagramme erfolgen. ⁹⁷

Die Zuweisung der Daten in vorgegebene Cluster ermittelt der k-means-Algorithmus iterativ. Das bedeutet, die Cluster werden vorerst zufällig in die Datenmenge gelegt. Die Ähnlichkeit zweier Punkte x und y und damit die Zugehörigkeit der beiden Punkte zu einem Cluster mit stetigen Merkmalen lässt sich über die quadrierte euklidische Distanz ermitteln: ^{97-99,101}

$$d(x, y)^2 = \sum_{j=1}^m (x_j - y_j)^2 = \|x - y\|_2^2 \quad 1.9$$

In Formel 2.1 steht der Index j für die Dimension (Merkmalsspalte) der beiden zu vergleichenden Punkte x und y . Im Folgenden werden die hochgestellten Buchstaben i und j für den Clusterindex bzw. Objektindex verwendet. Aus der quadratischen euklidischen Distanz lässt sich die *Summe der quadrierten Abweichungen innerhalb eines Clusters* (SSE) ableiten. Im Englischen wird diese Summe auch als „Sum of Squared Errors“ bezeichnet und beschreibt im Allgemeinen den k-means-Algorithmus ^{97,102}:

$$SSE = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m w^{(i,j)} \|x^{(i)} - \mu^{(j)}\|_2^2 \quad 1.10$$

Die Variable μ in Formel 1.10 stellt hierbei nicht den Punkt y , sondern einen Zentroiden (Schwerpunkt) des Clusters j dar. Es gilt dabei: $x^{(i)}$ zugehörig zu Cluster j , dann ist $w^{(i,j)} = 1$, sonst $w^{(i,j)} = 0$.

Daraus ergibt sich ein Arbeitsablauf für die Berechnung der einzelnen Cluster mit dem k-means-Algorithmus: ⁹⁷

- 1) Zufällige Festlegung von Zentroiden bzw. Clustern k in den vorliegenden Daten
- 2) Zuweisung der Daten auf den jeweils nächsten Zentroiden $\mu^{(j)}$ ($j \in \{1, 2, \dots, k\}$)
- 3) Erneute Berechnung der Zentroiden unter Berücksichtigung der Zuweisung aus Schritt 2)
- 4) Iteration der Schritte 2) und 3), bis sich die Zuordnungen nicht oder nur sehr gering ändern. Hierbei sollte eine Abbruchbedingung hinterlegt sein.

Abbildung 7 veranschaulicht die Anwendung des k-means-Algorithmus nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die hier verwendeten Beispiel-Daten beruhen auf zufälligen Datenpunkten innerhalb zweier Dimensionen (hier kartesische Koordinaten in X und Y). Mit der Vorgabe $k = 4$, lassen sich die Daten in vier Cluster einteilen. Es zeigt sich, dass zwischen Cluster 3 und 4 zwei Datenpunkte sehr nah an der Clustergrenze liegen. Dennoch sind die beiden Punkte eindeutig einem Cluster zugeordnet.

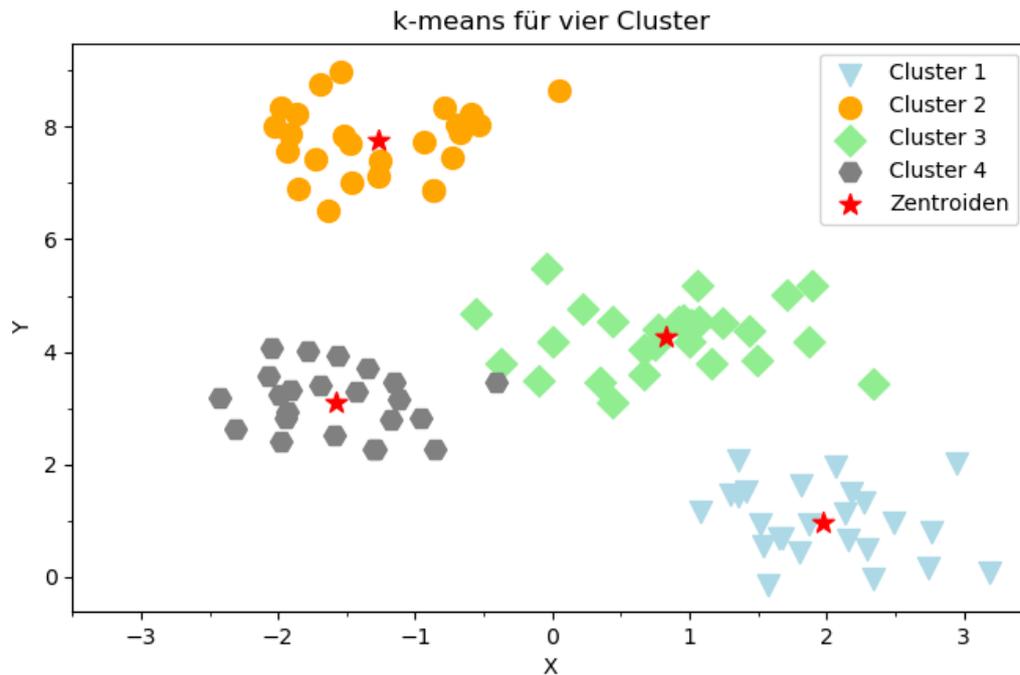


Abbildung 7: Anwendung des k-means-Algorithmus auf beliebige Beispiel-Daten mit vier Clustern.

Ergänzung zum k-means-Algorithmus, k-means++

Der klassische k-means-Algorithmus beruht auf der zufälligen Zuordnung der Zentroiden zu Beginn der Clusterung. Dies kann zu fehlerhaften Zuordnungen zu den Clustern führen oder zu längeren Berechnungsschritten. Dieses Problem kann verringert werden, wenn der herkömmliche k-means mehrfach auf eine definierte Datenmenge angewendet wird. Anschließend verwendet man den SSE, welcher am geringsten ist. Eine weitere Optimierungsmethode ist die Platzierung von Zentroiden mit möglichst großem Abstand zueinander. Die Zusammenfassung der beiden genannten additiven Verfahren zum herkömmlichen k-means ist auch als k-means++-Algorithmus bekannt. Die Vorgehensweise für den k-means++ ist dabei wie folgt: ^{97,100,102}

- 1) Definieren einer leeren (Daten-) Menge M , in welcher die ausgewählten Zentroiden gespeichert werden
- 2) Zufällige Auswahl eines ersten Zentroiden $\mu^{(j)}$ aus den Eingabedaten
- 3) Ermittlung von minimaler quadrierter Distanz $d(x^{(i)}, M)^2$ zu den Zentroiden $\mu^{(j)}$ in Menge M aus allen nicht in Zusammenhang mit M stehenden Objekten $x^{(i)}$
- 4) Anwendung von gewichteter Wahrscheinlichkeitsverteilung für die zufällige Auswahl des nächsten Zentroiden $\mu^{(p)}$

- 5) Wiederholung von Schritt 2) und 3), bis zur vollständigen Auswahl aller k -Zentroiden
- 6) Anwendung des herkömmlichen k -means zur weiteren Clusteranalyse

Zusätzlich gibt es noch weitere Clustermethoden, die jeweils eigene Eigenschaften besitzen und auch jeweils andere Ergebnisse der Clusterung hervorbringen. Beispiele für weitere Clusteranalysen sind Agglomerative und Spectral Clustering sowie Affinity Propagation oder das sogenannte Birch ¹⁰³. Diese Analysemethoden sind jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit und werden daher nicht weiter erläutert.

1.7 Bezug zur Problemstellung

Aus der oben aufgeführten theoretischen Aufbereitung der IR-Spektroskopie geht deutlich hervor, dass die lasergestützte Spektroskopie potentiell für die schnelle Detektion und Abbildung von medizinischen Gewebeschnitten geeignet ist. Auch die Betrachtung der einzelnen Schwingungsbanden im Mittelinfrarot zeigt, dass unter Verwendung geeigneter einzelner Wellenlängen die Detektion von Lipiden und Proteinen möglich sein könnte und damit die Analyse einzelner Gewebestrukturen realisierbar ist. Aus diesem Grund ist der Mittelinfrarotbereich zwischen 4000 cm^{-1} bis 2500 cm^{-1} grundsätzlich geeignet, um die Problemstellung dieser Arbeit messtechnisch zu lösen.

Ausgewählte Clusteranalysen, wie der k -means-Algorithmus, können auch bei der geplanten Messtechnik einen wesentlichen Vorteil bei der Datenanalyse bringen. Die daraus segmentierten Datensätze lassen sich voraussichtlich auch mit anderen Messtechniken (beispielsweise der FT-IR-Bildgebung) vergleichen und können damit eine Referenz zur entwickelten Messmethode bieten.

2 Material und Methoden

2.1 Auslegung eines Mittelinfrarot-Scanners zum Detektieren medizinischer Gewebeschnitte

Auf Basis der in der Problemstellung formulierten Anforderungen lässt sich ein Messsystem zur Messung von medizinischen Gewebeproben auslegen. Die Auslegung des MIR-Scanners unterliegt dabei einigen (medizin-) technischen Anforderungen, die das zu entwickelnde Messsystem wesentlich beeinflussen. Die Anforderungen ergeben sich auf der einen Seite aus medizintechnischen Problemstellungen und zum anderen aus messtechnischen Voraussetzungen. Sie können wie folgt übergeordnet zusammengefasst werden:

- Vollständige Erfassung biomedizinischer Proben (Messfeld größer 1 cm², idealerweise ein gesamter Objektträger)
- Hinreichende spektrale Erfassung von ganzen Gewebeschnitten innerhalb einer Minute
- Ortsauflösung 20 µm; vergleichbar zu kommerziellen und etablierten Messverfahren (FT-IR-Bildgebung)
- Molekülselektive Erfassung der medizinischen Probe
- Hohes Signal-Rausch-Verhältnis

Medizintechnische Proben, speziell bei der Schnellschnittanalyse, können unterschiedlich groß ausfallen. Oft ist eine vollständige Erfassung der Probe, bedingt durch die Limitierung des Messsystems^{33–38}, nicht möglich. Eine noch nicht weit verbreitete Technik zur Erfassung von medizinischen Proben stellen sogenannte Flying-Spot-Scanner^{104–106} (FSS) dar. Hierbei wird ein Laserstrahl über der Probe ausgelenkt und ermöglicht dadurch eine schnelle flächige Punkt-für-Punkt Messung. Diese Technik in Kombination mit der lasergestützten Spektroskopie und konfokaler Messanordnung ermöglichen die Einhaltung der oben genannten Anforderungen. Aus diesem Grund soll das zu entwickelnde Messsystem, der MIR-Scanner, auf einem Flying-Spot-System beruhen. Hierbei konzentriert sich die Auslegung und Entwicklung speziell auf die Detektion von lipid- und proteinhaltigen Strukturen, die im Bereich der funktionellen

Gruppen messbar sind. Das gesamte optische System wird daher auf den Mittelinfrarotbereich zwischen 4000 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$) und 2500 cm^{-1} ($5\text{ }\mu\text{m}$) ausgelegt. Anhand einer vorab erfolgten theoretischen Auslegung und virtuellen Simulation des optischen Systems lässt sich das Messsystem auf die oben genannten Anforderungen untersuchen und optimieren.

2.1.1 Theoretische Beschreibung des Scansystems

Die Auslegung des MIR-Scanners basiert auf der Probenanregung durch vier Distributed Feedback (DFB)-Lasermodule mit ausgewählten Emissionseigenschaften. Damit zählt das entwickelte Messsystem zu der lasergestützten Spektroskopie. Die vier Lasermodule werden so ausgewählt, dass die Emissionswellenlänge eines Lasers Lipide stark absorbiert (siehe Abbildung 8). Eine weitere Wellenlänge eines weiteren Lasers absorbiert Molekülstrukturen mit Lipidanteil nur gering. Die gleiche Kombination von Wellenlängen ist auch für Proteine geplant. Daraus ergeben sich jeweils zwei Laser, deren emittierte Wellenlänge zwei Substanzen besonders gut absorbieren (Targetlaser) und zwei weitere Laser, deren emittierte IR-Strahlung beide Substanzen sehr gering bis nicht absorbieren (Referenzlaser). Die sogenannten Targetlaser können dabei Aufschluss über die Absorptionseigenschaften der Probe geben. Die Referenzlaser beinhalten dann Informationen über die Streueigenschaften der Probe in Kombination mit dem Untergrund, auf dem sich das Messobjekt befinden wird. Die ausgewählten Wellenlängen bzw. Wellenzahlen (siehe Abbildung 8) des MIR-Scanners sind daher 2790 cm^{-1} (Referenz für Lipide, Laser 1), 2926 cm^{-1} (CH-Schwingungsbindung für Lipide, Laser 2), 3350 cm^{-1} (NH-Schwingungsbindung für Proteine/Amid A, Laser 3) und 3700 cm^{-1} (Referenz für Proteine, Laser 4).

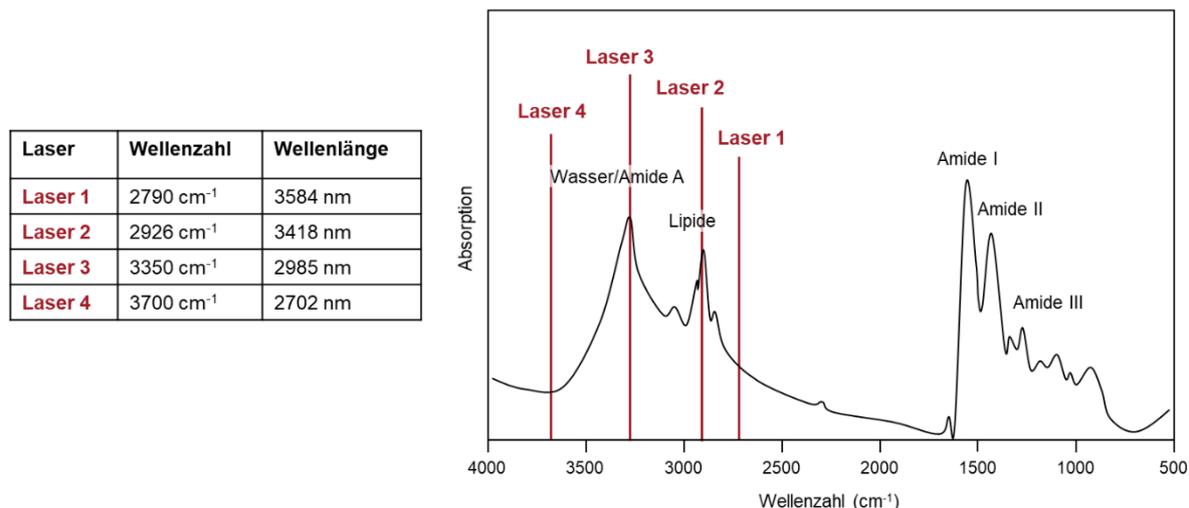


Abbildung 8: Gegenüberstellungen der Wellenlängen des MIR-Scanners

Die Laser (Laser 1 bis Laser 4) werden für Messungen sequenziell nacheinander angesteuert (siehe Abbildung 9). Ein linear verfahrbarer Spiegel koppelt hierbei automatisch den benötigten Laserstrahl in die optische Fokussiereinheit ein. Die Lasermodule emittieren das infrarote Licht divergent mit bis zu 35 °. Eine kontrollierte Einkopplung des monochromatischen Lichts in die Fokussiereinheit mit ausreichend hoher Flächenleistung ist mit einem Freistrahl für diese optische Anordnung nicht möglich. Durch Kollimation der Laserstrahlen auf einen Durchmesser von ~ 3 mm werden hohe Leistungsverluste vermieden und sie ermöglicht darüber hinaus eine kontrollierte Einkopplung in die Fokussiereinheit. Aus diesem Grund befindet sich vor jedem Lasermodul jeweils eine Kollimatorlinse, die das einfallende IR-Licht auf ~ 3 mm parallelisiert. Die Fokussiereinheit weitet den parallelen Laserstrahl auf einen Durchmesser von ~ 50 mm auf und fokussiert ihn anschließend auf die Probe. Zwischen Fokussiereinheit und Probe befindet sich eine bewegliche Spiegeleinheit, die das monochromatische IR-Licht auf der Probe auslenkt. Orthogonal zur Auslenkrichtung verfährt ein Kreuztisch, auf welchem sich die Probe befindet, um so ein Scanfeld zu generieren. Das Messsystem erfasst den Direktreflex konfokal über einen Infrarot (IR)-Detektor. Das Messsignal wird hierbei über einen Strahlteiler (Teilung 50:50) aus dem Hauptstrahl entkoppelt und über eine Sammellinse ($f = 30$ mm) auf den IR-Detektor abgebildet.

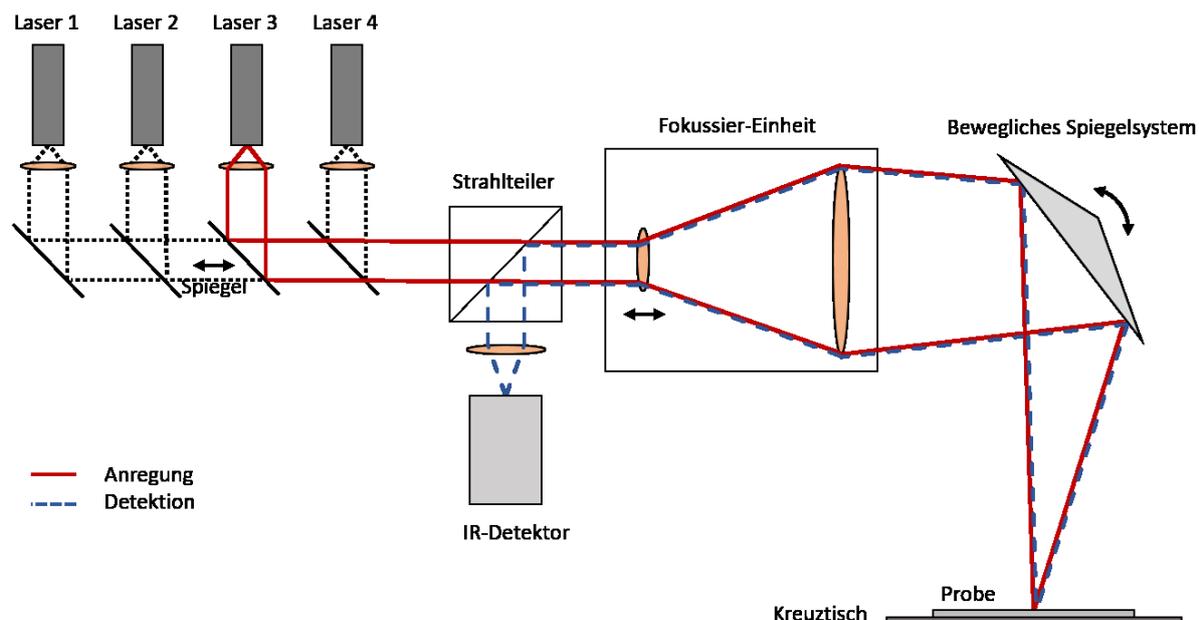


Abbildung 9: Anordnung der optischen Komponenten im Scansystem

Die Fokussiereinheit kann hierbei als eigenständiges optisches System angesehen werden. Optische Systeme mit mehreren Linsen bzw. Linsenpaketen lassen sich für die Auslegung und Beschreibung eines optischen Gesamtsystems zusammenfassen ¹⁰⁷. Dies hilft, das System in seiner gesamten Wirkung zu beurteilen und eine schematische Abbildung des optischen Systems zu erstellen. Die Berechnung erfolgt unter Berücksichtigung der Gegenstandsweite a und Bildweite b oder über die Krümmungsradien der Eingangsapertur r_1 und der Ausgangsapertur r_2 sowie des Brechungsindex n . Daraus resultiert die Brennweite f für das Gesamtsystem (siehe auch Abbildung 10).

$$\frac{1}{a} + \frac{1}{b} = (n - 1) * \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) = \frac{1}{f} \tag{2.1}$$

Die Berechnung aus Formel 2.1 ist auch auf das optische System des MIR-Scanners übertragbar. Durch die Verwendung eines Flying-Spot-Systems befindet sich ein (oder optional mehrere) Spiegel auf der Objektseite. Symbolisch wird ein Spiegel, der die Ablenkung des Laserstrahls repräsentiert, in die Objektweite A eingefügt. Dies bewirkt eine Ablenkung der Objektweite auf den Objektpunkt A_{Sample} (siehe Abbildung 10).

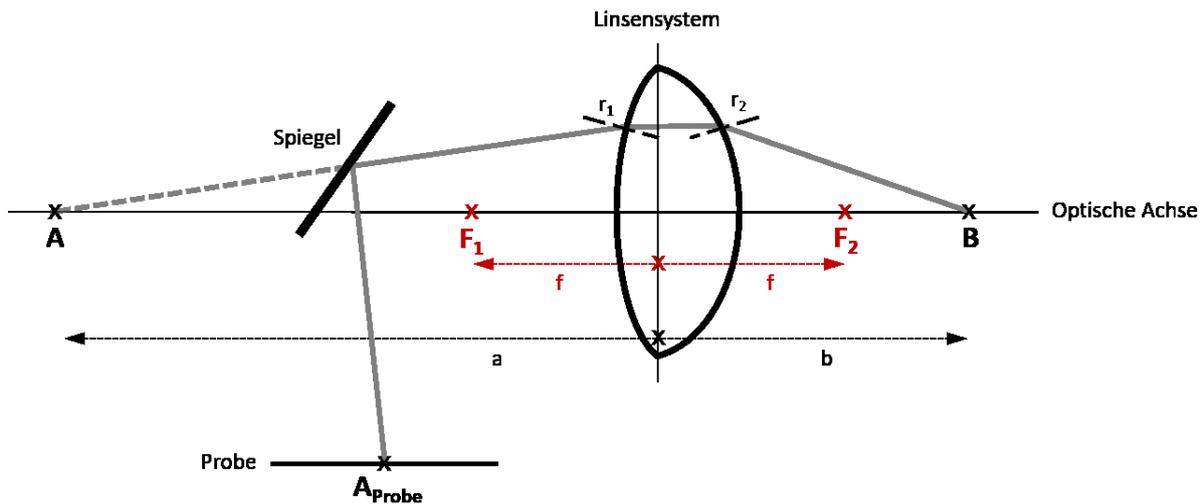


Abbildung 10: Schematische Darstellung des zusammengefassten optischen Linsensystems

Die Betrachtung der einzelnen Linsen des optischen Gesamtsystems ist dennoch von hoher Bedeutung, da jedes optische Element direkte Auswirkung auf das Gesamtsystem hat. Der Prozess für die richtige Linsenkombination und Anordnung ist elementar wichtig, wird jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit in diesem Rahmen nicht näher beleuchtet. Es ist dennoch anzumerken, dass

- die Linsenkombination,
- die entsprechenden optischen Elemente sowie
- die Abstände zwischen den Linsen und
- der Abstand zur Probe

durch die minimal zu erreichende Größe des Messflecks, der sogenannten Spotsize, beeinflusst wird. Zusätzlich sind die numerische Apertur und die optische Vergrößerung ebenso von diesen Parametern abhängig. Die Spotsize ist dabei maßgeblich für die Ortsauflösung (im Folgenden auch räumliche Auflösung genannt) verantwortlich und ist deshalb in diesem Fall möglichst gering zu wählen. Die theoretische Spotsize d_{Spot} steht in direktem Zusammenhang mit der Wellenlänge λ , der Apertur der letzten Linse D_{Linse} und der Gesamtbrennweite f_{gesamt} des optischen Systems. Hieraus ergibt sich die in Gleichung 2.2 dargestellte mathematische Beziehung. ^{108,109}

$$d_{Spot} = \frac{4\lambda f_{gesamt}}{\pi D_{Linse}} \rightarrow D_{Linse} = \frac{\pi d_{Spot}}{4\lambda f_{gesamt}} \quad 2.2$$

Für eine Spotsize d_{spot} von theoretisch $17\ \mu\text{m}$ muss somit eine Apertur der letzten Linse von $50\ \text{mm}$ verbaut werden. Die gesamte Brennweite f_{gesamt} richtet sich hierbei nach dem Abstand zwischen Fokussiereinheit und beweglichem Spiegelsystem und dem Arbeitsabstand (Abstand zwischen beweglichem Spiegelsystem und Probe). Die Brennweite f_{gesamt} ist mit $200\ \text{mm}$ angegeben, sodass sich ein Arbeitsabstand von $\sim 2\ \text{cm}$ ergibt. Die Fokussiereinheit ist deshalb so ausgelegt, dass eine Aufweitung von $\sim 3\ \text{mm}$ Laserstrahldurchmesser auf $50\ \text{mm}$ (Durchmesser der letzten Linse) erfolgt, um die gewünschte Spotsize zu erreichen.

Das gesamte optische System von parallelisiertem Laserstrahl bis zur Detektion wurde mittels Raytracing (Software: ZEMAX; Zemax Europe Ltd., Vereinigtes Königreich) simuliert und optimiert (siehe Abbildung 11 a)). Die Fokussiereinheit beinhaltet einen automatisierten beweglichen Linsenanteil, der eine Fokuspachführung auf der Probe ermöglicht und wellenlängenabhängige Shifts in der Scanebene ausgleichen kann (siehe Abbildung 11 b) und c)). Ohne automatisierte Fokuspachführung würde der ausgelenkte Laserstrahl eine kreisförmige Bewegung in der Scanebene nachfahren und das Messergebnis (hier ein resultierendes Messbild) wäre an den Rändern unscharf abgebildet. Die Nachführung während des Scannens ist überflüssig, solange die Auslenkung des Laserstrahls innerhalb einer Fokusebene erfolgt.

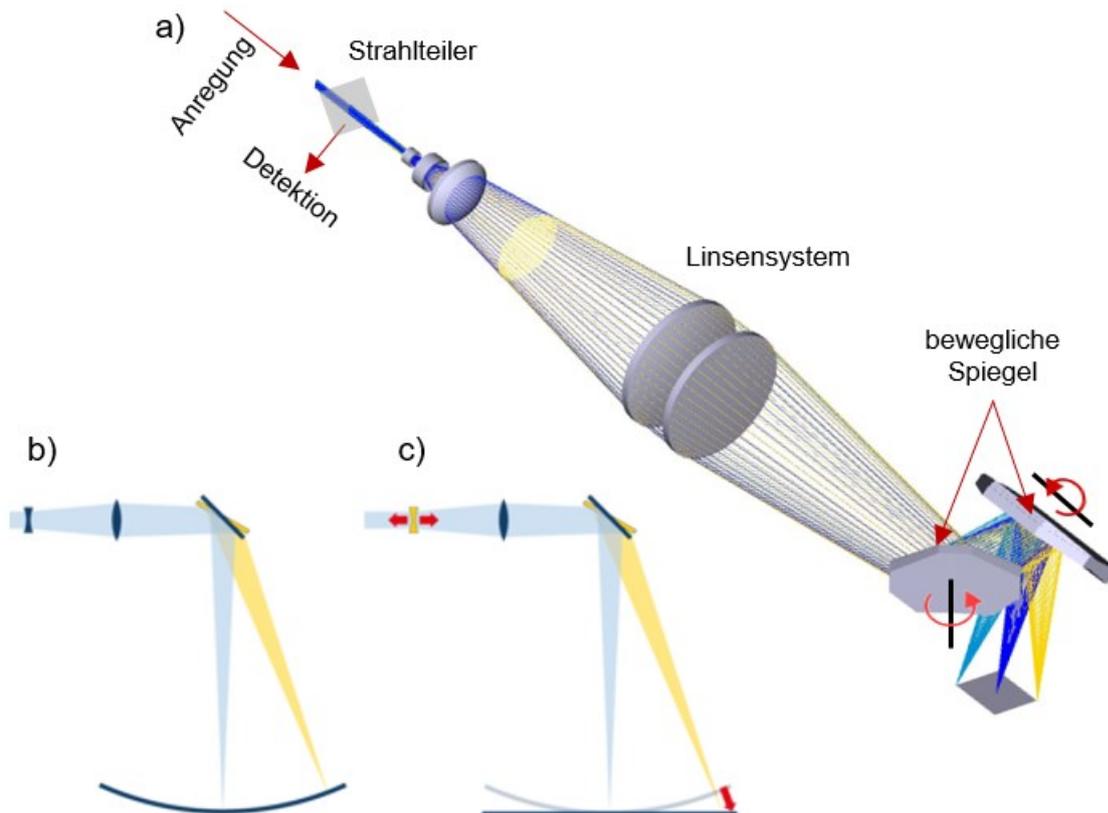


Abbildung 11: Simulation und Raytracing des optischen Systems. a) Strahlsimulation für das optische Gesamtsystem ohne Lasermodule. b) Verhalten der Fokusebene ohne Fokuspachführung. c) Verhalten der Fokusebene mit Fokuspachführung.

Der gesamte optische Aufbau des MIR-Scanners ist für Messungen im spektralen Bereich der funktionellen Gruppen konzipiert. Der zu detektierende Spektralbereich liegt zwischen 4000 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} . Aus diesem Grund richtet sich die Auswahl der optischen Komponenten nach diesem Wellenlängenbereich. Der IR-Detektor (VIGO Systems GmbH, Deutschland) ist speziell für diesen Spektralbereich konfiguriert und hat dort auch sein Detektionsmaximum. Der Sensorchip des Detektors hat eine Sensorfläche von $1 \times 1\text{ mm}^2$ und eine vierstufige Vorverstärkung. Vor dem Sensorchip befindet sich ein Saphirfenster mit Antireflexions (AR) -Beschichtung. In Kombination mit der vorgeschalteten Sammellinse wird das einfallende kollimierte Messsignal optimal auf den Sensorchip abgebildet. Zusätzlich sind alle Linsen (CaF_2 und Black Diamond) des MIR-Scanners mit einer AR-Beschichtung für diesen Wellenlängenbereich versehen. Der IR-Detektor und die Linsenbeschichtung verbessern die optische Leistung des MIR-Scanners in diesem Spektralbereich, schränken sie aber gleichzeitig auf diesen Wellenlängenbereich ein.

Die Spiegel der beweglichen Spiegeleinheit *ELEFHANT Precession* (ARGES GmbH, Deutschland) sind zur Verbesserung der Reflexionseigenschaften im mittleren infraroten Wellenlängenbereich mit Gold beschichtet. Die Fokussiereinheit besteht aus einer Kombination mehrerer Linsen (CaF₂, AR-beschichtet für den Spektralbereich zwischen 4000 cm⁻¹ und 2000 cm⁻¹).

2.1.2 Versuchsaufbau

Die optischen Komponenten des MIR-Scanners sind in einem Gehäuse vor Staub und Fremdeinwirkung geschützt. In Abbildung 12 ist der Versuchsaufbau mit den wichtigsten Komponenten abgebildet. Die zu Abbildung 12 a) bis c) zugehörigen Bezeichnungen einzelner Komponenten des entwickelten MIR-Scanners sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Lasereinheit und der IR-Detektor befinden sich in einer separat zugänglichen Kammer, die für eine Justierung der Laser geöffnet werden kann. Dagegen sind die Fokussiereinheit und das bewegliche Spiegelsystem in einem fest verschlossenen Gehäuse integriert. Die darin enthaltenen optischen Komponenten sind hochempfindlich auf Verschmutzungen durch Fingerfett und sind deshalb nicht frei zugänglich. Auf dem Kreuztisch befindet sich ein Probenhalter, welcher Objektträger auf einer fest definierten Fokusebene und an einer definierten Position fixiert. Dadurch sind automatisierte Messabläufe möglich. Der Kreuztisch mit Probenhalter ist frei zugänglich, da hier die entsprechende Probe platziert wird. Die Probe wird nach Platzierung automatisiert in den Messbereich gefahren und abgescannt.

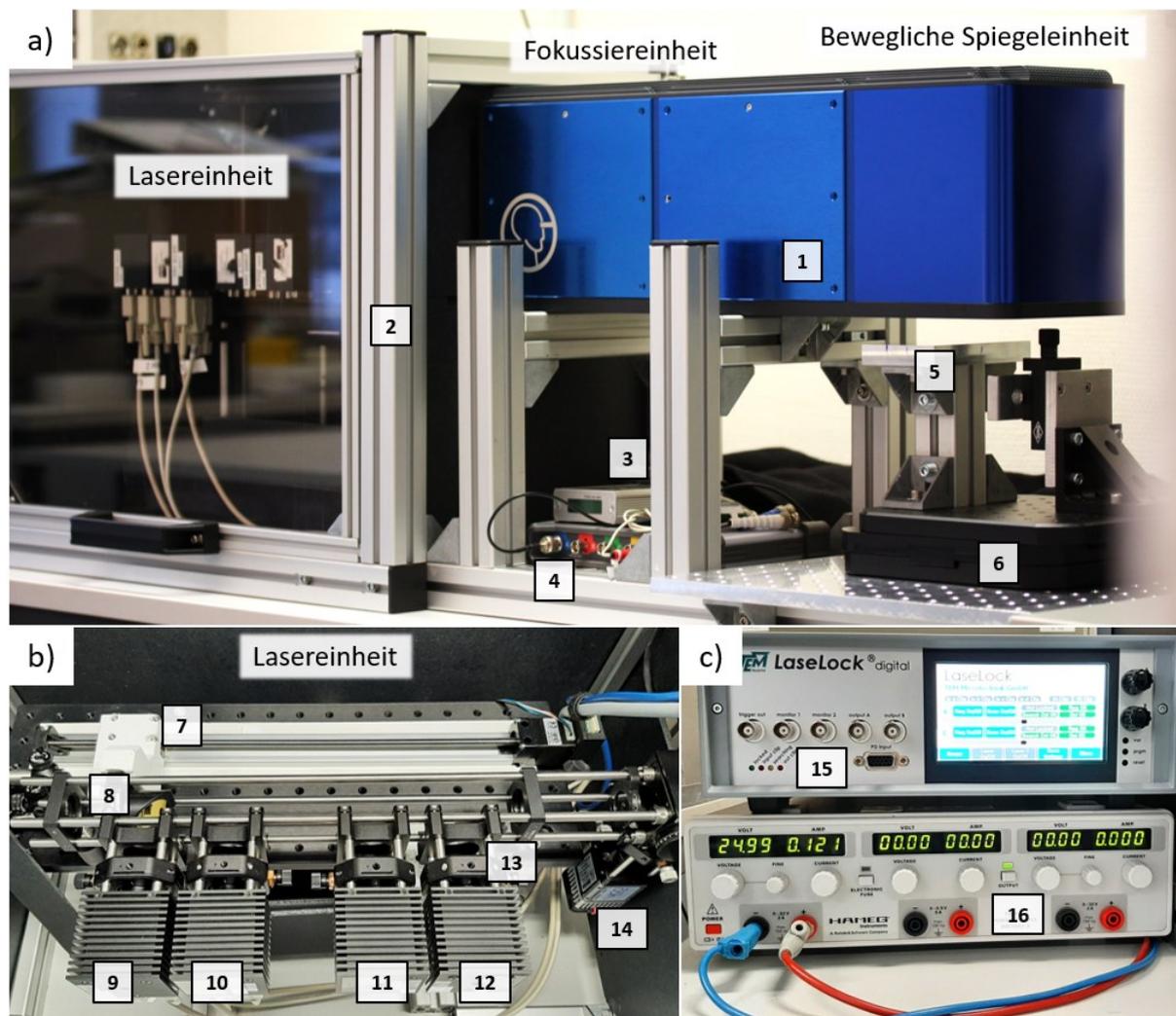


Abbildung 12: Entwickelter Versuchsstand für die schnelle Abbildung medizinischer Proben im Mittelinfrarotbereich. a) MIR-Scanner mit Lasereinheit, Fokussiereinheit und beweglichem Spiegelsystem. b) Lasereinheit (Ansicht von oben). c) Laserstabilisierungsmodul und Stromversorgung für die Lineareinheit.

Eine zusätzliche Abschirmung des Versuchsstandes ist nicht erforderlich, da normales Tages oder Deckenlicht den Wellenlängenbereich des MIR-Scanners nicht beeinflusst. Die Laser des MIR-Scanners sind mit der Laserschutzklasse 1M angegeben und befinden sich in einem Leistungsbereich von < 15 mW. Das Laserlicht ist für das menschliche Auge nicht gefährlich, da in dem verwendeten Wellenlängenbereich die Flüssigkeit des Auges das Laserlicht stark absorbiert und die Netzhaut nicht beschädigt werden kann. Dies ist jedoch nur der Fall, wenn das Licht nicht gebündelt ins Auge trifft. Ein spezieller Schutz vor austretendem Laserlicht ist daher nicht erforderlich, solange der Fokus nicht in das Auge gelangen kann (z. B. bedingt durch den nicht zugänglichen Arbeitsabstand zwischen Optik und Messobjekt).

Tabelle 3: Bezeichnung einzelner Komponenten des MIR-Scanners in Bezug auf Abbildung 12.

Position	Bezeichnung
1	Scankopf Precession ELEPHANT (Novanta Europe GmbH)
2	Schutzgehäuse
3	PTCC-01 Controller IR-Detektor (VIGO Systems S.A.)
4	Picoscope Digitaloszilloskop (Pico Technology)
5	Probenhalterung
6	Kreuztisch (Steinmeyer Mechatronik GmbH)
7	Linearachse (igus GmbH)
8	Beweglicher Spiegel im Lasermagazin (Thorlabs Inc.)
9	Laser 1 (3584 nm, nanoplus Nanosystems and Technologies GmbH)
10	Laser 2 (3418 nm, nanoplus Nanosystems and Technologies GmbH)
11	Laser 3 (2985 nm, nanoplus Nanosystems and Technologies GmbH)
12	Laser 4 (2702 nm, nanoplus Nanosystems and Technologies GmbH)
13	Kollimatorlinse (Edmund Optics GmbH)
14	IR-Detektor mit Vorverstärker (PVI-5, VIGO Systems S. A.)
15	Laserstabilisierungsmodul (LaseLock, TEM Messtechnik GmbH)
16	Stromversorgung Linearachse (Hameg Instruments GmbH)

2.1.3 Durchführung von Messungen, Synchronisierung und Parametrierung des MIR-Scanners

Messungen mit dem MIR-Scanner werden folgendermaßen durchgeführt. Das Messobjekt wird auf dem Kreuztisch bzw. auf der Probenhalterung platziert. Anschließend verfährt die Probe automatisiert in einen vorab definierten Messbereich. Die Scangeschwindigkeit des beweglichen Spiegelsystems wird auf 5,3 m/s mit einer räumlichen Auflösung von 20 μm eingestellt.

Die Ortsauflösung ergibt sich aus der (Auslenk-) Geschwindigkeit der beweglichen Spiegeleinheit und der Bewegungsgeschwindigkeit der Probe auf dem Kreuztisch. Durch die Spiegelbewegung wird der Laser auf der Probe eine definierte und kalibrierte Linie abgelenkt. Auf dieser resultierenden Laserlinie lässt sich eine bestimmte Anzahl von Messpunkten erfassen. Aus der zeitlichen Erfassung der einzelnen Messpunkte ergibt sich die räumliche Auflösung. Um eine konstante Ortsauflösung zu gewährleis-

ten, wird die Datenerfassung bei jeder neuen Laserlinie, die von der beweglichen Spiegeleinheit erzeugt wird, ausgelöst. In Kombination mit der konstanten Probengeschwindigkeit lässt sich damit ein Messfeld mit einer spezifischen räumlichen Auflösung erzeugen. Das Ergebnis ist ein Array von Pixeln (16-Bit-Tiefe), das in einem Messbild resultiert (siehe auch Abbildung 13).

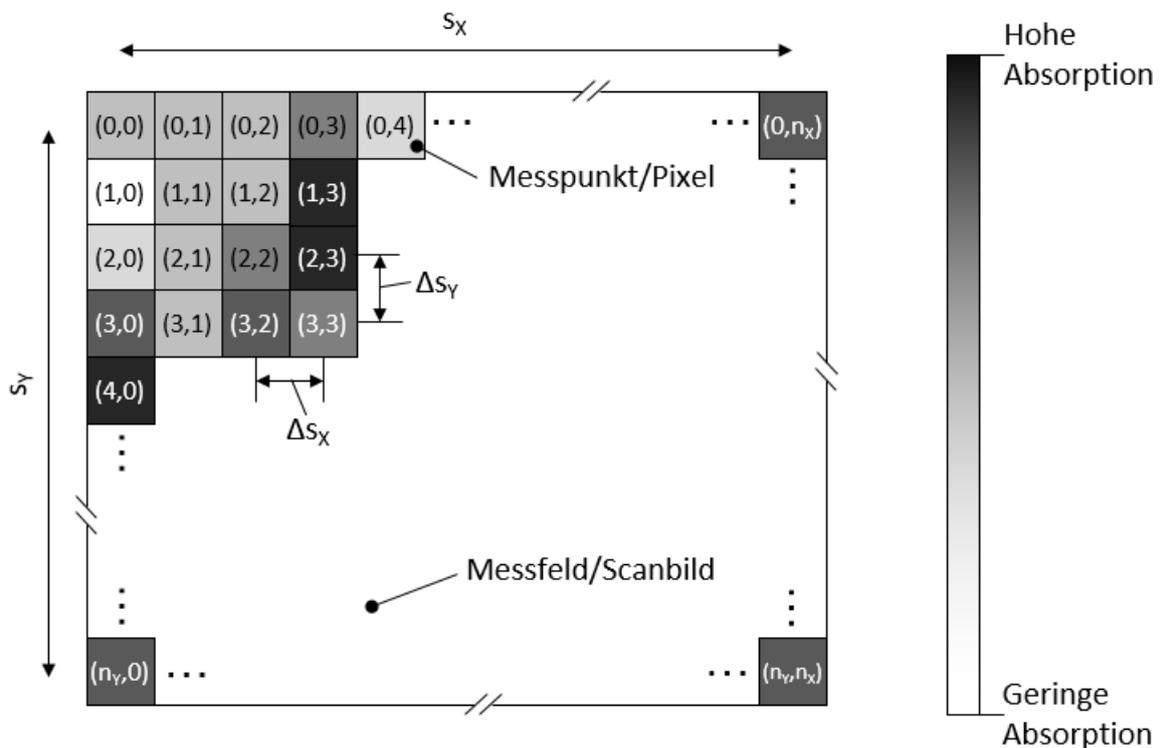


Abbildung 13: Zusammenhänge zur Generierung des Messfeldes und Zusammensetzung des Scanbildes. Die Messstrecken s_x und s_y geben die Abmaße des Messfeldes an. Die räumliche Auflösung Δs_x und Δs_y definiert den Abstand zwischen jedem Messpunkt. Die Anzahl der maximalen Messpunkte pro Messlinie und Messzeile werden in n_x und n_y angegeben. Die Messpunkte resultieren in Bildpixeln, welche die vorhandene Absorptionsinformation beinhalten.

Bei einer Laserlinie von 1 cm Länge ergeben sich somit 5000 Messpunkte (inklusive Oversampling-Faktor 10, das sogenannte Oversampling entspricht der Akkumulation pro Messpunkt und wird zur Rauschunterdrückung eingesetzt). Die Anzahl der Messpunkte pro Messlinie n_x setzen sich aus der Messstrecke s_x (bzw. der Laserlinie), der räumlichen Auflösung Δs_x und dem Oversampling-Faktor OSF zusammen (siehe Formel 2.3 und Abbildung 14).

$$n_X = \frac{S_X}{\Delta S_X} * OSF \quad 2.3$$

Die Spiegelgeschwindigkeit $v_{Spiegel}$ bestimmt maßgeblich die Scanzeit pro Laserlinie t_X und das damit zusammenhängende Messintervall Δt_X . In Formel 2.4 und 2.5 sind hierfür die mathematischen Beziehungen aufgeführt.

$$t_X = \frac{S_X}{v_{Spiegel}} \quad 2.4$$

$$\Delta t_X = \frac{t_X}{n_X} \quad 2.5$$

Das Messintervall dient an dieser Stelle auch zur Parametrierung des Oszilloskops und legt damit die Abtastrate fest. Die Anzahl der Messzeilen n_Y setzt sich hierbei aus der räumlichen Auflösung Δs_Y (mit $\Delta s_Y = \Delta s_X$) und der Messstrecke des Kreuztisches s_Y zusammen (siehe Abbildung 14 und Formel 2.6).

$$n_Y = \frac{s_Y}{\Delta s_Y} \quad 2.6$$

Die Verfahrensgeschwindigkeit des Kreuztisches $v_{Kreuztisch}$ setzt sich dabei aus der Scanzeit pro Messlinie t_X , der Anzahl der zu messenden Messlinien n_Y und der Messstrecke, (resultierend durch den Kreuztisch) s_Y zusammen. In Formel 2.7 ist der mathematische Zusammenhang dafür aufgeführt. Die Scanzeit pro Messzeile t_X muss zweifach berechnet werden, da der Laser bzw. der bewegliche Spiegel nach Beendigung der Laserlinie wieder auf seine Startposition verfahren muss. Messen und Zurücksetzen erfordert an dieser Stelle die gleiche Zeit pro Messzeile.

$$v_{Kreuztisch} = \frac{s_Y}{(2 * t_X * n_Y)} \quad 2.7$$

Bei 5000 Messpunkten pro Messzeile (inkl. Oversampling; hier beispielsweise für ein quadratisches Scanfeld von $1 \times 1 \text{ cm}^2$) ergibt sich eine Abtastrate des Oszilloskops von $\sim 2,7 \text{ MS/s}$ (MS steht für Megasamples) und eine Verfahrgeschwindigkeit des Kreuztischs von $\sim 3,3 \text{ mm/s}$. Die beweglichen Spiegel benötigen eine entsprechende Beschleunigungsrampe, bis die Auslenkbewegung der Spiegel konstant ist. Daher wird pro Messzeile ein Offset von 5 mm eingerechnet. Das tatsächliche Scanfeld ist somit größer als das anschließend automatisiert ausgeschnittene Messbild. Die Parameter beziehen sich auf ein korrigiertes Bildfeld und einen kalibrierten Arbeitsabstand von $\sim 2 \text{ cm}$.

Zu jeder Wellenlänge des MIR-Scanners gehört bei medizintechnischen Untersuchungen eine Referenzmessung, welche auf dem reinen Substrat (beispielsweise ein Objektträger ohne Probenanteile) durchzuführen ist. Die daraus resultierenden Hintergrundmessungen werden dann mit dem Messsignal des jeweiligen Lasers verrechnet. Die Wellenlängen lassen sich für Messungen sequentiell nacheinander und automatisiert ansteuern. Die Messzeit für das Scannen einer Probenfläche von $1 \times 1 \text{ cm}^2$ liegt bei 3 s. Eine Messung, die alle Wellenlängen inklusive der Referenzmessungen beinhaltet benötigt somit eine reine Messzeit von $\sim 24 \text{ s}$. Anschließend lassen sich die Messbilder verrechnen und weiterverarbeiten. Die Scanzeit erhöht sich dabei proportional zum Scanbereich, wenn der Scanbereich zunimmt und die Ortsauflösung konstant bleibt.

Der MIR-Scanner liefert Messpunkte, die auf Absorptionsunterschieden basieren (vgl. Abbildung 13) und die Schwingungsintensität der lokal vorhandenen Moleküle der Probe repräsentieren. Die Schwingungsintensität hängt unter anderem stark von den Streueigenschaften des Untergrunds ab. Es ist daher vorteilhaft, Messungen auf einem stark reflektierenden Untergrund durchzuführen, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen. Idealerweise erfolgen daher Messungen auf einem gold- oder silberbeschichteten Objektträger. Die Messungen sind damit auch vergleichbar zu Messungen mit der DRIFT-Spektroskopie oder der FT-IR-Bildgebung.

2.1.4 Steuerung Versuchsstand und Software

Eine übergeordnete Steuerung ist für die Regulierung der einzelnen Komponenten des Messsystems zuständig. Zwar kann jede Komponente eigenständig bedient werden, jedoch muss die Synchronisation zwischen den Komponenten weitestgehend übergeordnet erfolgen. Eine nicht synchronisierte Mess- und Steuerabfolge würde zu erheblichen Messfehlern und damit zu einer nicht hinreichenden Reproduzierbarkeit der Messergebnisse führen.

Die Steuerung erfolgt über eine mit *Python* (<https://www.python.org/>) speziell entwickelte Software von einem handelsüblichen Desktop-Rechner aus. Sie beinhaltet die Initialisierung, Parametrisierung und Steuerung der wichtigsten Komponenten. Darunter fällt die Ansteuerung des Kreuztisches, der Datenaufnahme über das Digitaloszilloskop und der Linearachse für die Einkopplung der Laserstrahlen. Alle anderen Geräte, wie das Stabilisierungsmodul für die Laser oder der IR-Detektor, müssen nicht zwangsläufig über eine übergeordnete Steuerung synchronisiert oder parametrisiert werden, da diese in ihrer *default*-Standardroutine agieren.

Der Signalfluss des Versuchsstands erfolgt wie in Abbildung 14 dargestellt. Er beginnt mit der Ansteuerung der Laser über das Stabilisierungsmodul. Zusätzlich kommuniziert der Computer mit einer Controllereinheit des beweglichen Spiegelsystems, die wiederum vordefinierte Programme parametrisiert und startet. Zusätzlich triggert die Controllereinheit ASC2 (Novanta Europe GmbH, Deutschland) das Digitaloszilloskop. Das Oszilloskop kommuniziert mit der übergeordneten Steuerung auf dem Computer und übermittelt die vom IR-Detektor aufgenommenen Daten. Die angewählten Lasermodule sind hierbei nicht gesondert gepulst oder getriggert, sondern emittieren dauerhaft im CW-Modus (Continuous Wave) IR-Strahlung ab. Der IR-Detektor ist ebenfalls nicht getriggert und erfasst kontinuierlich mit 300 MHz Messsignale, die nur bei Triggerng des Oszilloskops gespeichert und auf den Computer übertragen werden. Insgesamt ist die Versuchsstandsteuerung neben der Synchronisation der Steuersignale auch für die Zusammensetzung des Messsignals bzw. des Messbildes zuständig.

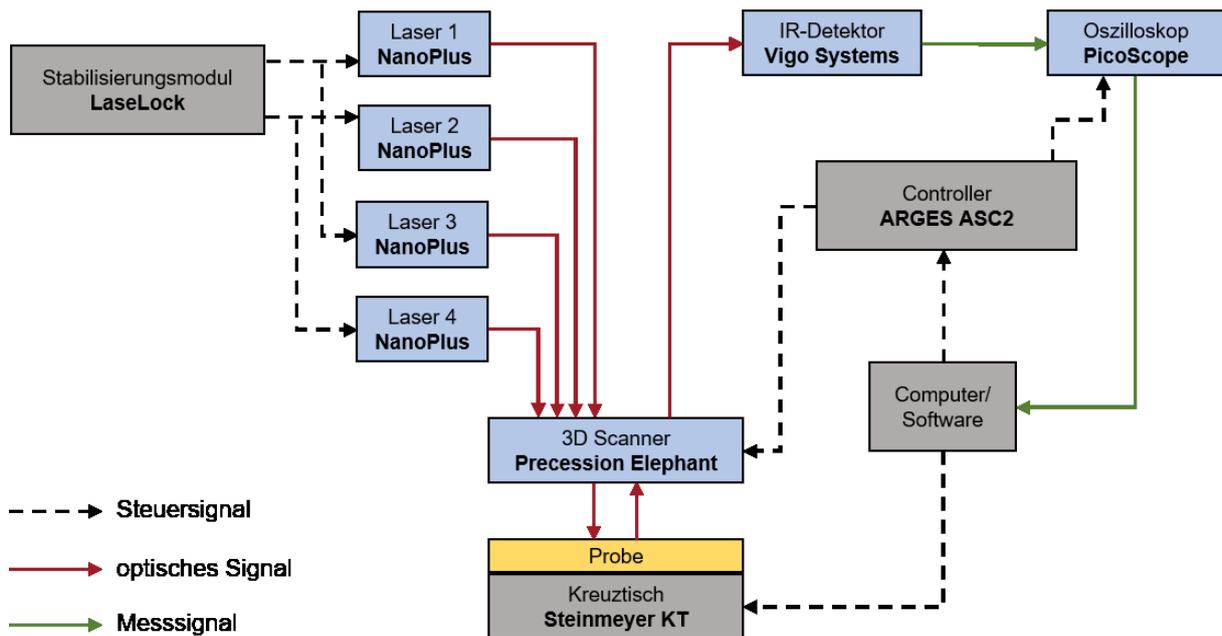


Abbildung 14: Signalflussdiagramm der entwickelten Messmethode

2.2 Technische Validierung der entwickelten Messmethode

Die technische Validierung des gesamten MIR-Scanners ist die grundlegende Voraussetzung für die spektrale Untersuchung von biochemischen Substanzen im medizinischen Gewebeschnitt. In diesem Kapitel stellt deshalb die technische Validierung des Systems einen wesentlichen Bestandteil dar.

2.2.1 Einflüsse auf die Spotsize (Messfleck) und deren Nachweis

Die Spotsize beeinflusst im Wesentlichen die räumliche Auflösung beim Scanprozess bzw. die resultierende Bildqualität und muss daher validiert werden. Das optische System wurde theoretisch auf eine Spotsize von $17\ \mu\text{m}$ ausgelegt. In der Praxis nehmen einige Parameter erheblichen Einfluss auf diesen berechneten Wert, wie die

- Abstrahlcharakteristik der Laser,
- Ungenauigkeiten der axialen Ausrichtung aller optischen Komponenten,
- Fertigungsungenauigkeiten der Linsen,
- verwendete Wellenlänge und
- ein resultierender Abbildungsfehler (Koma, sphärische Aberration).

Die verwendeten Lasermodule besitzen keine kreisförmige, sondern eine rechteckige Lichtquelle. Dies ist durch die verwendete Halbleitertechnik bedingt, bietet aber den Vorteil, dass eine verhältnismäßig hohe Laserleistung (im CW-Mode) in diesem Wellenlängenbereich gewährleistet ist. Die rechteckige Abstrahlcharakteristik führt jedoch dazu, dass der Laserstrahl nicht vollständig in eine Linse eingekoppelt werden kann bzw. diese nicht im ganzen Durchmesser ausleuchtet. Dadurch kommt es zu einem Leistungsverlust im weitergeführten Laserstrahl und zum anderen zu Abbildungsfehlern, die sich wiederum negativ auf die Spotsize und die Elliptizität des Messflecks auswirken. Andere Laserhersteller bieten kreisförmige Lichtquellen an, können aber die erforderliche Leistung (größer 8 mW im CW-Mode) für diesen Wellenlängenbereich nicht gewährleisten. Das Signal-Rausch-Verhältnis fällt für diese Laser sehr gering aus.

Der Ungenauigkeit hinsichtlich der axialen Ausrichtung aller optischen Komponenten wird mit optischen Reitern, die auf einer optischen Bank sitzen, vorgebeugt. Zudem befinden sich die einzelnen optischen Komponenten in einem miteinander verbundenen Caging, was eine einheitliche optische Achse gewährleistet.

Die Spotsize lässt sich über verschiedene Vermessungstechniken (beispielsweise über die Knife-Edge-Methode) bestimmen. Im Folgenden wird die Spotsize mit einem sogenannten schlitzbasierenden und pyroelektrischen Profilmessgerät *Nano-Scan 2s Pyro/9/5* (Ophir Spiricon Europe GmbH, Deutschland) vermessen. Die resultierenden Ergebnisse der einzelnen Lasermodule (Laser 1 bis Laser 4) sind in Tabelle 4 aufgeführt. Hierbei richtet sich die Spotsize-Bestimmung nach der vollen Breite des Laserstrahls bei halbiertem gemessener Leistung FWHM (engl. full width at half maximum) ^{110–112}. Das Spotsize-Messgerät befindet sich während der Messung im Messbereich des MIR-Scanners. Die Fokusebene (des MIR-Scanners) befindet sich dabei für alle Wellenlängen auf der gleichen Ebene und wird für jede Wellenlänge über die Fokussiereinheit des MIR-Scanners eingestellt. Die Spotsize wird jeweils im kartesischen System in x- und y-Richtung vermessen und basiert auf der Messung der Lichtintensität (Laserleistung), welche auf den Sensorchip des Messgeräts fällt (siehe Abbildung 15). Daraus ergibt sich anschließend eine Elliptizität des Messflecks, die die Rundheit des Spots definiert (Elliptizität = 1 → idealer Kreis). Die in Tabelle 4 angegebenen Werte beziehen sich auf den Mittelwert aus jeweils 100 Messungen.

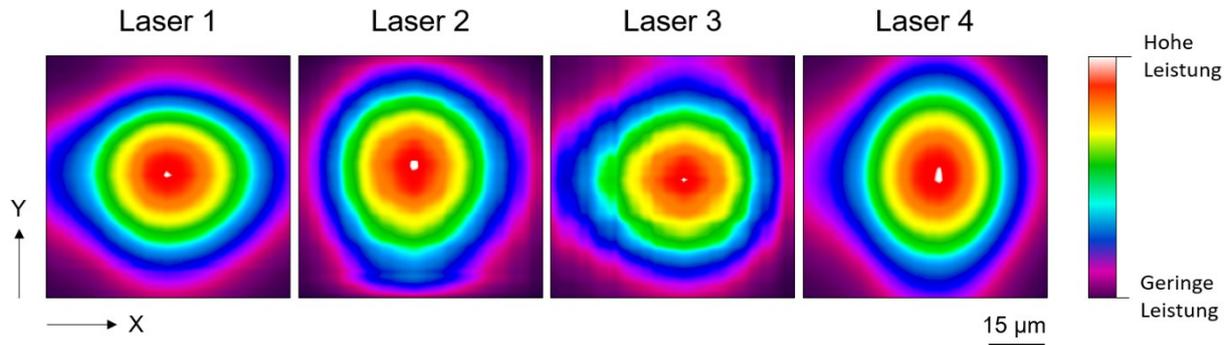


Abbildung 15: Spotsize-Bestimmung für jede Wellenlänge des MIR-Scanners (Laser 1 bis 4)

Tabelle 4: Ergebnisse der Spotsize-Messungen

Laser	FWHM X (µm)	FWHM Y (µm)	St. Abw. X (µm)	St. Abw. Y (µm)	Elliptizität
1	27,9	24,6	0,5	0,6	0,8
2	26,5	27,7	0,3	0,3	0,9
3	24,0	23,8	0,5	0,8	0,9
4	20,4	24,4	0,1	0,4	0,8

2.2.2 Kalibrierung des Bildfelds und Wiederholgenauigkeit des MIR-Scanners

Nicht kalibrierte Bildfelder neigen zu einer erhöhten Bildverzerrung. Dabei entstehen sogenannte Kissen- oder Tonnenformen im Bild. Das erfasste Messbild wirkt dann kreisförmig gewölbt auf den Betrachter. Zusätzlich sind die einzelnen Bildpunkte nicht mehr einer definierten Position auf der Probe zuzuordnen. Bezogen auf den MIR-Scanner kommen solche Verzerrungen vor, wenn die Steuereinheit des beweglichen Spiegelsystems nicht den realen Arbeitsabstand hinterlegt hat. Besonders in den Randbereichen des Bilds vergrößert sich dann die räumliche Auflösung Δs_x und deformiert das Messergebnis (siehe Abbildung 16).

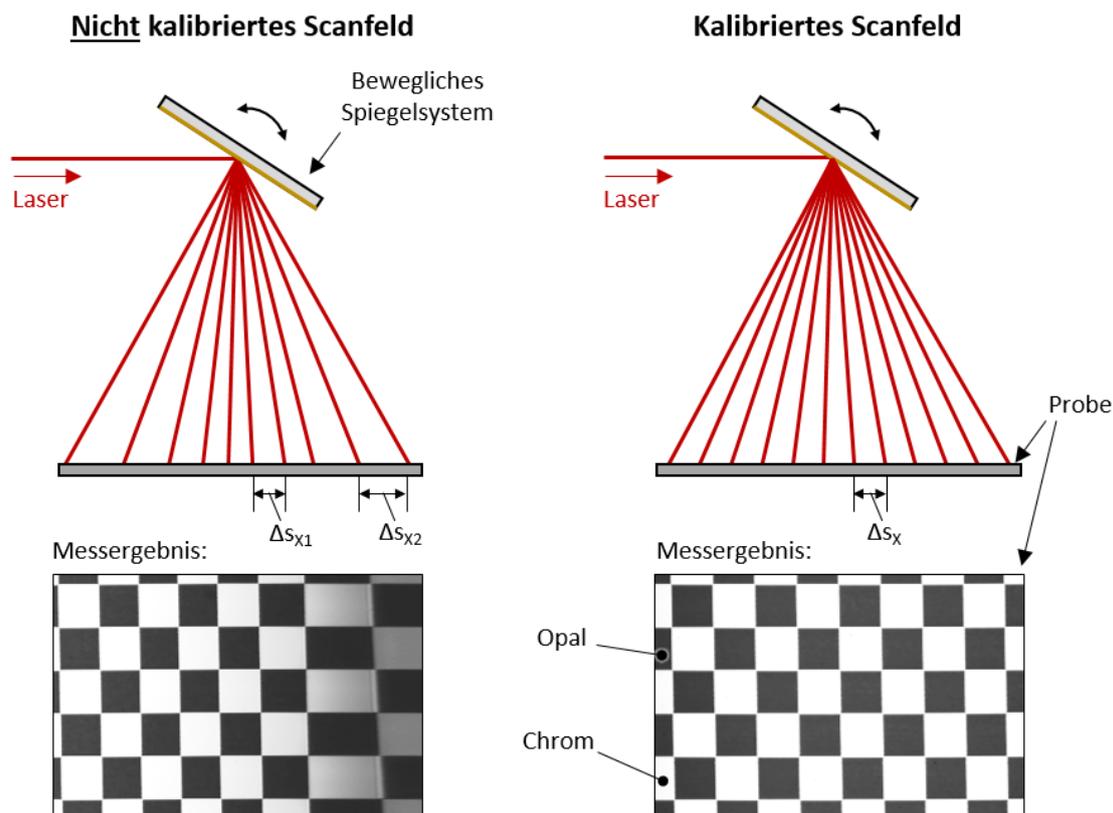


Abbildung 16: Veränderung der räumlichen Auflösung vor und nach der Kalibrierung des Scanfeldes

Die Kalibrierung wird mit einem speziell für diesen Wellenlängenbereich angepassten Kalibriernormal durchgeführt. Auf dem Normal befindet sich ein definiertes Schachbrettmuster (Kästchengröße 0,8 mm x 0,8 mm mit einer Toleranz von $\pm 0,002$ mm; Edmund Optics Inc., USA). Das Muster besteht aus einem verchromten nicht absorbierenden Kästchenanteil (Reflektor) und einem absorbierenden, aus Opal bestehenden, Kästchenanteil (Absorber). Die Kalibrierung bezieht sich auf den Arbeitsabstand von 2 cm und eine Laserlinie (diese definiert auch die Scanbreite) von 1 cm, mit 20 μm räumlicher Auflösung. Da sich die Kalibrierung auf das bewegliche Spiegelsystem bezieht, ist die zu verwendende Wellenlänge nicht von Relevanz. In diesem Fall wird Laser 1 ($2790\text{ cm}^{-1}/3584\text{ nm}$) verwendet, da dieser im Gegensatz zu den anderen Lasern Opal besser absorbiert ¹¹³.

Mit der Ausrichtung des Scanfeldes lässt sich auch die Wiederholgenauigkeit mit dem Kalibriernormal ermitteln. In Tabelle 5 sind die Abweichungen von insgesamt 50 Messbildern dargestellt. Die Messungen beinhalten die Verwendung von allen Wellenlängen (Laser 1 bis Laser 4). Hierbei bezieht sich die Abweichung in x-Richtung auf die lineare

Bewegung des Kreuztisches und die in y-Richtung auf die generierte Laserlinie auf der Probe (Auslenkung des beweglichen Spiegelsystems). Die Messdatenauswertung erfolgt mit einem für den MIR-Scanner entwickelten Auswerte-Tool, basierend auf *Python*. Daraus resultierend konnte eine Ungenauigkeit des Kreuztischs von $\pm 10 \mu\text{m}$ ermittelt werden. Die Abweichung der Laserlinie in y-Richtung wurde auf $\pm 2 \mu\text{m}$ ermittelt. Die Leistungsschwankung der Laser beträgt hierbei $\pm 2 \%$.

Tabelle 5: Aufführung der Wiederholgenauigkeit von Scanbildern mit dem MIR-Scanner.

Parameter	Abweichung
X (in μm)	± 10
Y (in μm)	± 2
Leistung	$\pm 2 \%$

Die, im Gegensatz zur Abweichung in y-Richtung, hohe Abweichung in x-Richtung ist auf die Wiederholungenauigkeit und die Eigenstabilisierung des Kreuztischs zurückzuführen. In diesem Aufbau ist der Kreuztisch nicht gesondert schwingungsgedämpft gelagert und ist daher gegenüber geringen äußeren Einflüssen besonders anfällig.

Die Schwankung der Laserleistung hängt an dieser Stelle von der Laserstabilisierung ab. Die Laser werden jeweils auf einen vorgegebenen Betriebsstrom und eine Betriebstemperatur geregelt. Der Regelprozess ist in Form von geringen Signalunterschieden auf ideal reflektierenden Substraten wie beispielsweise gold- oder silberbeschichteten Objektträgern sichtbar. Die abweichende Laserleistung resultiert dann in einem schwankenden Messsignal.

2.2.3 Unterschiedliche Scanauflösungen

Die erforderliche Scanauflösung hängt direkt von der zu erfassenden Strukturgröße ab. Die Standardeinstellung des MIR-Scanners beträgt eine Scanauflösung von $20 \mu\text{m}$ in horizontaler (X) und vertikaler (Y) Scanrichtung. Praktisch lässt sich die räumliche Auflösung des MIR-Scanners bis auf $5 \mu\text{m}$ einstellen. In Abbildung 17 ist dargestellt, wie sich das Scanergebnis durch Reduzierung der räumlichen Auflösung verhält. Bei

einer räumlichen Auflösung $< 20 \mu\text{m}$, in Kombination mit einer $20\text{-}\mu\text{m}$ -Spotsize, erfolgt eine Überlappung der einzelnen Messpunkte. Daraus resultiert eine Mittelung des Messwertes. Der Messfleck überlappt bei einer räumlichen Auflösung von $5 \mu\text{m}$ zu 75% mit dem darauffolgenden Messpunkt. Das Resultat ist eine Unschärfe im Messbild (blurring) und ein Signalabfall bei kleinen Strukturen ($< 100 \mu\text{m}$). Die räumliche Auflösung hängt somit im Wesentlichen von der Spotsize ab.

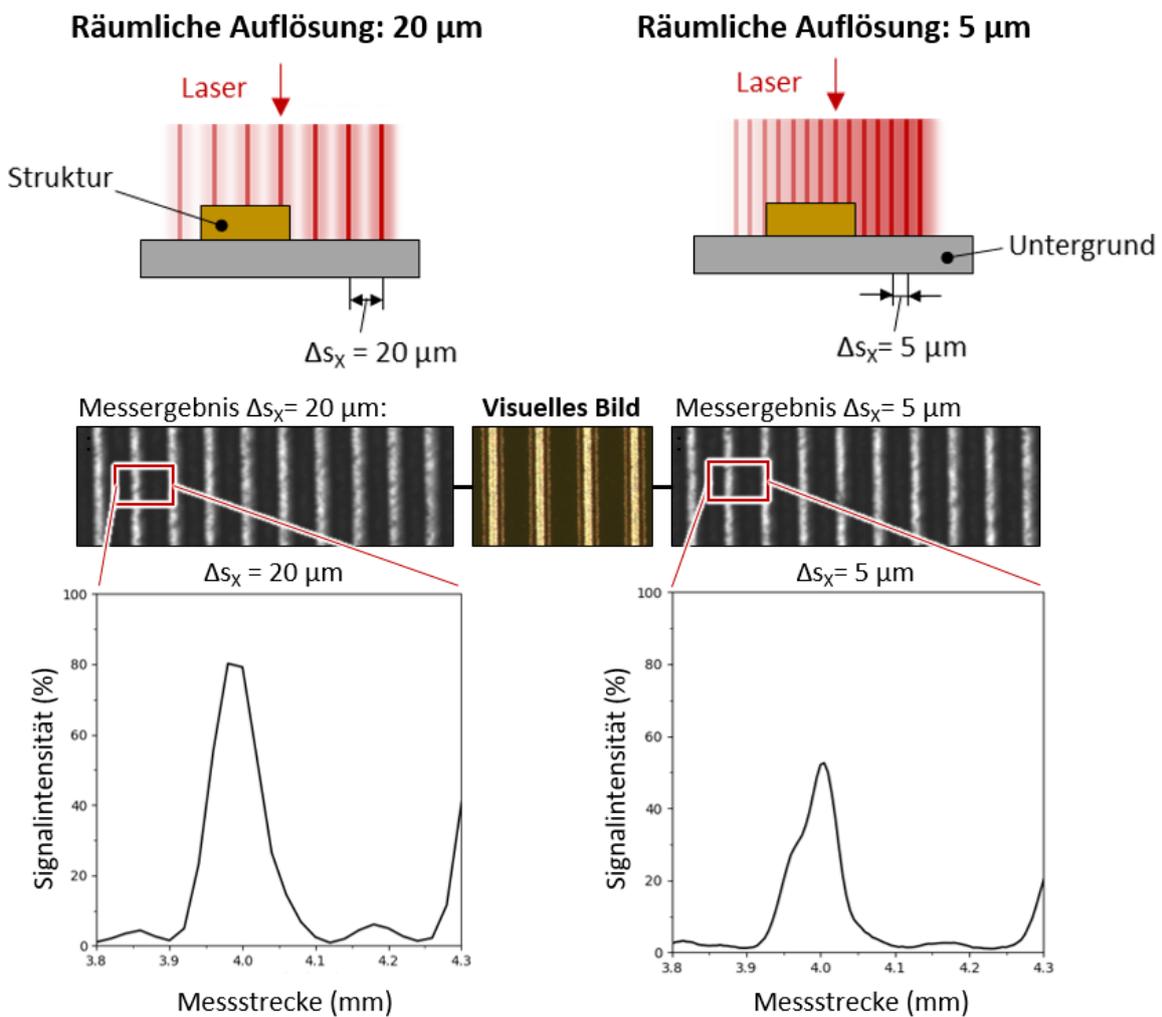


Abbildung 17: Auswirkung der räumlichen Auflösung auf das Messergebnis. Vergleich zwischen $20 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ räumlicher Auflösung in Kombination mit einer Spotsize von $\sim 20 \mu\text{m}$.

Die Messergebnisse in Abbildung 17 wurden an einem speziell für den MIR-Scanner angefertigten Substrat durchgeführt. Der Untergrund des Substrats besteht aus einer Polymer-Schicht, auf welcher in definierten Abständen Goldstreifen aufgebracht sind. Durch die Substratkombination von Polymeren (stark absorbierend) und Gold (sehr

gering absorbierend) ergibt sich eine deutliche Kante, die auch im Messsignal deutlich zu erkennen ist. Die in Abbildung 17 verwendete Struktur bezieht sich auf einen Abstand zwischen den Goldschichten von 175 μm . Der Signalunterschied zwischen den beiden untersuchten räumlichen Auflösungen, bedingt durch den hohen Überlappungsanteil der einzelnen Messpunkte, ist hierbei besonders gut zu sehen. Basierend auf den Erkenntnissen von Abbildung 17 wird die räumliche Auflösung für Messungen mit dem MIR-Scanner auf 20 μm standardisiert eingestellt.

2.2.4 Detektorverstärkung und Einstellung

Der IR-Detektor hat im Wellenlängenbereich zwischen 2,5 μm bis 5 μm sein Empfindlichkeitsmaximum (Detektorbezeichnung: PVI-5 von VIGO Systems S. A.). Der Photovoltaik-Detektor erreicht für diesen Wellenlängenbereich eine spezifische Detektivität von $9 \cdot 10^9 \text{ cmHz}^{1/2}/\text{W}$, bei Raumtemperatur (20 °C). Das Messsignal des IR-Detektors wird als Spannung (0 bis 4 V) ausgegeben. Ist die Sättigung des Detektors bei ca. 4 V erreicht, so regelt der Detektor auf eine konstante Ausgangsspannung ab. Die Einstellung der Empfindlichkeit bzw. die Detektorvorverstärkung lässt sich in 256 Verstärkungsstufen einstellen. Jedes Lasermodul (Laser 1 bis 4) benötigt aufgrund der variierenden Emissionsleistung eine spezifische Vorverstärkung. In Abbildung 18 ist die optimale Einstellung der Verstärkungsstufe des Detektors in Abhängigkeit unterschiedlicher Substanzen dargestellt. Die Messobjekte beziehen sich hierbei auf zwei ideale Reflektoren (Gold und Silber) und auf zwei Absorber (Wollwachs und PVC). Die Substanzen simulieren das Messen von lipidhaltigen Strukturen auf einem gold- oder silberbeschichteten Objektträger.

Die optimale Verstärkung, auch optimales Gain genannt, befindet sich zwischen der ansteigenden Rampe des Messsignals und der Sättigung des Detektors. Bezogen auf Gewebeschnitte, die sich auf einem gold- oder silberbeschichteten Objektträger befinden, bezieht sich das optimale Gain auf die maximale Differenz innerhalb der ansteigenden Messsignal-Rampe der Objektträgerbeschichtung. Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wird das optimale Gain so eingestellt, dass immer ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zwischen Untergrund (z. B. Silber) und Probe (hier z. B. Wollwachs) erreicht wird. Dies erfolgt, ohne dass der Detektor in einen Sättigungszustand kommt. Im Sättigungszustand sind die Messsignale nicht mehr aussagekräftig.

Deshalb ergibt sich für silberbeschichtete Objektträger ein maximales Messsignal von 3,5 V zur Ermittlung der entsprechenden Gain-Stufe. Daraus resultierend ergeben sich folgende Verstärkungsstufen (Gain, siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Parameter zur Einstellung der Verstärkungsstufe des IR-Detektors

	Laser 1	Laser 2	Laser 3	Laser 4
Gain	75	80	115	125

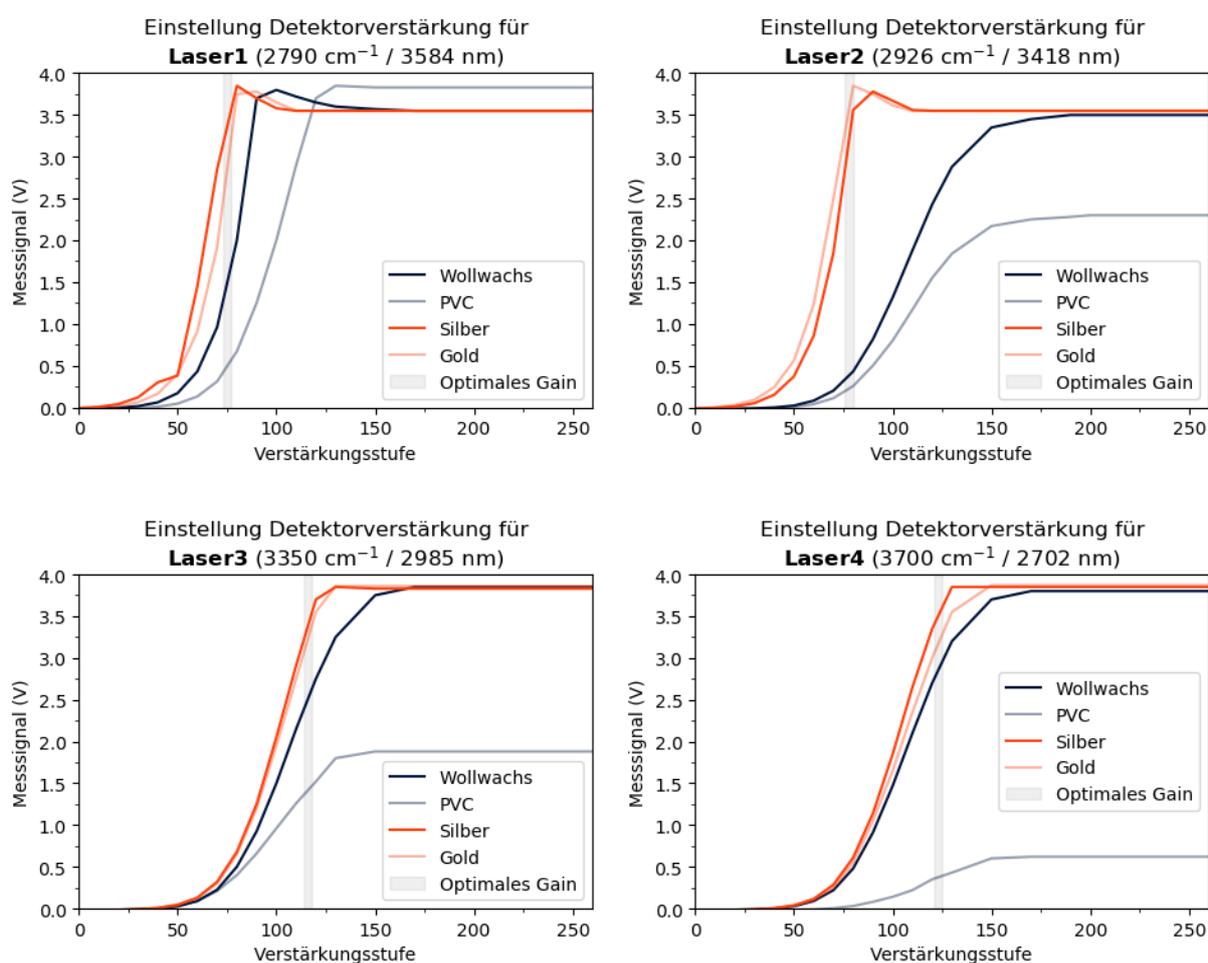


Abbildung 18: Einstellung der optimalen Verstärkerstufe des IR-Detektors für die Laser 1 bis 4.

2.2.5 Messbarkeit unterschiedlicher Materialien

In Abbildung 19 sind vier Substanzen (ein Proteinpräparat, zwei lipidhaltige Substanzen und eine polymerhaltige Substanz) aufgeführt, die wesentlicher Bestandteil dieser

Arbeit sind. Die IR-Spektren stellen Referenzmessungen dar, die mit einem FT-IR-Mikroskop *Spotlight 400* (PerkinElmer Inc., USA) unter jeweils gleichen Versuchsbedingungen aufgenommen wurden (spektrale Auflösung 8 cm^{-1} , zweifach akkumuliert, Messung auf einem silberbeschichteten Objektträger). Die Markierung der einzelnen Laser (Laser 1 bis Laser 4) repräsentiert die Wellenlängen des MIR-Scanners und verdeutlicht die Messbarkeit der einzelnen Substanzen im jeweiligen spektralen Bereich. Die Markierungen sind mit den Messungen aus Abbildung 18 vergleichbar. Die Messbarkeit richtet sich hierbei nach vorhandenen Absorptionsbanden im spektralen Emissionsbereich der Laser.

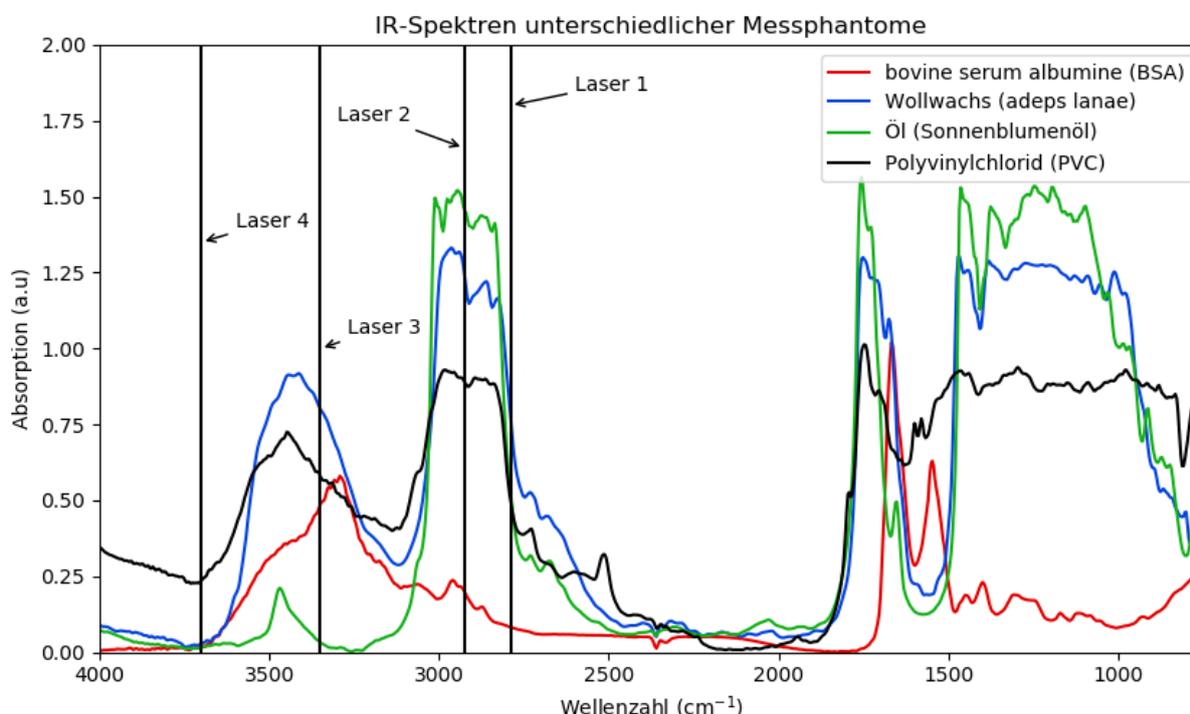


Abbildung 19: IR-Spektren von bovine serum albumine (BSA), Wollwachs (adepts lanae), Sonnenblumenöl und Polyvinylchlorid (PVC) mit Darstellung der einzelnen Wellenlängen des MIR-Scanners.

Die in Abbildung 19 aufgeführten Substanzen zielen auf die Untersuchung von medizinischen Gewebeschnitten ab. Jede der ausgewählten Substanzen bezieht sich auf spektrale Eigenschaften, die in medizinischen Proben vorkommen (Protein- und Lipidanteil). Proteine sind wichtige Bestandteile von Zellen, die aus linearen Ketten von Aminosäuren aufgebaut sind. Kleinere Proteine werden auch Peptide oder Polypeptide genannt. Sie enthalten zwei funktionelle Gruppen, zum einen die Carbonsäure-

(Carboxyl)-gruppe ($-\text{COOH}$), welche durch Dissoziation als Säure wirkt, und zum anderen die Aminogruppe, $-\text{NH}_2$. Die Aminogruppe beinhaltet einen organischen Rest, der bestimmt, um welche Aminosäure es sich handelt. In den Proteinen sind die Aminosäuren in verschiedener Folge und Anzahl miteinander verbunden. Somit sind die Kombinationsmöglichkeiten schon bei einer relativ geringen Aminosäurekette sehr hoch. Im menschlichen Körper kommen zwanzig unterschiedliche Aminosäuren vor, die sich in gleicher oder ähnlicher Form auch in tierischen Modellen (beispielsweise Mäuse) befinden. Sie sorgen für einen funktionierenden Stoffwechsel und bilden die Basis der Zellstruktur. ^{114,115}

Eine charakteristische Schwingungsbande von Proteinen ist die Amine- bzw. die Amide A-Bande. Die Bande wird in primäre und sekundäre Amide unterteilt und ist im Bereich der funktionellen Gruppen bei 3500 cm^{-1} bis 3050 cm^{-1} (vergleiche Kapitel 1.4, Tabelle 1). Das Intensitätsmaximum für primäre Amide als Feststoff liegt bei 3350 cm^{-1} , das der sekundären Amide bei 3300 cm^{-1} . ^{65,77,116}

Messphantome für spektrale Untersuchungen von Proteinen beziehen sich meist auf human serum albumin ¹¹⁷ (HSA), bovine serum albumin ¹¹⁸ (BSA) und teilweise mouse serum albumin ¹¹⁹ (MSA). Spektral verhalten sich die Sera vergleichbar zueinander ¹²⁰. Aus Sicherheitsgründen und aufgrund der hohen Verfügbarkeit wird für Laborversuche häufig BSA verwendet ¹¹⁸⁻¹²⁰. Die Referenzierung des MIR-Scanners für Protein-Banden wird darum ebenfalls mit BSA durchgeführt. Für BSA liegt das Absorptionsmaximum von NH-Bindungen bei 3350 cm^{-1} und liegt damit auf der Emissionswellenlänge von Laser 3.

In medizinischen Gewebeschnitten bilden Lipide die Struktur aller Membranen. Sie dienen der Energiegewinnung und spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Kommunikation. Durch die hydrophobe Beschaffenheit der Fettsäuren wird die Verbindung von Lipiden zu Membranen möglich. Aufgrund ihrer Löslichkeit in unpolaren Lösemiteln werden Lipide als lipophil bzw. hydrophob oder auch als Fettsäure bezeichnet. Sie beinhalten einen hohen CH-Anteil und sind deshalb spektral sehr gut nachweisbar. Aus chemischer bzw. molekularer Betrachtungsweise verhalten sich CH_2 - und CH_3 -Bindungen analog zu den Lipiden ^{80,114}. Hierbei repräsentieren Wollwachs (auf tierischer Basis) und Öl (Sonnenblumenöl) Lipide, die als Messphantom zur Referenzierung des MIR-Scanners und zur Überprüfung der Messbarkeit von Lipiden verwendet

werden. An dieser Stelle ist vorausgesetzt, dass sich Lipidanteile in medizinischen Gewebeschnitten vergleichbar im infraroten Schwingungsspektrum verhalten. Das Absorptionsmaximum für Wollwachs und Öl liegt bei 2926 cm^{-1} und wird ideal von Laser 2 absorbiert. Die FT-IR-Messungen zeigen, dass sich die Referenzwellenlängen Laser 1 und Laser 4 außerhalb der zu untersuchenden Absorptionsbanden befinden und sich dabei annähernd ideal auf die Streueigenschaften der Proben bzw. Probenuntergründe beziehen. Auch Polymere beinhalten langkettige CH-Moleküle^{121–123}, deren Absorptionsmaximum ebenfalls zwischen 3000 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} liegt. Einige Polymere, speziell Polyvinylchlorid (PVC), sind grundsätzlich auch mit Laser 2 messbar und aus spektraler Betrachtungsweise auch (in diesem Wellenlängenbereich) mit Lipiden vergleichbar. Die ersten Scanversuche mit dem MIR-Scanner beziehen sich daher speziell auf PVC als Messphantom.

2.2.6 Erläuterung zur H&E-Färbung

In dieser Arbeit werden murine Gewebemessungen mit H&E-gefärbten Proben referenziert und verglichen. Die einzelnen Bäder des Färbeprozesses haben unterschiedliche Auswirkungen¹²⁴ auf die gefärbte Probe und sind deshalb an dieser Stelle gesondert aufgeführt:

- Hämatoxylin (Mayer's Hämalaunlösung; Merck KGaA, Deutschland): färbt Zellkerne vorerst rot-braun, die dann in Kombination mit Leitungswasser bläulich erscheinen.
- Destilliertes Wasser: entsalztes Wasser, welches überschüssiges Färbe- und Lösungsmittel von der Probe abwäscht.
- *acidic alcohol* (Sigma Aldrich GmbH, Deutschland): verstärkt die Färbung der Zellkerne durch Reduzierung unspezifischer Bindungen im Cytosol. Zusammensetzung: 350 ml EthOH + 150 ml H₂O + 1,5 ml HCl.
- *blueing solution* (Sigma Aldrich GmbH, Deutschland): verstärkt die bläuliche Färbung der Zellkerne zusätzlich. Zusammensetzung: 2 g NaHCO₃ + 20 g MgSO₄ in 1 l H₂O.
- Eosin (Merck KGaA, Deutschland): Y-Lösung 0,5% wässrig, färbt das Zytoplasma, Kollagenfasern sowie Erythrozyten pink bis rötlich ein.
- Ethanol (80%-100%) und Xylol: Dehydrierung der Probe.

3 Ergebnisse

Die Auslegung, Entwicklung und Validierung des MIR-Scanners ist ein Teil dieser Arbeit und konnte im vorhergehenden Kapitel detailliert dargestellt werden. Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit einer vertieften Validierung der entwickelten Messmethode und zielt auf das schnelle Abbilden biomedizinischer Gewebeschnitte ab. Dies wird in diesem Kapitel beschrieben. Das Vorgehen zur Erreichung des Ziels ist in folgende Schritte und damit Teilversuche untergliedert:

- Ermittlung und Steigerung von Grenzkontrasten an polymeren Messphantomen
- Untersuchung lipidhaltiger Strukturen am Messphantom
- Bestimmung unterschiedlicher Schichtdicken anhand lipidhaltiger Strukturen

Aus den erlangten Zwischenergebnissen lässt sich die Messmethodik anschließend auf medizinische Proben übertragen. Die zusätzliche Anwendung von unüberwachten Clusteranalysen wie der k-means-Algorithmus führt damit zur Segmentierung einzelner Gewebestrukturen bis hin zur Detektion von malignen Gewebeanteilen im murinen Gewebeschnitt. Folgende Zwischenschritte erfolgen für die Erkennung maligner Gewebeanteile im Gefrierschnitt:

- Validierung des Messsystems und der Software an biologischem Material vom Schwein
- Integration der Messtechnik in einen bestehenden Workflow für die spektrale Untersuchung von murinen Gewebeschnitten
- Durchführung von Versuchsreihen an murinen Gewebeschnitten

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der oben aufgeführten Teilversuche näher beschrieben.

3.1 Kontraststeigerung für dünne Schichten

Die Ermittlung und Steigerung von Grenzkontrasten für die Analyse biologischer Gewebeschnitte ist vorerst nicht zwingend an reale Gewebeschnitte gebunden, sondern

kann auch an sogenannten Messphantomen erfolgen. Die spektralen Absorptionseigenschaften müssen aber gemäß den Ausführungen in Kapitel 2.2 vergleichbar sein (siehe auch Abbildung 19). Im Folgenden wird solch ein Messphantom mit hohem CH_2/CH_3 -Molekülanteil zur Analyse des Grenzkontrastes verwendet.

3.1.1 Eindringtiefe des Laserlichts in polymeren Substanzen

Für dünne Gewebeschnitte hängt der Grenzkontrast im Wesentlichen von der Proben-schichtdicke ab. Die medizinische Gewebeprobe befindet sich üblicherweise bei der IR-Spektroskopie auf einem gold- oder silberbeschichteten Untergrund^{30,35,66,68}. Die Reflexion des Untergrunds dient zur vollständigen Durchleuchtung der Probe in Kombination mit einer Verbesserung des Messsignals (Signal-Rausch-Verhältnis). Je dicker die Probe ist, desto weniger Messsignal fällt auf den Detektorchip. Dies spielt überwiegend bei stark absorbierenden Substanzen eine Rolle (vgl. Gleichung 1.1 und 1.3). Aus diesem Grund wird anhand eines Messphantoms mit stark absorbierenden Eigenschaften die maximale Eindringtiefe ermittelt. Als Messphantom eignen sich Polymere (z. B. Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol) mit hohem Absorptionsanteil für CH_2/CH_3 -Schwingungen. Polyvinylchlorid (PVC) weist in diesem spektralen Bereich hinreichende Voraussetzungen auf (siehe Abbildung 19) und wird daher als Messphantom eingesetzt. Zur Bestimmung der maximalen Eindringtiefe wird der jeweilige Targetlaser (Laser 2) und Referenzlaser (Laser 1) verwendet. Die unterschiedlichen Emissionseigenschaften der Laser zeigen hierbei zusätzlich, wie unterschiedlich sich jede Wellenlänge auf die Messung eines Substrats auswirkt.

In Abbildung 20 ist die Eindringtiefe für Laser 1 und Laser 2 im Verhältnis zu unterschiedlichen PVC-Schichtdicken dargestellt. Die Schichtdicken sind über einen PVC-Keil ermittelt und betragen für dieses Messmodell 2 μm bis 1 mm. Um die Emissionswellenlängen der Laser direkt miteinander vergleichen zu können, wird das Messsignal nicht als Absorption verrechnet, sondern als Sensorintensivität (Rohsignal des IR-Detektors) dargestellt. Die Messpunkte sind in der Mitte des Scanfeldes aufgenommen und setzen sich aus zehn gemittelten Einzelmessungen zusammen. Aus dem Graphen in Abbildung 20 geht deutlich hervor, dass Laser 1 ($2790\text{ cm}^{-1}/3584\text{ nm}$) eine wesentlich höhere Eindringtiefe erreicht als Laser 2 ($2926\text{ cm}^{-1}/3418\text{ nm}$). Dies liegt haupt-

sächlich an den unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der Emissionswellenlängen. Laser 1 erreicht hierbei eine Eindringtiefe von bis zu $\sim 150 \mu\text{m}$ und Laser 2 eine Eindringtiefe von $\sim 20 \mu\text{m}$.

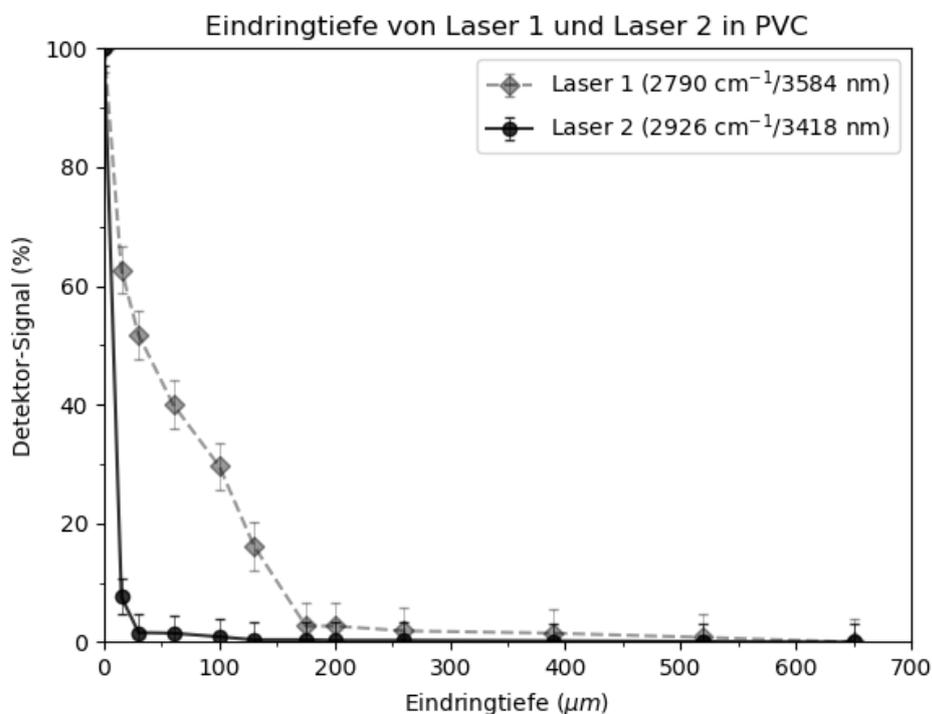


Abbildung 20: Bestimmung der Eindringtiefe von Laser 1 (2790 cm^{-1} / 3584 nm) und Laser 2 (2926 cm^{-1} / 3418 nm) anhand eines Messphantoms aus Polyvinylchlorid (PVC)

Ab einer Eindringtiefe von $\sim 150 \mu\text{m}$ (für Laser 1) bzw. $\sim 20 \mu\text{m}$ (für Laser 2) geht das Messsignal in das Grundrauschen des Detektors über. Eine eindeutige Aussage über ein reproduzierbares Messsignal kann dann nicht mehr getroffen werden (Signal-Rausch-Verhältnis unter dem Wert 3). Anhand der ermittelten Eindringtiefe lassen sich Absorptionsunterschiede an entsprechenden Schichtdicken ermitteln, die den Grenzkontrast und die Absorptionsunterschiede zwischen den Lasern an der PVC bzw. CH_2/CH_3 -Schwingung verdeutlichen.

3.1.2 Detektion von überlagerten Strukturen

Die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von Laser 1 und Laser 2 lassen sich auf vollständige Scanbilder übertragen. In Abbildung 21 ist als Beispiel eine Münze dargestellt, welche mit einer PVC-Schicht präpariert ist und über den MIR-Scanner

optisch erfasst wird. Das gescannte Objekt enthält ebene und unregelmäßige Oberflächen sowie einen Bereich, der durch das Polymerband (PVC, Dicke 130 μm) abgedeckt ist. Die präparierte Probe beinhaltet das Verdecken des Münzenschriftzugs mit dem Polymerband. Die Münze besteht anteilig aus Messing, Nickel und Kupfer. Damit stellt die Münze einen annähernd idealen Reflektor dar. Im Gegensatz dazu ist das Polymerband ein annähernd idealer Absorber. Mit dieser absorbierenden Eigenschaft können Absorptionsunterschiede auf der Oberfläche bzw. auf dem Probenmaterial untersucht werden. Die Scanfläche bezieht sich für diesen Versuch auf 25 cm^2 mit 20 μm räumlicher Auflösung. Die Scanergebnisse von Laser 1 und Laser 2 sind anschließend auf ein entsprechendes Messbild zugeschnitten.

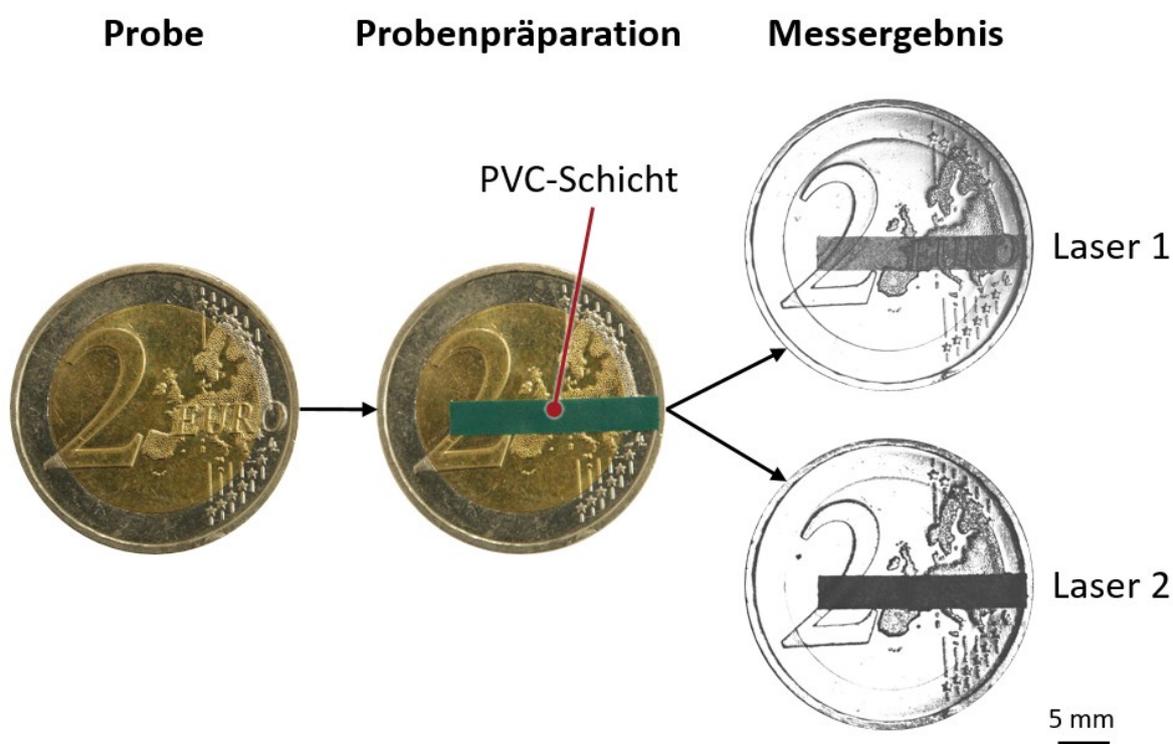


Abbildung 21: Messergebnisse für eine definierte PVC-Schicht (Dicke: 130 μm) mit Laser 1 (2790 cm^{-1} / 3584 nm) und Laser 2 (2926 cm^{-1} / 3418 nm). Die PVC-Schicht befindet sich auf einer Münze mit reproduzierbaren Strukturen.

Die Absorptionsunterschiede zwischen Laser 1 (2790 cm^{-1} / 3584 nm) und Laser 2 (2926 cm^{-1} / 3418 nm) sind auf den metallischen Oberflächen der Münze annähernd gleich. Auf strukturierten Oberflächen, wie z. B. am Prägemuster der Münze, sind verdunkelte Bereiche sichtbar (vergleiche Abbildung 21, Laser 1 und Laser 2). Durch die Brechung des Laserlichts an den Objektkanten wird der Direktreflex des Laserlichts

abgelenkt und führt zu einer nicht vollständigen Abbildung des konfokal erfassten Messsignals auf den IR-Detektor. Diese Auslenkungen des Direktreflexes können jedoch nur als Mittelwert erkannt werden und erscheinen aufgrund der unterschiedlichen Erfassung des Direktreflexes unterschiedlich im Messbild.

Die Anwendung des Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetzes (vgl. Gleichung 1.3) auf die Messbilder verdeutlicht die Absorptionsunterschiede zwischen den verwendeten Laserwellenlängen zusätzlich und fasst die Messergebnisse in einem Gesamtbild zusammen. In Abbildung 22 ist das Absorptionsbild der beiden Laserwellenlängen im Vergleich zum visuellen Bild der Probe dargestellt. Für die Berechnung der Absorption ist Laser 1 als Referenz I_0 (da Laser 1 für diese PVC-Schichtdicke das Material durchleuchtet, siehe Abbildung 20) und Laser 2 als I definiert. Durch die logarithmische Darstellung der Absorption sind auch geringe Abweichungen zwischen den Wellenlängen erkennbar.

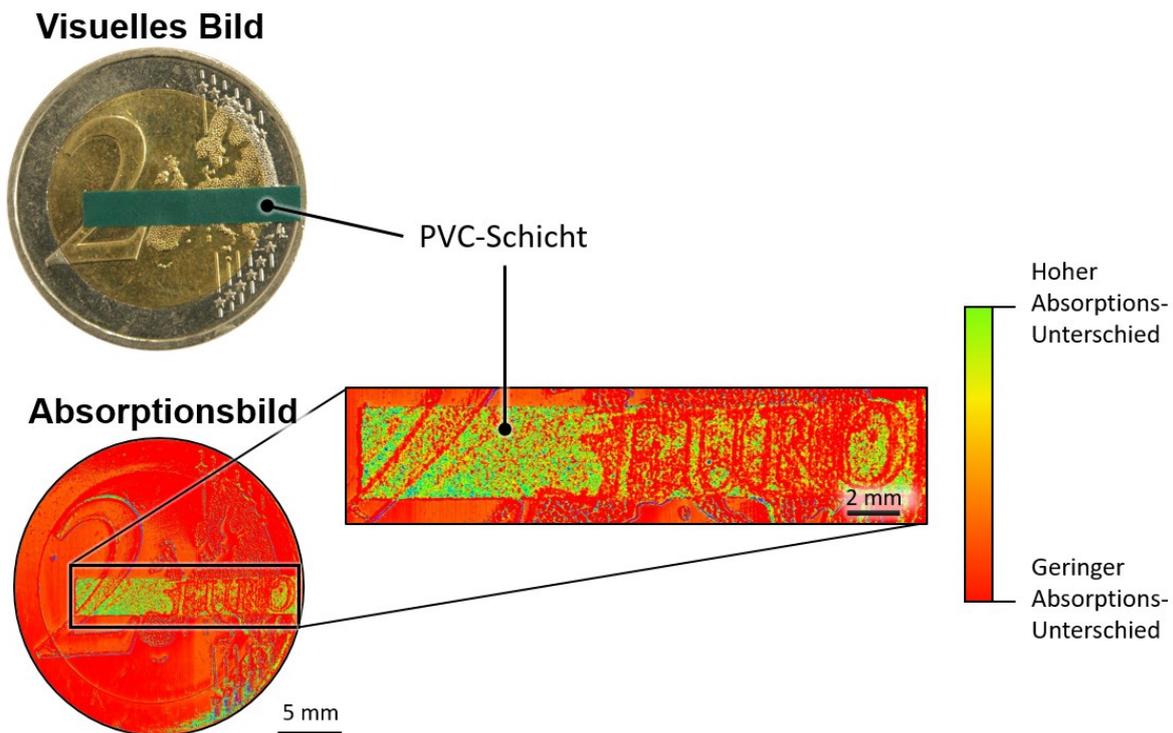


Abbildung 22: Darstellung visuelles Bild der Probe mit entsprechendem Absorptionsbild. Das Absorptionsbild setzt sich aus dem Informationsgehalt von Laser 1 und Laser 2 zusammen und lässt die Visualisierung von verdeckten Strukturen zu.

Die flächige Homogenität der Absorption (hier normiert) wird durch die gleichmäßige Farbverteilung auf der metallischen Oberfläche der Münze in Abbildung 22 verdeutlicht. Relevante Absorptionsunterschiede zwischen den Wellenlängen sind vor allem auf dem PVC-Band deutlich sichtbar. Anhand der Absorptionsunterschiede auf der Polymerschicht lässt sich die aufgebrauchte PVC-Schicht durchleuchten und der darunterliegende Schriftzug der Münze darstellen. Darüber hinaus bleibt die Information über das Vorhandensein der PVC-Schicht erhalten.

Die Messung von Absorptionsunterschieden kann auch auf andere Proben angewandt werden und Aufschluss auf die Vollständigkeit einer verdeckten Struktur geben. In Abbildung 23 ist repräsentativ eine Leiterplatte, ebenfalls mit einem Polymerband teilweise abgedeckt, zu sehen. Die Leiterplatte besteht aus FR4 (flame retardant, Klasse 4) in Kombination mit goldbeschichteten Leiterbahnen und Lötspots (Abbildung 23 a)). Durch die Berechnung der Absorption zwischen den Wellenlängen und der Übertragung auf vollständige Messbilder ist auch hier die Visualisierung des verdeckten Strukturanteils möglich (siehe Abbildung 23 b)). Durch Überlagerung des visuellen Bildes der Probe und dem berechneten Absorptionsbild lässt sich die Durchleuchtung zusätzlich verdeutlichen (Abbildung 23 c)). In diesem Fall kann der MIR-Scanner als ein Teil der Qualitätskontrolle für sogenannte Multilayer-Leiterplatten fungieren.

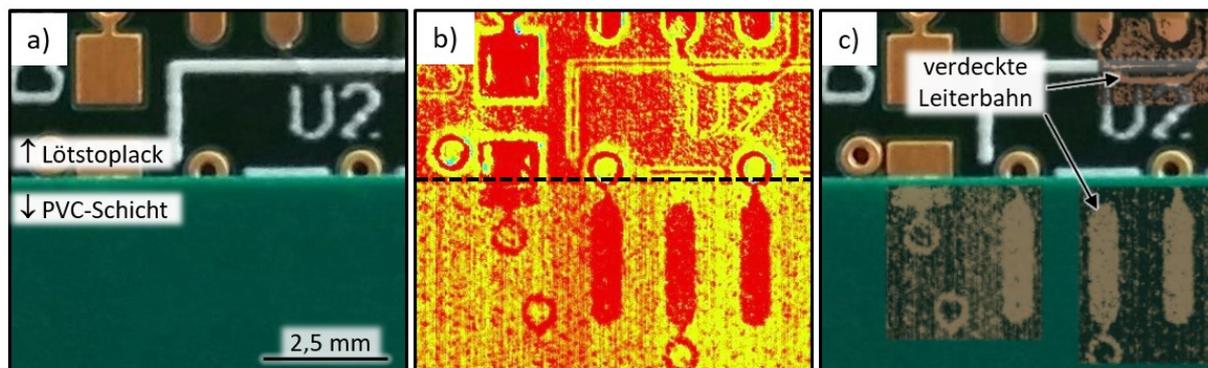


Abbildung 23: Untersuchung verdeckter Strukturen am Beispiel einer Leiterplatte. a) visuelle Abbildung der Probe. b) Absorptionsbild berechnet aus den Absorptionsinformationen von Laser 1 und Laser 2. c) Überlagerung von visuellem Bild und Absorptionsbild, zum Aufzeigen von verdeckten Leiterbahnen.

Anhand der aufgezeigten Messversuche (verdeckte Münze und Leiterplatte) lässt sich zeigen, welche unterschiedlichen Absorptionseigenschaften die verwendeten Wellenlängen des MIR-Scanners haben und welche Wirkung damit erreicht werden kann.

Auch ist nachgewiesen, dass die einzelnen Wellenlängen auf metallischen Oberflächen keine Absorptionsunterschiede aufweisen, sondern lediglich bei Substanzen mit unterschiedlichem CH_2/CH_3 -Anteil. Medizinische Gewebeschnitte bestehen in der Regel aus dünnen Schichten ($\sim 10 \mu\text{m}$). Dies ist vorteilhaft für spektrale Messungen, da sonst bei der Anwendung des Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetzes Nicht-Linearitäten auftreten können und zusätzlich das Signal-Rausch-Verhältnis mit steigender Schichtdicke im Gewebe abnimmt ¹²⁵. Aus diesem Grund wird auf eine umfangreichere Studie bezüglich des Grenzkontrastes und dessen mögliche Steigerung verzichtet. Dennoch lässt sich der in diesem Kapitel erreichte Grenzkontrast auch auf unbekannte Schichtdicken übertragen, die in einem weiteren Sinne auch auf medizinische Proben (bspw. Konzentrationsunterschiede von Lipiden im Gewebeschnitt) übertragbar sind.

3.2 Modellierung eines Höhenprofils für bekannte lipidhaltige Strukturen

Aufbauend auf den Ergebnissen von Kapitel 3.1 lassen sich die Absorptionsunterschiede zwischen Laser 1 und Laser 2 auch auf lipidhaltige Strukturen anwenden. Die Erstellung eines Kalibriermodells lässt die Bestimmung von unbekanntem Schichtdicken innerhalb eines Scanbildes zu. Für Scanbilder, die mit dem MIR-Scanner erstellt werden, lässt sich das Kalibriermodell direkt anwenden. Dies setzt jedoch voraus, dass in den jeweiligen Scanbildern eine einheitliche Substanz (wie beispielsweise Lipide) vorliegt. Für Untersuchungen am gleichmäßig geschnittenen Gewebeschnitt spielt dies keine wesentliche Rolle, da die Schichtdicke der Probe nicht innerhalb der Probe variiert. Dennoch kann ein solches Kalibriermodell hilfreich bei der Bestimmung zweier (oder mehrerer) gemischter Substanzen sein. Das Kalibriermodell gibt vor, bei welcher Schichtdicke ein definierter Absorptionswert zwischen den verwendeten Wellenlängen zu erwarten ist. Liegt der gemessene Absorptionswert außerhalb des Modells, ist dies ein Hinweis auf die Überlagerung zusätzlicher Molekülschwingungen. Auf Gewebeschnitte übertragen kann dies durch einen Blutanteil (im Gewebe) die CH_2/CH_3 -Schwingungsbande beeinflussen und die Absorptionseigenschaften für diesen Spektralbereich deutlich erhöhen ^{126,127}. Bei bekannter Überlagerung kann somit das Kalibriermodell dabei helfen, den ursprünglichen Lipidanteil des Gewebes herauszurechnen. In diesem Kapitel steht diese komplexe Rückrechnung nicht im Vordergrund. Es wird dennoch gezeigt, dass anhand des MIR-Scanners ein solches Kalibriermodell realisierbar ist. In diesem Fall lässt sich die Kalibriermethode auf lipidhaltige Strukturen

in der Forensik, hier Fingerabdrücke, übertragen. Die Übertragung des Kalibriermodells erfolgt dann auf die unbekannte Profilhöhe der Papillarlinien des Fingerabdrucks.

3.2.1 Kalibriermodell für lipidhaltige Substanzen

Das Kalibriermodell beruht wie in Kapitel 3.1 auf den Absorptionsunterschieden von Laser 1 und Laser 2. Das Modell lässt sich identisch auch auf die anderen beiden Laserwellenlängen, die sich in der Lasereinheit befinden (Laser 3 und Laser 4), übertragen und stellt dann eine Kalibrierung für NH-haltige Strukturen dar. In Abbildung 24 a) sind die Eindringtiefen und damit die Absorptionsunterschiede für Laser 1 und Laser 2 anhand unterschiedlicher Lipidschichten dargestellt. Die Lipidschicht besteht hierbei aus tierischem Wollwachs (*adepts lanæ*), das dem menschlichen Körperfett in seinen Eigenschaften sehr ähnlich ist. *Adepts lanæ* hat eine pastöse Konsistenz und lässt sich zu einem Keil mit steigender Schichtdicke verstreichen, der anschließend vermessen wird. Daraus resultierend lässt sich die Absorption zwischen den beiden Wellenlängen in Abhängigkeit der Eindringtiefe berechnen und als Kalibriergerade (mit $R^2 = 0,977$) darstellen (siehe Abbildung 24 b)).

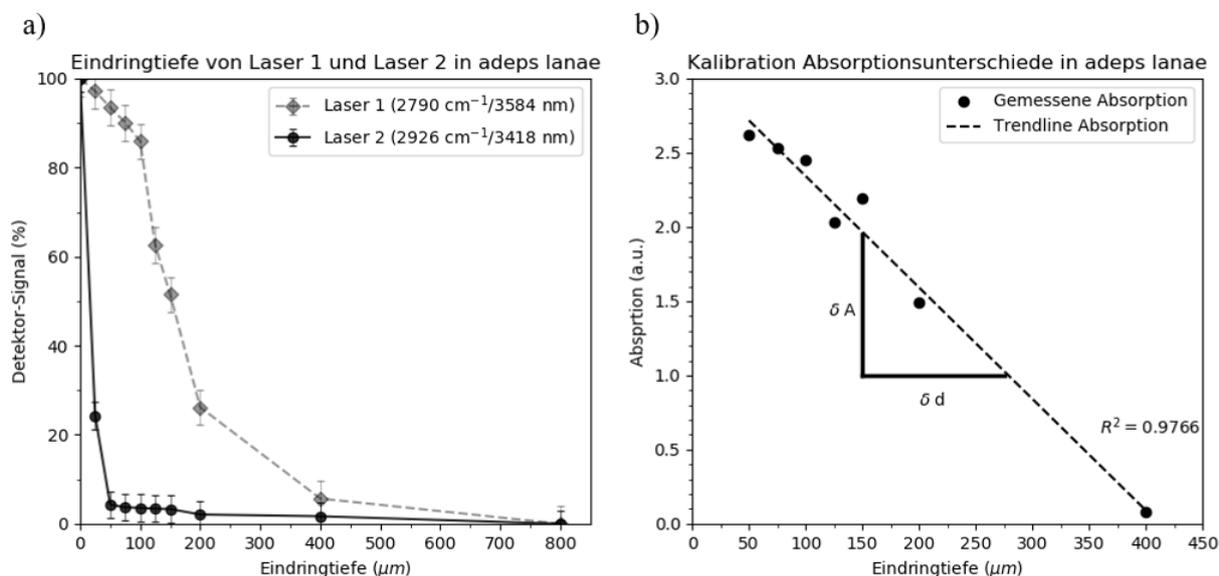


Abbildung 24: Darstellung der Eindringtiefe für *adepts lanæ*. a) Die Signal-Intensität der beiden Wellenlängen nimmt bei beiden Lasern mit zunehmender Eindringtiefe ab. b) Bestimmung der Eindringtiefe mit Hilfe eines Kalibriermodells für lipidhaltige Substanzen (hier *adepts lanæ*).

Die Kalibriergerade setzt sich aus der gemessenen Absorption A und der damit zusammenhängenden Eindringtiefe d zusammen. Die Steigung m und der Offset b resultieren aus der in Abbildung 24 b) ermittelten Kalibriergeraden.

$$A = m \cdot d + b \quad 3.1$$

$$d = \frac{(A - b)}{m} \quad \text{mit: } m = \frac{\delta d}{\delta A} = \frac{d_n - d_{n-1}}{A_n - A_{n-1}} \quad 3.2$$

Die Gerade lässt sich mit der Gleichung 3.1 und 3.2 auf jedes gemessene Bildpixel übertragen. Bezogen auf Fingerabdrücke setzt dies voraus, dass für jede Wellenlänge (von Laser 1 und Laser 2) ein Messbild vorliegt. In Abbildung 25 a) und b) sind entsprechende Scanergebnisse eines Fingerabdrucks auf einem Golduntergrund dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden ein ausgeschnittener und vergrößerter Bereich des Abdrucks dargestellt. Für den ausgewählten Bereich wird die Transmission T beziehungsweise die Absorption A zwischen den beiden Messbildern berechnet (siehe Abbildung 25 c)).

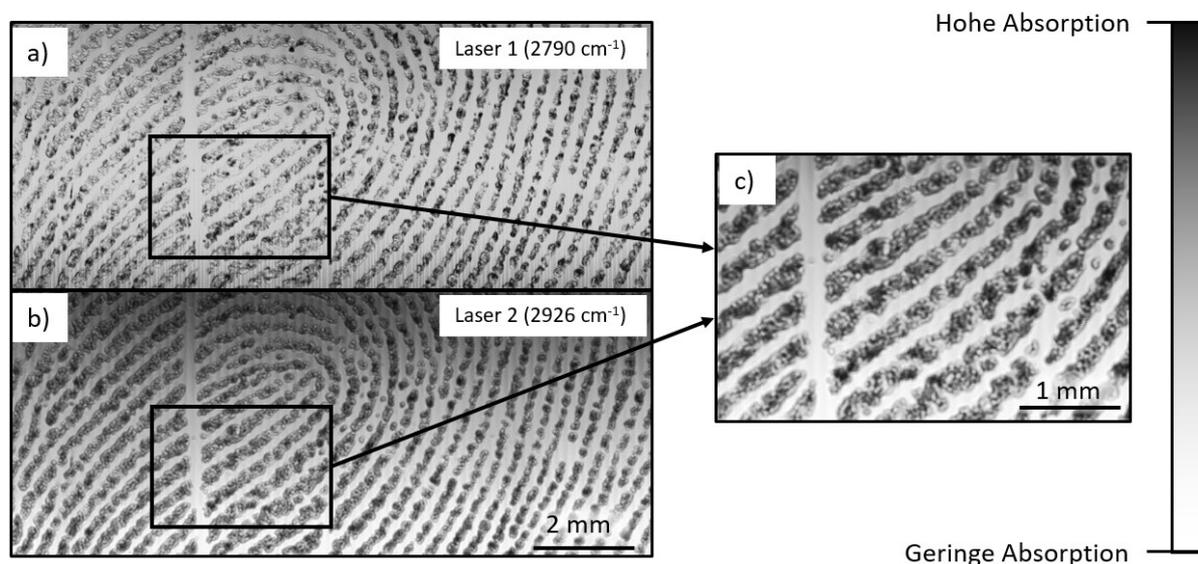


Abbildung 25: Scanergebnis eines menschlichen Fingerabdrucks. a) Scanergebnis des Fingerabdrucks für Laser 1 (2790 cm^{-1}). b) Scanergebnis des Fingerabdrucks für Laser 2 (2926 cm^{-1}). c) Vergrößerter Ausschnitt mit Informationsgehalt über die berechnete Absorption A .

3.2.2 Anwendung des Kalibriermodells auf Messergebnisse mit dem Mittelinfrarot-Scanner

Die berechnete Absorption A aus Abbildung 25 c) lässt sich auf das Kalibriermodell anwenden. Das daraus resultierende Bild enthält somit für jedes Pixel eine Höheninformation. Ein topografisches Abbild des untersuchten Bereichs im Fingerabdruck ist dann die Folge. In Abbildung 26 a) ist das verrechnete Messbild dargestellt. Die farbliche Zuordnung bezieht sich hierbei auf die unterschiedlichen Schichtdicken (Profilhöhen), die in Abbildung 26 b) nochmal als Linienplot (engl.: plotline, PL) dargestellt sind. Der Linienplot zeigt an der Stelle, dass eine Profilhöhe der Papillarlinien von über $250\ \mu\text{m}$ vorliegt.

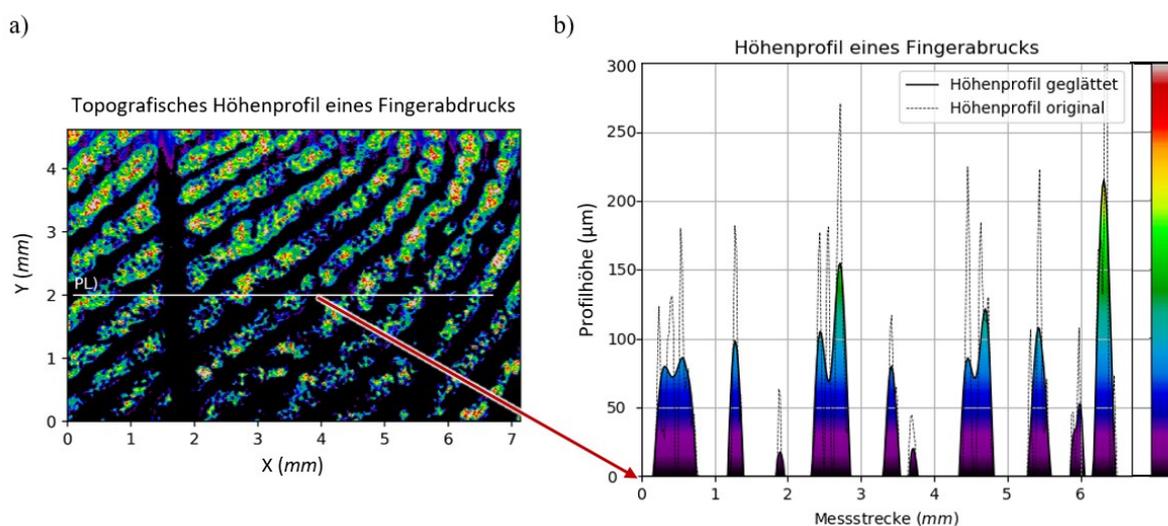


Abbildung 26: Absorptionsbild des Fingerabdrucks in Abhängigkeit von der Höheninformation der Fettschicht. a) Gesamtbild mit enthaltenen Höheninformationen. b) Linienplot (hier PL) einer einzelnen Pixelreihe, zur verbesserten Darstellung der Höhenunterschiede.

Wie schon in Kapitel 3.1 erwähnt, können die unterschiedlichen Wellenlängen der Lasermodule Kanten unterschiedlich sehen. An dieser Stelle wird für die Scanergebnisse des Fingerabdrucks und der resultierenden Höhe der Papillarlinien bzw. der resultierenden Höhe der Fettschicht davon ausgegangen, dass die Wellenlängen die Papillarlinien unterschiedlich sehen und das Messergebnis beeinflussen. In der Regel sind Papillarlinien kleiner als $250\ \mu\text{m}$ ¹²⁸. Aus diesem Grund muss an dieser Stelle und für weitere forensische Analysen des Abdrucks ein Glättungsfilter wie beispielsweise der Savitzky-Golay-Filter ¹²⁹ auf die Ergebnisse angewandt werden. Die richtige Filter-Parametrierung und Validierung von Fingerabdrücken muss in enger Absprache mit

ausgebildeten Forensiker:innen getroffen werden und ist daher nicht mehr Teil dieser Arbeit. Es wird aber deutlich, dass die Erstellung eines Kalibriermodells für spezifische Substanzen durchaus auch auf andere Anwendungen außerhalb der medizintechnischen Umgebung anwendbar ist. Unter Berücksichtigung der erlangten Kenntnisse über die Absorptionsunterschiede von Laser 1 und Laser 2 ist die Anwendung auf biomedizinische Proben möglich.

3.3 Herleitung zur Messung von Gewebeschnitten

Kapitel 3.1 und 3.2 beschäftigen sich mit der Validierung des MIR-Scanners anhand von spezifisch ausgewählten und idealen Messphantomen. Die Übertragung der Messergebnisse auf reale biomedizinische Proben ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich und bedarf einiger Erläuterungen. Diese werden im Folgenden näher beleuchtet.

3.3.1 Übertragung der erlangten Messergebnisse auf medizintechnische Anwendungen

Die bisher erlangten Messergebnisse beziehen sich überwiegend auf annähernd reine Substanzen mit sehr hohem langkettigen CH-Molekülanteil. Solche Substanzen kommen in der Praxis nur in geringem Maße als Reinstoff vor und entsprechen damit idealen Laborbedingungen. Wird die entwickelte Messmethode auf medizintechnische Anwendungen übertragen, so muss berücksichtigt werden, dass es zu spektralen Überlagerungen kommen kann^{130–133}. Nebenliegende Banden im spektralen Bereich schwingen unter Umständen so stark, dass die zu messende Bande nicht mehr eindeutig einem spezifischen Peak zuzuordnen ist. Eine genauere Untersuchung hierzu befindet sich in Kapitel 3.4.3, die die spektrale Überlagerung von NH-Molekülen durch die OH-Bande näher beleuchtet. Neben der spektralen Überlagerung ist auch die Zuordnung der schwingenden Moleküle zu einer Substanz kritisch zu betrachten. Beispielsweise kann sich die Schwingungsbande von Lipiden auch auf Schwingungsanteile anderer Molekülzusammensetzungen, die einen langkettigen CH-Anteil besitzen, auf das Messsignal auswirken^{130,134}. Der MIR-Scanner detektiert hierbei nur die gesamte Schwingungsbande für alle Substanzen, die langkettige CH- bzw. NH-Moleküle

beinhalten. Eine genaue Aufteilung des entsprechenden Messsignals kann in diesem Fall mit dem MIR-Scanner nicht erfolgen. Hierfür muss die Probe mit einer selektiveren Messmethode wie beispielsweise MALDI MSI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Mass Spectrometry Imaging)^{30,135} oder weiteren Referenzspektren von Reinstoffen erfolgen.^{65,66}

3.3.2 Relevanz von Proteinstrukturen

Neben lipidhaltigen Strukturen geben auch Strukturen mit ausreichendem Anteil von NH-Molekülen weitere wichtige Informationen zur Analyse von Gefrierschnitten. Die daraus resultierenden Proteinstrukturen können auf erkranktes Gewebe hindeuten^{136–138}. Die spektrale Schwingungsbande von NH-Molekülen ist indirekter Indikator für ansteigende Konzentrationen von Amiden^{66,136,139,140}. In diesem Zusammenhang wird die NH-Schwingungsbande auch als Amide A bezeichnet (hier unterscheiden sich die NH-Bindungen lediglich im H-Anteil)^{65,66}. Das Referenzieren des MIR-Scanners von NH-Schwingungen für medizinische Anwendungen ist nur durch aufwendige Versuchsanordnungen möglich. In der Praxis erwies sich die Erstellung von Kalibrierkurven für beispielsweise Konzentrations- oder Schichtdickenmodelle als nicht zuverlässig. Referenzsubstanzen wie bovine serum albumin (BSA) müssen in anderen Substanzen, wie z. B. Wasser, gebunden werden. Obwohl BSA vorwiegend aus Protein besteht, überlagert die OH-Bande die NH-Bande vollständig und kann daher nicht gemessen werden (siehe Abbildung 27). Auch nach Trocknung der Probe ist der Konzentrations- oder Schichtdickenanteil nicht eindeutig dem Messsignal zuzuordnen. Dies liegt nicht an der entwickelten Messmethode, sondern an der Schwierigkeit, geeignete zuverlässige Versuchsbedingungen zu schaffen. Die medizintechnische Relevanz proteinhaltiger Strukturen ist jedoch sehr hoch einzustufen, da sie in Gewebeschnitten sehr häufig vertreten sind und unter anderem zur Tumordetektion beitragen.^{136,141,142}

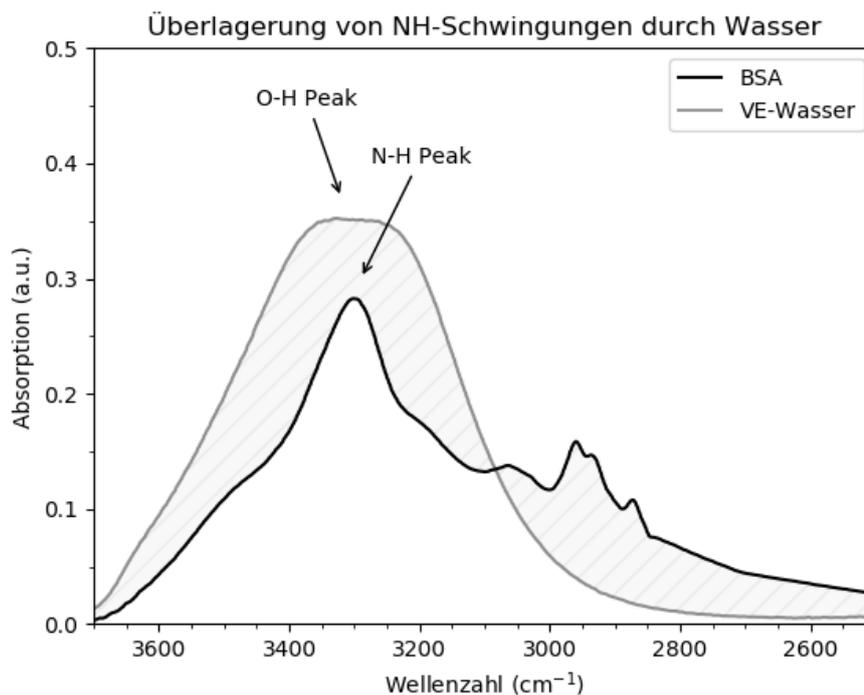


Abbildung 27: IR-Spektren zur Veranschaulichung der überlagerten Peaks. Hier die Überlagerung der NH-Bande (IR-gemessen mit DRIFTS) von BSA (bovine serum albumine) durch die Wasserbande (IR-gemessen mit ATR-Spektroskopie).

3.3.3 Erste Messungen an tierischem Gewebe – Proof of Principle

Erste Scanergebnisse an Gewebeschnitten zeigen, dass sich die entwickelte Messmethode auf Gewebeschnitte übertragen lässt (siehe Abbildung 28). Die Messergebnisse sollen lediglich die Funktionsfähigkeit des Systems auf der Scan- und Verrechnungsebene, als sogenanntes „Proof of Principle“, darstellen. Qualitativ hochwertige Messergebnisse können in diesem Zusammenhang nur mit Hilfe einer H&E-Färbung (= Färbung des frischen Gewebeschnitts, um unterschiedliche morphologische Strukturen sichtbar zu machen) durchgeführt und referenziert werden. Der erste Versuch mit tierischem Material bezieht sich auf die Messbarkeit der weißen (z. B. Corpus colosum) und grauen (z. B. Cortex) Substanz eines Schweinehirns (siehe Abbildung 28). Der im visuellen (VIS) Bild dargestellte Ausschnitt wird jeweils mit dem MIR-Scanner und einem FT-IR-Mikroskop (Perkin Elmer Spotlight 400) vermessen. Die Messdaten des MIR-Scanners beziehen sich auf Messungen mit Laser 1 (2790 cm⁻¹) und Laser 2 (2926 cm⁻¹). Im Vergleich dazu beziehen sich die Messdaten des FT-IR-Mikroskops auf den spektralen Bereich von 4000 cm⁻¹ bis 400 cm⁻¹. Die räumliche Auflösung für

das FT-IR-Mikroskop beträgt $25\ \mu\text{m}$, die des MIR-Scanners $20\ \mu\text{m}$. Die Verrechnung der einzelnen Datensätze erfolgt über eine k-means-Clusteranalyse. Die ausgewerteten Datensätze des FT-IR-Mikroskops beziehen sich auf die Schwingungsbereiche zwischen $4000\ \text{cm}^{-1}$ und $2800\ \text{cm}^{-1}$ (Bereich der funktionellen Gruppen) und den Bereich zwischen $1800\ \text{cm}^{-1}$ und $400\ \text{cm}^{-1}$ (Fingerprint-Bereich). Die ausgewerteten Datensätze des MIR-Scanners beziehen sich hingegen auf die zwei gemessenen Wellenzahlen $2790\ \text{cm}^{-1}$ und $2926\ \text{cm}^{-1}$. Für beide Messverfahren, MIR Scanning und FT-IR Bildgebung, kann für $k=3$ die weiße und graue Hirnsubstanz differenziert werden. Der Abgleich, welche Substanz in den Bildern vorliegt, wurde im Rahmen dieses Testversuchs mit der Literatur ^{143,144} abgeglichen.

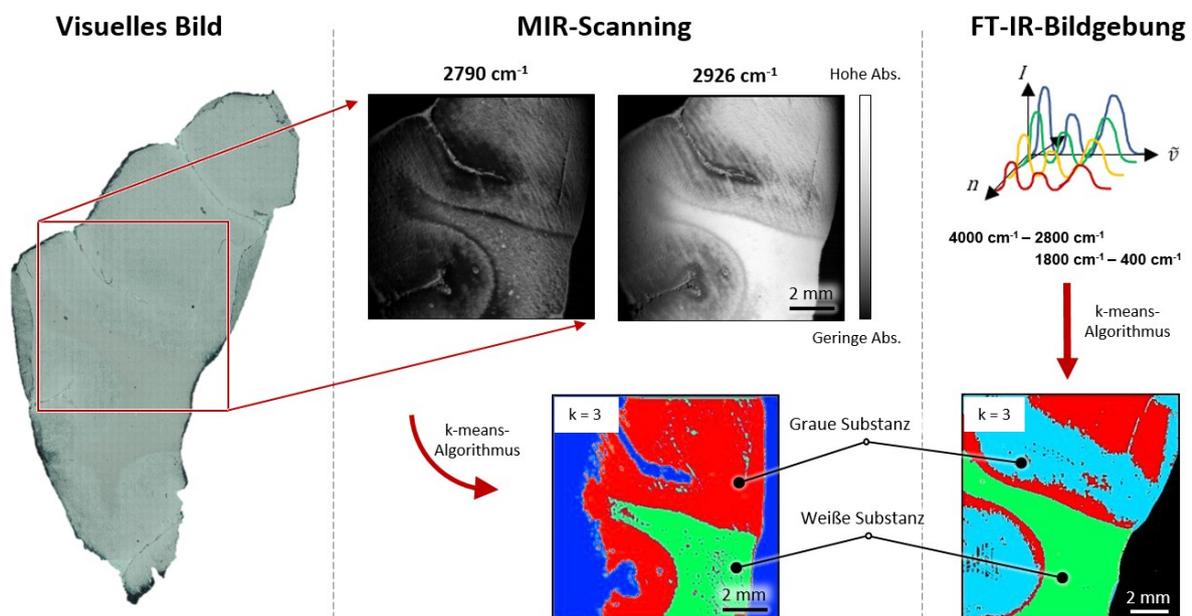


Abbildung 28: Erste Anwendung des MIR-Scanners auf Gewebe (Schweinehirn).

Das Schweinehirn enthält in der untersuchten Hirnregion (Großhirnrinde) große Hirnstrukturen, daher ist das Clustering der Strukturen für beide Messverfahren eindeutiger als für kleinere Strukturen, wie es zum Beispiel im Mäusehirn der Fall sein könnte. In den folgenden Kapiteln wird die Messtechnik am Mausmodell referenziert, um daraus resultierende kleine Strukturen, wie sie zum Beispiel im hippocampalen Bereich vorhanden sind, zu detektieren.

3.4 Anwendung der Messmethode auf murine Gewebeschnitte

Die Übertragung der entwickelten Messtechnik zur schnellen Abbildung (innerhalb von wenigen Sekunden) von biochemischen Substanzen im Schnellschnitt bedarf eines definierten Arbeitsablaufs, um reproduzierbare und vergleichbare Messergebnisse zu erzielen. Auch die Versuchsbedingungen müssen für den Versuchsablauf eindeutig definiert sein. Aus diesem Grund befassen sich die folgenden Unterkapitel mit der Integration des MIR-Scanners in einen bestehenden Arbeitsablauf, auch Workflow genannt, zur spektralen Gewebeanalyse. Hierbei geht es um eine bewusste Integration der entwickelten Messmethode in den Workflow, um zum einen Messergebnisse besser mit einer Referenzmethode vergleichen zu können und zum anderen mit der Messmethode bestehende Arbeitsabläufe zu optimieren.

3.4.1 Referenzmethode

Die spektrale und flächige Referenzvermessung der untersuchten Gewebeproben erfolgt über das FT-IR-Mikroskop *Perkin Elmer Spotlight 400*. Die Gewebeprobe wird in den Messbereich des Mikroskops gelegt. Idealerweise befindet sich der Gewebeschnitt auf einem silberbeschichteten Objektträger, vergleichbar zu Messungen mit dem MIR-Scanner. Die Software (Spectrum, PerkinElmer Inc.) des FT-IR-Mikroskops bietet die Möglichkeit, ein visuelles Übersichtsbild der Probe zu erstellen. Hierbei wird die Probe innerhalb eines definierten Bereichs über mehrere Einzelbilder mikroskopisch erfasst und diese Einzelbilder werden anschließend zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Das Übersichtsbild gibt Aufschluss über die Lage und Größe der Probe. Anhand des Übersichtsbildes wird der Scanbereich für die spektrale Vermessung festgelegt. Die spektrale Vermessung findet dann nur in dem definierten Bereich statt. Damit lassen sich geringere Messzeiten realisieren (z. B. von 2 h auf 45 min) und Datensätze auf nur relevante Bereiche reduzieren. Die Messung mit dem FT-IR-Mikroskop erfolgt im Rahmen dieser Dissertation ausschließlich im Reflexions-Modus.

Die spektrale Auflösung des FT-IR-Mikroskops beträgt für die folgenden Untersuchungen 8 cm^{-1} . Der spektrale Messbereich reicht von 4000 cm^{-1} bis 750 cm^{-1} . Die verwendete Pixelgröße (räumliche Auflösung) beträgt $25\text{ }\mu\text{m}$. Pro Messpunkt erfolgt eine zweifache Mittelung. Die Geschwindigkeit des Probenstischs ist dabei auf 2 cm/s

gesetzt und wird Punkt für Punkt abgerastert. Vor dem Scanprozess erfolgt eine Referenzmessung außerhalb der Probe auf dem Objektträger. Die Referenzmessung wird dabei automatisiert vom Messsignal abgezogen. Die Kühlung des Detektors erfolgt mit flüssigem Stickstoff. Der damit zusammenhängende Kühlprozess startet ca. 30 min vor Messbeginn.

Die Gleichwertigkeit dieser Referenzmethode zum entwickelten MIR-Scanner wird in Kapitel 3.5.2 am Mausmodel näher beleuchtet.

3.4.2 Workflow

Zur Untersuchung von Schnellschnitten werden zwei Folgeschnitte der jeweiligen Gewebeprobe angefertigt. Der erste Schnitt wird für die spektrale Messung durch FT-IR-Bildgebung mit anschließendem MIR-Scanning verwendet, wie in Abbildung 29 dargestellt. Zur kontrastreichen visuellen Darstellung der morphologischen Strukturen im Gewebeschnitt dient der zweite (Folge-) Schnitt, welcher über H&E-Färbung eingefärbt wird. Vor der spektralen Vermessung ist eine Trocknung der Probe im Exsikkator für 10 min erforderlich, um die Überlagerung der OH-Schwingung von Wasser im Gewebeschnitt mit der CH- und NH-Valenzschwingung zu vermeiden. Eine zuverlässige und reproduzierbare Messung der CH- und NH-Banden im Bereich der funktionellen Gruppen ist ohne den Trocknungsprozess nicht möglich. Die anschließende FT-IR-Bildgebung erfasst vollständige Spektren im Bereich von 4000 cm^{-1} bis 750 cm^{-1} und wird als Referenzsystem zu Messungen mit dem MIR-Scanner verwendet. Im Vergleich dazu beruhen Messungen mit dem MIR-Scanner auf den Emissionswellenlängen der Laser 1 bis 4. In den nachfolgenden flächigen Messungen wird deshalb immer ein Vergleich zwischen der etablierten FT-IR-Bildgebung^{30,136} und der hier entwickelten und neuartigen MIR-Messmethode angestrebt. Das Preprocessing der Infrarot-Datensätze beider Messtechniken setzt sich aus Algorithmen wie locally adaptive total variation regularization¹⁴⁵ zur Rauschunterdrückung (der erfassten Daten) oder einer Normalisierung zusammen. Dies ist eine notwendige Maßnahme, um die Datensätze für das Clustering vorzubereiten und damit bestmögliche Ergebnisse zu erlangen. Das Grundrauschen der Spektren wird damit beispielsweise annähernd eliminiert. Für jede Scanning-Methode werden die aufbereiteten Messdaten anschließend mittels k-means-

Algorithmus in sinnvolle und zusammenhängende Datenpakete sortiert. Die Datenpakete lassen sich anschließend mit zusammenhängenden Strukturen im Gewebeschnitt in Verbindung bringen. Zusätzlich können weitere ergänzende Analyseverfahren nachgeschaltet werden, wie beispielsweise MALDI MSI.³⁰

Basierend auf dem H&E-Bild ist die Referenzierung der geclusterten FT-IR- und MIR-Datensätze möglich. Zusätzlich werden H&E-Schnitte verwendet, um zu evaluieren, welche Strukturen mit der jeweiligen Scanmethode besser visualisierbar sind. Die gestrichelte Linie in Abbildung 29 deutet an, dass zukünftig der MIR-Scanner vollständig in den Workflow integriert werden kann und die FT-IR-Bildgebung teilweise (je nach Anwendung) ersetzt.

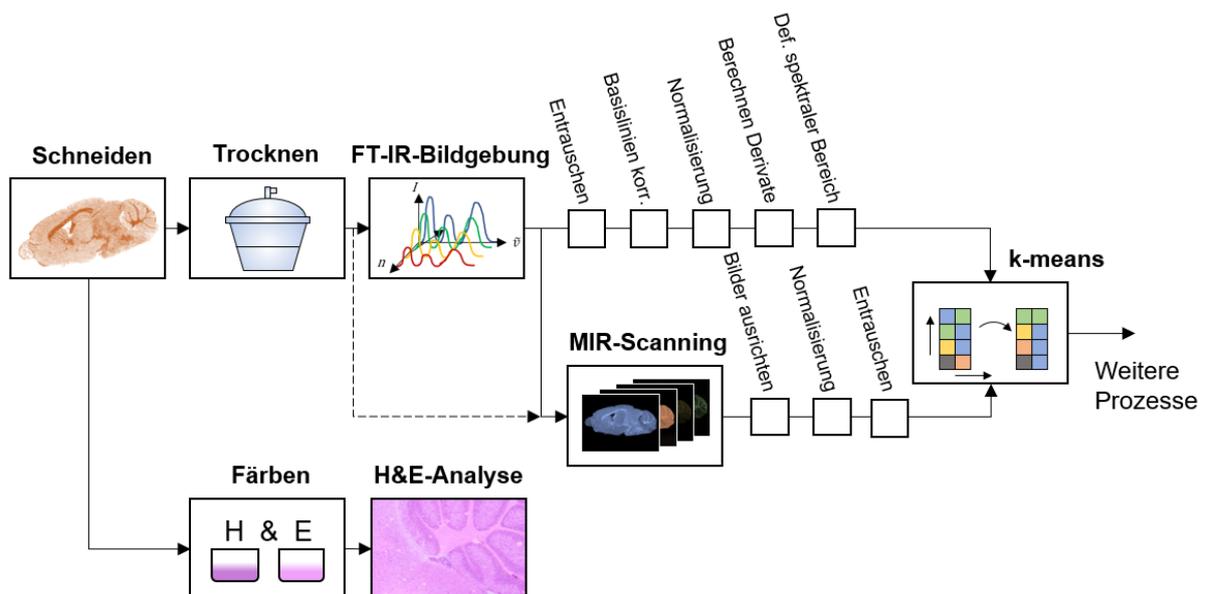


Abbildung 29: Schematischer experimenteller Workflow zum Vergleich von FT-IR-Bildgebung und MIR-Scanning¹⁴⁶. Es werden zwei Folgeschnitte erstellt. Ein Gewebeschnitt dient zur spektralen Vermessung durch FT-IR-Bildgebung mit anschließendem MIR-Scanning. Das anschließende Preprocessing der erlangten Daten lässt sich über k-means in zusammenhängende Datenpakete clustern und visualisieren. Der zweite Gewebeschnitt dient zur Referenzierung morphologischer Strukturen und wird H&E-gefärbt.

3.4.3 Probenvorbereitung, Trocknung von Gewebeschnitten und H&E-Färbung

Probenvorbereitung

Die Gewebeproben werden mit einem *CM1950* Kryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Vor und nach dem Schneiden der Gewebeprobe ist das Organ bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert, zum Transport zwischen Probenentnahme und Lagerung wurde das tierische Material mit Trockeneis bei -80 °C in einer geeigneten Transportbox transportiert. Nach dem Schneiden der Gewebeproben werden die Schnitte auf *Mirr-IR*-Objektträger (Kevley Technologies, Ohio) gelegt und schonend aufgetaut. Folgeschnitte, die für die H&E-Färbung vorgesehen sind, werden auf *SuperFrost Plus*-Objektträger (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) platziert und aufgetaut. Anschließend ist ein Trocknungsprozess mit den Proben, die mit FT-IR-Bildgebung vermessen werden sollen, erforderlich. Dies erfolgt bei geringem Unterdruck für 10 min im Exsikkator.

Trocknung von Gewebeschnitten

Für Proben, die mit dem MIR-Scanner vermessen werden, ist eine Trocknungsphase von wenigen Sekunden ausreichend (Abbildung 30 a)). In Abbildung 30 sind zwei unterschiedliche Trocknungsmethoden (Abbildung 30 a) und b), ohne und mit Exsikkator) dargestellt. Die Ermittlung der gemessenen Absorption erfolgt mit dem MIR-Scanner. Die Probenhalterung am MIR-Scanner besteht aus Aluminium und erwärmt den Objektträger bzw. Gewebeschnitt innerhalb von 1,5 min auf Zimmertemperatur (hier 22 °C), sodass die Feuchte auf dem Objektträger und im Gewebeschnitt fast vollständig verdunstet ist. Das Wasser auf dem Objektträger ist überwiegend die Folge von Tauwasser nach dem Auftauen von ca. -20 °C Schneidetemperatur auf ca. 22 °C Raumtemperatur. Im MIR-Scanner beschleunigt die Aluminiumhalterung des Objektträgers den Tau- und Verdunstungsprozess erheblich, da sie dem Objektträger in wenigen Sekunden ausreichend Energie zuführt. Im Gegensatz dazu benötigt die Trocknung im Exsikkator (mit Silica Gel und geringem Unterdruck) ca. 15 min bis zur vollständigen Trocknung des Gewebeschnitts. Die Restfeuchte wird hierbei durch die Absorption von Laser 3 (3350 cm^{-1} / 2985 nm) ermittelt. Für jede Messung wurde dabei ein neuer Objektträger mit darauf befindlichem Gewebeschnitt aufgetaut und vermessen. Die Laserwellenlänge befindet sich direkt auf der OH-Schwingungsbande und ist

damit direkter Indikator für Änderungen des Wasseranteils im Gewebe. Ändert sich der Absorptionswert von Laser 3 mit steigender Messzeit nicht mehr, so wird davon ausgegangen, dass die Probe einen so geringen Wasseranteil hat, dass eine zuverlässige IR-Messung möglich ist.

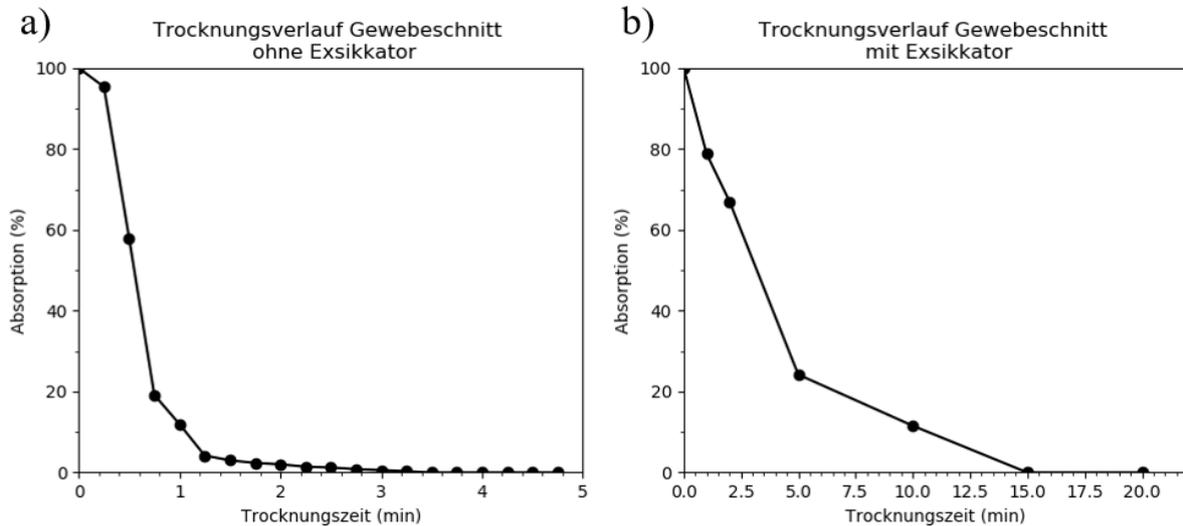


Abbildung 30: Trocknungsverlauf von Gewebeschnitten (Dicke 10 µm auf Mirr-IR-Objektträger) mit und ohne Exsikkator. Die Messkurven sind mit dem MIR-Scanner erstellt.

H&E-Färbung

Der Gewebeschnitt wird für ~ 2 min in ein Hämatoxylin-Bad getaucht. Anschließend erfolgt das Waschen in Leitungswasser für ~3 min, ein kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser und ein weiteres Bad in *acidic alcohol* für ~ 1 min. Es folgt ein dreimaliges kurzes Eintauchen der Probe in dest. Wasser und ein Bad aus *blueing solution* für ~ 2 min. Anschließend wird die *blueing solution* durch dreimaliges Eintauchen in dest. Wasser entfernt.

Nach einem ~ 2 min Eosin-Bad (0,5 % wässrig) wird das Eosin mit dest. Wasser für ~ 1 min gewaschen. Ein gründliches Säubern der Proben erfolgt in 80 %- und 90 %ig Ethanol für jeweils ~ 2 min. Anschließend erfahren die Gewebeschnitte zwei Bäder aus 100 % Ethanol für jeweils ~ 1 min. Abschließend werden die Proben ~ 2 min in Xylol zur Reinigung letzter Rückstände eingelegt. Mit *Eukitt* (Sigma Aldrich GmbH, Deutschland) lassen sich die Proben nach dem Färbungsprozess mit einem Deckglas konservieren.

3.4.4 Preprocessing und k-means

Das Preprocessing der erlangten Messdaten dient zur Vorbereitung der einzelnen Datensätze für Clusteranalysen, hier speziell für die Anwendung des k-means-Algorithmus. Die Scanbilder des MIR-Scanners müssen vor Weiterverarbeitung aufeinander ausgerichtet werden. Durch die unterschiedlichen Laserwellenlängen kann es zu geringen Abweichungen von Pixel zu Pixel kommen. Über das automatisierte Ausrichten der Bilder ist gewährleistet, dass die Messposition in allen Bildern die Gleiche ist. Zusätzlich erfolgt eine Threshold-Anpassung (Schwellenwert für die Pixelinformation) für die Hervorhebung von geringen Messsignalen. Der Threshold liegt standardisiert auf sieben Counts und unterdrückt zusätzlich Fehlstellen auf dem Objektträger, die durch minimalste Kratzer oder geringe Unreinheiten hervorgerufen werden. Anschließend folgt ein Denoising (Locally Adaptive Total Variation Regularization ¹⁴⁵). Die Anwendung des k-means-Algorithmus dient zur Segmentierung einzelner Gewebestrukturen anhand der erlangten Datensätze von MIR- und FT-IR-Scanning. Die ersten beiden k-Werte können grundsätzlich nicht für die Auswertung verwendet werden, da sich diese auf den Hintergrund (Objektträger) beziehen. In den folgenden Angaben der k-Werte sind immer nur die Clusterungen, welche sich auf den Gewebeschnitt beziehen, angegeben.

Die Datensätze des FT-IR-Mikroskops werden, vergleichbar zum MIR-Scanner, einem Denoising und einer Normalisierung unterzogen. Eine anschließende Eingrenzung des spektralen Bereichs zur Auswertung reduziert den Rechenaufwand und klammert Spektralbereiche, die keine zielführende Information beinhalten, aus. Das Clustering bezieht sich dann nur auf die vordefinierten spektralen Bereiche. Standardisiert ist der Spektralbereich der funktionellen Gruppen und der Fingerprint-Bereich festgelegt. Auf diese Bereiche beziehen sich auch die nachfolgenden Clusteranalysen und Segmentierungen.

Das Preprocessing der Messdaten des MIR-Scanners ist über eine speziell entwickelte Software in *Python* (<https://www.python.org/>) realisiert. In *MATLAB* (The MathWorks Inc., USA) ist das vollständige Preprocessing für die Datensätze der gemessenen FT-IR-Daten und das allgemeine k-means-Clustering bzw. die Segmentierung integriert und ist Teil des schon bestehenden Workflows. ³⁰

3.5 Segmentierung von definierten Gehirnstrukturen eines Mausmodells

In Kombination des aufgezeigten Workflows und den damit zusammenhängenden Voraussetzungen zum spektralen Vermessen von Schnellschnitten ist die Untersuchung von murinen Gewebeschnitten Teil dieses Kapitels. Neben der Segmentierung von speziellen Gewebestrukturen im Mäusehirn (Corpus colosum, Cortex sowie der Hippocampus) ist auch der Nachweis von der Messbarkeit einzelner Strukturen und die Vergleichbarkeit zwischen MIR-Scanner und der etablierten Referenzmethode (FT-IR Mikroskop) wesentlicher Bestandteil der folgenden Abschnitte.

3.5.1 Tiermodell

Bei dem hier verwendeten Tiermodell handelt es sich um eine Maus des Typs C57BL/6N aus dem Universitätsklinikum Mannheim (UMM). Die Haltung und Tötung des Tiers wurde durch den institutionellen Tierschutzbeauftragten in Übereinstimmung mit den Richtlinien des *National Instituts of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* beaufsichtigt. Die Tierversuche wurden behördlich genehmigt (Regierungspräsidium Karlsruhe, Deutschland, Genehmigungsnummer: I-20/08)

3.5.2 Segmentierung des murinen hippocampalen Hirnbereichs

Dieser Versuch erfordert nicht alle im MIR-Scanner verfügbaren Laserwellenlängen. Dies zeigt eine genauere Betrachtung von IR-Spektren, die am und um den Hippocampus punktuell durchgeführt werden.

Spektrale Untersuchung definierter Hirnstrukturen im Mäusehirn

Abbildung 31 a) zeigt die Absorptionseigenschaften ausgewählter Strukturbereiche des Mäusegehirns. Die Daten sind mit dem FT-IR-Mikroskop als spektrale Punktmesung aufgenommen und beziehen sich auf die graue (Cortex) und weiße (Corpus colosum) Substanz ¹⁴⁷ sowie den Hippocampus (Abbildung 31 b)). Hier steht die Betrachtung der CA3-Region ¹⁴⁸ exemplarisch für den Hippocampus im Vordergrund. Bei der spektralen Betrachtung unterscheiden sich die spektralen Informationen von Laser 1 und Laser 4 bis auf einen Offset nur sehr geringfügig. In diesem speziellen Fall ist es nicht zwingend erforderlich, beide Referenzlaser zu verwenden, da keine zusätzliche

Absorptionsinformation mit dem weiteren Laser zu gewinnen ist. Daher werden die folgenden Messungen am Mäusehirn mit dem MIR-Scanner nur mit drei Wellenlängen (Laser 1, 2 und 3) durchgeführt. Laser 2 und Laser 3 unterscheiden sich signifikant zum jeweiligen Absorptionsbereich. Dies deutet darauf hin, dass sich der Protein- und Lipidgehalt für die vermessenen Strukturen deutlich ändert. Obwohl Laser 3 nicht exakt auf der Schwingungsbande von Proteinen (N-H) liegt, ist der Absorptionsunterschied ausreichend, um die einzelnen Strukturbereiche deutlich voneinander zu differenzieren.

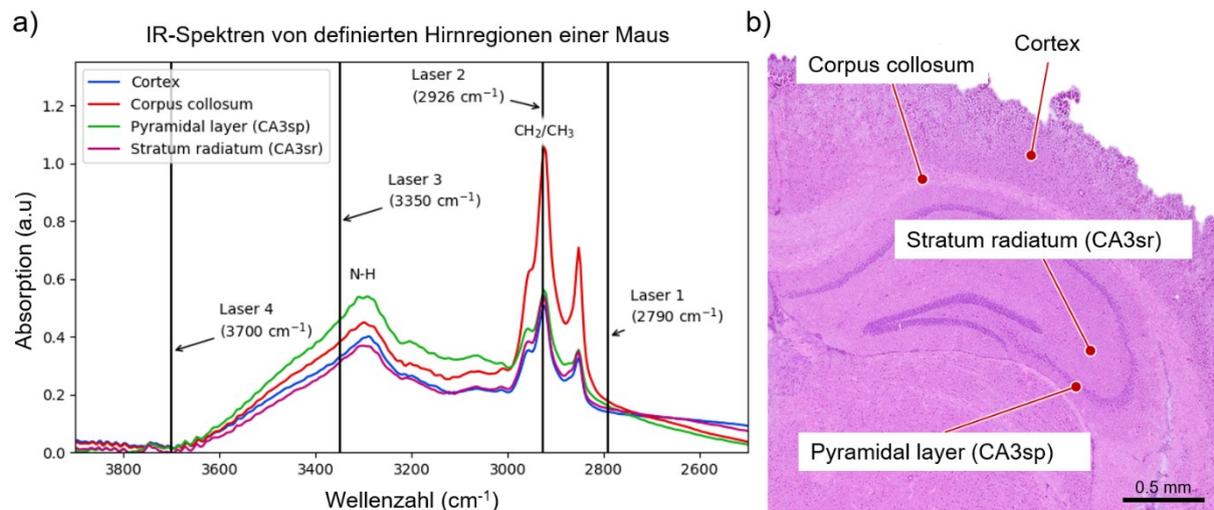


Abbildung 31: IR-Referenzmessungen von charakteristischen Strukturen des Mäusegehirns. a) IR-Spektren der grauen (Cortex) und weißen (Corpus collosum) Substanz sowie der CA3-Region eines coronal geschnittenen Mäusehirns des Mäusetyps C57BL/6. Die Erstellung der Spektren erfolgt mit dem FT-IR-Mikroskop und dient zum Referenzieren der einzustellenden Laserkombination am MIR-Scanner. b) Lage der Messpunkte im Mäusehirn, dargestellt im H&E-eingefärbten Schnellschnitt.

Vergleichbarkeit von FT-IR-Bildgebung und MIR-Scanning am Beispiel muriner Hirnschnitte

Die mit dem MIR-Scanner und dem FT-IR-Mikroskop erfassten spektralen Informationen können auf der Grundlage der „Berechnung der Ähnlichkeit“ (engl.: similarity calculation) verglichen werden. Die Berechnung beinhaltet einen Vergleich zwischen den selben Wellenzahlen für beide Messverfahren (2790 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} und 3350 cm^{-1}). Diese werden für den Vergleich in Abbildung 32 auf einen relevanten Messbereich (Region of Interest, ROI) begrenzt. Ein optischer Vergleich der untersuchten Bildbereiche ist in Abbildung 32 ROI MIR und ROI FT-IR dargestellt. Die sogenannte *similarity*

calculation zeigt, dass die ausgewählten Wellenzahlen der beiden Messverfahren vergleichbar sind. Die Daten beider Verfahren lassen sich überlagern und anschließend über den strukturellen Ähnlichkeitsindex ¹⁴⁹ softwaretechnisch miteinander vergleichen. Der Index setzt sich aus der Berechnung des mittleren quadratischen Fehlers (MSE) ¹⁵⁰ zusammen. Die Ähnlichkeit zwischen den Datensätzen beträgt ~ 75 %. Die Betrachtung des hervorgehobenen Bereichs ROI MIR und ROI FT-IR zeigt auch visuell, dass die strukturelle Abweichung zwischen den Messbildern gering ist (vergleiche Abbildung 32). Der Intensitätsunterschied zwischen den Messsignalen ist dagegen signifikant unterschiedlich und beeinflusst den Ähnlichkeitsindex negativ. Dieser Unterschied zwischen den Messsignalen ist technisch bedingt und muss beim Vergleich der beiden Messtechniken berücksichtigt werden. Dennoch ist die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Messmethoden gegeben und ein weiterer Vergleich hinsichtlich der Clusteranalysen am Gewebeschnitt angebracht.

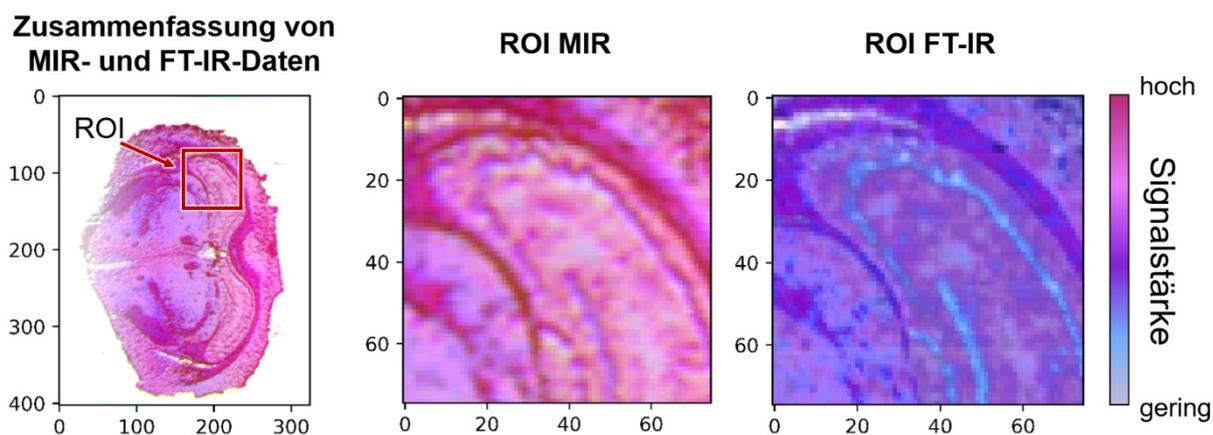


Abbildung 32: Gegenüberstellung und Vergleich zwischen den spektralen Informationen, die über den MIR-Scanner und das FT-IR Mikroskop erfasst werden. Die Datensätze des MIR-Scanners (ROI MIR) beinhalten eine wesentlich höhere Signalintensität, und damit ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis, als die Daten des FT-IR Mikroskops (ROI FT-IR).

Clusteranalyse am Mäusehirn

In Abbildung 33 a) sind die Scanergebnisse des MIR-Scanners für ein coronal geschnittenes Mäusehirn (Dicke 10 μm , auf einem silberbeschichteten Objektträger) gegenübergestellt. Jedes Scanbild besteht aus 250 000 Messpunkten, die innerhalb von ~ 3 s aufgenommen wurden (inkl. Oversampling). Die graue (Cortex und CA3-Region) und weiße Substanz (Corpus collosum) sind für alle drei Wellenzahlen sichtbar.

Die weiße Substanz besitzt ein Absorptionsmaximum bei der Wellenzahl 2926 cm^{-1} im Bereich der funktionellen Gruppen¹⁵¹. Dies ist auf die erhöhte CH_2 bzw. CH_3 -Schwingungen der weißen Substanz im Vergleich zur grauen Substanz zurückzuführen¹⁵². Die Schwingungsbande von NH-Molekülen, insbesondere die Schwingungsbande der sekundären Amine um 3350 cm^{-1} , ist im Gewebeschnitt ebenfalls nachweisbar^{136,153,154}. Bei einigen Gehirnstrukturen sind im Gewebeschnitt signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen bei den Wellenzahlen 2926 cm^{-1} und 3350 cm^{-1} zu erkennen. Insbesondere der Hippocampus zeigt aufgrund seiner molekularen Zusammensetzung deutliche Unterschiede in den Schwingungseigenschaften von Lipiden und Aminen^{136,154,155}. Dies spiegelt sich auch in den Messergebnissen des MIR-Scanners (vgl. Abbildung 33 a)) wider. Für die Laser 1 bzw. die Wellenzahl 2790 cm^{-1} wird der Bereich des Hippocampus auf einem niedrigen Absorptionsniveau detektiert und stellt somit eine annähernd ideale Referenz mit Informationen über die Streueigenschaften des Gewebes dar. Trotz der begrenzten spektralen Informationen des MIR-Scanners kann ein Clustering mit Hilfe eines k-means-Algorithmus durchgeführt werden. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf der Erzielung sehr ähnlicher Clustering-Ergebnisse mit den beiden Datensätzen (des MIR-Scanners und des FT-IR-Mikroskops). Für beide Messmethoden werden die Strukturen im Mäusegehirn geclustert (Abbildung 33 b) und c)). Der direkte Vergleich zwischen den beiden Messergebnissen zeigt, dass die wesentlichen Strukturen wie die graue und weiße Substanz für beide Datensätze (MIR und FT-IR) vergleichbar geclustert werden.

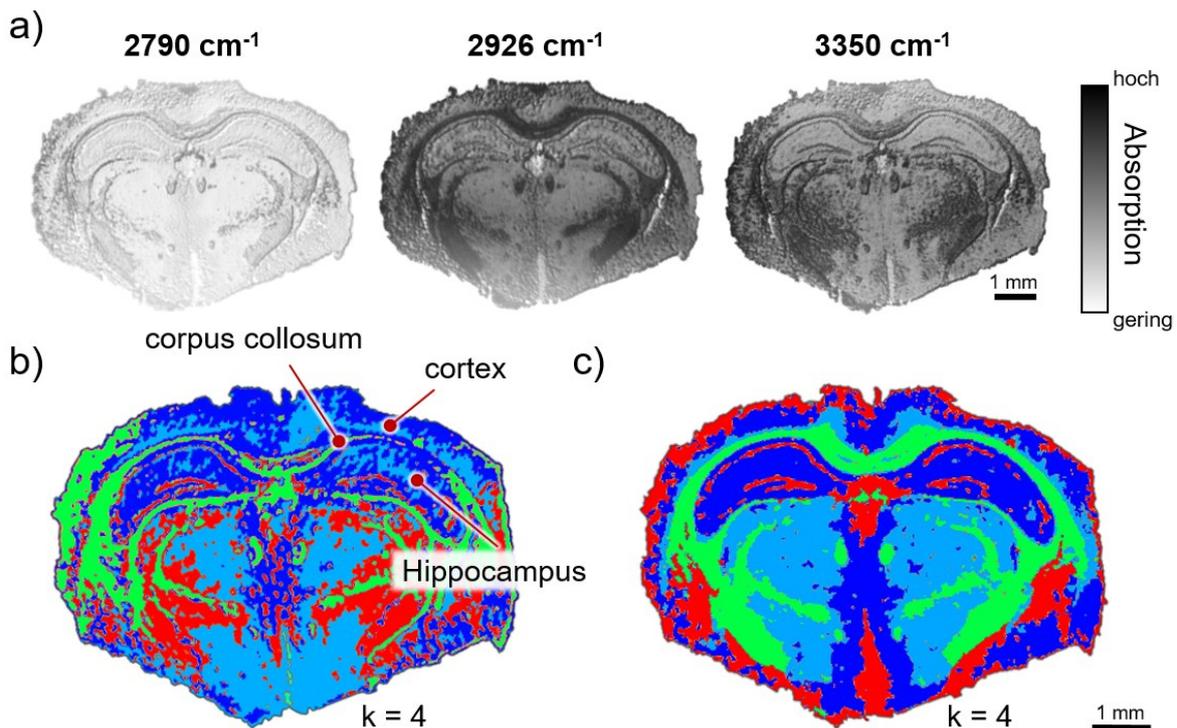


Abbildung 33: Clusteranalyse am Mäusehirn in der coronalen Ebene. a) Die Scanergebnisse des MIR-Scanners. b) Clusteranalyse mittels k-means an spektralen Daten des MIR-Scanners. c) Clusteranalyse an spektralen Daten des FT-IR Mikroskops.

Für die Clusterung der Spektraldaten bestehen die Datensätze des MIR-Scanners aus drei Wellenzahlen pro Pixel. Im Vergleich dazu umfasst der Datensatz mit spektralen Informationen des FT-IR-Mikroskops über hundert Wellenzahlen pro Pixel. Aufgrund der größeren Informationsmenge für das Clustering führt dies teilweise zu schärferen Strukturkanten und homogeneren Cluster-Bereichen. Darüber hinaus sind einige Bereiche des Gehirns deutlicher und zusammenhängender erkennbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich ein erheblicher spektraler Anteil der FT-IR-Daten im Finger-
printbereich befindet und mit in das Clustering einbezogen wird. Trotz der geringeren spektralen Information für die Datensätze des MIR-Scanners werden dennoch eindeutige Strukturen, wie z. B. der Corpus collosum, der Cortex und die gesamte Hippocampus-Region geclustert (vgl. Abbildung 33 b)). Auch Teile des Thalamus und Hypothalamus werden ansatzweise durch das Clustering visualisiert. Die Segmentierung des Hippocampus erfolgt mit den Daten des MIR-Scanners für den k-Wert k=4. Für die

Messdaten des FT-IR-Mikroskops erfolgt das Clustering ebenfalls für $k=4$. In den resultierenden Abbildungen (Abbildung 33 a) und b)) ist jedes Cluster bzw. jedes k durch eine eigene Farbe dargestellt.

Die Gegenüberstellung zum etablierten Allen Brain Mouse Atlas ^{156,157} zeigt, dass die Region des Hippocampus für die Daten des MIR-Scanners besonders gut zu segmentieren ist. Die resultierende Segmentierung in Abbildung 34 stellt den Hippocampus als eine annähernd vollständig zusammenhängende Struktur dar. Die zugehörige H&E-Färbung der Probe bestätigt die Cluster-Ergebnisse für die Daten des MIR-Scanners aus pathologischer Sicht.

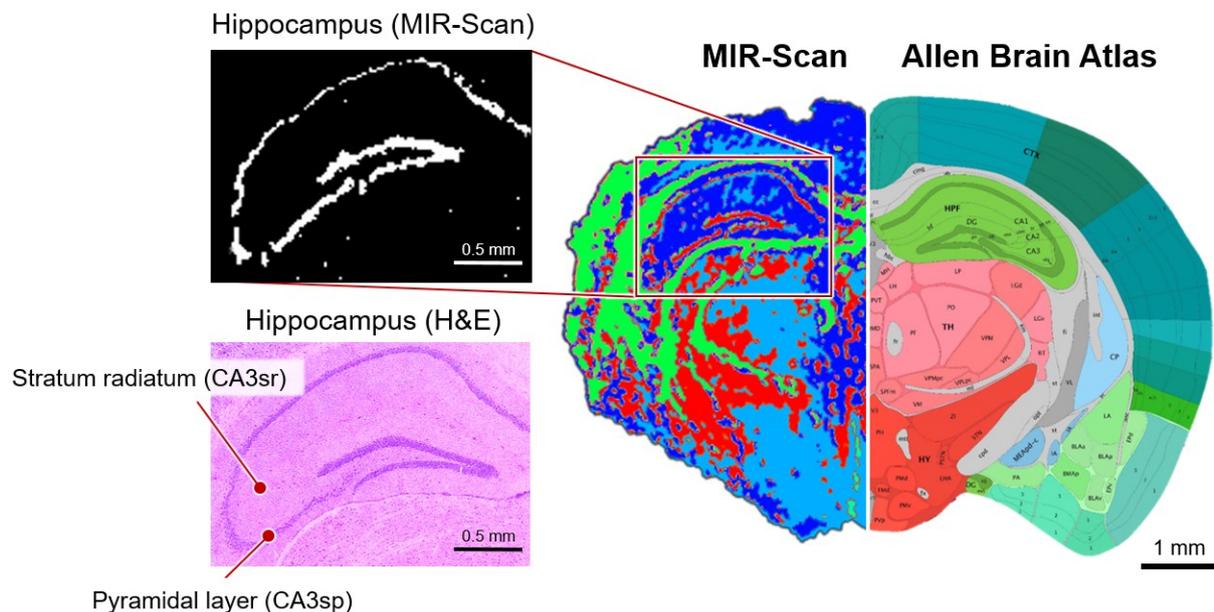


Abbildung 34: H&E-Färbung der Hippocampus-Region im Vergleich zum k-means Clustering der Daten des MIR-Scanners und in Bezug auf den Allen Brain Atlas für Mäusegehirn (Bildnachweis für „Allen Brain Atlas“: Allen Institut, 2021) ^{156,157}. Die Hippocampus-Region ist als zusammenhängende Struktur deutlich segmentiert.

3.6 Detektion eines primären hepatozellulären Karzinoms

Basierend auf der erfolgreichen Segmentierung von definierten und spezifischen Strukturen im Mäusegehirn ist der nächste Validierungsschritt für den MIR-Scanner die Untersuchung von nicht eindeutig definierten Gewebestrukturen. Die Untersuchung eines spontanen primären hepatozellulären Karzinoms (HCC) im Mausmodell

bietet hierfür geeignete Bedingungen, da dieses in der Regel inhomogene und infiltrierende Gewebestrukturen aufweist ¹⁵⁸.

3.6.1 Tiermodell mit Karzinom

Die in diesem Kapitel untersuchte tierische Probe wird vom Universitätsklinikum Mannheim (UMM) bereitgestellt. Die durchgeführten Tierversuche sind vom jeweiligen institutionellen Tierschutzbeauftragten des UMM in Übereinstimmung mit den Richtlinien des *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* abgestimmt und überwacht. Die Tierversuche wurden im Vorfeld behördlich genehmigt (Regierungspräsidium Karlsruhe, Genehmigungsnummer: G172/15 für den Mausstamm BALB/c-abcb4-/-). Der Mausstamm BALB/c-abcb4-/- ¹⁵⁹ wird zur Untersuchung von primär infiltrierendem Lebertumorgewebe verwendet. Dies transportiert eine homozygote Deletion des Gens, welches den Medikamententransporter ABCB4 kodiert. Dieser Mausstamm entwickelt spontane Leberfibrosen, die homolog zum Phänotyp der sklerosierenden Cholangitis sind. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC), ein primäres Malignom, welches von der Leber ausgeht, entwickelt sich oft spontan bis zum 9. bis 12. Lebensmonat. Die Leberentnahme wurde bei einer 548 Tage alten männlichen Maus des beschriebenen Stammes durchgeführt. Ein Teil des linken Leberlappens wurde sofort unter Verwendung von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Tieftemperatur-Kühlschrank, einem sogenannten Freezer, bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Versuchsdurchführung am gesunden murinen Leberschnitt

Zu Beginn dieser Untersuchung muss sichergestellt werden, dass die verwendeten Scansysteme eine äquivalente Erkennung von gesunder Mäuseleber (Maustyp C57BL/6 aus Kapitel 3.5.1; H&E-Färbung siehe Abbildung 36 a)) bieten und das resultierende Clustering mit k-means für beide Messmethoden vergleichbare Ergebnisse liefert. Der H&E-gefärbte Schnitt aus Abbildung 36 a) zeigt die Lage der in Abbildung 36 b) durchgeführten Messung auf der Probe. Der H&E-Schnitt ist hierbei der Folgeschnitt von der spektral vermessenen Probe. Zusätzlich zeigt ein vergrößerter Schnitt (Abbildung 36 b)) die morphologische Struktur der gesunden Leber. Diese kann im

Zusammenhang mit der spektralen Vermessung maligner Gewebebereiche als morphologische Referenzstruktur angesehen werden und steht im Vergleich zu Kapitel 3.6.3.

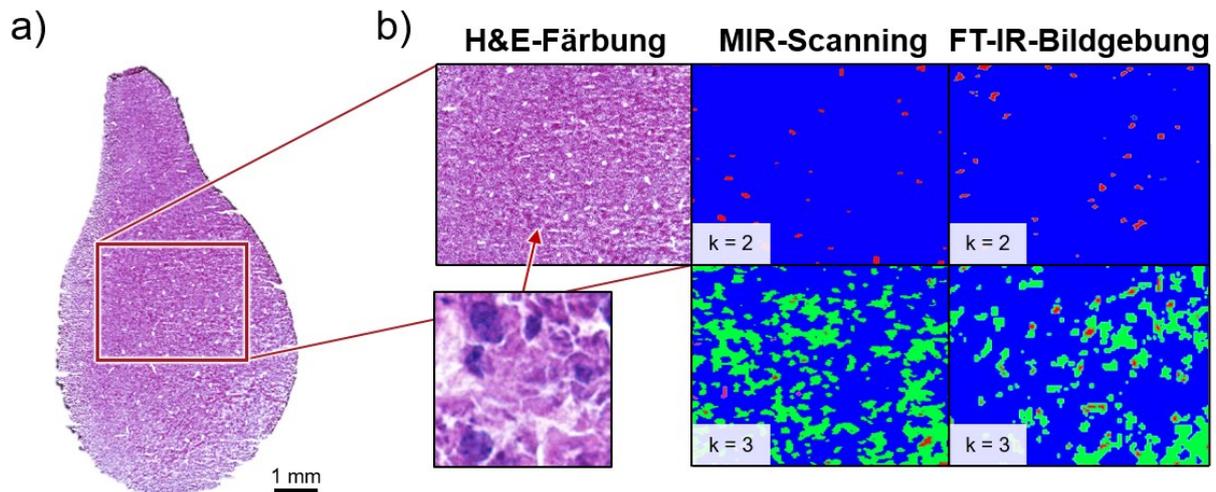


Abbildung 35: Untersuchung einer gesunden Leber mit dem MIR-Scanner. a) H&E-Färbung der Probe mit eingezeichnetem Messbereich des MIR-Scanners bzw. FT-IR Mikroskops. b) Vergrößerter Ausschnitt der H&E-Färbung im vermessenen Bereich mit zusätzlichen Clusterergebnissen für den MIR-Scanner und FT-IR-Mikroskop.

Dieses Experiment wird mit allen vier Wellenlängen des MIR-Scanners durchgeführt. Die annähernd homogene Struktur einer gesunden Mäuseleber wird für beide Messsysteme, den MIR-Scanner und das FT-IR-Mikroskop, vergleichbar erkannt. In Abbildung 36 b) sind neben dem H&E-gefärbten Gewebeschnitt die geclusterten Scannergebnisse von MIR-Scanner und FT-IR-Mikroskop dargestellt. Der Datensatz des MIR-Scanners besteht dabei für jede verwendete Laserwellenlänge aus 375 000 Messpunkten, die jeweils innerhalb von ~ 4,5 s erfasst werden. Im Vergleich dazu benötigt das FT-IR-Mikroskop ~ 45 min zur vollständigen spektralen Erfassung desselben Bildausschnitts. In diesem Fall wird der gesamte Gewebeschnitt (Größe vgl. Abbildung 36 a)) für beide Messmethoden spektral erfasst und geclustert. Anschließend werden die geclusterten Messdaten mit dem H&E-Bild überlagert. Der Bildausschnitt für beide Datensätze lässt sich damit für alle Messbilder identisch ausrichten und zuschneiden.

Grundsätzlich hat der k-means Algorithmus eine gewisse Varianz in der Reproduzierbarkeit, sodass die Messergebnisse zwischen MIR- und FT-IR-Scan nicht Pixel für Pixel identisch sind. Ein Vergleich von Pixel zu Pixel ist daher nur bedingt möglich und nur für eindeutige (große; > 20 μm) Strukturen sinnvoll. Dennoch zeigen die beiden

Methoden ein ähnliches Cluster-Muster für $k=2$ innerhalb des gesunden und homogenen Lebergewebes auf. Für $k=3$ werden ebenfalls ähnliche Segmentierungsergebnisse erzielt, die sich jedoch in Größe und Lage voneinander unterscheiden. Dies unterstreicht die Varianz des Algorithmus für annähernd homogene Strukturen und verdeutlicht, dass eine geringe räumliche Scanauflösung (bspw. $> 10 \mu\text{m}$) zu geringen Strukturinformationen führt. Dies wirkt sich direkt auf das Ergebnis der Segmentierung aus und stellt vor allem für annähernd homogene Gewebeausschnitte eine Herausforderung dar.

3.6.3 Untersuchung eines hepatozellulären Karzinoms mit dem MIR-Scanner

Die Untersuchung des HCC (hepatozellulärer Karzinom) wird an einer Probe vom Maustyp BALB/c-Abcb4^{-/-} (siehe Kapitel 3.6.1) durchgeführt. Durch visuelle Beurteilung des gesamten erkrankten Leberorgans konnte ein Tumorknötchen von ca. 3 mm am linken Leberlappen beobachtet werden. Die Probe wurde so gewählt, dass sie einen Übergang vom Knoten zum umliegenden vermeintlich gesunden Gewebe aufweist und beide Gewebeteile in einem Gewebeschnitt enthalten sind. Auf diese Weise ist die Erkennung von Tumorrändern eines infiltrierten Tumors topographisch möglich. Darüber hinaus bietet dies einen direkten Vergleich zwischen Tumorknoten und der umliegenden Geweberegion. Die spektrale Erfassung mittels MIR-Scanner erfolgt für jede der vier verwendeten Wellenlängen in ~ 3 s und resultiert für jede Wellenlänge in 250 000 Messpunkten. Für die Clusterung $k=2$ zeigen die entsprechenden Messergebnisse (siehe Abbildung 36) des MIR-Scanners eine deutliche Differenzierung zwischen gesundem und krankem Gewebe. Mit höheren k -Werten lässt sich ein Übergangsbereich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe erkennen. Im Vergleich dazu weisen die Messergebnisse für das FT-IR-Mikroskop ähnliche Cluster auf. Allerdings sind die Tumorränder für die Clusterung bei den beiden Scanverfahren etwas unterschiedlich. Dieser Unterschied kann durch die unterschiedliche Trocknung von Blut innerhalb der Leber entstehen. Blutgefäße in der Leber verändern sich mit zunehmender Trocknungszeit in ihren spektralen Eigenschaften. Dies ist hauptsächlich auf die NH-Schwingungsbande zurückzuführen¹⁶⁰. Die Zeit zwischen FT-IR- und MIR-Messung beträgt etwa 2 Stunden (Messzeit vom FT-IR-Mikroskop inkl. Transport bis zum MIR-Scanner). Somit ändert sich auch das Messergebnis für dieses Organ. In den beiden Messbildern (MIR-Scanning und FT-IR-Bildgebung, vgl. Abbildung 36) ist

zudem die infiltrierende Eigenschaft des Tumors durch den heterogenen Tumorrand deutlich erkennbar.

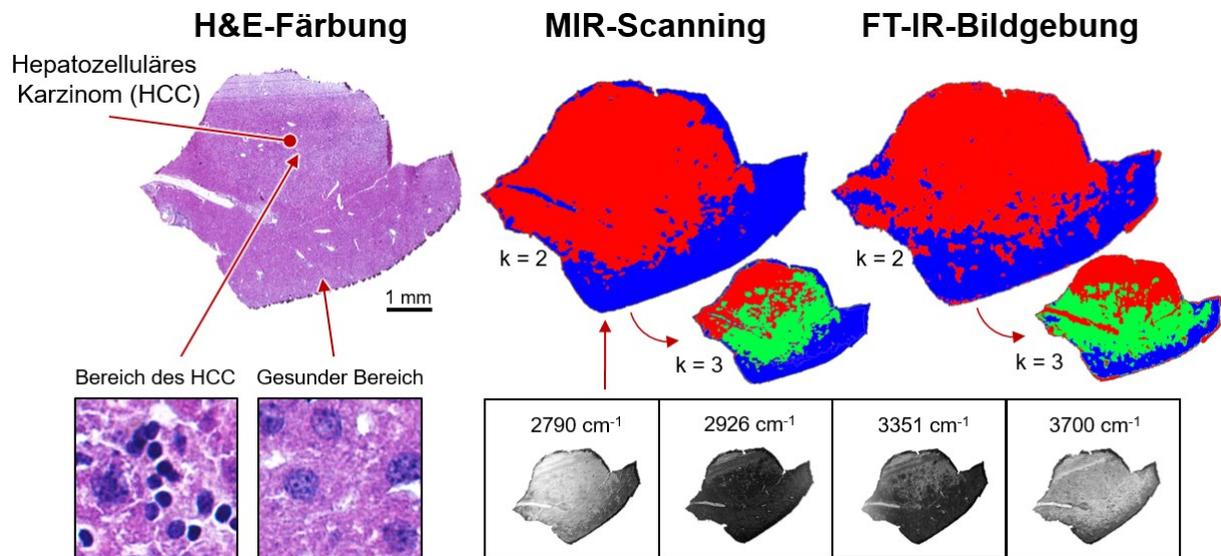


Abbildung 36: Scan-Ergebnisse zur Erkennung eines Lebertumors (hepatozelluläres Leberkarzinom). H&E-gefärbte HCC-Leber des Mäusetyps BALB/c-Abcb4^{-/-} und über k-means geclusterte Scan-Ergebnisse für das MIR-Scanning und FT-IR-Bildgebung (k=2 und k=3).

Die spektrale Analyse des Tumorknotens in Relation zur Umgebung zeigt, dass sich diese beiden Regionen grundlegend spektral voneinander unterscheiden (punktuelle Messung der Gewebereiche in Abbildung 37). Im Spektralbereich von 3100 cm^{-1} bis 2800 cm^{-1} unterscheidet sich vor allem der Anteil der langkettigen CH-Moleküle, der auf Gewebeveränderungen innerhalb der Leber hinweist. Dennoch ist für NH-Schwingungen auch ein deutlicher spektraler Unterschied zu erkennen. Aus den Clustern von k=3 (Abbildung 36) lässt sich ableiten, dass eine Substruktur innerhalb des HCC detektiert wird. An dieser Stelle bedarf es jedoch zusätzlicher Referenzmessungen und eines eindeutigen histopathologischen Befundes, was jedoch nicht mehr Teil dieser Arbeit ist. In diesem Kontext soll lediglich darauf hingewiesen werden, dass der MIR-Scanner potenziell eine solche Unter- bzw. Substruktur innerhalb eines Tumors erkennen kann und diese vergleichbar mit den Ergebnissen des FT-IR-Mikroskops ist.

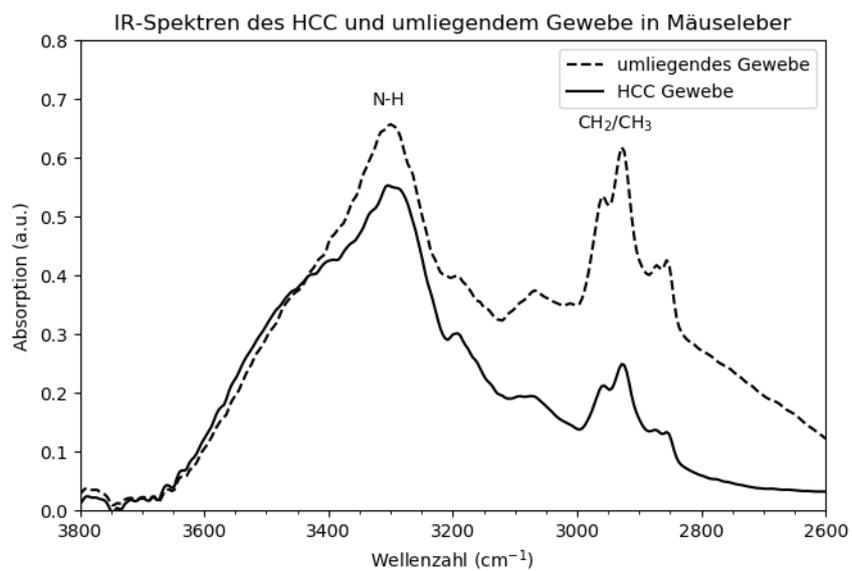


Abbildung 37: IR-Spektren von HCC und umliegendem Gewebe. Die IR-Messung bezieht sich auf gemittelte Punktmessungen auf dem mit MIR-Scanning und FT-IR-Bildgebung vermessenen Gewebeschnitt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine von Grund auf neu entwickelte Messmethode zur schnellen nicht-invasiven Abbildung von biochemischen Substanzen in Gewebeschnitten dargestellt. Die entwickelte Applikation stützt sich auf vier fest definierte Wellenlängen, die im Rahmen von Teilversuche validiert und mit einer etablierten Referenzmethode (FT-IR-Mikroskop *PerkinElmer Spotlight 400*) verglichen wurden. Anhand der Validierung ist es möglich, die Messmethode in einen bestehenden Workflow zur spektralen Untersuchung zu integrieren. Dadurch ist die schnelle Detektion von einzelnen ausgewählten Gewebestrukturen und die Segmentierung von Tumorgewebe möglich. In den folgenden Unterkapiteln wird zusätzlich diskutiert, wie sich die in dieser Arbeit entwickelte Messmethode zur Referenzmethode abhebt und wie sie weiter in bestehende und übergeordnete Workflows integriert werden kann. In diesem Zusammenhang erfolgt eine umfassende technische Bewertung des MIR-Scanners und der damit zusammenhängenden Ergebnisse. Diese beziehen sich zum einen auf Laborumgebungen wie auch auf reale Szenarien in der klinischen Umgebung. Abschließend sind wesentliche Einflussfaktoren, die auf das Gesamtsystem einwirken und Messungen stark beeinflussen können, aufgezeigt.

4.1 Technische Bewertung des MIR-Scanners

Beide Scan-Methoden (FT-IR und MIR) lieferten im Rahmen der hier durchgeführten vergleichbaren Systemstudie im Effekt gleichwertige Messergebnisse für fest vorgegebene Spektralbereiche, obwohl sie auf einer unterschiedlichen spektralen Informationsmenge basieren. Abbildung 38 zeigt einen Vergleich, der den MIR-Scanner und das FT-IR-Mikroskop für die Erfassung des HCC mit gleichwertiger Clusterung gegenüberstellt. Die Parametrierung der beiden Geräte erfolgte wie in Kapitel 2.1 (für den MIR-Scanner) und Kapitel 3.4.1 (für das FT-IR-Mikroskop) beschrieben. Somit basiert der Vergleich auf einer Scanfläche von 1 cm^2 mit einer räumlichen Auflösung von $25 \text{ }\mu\text{m}$ für das FT-IR Mikroskop und $20 \text{ }\mu\text{m}$ für den MIR-Scanner. Mit diesen Parametern wurden auch die Messbilder aus Abbildung 36 erstellt. In diesem Fall erfasst der MIR-Scanner die Scanfläche um den Faktor 225 schneller als das FT-IR-Mikroskop. Die daraus resultierende Datenmenge reduziert sich beim MIR-Scanner um den Faktor

136 und die Rechenzeit für die Datenvorverarbeitung, inklusive Clustering, reduziert sich beim MIR-Scanner um den Faktor 12.

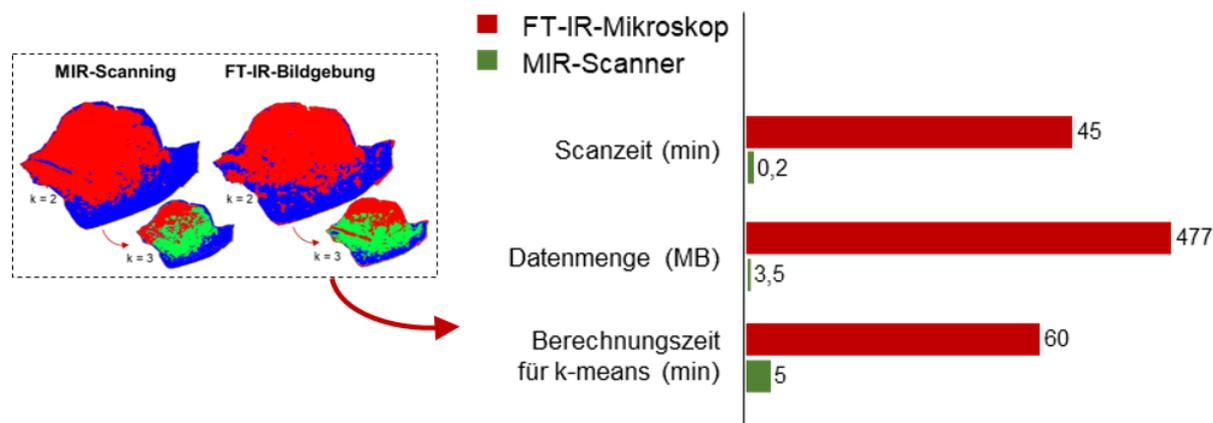


Abbildung 38: Vergleich zwischen MIR-Scanner und FT-IR-Mikroskop. Der Vergleich bezieht sich auf die selbe Probe (hier HCC) und auf die Parameter zu Erreichung vergleichbarer Ergebnisse

Der MIR-Scanner ist als Gesamtsystem zur Erfassung von ausgewählten Substanzen aus Anwendersicht, der neben der wiedergegebenen Detailtreue auch die Bearbeitungsgeschwindigkeit berücksichtigen muss, dem FT-IR-Mikroskop überlegen. Dennoch bezieht sich der MIR-Scanner nur auf vier Wellenlängen im infraroten Wellenlängenbereich im spektralen Bereich der funktionellen Gruppen. Damit ist der MIR-Scanner in spektraler Hinsicht stark limitiert. Jede zusätzliche Wellenlänge bedeutet einen Eingriff in das schon bestehende optische System. Bei Erweiterung der Lasereinheit durch weitere Lasermodule ist darauf zu achten, dass die ausgewählten Wellenlängen für das eingesetzte Linsenmaterial und die verwendete Beschichtung zulässig sind (zwischen 4000 cm^{-1} und 2500 cm^{-1}). Zusätzlich muss der spektrale Detektionsbereich des IR-Detektors die weiteren Wellenlängen erfassen können. Wellenlängen im spektralen Fingerprintbereich sind damit vorerst nicht nutzbar. Um qualitativ hochwertige Messergebnisse zu erlangen, die speziell auf Gewebeschnitte und die Detektion von Tumoren abgestimmt sind, müssten noch weitere Wellenlängen im Fingerprintbereich, wie beispielsweise Wellenlängen die auf der Absorptionsbande von Amide I, II oder III liegen, in das System integriert werden ^{161–163}.

Das entwickelte Scansystem ist im aktuellen Zustand auf eine feste Ortsauflösung von $20\text{ }\mu\text{m}$ ausgelegt. Damit ist eine hochauflösende chemische Untersuchung der Probe und die Analyse von sehr feinen Strukturen ($< 10\text{ }\mu\text{m}$), wie Nervenzellen im Mäusehirn

bzw. Kleinhirn^{164–166}, nur bedingt möglich. Eine höhere räumliche Auflösung trägt erheblich dazu bei, solche Strukturen besser zu detektieren. Hierbei muss aber darauf geachtet werden, dass die Spotsize dementsprechend angepasst wird und durch die Wellenlänge natürlich begrenzt ist. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung einer F-Theta-Linse anzustreben, da sie den Laserstrahl besser als das verwendete Zoomsystem abbilden kann (geringerer Arbeitsabstand und bessere Ausleuchtung des Scanfeldes). Die Verwendung des Kreuztisches entfällt dabei (je nach Anwendungs-Szenario und Probengröße), da mittels F-Theta-Linsen unter Umständen ausreichend große Scanfelder generiert werden können.

Im Vergleich zum FT-IR-Mikroskop^{30,167} benötigt der MIR-Scanner keine zusätzliche Kühlung. Insbesondere die komplexe Detektorkühlung mit flüssigem Stickstoff ist nicht erforderlich. Beim FT-IR-Mikroskop, welches mit flüssigem Stickstoff gekühlt ist, fällt vor Inbetriebnahme des Geräts eine Kühldauer von ~ 30 min an. Für lange Messprozesse ist ein Nachfüllen des Stickstoffs erforderlich und kann unter Umständen einen Messprozess unterbrechen.

Für hochauflösende FT-IR-Aufnahmen ist wegen der limitierten Messgeschwindigkeit zunächst ein Übersichtsbild zur genauen Lokalisation der Probe erforderlich³⁰. Die Erstellung dessen bedarf einiger Minuten. Über das Übersichtsbild lässt sich anschließend ein definierter Scanbereich der Probe bzw. des Objektträgers definieren. Dies reduziert die Scanzeiten des FT-IR-Mikroskops und die damit zusammenhängende Datenmenge. Für den MIR-Scanner entfällt die Erstellung des Übersichtsbildes, da ein gesamter Objektträger innerhalb weniger Sekunden vollständig erfasst werden kann. Die genaue Position der Probe spielt hierbei keine wesentliche Rolle.

4.2 Beurteilung der erlangten Messergebnisse

Die in Kapitel 3 aufgeführten Messergebnisse zeigen, dass die entwickelte Messmethode mit der kommerziellen und etablierten FT-IR-Bildgebung vergleichbar und die Trocknungszeit der Probe am MIR-Scanner wesentlich kürzer ist. Für ausgewählte Wellenlängen lassen sich spezifische Gewebestrukturen wie der Cortex, der Corpus collosum und der Hippocampus gut segmentieren und können unter anderem bei der Beurteilung von histopathologischen Untersuchungen ganzer Schnellschnitte helfen.

Die endgültige Beurteilung der Gewebeschnitte muss dennoch von einer ärztlichen Fachkraft für Pathologie erfolgen und kann nicht durch die angewandte Clusteranalyse übernommen werden. Jedoch sprechen die dargestellten Messergebnisse aus Kapitel 3.5 und 3.6 für eine schnelle Vorabanalyse der Gewebeschnitte und grenzen damit für die Fachkraft für Pathologie relevante Gewebebereiche ein. An dieser Stelle ist die Validierung der entwickelten Messmethode durch die ärztliche Fachkraft für Pathologie grundlegende Voraussetzung für die klinische Anwendung.

Die Anwendung der gewählten Clusteranalyse k-means zeigt, dass zusammenhängende Strukturen zuverlässig segmentiert werden. Dennoch unterliegt die Clusteranalyse einer Varianz, die von den Datensätzen und dem Algorithmus selbst herrührt. Um dem vorzubeugen, ist auf der einen Seite die Sicherstellung der Messdatenqualität eine hinreichende Bedingung, um eine reproduzierbare Clusterung zu erhalten. Auf der anderen Seite ist die Datenvorbereitung ebenso ein wesentlicher Einflussfaktor für die zuverlässige Clusterung und Segmentierung. In diesem Zusammenhang kann durch weitere vorgeschaltete Algorithmen, wie beispielsweise dem Random-Forest-Algorithmus^{168–170}, eine Vorabauswahl relevanter Daten realisiert werden. Zudem lässt sich die Entscheidung durch relevante Wellenlängen für die Auswertung mit einer vorgeschalteten Hauptkomponentenanalyse^{171,172} (eng.: principal component analysis, PCA) vereinfachen. Mit einer PCA lassen sich die Absorptionsunterschiede zwischen den Lasern 1 bis 4 automatisiert betrachten. Für nicht hinreichende Absorptionsinformationen des jeweiligen Lasers lässt sich dieser von der gesamten Datenauswertung mittels Clusteranalyse vorab ausschließen. PCAs arbeiten am zuverlässigsten mit Datensätzen, die eine hohe spektrale Informationsdichte haben (gesamte Spektren). Deshalb muss die PCA für Messergebnisse des MIR-Scanners und die geringe spektrale Informationsdichte getestet werden.

4.3 Integration der entwickelten Messmethode in weitere Messprozesse

Segmentierte Gewebeschnitte lassen sich für weitere übergeordnete und bildgebende Messverfahren weiterverarbeiten³⁰. Diese Messverfahren können hoch molekülselektiv sein und komplexe Analysen der Gewebeschnitte zulassen. Eines der molekülselektivsten bildgebenden Messverfahren stellt das MALDI MSI dar. Mit diesem Verfahren können Gewebeschnitte und Zellkulturen hinsichtlich der Wirkung und Verteilung

von Medikamenten auf molekularer Basis dargestellt werden ¹⁷³. Auch die Klassifikation von unterschiedlichen Tumorarten ^{174–176} oder die Verteilung von Primär- und Sekundär-Metaboliten in Pflanzegebe ¹⁷⁷ ist auf molekularer Ebene möglich. Aus diesem Grund spielt MALDI MSI für molekulare Analysen an Gewebeschnitten und anderen Anwendungsbereichen wie beispielsweise der Forensik ^{178–180} eine immer größer werdende Rolle.¹⁸¹ Dennoch benötigt MALDI MSI hohe Messzeiten von mehreren Stunden bis Tagen, welche durch Eingrenzung relevanter Messbereiche deutlich reduziert werden können ³⁰. In diesem Fall ist die Anwendung des MIR-Scanners zur Segmentierung relevanter Messbereiche bzw. Gewebe- oder Probenstrukturen denkbar. In Abbildung 39 ist ein Workflow zur Integration des MIR-Scanners als Vorabanalyse-Verfahren dargestellt. Die (Gewebe-) Probe wird nach dem Präparieren, zum Beispiel durch Schneiden und Trocknen, mit dem MIR-Scanner auf spektraler Ebene schnell (vor-) untersucht. Die resultierenden Ergebnisse lassen sich anschließend segmentieren und auf das Massenspektrometer übertragen ³⁰. Parallel zur Segmentierung wird die Probe für die massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet (Beschichten der Probe mit einer entsprechenden Matrix). Nach der Untersuchung mittels MALDI MSI lassen sich die Datensätze mit komplexen Auswertelgorithmen auf relevante Moleküle und deren resultierende Strukturen erneut segmentieren. Die molekulare Untersuchung mittels MALDI MSI bezieht sich in diesem Fall nur auf ein definiertes ROI (siehe Abbildung 39), welches durch den MIR-Scanner bestimmt wurde.

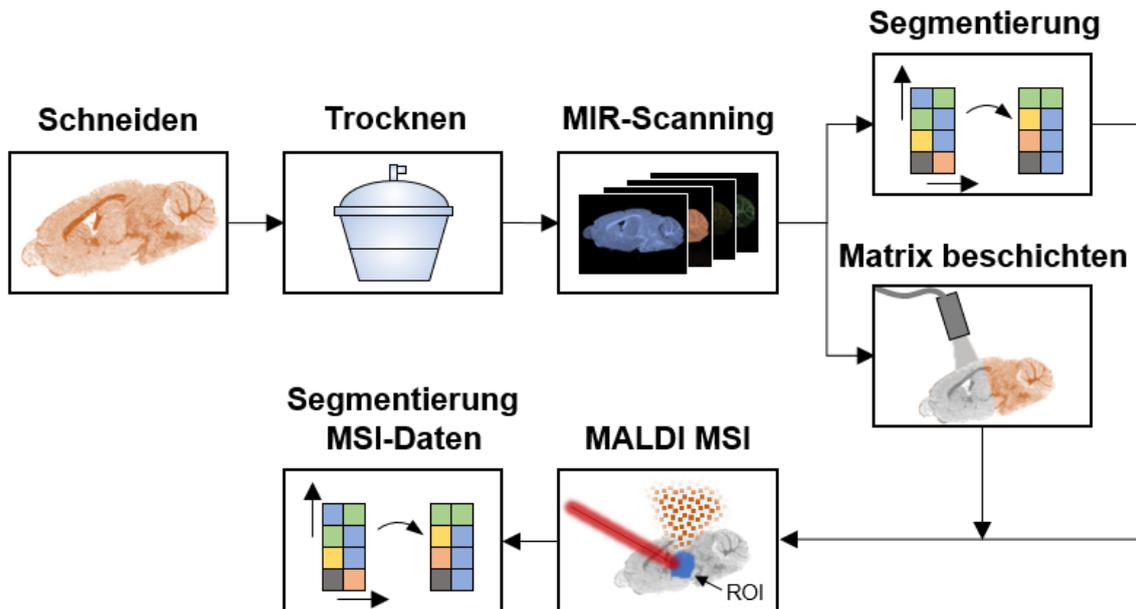


Abbildung 39: Integration des MIR-Scanners in einen bestehenden Workflow für MALDI MSI.

4.4 Theoretische Einsatzfähigkeit der entwickelten Messmethode im klinischen Umfeld

Neben der Integration des MIR-Scanners in ein Labor-Umfeld ist hier auch eine theoretische Möglichkeit der Integration in ein klinisches Umfeld aufgezeigt. Die intraoperative Schnellschnittanalyse ist eine weit verbreitete Methode zur Beurteilung des Grades einer Tumorextripation^{182–184}. Der damit verbundene Prozess von Probenentnahme, Schnellschnitt-Erstellung (Einfrieren und Schneiden) und die anschließende Einfärbung und Analyse des gefärbten Schnitts kann je nach Klinik und Klinikausstattung stark schwanken. Eine umfangreiche Studie zeigt, dass die intraoperative Erstellung und pathologische Bewertung durchschnittlich 20 min dauert¹⁸⁵. Das Färben der Probe benötigt dabei in der Regel 10 min. In dieser Zeit ist die laufende Operation unterbrochen.¹⁸⁶

Der MIR-Scanner kann im klinischen Bereich parallel zum Färbeprozess eingesetzt werden. Dafür ist ein Folgeschnitt des zu färbenden Schnellschnitts erforderlich. Das Trocknen des zu spektral vermessenden Folgeschnitts dauert nach Kapitel 3.4.3 und Abbildung 30 lediglich ~ 1,5 min. Der Scanning- und Segmentierungsprozess erfordert

zusätzlich ~ 6 min. Somit bekommt die ärztliche Fachkraft für Pathologie zur Beurteilung, noch vor Fertigstellung der H&E-Färbung, eine ROI-Markierung der relevanten Bereiche innerhalb des gesamten Gewebeschnitts. Die Annotation kann dann am segmentierten Bereich erfolgen und damit beschleunigt werden.

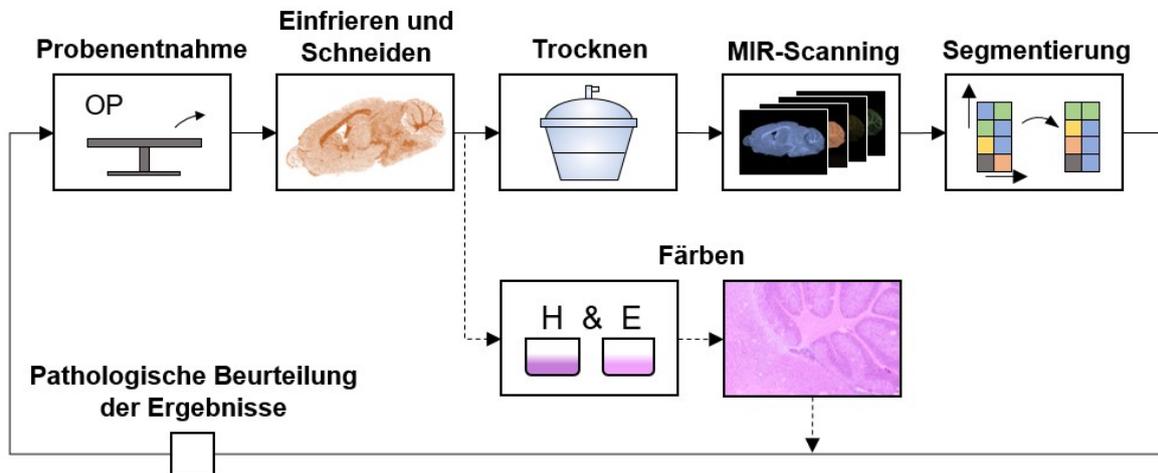


Abbildung 40: Integration des MIR-Scanners in die intraoperative Gefrierschnittanalyse

4.5 Risikobewertung

Die durch den MIR-Scanner erlangten Datensätze unterliegen mehreren Einflussfaktoren. Das Aufzeigen der Haupteinflussfaktoren zeigt zum einen die Anfälligkeit des Gesamtsystems, aber auch wie mit Einflüssen auf das Messsystem und den Messprozess umgegangen werden kann und diese idealerweise vermieden werden können.

Erschütterungen und Vibrationen

Äußere Einflüsse wie Erschütterungen und Vibrationen wirken sich negativ auf die Performanz des beweglichen Spiegelsystems und die elektrische Stabilisierung des Kreuztisches aus. Erfolgen Erschütterungen oder Vibrationen während der Messung auf das Messsystem, so treten Bildverzerrungen und sogenannte Pixelsprünge im Bild auf. Bei extremer Erschütterung kann sich die Probe auf dem Kreuztisch mechanisch verschieben. Zur Verringerung von Vibrationen, die extern zugeführt werden oder durch das Messsystem selbst entstehen können, ist die Platzierung des Gesamtsystems auf einem schwingungsgedämpften Tischaufbau vorteilhaft.

Laserstabilisierung

Die Stabilisierung der Lasermodule erfolgt über die elektrische Regelung, welche die Betriebstemperatur und den Betriebsstrom der Laserdioden regelt. Bei fehlerhafter Einstellung der einzelnen Regelparameter kann sich das Nachregeln der einzelnen Parameter auf die Laserleistung niederschlagen. Die Laserleistung hat direkten Einfluss auf die Signalstärke am Detektor. Durch (periodische) Laserschwankungen kann ein periodischer oder aperiodischer Gradient im Messbild erscheinen, der nur mit komplexen Algorithmen nachträglich herausgerechnet werden kann. Die Stabilisierung der Lasermodule sollte entsprechend der Parametrierung des Laserherstellers eingehalten werden.

Temperaturschwankungen

Die Raumtemperatur im Labor sollte nach Erstinbetriebnahme des Messsystems konstant bleiben. Idealerweise beträgt die Raumtemperatur 20 °C. Diese darf um ± 2 °C schwanken. Bei stärkeren Abweichungen der Raumtemperatur kann sich die im Messsystem befindliche Optik verstellen, was zu Abbildungsfehlern führt und damit nicht homogen ausgeleuchteten Messbildern.

Alterung der Probe

Bei biochemischen und medizinischen Proben kann es zu Probenveränderungen kommen, sobald der Schnellschnitt für mehrere Stunden oder Tage aufgetaut ist ¹⁶⁰. Besonders bei murinen Gewebeschnitten kann es dann auch zu Deformationen der Probe auf dem Objektträger oder Rissen in der Probe kommen und zusätzlich molekulare Veränderungen hervorrufen. Eine spektrale Vermessung der Probe empfiehlt sich direkt nach dem Trocknungsprozess.

Hinzu kommen weitere Einflussfaktoren, wie das Handhaben der tierischen Probe beim Einfrieren und während des Schneideprozesses: die Probendicke, die Parametrierung des Messsystems und der Probenuntergrund (Objektträger). In der folgenden Abbildung 41 sind die Einflussfaktoren auf das Gesamtsystem graphisch dargestellt und in schwerwiegende und anwendungsabhängige (geringe) Einflüsse unterteilt. Die zu vermeidenden Einflüsse stellen erhebliche Folgen für den Messprozess dar, können unter Umständen das Messsystem verstellen bzw. teilweise zerstören oder die

Probe irreversibel beschädigen. Bei den aufgeführten anwendungsabhängigen Einflüssen wird davon ausgegangen, dass diese keine nachhaltigen Folgen auf das Messsystem oder die Probe haben, sondern für jede spezifische Messaufgabe variieren und bewusst auf das System einwirken können (z. B. eine Variation der Probendicke).

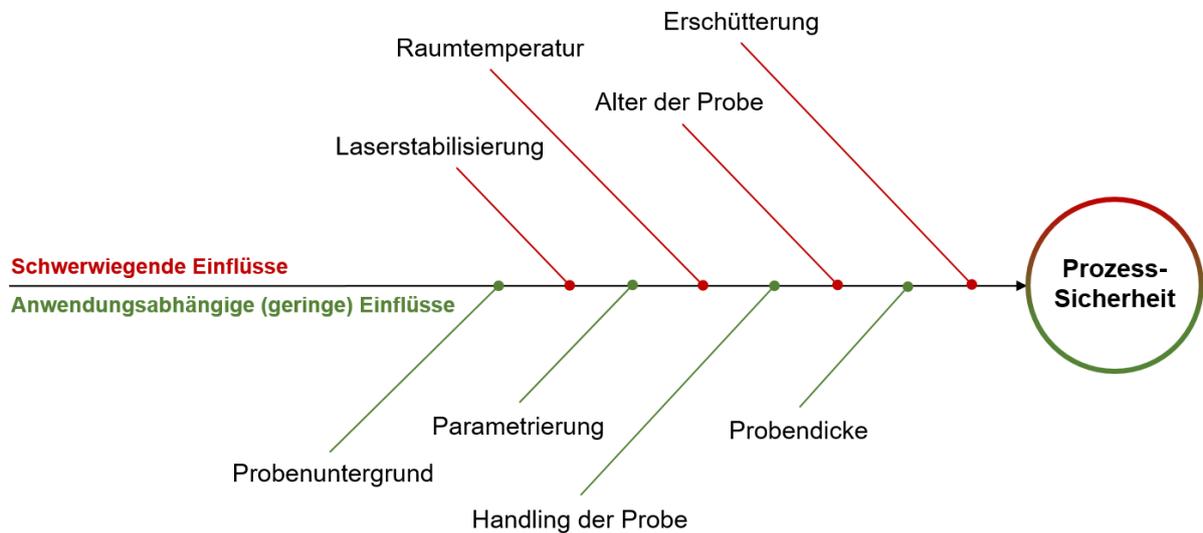


Abbildung 41: Einflussfaktoren auf das entwickelte Messsystem.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein neuartiges Messsystem für den Mittelinfrarotbereich entwickelt und an biochemischen Substanzen im Gewebeschnitt validiert werden. Die laser-gestützte Scaneinheit beruht auf vier ausgewählten Wellenlängen im Mittelinfrarotbereich, mit denen die Probe abgemustert wird. Die Wellenlängen beziehen sich auf den spektralen Wellenlängenbereich der funktionalen Gruppen, speziell auf die Schwingungsbanden von CH- und NH-Molekülen. Daraus resultierende Datensätze bestehen aus maximal vier spektralen Informationen pro Messpunkt. Der sogenannte MIR-Scanner wurde im Rahmen dieser Dissertation mit einem kommerziell erhältlichen und etablierten FT-IR-Mikroskop verglichen. Dessen Datensätze beruhen auf mehreren hundert spektralen Informationen pro Messpunkt, inklusive des spektralen Fingerprintbereichs. Der MIR-Scanner ist in der Lage, charakteristische Strukturen im murinen Gewebeschnitt, wie zum Beispiel im Mäusehirn den Hippocampus, den Corpus collosum oder den Cortex, zu erfassen. Im direkten Vergleich zur FT-IR Bildgebung ist der MIR-Scanner ebenso in der Lage, auf Basis der geringen spektralen Informationsdichte, maligne Gewebereiche von umliegendem Gewebe zu differenzieren. In diesem Zusammenhang wurde ein hepatocelluläres Karzinom einer Mäuseleber erfolgreich untersucht. Die Scanzeit für vergleichbare Ergebnisse mit dem FT-IR-Mikroskop konnte mit dem MIR-Scanner um Faktor 225 gesenkt werden. Auch die produzierte Datenmenge ließ sich um den Faktor 136 reduzieren, was eine Rechenzeit für anschließende Clusteranalysen bereits ohne weitere Optimierung der eingesetzten Algorithmen um Faktor 12 senkt. Damit ist eine schnelle Abbildung von biochemischen Substanzen in medizinischen Gewebeschnitten erreicht.

In Teilversuchen zur Validierung des entwickelten Messsystems konnte zusätzlich aufgezeigt werden, dass die Messtechnik auch auf forensische Problemstellungen, wie zum Beispiel die Erfassung von latenten Fingerabdrücken, übertragbar ist. Die Applikation ist in der Lage, anhand hinterlegter Kalibriermodelle Höhenprofile menschlicher Fingerabdrücke zu erstellen und damit einen Mehrwert für forensische Untersuchungen am Fingerabdruck zu liefern.

Wie gezeigt werden konnte, ist der MIR-Scanner wesentlich schneller im Gegensatz zu der gewählten Referenzmethode^{30,34–36}. Besonders in Bezug auf das Erfassen ganzer Gewebeschnitte bietet der MIR-Scanner wesentliche Vorteile. Dennoch ist zur endgültigen Beurteilung eines Gewebeschnitts die Bewertung durch eine ärztliche Fachkraft für Pathologie immer noch einzubinden. Die Beurteilung kann nicht ausschließlich durch die Messergebnisse des MIR-Scanners ersetzt werden. Idealerweise kann jedoch die entwickelte MIR-Messtechnik die Fachkraft für Pathologie unterstützen und in den vorsegmentierten Bereichen des gesamten Gewebeschnitts deutliche Hinweise auf Strukturänderungen oder Tumorränder geben.

Basierend auf den in dieser Arbeit erlangten Messergebnissen ist die Übertragung des Scansystems auf weitere Gewebearten ein Folgeschritt, um die Messmethode weiter zu validieren und vollständig in etablierte Arbeitsabläufe zur spektralen Gewebeuntersuchung zu integrieren. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen mit geringeren räumlichen Auflösungen erstrebenswert. Damit wäre eine schnelle Abbildung und Segmentierung von Nervenzellen wie den Purkinje-Zellen¹⁸⁷ oder Alzheimer-Plaques¹³⁵ möglich. Hierfür muss jedoch das optische System auf die Randbedingungen angepasst werden. Dennoch ist die aktuelle räumliche Scanauflösung von 20 µm ausreichend, um einzelne relevante Gewebebereiche zu klassifizieren und zu segmentieren. Die resultierenden Cluster lassen sich theoretisch auf übergeordnete und hochmolekülelektive Messverfahren wie das MALDI MSI übertragen, um weitere komplexere molekülelektive Untersuchungen der Probe anzustellen³⁰. Dadurch lassen sich hohe Messzeiten und Datenmengen am Massenspektrometer erheblich reduzieren. Zudem werden nicht benötigte Messdaten vermieden und der Berechnungsaufwand für weitere Clusteranalysen in Zusammenhang mit den erlangten Datensätzen mittels MALDI MSI gesenkt.

Anhand der ausgewählten Wellenlängen und der effizienten Messtechnik im MIR-Scanner lässt sich die Messmethode auch auf das klinische Umfeld übertragen. Hierfür sind jedoch noch weitere Validierungsschritte an humanen Gewebeproben erforderlich. Dennoch könnte der MIR-Scanner die pathologische Beurteilung in Form der Bereitstellung vorsegmentierter und relevanter Gewebebereiche zur histologischen Bewertung, unterstützen. In diesem Fall kann die ärztliche Fachkraft für Pathologie den MIR-Scanner als Werkzeug für ein Preprocessing verwenden.

Insgesamt zeigte diese Studie ein neuartiges, zerstörungsfreies Messsystem zur schnellen Struktur- und Tumorerkennung. Der Messaufbau wurde durch Referenzierung an einem kommerziell erhältlichen FT-IR-bildgebenden System validiert. Dadurch konnte eine neue schnelle Analysemöglichkeit für die intraoperative Gefrierschnittanalyse oder die schnelle Voranalyse für Anwendungen mit MALDI MSI vorgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Available at <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*(71): 209–49, 2021
3. Worldwide Cancer Statistics. Available at <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>. Accessed May 2021
4. Global Cancer Facts & Figures. Available at <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/global.html#>. Accessed May 2021
5. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F: Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 2021
6. Cancer Treatment Statistics. Available at <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/treatment#ref-4>. Accessed May 2021
7. Shakeel PM, Burhanuddin MA, Desa MI: Automatic lung cancer detection from CT image using improved deep neural network and ensemble classifier. *Neural Comput & Applic*, 2020
8. Seal A, Bhattacharjee D, Nasipuri M: Predictive and probabilistic model for cancer detection using computer tomography images. *Multimed Tools Appl*(77): 3991–4010, 2018
9. Horeweg N, van der Aalst CM, Thunnissen E, Nackaerts K, Weenink C, Groen HJM, Lammers J-WJ, Aerts JG, Scholten ET, van Rosmalen J, Mali W, Oudkerk

- M, Koning HJ de: Characteristics of lung cancers detected by computer tomography screening in the randomized NELSON trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*(187): 848–54, 2013
10. Stavrinides V, Giganti F, Trock B, Punwani S, Allen C, Kirkham A, Freeman A, Haider A, Ball R, McCartan N, Whitaker H, Orczyk C, Emberton M, Moore CM: Five-year Outcomes of Magnetic Resonance Imaging-based Active Surveillance for Prostate Cancer: A Large Cohort Study. *European urology*(78): 443–51, 2020
11. Lozano A, Hayes JC, Compton LM, Azarnoosh J, Hassanipour F: Determining the thermal characteristics of breast cancer based on high-resolution infrared imaging, 3D breast scans, and magnetic resonance imaging. *Scientific reports*(10): 10105, 2020
12. Rotili A, Trimboli RM, Penco S, Pesapane F, Tantrige P, Cassano E, Sardanelli F: Double reading of diffusion-weighted magnetic resonance imaging for breast cancer detection. *Breast cancer research and treatment*(180): 111–20, 2020
13. Attenberger U, Ritter M, Wenz F: *MR- und PET-Bildgebung der Prostata*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2017
14. Judmann B, Braun D, Wängler B, Schirmacher R, Fricker G, Wängler C: Current State of Radiolabeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*(13): 1–31, 2020
15. Kiedrowski V von, Hübner R, Kail D, Cheng X, Schirmacher R, Wängler C, Wängler B: Synthesis, characterization and optimization of in vitro properties of NIR-fluorescent cyclic α -MSH peptides for melanoma imaging. *Journal of Materials Chemistry B*(48): 10602–8, 2020
16. Hübner R, Cheng X, Wängler B, Wängler C: Functional Hybrid Molecules for the Visualization of Cancer: PESIN-Homodimers Combined with Multimodal Molecular Imaging Probes for Positron Emission Tomography and Optical Imaging: Suited for Tracking of GRPR-Positive Malignant Tissue*. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*(26): 16349–56, 2020

17. Choi HJ, Ju W, Myung SK, Kim Y: Diagnostic performance of computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with cervical cancer: meta-analysis. *Cancer science*(101): 1471–9, 2010
18. Fass L: Imaging and cancer: a review. *Molecular oncology*(2): 115–52, 2008
19. Byvaltsev VA, Bardanova LA, Onaka NR, Polkin RA, Ochkal SV, Shepelev VV, Aliyev MA, Potapov AA: Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy. *Frontiers in oncology*(9): 925, 2019
20. Wessels JT, Busse AC, Mahrt J, Dullin C, Grabbe E, Mueller GA: In vivo imaging in experimental preclinical tumor research--a review. *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*(71): 542–9, 2007
21. Schatten H: *Molecular & Diagnostic Imaging in Prostate Cancer*, Cham, Springer International Publishing, 2018
22. Sancakli-Usta C, Usta A, Karacan M, Kanter M, Ozen F, Guzin K, Yucel N, Ozbay-Ozel N, Takir M: Preoperative MRI versus intraoperative frozen-section in the assessment of myometrial invasion in endometrioid type endometrial cancer. *Electron J Gen Med* 14(1), 2017
23. Buchfelder M, Schlaffer S-M: Intraoperative magnetic resonance imaging during surgery for pituitary adenomas: pros and cons. *Endocrine* 42(3): 483–95, 2012
24. Gitas G, Proppe L, Alkatout I, Rody A, Kotanidis C, Tsolakidis D, Baum S: Accuracy of frozen section at early clinical stage of endometrioid endometrial cancer: a retrospective analysis in Germany. *Archives of gynecology and obstetrics* 300(1): 169–74, 2019
25. Obeidat FN, Awad HA, Mansour AT, Hajeer MH, Al-Jalabi MA, Abudalu LE: Accuracy of Frozen-Section Diagnosis of Brain Tumors: An 11-Year Experience from a Tertiary Care Center. *Turkish neurosurgery* 29(2): 242–6, 2019

26. N.B. Tepe, Z. Bozdağ, Ö. Balat, M.G. Uğur, H. Ç. Özcan, S. Sucu, Ö.K. Karuserci, Ö.F. Dizibüyük: Is intraoperative frozen examination sufficiently reliable for ovarian tumors: 11 years experience at a single center. *European Journal of Gynaecological Oncology*(40): 628–33, 2019
27. Sharifabadi AH, Haeri H, Zeinalizadeh M, Zargari N, Razavi AE, Shahbazi N, Tahvildari M, Azmoudeh-Ardalan F: Intraoperative consultation of central nervous system lesions. Frozen section, cytology or both? *Pathology, research and practice* 212(3): 179–84, 2016
28. Pandey S, Bhamra S, Singh A: Accuracy of intraoperative frozen section in assessing margins in oral cancers: A tertiary care hospital based study. *IJPO* 7(3): 415–9, 2020
29. Tuck M, Blanc L, Touti R, Patterson NH, van Nuffel S, Villette S, Taveau J-C, Römpf A, Brunelle A, Lecomte S, Desbenoit N: Multimodal Imaging Based on Vibrational Spectroscopies and Mass Spectrometry Imaging Applied to Biological Tissue: A Multiscale and Multiomics Review. *Analytical chemistry* 93(1): 445–77, 2021
30. Rabe J-H, A Sammour D, Schulz S, Munteanu B, Ott M, Ochs K, Hohenberger P, Marx A, Platten M, Opitz CA, Ory DS, Hopf C: Fourier Transform Infrared Microscopy Enables Guidance of Automated Mass Spectrometry Imaging to Predefined Tissue Morphologies. *Scientific reports* 8(1): 313, 2018
31. Ranjana Mehrotra, Gunjan Tyagi, Deepak K Jangir, Ramesh Dawar, Noopur Gupta: Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Ovarian Res*(3), 2010
32. P Wrobel T, Mateuszuk L, Chlopicki S, Malek K, Baranska M: Imaging of lipids in atherosclerotic lesion in aorta from ApoE/LDLR^{-/-} mice by FT-IR spectroscopy and Hierarchical Cluster Analysis. *The Analyst* 136(24): 5247–55, 2011
33. Kröger-Lui N, Gretz N, Haase K, Kränzlin B, Neudecker S, Pucci A, Regenscheit A, Schönhals A, Petrich W: Rapid identification of goblet cells in unstained colon

- thin sections by means of quantum cascade laser-based infrared microspectroscopy. *The Analyst* 140(7): 2086–92, 2015
34. Kilgus J, Langer G, Duswald K, Zimmerleiter R, Zorin I, Berer T, Brandstetter M: Diffraction limited mid-infrared reflectance microspectroscopy with a supercontinuum laser. *Optics express* 26(23): 30644–54, 2018
35. Bujin Guo, Y. Wang, C. Peng, H. L. Zhang, G. P. Luo, H. Q. Le, C. Gmachl, D. L. Sivco, M. L. Peabody, A.Y. Cho: Laser-based mid-infrared reflectance imaging of biological tissues
36. Kuepper C, Kallenbach-Thieltges A, Juette H, Tannapfel A, Großerueschkamp F, Gerwert K: Quantum Cascade Laser-Based Infrared Microscopy for Label-Free and Automated Cancer Classification in Tissue Sections. *Scientific reports* 8(1): 7717, 2018
37. Krafft C, Ramoji AA, Bielecki C, Vogler N, Meyer T, Akimov D, Rösch P, Schmitt M, Dietzek B, Petersen I, Stallmach A, Popp J: A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue. *Journal of biophotonics* 2(5): 303–12, 2009
38. Krafft C, Schmitt M, Schie IW, Cialla-May D, Matthäus C, Bocklitz T, Popp J: Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 56(16): 4392–430, 2017
39. Isensee K, Kröger-Lui N, Petrich W: Biomedical applications of mid-infrared quantum cascade lasers - a review. *The Analyst* 143(24): 5888–911, 2018
40. Savitri Krishnamurthy MD, Andrea Cortes MS, Mirtha Lopez BS, Michael Wallace M, Sharjeel Sabir MD, Kenna Shaw P: Ex Vivo Confocal Fluorescence Microscopy for rapid Evaluation of Tissues in Surgical Pathology Practice. *Arch Pathol Lab Med*(143): 396–401, 2018
41. Hollon TC, Lewis S, Pandian B, Niknafs YS, Garrard MR, Garton H, Maher CO, McFadden K, Snuderl M, Lieberman AP, Muraszko K, Camelo-Piragua S, Orringer DA: Rapid Intraoperative Diagnosis of Pediatric Brain Tumors Using Stimulated Raman Histology. *Cancer research* 78(1): 278–89, 2018

42. Hill AH, Manifold B, Fu D: Tissue imaging depth limit of stimulated Raman scattering microscopy. *Biomedical optics express* 11(2): 762–74, 2020
43. Bae K, Zheng W, Huang Z: Spatial light-modulated stimulated Raman scattering (SLM-SRS) microscopy for rapid multiplexed vibrational imaging. *Theranostics* 10(1): 312–22, 2020
44. Conway RM, Themel S, Holbach LM: Surgery for primary basal cell carcinoma including the eyelid margins with intraoperative frozen section control: comparative interventional study with a minimum clinical follow up of 5 years. *The British journal of ophthalmology* 88(2): 236–8, 2004
45. Shah JS, Mackelvie M, Gershenson DM, Ramalingam P, Kott MM, Brown J, Gauthier P, Nugent E, Ramondetta LM, Frumovitz M: Accuracy of Intraoperative Frozen Section Diagnosis of Borderline Ovarian Tumors by Hospital Type. *Journal of minimally invasive gynecology* 26(1): 87–93, 2019
46. Ivkovic-Kapicl T, Vicko F, Panjkovic M, Radovanovic Z, Vasiljevic T, Radovanovic D, Knezevic-Usaj S: Intraoperative imprint cytology of sentinel lymph nodes in breast cancer patients: Comparison with frozen section. *VSP* 77(2): 196–200, 2020
47. Heller B, Peters S: Assessment of liver transplant donor biopsies for steatosis using frozen section: accuracy and possible impact on transplantation. *Journal of clinical medicine research* 3(4): 191–4, 2011
48. Juan Lechago: Frozen section examination of liver, gallbladder, and pancreas. *Arch Pathol Lab Med*(129): 1610–8, 2005
49. Jayson R Miedema, Heike V Hunt: Practical issues for frozen section diagnosis in gastrointestinal and liver diseases. *J Gastrointestin Liver Dis*(19): 181–5, 2010
50. Mair S, Lash RH, Suskin D, Mendelsohn G: Intraoperative surgical specimen evaluation: frozen section analysis, cytologic examination, or both? A comparative study of 206 cases. *Am J Clin Pathol*(96): 8–14, 1991

51. Sabel MS, Jorns JM, Wu A, Myers J, Newman LA, Breslin TM: Development of an intraoperative pathology consultation service at a free-standing ambulatory surgical center: clinical and economic impact for patients undergoing breast cancer surgery. *American journal of surgery*(204): 66–77, 2012
52. Huang Y, Lei Y, Wang Q, Li D, Ma L, Guo L, Tang M, Liu G, Yan Q, Shen L, Tong G, Jing Z, Zhang Y, Deng Y: Telepathology consultation for frozen section diagnosis in China. *Diagnostic pathology*(13): 1–6, 2018
53. French JMR, Betney DT, Abah U, Bhatt N, Internullo E, Casali G, Batchelor TJP, West DG: Digital pathology is a practical alternative to on-site intraoperative frozen section diagnosis in thoracic surgery. *Histopathology*(74): 902–7, 2019
54. van den Bent MJ: Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta neuropathologica* 120(3): 297–304, 2010
55. Gilles FH, Tavaré CJ, Becker LE, Burger PC, Yates AJ, Pollack IF, Finlay JL: Pathologist interobserver variability of histologic features in childhood brain tumors: results from the CCG-945 study. *Pediatric and developmental pathology the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 11(2): 108–17, 2008
56. Sondermann W, Zimmer L, Schadendorf D, Roesch A, Klode J, Dissemond J: Initial misdiagnosis of melanoma located on the foot is associated with poorer prognosis. *Medicine* 95(29): e4332, 2016
57. Zhu X, Bledsoe JR: Frozen section diagnosis of gastrointestinal poorly cohesive and signet-ring cell adenocarcinoma: useful morphologic features to avoid misdiagnosis. *Virchows Archiv an international journal of pathology* 477(4): 497–506, 2020
58. Huang Z, Li Li, Li C, Ngaujah S, Yao S, Chu R, Xie L, Yang X, Zhang X, Liu P, Jiang J, Zhang Y, Cui B, Song K, Kong B: Diagnostic accuracy of frozen section analysis of borderline ovarian tumors: a meta-analysis with emphasis on misdiagnosis factors. *Journal of Cancer* 9(16): 2817–24, 2018

59. Yoshida H, Tanaka H, Tsukada T, Abeto N, Kobayashi-Kato M, Tanase Y, Uno M, Ishikawa M, Kato T: Diagnostic Discordance in Intraoperative Frozen Section Diagnosis of Ovarian Tumors: A Literature Review and Analysis of 871 Cases Treated at a Japanese Cancer Center. *International journal of surgical pathology* 29(1): 30–8, 2021
60. Swinehart DF: The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*(39): 333, 1962
61. Haus J (ed): *Optical Sensors*, Weinheim, Wiley-VCH, 2004
62. Hertel IV, Schulz C-P: *Atome, Moleküle und optische Physik 1*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2017
63. Mäntele W, Deniz E: UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 173: 965–8, 2017
64. Lajunen L (ed): *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2007
65. Günzler H, Gremlich H-U: *IR-Spektroskopie*, 3rd ed., Weinheim, Wiley-VCH, 1996
66. Gottwald W, Wachter G: *IR-Spektroskopie für Anwender: Die Praxis der instrumentellen Analytik*, Wiley-VCH, 1997
67. Ritgen U: *Analytische Chemie I*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2019
68. Gremlich H-U (ed): *Infrared and Raman Spectroscopy*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000
69. Hecht T: *Physikalische Grundlagen der IR-Spektroskopie*, Wiesbaden, Springer Fachmedien Wiesbaden, 2019
70. Settle F: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, 1997

71. Hynes A, Scott DA, Man A, Singer DL, Sowa MG, Liu K-Z: Molecular mapping of periodontal tissues using infrared microspectroscopy. *BMC medical imaging* 5(1): 2, 2005
72. Gressner AM, Arndt T: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2019
73. aprentas: *Laborpraxis Band 4: Analytische Methoden*, Cham, Springer International Publishing, 2017
74. Ortuño J, Stergiadis S, Koidis A, Smith J, Humphrey C, Whistance L, Theodoridou K: Rapid tannin profiling of tree fodders using untargeted mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Plant methods* 17(1): 14, 2021
75. Parson WW: *Modern Optical Spectroscopy*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2015
76. Salim RM, Asik J, Sarjadi MS: Chemical functional groups of extractives, cellulose and lignin extracted from native *Leucaena leucocephala* bark. *Wood Sci Technol* 55(2): 295–313, 2021
77. Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M: *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2020
78. Su K-Y, Lee W-L: Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. *Cancers* 12(1), 2020
79. Hanson RK, Spearrin RM, Goldenstein CS: *Spectroscopy and Optical Diagnostics for Gases*, Cham, Springer International Publishing, 2016
80. Bellisola G, Sorio C: Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*(2): 1–21, 2012
81. Milosevic M: *Internal reflection and ATR spectroscopy*, Hoboken N.J., Wiley, 2012
82. Kellner R, Gidàly G: Oberflächenanalyse durch IR-ATR-Spektroskopie. *Mikrochimica Acta*(69): 415–24, 1978

83. Gallei E: Die innere Reflexions- oder ATR-Spektroskopie und ihre Anwendung in der Oberflächen-Chemie. *Chemie Ingenieur Technik*(44): 722–5, 1972
84. Guicking D: *Schwingungen*, Wiesbaden, Springer Fachmedien Wiesbaden, 2016
85. Diem M: *Modern vibrational spectroscopy and micro-spectroscopy: Theory, instrumentation, and biomedical applications*, Chichester West Sussex UK, John Wiley & Sons Inc, 2015
86. Barnett nW, Dent G, Chalmers JM: *Industrial Analysis with Vibrational Spectroscopy*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2009
87. Armaroli T, Bécue T, Gautier S: Diffuse Reflection Infrared Spectroscopy (Drifts): Application to the in Situ Analysis of Catalysts. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 59(2): 215–37, 2004
88. Jiang W, Han G, Zhang Y, Liu S, Zhou C, Song Y, Zhang X, Xia Y: Monitoring Chemical Changes on the Surface of Kenaf Fiber during Degumming Process Using Infrared Microspectroscopy. *Scientific reports* 7(1): 1240, 2017
89. Türker-Kaya S, Huck CW: A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(1), 2017
90. Woess C, Unterberger SH, Roider C, Ritsch-Marte M, Pemberger N, Cemper-Kiesslich J, Hatzler-Grubwieser P, Parson W, Pallua JD: Assessing various Infrared (IR) microscopic imaging techniques for post-mortem interval evaluation of human skeletal remains. *PloS one* 12(3): e0174552, 2017
91. Sergei G. Kazarian and K. L. Andrew Chan: Micro- and Macro-Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging
92. Kazarian SG, Chan KLA: ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *The Analyst* 138(7): 1940–51, 2013
93. Katon JE: Infrared Microspectroscopy. A Review of Fundamentals and Applications. *Micron*(27): 303–14, 1996

94. Carr GL: Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instrum.* 72(3): 1613, 2001
95. Anna I, Bartosz P, Lech P, Halina A: Novel strategies of Raman imaging for brain tumor research. *Oncotarget*(8): 85290–310, 2017
96. Li X, Zhang D, Bai Y, Wang W, Liang J, Cheng J-X: Fingerprinting a Living Cell by Raman Integrated Mid-Infrared Photothermal Microscopy. *Analytical chemistry* 91(16): 10750–6, 2019
97. Raschka S, Mirjalili V: *Machine Learning mit Python und Scikit-learn und Tensor-Flow: das umfassende Praxis-Handbuch für Data Science, Deep Learning und Predictive Analytics*, 2nd ed., Frechen, mitp, 2018
98. Müller AC, Guido S: *Einführung in Machine Learning mit Python: Praxiswissen Data Science*, 1st ed., Heidelberg, O'Reilly, 2017
99. Jo T: *Machine Learning Foundations*, Cham, Springer International Publishing, 2021
100. Dinov ID: *Data Science and Predictive Analytics*, Cham, Springer International Publishing, 2018
101. Zhang J, Chen W, Gao M, Shen G: K-means-clustering-based fiber nonlinearity equalization techniques for 64-QAM coherent optical communication system. *Optics express* 25(22): 27570–80, 2017
102. Bachem O, Lucic M, Hassani SH, Krause A: Approximate K-Means++ in Sub-linear Time. *Thirtieth AAAI Conference on Artificial Intelligence*(30), 2016
103. Kahl T, Zimmer F: *Interaktive Datenvisualisierung in Wissenschaft und Unternehmenspraxis*, Wiesbaden, Springer Fachmedien Wiesbaden, 2020
104. Hatwig J, Minnerup P, Zaeh MF, Reinhart G: An automated path planning system for a robot with a laser scanner for remote laser cutting and welding. In: *2012 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation*, IEEE, 2012 - 2012, pp 1323–1328

105. Kachelriess M, Knaup M, Penssel C, Kalender WA: Flying focal spot (FFS) in cone-beam CT. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 53(3): 1238–47, 2006
106. Pieczona SJ, Zollitsch S, Zaeh MF: *2017 IEEE International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM): 3-7 July 2017*, Piscataway, NJ, IEEE, 2017
107. Fraden J: *Handbook of Modern Sensors*, Cham, Springer International Publishing, 2016
108. Kiang YC, Lang RW: Measuring focused Gaussian beam spot sizes: a practical method. *Applied optics* 22(9): 1296, 1983
109. Yu H, Kim B, Jang S, Kim K-H, Yoh JJ: Performance characterization of a miniaturized exploding foil initiator via modified VISAR interferometer and shock wave analysis. *Journal of Applied Physics* 121(21): 215901, 2017
110. Ghafouri-Shiraz H: *Distributed feedback laser diodes and optical tunable filters*, West Sussex England, Hoboken NJ, J. Wiley, 2003
111. Yonetani H, Ushijima I, Takada T, Shima K: Transmission characteristics of DFB laser modules for analog applications. *J. Lightwave Technol.* 11(1): 147–53, 1993
112. Ernst N, Bozdech G, Schmidt H, Schmidt W: On the full-width-at-half-maximum of field ion energy distribution. *Applied Surface Science*(67): 111–7, 1993
113. Goryniuk MC, Rivard BA, Jones B: The reflectance spectra of opal-A (0.5–25 μm) from the Taupo Volcanic Zone: Spectra that may identify hydrothermal systems on planetary surfaces. *Geophys. Res. Lett.*(31): 1–4, 2004
114. Bannwarth H, Kremer BP, Schulz A: *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2019
115. Heinrich PC, Müller M, Graeve L: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2014

116. Kumosinski TF, Farrell HM: Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform (FTIR) spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology*(4): 169–75, 1993
117. Huang Y-T, Liao H-F, Wang S-L, Lin S-Y: Glycation and secondary conformational changes of human serum albumin: study of the FTIR spectroscopic curve-fitting technique. *AIMS Biophysics*(3): 247–60, 2016
118. Oleszko A, Hartwich J, Gąsior-Głogowska M, Olsztyńska-Janus S: Changes of albumin secondary structure after palmitic acid binding. FT-IR spectroscopic study [Acta of Bioengineering and Biomechanics; 01/2018; ISSN 1509-409X / Acta of Bioengineering and Biomechanics; 01/2018; ISSN 1509-409X], 2018
119. Ghimire H, Venkataramani M, Bian Z, Liu Y, Perera AGU: ATR-FTIR spectral discrimination between normal and tumorous mouse models of lymphoma and melanoma from serum samples. *Scientific reports*(7): 16993, 2017
120. Hooshyar Z, Bardajee GR, Shafagh P, Ghiasvand S, Khanjari M, Dianatnejad N: In vitro study on the interaction of Mn(II)-DiAmsar with human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA) by spectroscopic and molecular docking methods. *J IRAN CHEM SOC*(12): 715–25, 2015
121. Miyazawa T, Fukushima K, Ideguchi Y: Molecular Vibrations and Structure of High Polymers. III. Polarized Infrared Spectra, Normal Vibrations, and Helical Conformation of Polyethylene Glycol. *The Journal of Chemical Physics*(37): 2764–76, 1962
122. Shirakawa H, Ikeda S: Infrared Spectra of Poly(acetylene). *Polymer Journal*(2): 231–44, 1971
123. Yoshihara T, Tadokoro H, Murahashi S: Normal Vibrations of the Polymer Molecules of Helical Conformation. IV. Polyethylene Oxide and Polyethylene- d4 Oxide. *The Journal of Chemical Physics*(41): 2902–11, 1964
124. Feldman AT, Wolfe D: Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*(1180): 31–43, 2014

125. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, Fielden PR, Fogarty SW, Fullwood NJ, Heys KA, Hughes C, Lasch P, Martin-Hirsch PL, Obinaju B, Sockalingum GD, Sulé-Suso J, Strong RJ, Walsh MJ, Wood BR, Gardner P, Martin FL: Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols* 9(8): 1771–91, 2014
126. Zou Y, Xia P, Yang F, Cao F, Ma K, Mi Z, Huang X, Cai N, Jiang B, Zhao X, Liu W, Chen X: Whole blood and semen identification using mid-infrared and Raman spectrum analysis for forensic applications. *Anal. Methods* 8(18): 3763–7, 2016
127. Mistek E, Lednev IK: FT-IR Spectroscopy for Identification of Biological Stains for Forensic Purposes. *IR Spectroscopy for Today's Spectroscopists*(33): 8–19, 2018
128. Marcel S, Nixon MS, Fierrez J, Evans N: *Handbook of Biometric Anti-Spoofing*, Cham, Springer International Publishing, 2019
129. Gorry PA: General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method. *Anal. Chem.* 62(6): 570–3, 1990
130. Bobroff V, Chen H-H, Delugin M, Javerzat S, Petibois C: Quantitative IR microscopy and spectromics open the way to 3D digital pathology. *Journal of biophotonics*(10): 598–606, 2017
131. Jansson H, Bernin D, Ramser K: Silicate species of water glass and insights for alkali-activated green cement. *AIP Advances*(5): 1–9, 2015
132. Sabbatini S, Conti C, Orilisi G, Giorgini E: Infrared spectroscopy as a new tool for studying single living cells: Is there a niche? *BSI*(6): 85–99, 2017
133. Sadat A, Joye IJ: Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. *Applied Sciences*(10): 5918, 2020
134. Liu Y, Lunter DJ: Systematic Investigation of the Effect of Non-Ionic Emulsifiers on Skin by Confocal Raman Spectroscopy-A Comprehensive Lipid Analysis. *Pharmaceutics*(12): 1–16, 2020

135. Enzlein T, Cordes J, Munteanu B, Michno W, Serneels L, Strooper B de, Hanrieder J, Wolf I, Chávez-Gutiérrez L, Hopf C: Computational Analysis of Alzheimer Amyloid Plaque Composition in 2D- and Elastically Reconstructed 3D-MALDI MS Images. *Analytical chemistry*(92): 14484–93, 2020
136. Petibois C, Déléris G: Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends in biotechnology* 24(10): 455–62, 2006
137. Elmi F, Movaghar AF, Elmi MM, Alinezhad H, Nikbakhsh N: Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*(187): 87–91, 2017
138. Kyriakidou M, Anastassopoulou J, Tsakiris A, Kouli M, Theophanides T: FT-IR Spectroscopy Study in Early Diagnosis of Skin Cancer. *In vivo (Athens, Greece)*(31): 1131–7, 2017
139. Weidner T, Breen NF, Drobny GP, Castner DG: Amide or amine: determining the origin of the 3300 cm⁻¹ NH mode in protein SFG spectra using ¹⁵N isotope labels. *The journal of physical chemistry. B*(113): 15423–6, 2009
140. Desmond KL, Moosvi F, Stanisiz GJ: Mapping of amide, amine, and aliphatic peaks in the CEST spectra of murine xenografts at 7 T. *Magnetic resonance in medicine*(71): 1841–53, 2014
141. Petibois C, Gionnet K, Gonçalves M, Perromat A, Moenner M, Déléris G: Analytical performances of FT-IR spectrometry and imaging for concentration measurements within biological fluids, cells, and tissues. *The Analyst*(131): 640–7, 2006
142. Bunaciu AA, Fleschin S, Aboul-Enein HY: Cancer Diagnosis by FT-IR Spectrophotometry. *Revue Roumaine de Chimie*(60): 415–26, 2015
143. Sauleau P, Lapouble E, Val-Laillet D, Malbert C-H: The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal an international journal of animal bioscience*(3): 1138–51, 2009

144. Takata N, Sato N, Komaki Y, Okano H, Tanaka KF: Flexible annotation atlas of the mouse brain: combining and dividing brain structures of the Allen Brain Atlas while maintaining anatomical hierarchy. *Scientific reports*(11): 6234, 2021
145. Grasmair M: Locally Adaptive Total Variation Regularization. *Scale Space and Variational Methods in Computer Vision*(5567): 331–42, 2009
146. Kümmel T, van Marwick B, Rittel M, Ramallo Guevara C, Wühler F, Teumer T, Wängler B, Hopf C, Rädle M: Rapid brain structure and tumour margin detection on whole frozen tissue sections by fast multiphotometric mid-infrared scanning. *Scientific reports* 11(1): 11307, 2021
147. Galea I, Bechmann I, Perry VH: What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*(28): 12–8, 2007
148. Swanson LW, Hahn JD: A qualitative solution with quantitative potential for the mouse hippocampal cortex flatmap problem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(6): 3220–31, 2020
149. Wang Z, Bovik AC, Sheikh HR, Simoncelli EP: Image quality assessment: from error visibility to structural similarity. *IEEE transactions on image processing a publication of the IEEE Signal Processing Society* 13(4): 600–12, 2004
150. Wang Z, Bovik AC: Mean squared error: Love it or leave it? A new look at Signal Fidelity Measures. *IEEE Signal Process. Mag.* 26(1): 98–117, 2009
151. Kidder LH, Colarusso P, Stewart SA, Levin IW, Appel NM, Lester DS, Pentchev PG, Lewis EN: Infrared Spectroscopic Imaging of the Biochemical Modifications Induced in the Cerebellum of the Niemann-Pick type C Mouse. *Journal of biomedical optics* 4(1): 7–13, 1999
152. Sanchez-Molina P, Kreuzer M, Benseny-Cases N, Valente T, Almolda B, González B, Castellano B, Perálvarez-Marín A: From Mouse to Human: Comparative Analysis between Grey and White Matter by Synchrotron-Fourier Transformed Infrared Microspectroscopy. *Biomolecules* 10(8), 2020

153. Dovbeshko G: FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* 53(1): 233–46, 2000
154. Palombo F, Tamagnini F, Jeynes JCG, Mattana S, Swift I, Nallala J, Hancock J, Brown JT, Randall AD, Stone N: Detection of A β plaque-associated astrogliosis in Alzheimer's disease brain by spectroscopic imaging and immunohistochemistry. *The Analyst* 143(4): 850–7, 2018
155. Hackett MJ, Hollings A, Majimbi M, Brook E, Cochran B, Giles C, Lam V, Nesbit M, Rye K-A, Mamo JCL, Takechi R: Multimodal Imaging Analyses of Brain Hippocampal Formation Reveal Reduced Cu and Lipid Content and Increased Lactate Content in Non-Insulin-Dependent Diabetic Mice. *ACS chemical neuroscience* 10(5): 2533–40, 2019
156. Jones AR, Overly CC, Sunkin SM: The Allen Brain Atlas: 5 years and beyond. *Nature reviews. Neuroscience* 10(11): 821–8, 2009
157. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen T-M, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong H-W, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramie AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivasay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf K-R, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR: Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*(445): 168–76, 2007

158. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, Laurent C, Hajji Y, Azoulay D, Bioulac-Sage P, Nault J-C, Zucman-Rossi J: Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *Journal of hepatology*(67): 727–38, 2017
159. Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Galun E, Goldenberg D: Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the *mdr2*-knockout mice. *Molecular cancer research MCR*(5): 1159–70, 2007
160. Zou Y, Xia P, Yang F, Cao F, Ma K, Mi Z, Huang X, Cai N, Jiang B, Zhao X, Liu W, Chen X: Whole blood and semen identification using mid-infrared and Raman spectrum analysis for forensic applications. *Anal. Methods*(8): 3763–7, 2016
161. Kuepper C, Kallenbach-Thieltges A, Juette H, Tannapfel A, Großerueschkamp F, Gerwert K: Quantum Cascade Laser-Based Infrared Microscopy for Label-Free and Automated Cancer Classification in Tissue Sections. *Scientific reports*(8): 7717, 2018
162. Kyriakidou M, Mavrogenis AF, Kyriazis S, Markouizou A, Thophanides T, Anastassopoulou J: An FT-IR Spectral Analysis of the Effects of γ -Radiation on Normal and Cancerous Cartilage. *In vivo*(30): 599–604, 2016
163. Roman M, Wrobel TP, Paluszkiewicz C, Kwiatek WM: Comparison between high definition FT-IR, Raman and AFM-IR for subcellular chemical imaging of cholesteryl esters in prostate cancer cells. *Journal of biophotonics*(13): 1-14, 2020
164. Hackett MJ, Borondics F, Brown D, Hirschmugl C, Smith SE, Paterson PG, Nichol H, Pickering IJ, George GN: Subcellular biochemical investigation of purkinje neurons using synchrotron radiation fourier transform infrared spectroscopic imaging with a focal plane array detector. *ACS chemical neuroscience*(4): 1071–80, 2013
165. Purushothuman S, Johnstone DM, Nandasena C, van Eersel J, Ittner LM, Mitrofanis J, Stone J: Near infrared light mitigates cerebellar pathology in transgenic mouse models of dementia. *Neuroscience letters*(591): 155–9, 2015

166. White JJ, Bosman LWJ, Blot FGC, Osório C, Kuppens BW, Krijnen WHJJ, Andriessen C, Zeeuw CI de, Jaarsma D, Schonewille M: Region-specific preservation of Purkinje cell morphology and motor behavior in the ATXN182Q mouse model of spinocerebellar ataxia 1. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*: e12946, 2021
167. Sreedhar H, Varma VK, Nguyen PL, Davidson B, Akkina S, Guzman G, Setty S, Kajdacsy-Balla A, Walsh MJ: High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopic imaging of human tissue sections towards improving pathology. *Journal of visualized experiments JoVE(95)*: 52332, 2015
168. Breiman L: Random Forests. *Maschine Learning(45)*: 5–32, 2001
169. Bosch A, Zisserman A, Munoz X: Image Classification using Random Forest and Ferns. *2007 IEEE 11th International Conference on Computer Vision, 2007*
170. Ho TK: Random decision forests. *Proceedings of 3rd International Conference on Document Analysis and Recognition: 278–82*, 2002
171. Jolliffe IT: *Principal Component Analysis*, 2nd ed., New York, Springer
172. Pearson K: LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science(2)*: 559–72, 1901
173. Sørensen IS, Janfelt C, Nielsen MMB, Mortensen RW, Knudsen NØ, Eriksson AH, Pedersen AJ, Nielsen KT: Combination of MALDI-MSI and cassette dosing for evaluation of drug distribution in human skin explant. *Analytical and bioanalytical chemistry(409)*: 4993–5005, 2017
174. Mascini NE, Teunissen J, Noorlag R, Willems SM, Heeren RMA: Tumor classification with MALDI-MSI data of tissue microarrays: A case study. *Methods (San Diego, Calif.)(151)*: 21–7, 2018
175. Kriegsmann M, Zgorzelski C, Casadonte R, Schwamborn K, Muley T, Winter H, Eichhorn M, Eichhorn F, Warth A, Deininger S-O, Christopoulos P, Thomas M,

- Longerich T, Stenzinger A, Weichert W, Müller-Tidow C, Kriegsmann J, Schirmacher P, Kriegsmann K: Mass Spectrometry Imaging for Reliable and Fast Classification of Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes. *Cancers*(12): 1–14, 2020
176. Hinsenkamp I, Schulz S, Roscher M, Suhr A-M, Meyer B, Munteanu B, Fuchser J, Schoenberg SO, Ebert MPA, Wängler B, Hopf C, Burgermeister E: Inhibition of Rho-Associated Kinase 1/2 Attenuates Tumor Growth in Murine Gastric Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*(18): 500–11, 2016
177. Sturtevant D, Lee Y-J, Chapman KD: Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ. *Current opinion in biotechnology*(37): 53–60, 2016
178. Bradshaw R, Wolstenholme R, Ferguson LS, Sammon C, Mader K, Claude E, Blackledge RD, Clench MR, Francese S: Spectroscopic imaging based approach for condom identification in condom contaminated fingermarks. *The Analyst*(138): 2546–57, 2013
179. Bradshaw R, Bleay S, Clench MR, Francese S: Direct detection of blood in fingermarks by MALDI MS profiling and imaging. *Science & justice journal of the Forensic Science Society*(54): 110–7, 2014
180. Ferguson LS, Creasey S, Wolstenholme R, Clench MR, Francese S: Efficiency of the dry-wet method for the MALDI-MSI analysis of latent fingermarks. *Journal of mass spectrometry JMS*(48): 677–84, 2013
181. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L: Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical chemistry*(90): 240–65, 2018
182. Suen KC, Wood WS, Syed AA, Quenville NF, Clement PB: Role of imprint cytology in intraoperative diagnosis: value and limitations. *Journal of clinical pathology*(31): 328–37, 1978

183. Chao C, Wong SL, Ackermann D, Simpson D, Carter MB, Brown CM, Edwards M, McMasters KM: Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *The American Journal of Surgery*(182): 609–15, 2001
184. Nowikiewicz T, Śrutek E, Głowacka-Mrotek I, Tarkowska M, Żyromska A, Zegarski W: Clinical outcomes of an intraoperative surgical margin assessment using the fresh frozen section method in patients with invasive breast cancer undergoing breast-conserving surgery - a single center analysis. *Scientific reports*(9): 13441, 2019
185. Novis DA, Zarbo RJ: Interinstitutional comparison of frozen section turnaround time. A College of American Pathologists Q-Probes study of 32868 frozen sections in 700 hospitals. *Arch Pathol Lab Med*(121): 559–67, 1997
186. Jaafar H: Intra-operative Frozen Section Consultation: Concepts, Applications and Limitations. *Malaysian Journal of Medical Science*(13): 4–12, 2006
187. Ramadoss J, Lunde ER, Ouyang N, Chen W-JA, Cudd TA: Acid-sensitive channel inhibition prevents fetal alcohol spectrum disorders cerebellar Purkinje cell loss. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*(295): 596-603, 2008

7 Lebenslauf

Name: Tim Kümmel

Geboren am: 20. Oktober 1991 in Hanau

Beruflicher Werdegang:

Seit 2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschule Mannheim am Institut CeMOS (Center for Biomedical Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy)

Forschungsbereich: optische Messtechnik im Bereich Medizintechnik

Ausbildung:

Seit 2018 Doktorand an der Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim

2016-2017 Hochschule Mannheim
Studiengang: Automatisierungs- und Energiesysteme (Master)
Abschluss: Master of Science; Oktober 2017

2012 – 2016 Hochschule Heilbronn
Studiengang: Mechatronik und Mikrosystemtechnik (Bachelor)
Abschluss: Bachelor of Engineering; Februar 2016

2011 – 2012 Kolping-Bildungszentrum Berufskolleg in Heilbronn
Abschluss: Fachhochschulreife; Juli 2012

Berufsausbildung:

2008 – 2011 Zerspanungsmechaniker bei Fa. Gerd Bär GmbH (Heilbronn)
Berufsschule: Christian-Schmidt-Schule, Neckarsulm
Abschluss: Zerspanungsmechaniker (IHK); Juli 2011

Publikationen:

Peer-Reviewed und open Access:

- 2021 Kümmel T, van Marwick B, Rittel M, Ramallo Guevara C, Wühler F, Teumer T, Wängler B, Hopf C, Rädle M: Rapid brain structure and tumour margin detection on whole frozen tissue sections by fast multiphotometric mid-infrared scanning. *Scientific reports* 11(1): 11307, 2021.
- 2019 Kümmel T, Teumer T, Dörnhofer P, Methner F-J, Wängler B, Rädle M: Contrast enhancement of surface layers with fast middle-infrared scanning. *Heliyon* 5(9): e02442, 2019.
- 2018 Hien A, Pretze P, Braun F, Schäfer E, Kümmel T, Roscher M, Schock-Kusch D, Wladeck J, Müller B, Wängler C, Rädle M, Wängler B: Noncontact recognition of fluorescently labeled objects in deep tissue via a novel optical light beam arrangement. *Plos One* 13(12): e0208236, 2018.

Non-Peer-Reviewed:

- 2020 Kümmel T, van Marwick B, Rädle M: Small structures in focus. *Transfer – Das Online-Magazin des Steinbeis-Verbunds* Edition 3, 2020.
- 2020 Rabe J-H, Kümmel T, Rädle M, Hopf C: Kombiniertes Infrarot- und Massenspektrometrie-Scanning. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 1-2, 2020.
- 2019 Beyerer J, Leon FP, Längle T: Optical characterization of materials: Conference proceedings. *Opt. Charact. Mater.* 4: 23–33, 2019.

Fachvorträge:

- 2019 Mittelinfrarotes Imaging zur nicht-invasiven Substanzerkennung. *Arbeitsgruppe Bildverarbeitung*, 10. April 2019, Darmstadt.
- 2019 Absorption Properties of lipid-based substances by non-invasive fast mid-infrared imaging. *4th International Conference on Optical Characterization of Materials (OCM)*, 13. März 2019, Karlsruhe.

8 Danksagung

Mein ganz persönlicher Dank richtet sich in erster Linie an meinen Doktorvater Prof. Dr. Björn Wängler, welcher mich während meiner Promotion zu jeder Zeit unterstützt, betreut und mir ausreichende Freiheiten zur erfolgreichen Bearbeitung dieser Arbeit gegeben hat. Außerdem möchte ich mich bei der Institutsleitung von CeMOS (Center for Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy), Herrn Prof. Dr. Rädle und Herrn Prof. Dr. Hopf, für die hochschulseitige Betreuung bedanken und die Bereitstellung von diversen Fördergeldern zur Bearbeitung dieser Dissertation. Persönlich freue ich mich ganz besonders über die Leidenschaft und das Engagement, welches ich bei Ihnen für dieses Thema geweckt habe. Hier sei auch besonders dem Bundeswirtschaftsministerium und dem Arbeitskreis industrieller Forschung (AiF) gedankt. Speziell möchte ich mich an dieser Stelle auch noch einmal bei Herrn Prof. Dr. Rädle für die konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die ich sehr schätze.

Mein größter Dank richtet sich jedoch an meine Ehefrau, die mich jederzeit mit vollem Einsatz unterstützt und mir den Rücken für diese Promotion (und allen damit zusammenhängenden Pflichten) freigehalten hat. Ohne sie hätte ich mir zu keiner Zeit die Bearbeitung dieser Arbeit zugemutet. Auch bei meiner gesamten Familie möchte ich mich an dieser Stelle für das große Interesse, Verständnis und speziell das Tragen im Gebet bedanken. Ich bin sehr dankbar euch in dieser Zeit hinter mir gewusst zu haben.

Vielen Dank auch an die Firma Novanta Europe GmbH (ehemals ARGES GmbH), speziell Daniel Schwab und Dmitry Badyukov, für die Auslegung des MIR-Scanners und die tatkräftige Unterstützung, während und nach dem gemeinsamen Förderprojekt.

Auch bei meinen Kollegen Björn van Marwick, Dr. Tobias Teumer, Natascha Heß-Mohr, Annabell Heintz, Marcel Nachtmann und Susanne Wolber möchte ich mich für die vielen konstruktiven Hilfestellungen zum Schreiben und Vollenden dieser Dissertation bedanken. An dieser Stelle möchte ich mich zusätzlich auch bei allen Kollegen, die mich auf meinem Promotionsweg begleitet haben, für den freundschaftlichen Um-

gang im Institut bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Carina Ramallo Guevara, Miriam Rittel, Thomas Enzlein und all meine liebgewonnenen Zimmerkollegen Felix Wühler, Kevin Kastner, Joel Lehmann, Isabel Medina und Kerstin Schlachter.

Nicht zuletzt bedanke ich mich auch für die finanzielle Unterstützung durch die Karl-Völker-Stiftung (KVS), die mir den Bau des MIR-Scanners ermöglicht hat. Durch sie konnten auch einige Studenten der Hochschule Mannheim ihre Abschlussarbeit am entwickelten MIR-Scanner erfolgreich durchführen und Einblicke in die lasergestützte Spektroskopie erhalten. An dieser Stelle möchte ich nicht verpassen auch (nochmals) Björn van Marwick, Maximilian Schilling, Paul Tullius und Dayana Kader (welche ihre studentische Arbeit bei mir in diesem Thema geschrieben haben) zu danken.

Vielen Dank für die tolle Zeit, die ihr/Sie mir während meiner Promotion gemacht habt! Ich werde sie nie vergessen.