

Schritt zur Klinikreife der Raman-Spektroskopie

Europäische Labore wollen Daten-Standards für Raman-spektroskopische Diagnostik schaffen.

■ Ist das Gewebe gesund oder krankhaft verändert? Wirkt das Antibiotikum gegen den Keim oder ist er dagegen resistent? Mithilfe der Raman-Spektroskopie lassen sich derartige Fragen schnell und präzise beantworten. Die Raman-Spektroskopie ist als nicht-invasive, Label-freie Technologie mit hoher Selektivität bekannt und wird daher zunehmend für biologische und biomedizinische Fragestellungen eingesetzt. Mithilfe dieses Verfahrens lässt sich ein molekularer Fingerabdruck der Probe gewinnen. Die Raman-Spektren enthalten die Schwingungsinformationen der Moleküle in einer Probe. Anhand des Fingerabdrucks lässt sich die biochemische Zusammensetzung der Probe ablesen und kann für verschiedene Anwendungen genutzt werden, zum Beispiel in der Forensik, der Diagnostik, der Stoffwechselforschung, der Mikrobiologie, der klinischen Pharmakologie und der Lebensmittelwissenschaft.

Gemein ist allen diesen Untersuchungen, dass zur Auswertung der Raman-Spektren datenwissenschaftliche Methoden, besonders chemometrische Techniken und Verfahren der künstlichen Intelligenz (KI), genutzt werden. Oft werden chemometrische Methoden oder maschinelle Lernmethoden, das heißt, spezielle KI-Modelle, konstruiert, um die Raman-Spektren in höhere Informationen im für die jeweilige Anwendung relevanten Zusammenhang zu übersetzen. Eine solche höhere Information kann zum Beispiel die Gruppenzugehörigkeit „gesund“/„krank“ sein, wenn es sich um eine diagnostische Anwendung handelt. Da die Modelle datengetrieben sind, ist die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Daten – also der Raman-Spektren – von großer Bedeutung für das Funktionieren der trainierten Modelle.

Vergleich der Raman-Spektren

Die meisten der genannten Raman-Untersuchungen befinden sich noch im Proof-of-Concept-Stadium und werden mit einem oder mehreren ähnlichen Raman-Spektrometern durchgeführt. Ebenso wie die Raman-Spektren den molekularen Fingerabdruck der Probe enthalten, enthalten sie allerdings auch intrinsische „Fingerabdrücke“ der jeweiligen Raman-Mess-Apparatur. So



Prof. Jürgen Popp (r.), Direktor des Leibniz-IPHT und Koordinator der COST Action „Raman4Clinics“, im Gespräch mit Priv.-Doz. Dr. Thomas Bocklitz, der am Leibniz-IPHT die Abteilung „Photonic Data Science“ leitet und die Auswertung des europäischen Laborvergleichs koordinierte.

(Foto: Sven Döring/ Leibniz-IPHT).

führt ein und dieselbe Probe zu nicht komplett identischen Raman-Spektren, wenn sie auf verschiedenen Messgeräten, unter verschiedenen Bedingungen oder zu verschiedenen Zeiten gemessen wird.

Subtile Unterschiede in der Raman-Apparatur können die Reproduzierbarkeit der Raman-spektroskopischen Signale minimieren. Dies verkompliziert einen quantitativen Vergleich von Raman-Spektren von verschiedenen Apparaturen und beeinträchtigt eine Apparatur-übergreifende Datenanalyse deutlich. Die Apparatur-Abhängigkeit hat sehr wahrscheinlich einen größeren Einfluss bei biologischen Anwendungen, da in diesen Anwendungen die spektralen Änderungen in der Probe sehr klein sein können und daher leichter maskiert werden. Wenn die Raman-Spektroskopie z. B. in der Klinik eingesetzt werden soll, ist es wahrscheinlich, dass ein oder mehrere „primäre“ Apparaturen eine große Datenbank mit Raman-Spektren z. B. einiger Krankheitszustände erzeugen. Diese Datenbank oder das daraus generierte Modell wird dann in verschiedenen Laboren in anderen Ein-

richtungen verwendet. Die Daten der „primären“ Apparatur oder das daraus generierte Modell werden nachfolgend genutzt, um die Daten der anderen „Replikat“-Einrichtung vorherzusagen. Wenn sich die Raman-Spektren der verschiedenen Einrichtungen, Labore oder Apparaturen signifikant unterscheiden, ist es jedoch wahrscheinlich, dass die trainierten Modelle die neu gemessenen Spektren und damit die entsprechenden Proben nicht korrekt vorhersagen können. Dieses Problem ließe sich lösen, indem individuelle Modelle für jede Apparatur erstellt werden. Dies allerdings ist in der Praxis nicht durchführbar, da diese (diagnostischen) Modelle ebenfalls Apparatur-abhängig wären. Auf vielen Anwendungsgebieten kann das Potential der Raman-Spektroskopie somit nur unzureichend ausgeschöpft werden.

DiResultate des Ring-Versuches

In Anbetracht all der genannten Herausforderungen ist die Apparatur-Abhängigkeit immer noch ein großes Problem und eine große Herausforderung

für die Anwendung der Raman-Spektroskopie in Real-world-Szenarien wie der klinischen Diagnostik.

Um diese analytische Herausforderung zu untersuchen, wurde ein Ring-Versuch (Interlabor-Test) mit Forschern aus etwa 50 europäischen Instituten entworfen, der im Rahmen der COST-Aktion „Raman4Clinics“ initiiert wurde. In diesem Test wurden technische Replikate der gleichen Proben an alle Partner geschickt und diese wurden mit den dort jeweils vorhandenen Raman-Apparaturen gemessen. Am Ende wurden die Daten von 35 Raman-Apparaturen aus 15 Instituten an ein einziges Labor zur einheitlichen Datenverarbeitung und -auswertung zurückgesandt.

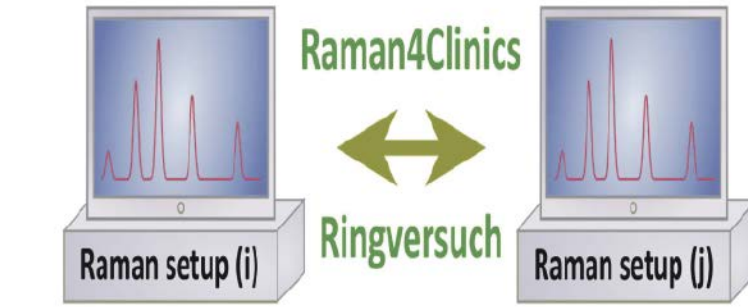
Die Vergleichbarkeit der Raman-Messgeräte wurde unter den Gesichtspunkten der Bandenpositionen, der Bandenintensitäten und der Bandenbreiten sowie des Rauschens in den Raman-Spektren bewertet. Das Konsortium konnte aufzeigen, dass es große Unterschiede zwischen den Laboren gab, und es wurden Empfehlungen für zukünftige laborübergreifende Studien formuliert.

Dieser Ringversuch soll den Grundstein dafür legen/die Möglichkeit schaffen, die Raman-Spektroskopie als bioanalytisches Protokoll für klinische Anwendungen einzusetzen.

Klinische Anwendung

Eine solche Anwendung erfordert eine behördliche Zertifizierung, bei der verschiedene Richtlinien eingehalten werden müssen wie z.B. die „Guideline on bioanalytical method validation“ der Europäischen Medizinagentur. Um den darin notierten Anforderungen an Genauigkeit und Präzision zu genügen, sind weitere Studien zur Datenübertragbarkeit von Raman-Spektren nötig.

Man hofft, dass der vorgestellte Ringversuch einheitlichere Bemühungen der Raman-Gemeinschaft auslöst, um eine Harmonisierung im Umgang mit der Geräte-Abhängigkeit



Konzeptionelle Veranschaulichung des Ringversuchs. Die gleichen Proben wurden mit unterschiedlichen Raman-Spektrometern vermessen und die Datenvergleichbarkeit wurde berechnet.

zu erreichen. Hierzu zählen offene zugängliche Methoden für die Setup-Standardisierung, Zertifizierung von Geräten und deren Daten und offene Datenformate. Konkret bedeutet dies: Hersteller und Wissenschaftler sollten die Kalibrierung des Spektrometers standardmäßig durchführen und die entsprechenden Software-Module als

Open Source zur Verfügung stellen. Dies ist ein praktikabler erster Schritt, um den Einfluss messtechnischer bedingter Effekte auf die Raman-Signale zu korrigieren. Entscheidend ist auch, dass sowohl Hersteller wie Forschende ihre Daten offen zugänglich machen. Wissenschaftler sollen ermutigt werden, aktiv zum Aufbau größerer Da-

tenbanken beizutragen. Dies wäre eine wertvolle Ressource, um maschinelle Lern-Modelle und chemometrische Verfahren zu erstellen, die tolerant gegenüber unerwünschten Abweichungen, wie sie zum Beispiel vom Messgerät resultieren, sind. Letztendlich soll dazu beigetragen werden, die Raman-Spektroskopie als zuverlässiges Werkzeug für Real-World-Anwendungen wie eine klinische Diagnostik zu etablieren, um so künftig das ganze Potential dieser leistungsstarken nicht-invasiven Methode auszuschöpfen. ■■

Autoren:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Bocklitz
Leibniz Institute of Photonic Technology (IPHT),
Jena und
Prof. Jürgen Popp,
Leibniz Institute of Photonic Technology (IPHT) und
Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of
Photonics (IPC), Friedrich-Schiller-University, Jena
www.leibniz-ipht.de/