

Innovative spektroskopische Sensoren für eine klinische Diagnostik und Therapie – Potentiale und Trends

Jürgen Popp

¹*Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, FSU Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Deutschland*

²*Leibniz-Institut für Photonische Technologien Jena, Mitglied im Leibniz Forschungsverbund „Leibniz-Gesundheitstechnologien“, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Deutschland*

³*InfectoGnostics Forschungscampus Jena e.V., Philosophenweg 7, 07743 Jena, Deutschland*
juergen.popp@leibniz-ipht.de

Zusammenfassung

Innovative biophotonische Methoden, wie lineare und nichtlineare spektroskopische Ansätze, bieten großes Potenzial für die klinische Diagnostik und Therapie. Der folgende Beitrag bezieht sich dabei insbesondere auf Arbeiten zur Übertragung von spektroskopischen Ansätzen, insbesondere von innovativen Raman-Methoden, hin zu klinischen Anwendungen mit Schwerpunkt auf Infektionskrankheiten und Krebs, da diese Krankheitsbilder nach wie vor einen ungedeckten medizinischen Bedarf in Bezug auf Diagnose und Therapie darstellen.

Keywords: Raman-Spektroskopie, Bildgebung, Bakterien, Gewebe, Diagnostik

Motivation

Krankheiten in ihren Ursachen verstehen, früher erkennen und gezielter therapieren – Hoffnungen die sich mit der modernen Biomedizin verbinden - erfordert die Ermittlung diagnostischer, prognostischer und prädikativer Faktoren inkl. deren umfassende Bewertung in wenigen Schritten oder idealerweise in einem Arbeitsgang. Das Werkzeug Licht spielt bei der Umsetzung dieser Ziele eine Schlüsselrolle. Der Einsatz optischer/photonischer Technologien in der medizinischen Diagnostik und Therapie hat innerhalb der letzten 10 Jahre rapide zugenommen. In diesem Zusammenhang sind besonders spektroskopische Techniken zu nennen, da sie das Potential besitzen, die oben genannten medizinischen Bedürfnisse zu stillen und die medizinische Diagnostik und damit eine gezielte auf den Patienten abgestimmte Therapie voranzubringen [1,2]. Dabei erlauben biophotonische Ansätze insbesondere die Überwachung Prozesse in lebender Zellen oder Geweben auf molekularer Ebene. Darüber hinaus besitzen photonische Verfahren das Potential einer "sanften"

Diagnose und Heilung von Krankheiten und eröffnen einen Weg zur minimal-invasiven Medizin. In dieser Hinsicht sind spektroskopische Verfahren (z.B. Fluoreszenz, IR-Absorption, Raman) besonders hervorzuheben. Sie liefern sowohl unter *Ex-vivo*- als auch *In-vivo*-Bedingungen eine adäquate Unterstützung in Form von klinisch relevanten Informationen [3,4]. Spektroskopische Verfahren haben darüber hinaus den großen Vorteil, molekulare Informationen direkt von der zu untersuchenden Probe (z. B. Zellen, Gewebe) markierungsfrei zu erhalten. Neben morphologischen Informationen, die mit klinischen Ergebnissen korreliert werden können, werden qualitative und quantitative biochemische Informationen erhalten. Eine besonders effiziente Methode ist in dieser Hinsicht die Raman-Spektroskopie, mit der sich molekülspezifische Schwingungen beobachten lassen. Ein generiertes Raman-Spektrum wird als sogenannter "molekularer Fingerabdruck" einer untersuchten Spezies bezeichnet [5,6]. In Verbindung mit statistischen Auswertungsmethoden ermöglicht die Raman-Spektroskopie eine automatisierte

schnelle Charakterisierung und Identifizierung von Zellen und Geweben.

Im folgenden Beitrag wird über die Entwicklung und Anwendung spektroskopischer Ansätze im Besonderen innovativer Raman-basierte Methoden für: (1) eine schnelle Diagnose und darauf basierenden gezielten Therapie von Infektionskrankheiten inkl. deren Resistenzen und (2) eine optisch molekulare Gewebe-Pathologie mit Fokus auf einer intraoperativen Bestimmung von Tumorrändern berichtet.

Spektroskopische Pathogendiagnostik - Point-of-Care-Ansatz für eine bettseitige Diagnostik und Therapie von Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten stellen weltweit einer der häufigsten Todesursachen dar. Eine erfolgreiche Behandlung einer Infektion erfordert eine rechtzeitige Identifizierung des Pathogens und seines Antibiotikaresistenzmusters, um gezielt passgenaue Therapien einleiten zu können. Klassische mikrobiologische Verfahren beruhen oftmals auf zeitaufwendigen Übernachtskulturen und benötigen im Regelfall mehr als einen Tag, um ein entsprechendes Ergebnis zu erzielen. Die Erforschung und Entwicklung zuverlässiger und schneller kulturunabhängiger Analysemethoden ist daher essentiell, um frühzeitig eine gezielte Behandlung einzuleiten und damit die Prognose der Patienten zu verbessern. Optisch/spektroskopische Verfahren spielen hierbei eine Schlüsselrolle. So konnte bereits erfolgreich aufgezeigt werden, dass eine molekulare Analyse einzelner Mikroorganismen mittels Raman-Spektroskopie in weniger als drei Stunden möglich ist [7]. Die Raman-spektroskopischen Verfahren umgehen dabei zeitaufwändige Kultivierungsverfahren [8,9]. Die niedrigen Bakterienkonzentrationen in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut oder andere Körperflüssigkeiten wie Urin, Sputum, Ascites) machen es jedoch schwierig, Pathogene und deren charakteristischen molekularen Fingerabdruck direkt in Suspension nachzuweisen. Die Raman-Signatur der Matrixbestandteile beeinflusst das Raman-Spektrum der Pathogene signifikant. Mittels chipbasierter Proben-Vorbereitungsstrategien kann dieser Herausforderung begegnet werden. Es ist gelungen direkt aus realen Proben Pathogene zu isolieren und der Raman-spektroskopischen Analyse zuzuführen [10-12]. Beispielhaft sei im Folgenden der dielektrophoretische Ansatz kurz vorgestellt. Die Dielektrophorese ermöglicht die direkte translationale Manipulation von Bakterien in Suspensionen mit räumlich angeordneten elektrischen Feldern. Hierzu wurde ein

Quadrupol-Elektroden-Design umgesetzt, um Bakterien aus Flüssigkeiten in wohldefinierten, mikroskopisch kleinen Bereichen einzufangen und direkt markierungs- und zerstörungsfrei Raman-spektroskopisch zu analysieren. Im Vergleich mit Lebend- / Fluoreszenz-Vitalitätsfärbung konnte verifiziert werden, dass die Bakterien dieses Verfahren für den relevanten Bereich von Feldstärken überleben. Die dielektrophoretische Anreicherung von Bakterien erlaubt es somit, Raman-Spektren hoher Qualität in verdünnten Suspensionen mit einer Integrationszeit von nur einer Sekunde zu erhalten. [12] Durch die geringe und schnelle Probenvorbereitung und automatisierte Probenverarbeitung, durch die Integration in eine mikrofluidische Vorrichtung wird für eine sichere Handhabung von infektiösem Material mit minimalem Zeitaufwand für den Bediener gesorgt.

Nicht nur die Identifizierung von Pathogenen sondern die Erforschung schneller, sensitiver und spezifischer Methoden zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen ist in der heutigen Zeit, geprägt durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen, von essentieller Bedeutung. Dabei können Raman-spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Bakterien und Medikamenten als erster Schritt in Richtung Antibiotika-Empfindlichkeitstests herangezogen werden [13]. Im Folgenden wird kurz das Potential des zuvor vorgestellten dielektrophoretischen Chipsystems für die Untersuchung von Bakterium-Antibiotika-Wechselwirkungen aufgezeigt. Hierbei können erste Veränderungen in den bakteriellen Raman-Spektren aufgrund einer Antibiotikatherapie bereits nach 30 Minuten der Behandlung festgestellt werden [14]. Die klinische Anwendbarkeit konnte darüber hinaus am Beispiel von *Escherichia coli* gegenüber dem üblicherweise verschriebenen Fluorchinolon Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Ciprofloxacin-resistente *E. coli* wurden von empfindlichen *E. coli* mit hoher Genauigkeit innerhalb von etwa 90 Minuten Gesamtanalysenzeit differenziert. Zur Differenzierung wurden multivariate statistische Verfahren für die Erstellung eines robusten Klassifikationsmodells herangezogen. Spektrale Veränderungen, die zu einer Unterscheidung zwischen empfindlichen und resistenten Bakterien führen, stehen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den erwarteten metabolischen Veränderungen in den Bakterien aufgrund der Wirkungsweise des Arzneimittels. [15]

Raman-mikrospektroskopische Ansätze kombiniert mit einer intelligenten Probenvor-

bereitung ebnen den Weg für zukünftige *Point-of-Care*-Tests sowie eine schnelle bettseitige Diagnostik.

Spektrale Histopathologie - intraoperative Tumordiagnostik

Aufgrund der weltweit stetig steigenden Zahl an Krebserkrankungen ist die Erforschung zuverlässiger Methoden zur Früherkennung, zum Monitoring sowie zur Behandlung von Krebs ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Kombination von linearen und nichtlinearen spektroskopischen Ansätzen für die Multi-Kontrast- und Multiparameter-Bildgebung großes Potential für die klinische Diagnostik und Therapie besitzen, um insbesondere den Herausforderungen der klinischen Pathologie zu begegnen [3,4,6].

Die Raman-Spektroskopie ermöglicht hierbei beispielsweise in Kombination mit innovativen chemometrischen Analyseverfahren eine markierungsfreie Unterscheidung zwischen normalen und zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) [16]. Besonders hervorzuheben ist, dass durch schnelles Scannen eines diffraktionsbegrenzten Spots über die Zelle und durch das kontinuierliche Erfassen des Raman-Spektrums die intrazelluläre Heterogenität einer Zelle überwunden werden kann und die resultierenden chemometrischen Modelle eine bessere und robustere Zellklassifizierung liefern. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass die spektrale Auflösung eines Raman-Spektrums nicht so entscheidend ist, um zwischen verschiedenen Zelltypen zu unterscheiden. Durch die 6-fache Reduzierung der spektralen Auflösung konnte eine Signalverstärkung um das 5-fache und dennoch eine zuverlässige Identifizierung einzelner Zellen erreicht werden [17].

Neben der Einzelzelldetektion gewann die Anwendung spektroskopischer Verfahren in den letzten Jahren für die Histopathologie zunehmend an Bedeutung. Im Folgenden wird das Potential der Raman-spektralen Histopathologie, d. h. die markierungsfreie spektroskopische Charakterisierung von Gewebeschnitten kurz vorgestellt. Die Realisierung einer markierungsfreien molekülspezifischen Bildgebung in Echtzeit ist entscheidend für die präzise chirurgische Führung und die intraoperative histopathologische Gewebeuntersuchung. Diese sind in der Lage konventionelle Färbemethoden zu ergänzen und somit die Arbeitsbelastung des Pathologen zu reduzieren. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der nichtlinearen multimodalen Bildgebung durch Kombination der drei markierungsfreien Modalitäten CARS

(kohärente *Anti-Stokes-Raman*-Streuung), TPEF (Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz) und SHG (*Second Harmonic Generation*). Dieser multimodale Ansatz kombiniert mit fortschrittlichen Bildverarbeitungsalgorithmen bietet die Möglichkeiten, intraoperative Standarduntersuchungen durch die Erzeugung multimodaler Bilder zu verbessern. Dabei wird die Gewebe-Morphologie und chemische Zusammensetzung von Biopsien mit signifikanter histopathologischer Information abgebildet, um z.B. Tumorränder zu bestimmen [18-23].

Darüber hinaus wird gezeigt, dass die multimodalen Bilder Informationen liefern, die mit Hilfe multivariater statistischer Verfahren in HE (Hämatoxylin und Eosin) Bilder übersetzt werden können [24]. Durch die rechnerische Erzeugung einer HE-Färbung, die zu Pseudo-HE-Übersichtsbildern führt, wird somit dem Pathologen ein bekanntes Werkzeug für die Auswertung der Gewebeschnitte gegeben. Zusätzlich werden jedoch durch die Raman-Spektroskopie molekulare Informationen über die Zusammensetzung der Gewebeschnitte erhalten. Dieser Ansatz wurde in ein kompaktes multimodales nichtlineares Mikroskop CARS / SHG / TPEF mit integrierten neuartigen Faserlaserquellen zur Verwendung in Kliniken übertragen [18]. Mit dem vorgestellten multimodalen Bildgebungs-Ansatz CARS / SHG / TPEF konnte somit das Potential für die gewebespezifische Laserchirurgie aufgezeigt werden. Der spezifische Nachweis von malignem Gewebe während der kurativen Operation ist die wichtigste Voraussetzung für eine vollständige Tumorentfernung. Um die Anwendbarkeit dieses multimodalen Bildgebungsverfahrens für das *In-vivo*-Gewebe-Screening von schwer zugänglichen Körperregionen weiter auszubauen, wurde die Entwicklung einer CARS-Imaging-Fasersonde maßgeblich vorangetrieben [25,26].

Insgesamt zeigen die vorgestellten Beispiele das große Potential der multimodalen nichtlinearen Bildgebung als Ergänzung zu den etablierten klinisch-pathologischen Diagnose-tools.

Danksagung

Der Europäischen Union über das Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitale Gesellschaft, der Thüringer Aufbaubank, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Carl-Zeiss-Stiftung wird für die finanzielle Unterstützung der Forschungsaktivitäten gedankt.

Literaturnachweis

- [1] Handbook of Biophotonics, Volume 2 "Photonics for Health Care", J. Popp, V.V. Tuchin, A. Chiou, S.H. Heinemann, eds. (Wiley-VCH, Weinheim, 2011).
- [2] Modern Techniques for Pathogen Detection, J. Popp, M. Bauer, eds (Wiley Blackwell, Weinheim, 2015).
- [3] N. Vogler, S. Heuke, T.W. Bocklitz, M. Schmitt, J. Popp, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8, 359-387 (2015).
- [4] *Ex-vivo and In-vivo Optical Molecular Pathology*, J. Popp, ed. (Wiley Blackwell, Weinheim, 2014).
- [5] K. Eberhard, C. Stiebing, C. Matthäus, M. Schmitt, J. Popp, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15, 773-787 (2015).
- [6] C. Krafft, I.W. Schie, T. Meyer, M. Schmitt, J. Popp, *Chem. Soc. Rev.* 45, 1819-1849 (2016).
- [7] S. Stöckel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, P. Rösch, J. Popp, *J. Raman Spectrosc* 47, 89-109 (2016).
- [8] S. Kloß, B. Kampe, S. Sachse, P. Rösch, E. Straube, W. Pfister, M. Kiehntopf, J. Popp, *Anal. Chem.* 85, 9610-9616 (2013).
- [9] S. Kloß, P. Rösch, W. Pfister, M. Kiehntopf and J. Popp, *Anal. Chem* 87, 937-943 (2015).
- [10] S. Kloß, B. Lorenz, P. Rösch, S. Dees, I. Labugger and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8333-8341 (2015).
- [11] S. Pahlow, S. Stöckel, S. Pollok, D. Cialla-May, P. Rösch, K. Weber, and J. Popp, *Anal. Chem.* 88, 1570-1577 (2016).
- [12] U. C. Schröder, A. Ramoji, U. Glaser, S. Sachse, C. Leiterer, A. Cszaki, U. Huebner, W. Fritzsche, W. Pfister, M. Bauer, J. Popp, U. Neugebauer, *Anal. Chem.* 85, 10717-10724 (2013).
- [13] U. Neugebauer, P. Rösch, J. Popp, *Int. J. Antimicrobial Agents* 46, S35-S39 (2015).
- [14] U. C. Schröder, C. Beleites, C. Assmann, U. Glaser, U. Hubner, W. Pfister, W. Fritzsche, J. Popp and U. Neugebauer, *Sci. Rep.* 5, 8217 (2015).
- [15] U-Ch. Schröder, J. Kirchhoff, U. Hübner, G. Mayer, U. Glaser, T. Henkel, W. Pfister, W. Fritzsche, J. Popp, U. Neugebauer, *J Biophotonics* 10, 1547-1557 (2017).
- [16] S. Dochow, C. Krafft, U. Neugebauer, T. Bocklitz, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, J. Popp, *Lab Chip*, 11, 1484-1490 (2011).
- [17] I.W. Schie, C. Krafft, J. Popp, *J. Biophoton.* DOI 10.1002/jbio.201600095 (2017).
- [18] T. Meyer, M. Chemnitz, M. Baumgartl, T. Gottschall, T. Pascher, C. Matthäus, B. F. M. Romeike, B. R. Brehm, J. Limpert, A. Tünnermann, M. Schmitt, B. Dietzek, J. Popp, *Anal. Chem.* 85, 6703-6715 (2013).
- [19] T. Meyer, M. Baumgartl, T. Gottschall, T. Pascher, A. Wuttig, C. Matthäus, B. F. M. Romeike, B. R. Brehm, J. Limpert, A. Tuennermann, O. Guntinas-Lichius, B. Dietzek, M. Schmitt, J. Popp, *Analyst*, 138, 4048-4057 (2013).
- [20] T. Meyer, O. Guntinas-Lichius, F. von Eggeling, G. Ernst, D. Akimov, M. Schmitt, B. Dietzek, J. Popp, *HEAD & NECK*, E280 (2013).
- [21] S. Heuke, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, F. Kluschke, H.-J. Röwert-Huber, J. Lademann, B. Dietzek, J. Popp, *British Journal of Dermatology*, 169, 794-803 (2013).
- [22] S. Heuke, O. Chernavskaya, T. Bocklitz, F. Bekele Legesse, T. Meyer, D. Akimov, O. Dirsch, G. Ernst, F. v. Eggeling, I. Petersen, O. Guntinas-Lichius, M. Schmitt, J. Popp, *HEAD & NECK*, 38, 1545-1552 (2016).
- [23] O. Chernavskaya, S. Heuke, M. Vieth, O. Friedrich, S. Schürmann, R. Atreya, A. Stallmach, M. F. N. M. Waldner, I. Petersen, M. Schmitt, T. Bocklitz, J. Popp, *Scientific Reports*, 6, 29239/1-11 (2016).
- [24] T. W. Bocklitz, F. S. Salah, N. Vogler, S. Heuke, O. Chernavskaya, C. Schmidt, M. J. Waldner, F. R. Greten, R. Bräuer, M. S4hmitt, A. Stallmach, I. Petersen, J. Popp, *BMC Cancer*, 16, 534/1-11 (2016).
- [25] A. Lukic, S. Dochow, O. Chernavskaya, I. Latka, C. Matthäus, A. Schwuchow, M. Schmitt, J. Popp, *J. Biophoton.* 9, 138-143 (2016).
- [26] A. Lukic, S. Dochow, H. Bae, G. Matz, I. Latka, B. Messerschmidt, M. Schmitt and J. Popp, *Optica* 4, 496-501 (2017).