

Jürgen Popp

# Raman Spektroskopie als vielseitiges analytisches Werkzeug in der biomedizinischen Forschung und der klinischen Diagnostik

Als der indische Physiker Chandrasekhara Venkata Raman 1928 die nach ihm benannte spektroskopische Methode Raman-Spektroskopie entdeckte, hätte niemand, vermutlich nicht einmal er selbst, den großen Erfolg dieser spektroskopischen Methode fast 100 Jahre nach ihrer Entdeckung vorhergesehen. Ohne Übertreibung kann man sagen, dass sich die Raman-Spektroskopie zu einer der wichtigsten Analysemethoden entwickelt hat, deren Anwendungsgebiete sich in alle Bereiche der Naturwissenschaften, der Medizin, aber auch in verschiedene andere Disziplinen wie der Kunstgeschichte etc. erstrecken [1]. Die Raman-Spektroskopie hat sogar die Erde verlassen und fliegt zum Mars [2].

Ganz allgemein beschreibt der Raman-Effekt die inelastische Streuung von Photonen an einem quantisierten molekularen System. In den meisten Fällen werden die Schwingungszustände von Molekülen als Streusystem genutzt, weshalb die Raman-Spektroskopie oft als Schwingungsspektroskopie bezeichnet wird [3]. Da Molekülschwingungen für jedes Molekül spezifisch sind, können Schwingungsspektren als eine Art charakteristischer „molekularer Fingerabdruck“ eines untersuchten anorganischen, organischen oder biologischen Moleküls oder komplexerer Systeme wie z. B. biologischer Zellen und Gewebe interpretiert werden [3].

Insbesondere in den Bereichen Biowissenschaften und Medizin haben Raman-basierte Technologien ihr großes Potential bewiesen und ergänzen zunehmend etablierte Verfahren wie die Fluoreszenz-Spektroskopie bzw. -Mikroskopie. Die Raman-Spektroskopie ermöglicht einen markierungsfreien Nachweis der molekularen Zusammensetzung sowie der Morphologie komplexer Proben wie biologischer Zellen oder Gewebe mit wenig oder gar keiner Probenvorbereitung [4-7]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein Raman-Spektrum aus vielen Dutzend unabhängigen Parametern über die Konzentration bis hin zur dreidimensionalen Anordnung von Makromolekülen und Biopolymeren in biologischen Proben besteht.

---

Prof. Dr. Jürgen Popp  
Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Helmholtzweg 4, D-07743 Jena  
juergen.popp@uni-jena.de

Leibniz Institut für Photonische Technologien e.V.  
Albert-Einstein-Str. 9, D-07745 Jena  
juergen.popp@leibniz-ipht.de  
DOI-Nr.: 10.26125/m9kt-4q06

Die Vorteile der Raman-Spektroskopie sind ihre sehr ausgeprägte molekulare Spezifität und ihre Vielseitigkeit, doch leidet sie unter ihrer geringen Empfindlichkeit, die den Nachweis von Molekülen in sehr geringen Konzentrationen einschränkt. Dieser Nachteil kann durch den Einsatz spezieller Raman-Signalverstärkungstechniken, wie z. B. Resonanz-Raman-Spektroskopie, oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)<sup>1</sup> oder durch nichtlineare kohärente Raman-Streuphänomene wie CARS<sup>2</sup> = kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung oder SRS<sup>3</sup> = stimulierte Raman-Streuung überwunden werden [3].

Die Anwendung dieser und weiterer Raman-Methoden in der biomedizinischen Forschung und klinischen Diagnostik hat in den letzten zehn Jahren rasant zugenommen und ist aufgrund der Fortschritte bei der Instrumentierung und vor allem aufgrund eines verstärkten interdisziplinären Dialogs zwischen Spektroskopikern und Endanwendern, wie z. B. Klinikern in eine neue Ära eingetreten. Die Raman-Spektroskopie ermöglicht eine nicht-invasive morphochemische Charakterisierung einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Proben, von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen, Pilzen, Biofilmen über Gewebeschnitte bis hin zu ganzen Organen [7]. Auf diese Weise haben Raman-Studien Einblicke und Erkenntnisse über z. B. Krankheitsmechanismen zur Frühdiagnose von Krankheiten [5-7], für eine mikrobielle Diagnostik, z. B. zum vor-Ort-Nachweis von Krankheitserregern [4, 8-11], zur Visualisierung von Stoffwechsel-, Abwehr- oder chemischen Kommunikationsprozessen in Zellen und Pflanzengewebe [12-14], für eine vor-Ort-Umwelt- und Bodenüberwachung [15-17], in der Forensik [18] sowie in der pharmazeutischen Prozessanalytik [19] ermöglicht. Abbildung 1 gibt einen kurzen Überblick über einige der wichtigsten Anwendungsbereiche biomedizinischer und klinischer Raman-Spektroskopie.

Dieser Anwendungsschub Raman-spektroskopischer Bioanalytik hat sowohl zu neuen Hardware- als auch zu Software-Fortschritten geführt, die neue Raman-Fasersonden-Designs [20], vor Ort einsetzbare kompakte und einfach zu bedienende Raman-Mikroskope [6] und neuartige Datenverarbeitungstechniken unter Ausnutzung künstlicher Intelligenz für eine automatisierte Auswertung von Raman-Datensätze [21] umfassen.

---

<sup>1</sup> SERS = Surface Enhanced Raman Scattering

<sup>2</sup> CARS = coherent anti-Stokes Raman scattering

<sup>3</sup> SRS = stimulated Raman scattering

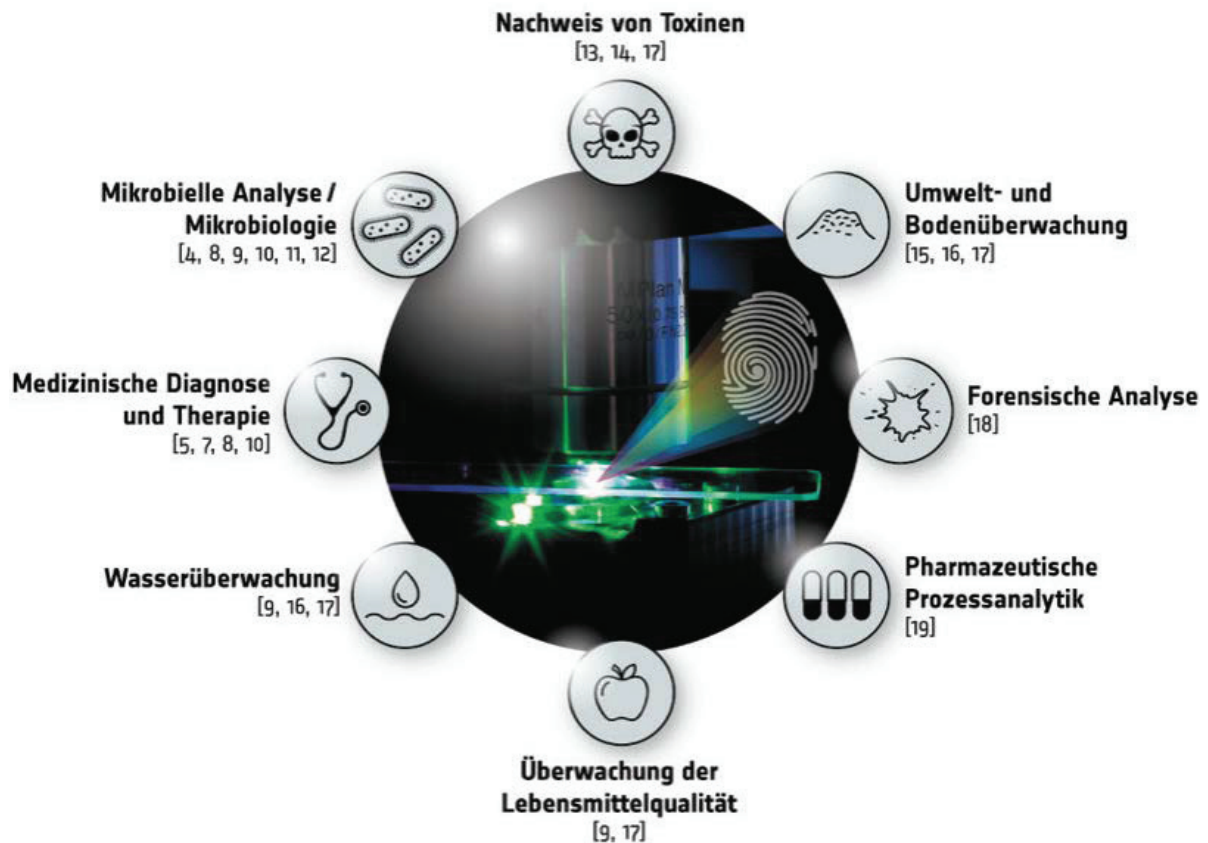


Abb. 1: Vielfältige Anwendungsbereiche biomedizinischer Raman-Spektroskopie

Eine umfassende Darstellung all dieser Anwendungsbereiche würde den Rahmen dieses kurzen Übersichtartikels bei weitem sprengen. Im Folgenden wird ein Schwerpunkt auf die Anwendung der Raman-Spektroskopie zur zuverlässigen Beurteilung von Tumorgewebe gelegt. Da pathologische Anomalien mit Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung und Struktur von Biomolekülen einhergehen, liefert das Raman-Spektrum von Gewebe einen empfindlichen und spezifischen Fingerabdruck der Art und des Zustands von diesem. Dies macht die Raman-Spektroskopie zu einem perfekten Werkzeug für eine markierungsfreie histopathologische Untersuchung von Gewebe [5]. Gerade in der Tumorchirurgie besteht ein großer Bedarf an neuen intraoperativ anwendbaren Technologien (d. h. *in-vivo* oder *ex-corpore in-vivo* als Schnellschnittverfahren), die den Tumor exakt lokalisieren können, um ihn möglichst vollständig zu entfernen, und die eine zuverlässige Tumortypisierung und -einstufung ermöglichen, um möglichst schnell einen individuellen, auf den Patienten zugeschnittenen Therapieplan einzuleiten. In den letzten Jahren hat sich die Raman-Spektroskopie von einer reinen wissenschaftlichen Forschungsmethode zu einem ausgereiften klinischen Werkzeug entwickelt, das eine solche markierungsfreie intraoperative Diagnostik ermöglicht [20]. Für einen intraoperativen Einsatz der Raman-Spektroskopie werden Raman-Fasersonden benötigt. Ein gängiges Design für solche Sonden verwendet mehrere Sammelfasern, die eine einzelne Anregungsfaser umgeben, zusammen mit einer Linsen- und Filterkonfiguration, um das Anregungs- und Sammellicht an der Probe zu überlagern, ohne dass das intensive Raman-Signal der Faser selbst stört [20]. Eine solche Raman-Faser wurde unter anderem für die intraopera-

tive Erkennung von Hirntumoren verwendet. Bei 17 Patienten mit Gliomen des WHO-Grades 2 bis 4 war es möglich, mit hoher Sensitivität und Spezifität gesundes Hirngewebe von tumorbefallenem Gewebe zu unterscheiden [22]. Diese Studie und viele weitere *Proof-of-Concept*-Studien zeigen das enorme Potenzial von Raman-basierten Anwendungen für eine intraoperative Tumordiagnostik, die die traditionelle histopathologische Analyse von bösartigem Gewebe ergänzen oder perspektivisch sogar ersetzen können. Der Vorteil der Raman-Spektroskopie besteht darin, dass Informationen über das Vorhandensein und den Grad eines Tumors in Echtzeit ermittelt werden können, ohne dass eine Biopsie entnommen werden muss. Für eine routinemäßige Anwendung der Raman-Spektroskopie in der intraoperativen Krebsdiagnostik müssen jedoch mehrere wichtige Aspekte bei der Geräteentwicklung berücksichtigt werden. Insbesondere sollten die Sonden Plug-and-Play-fähig, mechanisch robust und sterilisierbar sein. Außerdem sollte der Wechsel der Sonden keine Justage nach sich ziehen. Zu diesem Zweck haben wir eine endoskopische Raman-Sonde (Raman invaScope) entworfen und entwickelt, die eine mechanisch robuste Einheit darstellt, die einfach in das Backend-Gerät eingesteckt werden kann, dabei keine Justage erfordert und mit klinischen Standardverfahren vollständig sterilisiert werden kann (Abbildung 2). Weiterhin erfüllt die entwickelte Raman-Sonde die neue europäische Medizinprodukteverordnung (MDR 17/745), welche die Anwendung von Forschungsinstrumenten im klinischen Umfeld oft erheblich erschwert.

Die meisten Raman-Sonden ermöglichen nur Punktmessungen von Gewebepathologien, d. h. sie können nicht für die



**Abb. 2:** Raman invaScope für den *in-vivo*-medizinische Einsatz: Entwicklung einer Plug-and-Play medizinischen Raman-Plattform für die klinische Diagnostik zur *In-vivo*-Erfassung von Raman-Spektren. Die zugehörige faseroptische Raman-Sonde kann in Kombination mit einem Endoskop mit Arbeitskanal verwendet werden. Weiter Anwendungsgebiete ergeben sich u.a. in der (i) Zellforschung (Krankheitsdiagnose, Wechselwirkungen zwischen Medikamenten und Zellen); (ii) Raman-basierte Assays; (iii) Pharmazeutische Anwendungen wie Prozessanalytik.

Bildgebung verwendet werden, da die Erzeugung von hyperspektralen Raman-Bildern aufgrund der geringen Raman-Streuquerschnitte zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde. Hier können nichtlineare kohärente Raman-Verfahren wie CARS eingesetzt werden [5, 6]. Im Vergleich zur Raman-Endoskopie bietet die CARS-Endoskopie den großen Vorteil, dass aufgrund der deutlich kürzeren Messzeiten neben Punktmessungen auch Bilddaten (Images), die jedoch nur eine charakteristische Raman-aktive Schwingung abbilden, erzeugt werden können. Beim CARS-Verfahren werden auch andere nichtlineare Multiphotonen-Effekte wie die Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz (TPEF<sup>4</sup>, zur Anregung intrinsisch fluoreszierender Moleküle) und die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG<sup>5</sup>, in nicht-zentrosymmetrischen Systemen wie Kollagen) erzeugt. CARS-Implementierungen können daher von Natur aus als multimodal angesehen werden. In den letzten Jahren hat sich die nichtlineare multimodale CARS/TPEF/SHG-Bildgebung als ein leistungsfähiges Instrument für eine markierungsfreie und eine zuverlässige Beurteilung von Tumorgewebe etabliert [5, 6]. Die Implementierung eines solchen nichtlinearen multimodalen Bildgebungsansatzes für ein *in-vivo* Gewebescrining erfordert endospektroskopische Sondenkonzepte, was eine große technologische Herausforderung darstellt. Vor kurzem haben wir eine neuartige piezogesteuerte, distal scannende Fasersonde für die nichtlineare multimodale spektroskopische Bildgebung entwickelt [23]. Das Herzstück dieses Faser-Scanning-Endoskops ist eine eigens entwickelte, neuartige optische Faser für die Übertragung des CARS-Faserlasers, eine Singlemode-Doppelkern-Doppelmantel-Faser (DCDC)<sup>6</sup> aus reinem Quarzglas. Dieser Fasertyp vermeidet die Erzeugung eines störenden Vier-Wellen-Mischung Hintergrundssignals. Neben der DCDC-Faser ist das zweite Schlüsselement der endoskopischen Plattform ein speziell entwickeltes endomikroskopisches Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,55 und

einem Sichtfeld von 180  $\mu\text{m}$ . Das dritte Bauteil dieser flexiblen Sonde ist eine kompakte, einfach zu bedienende klinisch einsetzbare Yb-basierte Faserlaserquelle. Das entwickelte kompakte Sondenkonzept ist in der Lage, qualitativ hochwertige trimodale nichtlineare Bilder von ungefärbtem Gewebe zu liefern, vergleichbar mit Bildern erzeugt durch sperrige Laboraufbauten mittels kommerzieller Laser-Scanning-Mikroskopen. Die erforschte Sonde bringt die CARS/TPEF/SHG-Technologie nahe an die Bedürfnisse einer medizinischen Anwendung heran und eröffnet neue Möglichkeiten für eine verbesserte intraoperative Krankheitsdiagnostik.

Zum Abschluss soll noch eine sehr neue Entwicklung im Bereich biomedizinischer Raman-Spektroskopie, die ein enormes Potenzial für die biowissenschaftliche und biomedizinische Grundlagenforschung eröffnet, erwähnt werden. Die Raman-Spektroskopie, insbesondere die schnelle kohärente Raman-Bildgebung (CARS und SRS), ermöglicht auch eine gezielte räumlich-zeitliche Abbildung interessanter Zielmoleküle (wie z. B. Glukose, Arzneimittel, Metaboliten, Lipide, Aminosäuren, Nucleinsäuren usw.) in einer komplexen biologischen Umgebung, indem diese Zielmoleküle mit speziellen kleinen Raman-Tags markiert werden [12, 24, 25]. Diese Raman-Tags unterscheiden sich von Fluoreszenzmarkern durch ihre Größe und Multiplexfähigkeit. Während Fluoreszenzmarker oft größer als die markierten Moleküle selbst sein können, handelt es sich bei Raman-Tags um kleine Modifikationen der Zielmoleküle, die deren Funktionalität nicht verändern oder die Zellen beeinträchtigen. Bei den Modifikationen kann es sich z. B. um die Markierung mit stabilen Isotopen (wie <sup>2</sup>H oder <sup>13</sup>C) oder um das Hinzufügen einer einzelnen funktionellen Gruppe mit einem großen Raman-Streuquerschnitt (wie Nitril- oder Alkin-Gruppen) handeln, was zu Schwingungen im wellenzahlstillen Bereich eines Raman-Spektrums führt, der sich nicht mit zellulären Raman-Beiträgen überschneidet.

Insgesamt haben Raman-spektroskopische Ansätze ihr großes Potenzial gezeigt, um aktuelle klinisch-diagnostische Herausforderungen in verschiedenen medizinischen Bereichen zu bewältigen (z. B. eine intraoperative Bestimmung des Tumortyps und -grades oder eine bessere Abgrenzung von Tumorrändern), aber auch um etablierte Mikroskopie-Ansätze in der biomedizinischen und biowissenschaftlichen Forschung gezielt zu ergänzen.

## Referenzen

- [1] Michael Schmitt, Jürgen Popp, *J. Raman Spectrosc.*, 2006, **37**, 20–28.
- [2] <https://mars.nasa.gov/mars2020/mission/science/>
- [3] Dana Cialla-May, Michael Schmitt, Jürgen Popp, *Physical Sciences Reviews*, 2019, 20170040.
- [4] Susanne Pahlow, Karina Weber, Jürgen Popp, Bayden R. Wood, Kamila Kochan, Anja Rüter, David Perez-Guaita, Philip Heraud, Nick Stone, Alex Dudgeon, Ben Gardner, Rohith Reddy, David Mayerich, Rohit Bhargava, *Applied Spectroscopy*, 2018, **72**, 52–84.
- [5] Christoph Krafft, Michael Schmitt, Iwan W. Schie, Dana Cialla-May, Christian Matthäus, Thomas Bocklitz, Jürgen Popp, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**, 4392 – 4431.

<sup>4</sup> TPEF = two-photon excited fluorescence

<sup>5</sup> SHG = second harmonic generation

<sup>6</sup> DCDC = Double Core Double Clad