

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier

***Analyse von Hirn- und Hirntumorgewebe durch
Optische Kohärenztomographie***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Hans – Joachim Böhringer
aus Bassum

Lübeck 2007

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Alf Giese

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Julia Welzel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen Eltern
Edela und Prof. Dr. agr. Eberhard Böhringer
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	3
1.1 Primäre Hirntumore	3
1.2 Epidemiologie	3
1.3 Gliome.....	4
1.4 Therapie	6
1.5 Invasives Wachstum maligner Gliome.....	9
2. Material und Methoden	14
2.1 Messgeräte	14
2.1.1 Optische Kohärenztomographie (OCT).....	14
2.1.2 TD-OCT (engl.: time-domain OCT)	17
2.1.3 TD-OCT Gerät für in vivo Messungen.....	18
2.1.4 Spektral Domain-OCT (SD-OCT) oder Spektralradar	18
2.1.5 SD-OCT integriertes OP-Mikroskop	19
2.2 Gewebeproben und Histologien	20
2.2.1 Orthotopes allogenes Gliommodell in Maushirn	20
2.2.2 Ex vivo Messungen.....	21
2.2.3 In vivo OCT-Analysen	22
3. Ergebnisse	23
3.1 OCT-Analyse experimenteller Gliome im Mausmodell	23
3.1.1 OCT-Darstellung von nativem Maushirn	23
3.1.2 TD-OCT- und SD-OCT Analyse experimenteller Gliome	24
3.1.3 SD-OCT Darstellung und 3D Rekonstruktion experimenteller Tumore .	26
3.2 Analyse humanen Hirn- und Hirntumorgewebes durch TD-OCT	27
3.2.1 Ex vivo Analyse von humanen Hirn- und Gliombiopsien	27
3.2.2 Intraoperative OCT-Darstellung von Hirn- und Hirntumorgewebe	31
3.3 Vergleichende ex vivo Analyse von humanen Hirntumorbiopsien durch TD-OCT und SD-OCT	34

3.3.1 Einfluss von Formalinfixierung auf das OCT-Signal	35
3.4 Analyse humanen Hirn- und Hirntumorgewebes durch SD-OCT	35
3.4.1 Ex vivo Analyse von humanen Hirn- und Gliombiopsien durch SD-OCT	35
3.4.2 Ex vivo Analyse des Resektionsausmaßes durch SD-OCT	38
3.4.3 Einfluss von Resektionstechniken und chirurgischen Hilfsmitteln auf das SD-OCT Signal	40
3.4.4 SD-OCT integriertes Operationsmikroskop	43
3.4.5 Technische Entwicklung seit Abschluss der hier präsentierten Arbeit...	45
4. Diskussion	47
4.1 Ausblick	51
4.1.1 Klinischer Prüfplan 1. Abschnitt	52
4.1.2 Klinischer Prüfplan 2. Abschnitt	53
4.1.3 Klinischer Prüfplan 3. Abschnitt	53
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Danksagung	60
8. Lebenslauf	61
9. Publikationsliste.....	64

1. Einleitung

1.1 Primäre Hirntumore

Gliome gehören zu der Gruppe der primären Hirntumore. Unter primäre Hirntumore versteht man Tumore, die ihren Ursprung in neuronalem, glialem oder meningealem Gewebe nehmen, aus Geweben der Hirngefäße oder dem Plexus Choroideus hervorgegangen sind. Des weiteren werden primär im ZNS entstandene Lymphome dieser Gruppe zugerechnet (Böcker et al., 1999)

Der zelluläre Ursprung von Gliomen sind die Astrozyten, Oligodendrozyten oder Zellen des Ependyms. Histologisch lassen sich demnach Astrozytome, Oligodendrogliome und Mischgliome, die Oligoastrozytome, sowie Ependymome unterscheiden (Bernstein und Berger, 2000). Die World Health Organisation (WHO) klassifiziert die Gliome nach ihrem Differenzierungsgrad. Das fast nur bei Kindern oder Jugendlichen auftretende Pilozytische Astrozytom entspricht dem WHO Grad I. Bei den differenzierten Astrozytomen und Oligodendrogliomen des Erwachsenenalters handelt es sich um den WHO Grad II. Die anaplastischen Gliome entsprechen dem WHO Grad III, die entdifferenziertesten Tumore der glialen Reihe des WHO Grads IV werden als Glioblastome bezeichnet.

1.2 Epidemiologie

Hirntumore stellen relativ seltene Tumorerkrankungen dar. Primäre Hirntumore haben lediglich einen Anteil von 2% aller malignen Tumorerkrankungen des Menschen (Ellison und Love, 1998). Trotzdem sind sie eine nicht unerhebliche Ursache für Mortalität und Morbidität in der Bevölkerung (Bernstein und Berger, 2000). Dabei bilden die Gliome die größte Gruppe an neu auftretenden primären Hirntumore, gefolgt von den Meningeomen. Neben den Gliomen haben zerebrale Metastasen eine hohe klinische Relevanz, da sie mit einem Anteil von etwa 50% die größte Einzelgruppe der Hirntumore darstellen. 15-30% aller an Malignomen erkrankten Patienten entwickeln zu irgendeinem Zeitpunkt der Tumorerkrankung zerebrale Metastasen (Greenberg, 2001). Betrachtet man die Gruppe der häufigsten primären Hirntumore (Gliome und Meningeome) und fasst alle Altersgruppen zusammen, so kommt es zu etwa 8-9 Neuerkrankungen pro Jahr auf 100000 Einwohner (Preston-Martin, 1996). Es gibt einen deutlichen Zusammenhang zwischen Alter des Patienten und Auftretenswahrscheinlichkeit eines Hirntumors. Während vor dem dreißigsten Lebensjahr maligne Gliome (WHO Grad III und IV) nur selten

auftreten, steigt ab diesem Alter die Anzahl der neu auftretenden Gliome mit zunehmendem Alter stetig an. In der Mitte der sechsten Lebensdekade finden sich dann die meisten Neuerkrankungen. Eine Ausnahme bilden Gliome des WHO Grades I, bei denen es sich um Gliome des Kindes oder des jungen Erwachsenen handelt. Meningeome zeigen einen ähnlichen altersabhängigen Verlauf (Bernstein und Berger, 2000). Bei Gliomen nehmen zudem die malignen Formen mit steigendem Alter zu (Schlegel und Westphal, 1998).

1.3 Gliome

Allgemeine Pathologie

Von allen intrakraniell auftretenden Tumoren machen Gliome einen Anteil von 30-40% aus. 50% dieser Gliome sind Glioblastome (WHO Grad IV) und haben damit einen Anteil von 15-20% an allen intracraniellen Tumoren (Bernstein und Berger, 2000; Böcker et al., 1999). Das Glioblastom hat mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 12 Monaten die schlechtesten Prognose, gleichzeitig einen verhältnismäßig großen Anteil an allen Hirntumoren (Schlegel und Westphal, 1998). Aufgrund des häufigen Auftretens und der schlechten Prognose haben das Glioblastom, aber auch die anderen anaplastischen Gliome, eine hohe Relevanz im klinischen Alltag der Neuroonkologie. Man kann grundsätzlich zwei verschiedene histologische Tumorformen des Glioblastoms unterscheiden. Auf der einen Seite das so genannte „primäre“- oder „de novo“-Glioblastom, das vorwiegend ältere Patienten trifft, auf der anderen Seite das „sekundäre“ Glioblastom, welches aus der malignen Progression niedergradiger Gliome entsteht. Die große Mehrheit der Gliome zeigt ein ausgeprägtes Invasionsverhalten mit weitreichender Infiltration angrenzenden Hirngewebes.

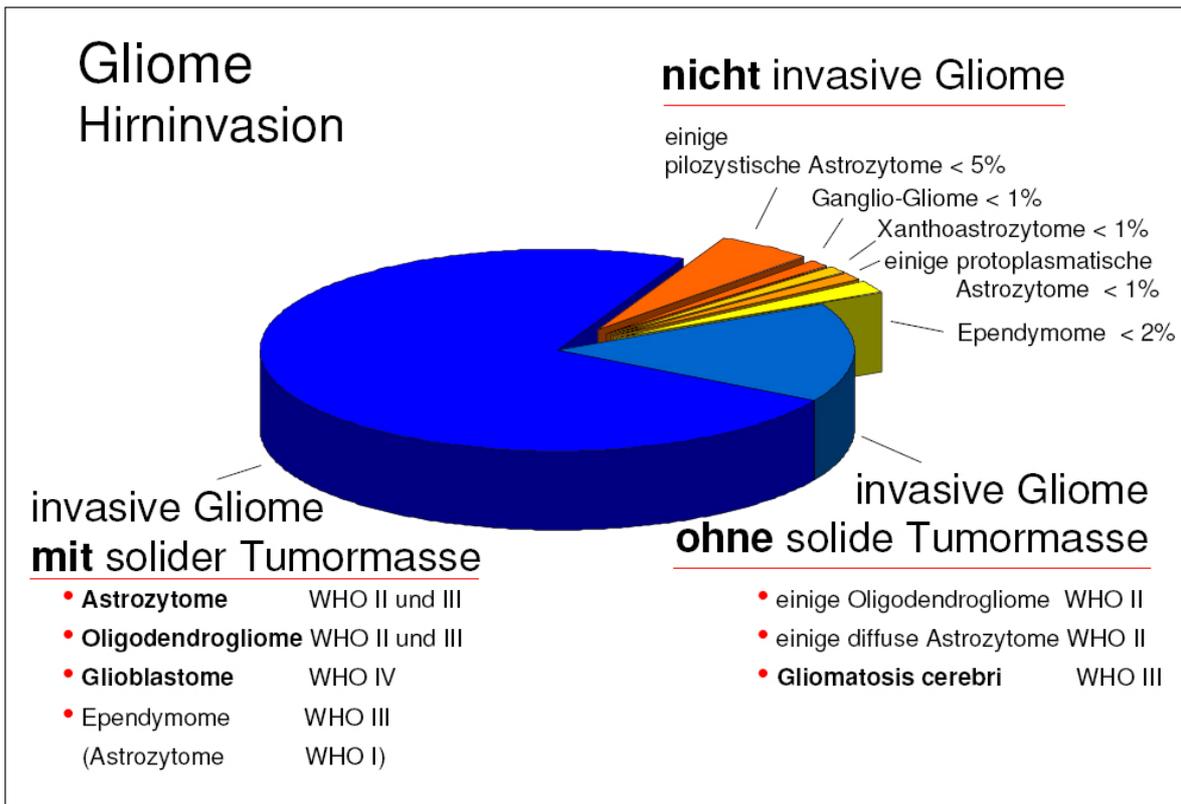


Abb. 1 Wachstumsmuster der histologischen Entitäten der Gliome.

Die Lokalisation des Glioblastoms ist in der Regel supratentoriell. Die klinische Manifestation geht deshalb häufig mit cerebralen Krampfanfällen bei 20% der Glioblastom Patienten einher. Insgesamt kommt es im Verlauf der Erkrankung bei 32% der Patienten zur Krampfanfällen (Bernstein und Berger, 2000).

Dabei sind Kopfschmerzen als initiales Symptom häufiger als Krampfanfälle. Kopfschmerzen treten in 37-39% der Fälle als Erstsymptom in Erscheinung. Verursacht werden diese in der Regel durch den ausgeprägten Masseneffekt und den dadurch ansteigenden Hirndruck, selten durch Affektion des Ventrikelsystems mit konsekutivem Hydrocephalus. Der Grund dafür ist, dass supratentorielle Tumore im Gegensatz zu infratentoriellen Tumoren den Liquorabfluß nur in speziellen Situationen, wie Blockaden des Foramen Monroe bei ausgeprägter Raumforderung oder durch Verlagerung und Verlegung von Teilen der Seitenventrikel, beeinträchtigen.

Nach Kopfschmerzen und Krampfanfällen führen an dritter Stelle fokale neurologische Defizite zur Diagnose eines malignen Glioms. Mit 61-83% ist die Hemiparese das häufigste fokale-neurologische Symptom, gefolgt vom Papillenödem mit 32-66% und dem Psychosyndrom oder Orientierungsstörungen des Patienten in 18-40% der Fälle. Bei linksseitig gelegenen Glioblastom entwickeln 37-58% der Patienten eine Dysphasie (Greenberg, 2001).

1.4 Therapie

Die Standardtherapie maligner Gliome besteht in einer chirurgischen Resektion der Tumormasse gefolgt von einer externen Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von 60 – 65 Gray (Greenberg, 2001). Diese postoperative Bestrahlung verlängert die mediane Lebenserwartung nach Resektion allein von 2-4 auf 8-11 Monate (Pfeiffer und Schröder, 1995). Dabei zeigt eine Ganzhirnbestrahlung keinen Lebenszeitgewinn gegenüber einer lokaleren externen Feldbestrahlung, bei größerem Risiko von therapieinduzierten Hirnnekrosen (Greenberg, 2001). Es sollte aber bedacht werden, dass nicht alle Patienten für eine chirurgische Therapie in Frage kommen. Kontraindikationen für eine chirurgische Intervention sind ausgedehnte Tumoren der dominanten Hemisphäre mit Infiltration eloquenten Hirns, bilaterale Tumoren, multifokales Wachstum, hohes Alter des Patienten oder schlechter Karnofsky Index, gleichbedeutend mit schlechtem neurologischem Funktionszustand (Greenberg, 2001).

Eine kurative Behandlung maligner Gliome ist bislang nicht möglich. Die derzeitigen Therapieoptionen erreichen in vielen Fällen eher eine geringe Lebenszeitverlängerung. Ziele der chirurgischen Therapie sind: 1. Sicherung der Diagnose; 2. Palliation von neurologischen Defiziten durch Reduktion der Raumforderung; 3. Verlängerung der Überlebenszeit (Giese et al., 2003). Eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit durch Resektion maligner Gliome ist jedoch möglicherweise nur bei Resektion von über 98% des kontrastmittel aufnehmenden Tumors zu erwarten (Abb. 2).

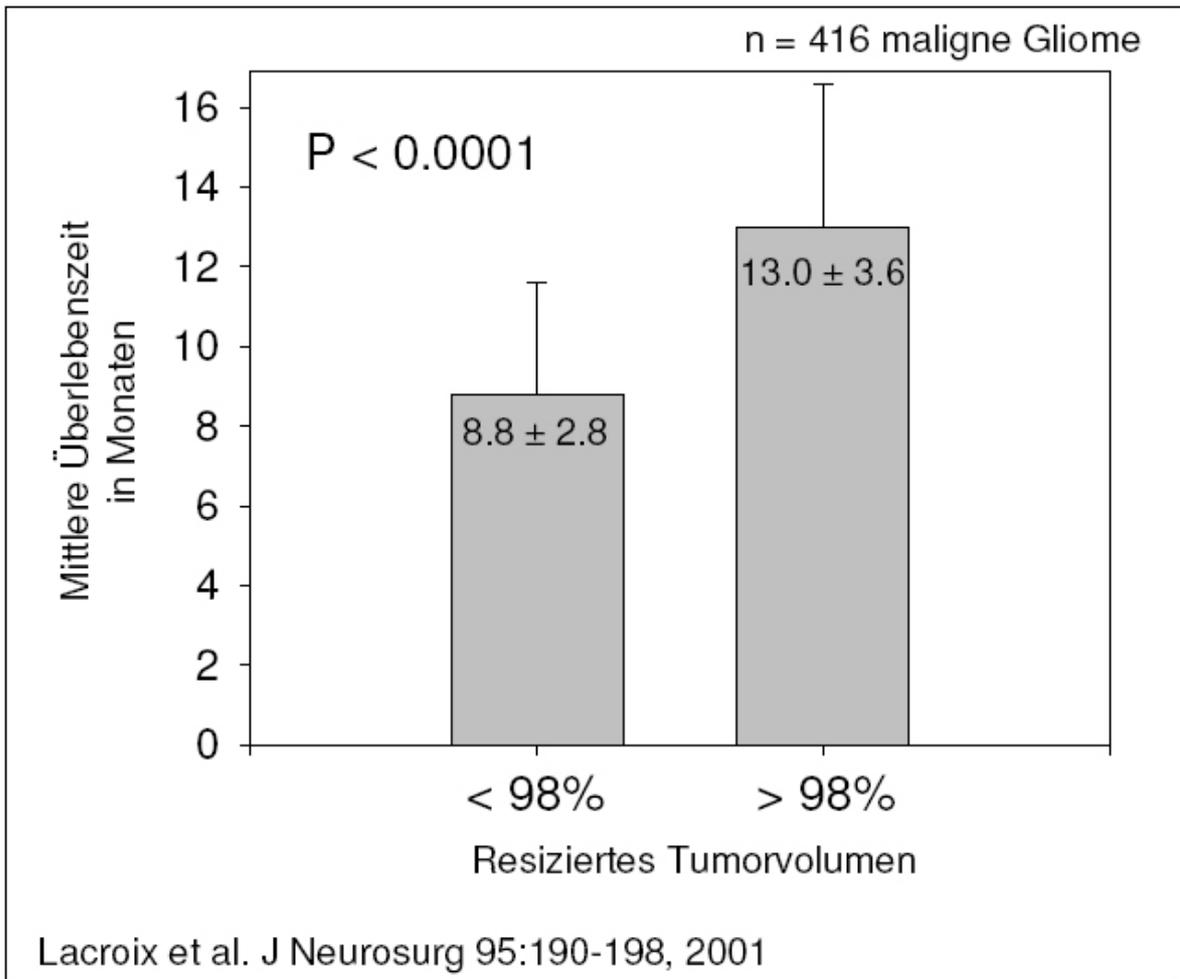


Abb.2 Verhältnis von Resektionsausmaß und Überlebenszeit bei malignen Gliomen in einer retrospektiven Analyse.

Im Falle von niedrig gradigen Gliomen kann durch eine vollständigere Resektion eine Verzögerung der Progression dieser Tumore zu malignen Formen und damit möglicherweise eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden (Keles et al., 2001). Eine Teilresektion maligner Gliome ist nicht nur wegen eines fraglichen Einflusses auf die Überlebenszeit problematisch, sondern auch wegen eines erhöhten Risikos für Nachblutungen oder postoperatives Hirnödem, was die postoperative Morbidität signifikant erhöht (Greenberg, 2001). Andererseits sind im eloquentem Hirn die Möglichkeiten der chirurgischen Radikalität begrenzt, sodass sich die chirurgische Neuroonkologie in einem Spannungsfeld von größtmöglicher Radikalität und zu verhinderndem neurologischen Defizit bewegt (Abb. 3).

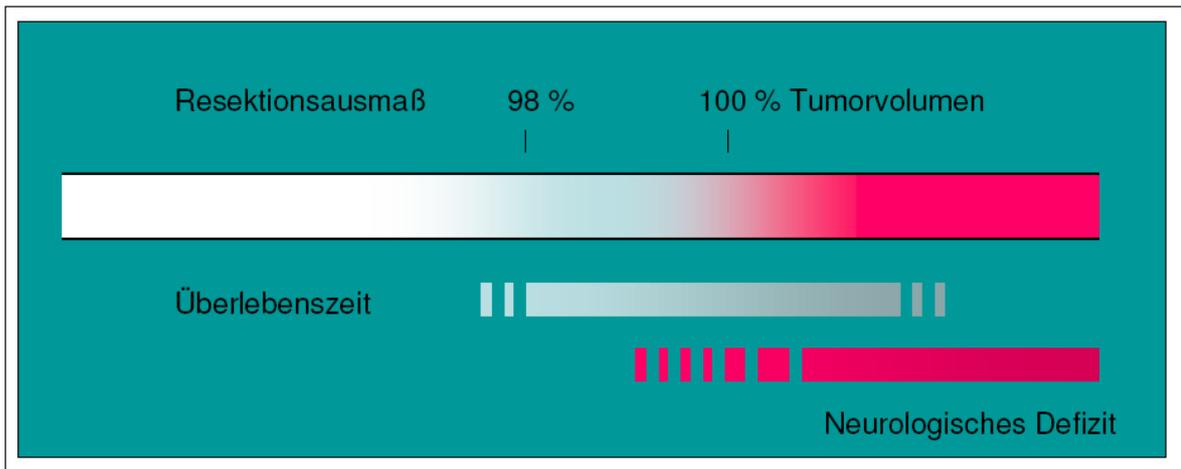


Abb. 3 Verhältnis zwischen Resektionsausmaß und neurologischem Defizit.

Auch die Chemotherapie ist Bestandteil der Standardtherapie. Der Nutzen ist dabei für anaplastische Astrozytome und Oligodendrogliome größer als für Glioblastome (Black, 1997). Ein wichtiger Faktor für das Ansprechen der Tumore auf Chemotherapien scheint ebenfalls die möglichst vollständige Resektion zu sein (Greenberg, 2001). Auch wenn der solide Kontrastmittel aufnehmende Tumor vollständig entfernt wird, verbleiben in makroskopisch unauffällig erscheinendem Hirngewebe invasive Gliomzellen, die bislang keiner definitiven Therapie zugänglich sind (Giese und Westphal, 1996).

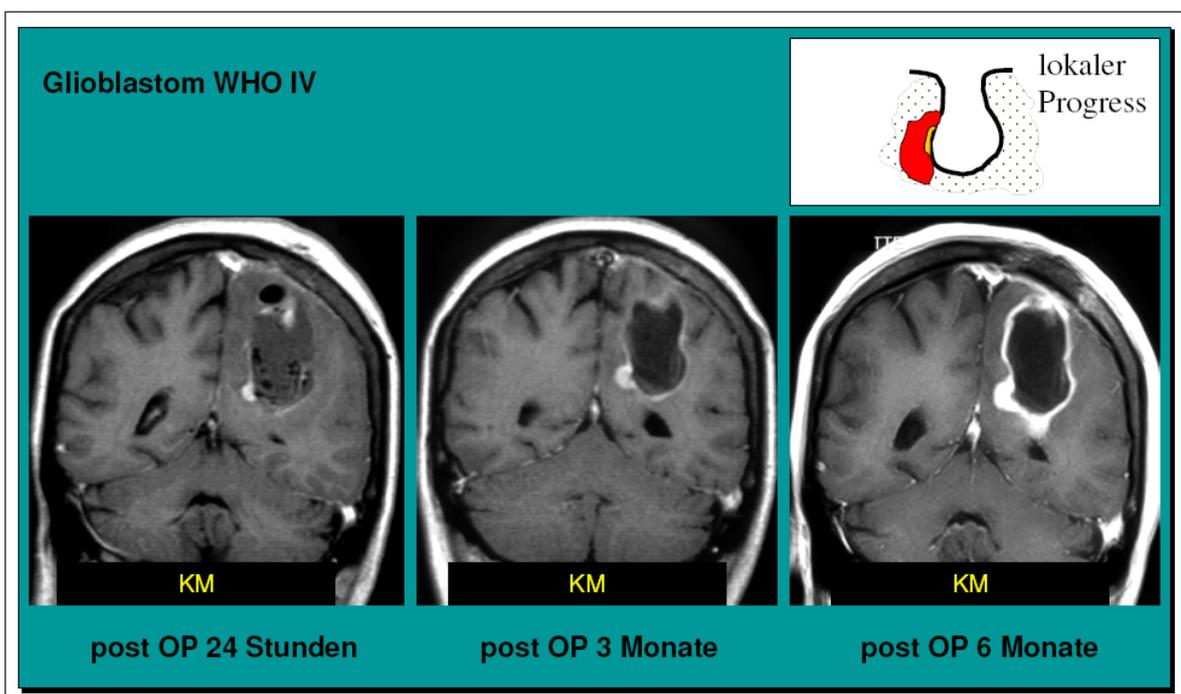


Abb. 4 Lokaler Tumorprogress aus einem intraoperativ unerkannten Tumorrest.

Diese invasiven Zellen oder intraoperativ verbliebene Anteile des soliden Tumors sind der Ursprung von Rezidiven (Abb. 4). Dabei treten über 95% der Rezidive innerhalb von 3 cm um die Resektionshöhle auf (Burger et al., 1983; Wallner und Galicich, 1989).

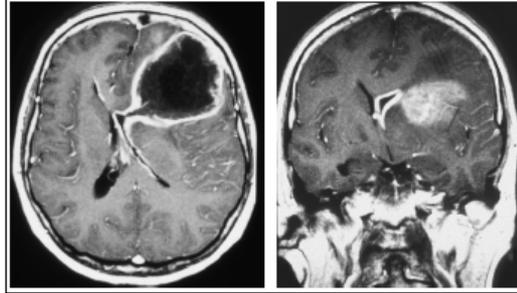
1.5 Invasives Wachstum maligner Gliome

Ein Charakteristikum von Gliomzellen ist das lokale Invasionsverhalten. Während sich das Glioblastom makroskopisch in einigen Bereichen gut abgegrenzt mit einer zentralen Nekrose darstellt, zeigt sich mikroskopisch immer eine variable Zone von infiltriertem Hirngewebe (Giese und Westphal, 1996). Bereits vor 60 Jahren konnte an einer Serie unbehandelter Gliome das Ausmaß des infiltrativen Wachstums dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Invasion der Tumorzellen bestimmten anatomischen Strukturen folgt (Abb. 5). Hierzu gehören myelinisierte Axone, Basalmembranen von Blutgefäßen und das Subependym der Ventrikelwände (Scherer, 1938; Scherer, 1940). Eine Konsequenz der hohen Affinität zu myelinisierten Fasern ist die weite Ausbreitung von Gliomzellen entlang der Sehbahn, durch den Balken und/oder die vordere Kommissur, woraus häufig bilaterales Tumorwachstum resultiert (Giese und Westphal, 1996). Bei einer Untersuchung unbehandelter maligner Gliome konnte von Matsukado et al. eine mikroskopische Ausbreitung von Tumorzellen in die kontralaterale Hemisphäre in 47% der Fälle einer konsekutiven Serie beobachtet werden (Matsukado et al., 1961).

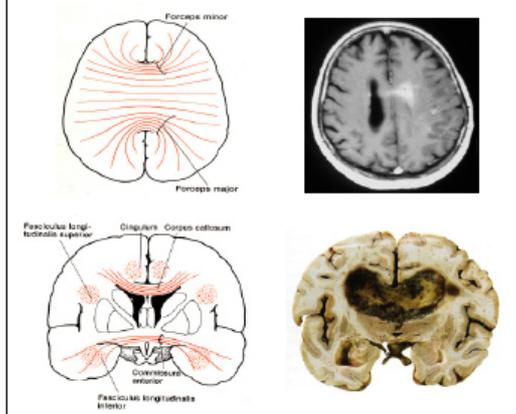
Dieses invasive Verhalten einzelner Gliomzellen geht zunächst mit einer nur minimalen Zerstörung neuronaler Strukturen einher (Giese und Westphal, 1996).

Gliome Invasionsmuster

Subependymal



anatomisch – strukturelle Infiltration



Subarachnoidal



Abb. 5 Gliom- Ausbreitungsmuster mit infiltrativen Wachstum entlang myelinisierter Faserbahnen (links unten), subependymales Tumorwachstum (oben rechts), subarachnoidale Infiltration (coronares Bild, unten) und die relativ seltenere spinale Metastasierung auf dem Liquorweg (unten rechts).

Auch wenn sich die Invasion der verschiedenen Gliome hinsichtlich Invasionsgeschwindigkeit und bevorzugter Leitstrukturen unterscheidet, so scheint doch das Phänomen der Invasion ein für alle Gliome typisches Verhalten zu sein, mit Ausnahme der benignen Ependymome und einiger seltener Astrozytome (Giese und Westphal, 1996). Der Prozess der Invasion folgt dabei einer charakterisierten Abfolge von Schritten. Zunächst muss durch einen rezeptorvermittelten Prozess eine Zell-Matrix-Interaktion durch Adhäsion initiiert werden. Ist dies geschehen, beginnen die Zellen Proteinase zu sezernieren, welche die extrazelluläre Matrix modifizieren. Auf diese Weise entsteht ein interzellulärer Raum, in den invasive Gliomzellen durch einen aktiven zellulären Prozess, die Migration, einwandern können (Giese und Westphal, 1996).

Dass Gliomzellen für die Invasion eine bestimmte extrazelluläre Matrix bevorzugen, zeigt die Affinität der Zellen zu bestimmten Leitstrukturen wie Gefäßen und myelinisierten Fasern. So ließ sich auch in vitro die Migrationsgeschwindigkeit der Gliomzellen grundlegend durch unterschiedliche Matrixkomponenten regulieren (Giese et al., 1995). Das invasive Wachstum der Gliome hat zur Folge, dass echte histologische Grenzen zum normalen Hirn nicht existieren, sondern in vielen Bereichen ein Gradient infiltrierender Zellen vom soliden Tumor in angrenzendes Hirn gefunden wird. Die Infiltration reicht dabei mehrere Zentimeter weit.

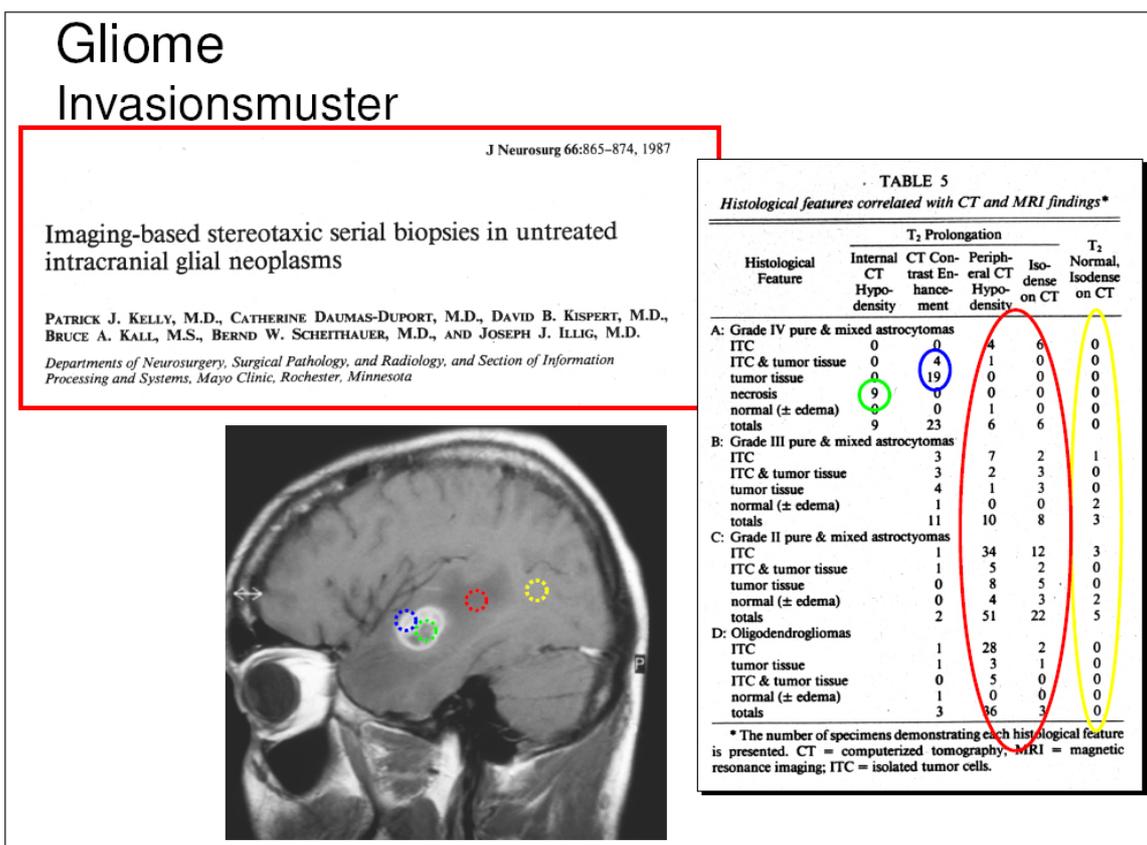


Abb. 6 Nachweis invasiver Gliomzellen relativ zu bildmorphologischen Befunden.

Intraoperativ ist dementsprechend die Definition des zu resezierenden Areals schwierig. Untersuchungen von Albert et al. konnten zeigen, dass die Einschätzung der Radikalität einer Glioblastomresektion durch den Chirurgen nur in 30% der Fälle mit Befunden postoperativ durchgeführter MRT übereinstimmt (Abb. 6; Albert et al., 1994). Diese Problematik zeigt die Wichtigkeit der Verfahren auf, die intraoperativ Tumorgewebe von invadiertem oder normalem Hirn differenzieren können.

Zur präoperativen Planung und Lokalisation eines Tumors stehen dem Chirurgen Computertomographien, Magnetresonanztomographien, Positionen Emissionstomogramme bzw. während der Operation Neuronavigation, Neurosonographie,

die operationsmikroskopisch-optische Vergrößerung, sowie letztlich der histologische Schnellschnitt zur Verfügung.

Im Falle der Gliome haben Magnetresonanztomographien die konventionellen Röntgenbilder und Computertomographien als diagnostisches Mittel weitestgehend ersetzt und erzeugen Bilder von Tumor und Hirnparenchym mit einer Auflösung im Millimeterbereich. Diese erlauben über eine multiplanare Berechnung der Bilddaten eine genaue Analyse der Tumoranatomie und die Verwendung dieser Bilddaten in intraoperativen Navigationsverfahren. Während diese Verfahren Information über die Lokalisation eines Tumors liefern und dem Chirurgen eine exakte Planung des Vorgehens während der Operation erlauben, können diese Verfahren weder eine Aussage über das Infiltrationsverhalten oder die Histoarchitektur eines Tumors geben, noch lassen sich damit exakte Grenzen zwischen Tumor und gesundem Hirngewebe darstellen.

Als weiteres intraoperativ- bildgebendes Verfahren steht dem Chirurgen der Ultraschall zur Verfügung, der während eines Eingriffes zur Lokalisation des Tumors genutzt werden kann und eine relativ differenzierte Darstellung des Tumorphenchyms, der Tumolvaskularisation und angrenzender anatomischer Strukturen erlaubt. Bei einer technisch erreichbaren Auflösung von 80 – 200 µm kann eine Darstellung der Histoarchitektur nicht erwartet werden wodurch eine exakte Differenzierung der Grenzen zwischen Tumor, Infiltrationszone und Hirngewebe ebenfalls nicht möglich.

Für eine exakte intraoperative Diagnose der Tumorentität und des Infiltrationsausmaßes des angrenzenden Hirns bleibt bislang der histologische Schnellschnitt der Goldstandard in der Darstellung der zellulären Elemente. Diese Verfahren allerdings setzen voraus, dass aus fraglichen Arealen Gewebe entnommen wird, was besonders in eloquentem Hirn problematisch sein kann. Die entnommenen Proben müssen mit histologischen Schnellverfahren aufgearbeitet und bewertet werden. Sollen im Sinne von Randschnitten mehrere Areale untersucht werden, steigen der entsprechende personelle Aufwand und die Untersuchungszeit. Es besteht somit ein Bedarf für Methoden, die intraoperativ eine verbesserte Darstellung von Tumorgewebe erlauben. Wünschenswert wäre eine kostengünstige, nicht-invasive Methode, mit einfacher Handhabung und Interpretation, sowie geringem Zeitaufwand, ohne Notwendigkeit für zusätzliches Instrumentarium, die in neurochirurgisches Operationsgerät integrierbar ist.

Vorraussetzung dafür wäre eine so hohe Auflösung, dass sich strukturelle Veränderungen des soliden Tumorgewebes, aber auch des Hirngewebes in der Infiltrationszone nachweisen lassen. Wesentliche Punkte dieser Merkmale werden von der Optischen Kohärenztomographie (engl.: optical coherence tomography, OCT) erfüllt.

Das OCT-Messverfahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen weltweit entwickelt. Als optische Methode, bei der infrarotes Licht eingesetzt wird, stellt OCT ein nicht invasives Verfahren dar. Mit einer räumlichen Auflösung von 4 – 10 μm und einer Eindringtiefe, abhängig von den optischen Eigenschaften des Gewebes, von 1 – 2 mm könnte sich OCT zur Visualisierung oberflächennaher Gewebsstrukturen und Gewebsschichten, zum Beispiel im Bereich der Resektionsflächen während der Operation von Hirntumoren eignen.

Das physikalische Prinzip beruht auf der Kohärenz zwei oder mehrerer optischer Wellen, die in ihrer Frequenz übereinstimmen, sowie in ihrer Phasenbeziehung konstant sind und die gleiche Ausbreitungsrichtung besitzen (Hering et al., 1986). In der Praxis ist dies lediglich bei Lichtwellen zu beobachten, die mit gleichen Lichtquellen erzeugt werden. Strahlen, die durch eine Lichtquelle erzeugt werden, zeigen in der Regel nur über eine begrenzte Zeit eine konstante Phasenbeziehung. Die Strecke, die das Licht innerhalb dieser Zeit zurücklegt (Wegdifferenz), bezeichnet man als Kohärenzlänge. Sie ist der maximale Weglängenunterschied, den zwei Wellenzüge durchlaufen können, um noch interferenzfähig zu sein.

Die Kohärenzlänge ist somit eine Eigenschaft von Lichtquellen mit Werten von vielen Kilometern (stabilisierter Laser) bis zu einem Mikrometer (Glühlampe).

Kohärenz von Wellen ist eine notwendige Voraussetzung zur Beobachtung von **Interferenz** (Hering et al., 1986), die bei Überlagerung von Wellen auftreten kann. Wenn die Phasendifferenz ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ausmacht, vervierfacht sich die Gesamtintensität und es entsteht eine sog. konstruktive Interferenz. Hingegen besteht bei einem Gangunterschied der beiden Teilwellen und einem ungradzahligen Vielfachen der halben Wellenlänge eine sog. destruktive Interferenz (Auslöschung), die Gesamtintensität ist Null. (Hering et al., 1986).

Erste medizinische Anwendungen dieses Meßverfahrens fanden sich in dem Bereich der Dermatologie und der Augenheilkunde (Welzel et al., 1997; Hee et al., 1995; Thomas und Duguid, 2004). In der Endoskopie wird die OCT-Technik experimentell zu Untersuchungen innerer Organsysteme angewendet, beispielsweise zur Darstellung von Schleimhäuten im Magen-Darm-Trakt, sowie mit endovaskulären Sonden zur Untersuchung von Atheromplaques in großen Blutgefäßen. (Drezek et al., 2003; Fockens, 2002; Nishioka, 2003; Zuccaro, 2001). Weiterentwickelte OCT- Geräte werden heute – und auch am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK S-H), insbesondere in bildgebenden Verfahren der Dermatologie genutzt. Die OCT bietet bei der Untersuchung von oberflächlichen Hautveränderungen eine bessere Auflösung als beispielsweise der Ultraschall.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob in Hirntumoren mittels OCT unterschiedliche Strukturen wie Elemente normalen Hirnparenchyms, Infiltrationszone hirneigener Tumore und solider Tumor differenziert werden können. Von besonderem Interesse war die Frage, ob sich in den Infiltrationszonen eine Aussage über die Infiltrationsdichte treffen lässt. Zur Analyse wurde ein orthotopes allogenes Gliommodell der Maus verwendet, in dem intracerebrale Tumoren unterschiedlichen Invasionsverhaltens erzeugt werden können. Weiterhin wurden während neurochirurgischer Operationen gewonnene Biopsien verschiedener Histotypen von Hirntumoren untersucht und die in der OCT zur Darstellung kommenden Befunde mit der histologischen Aufarbeitung korreliert. Ein erstmals in ein neurochirurgisches Operationsmikroskop integriertes OCT-Verfahren wurde in einem klinischen Pilotprojekt zur intraoperativen Analyse der Resektionsflächen während der Resektion von Hirntumoren verwendet.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen die Basis für eine Einschätzung der Tauglichkeit der OCT als hochauflösende Methode zur intraoperativen Bildgebung in der Neurochirurgie liefern und stellen die ersten Untersuchungen experimenteller und humaner Gliome mit dieser Methode dar.

2. Material und Methoden

2.1 Messgeräte

2.1.1 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die OCT lässt sich am Aufbau eines Michelson Interferometers erklären (Abb. 7). Analog zu Weißlichtinterferometrie werden in der OCT Lichtquellen mit kurzer Kohärenzlänge eingesetzt. Paralleles Licht wird über einen Strahlteiler in zwei Anteile aufgeteilt. Sind die optischen Wege über Spiegel 1 und Spiegel 2 zum Detektor gleichlang, so wird am Detektor ein Interferenzbild gemessen. Bei konstruktiver Interferenz wird eine sehr große Intensität nachgewiesen. Bei destruktiver Interferenz ist die Intensität am Detektor im Idealfall Null. Ist der optische Wegunterschied über Spiegel 1 und Spiegel 2 größer als die Kohärenzlänge der Lichtquelle, wird am Detektor kein Interferenzsignal, sondern lediglich die dort ankommende Gesamtintensität des von den beiden Spiegel zurückreflektierten Lichtes gemessen. Wird Spiegel 1 in z-Richtung verfahren und dabei am Detektor eine Intensitätsmodulation detektiert, so lässt sich die relative Position des Spiegels 2 im

Rahmen der Kohärenzlänge der Lichtquelle bestimmen. Das Signal wird elektronisch verstärkt und demoduliert, d. h. dass die Einhüllende der Interferenzmodulation aufgenommen wird. In der bildgebenden OCT wird der Spiegel 2 durch die zu untersuchende Probe ersetzt, so dass die Amplitude der Interferenzmodulation Rückschlüsse auf die optische Struktur der Probe ermöglicht.

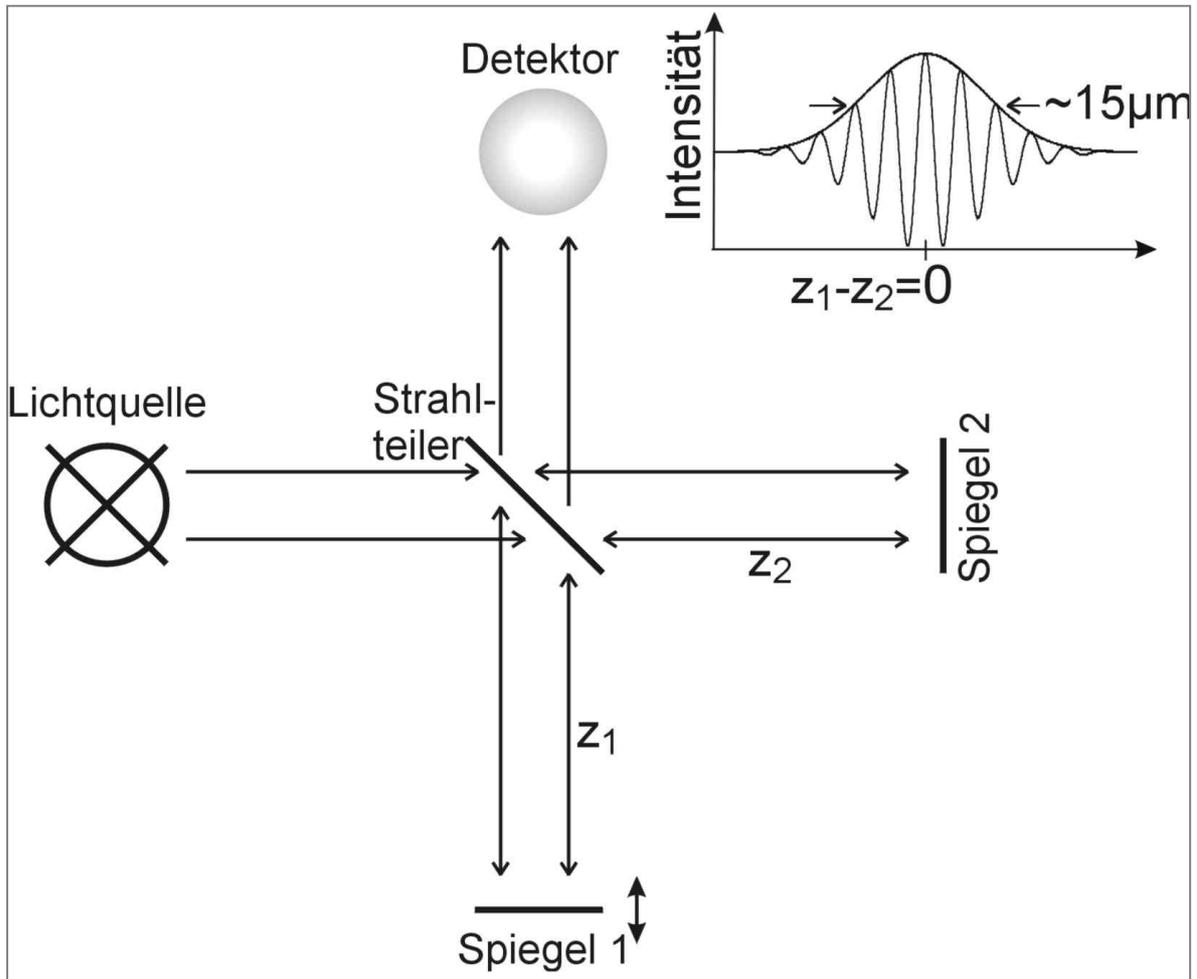


Abb. 7 Offenes Michelson Interferometer.

Für Anwendungen der OCT in der medizinischen Diagnostik ist ein 'offenes' Michelson-Interferometer nicht geeignet, da der Probenort (Mensch) flexibel erreichbar sein muss und dabei große optische Wege zur Probe berücksichtigt werden müssen.

Das Michelson-Interferometer lässt sich auch mit Lichtwellenleitern (LWL) realisieren (Abb.8).

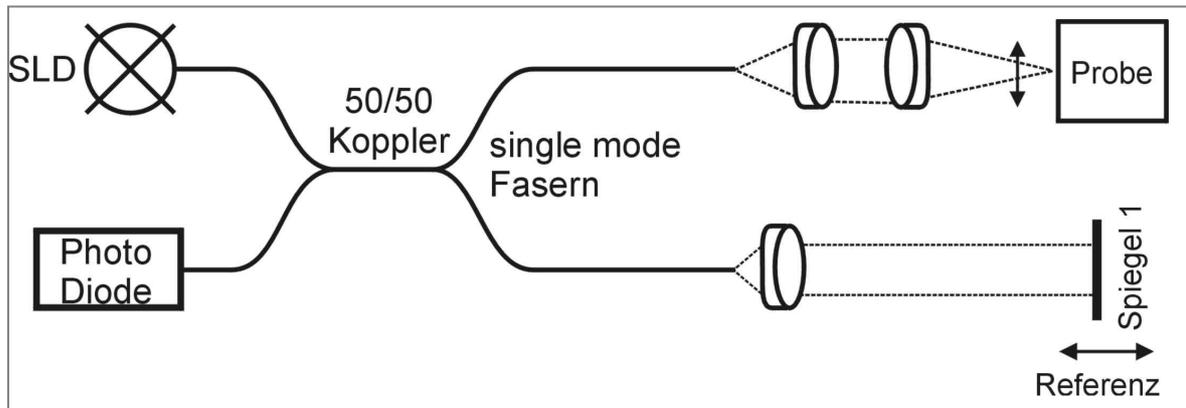


Abb. 8 Geschlossenes Interferometer.

Das Licht einer Superlumineszenzdiode (SLD) wird in einen LWL eingekoppelt und am Faserkoppler zu jeweils 50% in zwei Anteile (Referenz- und Probenlicht) aufgeteilt. Das vom Referenzspiegel und der Probe reflektierte Licht wird über Linsen wieder in die LWL eingekoppelt, so dass sich am Faserkoppler Proben- und Referenzlicht überlagern und am Detektor das Interferenzsignal detektiert wird. Die Vorteile eines Faseraufbaus liegen in einer einfacheren Justierung und einer nahezu frei wählbaren Positionierung des Probenortes. Für eine optimierte Messdynamik ist das OCT-Lichtwellenleitersystem aus mehreren Faserkopplern aufgebaut. Dabei werden ein konstanter Intensitätsuntergrund sowie Schwankungen der Intensität der Lichtquelle eliminiert. Um eine hohe Messgeschwindigkeit zu erreichen, wird die optische Wegverstellung im Referenzarm nicht durch das Verfahren eines einzelnen Spiegels, sondern beispielsweise durch ein Dehnen des LWL realisiert. Es wird eine Messgeschwindigkeit von bis zu 100 Hz pro 2mm - Tiefenscan erreicht. Ein Tiefenscan wird analog zur Ultraschalltechnik als A-scan bezeichnet. Um ein zweidimensionales Bild zu erhalten, wird die Probe lateral abgetastet. Die Amplitudenwerte der einzelnen A-Scans werden in logarithmierten Graustufen- oder Falschfarbenwerten dargestellt. Das resultierende Bild wird als B-scan bezeichnet. Für einen B-Scan bestehend aus 100 einzelnen A-Scans wird in der hier genutzten Konfiguration eine Sekunde Messzeit benötigt. In der medizinischen Diagnostik befindet sich stark lichtstreuendes Gewebe (z. B. Hirngewebe) am Probenort. Die hier wichtigen optischen Parameter sind der Streu- und Absorptionskoeffizient (μ_s , μ_a), die Dicke d und die Brechzahl n des Gewebes. Es erreichen den Detektor aus dem Probenarm Photonen, die durch Streuung im Gewebe unterschiedliche optische Wege zurückgelegt haben. Für Rekonstruktionen von Strukturen innerhalb des Gewebes dienen nur die Photonen, die

einmal gestreut direkt in die Messapertur zurückgelangen. Mehrfach im Gewebe gestreute Photonen verringern den Kontrast in tiefer liegenden Gewebeschichten.

2.1.2 TD-OCT (engl.: time-domain OCT)

Das in dieser Arbeit verwendete TD-OCT-Gerät basiert auf einem Sirius 713 Tomographen (Heidelberg Engineering AG, Heidelberg, Deutschland), dessen Technik am Medizinischen Laserzentrum der Universität zu Lübeck (inzwischen Institut für Biomedizinische Optik) entwickelt wurde. Das Gerät verwendet eine Superlumineszenz-Diode (SLD), die Licht im nahinfraroten Wellenlängenbereich mit einer zentralen Wellenlänge von 1310 nm und einer Kohärenzlänge von 15 μm (Abb.9) emittiert. Die Infrarotstrahlung wird von einer Monomodefaser zu einem modifizierten TD-OCT-Adapter geführt, der ein Linsensystem enthält, Messungen in einem Abstand von 2,5 cm erlaubt und mit einem integrierten Pilotlaser ausgestattet ist. Dies ermöglicht Messungen von Hirngewebe bzw. Hirntumorgewebe mit einer nicht-invasiven Technik, die zwei dimensionale Abbildungen von 4 mm Breite und 2.0 - 2.5 mm Tiefe je nach den Gewebemerkmale ermöglicht. Die Scanzeit bei einer Auflösung von 100 Pixel/mm betrug 8 Sekunden für eine 4 mm Scanlinie. Die bei dieser Studie verwendete Konfiguration ermöglicht eine axiale optische Auflösung von 15 μm mit einer lateralen Auflösung von 10 μm .

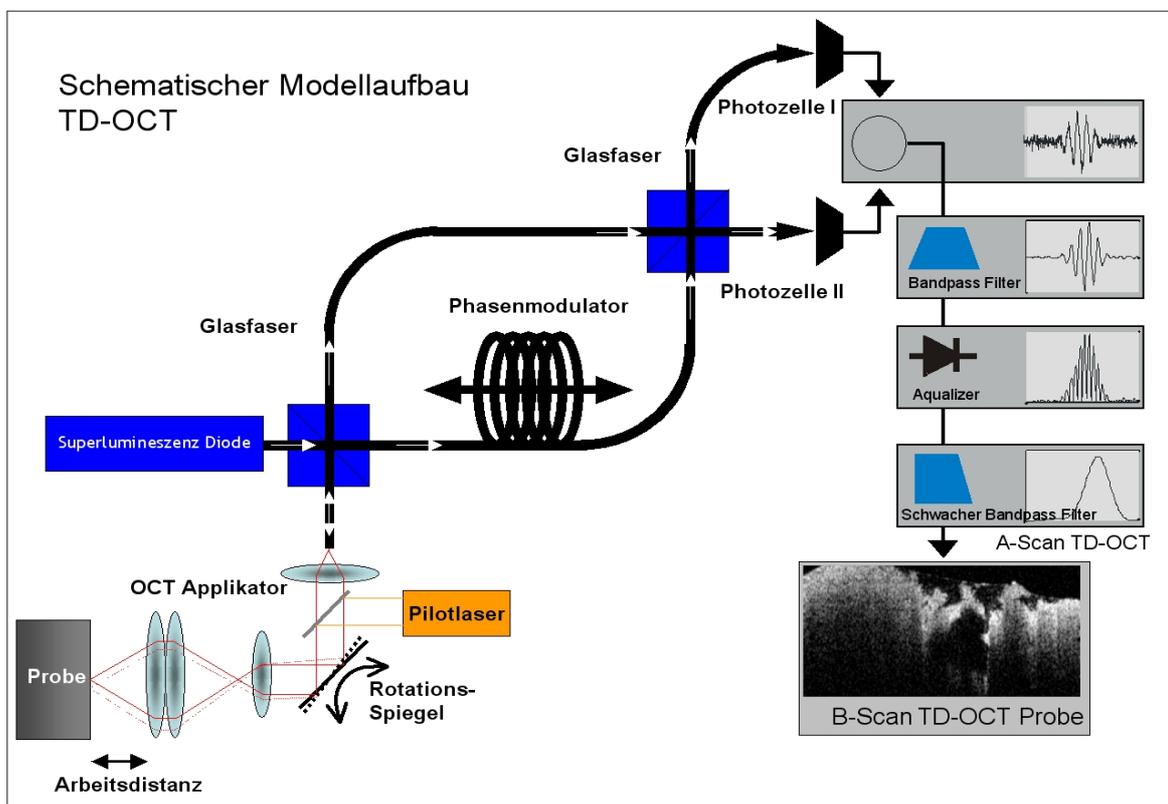


Abb. 9 Schematische Darstellung der TD-OCT Konfiguration.

2.1.3 TD-OCT Gerät für in vivo Messungen

Für die intraoperative TD-OCT Bildgebung wurde der Applikator, die Linsen, der Rotationsspiegel und der Pilotlaser (Abb. 9) an einen flexiblen Arm montiert, der fest mit dem Operationstisch verbunden werden konnte.

Für in situ Messungen von Hirn, Tumor oder Flächen der Resektionswände wurde der Arm samt Messeinheit in einem Abstand von 10 cm über das zu scannende Areal geschwenkt und manuell in die fokale Ebene gebracht. Der gescannte Bereich wurde mittels Neuronavigation dokumentiert und im Falle von Tumorgewebe wurde die Probe für die neuropathologische Aufarbeitung in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt.

2.1.4 Spektral Domain-OCT (SD-OCT) oder Spektralradar

Eine weiterentwickelte Form der TD-OCT stellt das Spektral Domain-OCT (engl.: spectral-domain OCT), oder Spektralradar dar. Diese Geräte erlauben eine erhöhte Messgeschwindigkeit und gleichzeitig verbesserte Bildqualität. Spektral Domain-OCT Messungen wurden mit ebenfalls am Medizinischen Laserzentrum Lübeck entwickelten und inzwischen von der Firma Thorlabs AG Lübeck hergestellten Geräte, durchgeführt (Koch et al., 2005; Boller, 2003). Eines der von uns verwendeten Geräte arbeitete mit einer zentralen Wellenlänge von 900 nm und einer spektralen Bandbreite von 165 nm. Diese Konfiguration erlaubt eine axiale Auflösung von 4,1 μm und eine laterale Auflösung von 8 μm in hochstreuendem Geweben. Das OCT-Grundgerät ist über eine Monomode-Lichtleitfaser, die sowohl die Strahlung zum Handstück hin als auch zurück transportiert, verbunden (Abb.10). Das Handstück enthält ein offenes Interferometer mit Strahlteiler, festem Referenzspiegel, Scanner und Fokussierungsoptik. Im OCT-Gerät wird die Proben- und Referenzstrahlung mittels eines Faserkopplers auf ein Spektrometer geleitet. Aus den gemessenen Spektren können A-Scans mit 1,5 mm Tiefe berechnet werden. Der Scanner im Handstück erlaubt die Aufnahme von B-Scans mit bis zu 8 mm Breite. Die Lichtleistung auf der Probe betrug während der Messungen etwa 150 mW. Die für die Darstellung und Auswertung der gemessenen Daten verwendete Software (OCT EVAL) wurde ebenfalls am Medizinischen Laserzentrum Lübeck entwickelt.

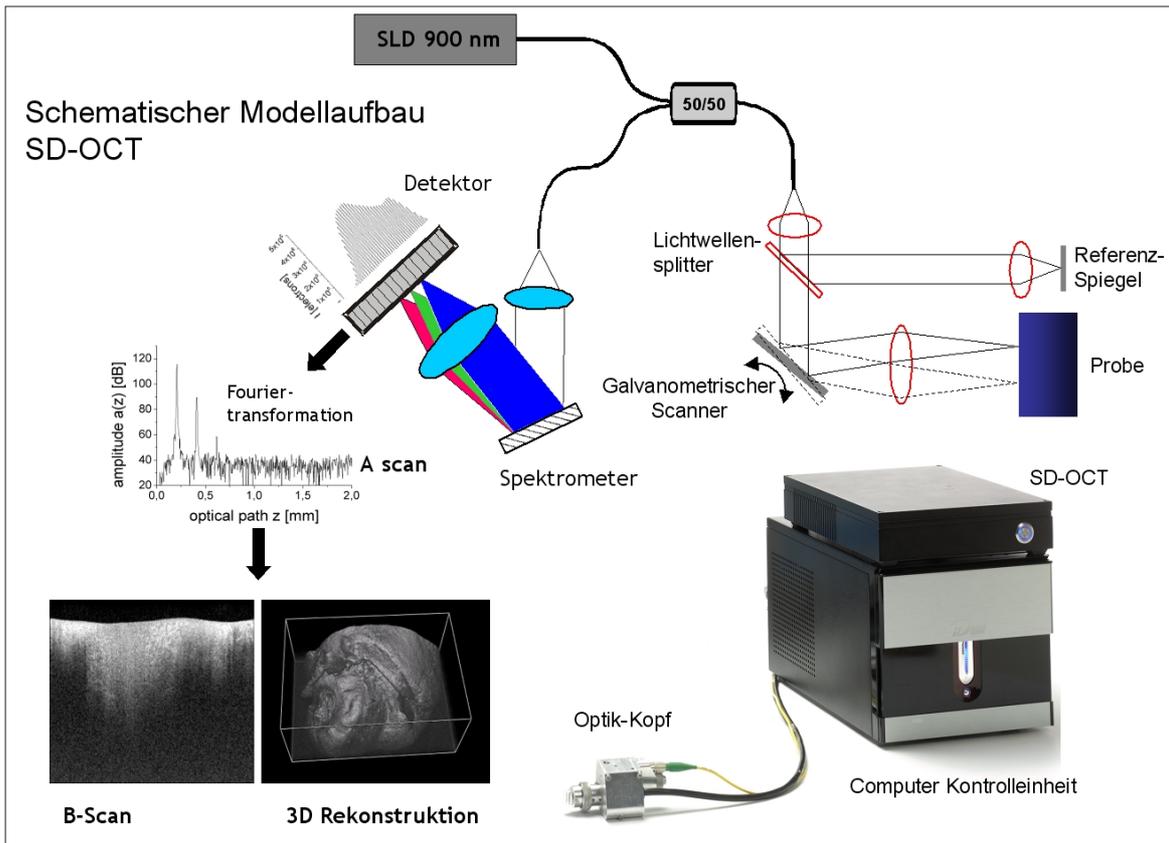


Abb. 10 Schematische Darstellung der SD-OCT Konfiguration.

2.1.5 SD-OCT integriertes OP-Mikroskop

Ferner wurde im Rahmen dieses Projekts ein SD-OCT-Gerät in ein neurochirurgisches Mikroskop der Firma Möller Wedel (Wedel, Deutschland) integriert. Die zentrale Wellenlänge dieses SD-OCT Geräts betrug 840 nm, die axiale Auflösung etwa 11 μm und die Messgeschwindigkeit 1220 A Scans pro Sekunde. Die OCT-Messungen wurden hier durch dieselbe optische Einheit, die auch für die sichtbaren Bereiche des Lichts für vergrößerte Darstellung des Gewebes verwendet wird, durchgeführt. Das Linsensystem ermöglicht einen Arbeitsabstand von 231 mm mit einem Tiefenmessbereich von 3,5 mm und einer lateralen Auflösung von 27 μm .

2.2 Gewebeproben und Histologien

2.2.1 Orthotopes allogenenes Gliommodell in Maushirn

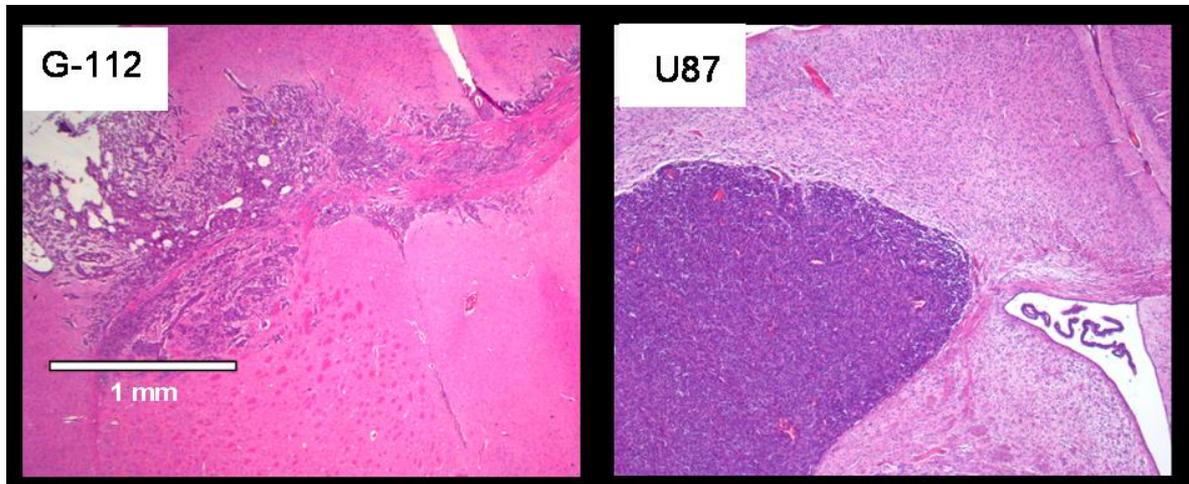


Abb. 11 Histologie von invasiven G112- und nicht invasiven U87 Gliomen.

Es wurden zwei aus menschlichen Glioblastomen etablierte Gliomzelllinien, G-112 und U87, verwendet (Abb. 11). Im Mausmodell zeigt G-112 ein diffus in das angrenzende Hirn infiltrierendes Wachstum, während U87 ein dem Wachstum von Hirnmetastasen ähnliches Muster mit guter Abgrenzung und minimaler Infiltration zeigt (Abb. 11). Um orthotope Gliome im Mausmodell zu erzeugen, wurden Zellen in aktiver Wachstumsphase aus Monolayerkultur durch Trypsinierung gewonnen und intrakraniell implantiert. Eine Zellsuspension in einer Konzentration von $3 \times 10^5/\mu\text{l}$ wurde stereotaktisch im Bereich der Capsula interna implantiert. Typischerweise werden Tumorgrößen von etwa 1 mm Durchmesser 3-4 Wochen nach Implantation erreicht. Alle Versuche wurden entsprechend den Bestimmungen der Tierschutzverordnung und des durch die Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein unter Protokoll Nr. 30/0/03 genehmigten Vorgehens ausgeführt.

Die Mäuse wurden mittels einer intraperitonealen Narkose betäubt (200 mg Ketamin und 20 mg Xylazin in 17 ml NaCl- Lösung mit je 0,15 mg/10 g Körpergewicht). Unter Verwendung eines stereotaktischen Rahmens (TSE Systeme Homburg, Deutschland) wurde ein 2-3 mm Mittellinieneinschnitt ausgeführt und eine 1 mm durchmessende Trepanation mit einem Diamantbohrer 3 mm paramedian auf Höhe des Bregmas angelegt und eine stereotaktische Implantation 0.5 mm tief im Bereich der Capsula interna in einem Volumen von 3 μl der Zellsuspension über 3 Minuten eingebracht. Der Implantation folgend wurde anschließend 50 mg/kg Novaminsulfon s.c. verwendet und 1 mg/ml

Novaminsulfon dem Trinkwasser für drei Tage beigefügt. Vier Wochen nach der Implantation der Tumorzellen wurde den Mäusen eine letale intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Xylazin und 350 mg/kg Ketamin verabreicht. Die tumortragenden Hirne von neun Mäusen wurden entnommen und koronare Schnitte für die OCT-Untersuchungen verwendet.

2.2.2 Ex vivo Messungen

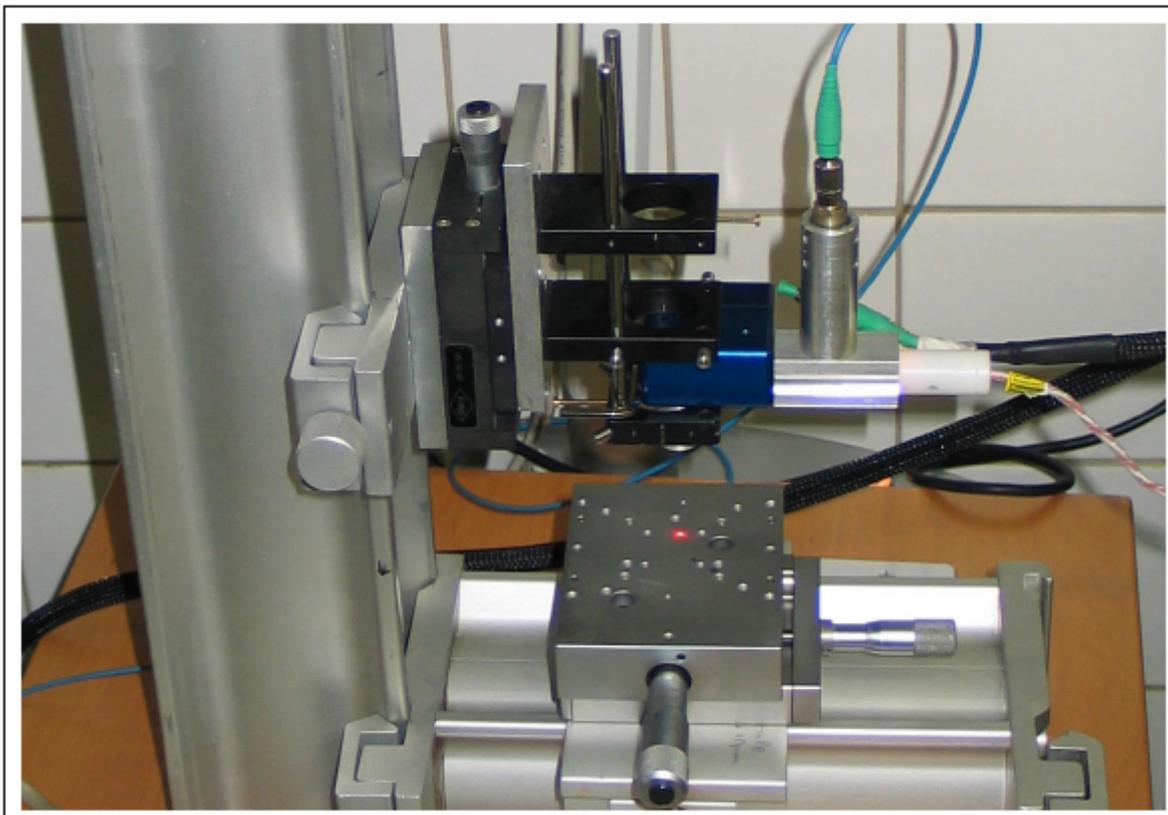


Abb. 12 TD-OCT Applikator mit Pilotlaser zur Untersuchung von Tumorproben ex vivo.

Die Untersuchung der Gewebeproben ex vivo erfolgte mit einem an einem Stativ angebrachten OCT-Applikator, der circa 2,5 cm über der Probe positioniert wurde und mit einer Noniusschraube in der z Achse im μm -Bereich fokussiert werden konnte. Der Probenstisch konnte in gleicher Weise in der x und y Achse bewegt werden, was eine genaue Untersuchung serieller optischer Schnitte und deren 3D Rekonstruktion ermöglichte. Der Messlaser traf im Winkel von 90° auf das Gewebe und konnte anhand eines Pilotlasers auf einen gewünschten Bereich gerichtet werden (Abb. 12). Die Länge der Scanzeile betrug 8 mm. Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Gewebeproben in Formalin fixiert, dann parallel zur optischen Achse geschnitten, in Paraffinblöcke eingebettet, 5 μm histologische Schnitte angefertigt und H&E gefärbt.

2.2.3 In vivo OCT-Analysen

Entsprechend eines durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigten Protokolls # 05-004 wurden im Rahmen einer Pilotstudie intraoperative OCT-Analysen von Hirn, Tumor und Resektionsflächen durchgeführt. Eine Patientenversicherung wurde abgeschlossen und getrennte Einwilligungserklärungen der Patienten zu Operation und klinisch-experimentellem Protokoll lagen 24 Stunden vor dem Eingriff vor. Intraoperativ wurde unter mikrochirurgischem Standard eine Entfernung des malignen Glioms vorgenommen. Dabei sind vor, während und nach der Resektion diverse OCT-Analysen von normalem Hirn, makroskopisch solidem Tumor, Tumornekrosezone sowie von den Flächen der Resektionsränder durchgeführt worden. Die Analyseorte wurden durch Akquisition der Raumkoordinaten mit Hilfe der Neuronavigation dokumentiert und Gewebeproben genommen. Die Proben wurden histologisch aufgearbeitet und eine Korrelation mit den OCT-Befunden und dem bildmorphologischen MRT Befund durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 OCT-Analyse experimenteller Gliome im Mausmodell

3.1.1 OCT-Darstellung von nativem Maushirn

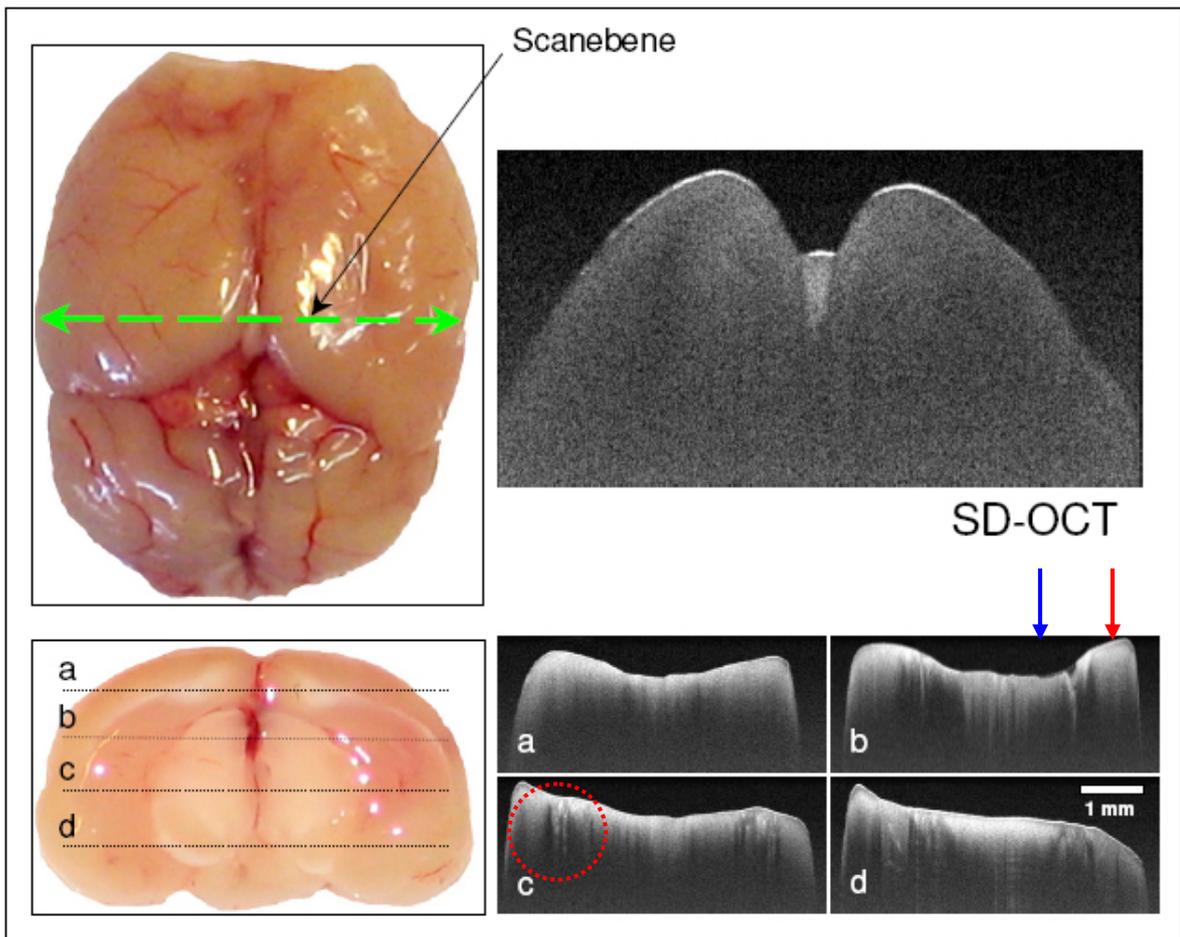


Abb. 13 OCT-Analyse eines nativen Maushirns, transkortikal (oben), coronarer Hirnschnitt (unten) entsprechend der Scanlinien a-d.

Ein normales Mausgehirn wurde nach Entnahme auf Eis gekühlt und sofort mittels OCT analysiert (Abb. 13 oben, grüne Scanebene). Die transkortikale OCT-Analyse zeigte die Oberflächenkontur des Maushirns. Bei einer Eindringtiefe von 1.5 mm subkortikal zeigte sich das Hirnparenchym homogen ohne darstellbare Binnenstruktur. Die OCT-Analyse eines coronaren Schnittes durch normales Maushirn zeigte entsprechend der makroskopischen Befunde die Grenzen der grauen- (Abb. 13 b und d roter Pfeil) und weissen Substanz (Abb. 13 b und d blauer Pfeil) und die Struktur der Basalganglien (Abb. 13 c roter Kreis) als Änderungen der OCT-Signalintensität.

3.1.2 TD-OCT- und SD-OCT Analyse experimenteller Gliome

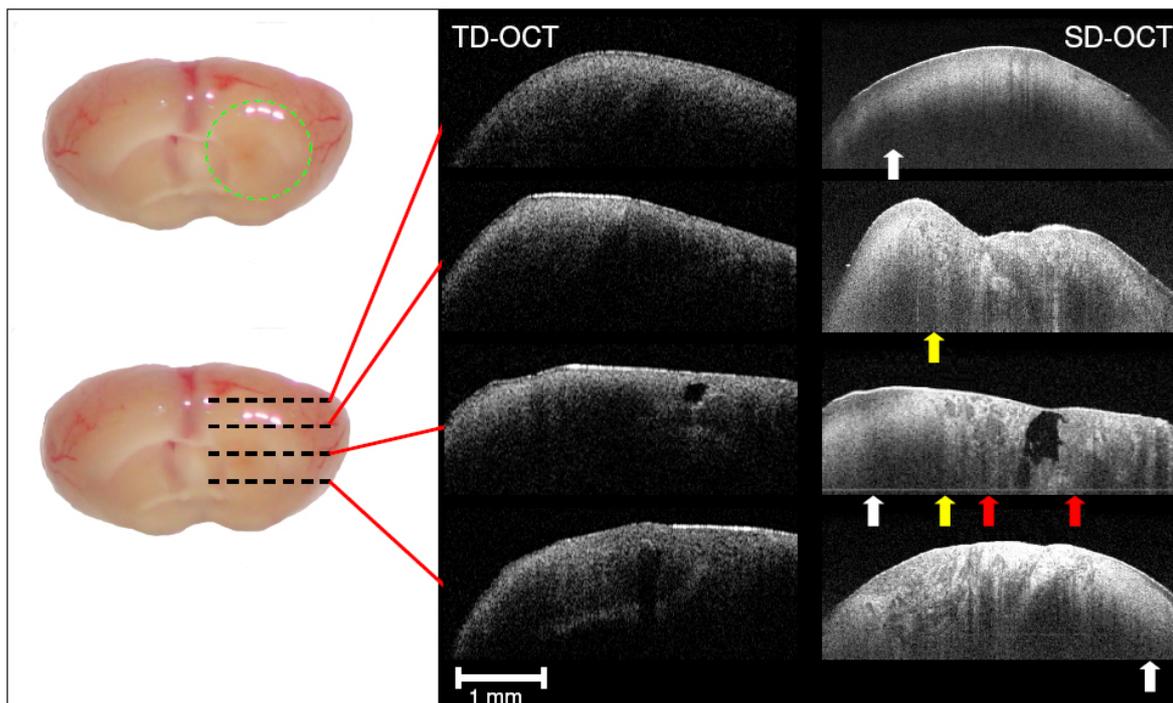


Abb. 14 Vergleichende Darstellung eines G-112 Glioms im Maushirn durch TD-OCT und SD-OCT.

Vier Wochen nach Implantation der hoch invasiven G-112 Gliomzelllinie erreichen diese Tumore typischerweise einen Durchmesser von 1 – 1,5 mm. Die Tiere wurden nach dem in 2.2.1 beschriebenen Verfahren getötet und das ganze Hirn entnommen, in koronarer Ebene im Bereich der Implantationsstelle geschnitten, auf Eis gekühlt und umgehend einer TD-OCT- bzw. SD-OCT-Analyse unterzogen. Abbildung 14 zeigt Messungen an einem Maushirn mit implantiertem Tumor. Die Position des Tumors ist grün umrandet im linken oberen Foto der Hirnprobe gekennzeichnet. Unten sind schematisch die Positionen der jeweiligen B-scans markiert. Die jeweiligen TD-OCT-Messungen zu den jeweiligen Positionen und die entsprechenden SD-OCT-Messungen sind dargestellt. In der SD-OCT treten kleine Strukturen deutlicher hervor als bei der TD-OCT. Während tumorfreies Hirngewebe keine Strukturen in der OCT-Darstellung zeigt (Abb. 14 weiße Pfeile), werden in der von Tumor infiltrierten Zone kleinere Strukturen und Unregelmäßigkeiten im Streuverhalten sichtbar (Abb. 14 gelbe Pfeile). Diese Unregelmäßigkeiten sind im soliden Tumor am deutlichsten (Abb.14 rote Pfeile). Sowohl Messtiefe, Auflösung als auch die Messdynamik sind in den SD-OCT-Messungen besser als bei der TD-OCT.

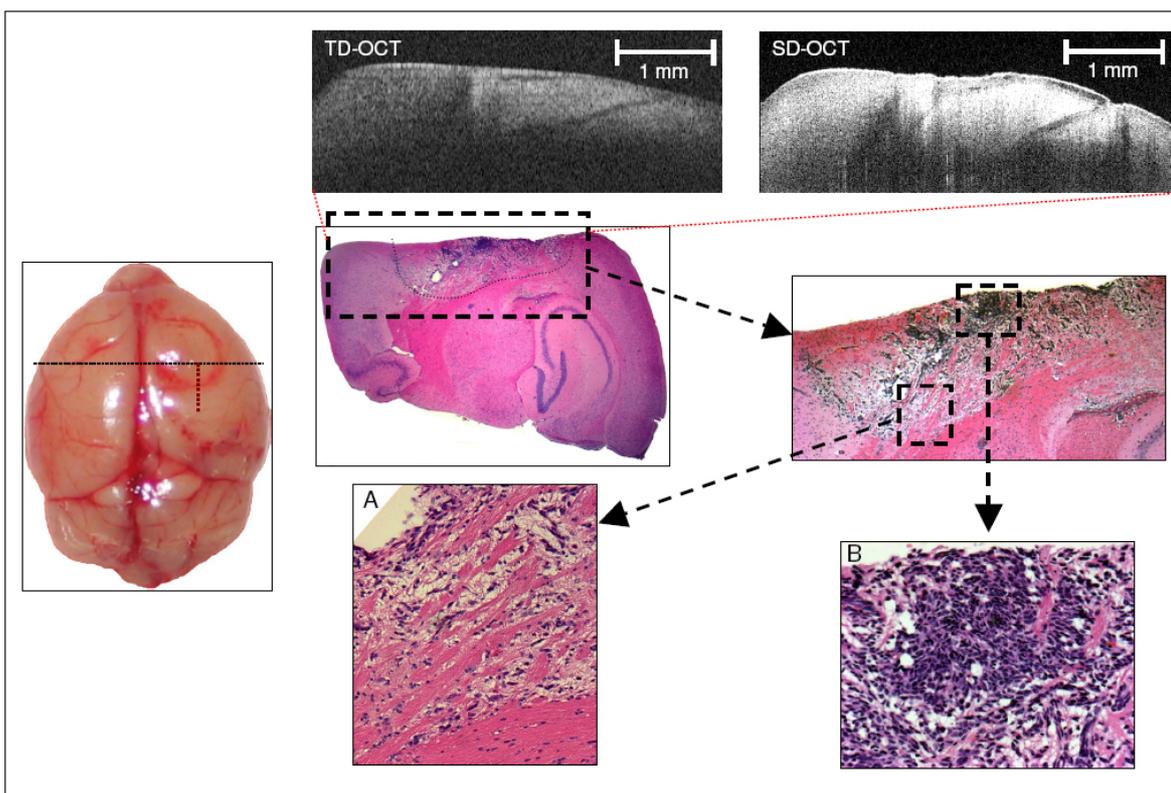


Abb. 15 Darstellung von Tumor (B), Infiltrationszone (A) und normalem Hirngewebe durch TD-OCT und SD-OCT.

Um die histologischen Korrelate der TD-OCT- bzw. SD-OCT-Darstellung invasiver Hirntumore zu untersuchen, wurden eine vergleichende Analyse coronarer Hirnschnitte mit implantiertem invasiven G-112 Gliom durchgeführt. Dafür wurden die analysierten Gehirnabschnitte parallel zur Scanlinie markiert in Formalin fixiert, in Paraffin gebettet und parallel zur Achse der optischen Gewebearbeitung 4 μm Schnitte angefertigt und H & E gefärbt. Diese Untersuchungen zeigten, dass TD-OCT und SD-OCT nicht nur die soliden Tumoranteile zur Darstellung bringen, sondern auch die Invasionszone als vom normalen Hirn abweichendes Signal darstellen. Der entsprechende histologische Schnitt zeigte, dass die OCT-Signalabnormitäten von einer kleinen Zahl invasiver Tumorzellen verursacht wird, also bereits ein geringer Infiltrationsgrad dargestellt und von normalem Hirn unterschieden werden kann. Auch hier zeigte sich die SD-OCT durch eine bessere Detaildarstellung und deutlichere Kontrastgebung der TD-OCT überlegen und mit einem höheren diagnostischen Wert.

3.1.3 SD-OCT Darstellung und 3D Rekonstruktion experimenteller Tumore

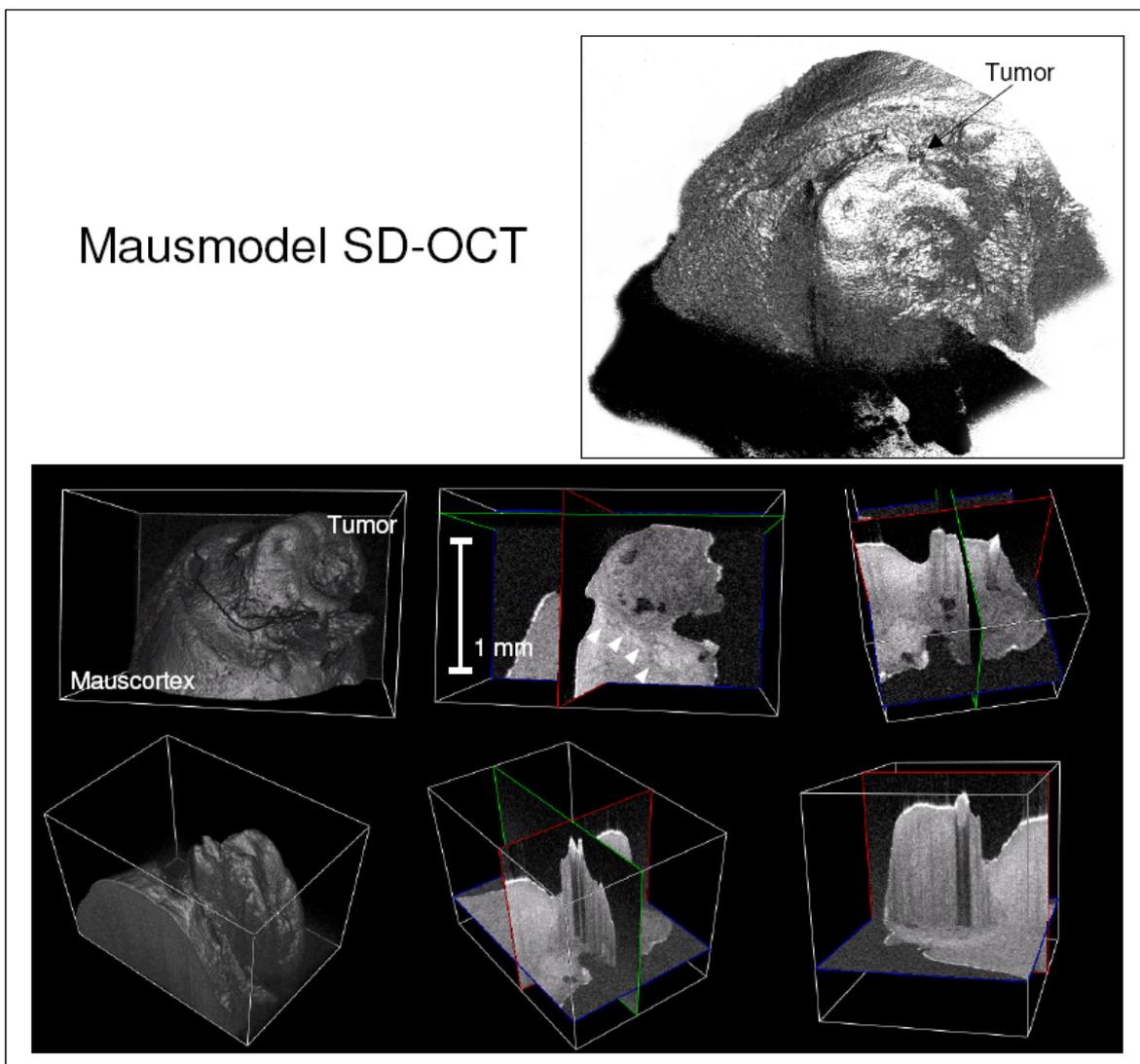


Abb. 16 3D Rekonstruktion und multiplanare Analyse der Hirn-Tumorgrenze.

Ein teilweise exophytisch gewachsener invasiver G-112 Tumor wurde transtumoral-transcortical einer SD-OCT-Analyse durch 300 konsekutive B-Scans über das Tumoreal und den angrenzenden Cortex unterzogen und mit Hilfe einer eigens hierfür entwickelten Software (Ibanez L: The ITK Software Guide) eine 3D Rekonstruktion des Datensatzes angefertigt. Unter Verwendung dieser Software kann die Bildmatrix einer multiplanaren Analyse unterzogen werden und so die Hirn-Tumorgrenze in verschiedenen Schnittebenen dargestellt werden (Abb. 16 weiße Pfeile). Diese Analyse zeigte verschiedene Eigenheiten der optischen Gewebeanalyse auf. Im Tumor kamen in sagittalen Analyseebenen lakunäre Strukturen niedriger Signalintensität zur Darstellung, die in coronarer Rekonstruktion als Auslöschungsphänomene hoch-signalintenser, optisch dichter Strukturen der

Gewebeoberfläche, z. B. als Knochenstück, identifiziert werden konnten (Abb. 16). Voraussetzung für die 3D Gewebeanalyse sind hohe B-Scan Zahlen kleiner Schrittweite. Während der Sirius 713 TD-OCT Tomograph circa 8 Sekunden für einen Scanbereich von 4 mm benötigt, benötigt die neue Generation der hier verwendeten SD-OCT Tomographen (Derma SR Tomograph) mit einer Bildrate von 3 Abbildungen pro Sekunde bei einem Scanbereich von 8 mm 90 Sekunden für einen 3D Datensatz.

3.2 Analyse humanen Hirn- und Hirntumorgewebes durch TD-OCT

3.2.1 Ex vivo Analyse von humanen Hirn- und Gliombiopsien

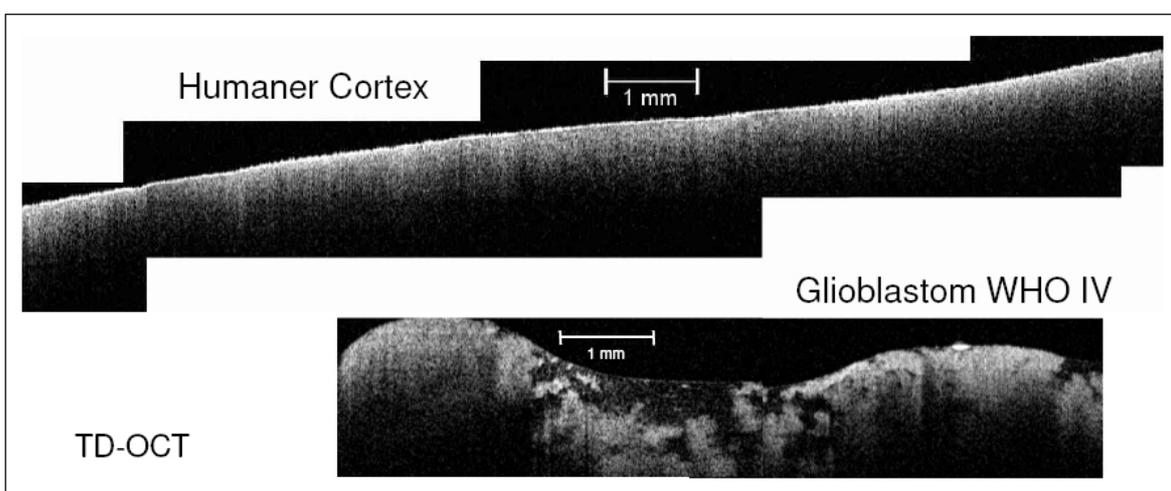


Abb. 17 Normale Hirn- und Glioblastombiopsie in der ex vivo TD-OCT Darstellung.

Zunächst wurde unter Verwendung der TD-OCT eine ex vivo Analyse von Hirn- und Hirntumorgewebe unter laborexperimentellen Bedingungen durchgeführt. Die TD-OCT Sonde wurde an einem Stativ 10 cm oberhalb des Probenbrettes befestigt und mit Hilfe eines Pilotlasers eine Scanlinie von 6-8 mm in den Bereich des zu analysierenden Gewebes platziert. Für einen B-Scan von 4 mm Länge wurden 9 Sekunden benötigt. Abbildung 17 zeigt die Analyse eines 12 mm langen Abschnittes normalen Hirngewebes. Normaler Cortex zeigt ein Bild homogener Signalstruktur mit einem charakteristischen Abfall der Signalintensität des TD-OCT Signals mit zunehmender Gewebetiefe (Abb. 17 Humaner Cortex). Wie für normales Maushirn konnte in humanem Cortex keine wesentliche Binnenstruktur identifiziert werden (Abb. 13). Dagegen zeigt die Biopsie eines Glioblastoms ein Bild heterogener Signalstruktur des Tumorparenchyms mit signalintensiven Strukturen und lakunären Arealen niedriger Signalintensität (Abb. 17 Glioblastom WHO IV). Im linken Randbereich der in Abbildung 17 dargestellten Biopsie kann man homogenere Gewebeabschnitte erkennen, die makroskopisch angrenzendem infiltriertem

Hirn entsprechen. Die Gewebeabschnitte in der Mitte der Probe entsprechen makroskopisch der Nekrosezone des Tumors. Tumorgewebe zeigte nicht die für normales Hirn charakteristische Schwächung des OCT-Signals mit zunehmender Gewebetiefe (Abb. 17). Damit ließ sich zeigen, dass prinzipiell mittels OCT das homogen erscheinende mikrostrukturarme Hirngewebe von Tumorgewebe anhand der Signalbinnenstruktur, aber auch anhand des Verlustes des charakteristischen kontinuierlichen Signalabfalls mit zunehmender Gewebetiefe unterschieden werden kann.

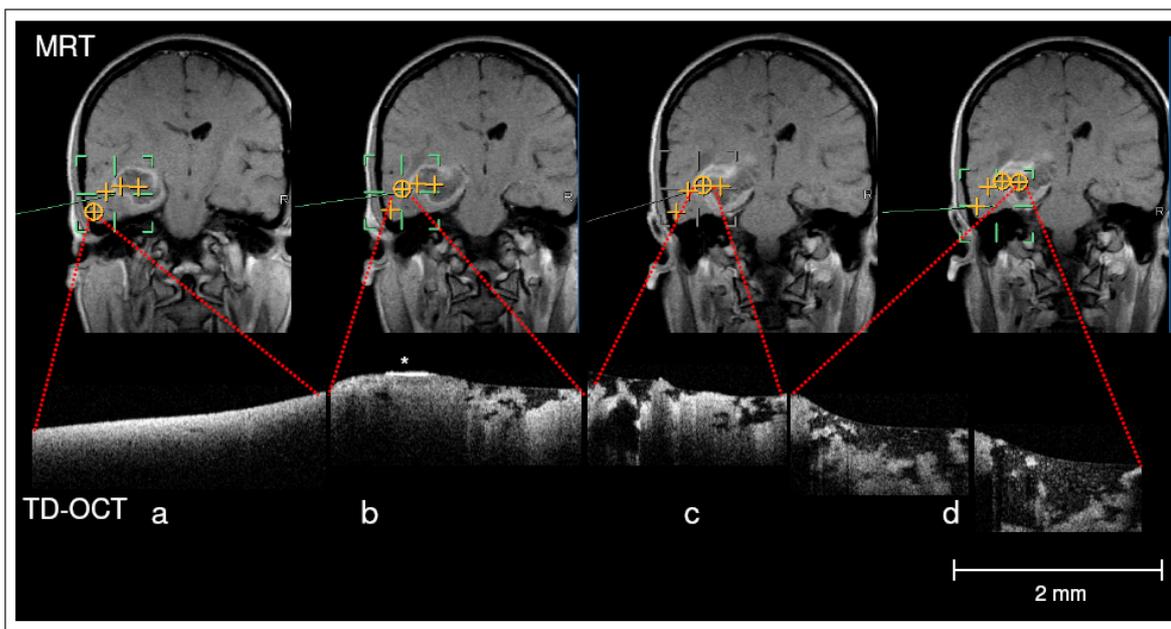


Abb. 18 Korrelation der TD-OCT Analyseorte mit der MRT-Darstellung.

Um zu untersuchen, ob die OCT Methode normales Hirn, Infiltrationszone, soliden Tumor und Nekrosezone maligner Gliome differenzieren kann, wurden während der Resektion eines links temporalen Glioblastoms (Abb. 18) Biopsien aus dem Bereich des operativen Zugangsweges gewonnen. Diese entsprachen Bereich des dem Tumor angrenzenden Hirns, aus der Invasionszone, dem soliden, im MRT Kontrastmittel aufnehmenden entsprechenden Tumor und der Nekrosezone. Die Biopsieorte wurden mit Hilfe der Neuronavigation registriert, dokumentiert und die Gewebeprobe unmittelbar der TD-OCT Analyse unterzogen. Abbildung 18a zeigt den in der OCT-Darstellung charakteristischen Befund normalen Hirngewebes ohne wesentliche Binnenstruktur, mit charakteristischem kontinuierlichen Signalabfall bei zunehmender Gewebetiefe. Makroskopisch entsprach dieser Bereich ödematösem Cortex im Bereich des operativen Zugangsweges. Aufgrund des ausgeprägten Invasionsverhaltens maligner Gliome muss aber auch in diesem Bereich von einer Durchsetzung des Gewebes mit einer niedrigen Dichte einzelner invasiver Tumorzellen ausgegangen werden. Abbildung 18b zeigt den OCT-Befund einer Biopsie unmittelbar angrenzend an den im MRT Kontrastmittel aufnehmenden Tumor.

Makroskopisch erschien diese Biopsie unauffällig. Die OCT-Analyse zeigte jedoch eine angehobene Signalintensität, den Verlust der charakteristischen Lichtschwächung und das Auftreten von inhomogener Mikrostruktur. Auflagerungen von Wasser auf Teilen der Probe führen zu starken Oberflächenreflektionen, die sich als signalintense Artefakte darstellen und als Beispiel mit einem Stern gekennzeichnet sind. Abbildung 18c zeigt den OCT-Befund einer Biopsie aus dem Bereich des Kontrastmittel aufnehmenden soliden Tumors mit heterogener signalintensiver Binnenstruktur und lakunären Arealen niedriger Signalintensität. Abbildung 18d entspricht der OCT-Analyse der Tumornekrosezone mit großen zusammenfließenden lakunären Arealen.

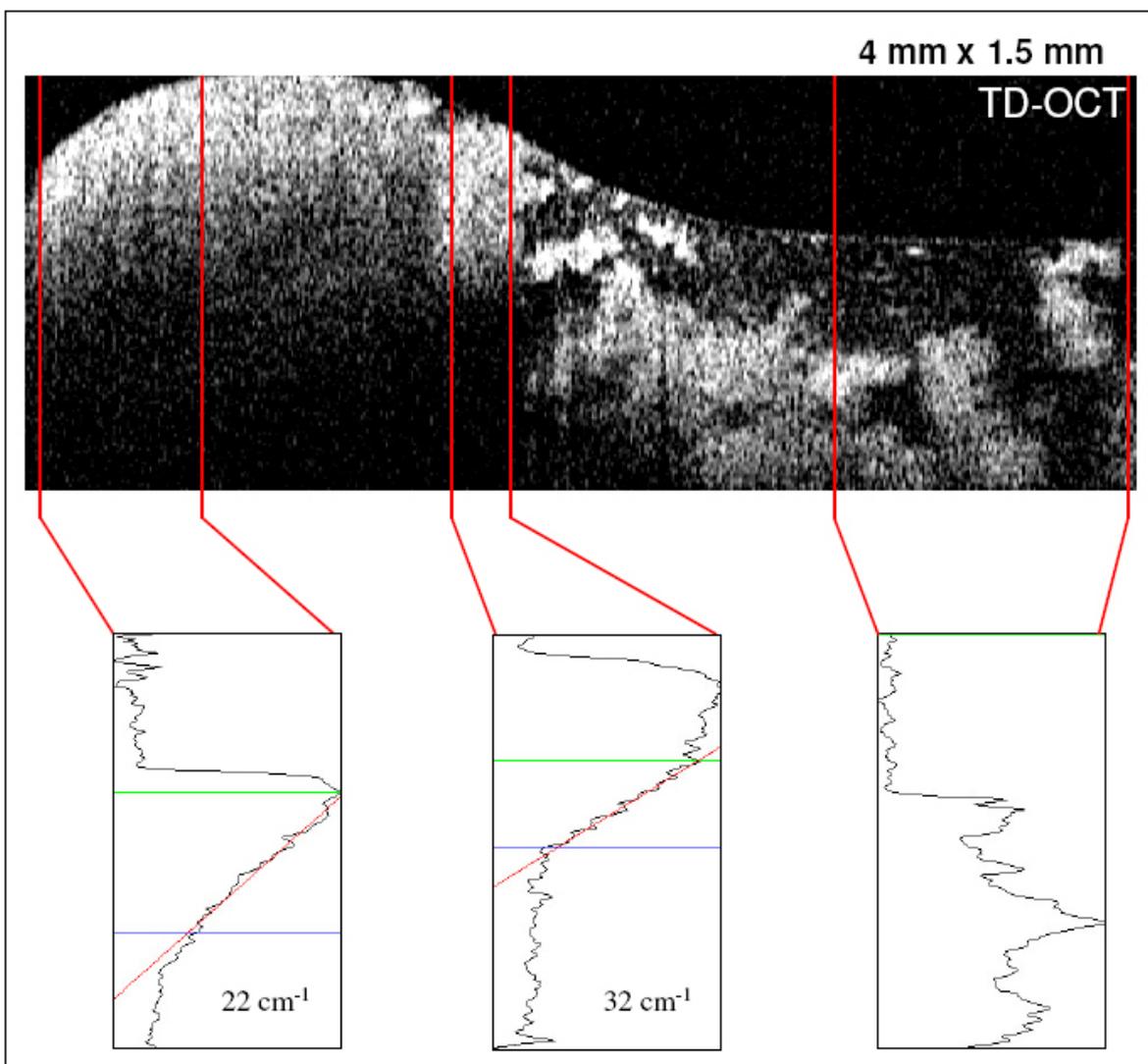


Abb. 19 TD-OCT Lichtschwächungskurven unterschiedlicher Areale einer Glioblastombiopsie ex-vivo.

TD-OCT B-Scans bestehen aus parallel angeordneten A-Scans, die Information der Signalintensität aus einer bestimmten Gewebetiefe enthalten. In B-Scan Bereichen

homogener Signalverteilung können die A-Scans gemittelt werden und die Lichtschwächung in Abhängigkeit der Probtiefe dargestellt werden. In Analyseabschnitten kontinuierlichen Signalabfalls kann ein Lichtschwächungskoeffizient berechnet werden. Abbildung 19 zeigt die TD-OCT Analyse einer Glioblastombiopsie mit angrenzend peritumoralem Hirngewebe (links), solider Tumor (Mitte) und Nekrosezone (rechts). Die Mittlung von A-Scans im Bereich des angrenzenden Hirns links zeigt eine homogene Lichtschwächung, die Regressionsanalyse der Lichtschwächungskurve zeigte einen Lichtschwächungskoeffizienten von 22 cm^{-1} , Mittelung der A-Scans im Bereich der Bildmitte, entsprechend soliden Tumorgewebes, zeigte eine stärkere Lichtschwächung mit einem berechneten Lichtschwächungskoeffizienten von 32 cm^{-1} , entsprechend der höheren Lichtschwächung kann in diesen Arealen verglichen mit dem Areal links in der Gewebetiefe keine verwertbare Bildinformation erhalten werden. Im Bereich der Nekrosezone resultiert aufgrund der heterogenen Binnenstruktur eine Lichtschwächungskurve mit diskontinuierlichem Abfall der Signalintensität. Eine Berechnung des Lichtschwächungskoeffizienten ist hier nicht sinnvoll möglich. Diese Experimente zeigen, dass das OCT-Signal über die morphologische Information des B-Scans hinaus Information zu den Lichtschwächungseigenschaften des Gewebes beinhaltet, die möglicherweise diagnostischen Wert haben könnte.

3.2.2 Intraoperative OCT-Darstellung von Hirn- und Hirntumorgewebe

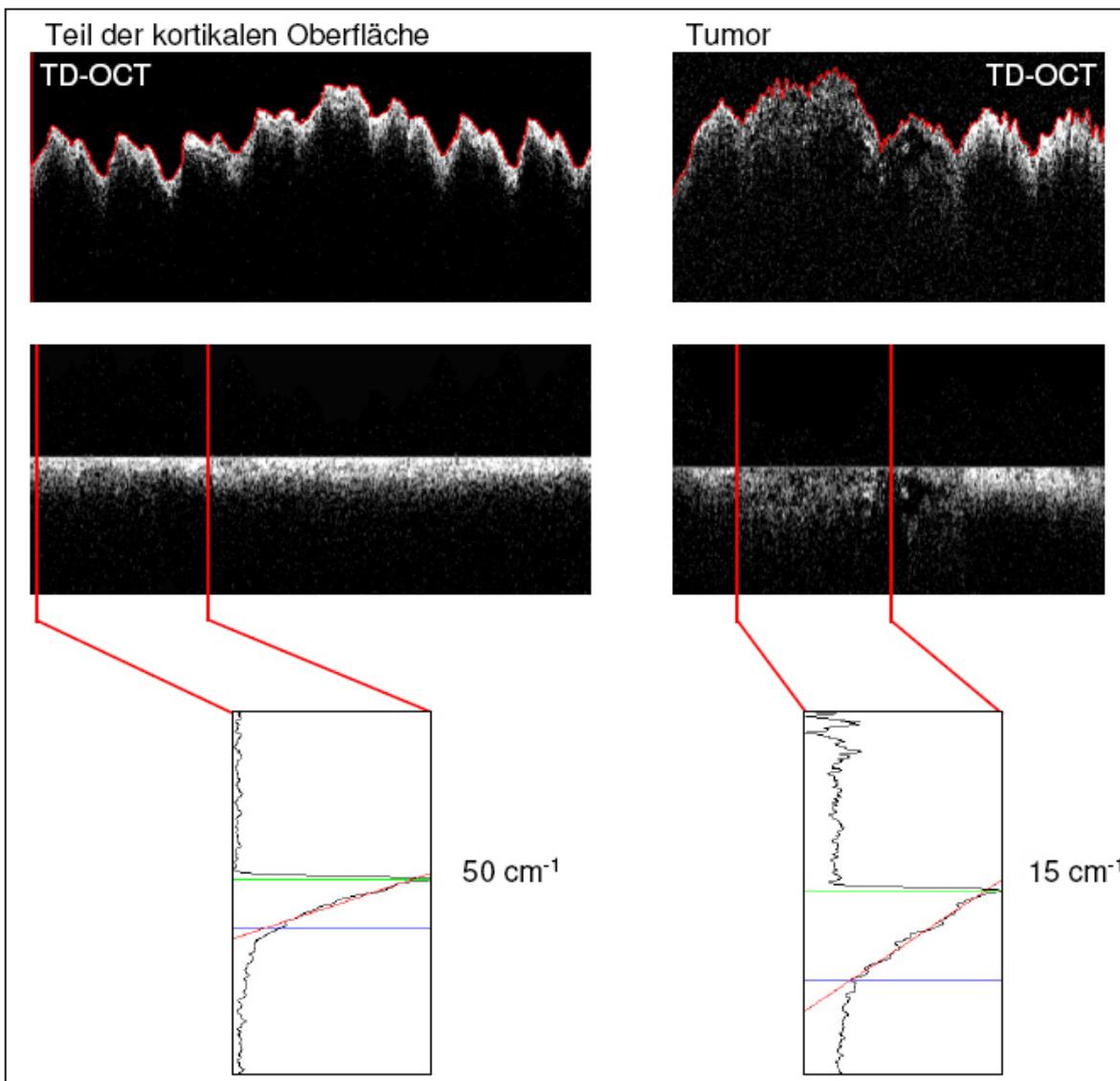


Abb. 20 Intraoperative TD-OCT Darstellung von Glianarbe und Tumorgewebe im Bereich der Resektionsflächen während der Resektion eines Glioblastomrezidivs.

Zunächst stand nur das TD-OCT Gerät der Fa. 4Optics aufgrund seiner CE-Zulassung für eine klinische Erprobung zur Verfügung. Intraoperative OCT-Messungen wurden an 10 Patienten in Rahmen einer klinischen Prüfung, entsprechend dem Medizinproduktegesetz (MPG) angemeldet, dokumentiert und durchgeführt. Abbildung 20 zeigt während der Resektion eines Rezidiv- Glioblastoms aufgezeichnete TD-OCT Analysen der Resektionsflächen. Links ist gliotisches Hirngewebe nach vorangegangener Resektion im Bereich des Zugangsweges gezeigt, rechts ein Anteil soliden Rezidivtumorgewebes umgeben von angrenzendem Hirn während der Tumorentfernung. Wegen der geringen

Messgeschwindigkeit von lediglich 20 A-Scans/sec, sind in den Primärbildern die Eigenbewegungen des Gehirns, das einer puls- und atemsynchronen Bewegung mit einer Amplitude von mehreren Millimetern folgt, deutlich erkennbar. Vor allem die Pulsfrequenz (etwa 60 Hz) ist als Distorsion der Gewebeoberfläche zu erkennen. Durch eine automatische Erkennung der Gewebeoberfläche und Ausrichtung der A-Scans konnte eine Begradigung der Gewebeoberfläche rechnerisch erreicht werden, wodurch die Strukturen im Gewebe deutlich erkennbar werden. Nun kommt in der Probe rechts ein Areal zur Darstellung, das einen Verlust der charakteristischen Lichtschwächung des normalen Hirngewebes zeigt. In der untersten Reihe der Abbildung sind über selektierte Bereiche der OCT-Messungen gemittelte A-Scans dargestellt sowie die dazugehörigen Lichtschwächungskurven. Auch hier zeigte sich, dass ein Tumor andere Lichtschwächungskurven und Lichtschwächungskoeffizienten als normales Hirn aufzeigt. Allerdings zeigt das gliotisch (narbig) veränderte Hirn nach vorangegangener Resektion deutlich höhere Lichtschwächung als normales Hirn in der Analyse in Abschnitt 3.2.1.

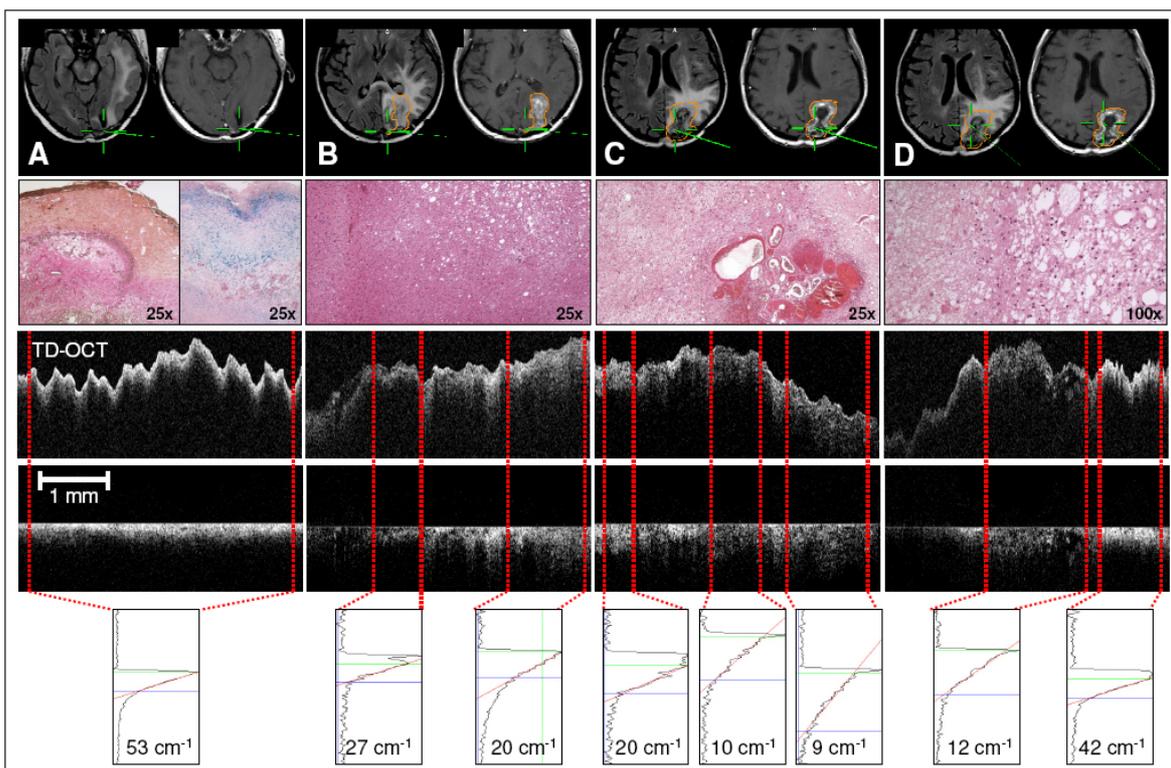


Abb. 21 Intraoperative OCT-Analyse während der Resektion eines Rezidiv- Glioblastoms.

Um zu untersuchen, ob intraoperativ OCT zur Analyse der Resektionsflächen während der Entfernung von Hirntumoren genutzt werden kann, wurden OCT-Untersuchungen während verschiedener Phasen der Entfernung eines Glioblastomrezidivs durchgeführt.

Mit Hilfe des Neuronavigationssystems konnten gezielt OCT-Messungen an definierten Positionen, die anhand der vorab präoperativ aufgenommenen MRT-Bilder bestimmt werden, durchgeführt werden und Proben für die histologische Aufarbeitung der entsprechenden Areale gewonnen werden. Die entsprechenden MRT-Bilder sind in der oberen Reihe von Abbildung 21 dargestellt. Die Lokalisation des OCT-Lasers entspricht dem grünen Kreuz, das der mit Hilfe der Neuronavigation registrierten Focusebene entspricht. In der zweiten Reihe ist die korrespondierende Histologie der Analyseorte gezeigt. Die dritte Reihe zeigt die B-Scandarstellung der TD-OCT-Messungen. Wegen der geringen Messgeschwindigkeit dieser Konfiguration sind Eigenbewegungen des Gehirns deutlich erkennbar. Vor allem die Pulsfrequenz (etwa 60 Hz) ist als Schwankung der Oberfläche zu erkennen, überlagert von einer langsameren Bewegung, die atemsynchron erfolgt. Die ausgerichteten A-Scan Bilder sind in der vierten Reihe dargestellt, was die Strukturen der Gewebeabschnitte deutlich hervorhebt. In der untersten Reihe sind über bestimmte Bereiche der OCT-Messungen (rote Kästchen) gemittelte A-Scans dargestellt. Es fällt auf, dass der Abfall des OCT-Messsignals mit der Tiefe in den gemittelten A-Scans unterschiedlich ist. Dieser Abfall ist mit der Lichtabschwächung des Gewebes korreliert und wurde als Schwächungskoeffizient (siehe oben) quantifiziert. Messung A zeigt einen Bereich eines gliotisch veränderten aber histologisch tumorfreien Resektionsrandes der vorangegangenen Erstoperation. Der Schwächungskoeffizient ist mit 53 cm^{-1} in diesem dichten Narbengewebe relativ hoch und die Messtiefe gering. Messung B zeigt mikrozystische Veränderungen gering gradig tumorinfiltrierten Hirngewebes, Messung C makrozystische Areale soliden Tumorgewebes mit Neovaskulationen und pleomorphen Tumorzellen. Messung D zeigt einen soliden Tumor mit pleomorphen Tumorzellen der an ein Areal von Tumornekrose angrenzt. Die Neuronavigationsdaten zeigen, dass es sich hier um das nekrotische Zentrum des Tumors handelt. Der Schwächungskoeffizient in Arealen soliden Tumors zeigte sich gegenüber gliotischem Gewebe und Arealen geringer Tumorerinfiltration erniedrigt.

3.3 Vergleichende ex vivo Analyse von humanen Hirntumorbiopsien durch TD-OCT und SD-OCT

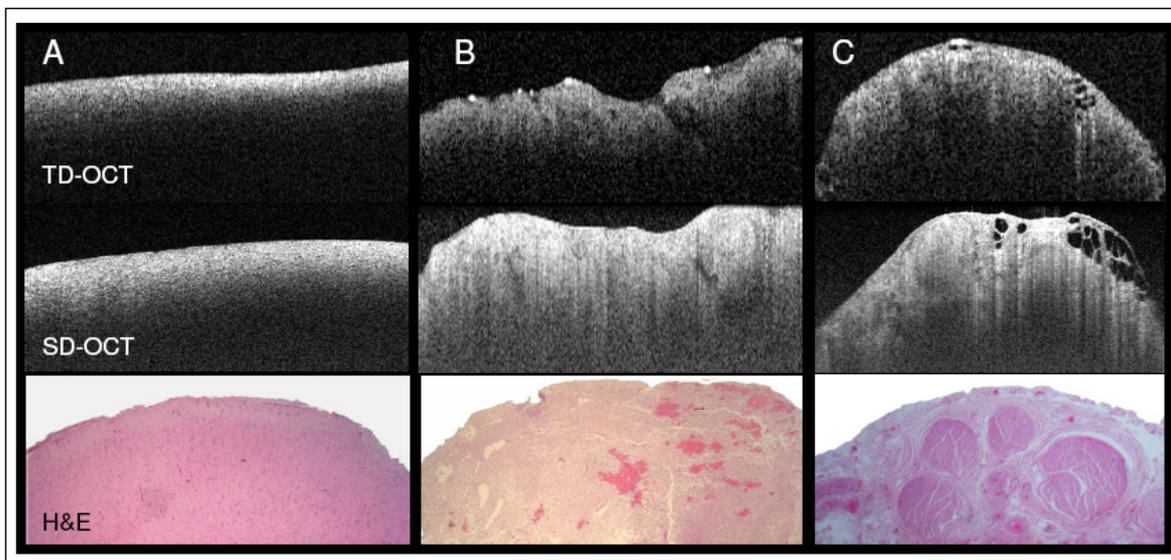


Abb. 22 Vergleich von TD-OCT, SD-OCT und Histologie.

Tumorfrees Hirngewebe zeigt in der OCT-Darstellung keine erkennbaren Strukturen, aber ein homogenes Erscheinungsbild mit einem typischen Signalabfall in die Gewebetiefe (Abb. 22 A). Dies bestätigte sich unabhängig vom eingesetzten OCT-Gerät. Die Homogenität des nativen Gewebes spiegelt sich auch in der Histologie wieder. Glioblastomgewebe (Abb. 22 B) ist histologisch durch Unregelmäßigkeiten wie variierende Zelldichte, Nekrose oder Einblutungen gekennzeichnet. Diese Inhomogenität und die daraus resultierende Mikrostruktur findet sich in der OCT-Darstellung wieder. Die OCT-Messtiefe ist bei Tumorgewebe deutlich größer als in tumorfreiem Hirngewebe. Wie in der Untersuchung experimenteller Gliome im Mausmodell zeigt der Vergleich der beiden OCT-Geräte für das SD-OCT einen erheblich größeren Detailreichtum. Dieses bestätigte sich auch in einer Untersuchung einer Probe des Nervus suralis (Abb. 22 C). Hier zeigen sich epi- und perineurale Zonen, ferner kann man die durch die chirurgische Bearbeitung entstandenen Lufteinschlüsse in den Bindegewebsschichten gut erkennen.

3.3.1 Einfluss von Formalinfixierung auf das OCT-Signal

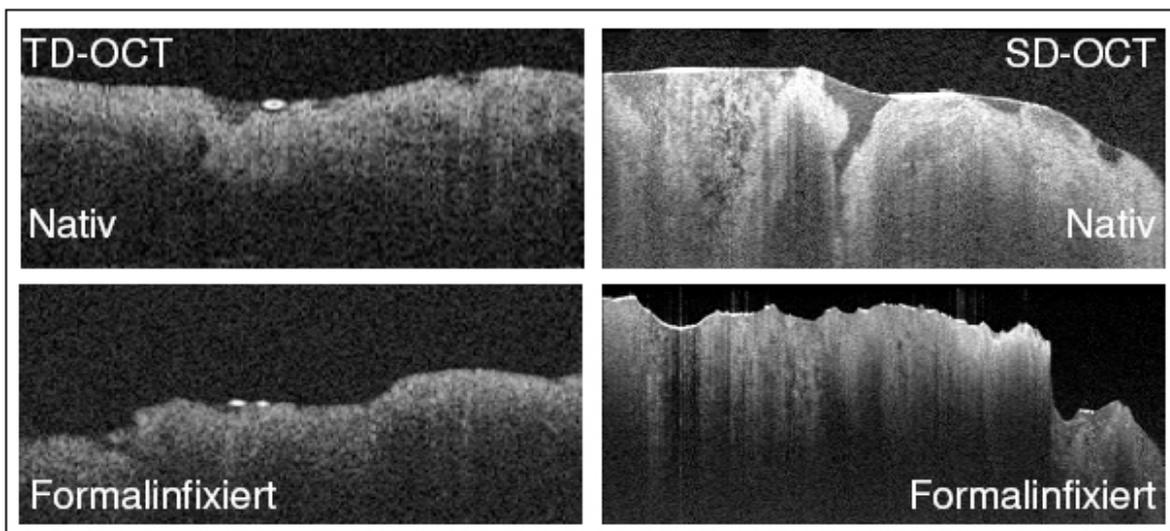


Abb. 23 Native und fixierte Glioblastomprobe.

Um den Einfluss von Formalinfixierung auf das OCT-Signal zu untersuchen, wurde eine TD-OCT- und SD-OCT Analyse einer Glioblastom-Biopsie vor und nach 48 Stunden der Formalinfixierung durchgeführt. Die Fixierung führt zu Volumen- und Gewebekonsistenzänderungen der Probe, was eine identische Ausrichtung der optischen Ebenen vor- und nach Fixierung verhindert. Deshalb entsprechen die optischen Analyseorte der Untersuchungen einander nur ungefähr. Es wurde deutlich, dass Formalinfixierung eine Änderung des Gewebesignals und der Analysetiefe hervorruft. Fixiertes Gewebe zeigte einen partiellen Verlust der Mikrostruktur. Auch war die Gewebetiefe, die noch ein interpretierbares Signal lieferte, vermindert. Erneut zeigte sich, dass SD-OCT in nativen, aber auch in fixierten Proben eine detailliertere Darstellung lieferte als TD-OCT.

3.4 Analyse humanen Hirn- und Hirntumorgewebes durch SD-OCT

3.4.1 Ex vivo Analyse von humanen Hirn- und Gliombiopsien durch SD-OCT

Die vorangegangenen Untersuchungen machten deutlich, dass zur Analyse von Hirn- und Hirntumorgewebe SD-OCT einen höheren diagnostischen Wert erkennen lässt als TD-OCT und darüber hinaus in der hier verwendeten Konfiguration eine deutlich höhere Messgeschwindigkeit erlaubte. Aus diesen Gründen wurde die Weiterentwicklung des Verfahrens mit dieser Technologie vorangetrieben.

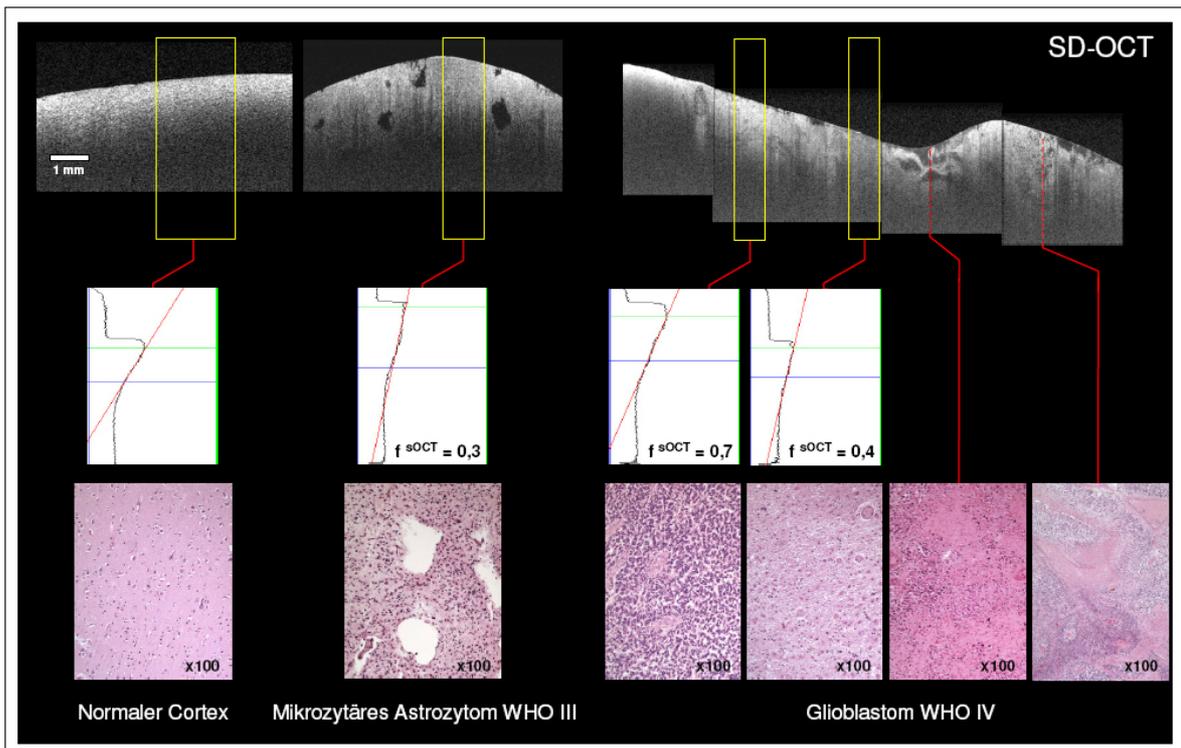


Abb. 24 SD-OCT Darstellung von humanen Cortex und Gliomgewebe ex vivo, den Lichtschwächungskurven und zugehörigen Histologien.

Es wurden erneut Hirnproben und Biopsien von Gliomen unterschiedlicher Malignitätsgrade untersucht. Abbildung 24 zeigt die ex vivo Analyse von intraoperativ entnommenen Biopsien, die analog zu den Voruntersuchungen der TD-OCT Analyse sofort einer SD-OCT Untersuchung unterzogen und unmittelbar für die histologische Aufarbeitung fixiert und bearbeitet wurden. Der normale menschliche Kortex zeigt analog zu den bisherigen Untersuchungen und in Übereinstimmung mit den histologischen Befunden ein homogenes Gewebe ohne Mikrostrukturen, jedoch den charakteristischen Signalverlust mit zunehmender Gewebetiefe. Die Lichtschwächungskurve zeigt die kontinuierliche Schwächung des Signals in Abhängigkeit der Gewebetiefe. Die Analyse eines mikrozystischen Astrozytoms WHO III zeigte analog zu dem histologischen Bild zahlreiche scharf umschriebene signalhypointense intraparenchymatische Strukturen, entsprechend den intratumoralen Mikrozysten. Das zwischen den Zysten zur Darstellung kommende hochzelluläre Tumorgewebe zeigte sich in der SD-OCT Darstellung hypointens. Der berechnete Lichtschwächungskoeffizient ($f_{sd-oct} = \mu$ (Tumorgewebe / Cortex) dieser Areale betrug $0,3 \text{ m}^{-1}$. Die Untersuchung eines Glioblastomresektats mit angrenzendem infiltriertem Hirngewebe erlaubte die Untersuchung verschiedener Areale eines solchen Tumors. Entsprechend der histologischen Aufarbeitung fanden sich Areale hochzellulären Tumors mit hoher Dichte pathologischer Blutgefäße, aber auch Areale mit

geringerer Tumorzellichte, sowie infiltrierten angrenzenden Hirngewebes. Die SD-OCT B-Scan Darstellung dieser Areale korrelierte mit den morphologischen Korrelaten der Gewebearchitektur. Der berechnete Lichtschwächungskoeffizient ($f_{sd-oct} = \mu$ (Tumorgewebe / Cortex)) des hochzellulären Tumors betrug in diesem Fall 0.7 m^{-1} , der des infiltrierten Hirngewebes 0.4 m^{-1} . Tumoranteile mit Mikronekrosen und geographischen Nekrosen zeigten die inhomogene durch Gewebeerfall gekennzeichnete Mikrostruktur. Wegen des inhomogenen Signalabfalls war eine Berechnung eines Lichtschwächungskoeffizienten in diesen Arealen analog zu unseren Voruntersuchungen nicht sinnvoll.

3.4.2 Ex vivo Analyse des Resektionsausmaßes durch SD-OCT

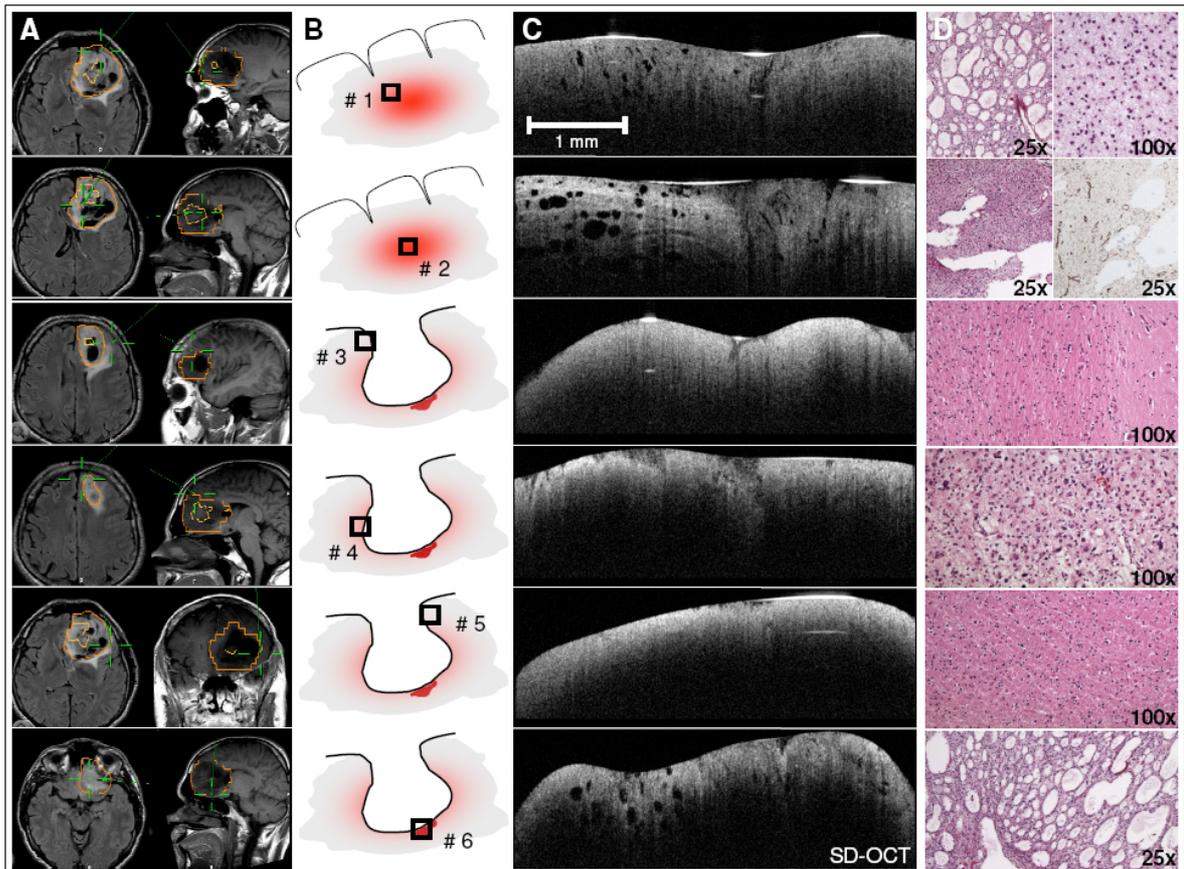


Abb. 25 Im Verlauf einer Resektion eines anaplastischen Astrozytoms WHO III wurden OCT-Analysen der Resektionsflächen zu verschiedenen Phasen der Tumorentfernung durchgeführt. A: Registrierung der Analysepunkte in der Neuronavigation, B: schematische Darstellung der Analyseregion, C: OCT-Befund, D: histologisches Korrelat.

Um zu untersuchen, ob die OCT-Technologie geeignet ist, Reste soliden Tumors oder hochinfiltrierter Areale der Invasionszone zu identifizieren, wurde während der operativen Entfernungen eines malignen Glioms nach Abschluss der Resektion in konventioneller Technik ex vivo eine OCT-Analyse von Biopsien der nun operationsmikroskopisch tumorfrei erscheinenden Resektionswände vorgenommen und mit H&E gefärbten konventionellen histologischen Tumorrandschnitten verglichen. Dabei zeigte sich, dass in Proben aus dem makroskopischen Tumorzentrum der Tumor anhand seiner Mikrostruktur eindeutig identifiziert werden konnte (Abb. 25 Proben #1 und #2). Untersuchungen des operationsmikroskopisch tumorfreien Resektionsrandes zeigten für die Proben #3 und #5 das typische OCT-Signal normalen Hirngewebes (Abb. 25). Histologisch konnte hier kein Tumor nachgewiesen werden. In den Proben #4 und #6 zeigten sich Signalcharakteristika

ähnlich dem soliden Tumor (Abb. 25). Histologisch konnte hier, obwohl es sich um operationsmikroskopisch unauffälliges Gewebe gehandelt hatte, Anteile soliden Tumorgewebes nachgewiesen werden. Somit konnten durch die hochauflösende SD-OCT Analyse intraoperativ verbliebene Tumoranteile nachgewiesen werden, was eine umgehende Erweiterung der Resektion ermöglicht. Diese Pilotuntersuchung zeigte, dass die SD-OCT Analyse in operationsmikroskopisch tumorfrei erscheinendem Hirngewebe hoch-zelluläre Tumordinfiltration, aber auch soliden Tumor nachweisen konnte (Abb.25). Damit konnten wir als erste Arbeitsgruppe experimentelle Daten vorlegen, die zeigen, dass prinzipiell die optische Kohärenztomographie geeignet ist, mikroskopische Tumorreste im Bereich der Resektionswände darzustellen.

Im Rahmen einer Pilotstudie wurden bei Resektionen von 10 malignen Gliomen insgesamt 40 optische Gewebeanalyse von Biopsien ex vivo durchgeführt und durch einen geblindeten Untersucher bezüglich der Befunde (hochzelluläres solides Tumorgewebe, Tumordinfiltration, oder tumorfreies Hirngewebe) bewertet, dann histologisch aufgearbeitet. Diese Untersuchung zeigte, dass ein hohes Maß an Übereinstimmung der OCT-Befunde mit der histologischen Bewertung erzielt werden konnte (Abb. 26). In dieser vorläufigen Untersuchung wurde keine Probe soliden Tumors in der OCT-Beurteilung als tumorfrei eingestuft. Allerdings wurden drei Proben, die sich histologisch tumorfrei zeigten, als tumorinfiltriert eingestuft. Es bleibt aber zu bedenken, dass diese Analysen ex vivo durchgeführt wurden und das eine Entnahme der Proben der Randbereiche erst nach Abschluss der Resektion durchgeführt werden konnten, zu einem Zeitpunkt, zu dem sekundäre Gewebsveränderungen regelhaft auftreten (siehe 3.4.3). Die größte Unschärfe der Methode zeichnet sich für tumorinfiltrierte Areale ab. Naturgemäß ist aber der Grad der Tumordinfiltration sehr variabel und damit sind die Übergänge zwischen den Bewertungsgruppen solider Tumor und Tumordinfiltration fließend.

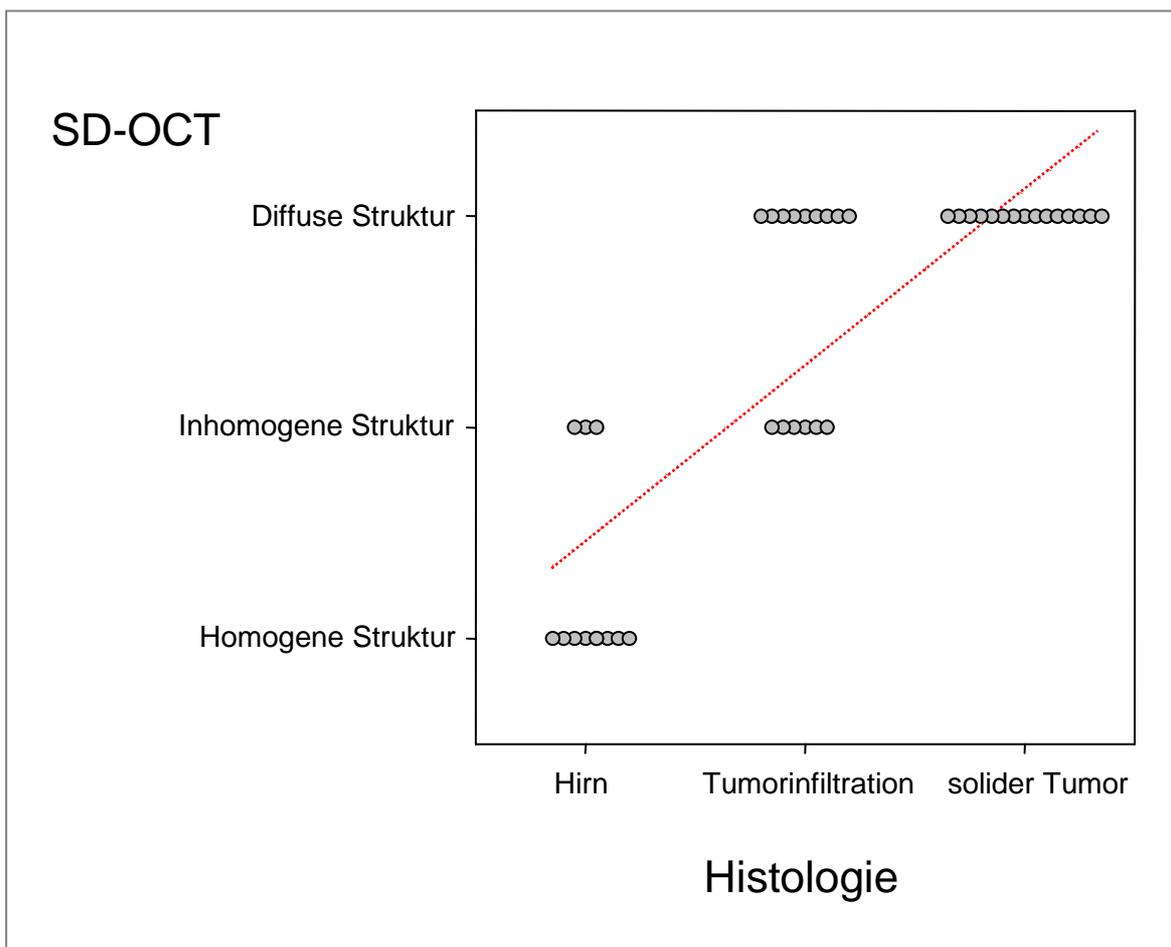


Abb. 26 Vergleich von 40 Biopsien maligner Gliome zwischen SD-OCT und Histologie.

3.4.3 Einfluss von Resektionstechniken und chirurgischen Hilfsmitteln auf das SD-OCT Signal

Während der Resektion von Hirntumoren kommen verschiedene Resektionstechniken, scharfe und stumpfe Präparation, Koagulation oder Ultraschallaspiration, zum Einsatz. Es ist denkbar, dass die Art der Entstehung von Resektionsflächen Einfluss auf das OCT-Signal hat. Weiterhin werden verschiedene Materialien zur Blutstillung eingesetzt, die aufgrund ihrer Struktur und ihres Lichtstreuungsverhalten, das OCT-Signal artifiziell alterieren. Auch könnten Auflagerungen der zu analysierenden Gewebeoberfläche die Bildgebung verändern ebenso wie physiologische oder physikalische Gewebezustände (Temperatur oder Dehydratation). Aufgrund dessen wurde eine vorläufige Analyse für einige dieser Einflussfaktoren durchgeführt, indem eine native Glioblastombiopsie zur Simulation dieser beeinflussenden Faktoren *ex vivo* verwendet wurde. Diese Untersuchung bleibt aber bis zu einem breiteren intraoperativen Einsatz des Verfahrens

vorläufig, da Einflussfaktoren wie Resektionstechniken und die damit verbundenen Gewebeveränderungen durch Kontusion zum Beispiel nur in vivo untersucht werden können.

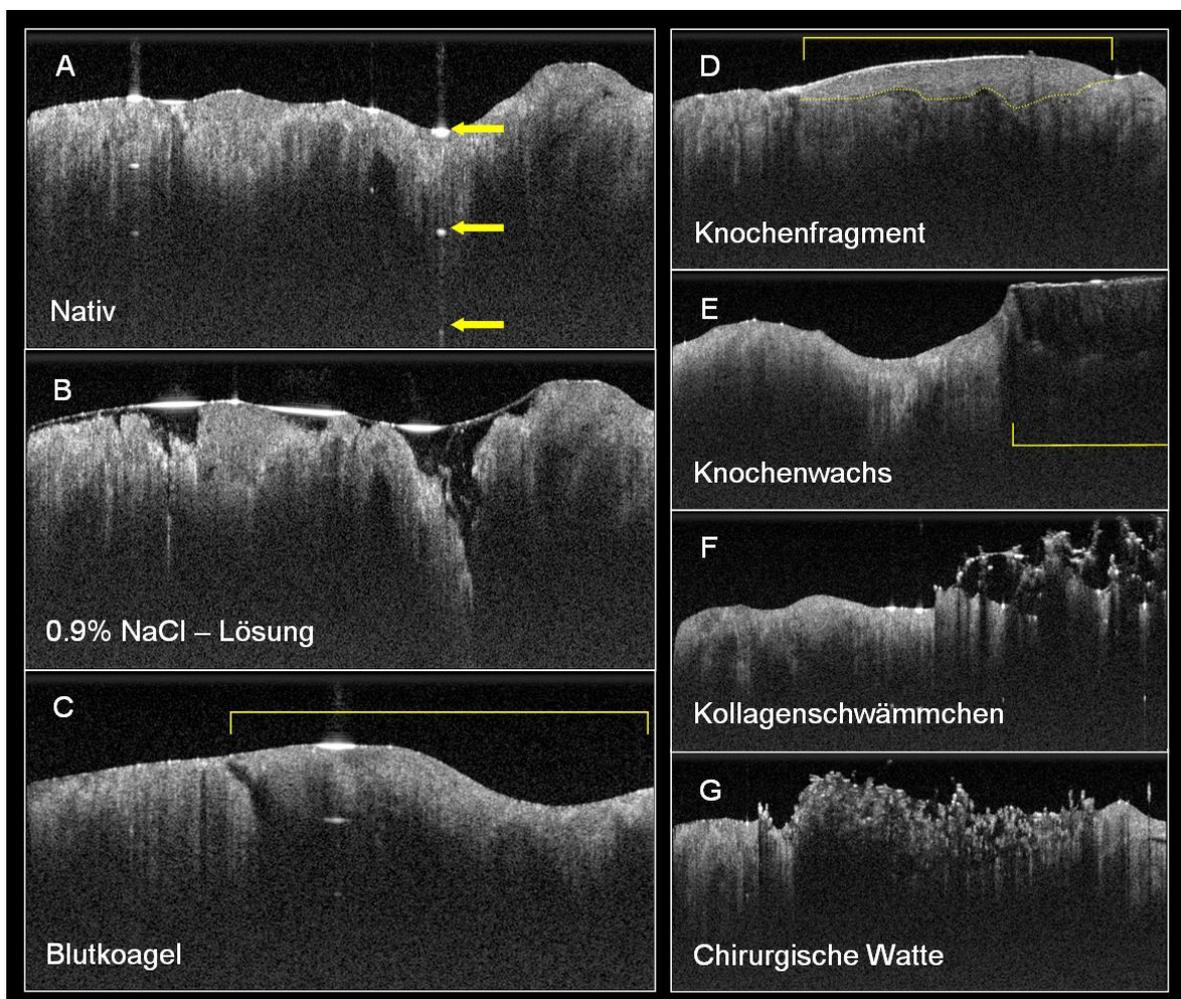


Abb. 27 Einfluss von Auflagerungen der Gewebeoberfläche auf die SD-OCT Darstellung einer Glioblastombiopsie.

Die Untersuchung frisch entnommener Gewebeprobe zeigt in umschriebenen Arealen der Gewebeoberfläche sich in der Gewebetiefe fortsetzende signalintense Artefakte (Abb. 27A, Pfeile). Diese Artefakte konnten als geometrische Reflexe von Flüssigkeiten auf der Gewebeoberfläche identifiziert werden, die entstehen, wenn der Messlaser 90 Grad zum Flüssigkeitsspiegel auftrifft. Flutung der Gewebeoberfläche mit isotoner Kochsalzlösung zeigte, dass sich durch das Auffüllen präparationsbedingter Gewebeinhomogenitäten das Erscheinungsbild der Probe und das der intraparenchymatischen Mikrostruktur verändert (Abb. 27B). Blutkoagel oder Knochenspäne, wie sie bei der Trepanation entstehen, führen auf der Gewebeoberfläche aufgrund der starken Lichtschwächung im Koagel zu einer

Auslöschung des Signals darunter und erlauben somit keine Interpretation der Gewebstruktur (gelbe Klammer Abb. 27 C und D). Ähnliche Phänomene wurden für auf die Gewebeoberfläche aufgebraute chirurgische Hilfsmittel beobachtet (Abb. 27 E bis G).

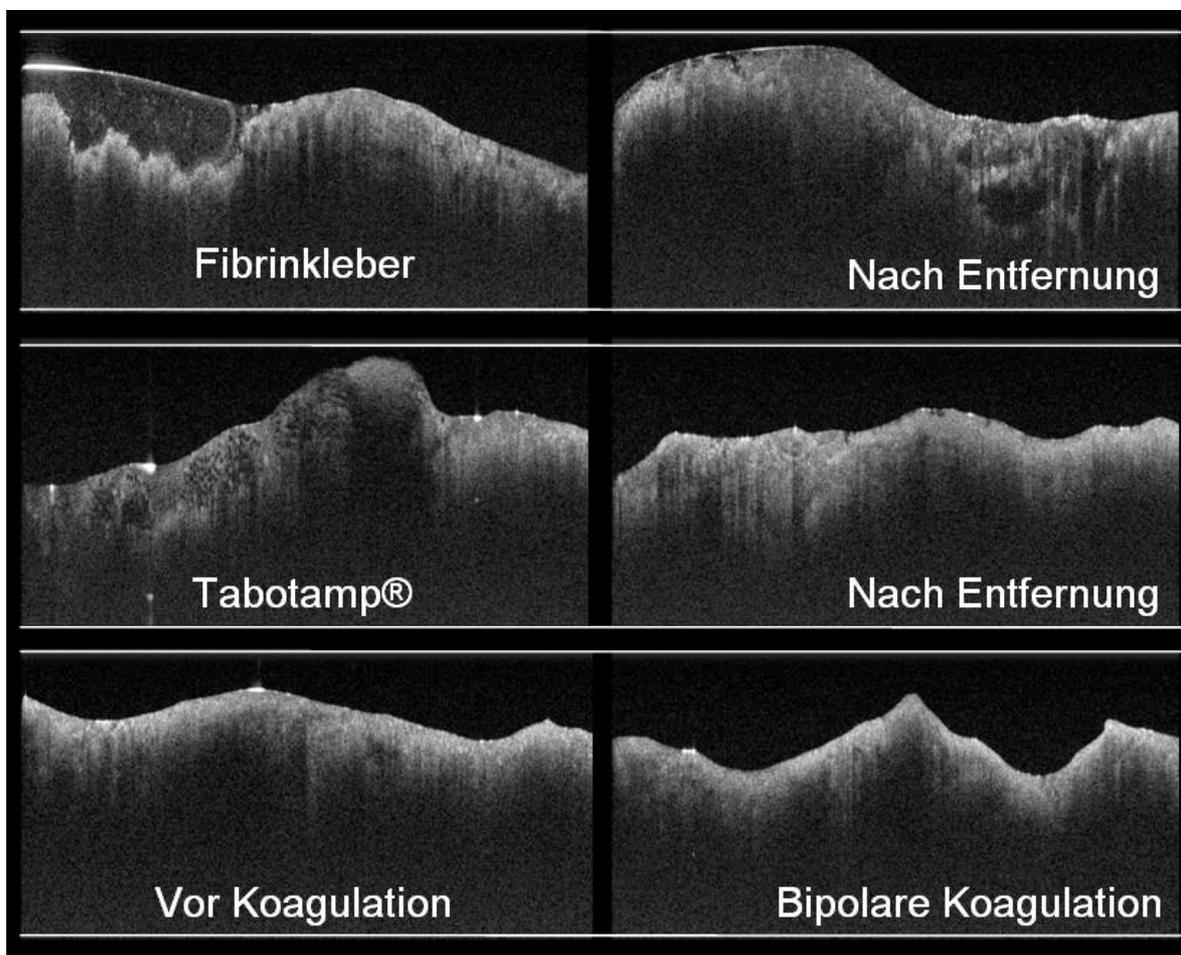


Abb. 28 Artefakt Darstellung im SD-OCT auf Glioblastomprobe.

Um die Auswirkungen bestimmter Arbeitsstoffe beim Aufbringen bzw. Entfernen bildlich darzustellen, wurde Gewebe mit den üblichen Arbeitsstoffen in der neurochirurgischen OP-Technik behandelt (Abb. 28). Auf die Gewebeoberfläche aufgebraute Fibrinkleber führte zu einer Signalanhebung der darunter gelegenen Gewebestruktur. Nach Entfernung des Fibrins stellte sich das behandelte Gewebeareal in veränderter Signalcharakteristik dar (Abb. 28 oben). Auch die Aufbringung blutstillender Präparate, wie Tabotamp® erlaubt keine Interpretation der darunter gelegenen Gewebestruktur aufgrund der dem Material inhärenten Mikrostruktur und Lichtschwächungseigenschaften. Nach Entfernung des Materials von der Gewebeoberfläche verbleibt makroskopisch eine Verfärbung der Gewebeoberfläche. Auch in der OCT-Darstellung bleibt eine Änderung des Signalverhaltens bestehen (Abb. 28 Mitte). Die zur Blutstillung verwendete bipolare

Gewebekoagulation führt einerseits zu einer permanenten Alteration der Form der Gewebeoberfläche, andererseits zu einer permanenten Alteration des intraparenchymatischen Signalverhaltens (Abb. 28 unten).

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine optische Gewebeanalyse zum Abschluss einer Resektion nicht praktikabel ist. Zu diesem Zeitpunkt werden Mikrounterblutungen der Resektionsflächen, Kontusionsphänomene und eingebrachte Fremdmaterialien zu einer permanenten Veränderung der Signalcharakteristik des angrenzenden Hirns geführt haben. Da Veränderungen der Resektionsflächen als Folge der Gewebekontusion, unabhängig ob in normalem Hirn oder in Tumorgewebe, innerhalb von Minuten eintreten, sollte eine Analyse des Gewebes unmittelbar erfolgen. Deshalb ist es erforderlich, die intraoperative optische Gewebeanalyse zeitnah zum Zeitpunkt des Entstehens der Resektionsflächen durchzuführen, bevor artifizielle Änderungen des OCT-Signals auftreten. Dieses erfordert die Integration dieser Technologie in neurochirurgisches Instrumentarium und die neurochirurgischen Arbeitsabläufe.

3.4.4 SD-OCT integriertes Operationsmikroskop

Die optische Gewebeanalyse zur intraoperativen Detektion von Tumorgewebe eignet sich aufgrund ihrer technischen Voraussetzungen für eine Integration in neurochirurgisches Instrumentarium, speziell in neurochirurgische Operationsmikroskope. Anhand der gesammelten Daten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über einen Messabstand von 20-40 Zentimeter eine berührungslose und nicht-invasive Gewebeanalyse durchgeführt werden kann und somit theoretisch die Messungen durch den Strahlengang eines Mikroskops erfolgen könnten.

In Zusammenarbeit mit der Firma Möller-Wedel wurde daraufhin konzeptionell gezeigt, dass eine Integration eines Spektraldomain OCT-Tomographen in den optischen Strahlengang eines neurochirurgischen Operationsmikroskops möglich ist (Abb.29). Operationsmikroskope dieser Bauart sind für kommerzielle Anwendungen bereits für eine Integration in ein Neuronavigationssystem vorgerüstet. Die Einbindung des Mikroskops in ein Navigationssystem ermöglicht die Darstellung der Blickachse und des Blickfelds in Relation zu vor der Operation gewonnenen MRT-Bildern, was eine „globale“ Orientierung in Bezug auf die Tumorlokalisierung und die angrenzenden Hirnregionen erlaubt. Die Einbindung der SD-OCT in das Mikroskop ermöglicht nun eine Analyse der Gewebeflächen im Gesichtsfeld des Mikroskops, ohne dass ein Unterbrechen des chirurgischen Vorgehens für die Analyse erforderlich wird. Damit stünde die optische Gewebeanalyse praktisch kontinuierlich während des Entstehens der Resektionsflächen

zur Verfügung. Über die Einbindung des Mikroskops in die Navigation wird gleichzeitig eine Referenzierung des OCT-Analyseortes und seine Darstellung in Bezug zu den vor der Operation gewonnenen MRT-Bildern erreicht.



Abb. 29 SD-OCT integriertes Operationsmikroskop.

Die Integration des Mikroskops in die Neuronavigation ermöglicht die Orientierung des Blickfelds und des Trajekts an den präoperativ erstellten MRT-Bildern, was eine „globale“ Orientierung an der Tumormorphologie und benachbarten Landmarken ermöglicht. Die Integration der optischen Gewebeanalyse wiederum erlaubt über den Blick auf die Resektionsflächen hinaus einen nicht-invasiven tomographischen Blick in die Resektionswand hinein und stellt Information über die Mikrostruktur und die Lichtschwächungseigenschaften des Gewebes bereit, eine Informationsqualität, die konventionelle Operationsmikroskope bisher nicht erreichen.

Es wurde ein modifiziertes SD-OCT Gerät mit einer Zentralwellenlänge von 830 nm realisiert. Aufgrund der erwarteten Verschlechterung der lateralen OCT-Messauflösung durch das OCT-OP-Mikroskop wurde auf eine hohe axiale Messauflösung zugunsten einer größeren Tiefenmessbereiches verzichtet. Zur Einstellung des Arbeitsabstandes und Kompensation der Eigenbewegungen des Gehirns während der Operation ist eine größere Messfenstertiefe von Vorteil. Das Messfenster des 830nm SD-OCT Gerätes konnte auf 3,6 mm vergrößert werden. Die axiale Messauflösung verschlechterte sich dabei von 8 μm auf 16 μm . Um die insgesamt geringe IR-Transmission des für sichtbares Licht konzipierten OP-Mikroskopes zu kompensieren, wurde eine externe Lichtquelle mit einer Leistung von 20 mW angeschlossen. Das SD-OCT Gerät wurde in das Operationsmikroskop Hi-R1000 der Firma Möller Wedel integriert, das als neurochirurgisches Operationsmikroskop ausgelegt ist. Das Gerät besteht aus den drei

Komponenten OCT-Spektrometer, Referenzarm und Scanner im Probenarm, der am Kameraport angebracht ist (Klinger, 2007; Malik, 2006).

Dieser Prototyp war mit diversen Einschränkungen behaftet. Der Arbeitsabstand war noch nicht variabel und die Qualität der OCT-Messungen (Messtiefe und Kontrast) war aufgrund einer geringen IR-Transmission des OCT-Probenlichtes durch die Mikroskopoptik schlechter als in unseren vorangegangenen OCT-Messungen mit externen Geräten. Trotz dieser Einschränkungen waren so weltweit die ersten interoperativen OCT-Messungen während einer neurochirurgischen Operation möglich. Abbildung 29 zeigt die Einbindung des Mikroskops in die Neuronavigation und den OP-Situs, sowie die zugehörige OCT-Analyse. In Abbildung 30 sind intraoperative OCT-Messungen gezeigt, die blauen Linien kennzeichnen das Analyseareal. Zur Darstellung kommt die tumorfreie Hirnoberfläche (links) ohne prominente Strukturen, während im soliden Tumor (Mitte), und im Bereich der Resektionswand (rechts) Mikrostrukturen in den OCT-Messungen differenziert werden können

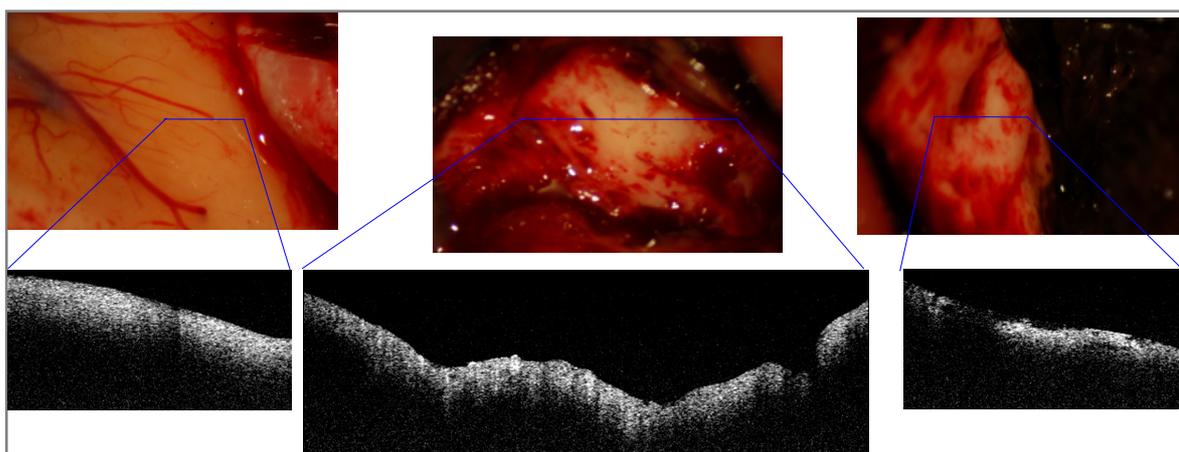


Abb. 30 In vivo Messungen am menschlichen Gehirn mit dem OCT-OP Mikroskop.

Oben: Auflichtbilder durch das OP-Mikroskop. Unten: OCT B-Scans durch das OP-Mikroskop. Links: tumorfreie Gehirnoberfläche. Mitte: solider Hirntumor. Rechts: Resektionswand.

3.4.5 Technische Entwicklung seit Abschluss der hier präsentierten Arbeit

Inzwischen konnte der Mikroskop Prototyp erheblich verbessert werden. Es wurde eine Optimierung des optischen Systems des Mikroskops für den sichtbaren Bereich und für den Infrarotbereich des OCT-Geräts durchgeführt. Dies ermöglichte eine erhebliche Verbesserung der OCT-Abbildungsqualität und eine höhere Lichtstärke. Es wurde eine Kopplung des OCT-Lasers mit dem Fokussystem des Mikroskops für variable

Messabstände realisiert sowie eine Kopplung mit dem Zoom des Mikroskops verwirklicht, wodurch OCT-Messungen in variabler Vergrößerung durchgeführt werden können. Die Messgeschwindigkeit konnte auf 5000 A-Scans / Sekunde gesteigert werden, was die Messungen gegen Bewegungsartefakte unempfindlicher macht. Der Prototyp ist nun für eine klinische Studie unter Bedingungen bereit, die keine Kompromisse im Vergleich zu kommerziellen Operationsmikroskopen verlangen. Ein positives Votum der Ethikkommission Göttingen für eine Folgestudie liegt vor, deren Beginn für Mai /2007 geplant ist.

4. Diskussion

Hirneigene Tumore, deren größte Gruppe die Gliome darstellen, haben aufgrund eines ausgeprägten Invasionsverhaltens keine Grenzen gegenüber dem normalen Gehirn. Vielmehr sind diese Tumore von einer Invasionszone umgeben, die invasive Tumorzellen in einem Gradienten abfallend vom hochzellulären Tumor in die Peripherie darstellen (Giese et al., 1994; Giese und Westphal, 1996; Giese et al., 2003). Dieses trifft sowohl für die niedrig-malignen besser differenzierten so genannten „low grade“ Gliome als auch für die malignen Tumore zu, deren entdifferenziertester und gleichzeitig am häufigsten vorkommender Tumor das Glioblastom darstellt. Niedrig-maligne hirneigene Tumore zeigen nach vollständigeren Resektionen eine verminderte Progressionsrate zu entdifferenzierteren Formen, was möglicherweise als Folge einer verlängerten Überlebenszeit beinhaltet. Für hoch maligne hirneigene Tumore konnte kürzlich definitiv gezeigt werden, dass eine möglichst vollständige Entfernung des Tumors einen Überlebensvorteil für den Patienten bedeutet (Lacroix et al., 2001).

Die intraoperative Darstellung von Resttumor oder hochgradig tumor-infiltrierter Hirnareale ist dennoch mit Hilfe der vergrößernden Darstellung der Operationsmikroskope schwierig und im Falle der niedrig-malignen Gliome häufig unmöglich. So kommen verbliebene Resttumoranteile erst auf postoperativ angefertigten Kernspintomographien zur Darstellung. Die histologische Aufarbeitung von intraoperativen Randschnitten stellt zwar eine zuverlässige Möglichkeit dar, Resttumor oder hochgradig infiltrierte Zonen zu identifizieren, sie ist allerdings sehr zeit- und personalaufwendig, so dass diese Methode kaum im Sinne eines während der Resektion kontinuierlichen Verfahrens steht. Zudem ist problematisch, dass die Untersuchung die Entnahme des Gewebes erfordert, was in funktionellem Hirngewebe nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden kann.

Die intraoperative Neurosonographie, die auf Darstellung akustischer Übergänge des Gewebes basiert, ist für die Lokalisation und Darstellung von Tumorgewebe und umgebender anatomischer Strukturen, Identifizierung von an die Resektionshöhle angrenzenden Resttumorgewebes und Darstellung der perifokalen Infiltrations- und/oder Ödemzone ein etabliertes und validiertes Verfahren, das in der Neurochirurgie intrakranieller Tumore seit Jahren routinemäßig verwendet wird (Chandler und Knake, 1983; Bernays, 2003). Allerdings ist die Auflösung dieser Methode begrenzt und erreicht keinen „histologie-äquivalenten“ Informationsgehalt. Weiterhin erscheint problematisch, dass in Abhängigkeit einer zeitlichen Dynamik operationsbedingte Gewebeläsionen dieselbe Signaldarstellungen annehmen können wie solides Tumorgewebe, wodurch eine Histospezifität nicht gegeben ist.

Die intraoperative Darstellung von Hirn, Tumor und Resektionshöhle ist auch durch intraoperative MRT-Untersuchungen möglich (Albayrak et al., 2003). Hohe Investitionskosten für das Gerät, bauliche Voraussetzungen, die Notwendigkeit spezialisierten Personals anderer Fachdisziplinen, der hohe zeitliche Aufwand und die Beschränkung auf spezielles, nicht ferromagnetisches Instrumentarium sowie elektronisches Gerät, schränken eine breite Anwendung dieser Methode stark ein. Ähnlich wie in der sonographischen Darstellung wird trotz des enormen Aufwands klar, dass auch die im MRT zur Darstellung kommenden Signalabnormitäten operationsbedingter Gewebeläsionen (Kontusionen, Hyperämien, Blutungen, Ischämien) in gewissen Phasen schon während der Operation keine Differenzierung von kontrastmittelaufnehmendem Tumor erlauben und somit ebenfalls keine Histospezifität besitzen.

Optische Technologien der Gewebeanalyse, wie die optische Kohärenztomographie sind Verfahren, die Reflektionseigenschaften von Gewebe unter Einstrahlung eines nah-infrarot Lasers nutzen, um eine B-Scan tomographische Darstellung des Gewebes zu erreichen. Konzeptionell lassen sich durch eine Adaptation dieser Methoden für neurochirurgische Applikationen die Nachteile der Sonographie oder des intraoperativen MRT überwinden. Während die Sonographie (und auch das MRT) einen während der Operation „intermittierenden Überblick“ des an das Resektionsareal angrenzenden Gewebes und damit die Analyse größerer Gewebezusammenhänge erlaubt, ist ein optisches kohärenztomographisches Verfahren geeignet, eine kontinuierlich Analyse der optischen Gewebeeigenschaften des im Gesichtsfeld gelegenen Areals durchzuführen, ohne die Notwendigkeit Gewebe für die Untersuchung zu entnehmen oder funktionell zu schädigen. Die klassische TD-OCT wurde bereits in verschiedenen Disziplinen getestet und befindet sich in verschiedenen Stadien der klinischen Anwendung. Umfangreiche Vorarbeiten existieren für die Ophthalmologie (Hee et al., 1995a; Hee et al., 1995b; Puliafito et al., 2004; Thomas und Duguid, 2004) und Dermatologie (Schmitt et al., 1995; Welzel et al., 1997; Welzel et al., 2004), während für die Urologie (Tearney et al., 1997; Zagnavnova et al., 2002), Gynäkologie (Drezek et al., 2003), oder Gastroenterologie (Fockens, 2002) bislang experimentelle Arbeiten präsentiert wurden. Im Bereich der Neurochirurgie wurden bislang verschiedene Arbeiten mit der klassischen TD-OCT veröffentlicht.

Dazu gehören experimentelle Untersuchungen und Gewebedarstellungen im Tiermodell (Bizheva et al., 2004; Maheswari et al., 2003; Satomura et al., 2004), Darstellungen von morphologisch veränderten Hirngewebe (Boppart, 2003; Bizheva et al., 2005; Fujimoto et al., 2000; Jafri et al., 2005; Jeon et al., 2006) und Untersuchungen der Hirngefäße und hirnfremder Tumore (Boppart et al., 1998; Thorell et al., 2005).

Ein Vergleich der Gewebedarstellungen zwischen der TD-OCT und der SD-OCT existierte jedoch nicht (Böhringer et al., 2005c; Böhringer et al., 2006a).

Ein SD-OCT steht seit 2004 zur Verfügung. Zunächst wurden Hirntumorbiopsien ex vivo untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass normales Hirngewebe und verschiedene hirneigene Tumore ein charakteristisches Erscheinungsbild in der OCT-Analyse zeigen und das für andere Gewebe z.B. für menschliche Haut, eine strukturelle Auflösung von unter 10 µm erreicht werden kann. Damit werden strukturelle Details wie Gewebeschichtungen, Mikrogewebestruktur und mikrovaskuläre Elemente darstellbar. Unsere umfangreichen Untersuchungen im Hirntumormodel der Maus zeigten, dass SD-OCT eine erheblich höhere Auflösung erreicht als die konventionelle TD-OCT (Böhringer et al., 2005c; Böhringer et al., 2006a). Die Untersuchung der histologischen Korrelate des OCT-Signals zeigte, dass über die soliden Tumoranteile hinaus die Invasionszone, die nur eine diffuse Infiltration von Hirngewebe durch einzelne Tumorzellen darstellt, ein in der OCT-Darstellung abgrenzbares Signal erkennen lässt. Dabei wurde deutlich, dass Tumorareale im Submillimeterbereich erkannt werden können. Damit ist die Auflösung der Methode geeignet, klinisch relevante Resttumorareale im Bereich der Resektionsflächen zu erkennen.

Um den potentiellen Wert der optischen Kohärenztomographie für die intraoperative Detektion von Resttumor oder tumorzellreicher Areale der Infiltrationszone hirneigener Tumore zu untersuchen, wurden während einer Glioblastomoperation die Entnahmepunkte von Gewebe mit Hilfe der Neuronavigation dokumentiert und zu den bildmorphologischen Veränderungen in der kernspintomographischen Darstellung in Beziehung gesetzt. Die Gewebeproben wurden einer OCT-Analyse ex vivo unterzogen und begleitend histologisch untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass OCT eine Differenzierung von Infiltrationszone, solidem Tumor und Nekrosezone in der B-Scan-Darstellung erlaubt und damit die wesentliche klinisch relevante Information zur Verfügung stellen kann.

Nach Modifikation eines kommerziell erhältlichen Sirius 713 OCT-Tomographen und positiver Bewertung eines klinischen Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Universität Lübeck wurde 2005 im Rahmen dieser Arbeit erstmals die OCT-Gewebeanalyse während neurochirurgischer Operationen möglich. Während der operativen Entfernung von malignen Gliomen wurde parallel zur optischen Achse des Operationsmikroskops der OCT-Messlaser eingespiegelt und eine berührungslose Analyse von Hirnparenchym, Tumor und der Resektionsflächen durchgeführt. Diese Arbeiten zeigten, dass die in vivo OCT-Analyse von Hirngewebe mit verschiedenen Problemen verbunden ist. Einerseits führt die puls- und atemsynchrone Bewegung der Hirnsubstanz zu einer Distorsion der B-Scans, was die Interpretation der Befunde erschwert. Andererseits führt die während der Operation unvermeidliche Kontusion der

Gewebeflächen durch die Resektionstechniken zu einer schon innerhalb von Minuten makroskopisch zu erkennenden dynamischen Veränderung der Resektionsflächen. Diese Veränderungen führten erwartungsgemäß zu einer Alteration des OCT-Signals. Diese Probleme konnten überwunden werden. Die während der Analyse unvermeidlichen Bewegungen der Hirnoberfläche oder der Resektionsflächen konnten durch eine Ausrichtung der A-Scans nach automatischer Oberflächenerkennung kompensiert werden. Dieses „Realignment“ erleichterte die Interpretation der B-Scanbefunde und erlaubte weiterhin die Selektion von Arealen für eine Analyse der Lichtschwächungskurven des zur Darstellung kommenden Gewebes. Durch eine frühe Analyse der entstehenden Resektionsflächen innerhalb von wenigen Minuten wurde der Einfluss kontusioneller Veränderungen umgangen. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass im Gegensatz zur intraoperativen Neurosonographie oder dem intraoperativen MRT die optische Gewebeanalyse als kontinuierliches Verfahren während des Fortschreitens der Resektion zur Verfügung stehen kann und damit der Einfluss sekundärer Veränderungen durch chirurgische Manipulation der Gewebe auf die Bildgebung mit dieser Methode umgangen werden kann.

Um zu untersuchen, ob diese Technologie geeignet ist, Reste soliden Tumors oder hochinfiltrierte Areale der Invasionszone zu identifizieren, wurde während operativer Entfernungen von malignen Gliomen nach Abschluss der Resektion in konventioneller mikrochirurgischer Technik eine OCT-Analyse der nun operationsmikroskopisch tumorfrei erscheinenden Resektionswände vorgenommen und mit H&E gefärbten konventionellen histologischen Tumorrandschnitten verglichen. Diese Pilotuntersuchung zeigte, dass die OCT-Analyse in operationsmikroskopisch tumorfrei erscheinendem Hirngewebe hochzelluläre Tumorfiltration, aber auch soliden Tumor nachweisen konnte (Böhringer et al., 2005b). Diese Pilotstudie bewies exemplarisch, dass der Informationsgehalt der optischen Gewebeanalyse ausreicht, intraoperativ Tumorareale zu identifizieren, die der konventionellen Resektionstechnik entgangen wären. Ob diese Tumorrreste durch intraoperative Neurosonographie oder das intraoperative MRT in ähnlicher Weise hätten erkannt werden können, muss zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen offen bleiben, wird aber der Gegenstand zukünftiger Untersuchungen einer bereits genehmigten Folgeuntersuchung sein (Studienprotokoll # 30/2/06, Georg-August-Universität Göttingen). Die optische Gewebeanalyse zur intraoperativen Detektion von Tumorgewebe eignet sich aufgrund ihrer technischen Voraussetzungen für eine Integration in neurochirurgisches Instrumentarium und neurochirurgische Arbeitsabläufe während der Resektion. Anhand dieser Arbeit wird deutlich, dass über einen Messabstand von 20-40 Zentimetern eine berührungslose und nicht-invasive Gewebeanalyse durchgeführt werden kann (Böhringer

et al., 2005b; Giese et al., 2006). Da Veränderungen der Resektionsflächen in Folge der Gewebekontusion, unabhängig ob normales Hirn oder Tumor, innerhalb von Minuten eintreten, sollte eine Analyse des Gewebes unmittelbar im Entstehen der Resektionsränder durchgeführt werden. In Zusammenarbeit mit der Firma Möller-Wedel konnte eine Integration eines SD-OCT-Tomographen in den optischen Strahlengang eines neurochirurgischen Operationsmikroskops verwirklicht werden. Dieses Operationsmikroskop ist kommerziell mit einer Integration in ein Neuronavigationssystem vorgerüstet. Dadurch wird eine unmittelbare SD-OCT Analyse der Gewebeflächen möglich, die im Gesichtsfeld des Mikroskops liegen, ohne dass ein Unterbrechen des chirurgischen Vorgehens für die Analyse erforderlich ist. Damit steht die optische Gewebeanalyse praktisch kontinuierlich während des Entstehens der Resektionsflächen bei voller Integration in ein ohnehin während der Operation verwendetes Instrumentarium zur Verfügung.

4.1 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit konnten zeigen, dass bereits mit einem Prototyp des vergleichsweise niedrig-auflösenden TD-OCT verschiedene Tumorregionen und insbesondere nach operationsmikroskopisch vollständiger Tumorresektion verbliebene Resttumoranteile dargestellt werden können. Die nun geplanten und genehmigten Untersuchungen an der Georg-August-Universität, Göttingen, sollen die hochauflösende mikroskopintegrierte SD-OCT in einem optisch optimierten Operationsmikroskop verwenden, um eine erste Analyse zur klinischen Anwendbarkeit und zur Sensitivität und Spezifität dieser Folgetechnologie durchzuführen.

Die Untersuchungen werden in drei Abschnitten erfolgen, die jeweils einer Abschnittsanalyse unterzogen werden.

4.1.1 Klinischer Prüfplan 1. Abschnitt

Im ersten Abschnitt soll die SD-OCT Darstellung von Tumorgewebe und der Resektionswände systematisch untersucht werden.

Abbildung 31 zeigt die schematische Darstellung der Analyse- und Biopsieorte. Vor Beginn der Tumorentfernung wird die nicht eröffnete Tumoroberfläche analysiert (A). Im Verlauf der Tumorsektion werden im Bereich des sicher pathologischen Areals Analysen im Sinne einer positiven Kontrolle durchgeführt (B). Nach Abschluss der Tumorentfernung werden bis zu 10 Areale der Resektionswand analysiert, biopsiert und die OCT-Befunde mit den histologischen Korrelaten durch einen geblindeten Untersucher verglichen (C). Zunächst soll analog zu unseren Vorarbeiten im Verlauf von 10 Resektionen hirneigener Tumore eine Gewebeanalyse der Resektionsflächen durch die navigations- und mikroskopintegrierte SD-OCT durchgeführt werden. Die Analyseorte werden mit Hilfe der Neuronavigation registriert und mit den präoperativ angefertigten MRT-Befunden korreliert, was eine Zuordnung der OCT-Befunde zur makroskopischen Tumoranatomie ermöglichen soll.

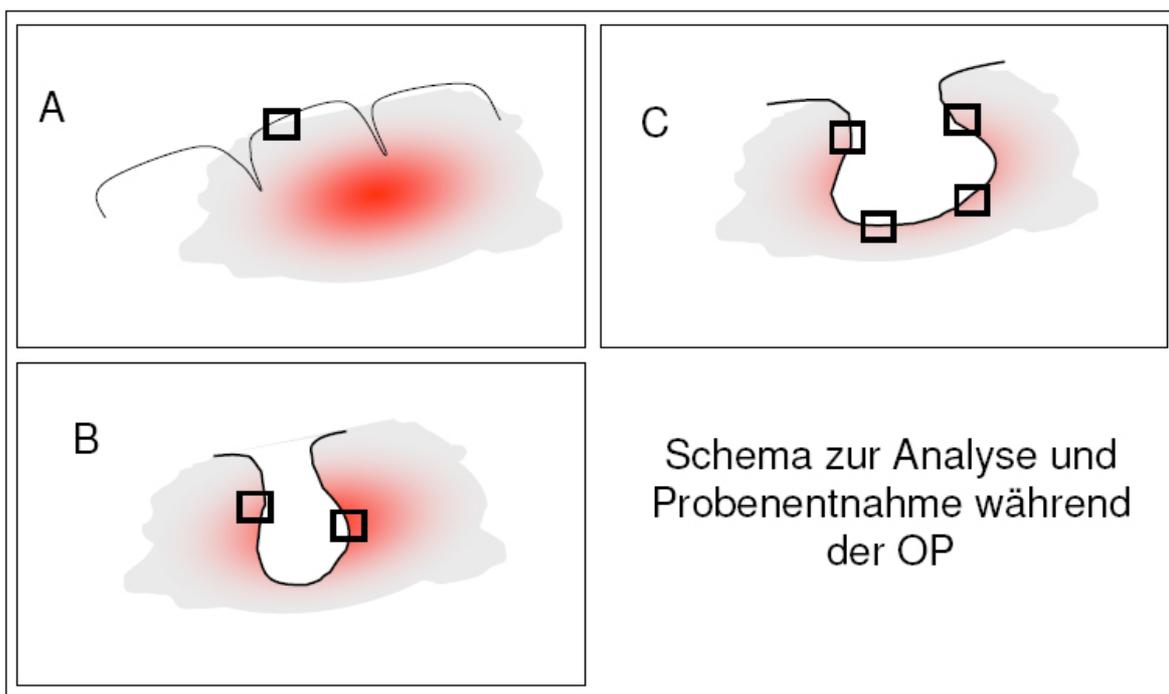


Abb. 31 Schema der Analyseorte im Rahmen der klinischen Prüfung.

4.1.2 Klinischer Prüfplan 2. Abschnitt

Über die in Abschnitt 1 untersuchten Parameter soll im zweiten Abschnitt der Einfluss von Resektionsverfahren und der Gewebereaktion in Folge von Resektionstechniken auf die SD-OCT Darstellung untersucht werden.

In einer Gruppe von 5 Patienten mit MRT morphologischem Verdacht auf ein malignes Gliom soll der Einfluss verschiedener Tumorresektionsverfahren auf die Darstellung in der OCT-Analyse untersucht werden. Die Gewebeanalyse folgt dem im Abschnitt 1 beschriebenen Vorgehen, schließt jedoch weitere Analysen ein. Nach Bestätigung der Verdachtsdiagnose durch einen zum frühest möglichen Zeitpunkt abgegebenen Schnellschnitt werden bis zu 5 Areale soliden Tumorgewebes während der Resektion mittels OCT analysiert. Dabei sollen Grenzflächen untersucht werden, die in Abhängigkeit der individuellen chirurgischen Notwendigkeiten durch Ultraschallaspiration, Koagulation oder stumpfe Präparation entstehen. Diese während der Tumorresektion entfernten Areale werden in der Neuronavigation dokumentiert und histologisch aufgearbeitet. Nach Abschluss der Tumorresektion wird unmittelbar nach Entstehen der Resektionsränder der Rand der Resektionshöhle in bis zu 6 OCT Analysen untersucht und die untersuchten Areale in der Neuronavigation dokumentiert. Die Analyseorte werden mit Hilfe navigations-registrierter Raumpunkte in jeweils 5 Minuten Intervallen dreimal aufgesucht und reanalysiert, um den Einfluss dynamischer Gewebeveränderungen in Folge von Gewebekontusion auf die SD-OCT Darstellung zu untersuchen.

4.1.3 Klinischer Prüfplan 3. Abschnitt

Die in den Abschnitten 1 und 2 durchgeführten Untersuchungen werden Aufschluss über die in vivo Darstellung von Hirntumorgewebe durch SD-OCT und den Einfluss von Resektionstechniken geben, sowie weiterhin in gewissem Maße eine Korrelation mit der zugrunde liegenden Histoarchitektur des Gewebes erlauben. Im dritten Abschnitt soll analog zu unserer vorangegangenen TD-OCT Studie nun während der Operation diese Erfahrung genutzt werden. Ein für den Analyseort geblindeter Analyseassistent soll ohne Einfluss auf den Operationshergang eine Bewertung der OCT-Befunde vornehmen, die mit den endgültigen histologischen Befunden und dem postoperativ angefertigten MRT korreliert werden.

5. Zusammenfassung

In vielen mikrochirurgischen Disziplinen (z. B. der Neurochirurgie, HNO, Gynäkologie) erfolgt die intraoperative Gewebsdarstellung und Diagnostik durch eine 10 bis 50 fach vergrößerte operationsmikroskopische Darstellung der Gewebeoberfläche. Der Tiefenaufbau des Gewebes sowie die funktionellen Informationen, die über die Morphologie hinausgehen, bleiben dem Chirurgen dabei verborgen. Sichere Aussagen über die Beschaffenheit der Resektionsränder ermöglichen erst intraoperative Histologie oder aufwendige bildgebende Verfahren wie z. B. intraoperatives MRT oder intraoperative Sonographie.

Deshalb wird intensiv an neuen Ansätzen zur Verbesserung der intraoperativen Diagnostik gearbeitet. Für eine intraoperative Anwendung im Operationssitus sind echte mikroskopische Methoden mit höchsten Vergrößerungen und dementsprechend kleinem Analyseausschnitt kaum praktikabel. Hier sind vielmehr Verfahren gefragt, die Gewebeverbände identifizieren und über ein Gesichtsfeld von mehreren Millimetern darstellen können. Ein derartiges Verfahren ist die optische Kohärenztomographie (OCT), die die Reflektionseigenschaften von Gewebe unter Einstrahlung von nahinfrarotem Licht nutzt, um in einem B-Scan eine tomographische Darstellung des Gewebes zu erreichen. Integriert in ein OP-Mikroskop erweitert die OCT die intraoperative Darstellung des OP-Situs um die dritte Dimension. Die optische Gewebeanalyse ermöglicht eine kontinuierliche Darstellung der Gewebearchitektur mit Dichteanalyse des im Gesichtsfeld gelegenen Gewebes und kann dem Operateur in Echtzeit zur Verfügung gestellt werden.

Diese Arbeit konnte in einem Tiermodell, aber auch an menschlichem Biopsiematerial zeigen, dass eine differenzierte OCT-Darstellung von Tumorarchitektur und eine Abgrenzung von Invasionszone und normalem Hirngewebe möglich ist. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie eine intraoperative Gewebeanalyse möglich ist und dass dieses Verfahren in der Lage ist, operationsmikroskopisch nicht darstellbare Tumorreste im Bereich der Resektionsflächen zu identifizieren. Diese Arbeit präsentiert Lösungsansätze für verschiedenen Probleme der intraoperativen Gewebeanalyse, wie beispielsweise die puls- und atemsynchrone Bewegung der zu analysierenden Zielvolumina, den Einfluss von kontusionellen Gewebeveränderungen auf das OCT-Signal oder aber die zu überbrückenden Untersuchungsabstände. Es gelang weiterhin erstmals, die OCT-Technologie mit ausreichender Signalqualität in ein Operationsmikroskop zu integrieren und in einem Pilotprojekt erstmals klinisch zu testen.

6. Literaturverzeichnis

- Albayrak B, Samdani AF, Black PM: Intra-operative magnetic resonance imaging in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien)* 146 (6): 543-56, (2004)
- Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S: Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: Objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 1994 34:45-61, (1994)
- Bernays RL: Intraoperative imaging in neurosurgery. MRI, CT, ultrasound. Introduction. *Acta Neurochir Suppl.* 2003; 85: 1-3, (2003)
- Bernstein M, Berger MS: *Neuro-Oncology*, 1st edn. Thieme, New York (2000)
- Bizheva K, Unterhuber A, Hermann B, Povazay B, Sattmann H, Drexler W, Stingl A, Le T, Mei M, Holzwarth R, Reitsamer HA, Morgan JE, Cowey A: Imaging ex vivo and in vitro brain morphology in animal models with ultrahigh resolution optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 9:719-724, (2004)
- Bizheva K, Unterhuber A, Hermann B, Povazay B, Sattmann H, Fercher AF, Drexler W, Preusser M, Budka H, Stingl A, Le T: Imaging ex vivo healthy and pathological human brain tissue with ultra-high-resolution optical coherence tomography. *JBO* 10:11006, (2005)
- Black PM, Loeffler JS: *Cancer of the Nervous System*, 1st edn. Blackwell Science, Oxford, (1997)
- Böcker W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie, Kapitel Neuropathologie*, Urban & Fischer 9. Auflage. 1999
- Böhringer HJ, Boller D, Leppert J, Knopp U, Lankenau E, Reusche E, Hüttmann G, Giese A: Time domain and spectral domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue. *Lasers in Surgery and Medicine* 38: 588 – 597, (2006a)
- Böhringer HJ, Leppert J, Lankenau E, Reusche E, Hüttmann G, Giese A: Analysis of human brain tumor tissue by optical coherence tomography. Submitted 2005b
- Böhringer HJ, Leppert J, Wüstenberg R, Bodensteiner C, Reusche E, Stellmacher F, Lankenau E, Winter C, Koch P, Hüttmann G, Giese A: Analysis of glioma tissue by high resolution spectral-domain optical coherence tomography. Submitted 2005c
- Boller D: *Entwicklung eines Spektralradars für dermatologische Anwendungen* Diplomarbeit Lübeck: Fachhochschule; (2003)

- Boppart SA, Bouma BE, Brezinski ME, Tearney GJ, Fujimoto JG: Imaging developing neural morphology using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods* 70 (1): 65-72, (1996)
- Boppart SA: Optical coherence tomography: technology and applications for neuroimaging. *Psychophysiology*. Jul; 40 (4): 529-41, (2003)
- Brezinski M: Characterizing arterial plaque with optical coherence tomography. *Curr Opin Cardiol*. 17 (6): 648-55, (2002)
- Burger PC, Dubois PJ, Schold SC Jr, Smith KR Jr, Odom GL, Crafts DC, Giangaspero F: Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 58(2):159-69, (1983)
- Chandler WF, Knake JE: Intraoperative use of ultrasound in neurosurgery. *Clin Neurosurg*. 31: 550-63, (1983)
- Comeau RM, Fenster A, Peters TM: Intraoperative US in interactive image-guided neurosurgery. *Radiographics*. Jul-Aug; 18 (4): 1019-27, (1998).
- Crow P, Stone N, Kendall CA, Persad RA, Wright MP: Optical diagnostics in urology: current applications and future prospects. *BJU Int*. Sep; 92 (4): 400-7, (2003)
- Drezek RA, Richards-Kortum R, Brewer MA, Feld MS, Pitris C, Ferenczy A, Faupel ML, Follen M: Optical imaging of the cervix. *Cancer*. Nov 1; 98 (9 Suppl): 2015-27, (2003)
- Ellison D, Love S: *Neuropathology*, 1st edn. Mosby, London Chicago, 1998
- Fockens P: Future developments in endoscopic imaging. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Dec; 16 (6): 999-1012, (2002)
- Fujimoto JG, Pitris C, Boppart SA, Brezinski ME: Optical coherence tomography: An emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia* 2: 9-25, (2000)
- Gaab MR: [Intraoperative ultrasound imaging in neurosurgery] *Ultraschall Med*. Apr; 11 (2): 62-71, (1990)
- Giese A, Böhringer HJ, Leppert J, Kantelhardt SR, Lankeau E, Koch P, Hüttmann G: Non-invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors. *Photonic Therapeutics and Diagnostics II (Proceedings Volume), Proceedings of SPIE Volume: 6078*; (2006)
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M: Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment: *Journal of Clinical Oncology*, Vol 21, No 8 (April 15): pp 1624-1636, (2003)

- Gratton G, Fabiani M, Elbert T, Rockstroh B: Seeing right through you: applications of optical imaging to the study of the human. *Psychophysiology* 40 (4): 487-91, (2003)
- Greenberg MS: *Handbook of Neurosurgery*, 5th edn. Thieme, New York, (2001)
- Hee MR, Puliafito CA, Wong C, Reichel E, Duker JS, Shuman JS, Swanson EA, Fujimoto JG: Optical coherence tomography of central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol* 120: 65 – 74, (1995)
- Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, Puliafito CA, Fujimoto JG: Optical coherence tomography of the human retina. *Ophthalmology* 102:217-29, (1995).
- Hering E, Martin R, Stroher M: *Optik In: Physik für Ingenieure*. 3. Auflage; VDI-Verlag, Düsseldorf, 392-451 (1986)
- Ibanez L, Schroeder W, Ng L, Cates J: *The ITK Software Guide*, Insight Consortium, <http://www.itk.org/ItkSoftwareGuide.pdf>, (2003)
- Ito S, Rachinger W, Sepp H, Reulen HJ, Stummer W: Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumors using 5-ALA. *Acta Neurochir.* 147: 57-65, (2005)
- Jafri MS, Farhang S, Tang RS, Desai N, Fishman PS, Rohwer RG, Tang CM, Schmitt JM: Optical coherence tomography in the diagnosis and treatment of neurological disorders. *J Biomed Opt* 10:51603, (2005)
- Jeon SW, Shure MA, Baker KB, Huang D, Rollins AM, Chahlavi A, Rezai AR: A feasibility study of optical coherence tomography for guiding deep brain probes. *J Neurosci Methods* 154:96-101, (2006).
- Keles GE, Lamborn KR, Berger MS: Coregistration accuracy and detection of brain shift using intraoperative sononavigation during resection of hemispheric tumors. *Neurosurgery*. Sep; 53 (3): 556-62; discussion 562-4, (2003)
- Keles GE: Intracranial neuronavigation with intraoperative magnetic resonance imaging. *Curr Opin Neurol.* 17 (4): 497-500, (2004)
- Klaus D, Reusch M: Endo-neuro-sonography: first clinical series (52 cases). *Childs Nerv Syst.* 19: 137-144, (2003)
- Klinger D: *Entwicklung einer motorgesteuerten Referenzoptik für SD-OCT und deren Adaption an ein Operationsmikroskop*. Diplomarbeit Fachhochschule Lübeck (2007)
- Koch P, Boller D, Koch E, Welzel J, Hüttmann G: Ultrahigh-resolution FDOCT system for dermatology. In: Tuchin VV, Izatt JA, Fujimoto JG, editors. *Proceedings of. SPIE Vol. 5690*; p. 24-30, (2005)

- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Golaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198, (2001)
- Maheswari RU, Takaoka H, Kadono H, Homma R, Tanifuji M: Novel functional imaging technique from brain surface with optical coherence tomography enabling visualization of depth resolved functional structure in vivo. *J Neurosci Methods* 124:83-92, (2003)
- Malik AR: Adaption of Optical Coherence Tomography with an Operation Microscope. Lübeck, Masterarbeit, Fachhochschule Lübeck (2006)
- Matsukado Y: The growth of glioblastoma multiforme in neurosurgical practice. *J Neurosurg* 18:636-644, (1961)
- Nimsky C, Ganslandt O, Fahlbusch R: Functional neuronavigation and intraoperative MRI. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 29: 229-63, (2004)
- Nishioka NS: Optical biopsy using tissue spectroscopy and optical coherence tomography. *Can J Gastroenterol.* Jun17 (6): 376-80, (2003)
- Pfeiffer J, Schröder JM: Neuropathologie, Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems, der Skelettmuskulatur und der Sinnesorgane, 1. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg Ney York, (1995)
- Preston-Martin S: Epidemiology of primary CNS neoplasms. *Neurol Clin* 14(2):273-90, (1996)
- Reinacher PC, van Velthoven V: Intraoperative ultrasound imaging: practical applicability as a real-time navigation system. *Acta Neurochir Suppl.* 85: 89-93, (2003)
- Satomura Y, Seki J, Ooi Y, Yanagida T, Seiyama A: In vivo imaging of the rat cerebral microvessels with optical coherence tomography. *Clin Hemorheol Microcirc* 31:31-40, (2004)
- Scherer HJ: Structural development in gliomas. *Am J Cancer* 34:333-351, 1938
- Scherer HJ: The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 63:1-35, (1940)
- Schlegel U, Westphal M: Neuroonkologie, 1. Ausg. Thieme, New York, 1998
- Schmitt JM, Yadlowsky MJ, Bonner RF: Subsurface imaging of living skin with optical coherence microscopy. *Dermatology* 191:93-98, (1995)
- Tearney GJ, Brezinski ME, Southern JF, Bouma BE, Boppart SA, Fujimoto JG: Optical biopsy in human urologic tissue using optical coherence tomography. *J Urol.* 157:1915-9, (1997)

- Thomas D, Duguid G: Optical coherence tomography-a review of the principles and contemporary uses in retinal investigation. *Eye*. Feb 6, (2004)
- Thorell WE, Chow MM, Prayson RA, Shure MA, Jeon SW, Huang D, Zeynalov E, Woo HH, Rasmussen PA, Rollins AM, Masaryk TJ: Optical coherence tomography: a new method to assess aneurysm healing. *J Neurosurg* 102:348-354, (2005)
- van Velthoven V: Intraoperative ultrasound imaging: comparison of pathomorphological findings in US versus CT, MRI and intraoperative findings. *Acta Neurochir Suppl.* 85: 95-9, (2003)
- Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG: Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16(6):1405-9, (1998)
- Welzel J, Lankenau E, Birngruber R, Engelhardt R: Optical coherence tomography of the human skin. *J Am Acad Dermatol.* 37:958-63, (1997)
- Welzel J, Reinhardt C, Lankenau E, Winter C, Wolff HH: Changes in function and morphology of normal human skin: evaluation using optical coherence tomography. *Br J Dermatol* 150:220-225, (2004)
- Zagaynova EV, Streltsova OS, Gladkova ND, Snopova LB, Gelikonov GV, Feldchtein FI, Morozov AN: In vivo optical coherence tomography feasibility for bladder disease. *J Urol* 167:1492-6, (2002)
- Zuccaro G, Gladkova N, Vargo J, Feldchtein F, Zagaynova E, Conwell D, Falk G, Goldblum J, Dumot J, Ponsky J, Gelikonov G, Davros B, Donchenko D, Richter J: Optical coherence tomography of the esophagus and proximal stomach in health and disease. *Am J Gastroenterol*; 96 (9): 2633-9, (2001)

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alf Giese für die Überlassung des Themas, die intensive konzeptionelle Unterstützung, sowie die wissenschaftlichen Betreuung der Arbeit und die Bereitstellung der Infrastruktur des Neuroonkologischen Labors.

Meinen besonderen Dank spreche ich Herrn Prof. Dr. med. Volker Tronnier für die nette Integration in die Neurochirurgische Klinik sowie den Mitarbeitern des neuroonkologischen Labors der Neurochirurgie Lübeck, Frau Dr. rer. nat. Ella Kim, Herrn Dr. rer. nat. Sven Hanson, Frau Edith Pawlak für die intensive Unterstützung und die nette Zusammenarbeit aus. Frau Nadine Pettkus danke ich für die nachhaltige Unterstützung bei der Aufarbeitung des histologischen Materials. Weiterhin möchte ich Herrn Sven M. Schlaffer danken für die Hilfestellung bei Fragen der digitalen Bildbearbeitung, Herr Robin Wüstenberg und Herrn Dr. med. Jan Leppert danke ich für die Bereitstellung und Überlassung von tierexperimentellem Probematerial.

Besonders möchte ich den Mitarbeiter des Institutes für Biometrische Optik der Universität zu Lübeck, Herrn Dr. rer. nat. Gereon Hüttmann und Frau Dr. rer. nat. Eva Lankenau danken für die intensive Einarbeitung in die Messverfahren, die Bewertung der optischen Befunde und Betreuung meiner Arbeit. Ohne die kontinuierliche Weiterentwicklung der technischen Verfahren und Geräte in der Arbeitsgruppe des Instituts für Biomedizinische Optik wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich sehr Frau Gabriele Feldhoff und Herrn Prof. Dr. Erich Reusche aus dem Pathologischen Institut der Universität zu Lübeck. Frau Feldhoff für die histologische Aufarbeitung der Proben und Herrn Prof. Reusche für die fachliche Bewertung des histologischen Materials, sowie für die intensive wissenschaftliche Diskussion.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Frau Andrea bedanken, zum einen für die Unterstützung dieser Arbeit und zum anderen für den ganz besonderen Menschen an meiner Seite, der mich glücklich in die Zukunft blicken lässt.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Hans-Joachim Böhringer
 Geburtsdatum: 19 Januar 1975
 Geburtsort: Bassum
 Verheiratet mit Andrea Böhringer, geb. Schmid
 Kinder: Zwei Töchter, einen Sohn
 Religion: Evangelisch lutherisch
 Staatsangehörigkeit: Deutsch



Schuldbildung

1981 – 1985	Grundschule Bassum
1985 – 1987	Orientierungsstufe Bassum
1987 – 1990	Hauptschule Bassum
1990 – 1991	Erweiterte Hauptschule Bassum mit Realschulabschluss

Berufsbildung

1991 – 1995	Ausbildung zum Industriemechaniker, Fachbereich Maschinen – und Systemtechnik bei Fa. A. – H. Meyer, Twistringen
1995 – 1996	Technical Support bei Fa. Sängler und Massierer, Wildeshausen im In – und Auslandseinsatz
1996 – 1999	Kolleg Schule Bremen / Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999 – 2000	Studium der Humanmedizin, Universität Heidelberg
2000 – 2006	Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
2003	Ärztliche Vorprüfung, Note 3
2006 – 2007	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none"> • Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (<i>Plastische – und allg. Chirurgie</i>) • Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (<i>Anästhesie</i>) • Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (<i>Innere Medizin</i>)
April 2007	Staatsexamen nach ÄAppO vom 27. Juni 2002

Promotionsarbeit

Juli 2004 Promotionsthema: „Analyse von Hirn- und Hirntumorgewebe durch Optische Kohärenztomographie.“

Klinik für Neurochirurgie, Direktor Prof. Dr. med. Tronnier, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, betreut durch Prof. Dr. med. A. Giese

Klinische Weiterbildung:

- Famulaturen
 - Chirurgie: Klinikverbund Bassum/Sulingen, August 2003
 - Chirurgische Praxis: Salzachklinik Fridolfing, Oberbayern September 2003
 - Chirurgie: Klinikverbund Bassum/Sulingen, April 2004
 - Neurochirurgie: Universität zu Lübeck, April 2005
 - Innere Medizin: Universität zu Lübeck, August 2005
- Kurse an der Universität Lübeck
 - Unfallchirurgische Visite sowie Sofortmaßnahmen bei Politraumen

Stipendien:

Reisestipendium der "Gesellschaft und Förderer der Universität zu Lübeck" zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in Strasbourg, Mai 2005

Originalarbeiten:

- *Time domain and spectral domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue.* Boehringer HJ, Boller D, Leppert J, Knopp U, Lankenau E, Reusche E, Huettmann G, Giese A; *Lasers in Surgery and Medicine* 38: 588 – 597; (2006)
- *Analysis of human brain tumor tissue by optical coherence tomography.* Boehringer HJ, Leppert J, Lankenau E, Knopp U, Stellmacher F, Reusche E, Huettmann G, Giese A; Eingereicht 10/2005
- *Analysis of glioma tissue by high resolution special- domain optical coherency tomography.* Boehringer HJ, Leppert J, Schlaffer S, Wuestenberg R, Reusche E, Lankenau E, Winter C, Huettmann G, Giese A; Eingereicht 12/2005
- *Non- invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors.* A. Giese, H.-J. Böhringer, J. Leppert, S. R. Kantelhardt, E. Lankenau, P. Koch, R. Birngruber, G. Hüttmann; *Photonic Therapeutics and Diagnostics II (Proceedings Volume), Proceedings of SPIE Volume: 6078;* (2006)
- *Optical coherence tomography for experimental neuro-endoscopy.* H.J. Böhringer, E. Lankenau, G. Hüttmann, A. Giese; *Minimally Invasive Neurosurgery* 49(5): ; 269-75; (2006)

Vorträge:

Spectral domain optical coherence tomography:

A pilot study for a novel guidance technique for neurosurgical resection of brain tumors.

Boehringer HJ, Knopp U, Boller D, Lankenau E, Huettmann G, Arnold H,

Giese A (Sektionstagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie in Strasbourg, Frankreich. Mai 2005)

The International Society for Optical Engineering:

Non-invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors.

A. Giese, H.J. Böhringer, J. Leppert, E. Lankenau, P. Koch, G. Hüttmann,

R. Birngruber (Sektionstagung Biomedical Optics BIOS in San José Kalifornien, USA. Januar 2006)

57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie

Non-invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors

Böhringer H. J., Leppert J., Lankenau E., Hüttmann G., Giese A. (Joint Meeting mit der Japanischen Gesellschaft für Neurochirurgie in Essen, Mai 2006)

7 th Congress of the European Association for Neurooncology (EANO)

Operating microscope integrated optical coherence tomography for surgery of intrinsic brain tumors.

H. J. Böhringer, E. Lankenau, G. Hüttmann, V. Rohde, A. Giese (14 – 17 September 2006; Vienna Austria)

Sprachen:

Englisch

Bassum, den 25. November 2008

9. Publikationsliste

- *Time domain and spectral domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue.* Boehringer HJ, Boller D, Leppert J, Knopp U, Lankenau E, Reusche E, Huettmann G, Giese A; Lasers in Surgery and Medicine 38: 588 – 597 (2006)
- *Analysis of human brain tumor tissue by optical coherence tomography.* Boehringer HJ, Leppert J, Lankenau E, Knopp U, Stellmacher F, Reusche E, Huettmann G, Giese A; Eingereicht 10/2005
- *Analysis of glioma tissue by high resolution special- domain optical coherency tomography.* Boehringer HJ, Leppert J, Schlaffer S, Wuestenberg R, Reusche E, Lankenau E, Winter C, Huettmann G, Giese A; Eingereicht 12/2005
- *Non- invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors.* A. Giese, H.-J. Böhringer, J. Leppert, S. R. Kantelhardt, E. Lankenau, P. Koch, R. Birngruber, G. Hüttmann; Photonic Therapeutics and Diagnostics II (Proceedings Volume), Proceedings of SPIE Volume: 6078; (2006)
- *Optical coherence tomography for experimental neuro-endoscopy.* H.J. Böhringer, E. Lankenau, G. Hüttmann, A. Giese; Minimally Invasive Neurosurgery 49(5): 269-75.(2006)