

Abschlussbericht

Forschungsprojekt: Raman-Spektroskopie von nativen Hirntumorproben

Projekt: 7/14

Laufzeit: 01.01.2015-31.12.2015

Prof. Dr. Gabriele Schackert

Prof. Dr. Matthias Kirsch

Dr. Gerald Steiner

TU Dresden, Medizinische Fakultät Cars Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

1. Aufgabenstellung

Im Rahmen des Projektes sollte die Ramanspektroskopie für die neurochirurgische und neuropathologische Diagnostik in einem kliniknahen Umfeld erforscht werden. Das Potential der Technik für eine operationsbegleitende Analyse von Hirntumoren sollte abgeschätzt und insbesondere in Hinblick auf die Unterscheidung von Normal- und Tumorgewebe, die Identifikation von Tumorzellinfiltraten und die Gewebeklassifikation bewertet werden. Die folgende zentrale Fragestellung sollte beantwortet werden: Ist eine zuverlässige intraoperative Detektion jeglicher Tumorentitäten und eine Abgrenzung zu umgebendem Hirngewebe mittels Raman-Spektroskopie möglich?

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Sämtliche Arbeitspakete des Projektes wurden wie geplant durchgeführt.

3. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens

In Zusammenarbeit mit dem OP-Team der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie wurden als wesentliche Voraussetzung für dieses Projekt standardisierte Protokolle für die Analyse von frischen, nativen Hirntumorbiopsien erstellt. Weiterhin wurden die Parameter für die Registrierung der Ramanspektren etabliert und optimiert und Analysestrategien für die Auswertung der spektralen Datensätze erarbeitet.

3.1 Probenakquise

Um einen hohen Grad an Translation in einem klinischem Umfeld zu erzielen, wurden frische Tumorproben spektroskopisch untersucht. Die Biopsieproben werden im Rahmen von regulären Tumorresektionen entnommen und direkt im Anschluss (binnen weniger Minuten nach Entnahme) mit Raman Spektroskopie untersucht. Im Projektzeitraum von zwölf Monaten wurden 126 Proben operations-begleitend untersucht. Die Tumorarten, welche untersucht werden konnten, wurden für die Analyse zu Gruppen zusammengefasst und sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Humane Gewebeproben, die mittels Ramanspektroskopie untersucht wurden. „Andere“ beinhaltet Tumore, die nur selten/einmalig gemessen werden konnten (Neurozytom (2x), Kavernom, Hypophysenadenom-Rezidiv, dysembryoblastischer neuroepithialer Tumor, Hämangioperizytom, Gangliogliom, Subependymom, hormoninaktives Hypophysenadenom, Chordomrezidiv, atypisches Plexuspailom, multiples Mylelom).

	Anzahl Patienten	Anzahl Spektren
Epilepsie (nicht neoplastisch)	6	34
Glioblastom	33	166
Glioblastom – Rezidiv	10	50
Oligoastrozytom	3	20
Astrozytom	5	30
Neurinom	7	33
Meningiom	30	165
Hirnmetastasen	17	88
Nekrose / reaktives Gewebe	3	20
Andere	12	61

3.2 Etablierung Messparameter

Initial wurden Aufnahmeparameter und verschiedene Objektive (10x vs. 50x Objektiv) getestet. Es zeigte sich, dass mit den Objektiven ein vergleichbares Signal zu Rausch Verhältnis erzielt werden kann und auch Banden mit geringer Intensität, z. B. DNA bei 780 cm^{-1} gut aufgelöst werden. Mit dem 10x Objektiv kann ein größerer Messbereich erfasst werden, wodurch mögliche lokale Gewebeveränderungen oder -kontaminationen weniger das Spektrum beeinflussen (Durchmesser des Anregungslasers auf der Probe: 50x: $20\mu\text{m}$, 10x: $120\mu\text{m}$). Weiterhin vereinfacht der große Arbeitsabstand des 10x Objektivs (13 mm) die Durchführung der Messung und Kontaminationen der Optik durch die Tumorprobe sind ausgeschlossen. Als Standardparameter wurden eine Aufnahmezeit von 2 s und eine 20-fache Aufsummierung gewählt. Von jeder Probe wurden fünf Spektren an unterschiedlichen Positionen aufgenommen. Die gesamte Messzeit pro Probe betrug $< 10\text{ min}$.

3.3 Probenqualität

Gewebeproben, die direkt aus dem Situs zur Messung gelangen, unterliegen einem raschen Trocknungs- und Abbauprozess, dem insbesondere für die empfindlichen spektroskopischen Messungen Rechnung getragen werden muss. Daher wurden Serienuntersuchungen zur Abhängigkeit der Qualität spektroskopischer Messungen von der zunehmenden Trocknung der Gewebeproben an murinen Hirngewebe und exemplarisch an humanen Tumorproben durchgeführt.

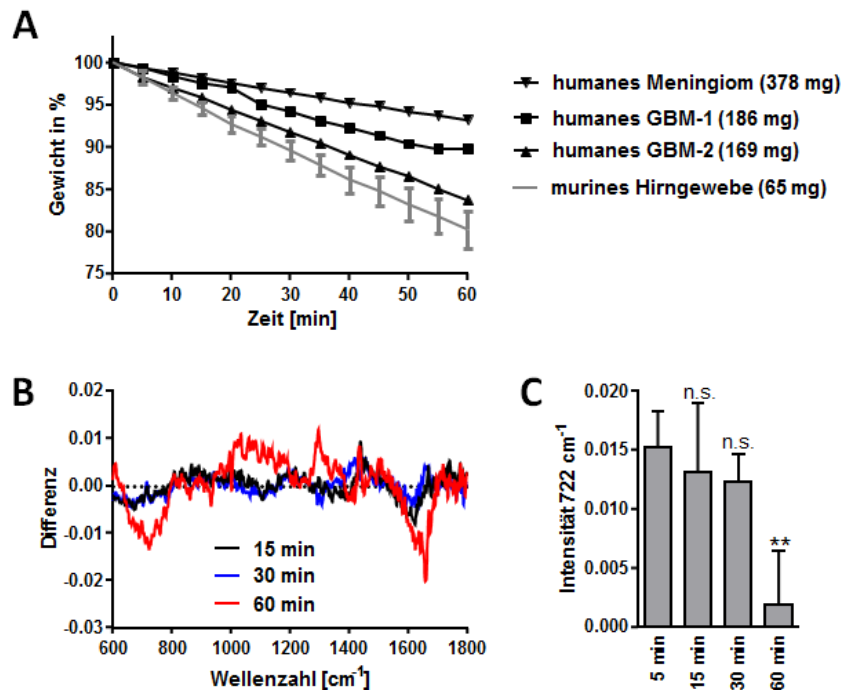


Abb. 1: Zeitverlauf der Gewebeveränderung nach Entnahme. A: Wasserverlust des Gewebes unter Normalbedingungen innerhalb einer Stunde. B: Differenzspektren zum Ramanspektrum 5 min nach Gewebeentnahme. C: Intensität der Bande bei 722 cm^{-1} . n.s. kein signifikanter Unterschied bzw. ** signifikanter Unterschied ($P=0,0028$) zur Intensität am Zeitpunkt 5 min, t-test.

Abbildung 1 zeigt Veränderungen der Proben in Abhängigkeit von der Zeitdauer nach Entnahme und zunehmender Trocknung. Die lineare Gewichtsabnahme während der 60 min ist ein Indikator für den Wasserverlust der Probe. Diese ist bei größeren (schwereren) Proben geringer ausgeprägt (Abb. 1A). Bis

zum Zeitpunkt 30 min sind im Differenzspektrum nur geringe Veränderungen zu beobachten. Nach 60 min sind deutliche Veränderungen sichtbar (Abb. 1B). Die Intensität der Bande bei 722 cm^{-1} war nach 60 min signifikant reduziert und deutet auf die Degradation von DNA/RNA hin (Abb. 1C).

Die Gewebesanalyse mit Ramanspektroskopie kann somit in einem Zeitfenster bis 30 min nach Entnahme stattfinden, da die Technik gegenüber dem Wassergehalt der Probe unempfindlich ist und nur geringe chemische Veränderungen des Gewebes in diesem Zeitraum gefunden wurden.

3.4 Dokumentation und Pathologie

Sämtliche humanen Proben, welche im Rahmen des Projektes untersucht wurden, sowie die tierexperimentellen Daten wurden in einer Datenbank hinterlegt. Nach Cryokonservierung wurden Dünnschnitte der gemessenen Proben angefertigt, immunhistologisch gefärbt und beurteilt. Die entsprechenden pathologischen Diagnosen wurden eingepflegt (Abb. 2).

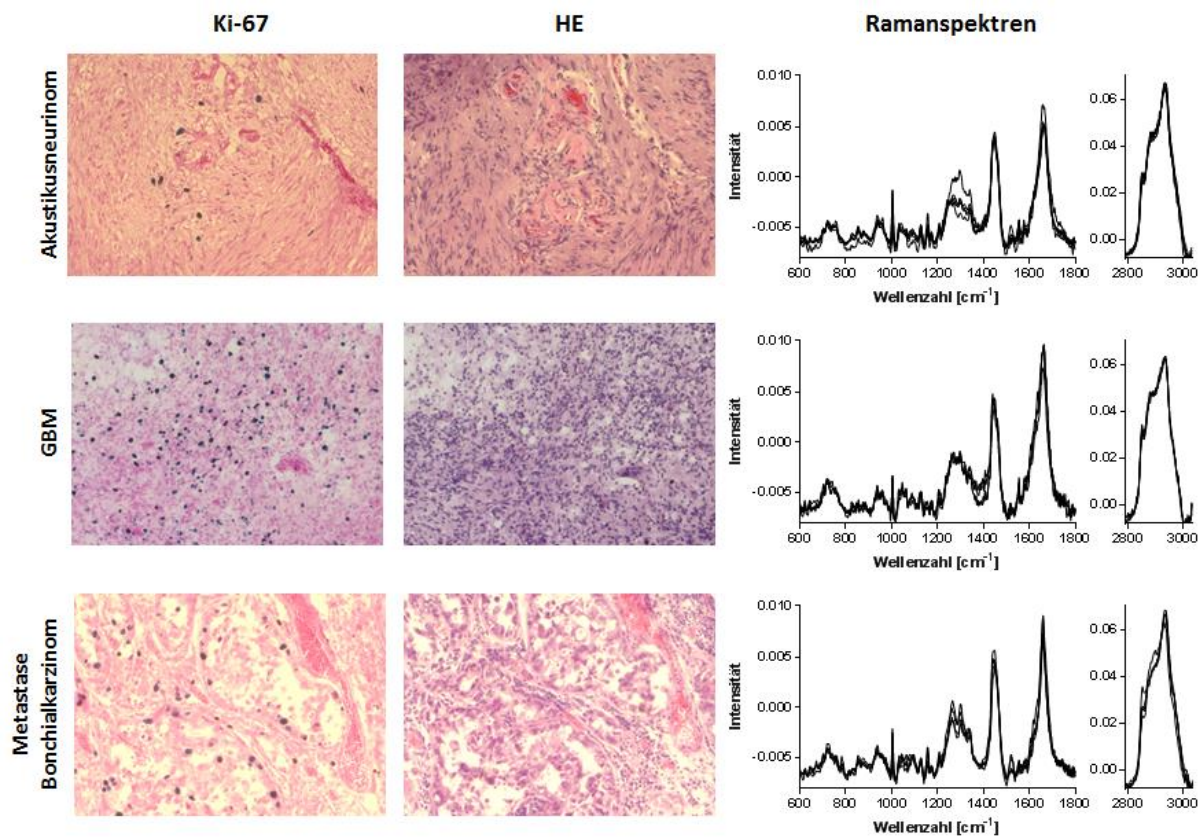


Abbildung 2: Histopathologie und Ramanspektren. Immunhistochemische Färbung von Ki-67 (proliferierende Zellen) und Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurde an der gemessenen Probe durchgeführt. Ramanspektren wurden an fünf Positionen aufgenommen. Unterschiede in den Ramanspektren einer Probe spiegeln die chemische Heterogenität des Gewebes wieder.

3.5 Operations-begleitende spektroskopische Analyse von Hirntumorbiopsien

Die registrierten Spektren geben Aufschluss über die biochemischen Bestandteile der Probe. Diese Methodik ist potentiell dafür geeignet, innerhalb kürzester Zeit während der Operation diagnostische Informationen für den Operateur zu liefern.

Die Rohspektren wurden auf den informationstragenden Bereich reduziert, eine Basislinie subtrahiert und normalisiert. Spektren, die außerhalb des Bereichs der Standardabweichung der Gruppen lag wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Der Vergleich von nicht-neoplastischem Gewebe aus Epilepsiechirurgien und Tumorgewebe ermöglichte die Identifikation relevanter Banden im Mittelwertspektrum der unterschiedlichen Tumortypen (Abb. 3, links). Der Fischerkoeffizient (Abb. 3, rechts) zeigt spektrale Bereiche auf, welche sich statistisch signifikant zwischen nicht neoplastischem Gewebe und dem jeweiligen Tumortyp unterscheiden.

Bei allen Tumorentitäten ist der Bereich von $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ deutlich reduziert. Dies bestätigt die Daten von Kalkanis et al. (J Neurooncol 2014: 116:477–485) an GBM und erweitert diese Erkenntnis auf weitere Tumortypen.

Bei Glioblastomen (GBM) sind Banden, die Lipiden zugeordnet werden können ($1297, 2850, 3011\text{ cm}^{-1}$) reduziert. Die Intensität der Bande bei 1660 cm^{-1} (Proteinen zugeordnet) ist im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe erhöht und weist bei 1622 cm^{-1} eine zusätzliche Schulter auf. Diese Veränderungen sind bei GBM Rezidiven und niedriggradigen Gliomen (Oligoastrozytom und Astrozytom) geringer ausgeprägt.

Bei Neurinomen finden sich zusätzliche Banden bei 1158 und 1521 cm^{-1} , welche Carotinoiden zugeordnet werden können. In den Spektren von Meningiomen und Metastasen finden sich ähnliche Veränderungen. Die Bande bei 700 cm^{-1} (Cholesterol) fehlt weitestgehend; Banden welche Kollagen zugeordnet werden können sind erhöht ($755, 856, 938, 1031, 1236, 1401\text{ cm}^{-1}$)

3.6 Klassifizierung

Weiterhin war eine verlässliche Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe auf Basis dieser spektralen Daten möglich. Nach Auswahl von fünf Datenpunkten des Spektrums ($1090, 1217, 1297, 1622, 3011\text{ cm}^{-1}$, grau in Abb. 3, rechts markiert) wurde eine Klassifizierung mit Hilfe der Minimaldistanz (Mahalanobis) mit der „leave one out“ Methode durchgeführt. Dies ermöglichte eine zu 97% korrekte Unterscheidung von Tumor und nicht-neoplastischem Gewebe.

Auch eine Unterscheidung von hirneigenen Tumoren (Gliomen) und Metastasen peripherer Tumore ist durch eine Klassifizierung möglich. Basierend auf den Banden bei $700, 856, 1033, 1241$ und 2838 cm^{-1} wurden 85 % der Spektren der korrekten Klasse zugeordnet.

4. Verwertung der Ergebnisse

Die im Rahmen des Projektes erhobenen Daten bestätigen, dass eine Unterscheidung von Hirntumoren und normalem Hirngewebe mittels Ramanspektroskopie möglich ist. Dies konnte erstmalig an einer großen Anzahl von frischen Gewebeproben gezeigt werden. Zusätzlich konnte eindeutig belegt werden, dass auch Metastasen peripherer Tumoren eindeutig abgrenzbar sind. Eine intraoperative Anwendung von Ramanspektroskopie in situ bei Hirntumoroperationen wurde während der Projektlaufzeit erstmalig von Jermyn et al. (Sci Transl Med 2015: 7 (274): 274ra19) beschrieben. Damit sind optimale Voraussetzungen für eine Translation dieser Technologie in den klinischen Diagnostikprozess gegeben.

Eine Publikation befindet sich in Vorbereitung.

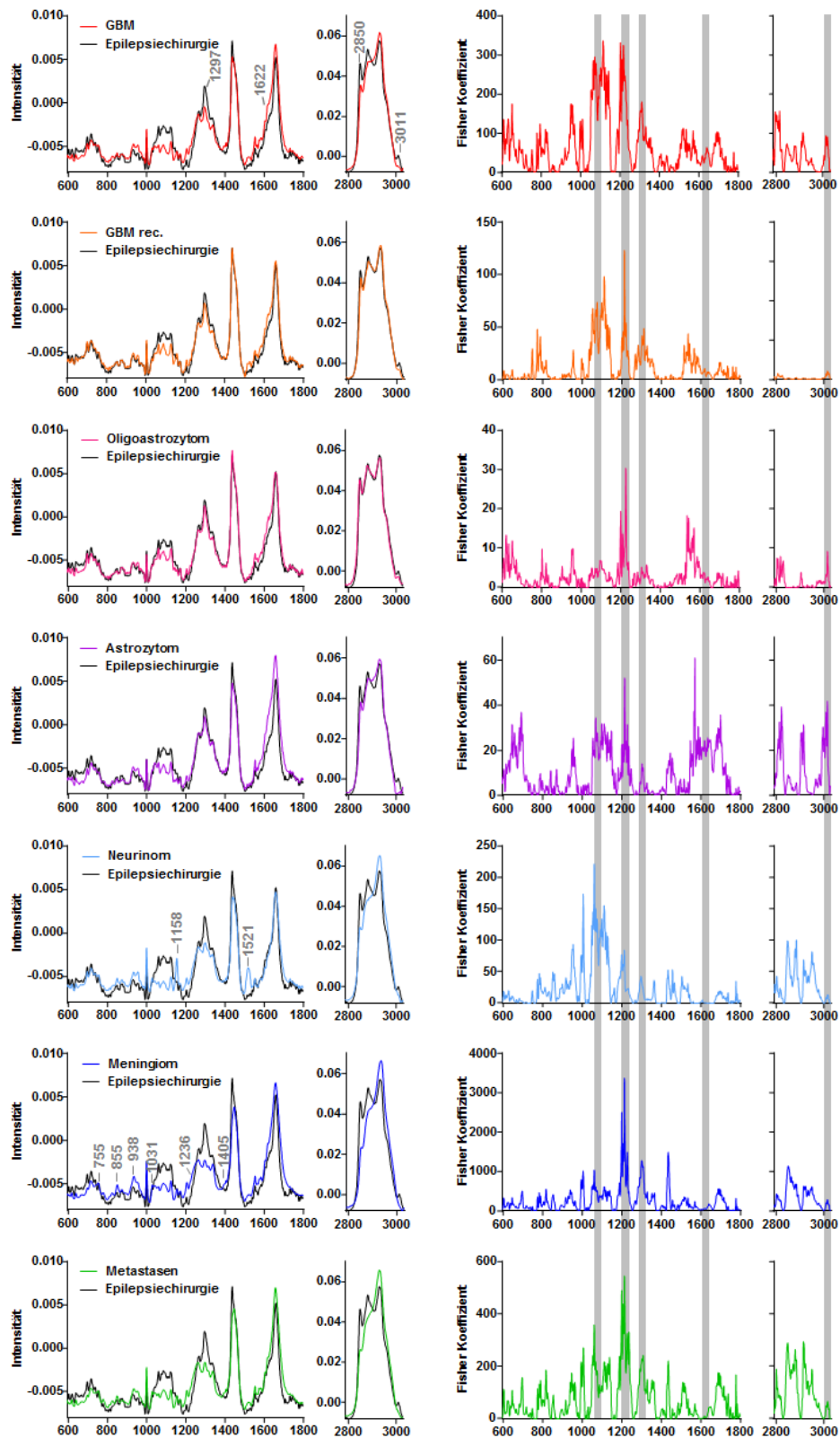


Abb. 2: Ramanspektroskopie verschiedener Hirntumortypen. Links: Mittelwertspektren der Tumortypen im Vergleich zu humanem nicht-neoplastischem Hirngewebe aus Epilepsiechirurgien. Rechts: entsprechender Fisherkoeffizient. Die Banden, die zur Klassifizierung ausgewählt wurden sind grau hinterlegt (1090 cm^{-1} , 1217 cm^{-1} , 1297 cm^{-1} , 1622 cm^{-1} , 3011 cm^{-1}).