

Vibrationsspektroskopie

„Wo geht's hier zur Klinik?“

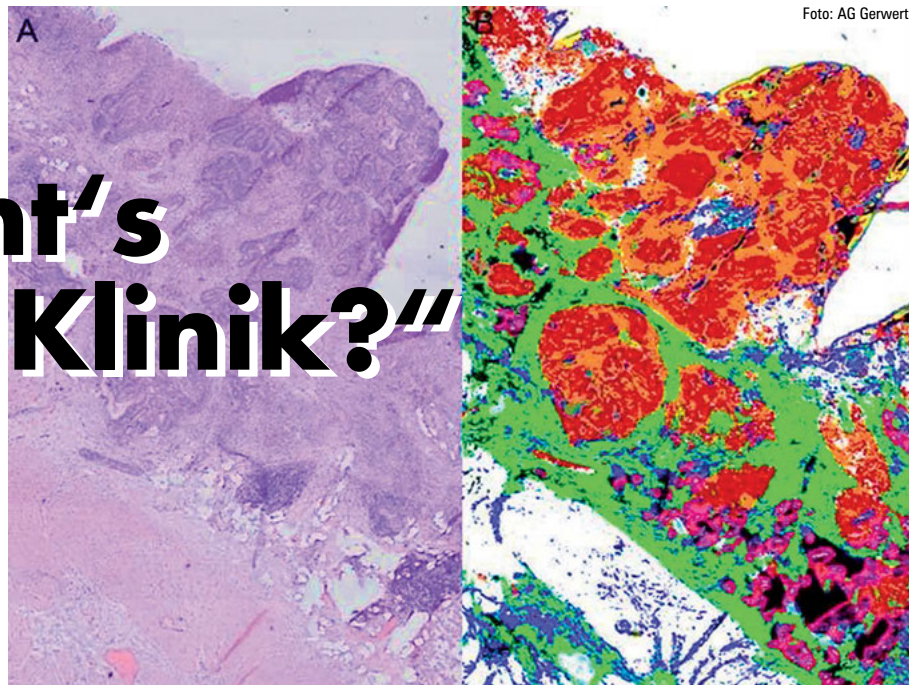
■ Kann die Infrarotspektroskopie eine nützliche Rolle in der medizinischen Diagnostik spielen? Auf jeden Fall, meinen die Spektroskopiker. Die Mediziner sind dagegen eher zurückhaltend.

Zu jedem Jahresende geben Wissenschaftsmagazine Tipps, welche neuen Technologien, Erkenntnisse und Forscher man im Blick haben sollte. In den Life Sciences war der letzte Top-Tipp natürlich das Gen-Geschnipsel mit CRISPR. Doch da *Laborjournal* darüber bereits 2014 ausführlich berichtete, haben wir einen anderen, interessanten Tipp: die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, kurz FTIR, in der medizinischen Diagnostik.

Diese Methode gehört zwar nicht zu den allerheißesten und brandneuesten Kandidaten, die man 2016 unbedingt im Auge behalten sollte. Sie lohnt aber dennoch die Aufmerksamkeit, weil man sie in den letzten Jahren deutlich verbessern und auch erste vielversprechende Ergebnisse erzielen konnte. Aus diesem Grund sollte man sie in den kommenden Jahren auch unbedingt in der Klinik zum Einsatz bringen, wie FTIR-Experten auf der 16. Europäischen Konferenz über Spektroskopie von biologischen Molekülen forderten, die letzten September in Bochum stattfand.

Brillante Zukunft

„IR-Spektroskopie hat ein enormes Potenzial, etwa in der Krebsdiagnostik“, warb etwa Max Diem von der Northeastern University in Boston. Er gehört zu den Pionieren, die erstmals Zellen mit Hilfe von Infrarotspektroskopie mikroskopisch darstellten. Und Nick Stone, Professor für Biomedical Imaging and Biosensing an der University of Exeter, meinte: „Die Zukunft für Licht-basierte Krebsdiagnostik ist brillant.“



Darmkrebsgewebe via Histopathologie (l.) und Vibrationsspektroskopie (r.)

Während also die Community begeistert ihre neuesten Daten präsentierte, werden die meisten unserer Leser noch nicht mal die Technik an sich kennen – denn die Kollegen, die mit FTIR biologische Strukturen studieren, publizieren in der Regel in Blättern wie *Analyst*, *Biophotonics* oder *Analytical Chemistry*. Und die gehören definitiv nicht zum üblichen Lesestoff des Biologen oder Mediziners. Arbeiten in *PLoS* oder gar *Science* sind die Ausnahme. (Im Kasten auf der nächsten Seite erklären wir darum kurz die Technik.)

Defensive Pathologen

Bei der FTIP lassen sich heute mit Kombinationen aus hochauflösenden Mikroskopen, schnellen Spektrometern und leistungsfähiger Software komplexe Substanzgemische samt deren Veränderungen analysieren und in Bildern darstellen. Daher könne sie durchaus eine signifikante Rolle in Histopathologie, Zytologie und Biopsie-Analyse, sowie in der Chirurgie, im Monitoring von Therapien und bei Medikamentenstudien spielen, schrieben Hugh Byrne vom Dublin Institute of Technology und andere FTIR-Spezialisten im letzten Jahr (*Analyst* 140: 2066).

Viele der bisherigen Machbarkeitsstudien drehten sich um Krebsdiagnostik. Da Krebs in vielen Formen und Stadien vorkommt, ist für die richtige Therapie eine eindeutige Klassifizierung des Tumors unumgänglich. Dennoch liest man immer wieder von histopathologischen Fehldiagnosen.

Ein Beispiel: In den USA begutachteten 115 Pathologen 240 Brustbiopsien. Für jeden Fall hatten die Pathologen jeweils nur eine Gewebeprobe zur Verfügung. So kamen 6.900 individuelle Diagnosen zustande, die wiederum mit denjenigen dreier Experten verglichen wurden. Die Übereinstimmung der Diagnosen hing natürlich von der Art des Gewebes wie auch von der Erfahrung der Pathologen ab: Die Spanne reichte von 95 Prozent bei invasivem Brustkrebs bis herunter zu 48 Prozent für atypische Fälle (*JAMA* 2015, 313, S. 1122). Nun muss man bei der Bewertung dieser Zahlen allerdings berücksichtigen, dass ein verdächtiges Gewebe niemals anhand nur eines Schnittes diagnostiziert wird. Und zumindest in Deutschland werden für jede Diagnose zwei Pathologen zu Rate gezogen.

Andrea Tannapfel, Chefin der Pathologie an der Universität Bochum, wo man täglich tausend Gewebeproben diagnostiziert, sagt dazu: „Histopathologische Diagnostik ist die Standardmethode, und bei uns ist sie zu nahezu hundert Prozent richtig. Das gilt für Darmkrebs genauso wie für Prostata- und Lungenkrebs. Fehldiagnosen liegen in der Pathologie bei unter einem Prozent.“ Und weiter „verteidigt“ sie ihre Zunft: „Die Pathologen sind das Fach innerhalb der Medizin mit der geringsten Anzahl an relevanten Fehldiagnosen – das zeigen Gerichtsstatistiken. Es liegt an der Materie, dem Gewebe oder dem Proteingemisch selbst, dass auch hier Fehldiagnosen oder Fehleinschätzungen vorkommen. Und es gibt komplizierte Erkrankungen, die in

zehn Prozent der Fälle falsch eingeschätzt werden. Das liegt aber nicht an der Methode, sondern etwa an der Seltenheit oder Vielgestaltigkeit der Erkrankung.“

Spektroskopische Techniken könnten helfen, die Diagnostik und vielleicht sogar die Prognose noch zu verbessern, meinten dagegen deren Vertreter auf der Bochumer Konferenz. Dazu können sie automatisiert werden, da sie ohne Färbungen oder Markierungen auskommen. Dass sie mindestens gleich gut oder mitunter sogar besser als der Pathologe sein können, zeigten gleich einige der jüngsten Studien. Im folgenden drei Beispiele:

1) Metastasierende Melanome sind aggressiv und gefährlich. Nicht alle sprechen auf eine Chemotherapie an und es gibt keine prädiktiven Tests. Die Gruppe von Erik Goormaghtigh an der Universität Brüssel konnte anhand ihrer FTIR-Spektren Decarbazin-responsive und resistente Melanome mit einer Genauigkeit von 83% erkennen (*Biochim Biophys Acta*. 1862: 174). Die Unterschiede in den Spektren resultierten aus Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Melanomzellen. Daraus ergibt sich vielleicht ein neuer Ansatz zur Diagnostik.

Quotensieger

2) Die Arbeitsgruppe um den Biophysiker Klaus Gerwert an der Ruhr-Universität Bochum zeigte, dass man mit FTIR-Imaging nicht nur verschiedene Klassen von Lungenkrebs sondern auch Subtypen des häufigsten Lungenkrebses, des Adenokarzinoms, unterscheiden kann. In die Studie gingen Proben von 92 Patienten mit den unterschiedlichsten Lungentumoren ein. Bei 88 Personen (96%) kam die so genannte Spektral-Histopathologie zu den gleichen Ergebnisse wie die Histopathologie (*Analyst* 140: 2114). „Anhand der Subtypen kann man auch eine Aussage über die Aggressivität der Tumoren machen, was

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Infrarotspektroskopie wird schon lange zur Identifikation von Substanzen benutzt. Hierbei macht man sich zunutze, dass Moleküle infrarotes (IR) Licht (780 nm bis 1 mm Wellenlänge) absorbieren und sich dabei deren Rotations- und Schwingungsenergie ändert. Sehr salopp ausgedrückt: das Licht bringt die Molekülbindungen zum Wackeln. Daher spricht man auch von Vibrationsspektroskopie. Die Art der Molekülbindung definiert, welche Frequenzen des eingestrahlten Lichts absorbiert werden. Trägt man die Absorption gegen die Energie des Lichts auf, erhält man ein IR-Spektrum der Substanz. Dieses ist so eindeutig und stoffspezifisch, dass man auch von IR-Fingerabdrücken spricht. Hat man mehrere Substanzen in seiner Probe (beispielsweise Hunderte oder gar Tausende in einer Zelle), so ist das resultierende Spektrum die additive Mixtur der Einzelspektren.

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, kurz FTIR, ist ein Verfahren, bei dem ein schnelles, empfindliches Fourier-Spektrometer verwendet wird. Beim FTIR-Imaging nimmt man die IR-Spektren von Proben unter dem Mikroskop auf und verrechnet die Daten zu einem Bild. Wegen der Wellenlänge der IR-Strahlung beträgt die räumliche Auflösung dieser bildgebenden Spektroskopie maximal 3 bis 5 Mikrometer. Da eine Zelle – je nach Typ – zwischen einem und 30 Mikrometer groß sein kann, lassen sich deren Strukturen bildlich nicht gut auflösen. In der Regel nimmt man daher für die hier beschriebene Diagnostik die Spektren von drei bis vier Messpositionen auf. Das zelluläre IR-Spektrum eines jeden Bildpixels generiert sich aus den Spektren sämtlicher Substanzen an der Messposition.

Wie macht man nun mit einer solchen Mixtur Diagnostik? Das gelingt nur, wenn man Unterschiede in den Spektren von gesunden und entarteten Zellen identifizieren kann, die Rückschlüsse auf den Gewebetyp und dessen Zustand erlauben. Je deutlicher diese Unterschiede sind, desto besser lässt sich die Software „trainieren“. Und am Ende steht dann die Validierung, bei der sich die neue Technologie beweisen muss: Kommt man mit der spektralen Analyse zu den gleichen Ergebnissen wie mit der klassischen Pathologie?

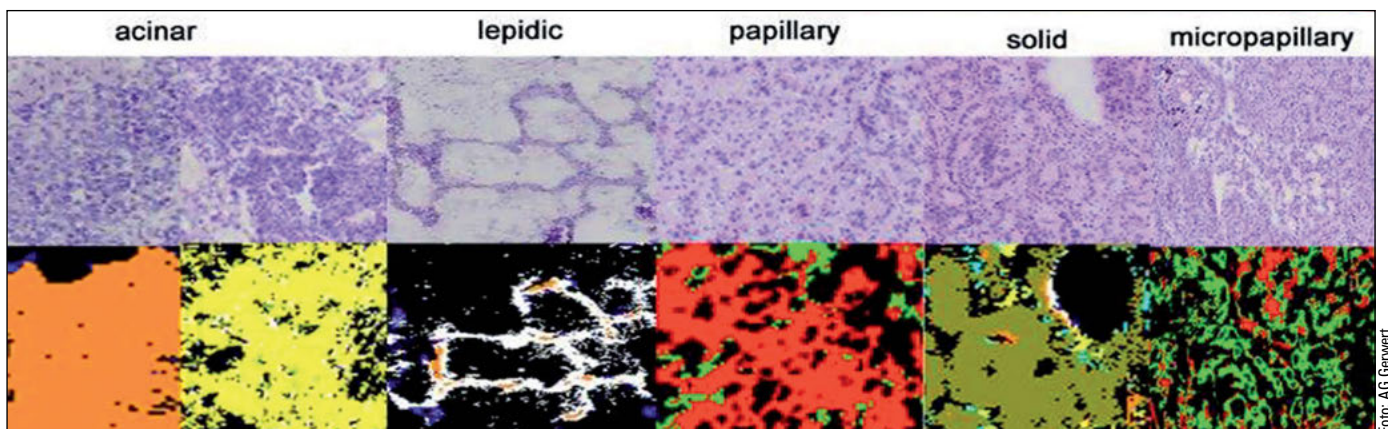
natürlich wichtig ist für die Therapieentscheidung des Chirurgen“, sagt Gerwert.

Auch die Gruppe von Diem und die Mitarbeiter der von ihm gegründeten Firma Circera beschäftigten sich mit der spektralen Diagnose von Lungenkarzinomen. „Wir liegen bei der Erkennung von Krebs bei 98 Prozent, das ist so gut wie die Pathologie. Bei der weiteren Klassifizierung – zum Beispiel Adenokarzinom versus Plattenepithelkarzinom – liegen wir wohl besser als die Pathologie“, schrieb er in einer E-Mail. Die zugehörigen Daten stammten von 700 Patienten.

3) Eine größere Studie zum Prostatakarzinom publizierten Wissenschaftler um Rohit Bhargava von der University of Illinois in Urbana-Champaign. Ihre Patienten

hatten mittelgradig differenzierten Prostatakrebs – das am häufigsten diagnostizierte Stadium. Eine Prognose ist schwierig, obwohl man sowohl morphologische (Gleason-Score) wie auch biochemische Marker (PSA) zu Rate zieht. Ein schneller und steiler Anstieg von PSA (prostataspezifisches Antigen) deutet auf einen Prostata tumor hin. Ebenso ein hoher Gleason-Score, bei dem der Tumor nach dem Grad der zellulären Veränderung eingestuft wird.

In der Studie prüften die Autoren, ob die spektrale Analyse von Tumorgewebe, das den Patienten operativ entfernt worden war, Hinweise auf die Prognose erlaubt. Dazu wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt: die Fälle, in denen in einem definierten Zeitraum nach der



Verschiedene Subklassen von Lungentumoren via Histopathologie (obere Reihe) und Vibrationsspektroskopie (untere Reihe).

Foto: AG Gerwert

Operation der PSA-Wert schnell und deutlich anstieg und in denen man daher nach Lokalrezidiven oder Metastasen suchen sollte; und die Kontrollen, bei denen der PSA-Wert niedrig blieb oder nur langsam stieg. Ergebnis: in 70 Prozent der Fälle konnten die Forscher die Weiterentwicklung der Erkrankung korrekt vorhersagen – heißt also, aus dem Spektrum der Proben des ursprünglichen Tumors auf die spätere Entwicklung des PSA-Werts schließen.

70 Prozent klingen kaum nach medizinischem Durchbruch. Der Wert gewinnt allerdings an Bedeutsamkeit, wenn man sich die Genauigkeit der im Vergleich verwendeten, gängigen Vorhersagemethoden (Kattan- und Capra-S-Scores) anschaut: die lagen in dieser Studie unter 50 Prozent (*Scientific Reports* 2015, 5, 8758). Der nicht an der Studie beteiligte Diem meint dazu: „Ja, die Pathologie ist hier recht unzuverlässig. Der Gleason-Score ist sehr subjektiv, und kann zwischen zwei Pathologen leicht um ein oder zwei „Grades“ variieren. SHP [*Spektrale Histopathologie, Anm. d. Red.*] ist zumindest reproduzierbar.“ Ungleich euphorischer meldete sich Peter Griffiths, ebenfalls nicht an der Studie beteiligter Professor Emeritus für Chemie der Universität von Idaho, zu Wort. Er hält diese Arbeit zur Prostatakrebs-Prognose für ein „Meilenstein-Paper“ (*The Analytical Scientist* 2015, 34, 30).

Auch bei Biomarkern gut

Doch nicht nur zur Unterscheidung von Gewebe und Zellen samt deren Eigenschaften hat sich die FTIR bewährt, sondern auch zur Identifizierung von Biomarkern. Die Gerwert-Gruppe etwa peilte auf diese Weise unter anderem den Nachweis von Alzheimer an. Denn schon länger ist bekannt, dass sich mit FTIR Unterschiede in der Sekundärstruktur von Proteinen nachweisen lassen – eben auch die Faltungszustände des Amyloid-Beta-Proteins (Abeta). Gerwert und Kollegen entwickelten daher einen Sensor, der die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen der Abeta-Peptide in Rückenmarksflüssigkeit und Blut bestimmt (*J. Biophotonics*, doi: 10.1002/jbio.201400145).

In einem neuen Paper, das gerade begutachtet wird, berichten die Bochumer gar, dass sie eventuell eine Möglichkeit entdeckt haben, Alzheimer schon in sehr frühen Stadien zu erkennen. Sie analysierten das Blut von hundert Patienten, die an Alzheimer oder einer anderen neurologischen Erkrankung litten. Mit dem Sensor gelang es, die Alzheimer-Patienten mit einer Genauigkeit von 90 Prozent zu

identifizieren. Der Clou daran: Das Blut war bereits vor acht Jahren abgenommen worden! „Wenn sich dieser Befund erhärtet, hätten wir endlich eine Möglichkeit der frühen Diagnose und der Erforschung früher Alzheimer-Stadien“, sagt Gerwert.

Angesichts erfolgreicher Machbarkeitsstudien stellt sich nun die Frage: Will und kann man FTIR in der Klinik implementieren? Tannapfel sagt: „Die FTIR ist eine faszinierende Technologie und könnte, wenn sie gut funktioniert, die Diagnostik wirklich vereinfachen. Aber noch ist sie nicht gut genug. Beispielsweise müssten Firmen und Entwickler tätig werden und die Geräte verbessern.“

Auch Gerwert sieht noch Entwicklungsbedarf. Noch ist die Methode nämlich viel zu langsam. Derzeit dauert die automatisierte Analyse von zehn Millionen Spektren eines 1,8 x 1,8 Quadratzentimeter großen Gewebestücks zwei Stunden. Gerwert: „Wir müssen auf mindestens 30 Minuten runter.“

Frage der Akzeptanz?

„Lab-to-Bench“, also die Anwendung in der Klinik wird folglich noch nicht so bald erfolgen. Das bestätigt auch Peter Schirmacher, Chef der deutschen Gesellschaft für Pathologie. Er schrieb auf die Frage, ob FTIR in absehbarer Zeit in der Tumordiagnostik eingesetzt werden könnte: „Wir sind bislang damit nicht befasst. Meines Wissens wird das auch im klinischen Kontext nicht diskutiert.“

Seine Kollegin Tannapfel sieht durchaus Optionen. Sie meint, die spektrale Histopathologie könne die Arbeit des Pathologen vereinfachen, die Histopathologie aber nicht ersetzen. Griffiths dagegen hält einen Zeitrahmen von zehn Jahren für wahrscheinlich – so lange habe es auch mit der Kernspintomographie gedauert.

Gerwert hält dagegen: „Die Spektral-Histopathologie könnte bereits heute dem Pathologen eine nützliche Referenz bei der Routinediagnostik sein, wenn sie akzeptiert würde.“ Man sollte also diese neue Methode die nächsten Jahre im Auge behalten. *KARIN HOLLRICHER*

(Außer FTIR wird auch die Raman-Mikroskopie als spektrale, medizinisch-diagnostische Methode erprobt. Auf die Darstellung dieser Daten hat die Autorin dieser Zeilen absichtlich verzichtet. Nicht weil die Daten zu schlecht sind, sondern weil sie neben ihrer journalistischen Tätigkeit zeitweise auch bei einem Hersteller von Raman-Mikroskopen arbeitet und Interessenskonflikte vermeiden will.)