Laser- und Medizin-Technologie GmbH Berlin

Entwicklung einer bildgestützten Raman-spektroskopischen Plattform für die instrumentelle Analytik

Carina Reble[1,2,*], Ingo Gersonde[1], Cathrin Dressler[1], Jürgen Helfmann[1], Hans Joachim Eichler[1,2]

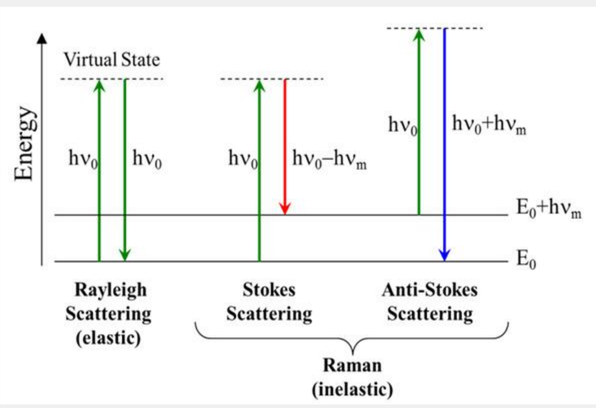
*[1]Laser- und Medizin- Technologie Berlin (LMTB), Fabeckstraße 60-62, 14195 Berlin , *c. reble@LMTB.de*
[2]Institut für Optik und Atomare Physik, Technische Universität Berlin, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

Einführung

Raman-Spektroskopie

Raman-Spektroskopie ist eine berührungs- und zerstörungsfreie Analysenmethode zur Materialcharakterisierung. Mittels Raman-Spektroskopie können biologische, chemische und pharmazeutische Proben analysiert werden. Raman-Spektren können in wenigen Sekunden detektiert werden und sind für ein Material mit einem Fingerabdruck vergleichbar. Ein großer Vorteil der Methode ist es, dass keine Störung durch Wasser erfolgt und Analysen auch durch Glas- oder Polymere hindurch realisierbar sind.

Die Raman-Spektroskopie beruht auf dem wenig intensiven Raman-Effekt. Dank Technologischer Fortschritte bei leistungsstarken Lasern, empfindlichen Detektoren, robusten kommerziellen Spektrometersystemen und eine einfache Bedienung verhelfen dieser Analysentechnik, auch in Bereiche des täglichen Lebens vorzudringen, so dass die Bedeutung der Raman-Spektroskopie stetig weiter zunimmt. Einzig Verunreinigungen der Probe oder die Eigenfluoreszenz derselben ebenso wie die Gefahr der Aufheizung der Probe durch intensive Laserstrahlung limitieren die Anwendbarkeit der Methode.



Der Raman-Effekt kann als inelastischer Stoß zwischen einem Photon und einem Molekül aufgefasst werden. Die Energie, die dabei abgegeben oder aufgenommen wird, entspricht der Differenz zwischen zwei Energieniveaus einer Molekülschwingung

RaDiag – Einsatz der Raman-Spektroskopie zur Tumordiagnostik in der Gynäkologie und Dermatologie

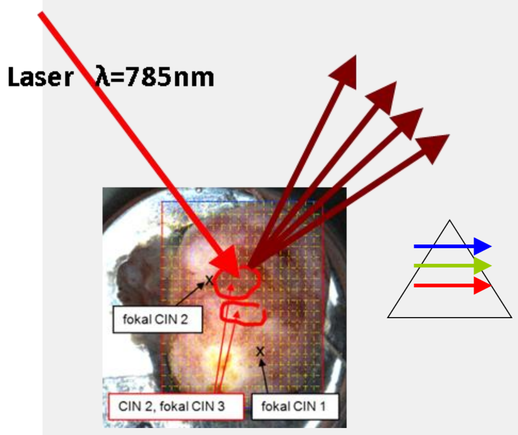
In dem durch das *Pro*FIT-Förderprogramm und der EU (EFRE) co-finanziertem Projekt RaDiag wurde die Anwendung der Raman-Spektroskopie zur optischen Erkennung von Krebsvorstufen am Gebärmutterhals und in der Haut untersucht. Für beide Anwendungsfelder wurden für die Klinik geeignete Messgeräte realisiert und diese im Rahmen einer klinischen Studie erfolgreich eingesetzt.

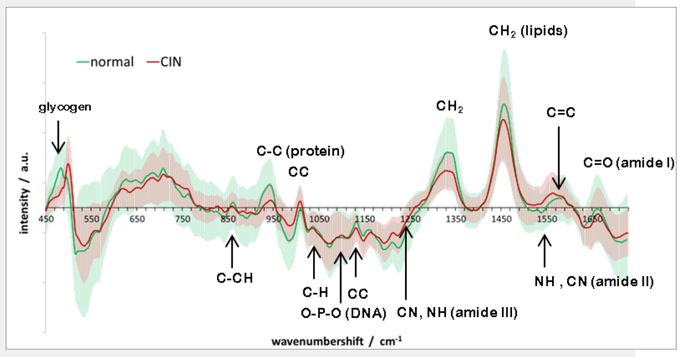
Hintergrund -

Goldstandard zur Früherkennung präkanzeröser Veränderungen des Gebärmutterhalses ist die kolposkopisch geführte Biopsie mit anschließender histologischer Analyse. Aufgrund der dazu notwendigen Erfahrung des Kolposkopikers und der notwendigen Entnahme und Analyse von Gewebeproben, ist eine nicht-invasive Detektion der CIN in Echtzeit mittels eines optischen Verfahrens wünschenswert. Die Raman-Spektroskopie ist geeignet, um ohne Markierung („label free“) Veränderungen in der Gewebezusammensetzung zu erkennen. Eine Anzahl von in Fachzeitschriften publizierten Artikeln berichten von Sensitivitäten und Spezifitäten im Bereich von 74-99% bzgl. der Detektion einer CIN.

Raman-Mapping am Gebärmutterhals

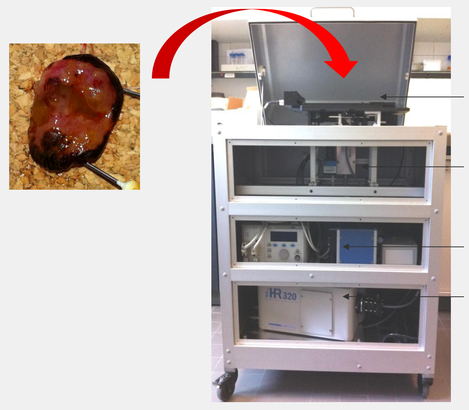
- **Ziel: Erkennung von Krebsvorstufen (CIN = *cervikale intraepitheliale neoplasie*)**
- **Vision: Vermeidung von Biopsien und großflächigen Konisationen**





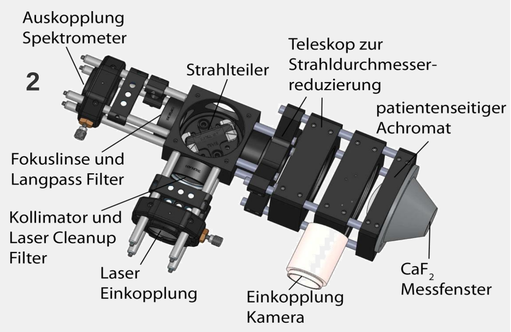
Prototyp und Design-Entwicklung -

i) für die klinische ex-vivo-Studie wurde ein mobiler, lichtdichter Messaufbau konzipiert, Punkt für Punkt wurden ortsabhängig Spektren der CIN und des normalen Gewebes erfasst. Für die Zuordnung wurde der histo-pathologische Befund kartographisch auf dem Nativbild des Konisationspräparates dokumentiert.



- **xy-Tisch mit Probenhalter**
- **Makroskopische Raman-Optik => Messfleck Ø ≈ 300µm , + Farbkamera zur Dokumentation (Bildfeld= 31x46 mm²)**
- **Laser: 785nm, P<70mW**
- **Spektrometer mit Querschnittswandlung für Detektionsfaserbündel**

ii) das Potenzial der Raman-Spektroskopie zur Diskriminierung kanzeröser und normaler Haut ist bekannt. Zwei Varianten der fasergestützten Raman-Sonde wurden für eine klinische *In-vivo*-Studie zur Hautkrebs-Erkennung erstellt und an ca. 80 Verdachtsfällen getestet.



Raman-Spektroskopie für die Analytik – RIA

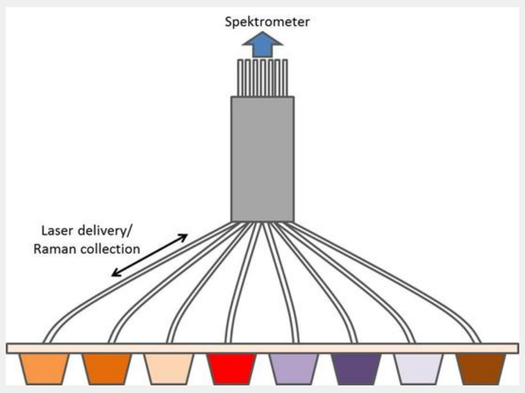
(Raman Imaging Analyse)

In dem aktuellem Verbundprojekt wird ein neuartiges simultan bildgebendes Raman-Spektroskopie-System für die chemische Analytik und Prozesskontrolle als Demonstrator aufgebaut und in verschiedenen Pilotapplikationen erprobt.

Status

Raman-Spektrometer mit punktweiser Messung haben sich als „Process Analytical Technology“ (PAT) etabliert. Derartige Geräte werden sequentiell rasternd eingesetzt, um bildgebend heterogene Stoffe - mit hohem Zeitaufwand - zu analysieren und sind deswegen industriell nur begrenzt einsetzbar. Gleichzeitig gibt es bildgebende Spektrometer mit mehreren Kanälen, die hauptsächlich im wissenschaftlichen Bereich eingesetzt werden. Ausgehend von den Anwendungen, gibt es eine technologische Lücke mit einer Kapazität von 100 bis 400 parallelen Kanälen. Ziel des Verbundprojektes ist es die Fertigbarkeit von Multiplex-Spektrometern unter marktfähigen Kriterien nachzuweisen. Ausgangspunkt ist die weltweit einmalige Technologie im wissenschaftlichen Bereich zur Herstellung von Multiplex-Spektrometer, die am Astrophysikalischen Institut Potsdam von Prof. Roth entwickelt wurde und in diesem Projekt einfließt.

Als eine wichtige Pilotapplikation für die Analytik ist die Entwicklung von Raman-Mikrotiterplatten-Systemen identifiziert worden, welche zudem im Hinblick auf label-freie Anwendungen, durch die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS, surface enhanced Raman spectroscopy) noch an zusätzlicher Attraktivität gewinnt.



Anwendung -

z.B. ist in der pharmazeutischen Industrie die Erfassung der chemischen Reaktionskinetik eine Routineaufgabe. Die simultane Raman-spektroskopische Erfassung dieser Reaktionskinetiken mit Mikrotiterplatten stellt eine erhebliche Innovation dar, die durch das aufzubauende bildgebende Raman-System geleistet werden kann. Im Zuge dieser Anwendung können auch neue Testsysteme für chemisch-analytische Fragestellungen entwickelt werden.

Schema: Faserapplikatoren für das multiplex Raman-Imaging zum Auslesen von Mikrotiterplatten.

Zusammenfassung

- **Im Projekt RaDiag wurde erfolgreich ein Raman-spektroskopischer Aufbau für die Vermessung von Cervixproben sowie für die fasergestützte Messung an Hautgewebe etabliert.**
- **Mit medizinischen Projektpartnern an der Charite konnten erfolgreich Klinische Studien zur Evaluierung des Verfahrens zur Gewebedifferenzierung durchgeführt werden.**
- **Die Entwicklung eines bildgebenden, multispektralen Raman-Systems im Hinblick auf die instrumentelle Analytik und Prozesskontrolle wird realisiert.**
- **Der Einsatz Raman-spektroskopischer Verfahren für die biochemische Analytik ermöglicht die Entwicklung neuartiger label-freier Testsysteme/Assays.**

References:
Reble C, I. Gersonde, C. A. Lieber, and J. Helfmann, "Influence of tissue absorption and scattering on the depth dependent sensitivity of Raman fiber probes investigated by Monte Carlo simulations", *Biomed. Opt. Express* **2**, 520-533 (2011)
Reble C, I. Gersonde, C. Dressler, J. Helfmann, W. Kühn and H.J. Eichler, “Evaluation of Raman spectroscopic macro raster scans of native cervical cone biopsies using histopathological mapping”, submitted

This work was co-financed by the Senate of Berlin and by the European Union (European funds for regional development) (FKZ 10147189).