

Unsichtbare Spuren im Blut

Mithilfe der Infrarot- und Raman-Spektroskopie lassen sich Marker für verschiedene Krankheiten im Blut bestimmen.

Wolfgang Petrich

Chemische Methoden erlauben es, die Inhaltsstoffe des Blutes sehr genau zu bestimmen, und bilden daher eine unverzichtbare Säule der medizinischen Diagnostik. Da diese Methoden zum Teil recht aufwändig sind, versuchen Wissenschaftler nun, diagnoserelevante Informationen direkt aus dem Infrarot- oder Raman-Spektrum des Blutes abzuleiten. Erste Erfolge dieser reagensfreien Diagnostik bedürfen zwar noch der weiteren Überprüfung und Entwicklung, sie sind jedoch auf dem Weg zur Anwendung einen großen Schritt vorangekommen.

Blut ist ein ganz besonderer Saft – dies stand auch schon lange vor Goethes Faust außer Zweifel. Medizinisch gesehen besteht Blut aus zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten) und einer Flüssigkeit, dem Plasma. Lässt man Blut stehen und zentrifugiert es anschließend, trennt es sich in einen Blutkuchen (Zellen, Fibrinogen, etc.) und eine gelblich-klare Flüssigkeit, das Serum. Wasser ist wiederum Hauptbestandteil des Serums, gefolgt von Eiweiß (Proteinen), Fett (Lipiden) und niedermolekularen Stoffen mit geringerer Konzentration. Zu letzteren gehört mit einer Konzentration von typischerweise 100 mg/dl die Glucose, der Blutzucker.

Die Konzentration der Blutbestandteile spielt häufig eine entscheidende Rolle für die Diagnostik. Beispielsweise diagnostiziert ein Arzt beim Auftreten einer Glucosekonzentration von mehr als 126 mg/dl (nach mindestens achtstündigem Fasten) Diabetes mellitus. Erhöhte Werte von Amylase und Lipase deuten auf eine entzündete Bauchspeicheldrüse hin, zu hohe Konzentrationen von Harnsäure im Blut geben einen Hinweis auf eine Nierenstörung ebenso wie erhöhte Werte für Kreatinin. Gerinnungsparameter, Hormonstatus oder Tumormarker sind ebenfalls von hoher medizinischer Relevanz. Diese Liste lässt sich lange fortsetzen.

Mit Ausnahme des Hämoglobins, also des roten Blutfarbstoffs, sind die Inhaltsstoffe ohne geeignete Nachweisverfahren bzw. ohne weitere Hilfsmittel meist nicht zu erkennen. Derzeit gibt es daher zahlreiche analytische Methoden, um entnommene Blutproben „in vitro“ zu untersuchen. In der klinischen Labordiagnostik wird häufig die hohe Spezifität eines chemischen Prozesses mit der hohen Sensitivität physikalischer Nachweisverfahren kombiniert. So wird beispielsweise mittels eines Enzyms aus Glucose eine



Roche Diagnostics

äquivalente Stoffmenge eines Moleküls erzeugt, das im ultravioletten Spektralbereich absorbiert und sich mittels Absorptionsspektroskopie sehr genau quantitativ nachweisen lässt.

Diese nasschemischen Analysemethoden können jedoch sehr aufwändig sein. Daher wäre es vorteilhaft, wenn man nicht nur Hämoglobin, sondern auch die anderen Inhaltsstoffe des Blutes ohne chemische Reagenzien „sehen“ könnte. Offensichtlich gelingt dies zwar nicht unmittelbar im sichtbaren Spektralbereich der elektromagnetischen Strahlung, vielleicht aber zumindest in anderen spektralen Bereichen? Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit den Dipolmomenten von Molekülen lässt im Zusammenhang mit spezifischen Molekülschwingungen Hoffnung aufkommen (**Infokasten**). Zum einen existiert ein Beitrag für die Wechselwirkung des permanenten

Spektroskopische Methoden könnten eine Laboranalytik ohne chemische Reagenzien ermöglichen, bei welcher aus einem einzigen Spektrum gleichzeitig mehrere Inhaltsstoffe von Blut bestimmt werden könnten.

KOMPAKT

- Die Infrarot- bzw. Raman-Spektroskopie erlauben es, die Konzentration einiger Bestandteile des Blutes mit hoher Spezifität zu bestimmen und damit zur Diagnose verschiedener Krankheiten beizutragen.
- Anstatt das Spektrum in Signaturen der einzelnen Blutbestandteile zu zerlegen, lässt es sich über eine Mustererkennung auch direkt mit Krankheiten verknüpfen.
- Im Test befindet sich zurzeit ein Sensor, der eine Untersuchung auch „in vivo“ ermöglichen würde.

Prof. Dr. Wolfgang Petrich, Kirchhoff-Institut für Physik, Im Neuenheimer Feld 227, Universität Heidelberg und Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim

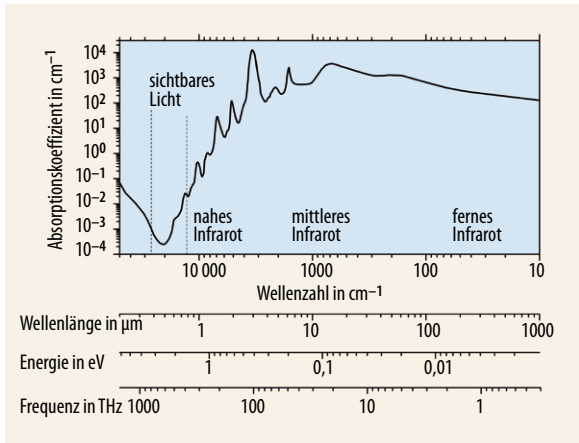


Abb. 1 Wasser absorbiert stark im Infraroten, da z. B. die Biegeschwingung bei 1644 cm^{-1} liegt oder die symmetrische bzw. asymmetrische Streckschwingung bei 3280 bzw. 3490 cm^{-1} . Zum Vergleich sind neben der Wellenzahl, d. h. der inversen Wellenlänge, auch die Wellenlänge, Photonenenergie und Frequenz angegeben.

Gegensatz zu gasförmigen Proben wie der Atemluft [2] spielt bei wässrigen Proben – und Blut besteht zu einem wesentlichen Teil aus Wasser – die Absorption von Wasser eine entscheidende Rolle. Auch Wasser besitzt die Grundmoden seiner Schwingungen bei Frequenzen im Infraroten (Abb. 1). Die resonante Wechselwirkung eines molekularen Dipolmoments mit elektromagnetischer Strahlung birgt daher in puncto Analyse biologischer Proben gleichzeitig einen Segen – das sehr gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Mittelinfrarotspektroskopie – als auch einen Fluch – die alles überlagernden Wasserbanden: Eine $0,1\text{ mm}$ dicke, wassergefüllte Küvette absorbiert durchgehende MIR-Strahlung der Wellenlänge $10\text{ }\mu\text{m}$ zu fast $99,9\%$.

Anders ist die Situation im „biologischen Fenster“ der sichtbaren Strahlung und angrenzender Frequenzbereiche (Abb. 1). Hier absorbiert Wasser praktisch nicht, sodass das typischerweise zur Raman-Spektroskopie verwendete Licht sehr gut die wässrige Probe durchdringt und das inelastisch gestreute Licht die molekularen Schwingungen der Inhaltsstoffe offen legen sollte. Leider ist der Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung sehr klein (etwa 10^4 - bis 10^6 -mal kleiner als der Wirkungsquerschnitt von Fluoreszenzprozessen), sodass die Raman-Spektroskopie in der biomedizinischen Optik gegenüber der MIR-Spektroskopie lange als deutlich unterlegen galt. Ferner führt die Bestrahlung biologischer Proben mit sichtbarem oder UV-Licht häufig zu Fluoreszenzlicht, das dem ohnehin kleinen Raman-Signal als Untergrund ein beträchtliches Rauschen überlagern kann. Nahinfrarote Strahlung verursacht zwar weniger Fluoreszenz, führt aber rasch zu sehr kleinen Signalen, da der Raman-Wirkungsquerschnitt wie λ^{-4} von der Wellenlänge abhängt.

1) Die Definition der genauen Bereiche unterscheidet sich leicht je nach Literatur, häufig wird z. B. auch der Bereich von $2,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $25\text{ }\mu\text{m}$ als MIR-Bereich bezeichnet.

elektrischen Dipolmoments mit elektromagnetischer Strahlung derjenigen Frequenz, bei der ein Molekül seine Eigenschwingungen ausführt. Diese Strahlung liegt typischerweise im mittleren Infrarot (MIR), also bei Wellenlängen zwischen 3 und $50\text{ }\mu\text{m}$.¹⁾ Zum anderen kann die Strahlung ein molekulares Dipolmoment induzieren. Dieses Phänomen liefert Beiträge bei der eingestrahnten Frequenz (Rayleigh-Streuung) sowie bei einer um die molekulare Schwingungsfrequenz erhöhten oder erniedrigten Frequenz. Diese inelastische Raman-Streuung tritt in der Regel mit Licht im sichtbaren, nahe ultravioletten oder nahen infraroten Spektralbereich auf.

Sowohl die MIR- als auch die Raman-Spektroskopie haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile [1]. Im

EIN KLASSISCHES MODELL ZUR INFRAROT- UND RAMAN-SPEKTROSKOPIE

Ein zweiatomiges Molekül mit dem permanenten elektrischen Dipolmoment d_0 und der Polarisierbarkeit a sei einem äußeren elektrischen Feld E ausgesetzt.¹⁾ Für kleine Auslenkungen des Abstandes R zwischen den beiden Atomkernen um die Ruhelage R_0 lassen sich d_0 und a nähern durch

$$d_0 \approx d_0(R_0) + \left. \frac{\partial d_0}{\partial R} \right|_{R_0} (R - R_0) + \dots$$

und

$$a \approx a(R_0) + \left. \frac{\partial a}{\partial R} \right|_{R_0} (R - R_0) + \dots$$

Schwingt das Molekül mit der Kreisfrequenz ω_v um seine Ruhelage, so gilt in harmonischer Näherung $R(t) - R_0 = r \cos(\omega_v t)$. Für das elektrische Feld mit der Schwingungsfrequenz ω gilt $E(t) = E_0 \cos(\omega t)$. Somit resultiert für das Gesamtdipolmoment

$$d = d_0 + aE \approx d_0(R_0) + \left. \frac{\partial d_0}{\partial R} \right|_{R_0} r \cos(\omega_v t) + a(R_0) E_0 \cos(\omega t) + \left. \frac{\partial a}{\partial R} \right|_{R_0} r \cos(\omega_v t) E_0 \cos(\omega t) + \dots$$

Mit $2\cos x \cdot \cos y = \cos(x+y) + \cos(x-y)$ folgt hieraus eine Summe von fünf Termen:

- das konstante elektrische Dipolmoment $d_0(R_0)$
- die für die Infrarotspektroskopie relevante dynamische

Änderung des permanenten Dipolmoments bei der Eigenfrequenz der Molekularschwingung

$$r \left. \frac{\partial d_0}{\partial R} \right|_{R_0} \cos(\omega_v t)$$

- die als Rayleigh-Streuung bezeichnete elastische Streuung der einfallenden Strahlung $a(R_0) E_0 \cos(\omega t)$
- der Teil der Raman-Streuung, bei dem das gestreute Licht eine um die Schwingungsfrequenz erniedrigte Frequenz aufweist („Stokes-verschoben“)

$$\frac{r E_0}{2} \left. \frac{\partial a}{\partial R} \right|_{R_0} \cos((\omega - \omega_v) t)$$

- und der Teil der Raman-Streuung, bei dem das gestreute Licht eine um die Schwingungsfrequenz erhöhte Frequenz aufweist („Anti-Stokes-verschoben“):

$$\frac{r E_0}{2} \left. \frac{\partial a}{\partial R} \right|_{R_0} \cos((\omega + \omega_v) t)$$

Die Infrarotspektren treten somit bei der Frequenz der Eigenschwingung des Moleküls auf und basieren auf Änderungen des permanenten Dipolmoments während einer Molekülschwingung. Mit $\omega \gg \omega_v$ liegen die Raman-Spektren hingegen meist im sichtbaren und unmittelbar angrenzenden Spektralbereich. Ihre Amplitude ergibt sich aus der Änderung der Polarisierbarkeit während der Schwingung.

1) Zur Vereinfachung sei anstelle des Dipolmomentvektors und des Polarisierbarkeitstensors nur die jeweilige Projektion auf die Richtung des elektrischen Feldes betrachtet.

Klinische Chemie ohne Reagenzien?

Für die MIR-Spektroskopie gibt es Strategien, den Einfluss der starken Wasserabsorption zu reduzieren oder gar zu vermeiden, nämlich mit intensiven Lichtquellen wie Quantenkaskadenlaser oder Synchrotrons, durch die Reduktion der Absorptionslänge oder die simple Trocknung der Probe. Das Trocknen beeinflusst zwar die molekulare Struktur von z. B. Proteinen oder einfachen Molekülen wie Glucose [3]. Solange dies aber reproduzierbar geschieht, lässt sich aus einer Reihe von Kalibrationsmessungen ein Modell ableiten, das Vorhersagen zur Molekülkonzentration aus dem MIR-Spektrum erlaubt (Abb. 2). Auf Basis eingetrockneter Serumproben ist es in der Tat gelungen, die Konzentration von medizinisch relevanten Inhaltsstoffen mit einer Genauigkeit vorherzusagen, wie sie für die klinische Anwendung meist ausreicht (Tab. 1).

Aus Sicht der klinischen Anwendung ist neben der Präzision und Richtigkeit der Vorhersage auch wichtig, wie lange eine Messung dauert. Pipettieren, Eintrocknen, Spektroskopie und Auswertung in einer klinisch üblichen Stapelverarbeitung benötigt in Summe über 95 Proben gemittelt etwa fünf Minuten pro Probe. Dies ist zu vergleichen mit der Raman-Spektroskopie bei fünf Minuten Integrationszeit pro Probe, da dies direkt in der flüssigen Phase möglich ist (Abb. 3). Ein direkter Vergleich derselben Serumproben unter – aus Sicht der Klinik – identischen Randbedingungen zeigt überraschenderweise, dass Raman- und Mittelinfrarotspektroskopie ebenbürtig sind (Tab. 1) [4, 5]. Die MIR-Spektroskopie übertrifft zwar auch hier wie erwartet in puncto Signal-zu-Rausch-Verhältnis die Raman-Spektroskopie bei weitem. Jedoch stellt sich heraus, dass nicht das Rauschen, sondern die Wiederholgenauigkeit der Messung die limitierende Größe der MIR-Spektroskopie von Biofilmen ist – und das trotz Pipettierroboter, Dreifachbestimmung und eng kontrollierter Eintrocknung.

Somit ist es für einige wichtige Inhaltsstoffe unabhängig von der Spektroskopiemethode mit klinischer Relevanz möglich, ihre Konzentration zu bestimmen. Ein derartiger Ansatz könnte die Labordiagnostik revolutionieren, da sich mit nur einer Messung die Konzentration mehrerer Inhaltsstoffe gleichzeitig ermitteln lässt. Lediglich der Auswertalgorithmus legt fest, welche Kombination von Schwingungsbanden für welche Konzentrationsbestimmung herangezogen wird. Die Auswertung kann für neuartige Marker bei Bedarf noch nach Jahren stattfinden, da es deutlich einfacher ist, Spektren zu speichern als biologische Proben für die chemische Analyse aufzubewahren.

Klassifikation von Spektren

Doch was geschieht mit all denjenigen spektralen Signaturen, die bei der quantitativen Analyse unberücksichtigt bleiben? Man könnte die Ansicht vertreten, dass das Spektrum von Blut eigentlich schon

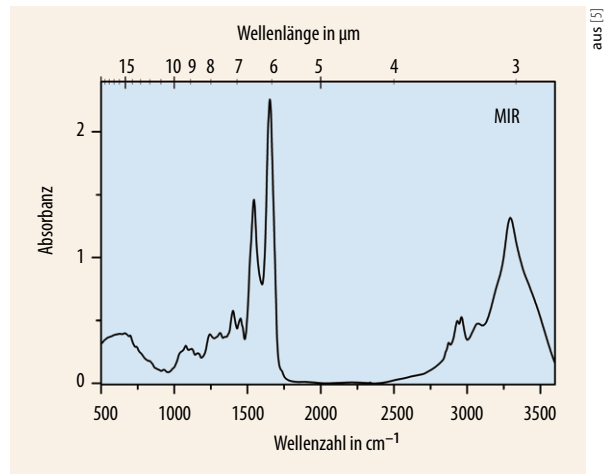


Abb. 2 Für einen eingetrockneten Serum-Biofilm weist die Absorbanz, das Produkt aus Absorptionskoeffizient und Weglänge, reproduzierbar die dominierenden Banden für Proteine (insbesondere Albumin und Globuline) bei Wellenlängen zwischen 6 und 7 µm auf. Neben dem durch O-H-Schwingungen der Biomoleküle verursachten Maximum um 3 µm sind auch die kleineren Banden um 3,5 µm charakteristisch für Lipide, d. h. Blutfette wie Cholesterin und Triglyceride.

alle Informationen vereint. Die Zerlegung eines Probenspektrums in biochemische Einzelkomponenten und das anschließende Zusammensetzen der Einzelinformationen zu einem Gesamtbild des Blutes, d. h. zu einem Krankheitsbild, steckt im Grunde genommen schon in der Form des Gesamtspektrums. In der Tat sind Schwingungsspektren von Blutproben gesunder Probanden innerhalb eines sehr engen Toleranzbandes deckungsgleich, während bei einigen Krankheiten spezifische Signaturen aufzutreten scheinen [6]. Lässt sich aber eine derartige, direkte Verknüpfung der Spektren mit einer Erkrankung belegen? Anders gefragt: Kann die Spektroskopie direkt einen Zusammenhang zwischen der Probe und dem Gesamtbild des Puzzles herstellen, ohne überhaupt die Frage nach den einzelnen Puzzleteilen zu stellen? Wir haben dies an mehreren Beispielen untersucht und wollen es an zwei illustrieren.

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE, „Rinderwahn“) ist eine Erkrankung des Gehirns, verursacht durch das veränderte Prionprotein PrP^{Sc}. Dessen Nachweis im Rinderhirn mittels der „Western-

Vorhersagefehler der Spektroskopie					
Stoff	mittl. Konz. in mg/dl	bei Infrarot		bei Raman	
		mg/dl	%	mg/dl	%
Gesamtprotein	7008	328	5	176	3
Triglyzeride	198	18,1	9	20,7	10
Glucose	154	14,7	10	17,1	11
Gesamtcholesterin	133	16,1	12	11,5	9
LDL Cholesterin	118	19,4	16	15,7	13
HDL Cholesterin	54	11,9	22	11,0	20
Harnstoff	31	3,3	11	4,4	14
Harnsäure	5,3	1,4	26	1,1	21

Tab. 1 Infrarot- und Raman-Spektroskopie können verschiedene Analyten im Blutserum sehr gut nachweisen. Angegeben ist neben der in der Studie auftretenden mittleren Konzentration jedes Analyten der mittlere Vorhersagefehler einer unabhängigen Validierungsmessung an 99 Proben.

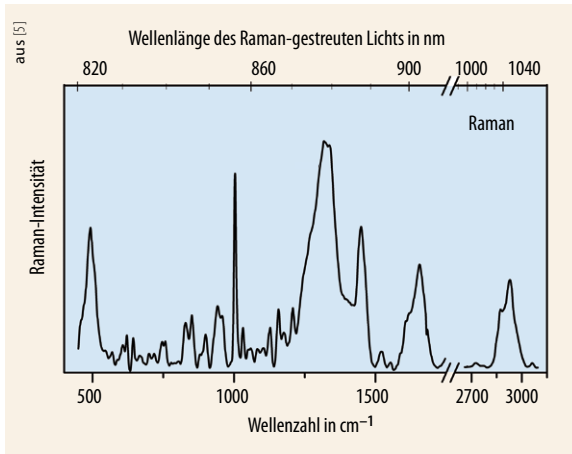


Abb. 3 Bei der Streuung von nahinfrarotem Licht (785 nm) an einer flüssigen Serumprobe zeichnen sich nach Untergrundkorrektur die Molekülschwingungen aufgrund des Raman-Effekts durch spektrale Beiträge im Streulicht bei benachbarten Wellenlängen ab.

Plot-Technik“ ist nur an Hirngewebe und damit post mortem möglich. Vorteilhaft wäre es, auch das lebende Tier testen zu können – idealerweise anhand einer einfachen Blutprobe –, um so z. B. Übertragungswege oder einen Krankheitsverlauf untersuchen zu können. Die Arbeitsgruppe von D. Naumann am Robert-Koch-Institut hat erstmals für eine solche Untersuchung die Molekülspektroskopie eingesetzt [7]. In einer darauf folgenden Studie, die von unserem Team bei Roche Diagnostics GmbH, dem Robert-Koch-Institut und weiteren Partnern gemeinsam durchgeführt wurde, ist es gelungen, in einem Blindtest zwischen dem Serum von gesunden Rindern und solchen im BSE-Endstadium mit einer Zuverlässigkeit von 94 % zu differenzieren – und das, obgleich die bekannte Obergrenze für die Prionkonzentration im Blut deutlich unter der Nachweisgrenze der MIR-Spektroskopie liegt [8]! Dennoch ist es möglich, Proben von kranken Rindern zu erkennen, weil offenbar nicht die Prionproteine selbst, sondern die Auswirkungen von BSE nachgewiesen werden. Aus physikalischer Sicht interessant ist der damit einhergehende Vergleich mehrerer Datenanalyseverfahren am gleichen Datenkollektiv [8].²⁾

Doch lässt sich diese Erkennung von Krankheitsmustern (Diagnostic Pattern Recognition, DPR) auch auf die Humandiagnostik übertragen? In der bisher größten Studie zu DPR ist es gelungen, anhand von 1008 Serumproben einen Algorithmus zur Analyse von MIR-Spektren zu erzeugen, der in einem Blindtest bei Patienten mit akutem Thoraxschmerz diejenigen rund 10 % der Patienten herausfinden konnte, die einen akuten Herzinfarkt hatten [10]. Die Zuverlässigkeit für die korrekte Identifikation des Herzinfarkts (Sensitivität, „richtig positiv“) lag bei 88,5 %. Umgekehrt wurden von den mittels MIR-Spektroskopie als „kein Herzinfarkt“ kategorisierten Proben 85,1 % (Spezifität, „richtig negativ“) durch die Referenzanalytik und weiterführende Diagnostik bestätigt.

Allerdings lassen sich (ganz allgemein in der medizinischen Diagnostik) durch Veränderung des

Schwellenwerts eines Markers die Sensitivität oder auch die Spezifität jeweils zu Lasten der anderen Größe erhöhen. Eine objektive Aussage für die Qualität eines klinischen Markers liefert daher oftmals die aus der Fernmeldetechnik bekannte „Receiver Operating Characteristics“ (ROC), bei der die Sensitivität gegenüber der Größe „1-Spezifität“ („falsch positiv“) für variierende Schwellenwerte aufgetragen sind (Abb. 4). Idealerweise läge die Sensitivität eines Markers möglichst bei 100 % und 1-Spezifität bliebe weitgehend bei 0 %, sodass die Fläche unter der in Abb. 4 dargestellten Kurve ein gutes Maß für die Qualität eines Markers ist. In der Tat liefert der DPR-Marker einen sehr guten Wert von 0,921 und ist mit gegenwärtigen Labor-Markern durchaus vergleichbar.

In dieser Studie an Patienten mit akutem Thoraxschmerz wurden neben den Proben für die MIR-Spektroskopie auch Blutproben für die klassische Laboranalytik abgenommen. Proteinkomplexe (Troponin) spielen eine entscheidende Rolle, um einen akuten Herzinfarkt zu diagnostizieren – allerdings zeigt dieser Marker die Schädigung des Herzmuskels an und erreicht sein Maximum erst einige Stunden nach Einsetzen des Thoraxschmerzes.³⁾ Umgekehrt zeigen klinische Studien, dass die Mortalität ohne therapeutische Intervention gerade in den ersten Stunden nach Einsetzen der Beschwerden stark zunimmt. Unterhalb von sechs Stunden ist in dieser Studie der Marker DPR dem Troponin deutlich überlegen, während beide Marker bei großen Zeiten, nach acht bis zwölf Stunden, ebenbürtig sind (Abb. 5).

Diese ersten Studien bedürfen zwar der kritischen, noch umfangreicheren klinischen Überprüfung, bevor an einen standardmäßigen Einsatz zu denken ist. Zusammen mit früheren Studien zur Erkennung von Di-

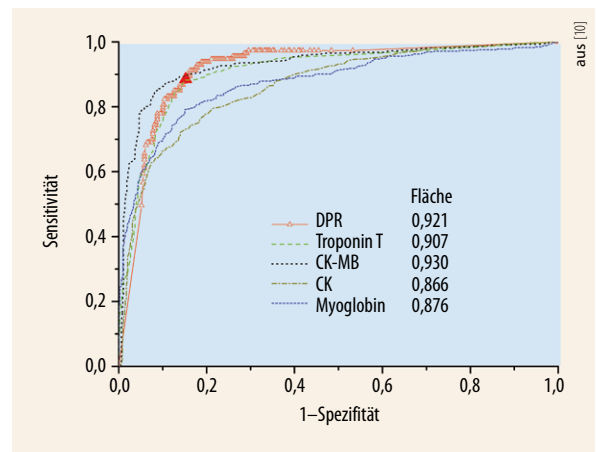


Abb. 4 Dieses ROC-Diagramm zeigt für unterschiedliche Marker den Anteil der Proben, die korrekt einem Herzinfarkt zugeordnet werden (Sensitivität), gegen den Anteil der „falsch positiven“ Proben, bei denen der akute Thoraxschmerz andere Ursachen hat (1-Spezifität). Die Marker sind Troponin, Kreatinkinase (CK), Kreatinkinase „muscle-brain“ (CKMB) und Myoglobin sowie die Klassifikation von Mittelinfrarotspektren (DPR). Jeder Punkt einer ROC-Kurve entspricht einem bestimmten Schwellenwert. Das große rote Dreieck markiert z. B. für einen Schwellenwert von 0,5 eine Sensitivität von 88,5 % und eine Spezifität von 85,1 %.

2) Verglichen wurden einfache und eine robuste Hauptkomponentenregression mit iterativer Auswahl der charakteristischen Spektralbereiche, ein neuronales Netz und eine „Support Vector Machine“. Später wurden diese Ansätze durch den Einsatz der „Gini-importance“ ergänzt [9].

3) Die zum Zeitpunkt der hier präsentierten DPR-Studie verfügbaren, spezifischen Marker benötigten in der klinischen Praxis in der Tat eine Wartezeit von 6 Stunden für den eindeutigen Ausschluss eines Herzinfarkts. Die neuere Version des Troponin-T-Tests erlaubt inzwischen bereits nach 3 Stunden einen äußerst sensitiven Nachweis.

abetes [11], des metabolischen Syndroms [12] oder auch der rheumatoiden Arthritis [13] unterstreicht dieses Ergebnis das ausgeprägte Potenzial, das die Erkennung von Krankheitsmustern mithilfe Molekülspektroskopie besitzt, um – zumindest bei ausgewählten medizinischen Fragen – mithilfe der reagensfreien klinischen Analytik die medizinische Diagnostik zu unterstützen.

Anwendbarkeit in vivo

Ein erheblicher Anteil der bisher beschriebenen Experimente basiert auf der MIR-Spektroskopie von eingetrockneten Proben. Für den Einsatz in vivo wäre allerdings die Raman-Spektroskopie die Methode der Wahl. Zudem könnten alternative Ansätze der MIR-Spektroskopie zielführend sein. Letztlich gilt es auch in der MIR-Spektroskopie, trotz der durch das Lambert-Beersche Gesetz hohen Absorption von Wasser ein gegenüber dem Rauschen hinreichend großes Signal zu gewährleisten.

Zum einen lässt sich die Wechselwirkungslänge mithilfe der abgeschwächten Totalreflexion reduzieren: Licht wird beim Übergang vom optisch dichten in ein optisch dünnes Medium für große Winkel im dichten Medium totalreflektiert. Dabei dringt ein kleiner Teil des Lichts in das dünnere Medium ein. Die Intensität dieses evaneszenten Feldes nimmt allerdings exponentiell mit dem Abstand von der Grenzfläche ab; die typische Abklingtiefe liegt in der Größenordnung der halben Wellenlänge. Befindet sich ein Absorber im optisch dünneren Medium, absorbiert er einen Teil des evaneszenten Lichtfeldes, der im reflektierten Signal fehlt. Auf diese Weise gelingt es, Prozesse sehr nahe an einer Grenzfläche bei limitierter Eindringtiefe zu erforschen. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass hiermit auch quantitative Messungen möglich sind [14].

Zum anderen ließe sich die Wechselwirkungslänge durch dünnere Küvetten reduzieren. Allerdings skaliert gemäß des Hagen-Poiseuillschen Gesetzes der für die Befüllung eines dünnen Küvettenspaltes benötigte Druck umgekehrt proportional zur dritten Potenz der Schichtdicke.⁴⁾ Dies erschwert die Herstellung und Anwendung von konvektiv befüllten Dünnschichtküvetten.

Ein anderer Ansatz basiert darauf, die Intensität der Strahlungsquelle, genauer gesagt die spektrale Leistungsdichte im interessierenden Wellenlängenbereich, deutlich zu erhöhen, damit trotz hohem Extinktionskoeffizienten, hoher Stoffkonzentration und nicht hinreichend reduzierter Wechselwirkungslänge noch genügend viele Photonen den Detektor erreichen. Für die Infrarotspektroskopie werden hierfür in letzter Zeit zunehmend Synchrotronquellen [15] sowie Quantenkaskadenlaser [16] eingesetzt.

Kürzlich ist es uns am Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg gelungen, eine geringe Küvettendicke mit der hohen spektralen Energiedichte eines Quantenkaskadenlasers zu kombinieren. Diese

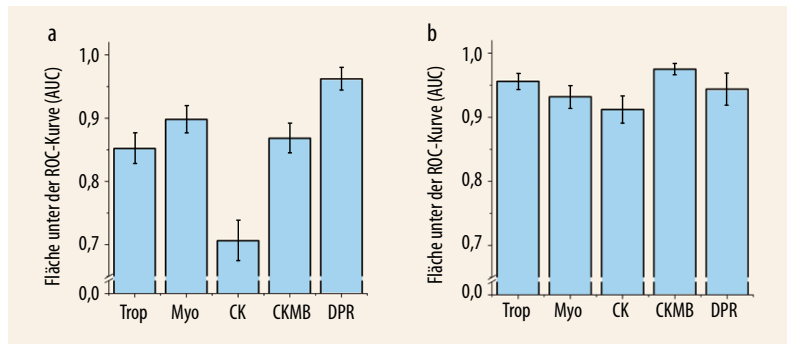


Abb. 5 Die Fläche unter den in Abb. 4 dargestellten Kurven dient häufig als Maß für die Qualität eines diagnostischen Markers. Die Proben aus den ersten sechs Stunden nach Einsetzen des Thoraxschmerzes waren mit den klinischen Markern vom Idealwert 1 noch deutlich entfernt (a), im Gegensatz zum reagensfreien, spektroskopischen DPR-Verfahren. Nach acht bis zwölf Stunden liegen die Marker etwa gleichauf (b).

Arbeiten zur faserbasierten MIR-Transmissionsspektroskopie zielen darauf ab, einen minimal-invasiven Sensor zu erhalten, der den Glucosespiegel kontinuierlich in vivo überwacht. Hierfür wird die Emission eines Quantenkaskadenlasers bei einer für die Glucose spezifischen Absorptionswellenlänge von 9,7 μm kombiniert mit einer miniaturisierten Küvette, die über die Diffusion des zu untersuchenden Moleküls befüllt wird. Realisieren ließ sich diese Mikroküvette durch einen einfachen Spalt oder ein Loch in einer Lichtleitfaser, deren Durchmesser mit 500 μm hinreichend gering ist, damit sich die Konzentrationen im umgebendem Medium und der Flüssigkeit im Spalt oder Loch rasch ausgleichen (Abb. 6). Um die Grenzen eines derartigen Ansatzes zu beschreiben, wird die durch Rauschen und Drift verursachte Signalschwankung nach Erstellen einer Eichkurve in Einheiten der Glucosekonzentration ausgedrückt. Bei dieser „rauschäquivalenten Konzentration“ (Noise Equivalent Concentration, NEC) handelt es sich um diejenige Konzentration des Analyten (hier: Glucose), unterhalb derer das analytenspezifische Messsignal im Rauschen verschwinden würde.⁵⁾ Durch die Kombination von miniaturisierter Küvette und Quantenkaskadenlaser war es möglich, im Labor mit wässrigen Glucoselösungen bei einer Integrationszeit von nur vier Sekunden in vitro

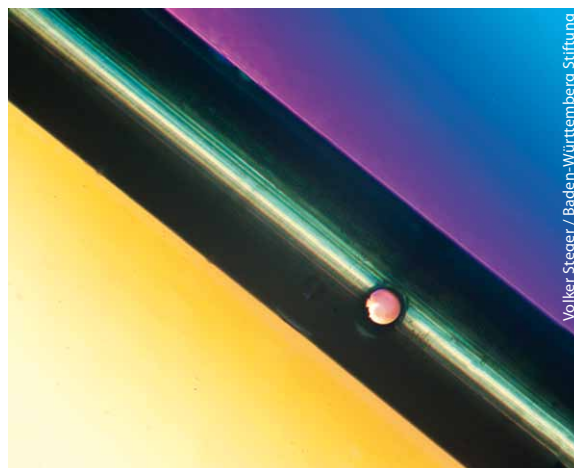


Abb. 6 Mit einer „Bohrung“ in einer Glasfaser lässt sich eine Mikroküvette realisieren.

4) Während bei einem runden Strömungsquerschnitt mit Radius r der gleiche Volumenstrom einen proportional r^4 ansteigenden Befüllungsdruck erfordert, gilt für stark asymmetrische, rechteckige Querschnitte der Breite b und Höhe h die Proportionalität zu b^3h^4 . Die dem Gesetz zugrunde liegende Annahme einer Newtonschen Flüssigkeit stimmt für Serum, Plasma und interstitielle Flüssigkeit, nicht aber für Vollblut.

5) Genauer gesagt handelt es sich um das in Konzentrationseinheiten umgerechnete Signal, das der zweifachen Standardabweichung des Rauschens bei gegebener Integrationszeit entspricht.

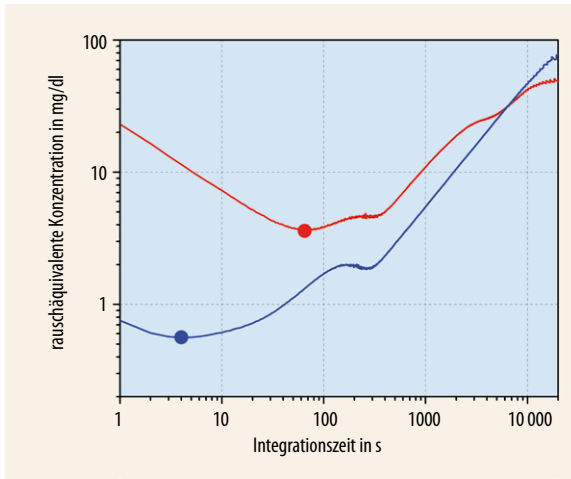


Abb. 7 Die rauschäquivalente Glucosekonzentration ist für kleine Integrationszeiten von Rauschen und für große Zeiten von Systemdrift dominiert. Während in ersten in-vitro-Laborexperimenten zur faserbasierten MIR-Spektroskopie an Testlösungen das Minimum der Kurve noch bei etwa einer Minute und 4 mg/dl lag (roter Punkt), ist es inzwischen gelungen, die optimale Integrationszeit zu verkürzen und Werte unter 1 mg/dl zu erzielen (blauer Punkt) [18]. Dies entspricht einer Messgenauigkeit von besser als 1 %.

eine rauschäquivalente Konzentration unterhalb von 1 mg/dl zu erreichen (Abb. 7) [17, 18]. Dies ist mit der eingangs erwähnten mittleren Glucosekonzentration von 100 mg/dl zu vergleichen.

Die hier beschriebenen Experimente mit einer in eine optische Faser eingebrachten Mikroküvette wurden bisher nur in vitro, also im Labor an wässrigen Lösungen durchgeführt. Weiterführende Experimente müssen zeigen, inwiefern diese viel versprechenden Laborergebnisse auf die Verwendung als minimal-invasiver Sensor in vivo übertragbar sind. Kernthemen werden dabei die Biokompatibilität des Sensorkopfes und Stabilität des Sensorsignals in vivo sein. Ziel ist es, den weniger als 1 mm dicken Sensorkopf durch die Haut in das subkutane Fettgewebe des Bauchs einzubringen und so einen spektroskopischen Zugang zur Gewebsflüssigkeit zu schaffen. Die Glucosekonzentration in dieser „interstitiellen Flüssigkeit“ korreliert mit der Blutglucose, sodass eine reagensfreie, kontinuierliche Überwachung des Blutzuckerspiegels möglich wäre.

Ausblick

Die Schwingungsspektroskopie ermöglicht es, entnommene Blutproben bzw. deren Derivate wie Plasma oder Serum quantitativ zu analysieren. Auf Basis von Mustererkennungsverfahren für die gewonnenen Spektren bietet sich zudem ein vollkommen neuartiger Ansatz der medizinischen Diagnostik, um zwischen verschiedenen Krankheitsursachen zu unterscheiden. Möglicherweise lässt die Kombination von biomedizinischer Schwingungsspektroskopie und Mikrotechnologie es sogar zu, auch ohne Probennahme (in vivo) zur medizinischen Diagnostik beizutragen.

Das Anwendungspotenzial der Infrarot- und Raman-Spektroskopie beschränkt sich nicht auf flüssige Proben: Inzwischen sind sowohl MIR- als auch Raman-Mikroskope auf dem Markt, mit denen sich Gewebsschnitte orts aufgelöst untersuchen lassen und die einen molekularen Fingerabdruck der Probe ohne Färbetechniken oder Fluoreszenzmarkierung liefern. Dies ist insbesondere zur Reduktion der Präanalytik und zur Objektivierung in der histopathologischen Praxis hilfreich. Die gegenwärtigen technischen Fortschritte bei Lichtquellen und Detektoren sowie das zunehmende Interesse der Biologen und Mediziner geben Grund zu einem hoffnungsvollen Ausblick für die biomedizinische Spektroskopie molekularer Schwingungen.

*

Um die hier beschriebenen Ergebnisse zu erreichen, war eine große Zahl engagierter Kollegen, Mitarbeiter und Unterstützer nötig, von denen ich hier insbesondere Gerhard Werner, Reinhold Mischler, Daniel Rohleder (jetzt Dioptic GmbH), Michael Hein, Gerd Grenner, Dirk Voelkel und Matthias Essenpreis bei Roche Diagnostics erwähnen möchte sowie Christian Vrančić, Niels Kröger und Annemarie Pucci am Kirchhoff-Institut für Physik. Ferner danke ich der Baden-Württemberg Stiftung für die Finanzierung der Arbeiten zur minimal-invasiven Sensorik.

Literatur

- [1] P. Lasch und J. Kneipp (Hrsg.), Biomedical Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons, New York (2008)
- [2] M. Mürtz und P. Hering, Physik Journal, Oktober 2008, S. 37
- [3] C. Vrančić und W. Petrich, J. Phys. Chem. A **115**, 12373 (2011)
- [4] D. Rohleder, W. Kiefer und W. Petrich, Analyst **129**, 906 (2004)
- [5] D. Rohleder et al., J. Biomed. Opt. **10**, 031108 (2005)
- [6] G. Werner und W. Petrich, Phys. Bl. **55**, 49 (1999)
- [7] P. Lasch et al., Anal. Chem. **75**, 6673 (2003)
- [8] T. C. Martin et al., Analyst **129**, 897 (2004)
- [9] B. Menze et al., BMC Bioinformatics **10**, 213 (2009)
- [10] W. Petrich et al., Analyst **134**, 1092 (2009)
- [11] W. Petrich et al., Appl. Opt. **39**, 3372 (2000)
- [12] J. Früh et al., Proceedings of SPIE **4614**, 63 (2002)
- [13] A. Staib et al., Clin. Chim. Acta **308**, 79 (2001)
- [14] H.-M. Heise, R. Marbach, T. Koschinsky und F. A. Gries, Appl. Spectrosc. **48**, 85 (1994)
- [15] D. Moss (Hrsg.), Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy, RSC Publishing, London (2011)
- [16] J. Faist et al., Science **264**, 553 (1994)
- [17] C. Vrančić et al., Analyst **136**, 1192 (2011)
- [18] N. Kröger, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (2011)

DER AUTOR

Im Anschluss an das Studium der Physik in Heidelberg und Zürich sowie der Promotion am MPI für Kernphysik forschte **Wolfgang Petrich** (FV Quantenoptik / Photonik) als Feodor-Lynen-Stipendiat bei den späteren Nobelpreisträgern Carl Wieman und Eric Cornell (JILA, Boulder, USA) im Bereich der Quantenoptik. Seit 1998 arbeitet er in der Forschung der Roche Diagnostics GmbH mit Schwerpunkt Optik und Spektroskopie. Als Gastwissenschaftler leitet er zudem die Arbeitsgruppe „Biophotonik“ am Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg, wo er 2009 zum außerplanmäßigen Professor ernannt wurde. Für seine Arbeiten zur optischen Sensorik erhielt er kürzlich den Kaiser-Friedrich Forschungspreis.

