

Aus dem Zentrum für Medizinische Forschung
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Gretz)

Krebserkennung durch multispektrale Gewebeuntersuchung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doctor scientiarum humanarum
(Dr. sc. hum.)
der
Medizinische Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Frank Braun

aus
Heidelberg
2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Norbert Gretz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zellmetabolismus und endogene Markersubstanzen in malignem Gewebe.....	3
1.2 Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Setup der multispektralen Gewebeanalytik	9
2.2 Aufbau des multispektralen Stichsensors zur <i>in-vivo</i> -Gewebeanalytik.....	11
2.3 Modellsystem flüssiges Gewebephantom	12
2.4 Auto-Streu-Korrektur	13
2.5 Tiermodell und Vorgehensweise	17
2.6 Bestimmung der Nadelposition mittels Ultraschall und Polymerfilament.....	17
2.7 Vorbehandlung der multispektralen Informationen	18
2.8 Multivariate Datenanalyse der spektralen Datensätze und Klassifikation der virtuellen Photometriedaten mittels PCA	19
2.9 Detektion von Blutgefäßen mittels VIS-Spektroskopie	23
2.10 Optiken für kontaktlose hochsensitive Raman- und Fluoreszenzmessungen	23
3. Ergebnisse	30
3.1 Ortung der Sonde.....	30
3.2 Detektion von Blutgefäßen als Funktionstest zum Erkennen von typischen Gewebestrukturen und Validierung der erreichbaren Messfrequenzen.....	33
3.3 Validierung der Relevanz der Sondensignale mittels UV/VIS Remissions- und Fluoreszenzspektroskopie.....	34
3.4 Einfluss der Gewebestreuung auf die Fluoreszenzemission von NADH	37
3.5 Algorithmus für quantitative Fluoreszenzmessungen durch Berücksichtigung einer Streulichtkorrektur im flüssigen Gewebephantom	37
3.6 Absorptions- und Streueigenschaften von Gewebe	41
3.7 <i>In-vitro</i> -Voruntersuchungen an Muskel- und Fettgewebe.....	42
3.8 Proof of Concept der multispektralen <i>in-vivo</i> -Klassifikation von gesundem und malignem Gewebe	44
3.9 <i>In-vivo</i> -Stichverlauf der fünf virtuellen photometrischen Sensoren.....	48

3.10 Evaluation der Raman-Sonde zur Messung von Stoffeigenschaften aus großen Abständen.....	51
3.11 Applikation und Evaluation der Sonde mit großer Brennweite durch Messungen bei verschiedenen Fensterdicken	51
4. Diskussion	67
4.1 Multispektralsensor zur UV/VIS-, NIR- und FL-Detektion.....	67
4.2 Fluoreszenz-Korrektur.....	72
4.3 Tiermodell	73
4.4 Hochsensitives, an die Applikation anpassbares Raman-Spektrometer	76
4.5 Sammeleffiziente Sonde für Raman-Messungen und Fluoreszenzmessungen aus hohen Abständen	79
4.6 Weitere Schritte im Optimierungsprozess des Sensors	81
5. Zusammenfassung.....	84
6. Quellenverzeichnis.....	86
7. Curriculum Vitae und Veröffentlichungen.....	95
8. Danksagung	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Setup für die multispektrale *in-vivo*-Gewebeanalyse. Der Aufbau besteht aus zwei Lichtquellen (UV-LED: NCSU 033B, Nichia, Tokushima, Japan; Halogenlampe: CLH 600, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und drei Spektrometern für die Detektion des Sekundärlichtes der einzelnen Spektralbereiche (MCS 621 VIS II; MCS611 NIR 2,2 μ ; MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

Abbildung 2: Im 30° Winkel angeschliffener Sondenkopf der Multispektralnadel mit geschärften Flanken für effizientes Gewebeeindringverhalten. Die in dichtester Kreispackung angeordneten Fasern innerhalb der 19-G-Kanüle sind frei wählbar. Die Abmessungen der Nadel und der optischen Fasern sind in der Abbildung unten links dargestellt.

Abbildung 3: Programmablaufplan zur Bestimmung der absoluten NADH-Konzentrationen für opake Systeme. Der Messbereich wird mit einem Trainingsset (schwarz), bestehend aus VIS- und Fluoreszenzmessungen, überspannt. Mit (1) VIS- und (2) Fluoreszenzmessungen (grau) werden Zwischenergebnisse (hellgrau) generiert und Unterprogramme (anthrazit) des Algorithmusses ausgeführt, die in der Absolutkonzentration von NADH (weiß) resultieren.

Abbildung 4: Vorverarbeitung der multispektralen Daten durch eine virtuelle Photometerumgebung und Klassifizierung der stark reduzierten Datenmenge in fünf Kanälen durch eine PCA-Klassifikation.

Abbildung 5: Matrixschreibweise der PCA.

Abbildung 6: Optischer Aufbau einer Raman-Sonde mit großer freier Gegenstandsweite, Abbildung nach [1].

Abbildung 7: Aufbau des auf Photonenfluss optimierten Raman-Spektrometers, Abbildung nach [2].

Abbildung 8: Synthese von 3-Piperidinopropionsäureethylester.

Abbildung 9: Messaufbau Kapillarmessung: (a) Schematischer Aufbau für Messungen in einer PFA-Kapillare; (b) Beispielbild des Zweiphasenstroms mit Lasereintritt und Laseraustritt, Abbildung nach [2].

Abbildung 10: Ultraschall-Tracking der Kanülenposition. Die Bilder, die mit 1 und 2 bezeichnet sind, zeigen die optische Stichsonde und deren typische echogenen Metallreflexe zur Lokalisation an verschiedenen Positionen: vor dem Eindringen in den Tumor (Position 1) und in der Endposition (Position 2).

Abbildung 11: Raumaufteilung während der Magnetresonanztomographie bei simultaner, multispektraler Gewebe *in-vivo*-Gewebemessung. Der Stichsensor besteht vollständig aus MRT-kompatiblen Materialien (Nitinol / Polymer und Faseroptik). Der MRT-Raum ist mit einem Faraday'schen-Käfig (links) ausgestattet und schützt so das Messequipment vor elektromagnetischer Strahlung. Die Verbindung der Sonde mit den Lichtquellen erfolgt via Lichtwellenleiter über eine Wanddurchführung, Abbildung nach [3].

Abbildung 12: MRT-Lagebestimmung der multispektralen Nadelsonde. Die Nitinolsonde (die durch den roten Pfeil im oberen linken Bild dargestellt und deren Position durch den roten Kreis in Bild 1 hervorgehoben wird) ist klar in den MRT-Schnitten erkennbar. Die MRT-Schnitte 1 bis 8 zeigen die Stichsonde und die typischen Nitinolartefakte, die mit der Nadel an verschiedenen Positionen in der Abbildungsebene beobachtet, Abbildung nach [3].

Abbildung 13: (a) Intensitätsspektren der spektral aufgelösten Rückstreuung über den Messzeitraum (Rohdaten) zur Veranschaulichung der Effekte im für die Blutdetektion relevanten grünen Spektralbereich. (b) Zeitlicher Intensitätsverlauf bei der Wellenlänge 579 nm. Die Blutdruckamplitude mit systolischen (minimaler Intensitätswert) und diastolischen Werten (maximaler Intensitätswert) ist deutlich erkennbar. Der durch die Referenzmethode ermittelte Puls von 120 Schlägen/Minute wird durch diese Messtechnik bestätigt.

Abbildung 14: Intensitätsspektrum der UV-LED bei einer Wellenlänge von 365 nm, Absorptionsspektren von NADH und NC (gestrichelte Linien) und Pseudoabsorptionsspektrum der lichtstreuenden Suspension Calcilit 4 (gepunktete Linie), Fluoreszenzintensitätsspektrum von NADH (durchgezogene Linie), Abbildung nach [3].

Abbildung 15: (a) Intensitätsspektren im Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm für eine Suspension von 2,7 Gew.-% Calcilit (schwarze Kurve) und Suspensionen mit verschiedenen NC-Konzentrationen (rote Kurven). (b) Absorptionsspektren von Suspensionen, die NC, Wasser und Calcilit im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm enthalten, wobei das Intensitätsspektrum unter Rückstreuung (2,7 Gew.-% Calcilit) als Referenz dient [3].

Abbildung 16: Die Absorptionsspektren von Hämoglobin (gestrichelte Linie) und Wasser (durchgezogene Linie) rahmen das optische Fenster ein, Abbildung nach [3].

Abbildung 17: (a) Fluoreszenzemissionsspektren $C_{\text{NADH}} = 2.0 \text{ mmol/l}$ mit unterschiedlichen Calcilit-Konzentrationen. Die FL-Emission nimmt zu, wenn die Calcilit-Konzentration von 2,4 Gew.-% (durchgezogene Linie) auf 2,7 Gew.-% (gestrichelte Linie) und dann auf 3,0 Gew.-% (gestrichelte Linie) ansteigt. Rechts unten: Intensität der Fluoreszenzemissionsspektren zwischen 465 und 850 nm einer Suspension $C_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol/l}$ und verschiedenen Calcilit-Konzentrationen. (b) VIS-Rückstreuungsspektren zwischen 200 und 1000 nm. Links unten: Integrationsbereich einer Suspension von 600 bis 940 nm ($C_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol/l}$ und verschiedenen Calcilit-Konzentrationen). Die NADH-Konzentrationen wurden im Bereich von 0 bis 2,0 mmol/l variiert (Schrittweite 0,2 mmol/l), Abbildung nach [3].

Abbildung 18: (a) Vergleich der vorhergesagten FL-Emissionsintensitäten bei 465 nm (durchgezogene Linie) und gemessenen, (gestrichelte und gepunktete Linien) in einem NADH-Konzentrationsbereich von 0 mmol/l und 2.0 mmol/l. Die NADH-Konzentrationen entsprechen 2,4 Gew.-% und 3,0 Gew.-% der Gesamtmasse, Calcilit in verschiedenen Konzentrationen wird verwendet, um den experimentellen Streubereich zu definieren. Ein Testset wird bei 2,7 Gew.-% Calcilit gewählt, um die vorhergesagten und gemessenen NADH-Konzentrationen miteinander zu vergleichen und die Leistungsfähigkeit zu ermitteln. Links oben: prognostizierte gegen wahre NADH-Konzentration. (b) Gemessene Emissionsintensitäten bei 465 nm unter Verwendung von 2,4 Gew.-%, 2,7 Gew.-% und 3,0 Gew.-% Calcilit- und NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 2,0 mmol/l. Die verschiedenen unabhängigen Messreihen ($n = 4$) unterscheiden sich durch die verschiedenen Graustufen in den Spalten, Abbildung nach [3].

Abbildung 19: Simultan erzeugte UV/VIS-NIR-Absorptionsspektren von Muskel- und Fettgewebe unter Verwendung der multispektralen Stichsonde. Die Streueigenschaften sowie die Hauptabsorber (Hämoglobin, Wasser, Fett) können direkt erfasst werden. Das optische Fenster zwischen oxy-Hämoglobin und Wasser ist oben links dargestellt. Die vorhergesagten Gewebefarben sind unter den Fotos links dargestellt.

Abbildung 20: a) Exemplarisch sind in-vivo-Absorptionsspektren (UV/VIS, NIR und FL) zur Darstellung der Absorptions-, Streu- und Emissionseigenschaften der einzelnen Gewebeklassen dargestellt. b) Unter Verwendung einer 2D-Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist die Klassifikation in einem Score-Plot dargestellt. Die Gewichtung der Informationsgehalte der virtuellen Sensoren enthält der Loading-Plot.

Abbildung 21: Auto-FL-Signal im Verlauf eines Durchstiches.

Abbildung 22: Sekundärsignal der Fettsäuren im Verlauf des Durchstiches.

Abbildung 23: Auftragung der Deoxy-Hb- und der Gesamt-Hb-Absorption über den Stichweg startend von malignem Gewebe in gesundes subkutanes Gewebe vordringend.

Abbildung 24: Absorption der elastischen Rayleigh-Streuung im Wellenlängenbereich des ersten optischen Fensters.

Abbildung 25: Messaufbau zur Raman-Messung durch ein 15 mm Borosilikatglasfenster (orthogonale Anordnung Fenster und Sondensystem), Abbildung nach [1].

Abbildung 26: Raman-Spektren von Ethanol inklusive Referenz durch ein 15 mm dickes Borosilikatglasfenster mit dem langreichweitigen Sondensystem (Brennweite 25,4 mm, Integrationszeit 8 s, Akkumulation = 1), Abbildung nach [1].

Abbildung 27: Peakhöhe bei 880 cm^{-1} (843,25 nm), hervorgerufen durch Stokes-Raman-Streuung in Ethanol bei Variation der Integrationszeit und Laserleistung. Alle Messungen wurden mit der zölligen Weit-Apertur-Optik durchgeführt, Abbildung nach [1].

Abbildung 28: Sekundärlichtantwort (Fluoreszenzemission und Raman-Streuung) von Ethanol nach Anregung mit zölliger Optik (Brennweite: 25,4 mm) durch verschiedene Fensterdicken und im Vergleich dazu eine 2-Zoll-Fresnel-Optik (Brennweite 32 mm), beide bei einer Integrationszeit von 10s und einer Akkumulation von 1, Abbildung nach [1].

Abbildung 29: Schnittansicht der kontaktlosen Raman-Inline-Überwachung eines Borosilikatglas-Fermenters. Ein Linearsystem, ausgelegt als Gleitführung mit Arretierung, ermöglicht eine Variation des Sondenabstandes zum Reaktor und damit der Penetrationstiefe von Primär- und Sekundärlicht, Abbildung nach [4].

Abbildung 30: Substratabbau von Glucose und Aufbau des Produktes Ethanol der aeroben Batch-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* durch von außen den Mantel durchdringende, Raman-Messung im Vergleich zur HPLC-Analytik, Abbildung nach [4].

Abbildung 31: Unterschied der Raman-Intensitäten zwischen 1012 und 1863 cm^{-1} (562,27 und 590,53 nm) (a) Raman-Spektren A und B aus Messungen in den jeweiligen Phasensegmenten – markierte Positionen (b). Die zyklischen Messungen wurden mit einer Integrationszeit von 50 ms bei einer Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit von 0,2 cm/s durchgeführt, Abbildung nach [2].

Abbildung 32: Raman-Intensitätsdifferenz zwischen 1012 und 1863 cm^{-1} (562,27 und 590,53 nm) (a) Raman-Spektren A und B aus Messungen in beiden Phasensegmenten (b) Zyklische Messungen mit einer Abtastrate von 333 Hz und einer Fluidströmungsgeschwindigkeit von 9,0 cm/s – Positionen markiert, Abbildung nach [2].

Abbildung 33: Spektren von Ethylacrylat bei unterschiedlichen Auflösungen, unterschiedlichen Anregungswellenlängen, Intensitäten, Faserdurchmessern und Integrationszeiten. Mit einer Rückstreusonde (a: 532 nm; 7 mW; 400 μ m; 1000 ms), einer koaxialen Raman-Sonde (b: 532 nm; 300 mW; 200 μ m; 2500 ms) und einer koaxialen Raman-Sonde auf einem MultiSpec-Raman-System der tec5 AG (c: 785 nm; 500 mW; 600 μ m; m; 10 s), Abbildung nach [2].

Abbildung 34: Verfolgung des Ethylacrylat-Umsatzes mittels Raman-Spektroskopie (Anregungsleistung: 7 mW) im Vergleich zum kinetischen Modell. Mittelwerte aus fünf aufeinanderfolgenden Experimenten werden zusammen mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt, Abbildung nach [2].

Abbildung 35: Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR), berechnet aus Raman-Spektren von Ethylacrylat in Wasser und bestimmt bei unterschiedlichen Konzentrationen aus 20 Spektren mit jeweils 4 s Erfassungszeit, Abbildung nach [2].

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spektroskopische Techniken und optische Einflüsse/Informationen auf die Messung.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aq	wässrig (aqueous)
ArA	Arterienalter (engl. arterial age)
ATEX	AT mosphères Exp losibles, Richtlinie des Explosionsschutzes
ATP	Adenosintriphosphat
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CAD	computer-aided design
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. Charge-Coupled Device)
CE	CE-Kennzeichnung: Der Innverkehrbringer erklärt gemäß EU-Verordnung 765/2008, dass sein Produkt den geltenden Anforderungen genügt.
CHO-Zellen	immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (<i>Cricetulus griseus</i>)
CIE	Internationaler Beleuchtungskommission
DIN	Deutsche Industrie Norm
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (engl. formalin-fixed paraffin-embedded tissue oder formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue)
FFT	Fourier-Transformation
FL	Fluoreszenz
FWHM	spektrale Halbwertsbreite (engl. Full width at Half Maximum)
Hb	Hämoglobin

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
KVP	kontinuierlichen Verbesserungsprozess
LED	Leuchtdiode (engl. Light Emitting Diode)
MC	Messkanäle
MIR	Mittelinfrarot
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	numerische Apertur
NADH	Nicotinamidadenindinucleotidhydrat
NC	New Coccine
NIH	National Institutes of Health
NIPALS	Nonlinear Iterative Partial Least Square-Algorithm
NIR	Nahinfrarot
NiTi	Nitinol
OD	optischen Dichte
OH	Hydroxygruppe
Pap-Test	Papanicolaou-Test
PAT	Prozess-Analyse-Technologie
PCA	chemometrische Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis)
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PN	Druckstufe
PpIX	Protoporphyrin IX
RC	Referenzkanäle
RGB	Rot/Grün/Blau

RMSEP	mittlerer quadratischer Fehler (engl. Root-mean-square deviation)
SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy
SMA	SubMiniature-Version A
SMART	Specific Measurable Achievable Reasonable Time Bound
SPF-NMRI-Maus	spezifisch, pathogenfreie - sehr anfällige Maus für jede Art der Ansteckung
TNM-Klassifikation	Tumor Nodus Metastasen – Klassifikation
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar

1. Einleitung

Die International Agency for Research on Cancer schätzt, dass im Jahr 2012 14,1 Millionen neue Krebsfälle auftraten und mehr als 8 Millionen Menschen an Krebs starben. Dies ist die weltweit zweithäufigste Todesursache [5].

Basierend auf den Schätzungen der Vereinten Nationen unter Berücksichtigung der demografischen Entwicklung prognostizierten Bray et al., dass im Jahre 2030 22,2 Millionen neue Krebsfälle auftreten werden [6]. Um sich diesem Trend entgegenzustellen, gilt es, das Auftreten von Krebserkrankungen durch Prävention zu verhindern, indem man Risikofaktoren vermeidet oder diesen entgegenwirkt, zum Beispiel mithilfe von gesunder Ernährung und Bewegung oder auch durch Minimierung von ultravioletter und radioaktiver Strahlenbelastung, durch Konsum von Drogen und Alkohol sowie vieles mehr. Besonders wichtig ist auch die möglichst frühe Erkennung von Krebserkrankungen.

Die Herausforderung besteht darin, die maligne Neoplasie in der frühen Phase zu diagnostizieren, um die Heilungschancen zu erhöhen. Es werden viele Anstrengungen unternommen, die Analytik von Gewebeveränderungen weiterzuentwickeln, neue Verfahren zu etablieren und diese in den kontinuierlichen Verbesserungsprozess (KVP) der medizinischen Versorgung zu integrieren. Klassische Diagnosemethoden reichen von Palpation, bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT), Szintigraphie oder Computertomographie bis hin zur Biopsie.

Bis heute sind Biopsietechniken, basierend auf mikroskopischen Bildern von Gewebeschnitten in einem Labor mit anschließender Interpretation durch einen Pathologen, der „Goldstandard“ bei der Diagnose von Gewebeveränderungen [7,8]. Dieses Standardverfahren wird vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) kritisiert, da beispielsweise bei Brustbiopsien fast 50% der 35.000 jährlich in Deutschland untersuchten Frauen keine Krebserkrankung (Mammakarzinom) aufweisen [9]. Eine Pre-Selektion könnte hierbei die Auswahl unterstützen. Die Biopsie-Prozedur gehört zu den am häufigsten durchgeführten klinischen Eingriffen in Deutschland [10].

In Kombination mit der pathologischen Befundung gilt sie als anerkannt und etabliert. Aktuell gibt es für eine Biopsie mit nachfolgender mikroskopischer und pathologischer Befundung keine alternative Methode. Der Pathologe stellt die Art der Erkrankung und deren Schweregrad fest. Insbesondere bei der Klassifikation von Tumoren in gut- oder bösartig sowie bezüglich der Prognosefaktoren (TNM-Klassifikation) ist der Pathologe

gefragt. Die histopathologische Untersuchung per Mikroskop erfolgt nicht automatisiert, sondern zeit- und kostenintensiv von Hand.

Optische Spektroskopie in der Gewebeanalyse

Als unterstützendes Werkzeug der Biopsie bietet die optische Spektroskopie Vorteile als minimal-invasives Instrument. Die optische Messtechnik ist in der Lage, konkrete und abstrakte Vorabinformationen über den Gewebezustand *in-vivo* in Echtzeit bereitzustellen und benötigt kein Verbrauchsmaterial und wenig Personal.

Seit den 1990er-Jahren arbeiten vermehrt Forschungsgruppen im Bereich Krebsdiagnostik mit optischen Spektroskopietechniken. Im Folgenden wird ein kleiner Auszug über den Stand der jeweiligen Entwicklungen gegeben:

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Probenvorbereitung zu. Diese reicht von gekühlten, schockgefrorenen [11,12], formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) [13] Abschnitten bis hin zu nicht fixiertem, gefrorenem oder frischem Gewebe [13]. Ebenso ist auch das Anwendungsfeld der verschiedenen Spektroskopietechniken sehr breit gefächert. Die Raman-Spektroskopie wird beispielsweise von vielen Forschungsgruppen genutzt, z. B. zum Nachweis fibrösen Gewebes [14,15] oder zur Unterscheidung zwischen normalem Gewebe sowie benignen und malignen Tumoren im Darm [16]. Hierbei werden die Proben *ex-vivo* nach der Biopsie ohne weitere Vorbereitung untersucht. Die Klassifikation von Lungenkarzinomen und Normalgewebe [17], der Nachweis von Plattenepithelkarzinomen in der Halskopffregion [18] und Speiseröhrenkrebs [19] sind weitere Beispiele für den Einsatz der Raman-Spektroskopie.

Der Nachweis von Pankreas- sowie kolorektalem Karzinomen in frischen Biopsien ohne Nachbehandlung wurde mittels Nahinfrarot (NIR)-Spektroskopie durchgeführt [20,21]. Alle beispielhaften Untersuchungen wurden *ex-vivo* durchgeführt.

Die Mittelinfrarot (MIR)-Spektroskopie, oft auch als komplementär zur Raman-Spektroskopie angesehen, ist ein leistungsfähiges Werkzeug in den Bereichen Arteriosklerose und Leukämie sowie bei Hirntumoren, Arthritis und Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) [22]. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist der Nachweis von Krebsvorläufern bei der zervikalen Dysplasie als Ersatz für den sogenannten Papanicolaou-Test (Pap-Test), der gebräuchliche Ausdruck für den vaginalen Zytologie-Abstrich (Färbungsmethode von Zellen und deren Beurteilung auf Malignität). Diese Pap-Analyse wird mittels optischen Sonde *in-vivo* durchgeführt [23].

Die genannten Klassifizierungen und Analysen basieren hauptsächlich auf der Bestimmung der Gewebezusammensetzung und deren Bestandteilen wie beispielsweise Wasser [24], Fett [25,26], Kollagen [27,28] oder Hämoglobin (Hb) [29]. Der Gehalt des roten Blutpigments Hb ist ein wichtiger Marker in der Krebsdiagnose, der durch *in-vivo* faseroptische Spektroskopie in beiden Formen, oxy- und deoxy-Hb, feststellbar ist. Durch den Nachweis der beiden Hb-Formen erweisen sich Aussagen zur Sauerstoffsättigung oder zum Sauerstoffbedarf des Gewebes als aussagekräftige Größen [30].

1.1 Zellmetabolismus und endogene Markersubstanzen in malignem Gewebe

Solide Tumore sind auf ein wachsendes Kapillarnetzwerk (tumorinduzierte Angiogenese) angewiesen. Nur durch Neubildung von Blutgefäßen kann der Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und das Wachstum jenseits eines Volumens von 1 bis 2 mm³ erreicht werden. Ohne gesteigerte Gefäßneubildung zur Versorgung des wachsenden Tumors beschränkt sich die nicht angiogenetische Neoplasie auf eine symptomlose und nicht klinisch relevante Größe [31]. Die Ergebnisse von Chen et al. zeigen, dass bei jedem Patienten der durchschnittliche Hämoglobin(Hb)-Gehalt in einem Hirntumor in Relation größer ist als der durchschnittliche Gehalt, der in einem normalen Kortex gemessen wird. In einem Durchschnittswert von sechs Patienten erhielt man $0,37 \pm 0,18$ g/dl im normalen Kortex und $0,99 \pm 0,57$ g/dl im Tumorgewebe [32]. Da Hb ein starker Absorber im Visuellen und Nahinfraroten ist, werden die Spektraldaten als Referenz für den Blutfluss herangezogen: je höher die Konzentration, desto höher die Durchblutung des Gewebes [33]. Zur Ermittlung der Bindegewebskonzentration erweist sich ein Spektralbereich mit geringer Extinktion im "optischen Fenster des Gewebes" [3,34] zielführend, indem elastische Lichtstreuungstechniken zum Einsatz kommen [3]. Neben den zuvor genannten spektroskopischen Methoden wird die Fluoreszenz(FL)-Diagnostik zur Erkennung von Haut- [35], Blasen- [36], Lungen- [37] und Gebärmutterhalskrebs [38] eingesetzt. Diese Techniken basieren auf den unterschiedlichen natürlichen endogenen Markersubstanzen [39] und deren unterschiedlichen Zusammensetzung in gesundem und krankem Gewebe. Der Fluorophor Nicotinamidadenindinucleotidhydrat (NADH) ist ein signifikanter endogener Marker [40–42]. Nahezu alle Stoffwechsellzyme benötigen NADH als Coenzym. Dieses wird kontinuierlich insbesondere im Zitronensäurezyklus produziert. NADH ist ein Indikator für den Zellmetabolismus und

gilt als Maß für den Redoxzustand sowie für Sauerstoffmangel und Störungen der Atmungskette [43,44]. Einen Anstieg der NADH-Konzentration und somit dessen FL deutet auf eine verminderte Gewebsaktivität und einen damit einhergehenden niedrigeren NADH-Verbrauch hin [45]. Im Gegensatz dazu verweist eine verringerte Konzentration im Gewebe auch auf eine Zunahme der metabolischen Zellaktivität und einen hohen Verbrauch [46].

Diesen Sachverhalt macht man sich im Allgemeinen für die Tumorlokalisierung zunutze, da tumoröses Gewebe im Vergleich zu normalem Gewebe eine reduzierte FL-Emission aufweist [38]. Zusätzlich kann die FL-Spektroskopie mit diffuser Reflexion kombiniert als Nachweis der Vorläufer von Gebärmutterhalskrebs *in-vivo* eingesetzt werden [47]. Eine spektroskopiebasierte Endoskopie zur Diagnose von Darmkrebs verwendet als Marker Fluorophor Protoporphyrin IX (PpIX), der sich im malignen Gewebe anreichert [48].

Kompensation von Matrixeffekten in der Fluorezenzspektroskopie

Das hohe Potenzial der einzelnen optischen Spektroskopie-Techniken durch Erkennung von unterschiedlichen endogenen und exogenen Markersubstanzen in verschiedenen Applikationen und Anwendungsfeldern legt den Gedanken nahe, ein generalistisches Messsystem aufzubauen. Hierzu werden mehrere spektrale Methoden in einem multispektralen *in-vivo*-Messsystem, das eine stichoptimierter Sonde beinhaltet, kombiniert. Diese Technik ermöglicht neue Lösungsansätze in der Auswertung der spektralen Daten, da die Matrixeinflüsse in unabhängigen Kanälen erfasst und hierdurch die Zielgröße korrigiert werden kann. Interessant ist dies vor allem bei der Bestimmung des endogenen Markers NADH. Die Anregung der Fluoreszenzemission mittels Primärlicht erfolgt aus dem am niedrigsten angeregten elektronischen Zustand s_1 nach der Kasha-Regel [49]. Folglich wird das Sekundärlicht der Fluoreszenzemission immer langwelliger als die des Anregungslichts re-emittiert. Diese Wellenlängenverschiebung, hin zu energieärmeren Wellenlängen, wird Stokes-Shift [49] genannt. Sowohl der Primär- als auch der Sekundärlichtpfad sind anfällig für Matrixeinflüsse (Streu- und Absorptionseinflüsse). Diese sind aufgrund der Inhomogenität des menschlichen Körpers an unterschiedlichen Orten nicht gleich und beeinflussen die Fluoreszenzmessung. Die Streu- und Absorptionseigenschaften des Gewebes hängen hauptsächlich von den Zellstrukturen und insbesondere vom Hämoglobin und vom Wasser ab. Diese Stoffe und die morphologischen

Eigenschaften verstärken oder hemmen das detektierbare Fluoreszenzsignal. Es kommt zu ungenauen Fluoreszenzemissionsmessungen und folglich zu falschen Konzentrationen.

Für diesen Sachverhalt greifen viele Methoden zur Korrektur von Fluoreszenzemissionsspektren, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Komplexität und Verwendbarkeit erheblich unterscheiden [50]. Die verbreitetsten Verfahren basieren auf Verhältnistechniken und beinhalten Quotienten von gemessenen Fluoreszenzsignalen durch Reflexionsgrade in entsprechenden Wellenlängenfenstern [50]. Finlay et al. [51] haben eine von Wu et al. [52] entwickelte Methode weiterentwickelt, bei der ein Korrekturfaktor auf der Grundlage der Emissionswellenlänge Anwendung findet. Dieser Ansatz wurde von Hull et al. [53] weiter verallgemeinert: durch Verwendung experimentell bestimmter Korrekturfaktoren, die sowohl die Emissionswellenlänge als auch die Anregungswellenlänge betreffen. Middelburg et al. erarbeiteten eine Methode, die eine spezielle Sondengeometrie unter Verwendung mehrerer Einzelfasern zur Variation der Weglänge des im Medium gestreuten Lichtes anwendet [54]. Eine Monofaser-Reflexionssonde ist in der Lage, die Absorptionskoeffizienten von Gewebeproben zu extrahieren [55]. Mehrere Fasern mit verschiedenen Durchmessern können verwendet werden, um Phasenfunktionen und reduzierte Streukoeffizienten zu messen [56,57]. Mit der kontinuierlichen Leistungssteigerung von Computersystemen ist es möglich, rechenintensive Monte-Carlo-Simulationen zur Korrektur von Fluoreszenzmessungen anzuwenden [58,59]. In Kombination mit komplexen Anpassungsalgorithmen, die auf der Forward-Adjoint-Theorie der Fluoreszenz basieren, ist es zudem möglich, die optischen Eigenschaften von Gewebeproben aus ihren Reflexionsspektren zu ermitteln und zur Korrektur ihrer Fluoreszenzemissionsspektren einzusetzen. Dies erfordert ein Gewebemodell, das Absorber und Streuer sowie allgemeine Kenntnisse der Konzentration enthält [60].

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger Algorithmus zur quantitativen FL-Messung unter Einsatz einer neuartigen Sonde präsentiert. Diese maßgeschneiderte, im Stichverhalten optimierte Ultraschall- und MRT-kompatible, multispektrale Nitinolsonde wurde für *in-vivo*-Messungen entwickelt [61]. Die Kombination von Fasern mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften ermöglicht die Durchführung verschiedener spektroskopischer Techniken: ultraviolette (UV), visuelle (VIS), Nahinfrarot (NIR)- und Fluoreszenzmessungen.

Hierdurch ist der gewonnene spektrale Informationsgehalt höher und liefert wichtige zusätzliche Informationen, die zur Korrektur von Matrixeinflüssen hilfreich sind.

Entwickelte *in-vivo* und kontaktlose Messsysteme

Die vorgestellten Techniken kommen der Vision "Fusion von *in-vivo*- und *in-vitro*-Analytik" nahe und sind in der Lage, die „ePathology“ um wichtige Applikationen zu ergänzen: Erste Gewebeeigenschaften und Informationen zur Vorauswahl der Biopsate sind während der Operation/Prozedur verfügbar. Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Sonde zur *in-vivo*-Vorauswahl. Verschiedene Sondenkonzepte und ein auf Photonenfluss optimiertes Spektrometer werden für das mögliche Einsatzfeld der *in-vitro*-Gewebe-, aber auch Zellkultur-Analytik entwickelt:

- koaxialer Raman-Sondenaufbau mit langer Brennweite
- koaxialer Raman-Sondenaufbau mit Fresnel-Optik zur Erhöhung von Brennweite und Sammeleffizienz
- Spektrometer mit optimiertem Photonenfluss in Kombination mit einer Rückstreuersonde (Proof of concept: Raman-Implementierung in Stich-Sonde) – wenig Energieeintrag und hohe Sammeleffizienz

Diese Sondenkonzepte beruhen auf der Raman-Technik. Dies liegt darin begründet, da die in die Nadel bereits implementierten Techniken entscheidend durch diese Technik ergänzt werden können. Auf physikalischer Ebene handelt es sich bei NIR-, MIR- und Raman-Spektroskopie um Schwingungsspektroskopietechniken, bei ultravioletter und visueller Spektroskopie um Elektronenabsorptionsspektroskopie. Die Nachweisgrenzen der MIR-Spektroskopie liegt in der Größenordnung von 100 ppm (0,01 Gew.-%), in der NIR-Spektroskopie bei ca. 1000 ppm (0,1 Gew.-%) [62,63] und in der Raman-Spektroskopie unter Laborbedigungen bei 0,8 mmol/l [2].

Von den besagten Techniken besitzt die MIR- und Raman-Technologie durch Anregung der Grundschnwingungen die höchste molekulspezifische Selektivität. Bei der zur MIR-Technologie komplementären Raman-Spektroskopie wird die eingestrahlte monochromatische Laserwellenlänge um die Anregungsenergie einer Molekülschwingung langwellig verschoben. Die Frequenzunterschiede zum eingestrahlten Licht entsprechen den molekülcharakteristischen Energien von Rotations-, Schwingungs-, Phonon- oder Spin-Flip-Prozessen.

Der Grund liegt in einer Wechselwirkung des Lichtes mit der Materie, dem sogenannten Raman-Effekt, bei dem Energie vom Licht auf die Materie übertragen

wird („Stokes-Seite“ des Spektrums) bzw. Energie von der Materie auf das Licht („Anti-Stokes-Seite“ des Spektrums) [64–66].

Die Marktdurchdringung der Raman-Spektroskopie hat in den letzten Jahren sowohl in der Prozessanalysetechnik als auch in der Laboranalytik zugenommen. Dies liegt vor allem an der nichtinvasiven Technik über dem gleichen optischen Pfad für Primär- und Sekundärlicht. Es muss keine Transmissionsstrecke oder eine Reflexionssonde, die auf Streueignisse angewiesen ist, wie diese in der klassischen Absorptionsspektroskopie gebräuchlich ist, aufgebaut werden. Selektive, chemische Informationen in Prozesseinheiten, Produktionslinien, Zellkulturen und Gewebe sind ohne Probenvorbereitung adressierbar. Konzentrationsprofile von Reaktanten und Produkten in Mikrokanälen wurden mittels konfokaler Raman-Mikroskopie mit hoher räumlicher Auflösung ($<10\ \mu\text{m}$) aufgenommen [67,68]. Eine hohe Selektivität bei gleichzeitig niedriger Absorption des Wassermoleküls prädestiniert die Raman-Spektroskopie (mit 785 nm Anregung) für die Kontrolle in der pharmazeutischen/chemischen Industrie [69,70] und in der Biotechnologie [4,71,72]. Die Raman-Spektroskopie kombiniert also die hohe chemische Spezifität des MIR-Bereichs mit dem für die Applikationen wichtigen Einsatz von VIS/NIR-Lichtleitern aus Quarz [62,73]. Der Einsatz konventioneller Lichtwellenleiter ist dadurch möglich, dass die Anregungswellenlänge des Lasers frei gewählt werden kann. Die Nutzung von Lichtleitern zur optischen Kopplung gewährleistet eine räumliche Trennung von Primärlichtquelle und Spektrometer/Detektoren vom Messort: sei es die Verfolgung von chemischen und biotechnologischen Prozessen mit Immersionssonden, d. h. direkter Kontakt zum Medium [74] oder die hier vorgestellten Sonden, die kontaklos die Probe analysieren können.

Speziell im exploratorischen Bereich ergeben sich Vorteile des kontaklosen Messens:

- Vermeidung von (Kreuz-) Kontamination, da keine Sonde in Behältnisse eingeführt werden oder in Kontakt mit der Probe kommen
- keine besondere Materialwahl für aggressive Medien oder Autoklavierung notwendig (z. B. Hastelloy-Stahl, Tantal oder Keramik)
- Wartungen bzw. Justagearbeiten der Sonde sind von außerhalb des Reaktors möglich

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es eine kontinuierliche, optische *in-vivo*-Messung zur Detektion und Lokalisation cancerogenen Gewebes zu entwickeln. Hierbei soll ein System entwickelt werden, das mehrere Spektroskopietechniken (UV/VIS, NIR und Fluoreszenz) miteinander vereint. Die zu entwickelnde Sonde muss in der Lage sein effizient in Gewebe einstechen zu können. Die gewonnenen multispektralen Informationen sollen über chemometrische Methoden ausgewertet werden. Durch die innovative „point of care“ Messtechnik wird der behandelnde Arzt schon während einer Biopsie visuell über den aktuellen, lokalen Gewebezustand, an dem sich die Nadelspitze befindet, informiert. Hierbei sind zielgerichtete Gewebeentnahmen möglich. Bei dem entwickelten Instrument handelt es sich um ein Onlinesystem. Der komplette Stichweg der Biopsie wird optisch verfolgt, d.h. dem Arzt liegen die Daten des kompletten Weges zur Befunderstellung vor. Die Diagnostik des zu untersuchenden Organs wird repräsentativer. Der Arzt muss sich nicht mehr nur auf die Histopathologie verlassen. Die diagnostische Treffsicherheit wird durch zielgerichtete Biopsientnahme erhöht. Vorabuntersuchungen sollen zeigen ob es möglich ist die Raman-Spektroskopie in die Prozesskette als *in-vitro*-Werkzeug zu integrieren. Hierbei soll die notwendige Anregungsleistung gesenkt, aber die Nachweisempfindlichkeit und die maximale Abtastrate gesteigert werden. Für die zukünftige *in-vivo*-Applikation soll es möglich sein, diesen neu zu entwickelnden Detektor mit der auf Remission beruhenden, ebenfalls neu entwickelten, Stichsonde zu kombinieren.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Materialien (Aufbauten, optische Bauteile, Chemikalien, Zellen, Modellsysteme) und verwendete Methoden vorgestellt und deren Aufbau und Funktionsweise näher erläutert.

2.1 Setup der multispektralen Gewebeanalytik

Der multispektrale Messaufbau zum *in-vivo*-Monitoring ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die Anordnung enthält zwei Lichtquellen und drei Spektrometer:

- 365 nm Leuchtdioden-Lichtquelle (LED; NCSU 033B, Nichia, Tokushima, Japan)
- Breitbandige Halogenlampe (CLH 600, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- FL-Spektrometer (MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- UV/VIS-Spektrometer (MCS 621 VIS II, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- NIR-Spektrometer (MCS611 NIR 2.2, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)

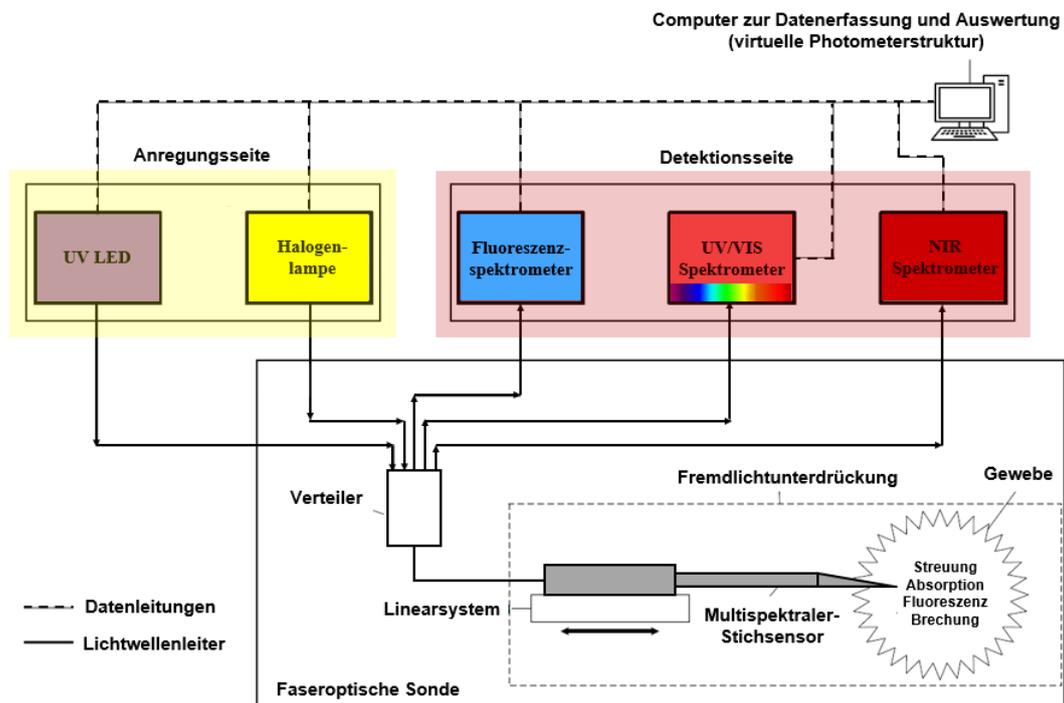


Abbildung 1: Setup für die multispektrale *in-vivo*-Gewebeanalyse. Der Aufbau besteht aus zwei Lichtquellen (UV-LED: NCSU 033B, Nichia, Tokushima, Japan; Halogenlampe: CLH 600, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und drei Spektrometern für die Detektion des Sekundärlichtes der einzelnen Spektralbereiche (MCS 621 VIS II; MCS611 NIR 2,2 μ ; MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

Darüber hinaus beinhaltet das Setup den, im nächsten Abschnitt (Aufbau und Design des multispektralen faseroptischen Stichsensors zur *in-vivo*-Gewebeanalytik) beschriebenen, faseroptischen, multispektralen Stichsensor mit sieben unabhängigen optischen Fasern.

Die UVA-LED hat ein Emissionsmaximum bei 365 nm sowie eine spektrale Halbwertsbreite von 9 nm (FWHM) und führt eine optische Leistung am Sondenkopf von 160 μ W in das zu untersuchende Medium zu. Fünf von sieben im Sondenkopf verbauten Glasfasern werden in dieser Studie verwendet: zwei zur Einkopplung des Primärlichtes in die Fasern und drei als Detektionspfade des Sekundärlichtes zurück in die jeweiligen Spektrometer (siehe Abbildung 1 und 2). Die Lichtquellen und Spektrometer sind farblich gekennzeichnet und die jeweils zugehörige Faser mit der gleichen Farbe versehen. Alle Lichtwellenleiter werden über SubMiniature-Version A (SMA)-Verbinder mit der faseroptischen Sonde verbunden. Zur besseren Unterscheidung sind die Lichtquellen und Detektoren farblich hervorgehoben.

Für die longitudinale Positionierung der Sonde ist diese auf einem Linearsystem befestigt (Spindler & Hoyer, Göttingen, Deutschland).

Die Spektren werden mit der Software Aspect Plus® (Version 2.3, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und mit den Integrationszeiten 100 ms für UV/VIS-, 200 ms für NIR sowie 250 ms für FL-Spektroskopie aufgenommen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, werden die Mittelwerte aus jeweils drei Datensätzen berechnet. Die Messesequenz lautet wie folgt:

- 1) FL-Spektroskopie (kontinuierliche Dunkelstromkorrektur)
- 2) UV/VIS-Spektroskopie (kontinuierliche Dunkelstromkorrektur)
- 3) NIR-Spektroskopie (kontinuierliche Dunkelstromkorrektur)
- 4) Datenaufbereitung
- 5) PCA mittels Unscrambler® X (CAMO Software AS, Norwegen)

Um Störeinflüsse durch Umgebungslicht auszuschließen, wird die Messanordnung während der Versuche durch zwei Schichten lichtdicht verschlossen und zwar mit schwarzem Textilgewebe als äußere Schicht und mit Carbon-Black-Polymerfolie als innere Schicht. Carbon-Black-Polymerfolie wird verwendet, da diese Folie mit Kohlenstoffpartikeln durchgefärbt ist und so keine messbare Auto-Fluoreszenz zeigt.

Das Setup einschließlich der multispektralen Stichnetadel wird durch UV/VIS-, NIR- und FL-Messungen in einem Flüssigkeitsgewebephantom (siehe Kapitel „Modellsystem flüssiges Gewebephantom“) evaluiert, sowie in einem Proof-of-Concept im Tiermodell bei simultaner Ultraschallüberwachung. Die MRT-Fähigkeit wurde durch Messungen der Nadelposition in einem biologischen Phantom bestätigt [3].

2.2 Aufbau des multispektralen Stichsensors zur *in-vivo*-Gewebeanalytik

Die optische Funktion der Stichsonde beruht auf sieben Quarzfasern (numerische Apertur (NA) 0,22; Kern-/Außendurchmesser: 200/250 μm , Edmund Optics Ltd., York, UK), siehe Abbildung 2. Diese sind innerhalb der Kanüle in hexagonal dichtester Kreispackung (Packungsdichte: ca.78 %) angeordnet. Die Schnittdarstellung A-A links unten enthält die wichtigsten Abmessungen der verwendeten Kanüle und Fasern.

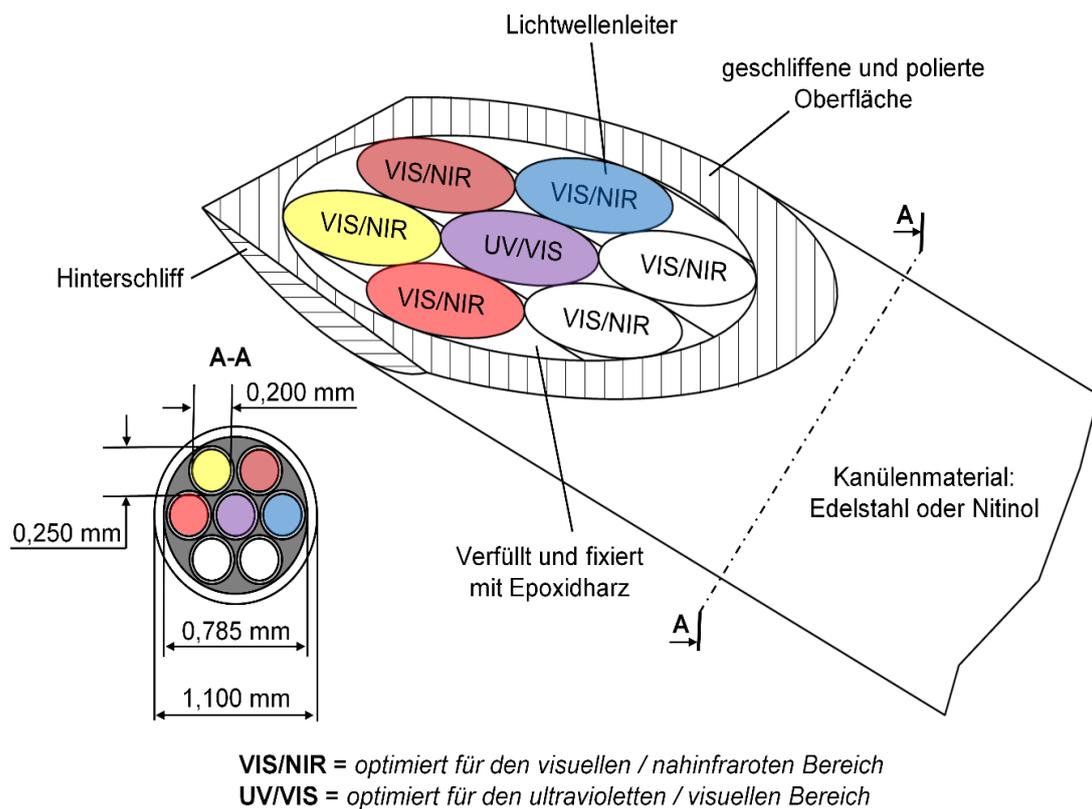


Abbildung 2: Im 30° Winkel angeschliffener Sondenkopf der Multispektralnadel mit geschärften Flanken für effizientes Gewebeeindringverhalten. Die in dichtester Kreispackung angeordneten Fasern innerhalb der 19-G-Kanüle sind frei wählbar. Die Abmessungen der Nadel und der optischen Fasern sind in der Abbildung unten links dargestellt.

Die Zwickel zwischen den einzelnen Fasern werden mittels eines Epoxidharzes (EPO-TEK® 353ND, Epoxy Technology Inc., Billerica, USA) verfüllt, das nach den USP Class VI und ISO 10993 Biokompatibilitätsstandards für medizinische Implantate zertifiziert ist. Ebenfalls werden die Anforderungen an Sterilisationsverfahren durch den CIDEX® OPA-Sterilisationsstandard erfüllt. Durch thermischen Energieeintrag polymerisiert das 2-Komponentenharz (bestehend aus Härter und Binder) in wenigen Minuten aus und fixiert die Fasern in der Kanüle miteinander.

Die Ultraschall- und MRT-Kompatibilität wird durch die 1,1 mm 19-G-Kanüle (Innendurchmesser 0,785 mm, Edelstahl, Sterican, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) oder Nitinol-Kapillare [75–77] (Endosmart® Gesellschaft für Medizintechnik mbH, Stutensee, Deutschland) erreicht.

Ein spezieller Sondenschliff ähnlich einer Injektionsnadel gewährleistet ein effizientes Eindringen in das Gewebe.

Die zentrische Faser ist für den UV/VIS-Bereich optimiert (hoher OH-Gehalt). Sie wird daher für den Lichteintrag der FL-Anregung verwendet. Die umgebenden sechs VIS/NIR-Fasern (niedriger OH-Gehalt) zum Eintrag der breitbandigen Halogenlichtquelle und zur Detektion der einzelnen Techniken.

Die Kombination verschiedener optischer Fasereigenschaften im Sondenkopf ermöglicht die nacheinander getaktete, *in-vivo*-Anwendung verschiedener spektroskopischer Techniken am gleichen Messort. Durch einen Verteiler werden die sieben optischen Fasern in voneinander unabhängige, abgeschirmte Kanäle aufgeteilt. Dies gestattet eine individuelle und gleichzeitige Auswahl von Lichtquellen und Spektrometern oder anderen Detektoren über eine SMA-Verbindung [3]. Die optische Eindringtiefe von dem, aus der Nadel ausgekoppeltem Licht, in ein Flüssigkeitsgewebephantom beträgt etwa 0,8 mm. Die Streukoeffizienten werden ähnlich menschlicher Unterarmhaut eingestellt (Fitzpatrick-Skala Typ II) [3].

2.3 Modellsystem flüssiges Gewebephantom

Die Validierung der Relevanz der SONDENSIGNALE hinsichtlich selektiver Erkennbarkeit gewebetypischer Stoffe, erfolgt mittels UV/VIS-Remissions- und Fluoreszenzspektroskopie in einem flüssigen Phantom. Da die Messung von menschlichem und tierischem Gewebe nur unter erhöhtem Aufwand durchführbar ist und Streu- sowie Absorptionskoeffizienten im Gewebe nicht gezielt variiert werden können, wurde ein flüssiges Phantom etabliert. Zur einfacheren und risikoärmeren

Handhabung während der Versuchsreihen wird ein flüssiges Gewebephantom entwickelt, das auf menschliches oder tierisches Hämoglobin verzichtet. Hierbei handelt es sich um eine wässrige Suspension von Calcilit (Streuer: mittlere Teilchengröße von 4 μm , (Calcilit 4G, Artikelnummer FU 1001054 / 8.2.02, Alpha Calcit Füllstoff GmbH & Co. KG, Köln, Deutschland)), New Coccine (New Coccine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und NADH (Fluorophor: NADH-Dinatriumsalz, Artikelnummer AE12.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Hierdurch ist es möglich, Gewebe sowohl in seinen Streu- als auch in seinen Absorptionseigenschaften gezielt zu imitieren. Die Konzentrationen von 2,7 Gew.-% zeigt annähernd die gleichen Rückstreuereigenschaften wie helles Unterarmgewebe (Fitzpatrick-Skala Typ II). Um die Streueigenschaften verschiedener Gewebe und speziell unterschiedlicher Hauttypen darzustellen, wurden die Messungen in dieser Arbeit in einem Calcilit-Massenanteil der Mischungskomponente zwischen 2,4 % und 3,0 % durchgeführt. Die Bestimmung der Streukoeffizienten des flüssigen Gewebephantoms erfolgte anhand von Transmissionsspektren einer hochverdünnten Suspension (Calcilit und VE-Wasser).

Die Randbereiche des Modells bilden die Streukoeffizienten:

- 600 nm; 64,9 cm^{-1} // 940 nm 51,9 cm^{-1} (2,4 Gew.-% Calcilit)
- 600 nm; 81,1 cm^{-1} // 940 nm 64,8 cm^{-1} (3,0 Gew.-% Calcilit)

Die Streukoeffizienten der Haut liegen laut Literatur zwischen 29,7 und 68,7 cm^{-1} bei einer Wellenlänge von 500 nm [78]. Die Streukoeffizienten dieser Suspension bei 500 nm betragen 67,6 cm^{-1} (2,4 Gew.-%) und 84,5 cm^{-1} (3,0 Gew.-%). Eine höhere oder niedrigere Gewebestreuung kann mit anderen Calcilit-Konzentrationen imitiert werden. NADH dient als Fluorophor innerhalb des physiologischen Bereiches von 0 bis 2,0 mmol/l. Dieser Wertebereich wurde durch Literaturrecherche festgelegt: Reiss et al. bestimmten die NADH-Konzentration einer Rattenleber zu 1 $\mu\text{mol/g}$ [79]. Eine weitere Forschergruppe identifizierte die molare Konzentration von NADH in Zellen in einem Bereich zwischen 0 und 0,9 mmol/L [80].

2.4 Auto-Streu-Korrektur

Zur Bestimmung der absoluten NADH-Konzentration im Gewebephantom ermöglicht die autoklavierbare Nadelsonde die Erfassung der multispektralen Rückstreuenspektren von UV/VIS, NIR- und FL. Hierbei werden die Fluoreszenzmissionsspektren bei

465 nm unter Verwendung einer diffusen Reflexionsspektroskopie zwischen 600 nm und 940 nm korrigiert. Dadurch kann der Einfluss von Mehrfachstreuungen auf dem optischen Weg durch die dispergierte Phase kompensiert werden. Das Primärlicht muss in die Apertur der Detektionsfaser zurückgestreut und detektiert werden. Dies geschieht durch Streuung- und Mehrfachstreuung des Primärlichts im flüssigen Gewebephantom und wird als Sekundärlicht (Fluoreszenz) erfasst. Vor der Sonde bildet sich ein mit Photonen angereichertes Messvolumen, in dem Streu- und Mehrfachstreu-Effekte auftreten. Kommt es zu einer Erhöhung des Massenanteils an Streuer in der Mischungskomponente des Phantoms, werden die Photonen vermehrt gestreut und das Messvolumen verkleinert sich. Auf diese Weise wird das erzeugte Volumen „heller“, da statistisch mehr Streuzentren zur Verfügung stehen, die die Anregungsenergie innerhalb eines kleineren Messvolumens eingrenzen. Hierdurch wird die mittlere freie Wegstrecke der Photonen reduziert und das erfasste Probenvolumen ebenfalls kleiner. Im besagten Konzentrationsbereich stehen folglich mit Erhöhung des Streuergehaltes mehr Photonen pro Volumen zu Verfügung und die Fluoreszenz steigt an. Das überwachte, rückgestreute, sichtbare Licht wird verwendet, um die Fluoreszenzspektren zu korrigieren und dadurch die wahren NADH-Konzentrationen bei unbekanntem Calcilit-Konzentrationen zu bestimmen.

Die Eigenschaften des rückgestreuten Lichtes der Halogenlampe durch Absorption und Fluoreszenz sind im optischen Fenster zwischen 600 nm und 940 nm nahezu unbeeinflusst. Zusammen mit Referenzmessungen unterschiedlicher Calcilit- und verschiedener Fluorophor-Konzentrationen, die den Messraum des Modells für weitere streuungskorrigierte Messungen aufspannen, kann die Korrelation zwischen dem Integral des rückgestreuten sichtbaren Lichts verwendet werden, um den Einfluss der Streuung zu kompensieren. Dies führt zu absoluten NADH-Konzentrationen (siehe Abbildung 3). Hierbei wird der Programmablaufplan zur Bestimmung der absoluten NADH-Konzentrationen dargestellt. Durch ein Trainingsset „Vorbereitung/Anlernen des Modells im Labor“ (blau) wird der Messbereich überspannt. Mit VIS- und Fluoreszenzmessungen (dunkelgrau) werden Zwischenergebnisse (hellgrau) generiert und Unterprogramme (schwarz) des Algorithmusses ausgeführt, die in der Absolutkonzentration von NADH (weiß) resultieren.

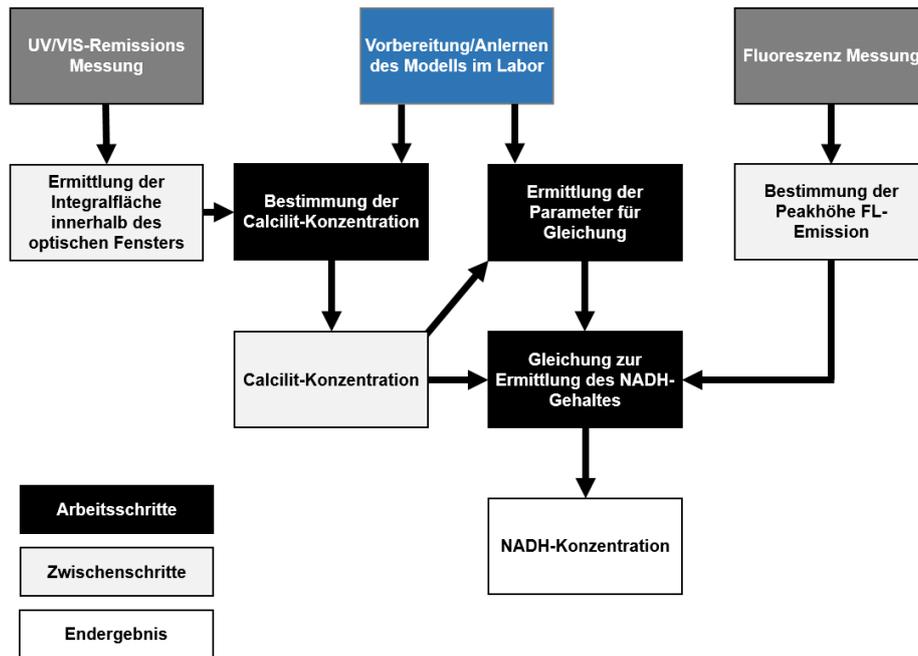


Abbildung 3: Programmablaufplan zur Bestimmung der absoluten NADH-Konzentrationen für opake Systeme. Der Messbereich wird mit einem Trainingsset „Vorbereitung/Anlernen des Modells im Labor“ (blau), bestehend aus VIS- und Fluoreszenzmessungen, überspannt. Mit (1) VIS- und (2) Fluoreszenzmessungen (dunkelgrau) werden Zwischenergebnisse (hellgrau) generiert und Unterprogramme (schwarz) des Algorithmusses ausgeführt, die in der Absolutkonzentration von NADH (weiß) resultieren.

Nachfolgend werden die einzelnen Schritte des Programms näher beschrieben. Die Beziehung zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität y und der Fluorophor-Konzentration x (in mmol/l) ergibt sich aus der Gleichung (1):

$$y = A \cdot \ln(x + B) + C \quad (1)$$

Der Parameter y steht für die Peak-Intensität der Fluoreszenzemission bei 465 nm; x ist die quantitative Fluorophor (NADH)-Konzentration; A , B und C sind Parameter, die von der simultan ermittelten Calcilit-Konzentration direkt abhängig sind. Ein vermessenes Testset innerhalb des aufgespannten Messbereichs mit unbekanntem Calcilit- und NADH-Konzentrationen dient zur Ermittlung und Validierung des Systems. Als Referenzmethode fungiert die gravimetrische Bestimmung von Calcilit und der verschiedenen NADH-Konzentrationen. Gleichung (1) stellt eine effiziente Näherung an die Messwerte dar. Bei sehr niedrigen Fluorophor-Konzentrationen folgen die Werte einem annähernd linearen Trend [81,82]. Im vorgestellten System trat eine

Abweichung von diesem Verhalten ab 0,2 mmol/l auf. Das Messvolumen der Rückstreusonde wird reduziert und die resultierende Eindringtiefe des Lichtes verringert. Die Parameter A und B beeinflussen direkt den Verlauf der Funktion. A nimmt Einfluss auf die Sensitivität des gesamten Messsystems. Die Sensitivität wird bestimmt von der Intensität der Lichtquelle, der Sammeleffizienz der Sonde, des Photonenflusses im Spektrometer, der Empfindlichkeit des Detektors und der Elektronik. Der Parameter B passt die Ergebnisse der natürlichen Logarithmusfunktion (ln-Funktion) bei $x = 0$ an, da der Wertebereich sonst nicht definiert wäre. Zudem beeinflusst dieser Parameter die Gleichung bei niedrigen Konzentrationen – kleine B-Werte führen zu großen Steigungen bei kleinen x-Werten – da x und B im Nenner der ersten Ableitung erscheinen. Unabhängig davon kann der Wert von C die Funktion in Richtung der y-Achse verschieben. Die Verschiebung durch den y-Achsenabschnitt dient dazu parasitäre Signale (z.B. Raman-Streuung von Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm, die sich teilweise mit den Fluoreszenzemissionsspektren überlappen, sowie die inhärente Fluoreszenz der faseroptischen Sonde) zu kompensieren. Zum besseren Verständnis ist die erste Ableitung der Gleichung dargestellt:

$$\frac{dy}{dx} = \frac{A}{x + B} \quad (2)$$

Nach Bestimmung der Calcilit-Konzentration und Messung des Fluoreszenzemissionspeaks werden die Werte von A, B und C für das untersuchte unbekannte System bestimmt. Gleichung (1) muss hierzu nach der wahren NADH-Konzentration umgestellt werden.

$$x = e^{\left(\frac{y-C}{A}\right)} - B \quad (3)$$

Mit dieser Methode ist eine quantitative Bestimmung des Fluorophor-Gehaltes unabhängig von den Streueigenschaften des Phantoms möglich.

2.5 Tiermodell und Vorgehensweise

Für diese Studie wurden weibliche SPF-NMRI-Mäuse (Alter: 12 Wochen, Janvier-Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich) mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser eingesetzt. Die Versuche wurden nach den lokalen und internationalen Vorschriften, die der EC 2010/63 Richtlinie für die Pflege und Verwendung von Labortieren entsprechen, durchgeführt. Sechs Mäusen wurde subkutan in die Flankenregion 5E + 05 LLC P4-Zellen/Maus (Lewis-Lungenkarzinomzellen in 100 µL; phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) injiziert. Nach ca. zwei Wochen waren die Carcinoma in situ auf eine Größe von etwa 1 cm³ angewachsen und die Tiere unter Anästhesie untersucht [Medetomidin 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) (Eurovet, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland), Midazolam 5 mg/kg KG (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), Fentanyl, 0,05 mg/kg KG (Janssen Cilag, Neuss, Deutschland)]. Nach Rasur der betreffenden Stelle und Desinfektion der Cutis ermöglichte ein kleiner Hautschnitt von etwa 1-2mm in der Nähe des Tumors den minimalinvasiven Eingriff der multispektralen Stichnetel. Die Temperatur der Tiere wurde konstant afebril gehalten.

2.6 Bestimmung der Nadelposition mittels Ultraschall und Polymerfilament

In der vorgestellten Untersuchung zur *in-vivo*-Klassifikation wurde die faseroptische Nadel mit einem Ultraschallsystem (Philips Sonos 5500; Philips Medical System, Hamburg, Deutschland) mit den folgenden Attributen verfolgt:

- Kopf: lineare Philips 15-6L-Sonde
- Tiefeneinstellung: 2 cm
- Frequenz: 76 Hz

Während der Versuche wurde die Gelschichtdicke zwischen Sonde und Haut im Zentimeterbereich gehalten, um einen ausreichenden Abstand zwischen Sonde und Hautoberfläche herzustellen. Messungen des Gewebes direkt unter der Hautoberfläche wurden ermöglicht. Ein Polymerfilament (PROLENE, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) markierte zusätzlich den Stichkanal. Dieser wurde mit einem UV-Klebstoff (Bondic®, VIKO UG, München, Deutschland) seitlich am Sondenkopf befestigt und verblieb als Markierung im Stichkanal.

2.7 Vorbehandlung der multispektralen Informationen

Aufgrund der großen Datenmengen der drei Zeilenkameras der jeweiligen Spektrometer (UV / VIS, NIR und FL) war eine Vorverarbeitung zur Datenreduktion notwendig. Die erzeugte Menge an Rohdaten (40.000 Bytes pro Messpunkt) wurde durch eine spezialisierte, virtuelle Photometerstruktur auf fünf aussagekräftige Messkanäle mittels Computer/Tablett reduziert. Die Bereiche wurden aufgrund der spektralen Eigenschaften den Bereichen endogener Marker-Substanzen oder bekannten morphologischen Änderungen zugeordnet.

Bei einer Abtastrate von 50 Hz, entsprechend 3.000 Messpunkten pro Minute, betrug die Datenmenge vor der Reduktion 120 Megabyte pro Minute. Nach der Vorverarbeitung war diese um den Faktor 4.000 auf 0,03 Megabyte pro Minute Betriebszeit reduziert (Datenreduktion durch virtuelle Photometerstruktur, siehe Abbildung 4).

Dadurch wurden die Speichieranforderungen und die notwendige Rechenleistung bei der Klassifizierung mittels „principal component analysis“ PCA stark reduziert. Hiervon profitieren insbesondere mobile Geräte, bei denen durch Reduktion des Rechenaufwandes die Akkulaufzeit gesteigert werden kann.

Für die hier beschriebene Applikation ist das Flussdiagramm in Abbildung 4 dargestellt, das alle angewandten Bandpassfilter und ihre Grenzen für die Messung Messkanäle (MK) und die Referenzkanäle (RK) enthält.

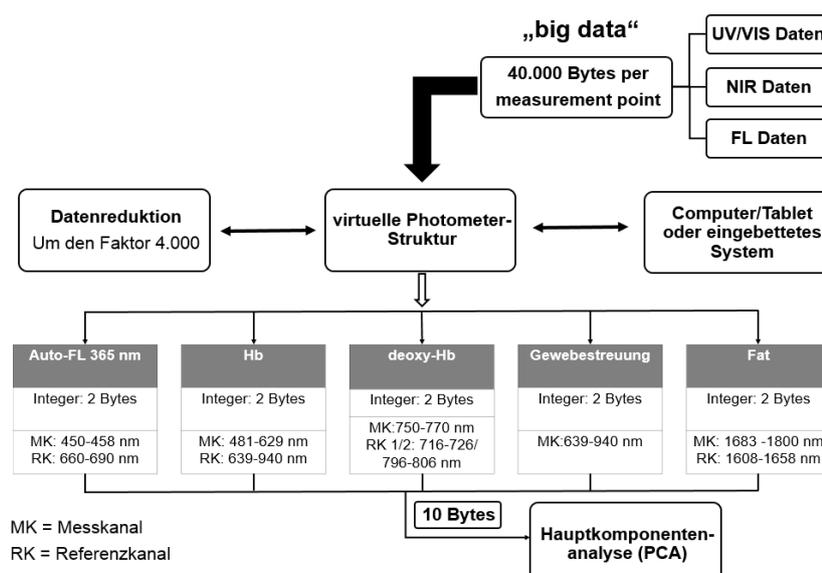


Abbildung 4: Vorverarbeitung der multispektralen Daten durch eine virtuelle Photometerumgebung und Klassifizierung der stark reduzierten Datenmenge in fünf Kanälen durch eine PCA-Klassifikation.

2.8 Multivariate Datenanalyse der spektralen Datensätze und Klassifikation der virtuellen Photometriedaten mittels PCA

Die PCA gehört zu den chemometrischen Methoden zur Klassifikation, die ein Maximum an Informationen aus experimentellen Messdaten extrahieren. Die PCA ist eine statistische Klassifikationsmethode mit dem Ziel, multidimensionale Daten auf wenige Hauptkomponenten (PCs) zu reduzieren [83]. Das resultierende Koordinatensystem beschreibt die aufgenommenen Spektraldaten aus den verschiedenen verwendeten Techniken: UV/VIS-, NIR- und FL-Spektroskopie in Form einzelner, aus dem gesamten Datensatz erzeugten, Messsensoren/Kanäle.

Der Einfluss jeder einzelnen Sensor-Variablen auf eine Hauptkomponente wird in den Loadings ausgedrückt. Die Kanäle selbst werden auf den Scores im neuen PC-Koordinatensystem beschrieben:

$$X = TP^T + E \quad (4)$$

X = Datenmatrix (Zeilen sind die Proben; Spalten die Spektralwerte)

T = Scorematrix (Beschreibung der Proben – gewichtet)

P^T = transponierte Loadingmatrix (fasst die Daten zusammen – Variablen)

E = Residuenmatrix (unerklärter Anteil – Rauschen, Fehler)

Die multivariate Datenanalyse oder auch Chemometrie ist ein unverzichtbares Hilfsmittel bei der Analyse und Auswertung großer Datensätze. Sie ist in der Lage, Informationen mehrdimensional durch Mustererkennung zu extrahieren und diese zu klassifizieren bzw. in Regressionsmodelle umzusetzen. Der Gebrauch erfolgt automatisch nach Festlegung und Eingrenzung von Variablen z. B. Wellenlängenbereichen, Datenaufbereitung, Anzahl der Hauptkomponenten und Auswahl der Lösungsalgorithmen, z. B. den Nonlinear Iterative Partial Least Square-Algorithm (NIPALS).

Die vorliegenden Datensätze werden wie folgt für das Modell aufbereitet: Zunächst werden aus Recherche und Versuchen an totem Gewebe und im flüssigen Phantom relevante Spektrenbereiche identifiziert, im Tiermodell verifiziert und bestätigt. Die Bereiche werden als einzelne Sensoren betrachtet. Hierdurch können die Daten reduziert und vereinfacht werden (weitere Informationen siehe Datenreduktion). Anschließend findet eine Klassifizierung mittels PCA statt.

Die bekanntesten Ergebnisdiagramme aus der PCA sind der Score- und Loadingsplot, welche auch große Datenmengen für den Betrachter überschaubar und klassifizierbar machen. Beispielsweise bedeutet ein positiver Scorewert, dass die Proben bezüglich dieser Hauptkomponente – in unserem Fall einer der fünf virtuellen Sensoren – dominiert werden, bzw. die höchste Varianz aufweisen. Entsprechend sind negative Probenwerte unterdurchschnittlich bzgl. dieses Sensors bzw. dieser Hauptkomponente. Wichtig ist zudem, die Loadings zu betrachten. Hierbei besagt ein positiver/negativer Loadingwert, dass die Variable positiv/negativ mit der Hauptkomponente korreliert ist.

Das mathematische Prinzip der PCA beruht auf der Lösung eines Eigenwertproblems der linearen Algebra. Die Beschreibung der Daten, der Scorewerte, der Loadings und der Residuen erfolgt in Matrixschreibweise (siehe Abbildung 5).

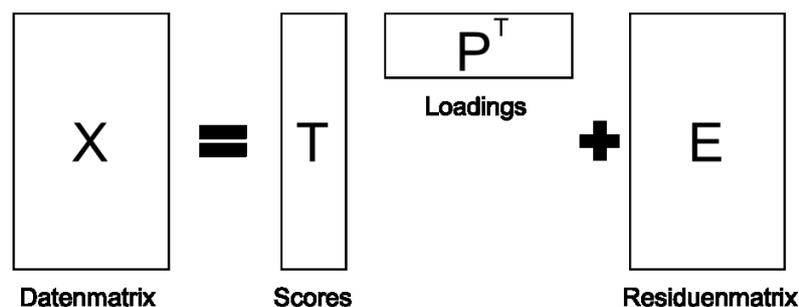


Abbildung 5: Matrixschreibweise der PCA, Abbildung nach [83].

Faktoren sind Größen, die aus den Variablen berechnet werden und jede Probe im Faktorenraum beschreiben. Bei unendlich vielen Faktoren würde die Residuen-Matrix gegen null laufen und folglich wegfallen. Es ist jedoch immer anzustreben, mit so wenigen Faktoren wie möglich und so vielen Faktoren wie nötig zu arbeiten. Ein überbestimmtes Modell ist im Betrieb deutlich weniger robust und anfälliger für Störgrößen. Deshalb wurde in dieser Arbeit mit lediglich zwei Faktoren gearbeitet, denen als Variablen die virtuelle 5-Kanal-Photometerstruktur dient.

Für die Datenmatrix wird vor der eigentlichen Hauptkomponentenanalyse eine Mittenzentrierung durchgeführt:

$$x(\text{zentriert})_{ik} = x(\text{orig})_{ik} - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x(\text{orig})_{ik} \quad (5)$$

Hierbei wird über jede Variable der Spalte der Datenmatrix X der Mittelwert berechnet und vom Originalwert der Spalte abgezogen.

Durch das Einsetzen der Mittenzentrierung (siehe Gleichung 4) in die allgemeine Gleichung der Hauptkomponentenanalyse (PCA),

$$X = TP^T + E \quad (6)$$

ergibt sich folgende Gleichung:

$$x_{ik} = x_{mittel,k} + \sum_{a=1}^A t_{ia}p_{ka} + e_{ik(A)} \quad (7)$$

$x_{mittel,k}$ = *k – ter Spaltenmittelwert*

t_{ia} = *Scorewert für Objekt i und Hauptkomponente a*

p_{ka} = *Loadingwert für Variable k und Hauptkomponente a*

$e_{ik(A)}$ = *Restfehler nach A Hauptkomponenten*

Bei der PCA handelt es sich um ein lineares additives Modell. Dies bedeutet, dass nacheinander die Hauptkomponenten berechnet und dem Modell hinzugefügt werden. Der Restfehler wird kleiner und der Informationsgehalt in den einzelnen Komponenten größer.

Verschiedene Verfahren sind in der Lage, das Eigenwertproblem zu lösen. Das Standardverfahren bildet zuerst die Kovarianz-Matrix Z, welche die Varianz der Variablen aus der Datenmatrix X beschreibt [83].

$$Z = X^T X \quad (8)$$

Z hat die Dimension (MxM). Hierbei steht M für die Anzahl der Variablen. Die Matrix Z^T wurde bestimmt, die die Varianz der Objekte (NxN) beschreibt. Hat man mehr Objekte als Variablen, wie dies bei spektroskopischen Daten der Fall ist, wird meist nach der folgenden Kovarianzmatrix gerechnet [83]:

$$Z^T = X X^T \quad (9)$$

Hierbei handelt es sich um eine quadratische Matrix, in der die Varianz auf den Diagonalelementen steht. Die Außerdiagonalelemente beinhalten die Kovarianzen. Durch Diagonalisieren der Matrix stehen auf der Diagonalen (die Varianzen der Koordinaten). Diese wiederum geben die Richtung der Loadings, also der Hauptkomponentenachsen, an.

Für spektroskopische Daten ist der gebräuchlichste Ansatz die Singulärwertzerlegung (Singular Value, Decomposition, SVD): Hierbei wird zunächst die Datenmatrix X der Dimension $(N \times M)$ in drei Matrizen zerlegt [83]:

$$X = USV^T \quad (10)$$

Durch Ersetzen $T(S^{-1}S)P^T$ erhält man:

$$U = TS^{-1} \text{ und } V^T \quad (11)$$

$$U = TS^{-1} \text{ und } V^T = P \quad (12)$$

$$\text{und } S^2 = P^{-1}ZP \quad (13)$$

P ist hierbei die Transformationsmatrix und Matrix S die diagonalisierte Kovarianzmatrix. Deren Diagonalwerte sind die sogenannten Singulärwerte (singular values). Diese sind die Quadratwurzel der Eigenwerte der Kovarianzmatrix $Z = X^T X$. Diese Eigenwerte stehen nach ihrer Größe in der Matrix S - s_1, s_2, s_n . Der erste Eigenvektor p_1 stellt die Richtung höchster Varianz dar, dann p_2, p_3, p_n . Die Eigenvektoren sind nach Ihrer Wichtigkeit geordnet und der Vektor mit der kleinsten Varianz hat auch den kleinsten Eigenwert. Die orthonormale Matrix P (Loadingmatrix) hat als Spalten die Eigenvektoren der Matrix $Z = X^T X$. Die Eigenvektoren spannen das neue Koordinatensystem auf [83].

Der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus zur Berechnung der Hauptkomponenten ist der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Square). Dieser ist in das Programm The Unscrambler[®] implementiert. Hierbei handelt es sich um ein iteratives Näherungsverfahren zum Auffinden der ersten Eigenwerte A der Kovarianzmatrix Z . Das Verfahren beginnt mit einem zufälligen Startwert für die Lösung und verbessert den Bezugswert, bis ein tolerierbarer Fehler erreicht ist [83].

2.9 Detektion von Blutgefäßen mittels VIS-Spektroskopie

Durch die Implementierung einer *in-vivo*-Detektion von Blutgefäßen in die Nadel, können Komplikationen reduziert werden. Pulsationsereignisse im Körper können erkannt und so mögliche Verletzungen von Gefäßwänden durch Punktionen auf ein Minimum reduziert werden. Diese Funktion wird durch zwei unabhängige, optische Kanäle/Fasern der Sonde erreicht. Exemplarisch wurde die Nadel auf die Haut am Handgelenk aufgesetzt und eine transkutane Messung eines Blutgefäßes direkt unter der Haut bei leichter körperlicher Belastung durchgeführt. Der Puls wurde mit einer handelsüblichen Fitnessuhr (Garmin Vivosmart HR, Garmin Ltd., Schaffhausen, Schweiz) als Referenz mit 120 Schlägen/Minute bestimmt. Der Aufbau der optischen Messung bestand aus folgenden Komponenten:

- Multispektraler-Sensor
- Breitband-Halogenlampe (CLH 600, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Spektrometer (MCS CCD / UV-NIR, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Integrationszeit: 20 Millisekunden
- Zyklische Messung/Abtastrate: 50 Millisekunden
- Intensitätsmessung: Wellenlänge 579 nm

2.10 Optiken für kontaktlose hochsensitive Raman- und Fluoreszenzmessungen

Raman-Messungen mit hoher Sammeleffizienz und hohen Gegenstandsweiten

Raman-Messungen mit großer Brennweite und hoher Sammeleffizienz wurden aufbauend auf einem koaxialen Sondenaufbau entwickelt [1,4]. Der Strahlengang wurde mithilfe der Software OptiCAD® (OptiCAD Corporation, USA) simuliert und optimiert, siehe Abbildung 6.

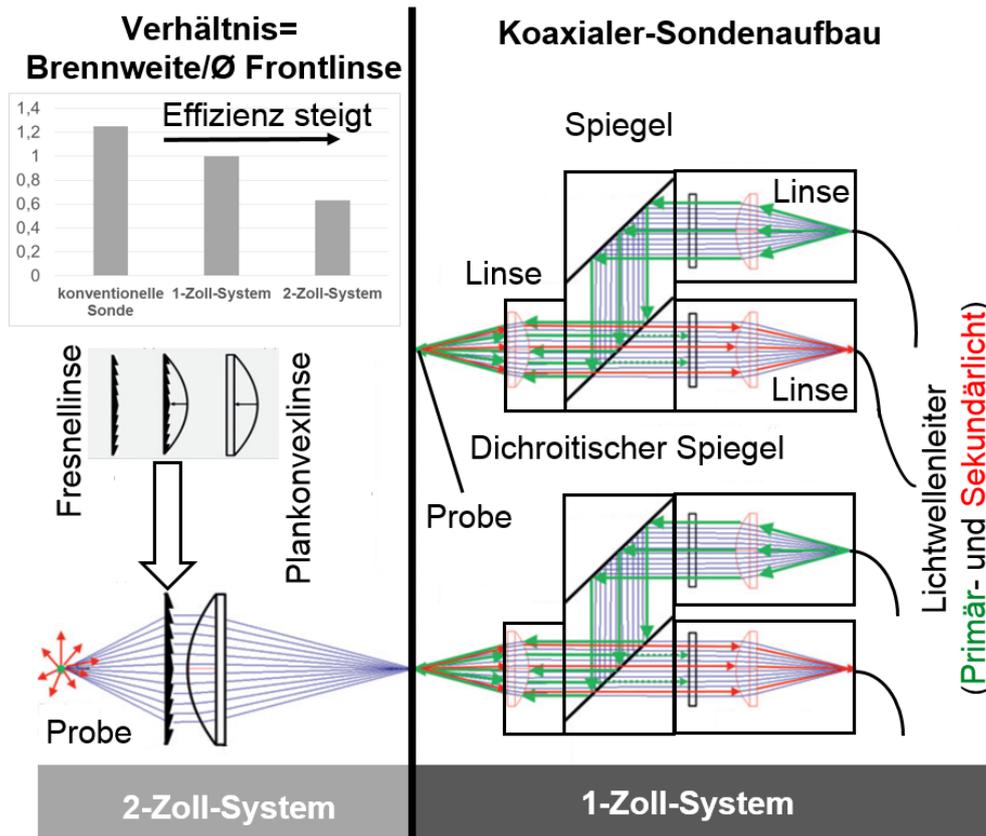


Abbildung 6: Optischer Aufbau einer Raman-Sonde mit großer freier Gegenstandsweite, Abbildung nach [1].

Dieser Aufbau eignet sich zur Analytik sowohl klarer als auch opaker Medien. Für opake (streuende und/oder absorbierende) Medien lässt sich der Arbeitsabstand der Sonde bzw. die Penetrationstiefe der Strahlung ins Medium justieren, um eine möglichst effiziente Einstellung zu erzielen. Die Aufnahme und Halterung der optischen Komponenten erfolgte mit einem modularen System der Firma Thorlabs Inc., USA [1,4].

Das Primärlicht wird mit einem 785 nm Laser (PD-LD, USA) erzeugt und mit einem NIR-Lichtwellenleiter mit der Sonde verbunden und das monochromatische Primärlicht (grün dargestellt) von einer zölligen Plankonvexlinse (Brennweite: 25,4mm; Linsendicke: 11,7mm, freie Gegenstandsbrennweite: 17,6mm) parallelisiert.

Im kollimierten (parallelen) Strahlengang wird ein Laserlinien-Filter (Semrock, Inc, USA) orthogonal passiert und anschließend mittels Umlenkspiegel auf einen dichroitischen Strahlenteiler (Semrock, Inc, USA) reflektiert. Der Strahlenteiler ist auf die Primärlichtwellenlänge ausgelegt und reflektiert das Licht auf eine zweite Plankonvexlinse, die das monochromatische Laserlicht fokussiert.

Hierbei wird ein Bruchteil des Primärlichtes zu inelastischem Sekundärlicht (rot dargestellt) gestreut und das Molekül ggf. auch zur Fluoreszenz angeregt. Dieses Sekundärlicht muss wiederum mit der Linse, die zuvor das Primärlicht abgebildet hat, effizient gesammelt werden. Hierbei ist das Verhältnis des Durchmessers zur Brennweite entscheidend. Soll dieses Verhältnis bei höheren Brennweiten gleich bleiben, muss der Linsendurchmesser erhöht werden. Der Grundaufbau beinhaltet ebenfalls eine zöllige Frontlinse mit 1 Zoll Brennweite.

Die erzeugte Sekundärlichtantwort (Raman und Fluoreszenz) in Bezug auf das Primärlicht ist langwelliger als die Anregungswellenlänge von 785 nm. Daher passieren diese Wellenlängen den dichroitischen Spiegel. Das in der Probe elastisch gestreute Licht schwingt mit der Wellenlänge des Primärlichtes und kann den Spiegel nicht passieren. Es wird reflektiert. Das den Filter durchdringende Restlicht der Anregungswellenlänge wird durch einen nachgeschalteten 785 nm Notch-Filter (Semrock, Inc., USA) gestrahlt und um den Faktor der optischen Dichte (OD) 6 geblockt. Anschließend wird das langwelligere Sekundärlicht mittels Lichtwellenleiter (600 μm NIR-Faser) in ein Raman-Spektrometer (MultiSpec® Raman, tec5 AG, Deutschland) eingekoppelt. Um die Sammeleffizienz bei gleichzeitiger Vergrößerung der freien Gegenstandsweite weiter zu erhöhen, wurde ein zwei-zölliger Aufsatz zur Effizienzsteigerung entwickelt. Dieser ergänzt den coaxialen, zölligen Aufbau: Nach der Zwischenfokussierung durch die Frontlinse des zölligen Systems werden die Strahlen über eine weitere Plankonvexlinse mit doppeltem Durchmesser und 32 mm Brennweite kollimiert. Die Fokussierung in das zu untersuchende Medium wird mithilfe einer 2-Zoll-Fresnel-Linse mit 32 mm Brennweite (Material: Acryl, Dicke: 1,5 mm, Thorlabs Inc, USA) umgesetzt. Bei Verdopplung des Durchmessers steigt die freie Brennweite stark an, da diese Linsenbauform eine deutlich geringere räumliche Ausdehnung aufweist. Zeitgleich verbessert sich das Verhältnis des Durchmessers zur Brennweite. Wie zuvor die Frontlinse im zölligen System, übernimmt nun die Fresnel-Linse diese Funktion und der Strahlengang wird in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Die Abbildungsfehler der Fresnel-Linse sind durch den großen 600 μm Querschnitt der Detektionsfaser tolerierbar. Anschließend wird das empfangene Licht mittels Querschnittswandler in eine Spaltgeometrie am Spektrometereingang umgesetzt [1,4].

Hochsensitives Raman-Spektrometer

Zur Stimulation der Raman-Streuung dient eine diodengepumpte Festkörperlaserquelle mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Ausgangsleistung von maximal 300 mW (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., China). Die Optiken werden mit einem Tubus sowie einem Cagesystem der Firma Thorlabs Inc., USA gefasst, montiert und der Strahlengang justiert. Das zuvor in der Sonde fasergekoppelte Licht, tritt direkt ohne weitere Strahlformung direkt ins Spektrometer ein. Die Photonverluste werden im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Methoden reduziert. Anschließend wird das mit der Faserapertur austretende Licht, mittels einer achromatischen Linse kollimiert und durchstrahlt orthogonal einen Edge-Filter (Semrock Inc., USA). Dieser unterdrückt die Rayleigh-Streuung mit einer optischen Dichte (OD) von 6. Danach wird dieser parallelisierte und von Anregung befreite Strahl an einem Reflexionsgitter mit einer Blazewellenlänge von 500 nm gebeugt, siehe Abbildung 7.

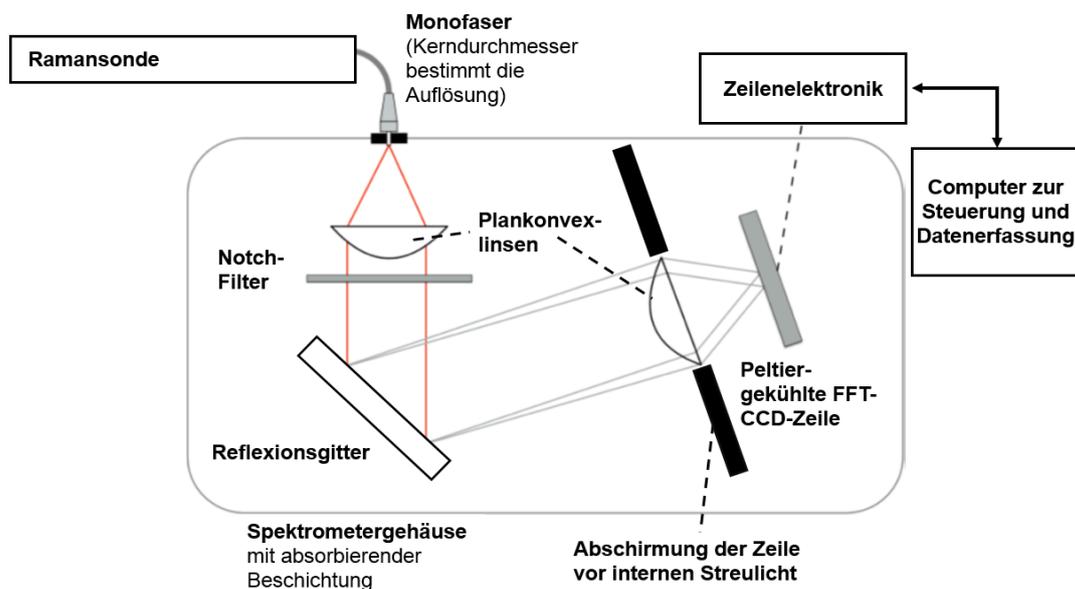


Abbildung 7: Aufbau des auf Photonenfluss optimierten Raman-Spektrometers, Abbildung nach [2].

Dieses wurde ebenfalls ausgewählt, um den Photonverlust so gering wie möglich zu halten, da das Reflexionsgitter effizienter als ein Transmissionsgitter arbeitet.

Der relevante Wellenlängenbereich wurde auf eine hochempfindliche, einstufige, Peltier-gekühlte back-thinned CCD-Zeile S7031-1006S (Hamamatsu Photonics KK, Japan) abgebildet und mit einer schnellen Elektronik (tec5 AG, Deutschland), die für

die Detektion schwachen Lichtes ausgelegt ist, ausgelesen. Die große aktive Fläche der Zeile von 24,576 mm × 1,392 mm (Einzelpixelgröße von 24 µm × 24 µm) ermöglicht die Abbildung großer Spektrometereintrittsflächen. Bei der Zeile handelt es sich um einen linearen Bildsensor, der für vertikales Binning geeignet ist. Dies ist ein etabliertes Verfahren, das eine wesentliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Signalverarbeitungsgeschwindigkeit nach sich zieht. Ebenfalls gilt es das, im Spektrometer erzeugte, interne Streulicht effizient zu unterdrücken, da es sich bei Kontakt mit der Zeile sofort als parasitärer Signalanteil niederschlägt. Ein spezieller Gitterhalter mit abgerundeten Kanten und einer Beschichtung aus Epoxidharz, versetzt mit fein gemörserter Holzkohle, dient zur Beschichtung und weiteren Minimierung des Streulichtes durch die hohe Absorptions- und Streuwirkung. Zudem wird das Gehäuse groß dimensioniert, sodass sich vagabundierende Strahlen schnellstmöglich durch Mehrfachkontakt mit der Wandung selbst auslöschen. Die direkte Reflexion des Gitters wird mit einer Lichtfalle absorbiert und der Detektor in einem separaten Gehäuseteil abgeschottet und zwar mithilfe eines Fensterzugangs mit ausschließlich dem zu erfassenden Wellenlängenbereichs. Das Spektrometer wird durch die charakteristischen Peaks von Cyclohexan sowie einer Neon-Pen-Ray-Lichtquelle (UVP, LLC, Kanada) kalibriert.

Schnelle Messung durch optische Fenster (In-line-Reaktionsüberwachung)

Die Synthese von 3-Piperidinopropionsäureethylester (Abbildung 8) wird in einem Glasfläschchen durch sofortige Zugabe von 5 ml Piperidin zu 5 ml Ethylacrylat gestartet. Hierdurch kann getestet werden, ob das System schnelle Änderungen von Analyten bei geringer Anregungsleistung erfassen kann [2].

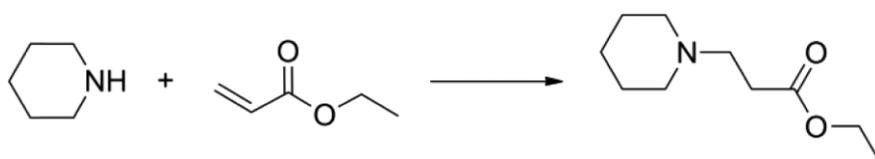


Abbildung 8: Synthese von 3-Piperidinopropionsäureethylester.

Die kontinuierlich gerührte Reaktionsmischung wird in einem Eisbad gekühlt, um die thermische Energie der exothermen Reaktion schnell abzuführen.

Zur Überwachung der Michael-Addition wird eine nicht-fokussierende Rückstreusonde (sieben Fasern mit jeweils 400 µm, eine Anregungsfaser zentrisch und sechs

Detektionsfasern ringförmig angeordnet, Helma GmbH & Co. KG, Deutschland) verwendet und in die Reaktionsmischung eingetaucht. Diese optische Anordnung eignet sich sehr gut für stark streuendes Gewebe.

Gerade bei hohen Streukoeffizienten hat diese Anordnung im Vergleich zu fokussierenden Optiken Vorteile. Das Primärlicht wird unter Verwendung eines optischen Neutralfilters auf eine Ausgangsleistung von 7 mW reduziert. Die Integrationszeit beträgt 1000 ms [2].

Messungen in Kapillaren

Um das Leistungsvermögen des auf Sensitivität hin optimierten Spektrometers zu testen, wird eine Mehrphasenströmungsüberwachung durchgeführt. Hierzu wird mittels T-Mischer (Upchurch Scientific, USA) und einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, USA) mit zwei 20 ml-Spritzen, ein segmentierter konstanter Wasser/Toluolfluss in PFA-Kapillaren (1,59 mm und 0,75 mm Innendurchmesser) erzeugt. Wie in Abbildung 9 dargestellt, werden die Messungen mittels Anregungslaser (532 nm, 300 mW Laserleistung) direkt innerhalb einer Kapillare durchgeführt [2].

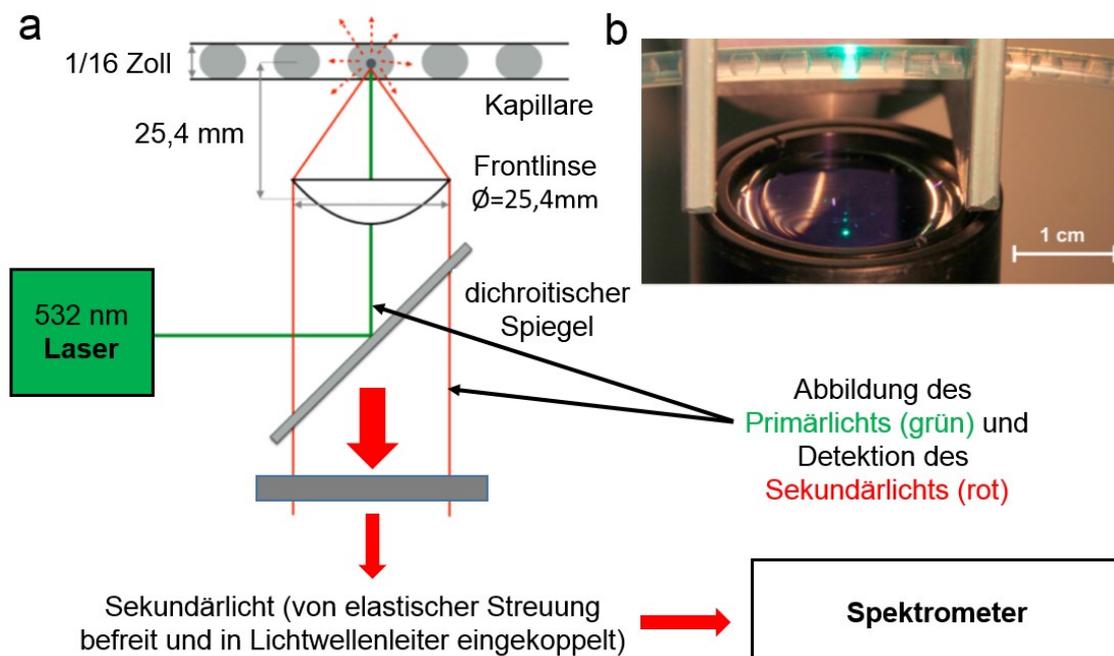


Abbildung 9: Messaufbau Kapillarmessung: (a) Schematischer Aufbau für Messungen in einer PFA-Kapillare; (b) Beispielbild des Zweiphasenstroms mit Lasereintritt und Laseraustritt, Abbildung nach [2].

Nach Verlusten beim Durchtritt der optischen Komponenten wurde eine optische Leistung von ungefähr 191 mW am Sondenkopf gemessen.

In der eigens für diese Anwendung entwickelten Sonde wird das Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel abgelenkt und auf die einzelnen Phasen in der Kapillare fokussiert. Das inelastisch gestreute Licht passiert den dichroitischen Spiegel und wird über einen Lichtwellenleiter in das Spektrometer geleitet. Somit hat die Sonde trotz der Brennweite von 1 Zoll eine hohe Sammelleistung.

Es wird ein Brennweiten-Durchmesser-Verhältnis von 1 realisiert [1]. Diese Optik ermöglicht Raman-Messungen und Fluoreszenzmessungen aus größerer Distanz von Gewebeschnitten oder Hautoberflächen bzw. das Durchdringen der Kapillarwände (z. B. Analytik in Infusionsschläuchen, Katheter und Tropfkammern) bei geringerem Quereinfluss, als dies mit Standardsonden möglich ist.

3. Ergebnisse

Das Ergebniskapitel beleuchtet sowohl die Möglichkeiten der Positionserkennung des Sensors in Gewebeverbänden als auch dessen optische Eigenschaften.

3.1 Ortung der Sonde

Eine genaue Lageerkennung des Stichsensors und dessen Spitze ist essenziell zur Positionierung während der, für zukünftige Einsätze angestrebten, Prozedur der *in-vivo*-Tumorerkennung. Im Folgenden wird die Ortsbestimmung mittels zweier Techniken vorgestellt: Ultraschall und Magnetresonanztomographie (MRT). Diese wurden ausgewählt, da sie sich als gängige Techniken im klinischen Umfeld bzw. in der Ultraschalltechnik bis in die Arztpraxis großflächig etabliert haben.

Validierung der Bestimmung der Sondenposition mittels Ultraschall und verbleibende Markierung des Stichpfades im Gewebe

Exemplarisch für die durchgeführten Untersuchungen ist die Darstellung von Ultraschallbildern während des minimalinvasiven Eingriffs gezeigt, siehe Abbildung 10.

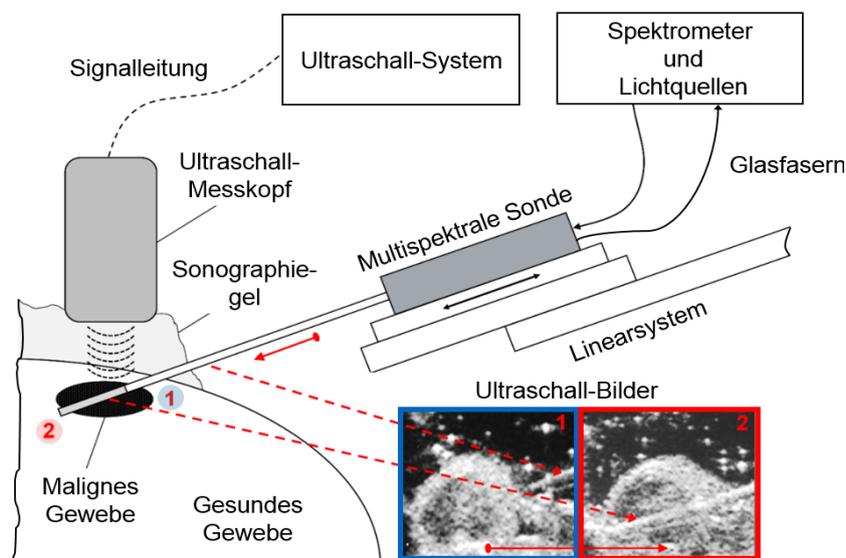


Abbildung 10: Ultraschall-Tracking der Kanülenposition. Die Bilder, die mit 1 und 2 bezeichnet sind, zeigen die optische Stichsonde und deren typische echogenen Metallreflexe zur Lokalisation an verschiedenen Positionen: vor dem Eindringen in den Tumor (Position 1) und in der Endposition (Position 2).

Weitere Informationen finden sich im Abschnitt „Proof of Concept der multispektralen *in-vivo*-Klassifikation von gesundem und malignem Gewebe.“ Die Sondenposition ist durch charakteristische Ultraschallreflexe in Echtzeit mit konventionellem Ultraschallequipment detektierbar. Vor dem Einstich wurde für den Test eine Textilfaser als zusätzlicher Marker am Sondenkopf fixiert, der nach Entfernen der Sonde im Stichkanal verblieb. Die Kombination dieser drei Techniken (Ultraschall, Messung der Eindringtiefe mittels Skala auf dem Linearsystem und Markierung des Stichweges durch eine Textilfaser für die histologische Befundung), erlaubt die Zuordnung der Messorte zu den erhaltenen spektralen Informationen im Tiermodell. Diese werden im späteren Verlauf der Arbeit vorgestellt und zwar ebenfalls im Abschnitt „Proof of Concept der multispektralen *in-vivo*-Klassifikation von gesundem und malignem Gewebe“. Erst hierdurch konnte eine Klassifizierung von tumorösem Gewebe, Gewebe im Übergangsbereich sowie gesundem umliegenden Gewebe durchgeführt werden.

Ermittlung der Sondenposition mittels Magnetresonanztomographie

Um die MRT-Kompatibilität der Sonde zu gewährleisten, fiel die Materialwahl auf Nitinol und Polymere. In einer Machbarkeitsstudie wurde für die Verwendung der Nadelsonde im klinischen Umfeld eine spezielle, räumlich getrennte Anordnung entwickelt. Die Sensorspitze selbst beinhaltet dabei keine strom- oder spannungsführenden Komponenten. Das Detektionsequipment, das die elektronischen Komponenten beinhaltet, wird im angegliederten Kontrollraum gelagert und durch den Faraday-Käfig des MRT-Raums vor elektromagnetischer Strahlung geschützt. Kabelkanäle und Wanddurchführungen wurden verwendet, um die Multispektralsensoren mit den Spektrometern und Lichtquellen über Lichtwellenleiter zu verbinden, wie in Abbildung 11 dargestellt.

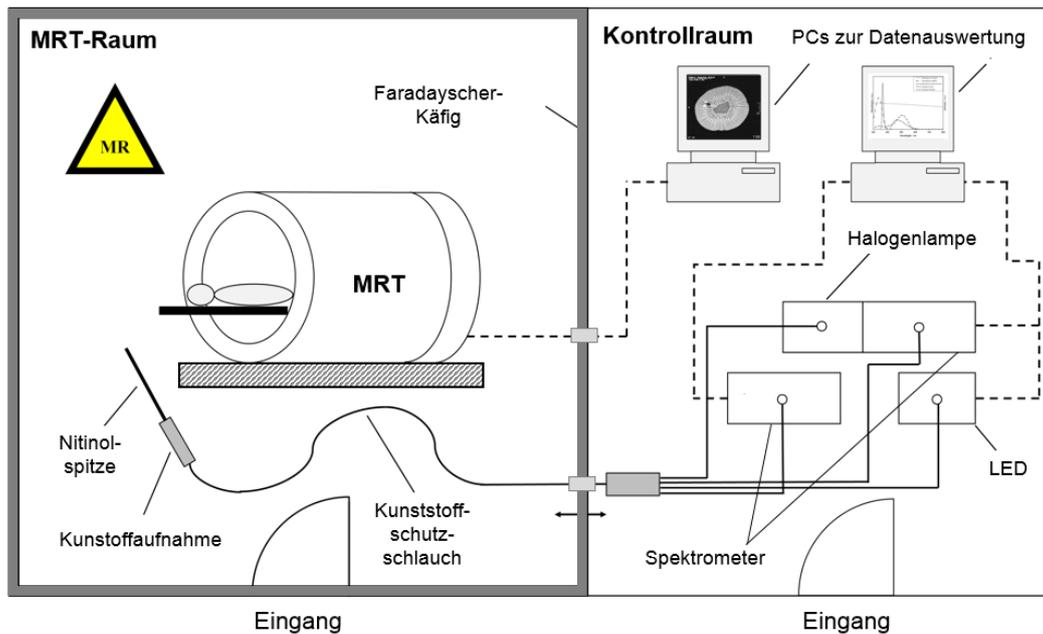


Abbildung 11: Raumaufteilung während der Magnetresonanztomographie bei simultaner, multispektraler Gewebe *in-vivo*-Gewebemessung. Der Stichsensor besteht vollständig aus MRT-kompatiblen Materialien (Nitinol / Polymer und Faseroptik). Der MRT-Raum ist mit einem Faraday'schen-Käfig (links) ausgestattet und schützt so das Messequipment vor elektromagnetischer Strahlung. Die Verbindung der Sonde mit den Lichtquellen erfolgt via Lichtwellenleiter über eine Wanddurchführung, Abbildung nach [3].

Abbildung 12 zeigt die MRT-Ergebnisse, die mit der multispektralen Nadelsonde während der Durchdringung einer Kiwi-Frucht erhalten wurden. Hierbei hebt sich das Sensorsignal klar von der typischen inneren Struktur dieser Frucht ab.

Die markierten Bereiche repräsentieren die Nadel und deren typische Nitinolartefakte [84]. Diese erlauben die Erfassung der Nadelposition zu jedem Zeitpunkt. Die genaue Verfolgung des Sondenkopfes durch die MRT-Information, ermöglicht simultan zur spektralen Messung eine zuverlässige Lagebestimmung der Sonde und damit die genauen Koordinaten der messtechnisch relevanten Position der Sensorspitze.

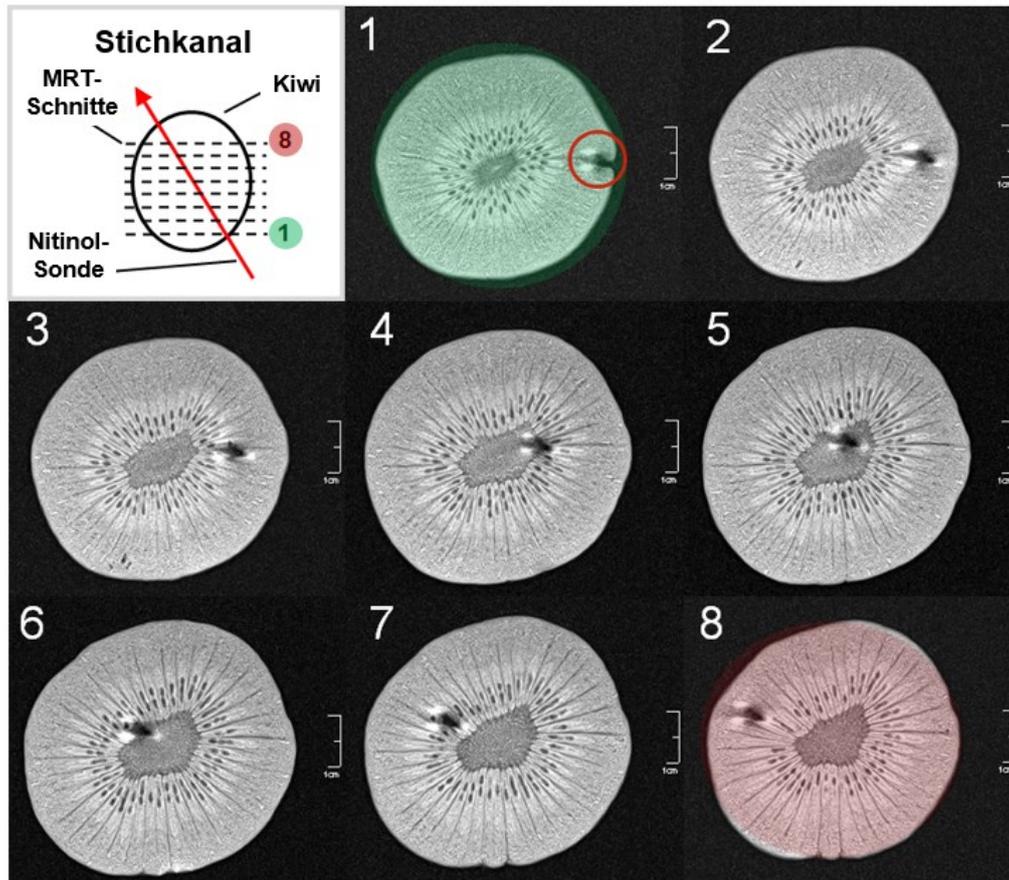


Abbildung 12: MRT-Lagebestimmung der multispektralen Nadelsonde. Die Nitinolsonde (die durch den roten Pfeil im oberen linken Bild dargestellt und deren Position durch den roten Kreis in Bild 1 hervorgehoben wird) ist klar in den MRT-Schnitten erkennbar. Die MRT-Schnitte 1 bis 8 zeigen die Stichsonde und die typischen Nitinolartefakte, die mit der Nadel an verschiedenen Positionen in der Abbildungsebene beobachtet, Abbildung nach [3].

3.2 Detektion von Blutgefäßen als Funktionstest zum Erkennen von typischen Gewebestrukturen und Validierung der erreichbaren Messfrequenzen

Als direkte Folge der linksventrikulären Kontraktion breitet sich eine primäre Blutdruckwelle in den arteriellen Gefäßen aus. Ihre Geschwindigkeit wird als Pulswellengeschwindigkeit bezeichnet. Der zeitliche Verlauf der gemessenen Lichtintensität bei einer ausgewerteten Wellenlänge von 579 nm liefert ein Maß, das unmittelbar mit dem Blutdruck im Inneren der Gefäße direkt vor der Nadelspitze in Verbindung steht (siehe Abbildung 13).

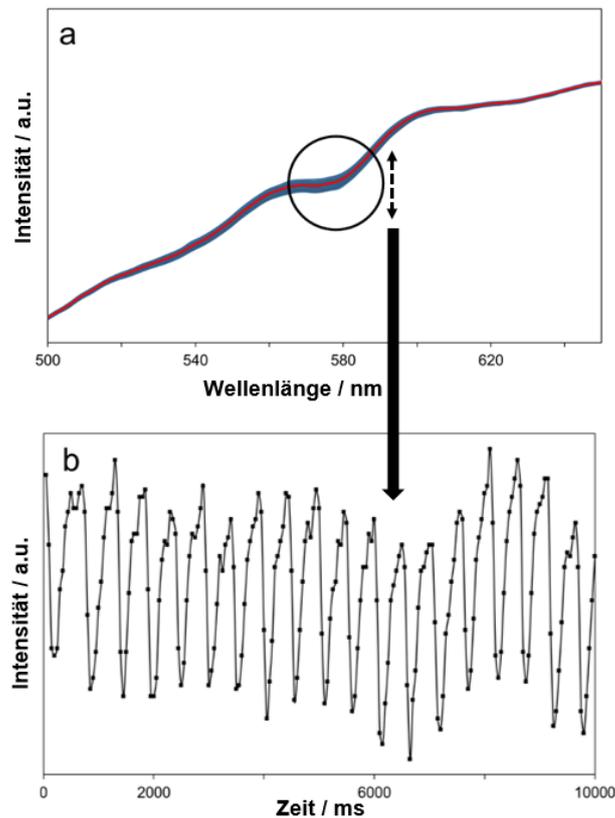


Abbildung 13: (a) Intensitätsspektren der spektral aufgelösten Rückstreuung über den Messzeitraum (Rohdaten) zur Veranschaulichung der Effekte im für die Blutdetektion relevanten grünen Spektralbereich. (b) Zeitlicher Intensitätsverlauf bei der Wellenlänge 579 nm. Die Blutdruckamplitude mit systolischen (minimaler Intensitätswert) und diastolischen Werten (maximaler Intensitätswert) ist deutlich erkennbar. Der durch die Referenzmethode ermittelte Puls von 120 Schlägen/Minute wird durch diese Messtechnik bestätigt.

Die systolischen (min) und diastolischen (max) Intensitätswerte und damit die Blutdruckamplitude werden erfasst [85]. Dadurch erhält man eine Aussage über die Hb-Absorption und eine lokale *in-vivo*-Pulsfrequenzbestimmung.

3.3 Validierung der Relevanz der Sondensignale mittels UV/VIS Remissions- und Fluoreszenzspektroskopie

Die optischen Eigenschaften des partikulären Streuers aus Calciumcarbonat (Calcilit 4), des Fluorophors NADH und des Farbstoffes New Coccine, sowie das Intensitätsspektrum der LED, sind in Abbildung 14 dargestellt.

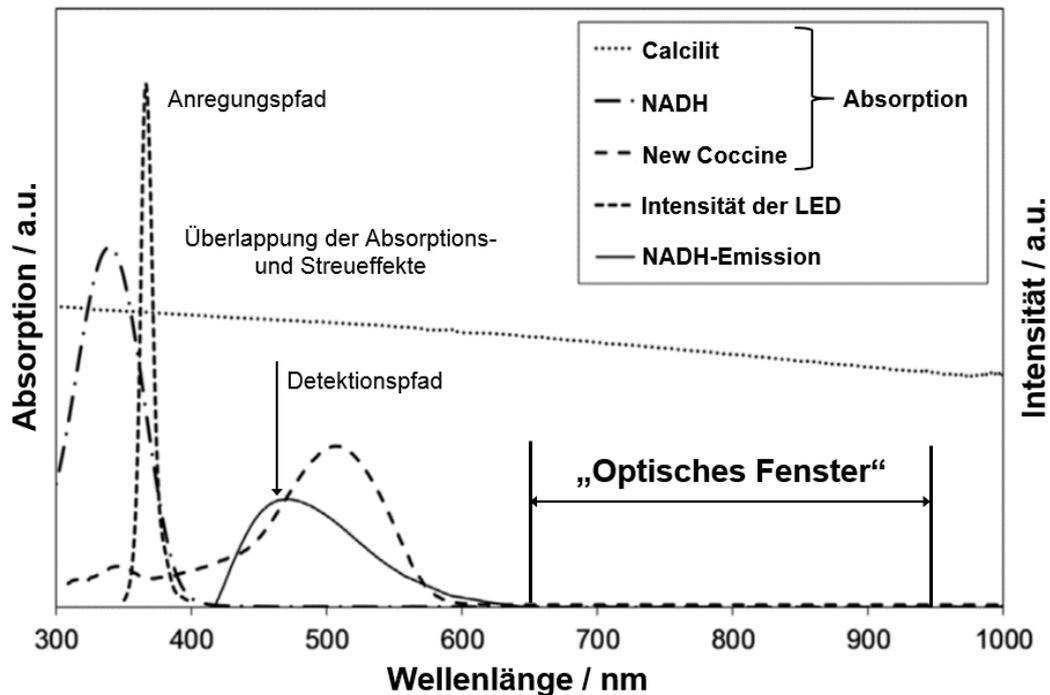


Abbildung 14: Intensitätsspektrum der UV-LED bei einer Wellenlänge von 365 nm, Absorptionsspektren von NADH und NC (gestrichelte Linien) und Pseudoabsorptionsspektrum der lichtstreuenden Suspension Calcilit 4 (gepunktete Linie), Fluoreszenzintensitätsspektrum von NADH (durchgezogene Linie), Abbildung nach [3].

Dadurch werden Überlagerungseffekte auf dem Anregungs- und Detektionspfad visualisiert. Die gemessene Intensität nimmt bei zunehmender Absorberkonzentration ab. Folglich dämpft ein Absorber im Anregungs- und/oder Detektionspfad der Fluoreszenzmessung die Emission von NADH mit steigender Konzentration.

Das in die streuende Suspension eingebrachte Licht, wirkt sich hingegen auf den gesamten Wellenlängenbereich in Form einer weitläufigen Pseudoabsorption (in Transmissionsanordnung) aus. Unter Pseudoabsorption wird ein, durch Streuung verursachter, scheinbarer Absorptionseffekt in Transmissionsanordnung verstanden [86]. Dieser liegt darin begründet, dass Photonen aus dem Strahlengang der translatorischen Richtung weggestreut und nicht auf den Detektor abgebildet werden. Mittels Variation der Calcilit-Konzentration kann das Streuverhalten des Phantoms bzw. der Streukoeffizient auf das jeweilige Gewebe angepasst werden. Die VIS-Intensitätsspektren in Abbildung 15 (a) zeigen den Einfluss des Absorbers NC auf die Fluoreszenzemission zwischen 400 und 600 nm.

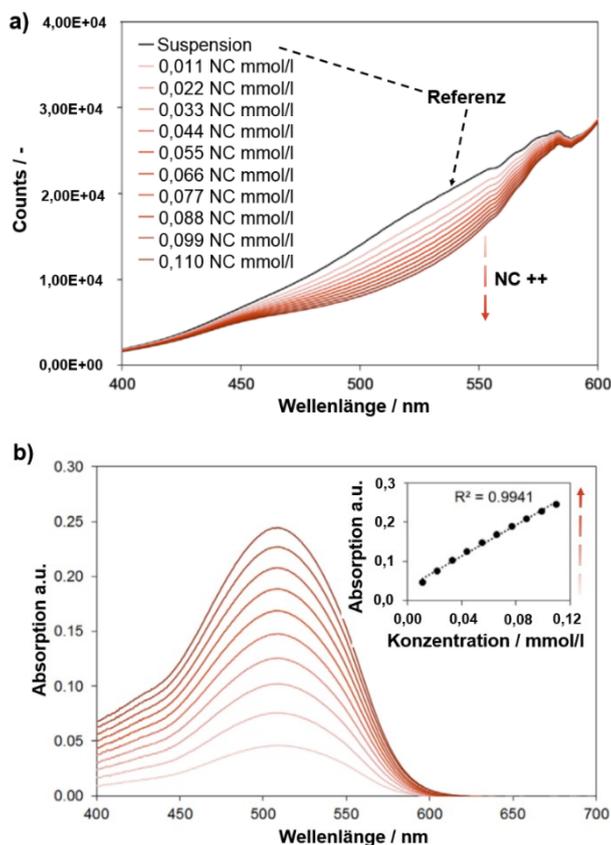


Abbildung 15: (a) Intensitätsspektren im Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm für eine Suspension von 2,7 Gew.-% Calcilit (schwarze Kurve) und Suspensionen mit verschiedenen NC-Konzentrationen (rote Kurven). (b) Absorptionsspektren von Suspensionen, die NC, Wasser und Calcilit im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm enthalten, wobei das Intensitätsspektrum unter Rückstreuung (2,7 Gew.-% Calcilit) als Referenz dient [3].

Als Referenz zur Berechnung dient die reine Calcilit-Suspension ohne den Farbstoff (schwarze Kurve in 15 (a)). Zur besseren visuellen Interpretation der Graphen wurde ein Farbgradient von hell- nach dunkelrot eingeführt. Durch Berechnung der Extinktion zwischen 400 und 600 nm kann ein lineares Verhalten zwischen dem Absorptionsmaximum nahe 510 nm und der Konzentration von NC beobachtet werden (Abbildung 15 (b)). Das lineare Verhalten zwischen Absorption und NC-Konzentration im untersuchten Bereich ist rechts oben dargestellt. Die Konzentrationsermittlung eines flüssigen Farbstoffes in einer lichtstreuenden Suspension wurde damit erfolgreich nachgewiesen. Dies ist anhand des Bestimmtheitsmaßes zu erkennen. Für die Bestimmung der Konzentration von gelöstem NADH, trotz der Anwesenheit von die Messung störender Partikel, ist die Erarbeitung dieses Zusammenhangs von elementarer Bedeutung.

3.4 Einfluss der Gewebestreuung auf die Fluoreszenzemission von NADH

Die Hauptabsorber im menschlichen Gewebe sind Hämoglobin und Wasser, deren Absorptionsspektren in Abbildung 16 dargestellt sind. Hämoglobin ist hauptsächlich für die Absorption von Licht unter 600 nm verantwortlich. Wasser dominiert die Absorption bei Wellenlängen größer 940 nm. Zwischen 600 und 940 nm sind die Extinktionen signifikant niedriger als in den umgebenden spektralen Bereichen. Hierbei handelt es sich um das sogenannte „optische Fenster von Gewebe“, das hauptsächlich von Streueffekten dominiert wird. In Rückstreuordnung wird die Absorption bei steigendem Streugehalt verringert, da die Streuvorgänge die Eindringtiefe des Lichtes verkürzen und damit die relevante Lauflänge des Lichtes durch den Absorber reduziert wird. Dadurch steigt das Fluoreszenzsignal mit steigendem Streugehalt an.

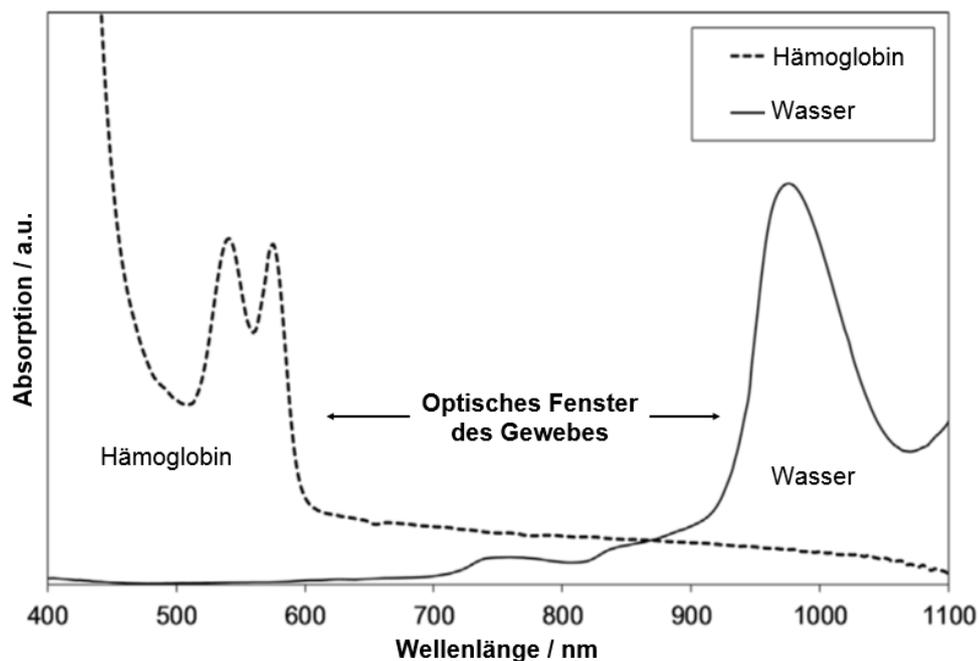


Abbildung 16: Die Absorptionsspektren von Hämoglobin (gestrichelte Linie) und Wasser (durchgezogene Linie) rahmen das optische Fenster ein, Abbildung nach [3].

3.5 Algorithmus für quantitative Fluoreszenzmessungen durch Berücksichtigung einer Streulichtkorrektur im flüssigen Gewebephantom

Wenn zwischen den Peakhöhen und der NADH-Konzentration im Gewebephantom keine Streueffekte berücksichtigt werden, führt dies zu fehlerhaften, verfälschten

Ergebnissen. Daher ist es notwendig, einen Algorithmus zu entwickeln, der in der Lage ist, Matrixänderungen wie Schwankungen der Partikelkonzentration zu kompensieren. Die Veränderung der Streulichtspektren durch unterschiedliche Streuerkonzentrationen, jedoch konstantem NADH ist in Abbildung 17 veranschaulicht.

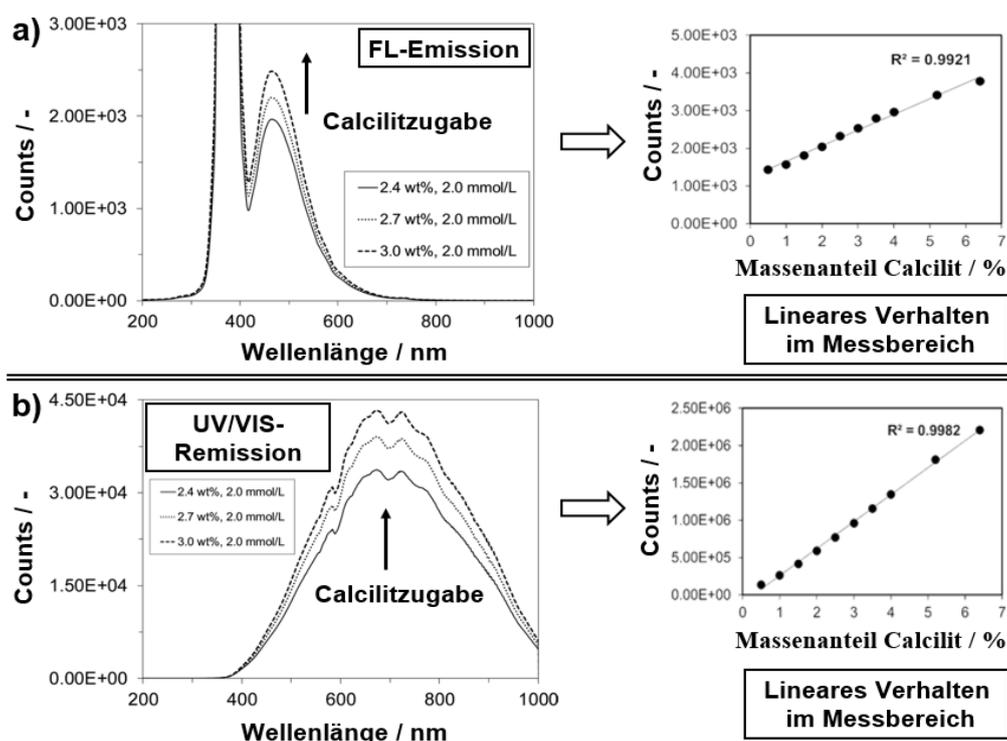


Abbildung 17: (a) Fluoreszenzemissionsspektren $C_{\text{NADH}} = 2,0 \text{ mmol/l}$ mit unterschiedlichen Calcilit-Konzentrationen. Die FL-Emission nimmt zu, wenn die Calcilit-Konzentration von 2,4 Gew.-% (durchgezogene Linie) auf 2,7 Gew.-% (gestrichelte Linie) und dann auf 3,0 Gew.-% (gestrichelte Linie) ansteigt. Rechts unten: Intensität der Fluoreszenzemissionsspektren zwischen 465 und 850 nm einer Suspension $C_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol/l}$ und verschiedenen Calcilit-Konzentrationen. (b) VIS-Rückstreuungsspektren zwischen 200 und 1000 nm. Links unten: Integrationsbereich einer Suspension von 600 bis 940 nm ($C_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol/l}$ und verschiedenen Calcilit-Konzentrationen). Die NADH-Konzentrationen wurden im Bereich von 0 bis 2,0 mmol/l variiert (Schrittweite 0,2 mmol/l), Abbildung nach [3].

Im Experiment wird der Fluorophor-Gehalt für diese Messung mit 2,0 mmol/l NADH konstant gehalten. Die Calcilit-Konzentrationen wurden im Bereich von 2,4 Gew.-% bis 3,0 Gew.-% variiert. Hierbei nimmt die gemessene Fluoreszenzemission mit zunehmender Streuerkonzentration zu, obwohl die Fluorophor-Konzentration konstant gehalten wird. Weitere Messungen zeigen, dass die VIS-Rückstreuungsspektren

(siehe Abbildung 17 (b)) mit konstanten Calcilit-Konzentrationen nahezu unbeeinflusst bleiben, obwohl die Fluorophor-Konzentration von 0 mmol/l bis 2 mmol/l variiert wird. Eine mathematische Korrektur in Form eines effizienten Algorithmus wird im Folgenden beschrieben. Zunächst ist es wichtig, die Streuerkonzentration möglichst genau zu erfassen. Durch Integration des Spektrums im optischen Fenster von 600 bis 940 nm konnte die Calcilit-Konzentration unabhängig von Matrixeinflüssen mit Vorhersagefehlern unter 1 % bestimmt werden (siehe auch Abbildung 17 (b)). Hierbei wurde mittels dreier Punkte kalibriert und mit einem Testset im Messbereich der mittlere Fehler ermittelt. Die ermittelten Calcilit-Konzentrationen dienen nun dazu, die verschiedenen NADH-Konzentrationen zu korrigieren. Für die Calcilit-Konzentrationen zwischen 2,4 und 3,0 Gew.-% wird eine lineare Beziehung zwischen der Fläche des gewählten Rückstreubereiches und der Konzentration identifiziert. Aus der Übereinstimmung mit dem linearen Modell ist ersichtlich, dass die Intensitäten linear mit der Calcilit-Konzentration (zwischen 0,5 und 6,4 Gew.-%) ansteigen. Ebenso konnte ein lineares Verhalten der Intensitäten der FL-Emissions-Peakhöhe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17 (a)).

Durch diese linearen Abhängigkeiten ist es möglich, einen einfachen Algorithmus für einen bestimmten Streubereich zu entwickeln. Basierend auf den Trainingssets an den Messbereichsgrenzen bei Calcilit-Konzentrationen von 2,4 Gew.-% und 3,0 Gew.-%, unter Variation der NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 2,0 mmol/l mit der Schrittweite 0,2 mmol/l wird der Messbereich aufgespannt.

Mittels Gleichung (1) wurden die gemessenen Intensitäten der Fluoreszenzemission approximiert und die Fehlerquadratsumme der einzelnen Werte minimiert. Detaillierte Informationen über die Vorgehensweise finden sich im Teil „Material und Methoden“. Die Approximation geschieht über die Variation der Koeffizienten A, B und C. Um eine unbekannte NADH-Konzentration im Gewebephantom vorherzusagen, wird die Streuerkonzentration zunächst durch VIS-Spektroskopie bestimmt.

Die gemessenen und für eine unbekannte Streuerkonzentration (2,7 Gew.-% Calcilit) vorhergesagten NADH-Konzentrationen, sind in Abbildung 18 (a) dargestellt. Alle Messungen werden 4-fach-bestimmt und sind als Säulen in Abbildung 18 (b) dargestellt. Mit diesem Modell wurde ein mittlerer quadratischer Fehler (RMSEP) von 0,093 mmol/l erreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass der vorgestellte Algorithmus zur Bestimmung unbekannter Fluorophor- und Streuerkonzentrationen im experimentellen Bereich zwischen 2,4 und 3,0 Gew.-% anwendbar ist. Die Korrelation der

vorhergesagten im Vergleich zu den wahren NADH-Konzentration mit 2,7 Gew.-% Calcilit und verschiedenen Fluorophor-Konzentrationen, ist in Abbildung 18 (a) oben links dargestellt ($R^2 = 0,9806$). Trotz der Einfachheit des vorgestellten Algorithmusses beträgt der mittlere quadratische Fehler der Vorhersage (RMSEP) 0,093 mmol/l.

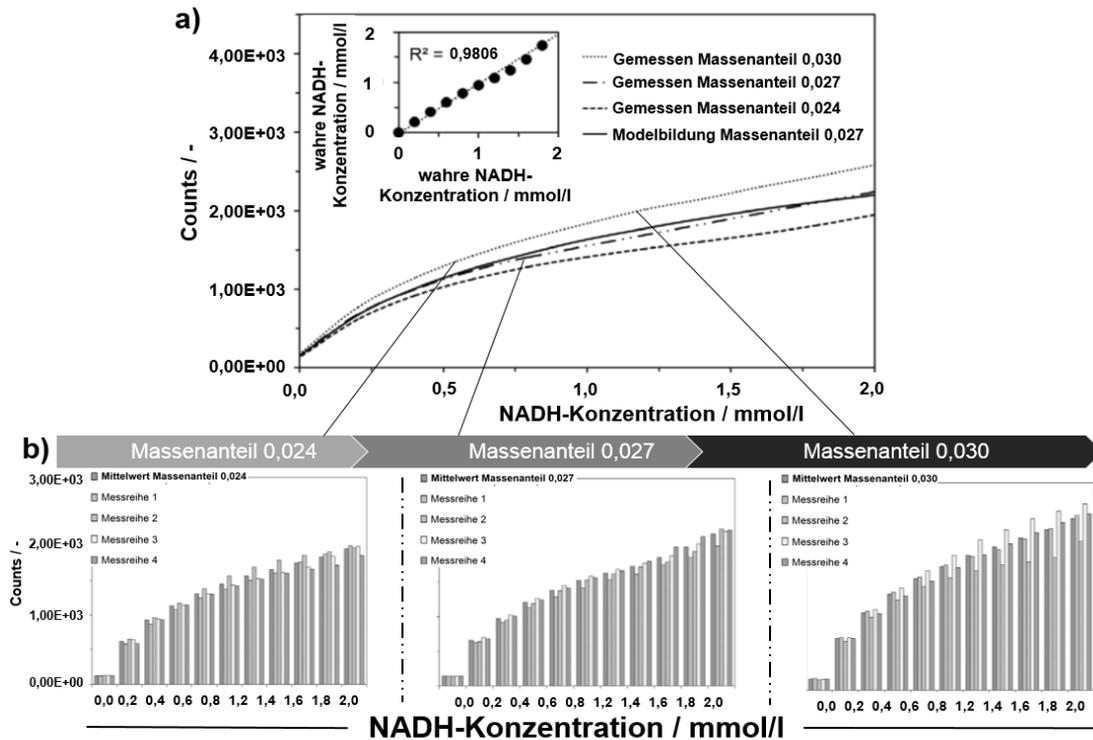


Abbildung 18: (a) Vergleich der vorhergesagten FL-Emissionsintensitäten bei 465 nm (durchgezogene Linie) und gemessenen, (gestrichelte und gepunktete Linien) in einem NADH-Konzentrationsbereich von 0 mmol/l und 2,0 mmol/l. Die NADH-Konzentrationen entsprechen 2,4 Gew.-% und 3,0 Gew.-% der Gesamtmasse, Calcilit in verschiedenen Konzentrationen wird verwendet, um den experimentellen Streubereich zu definieren. Ein Testset wird bei 2,7 Gew.-% Calcilit gewählt, um die vorhergesagten und gemessenen NADH-Konzentrationen miteinander zu vergleichen und die Leistungsfähigkeit zu ermitteln. Links oben: prognostizierte gegen wahre NADH-Konzentration. (b) Gemessene Emissionsintensitäten bei 465 nm unter Verwendung von 2,4 Gew.-%, 2,7 Gew.-% und 3,0 Gew.-% Calcilit- und NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 2,0 mmol/l. Die verschiedenen unabhängigen Messreihen ($n = 4$) unterscheiden sich durch die verschiedenen Graustufen in den Spalten, Abbildung nach [3].

Die Leistungsfähigkeit des vorgestellten Algorithmusses liegt in der Möglichkeit einer quantitativen NADH-Emissionsmessung nahezu frei von störenden Matrixeinflüssen durch den Streukoeffizienten in einem Gewebephantom unter Verwendung der multispektralen Stichnetel als Immersionssonde.

3.6 Absorptions- und Streueigenschaften von Gewebe

Um die Erkenntnisse aus den Trainingssets (Calzilit, NADH) auf die reale Gewebeumgebung zu übertragen, wird zunächst das Absorptions- und Streuverhalten von Gewebe vermessen. Sowohl literaturbekanntes Wissen als auch eigene Erfahrungen (siehe Tabelle 1) wurden direkt in die Bewertungsmethoden und die Interpretation von Spektren einbezogen.

Tabelle 1: Spektroskopische Techniken und optische Einflüsse/Informationen auf die Messung.

Spektroskopie-Technik	Effekte	Messbare Parameter/ Medizinische Relevanz	Lit.
Wellenlängen-bereich	Chemische Absorption Morphologie		
VIS 380-780 nm	Streuung / Absorption	In-vivo Ermittlung der Gewebefarbe <ul style="list-style-type: none"> XYZ/sRGB unter Verwendung einer Halogenlampe für natürliche Farbgebung 	[87]
VIS 450-600 nm	Absorption in dieser Arbeit sehr schnelle Abtastrate umgesetzt	In-vivo Blutfluss <ul style="list-style-type: none"> Blutdruck, Fließgeschwindigkeit, Puls 	[88]
VIS/NIR 600-940 nm	Streuung Pseudo- Absorption des Gewebes	Nachweis von nahezu reiner Gewebestreuung Streukoeffizienten, Apoptose, Nekrose, Proliferation	[3,89]
650-1000 nm	Absorption Hämoglobin	Hb-Gehalt (Gesamt, oxy- und deoxy- Hb) <ul style="list-style-type: none"> Angiogenese, Hypoxie 	
NIR			[24,90]
bei 920, 1040, 1210, 1730 und 1760 nm	Absorption Fett	Fettgehalt <ul style="list-style-type: none"> adipöses Gewebe erkennen (Fettgehalt) 	
bei 980, 1444 und 1944 nm	Absorption Wasser	Wassergehalt <ul style="list-style-type: none"> Dehydration 	
Banden bei 1200 nm, near 1500, 1725 und eine Schulter bei 1690 nm	Absorption Kollagen	Kollagengehalt Kollagen (hoch, niedrig)	
Fluorescence Emissionsmaximum bei circa 460 nm	Emission NADH	NADH-Gehalt <ul style="list-style-type: none"> Wichtiger Parameter innerhalb des Energiestoffwechsels Redoxverhältnis, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Hypoxie 	[91,92]

Die Tabelle ist in drei Segmente (Spektroskopie-Techniken) unterteilt. In diesen Unterteilungen werden relevante Absorptions-, Streu- und Fluoreszenzeffekte beschrieben. Hämoglobin und Wasser sind die Hauptabsorber des Gewebes. Der rote Blutfarbstoff ist verantwortlich für die Absorption von Licht unter 600 nm, hauptsächlich im grünen Spektralbereich.

Die Wasserabsorption setzt bei etwa 940 nm am langwelligen Ende des optischen Fensters ein. Wie bereits ausgeführt, wird der Bereich zwischen 600 und 940 nm als „optisches Fenster“ bezeichnet. Daher können in diesem Bereich Rückschlüsse auf das Rückstreuverhalten von Gewebe mit geringer Störung durch Chromophore gezogen werden.

3.7 *In-vitro*-Voruntersuchungen an Muskel- und Fettgewebe

In-vitro wurden Fett- und Muskelgewebeproben multispektral untersucht und seriell UV/VIS- und NIR-Informationen generiert (siehe Abbildung 19). Durch die Beleuchtung mit einer breitbandigen Halogenlichtquelle und zwei Spektrometern, optimiert für den UV/VIS und NIR-Bereich, sind die Streu- und Absorptionseigenschaften über einen weiten Spektralbereich von 200 bis 1900 nm nachweisbar. Die dominierenden Absorptionspeaks bei 430 und 560 nm sind charakteristisch für das rote Blutpigment (Hb). Muskelgewebe ist im Vergleich zu Fettgewebe deutlich besser mit Blut versorgt und weist eine entsprechend hohe spektrale Extinktion im Grünen auf. Dies ist visuell deutlich erkennbar an seiner roten Farbe. Das absorptionsarme optische Fenster zwischen den Absorbern Wasser und oxy-Hb ist in Abbildung 19 oben links dargestellt.

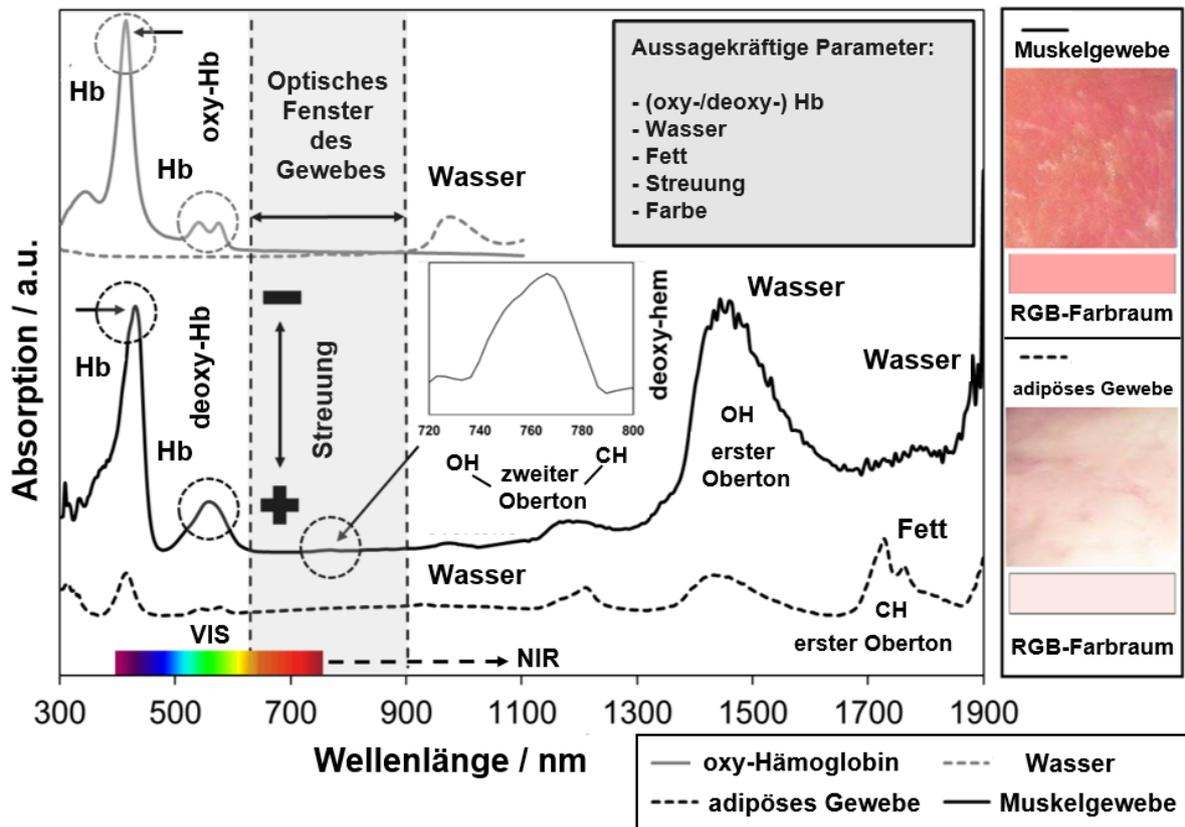


Abbildung 19: Simultan erzeugte UV/VIS-NIR-Absorptionsspektren von Muskel- und Fettgewebe unter Verwendung der multispektralen Stichsonde. Die Streueigenschaften sowie die Hauptabsorber (Hämoglobin, Wasser, Fett) können direkt erfasst werden. Das optische Fenster zwischen oxy-Hämoglobin und Wasser ist oben links dargestellt. Die vorhergesagten Gewebefarben sind unter den Fotos links dargestellt.

Das Rückstreuungssignal des optischen Fensters ist im Fettgewebe deutlich höher als im Muskelgewebe.

Die drei spezifischen Wasserbanden, bei 980, 1444 und 1944 nm [24], können in beiden Gewebearten detektiert werden. Sie sind jedoch deutlich dominanter im Muskelgewebe [93]. Die Banden im NIR-Bereich, bei ca. 920, 1040, 1210, 1730 und 1760 nm, sind charakteristisch im Fettgewebe vertreten [90].

Zusätzlich zu den Spektraldaten von Muskel- und Fettgewebe ist auf der rechten Seite ein Foto mit aus den Spektraldaten berechneter RGB-Farbe abgebildet. Ein Planck'scher Strahler A hat laut Internationaler Beleuchtungskommission (CIE) eine Farbtemperatur von 2854 K. Die Wolfram-Halogen-Leuchte, die in dieser Arbeit verwendet wurde, eine ähnliche Spezifikation von 2900 K (Zeiss AG, Jena, Deutschland).

3.8 Proof of Concept der multispektralen *in-vivo*-Klassifikation von gesundem und malignem Gewebe

Zur Klassifizierung von benignem und malignem Gewebe wurden *in-vivo*-Messungen in einem Tiermodell unter Verwendung des vorgestellten Messsystems durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die spektralen Daten der drei spektroskopischen Techniken UV/VIS, NIR und FL. Anschließend macht eine Zusammenführung der Informationsgehalte dieser spektroskopischen Techniken in Form von spektralen Varianzen in den optischen Eigenschaften, eine Klassifizierung von gesundem und bösartigem Gewebe möglich. Abbildung 20 ist in die folgenden fünf Zeilen unterteilt: dem Vergleich der spektralen Daten von UV/VIS, NIR und FL der Gewebetypen, einem PCA-Streudiagramm und einem Loading-Plot. Der Loading-Plot beschreibt die jeweiligen virtuellen Sensoren, die auf photometrischen Kanälen von ermittelten, aussagekräftigen Kanälen beruhen, die eine hohe spektrale Dynamik aufweisen.

a)

UV/VIS-NIR-Spektrum

Probe

Weitere

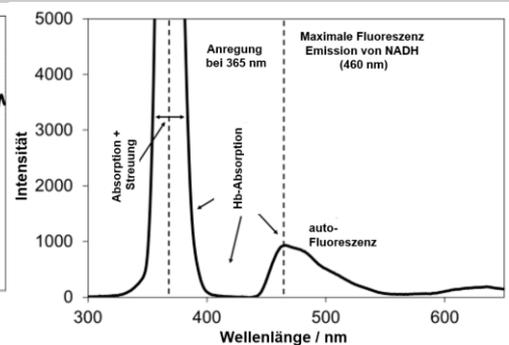
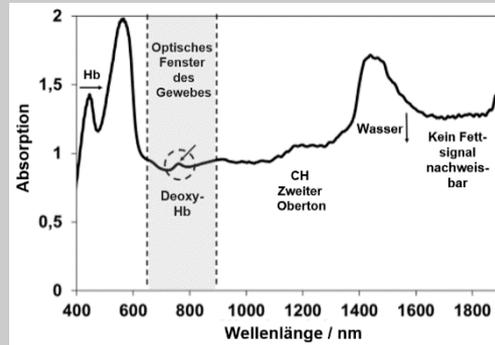
Informationen

Fluoreszenz (FL) - Spektrum

Malignes

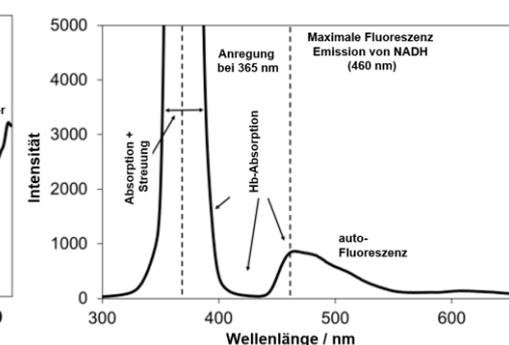
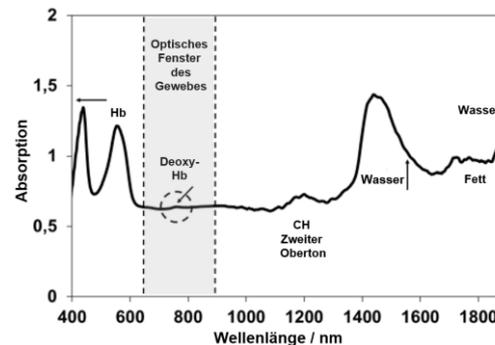
Gewebe

Erhöhte Hb-
Beladung;
Reduzierte O₂-
Sättigung;
Wasser-, Fett-
und Streupegel
verringert; Auto-
FL-Emission
reduziert



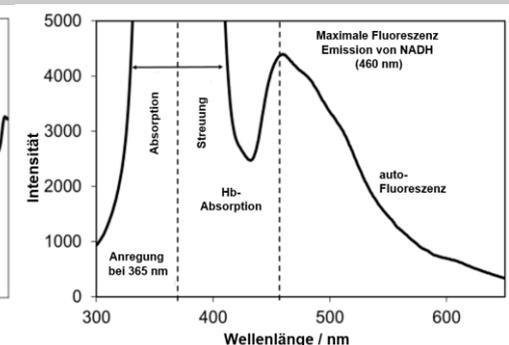
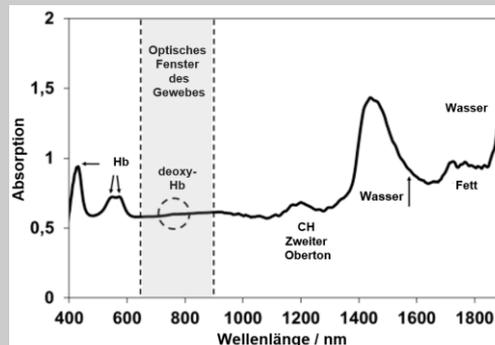
Randzone

Mittlerer Hb-
Gehalt und O₂-
Sättigung;
Wasser-, Fett-
und Streupegel
reduziert; Auto-
FL-Emission
reduziert



**Subkutanes
Gewebe in
unmittelbarer
Nähe**

geringer Hb-
Gehalt; hohe O₂-
sättigung;
erhöhte Wasser,
Fett und FL-
Signalpegel



Spektrale Unterschiede

(in den Abbildungen markiert)

→ VIS: Hb-Gehalt (oxy-/deoxy)

resultierende RGB-Farbe

PCA Score und Loading plot

→ NIR: Fett, Wasser

→ FL: 365 nm auto-FL

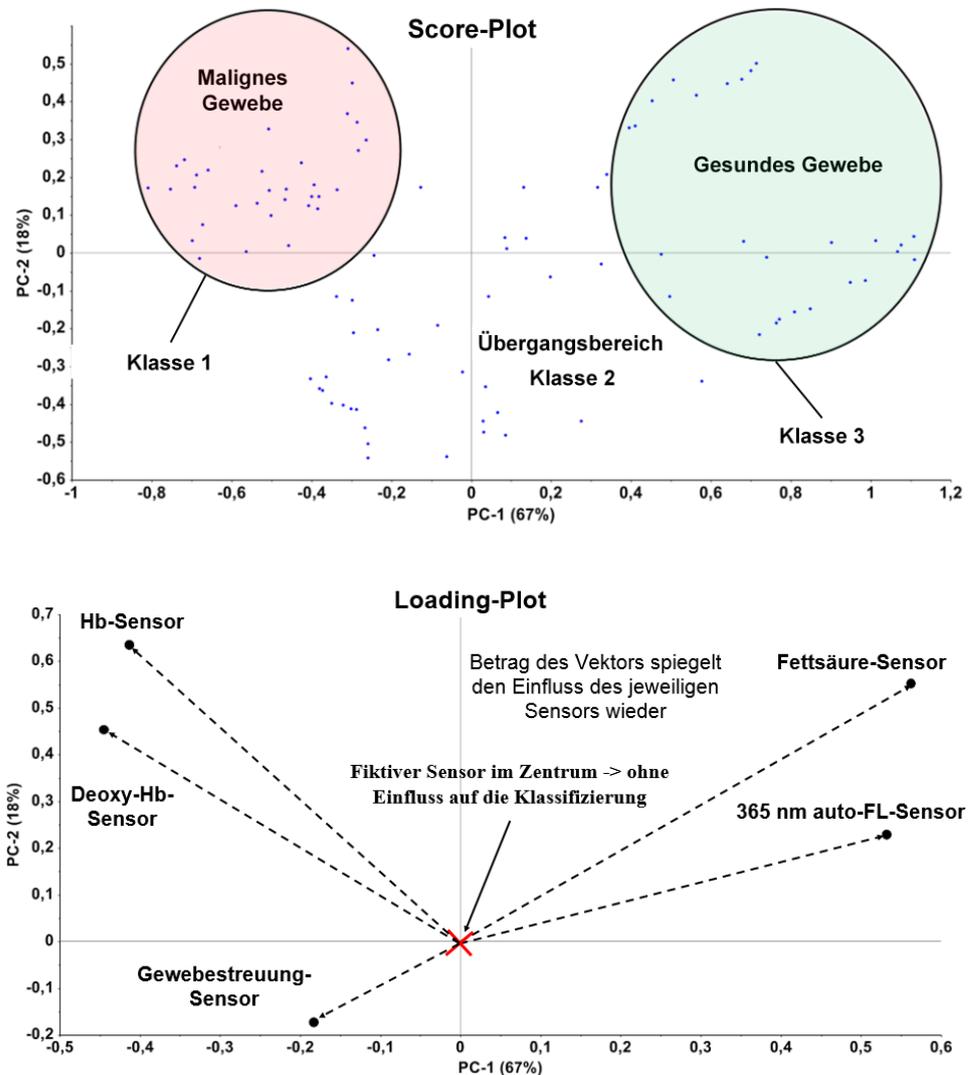
→ Bei allen Techniken:

Morphologie (Streuung)

b)

→ gewonnen aus den multispektralen Daten mit vorgeschalteter virtueller Photometerstruktur

Drei Klassen identifizierbar: Malignes Gewebe, Übergangsbereich und gesundes umliegendes Gewebe.



Gewichtung der jeweiligen Sensoren im Loading-Plot

Abbildung 20: a) Exemplarisch sind in-vivo-Absorptionsspektren (UV/VIS, NIR und FL) zur Darstellung der Absorptions-, Streu- und Emissionseigenschaften der einzelnen Gewebeklassen dargestellt. b) Unter Verwendung einer 2D-Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist die Klassifikation in einem Score-Plot dargestellt. Die Gewichtung der Informationsgehalte der virtuellen Sensoren enthält der Loading-Plot.

Das Messsystem kann die folgenden biochemischen und morphologischen Gewebeeigenschaften den einzelnen Gewebetypen klar zuordnen:

Die FL-Spektren beinhalten die Rayleigh-Streuung der 365 nm-LED additiv zur Fluoreszenzemission als zusätzliche Information.

Die LED zeigt eine starke Absorption im malignen Gewebe, hauptsächlich verursacht durch die stärkere Hb-Absorption. Die FL-Emission bei etwa 460 nm ist für malignes Gewebe deutlich niedriger als für das umliegende gesunde Gewebe.

Die Absorptionsbanden im VIS-Bereich werden durch die Gewebefarbstoffe/Pigmente verursacht und von der elastischen Streuung überlagert (siehe Abbildungen 19/20). Eine höhere Absorption in Remissionsanordnung bedeutet weniger Rückstreusignale. Im Gegensatz dazu führt mehr Streuung, die sehr stark von der Morphologie des Gewebes (Größe, Struktur, innere Oberfläche usw.) abhängig ist, zu einer geringeren Absorption, da mehr Photonen zurück in die Detektionsfaser gestreut werden. Dieses Rückstreuverhalten kann fast ohne Matrixeinflüsse im optischen Fenster zwischen 650 und 900 nm verfolgt werden. Diese Streuung ist im subkutanen Gewebe erhöht.

Im malignen Gewebe ist der Gesamt-Hb-Gehalt im Gegensatz zum umgebenden Gewebe deutlich erhöht. Diese Effekte werden im Folgenden näher beleuchtet:

- Eine erhöhte Absorptionsbande im Grünen bei einer Wellenlänge von 560 nm weist auf eine höhere Hb-Beladung hin.
- Die Bandenlage bei 430 nm wird durch Senkung des Oxy/Deoxy-Hb-Verhältnisses nach rechts verschoben.
- Zwei sich überlagernde Absorptionsbanden zwischen 500 und 600 nm sind oxy-Hämoglobin zuzuordnen und bilden bei hoher Sauerstoffbeladung des Gewebes bildlich einen „Doppelhöcker“ aus.
- Die Bande inmitten des optischen Fensters frei von Quereinflüssen durch andere Absorber bei 760 nm ist charakteristisch für Deoxy-Hb.

Bei NIR-Gewebemessungen ist Wasser das spektral dominierende Molekül. In den vorgestellten Messungen ist der erste Oberton der O-H-Streckschwingung bei 1470 nm zu stark für eine quantitative Analyse.

Die hohe Absorption führt zu einer gerätebedingten, scheinbaren Sättigung der Absorption. Diese wird dadurch verursacht, dass bei zu geringem Photonenfluss auf den Detektor Offsets durch thermisches Rauschen oder Auslesefehler der Zeile dominieren und das Signal verfälschen. Die Steigung der Absorptionsflanken kann jedoch zum Nachweis der Linearität des Sensors genutzt werden. Die Absorption bei ca. 1750 nm ist in adipösem Gewebe erhöht (siehe auch Abbildung 19) und im Tumor durch den sehr niedrigen Fettgehalt quasi nicht vorhanden.

Werden in der Auswertung nur die beiden ersten Hauptkomponenten betrachtet, weisen diese bereits einen Informationsgehalt von ca. 85 % auf. Die erste Hauptkomponente allein ergibt einen Wert von 67%. Dieser wird durch die Hinzunahme der zweiten Hauptkomponenten um weitere 18 % gesteigert. Die Loadings repräsentieren den gewichteten Einfluss der virtuellen Sensoren auf das Modell (siehe Abbildung 20).

3.9 *In-vivo*-Stichverlauf der fünf virtuellen photometrischen Sensoren

Als Beispiel sind die Signale und der Mittelwert von drei Datenpunkten (gestrichelte Linie) während der Penetration der Analysenadel mit fünf virtuellen photometrischen Sensoren, startend von malignem und dann in gesundes subkutanes Gewebe vordringend, beschrieben und dargestellt:

1. Signalverlauf der Auto-FL-Emission des Gewebes (Abbildung 21)
2. Absorptionskanal der Fettsäuren (Abbildung 22)
3. Detektion des deoxy-Hb-Signal (Abbildung 23)
4. Detektion der Hb-Absorption (Abbildung 23)
5. Detektion der Rückstreuungseigenschaften (Abbildung 24)

Signalverlauf der Auto-FL-Emission des Gewebes

Das Signal des Fluoreszenz-Emissionskanals ist im malignen Gewebe stark abgeschwächt und nimmt im gesunden subkutanen Gewebe zu (siehe Abbildung 21).

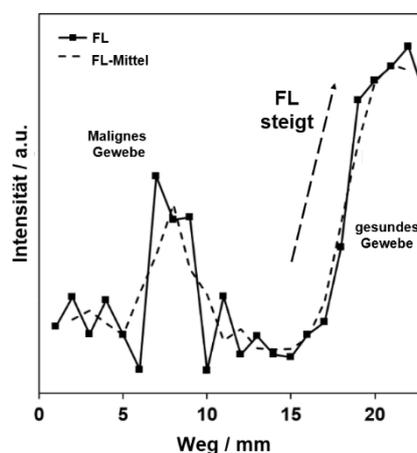


Abbildung 21: Auto-FL-Signal im Verlauf eines Durchstiches.

Absorptionskanal der Fettsäuren

Die Absorption von Fetten ist im malignen Gewebe deutlich geringer und im gesunden Unterhautgewebe erhöht (siehe Abbildung 22).

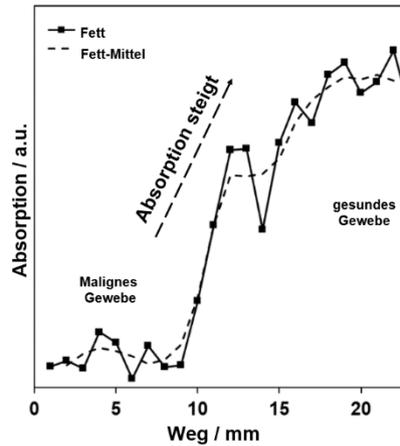


Abbildung 22: Sekundärsignal der Fettsäuren im Verlauf des Durchstiches.

Detektion der gewebeabhängigen deoxy-Hb- und der Gesamt-Hb-Absorption

Ein typischer Stichweg startend von malignem Gewebe mit hohem Deoxy-Hb-Gehalt (lokale Hypoxie) in gesundes Gewebe mit hoher Sauerstoffsättigung vordringend, ist in Abbildung 23 (rechts) dargestellt. Die deutlich verbesserte Blutversorgung ist auf der rechten Seite in Abbildung 23 (links) deutlich zu erkennen.

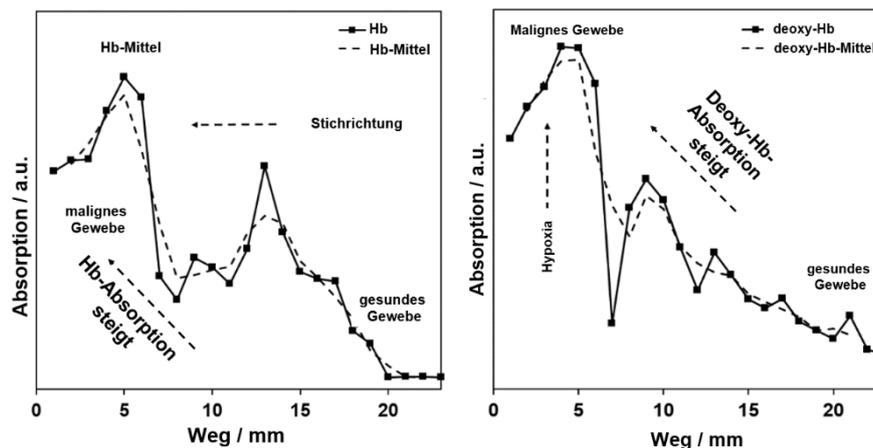


Abbildung 23: Auftragung der Deoxy-Hb- und der Gesamt-Hb-Absorption über den Stichweg startend von malignem Gewebe in gesundes subkutanes Gewebe vordringend.

Auswertung der elastischen Rückstreuungseigenschaften des Gewebes

Die elastische Lichtstreuung nimmt während des Stichvorgangs vom bösartigen in das gesunde Unterhautgewebe vordringend eindeutig zu. Dieses Phänomen ist an der geringeren Extinktion erkennbar, die einer höheren Rückstreuung in die Detektionsfaser am Sondenkopf entspricht. Darüber hinaus zeigen die Werte merkliche Schwankungen aufgrund lokaler Inhomogenitäten der Streukoeffizienten im Gewebe, siehe Abbildung 24.

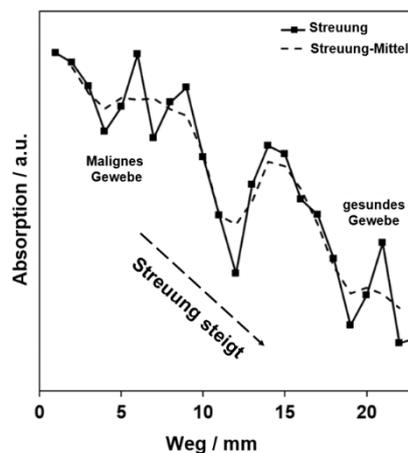


Abbildung 24: Absorption der elastischen Rayleigh-Streuung im Wellenlängenbereich des ersten optischen Fensters.

Potenziale und Vorteile des Stichsensors

Der Aufbau der Sonde wurde auf folgende Eigenschaften hin optimiert:

- Optimiertes Gewebepenetrierungsverhalten durch angeschrägten Sondenkopf und zwei Hinterschliffe. Die speziell für die Applikation ausgewählten Materialien Edelstahl oder Nitinol und das Epoxidharz sind biokompatibel, autoklavierbar und lassen sich für den Mehrfachgebrauch nachschärfen.
- Die Ermöglichung der multispektralen Untersuchung durch individuelle Auswahl und Verbindung der sieben optischen Fasern mit Lichtquellen, Spektrometern und anderen Sensoren (Spektrophotometer, Photometer) führt zu einem multifunktionalen Messsystem nach dem „Baukastenprinzip“.
- Sonographie- und MRT-Tauglichkeit, um das Risiko einer Fehlplatzierung mit möglichen strukturellen Schäden z. B. an Arterien, Nervenbündeln etc. zu minimieren [94]. Dies wird erreicht, zum einen durch eine Edelstahlkanüle und deren Ultraschallverhalten bzw. durch die einfache Kombinierbarkeit mit Biopsiesystemen und deren echogenen Markierungen für genaueste

Positionierungen. Zum anderen ist die MRT-Tauglichkeit durch die Werkstoffe Nitinol, Quarzglas und Polymere gegeben.

- Die Erkennung von Blutgefäßen und Blutansammlungen bzw. Pulsationsereignissen, hervorgerufen durch den Herzschlag (lokale *in-vivo*-Pulsmessung) eröffnet neue Applikationsmöglichkeiten.
- Die Sonde ist aus marktüblichen Elementen aufgebaut und kann wirtschaftlich produziert werden.

3.10 Evaluation der Raman-Sonde zur Messung von Stoffeigenschaften aus großen Abständen

Raman-Spektroskopie-Sonden sind für den direkten Kontakt oder für Untersuchungen aus sehr kurzer Entfernung optimiert. Um Sterilisationsprobleme und eine Biofilmbildung der Sondenspitze zu vermeiden oder die Sonde vom eigentlichen Messort bei hoher Sammeleffizienz räumlich zu entkoppeln, wurde zusätzlich zur Stichsonde eine Raman-Sonde mit großer Apertur entwickelt. Diese ermöglicht auch berührungslose *in-line*-Messungen aus großen Abständen und sogar durch Glasgefäße hindurch. Diese Sondenbauweise ist ebenfalls geeignet, um eine Einbindung überall dort zu realisieren, wo das Messequipment am Ort des Geschehens stört z. B. im Operationssaal. Speziell biologische Proben wie Fermentationsmedien, aber auch tierisches und menschliches Gewebe, zeichnen sich durch hohe Streukoeffizienten und Eigenfluoreszenz aus.

Daher wurde diese Sonde für eine Anregungswellenlänge von 785 nm möglichst langwellig innerhalb des optischen Fensters gewählt; allerdings so, dass noch ein konventioneller Silizium-Nachweis-Detektor eingesetzt werden kann.

3.11 Applikation und Evaluation der Sonde mit großer Brennweite durch Messungen bei verschiedenen Fensterdicken

Zunächst findet die Ermittlung der Leistungsfähigkeit des entwickelten SONDENSYSTEMS bei Versuchen durch optische Borosilikatfenster (Auer Lightning GmbH, Deutschland) statt. Hierbei wurde eine hohe Gegenstandsweite realisiert. Weiterhin wurde erprobt, wie sich eine störende Substanz (z. B. Glas) im Anregungs- und Detektionspfad

verhält. Die Glasart Borosilikat ist in diesem Fall ausgewählt worden, weil dieses Material als Standard in vielen Anwendungen eingesetzt wird.

Im Versuch werden zwei optische Fenster unterschiedlicher Schichtdicken (15, 25 mm) mit Anregungslicht und dem erzeugten Sekundärlicht auf Sende- und Empfangspfad durchstrahlt.

Als zu vermessender Test-Analyt dient Ethanol (96 Vol.-%, Artikelnummer 20905.365, VWR BDH Prolabo, Belgien), das in ein 50 ml Borosilikat-Becherglas als Vorlagegefäß gefüllt wird. Das 15 mm Borosilikatglasfenster wird orthogonal im optischen Weg zwischen Vorlagegefäß und Messsonde positioniert und fixiert (siehe Abbildung 25).

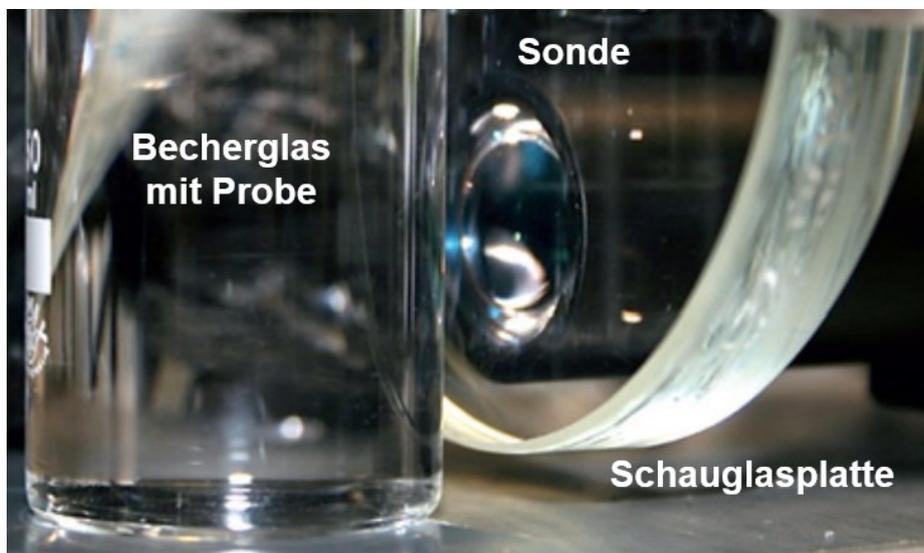


Abbildung 25: Messaufbau zur Raman-Messung durch ein 15 mm Borosilikatglasfenster (orthogonale Anordnung Fenster und SONDENSYSTEM), Abbildung nach [1].

Bei der Messung durch 15 mm Borosilikatglas kommt das SONDENSYSTEM (zöllige Plankonvexlinse, 25,4 mm Brennweite, freie Gegenstandsweite 17,6 mm) zum Einsatz. Das Ethanol-Spektrum und ein Referenzspektrum gegen Luft (Rohdaten, Integrationszeit: 8000 ms, Akkumulation:1, Anregungsleistung am SONDENKOPF: 180 mW) in einem Wellenzahlbereich von 300 bis 3100 cm^{-1} (803,93 bis 1037,47 nm) ist in Abbildung 26 dargestellt.

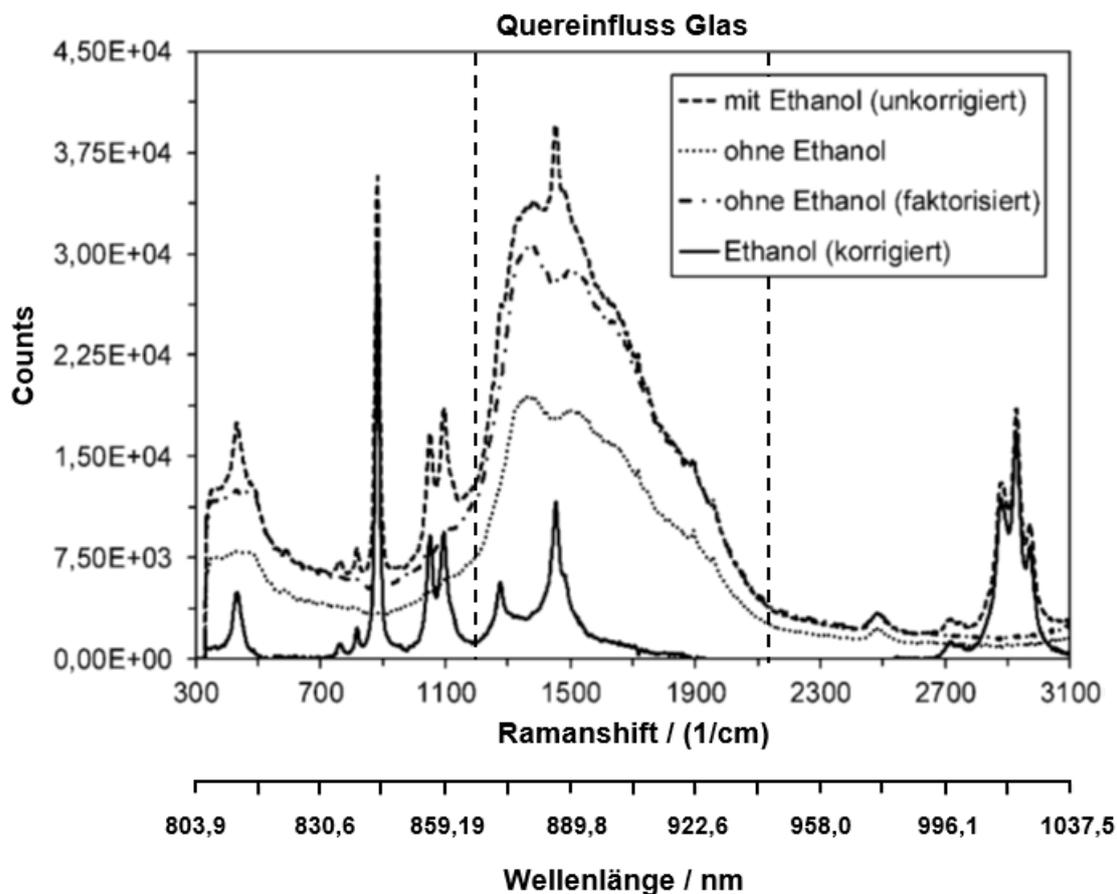


Abbildung 26: Raman-Spektren von Ethanol inklusive Referenz durch ein 15 mm dickes Borosilikatglasfenster mit dem langreichweitigen SONDENSYSTEM (Brennweite 25,4 mm, Integrationszeit 8 s, Akkumulation = 1), Abbildung nach [1].

Die Ethanolrohdaten weisen einen deutlichen Signaleinfluss des Borosilikatglases auf, der im reinen Ethanolspektrum nicht vorkommt. Dieser Einfluss wird direkt durch die Abbildung der Frontlinse im Medium bestimmt: Liegt dieser „Fokuspunkt“ knapp in der Flüssigphase, führt dies zu einem nachweisbaren spektralen Offset, hervorgerufen durch das Fenstermaterial (in diesem Falle Borosilikatglas) über das gesamte Spektrum.

Die spezifischen Ethanol-Peaks bei 880 cm^{-1} , 1055 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1479 cm^{-1} und $2878\text{--}2972\text{ cm}^{-1}$ (bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm entspricht dies: 843,25 nm, 855,88 nm, 858,90 nm, 888,11 nm und 1014,11 - 1023,87 nm) treten deutlich hervor [95,96]. Zur Kompensation des Untergrundes, welcher durch das Glas im Strahlengang hervorgerufen wird, dient ein einfacher Algorithmus: Durch Multiplikation mit einer empirisch ermittelten Konstante (so gewählt, dass sich der Untergrund des Ethanolspektrums mit demjenigen des Referenzspektrums deckt) werden alle Intensitätswertes des spektralen Bereiches multipliziert und dadurch der Borosilikat-

Untergrund an den Untergrund des Ethanolpektrums angepasst. Durch Subtraktion von Ethanolpektrum und faktorisierter Referenz wird ein quasi untergrundfreies Spektrum von Ethanol erzeugt.

Die Nachweisgrenzen wurden, wie in DIN 32645 beschrieben, bei einer Integrationszeit von 10.000 ms und zwölf Akkumulationen ermittelt. Ausgewertet wurde die Peakfläche der dominierenden Raman-Bande zwischen 879 und 881 cm^{-1} (843,18 und 843,32 nm) und 849 und 851 cm^{-1} (841,05 und 841,19 nm):

- Eigenbau: Zölliger Sondenoptik (25,4 mm Brennweite; 256 mW Anregungsleistung am Kopf) Nachweisgrenze: 0,839 g/l
- Eigenbau: 2-Zoll-Sondenoptik (32 mm Brennweite; 196 mW Anregungsleistung am Kopf) Nachweisgrenze: 0,726 g/l (tiefer, da höhere Sammeleffizienz durch Fresnel-Linse erreicht)
- Kommerzielle Sonde 1: process Raman-Probe (tec5 AG; 1,5 mm Brennweite 260 mW Anregungsleistung am Kopf, Nachweisgrenze: 0,466 g/l)
- Kommerzielle Sonde 2: Raman-Probe™ II (InPhotonics, USA; 7,5 mm Brennweite, 228mW Anregungsleistung am Kopf) Nachweisgrenze: 0,906 g/l

Die selbst entwickelten Sonden liegen trotz deutlich höherer, freier Gegenstandsweiten auf dem gleichen Leistungsniveau wie handelsübliche Raman-Sonden und können somit neue berührungslose Applikationen aus großen Abständen heraus erschließen und adressieren, z. B. Messungen in Zellkulturen oder auch Untersuchungen von Oberflächen wie beispielsweise Haut. Durch die Scal-up-Fähigkeit des Systems sind freie Gegenstandsweiten bis in den Meterbereich bei entsprechender Wahl der Frontlinsenoptik realisierbar.

Wichtig im medizinischen Bereich ist ein möglichst geringer Energieeintrag ins Gewebe. Daher ist es von höchster Priorität, diesen auf ein verträgliches Maß zu begrenzen. Der Zusammenhang zwischen Anregungsleistung und Raman-Signal ist linear. Eine doppelte Anregungsleistung führt zu doppeltem Signal und bei gleichem Rauschniveau zu einer Verdopplung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Hieraus ergibt sich ebenfalls eine um Faktor 2 kleinere Nachweisgrenze.

Betrachtet man ausschließlich die Photonen-Ausbeute, die am Detektor ankommt, führt eine Verdopplung der Integrationszeit bei gleichbleibender Anregungsleistung ebenfalls zu einer Verdopplung der Zählrate und folglich zu einer Verdopplung der Intensität. Allerdings steigt in der Regel auch das störende Untergrundsignal.

Dieser theoretische Zusammenhang wird im Folgenden auch praktisch untersucht: Das zuvor beschriebene Raman-System mit zölliger Frontlinse wird in der Anregungsleistung mit 5, 15 und 20 mW am Kopf variiert und die jeweilige Raman-Intensität zusätzlich gegen die Integrationszeit aufgetragen (Abbildung 27). Die Versuche werden mit Ethanol C = 96 Vol.-% in einem Borosilikat-Becherglas analysiert und bei einem Peak von 880 cm^{-1} ($843,25\text{ nm}$) ausgewertet. Es wird ersichtlich, dass die verringerte Laserleistung und damit der verringerte Photonenfluss des Primärlichtes durch längere Integrationszeiten kompensiert werden kann, weil in dieser Anordnung der Untergrund kaum steigt.

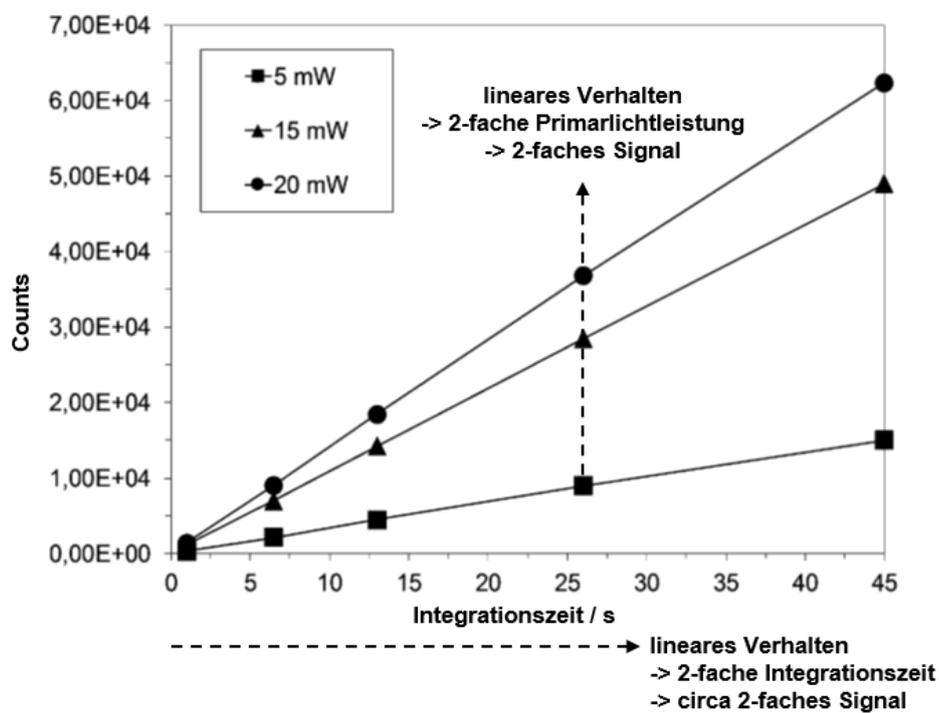


Abbildung 27: Peakhöhe bei 880 cm^{-1} ($843,25\text{ nm}$), hervorgerufen durch Stokes-Raman-Streuung in Ethanol bei Variation der Integrationszeit und Laserleistung. Alle Messungen wurden mit der zölligen Weit-Apertur-Optik durchgeführt, Abbildung nach [1].

Ermittlung der Leistungsfähigkeit des optischen Systems in applikationsnaher Umgebung

Um die Leistungsfähigkeit des Systems und dessen Scale-up-Fähigkeit des Arbeitsabstandes ohne Leistungsverlust zu verdeutlichen, werden nachfolgend fünf Versuche/Applikationen durchgeführt:

- Durchdringung verschiedener Dicken an Borosilikatglas: Verdeutlichung der Matrixeffekte und Auswirkung eines Scale-ups der Optik
- Applikation der Sonde zum Monitoring einer alkoholischen Gärung unter industrienahen Bedingungen während einer kontaktlosen Messung von außen durch den Glasmantel eines Borosilikatglas-Fermenters
- Verfolgung von Zweiphasenströmungen innerhalb einer Teflon-Kapillare mit einer sehr hohen Abtastrate von 333 Hz und entsprechender Stoffidentifikation beider Phasen. Diese Applikation wird zum einen durch die neuartige Sondengeometrie, zum anderen aber auch in Verbindung mit einem auf Photonfluss hin optimierten Spektrometer erreicht.
- Verfolgung einer chemischen Reaktion mittels Raman-Spektroskopie mit lediglich 7 mW Primärlichtleistung zur Reduktion der thermischen Belastung des Gewebes
- Herausarbeitung niedrigster Nachweisgrenzen für Raman-Streuung durch diese neue technologische Kombination

Untersuchung der Störeinflüsse verschiedener optischer Fensterdicken im optischen Pfad

Zunächst wird der Versuch „Durchdringung verschiedener Dicken“ an Borosilikatglas durchgeführt. Hierzu ist die Scheibe orthogonal zu den optischen Achsen und damit im Anregungs- und Detektionspfad der Sonde platziert. Sofort wird der Glaseinfluss sichtbar, wenn der optische Lichtweg durch eine höhere Glas-Schichtdicke sowohl auf dem Primär- als auch auf dem Sekundärpfad führt. Während dieser Transmission der Anregungsphotonen lösen diese beim Durchdringen des Fenstermaterials sowohl Raman-Streuung als auch Fluoreszenzemissionseffekte aus, die als parasitäres Signal auf dem Spektrum wahrgenommen werden.

Simultan verringert sich mit steigender zu durchdringender Schichtdicke, bei Messungen mit der zölligen Sonde, die Intensität des Ethanol-Raman-Signals, da der für das Signal maßgebende Bereich mit der höchsten Flussdichte an Primärlicht um

den Fokus zum Teil ins Borosilikatglas drifft und damit nicht voll zur Anregung des Analyten zur Verfügung steht – es wird mehr und mehr Glas angeregt (siehe Abbildung 28).

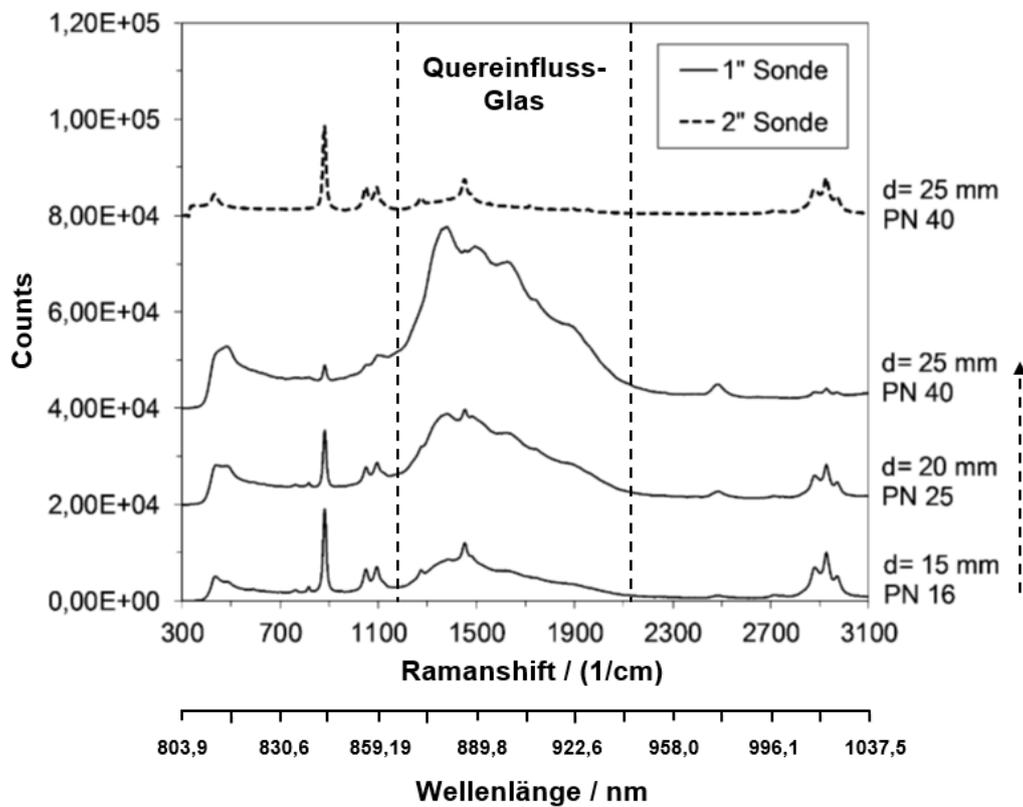


Abbildung 28: Sekundärlichtantwort (Fluoreszenzemission und Raman-Streuung) von Ethanol nach Anregung mit zölliger Optik (Brennweite: 25,4 mm) durch verschiedene Fenstertypen und -dicken und im Vergleich dazu eine 2-Zoll-Fresnel-Optik (Brennweite 32 mm), beide bei einer Integrationszeit von 10s und einer Akkumulation von 1, Abbildung nach [1].

Ab Glasdicken von 25 mm wird primär das Glas angeregt und nur noch in geringem Maße der Analyt. Weiterhin liegt dieser zudem außerhalb des Schärfetiefenbereiches der Sondenoptik und kann nur höchst ineffizient gesammelt werden. Durch die Implementierung einer Zwischenfokussierung und Aufweitung des zölligen Pfades auf 2 Zoll, sowie durch den Einsatz einer Fresnel-Optik, die eine deutlich höhere freie Gegenstandsweite aufweist, kann die Situation erheblich verbessert werden.

Das Durchdringen von 25 mm Borosilikatglas bei hohen Ethanol-Signalintensitäten und geringem störenden Borosilikat-Untergrund konnte mit dieser optischen Anordnung erfolgreich adressiert werden.

Validierung der Sonde in der Applikation „Monitoring einer alkoholischen Gärung“

Die beschriebenen optischen Eigenschaften prädestinieren das System für kontaktlose Anwendungen, bei dem die Durchdringung transparenter Materialien auf dem Weg zum Analyten unumgänglich ist. Mögliche Applikationen im medizinischen aber auch im industriellen Umfeld sind:

- Durchdringen von optischen Fenstermaterialien
 - Messungen durch Kunststoffe wie Vials, Bechergläser, Kapillare, Schläuche, und Einweg-Fermenter; hierbei sind z. B. Stoffidentifizierungen von Wirkstoffen bei Infusionsgabe zu nennen oder aber auch die Verfolgung von Analyten während der Dialyse
 - Messungen durch Gläser, wie Bechergläser, Schaugläser, Fermenter, Kapillare, Fensterzugänge in der Motorenentwicklung (Glasmotor) oder auch durch Fenster in Reinräumen und Gloveboxen
- Durchdringung von Flüssigkeiten
 - Messungen durch Flüssigkeiten in anderen Medien wie z. B. Doppelmantelreaktoren oder Zellkulturen (aq)
- Durchdringungen von Gasen aus großem Abstand
 - 2D-Scanning von Gewebe wie z. B. Hautoberflächen, Gewebeschnitte sowie Oberflächenkontaminationen durch geometrische Scale-up-Fähigkeit des Systems bis in den Meterbereich

Die praktische Anwendbarkeit der Weit-Apertur-Sonde wird während einer alkoholischen Gärung von außen durch einen Borosilikatglas-Fermenter getestet. Die Sonde durchdringt hierbei den Reaktormantel (Dicke: 9 mm) mit Primärlicht. Dieses wird als Sekundärlicht gestreut (Rayleigh- und Raman-Streuung), aber auch zur Fluoreszenzemission angeregt. Dieses Sekundärlicht durchdringt anschließend wieder den Reaktormantel und wird mit hoher Sammeleffizienz von der Sondenoptik via Lichtwellenleiter erfasst und an das Spektrometer geleitet (Abbildung 29).

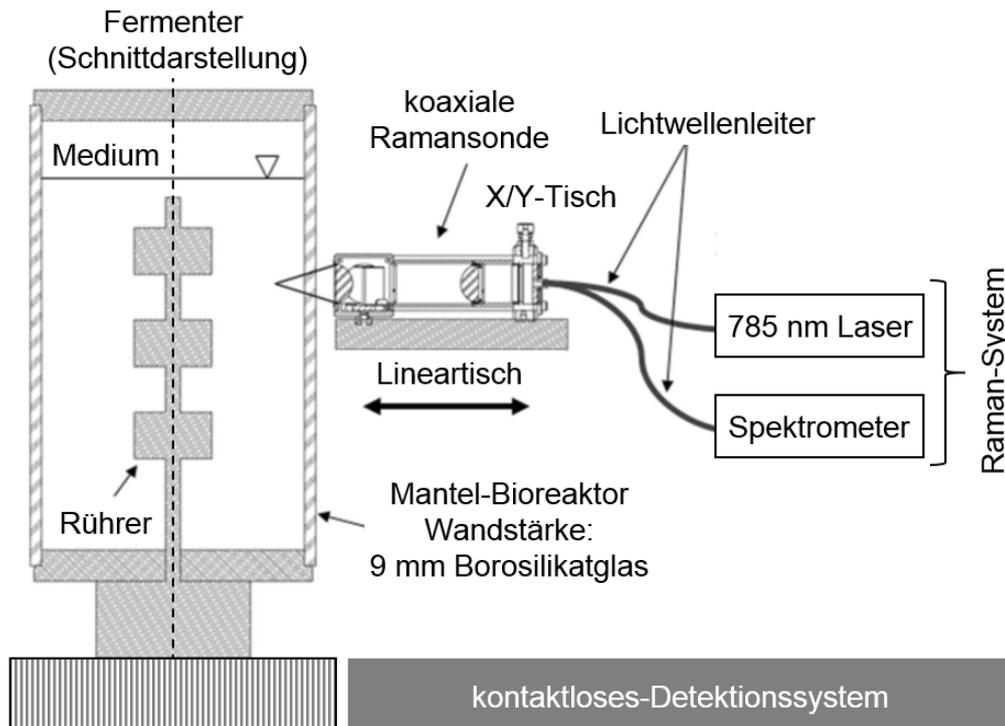


Abbildung 29: Schnittansicht der kontaktlosen Raman-Inline-Überwachung eines Borosilikatglas-Fermenters. Ein Linearsystem, ausgelegt als Gleitführung mit Arretierung, ermöglicht eine Variation des Sondenabstandes zum Reaktor und damit der Penetrationstiefe von Primär- und Sekundärlicht, Abbildung nach [4].

Die Sonde selbst ist auf einem Verfahrssystem fixiert, das eine Translation der Sonde in optischer Pfadrichtung mittels Gleitführung sicherstellt. Diese geführte, translatorische Bewegung, ist von höchster Bedeutung, um die Penetrationstiefe ins Medium exakt einstellen zu können. Dies ist wichtig, da das Medium einen hohen mittleren Streukoeffizienten aufweist und eine möglichst kleine Penetrationstiefe erreicht werden soll. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, die Anlage so zu justieren, dass der Glaseinfluss auf ein akzeptables Maß zurückgeht, siehe Abschnitt „Störeinfluss verschiedenen optischer Fensterdicken im optischen Pfad“.

Sowohl der Verbrauch des Substrates Glucose als auch die Bildung des Produktes Ethanol durch *Saccharomyces cerevisiae* konnten zuverlässig überwacht werden (Abbildung 30).

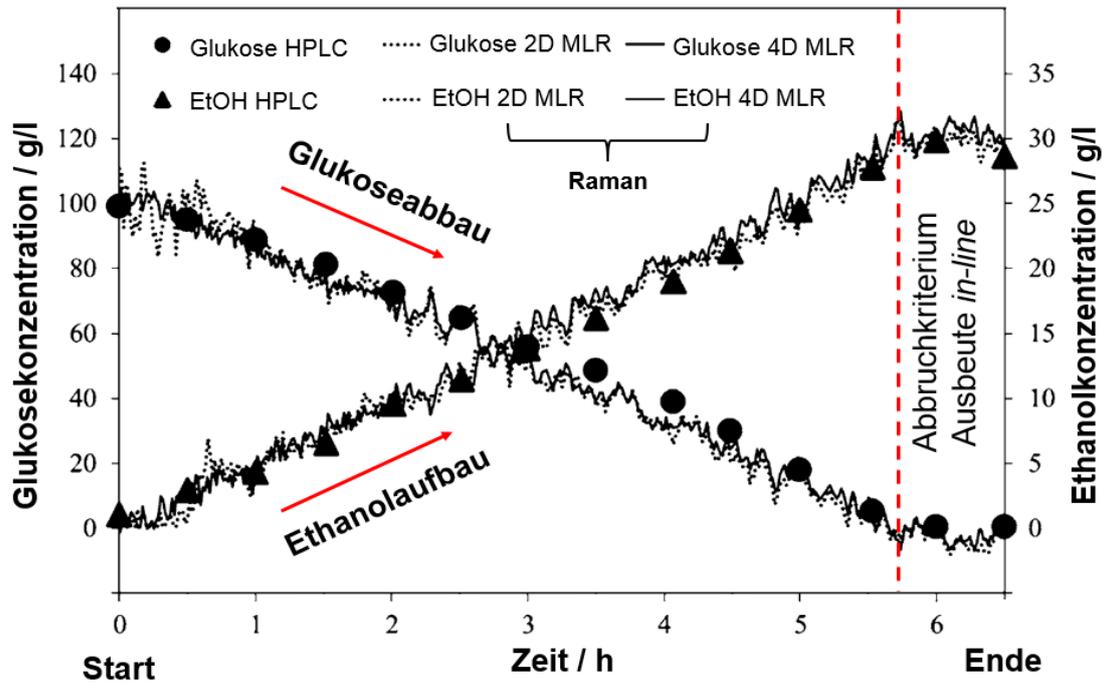


Abbildung 30: Substratabbau von Glucose und Aufbau des Produktes Ethanol der aeroben Batch-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* durch von außen den Mantel durchdringende, Raman-Messung im Vergleich zur HPLC-Analytik, Abbildung nach [4].

Mehrere lineare Regressionsmodelle wurden angewendet, um die Raman-Spektren auszuwerten. Referenzwerte wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Die implizierten relativen Vorhersagefehler für Glucose und Ethanol betragen 5 bzw. 3 % auf die Referenzmethodik angewandt, die wiederum selbst einen Fehler von 3 bzw. 2 % beinhaltet.

Wie am Beispiel gezeigt, bietet diese neue Technik die Möglichkeit, die vorgestellte Fermentation zukünftig mittels berührungsloser Raman-Spektroskopie von außen durch den Reaktormantel zu verfolgen und damit Kontaminationen zu vermeiden. Die Labortätigkeiten durch die HPLC-Analytik können deutlich reduziert werden. Eine Probenahme (Probenzug von Hand durch geschultes Personal) wird obsolet und dadurch werden die Analysenkosten gesenkt. Die gesammelten Erkenntnisse bezüglich der einzusetzenden Hardware sind auf sämtliche Fermentationen und Reaktionen und auf sonstige biologische Systeme anwendbar und umsetzbar.

Validierung durch berührungslose Stoffidentifizierung in einer Zweiphasenströmung in Kapillaren

Das folgende Beispiel verdeutlicht das Einsatzfeld der erarbeiteten Technologie bei sehr schnellen Vorgängen, die ein sehr schnelles Eingreifen bzw. eine Schutzschaltung aktivieren müssen (Stoffidentifikation), beispielsweise selbstsperrende Ports z. B. bei der Zytostatika-Gabe oder bei der Überwachung von Infusionen. Exemplarisch wurde eine Flüssigkeits-Kapillare, durchströmt mit einer nicht mischbaren Multiphasenströmung unter Verwendung einer hohen Abtastrate, vermessen. Für die notwendige Abtastfrequenz gilt grundsätzlich das Nyquist-Shannon-Abtasttheorem: Die Messanordnung muss mindestens um Faktor 2 in äquidistanter Schrittweite schneller abtasten, als die am höchsten auftretende Frequenz im zu rekonstruierenden Signal. Folglich wird eine zu lange Integrationszeit dazu führen, dass die Spektren der beiden Phasen verschwimmen, ähnlich der Bewegungsunschärfe in der Fotografie. Um dies zu verhindern, wurde das Messsystem auf die Erfassung schneller Ereignisse hin optimiert. In diesem Anwendungsfall ist die höchste Frequenz die Frequenz des Phasenwechsels zwischen wässriger und organischer Phase der Tröpfchen. Nur so ist es möglich, unverfälschte Informationen beider Fluidsegmente getrennt oder im besten Fall auch in der Kontaktschicht zu erhalten. In dem untersuchten Testsystem (Toluol/Wasser) wurden Raman-Spektren fortlaufend alle 60 ms (50 ms Integrationszeit) aufgenommen. Als Optik zur Messung innerhalb der transparenten PFA-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 1/16 Zoll in einem äußeren Durchmesser von 1/8 Zoll, kam die zöllige Fokussiersonde zum Einsatz. Das Experiment wird mit einer Tröpfchengeschwindigkeit von 0,2 cm/s durchgeführt, was mit einer Erzeugungsfrequenz der Tröpfchen von ungefähr 0,5 Hz korrespondiert. Das Raman-Spektrum von Toluol weist große spektrale Unterscheide sowohl in der Fingerprintregion als auch im Bereich um 3000 cm^{-1} ($633,03\text{ nm}$) im Vergleich zu Wasser auf (siehe Abbildung 31b). In Abbildung 31a ist der Verlauf der Signalintensitätsdifferenz zwischen 1012 und 1863 cm^{-1} ($562,27$ und $590,53\text{ nm}$) für eine Messzeit von 5 s gezeigt. Aufgrund der hohen Zeitauflösung können die reinen einphasigen Messungen von denen unterschieden werden, bei denen beide Phasen im Fokus der Raman-Sonde liegen.

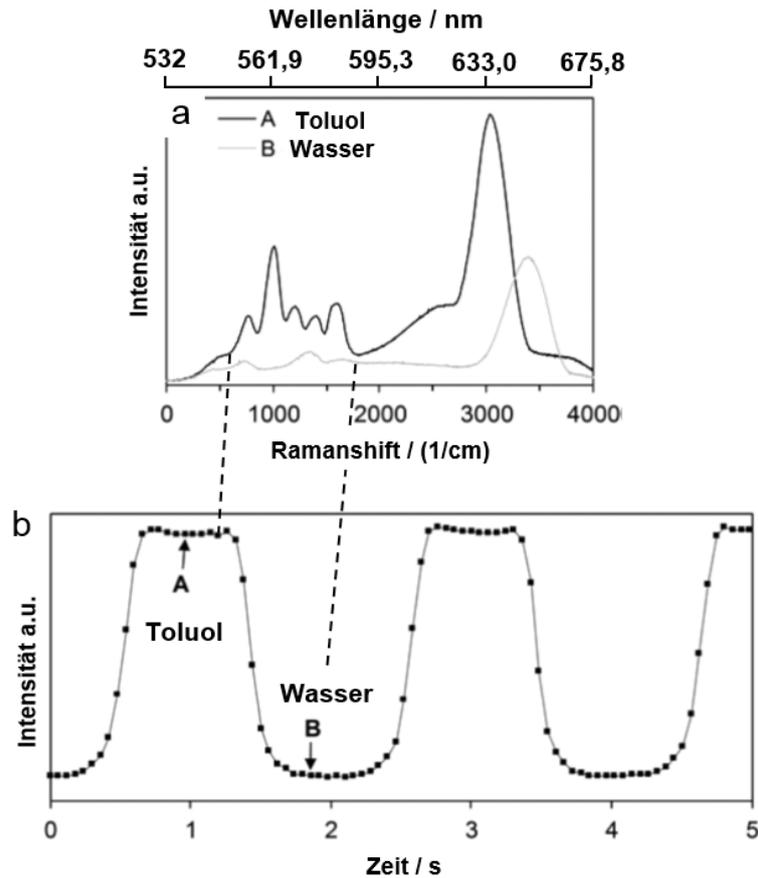


Abbildung 31: Unterschied der Raman-Intensitäten zwischen 1012 und 1863 cm^{-1} ($562,27$ und $590,53\text{ nm}$) (a) Raman-Spektren A und B aus Messungen in den jeweiligen Phasensegmenten – markierte Positionen (b). Die zyklischen Messungen wurden mit einer Integrationszeit von 50 ms bei einer Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit von $0,2\text{ cm/s}$ durchgeführt, Abbildung nach [2].

In einem weiteren Versuch mit kleinerer PFA-Kapillare (Innendurchmesser: $0,03\text{ Zoll}$ / Außendurchmesser: $1/16\text{ Zoll}$) sollte die Abtastgeschwindigkeit nochmals gesteigert werden. Tropfen mit einem Phasensegmentsvolumen unter $1\text{ }\mu\text{L}$ werden hierbei mit einer Frequenz von etwa 24 Hz und 48 Phasenwechseln pro Sekunde erzeugt. Die Strömungsgeschwindigkeit beträgt $9,0\text{ cm/s}$. Mit Integrationszeiten von nur 3 ms konnte die Abtastfrequenz auf ein Maximum von 333 Hz erhöht werden. Für dieses Experiment wurde das Detektionssystem im sogenannten Burst-Modus betrieben. Der Hersteller tec5 AG stellt speziell für diese Testapplikation ein Softwaremodul zur Verfügung, das die Erfassungsrate auf 333 Hz anhebt. Ohne den Einsatz dieses Modul war die Datenkommunikation zwischen dem Spektrometer und dem Computer durch die USB-Schnittstelle durch geringere Abtastraten begrenzt (siehe Abbildung 32).

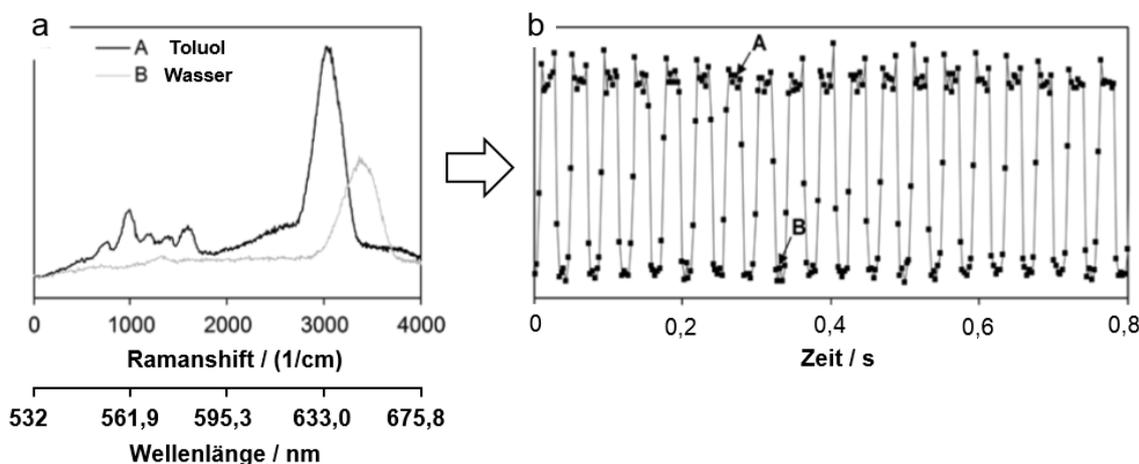


Abbildung 32: Raman-Intensitätsdifferenz zwischen 1012 und 1863 cm^{-1} ($562,27$ und $590,53\text{ nm}$) (a) Raman-Spektren A und B aus Messungen in beiden Phasensegmenten (b) Zyklische Messungen mit einer Abtastrate von 333 Hz und einer Fluidströmungsgeschwindigkeit von $9,0\text{ cm/s}$ – Positionen markiert, Abbildung nach [2].

Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnte damit der bis dato schnellste Raman-Scan aus der Entfernung mehrerer Zentimeter und eine Kapillare durchdringend weltweit erreicht werden. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Charakterisierung/Stoffidentifikation von segmentierten Strömungen und erlaubt des Weiteren auch quantitative Analysen von Raman-aktiven Substanzen in den jeweiligen Phasen innerhalb einer transparenten Kapillare.

Validierung der Möglichkeiten zur Gewebeschonung: Raman-Spektroskopische *in-line*- Verfolgung einer chemischen Reaktion mit geringer Primärlichtleistung

Bei diesen Versuchen wird der Reaktionsfortschritt einer Michael-Addition in Echtzeit mittels Raman-Spektroskopie überwacht und eine beträchtlich reduzierte Anregungsleistung etabliert. Abbildung 33b zeigt ein Spektrum des Eduktes Ethylacrylat, gemessen mit einer handelsüblichen faseroptischen Rückstreuende (ohne Fokussierung) mit $400\text{ }\mu\text{m}$ Lichtwellenleitern bei 7 mW Laserleistung am Sondenkopf. Im Vergleich zu dem Spektrum mit der zuvor beschriebenen koaxialen Sonde ist ein zusätzliches Ethylacrylat-Spektrum aufgetragen (siehe Abbildung 33c). Ein hochauflösendes Raman-Spektrum eines herkömmlichen Raman-Spektrometers mit 500 mW Laserleistung ist in Abbildung 33a dargestellt.

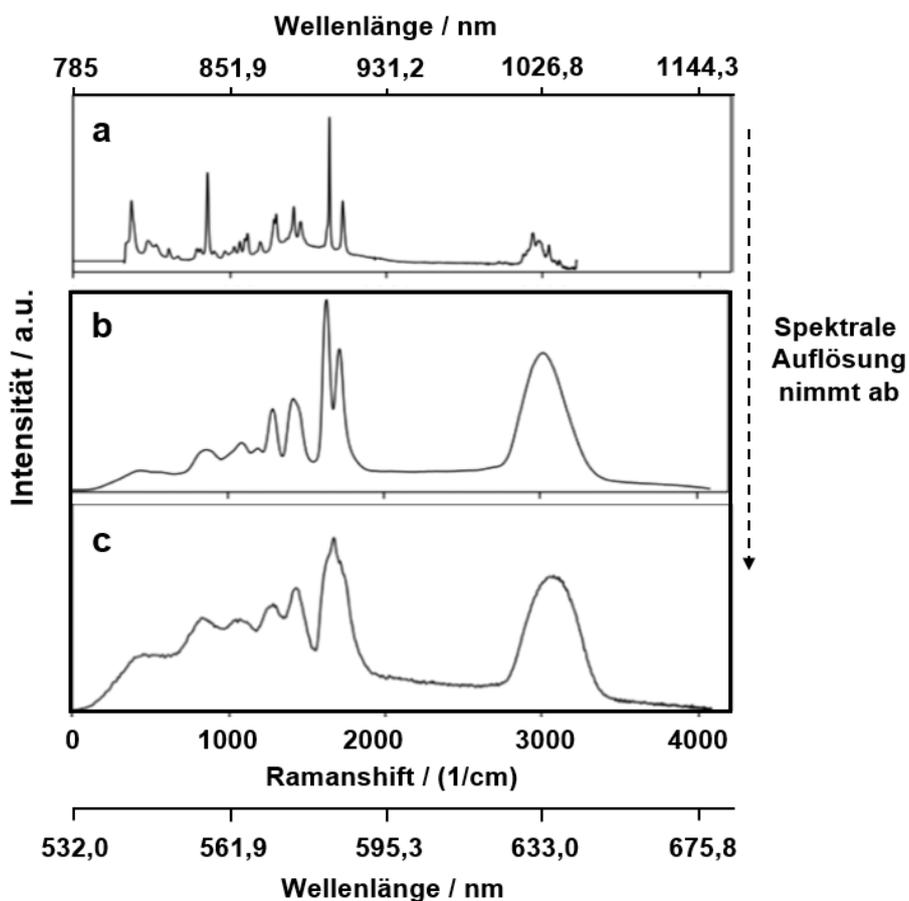


Abbildung 33: Spektren von Ethylacrylat bei unterschiedlichen Auflösungen, unterschiedlichen Anregungswellenlängen, Intensitäten, Faserdurchmessern und Integrationszeiten. Mit einer Rückstreuersonde (a: 532 nm; 7 mW; 400 μm ; 1000 ms), einer koaxialen Raman-Sonde (b: 532 nm; 300 mW; 200 μm ; 2500 ms) und einer koaxialen Raman-Sonde auf einem MultiSpec-Raman-System der tec5 AG (c: 785 nm; 500 mW; 600 μm ; m; 10 s), Abbildung nach [2].

Der charakteristische Peak bei 1637 cm^{-1} ($582,57\text{ nm}$) wird der Vinylstrettschwingung zugeordnet und dient der Reaktionsverfolgung.

Der Ethylacrylat-Umsatz während der Reaktion wird auf Basis der relativen Abnahme der Intensitätsdifferenz bei 1637 und 1550 cm^{-1} ($582,75$ und $579,81\text{ nm}$) bestimmt. Die Raman-Spektren werden während der chemischen Reaktion nach dem Start durch Zugabe von Piperidin zu gekühltem Ethylacrylat kontinuierlich in Abständen von 1 s aufgenommen. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde eine Umsatzkurve aus den Mittelwerten von fünf Experimenten, die unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden, erstellt (siehe Abbildung 34).

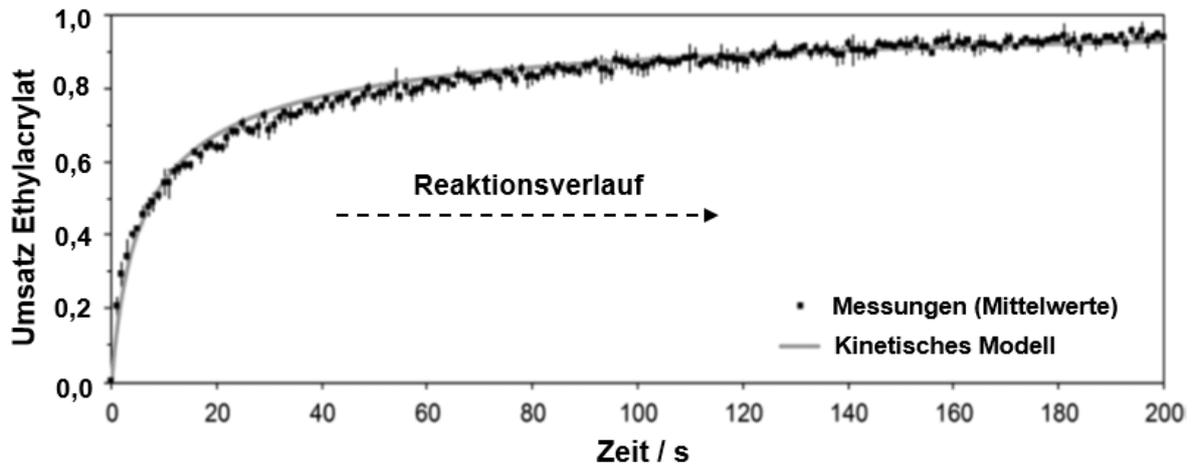


Abbildung 34: Verfolgung des Ethylacrylat-Umsatzes mittels Raman-Spektroskopie (Anregungsleistung: 7 mW) im Vergleich zum kinetischen Modell. Mittelwerte aus fünf aufeinanderfolgenden Experimenten werden zusammen mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt, Abbildung nach [2].

Die Standardabweichungen sind für jeden ermittelten Wert angegeben und zeigen eine moderate statistische Varianz, die dem Signalrauschabstand aufgrund der schwachen Anregung und den kurzen Integrationszeiten zugeschrieben werden kann. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen eines kinetischen Modells auf der Grundlage kürzlich veröffentlichter experimenteller Daten überein und sind reproduzierbar [2].

Mit der Möglichkeit, die Anregungsleistung stark zu reduzieren, ist die Echtzeit-Reaktionsüberwachung in explosionsgefährdeten Bereichen genauso wie *in-vivo*-Analysen durchführbar. Dadurch könnte dieser Ansatz das Anwendungsgebiet der Raman-Spektroskopie sowohl in der Prozess-Analyse-Technologie (PAT) erweitern und auch im klinischen Umfeld eingesetzt werden. Ein Ansatz zur Prozessintegration mit Messungen durch bestehende Inspektionsgläser (Druckstufe PN 40) in Produktionsanlagen wurde kürzlich von Braun et al. [1] demonstriert.

Demonstration geringer Nachweisgrenzen am Beispiel von Ethylacrylat

Die minimale Nachweisgrenze von Ethylacrylat mit einer Laserintensität von 300 mW wurde bestimmt, um die Fähigkeiten des Systems bei niedrigen Konzentrationen zu untersuchen. Ethylacrylat wurde hierzu mit Wasser verdünnt und durch die Wand eines Glasfläschchens mit der koaxialen Sonde und einer 400- μm -Faser gemessen. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen kann das allgemein schwache Raman-Signal von Wasser nicht vernachlässigt werden.

Der Wasserpeak bei 1640 cm^{-1} [95] ($582,85\text{ nm}$) addiert sich zu dem Ethylacrylatspeak zwischen 1559 und 1934 cm^{-1} ($580,11$ und $593,01\text{ nm}$) (siehe Abbildung 35). Daher wurde das Ethylacrylat-Signal aus der mittleren Intensität des Peaks nach der Grundlinienkorrektur und der Subtraktion des Wassersignals berechnet. Das Rauschen wurde als mittlerer quadratischer Fehler für eine parabolische Anpassung im Spektralbereich zwischen 1950 und 2060 cm^{-1} ($593,58$ und $597,48\text{ nm}$) bestimmt. Aufgrund einer linearen Interpolation des SNR-Konzentrationsdiagramms (Abbildung 35) kann für Ethylacrylat in Wasser eine Konzentration von $0,8\text{ mM}$ abgeschätzt werden [2].

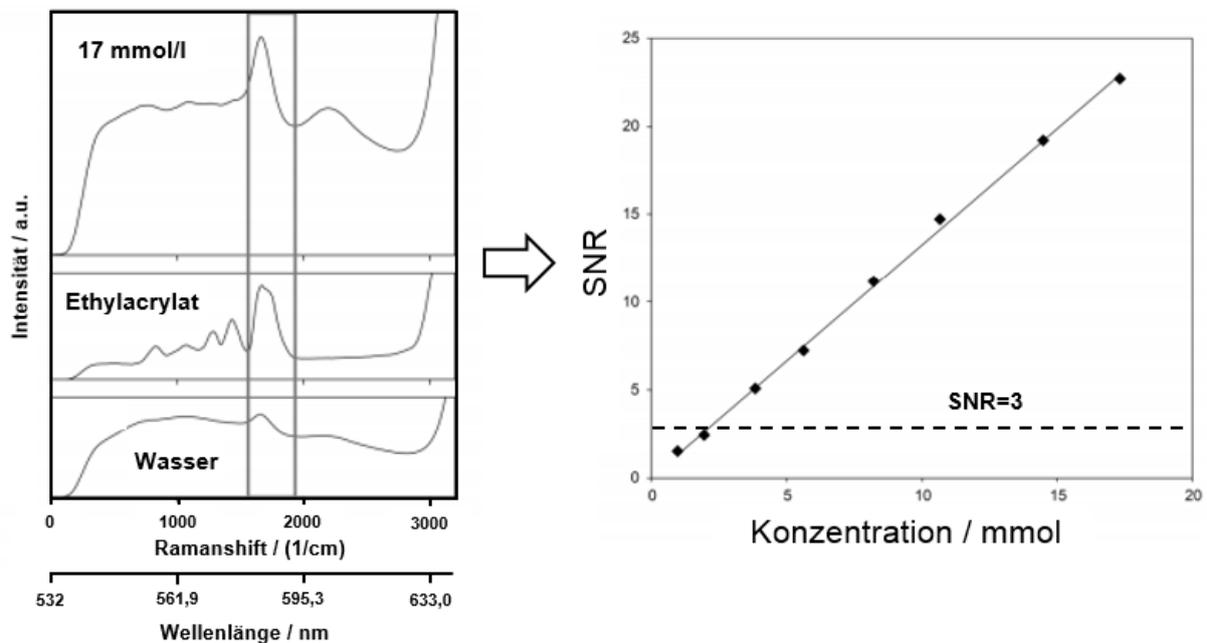


Abbildung 35: Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR), berechnet aus Raman-Spektren von Ethylacrylat in Wasser und bestimmt bei unterschiedlichen Konzentrationen aus 20 Spektren mit jeweils 4 s Erfassungszeit, Abbildung nach [2].

4. Diskussion

Das folgende Kapitel betrachtet die Ergebnisse der entwickelten Sensoren und Algorithmen. Anhand der Ergebnisse und physikalischen Sachverhältnisse wird eine Interpretation der Leistungsfähigkeit durchgeführt, erörtert und diskutiert. Des Weiteren werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Systeme analysiert und Grenzen bzw. mögliche Ausbaustufen in weiteren medizinischen und industriellen Applikationen betrachtet. Der wissenschaftliche Erkenntnisfortschritt wird beschrieben und auf Validität hin untersucht. Hierbei werden die jeweiligen Messeffekte Phänomenen des Gewebestoffwechsels oder der Gewebe-Morphologie zugeordnet und verifiziert. Mehrere Anwendungen wurden untersucht, um das Potenzial dieses Setups zu demonstrieren: Tracking der multispektralen Nadel über medizinische Ultraschall- und Magentresonanztomografie; Entwicklung eines Algorithmus zur Korrektur des Fluoreszenzsignals und Proof of Concept mit multispektraler label-free *in-vivo*-Klassifikation von gesundem und bösartigem Gewebe eines Tiermodells. Andere Applikationen wurden in Kombination mit dem auf Photonenfluss optimierten Spektrometer durchgeführt. Eine Demonstration der Anwendbarkeit des entwickelten Systems erfolgte in zwei Applikationen: 1) Reaktionsüberwachung einer schnellen chemischen Reaktion mit reduzierter Anregungsintensität unter Verwendung einer konventionellen Rückstreusonde. 2) Raman-Analyse einer Zweiphasenströmung von (Toluol / Wasser) mit einer Abtastrate von 333 Hz und einer Weit-Apertur-Sonde.

4.1 Multispektralsensor zur UV/VIS-, NIR- und FL-Detektion

Das Kernelement dieser Arbeit ist die Entwicklung eines multispektralen Stich-Sensors, der auf dem Prinzip der Rückstreuung beruht und verschiedene Spektroskopie-Techniken an der Sondenspitze miteinander vereint. Eine ebenfalls entwickelte Signalverarbeitung, die die Datenfülle mittels virtueller Photometerumgebung reduziert, erlaubt eine nachgeschaltete multivariate Auswertemethodik zur Gewebeklassifizierung. Zunächst werden mögliche Vor- und Nachteile des Konzeptes diskutiert:

- Eine einfache Gewebepenetration wird durch einen optimierten Sondenkopf erreicht (siehe Abbildung 2). Durch die Kombination mit ausgewählten Materialien wie Edelstahl oder Nitinol, sowie dem autoklavierbaren und biokompatiblen Epoxidharz ist ein Mehrfachgebrauch durch Nachschärfen und

-polieren möglich. Die Spitze wird speziell auf die Anforderungen einer SMART-*in-vivo*-Gewebediagnostik entwickelt. Eine Variante für den einmaligen Gebrauch auf Polymerfaserbasis ist ebenfalls umsetzbar. Dies konnte in Vorversuchen gezeigt werden. Hierbei werden die Quarzglasfasern durch Kunststofffasern aus dem Bereich der Telekommunikation ersetzt.

Dies bedeutet zwar eine deutliche Senkung der Teilekosten. Allerdings werden die optischen Eigenschaften der Sonde etwas geschwächt.

- Die Kombination mehrerer Spektroskopie-Techniken durch eine freie individuelle Wahl und Anbindung der sieben Lichtwellenleitern während des Biopsie-Verfahrens ist möglich mit Lichtquellen, Spektrometern und geeigneten Sensoren. Fasergekoppelte multifunktionale Systeme können damit individuell und angepasst an den jeweiligen Kosten- und Anforderungsrahmen zusammengestellt und aufgebaut werden. Weitere Messmethoden z. B. glasfasergebundene miniaturisierte NIR-Temperaturfühler wurden am Institut PI realisiert [97]. Diese sind ebenfalls implementierbar. Dadurch wird die aktuelle Gewebetemperatur an der Sondenspitze als weitere Messgröße mit hoher Zeitauflösung zugänglich. Viele Erkrankungen gehen mit lokaler Temperaturerhöhung einher, beispielsweise Entzündungen oder auch Bereiche mit erhöhtem Stoffwechsel und exothermen Reaktionen.
- Das System ist nicht nur als Werkzeug in der Gewebediagnostik einsetzbar, sondern zeigt auch Vorteile für andere zukünftige Anwendungen sowohl im Medizinbereich als auch in der Prozessanalysetechnik (PAT). Hierbei stehen Anwendungen im Fokus, bei denen entweder Informationen aus mehreren Spektroskopie-Techniken unabhängig voneinander benötigt werden oder Quereinflüsse (z. B. sich ändernde Streu- und Extinktionskoeffizienten) auf eine Technik, in unserem Fall FL-Spektroskopie, kompensiert werden müssen, um aussagekräftige Messungen zu gewährleisten. Gerade die FL-Spektroskopie kann durch ihre hohe Nachweisempfindlichkeit viele Stoffe in kleinen Konzentrationen (z.B. NADH im Bereich weit unter 1 mmol/l) erkennen [81]. Bisher ist sie allerdings nur in der Kombination mit der Erfahrung und dem Know-how eines Fachmannes in der Applikation zielführend nutzbar, da bisher keine Absolutinformation gewonnen werden konnte.
- Die multispektralen Informationen der einzelnen Spektralbereiche können miteinander verrechnet werden und bringen so erst die entsprechenden

Messgrößen (z.B. NADH-Konzentration) quantitativ zum Vorschein. Die erfolgreiche Umsetzung in einem Gewebephantom bei Variation des Streukoeffizienten bestätigt diese Annahme [3].

Auch für einen sich ändernden Absorptionskoeffizienten wurde die Korrekturfähigkeit gezeigt und die entsprechenden Erkenntnisse befinden sich aktuell in der Phase der wissenschaftlichen Prüfung [„*NADH-fluorescence absorption correction to determine absolute fluorophore concentrations of a liquid tissue model*“, Braun et. al., eingereicht am 19.04.2018].

- Die optionale Erkennung von Blutansammlungen, Blutgefäßen, sowie deren Durchblutungszustand durch Zirkulationsdetektion, wird durch lokale *in-vivo*-Pulsmessungen mit schnellen Abtastraten im Bereich von bis zu 50 Spektren pro Sekunde (20 ms Integrationszeit) umgesetzt. Hardwareseitig begrenzt die minimale Integrationszeit die Messung auf 333 Spektren pro Sekunde. Weitere Anwendungsfelder in der Medizintechnik, z. B. die Erkennung von Durchblutungsstörungen wie Thrombosen, sind weitere mögliche Anwendungen der entwickelten Technologie. Die Machbarkeit dieser Erweiterungsmöglichkeit ist transdermal bereits erreicht.
- In Kombination mit einer Ultraschallbildgebung während der Biopsie-Prozedur ist simultanes Tracking möglich und damit das Risiko einer Fehlplatzierung mit möglichen strukturellen Schäden an Arterien, Nervenbündeln und Pleura verringert [94]. Das in dieser Arbeit entwickelte Multispektralsystem kann leicht in Biopsie-Systeme als innere Kanüle implementiert werden und profitiert von den echogenen Markierungen auf der äußeren Kanüle des Biopsie-Systems. Eine noch genauere Positionierung ist möglich.

Darüber hinaus ist ein Kompatibilitätstest der Sonde in Verbindung mit der MRT-Technologie erfolgreich durchgeführt worden. Die Materialwahl fällt auf Nitinol (NiTi) und Polymere. NiTi-basierte Materialien sind in der Medizintechnik gut etabliert und werden von Duerig et al. [75] und Pelton et al [76] beschrieben. Die Nickel-Titan-Legierung besticht durch ihre Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit und hervorragenden mechanischen Eigenschaften. Ebenso ermöglicht ihre MRT-Kompatibilität den Einsatz in der medizinischen Diagnostik [3].

Eine simultane Verwendung in der MRT-Technik und damit Lokalisation der Nadel ist möglich, da ausschließlich Nitinol, Glas und Polymere als Rohmaterialien verwendet werden.

Die Kombination der beiden Techniken durch eine Trennung des sensiblen Messequipments durch Implementation der faseroptischen Sonde in die vorhandenen Räumlichkeiten der Klinik erreicht. Hierbei werden die Lichtwellenleiter über bereits vorhandene geschirmte Kabelkanäle in der Wand aus dem eigentlichen MRT-Raum in den Kontrollraum geleitet. Es kann also ohne jedwede Veränderung an den Räumlichkeiten in die vorhandenen MRT-Strukturen integriert und dadurch eine kostengünstige Installation gewährleistet werden.

- Die Herstellung des Sondenaufbaus ist wirtschaftlich darstellbar und ermöglicht eine günstige „Break-Even-Analyse“. Es wurde konsequent, während der Entwicklung, darauf geachtet, Leistungsfähigkeit, Materialkosten sowie optische als auch mechanische Eigenschaften in Einklang zu bringen. Die geringen Herstellungskosten resultieren aus am Markt erhältlichen Teilen, die miteinander durch Klebestellen zusammengefügt werden. Diese enden in der speziell optimierten Sondenspitze, die selbst gefertigt und mit einem Polierverfahren oberflächenveredelt wird. Hierbei wurde eine spezielle Schleifvorrichtung entwickelt, die den Fertigungsprozess mit einfachsten Mitteln zulässt.

Nachfolgend werden die spektroskopischen Messungen inklusive des physikalischen Hintergrunds näher betrachtet.

Hierbei ist es von fundamentaler Bedeutung, die Matrixeinflüsse auf die jeweilige Spektroskopie-Art näher zu betrachten und die Ergebnisse zu diskutieren, zu verstehen und zu deuten. Die multispektrale Analyse eines Gewebephantoms mit verschiedenen Fluorophor-, Streuer- und Absorberkonzentrationen können vielversprechendes Wissen genieren, welche Quereinflüsse jeweils zwischen den Spektroskopie-Arten auftreten. Es ist daher für ein Grundverständnis von elementarer Bedeutung, die durch die molekularen Stoffsysteme hervorgerufenen Messeffekte mit geringen oder bestenfalls ohne Quereinflüsse zu detektieren bzw. einfache, aber effektive Algorithmen zu entwickeln, die in der Lage sind, die Messinformation aus den sich überlagernden oder gegenseitig beeinflussenden Effekten zu extrahieren und

diese quantitativ zu erfassen. Alle Gehalte können für sich betrachtet mit geringen Fehlern ermittelt werden.

Zur Lösung dieser Problematik darf der Spektroskopiker die einzelnen Techniken nicht getrennt betrachten, sondern muss deren Gesamtheit überblicken und die gewonnenen Informationen analysieren. Im Tiermodell werden die Effekte zunächst qualitativ betrachtet und im flüssigen Gewebe-Phantom erfolgreiche Algorithmen zur quantitativen Bestimmung etabliert. Hierdurch konnte der Einfluss des Streueffektes auf die FL-Messung nahezu vollständig kompensiert werden. Ein Absorber im Modellsystem wirkt sich beispielsweise dämpfend auf die Fluoreszenzmission aus. Photonen werden vom Farbstoffmolekül absorbiert und stehen detektionsseitig den jeweiligen Techniken oder den Fluorophoren nicht mehr zur Verfügung. Dadurch können keine langwelligeren energieärmeren Photonen induziert werden. Die mittlere Weglänge sowohl der Primär- als auch der Sekundärphotonen wird verkürzt.

Die Streuung wirkt sich auf Absorptions- als auch auf Fluoreszenzeffekte im gesamten Messfenster aus, indem es das Messvolumen direkt beeinflusst. Allerdings wäre eine Remissionsmessung in einer klaren Flüssigkeit ohne Streuzentren nicht möglich. Diese Messtechnik ist von der Rückstreuung direkt abhängig – jedoch wirkt diese auch als Quereinfluss.

Bei höherem Gehalt an Streukörpern steigt die Anzahl von Streuzentren pro Volumenelement an. Es kommt zu Streuung und Mehrfachstreuung in Vorwärts-Richtung (Vorwärtsstreuung) aus Sicht der Sendefaser, aber auch zur Seite und zurück zum Sendeort (Rückstreuung). Das Licht wird in den kompletten 4 π -Raumwinkel in unterschiedlichen Intensitäten gestreut. Es gibt verschiedene Streuarten/Modelle:

- Rayleigh (symmetrisch nach vorne und hinten) [98,99]
- Mie (leicht asymmetrische bis komplexe Winkelverteilung) [99–101]
- Klassisch geometrisch an kleinen Tröpfchen (hauptsächlich vorwärts [sichtbar durch Hofbildung], aber auch komplex [durch Variation der Tröpfchengröße nicht mehr nachweisbar]) [99,102]
- Klassisch geometrisch an großen Tropfen (sehr eng und schwach vorwärts, sodass eine Hofbildung ausbleibt und zusätzlich bei transparentem Material in großem Winkel - Tyndall-Effekt)

Hierbei sei auf Spezialliteratur verwiesen [98–104]. Im flüssigen Gewebephantom sind folgende Abhängigkeiten für die Messung in Dispersion (Streuer Calcilit 4) zu

beobachten: Die Rückstreuintensität steigt von klarer Lösung ohne Streuzentren – keine Rückwärtsstreuung – mit zunehmender Opazität durch Streuung vermehrt an. Es werden mit steigender Konzentration mehr und mehr Photonen über den Wellenlängenbereich (je nach Luminar und dessen emittierten Photonenenergien) zurückgestreut. Ein Vorteil ist jedoch, dass das Rückstreusignal innerhalb des optischen Fensters quasi unbeeinflusst erfasst werden kann. Die Fluoreszenzspektroskopie gilt zwar als extrem nachweisempfindlich bis hinab in den ppb-Bereich, aber auch als extrem angreif- und verletzbar durch Quereinflüsse. Kleinste Änderungen innerhalb der Matrix haben großen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal. Dies ist der Technik per se geschuldet: Die Quereinflüsse wirken auf den Anregungspfad – Photonen müssen zu dem zu analysierenden Molekül gelangen, um von ihm absorbiert und anschließend als energieärmeres Photon langwelliger re-emittiert zu werden (Stokes-Shift). Anschließend muss der Weg in Richtung Detektionsfaser durch die Moleküle und Streukörper hindurch zurückgelegt werden, ohne von Absorptions- und Streueffekten Hinderung zu erfahren.

Beispielsweise kann ein hoher Absorbergehalt das FL-Signal nahezu vollständig auslöschen – ohne multispektrale Signalerfassung ist in diesem Fall für den Anwender kein Fluorophor im System vorhanden. Des Weiteren führt ein höherer Streukoeffizient, hervorgerufen durch Streuerzugabe, zu einem höheren FL-Signal und – ohne multispektrale Information lässt dies auf höhere Fluorophor-Gehalte schließen. Die reine Messung des Emissionssignals kann fehlerfrei nur in klarer Lösung bestimmt werden. In Gewebe oder Dispersion kann nur quantitativ gemessen werden, wenn der Streu- und der Absorptionskoeffizient im Anregungs- als auch Detektionspfad als konstant anzusehen ist.

Das verfälschte FL-signal muss also entsprechend korrigiert werden. Dies ist durch die multispektralen Informationen möglich.

4.2 Fluoreszenz-Korrektur

Hierbei wird ein Verfahren zur Bestimmung unbekannter NADH-Konzentrationen in Suspension, basierend auf verschiedenen optischen Spektroskopie-Techniken vorgestellt: UV/VIS-, NIR- und Fluoreszenzspektroskopie werden in der multispektralen Nadelsonde kombiniert.

Um die Fluoreszenzemissionsintensitäten zu korrigieren, wird die reine Rückstreuintensität des Gewebemodells im Wellenlängenbereich zwischen 600 und 940 nm innerhalb des optischen Fensters gemessen. Andere Forschergruppen definierten dieses Fenster von 600 bis 1100 nm [34] oder 600 bis 1300 nm [105]. Daher ist es möglich, Rückstreuintensitäten zu erhalten, die von der Absorption (der für die größte Absorption verantwortlichen Stoffe Hämoglobin und Wasser) unbeeinflusst sind [3]. Im Wellenlängenbereich von 600 bis 940 nm wurde nur die Breitband-Halogenlichtquelle verwendet, um die elastische Rückstreuintensität ohne die Effekte der induzierten Fluoreszenzemission und das daraus resultierende parasitäre Signal zu bestimmen. Diese Methodik erwies sich im Modellsystem als sehr effektiv und führte zu einem sehr geringen mittleren quadratischen Fehler (REMSEP) von 0,093 mmol/l bei der Bestimmung des Fluorophors NADH.

In weiteren Versuchen an Gewebeproben (*in vitro*) konnten die Hauptabsorber des Gewebes eindeutig zugeordnet und ihre spektrale Lage bestimmt werden: Spektraldaten im UV/VIS- und NIR-Bereich dienen dazu, Informationen über Gewebeeigenschaften wie Fett- und Wassergehalt, Hämoglobinkonzentration, Sauerstoffsättigung (Verhältnis von Oxyhämoglobin zu Desoxyhämoglobin) und damit den Sauerstoffverbrauch ins Verhältnis zum umgebenden Gewebe zu setzen. Weitere Informationen können durch die Bestimmung der Gewebefarb- und Streueigenschaften im UV/VIS- und NIR-Bereich erfasst werden. Dem Mediziner steht somit ein Werkzeug zur Verfügung, das ihm viele Informationen, die *in-vivo* gesammelt werden, zur Verfügung stellt. Dies muss jedoch auch an lebendem Gewebe verifiziert werden.

4.3 Tiermodell

Um das entwickelte Konzept auf seine Tauglichkeit zu prüfen, wird es zunächst in einem flüssigen Gewebephantom untersucht und anschließend im Tiermodell getestet.

Gerade der Gewebestoffwechsel birgt einige Besonderheiten, die in diesem Abschnitt diskutiert werden. Die Informationen resultieren aus lebendem Gewebe im Tiermodell. Dies ist notwendig, da die biologischen Strukturen und Zellen im 3-D-Verbund völlig natürlich mit Nährstoffen versorgt und deren Produkte über den Blutkreislauf abtransportiert werden. Es findet ein stetiger Zu- und Abtransport von Stoffen statt.

Was an Masse nicht abtransportiert wird, findet Nutzung im Zellaufbau (Massenbilanz). Im toten Gewebe sind durch die fehlende Versorgung weder die Sauerstoffsättigung noch NADH als Marker zugänglich.

Die *in-vivo*-Bedingungen sind *in-vitro* nicht nachstellbar. Krebs zeichnet sich durch unkontrollierte Proliferation (Gewebewachstum/Zellteilung) und übermäßigen Umsatz von Nährstoffen wie Glucose, Glutamin und Fettsäuren aus. Dies ermöglicht den Krebszellen eine schnelle Massezunahme. DeBerardinis und Chandel geben einen Überblick über die Grundlagen des Metabolismus von Krebszellen [106]. Basierend auf diesen Stoffwechselmerkmalen und morphologischen Unterschieden zu gesundem Gewebe, unterscheiden sich die Gewebetypen in ihren spektralen Fingerabdrücken in den einzelnen vorgestellten optischen Techniken. Die Detektion der endogenen Marker Hb, NADH, Wasser, Fett, Blutkonzentration (Färbung) und Bindegewebedichte (Streueigenschaft) gewährleistet eine Klassifikation und damit eine Vorabunterscheidung der Gewebe *in-vivo*. Durchblutetes lebendes Gewebe stellt durch seinen noch intakten Metabolismus eine besonders aussagekräftige Analysemöglichkeit bereit. Entscheidende Parameter zur Klassifikation können unverfälscht untersucht werden. In Totgewebe bzw. in Schnitten sind diese Parameter beeinflusst oder nicht mehr aussagekräftig.

Das Blutpigment Hb, das als Sauerstoffträgermolekül des Körpers fungiert, kann in seiner Gesamtheit erfasst oder durch das Verhältnis seiner oxy- und deoxy-Form als Maß für die Sauerstoffversorgung des analysierten Gewebes dienen. Die vorgestellten Untersuchungen zeigen ausnahmslos eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration in den Tumoren.

Trotz der gesteigerten Angiogenese-Aktivität und der damit einhergehenden besseren Zufuhr und Versorgung durch eine höhere Gesamt-Hb-Beladung konnte der Tumor offensichtlich nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden.

Diese Beobachtung stützt die Annahme einer erhöhten metabolischen Aktivität innerhalb und in der Randzone der untersuchten Tumorgewebe. Fadaka et al. [107] beschreiben diese große Abhängigkeit von der Blutversorgung: *„Hypoxie und Glucosemangel entstehen schnell im Inneren eines wachsenden Tumors. In der frühen Karzinogenese-Phase werden durch die unkontrollierte Zellproliferation Tumorzellen von den Blutgefäßen teilweise abgeschottet und damit aus der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung verdrängt. Nur durch Diffusion über die Basalmembran und durch die peripheren Tumorzellschichten können Nährstoffe und Sauerstoff in die Zellen*

eines nicht vaskularisierten Tumors gelangen“ [107]. 1924 schlug Warburg eine Hypothese für den Krebsmetabolismus vor [108]: den Warburg-Effekt. Die Krebszellen können durch die Hochregulierung der Glykolyse die notwendige Energie auch unter anaeroben Bedingungen gewinnen, was zu der Schlussfolgerung führt, dass Sauerstoff für das Krebswachstum nicht unbedingt notwendig ist [109].

Die Menge an Wasser ist im gesunden Unterhautgewebe gemäß den hier durchgeführten Messungen qualitativ höher als im Tumorgewebe. Das gleiche Phänomen gilt für Fett, das bei Tumoren aufgrund der Zunahme des Fettsäureabbaus und einer damit einhergehenden intrinsischen Verarmung abnimmt [107]. Gleichzeitig ist die induzierte Gewebe-auto-FL (Fähigkeit bestimmter Stoffe zur Fluoreszenzemission bei Anregung ohne zusätzliches Einbringen von Fluorophoren) in Tumoren mit einer guten Blutversorgung im Vergleich zum subkutanen Gewebe in unmittelbarer Nähe deutlich reduziert. Simultan wird jedoch auch eine Erhöhung der Absorption gemessen, die auf eine höhere Hb-Beladung im Spektralbereich der FL-Anregung und -Emission zurückzuführen ist. Morphologische Veränderungen sind durch verminderte Rückstreuung im optischen Fenster des Gewebes innerhalb des Tumors detektierbar. Außerhalb des Tumors ist eine Zunahme der Lichtstreuung im umgebenden stark streuenden, subkutanen Gewebe nachweisbar. Zusammenfassend können Fett und Wasser im NIR basierend auf charakteristischen Banden detektiert werden. Für Fluorophore, wie NADH findet ein hochsensitiver Nachweis mittels FL-Emissionssignalen statt.

Zur Bestimmung der Blutkonzentration erlauben die charakteristischen Banden im Visuellen (Absorptionen im Bereich zwischen 380-780 nm) eine eindeutige Interpretation.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht auf der technologischen Seite auch darin, ein einfach zu bedienendes Messsystem für die *in-vivo*-Gewebeanalyse mit hoher Abtastfrequenz zu entwickeln.

Kompromisse bei der Sensor konstruktion, der optischen Anordnung und der Datenauswertung innerhalb des Entwicklungsprozesses zum Erreichen des Ziels müssen hierfür in Kauf genommen werden. Die gesteckten Ziele dennoch zu erreichen, ermöglicht die Implementierung des gewählten Designs und des optischen Prinzips in ein preiswertes klinisches Werkzeug in der Größe einer 19G-Kanüle.

Die quantitative Auswertung für Fluorophore lässt sich durch die Komplexität der folgenden Matrixeffekte nicht einfach durchführen, aufgrund:

- der Inhomogenität der Brechungsindizes innerhalb der Probe,
- des Anregungs- und Detektionspfads der Photonen - quenchende Effekte direkt nach Austritt aus der Sendefaser als auch in die Detektionsfaser,
- der Einflüsse durch Gewebefarbstoffe und Pigmente auf den Extinktionskoeffizienten sowie
- des Zusammenhangs zwischen Streukoeffizient und Gewebemorphologie (Streuung und Multi-Streuung).

Die Überwindung der Matrixeffekte hin zur quantitativen Bestimmung erfordert einen Autokorrekturalgorithmus, der diese kompensiert. Der erste Schritt beschreibt quantitative NADH-FL-Messungen in einem Gewebephantom mit einstellbaren Streuparametern [3] und wurde vorab diskutiert.

Die Diagnose von Tumorgewebe wird nicht allein durch Spektraldaten und einen Auswertalgorithmus erreicht. Medizinisch geschultes Personal muss angeben, ob (und in welchem Umfang) Veränderungen in einem Gewebe von Normalwerten abweichen, unabhängig davon, ob die Werte für Fett, Blutkonzentration, Farbe, Streueigenschaften, Wassergehalt, Sauerstoffsättigung sowie metabolische Zwischenprodukte (wie NADH) oder andere Werte und Symptome klinischen Beweise liefern. Erforderliche zukünftige Untersuchungen müssen sich mit weiteren Korrelationen in Verbindung mit histologischen Veränderungen befassen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen auch, dass die Raman-Technologie eine hohe Bedeutung erlangen konnte, jedoch zum bisherigen Stand der Technik noch nicht sensitiv genug ist. Daher ist ein Entwicklungsziel die Miniaturisierung des Messaufbaus zu einem multi-photometrischen – im Gegensatz zu einem multi-spektrometrischen System für Echtzeitmessungen (inklusive Fluoreszenz- oder Raman-Signalkorrekturkanälen) vorzuschlagen. Bei Anwendung der genannten und getesteten Technologien könnten zukünftig sowohl die Sensitivität deutlich gesteigert als auch die Kosten des Gesamtsystems deutlich gesenkt werden.

4.4 Hochsensitives, an die Applikation anpassbares Raman-Spektrometer

Braun et al. [2] publizierten einen neuartigen und hochempfindlichen Spektrometer-Aufbau für Raman-Messungen. Dieser ermöglicht die direkte Implementierung der multispektralen Nadelsonde, ohne integrierte Filtereinheiten, durch Verbindung zum

Spektrometer-Eingang. Im Spektrometer befindet sich eine eigenständige, von der Sonde unabhängige Filtereinheit, die das Primärlicht effektiv unterdrückt.

Der Vorteil der neuartigen Spektrometer-Anordnung liegt in der Optimierung auf den maximalen Photonenfluss. Um Übertragungsverluste am Spektrometer-Eingang zu minimieren, erfolgt keine Implementierung strahlformender Teile wie Querschnittswandler oder konventionelle Eintrittsspalte. Stattdessen entsteht die Einkopplung direkt ohne Formung mit Faserdurchmessern von 50, 200, 400 und 600 μm . Größere Durchmesser erhöhen zwar die Intensität, führen aber zu einer geringeren spektralen Auflösung. Bei kleineren Durchmessern ist das Gegenteil der Fall. Es gilt immer abzuwägen, wann eine direkte Kopplung sinnvoll ist. Gedankenspiel: 600 μm direkt einkoppeln bedeutet einen sehr hohen Photonenfluss, aber auch eine Reduktion der spektralen Systemauflösung. Durch die Implementierung eines Wandlers (Eintrittsdurchmesser 600 μm mittels vieler 25 μm Monofasern auf Spaltgeometrie umgeformt) wird mehr Fluss generiert als durch eine einzelne 25 μm Faser – bei höheren Kosten. Generell schlägt ein Wandler jedoch mit Photonenverlusten um Faktor 2-3 aufgrund von Zwickel- und Koppelverlusten zu buche.

Da die Anregungswellenlänge die Intensität des Raman-Signals direkt beeinflusst, fällt die Wahl auf einen diodengepumpte Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 532 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., China).

Die Anregungsintensität I ist proportional zur vierten Potenz der Frequenz f ($I \propto \lambda^{-4}$). Somit kann eine 4,74-fach höhere Intensität unter Verwendung eines frequenzverdoppelten Nd: YAG-Lasers mit 532 nm anstelle der üblicherweise verwendeten 785 nm-Laserdiode erreicht werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm wird die höchste Quanteneffizienz der backthinned CCD genutzt, während die Sekundärlichtantwort für eine 785 nm Laserdiode auf der abnehmenden Sensitivitätsflanke des CCD-Chips detektiert wird. Die Wellenlängenstabilisierung des Lasers hat aufgrund der reduzierten spektralen Auflösung einen geringen Einfluss auf die Messergebnisse, da die Sekundärlichtantwort auf deutlich mehr Pixel, horizontal und vertikal, und damit eine größere Nachweisfläche abgebildet und verteilt wird.

Betrachtet man die marktüblichen Detektoren, ist es in der Regel so, dass bei kürzeren energiereichen Wellenlängen die Sensitivität steigt und die Kosten sinken und diese somit wirtschaftlicher werden.

Bei Erniedrigung der Primärlichtwellenlänge ist jedoch immer zwischen Gewinn durch stärkere Raman-Intensität und steigendem FL-Untergrund abzuwägen. Diese Fluoreszenz macht insbesondere in der Nähe der Nachweisgrenze den Löwenanteil der detektierten Photonen aus und bedeutet, wie zuvor diskutiert, eine sehr störanfällige Messgröße.

Das entwickelte Spektrometer kommt ohne bewegliche Teile aus und lässt sich problemlos in Serie fertigen. Die Nutzung von kostengünstigen VIS- oder NIR-durchlässiger Materialien gewährleistet eine wirtschaftliche und technisch machbare Umsetzung.

Selbst lange Faserlängen vermindern den Photonenfluss nur gering. Der Laser-Cleanup-Filter zum Blocken unerwünschter elastischer Streuung ist direkt in den kollimierten Lichtweg des Spektrometers implementiert. Dadurch wird eine höhere Flexibilität des Gesamtsystems erreicht. Sämtliche Sondentypen und fasergekoppelte Mikroskope mit und ohne Filtereinheiten können angeschlossen werden. Messungen mit konventionellen Rückstreusonden sind mit maximalem Photonenfluss möglich. Dies prädestiniert diesen Aufbau für stark streuende Medien. Mögliche Applikationen sind hierbei Gewebeschnitte, aber auch transkutane Messungen.

Die konventionelle Lösung für den Einsatz einer Rückstreusonde erfordert als Standardausrüstung eine Detektionsfaser, gefolgt von einem Notchfilter, eingebettet von zwei Linsen, die einen kollimierten Lichtweg generieren, in Kombination mit einer zweiten Faser zum Spektrometer. Entsprechend erhöhen viele optische Teile die Verluste und die Störanfälligkeit des Systems.

Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Möglichkeit, einen weiten Spektralbereich zu überwachen (Raman-Shift bis 4500 cm^{-1} (699,45 nm) oder höher). Systeme mit 785 nm Primärlicht-Quelle messen in der Regel bis zu 3400 cm^{-1} (1070,80 nm). Das Signal von Wasser bei etwa 3600 cm^{-1} (658,02 nm) kann mit dem entwickelten System quantifiziert werden, was besonders bei Anwendungen in wässrigen Systemen wie Gewebe und Gewebeschnitten, in denen Wasser als interner Standard verwendet werden kann, von Vorteil ist. Zusammenfassend ermöglicht das Messsystem sehr schnelle Abstraten oder alternativ Messungen mit minimaler Laserleistung, aber reduzierter spektraler Auflösung. Diese kann jedoch unter Kompromissen in Bezug auf die Sensitivität verbessert werden.

Die Ergebnisse, gewonnen innerhalb beispielhafter Applikationen, werden im Folgenden diskutiert: Die Nachweisgrenze für Ethylacrylat in Wasser kann auf

0,8 mmol/l gesenkt werden (Akkumulation: 20; Integrationszeit 4 s). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass dieser Wert in einer klaren Lösung ohne Streuer und Absorber unter Laborbedingungen ermittelt wurde. Bei der Anwendung dieses Systems in einer inline-Reaktionsüberwachung konnte der Reaktionsfortschritt in Echtzeit unter Verwendung der Raman-Spektroskopie mit stark reduzierter Anregungsintensität von nur 7 mW – gegenüber üblichen 500 mW - quantitativ in Echtzeit verfolgt werden [2].

In einer anderen Messreihe wird eine Abtastrate von 333 Hz in der Überwachung einer Zweiphasenströmung innerhalb eines Teflonschlauches realisiert [2]. Hierbei konnten die organischen Phasen von den wässrigen Phasen bei hohen Durchströmungsgeschwindigkeiten klar selektiert werden. Zusammenfassend kann mit dem System sowohl die Nachweisgrenze gesenkt, die Abtastrate gesteigert und die Primärlichtleistung je nach Anwendungsfall reduziert werden. Durch Entwicklungen in der Sensorik werden sich neue Wege öffnen und Applikationen erschließen, die niedrige Nachweisgrenzen bei geringer Primärlichtleistung fordern: beispielsweise die Bestimmung von Laktat durch die Haut bzw. Laktat oder ATP in der *in-vivo*-Gewebeanalytik, aber auch die Überwachung innerhalb von Schläuchen und Kapillaren.

4.5 Sammeleffiziente Sonde für Raman-Messungen und Fluoreszenzmessungen aus hohen Abständen

Die Validierung der Raman-Sonde erfolgt sowohl unter Laborbedingungen als auch durch Stoffidentifikation von Ethanol und Bewertung der Quereinflüsse durch verschiedene Borosilikat-Schauglasplatten. Im Technikumsumfeld wurde durch eine Echtzeit-Verfolgung eines Propylencarbonat-Wasser-Gemisches (im geschlossenen Kreislauf gepumpt) durch den Fensterzugang einer Schauglasarmatur PN 16/DN 50 die Systemstabilität über zwei Stunden erfolgreich getestet [1].

Die Funktion der Sonde und deren Eigenschaften unter Laborbedingungen überzeugen und adressieren neue Applikationsmöglichkeiten durch Fensterzugänge in der Medizintechnik, der Biotechnologie und im chemischen Umfeld auch aus sehr großen Entfernungen.

Durch Subtraktion von Ethanolpektrum und faktorisierte Referenz wird ein quasi untergrundfreies Spektrum von Ethanol erzeugt.

Die Nachweisgrenzen bewegen sich auf dem Niveau handelsüblicher Sonden, obwohl diese direkt mit dem Medium in Verbindung stehen und eine deutlich längere Brennweite als handelsübliche Raman-Sonden aufweisen:

- Eigenbau: 1-Zoll Sondenoptik (25,4 mm Brennweite; 256 mW Anregungsleistung am Kopf), Nachweisgrenze: 0,839 g/l (839 ppm)
- Eigenbau: 2-Zoll Sondenoptik (32 mm Brennweite; 196 mW Anregungsleistung am Kopf), Nachweisgrenze: 0,726 g/l (tiefer, da höhere Sammeleffizienz durch Fresnel-Linse erreicht)
- Kommerzielle Sonde, Fremdfabrikat: process Raman-probe (tec5 AG; 1,5 mm Brennweite 260 mW Anregungsleistung am Kopf), Nachweisgrenze: 0,466 g/l.
- Kommerzielle Sonde, Fremdfabrikat: Raman-Probe™ II (InPhotonics, USA; 7,5 mm Brennweite, 228 mW Anregungsleistung am Kopf), Nachweisgrenze: 0,906 g/l

Unter Verwendung der in dieser Arbeit entwickelten, zölligen Sonde wird in der Anwendung eine Präzision von etwa 5 g/l für Glucose und 1 g/l für Ethanol erreicht. In Bezug auf die maximalen Konzentrationen der Analyte für die Bestimmung von Glucose und Ethanol, betragen die relativen Fehler 5 bzw. 3 %. Der Verbrauch von Glucose im Nährmedium, die über die Massenbilanz in direkter Verbindung mit dem Umsatz der Zellen steht, kann direkt ermittelt werden.

Durch die durchgeführten Fermentationsüberwachungen konnte die Eignung der entwickelten Raman-Sonde für die Überwachung anderer Bioprosesse gezeigt werden. Diese Eigenschaft könnte insbesondere z.B. für die Produktion von Antikörpern durch CHO-Zellen, von Bedeutung sein [110–112]. Im Gegensatz zu kommerziellen Raman-Systemen, bei denen faseroptische Tauchsonden in direktem Kontakt mit der Zellkultur und dem Nährmedium stehen [112,113], ermöglicht die vorgestellte Raman-Sonde kontaktlose Analysen von außerhalb ins Medium hinein. Die Technik durchdringt durchsichtige Materialien wie Polymere oder Gläser (Fenster, Schläuche usw.) und das Kontaminationsrisiko wird obsolet.

In der Medizintechnik ist es zudem wichtig, verschiedene Eindringtiefen in Gewebe zu realisieren. Zur Lösung dieser Problemstellung wurde an der Detektionsseite der Sonde ein Linearsystem in zwei Achsen orthogonal zur optischen Achse vorgesehen. Hiermit können sich Anregungs- und Detektionsfleck zwar örtlich decken, aber auch gezielt ein Abstand erzeugt werden. Des Weiteren können mit der Sonde auch hochsensitive, fluoreszenzspektroskopische Messungen adressiert werden. Das

vorgestellte Sonden-Konzept kann durch den Austausch der Filter auf den jeweiligen Fluorophor abgestimmt werden.

Um dieses Messkonzept in Hinblick auf eine vollständige Prozesslösung zu entwickeln, sind neben den Anforderungen der DIN zusätzlich diejenigen der Medizin, als auch der chemischen Industrie einzuhalten. Exemplarisch sei hier die explosionsgeschützte Ausführung des Systems (ATEX-Zulassung) oder die elektromagnetische Verträglichkeit EMV nach NAMUR NE 21 oder die CE-Kennzeichnung von Medizinprodukten (93/42/EWG) genannt. Es ist daher plausibel, dass sich das System zu einer kostengünstigen und kontaktlosen Inline-Messtechnik mit hoher Verfügbarkeit sowohl in der Medizintechnik als auch in der Prozessanalysetechnik entwickelt.

4.6 Weitere Schritte im Optimierungsprozess des Sensors

Verschleißreduktion des Sondenkopfes durch den Einsatz spröder Werkstoffe mit einer gewissen Restelastizität (z. B. gehärteter Stahl, Hartmetall oder Keramik) mit dem Vorteil der Mehrfachnutzung ohne Nachschärfen/Schleifen und Polierprozesse.

- Entwicklung einer Einwegsonde auf Polymerbasis. Sowohl die Faseroptik als auch das benötigte Hüllrohr sind hierbei in Kunststoff ausführbar. Kritische Prozesse wie Reinigungs- und Sterilisationsprozesse im klinischen Alltag werden so gänzlich vermieden.
- Die nicht verwendeten Kanäle könnten als Backup-Kanäle verwendet werden, was zu einer höheren Sicherheitsintegrität und einer erhöhten Verfügbarkeit durch Hot-Spare-Redundanz führt.
- Die Methode zur quantitativen Fluoreszenzmessung im flüssigen Gewebephantom ist ein vielversprechender Ansatz für eine Übertragung in die Gewebediagnostik [3]. Speziell für Anwendungen, bei denen Streueffekte auftreten und bei denen die Fluoreszenzemission signifikant beeinflusst wird, sind bisher mit hohem Zeitaufwand erstellte, rechenintensive, chemometrische Modelle notwendig. Der in dieser Arbeit vorgestellte Algorithmus ist dagegen einfach und in Echtzeit durchzuführen.

Hierdurch ist er für den Einsatz auch in photometrischen Setups mit eingebetteten Systemen inklusive Auswertemethodik prädestiniert.

- Eine Erweiterung des spektralen Informationsgehaltes ist durch Hinzufügen der hochselektiven Raman-Messtechnik möglich. Das in dieser Arbeit entwickelte, nachweisempfindliche Spektrometer mit einstellbarer Auflösung und implementierter Filtereinheit zur Unterdrückung der Rayleigh-Streuung für hohen Photonenfluss [2] kann auf der Detektionsseite genutzt werden. Damit werden weitere Schlüsselmoleküle des Metabolismus zugänglich: ATP, Glutamin, Glukose und Milchsäure (niedrigere Glukose- und höhere Milchsäurekonzentration in der Tumormikroumgebung [114]).
- Integration der vorgestellten Pulsmessung in die Nadelsonde.
 - Erkennung von Blutgefäßen (Aorta, Arterien, Venen, Hohlvenen)
 - Nachweis von Thrombosen und lokalen Blutansammlungen, ohne oder mit geringer Durchblutung
 - Blutgefäße, die sich direkt vor dem Sensorkopf befinden, zeigen sich in einer Detektion pulsierender Ereignisse im grünen Spektralbereich
 - Lokale in-vivo-Pulsmessung: Pulsschlag durch schnellen Fourier-Transformationsalgorithmus (FFT) und Abtastrate in Echtzeit
 - Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit und des biologischen Gefäßalters, berechnet aus der arteriellen Druckwellenform (Arterienalter ArA) [88].
- Darüber hinaus steht mit dem, in dieser Arbeit entwickelten und publizierten Sondenkonzept, für die berührungslose Raman- und Fluoreszenzspektroskopie ein System mit hoher Sammeleffizienz trotz großer freier Gegenstandsweite zur Verfügung. Gerade diese freie Gegenstandsweite ermöglicht ein neues Anwendungsfeld: die Überwachung von Gewebeattributen und Vitalfunktionen aus großen Abständen heraus. Des Weiteren wurde die Möglichkeit entwickelt, mittels einer sehr hohen Apertur und damit eines kleinen Schärfentiefebereiches sehr kleine Probenvolumina aus einem Messabstand zu generieren [1]. Dies ermöglicht Messungen hinter optischen Fenstern [69], innerhalb dünner, transparenter Kapillaren [2], z. B. zum Monitoring von Wirkstoffkonzentrationen während einer Infusion oder zur Qualitätsüberwachung des Dialyseprozesses.
Zum Funktionsnachweis der entwickelten Auswertalgorithmen auch in trüben Medien, wurde die bekannte alkoholische Gärung von Glucose zu Ethanol

mittels *saccharomyces cerevisiae* erfolgreich durch den gläsernen Reaktormantel verfolgt [4].

- Eine Reduzierung des Hardwareaufwandes ist durch Signalreduktion auf eine geringe Anzahl von Wellenlängenbereichen möglich. Dies konnte zunächst mit dem hier vorgestellten spektroskopischen Aufbau und geeigneten Auswertalgorithmen virtuell simuliert [„Smart, label, free, multispectral in-vivo tissue analysis for cancer detection“, Braun et. al., eingereicht am 19.04.2018] und anschließend exemplarisch in Hardware umgesetzt werden [115].
- Aufbauend auf einem Mehrkanalphotometer von Egly et. al. mit Fremdlichtunterdrückung durch Lock-in-Verfahren und Nachweisgrenzen für die Fluorophore PpIX IX und NADH von 4×10^{-11} mol/l und 4×10^{-9} mol/l [81], werden robuste, kompakte und kostengünstige, photometrische Geräte mit geeigneten Bandpassfiltern, Lichtquellen und empfindlichen Detektoren zu einem hochsensitiven System mit schnellen Abtastraten und einer deutlichen Kostenreduktion realisiert. Ziel ist es, ein selbstlernendes Instrument [116] zu entwickeln, das Diagnostik und Therapie kombiniert und Ärzte bei ihrer täglichen Arbeit als zusätzliches Werkzeug unterstützt. Zusammen mit deren Erfahrung, Interpretation und Kenntnis des klinischen Gesamtbildes eines Patienten und in Kombination mit dem vorgestellten, faseroptischen Setup, kann dies zu einem leistungsfähigen, in-vivo-Mensch-Diagnose-System für die schnelle Klassifizierung und Charakterisierung von Gewebe, gefolgt von einer kurativen Behandlung und Therapie, führen.

5. Zusammenfassung

Der Einsatz von optischen Messtechniken im medizinischen Umfeld ist in der Regel auf eine Technologie beschränkt. In der Krebsdiagnostik kommt mehrheitlich die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (FL) zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wird eine kombinatorische Nutzung unterschiedlicher Spektroskopie-Arten für die instrumentelle Realisierung in einer neuartigen, patentierten, faseroptischen, multispektralen, *in-vivo* Stichsonde, basierend auf dem Rückstreuprinzip, entwickelt und erprobt. Diese patentierte autoklavierbare Nitinol-Sonde integriert die Kombination von ultravioletten (UV), sichtbaren (VIS), nahen Infrarot- (NIR) und Fluoreszenzspektren (FL). Sie ist anwendbar auch unter simultan angewandter Ultraschall-Bildgebung oder Magnetresonanztomographie (MRT).

Die Evaluation der Sonde erfolgte in einem Gewebephantom bei verschiedenen Streuer- und Absorberkonzentrationen *in-vitro*. Hierzu wurde eine Dispersion mit Wasser als Lösungsmittel entwickelt. Mit dieser konnten verschiedene Streu- und Absorptionskoeffizienten des menschlichen oder tierischen Gewebes nachgeahmt und deren Auswirkungen auf die Fluoreszenzemissionsmessung untersucht werden. Dieses künstliche Stoff-System basierte auf den Stoffen Wasser (Lösungsmittel), Calcilit 4 (Streuer, Calciumcarbonat, Partikelgröße 4 Mikrometer), New Coccine (Absorber, blutähnliches Spektrum) und Nicotinamidadeninucleotidhydrat (NADH; Fluorophor). Aus diesem Teil der Untersuchungen resultierend, entstand ein Streukorrektur-Auswertalgorithmus zur quantitativen Messung des Fluorophors (NADH). Der von uns publizierte Algorithmus erreichte eine Genauigkeit (RMSEP) von 0,093 mmol/l innerhalb physiologischer NADH-Konzentrationen. Die praktische Anwendbarkeit wurde in einem Tiermodell (NMRI-Mäuse) demonstriert. Bei den Versuchen wurde die Nadel, die im Rahmen dieser Dissertation entwickelt und publiziert wird, startend in gesundem Gewebe, konsekutiv durch bösartiges Gewebe geführt und die spektralen Daten aller multimodalen Messbereiche bei ihren jeweiligen Positionen aufgenommen. Die Kombination aller gewonnenen Informationen ermöglichte eine markierungsfreie Klassifikation des jeweiligen Gewebes mithilfe einer virtuellen, photometrischen Hauptkomponentenanalyse (PCA).

Durch diese Point-of-Care-Messtechnik konnte zwischen malignem und benignem Gewebe aufgrund von Veränderungen biochemischer, physikalisch-morphologischer und kolorimetrischer Werte ((Oxy-/Deoxy-)Hämoglobin, Fett und Gewebestreueung) unterschieden werden. Eine *in-vivo*-Vorauswahl für die Entnahme von Biopsien ist

dadurch greifbar. Im Rahmen dieser Untersuchungen - speziell zur möglichen Einbeziehung der Raman-Technik - wurde ein, über den Stand der Technologie hinausgehendes, hochempfindliches Spektrometer, zur direkten Ankopplung an die Stichsonde und an eine neuartige Raman-Sonde zur kontaktlosen Messung aus großen Abständen entwickelt und aufgebaut. Beide Methoden wurden publiziert [1,2,4].

6. Quellenverzeichnis

- 1 Braun F, Schalk R, Brunner J, Eckhardt HS, Theuer M, Veith U, et al.: Nicht-invasive Prozesssonde zur Inline-Ramananalyse durch optische Schaugläser. *Tm - Tech Mess* 2016; 83.
- 2 Braun F, Schwolow S, Seltenreich J, Kockmann N, Röder T, Gretz N, et al.: Highly Sensitive Raman Spectroscopy with Low Laser Power for Fast In-Line Reaction and Multiphase Flow Monitoring. *Anal Chem* 2016; 88:9368–9374.
- 3 Braun F, Schalk R, Heintz A, Feike P, Firmowski S, Beuermann T, et al.: NADH-fluorescence scattering correction for absolute concentration determination in a liquid tissue phantom using a novel multispectral magnetic-resonance-imaging-compatible needle probe. *Meas Sci Technol* 2017; 28:075903.
- 4 Schalk R, Braun F, Frank R, Rädle M, Gretz N, Methner F-J, et al.: Non-contact Raman spectroscopy for in-line monitoring of glucose and ethanol during yeast fermentations. *Bioprocess Biosyst Eng* 2017; 40:1519–1527.
- 5 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al.: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- 6 Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D: Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 2012; 13:790–801.
- 7 Galanski M, Lackner K: Prinzipien der bildgebenden Diagnostik in der Onkologie; in Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (eds): *Kompendium Internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp 429–448.
- 8 Hefti F, Jundt G: Grundsätzliches zur Tumordiagnostik; in : *Kinderorthopädie in der Praxis*. Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp 583–593.
- 9 Malek D, Käab-Sanyal V: Jahresbericht Evaluation 2013. Deutsches Mammographie- Screening-Programm. Kooperationsgemeinschaft Mammographie, Berlin, Kooperationsgemeinschaft Mammographie, Berlin, 2016.
- 10 Hesse S, Leve J, Goerdeler P, Zapp W: *Benchmarking im Krankenhaus*. Wiesbaden, Springer Fachmedien Wiesbaden, 2013.
- 11 Synytsya A, Alexa P, Besserer J, Boer JD, Froschauer S, Gerlach R, et al.: Raman spectroscopy of tissue samples irradiated by protons. *Int J Radiat Biol* 2004; 80:581–591.
- 12 Krishna CM, Sockalingum GD, Bhat RA, Venteo L, Kushtagi P, Pluot M, et al.: FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387:1649–1656.

- 13 Lyng F, Gazi E, Gardner P: Preparation of Tissues and Cells for Infrared and Raman Spectroscopy and Imaging. Royal Society of Chemistry, 2011.
- 14 Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS: Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:12371–12376.
- 15 Shafer-Peltier KE, Haka AS, Fitzmaurice M, Crowe J, Myles J, Dasari RR, et al.: Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. *J Raman Spectrosc* 2002; 33:552–563.
- 16 Widjaja E, Zheng W, Huang Z: Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines. *Int J Oncol* 2008; 32:653–662.
- 17 Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H: Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 107:1047–1052.
- 18 Devpura S, Thakur JS, Sethi S, Naik VM, Naik R: Diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma using Raman spectroscopy: tongue tissues: Squamous cell carcinoma diagnosis using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2012; 43:490–496.
- 19 Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H: Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer* 2006; 94:1460–1464.
- 20 Kondepoti VR, Oszinda T, Heise HM, Luig K, Mueller R, Schroeder O, et al.: CH-overtone regions as diagnostic markers for near-infrared spectroscopic diagnosis of primary cancers in human pancreas and colorectal tissue. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387:1633–1641.
- 21 Kondepoti VR, Heise HM, Backhaus J: Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390:125–139.
- 22 Wang L, Mizaikoff B: Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391:1641–1654.
- 23 Mo J, Zheng W, Low JJH, Ng J, Ilancheran A, Huang Z: High Wavenumber Raman Spectroscopy for in Vivo Detection of Cervical Dysplasia. *Anal Chem* 2009; 81:8908–8915.
- 24 Ali JH, Wang WB, Zevallos M, Alfano RR: Near Infrared Spectroscopy and Imaging to Probe Differences in Water Content in Normal and Cancer Human Prostate Tissues. *Technol Cancer Res Treat* 2004; 3:491–497.
- 25 Kukreti S, Cerussi A, Tromberg B, Gratton E: Intrinsic Near-Infrared Spectroscopic Markers of Breast Tumors. *Dis Markers* 2008; 25:281–290.

- 26 Cerussi A, Shah N, Hsiang D, Durkin A, Butler J, Tromberg BJ: In vivo absorption, scattering, and physiologic properties of 58 malignant breast tumors determined by broadband diffuse optical spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006; 11:044005.
- 27 Brancalion L, Durkin AJ, Tu JH, Menaker G, Fallon JD, Kollias N: In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol* 2001; 73:178–183.
- 28 Butte PV, Mamelak AN, Nuno M, Bannykh SI, Black KL, Marcu L: Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *NeuroImage* 2011; 54:S125–S135.
- 29 Cheng X, Mao J, Bush R, Kopans DB, Moore RH, Chorlton M: Breast cancer detection by mapping hemoglobin concentration and oxygen saturation. *Appl Opt* 2003; 42:6412–6421.
- 30 Vaupel P, Mayer A, Höckel M: Relationship between hemoglobin levels and tumor oxygenation; in Nowrousian MR (ed): *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology*. Vienna, Springer Vienna, 2008, pp 265–282.
- 31 Almog N: Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* 2010; 294:139–146.
- 32 Chen P, Fernald B, Lin W: Estimation of regional hemoglobin concentration in biological tissues using diffuse reflectance spectroscopy with a novel spectral interpretation algorithm. *Phys Med Biol* 2011; 56:3985–4000.
- 33 Kragh M, Quistorff B, Lund EL, Kristjansen PEG: Quantitative Estimates of Vascularity in Solid Tumors by Non-Invasive Near-Infrared Spectroscopy. *Neoplasia* 2001; 3:324–330.
- 34 Pu Y, Shi L, Pratavieira S, Alfano RR: Two-photon excitation microscopy using the second singlet state of fluorescent agents within the “tissue optical window.” *J Appl Phys* 2013; 114:153102.
- 35 Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Menke H, Ruzicka T, Goerz G, Olbrisch RR: Successful Surgery of Multiple Recurrent Basal Cell Carcinomas Guided by Photodynamic Diagnosis. *Aesthetic Plast Surg* 1997; 21:437–439.
- 36 Kriegmair M, Baumgartner R, Knuchel R, Stepp H, Hofstadter F, Hofstetter A: Detection of Early Bladder Cancer by 5-Aminolevulinic Acid Induced Porphyrin Fluorescence. *J Urol* 1996; 155:105–110.
- 37 Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, Stepp H, Rick K, Gamarra F, et al.: Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36:169–174.
- 38 Lohmann W, Mußmann J, Lohmann C, Künzel W: Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989; 31:249–253.

- 39 Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E: QUANTITATIVE OPTICAL SPECTROSCOPY FOR TISSUE DIAGNOSIS. *Annu Rev Phys Chem* 1996; 47:555–606.
- 40 Eng J, Lynch RM, Balaban RS: Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophys J* 1989; 55:621–630.
- 41 Pradhan A, Pal P, Durocher G, Villeneuve L, Balassy A, Babai F, et al.: Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J Photochem Photobiol B* 1995; 31:101–112.
- 42 Ramanujam N: Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues. *Neoplasia* 2000; 2:89–117.
- 43 Heikal AA: Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med* 2010; 4:241–263.
- 44 Piston DW, Masters BR, Webb WW: Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy. *J Microsc* 1995; 178:20–27.
- 45 Do'ra E, Gyulai L, Arisztid G.B. K: Determinants of brain activation-induced cortical NAD/NADH responses in vivo. *Brain Res* 1984; 299:61–72.
- 46 Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE: Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 1996; 740:268–274.
- 47 Georgakoudi I, Jacobson BC, Müller MG, Sheets EE, Badizadegan K, Carr-Locke DL, et al.: NAD (P) H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res* 2002; 62:682–687.
- 48 Ortner M-A, Fusco V, Ebert B, Sukowski U, Weber-Eibel J, Fleige B, et al.: Time-gated fluorescence spectroscopy improves endoscopic detection of low-grade dysplasia in ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2010;71:312–318.
- 49 Weiß D, Brandl H: Fluoreszenzfarbstoffe in der Natur: Cumarine. *Chem Unserer Zeit* 2013; 47:50–54.
- 50 Bradley RS, Thorniley MS: A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence. *J R Soc Interface* 2006; 3:1–13.
- 51 Finlay JC, Conover DL, Hull EL, Foster TH: Porphyrin Bleaching and PDT-induced Spectral Changes are Irradiance Dependent in ALA-sensitized Normal Rat Skin In Vivo. *J Photochem Photobiol* 2007; 73:54–63.
- 52 Wu J, Feld MS, Rava RP: Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. *Appl Opt* 1993; 32:3585.

- 53 Hull EL, Ediger MN, Unione AHT, Deemer EK, Stroman ML, Baynes JW: Noninvasive, optical detection of diabetes: model studies with porcine skin. *Opt Express* 2004; 12:4496.
- 54 Middelburg TA, Hoy CL, Neumann HAM, Amelink A, Robinson DJ: Correction for tissue optical properties enables quantitative skin fluorescence measurements using multi-diameter single fiber reflectance spectroscopy. *J Dermatol Sci* 2015; 79:64–73.
- 55 Kanick SC, Robinson DJ, Sterenborg HJCM, Amelink A: Method to quantitate absorption coefficients from single fiber reflectance spectra without knowledge of the scattering properties. *Opt Lett* 2011; 36:2791.
- 56 Kanick SC, Gamm UA, Sterenborg HJCM, Robinson DJ, Amelink A: Method to quantitatively estimate wavelength-dependent scattering properties from multidiameter single fiber reflectance spectra measured in a turbid medium. *Opt Lett* 2011; 36:2997.
- 57 Gamm UA, Kanick SC, Sterenborg HJCM, Robinson DJ, Amelink A: Measurement of tissue scattering properties using multi-diameter single fiber reflectance spectroscopy: in silico sensitivity analysis. *Biomed Opt Express* 2011; 2:3150.
- 58 Drakaki E, Makropoulou M, Serafetinides AA: In vitro fluorescence measurements and Monte Carlo simulation of laser irradiation propagation in porcine skin tissue. *Lasers Med Sci* 2008; 23:267–276.
- 59 Tinet E, Tualle JM, Etori D, Avrillier S: Real time transformation of pre-computed Monte Carlo results for fitting optical measurements in biomedical applications. *Monte Carlo Methods Appl* 2001; 7.
- 60 Finlay JC, Foster TH: Recovery of hemoglobin oxygen saturation and intrinsic fluorescence with a forward-adjoint model. *Appl Opt* 2005; 44:1917.
- 61 Braun F, Gretz N, Rädle M: Vorrichtung und Verfahren zur Erkennung von Krebstumoren und anderen Gewebeveränderungen
- 62 Kessler RW (ed): *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*. Weinheim, Wiley-VCH, 2006.
- 63 Kessler RW: Perspectives in process analysis. *J Chemom* 2013; 27:369–378.
- 64 Schrader B, Bougeard D: *Infrared and raman spectroscopy: methods and applications*. Weinheim; Basel, VCH, 1995.
- 65 Trigg GL, Vera ES, Greulich W, American Institute of Physics (eds): *Encyclopedia of applied physics*. New York, NY, VCH Publishers, 1991.
- 66 Atkins PW, De Paula J: *Physikalische Chemie*. Hauptbd. , 5. Auflage Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.

- 67 Rinke G, Ewinger A, Kerschbaum S, Rinke M: In situ Raman spectroscopy to monitor the hydrolysis of acetal in microreactors. *Microfluid Nanofluidics* 2011; 10:145–153.
- 68 Fletcher PDI, Haswell SJ, Zhang X: Monitoring of chemical reactions within microreactors using an inverted Raman microscopic spectrometer. *ELECTROPHORESIS* 2003; 24:3239–3245.
- 69 Schwolow S, Braun F, Rädle M, Kockmann N, Röder T: Fast and Efficient Acquisition of Kinetic Data in Microreactors Using In-Line Raman Analysis. *Org Process Res Dev* 2015; 19:1286–1292.
- 70 Vankeirsbilck T, Vercauteren A, Baeyens W, Van der Weken G, Verpoort F, Vergote G, et al.: Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 2002; 21:869–877.
- 71 Iversen JA, Berg RW, Ahring BK: Quantitative monitoring of yeast fermentation using Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406:4911–4919.
- 72 Iversen JA, Ahring BK: Monitoring lignocellulosic bioethanol production processes using Raman spectroscopy. *Bioresour Technol* 2014; 172:112–120.
- 73 Günzler H, Gremlich H-U: IR spectroscopy: an introduction. Weinheim, Wiley-VCH, 2002.
- 74 Houben C, Nurumbetov G, Haddleton D, Lapkin AA: Feasibility of the Simultaneous Determination of Monomer Concentrations and Particle Size in Emulsion Polymerization Using in Situ Raman Spectroscopy. *Ind Eng Chem Res* 2015; 54:12867–12876.
- 75 Duerig T, Pelton A, Stöckel D: An overview of nitinol medical applications. *Mater Sci Eng A* 1999; 273–275:149–160.
- 76 Pelton AR, Stöckel D, Duerig TW: Medical Uses of Nitinol. *Mater Sci Forum* 2000; 327–328:63–70.
- 77 Morgan N.: Medical shape memory alloy applications—the market and its products. *Mater Sci Eng A* 2004; 378:16–23.
- 78 Jacques SL: Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol* 2013; 58:5007–5008.
- 79 Reiss PD, Zuurendonk PF, Veech RL: Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984; 140:162–171.
- 80 Ma N, Digman MA, Malacrida L, Gratton E: Measurements of absolute concentrations of NADH in cells using the phasor FLIM method. *Biomed Opt Express* 2016; 7:2441.
- 81 Egly D, Geörg D, Rädle M, Beuermann T: A compact multi-channel fluorescence sensor with ambient light suppression. *Meas Sci Technol* 2012; 23:035702.

- 82 Banerjee A, Shuai Y, Dixit R, Papautsky I, Klotzkin D: Concentration dependence of fluorescence signal in a microfluidic fluorescence detector. *J Lumin* 2010; 130:1095–1100.
- 83 Kessler W: *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik: ein Lehrbuch*. 1. Aufl., 1. Nachdr Weinheim, WILEY-VCH, 2008.
- 84 Melzer A, Michitsch S, Konak S, Schaefers G, Bertsch T: Nitinol in Magnetic Resonance Imaging. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2004; 13:261–271.
- 85 Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, et al.: *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage, deutsche Ausgabe New York, McGraw-Hill Education, 2016.
- 86 Weigmann H-J, Lindemann U, Antoniou C, Tsirikas GN, Stratigos AI, Katsambas A, et al.: UV/VIS Absorbance Allows Rapid, Accurate, and Reproducible Mass Determination of Corneocytes Removed by Tape Stripping. *Skin Pharmacol Physiol* 2003; 16:217–227.
- 87 Cozzolino D, Barlocco N, Vadell A, Ballesteros F, Gallieta G: The use of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to predict colour on both intact and homogenised pork muscle. *LWT - Food Sci Technol* 2003; 36:195–202.
- 88 Shibata S, Levine BD: Biological aortic age derived from the arterial pressure waveform. *J Appl Physiol* 2011; 110:981–987.
- 89 Tromberg BJ, Cerussi A, Shah N, Compton M, Durkin A, Hsiang D, et al.: Imaging in breast cancer: Diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2005; 7.
- 90 Wilson RH, Nadeau KP, Jaworski FB, Tromberg BJ, Durkin AJ: Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization. *J Biomed Opt* 2015 ;20:030901.
- 91 Volynskaya Z, Haka AS, Bechtel KL, Fitzmaurice M, Shenk R, Wang N, et al.: Diagnosing breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy and intrinsic fluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt* 2008; 13:024012.
- 92 Bigio IJ, Mourant JR: Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Phys Med Biol* 1997; 42:803–814.
- 93 Büning-Pfaue H: Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chem* 2003; 82:107–115.
- 94 Chapman GA, Johnson D, Bodenham AR: Visualisation of needle position using ultrasonography. *Anaesthesia* 2006; 61:148–158.
- 95 Pouchert CJ, Aldrich Chemical Company: *The Aldrich library of infrared spectra*. Milwaukee, Sigma Aldrich, 1981.

- 96 Picard A, Daniel I, Montagnac G, Oger P: In situ monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure. *Extremophiles* 2007; 11:445–452.
- 97 Emin MA, Teumer T, Schmitt W, Rädle M, Schuchmann HP: Measurement of the true melt temperature in a twin-screw extrusion processing of starch based matrices via infrared sensor. *J Food Eng* 2016; 170:119–124.
- 98 Young AT: Rayleigh scattering. *Appl Opt* 1981; 20:533.
- 99 Tipler PA, Mosca G, Wagner J: Physik: für Wissenschaftler und Ingenieure. 7. Aufl. 2015 Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- 100 Hergert W (ed): The Mie theory: basics and applications. Heidelberg, Springer, 2012.
- 101 Gouesbet G, Gréhan G: Generalized Lorenz-Mie theories. Berlin Heidelberg, Springer, 2011.
- 102 Halliday D, Resnick R, Walker J, Koch SW: Physik: ideal für technisch orientierte Studiengänge. Bachelor-Edition, 2. überarbeitete Auflage Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- 103 Gail L, Gommel U, Hortig H-P (eds): Reinraumtechnik. 3., aktualisierte und erw. Aufl Berlin, Springer, 2012.
- 104 Bohren CF, Huffman DR: Absorption and scattering of light by small particles. Weinheim, Wiley-VCH, 2004.
- 105 Anderson RR, Parrish JA: The Optics of Human Skin. *J Invest Dermatol* 1981; 77:13–19.
- 106 DeBerardinis RJ, Chandel NS: Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2016; 2:e1600200–
- 107 Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, e1600200. Olayide I, Emuowhochere R: Biology of glucose metabolization in cancer cells. *J Oncol Sci* 2017; 3:45–51.
- 108 Warburg O, Wind F, Negelein E: THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY 1927;
- 109 Gatenby RA, Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4:891–899.
- 110 Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM: 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here? *Biotechnol Adv* 2009; 27:1023–1027.
- 111 Wurm FM: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22:1393–1398.

- 112 Berry B, Moretto J, Matthews T, Smelko J, Wiltberger K: Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biotechnol Prog* 2015; 31:566–577.
- 113 André S, Cristau LS, Gaillard S, Devos O, Calvosa É, Duponchel L: In-line and real-time prediction of recombinant antibody titer by in situ Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2015; 892:148–152.
- 114 Jiang B: Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis* 2017; 4:25–27.
- 115 M. Nachtmann, F. Braun, S. Keck, H.-S. Eckhardt, C. Mattolat, N. Gretz, et al.: 2.4 - Ex-tauglicher Kompakt-Raman-Sensor für das Qualitätsmonitoring in der chemischen Industrie. Wunstorf, Germany, 2017.
- 116 García Molina JF, Zheng L, Sertdemir M, Dinter DJ, Schönberg S, Rädle M: Incremental Learning with SVM for Multimodal Classification of Prostatic Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2014; 9:e93600.

7. Curriculum Vitae und Veröffentlichungen

Curriculum Vitae

Frank Braun

geboren am 12. August 1984
in Heidelberg

Studium:

10/2010 – 02/2012 Hochschule Mannheim in Kooperation
mit der Universität Mannheim
Fachrichtung: Chemieingenieurwesen
Abschluss: Master of Science

10/2006 – 08/2010 Hochschule Mannheim
Fachrichtung: Chemische Technik
Abschluss: Bachelor of Science

09/2005 – 10/2006 Berufsakademie Mannheim
Duales Studium in Kooperation mit
Heidelberger Druckmaschinen AG
Fachrichtung: Maschinenbau

Praktische Tätigkeiten:

03/2012 – Hochschule Mannheim; Institut für Prozessmesstechnik
und innovative Energiesysteme
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Optische Messtechnik / Spektroskopie

09/2011 – 02/2012 BASF SE
Masterthesis: Aufbau eines multimodalen
Bildanalyse systems

12/2010 – 08/2011 Hochschule Mannheim; Institut für Prozessmesstechnik
und innovative Energiesysteme
Projektmitarbeiter

- 08/2010 – 12/2010 Hochschule Mannheim; Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme
HIWI: Entwicklung optische Messsysteme
- 04/2010 – 08/2010 Hochschule Mannheim; Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme in Kooperation mit BorgWarner Turbo Systems
Bachelorthesis: Messtechnische Erfassung der Auslenkung einer Turboladerwelle mittels optischer Sensoren
- 08/2009 – 09/2009 Abwasserverband Bergstraße
Praktische Studienarbeit: Inbetriebnahme der Anlage zur solaren Trocknung von Klärschlamm
- 08/2008 – 01/2009 Roche Diagnostics GmbH
Praxissemester: Qualitätskontrolle/Qualitätssicherung
Erstellen einer IR-Fremdpartikelquellenbibliothek

Zivildienst:

- 08/2004 – 05/2005 Psychiatrisches Zentrum Nordbaden

Schulbildung:

- 09/2001 – 07/2004 Informationstechnisches Gymnasium Wiesloch
Abschluss: Abitur
Leistungskurse: Chemie und Informationstechnik
- 09/1995 – 07/2001 Realschule Leimen
Abschluss: mittlere Reife

Veröffentlichungen/Patent

Schwolow S, Braun F, Rädle M, Kockmann N, Röder T: **Fast and Efficient Acquisition of Kinetic Data in Microreactors Using In-Line Raman Analysis**. Org. Process Res. Dev 2015; 19, 1286–1292.

Braun F, Gretz N, Rädle M. **Vorrichtung und Verfahren zur Erkennung von Krebstumoren und anderen Gewebeveränderungen**. DE 10 2014 107 342 A1, 2015.

Braun F, Schwolow S, Seltenreich J, Kockmann N, Röder T, Gretz N, et al.: **Highly Sensitive Raman Spectroscopy with Low Laser Power for Fast In-Line Reaction and Multiphase Flow Monitoring**. Anal Chem 2016; 88:9368–9374.

Braun F, Schalk R, Brunner J, Eckhardt HS, Theuer M, Veith U, et al.: **Nicht-invasive Prozesssonde zur Inline-Ramananalyse durch optische Schaugläser**. Tm - Tech Mess 2016; 83.

Braun F, Schalk R, Heintz A, Feike P, Firmowski S, Beuermann T, et al.: **NADH-fluorescence scattering correction for absolute concentration determination in a liquid tissue phantom using a novel multispectral magnetic-resonance-imaging-compatible needle probe**. Meas Sci Technol 2017; 28:075903.

Schalk R, Braun F, Frank R, Rädle M, Gretz N, Methner F-J, et al.: **Non-contact Raman spectroscopy for in-line monitoring of glucose and ethanol during yeast fermentations**. Bioprocess Biosyst Eng 2017; 40:1519–1527.

Nachtmann M, Braun F, Keck S, Eckhardt H-S, Mattolat C, Gretz N, et al.: **Ex-
tauglicher Kompakt-Raman-Sensor für das Qualitätsmonitoring in der
chemischen Industrie**. AMA Service GmbH 2017.

A customized multispectral needle probe combined with a virtual photometric setup for in vivo detection of Lewis lung carcinoma in an animal model: a proof-of-concept study.

Braun F, Schalk R, Nachtmann M, Hien A, Frank R, Beuermann T, Methner F-J, Kränzlin B, Rädle M and Gretz N. (Status: under review)

New Coccine absorption correction to determine absolute NADH concentrations of a liquid tissue model.

Braun F, Heintz A, Schalk R, Beuermann T, Gretz N, Rädle M.

(Journal: Measurement Science and Technology / Status: just accepted / DOI: 10.1088/1361-6501/aad875)

A new process Raman photometer designed for installation in explosive atmospheres.

Nachtmann M, Keck S, Braun S, Eckhardt HS, Mattolat C, Gretz N, Scholl S, Rädle M. (Journal: Journal of Sensors and Sensor Systems / Status: under review)

Comparison of Raman and mid-infrared spectroscopy for real-time monitoring of yeast fermentations.

Schalk R, Braun F, Heintz A, Lacono G, Rädle M, Gretz N, Methner F-J, Beuermann T.

(Journal: Applied Spectroscopy / Status: under review)

8. Danksagung

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind durch eine enge Kooperation mit der Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim, Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) und der Hochschule Mannheim, Kompetenzzentrum CeMOS, Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme (PI) entstanden. Hierdurch war es erst möglich die Themenfelder Medizin/Medizintechnik und optische Messtechnik effizient miteinander zu vereinen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Norbert Gretz und Herrn Prof. Dr. Matthias Rädle für die ausgezeichnete Betreuung und die Bereitstellung sämtlicher benötigten Mittel. In regelmäßigen konstruktiven Diskussionen haben beide maßgebend zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung, die wertvollen Anmerkungen, Ratschläge und fachlichen Anregungen.

Ein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Beuermann, Herrn Prof. Dr. Rudolf Frank, Herrn Marcel Nachtmann, Herrn Andreas Hien, Frau Julia Seltenreich, Frau Annabell Heintz, Frau Viktoria Skude und Herrn Alexander Kron der mich federführend als Mentor in die optische Messtechnik eingearbeitet hat.

Darüber hinaus bei Herrn Dr. Sebastian Schwolow und Herrn Robert Schalk für die tolle gemeinsame Zeit, Zusammenarbeit und das interdisziplinäre Arbeiten in der Reaktionstechnik, Mikroverfahrenstechnik und Biotechnology.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Bettina Kränzlin und all meinen Arbeitskollegen, die mich jederzeit tatkräftig unterstützten haben.

Dies gilt für die Mitarbeiter des ZMFs und PIs gleichermaßen - auf alle war jederzeit Verlass.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern und meiner Freundin, die mich unterstützt haben und immer für mich da waren.