

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Institut für klinische Chemie und Labormedizin

Prof. Dr. Dr. Thomas Renné

**Massenspektrometrische Lipid Profile von durch den  
Pikosekunden Infrarot Laser generierten Ablationsaerosolen  
verschiedener Hirnareale**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Helena Elisabeth Meister geb. Heßling

aus Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 29.01.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

## Inhalt

1	Mass Spectrometric Lipid Profiles of Picosecond Infrared Laser-Generated Tissue Aerosols Discriminate Different Brain Tissues	1
2	Darstellung der Publikation	8
2.1	Einleitung	8
2.2	Material und Methoden	16
2.3	Ergebnisse	19
2.4	Diskussion	25
2.5	Schlussfolgerung	32
3	Summary	33
4	Zusammenfassung	34
5	Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärungen	35
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	37
7	Literaturverzeichnis	38
8	Danksagung	42
9	Lebenslauf	43
10	Eidesstattliche Erklärung	44

# Mass Spectrometric Lipid Profiles of Picosecond Infrared Laser-Generated Tissue Aerosols Discriminate Different Brain Tissues

Marcus Wurlitzer,<sup>1</sup> Elisabeth Hessling,<sup>1</sup> Karsten Rinas,<sup>1</sup> Marceline Manka Fuh,<sup>1</sup> Hannes Petersen,<sup>2</sup> Franz Ricklefs,<sup>3</sup> Katrin Lamszus,<sup>3</sup> Jan Regelsberger,<sup>3</sup> Stephanie Maier,<sup>4</sup> Sebastian Kruber,<sup>4</sup> Nils-Owe Hansen,<sup>4</sup> RJDwayne Miller,<sup>4,5</sup> and Hartmut Schlüter<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Mass Spectrometric Proteomics, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>4</sup>Atomically Resolved Dynamics Division, Max Planck Institute for the Structure and Dynamics of Matter, Luruper Chaussee 149, 22761 Hamburg, Germany

<sup>5</sup>Departments of Chemistry and Physics, Lash Miller Chemical Laboratories, University of Toronto, 80 St. George Street, LM245A, Toronto, Ontario, M5S 3H6, Canada

**Background and Objectives:** A picosecond infrared laser (PIRL) has recently been demonstrated to cut biological tissue without scar formation based on the minimal destructive action on the surrounding cells. During cutting with PIRL, the irradiated tissue is ablated by a cold vaporization process termed desorption by impulsive vibrational excitation. In the resulting aerosol, all molecules are dissolved in small droplets and even labile biomolecules like proteins remain intact after ablation. It is hypothesized that these properties enable the PIRL in combination with mass spectrometry as an intelligent laser scalpel for guided surgery. In this study, it was tested if PIRL-generated tissue aerosols are applicable for direct analysis with mass spectrometry, and if the acquired mass spectra can be used to discriminate different brain areas.

**Materials and Methods:** Brain tissues were irradiated with PIRL. The aerosols were collected and directly infused into a mass spectrometer via electrospray ionization without any sample preparation or lipid extraction.

**Results:** The laser produced clear cuts with no marks of burning. Lipids from five different classes were identified in the mass spectra of all samples. By principal component analysis the different brain areas were clearly distinguishable from each other.

**Conclusions:** The results demonstrate the potential for real-time analysis of lipids with a PIRL-based laser scalpel, coupled to a mass spectrometer, for the discrimination of tissues during surgeries. *Lasers Surg. Med.* © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** picosecond infrared laser; laser ablation; mass spectrometry; lipid analysis; brain lipids; diagnostic tools; brain surgery; PIRL; DIVE

## INTRODUCTION

The classification of biological samples is an important step in the treatment of malignant diseases. Current methods to verify the presence of tumorous tissue from biopsies or surgical resections rely on histology or immunohistochemistry. Intraoperative frozen section histopathology, which is used during surgery to give the surgeon feedback on the tumor content of the resected tissue, takes roughly 30 minutes and is usually limited to a few specimens. Their pathological assessment provides a general statement about the presence of tumor cells, but the extent or the exact placement of the tumor within the operative field cannot be determined from histopathology alone. A real-time classification technique which provides fast, accurate, minimally-invasive tissue diagnostics *in situ* is therefore highly desirable [1]

To overcome the limitations of tumor assessment in cancer surgery, several intraoperative methods based on the tissue identification by mass spectrometry are being

Marcus Wurlitzer and Elisabeth Hessling contributed equally to this work.

**Conflict of Interest Disclosures:** All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest and have disclosed the following: Dr. Miller is the author of the patent covering the PIRL process and is one of the founders of Attodyne Inc. All other authors declare no conflicts of interest. There has been no financial relationship with any sponsoring organization.

**\*Correspondence to:** Dr. Hartmut Schlüter, Mass Spectrometric Proteomics Group, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. E-mail: hschlue@uke.de.

Accepted 14 April 2019

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/lsm.23096

developed [2–5]. These methods are all based on the mass spectrometric analysis of lipids and metabolites, but use different desorption techniques to sample the tissues, including an electrosurgical knife [2], desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) [4], resonant infrared laser ablation (RIR-LA) [3], and dissolution of molecules by small water droplets [5].

In this study, a picosecond infrared laser (PIRL) based on the desorption by impulsive vibrational excitation (DIVE) is examined as another method to sample biological tissues for subsequent mass spectrometric identification. The DIVE ablation is a laser technique which has shown the potential for significantly less thermal damage to biological tissue compared with electrosurgery or conventional laser surgery through a more focused energy deposition by pulse durations in the picosecond time scale [6]. Targeting the O–H stretch vibration’s absorption band in water at 3  $\mu\text{m}$  wavelength and with pulse durations of 10–400 ps, no significant amount of energy is transferred to the surrounding tissue, neither in thermal form nor by acoustic shockwaves or by ionizing radiation, which would lead to degradation of biomolecules. Instead, the absorbed energy is efficiently coupled to translation motion and accelerates the ablation process instead of being lost to thermal or acoustic transients outside the excited volume [7]. Thus, irradiation with PIRL minimizes the damage to the surrounding tissue and generates an aerosol with all molecules from the tissue solubilized in small droplets.

Recent studies have demonstrated that surgical incisions of skin and laryngeal tissues, including vocal folds, made with the PIRL lead to heavily reduced collateral damage [8–10]. Labile biomolecules, such as proteins, remain in their original chemical composition, and even enzymatic activities are maintained [11,12]. In situ application of the PIRL has been demonstrated in a wound healing study, where surgical incisions made with the PIRL on the skins of rats showed a significant reduction in scar-formation [10]. Due to the soft properties of the DIVE ablation process, PIRL-based sample probing is particularly interesting for applications where minimal tissue damage is desired, like brain surgery. The PIRL laser produces clear cuts while reducing scar formation and thermal damage to the remaining tissue and releases intact biomolecules into the aerosol. Therefore, the PIRL is an ideal tool for soft *in situ* sampling of tissues for mass spectrometric analysis. In this study, it is tested if different types of tissues can be distinguished by the mass spectrometric lipid profiles of their PIRL ablation products.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue Preparation

The brain of a 3-year-old mini pig (*Sus scrofa domestica*) was dissected and six different anatomical regions, including cerebral cortex, cerebellar cortex, corpus callosum, thalamus, mesencephalon, and hypophysis, were prepared by a neurosurgeon. The areas were cut into pieces of

1  $\times$  1  $\times$  0.5 cm and snap-frozen on a piece of cork in liquid nitrogen. Tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until usage.

### DIVE Ablation With the PIRL Laser

A prototype laser system (PIRL-HP2-1064 OPA-3000; Attodyne Inc., Toronto, Canada) was used for the ablation of the tissue. The laser beam emitted light at a wavelength of 3  $\mu\text{m}$  with a pulse duration of 400 ps, a pulse energy of 700  $\mu\text{J}$ , at a repetition rate of 1,000 Hz. A custom-made beam guiding and auto-focus system with a scanning mirror before the final focusing lens was set up to direct the laser beam evenly in an overall area of 5  $\times$  5 mm [2]. The laser beam had to be focused on the tissue surface with a tolerance of approximately 1 mm to ensure optimal ablation conditions and prevent thermal damage to the tissue. The optical auto-focus system provided a fast and accurate focusing by measuring the distance to the sample surface with a camera and adjusting the position of the focusing lens in real time.

The tissue was placed in an ablation chamber on a pre-cooled copper block to optimize the capturing of the ablation plume and keep the tissue frozen during the ablation process. The tissue was irradiated with the laser for 4 minutes. The plume was transferred via polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing into a falcon tube by a surgical suction pump. Cooling of the falcon tube with liquid nitrogen led to immediate condensation and freezing of the plume at the wall of the tube. The condensed ablation plumes were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the mass spectrometric experiment.

### Mass Spectrometry

Mass spectrometry was performed on an Orbitrap Q Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) mass spectrometer with a nano-ESI source. Eight microliters of each sample were applied via flow injection with an Agilent LC 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) at a flow rate of 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The flow injection setup allowed for a constant signal of each sample of up to 15 minutes. Spectra were acquired in positive and negative full-scan mode in an  $m/z$  range from 400 to 1,500 at a resolution of 140,000. The maximum injection time was set to 2.0 seconds to maximize the spectrum quality.

### Data Analysis

For each sample, a five-spectra average was used for statistical analysis. The spectra were exported as peak lists with Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific) to a comma-separated table. Further processing was performed with Mathematica 10.0 (Wolfram Research). The peak lists of all spectra were imported, and signals were matched among the samples with a tolerance of 5 ppm. The signal intensities were normalized sample-wise to the median. Signals that occurred in three or more samples were included for the principal component analysis (PCA).

The LIPID MAPS Structure Database (LMSD) was used for identification of the lipids. The search was performed in all lipid categories with a mass tolerance of

$m/z \pm 0.005$  and ion species  $[M-H]^-$  and  $[M-2H]^{2-}$ . Comparison of the observed isotopic pattern of a specific signal with its theoretical isotopic pattern, calculated with ChemCalc (<http://www.chemcalc.org/main>), allowed for discrimination between multiple candidates of different ion species. The search output was reduced to the total number of C atoms and double bonds in the variable fatty acid chains.

## RESULTS

Six different areas from a pig brain including cerebral cortex, cerebellar cortex, corpus callosum, thalamus, mesencephalon, and hypophysis were subjected to PIRL ablation. An area of  $5 \times 5$  mm [2] was ablated from three separately prepared tissue blocks per brain area (two for cerebellar cortex). In 4 minutes ablation time, approximately 1 ml of aerosol condensate per sample was collected in the cooling trap (Fig. 1).

The soft ablation of the laser produced a square-sized hole with smooth borders in the ablated tissues. No marks of burning were visible on the tissue pieces (Fig. 2). The condensates of the tissue aerosols were directly infused into the nano-ESI source of a mass spectrometer by flow injection and analyzed in negative ion mode. Characteristic mass spectra of two different brain areas are shown in Figure 3.

Average spectra from each tissue block were converted to peak lists and subjected to a PCA. The six different brain areas were clearly separated by the first two components of the PCA (Fig. 4). For each cluster of samples from one brain area, the ellipse is drawn around the mean with radii of the doubled standard deviation along each principal component. All brain areas are separated by at least the doubled standard deviations in terms of confidence in identifying the different tissue types, except for a small overlap between thalamus and cerebellar cortex.

To identify the  $m/z$  signals with the highest contribution to the separation of the brain areas, the total weight in the first three principal components was calculated for each signal as the Euclidean distance from 0, resulting in a number between 0 (no weight) and 1 (maximum weight), as listed in Table 1.

## Identification of Lipid Signals

The  $m/z$  values of the monoisotopic signals were searched against the LIPID MAPS Structure Database (LMSD). A mass deviation of  $0.005 m/z$  from the calculated mass was allowed and the isotopic pattern had to be consistent with the ion species. Table 1 summarizes the closest match for each lipid signal in the LIPID MAPS database. Due to the existence of multiple isomers

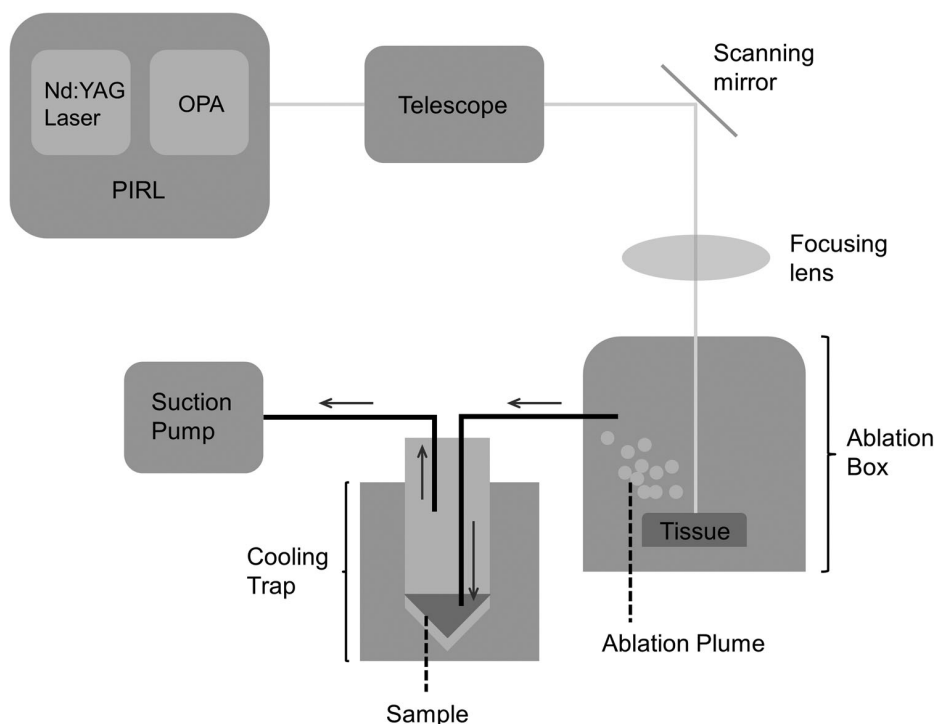


Fig. 1. Experimental setup of the laser ablation and plume collection. The laser beam is transferred through a custom-made beam guiding and auto-focus system with a scanning mirror, which allows for fast and precise movement of the laser spot on the tissue surface. It passes through a sapphire window into the closed ablation box. The tissue aerosol is sucked into a polytetrafluoroethylene tubing by a suction pump and condensed in a cooling trap filled with liquid nitrogen.

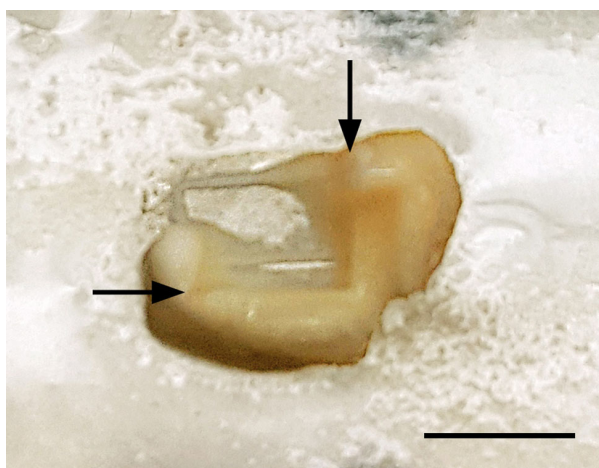


Fig. 2. Photograph of a piece of brain tissue after laser ablation. Arrows indicate the edges of the ablated area ( $5 \times 5 \text{ mm}^2$ ). The upper left part of the tissue was ablated completely. The picosecond infrared laser produced a smooth cut without any visible burning marks. Scale bar = 5 mm [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)].

sharing the same monoisotopic mass, only the sum formula is given.

Signals were identified as phosphatidylserines (PS), phosphatidylinositols (PI), a phosphatidic acid (PA), sulfatides (ST), as well as hydroxylated sulfatides (ST-OH). One phosphatidylserine, PS(40:6), was detected as a singly and a doubly charged ion species.

## DISCUSSION

In this study, we demonstrated that tissue ablation with PIRL allows for a direct mass spectrometric analysis without any further sample preparation. The majority of the detected signals in the brain tissue samples were identified as lipid species, including PS, PI, PAs, ST, and

ST-OH. No collateral damage to the brain tissue adjacent to the ablated area was visible after using the PIRL for tissue sampling. Moreover, our wound healing studies have shown that the removal of tissue material with PIRL leads to effectively scar-free healing [10].

The PIRL is an experimental setup in an optical lab and is under active development to optimize ablation results and usability. A newly developed auto-focus system improved handling and accuracy of the ablation procedure compared with earlier studies with manual focus. Automatic focusing can be considered a requirement for any practical use of the laser in an operating theater. It can be achieved either by a suitable auto-focus system, as in our study, or by guiding the laser through a fiber, which is held by the hand of the surgeon and brought into direct contact with the tissue [13,14].

The current sampling setup including the ablation chamber, PTFE suction, and the cooling trap has been used for the analysis of proteins in earlier studies with the PIRL laser. Condensation and freezing of the ablation plume allows for sample preparation procedures such as tryptic digestion, which is essential for the mass spectrometric analysis of proteins. In contrast to protein analysis, the high abundance and the good desolvation and ionization efficiency of lipids result in intense mass spectrometric signals even without specific preparation of the samples. We were able to skip the sample preparation procedure entirely and analyze and characterize the brain samples directly from the condensed ablation plumes. We therefore conclude that the ablation plume can be transferred directly into the source of a mass spectrometer to generate signals from lipids, making the PIRL-MS method suitable for on-line classification of biological tissues.

A long ablation and collection time of 4 minutes was chosen to ensure the collection of sufficient sample volumes despite potential losses in the tube transfer process. The average collection volume per sample was

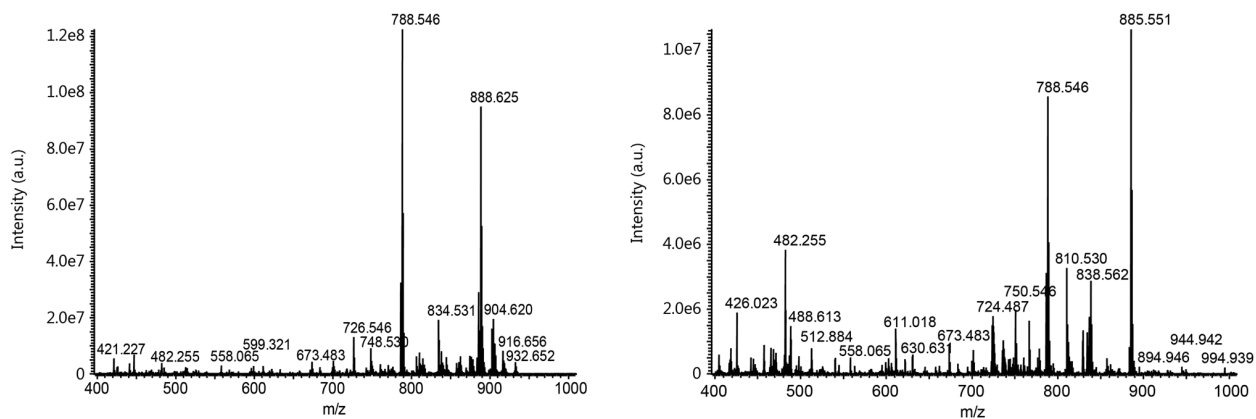


Fig. 3. Electrospray ionization–mass spectrometry full-scan spectra acquired from the corpus callosum (left) and the hypophysis (right) of the pig brain in the negative ion mode. Most signals were detected in an  $m/z$  range of 700–900, representing the  $m/z$  range of most singly charged lipids. Doubly charged species were found in an  $m/z$  range of 400–550.

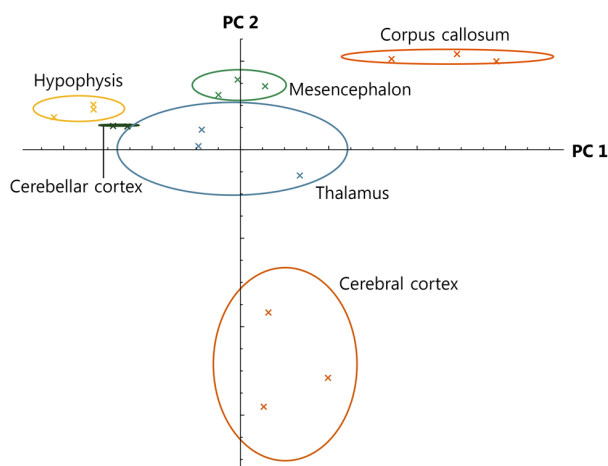


Fig. 4. Principal component analysis (PCA) plot of brain area mass spectra. The first two components of the PCA are shown. Each dot represents one sample, each color represents one brain area. The circles indicate the doubled standard deviation of the samples of each brain area [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)].

approximately 1 ml. Since only 8  $\mu$ l were needed for mass spectrometric analysis and no further sample processing was involved, the ablation time can potentially be reduced to a few seconds. The samples were kept frozen on a pre-cooled copper block to minimize degradation of the previously excised tissue material. Previous studies have shown that the soft properties of the PIRL ablation do not change when fresh tissue is irradiated at room temperature, so cooling of the tissue is not necessary when the laser is used intraoperatively [10].

The lipid profiles of the different brain areas were separated in a principal component analysis (PCA). Although the sample size was small ( $n = 3$  for each group, with  $n = 2$  in the cerebellar cortex group), it is notable that the brain areas formed distinct clusters in the PCA. Being

an unsupervised transformation of the data, the PCA is not specifically trained to classify known groups of samples, but rather separates the data points by a linear combination of the input variables (lipid signal intensities) to account for the highest possible variance. This suggests that the differences in the lipid composition of different brain areas are indeed the greatest source of variability in the data set, rather than statistical noise or artifacts from the experimental setup, such as variances in laser ablation or collection losses. Although the tissue samples were separated by at least the doubled standard deviation, except for thalamus and cerebellar cortex, the discriminative power of the PCA is limited by the small number of samples. Also, a supervised classification method, like a support vector machine, can potentially classify the samples with higher accuracy, but is likely to be overfitted with small sample sizes as in this study, and therefore was not used. Subsequent studies with a larger number of samples are necessary to fully explore the capacity of the PIRL-MS method to distinguish tissue samples.

Lipids are the basic constituents of the brain, providing about 60% of its dry weight [15]. The macroscopic appearance of different brain areas is mainly determined by its amount of myelin, which is rich in lipids and appears white. The brain cortex contains low amounts of myelin and appears as gray matter. In contrast, the corpus callosum consists of white matter fibers connecting both hemispheres and is rich in myelination [16]. This differentiation gets more difficult with inhomogeneous regions like the thalamus, which consists mostly, but not only, of gray matter. The mesencephalon hosts many different areas and functions and consists of a mixture of white and gray matter. When relating the separation observed in the PCA (Fig. 4) to the biology of the brain areas, the principal component 2 (PC2) axis coincides with the amount of myelination (gray vs. white matter). The cerebral cortex lies on the bottom end of the axis

**TABLE 1. List of Monoisotopic Signals With the Closest Matching Lipid Species in the LIPID MAPS Database**

$m/z$ (obs.)	Ion species	Sum formula	Lipid	$\Delta m/z$ (ppm)	PC 1–3 weight
834.531	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> PN	PS(40:6)	2.40	0.81
788.547	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>79</sub> O <sub>10</sub> PN	PS(36:1)	2.28	0.76
888.626	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> O <sub>11</sub> NS	ST(24:1)	1.91	0.67
885.552	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>47</sub> H <sub>82</sub> O <sub>13</sub> P	PI(38:4)	2.15	0.48
512.884	[M-2H] <sup>2-</sup>	C <sub>58</sub> H <sub>108</sub> O <sub>11</sub> PN	PS-NAc(52:1)	1.36	0.22
838.562	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>81</sub> O <sub>10</sub> PN	PS(40:4)	2.27	0.20
416.762	[M-2H] <sup>2-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> O <sub>10</sub> PN	PS(40:6)	1.44	0.19
786.531	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> PN	PS(36:2)	2.29	0.16
904.620	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> O <sub>12</sub> NS	ST-OH(24:1)	1.33	0.13
701.515	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> O <sub>8</sub> P	PA(36:1)	2.57	0.13
890.641	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>92</sub> O <sub>11</sub> NS	ST(24:0)	1.35	0.12

PA, phosphatidic acid; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PS-NAc, *N*-acyl phosphatidylserine; ST, sulfatide, ST-OH, hydroxylated sulfatide.

Lipid names are given by the lipid subclass and the total number of C atoms and double bonds in the variable fatty acid chains. The sum formula represents the chemical composition of the detected ion species. The deviation of the observed mass-to-charge ratio ( $m/z$  [obs.]) from the theoretical one is given in ppm, as well as the total weight in the first three components of the principal component analysis as the distance to zero (PC 1–3 weight).



(low myelination), the corpus callosum at the top end (high myelination), and mesencephalon and thalamus in-between. The hypophysis has a special status. It consists of two lobes, the anterior lobe (anterior pituitary), which is an endocrine gland and accounts for roughly 80% of the pituitary gland, and the posterior lobe (posterior pituitary), which consists mainly of unmyelinated axons. The special character of the pituitary gland is also reflected in the PCA, where the hypophysis samples gather at the top-left hand corner of the PCA plot.

Correlations between specific lipids and brain regions can be examined with the help of the PCA loadings plot (Supplemental Fig. S1). Combined with the previous observation that the PC2 axis corresponds to the presence of myelination, the lipid signal at  $m/z$  834.531, which represents PS(40:6) and had the highest negative coefficient in the PC2, was an indicator for low amounts of myelination and thus for gray matter. Conversely, the signals at  $m/z$  788.547 (PS(36:1)) and  $m/z$  888.626 (ST(24:1)), both with positive coefficients in the PC2, related to the presence of white matter. The PS(36:1) signal was also the strongest discriminator along the PC1 axis, separating the samples of hypophysis, where the signal intensity of this lipid was low, mesencephalon, and corpus callosum, where the highest signal intensity was detected for this lipid. The second most important discriminator in the PC1 was  $m/z$  885.552, representing PI(38:4), where high signal intensities were detected in the hypophysis samples and low intensities in the corpus callosum samples. The same discriminative properties of the  $m/z$  834 and  $m/z$  888 signals have been observed in a previous DESI-MS study of brain tissue [17]. There,  $m/z$  788 and  $m/z$  885 were also present as abundant signals, but only  $m/z$  885 showed some discriminative power among the samples in the PCA. Notably, only gray matter, white matter, and glioma samples were compared in that study. Samples from the hypophysis or the corpus callosum were not explicitly included, which may explain why  $m/z$  788 was not found among the discriminative signals. Considering the most dominant lipids, the results from our PIRL-MS study are consistent with the DESI-MS study by Cooks et al., which is promising in terms of reliability of the methods even when different desorption techniques are used.

The surgical treatment of brain cancer is particularly challenging as the patient's prognosis is heavily determined by the accuracy of tumor removal. In glioblastoma patients, only if over 98% of tumorous tissue is removed a significant increase in survival rate is observed [18], which is as low as 20% on average for the next 5 years [19]. However, the precise intraoperative assessment of tumor margins is difficult. A spacious resection with complete elimination of the entire tumor tissue is generally impracticable due to the infiltrative growth of the tumor cells and the risk of neurological deficits resulting from resection of healthy brain tissue. Standard microsurgical approaches usually involve conventional scalpels and medical lasers. Intraoperative magnetic resonance imaging [20] and fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic

acid increased the number of patients with radiologically visible complete tumor resection [21–23], but both methods leave room for improvement in tumor detection [24].

Several promising approaches in the field of on-line intraoperative discrimination of tissues are currently being developed or tested in the operating room. In 2013, Balog and Takats et al. introduced an electrosurgical knife connected to a mass spectrometer for the on-line identification of tissue, named *iKnife*. The molecules released by the electrosurgical dissection are directly transferred into a mass spectrometer [2]. In 2014, Santagata and Agar et al. demonstrated the use of DESI-MS for intraoperative identification of brain tumors. The method was applied to tissue biopsies in the operating room, a direct application to the tissue *in situ* was not shown [4]. In 2016, Jarmusch and Cooks et al. used DESI-MS in positive and negative mode to distinguish brain samples of gray matter, white matter, and glioma by their lipid profiles [17]. In 2016, Fatou and Fournier et al. developed an instrument based on RIR-LA for the intraoperative classification of tissues, named *SpiderMass*. Tissues are ablated by an infrared laser and the aerosol is directed to a mass spectrometer for real-time analysis [3]. In 2017, a handheld sampling device named the *MasSpec Pen* was introduced by Zhang and Eberlin et al. Molecules from the tissue are dissolved in a small water droplet which is then sucked into the source of a mass spectrometer [5].

All of these methods use mass spectrometry to acquire spectra from desorbed tissues and discriminate tissues by one or more features found in the spectra. The *iKnife* and *SpiderMass* methods use negative ion mode signals in the mass range of  $m/z$  600–900 and  $m/z$  200–1,000, respectively, to discriminate the samples. These signals mainly represent lipids of various species [2,3]. With the DESI-MS method, signals in the mass range of  $m/z$  100–1,000 were recorded, including lipids and other metabolites [4].

While the analytical part of the methods is similar, the desorption mechanisms are greatly different. Because of the different side-effects of these desorption mechanisms, one of the methods can be favorable to the others for a particular task in surgery. The electrosurgical knife used by the *iKnife* involves immediate coagulation to stop bleeding during cutting. It induces, by nature, significant thermal damage to the surrounding tissue, which may limit its use for operations on sensitive tissues such as the brain. DESI has been applied to tissue sections [25] and smears [26], but not for *in situ* sampling of potential tumorous tissue before excision. The infrared-laser desorption used by *SpiderMass* comes closest to the properties of the PIRL used in our study. Both lasers excite the O–H stretch vibration at a wavelength of 2.94  $\mu\text{m}$ . However, the PIRL laser emits 1,000 very short pulses (400 ps) per second with 700  $\mu\text{J}$  per pulse, while the *SpiderMass* infrared laser emits only 10 pulses per second pulse with energies between 7 and 9 mJ. The pulse energy is higher by a factor of 10, resulting in higher peak energy levels which are applied to the tissue. A comparative study of

the SpiderMass and the DIVE ablation on the outcome of brain surgery would be interesting to compare the thermal side-effects of cutting brain tissues *in situ*.

## CONCLUSION

We have demonstrated the PIRL-MS combination as an ultra-soft *in situ* classification method for biological tissues. The clear cuts produced by the PIRL highlight the minimal-invasive properties of the laser. The identification of lipids and the differentiation between various brain areas demonstrate that the aerosol generated by PIRL can be used for mass spectrometric tissue analysis. When used as an on-line method during surgery, the PIRL-MS combination can give molecular-level feedback on specific regions of the brain and other tissue for surgical guidance. Prospectively, the combination of minimally-invasive laser surgery and mass spectrometric guidance should lead to superior results in the efficacy of cancer removal and to maximal preservation of the surrounding healthy tissue.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the ERC Advanced Grant (ERC-2011-AdG) “SUREPIRL” (GA# 291630), and part of DIVE SPOT project (MPG-FhG cooperation project; M.FE.A.SD-MA0002; Max-Planck Gesellschaft).

## REFERENCES

1. Ifa DR, Eberlin LS. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin Chem* 2016;62(1):111–123.
2. Balog J, Sasi-Szabo L, Kinross J, et al. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci Transl Med* 2013;5(194):194ra93.
3. Fatou B, Saudemont P, Leblanc E, et al. In vivo real-time mass spectrometry for guided surgery application. *Sci Rep* 2016;6: 25919.
4. Santagata S, Eberlin LS, Norton I, et al. Intraoperative mass spectrometry mapping of an onco-metabolite to guide brain tumor surgery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(30):11121–11126.
5. Zhang J, Rector J, Lin JQ, et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci Transl Med* 2017;9(406):eaan3968.
6. Amini-Nik S, Kraemer D, Cowan ML, et al. Ultrafast mid-IR laser scalpel: protein signals of the fundamental limits to minimally invasive surgery. *PLOS One* 2010;5(9):e13053.
7. Franjic K, Miller D. Vibrationally excited ultrafast thermodynamic phase transitions at the water/air interface. *Phys Chem Chem Phys* 2010;12(20):5225–5239.
8. Hess M, Hildebrandt MD, Muller F, et al. Picosecond infrared laser (PIRL): An ideal phonomicrosurgical laser? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270(11):2927–2937.
9. Bottcher A, Kucher S, Knecht R, et al. Reduction of thermocoagulative injury via use of a picosecond infrared laser (PIRL) in laryngeal tissues. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015;272(4):941–948.
10. Petersen H, Tavakoli F, Kruber S, et al. Comparative study of wound healing in rat skin following incision with a novel picosecond infrared laser (PIRL) and different surgical modalities. *Lasers Surg Med* 2016;48(4):385–391.
11. Kwiatkowski M, Wurlitzer M, Omidi M, et al. Ultrafast extraction of proteins from tissues using desorption by impulsive vibrational excitation. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015;54(1):285–288.
12. Kwiatkowski M, Wurlitzer M, Krutilin A, et al. Homogenization of human tissues via picosecond-infrared laser (PIRL) ablation: Giving a closer view on the in-vivo composition of protein species as compared to mechanical homogenization. *J Proteomics* 2016;134: 193–202.
13. Petersen H, Gliese A, Stober Y, et al. Picosecond infrared laser (PIRL) application in stapes surgery-first experience in human temporal bones. *Otol Neurotol* 2018;39(4):e224–e230.
14. Woolman M, Gribble A, Bluemke E, et al. Optimized mass spectrometry analysis workflow with polarimetric guidance for ex vivo and in situ sampling of biological tissues. *Sci Rep* 2017;7(1):468.
15. Bascoul-Colombo C, Guschina IA, Maskrey BH, Good M, O'Donnell VB, Harwood JL. Dietary DHA supplementation causes selective changes in phospholipids from different brain regions in both wild type mice and the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861(6):524–537.
16. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Histologie—Das Lehrbuch*. 5th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 2018 445–451. 650–651, 653–658, 660–661.
17. Jarmusch AK, Alfaro CM, Pirro V, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Differential lipid profiles of normal human brain matter and gliomas by positive and negative mode desorption electrospray ionization–mass spectrometry imaging. *PLOS One* 2016;11(9):e0163180.
18. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001;95(2):190–198.
19. Robert-Koch-Institut. *Berlin*. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland 2011/2012. 2015;10.
20. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 2011;12(11):997–1003.
21. Eljamel MS, Mahboob SO. The effectiveness and cost-effectiveness of intraoperative imaging in high-grade glioma resection; a comparative review of intraoperative ALA, fluorescein, ultrasound and MRI. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;16: 35–43.
22. Barone DG, Lawrie TA, Hart MG. Image guided surgery for the resection of brain tumours. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(1):CD009685.
23. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7(5):392–401.
24. Coburger J, Wirtz CR. Fluorescence guided surgery by 5-ALA and intraoperative MRI in high grade glioma: a systematic review. *JNO* 2019;141(3):533–546.
25. Eberlin LS, Norton I, Dill AL, et al. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. *Cancer Res* 2012;72(3):645–654.
26. Woolman M, Tata A, Bluemke E, Dara D, Ginsberg HJ, Zarrine-Afsar A. An assessment of the utility of tissue smears in rapid cancer profiling with desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *J Am Soc Mass Spectrom* 2017;28(1):145–153.

## 2 Darstellung der Publikation

### 2.1 Einleitung

Das Gehirn ist das komplexeste menschliche Organ, über dessen Funktionen bislang nur eingeschränkte Erkenntnisse bestehen. Seine Einteilung in anatomische und funktionelle Areale erfolgt anhand von verschiedenen Gesichtspunkten. Damit funktionell wichtige Areale bei neurochirurgischen Eingriffen am Gehirn nicht geschädigt werden, erfordern sie höchste Präzision in der Lokalisation. Für die Unterscheidung verschiedener anatomischer Areale auf der einen Seite und Tumoren auf der anderen Seite wurden neben der makroskopischen visuellen Evaluation auch intraoperativ gewonnene Gewebeproben histologisch untersucht. Die mikroskopischen Gewebeuntersuchungen, auch „Schnellschnitt“ genannt, sind in der Regel auf wenige Proben beschränkt und dauern etwa 30 Minuten, wodurch es zu einer Verlängerung der Operationszeit kommt.

Ein weiteres gängiges Verfahren ist die intravitale Gewebefärbung mit 5-Aminolävulinsäure, die präoperativ systemisch appliziert wird. Durch die Akkumulation von fluoreszierenden Porphyrinen wird malignes Tumorgewebe sichtbar und vom Normalgewebe abgrenzbar (Fukuda et al. 1992). Stummer et al. (2006) gelang es in einer randomisierten Phase III Studie die gegenüber konventionellen Verfahren verbesserte Entfernung von Tumorgewebe und ein günstigeres Outcome bei Nutzung der 5-ALA Färbemethode zu beweisen. Das Verfahren basiert auf einer makroskopischen Sichtung und Entfernung fluoreszierender Areale. Verfahren die eine Beurteilung des Hirngewebes in-vivo auf mikroskopischer Ebene erlauben finden bislang nur in operativen Fächern außerhalb der Neurochirurgie Anwendung. Es konnten experimentelle Ansätze vorgestellt werden, die zur Unterscheidung von Geweben und Beurteilung ihrer Dignität in-vivo angewendet wurden (siehe unten). Diese Verfahren basieren auf massenspektrometrischen Lipidomanalysen. Die Lipidomik beschäftigt sich mit der Analyse von Lipidgehalten in Geweben und Zellen, mit ihren Funktionen und der Veränderung der Lipidkonstellationen. Sie ist ein Forschungszweig in der Gruppe der –omics, den relativ neuen Teilbereichen

der modernen Biochemie, die sich mit der Erforschung von beispielsweise dem Lipidom, Proteom oder Genom auseinandersetzen. Ihre Entwicklung wurde maßgeblich durch die Fortschritte in modernen Analyseverfahren wie der Massenspektrometrie vorangetrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Gewebe durch ihre spezifischen Lipidkonstellationen unterscheidbar sind (Jain et al. 2014). Weil das Gehirn ein sehr lipidhaltiges Organ ist, eignet es sich besonders gut für die Lipidanalyse. Seine makroskopische Erscheinung wird wesentlich durch seinen Lipidgehalt bestimmt. Erste Beweise für unterscheidbare Lipidome grauer und weißer Substanz wurden bereits Mitte des 20. Jahrhunderts vorgelegt (O'Brien und Sampson 1965, Vatassery et al. 1976).

Das Säugetiergehirn lässt sich unter Berücksichtigung morphologischer, entwicklungsgeschichtlicher und funktioneller Gesichtspunkte in folgende Abschnitte unterteilen: Den Hirnstamm, bestehend aus Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke) und Mesencephalon (Mittelhirn), das Diencephalon (Zwischenhirn), das Cerebellum (Kleinhirn) und das Telencephalon (Großhirn). Andere Einteilungen sind ebenfalls gängig und der komplexen Entwicklungsgeschichte des Gehirns geschuldet. Dazu gehört die Einleitung in Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon (Rautenhirn). Das Prosencephalon umfasst das Telencephalon und das Diencephalon. Pons, Metencephalon (Cerebellum) und Myelencephalon (Medulla oblongata) bilden das Rhombencephalon. Eine Zusammenfassung von Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Pons zum sogenannten Stammhirn ist möglich (Schirmer 2005, Ulfing 2008).

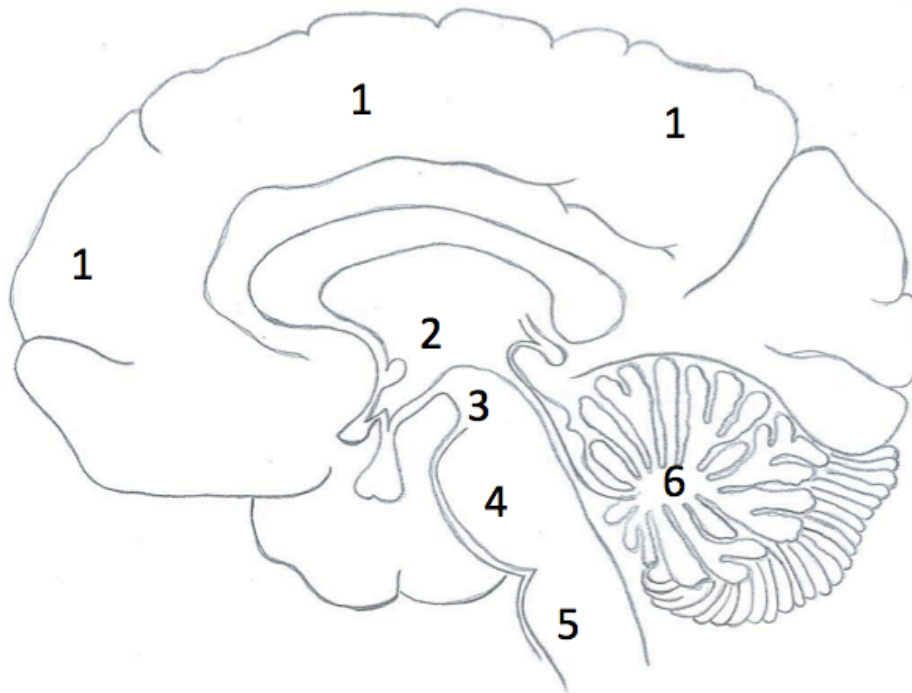


Abbildung 1: Gliederung des Gehirns. **1** Telencephalon (Großhirn), **2** Diencephalon (Zwischenhirn), **3** Mesencephalon (Mittelhirn), **4** Pons (Brücke), **5** Medulla oblongata (Verlängertes Mark), **6** Cerebellum (Kleinhirn) (Angelehnt an Ulfig - Kurzlehrbuch Neuroanatomie. Georg Thieme Verlag KG, 2008, Seite 4)

Makroskopisch lässt sich das zentrale Nervensystem in graue und weiße Substanz unterteilen. Die graue Substanz enthält vor allem die Perikarya der zentralnervösen Neurone. Die weiße Substanz enthält die Nervenzellfortsätze inklusive dem umgebenden Gliagewebe. Die Gliazellen des ZNS heißen Oligodendrozyten. Im Groß- und Kleinhirn liegen die Perikarya im Kortex (Rinde). Sie umgibt jeweils die weiße Substanz als Groß- bzw. Kleinhirnrinde. Gliazellen finden sich sowohl in der weißen, als auch der grauen Substanz (Trepel 2017).

Der Hirnstamm besteht von kaudal nach kranial aus Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke) und Mesencephalon (Mittelhirn). Er enthält Hirnnervenkerne, interne und auf- und absteigende Bahnsysteme, die das Rückenmark mit dem Großhirn verbinden und die Formatio reticularis,

die sich als eine Ansammlung von Kerngebieten und Fasern über den gesamten Hirnstamm erstreckt (Ulfig 2008).

Das Mesencephalon bildet das kraniale Ende des Hirnstamms. Es enthält die Substantia nigra, die durch einen hohen Neuromelaningehalt der Perikarya makroskopisch schwarz erscheint. Sie spielt eine wesentliche Rolle in der Bewegungsinitiation und hat Einfluß auf die extrapyramidale Motorik und damit den Muskeltonus. Eine Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra führt zum Krankheitsbild Morbus Parkinson (Trepel 2017). Der Nucleus ruber ist ein Kern im Mesencephalon, der durch seine rote Farbe auffällt. Diese kommt durch den hohen Eisengehalt der Perikarya zustande. Der Nucleus ruber ist eine Schaltstelle des extrapyramidal-motorischen Systems (Trepel 2017).

Das Cerebellum übernimmt wesentliche Aufgaben in der Koordination von Bewegungsabläufen. Es sitzt dorsal auf Pons und Medulla oblongata. Seine Rinde ist in drei Schichten aufgeteilt, in denen sich Zellkörper und Nervenzellfortsätze finden. Die Rinde umgibt das Kleinhirnmark, in dem neben Nervenfasern auch die Kleinhirnerne liegen (Trepel 2017).

Das Corpus callosum (Balken) ist ein System aus vielen Millionen Nervenfasern, die die beiden Hemisphären miteinander verbinden (Aumüller et al. 2010).

Das Diencephalon liegt dem Mesencephalon kranial auf. Es setzt sich aus Thalamus, Hypothalamus, Epithalamus und Subthalamus zusammen. Der Thalamus hat eine annähernd elliptische Form und enthält viele Kerne, die untereinander durch zahlreiche Fasern verbunden sind. Beinahe alle sensiblen und sensorischen Bahnen werden im Thalamus auf dem Weg zur Großhirnrinde verschaltet (Garzorz-Stark 2018).

Der Hypothalamus kontrolliert wesentliche Funktionen des vegetativen Nervensystems und der endokrinen Organe. Einen Teil des Hypothalamus bildet der Hypophysenhinterlappen (Trepel 2017).

Die Hypophyse nimmt eine Sonderstellung ein, wobei streng genommen nur ihr Hinterlappen Teil des ZNS ist. Sie besteht aus der Adenohypophyse (auch Lobus anterior, Hypophysenvorderlappen) und der Neurohypophyse (auch Lobus posterior, Hypophysenhinterlappen). Entwicklungsgeschichtlich entwickelt sich die Adenohypophyse aus der Rathke-Tasche des ektodermalen Rachendachs. Mikroskopisch handelt es sich um verschiedene Drüsenzellen, die die Hormone FSH (Follikel Stimulierendes Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon), TSH (Thyreotropin), ACTH (Adrenocorticotropin) und STH (Somatotropes Hormon) produzieren, speichern und auf Anreiz des Hypothalamus durch sogenannte releasing-Hormone freisetzen. Die Adenohypophyse entspricht folglich in ihrer Entwicklung und ihrer Funktion keinem zentralnervösen Gewebe sondern einer endokrinen Drüse. Die Neurohypophyse ist aus Nervengewebe aufgebaut. Sie besteht aus einzelnen Gliazellen und großen Mengen an Nervenzellfortsätzen, deren Perikarya im Hypothalamus liegen. In diesen Nervenzellfortsätzen werden in Granula die Hormone ADH (Antidiuretisches Hormon) und Oxytocin gespeichert, die in den im Hypothalamus liegenden Perikarya synthetisiert werden (Welsch et al. 2018).

Lipide sind Stoffe, die schlecht oder gar nicht in Wasser löslich sind, sich aber gut in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Methanol lösen. (Linnemann und Kühl 2005). Aus dieser Definition ergibt sich ein sehr heterogenes Bild von Stoffen, die im Allgemeinen drei Aufgaben erfüllen. Sie dienen als Energiespeicher, sind Membranbestandteile oder fungieren als Hormone bzw. Botenstoffe (Löffler et al. 2007). Hier sollen vor allem die Lipide betrachtet werden, die zur Bildung biologischer Membranen relevant sind. Es handelt sich meist um amphiphile Substanzen, also Moleküle die sowohl über hydrophile als auch über hydrophobe Bestandteile verfügen (Löffler 2008). Der Großteil der Membranlipide stammt aus der Gruppe der Phospholipide (Löffler 2008). Ihre Struktur bildet ein Glycerinmolekül, das über zwei OH-Gruppen mit Fettsäuren verestert ist. Über die dritte OH-Gruppe bildet das Glycerin mit Phosphat eine Esterbindung. Die Phosphatgruppe ist ihrerseits mit der OH-Gruppe eines kleinen organischen Moleküls verestert. Dieses kleinere Molekül kann zum Beispiel Cholin oder

Ethanolamin sein und fließt meist in die Namensgebung des Phospholipids ein (z.B. Phosphatidylcholin oder auch Lecithin im Fall von Cholin). Zu den Phospholipiden gehört auch die Familie der Phosphatidylinositole (Linnemann und Kühl 2005). Diese kommen vor allem an der inneren Schicht von Lipiddoppelmembranen vor und sind maßgeblich an der Signaltransduktion beteiligt (Rassow et al. 2008).

Eine weitere wichtige Gruppe der Membranlipide sind die Sphingolipide. Sie enthalten Sphingosin, das bereits eine lange  $\text{CH}_2$ -Kette enthält und daher nach Veresterung mit nur einer Fettsäure über zwei  $\text{CH}_2$ -Ketten verfügt. Sphingolipide werden, obwohl sie eine Phosphatgruppe enthalten, häufig nicht zu den Phospholipiden gezählt. Das relevanteste Sphingolipid ist Sphingomyelin. Es besteht aus einem Sphingosin, das über eine Säureamidbindung mit einer Fettsäure verbunden und mit einer Phosphatgruppe verestert ist, die ihrerseits mit einem Cholin verestert ist (Löffler 2008). Es spielt eine große Rolle bei der Bildung der Myelinscheiden der Nerven (Löffler 2008). Glykolipide sind ebenfalls Bestandteil von Membranen. Sie enthalten immer Sphingosin. Cholesterin ist die Ausgangssubstanz für viele Hormone und ein relevantes Membranlipid (Löffler et al. 2007, Rassow et al. 2008).

Biomembranen bestehen aus zwei Lipidschichten, die aufeinander liegen. An der Innenseite liegen die hydrophoben Acylgruppen der Membranlipide ( $\text{CH}_2$ -Ketten). Nach außen ragen hydrophile Gruppen, die mit Wassermolekülen aus der Umgebung interagieren. In die Lipiddoppelschicht sind Proteine eingelassen, die für Stoffaustausch und Kommunikation zuständig sind. Die Zusammensetzungen der Zellmembranen unterscheiden sich in Abhängigkeit ihrer Funktion (Rassow et al. 2008).

Die Myelinscheiden der Oligodendrozyten im ZNS bestehen aus mehreren Lipiddoppelschichten, die im Vergleich zu anderen Biomembranen nur einen geringen Proteinanteil enthalten. Im peripheren Nervensystem bilden Schwann-Zellen die Myelinscheiden. Das Myelin des ZNS macht einen Großteil des Hirngewichts aus. O'Brien und Sampson (1965) zeigten, dass Myelin zu etwa 80% aus Lipiden besteht. Makroskopisch erscheinen die



Bereiche des Gehirns, die myelinisierte Fasern enthalten als weiße Substanz, weniger myelinisierte Bereiche stellen die graue Substanz dar. 27% des Myelins bestehen aus Cholesterol, welches vor allem für die Stabilisierung der Membran verantwortlich ist (Garbay et al. 2000). Weitere Bestandteile sind zu etwa 50% Phospholipide und zu 17% Glycosphingolipide (Fledrich et al. 2018).

Die Lipidkonstellationen von Geweben unterliegen natürlichen Schwankungen. Rouser und Yamamoto zeigten schon 1968, dass die Lipidkomposition des menschlichen Gehirns altersbedingten Veränderungen unterliegt. Li et al. (2017) untersuchten den präfrontalen Kortex von Menschen, Schimpansen und Rhesusaffen und konnten zeigen, dass zwischen den verschiedenen Spezies Unterschiede in den Lipidspektren bestehen und dass sich diese Spektren im Verlauf des Lebens innerhalb der untersuchten Spezies verändern.

Jain et al. (2014) ist es gelungen gewebespezifische Lipide in verschiedenen Geweben der Maus zu identifizieren. Pamplona et al. (2018) zeigten, dass verschiedene Gewebe einer Ratte durch ihre Lipidome unterscheidbar waren.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchen die Veränderung des Lipidmetabolismus bei Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Morbus Parkinson und Schizophrenie und konnten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung verschiedener Gehirnareale zeigen (Abbott et al. 2015, Garbay et al. 2000, Ghosh et al. 2017). Die vorliegenden Studien zeigen, dass die Lipidomik prädisponiert ist, ein verlässliches Instrument in der Diagnostik vieler verschiedener Erkrankungen zu werden und eine Unterscheidbarkeit zu gesundem Gewebe anhand der Lipidkompositionen möglich ist. Die Hypothese, dass bestimmte Erkrankungen mit der Veränderung des (cerebralen) Lipidmetabolismus einhergehen, beschäftigt viele Arbeitsgruppen. Dabei stellt die Suche nach krankheitsspezifischen Biomarkern und charakteristischen Profilen einen wachsenden Zweig der Lipidomik-Forschung dar (Leishman et al. 2019, Nasaruddin et al. 2018, Xicota et al. 2019).

Der Pikosekunden Infrarot Laser (PIRL) ist ein relativ neuer Laser, der mit Infrarotlicht arbeitet. Es konnte mittels Wärmebildkamera, lichtmikroskopisch, und elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass der PIRL gegenüber herkömmlichen medizinischen Lasern wie dem CO<sub>2</sub>-Laser und dem Mikrosekunden-gepulsten:Yttrium-Aluminium-Granat (Er:YAG) signifikant geringere Schäden am bearbeiteten Gewebe verursacht (Jowett et al. 2013a, Jowett et al. 2013b). Der PIRL führte zu signifikant geringeren thermischen Schäden mit einem Temperaturanstieg von 4 K gegenüber 171 K beim Er:YAG (Böttcher et al. 2015). Diese Eigenschaft prädisponiert ihn zur Nutzung an sensiblen Geweben.

Erste experimentelle Verfahren zur Entwicklung intelligenter Skalpelle sind bereits vorgestellt worden. Grundlage sind Techniken, die auf der Analyse der Lipidkonstellation basieren. Takáts et al. stellten 2013 eine neue Methode zur on-line Identifizierung von Geweben vor, das sogenannte *iKnife*. Sie nutzten die Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry (REIMS) Technik, indem durch herkömmliche elektrochirurgische Messer entstehende Aerosole direkt in ein Massenspektrometer eingesaugt und analysiert wurden. Durch statistische Auswertung der entstehenden Spektren war eine adäquate Vorhersage über die Dignität der Gewebe möglich und konnte entsprechend in Abgleich mit der postoperativen Histologie verifiziert werden. Dazu wurden zuvor erstellte Datenbanken über gesundes und malignes Gewebe zum Abgleich mit den erhobenen Daten verwendet (Takáts et al. 2013). 2015 entwickelten sie ihre Methode weiter, indem das System mit einem Endoskop verbunden wurde. Es gelang, zwischen Mukosa, Submukosa und Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes zu unterscheiden (Balog et al. 2015). Santagata et al. (2014) stellten eine DESI-MS Methode zur intraoperativen Identifikation von Hirntumoren vor. Sie untersuchten operativ entnommene Gewebeproben, setzten die Methode aber nicht in-situ an vitalem Gewebe ein. Fournier et al. (2016) stellten das *SpiderMass* als Methode zur massenspektrometrisch gestützten Gewebeanalyse vor. Dazu wurde ein Nanosekunden-Infrarot Laser eingesetzt und das bei der Ablation entstehende Aerosol direkt in das Massenspektrometer eingesaugt. Zhang et al. (2017) stellten ein tragbares Gerät zur Probenanalyse vor, das sie

*MasSpecPen* nannten. Aus dem Gewebe herausgelöste Moleküle wurden in einem Wassertropfen gelöst in die Quelle eines Massenspektrometers gesaugt.

Die genannten Methoden basieren auf der Analyse negativer Ionenspektren im Bereich 600 – 900 m/z (Takáts) und 200 – 1000 m/z (Fournier), was hauptsächlich Lipiden entspricht. Der m/z-Wert beschreibt das Verhältnis der Masse eines Ions zu seiner Ladung und steht auf der X-Achse des Massenspektrums. Auf der Y-Achse wird die Intensität des Signals aufgezeichnet.

## **2.2 Material und Methoden**

Aus dem Gehirn eines dreijährigen Minischweines (*Sus scrofa domesticus*) aus der Versuchstierhaltung des UKE wurden durch einen Neurochirurgen unmittelbar post mortem unterschiedliche anatomische Regionen entnommen: Großhirnrinde, Großhirnmark, Kleinhirnrinde, Corpus callosum, Thalamus, Mesencephalon und Hypophyse (keine Trennung der verschiedenen Anteile). Die Proben wurden jeweils in Stücke von 1 cm x 1 cm x 0.5 cm geschnitten und umgehend auf Kork in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Korkstücke wurden nach Gewebe getrennt in Falcon® - Probengefäßen (50 ml) gelagert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei - 80 °C gelagert.

Die Ablationsversuche wurden mit einem prototypischen Lasersystem (PIRL-HP2-1064 OPA-3000, Attodyne Inc., Toronto, Canada) durchgeführt. Der Prototyp wurde auf einem Tisch eines Laserlabors in der Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf montiert, wo alle in dieser Arbeit beschriebenen Laserversuche stattgefunden haben. Der Laser sendet Strahlen der Wellenlänge 3 µm mit einer Pulslänge von 400 ps und einer Pulsenergie von 700 µJ bei einer Wiederholungsrate von 1000 Hz aus. Ein speziell angefertigtes Strahlleitungs- und Auto-Fokus-System leitet den Laserstrahl gleichmäßig auf eine quadratische Fläche von 5 mm x 5 mm. Das optische Auto-Fokus-System gewährleistet eine rasche und akkurate Fokussierung, indem es mit einer Kamera die Distanz zur Probenoberfläche

erfasst und die Position der Fokussierungslinse in Echtzeit anpasst. Durch einen roten Lichtstrahl ist die Bewegung des Laserstrahles auf dem Gewebe optisch verfolgbar.

Für die Ablation wurden die jeweiligen Gewebeproben auf einem gekühlten Kupferblock in einer speziell angefertigten Ablationsbox platziert. Die Kühlung wurde gewählt, um Zersetzungsprozessen im Verlaufe der Ablationsversuche vorzubeugen. Die Box hat zwei Öffnungen: Eine für den Laserstrahl und eine für die Absaugung, die die Ablationswolke auffängt. Die Gewebeproben wurden für je vier Minuten mit dem Laser bestrahlt. Die Ablationswolke wurde mit einem PTFE-Schlauch eingesaugt und in einem Falcon® - Probengefäß (50 ml) aufgefangen, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Die Absaugung wurde mit einer chirurgischen Saugpumpe betrieben. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das aufgefangene Kondensat in Glasvials transferiert und bei - 20 °C aufbewahrt.

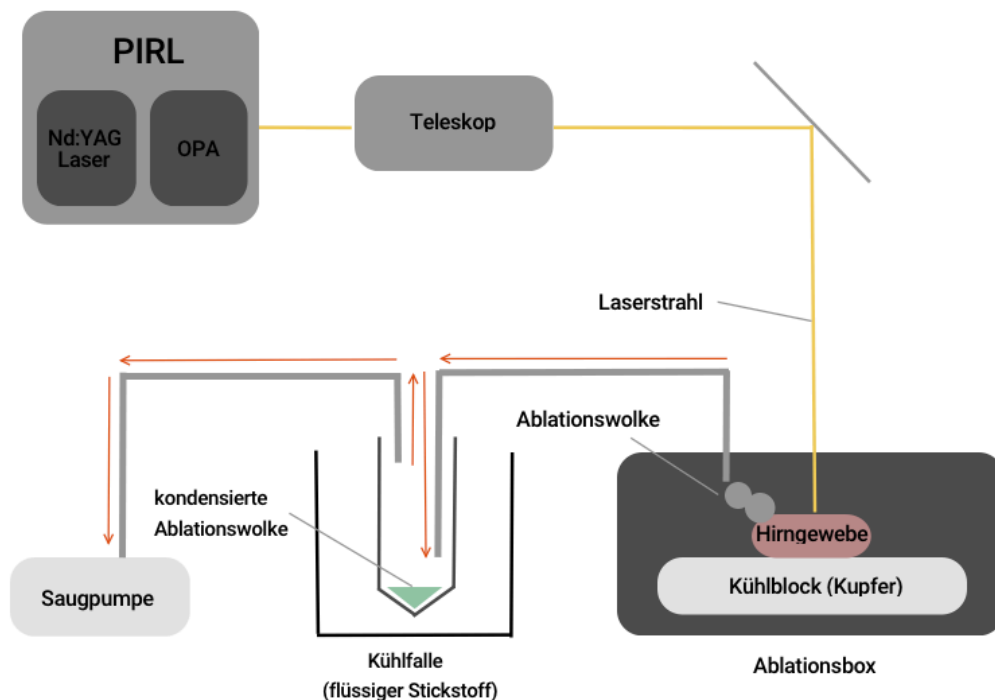


Abbildung 2: Aufbau der Ablationsversuche. Der PIRL-Prototyp entsendet den Laserstrahl, der durch ein speziell angefertigtes Leitungs- und Autofokussystem über eine kreisförmige Öffnung an der Oberseite der Ablationsbox auf das Hirngewebe geleitet wird. Über einen PTFE Schlauch

wird die Ablationswolke mithilfe eines chirurgischen Saugers abgesaugt und in einer zwischengeschalteten Kühlfalle durch Kondensation aufgefangen.

Die massenspektrometrischen Experimente wurden an einem Q Exactive Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) mit nano-esi Quelle durchgeführt. Die Proben wurden zu je 8  $\mu\text{l}$  als kontinuierliche Injektion mit einer Agilent LC 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California) mit Flussraten von 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  appliziert. Durch die Injektion war es möglich, konstante Spektren über je 15 Minuten pro Probe zu messen. Eine datenabhängige Aquisitionsmethode wurde erstellt, die zwischen der Aufzeichnung von einem Full-Scan-Spektrum und acht Fragmentspektren wechselte. Die Spektren wurden jeweils im positiven und negativen Modus in  $m/z$  Bereichen zwischen 400  $m/z$  und 1.500  $m/z$  aufgezeichnet. Die Auflösung lag bei 140.000 (dimensionslos). Um die Qualität der Spektren zu optimieren wurde die Injektionszeit sowohl für Full-Scan- als auch für Fragment-Spektren auf 2,0 Sekunden festgelegt. Für die Vorläufer-Ionen wurde ein Fenster von 0,4  $m/z$  gewählt. Als Fragmentationsenergien wurden 10, 16 und 20 eV gewählt.

Für die statistische Datenanalyse wurde von jeder Probe ein Durchschnittsspektrum aus je 5 Full-Scan-Spektren verwendet. Die Spektren wurden als Peak-Liste mit Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific) exportiert. Zur weiteren Datenanalyse wurde Mathematica 10.0 (Wolfram Research) verwendet. Die Spektren wurden entsprechend als Peak-Listen der gemessenen  $m/z$  Werte mit einer Toleranz von 5 ppm mit den jeweiligen Proben abgeglichen. Die Signalintensitäten wurden in der jeweiligen Probe gegen den Median normiert. Die Signale, die in allen drei Proben auftauchten wurden für die Hauptkomponentenanalyse (PCA) verwendet.

Zur Analyse der Lipide wurde die Lipid Maps Structure Database (LMSD) verwendet. Die Suche wurde in allen Lipidklassen durchgeführt mit einer Massentoleranz von  $\pm 0.005$  und den Ionen-Spezies  $[\text{M}-\text{H}]^-$  und  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ . Um zwischen verschiedenen Ionenspezies des gleichen Moleküls zu unterscheiden, wurde das Isotopensignal mit seinem theoretischen Isotopenmuster abgeglichen. Dafür wurde ChemCalc (<http://www.chemcalc.com>) verwendet.

chemcalc.org/main) verwendet. Als Ausschlaggeber der Unterscheidung zwischen den Ionenspezies wurde die absolute Anzahl der C Atome und der Doppelbindungen in den Fettsäuren betrachtet.

## 2.3 Ergebnisse

Es wurden sechs unterschiedliche anatomische Areale eines Schweinehirns untersucht. Dazu gehören Großhirnrinde, Großhirnmark, Kleinhirnrinde, Mesencephalon, Corpus callosum, Hypophyse und Thalamus. Die Unterteilung der Hypophyse in Lobus anterior und Lobus posterior war nicht möglich, sodass die Hypophyse als Ganzes in den Analysen verwendet wurde. Von jeder Region wurden drei Gewebestücke bzw. zwei Gewebestücke der Kleinhirnrinde entnommen und für die Ablationen verwendet. Es wurde jeweils ein Areal von 5 mm x 5 mm ablatiert. In einer Ablationszeit von 4 Minuten konnten pro Probe etwa 1 ml Ablationskondensat gewonnen werden. Dazu wurde die beim Ablationsprozess entstehende Wolke über einen chirurgischen Sauger in eine Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff gesaugt und kondensierte dort in einem Sammelgefäß (siehe Abbildung 2).

Der Laserstrahl erzeugte ein quadratisches Ablationsareal von 5 mm x 5 mm. Die Ränder der Schnittfläche stellten sich abgerundet dar. Ein Foto eines ablatierten Hirngewebestücks ist in der Abbildung 3 gezeigt. Die ablatierten Gewebestücke boten keine Anzeichen für Verbrennung oder Verkohlung. Auch ungleichmäßige Oberflächen, wie sie beim Schneiden der Gewebestücke teilweise entstanden sind, konnten problemlos und ohne erkennbare Verbrennung abgetragen werden.

Das Ablationskondensat wurde direkt und ohne weitere Aufarbeitungs- oder Extraktionsschritte mittels flow-injection mit einem Chromatographie-Gerät (Agilent) ohne zwischengeschaltete Säulen über die nano-ESI Quelle in das Massenspektrometer injiziert. Abbildung 4 zeigt beispielhaft zwei MS-Spektren verschiedener Hirnareale.

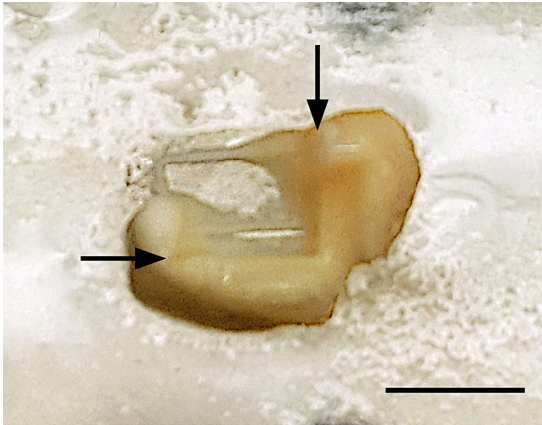


Abbildung 3: Hirngewebestück nach Ablation. Der waagerechte Strich rechts unten im Bild ist 5 mm lang. Die Pfeilspitzen repräsentieren die Ecken des Ablationsareals. Im oberen linken Bereich des Bildes stellt sich das Gewebe weiß dar. An der Stelle kann man bereits den unterliegenden Kühlblock erkennen.

Für jede Probe wurden 5 Durchschnittsspektren erstellt. Diese wurden zur weiteren Datenverarbeitung zu Messwertlisten konvertiert, die den  $m/z$  Wert und die Intensität enthielten. In der daraus erstellten Hauptkomponentenanalyse konnten alle sechs Hirnareale an den ersten beiden Komponenten deutlich voneinander unterschieden werden. In der Abbildung 5 ist jedes Hirnareal durch eine eigene Farbe gekennzeichnet. Die Ellipsen sind für jedes Hirnareal um den Durchschnittswert mit jeweils der zweifachen Standardabweichung als Radius an der jeweiligen Hauptkomponente eingezeichnet. Bis auf eine Ausnahme sind alle Hirnareale durch je zwei Standardabweichungen voneinander getrennt. Lediglich zwischen dem Thalamus und der Kleinhirnrinde gibt es eine Überschneidung. Großhirnmark konnte in der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da die vorhandene Probenmenge zu gering war.

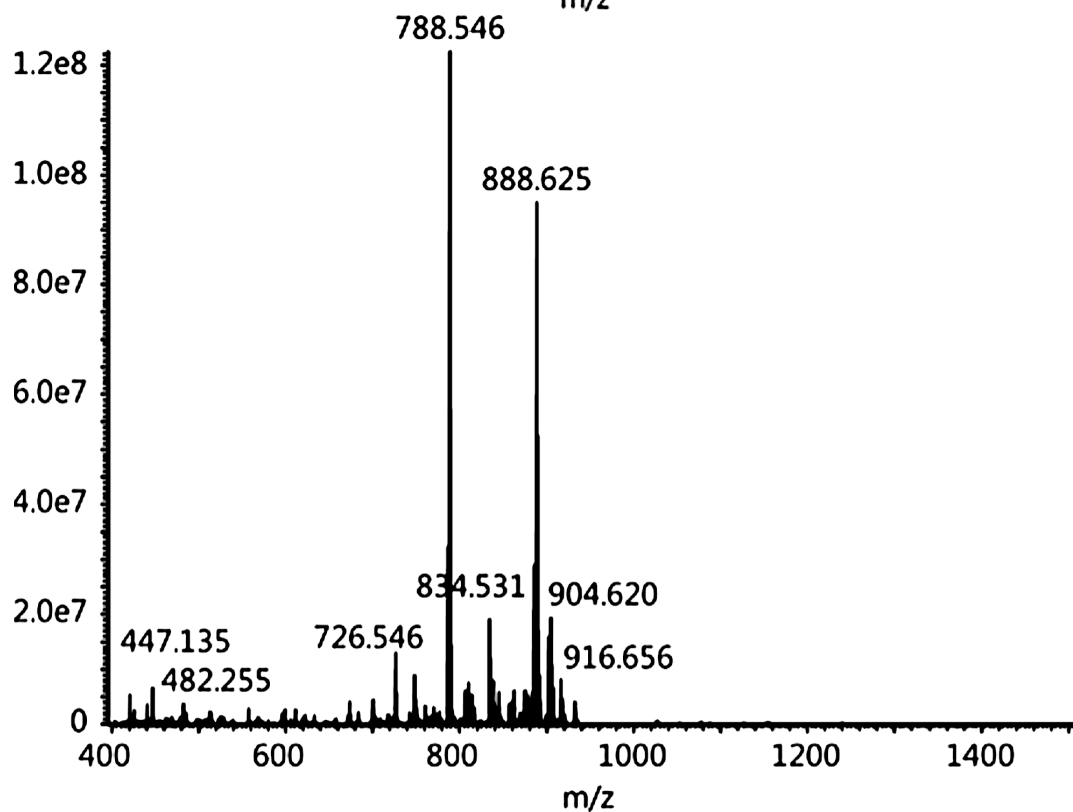
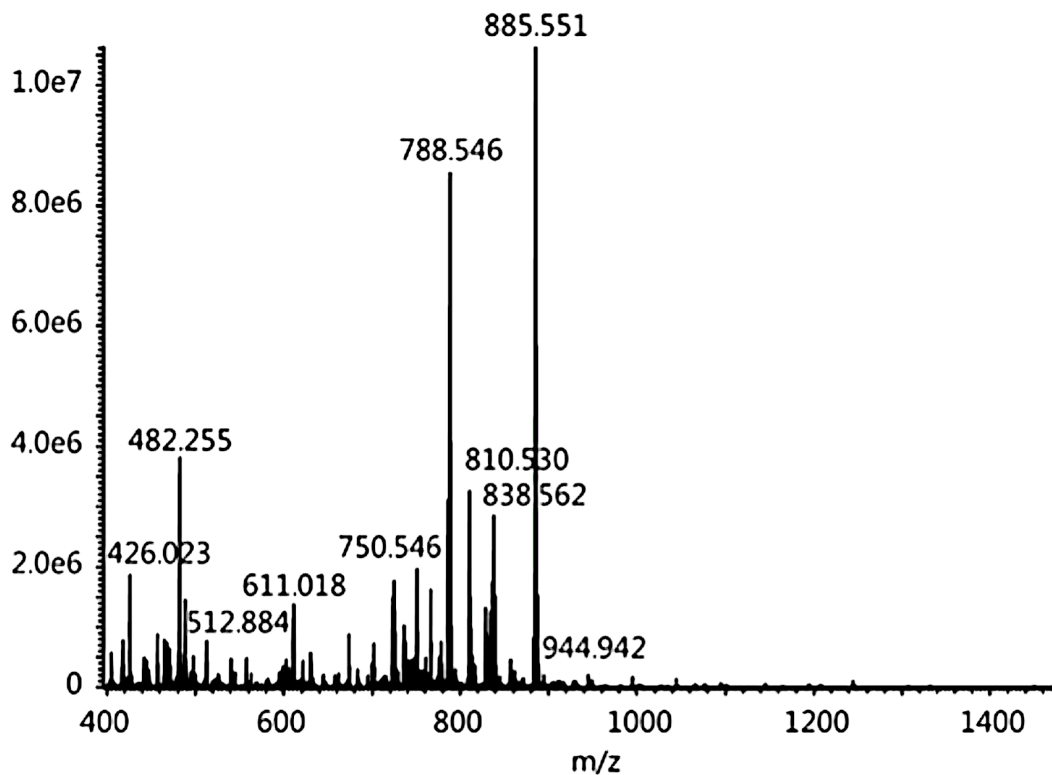


Abbildung 4: Full-Scan ESI-massenspektrometrische Spektren der Hypophyse (keine Trennung der verschiedenen Anteile) (oben) und des Corpus callosum (unten) des Hirns eines Mini-Schweins (*Sus scrofa domestica*) im negativen Modus. Das Gros der Signale wurde im Bereich  $m/z$  700 – 900 gemessen. Der Bereich bildet hauptsächlich einfach geladene



Lipide ab. Doppelt geladene Lipide finden sich im Bereich  $m/z$  400 – 550. Die X-Achse zeigt die  $m/z$  Werte. Die Y-Achse zeigt die Signalintensitäten.

Für jede Probe wurden 5 Durchschnittsspektren erstellt. Diese wurden zur weiteren Datenverarbeitung zu Messwertlisten konvertiert, die den  $m/z$  Wert und die Intensität enthielten. In der daraus erstellten Hauptkomponentenanalyse konnten alle sechs Hirnareale an den ersten beiden Komponenten deutlich voneinander unterschieden werden. In der Abbildung 5 ist jedes Hirnareal durch eine eigene Farbe gekennzeichnet. Die Ellipsen sind für jedes Hirnareal um den Durchschnittswert mit jeweils der zweifachen Standardabweichung als Radius an der jeweiligen Hauptkomponente eingezeichnet. Bis auf eine Ausnahme sind alle Hirnareale durch je zwei Standardabweichungen voneinander getrennt. Lediglich zwischen dem Thalamus und der Kleinhirnrinde gibt es eine Überschneidung. Großhirnmark konnte in der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da die vorhandene Probenmenge zu gering war.

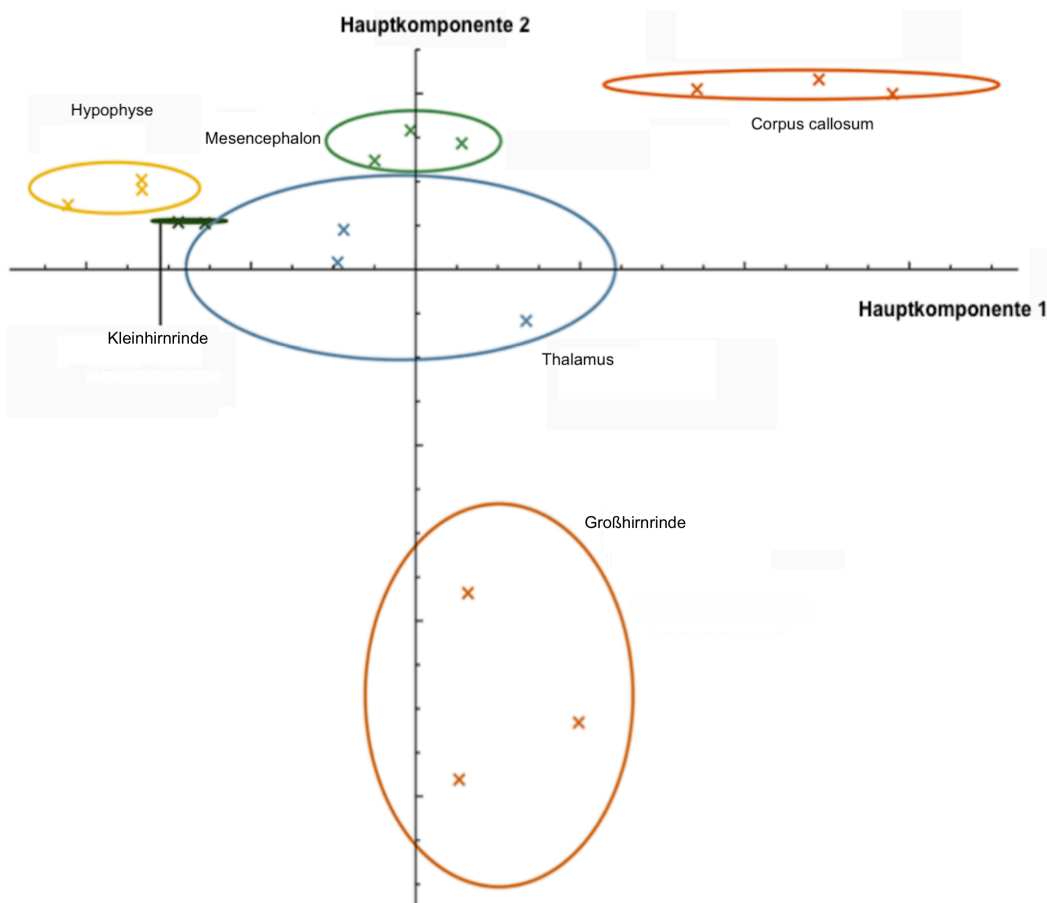


Abbildung 5: Hauptkomponentenanalyse der sechs Hirnareale mit Darstellung der ersten beiden Hauptkomponenten. Die Farben stehen jeweils für ein Hirnareal. Jedes Kreuz steht für eine Messung einer Probe des gleichen Gehirns. Die Ellipsen zeigen jeweils die zweifache Standardabweichung um den Mittelwert an.

Die  $m/z$  Signale, die den größten Einfluß auf die Unterscheidbarkeit der Hirnareale in der Hauptkomponentenanalyse hatten wurden ermittelt. Dafür wurde der euklidische Abstand von 0 für jeden  $m/z$ -Wert in den ersten drei Hauptkomponenten errechnet und damit ermittelt, wie der absolute Einfluß des Wertes war. Das Resultat war eine Zahl zwischen 0 und 1.

Die LIPID MAPS Structure Database (LMSD) wurde nach den  $m/z$  Werten der monoisotopischen Signale durchsucht. Als Suchbedingungen wurde eine Massenabweichung von 0.005  $m/z$  von der errechneten Masse erlaubt und festgelegt, dass das Isotopenmuster mit der Ionenspezies übereinstimmen musste. Die Lipide, die dabei identifiziert werden konnten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Dazu gehörten Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, eine Phosphatidsäure, Sulfatide, hydroxylierte Sulfatide und ein Phosphatidylserin, das in einfach und doppelt geladener Form gefunden wurde. Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure gehören zu den Phospholipiden. Sulfatide sind Glykolipide mit einer Sulfat-Gruppe.

<b>m/z (gemessen)</b>	<b>Ionen- Spezies</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Lipid</b>	<b><math>\Delta</math>m/z (ppm)</b>	<b>Einfluß auf Haupt- komponente 1-3</b>
834.531	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> PN	PS [40:6]	2.40	0.81
788.547	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>79</sub> O <sub>10</sub> PN	PS [36:1]	2.28	0.76
888.626	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> O <sub>11</sub> NS	ST [24:1]	1.91	0.67
885.552	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>47</sub> H <sub>82</sub> O <sub>13</sub> P	PI [38:4]	2.15	0.48
512.884	[M-2H] <sup>2-</sup>	C <sub>58</sub> H <sub>108</sub> O <sub>11</sub> PN	PS-NAc [52:1]	1.36	0.22
838.562	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>81</sub> O <sub>10</sub> PN	PS [40:4]	2.27	0.20
416.762	[M-2H] <sup>2-</sup>	C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> O <sub>10</sub> PN	PS [40:6]	1.44	0.19
786.531	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> PN	PS [36:2]	2.29	0.16
701.515	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> O <sub>8</sub> P	PA [36:1]	2.57	0.13
904.620	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> O <sub>12</sub> NS	ST-OH [24:1]	1.33	0.13
890.641	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>92</sub> O <sub>11</sub> NS	ST [24:0]	1.35	0.12

Tabelle 1: Liste der elf identifizierten Lipide mit dem stärksten Einfluß auf die Hauptkomponenten 1 bis 3. Die Einordnung in eine Lipidklasse erfolgt anhand der Anzahl an C Atomen und Doppelbindung im variablen Fettsäurerest. Die Abweichung der gemessenen m/z Werte vom theoretischen Wert ist in ppm angegeben. Der Einfluß der jeweiligen m/z Werte auf die Hauptkomponenten 1 – 3 ist in der letzten Spalte angegeben mit einem Wert von 0 (kein Einfluß) – 1 (maximaler Einfluß). Da viele Isomere mit der gleichen monoisotopischen Masse existieren, ist hier nur die Summenformel angegeben. Abkürzungen: ST-OH = hydroxyliertes Sulfatid, ST = Sulfatid, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin, PA = Phosphatidsäure, PS-NAc = N-acyl Phosphatidylserin.

## 2.4 Diskussion

Wir konnten zeigen, dass eine massenspektrometrische Gewebeanalyse nach Ablation mit PIRL ohne weitere Aufarbeitungsschritte möglich ist. Dabei konnten nach Gewebeablation mit dem Pikosekunden Infrarot Laser Signale gemessen werden, die anschließend Lipiden zugeordnet werden konnten. Die identifizierten Lipide sind essentielle Bestandteile von Biomembranen (Löffler et al. 2007, Rassow et al. 2008). Nach den Ablationsversuchen war kein makroskopisch sichtbarer Schaden (z.B. Verbrennungen) des das Ablationsareal umgebenden Gewebes erkennbar. Auch kam es im Rahmen der Ablationsversuche bei korrekter Lasereinstellung zu keiner Rauchentwicklung, die auf eine thermische Schädigung des ablatierten Gewebes hingewiesen hätte. Eine mikroskopische Untersuchung hinsichtlich thermischer Schäden wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Das Gewebe wurde während der Ablationsprozesse gekühlt, sodass die Beurteilung thermischer Schäden nur eingeschränkt verwertbar ist. In Wundheilungsstudien konnte demonstriert werden, dass Gewebeentfernung mit dem PIRL zu narbenfreier Abheilung führt (Petersen et al. 2016). Eine Beurteilung der Effekte des PIRL auf in-vivo Hirngewebe ist aufgrund moralischer und ethischer Aspekte nur unter strenger Indikationsstellung durchführbar. Sie sollte einer Applikation des PIRL in neurochirurgischen Operationen vorangehen.

Der Pikosekunden Infrarot Laser ist ein experimenteller Aufbau in einem optischen Labor, der stetig weiterentwickelt wird, um die Ablationsergebnisse und die Handhabung zu optimieren. In unseren Versuchen wurden vornehmlich zugeschnittene, glatte Oberflächen ablatiert. Dabei ist die korrekte Einstellung der Fokussierung eine vergleichsweise geringere Herausforderung, als bei Geweben mit unebener Oberfläche. Der aktuelle PIRL-Aufbau verfügt über ein neues Autofokussystem, das die Benutzbarkeit und Ablationspräzision im Vergleich zu vorausgegangenen Versuchen mit manuellem Fokus bereits verbesserte. Bei Fehleinstellungen des Fokus kann keine effiziente Gewebeablation erreicht werden. Für eine Anwendung des PIRL am Patienten ist eine automatisierte Fokussierung eine Voraussetzung.

Diese kann entweder, wie in unseren Versuchen, durch ein Autofokussystem oder durch eine Faser, die der Operateur mit dem zu ablatierenden Gewebe in Kontakt bringt, erreicht werden (Petersen et al. 2018, Woolman et al. 2017).

Der aktuelle Versuchsaufbau inklusive der Ablationsbox, der PTFE-Absaugung und der Kühlfalle wurden bereits in früheren Studien mit dem PIRL zur Analyse von Proteinen verwendet. Die Kondensation der Ablationswolke ermöglicht weitere Probenaufarbeitungen wie den tryptischen Verdau, der für die massenspektrometrische Analyse von Proteinen erforderlich ist. Im Gegensatz zur Proteinanalyse erlaubt das hohe Vorkommen, die gute Löslichkeit und die natürliche Ionisation von Lipiden die Messung starker massenspektrometrischer Signale ohne spezifische Probenaufbereitung. So war es uns möglich, diese zu umgehen und die Hirngewebeproben direkt aus der kondensierten Ablationswolke zu analysieren und zu charakterisieren.

Wir haben eine relativ lange Ablations- und Sammelzeit von vier Minuten gewählt, um trotz eventuellen Verlusten in den Sammelgefäßen ausreichend Material zu gewinnen und auch für spätere oder wiederholte Analysen Material zur Verfügung zu haben. Durchschnittlich wurde 1 ml Material pro Probe gewonnen. Bei einer patientennahen Anwendung, bei der die Gewinnung von zusätzlichem Material für experimentelle Analysen nicht erforderlich ist, kann auf diese lange Sammelzeit verzichtet werden. Da für eine massenspektrometrische Messung lediglich 8 µl erforderlich sind, kann die Ablationszeit potentiell auf wenige Sekunden reduziert werden. Während die (mehrfache) Entfernung von 1 ml Gewebe zu diagnostischen Zwecken wegen des signifikanten Gesamtvolumens und zu erwartenden Gewebeschäden nicht zu verantworten wäre, ist das erforderliche Probenvolumen von 8 µl so gering, dass durch die Entfernung dieses Volumens für die Analyse keine signifikanten Gewebeschäden zu erwarten sind.

Die Proben wurden für den Ablationsprozess auf einen gekühlten Kupferblock gesetzt, um einer Zersetzung des Gewebes vorzubeugen.

Frühere Studien zeigen, dass die schonenden Ablationseigenschaften des PIRL sich bei Ablation von frischem Gewebe bei Raumtemperatur nicht verändern, sodass eine Probenkühlung bei intraoperativer Anwendung des Lasers nicht erforderlich sein wird (Petersen et al. 2016).

Die Lipidprofile der verschiedenen Hirnareale waren in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) voneinander unterscheidbar. Obwohl die Probenzahl klein war (3 Proben in jeder Gruppe, 2 Proben in der Kleinhirnrinden-Gruppe) fällt auf, dass die Hirnareale deutliche Gruppen bilden. Die Hauptkomponentenanalyse ist eine nicht-supervidierte Methode und damit kein Algorithmus zur kontrollierten Transformation von Daten, um bekannte Gruppen von Proben einzuordnen. Sie unterscheidet zwischen Datenpunkten durch eine Linearkombination der verfügbaren Variablen. In unserem Fall sind das die Lipidsignalintensitäten. Die Linearkombination dient dabei der Berücksichtigung der größtmöglichen Varianz. Dadurch wird deutlich, dass die große Variabilität im Datensatz tatsächlich durch die Unterschiede in der Lipidkomposition der verschiedenen Gewebe und nicht etwa durch Artefakte oder Messungenauigkeiten zustande kommen. Die verschiedenen Areale konnten anhand ihrer Lipidzusammensetzungen voneinander unterschieden werden, ohne dass zuvor die ausschlaggebenden m/z-Werte bzw. Lipide definiert wurden. Die relevanten Lipide haben sich im Rahmen der PCA-Analyse ergeben.

Obwohl die Gewebeproben, außer Thalamus und Kleinhirnrinde, durch mindestens zwei Standardabweichungen voneinander getrennt waren, ist die Zuverlässigkeit der Unterscheidbarkeit anhand einer PCA durch die geringe Probenanzahl limitiert. Eine supervidierte Methode wie die Stützvektormaschine wäre in der Lage, die Proben mit größerer Genauigkeit voneinander zu trennen (Wang 2005). Mit geringen Probenzahlen, wie in unserer Studie wäre es jedoch wahrscheinlich zu einer Überanpassung durch die große Anzahl von Variablen gekommen, sodass auf diese Methode verzichtet wurde (Cristianini et Shawe Taylor 2000). Folgestudien mit größeren Probenzahlen sind erforderlich, um die Möglichkeiten der PIRL-MS Methode zur Differenzierung verschiedener Proben zu untersuchen.

Lipide sind ein basaler Bestandteil des Gehirns und stellen etwa 60% seines Trockengewichts dar (Bascoul-Colombo et al. 2016). Die makroskopische Erscheinung verschiedener Hirnareale ist hauptsächlich durch den Anteil an Myelin bestimmt, welches lipidreich ist und weiß erscheint. Die Hirnrinde enthält nur geringe Anteile an Myelin und beinhaltet vornehmlich Zellkörper der zentralnervösen Neurone. Sie erscheint makroskopisch grau. Im Gegensatz dazu besteht zum Beispiel das Corpus callosum aus weißer Substanz, also myelinisierten Nervenfasern, die beide Hirnhälften miteinander verbinden (Welsch et al. 2018). Die Differenzierung zwischen grauer und weißer Substanz wird schwieriger, wenn man inhomogene Regionen wie den Thalamus oder das Mesencephalon betrachtet. Beide Regionen beherbergen verschiedenste Funktionen und Kerngebiete und bestehen aus einer Mischung aus grauer und weißer Substanz. Wenn man die Ergebnisse der PCA (Abbildung 5) unter den biologischen Gesichtspunkten der Hirnareale betrachtet, orientiert sich die zweite Hauptkomponente an dem Grad der Myelinisierung des Gewebes, scheint also vor allem Lipide zu berücksichtigen, die graue und weiße Substanz voneinander unterscheiden. Von unten nach oben betrachtet stellt sich an der Achse der zweiten Hauptkomponente Gewebe mit hohen Anteilen grauer Substanz über gemischte Gewebe bis zu Geweben mit hohem Anteil an weißer Substanz dar. Die Großhirnrinde mit wenig myelinisierten Fasern (graue Substanz) stellt sich am unteren Teil der Achse dar. Großhirnrinde enthält vermehrt PS(40:6) ( $m/z$  834.531). Phosphatidylserin ist ein wesentlicher Teil von Biomembranen und spielt eine Rolle im programmierten Zelltod (Martin et al. 1995). Andere Funktionen, wie zum Beispiel PS-vermittelte, mechanisch-stabilisierende Eigenschaften auf Lipiddoppelmembranen werden angenommen (Cascales et al. 2012). Das Corpus callosum mit hohem Gehalt myelinisierter Fasern (weiße Substanz) stellt sich auf der entgegengesetzten Seite am oberen Teil der Achse dar. Es enthält hohe Anteile an PS(36:1) ( $m/z$  788.547) und ST(24:1) ( $m/z$  888.626). Sulfatid findet sich vermehrt in Oligodendrozytenmembranen und übernimmt dort eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung ihrer Integrität (Pintado-Sierra et al. 2017, McGonical et al. 2019). Mesencephalon und Thalamus finden sich als Mischgewebe mit

Anteilen grauer und weißer Substanz im Bereich zwischen Großhirnrinde und Corpus callosum. Mesencephalon enthält hohe Anteile an PS(36:1) (m/z 788.547). Die Hypophyse nimmt eine Sonderstellung ein, weil sie nur anteilig aus Nervengewebe besteht. Ihr Lobus anterior, der etwa 80% der Hypophyse ausmacht, besteht aus endokrinem Drüsengewebe. Der Lobus posterior besteht hauptsächlich aus unmyelinisierten Axonen. Bei der Probenentnahme aus dem Schweinehirn war eine Trennung in Lobus anterior und posterior nicht möglich, sodass die Analysen an der gesamten Hypophyse erfolgten. Die Sonderstellung der Hypophyse wird ebenfalls durch die PCA abgebildet, indem die Hypophysenproben sich im oberen linken Bereich der graphischen PCA Darstellung sammeln. In den Hypophysenproben trat PI (38:4) (m/z 885.552) vermehrt auf. Phosphatidylinositol ist häufig an der Modulation von Membranrezeptoren und Signalprozessen beteiligt (Czech 2000). In weiterführenden Studien sollte die getrennte Analyse des Lobus anterior und Lobus posterior angestrebt werden.

Korrelationen zwischen spezifischen Lipiden und Hirnarealen können anhand der graphischen PCA Darstellung untersucht werden (Abbildung 5). Das Signal m/z 834.531, das PS(40:6) repräsentiert, hatte den größten negativen Koeffizienten in PC2. PS(40:6) trat gehäuft in Großhirnrindenproben auf. In Berücksichtigung der vorherigen Beobachtung, dass die PC2-Achse mit dem Grad der Myelinisierung korreliert, ist dieses Signal ein Indikator für eine geringe Myelinisierung und damit für graue Substanz. Im Gegensatz dazu hatten die Signale m/z 788.547 (PS(36:1)) und m/z 888.626 (ST(24:1)) beide positive Koeffizienten in der PC2 und sind damit ein Indikator für weiße Substanz. PS(36:1) war darüber hinaus das am stärksten differenzierende Signal auf der PC1-Achse und trennte die Hypophysen-Proben, in denen die Intensitäten dieses Signals sehr gering waren, von Mesencephalon und Corpus callosum, in deren Proben die stärksten Signalintensitäten des Lipids PS(36:1) gemessen wurden. Das zweitstärkste unterscheidende Signal in PC1 ist m/z 885.552 (PI(38:4)), das mit hohen Signalintensitäten in der Hypophyse und niedrigen Signalintensitäten im Corpus callosum detektiert wurde. In Thalamusproben sahen wir eine gehäuftes Auftreten des Wertes m/z 904.620 (ST-OH(4:1)). Die gleichen differenzierenden Eigenschaften der



m/z 888 und m/z 834-Werte wurden in einer vorherigen DESI-MS Studie am menschlichen Gehirn beobachtet (Jarmusch et al. 2016). Dort waren m/z 788 und m/z 885 ebenfalls als starke Signale gemessen worden, allerdings hatte nur m/z 885 einen Einfluß auf die Unterscheidbarkeit in der PCA. In der Studie von Jarmusch (2016) wurden nur Proben weißer Substanz, grauer Substanz und Gliom-Proben betrachtet. Proben der Hypophyse und des Corpus callosum wurden nicht einbezogen. Das könnte erklären, warum m/z 788 sich nicht innerhalb der für die Unterscheidbarkeit relevanten Signale befindet. Wenn man die dominantesten Lipide betrachtet, sind unsere PIRL-MS Ergebnisse mit der DESI-MS Studie von Jarmusch (2016) teilweise vereinbar. PS (40:6) (m/z 834) trat bei Jarmusch und bei uns häufig in grauer Substanz auf. Die m/z-Werte 788 (PS(36:1)) und m/z 888 (ST(24:1)) traten sowohl bei Jarmusch, als auch in unserer Studie gehäuft in weißer Substanz auf. Der m/z-Wert 885 wurde bei Jarmusch vermehrt in grauer Substanz gemessen. Auch in unserer Studie wurde m/z 885 (PI(38:4)) gemessen, war allerdings nicht in grauer Substanz, sondern in Hypophysenproben stark vertreten. Der m/z-Wert 904 (ST-OH(24:1)) konnte ebenfalls in unserer und der Arbeit von Jarmusch identifiziert werden. Allerdings war das Lipid bei uns vermehrt in Thalamusproben nachweisbar, während Jarmusch das Lipid vornehmlich in weißer Substanz identifizierte. Durch die vielen Lipide, die sowohl in unserer als auch der Studie von Jarmusch detektiert wurden, lassen sich Rückschlüsse bezüglich der Verlässlichkeit der Ergebnisse trotz unterschiedlicher Desorptions-Techniken ziehen.

Die von Fournier (2016, *SpiderMass*) und Takáts (2013, *iKnife*) vorgestellten Methoden unterscheiden sich in Vergleich zu einer PIRL-basierten Methode vor allem durch ihre Auswirkungen auf das bearbeitete Gewebe, während die Ansätze zur Gewebeanalyse bei Fournier, Takáts und unserer PIRL-Methode sich ähneln, indem sie alle auf massenspektrometrischen Lipidomanalysen basieren. Die unterschiedlichen Effekte der Methoden auf umliegendes Gewebe prädisponieren sie für verschiedene Anwendungen. Die unmittelbare Blutstillung während des Schneideprozesses, wie sie beim *iKnife* auftritt, kann in manchen chirurgischen Bereichen (z.B. Orthopädie und Unfallchirurgie) von Vorteil sein. Im neurochirurgischen Bereich können

thermische Effekte allerdings fatale Folgen haben. Die genannten Methoden basieren alle auf massenspektrometrischen Messungen von desorbierten Geweben und unterscheiden die Gewebe anhand von einem oder mehreren Merkmalen, die sich aus den Spektren ergeben. Die *iKnife* und *SpiderMass* Methoden nutzen jeweils Signale aus dem negativen Ionenmodus im Massenbereich  $m/z$  600-900 und  $m/z$  200-1000 um Proben zu unterscheiden. Diese Massenbereiche repräsentieren vor allem verschiedene Lipidspezies (Takáts et al. 2013, Fournier et al. 2016). Mit der DESI-MS Methode wurden Signale im Massenbereich  $m/z$  100 bis 1000 beschrieben. Darunter befinden sich Lipide und andere Metabolite (Santagata et al. 2014). Während die analytischen Anteile der Methoden sich ähneln sind die Desorptionsmechanismen äußerst unterschiedlich. Ihre verschiedenen Auswirkungen auf das Gewebe ergeben eine präferentielle Anwendung in unterschiedlichen chirurgischen Bereichen. Das *iKnife* ermöglicht durch sein elektrochirurgisches Messer eine unverzügliche Koagulation um Blutungen im Prozess des Scheidens zu stillen. Dadurch verursacht es am umliegenden Gewebe einen signifikanten Hitzeschaden, was seine Anwendbarkeit an sensiblen Geweben wie dem Gehirn limitiert. Die Desorption Elektrospray Ionisation (DESI) ist bereits an Gewebeschnitten und Ausstrichen getestet worden, nicht jedoch an vitalen in-situ Tumoren vor ihrer Exzision. Die Infrarot Laser-Desorption, die das *SpiderMass* nutzt, kommt der PIRL Methode in unserer Studie am nächsten. Beide Laser erregen die O-H Bindung bei einer Wellenlänge von 2.94  $\mu\text{m}$ . Allerdings emittiert der PIR-Laser 1000 sehr kurze Pulse (400 ps) pro Sekunde mit einer Energie von 700  $\mu\text{J}$  pro Puls, während der *SpiderMass* Infrarot Laser nur 10 Pulse pro Sekunde mit einer Energie zwischen 7 und 9 mJ emittiert. Die Pulsenergie ist um den Faktor 10 höher wodurch das Gewebe einer höheren Spitzenenergie ausgesetzt ist. Eine vergleichende Studie zwischen dem *SpiderMass* und der PIRL-Ablation hinsichtlich des Outcomes nach Operationen am Gehirn wäre interessant um den Effekt thermischer Nebenwirkungen zu evaluieren. Die Entwicklung von Geräten, die auch an sensiblen Geweben einsetzbar sind, ist essentiell. Damit der PIRL für Operationen am Gehirn eingesetzt werden kann, stehen noch mehrere Entwicklungen aus. Zunächst bedarf es eines beweglichen Laserskalpells, das in Patientennähe durch einen Chirurgen bedient werden

kann. Eine verlässliche Autofokusfunktion muss integriert werden. Eine Absaugung mit direkter Injektion der Proben in ein Massenspektrometer muss in unmittelbarer Nähe zur Ablationswolke vorhanden sein. Der Absaugungskanal muss zwischenzeitlich gereinigt werden, um etwaigen Verunreinigungen durch zuvor analysiertes Material vorzubeugen. Eine Datenbank zum Abgleich und zur zuverlässigen Zuordnung der Massenspektren zu speziellen Geweben muss etabliert und validiert werden.

## **2.5 Schlussfolgerung**

Wir konnten das Potential der PIRL-MS Kopplung für eine schonende in-situ Klassifikation von biologischen Geweben demonstrieren. Die sauberen Schnitte, die der PIRL erzeugt heben die schonenden Eigenschaften des Lasers hervor. Die Identifikation von Lipiden und die Differenzierung zwischen verschiedenen Hirnarealen zeigt, dass die PIRL-generierten Aerosole zur massenspektrometrischen Unterscheidung von Geweben genutzt werden können. Als on-line intraoperatives Verfahren kann die PIRL-MS Methode auf molekularer Ebene Auskunft über spezifische Hirnareale und andere Gewebe geben, um chirurgische Prozesse zu unterstützen. Perspektivisch wird die Kombination von minimalinvasiver Laserchirurgie und Massenspektrometrie zu herausragenden Ergebnissen in der Effektivität von Tumorentfernung und dem bestmöglichen Erhalt umgebenden, gesunden Gewebes führen.

### 3 Summary

We were able to show that the condensed ablation plumes generated by PIRL contain lipids which could be used to differentiate anatomical brain areas by mass spectrometry without further processing. The brain areas were clearly distinguishable by principal component analysis (PCA). We identified lipids that appear frequently in the examined regions and contribute to their discrimination: The signals  $m/z$  788.547 (PS(36:1)) and  $m/z$  888.626 (ST(24:1)) were frequently detected in mesencephalon and corpus callosum. Hypophysis showed high abundances of  $m/z$  885.552 (PI(38:4)). Thalamus was marked by high amounts of  $m/z$  904.620 (ST-OH(4:1)).  $m/z$  834.531 (PS(40:6)) was a frequent signal in cerebral cortex. The data points of the measurements of different brain area samples were distributed within the PCA loading plot according to their composition of white and grey matter. On the upper, positive part of PCA-2 axis samples with high amounts of white matter were displayed. Samples with high amounts of grey matter collected on the lower, negative part of the PCA-2 axis. The results show the potential of a PIRL-MS-based method for tissue analysis.

## 4 Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, dass die mit dem PIRL gewonnenen Ablationskondensate Lipide enthalten, die ohne weitere Aufarbeitung nach entsprechender massenspektrometrischer Messung zur Differenzierung verschiedener Hirnareale verwendet werden können. Die Hirnareale konnten mittels Hauptkomponentenanalyse voneinander unterschieden werden. Wir identifizierten Lipide, die gehäuft in den untersuchten Hirnarealen auftreten und zu ihrer Unterscheidbarkeit beitragen: Die Signale  $m/z$  788.547 (PS(36:1)) und  $m/z$  888.626 (ST(24:1)) wurden vermehrt in Mesencephalon und Corpus callosum gemessen. In der Hypophyse trat  $m/z$  885.552 (PI(38:4)) gehäuft auf. Thalamus war durch das Auftreten von  $m/z$  904.620 (ST-OH(4:1)) gekennzeichnet. In der Großhirnrinde war  $m/z$  834.531 (PS(40:6)) ein starkes Signal. Die Datenpunkte der Messungen verschiedener Hirnareale waren in der graphischen PCA Darstellung in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung aus grauer und weißer Substanz verteilt. Im oberen, positiven Teil der PCA-2 Achse stellten sich Proben mit höherem Gehalt weißer Substanz dar. Im unteren, negativen Teil der PCA-2 Achse sammelten sich Proben mit hohem Gehalt grauer Substanz. Diese Ergebnisse belegen das Potential einer PIRL-MS basierten Methode für die Analyse von Geweben.

## 5 Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärungen

ACTH	Adrenocorticotropin
ADH	Antidiuretisches Hormon
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DIVE	Desorption through vibrational excitation, zu Deutsch Herauslösung durch Schwingungsanregung
engl.	Englisch
Er:YAG- Laser	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
eV	Elektronenvolt
flow-injection	Fließinjektion: Automatisiertes Verfahren zur kontinuierlichen Injektion einer Probe in einen Analyten
FS	Fettsäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GBM	Glioblastoma multiforme
Hz	Hertz
K	Kelvin
iKnife	Intelligentes chirurgisches Skalpell, das 2013 von Takáts et al. vorgestellt wurde
kaudal	Zum Steißbein hin orientiert, schwanzwärts; von lateinisch cauda - Schwanz
kranial	Zum Kopf hin <i>oder</i> nach oben hin; von lateinisch cranium – Schädel
LH	Luteinisierendes Hormon
LMSD	Lipid Maps Structure Data Base
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie

m/z	Der m/z-Wert beschreibt das Verhältnis der Masse eines Ions zu seiner Ladung und steht auf der X-Achse des Massenspektrums. Er wird gegen die Intensität auf der Y-Achse aufgezeichnet.
PA	Phosphatidsäure
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principal component analysis)
Peak(s)	Signale, die bei der massenspektrometrischen Messung entstehen und als Striche in einem Koordinatensystem dargestellt werden
PI	Phosphatidylinositol
PIRL	Pikosekunden Infrarot Laser
PNS	Peripheres Nervensystem
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
ps	Pikosekunde
PS-NAc	N-acyl Phosphatidylserin
PTFE	Polytetrafluorethylen
REIMS	Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry
SpiderMass	Intelligentes Laserskalpell, das 2016 von Fournier et al. vorgestellt wurde
STH	Somatotropes Hormon
ST-OH	Hydroxyliertes Sulfatid
ZNS	Zentrales Nervensystem
μJ	Mikrojoule
μl	Mikroliter

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen		Seite
Abbildung 1	Gliederung des Gehirns	10
Abbildung 2	Aufbau der Ablationsversuche	17
Abbildung 3	Hirngewebestück nach Ablation (Foto)	20
Abbildung 4	Full-Scan ESI-massenspektrometrische Spektren der Hypophyse (links) und des Corpus callosum (rechts) des Hirns eines Mini-Schweins ( <i>sus scrofa domesticus</i> ) im negativen Modus	21
Abbildung 5	Hauptkomponentenanalyse der sechs Hirnareale mit Darstellung der ersten beiden Hauptkomponenten	22
Tabellen		
Tabelle 1	Liste der elf identifizierten Lipide mit dem stärksten Einfluß auf die Hauptkomponenten 1 bis 3	24



## 7 Literatur

Abbott S, Jenner A M, Spiro A S, Batterham M, Halliday G M, Brett G (2015) Fatty Acid Composition of the Anterior Cingulate Cortex Indicates a High Susceptibility to Lipid Peroxidation in Parkinson's Disease. *J Parkinson's Disease*. 5: 175-185.

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzing LJ, Zilch HG (2010) *Duale Reihe Anatomie*, 2. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart. 1003, 1024-1025, 1044.

Balog J, Kumar S, Alexander J, Golf O, Huang J, Wiggins T, Abbassi-Ghadi N, Eneydi A, Kacska S, Kinross J, Hanna GB, Nicholson JK, Takáts Z (2015) In Vivo Endoscopic Tissue Identification by Rapid Ionization Mass Spectrometry (REIMS) *Angewandte Chemie, International Edition*. 54(38): 11059-11062.

Bascoul-Colombo C, Guschina IA, Maskrey BH, Good M, O'Donnell VB, Harwood JL (2016) Dietary DHA supplementation causes selective changes in phospholipids from different brain regions in both wild type mice and the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta*. 1861(6): 524-537.

Böttcher A, Kucher S, Knecht R, Jowett N, Krötz P, Reimer R (2015) Reduction of thermocoagulative injury via use of a picosecond infrared laser (PIRL) in laryngeal tissues. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 272(4): 941-948.

Cascales JL, Costa SO, Garro A, Enriz R (2012) Mechanical properties of binary DPPC/DPPS bilayers. *RSC Adv*. 2: 11743-11750.

Cristianini N, Shawe-Taylor J (2000) *An Introduction to Support Vector Machines and other kernel-based learning methods*. Cambridge University Press, New York. 4-5.

Czech MP (2000) PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*. 100: 603-606.

Fledrich R, Abdelaal T, Rasch L, Bansal V, Schütza V, Brügger B, Lüchtenborg C, Prukop T, Stenzel J, Rahman RU, Hermes D, Ewers D, Möbius W, Ruhwedel T, Karona I, Weis J, Klein D, Martini R, Brück W, Müller WC, Bonn S, Bechmann I, Nace KA, Stassart RM, Sereda MW (2018) Targeting myelin lipid metabolism as a potential therapeutic strategy in a model of CMT1A neuropathy. *Nat Commun*. 9(1):1-14.

Fournier I, Fatou B, Leblanc E, Vinatier D, Mesdag V, Wisztorski M, Fosca C, Salzert M, Ziskind M (2016) In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci Rep*. 6: 1-14.

Fukuda H, Paredes S, Battle A (1992) Tumor-localizing properties of porphyrins in vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem.* 102(2):433-436.

Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 61, 267–304.

Garzorz-Stark N (2018) *Neuroanatomie, 2. Auflage.* Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München. 54-55.

Ghosh S, Dyer RA, Beasley CL (2017) Evidence for altered cell membrane lipid composition in postmortem prefrontal white matter in bipolar disorder and schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 95: 135-142.

Jain M, Ngoy S, Sheth SA, Swanson RA, Rhee EP, Liao R, Clish CB, Mootha VK, Nilsson R (2014) A systematic survey of lipids across mouse tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism.* 306(8): 858-864.

Jarmusch AK, Alfaro CM, Pirro V, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG (2016) Differential Lipid Profiles on Normal Human Brain Matter and Gliomas by Positive and Negative Mode Desorption Electrospray Ionization - Mass Spectrometry Imaging. *PLoS One.* 11(9): e0163180.

Jowett N, Wöllmer W, Mylnarek A, Wiseman P, Segal B, Franjic K, Krötz P, Böttcher A, Knecht R, Miller R (2013 (a)) Heat Generation During Ablation of Porcine Skin With Erbium:YAG Laser vs a Novel Picosecond Infrared Laser. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 139(8): 828-833.

Jowett N, Wöllmer W, Reimer R, Zustin J, Schumacher U, Wiseman PW, Mylnarek AM, Böttcher A, Dalchow CV, Lörincz BB, Knecht R, Miller RJD (2013 (b)) Bone Ablation without Thermal or Acoustic Mechanical Injury via a Novel Picosecond Infrared Laser (PIRL). *Otolaryngol Head Neck Surg.* 150(3), 385-393.

Leishman E, Kunkler PE, Hurley JH, Miller S, Bradshaw HB (2019) Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases: Acute and Chronic Mild Traumatic Brain Injury Differentially Changes Levels of Bioactive Lipids in the CNS Associated with Headache. *Adv Exp Med Biol.* 1161: 193-217.

Li Q, Bozek K, Xu C, Guo Y, Sun J, Sherwood C, Hof P, Ely J, Li Y, Willmitzer L, Gialvalisco P, Khaitovich P (2017) Changes in Lipidome Composition during Brain Development in Humans, Chimpanzees, and Macaque Monkeys. *Mol Biol Evol.* 34(5): 1155-1166.

Linnemann M, Kühl M (2005) *Biochemie für Mediziner, 7. Auflage.* Springer Verlag, Berlin. 195, 211-212.

Löffler G, Petrides P, Heinrich PC (2007) *Biochemie & Pathobiochemie, 8. Auflage.* Springer Verlag, Berlin. 33, 40-42.

Löffler G (2008) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 7. Auflage. Springer Verlag, Berlin. 94, 98, 122, 472-473.

Martin S, Reuelingsperger C, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie R, LaFace DM, Greem DR (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl J Exp Med. 182: 1545-1556.

Nasaruddin ML, Pan X, McGuinness B, Passmore P, Kehoe PG, Hölscher C, Graham SF, Green BD (2018) Evidence That Parietal Lobe Fatty Acids May Be More Profoundly Affected in Moderate Alzheimer's Disease (AD) Pathology Than in Severe AD Pathology. Metabolites. 8(4): 1-16.

O'Brien J und Sampson E (1965) Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. J Lipid Res. 6(4): 537-544.

Pamplona R, Pradas I, Huynh K, Cabré R, Ayala V, Meikle PJ, Jové M (2018) Lipidomics Reveals a Tissue-Specific Fingerprint. Front Physiol. 9: 1-17.

Petersen H, Tavakoli F, Kruber S, Münscher A, Gliese A, Hansen NO, Uschold S, Eggert D, Robertson WD, Gosau T, Sehner S, Kwiatkowski M, Schlüter H, Schumacher U, Knecht R, Miller RJD (2016) Comparative study of wound healing in rat skin following incision with a novel picosecond infrared laser (PIRL) and different surgical modalities. Lasers Surg Med. 48(4): 385-391.

Petersen H, Gliese A, Stober Y, Maier S, Hansen NO, Kruber S, Eggert D, Toth M, Gosau T, Schlüter H, Püschel K, Schumacher U, Miller RJD, Münscher A, Dalchow C (2018) Picosecond Infrared Laser (PIRL) Application in Stapes Surgery-First Experience in Human Temporal Bones. Otol Neurotol. 39(4): e224-e230.

Pintado-Sierra M, García-Alvarez J, Bribián A, Medina-Rodriguez EM, Lebrón-Aguilar R, Garrido L, de Castro F, Fernández-Mayoralas A, Quintanilla-López JE (2017) A comprehensive profiling of sulfatides in myelin from mouse brain using liquid chromatography coupled to high-resolution accurate tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 951: 89-98.

Rassow J, Hause K, Netzker R, Deutzmann R (2008) Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart. 12-14, 331-337.

Rouser G, Yamamoto A (1968) Curvilinear regression course of human brain lipid composition changes with age. Lipids. 3: 284-287.

Santagata S, Eberin LS, Norton I, Calligaris D, Feldman DR, Ide JL, Liu X, Wiley JS, Vestal ML, Ramiksson SH, Orringer DA, Gill KK, Dunn IF, Santagata DD, Ligon KL, Jolesz FA, Golby AJ, Cooks RG, Agar NYR (2014) Intraoperative mass spectrometry mapping of an onco-metabolite to guide brain tumor surgery. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(30): 11121-11126.

Schirmer M (2005) Neurochirurgie, 10. Auflage. Urban & Fischer/Elsevier GmbH, München, 15-28.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7(5): 392-401.

Takáts Z, Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K, Mirnezami R, Dezső B, Damjanovich L, Darzi A, Nicholson JK (2013) Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Sci Transl Med.* 194(5): 1-11.

Trepel M (2017) Neuroanatomie Struktur und Funktion, 7. Auflage. Elsevier, München. 13, 137, 138-139, 155-160, 179, 185.

Ulfing N (2008) Kurzlehrbuch Neuroanatomie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 4, 93.

Vatassery GT, Berry JF, Younozai R, Lam Bergrad P (1976) Effect of vitamin E deficiency on the lipid class and fatty acid composition of rat brain gray and white matter. *Lipids.* 11(4):317-321.

Wang L (2005) Support Vector Machines: Theory and Applications. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1-2.

Welsch U, Kummer W, Deller T (2018) Histologie - Das Lehrbuch, 5. Edition. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 445-451, 650-651, 653-658, 660-661.

Woolman M, Gribble A, Bluemke E, Zou J, Bernardis N, Wu M, Ginsberg HJ, Das S, Vitkin A, Zarrine-Afsar A (2017) Optimized Mass Spectrometry Analysis Workflow with Polarimetric Guidance for ex vivo and in situ Sampling of Biological Tissues. *Sci Rep.* 7(1): 468.

Xicota L, Ichou F, Lejeune FX, Colsch B, Tenenhaus A, Leroy I, Fontaine G, Lhomme M, Bertin H, Habert MO, Epelbaum S, Dubois B, Mochel F, Potier MC (2019) Multi-omics signature of brain amyloid deposition in asymptomatic individuals at-risk for Alzheimer's disease: The INSIGHT-preAD study. *EBioMedicine.* 47: 518-528.

Zhang J, Rector J, Lin JQ, Young JH, Sans M, Katta N, Giese N, Yu W, Nagi C, Suilburk J, Liu J, Bensussan A, DeHoog RJ, Garza KY, Ludolph B, Sorace AG, Syed A, Zahdivash A, Milner TE, Eberlin LS (2017) Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci Transl Med.* 9(406): eaan3968.

## **8 Danksagung**

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter, meinem Doktorvater, der meine Arbeit mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik begleitet hat.

Für seine besondere Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei praktischen Fragen danke ich Karsten Rinas. Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schlüter bedanke ich mich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Dr. Matthias Meister, der mir stets mit Liebe zur Seite steht.

Meiner Familie danke ich für die herausragende und umfassende Unterstützung über den Verlauf meines Studiums, meines bisherigen beruflichen Werdeganges und meiner Promotion.

## **9 Lebenslauf**

**Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt**

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....