



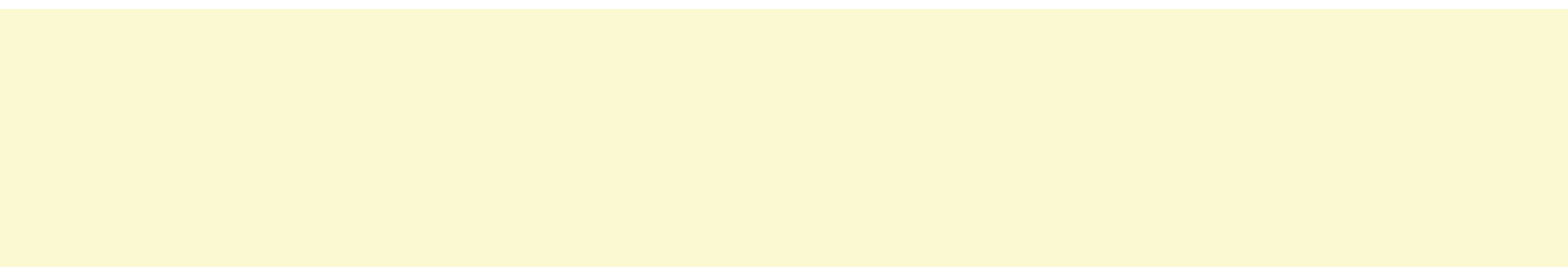
Forschungsergebnisse

# Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

---

Multiskalige molekulare Bildgebung



## Multiskalige molekulare Bildgebung

Dieses Projekt wurde im Rahmen der Ausschreibung „Forschung Optische Technologien 2010: Multiskalige optische Messverfahren“ finanziert durch die Baden-Württemberg Stiftung gGmbH.

Die molekulare Bildgebung basiert derzeit vorwiegend auf der Behandlung von Proben mit Farbstoffen oder fluoreszenzbasierten Marker-Substanzen. Die Zugabe derartiger Reagentien beeinträchtigt jedoch konzeptionell die zu untersuchende Probe und verändert diese zumeist irreversibel. Daher kann es wünschenswert sein, eine reagensfreie Methode zur molekulspezifischen Bildgebung zur Verfügung zu stellen.

Unter den reagensfreien Ansätzen befinden sich die Verfahren der Schwingungsspektroskopie. Werden die Spektren molekularer Schwingungen – insbesondere Mittelinfrarotspektren oder Ramanspektren – ortsabhängig aufgezeichnet, so kommt diese Mittelinfrarot- oder Ramanmikroskopie einer reagensfreien, molekularen, häufig als „hyperspektral“ bezeichneten Bildgebung gleich. Hierbei liegt die Stärke der Infrarotmikroskopie aufgrund des großen Wirkungsquerschnitts im sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und, für den Fall der Ramanmikroskopie, aufgrund der kürzeren Wellenlänge in der guten Ortsauflösung.

Im von der Baden-Württemberg Stiftung finanzierten Projekt „Multiskalige molekulare Bildgebung (MMB)“ ist es erstmals gelungen, großflächige Infrarot-mikroskopische Bilder mit der gezielten Raman-mikroskopischen Untersuchung ausgewählter Bildbereiche zu verknüpfen.

In Abbildung 1 wird ein typisches Beispiel auf Basis herkömmlicher Methoden der Schwingungsspektroskopie (d.h. Infrarot- und Ramanspektroskopie) gezeigt. Die langsamste Methode

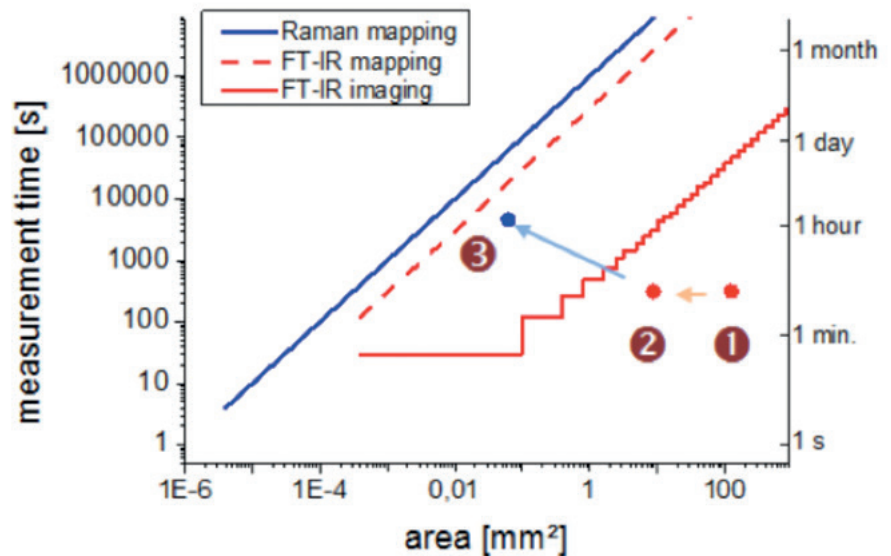
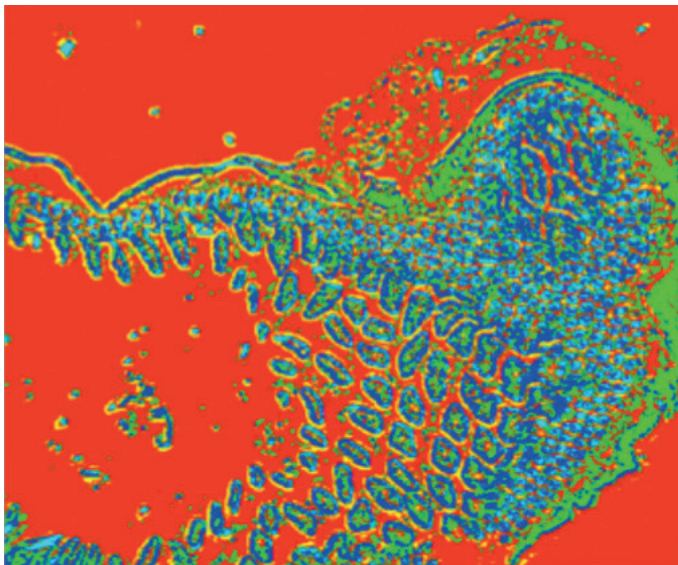


Abb. 1: Vorgehensweise zur multiskaligen Bildgebung bestehend aus (1) rascher Infrarotmikroskopie großer Flächen mit moderater Ortsauflösung, (2) etwas detaillierterer Infrarotmikroskopie vorausgewählter Flächen und letztlich (3) der hochauflösenden Messung kleiner Flächen mittels Ramanspektroskopie (die eingetragenen Werte beziehen sich auf eine durchgehende Messreihe an Polystyrolkugeln auf einem BaF<sub>2</sub> Substrat). Zum Vergleich sind typische Zeiten (rot) der bildgebenden Fouriertransformations-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie und (blau) der Ramanspektroskopie dargestellt.

ist in diesem Beispiel das schrittweise Abtasten einer Fläche (durch mechanisches Verfahren des Objektträgers) auf Basis der spontanen Ramanspektroskopie („Raman mapping“). Die Vermessung verhältnismäßig kleiner Flächen von beispielsweise 1 mm<sup>2</sup> erfordert bereits in der Praxis eine Messdauer von Tagen. Der hohe Zeitbedarf entsteht hierbei aus der Notwendigkeit der mechanischen Bewegung sowie dem geringen Wirkungsquerschnitt der Ramanspektroskopie. Aufgrund der höheren Sensitivität der Infrarotspektroskopie erscheint hier aus diesem Grund das Abrastern im mittleren infraroten Spektralbereich („FT-IR mapping“) etwas vorteilhafter, wobei das grundlegende Problem der mechanischen Bewegung bestehen bleibt. Ein deutlicher Schritt zu einer kürzeren Messdauer entsteht erst bei der Verwendung ortsauflösender Detektoren („FT-IR imaging“). Zum Beispiel kommt bei der FT-IR Spektroskopie typischerweise ein gekühltes Array aus HgCdTe-Detektoren

zum Einsatz. Diese sind jedoch teuer, in der Pixelanzahl derzeit auf ca. 128 x 128 Pixel beschränkt und erfordern in der Regel eine Kühlung mit flüssigem Stickstoff.

Im Rahmen des Projekts wurde ein Durchbruch in der für die Infrarotmikroskopie benötigten Messdauer erzielt – je nach Vergleich sogar eine Verkürzung von 18 Stunden auf 5 Minuten. Dies ist durch die Verwendung der jetzt verfügbaren Quantenkaskadenlaser (QCL) möglich geworden. Gleichzeitig können die Ansprüche an die Detektion durch die hohe spektrale Energiedichte der QCLs gesenkt werden, sodass auf die Kühlung eines Detektorarrays mit flüssigem Stickstoff komplett verzichtet werden kann. Insbesondere kommen in Verbindung mit den leistungsstarken QCLs kostengünstige Mikrobolometerarrays als Detektoren in Betracht [1], die zudem noch mit einer deutlich höheren Zahl an Pixeln verfügbar sind.



**Abb. 2: Ergebnis der Clusteranalyse eines hyperspektralen Mittelinfrarotbildes eines Gewebeschnittes durch den Dünndarm einer Maus. Der Bildausschnitt entspricht einer Fläche von 3,2 x 2,8 mm<sup>2</sup> und basiert auf der QCL-basierten Mikroskopie in einem Spektralbereich von 1030...1090 cm<sup>-1</sup> (9,7...9,2 µm). Die gesamte Messzeit betrug 5 Minuten [7].**

Am Beispiel von Polystyrolkugeln konnte das Verfahren demonstriert werden, wobei die multiskalige molekülspezifische Bildgebung von 100 mm<sup>2</sup> Bildfeld bei 20 µm lateraler Auflösung bis hinab zu 0,01 mm<sup>2</sup> bei 2 µm Auflösung gezeigt werden konnte. Für groß- und mittelformatige Probenbereiche kam hierbei eine von uns entwickelte Variante der Infrarotmikroskopie auf Basis von durchstimmbaren QCLs sowie mikrobolometrischen Detektorarrays und für den kleinformatischen Bereich das klassische Raman mapping zum Einsatz [2].

Erstmals wurde die Methode an biologischen Proben eingesetzt und mit der klassischen FT-IR Mikroskopie verglichen [3,4]. Abbildung 2 zeigt das mittels Clusteranalyse bearbeitete hyperspektrale Bild eines in Paraffin eingebetteten Gewebeschnittes eines Mäusejejunums (Jejunum: Leerdarm, Teil des Dünndarms).

Das in einem engen Wellenzahlbereich von nur 60 cm<sup>-1</sup> gemessene Bild wurde in nur 5 Minuten akquiriert und ist offensichtlich bereits geeignet, verschiedene Gewebeselemente klar zu kontrastieren. Um einen Vergleich mit herkömmlichen FT-IR Mikroskopen zu bewerkstelligen, wurde die identische Probe mit einem Hyperion 1000 im Sinne des IR-mapping abgerastert und mit einem Hyperion 3000 (FT-IR Imaging) vermessen. Um die Messzeit im Rahmen zu halten, wurde hier nur ein Ausschnitt von 171 x 171 µm<sup>2</sup> spektral untersucht. Die Messdauer für diesen kleinen Bildausschnitt betrug beim FT-IR-imaging 17 Minuten und beim FT-IR-mapping 18 Stunden. Mit dem QCL konnte im Gegensatz dazu bei gleicher lateraler Auflösung eine 300-fach größere Fläche in nur 5 Minuten gemessen werden. Umgekehrt musste sich die QCL-Mikroskopie hierbei auf einen kleineren Spektralbereich beschränken – allerdings wird hierdurch die Interpre-

tation der gewonnenen Daten im Sinne der Clusteranalyse nicht beeinträchtigt, wie der Vergleich der Analyseergebnisse zeigt. Will man trotzdem den breiteren Spektralbereich der FT-IR Spektroskopie gerecht werden, so kann man die Messdauer auf die Bildfläche und den Wellenzahlbereich normieren. Auch in diesem Vergleich der Flächen- und Bandbreiten-korrigierten Messdauer schneidet die QCL-basierte Mikroskopie deutlich besser ab:

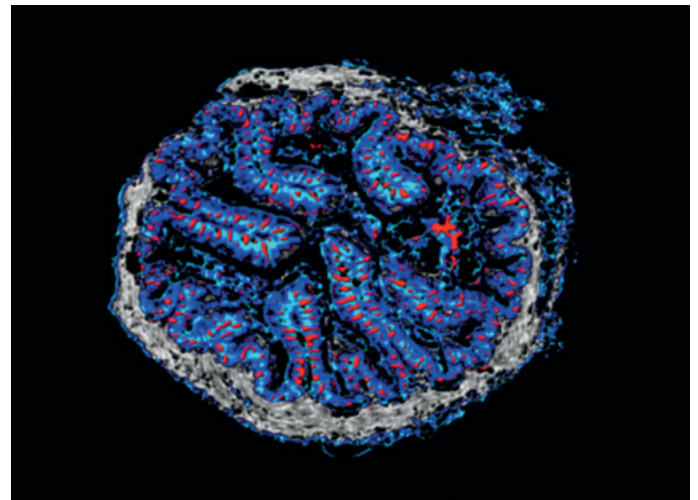
Um die praktische Relevanz zumindest ansatzweise zu illustrieren, wurde die Methode im Umfeld der zusätzlichen differentialdiagnostischen Applikation im Krankheitsbild der colitis ulcerosa, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, angewendet. Die Differentialdiagnostik basiert neben klinischen, labor-medizinischen, radiologischen und endoskopischen Untersuchungen ggf. auch auf der Entnahme einer Biopsie. Eines der Erkennungsmerkmale in histologischen Schnittbildern sind morphologische Veränderungen in Größe und/oder Anzahl von Becherzellen im Epithel. Für die Untersuchung der Mucin-produzierenden Becherzellen in Mäusedarm standen QCLs in den Wellenlängenbereichen von 9,74 ... 9,20 µm und 8,57 ... 7,58 µm zur Verfügung, welche den Spektralbereich der Eigenschwingungen von Glykoproteinen beinhalten. Die QCL-basierte Messung dauerte insgesamt nur 7,5 Minuten, was bei einer machbaren Eingrenzung auf die spezifischen Glykoproteinbanden noch auf deutlich unterhalb einer Minute reduziert werden kann.

FTIR-MAPPING	FTIR-IMAGING	QCL-IMAGING
740 s/[mm <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> ]	12 s/[mm <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> ]	0.6 s/[mm <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> ]

QCL-basierte molekulare Bildgebung ist somit selbst unter Berücksichtigung des (biochemisch motivierbaren) eingeschränkten Wellenlängenbereichs um ein bis drei Größenordnungen besser als die herkömmliche FT-IR Mikroskopie.

Insofern scheint es in diesem konkreten medizinischen Anwendungsbeispiel machbar, kontrastreiche und für die Differentialdiagnostik relevante histologische Bilder auch ohne Färbetechniken zu erhalten. Es ist anzumerken, dass die infrarotspektroskopische Untersuchung zerstörungsfrei ist und daher derselbe Schnitt nach der QCL-basierten Spektroskopie für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht, d.h. zusätzlich noch für speziellere Fragestellungen beispielsweise mittels Immunohistochemie angefärbt werden könnte.

**Abb. 3: Mucin-spezifische Falschfarbendarstellung des Verhältnisses der Infrarotabsorbanz bei 2 Wellenlängen [2,4] zur Lokalisation der Becherzellen in Mäusedarm.**



Im Laufe des MMB-Projekts sind drei Publikationen veröffentlicht worden [1,2,5] sowie zwei Erfindungsmeldungen entstanden, die zum Patent angemeldet wurden. Das Projekt resultierte zudem in drei Bachelorarbeiten [6-8], einer Masterarbeit [9], und einer Dissertation [3]. Die Ergebnisse gewannen den Analyst Best Poster Award der SPEC 2014 Konferenz.

- [1] Rapid hyperspectral imaging in the mid-infrared – N. Kröger, A. Egl, M. Engel, N. Gretz, K. Haase, I. Herpich, S. Neudecker, A. Pucci, A. Schönhals, W. Petrich, Proc. SPIE 8939 (2014) 89390Z
- [2] Quantum cascade laser-based hyperspectral imaging of biological tissue – N. Kröger, A. Egl, M. Engel, N. Gretz, K. Haase, I. Herpich, B. Kränzlin, S. Neudecker, A. Pucci, A. Schönhals, J. Vogt, W. Petrich, J. Biomed. Optics 19 (2014) 111607
- [3] Multiskalige molekulare Bildgebung – Niels Kröger-Lui, Dissertation, Universität Heidelberg (2015).
- [4] Rapid hyperspectral imaging in the mid-infrared – Niels Kröger, Alexander Egl, Maria Engel, Norbert Gretz, Katharina Haase, Iris Herpich, Sa-

bine Neudecker, Annemarie Pucci, Arthur Schönhals, Wolfgang Petrich, Eingeladener Vortrag bei der SPIE Photonics West, San Francisco (2014)

- [5] Rapid identification of goblet cells in unstained colon thin sections by means of quantum cascade laser-based infrared microspectroscopy – N. Kröger-Lui, N. Gretz, K. Haase, B. Kränzlin, S. Neudecker, A. Pucci, A. Regenscheit, A. Schönhals, W. Petrich, Analyst 140 (2015) 2086-2092, DOI: 10.1039/C4AN02001D
- [6] Zentrale Aspekte der Detektion für die Quantenkaskadenlaser-basierte Infrarotmikroskopie – Katharina Haase, Bachelorarbeit, Universität Heidelberg (2012)
- [7] Charakterisierung eines durchstimmbaren Quantenkaskadenlasers für die Mittelinfrarot-Mikroskopie – Maria Engel, Bachelorarbeit, Universität Heidelberg (2012)
- [8] Wellenzahl- und Leistungsreferenzierung eines Quantenkaskadenlasers zur Mittelinfrarot-Mikrospektroskopie – Alexander Egl, Bachelorarbeit, Universität Heidelberg (2013)

- [9] Mutual interactions in simultaneous Raman and mid-infrared microspectroscopy – Iris Herpich, Masterarbeit, Universität Heidelberg (2013) (nicht veröffentlicht).

#### Kontakt

Prof. Dr. Norbert Gretz  
 Zentrum für Medizinische  
 Forschung (ZMF)  
 Universität Heidelberg  
 Medizinische Fakultät Mannheim  
 Theodor-Kutzer-Ufer  
 D-68167 Mannheim

Prof. Dr. Wolfgang Petrich  
 (Koordinator)  
 Kirchhoff-Institut für Physik  
 Universität Heidelberg  
 Im Neuenheimer Feld 227  
 69120 Heidelberg

Prof. Dr. A. Pucci  
 Kirchhoff-Institut für Physik  
 Universität Heidelberg  
 Im Neuenheimer Feld 227  
 69120 Heidelberg