

Charité Centrum für diagnostische und interventionelle Radiologie und
Nuklearmedizin

Institut für Medizinische Physik und Lasermedizin

Habilitationsschrift

**Spektroskopische Bestimmung biophysikalischer
Parameter humanen Blutes**
Grundlagen und Anwendungen für das nicht-invasive Blutmonitoring

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Medizinische Physik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. rer. nat. Martina Meinke
geboren am 24.03.1965 in Berlin

eingereicht im Dezember 2006

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter 1. Prof. Dr. Reginald Birngruber
 2. Prof. Dr. Rudolf Steiner

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	3
1.1	VORBEMERKUNG.....	3
1.2	BEDEUTUNG DES BLUTES UND DESSEN OPTISCHE EIGENSCHAFTEN	3
1.3	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	6
1.4	VORAUSSETZUNGEN FÜR OPTISCHE MESSUNGEN AN BLUT	8
2	BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	10
2.1	BLUT: ZUSAMMENSETZUNG, PHYSIOLOGISCHE AUFGABEN UND WICHTIGE LABORPARAMETER.....	10
2.2	BEGRIFFSDEFINITION KLINISCHER LABORPARAMETER	11
2.3	MIKROZIRKULATION DER HAUT	12
3	GRUNDLAGEN ZUR SPEKTROSKOPIE STREUENDER MEDIEN.....	14
3.1	OPTIK STREUENDER MEDIEN	14
3.2	INVERSE MONTE-CARLO-SIMULATION ZUR BESTIMMUNG OPTISCHER EIGENSCHAFTEN STREUENDER MEDIEN	16
3.3	KALIBRIERUNG VON SENSOREN MITTELS MULTIVARIATER REGRESSION	18
3.4	LASER-DOPPLER-EFFEKT	19
4	ERGEBNISSE - OPTISCHE EIGENSCHAFTEN VON BLUT.....	22
4.1	BRECHUNGSINDEX VON HÄMOGLOBINLÖSUNGEN.....	22
4.2	OPTISCHE EIGENSCHAFTEN VON ERYTHROZYTEN.....	25
4.3	OPTISCHE EIGENSCHAFTEN VON THROMBOZYTEN UND BLUTPLASMA	26
5	ERGEBNISSE - NEUE SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON BLUTPARAMETERN	27
5.1	SPEKTRALAUFGEÖSTE MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DES HÄMATOKRITS, DER SAUERSTOFFSÄTTIGUNG UND DER HÄMOLYSE.....	28
5.2	QUALITÄTSSICHERUNG VON BLUTPRODUKTEN	30
5.3	FREQUENZAUFGEÖSTE LASER-DOPPLER-BLUTFLUXMESSUNGEN AN DER HAUT.....	31
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	32
6.1	ERGÄNZENDE UND WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN /PROJEKTE.....	34
7	LITERATURVERZEICHNIS	35
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	42
9	DANKSAGUNG	44
10	ERKLÄRUNG	45

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Vorbemerkung

Die vorliegende Schrift ist eine gewichtete Zusammenfassung eigener 'Peer-Reviewed' Publikationen. Nach einer Einleitung und Darstellung wesentlicher Grundlagen werden die Original-Einzelarbeiten in zwei Ergebniskapiteln vorgestellt. Abschließend erfolgt eine allgemeine Zusammenfassung mit Ausblick.

1.2 Bedeutung des Blutes und dessen optische Eigenschaften

Die Entwicklung neuer optischer Methoden für die Diagnostik gewinnt in der modernen Medizin immer mehr an Bedeutung. Optische Techniken bieten die Möglichkeit nicht-invasiver oder minimal-invasiver Untersuchungsmethoden (Endoskopie, Pulsoximetrie, Fluoreszenzbildgebung etc.). Hierbei wird die Wechselwirkung von Licht mit Blut oder Gewebe genutzt, um Information über die Stoffwechselforgänge oder physiologischen Zustände zu erhalten. Bei diesen Untersuchungen wird Laserlicht oder Licht breitbandiger Lichtquellen auf das Gewebe eingestrahlt und das transmittierte oder rückgestreute Licht gemessen und die Daten mit Hilfe von mathematischen Algorithmen ausgewertet [Wilson1990].

Neueste Entwicklungen nutzen nicht-invasive optische Messungen, um z.B. im Gehirn physiologische Informationen zu gewinnen [Selb2005] oder die Sauerstoffversorgung nach Bluttransfusionen bei Neugeborenen zu überprüfen [Cerussi2005].

Die Durchblutung von Gewebe ist ein physiologisch wichtiger Parameter, da viele Krankheiten Störungen in der Mikrozirkulation zeigen (Diabetes, Wundheilungsstörungen, arterielle Verschlusskrankheiten) [Humeau2004, Hemington2005]. Auch die Vitalität von transplantiertem Gewebe kann über deren Durchblutung ermittelt werden [Hovius1995]. Hierfür kann das nicht-invasive Laser-Doppler-Verfahren eingesetzt werden, welches Aussagen über die Strömung der roten Blutzellen im Gewebe zulässt [Nilson2003, Lima2005]. Die Zuordnung der mittels Laser-Doppler-Technik gemessenen Durchblutung zu den verschiedenen Gefäßtypen ist nicht ohne weiteres möglich. Sowohl die kapillare Durchblutung, die für die nutritive Versorgung des Gewebes zuständig ist, als auch der Flux der Gefäße zur Thermoregulation können Anteile zu den Signalen beisteuern [Leahy1999]. Eine Methode, die zwischen den beiden Gefäßtypen unterscheiden könnte, würde potenziell wertvolle diagnostische Informationen bieten.

Direkte Bestimmungen von Blutwerten sind z.B. bei Untersuchungen an extrakorporal fließendem Blut (Herz-Lungen-Maschine, Dialysesysteme) und bei der Qualitätssicherung von Blutprodukten (Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate und Blutplasmen) notwendig. Bei beiden Anwendungen ist die Entnahme von Proben entweder zu zeit- und kostenaufwendig oder aus Kontaminationsgründen zu riskant oder sogar unzulässig, so muss

z.B. eine einmal geöffnete Blutprodukte entweder sofort verbraucht oder entsorgt werden.

Die Untersuchungen an fließendem Blut sollten nicht nur ohne Probennahme erfolgen, sondern auch eine Online-Überwachung ermöglichen, sodass Notfallsituationen sofort erkannt und entsprechende Maßnahmen ohne Zeitverzug ergriffen werden können. Wichtige zu kontrollierende Blutparameter beim Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen sind die Sauerstoffsättigung und der Hämatokrit. Bisherige Methoden ermöglichen nur Trendmessungen, Absolutmessungen sind mit hohen Fehlern behaftet, sodass eine regelmäßige Probennahme mit anschließender externer Blutparameterbestimmung weiterhin notwendig ist [Appelblad1994, Southworth1998]. Ein verlässlicher Sensor, der absolute Blutwerte online ermittelt, ist noch nicht verfügbar.

Die Qualitätssicherung der Erythrozytenkonzentrate erfolgt u.a. über die Messung des freien Hämoglobins. Ein Verfahren für die Bestimmung des freien Hämoglobins bzw. der Hämolyse steht bisher nur nach Probennahme zur Verfügung, bei der die Konserve geöffnet werden muss [Malinauskas1997]. Eine wesentliche Qualitätskontrolle ist die Überprüfung der Erythrozytenkonzentrate während der Lagerung bzw. vor der Ausgabe zur Transfusion. Hierbei nimmt durch den natürlichen Zerfall der roten Blutkörperchen das freie Hämoglobin im Beutel ständig zu. Bei der Transfusion muss der Hämolysewert unter 0,8 % liegen [BundesÄK1995]. Auch bei der Herstellung der Blutprodukte finden laufende Kontrollen statt. Treten bei der Herstellung der Erythrozytenkonzentrate Fehler auf, kann Hämolyse entstehen. Weiterhin fehlt für die Detektion von intakten, nicht vollständig abgetrennten Erythrozyten in Plasmen und Thrombozytenkonzentraten ein Verfahren, welches ohne Probennahme auskommt. Es wird demnach ein nicht-invasives optisches Verfahren gesucht, welches die Bestimmung des freien Hämoglobins bzw. des Gesamthämoglobins durch Messungen an den Blutbeuteln, so wie sie heute in Verkehr gebracht werden, ermöglicht.

Die Lichtverteilung im Gewebe oder allgemein in streuenden Medien hängt von den optischen Eigenschaften des Mediums ab. Für nicht-invasive optischen Messungen an fließendem Blut, Gewebe oder Blutprodukten zur Bestimmung wichtiger blutphysiologischer Kenngrößen sind Kenntnisse der optischen Eigenschaften und deren Änderungen bei Variation dieser physiologischen Größen unerlässlich. Es können nur solche Blutparameter optisch analysiert werden, bei denen sich Änderungen signifikant in den optischen Parametern zeigen. Demnach müssen sich die biologischen Blutparameter gemäß der Strahlungstheorie auf den Absorptionskoeffizienten μ_a , den Streukoeffizienten μ_s oder die Streuphasenfunktion (oft vereinfacht integrierend beschrieben durch den Anisotropiefaktor g) auswirken, die wiederum durch den komplexen Brechungsindex innerhalb der Zellen, die Zellgröße und -form oder -konzentration beeinflusst werden. Sind die optischen Parameter bekannt, können Entwicklungen von Verfahren, Applikatoren und Sensoren z.B. durch Monte-Carlo-Simulationen wesentlich unterstützt werden. Damit ist die Bestimmung der optischen Eigenschaften von Blut und Gewebe die Grundvoraussetzung, um zielgerichtete Forschung in der nicht-invasiven optischen Diagnostik betreiben zu können. Auch für die

Dosimetrie zum Einbringen von Licht in Gewebe oder Blut müssen die optischen Eigenschaften im zu untersuchenden Medium bekannt sein. Dies ist z.B. wichtig bei der photodynamischen Therapie [Jacques1992, Barajas1997, Thompson2005] oder der laserinduzierten Thermotherapie [Flock1989, Welch1987, Roggan1997].

Die optischen Eigenschaften von Gewebe sind gut beschrieben [VanGemert1989, Patterson1989, Tuchin1993], werden aber in der Regel blutleer bestimmt [Roggan1994]. Da nahezu jedes spezifische Körpergewebe von Blut durchsetzt ist und Blut stark lichtabsorbierende und streuende Eigenschaften besitzt, werden die optische Eigenschaften des Gewebes erheblich durch die des Blutes beeinflusst [Kienle1996].

Optische Untersuchungen an humanem Blut sind sehr komplex und aufwendig, da es neben den Schwierigkeiten der Beschaffung und Handhabung auch besondere biologische *und* physikalische, speziell optische, Eigenschaften besitzt. 'Blut ist ein ganz besonderer Saft', stellte schon Mephisto zurecht in Goethes Faust fest [Goethe1828].

Die Zusammensetzung des Blutes unterliegt großen inter- und intra-individuellen Schwankungen [Hammer1998], sodass zwei Blute von verschiedenen Spendern mit dem gleichen Hämatokrit signifikante Unterschiede in den optischen Eigenschaften aufweisen und somit geringfügige Änderungen oft nur relativ betrachtet werden können [MeinkeAO2007].

Aufgrund der sofort einsetzenden Sedimentation der Zellen im statischen Zustand muss Blut unter Strömungsbedingungen untersucht werden [Lindberg1993]. Erfolgen die Untersuchungen an Vollblut, so ist die Plasmaprotein vermittelte Aggregation der Zellen zu verhindern bzw. zu berücksichtigen [Tomita1983]. Hinzu kommt das Infektionsrisiko (HIV, Hepatitis etc.) beim Arbeiten mit Blut oder Blutprodukten, welches wiederum erhöhte Anforderungen an den Messaufbau stellt.

Blut besteht, als eines der wenigen Streumedia, aus Streuteilchen, die gleichzeitig den Absorber enthalten. Aufgrund der speziellen Form und der extrem hohen Konzentration der Erythrozyten sind theoretische Modelle wie z.B. die Mie-Theorie [Mie1908] zur Berechnung der Lichtverteilung in Blut nur sehr begrenzt anwendbar [Friebel2006]. Auch die Diffusionstheorie, die hohe Streuung und geringe Absorption zur Grundlage hat und die für Gewebe verwendet wird, bei dem im blauen bis grünen Wellenlängenbereich die Streuung gegenüber der Absorption überwiegt, stößt bei Blut an ihre Grenzen, da in diesem Wellenlängenbereich starke Absorptionsbanden vorliegen.

Der Einfluss physiologischer Blutparameter auf die Extinktion oder auf die Rückstreuenspektren von Blut wurde schon vor Jahrzehnten untersucht [Kramer1935, Wever1954, Tomita1983]. In der Literatur sind als optische Daten daher überwiegend der effektive Streukoeffizient μ_s' (als Zusammenfassung von μ_s und g , siehe Kapitel 3.1) und der Absorptionskoeffizient zu finden, wobei diese meist an tierischem Blut bestimmt wurden [Enejder2003]. Die Bestimmung der drei optischen Parameter Absorptionskoeffizient, Streukoeffizient und Phasenfunktion/Anisotropiefaktor ist an einzelnen Erythrozyten oder an stark verdünntem Blut und meist im Spektralbereich geringer Hämoglobinabsorption oberhalb 600 nm

durchgeführt worden [Steinke1988, Yaroslavsky1999, Sem'yanov2000]. Optische Parameter von unverdünntem, also physiologischen konzentriertem Blut im Bereich hoher Absorption sind dagegen rar [Hammer2001, Roggan1999]. Unter 500 nm im Bereich der starken Soret-Absorptionsbande des Hämoglobins sind keine Daten in der Literatur zu finden.

Demnach war eine spezielle Methodik zu entwickeln, die trotz der spezifischen biologischen und physikalischen Probleme eine verlässliche Bestimmung aller drei optischen Parameter von unverdünntem Blut im Spektralbereich von 250 nm bis 1100 nm ermöglicht.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, spektroskopische Verfahren für die nicht-invasive Bestimmung von Blutparametern zu entwickeln (Abbildung 1).

Für die verschiedenen Blutparameter (Hämatokrit, Sauerstoffsättigung, Durchblutung, Hämolyse) mussten die entsprechenden Messmethoden und mathematischen Verfahren ausgewählt bzw. entwickelt werden. Hierbei stehen verschiedene grundlegende spektroskopische Messparameter zur Auswahl (z.B. Transmissionsmessungen, Reflexionsmessungen, spektralaufgelöste, orts aufgelöste, zeitaufgelöste Messungen). Für eine zielgerichtete Entwicklung dieser Methoden waren die optischen Eigenschaften des Blutes zu bestimmen, da deren Kenntnis die Entwicklung der Methoden erleichtern und verbessern. Einerseits können mit ihrer Hilfe Machbarkeiten von Verfahren abgeschätzt oder berechnet werden und andererseits die Messmethodik ausgewählt und die konkrete Messgeometrie optimiert werden. Weiterhin sind diese Daten für dosimetrische Berechnungen von Lichtverteilungen in Gewebe und Blut notwendig (laserinduzierte Thermoerapie, photodynamische Therapie).

Daher ist im ersten Ergebnisteil (Kapitel 4) der komplexe Brechungsindex von Hämoglobinlösungen in den sehr hohen Konzentrationen, wie sie innerhalb der Erythrozyten vorkommen, bestimmt worden [M. Friebel, **M. Meinke**: *Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solution using transmittance and reflectance measurements*, J. Biomed. Optics, 10(6), 064019, (2005), und M. Friebel, **M. Meinke**: *Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250 -1100 nm dependent on concentration*, Appl. Opt. 45(12), 2838-2842 (2006)].

Weiterhin sind die optischen Parameter Absorptionskoeffizient, Streukoeffizient und Streuphasenfunktion für die verschiedenen Blutkomponenten Erythrozyten [M. Friebel, A. Roggan, G. Müller, and **M. Meinke**: *Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250-1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions*, J. Biomed. Opt. 11(3), 031021 1-10 (2006)], Thrombozyten und Plasma [**M. Meinke**, G. Müller, J. Helfmann, and M. Friebel: *Optical properties of platelets, leukocytes and blood plasma and their influence on the optical*

behaviour of whole blood in the VIS-NIR wavelength range, J. Biomed. Optics 12 (1) 2007 im Druck] ermittelt worden. Hierzu wurden Transmissions- und Remissionsmessungen an einem Ulbricht-Kugel-Spektrometer durchgeführt und über eine inverse Monte-Carlo-Simulation die optischen Eigenschaften errechnet. Dies war für Blut in physiologischen Konzentrationen und über einen weiten Wellenlängenbereich zu leisten.

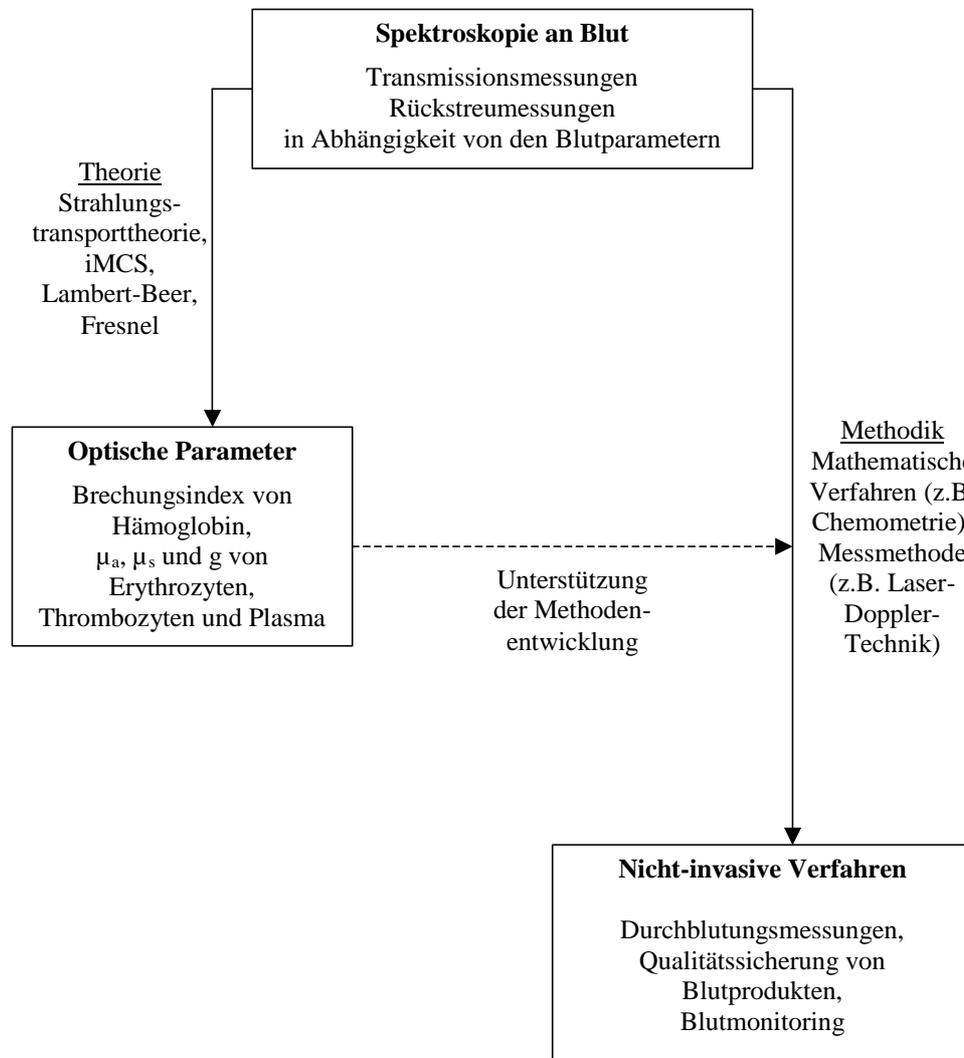


Abbildung 1: Übersicht zum methodischen Vorgehen zur Entwicklung nicht-invasiver Untersuchungsmethoden.

Für diesen ersten Ergebnisteil wurden stellvertretend vier grundlegende Arbeiten ausgewählt, die einen Einblick in die Methodik und Arbeitsweise zur Bestimmung der optischen Parameter ermöglichen. Die erhaltenen optischen Parameter und deren ermittelte Abhängigkeiten von den einzelnen Blutparametern wurden verwendet, um für drei konkrete nicht-invasive Blutparameterbestimmungen die Messmethoden auszuwählen und zu optimieren.

Vier ausgewählte Arbeiten zu Verfahren, die ohne direkten Kontakt mit dem Blut Aussagen über den Hämatokrit, die Sauerstoffsättigung, die Hämolyse oder über die Durchblutung in der Haut zulassen, werden im zweiten Ergebnisteil (Kapitel 5) der Arbeit vorgestellt.

Es werden ein Verfahren und ein Sensor beschrieben, die an einem Blutkreislauf ohne Blutkontakt online eine quantitative Aussage über die Blutparameter Sauerstoffsättigung und Hämatokrit mittels spektroskopischer Messungen ermöglichen. Hierfür werden Methoden der Chemometrie eingesetzt, um die Einflüsse der inter- und intra-individuellen Varianzen zu minimieren. Ziel ist die Entwicklung eines Sensors, der an den extrakorporalen Kreislauf einer Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden kann [M. Meinke, G. Müller, I. Gersonde, M. Friebel: *Determination of oxygen saturation and hematocrit of flowing human blood using spectral resolving sensors*, Biomed. Technik 51(5/6) 2006, im Druck]. Dafür mussten Voruntersuchungen an einem hochauflösenden kommerziellen Laborspektrometer durchgeführt und ein In-vitro-Kreislauf aufgebaut werden, der die klinische Situation widerspiegelt [M. Meinke, I. Gersonde, M. Friebel, J. Helfmann und G. Müller: *Chemometric determination of blood parameters using VIS-NIR-spectra*. Appl. Spectros. 59(6), 826-835 (2005)].

Für die Qualitätskontrolle der Blutprodukte werden repräsentativ die Hämoglobinmessungen an Erythrozytenkonzentraten vorgestellt [M. Meinke, M. Friebel, J. Helfmann, M. Notter: *A novel device for the non-invasive measurement of free hemoglobin in blood bags*. Biomed. Technik, 50, 2-7, (2005)]. Ziel bei dieser Methode ist die objektive Bestimmung der Hämoglobinkonzentration, um den Zustand und die Verwertbarkeit des Blutproduktes ohne Probennahme beurteilen zu können. Dazu musste eine entsprechende Methode und ein Handphotometer entwickelt werden. Die Blutprodukte einschließlich ihrer Behältnisse dürfen hierbei nicht verändert oder beschädigt werden.

Für die Beurteilung der Vitalität von Transplantaten ist eine gewichtete Flux-Messung der kleinsten Blutgefäße, der Kapillaren, die für die Versorgung des Gewebes zuständig sind, notwendig. Um die Durchblutung der Kapillaren mit sehr niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten von der Durchblutung zur Thermoregulation mit höheren Geschwindigkeiten zu unterscheiden, wurden Laser-Doppler-Flux-Messungen durchgeführt und die Korrelation der Doppler-Frequenzverschiebung mit den Blutströmungsgeschwindigkeiten untersucht. [M. Meinke, M. Schröder, R. Schütz, U. Netz, J. Helfmann, A. Pries, G. Müller: *Frequency weighted Laser-Doppler blood perfusion measurements in skin*, Laser Phys. Lett. 4 (1), 66-71 (2007)].

In den Kapiteln 2 und 3 werden die Grundlagen zu den verschiedenen optischen Methoden und dem Target Blut und Haut kurz zusammengefasst.

1.4 Voraussetzungen für optische Messungen an Blut

Optische Messungen an Blut erfordern neben physikalisch-optischem Wissen Kenntnisse über das Medium Blut selbst. Aufgrund der schnellen Sedimentation der Zellen im Stillstand und des damit einhergehenden undefinierten, nicht reproduzierbaren Zustandes, sollten verlässliche und reproduzierbare Messungen an strömendem Blut durchgeführt werden

[Lerche1993]. Hierbei sind die Strömungsbedingungen reproduzierbar einzustellen und zu dokumentieren, da diese Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Blutes haben [Friebelsub]. Da Blut potenziell infektiöses biologisches Material darstellt, müssen entsprechende Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit Blutproben beachtet werden. Auch das Reinigen von Apparaturen, Kreisläufen und Küvetten verlangt nach einem besonderen Procedere, damit Reste vollständig entfernt werden und die Oberflächen wieder optisch verwendbar sind. Oft stehen die Eigenschaften optischer Oberflächen zu denen von zellverträglichen Oberflächen im Widerspruch und können zur Hämolyse führen [Malinauskas1997]. Die Auswahl des gesamten Materials des Kreislaufes muss auf Zellverträglichkeit ausgerichtet sein. Aufgrund der guten Verfügbarkeit wird häufig mit Erythrozytenkonzentraten an Stelle von Vollblut gearbeitet, welches auch den Vorteil der geringeren Benetzung der Oberflächen mit Proteinen bietet und die Aggregation der Erythrozyten unterbindet. Dies ist für optische Messungen günstig, führt aber andererseits zu einer Erhöhung der Hämolyserate. Die Verwendung von Erythrozytensuspensionen mit einer Nährsalzlösung als Medium an Stelle von Vollblut verändert außerdem die optischen Eigenschaften [MeinkeJBO2007], dies wird in Kapitel 4.3 beschrieben.

Wegen der stark lichtschwächenden Eigenschaften des Blutes müssen bei Messungen an unverdünntem Blut sehr dünne Schichtdicken gewählt werden, um signifikante Transmissionswerte zu erhalten. Die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von fast vier 10er Potenzen über den gesamten Wellenlängenbereich von 250 nm bis 1100 nm erfordern Spezialküvetten, die die Einstellung verschiedener Schichtdicken ermöglichen und eine laminare Strömung garantieren. Bei der Präparation sind die Osmolarität und der pH-Wert konstant zu halten, um Einflüsse auf die optischen Eigenschaften zu vermeiden.

Als Letztes sei hier die biologische Varianz der Proben erwähnt, die Vergleichsmessungen in besonderem Maße erschweren. Hierbei bieten relative Betrachtungen oft die einzige Möglichkeit zur Beschreibung der Phänomene. Für die Berechnung von absoluten Werten musste ein optisches "Normblut" eingeführt werden, dessen Eigenschaften aus statistisch gestreuten Feldmessungen an Proben zahlreicher Probanden bestimmt wurden [MeinkeAO2007].

2 Biologische Grundlagen

2.1 Blut: Zusammensetzung, physiologische Aufgaben und wichtige Laborparameter

Humanes Vollblut besteht aus ca. 60 Vol-% Plasma und 40 Vol-% Zellen, die wiederum zu ca. 99 Vol-% aus Erythrozyten bestehen. Die optischen Eigenschaften des Vollblutes werden im sichtbaren Spektralbereich und nahen Infrarot fast ausschließlich durch die **Erythrozyten** bestimmt. Dies liegt einerseits an der sehr hohen Konzentration von 4 bis 5,5 Mio/ μL im Blut, andererseits an der im Vergleich zum Blutplasma und den anderen Blutzellen sehr ausgeprägten optischen Aktivität. Die Erythrozyten sind kernlose Zellen, die eine bikonkave Scheibenform besitzen (Abbildung 2). Der Durchmesser beträgt zwischen 7 und 8 μm , die Dicke ca. 2 μm . Sie bestehen aus einer sehr flexiblen, jedoch kaum dehnbaren, Membran (Dicke ca. 6-7 nm), die eine flüssige Lösung umhüllt, die in hoher Konzentration den roten Blutfarbstoff Hämoglobin enthält. Hämoglobin ist ein spezielles tetrameres Protein, das dem Transport von O_2 und CO_2 dient und eine ausgeprägte Absorption im sichtbaren Spektralbereich zeigt. Diese Eigenschaft ist speziell für die rote Blutfarbe verantwortlich.

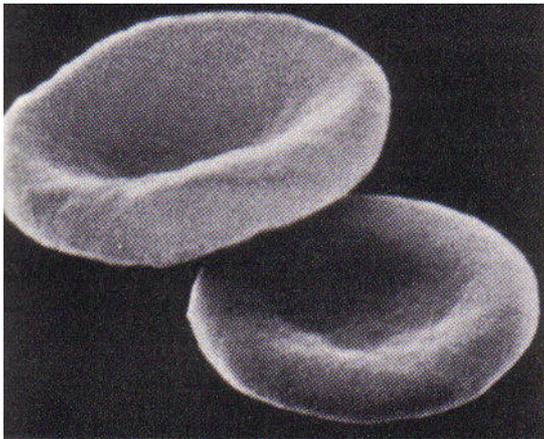


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Erythrozyten

Neben der Absorption bewirkt die hohe Konzentration an Hämoglobin in der Zelle eine deutliche Erhöhung des Brechungsindex gegenüber dem Blutplasma. Auch die Erythrozytenmembran weist einen etwas höheren Brechungsindex als Plasma auf [Barer1953]. Deren Streuwirkung ist aber aufgrund der sehr geringen Schichtdicke praktisch vernachlässigbar. Demgemäß werden in das Blutmedium eingestrahelte Photonen nicht nur durch das Hämoglobin im Innern der Erythrozyten absorbiert, sondern es kommt auch in hohem Maße zu Reflexionen und Brechungen besonders an der inneren Oberfläche der Erythrozytenmembran, d.h. also zu erheblichen Streueffekten. Dies zeigt sich am lackartigen Aussehen von frischem Vollblut. Eine zellfreie Hämoglobinelösung gleichen Hämoglobingehalts erscheint hingegen kirschrot durchsichtig, da keinerlei Streueffekte mehr auftreten.

Leukozyten oder weiße (farblose) Blutkörperchen sind kugelförmige (Durchmesser 6-20 μm) kernhaltige, hämoglobinfreie Zellen, die der Immunabwehr dienen. Die Konzentration im

Blut liegt beim Gesunden zwischen 4000 und 10.000 / μ L, also etwa um den Faktor 10^3 niedriger als die der Erythrozyten. Morphologisch und funktionell lassen sich die Leukozyten in drei Gruppen unterteilen: Granulozyten (Anteil 60-70 %, Durchmesser 10-17 μ m), Monozyten (2-6 %, Durchmesser 12-20 μ m) und Lymphozyten (25-40 %, Durchmesser 7-9 μ m). Bei Infektionen und entzündlichen Prozessen kann die Leukozytenkonzentration um ein Mehrfaches ansteigen.

Die **Thrombozyten**, auch Blutplättchen genannt, sind kernlosen Zellen und besitzen eine flache, unregelmäßig runde Form. Sie sind Bestandteil des Blutgerinnungssystems. Thrombozyten haben eine Länge von 1-4 μ m und eine Dicke von 0,5-0,75 μ m. Beim gesunden Erwachsenen findet man 150.000 bis 350.000 Thrombozyten pro Mikroliter. Dies entspricht nur ca. 5 % der Erythrozytenkonzentration.

Menschliches **Blutplasma** enthält pro Liter 900-910 g Wasser, 65-80 g Eiweiß und 20 g niedermolekulare Substanzen. Plasma hat eine spezifische Dichte von 1,025-1,029 g/cm³, der pH-Wert liegt im Bereich von 7,37-7,43. Die größte Eiweißfraktion bildet das Albumin, das hauptsächlich als Transportvehikel dient. Unter den niedermolekularen Substanzen befinden sich hauptsächlich Elektrolyte wie z.B. Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid oder Bicarbonat. Die Viskosität des Plasmas ist etwa doppelt so hoch wie die von Wasser.

2.2 Begriffsdefinition klinischer Laborparameter

Der **Hämatokrit** (Hkt) ist definiert als der Volumenanteil der Blutzellen am Gesamtblutvolumen und kann in einfacher Weise nach Zentrifugation durch Ausmessen der abgesetzten Zellmasse bestimmt werden. Physiologisch sind Hämatokrit-Werte zwischen 35 und 45 %.

Die **red blood cell concentration** (RBCc) gibt die Konzentration der Erythrozyten im Blut an. Die Werte liegen beim Erwachsenen zwischen 4 und $5,5 \cdot 10^6$ /mm³

Das **mean corpuscular volume** (MCV) gibt das mittlere Erythrozytenvolumen in μ m³ an. Typische Werte liegen bei 80-90 μ m³. Durch Veränderung der Plasmaosmolarität, d.h. des osmotischen Druckes, kann sich das MCV verändern.

Das **mean corpuscular hemoglobin** (MCH) ist der mittlere Hämoglobingehalt eines Erythrozyten. Der Normalwert liegt hier bei 25-35 pg. Bei bestimmten Anämien kann dieser Wert sowohl vermindert als auch erhöht sein.

Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ist abgeleitet aus dem MCH und dem MCV und beschreibt die mittlere Hämoglobinkonzentration innerhalb des Erythrozyten. Die Normalwerte liegen hier bei 25-35 g/dL, was eine außerordentlich hohe Proteinkonzentration darstellt.

Der **Hämoglobingehalt** (Hb) beschreibt den Hämoglobingehalt bezogen auf das Gesamtblutvolumen und stellt ein klinisches Maß für die Sauerstofftransportkapazität dar. Normale Werte sind 14-16 g/dL.

Die **white blood cell concentration** (WBCc) ist die Konzentration der Leukozyten im Blut. Die Normalwerte liegen zwischen 4 und $10 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, bei Infektionen können Werte über $20 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ auftreten.

Die **platelets concentration** (PLT) gibt die Konzentration der Thrombozyten im Blut an, die typischen Werte liegen zwischen 150 und $350 \cdot 10^3/\text{mm}^3$

Als **Sauerstoffsättigung** (SatO_2) wird der Anteil des oxygenierten Hämoglobins (HbO_2) am gesamten Hämoglobin ($\text{HbO}_2 + \text{Hb}$) bezeichnet

$$\text{SatO}_2 = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{HbO}_2] + [\text{Hb}]} \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

Bei der Sauerstoffaufnahme lagert sich dem Hämoglobinmolekül ein O_2 -Molekül an, wobei keine chemische Oxidation stattfindet. Diese Reaktion wird als Oxygenierung bezeichnet, die O_2 -Abgabe als Desoxygenierung.

Durch zahlreiche Einflüsse (osmotische, mechanische, immunologische, Alterung etc.) kann es zur Zerstörung der Erythrozyten, der **Hämolyse**, kommen, wobei das in ihnen enthaltene Hämoglobin in das Blutplasma austritt. Zur Quantifizierung dieser Zellzerstörung wird der Hämolysegrad bestimmt. Dieser ist definiert als das Verhältnis des extern im Plasma befindlichen Hämoglobins zum Gesamthämoglobin und wird für klinische Belange, d.h. insbesondere für geringgradige Hämolyse und physiologische Blutkonzentrationen, berechnet nach:

$$\text{Hämolysegrad} = (100 - \text{Hkt}) \cdot \frac{\text{Hb}_{\text{Plasma}}}{\text{Hb}_{\text{Gesamt}}} \quad [\%] \quad (2)$$

2.3 Mikrozirkulation der Haut

Die Haut besteht aus der Epidermis, Dermis und Subkutis (siehe Abbildung 3). Die Epidermis ist die oberste Hautschicht und nicht durchblutet. Die unter der Epidermis liegende Dermis setzt sich aus zwei Schichten zusammen (Lederhaut, Unterhaut).

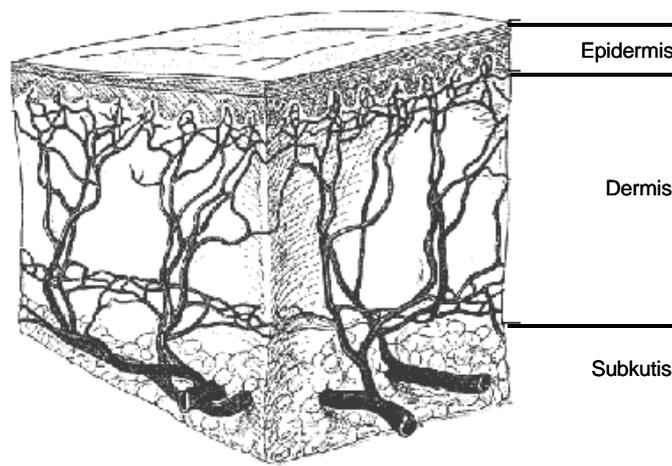


Abbildung 3: Blutgefäßsystem der Haut [Sams1990]

Die Lederhaut besteht aus zwei Schichten, der Zapfenschicht und der Netzschicht. Die Zapfenschicht ist über Haftkämme mit der Epidermis verzapft. Diese Haftkämme sind von kleinen Blutgefäßen, den Kapillaren, durchzogen. Sie versorgen die Epidermis mit Sauerstoff und Nährstoffen. Daher wird die Durchblutung durch die Kapillaren auch als nutritive Durchblutung bezeichnet. Die Kapillaren bilden verwundene Schlingen, die Längen von ca. (0,2 – 1) mm erreichen. Ihnen wird das Blut über die tieferen liegenden Arteriolen und Venolen der Netzschicht zugeführt. Neben der Versorgung der Kapillaren sind diese Gefäße für die Regulierung der Körpertemperatur verantwortlich. Hierzu dienen auch Kurzschlüsse zwischen arteriellem und venösem Schenkel des Blutgefäßsystems [Chambers1944, Zweifach1961]. Diese Shunts sind arterio-venöse Randschlingen zur Umgehung des villären Kapillarsystems sodass die Thermoregulierung unabhängig von der nutritiven Versorgung erfolgen kann.

Tabelle 1: Mittlere Strömungsgeschwindigkeiten im Blutgefäßsystem [Witzleb1990]

Blutgefäße	Durchmesser [mm]	Mittlere Geschwindigkeit [mm/s]
Aorta	20-25	200
mittlere Arterien	k. A.	100-50
sehr kleine Arterien	k. A.	20
Arteriolen	0,06-0,02	3-2
Kapillaren	0,006	0,3
sehr kleine Venen	k. A.	5-10
kleine bis mittlere Venen	k. A.	10-50
große Venen	5-15	50-100
Venae Cavae (Hohlvenen)	30-35	100-160

Die Durchblutung der Haut ist durch externe Faktoren wie Hitze, oberflächlich applizierte durchblutungsfördernde Substanzen oder durch die Einnahme von Medikamenten als auch durch Rauchen oder mentale Stimulation beeinflusst. Störungen in der Mikrozirkulation können vielfach beobachtet werden, z.B. bei Diabetes, Raynaud-Krankheit, Wundheilungsstörungen und kardiovaskulären Krankheiten [Humeau2004, Stefanovska 1999, Hemington2005, Kiesewetter1989].

Der Gesamtquerschnitt aller Gefäße wächst bei der Verzweigung, die Strömungsgeschwindigkeit nimmt daher zu kleineren Gefäßen ab (Tabelle 1). Der Durchmesser der Gefäße nimmt von den unteren Hautschichten zu den oberen ab.

Damit wird deutlich, dass sich die für die Versorgung der Haut notwendigen Kapillaren dicht unter der Hautoberfläche befinden und die geringsten Strömungsgeschwindigkeiten besitzen. Mit Zunahme der Hauttiefe nimmt die Strömungsgeschwindigkeit zu. Wenn eine selektive Messung dieser langsamen Geschwindigkeiten möglich ist, kann eine Zuordnung zu den entsprechenden Gefäßen und eventuell auch zu den Hauttiefen vorgenommen werden.

3 Grundlagen zur Spektroskopie streuender Medien

3.1 Optik streuender Medien

Allgemein kann die Lichtausbreitung in streuenden und absorbierenden Medien durch die **Strahlungstransportgleichung** beschrieben werden [Ishimaru1978]:

$$\frac{dL(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{ds} = (\mu_a + \mu_s)L(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')L(\mathbf{r}, \mathbf{s}')d\Omega' + S(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (3)$$

$L(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ [W/cm²sr] beschreibt die Strahlungsdichte am Ort \mathbf{r} in Richtung \mathbf{s} . $S(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ beschreibt den Quellterm (z.B. Einstrahlung), μ_a ist der Absorptionskoeffizient, μ_s der Streukoeffizient und $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ ist die Streuphasenfunktion. Die Strahlungstransportgleichung vernachlässigt die Welleneigenschaften wie Interferenz oder Polarisation. Diese Einschränkung ist aber hinsichtlich der im Blut auftretenden Vielfachstreuung vernachlässigbar.

Der **Absorptionskoeffizient** $\mu_a = \sum c_a \sigma_a$ [mm⁻¹] ist das Produkt aus Absorberkonzentration c_a [mm⁻³] und dem Absorptionsquerschnitt σ_a [mm²]. Falls mehrere unterschiedliche Absorber vorliegen, ist μ_a als Summe über die Produkte aller Absorber zu bestimmen:

Allgemein weisen biologische Gewebe im sichtbaren und nahen Infrarot Absorptionskoeffizienten in der Größenordnung $0,001 < \mu_a < 10$ mm⁻¹ auf [VanGemert1989, Cheong1990]. Im Falle von Blut sind aber bei bestimmten Wellenlängen je nach Blutkonzentration μ_a -Werte bis über 500 mm⁻¹ möglich.

Die Streuung der Photonen findet im Blut, hervorgerufen durch Differenzen im Brechungsindex, an den Blutzellen, insbesondere den Erythrozyten, statt. Dies wird mit Hilfe des **Streukoeffizienten** $\mu_s = \sum c_s \sigma_s$ [mm⁻¹] als dem Produkt der Streuzentrenkonzentration c_s [mm⁻³] und dem Streuquerschnitt σ_s [mm²] beschrieben.

Die Streukoeffizienten für biologische Gewebe liegen zwischen 1 und 100 mm⁻¹ [Cheong1990]. Bei Blut kann er Werte bis 150 mm⁻¹ erreichen.

Zur vollständigen Beschreibung eines Streueignisses dient die **Streuphasenfunktion** $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$. Sie ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon aus der Richtung \mathbf{s} in die Richtung \mathbf{s}' gestreut wird [van de Hulst1957, Kerker1969]. Bezüglich der ursprünglichen Ausbreitungsrichtung lassen sich dabei der Streuwinkel Θ und der Azimutalwinkel Φ definieren:

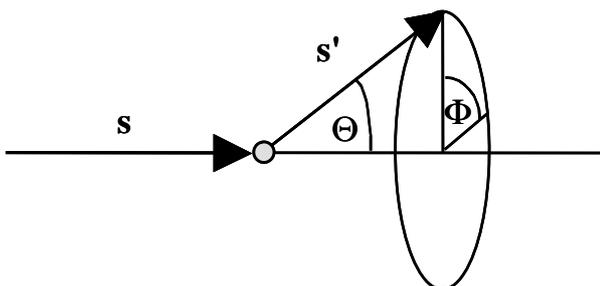


Abbildung 4: Winkeldefinition bei einem Streueignis

Bei isotropen Medien, die nicht, wie z.B. Muskelfasern, eine ausgesprochene Richtungsstruktur aufweisen, wird die Streuung als von Φ unabhängig angenommen. Integriert man die Streuphasenfunktion über den gesamten Raumwinkel Ω , so ergibt sich unter der Annahme von Photonenerhaltung (konservative Streuung) gemäß der Wahrscheinlichkeitsdefinition die Normierungsbedingung:

$$\int_4 p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega = \int_0^2 d\Phi \int_0^0 p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \sin\Theta d\Theta = 1 \quad (4)$$

Für Blut wird häufig die **Reynold-McCormick-Streuphasenfunktion** [Reynold1980] verwendet:

$$P_{RM}(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \alpha \hat{g} \frac{1}{\pi} \frac{(1 - \hat{g}^2)^{2\alpha}}{\left((1 + \hat{g})^{2\alpha} - (1 - \hat{g})^{2\alpha} \right) (1 + \hat{g}^2 - 2\hat{g} \cos\Theta)^{(\alpha+1)}} \quad (5)$$

wobei α größer als -0,5 ist und \hat{g} einen Parameter darstellt, aus dem der Anisotropiefaktor g (siehe unten) numerisch errechnet werden kann. Θ ist der Winkel zwischen \mathbf{s} und \mathbf{s}' . Ist $\alpha = 0,5$, handelt es sich um die Henyey-Greenstein-Phasenfunktion [Henyey1941], die häufig für Gewebe verwendet wird.

Zur einparametrischen Beschreibung derartiger Streuprozesse wird der **Anisotropie-Faktor** g verwendet. Dieser ist definiert als der Erwartungswert des Cosinus des Streuwinkels Θ :

$$\int_0^2 d\Phi \int_0^0 p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \cos\Theta \sin\Theta d\Theta = \langle \cos\Theta \rangle = g \quad (6)$$

Der Wertebereich von g erstreckt sich von -1 (Rückwärtsstreuung) über 0 (isotrope Streuung) bis +1 (Vorwärtsstreuung). Biologische Gewebe, darunter Blut, zeigen in der Regel eine ausgeprägte Vorwärtsstreuung, wobei g üblicherweise für das sichtbare Spektrum und das nahe Infrarot Werte zwischen 0,8 und 0,99 annimmt [Cheong1990].

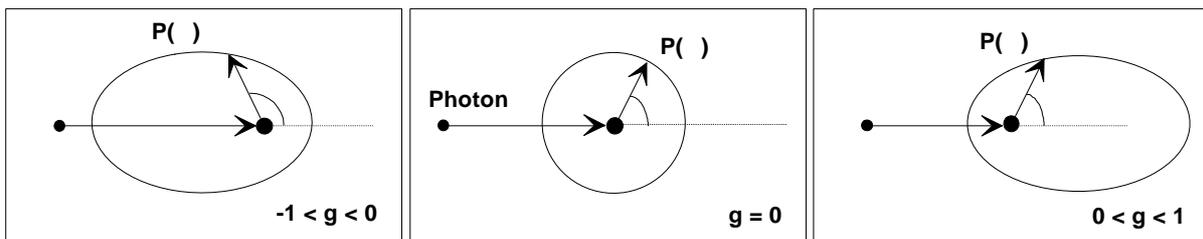


Abbildung 5: Streuphasenfunktion für verschiedene Anisotropiefaktoren: $g < 0$ Rückwärtsstreuung (links), $g = 0$ isotrope Streuung (mitte), $g > 1$ Vorwärtsstreuung (rechts) [Roggan97]

Der Anisotropiefaktor ist neben μ_a und μ_s der dritte optische Parameter, der bei bekannter Streuphasenfunktion zur Beschreibung der Strahlungsverteilung in einem absorbierenden und streuenden Medium benötigt wird.

Zur vereinfachten Beschreibung der Streueigenschaften kann auch der reduzierte Streukoeffizient μ_s' verwendet werden, der sich aus dem Streukoeffizienten μ_s und dem Anisotropiefaktor g ergibt gemäß:

$$\mu_s' = \mu_s (1-g) \quad (7)$$

Diese so genannte Ähnlichkeitstransformation reduziert die Beschreibung der Streueigenschaften auf eine isotrope Phasenfunktion, ist jedoch nur fern von Quellen und Grenzflächen gültig. In der Literatur sind häufig nur μ_s' -Werte zu finden, da die unabhängige Bestimmung von μ_s und g nicht immer möglich ist.

Der wellenlängenabhängige **Brechungsindex** ist gemäß Definition eine komplexe Größe, wobei der Imaginärteil k die Dämpfung der einfallenden Lichtwelle beschreibt (Kramers-Kronig-Relation). k kann bei geringer Absorption vernachlässigt werden.

$$n(\lambda) = n(\lambda) - i \cdot k(\lambda) \quad (8)$$

mit

$$k = \mu_a \lambda / 4\pi \quad (9)$$

3.2 Inverse Monte-Carlo-Simulation zur Bestimmung optischer Eigenschaften streuender Medien

Die Strahlungstransportgleichung ist für komplexere Probleme, insbesondere für die Lichtausbreitung in biologischen Substraten, nicht analytisch lösbar [Ishimaru1978]. Es wurden zahlreiche Lösungsverfahren entwickelt wie z.B. die Diffusionsnäherung oder als Spezialfall die Kubelka-Munk-Näherung [Kubelka1948]. Diese Theorien verlangen aber nach bestimmten Voraussetzungen, die in biologischen Geweben und besonders bei Blut nicht gegeben sind, wie z.B. isotrope Streuung oder im Verhältnis zur Streuung schwache Absorption. Es wurden verschiedene numerische Modelle zur Lösung der Strahlungstransportgleichung vorgeschlagen, wie z. B. die ‚Successive-Scattering‘-Methode [Irvine1964] oder die Adding-Doubling-Methode [van de Hulst1980], die jedoch für komplexe Geometrien und Randbedingungen keine ausreichend genauen Ergebnisse liefern konnten.

Als flexibelstes und auch exaktestes Verfahren zur Berechnung des Strahlungstransports in streuenden und absorbierenden Medien bei Vorliegen komplexer Randbedingungen hat sich die Monte-Carlo-Simulation erwiesen, die daher für die Untersuchung von Blut das Verfahren der Wahl darstellt [Yaroslavsky1999, Roggan1999].

Die Monte-Carlo-Simulation gehört zu den indirekten Verfahren, bei denen Lösungsansätze der Strahlungstransportgleichung (Glg. 3) genutzt werden, um die optischen Parameter μ_a , μ_s und g aus makroskopisch messbaren optischen Größen abzuleiten. Es handelt sich dabei um ein numerisches Verfahren, das auf der ‚Wahrscheinlichkeitsnatur‘ der Wechselwirkung Medium/Strahlung basiert [Prahl1989]. Das Prinzip der Monte-Carlo-Simulation (MCS) besteht darin, mittels einer Computersimulation nacheinander eine große Anzahl von Photonen gemäß den Quelleneigenschaften in das zu untersuchende Medium, im vorliegenden Fall Blut, zu ‚injizieren‘. Das Medium wird dabei statistisch identifiziert mit

Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen, die die jeweiligen physikalischen Eigenschaften beschreiben. Die benötigten Daten (μ_a , μ_s , $p(s,s')$ bzw. g) sind mit denen der Strahlungstransportgleichung identisch [Patterson1991]. Die Parameter der Simulation wie Startposition des Photons und initiale Richtung, freie Wegstrecke zwischen den Interaktionen (Streuung oder Absorption), Streuwinkel und Reflexions- bzw. Transmissionswahrscheinlichkeiten an Grenzflächen werden mittels Zufallszahlen anhand der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen ermittelt. Die dadurch entstehenden zufallsgenerierten Wege der einzelnen Photonen werden verfolgt, bis die Photonen entweder absorbiert worden sind, oder das betrachtete Volumen nach vielfachen Streueignissen verlassen haben (Abbildung 6).

Die zu untersuchende Region wird für diese Simulation in Volumeneinheiten eingeteilt, für die die interessierenden Größen wie absorbierte Energie oder Strahlungsdichte akkumuliert werden können.

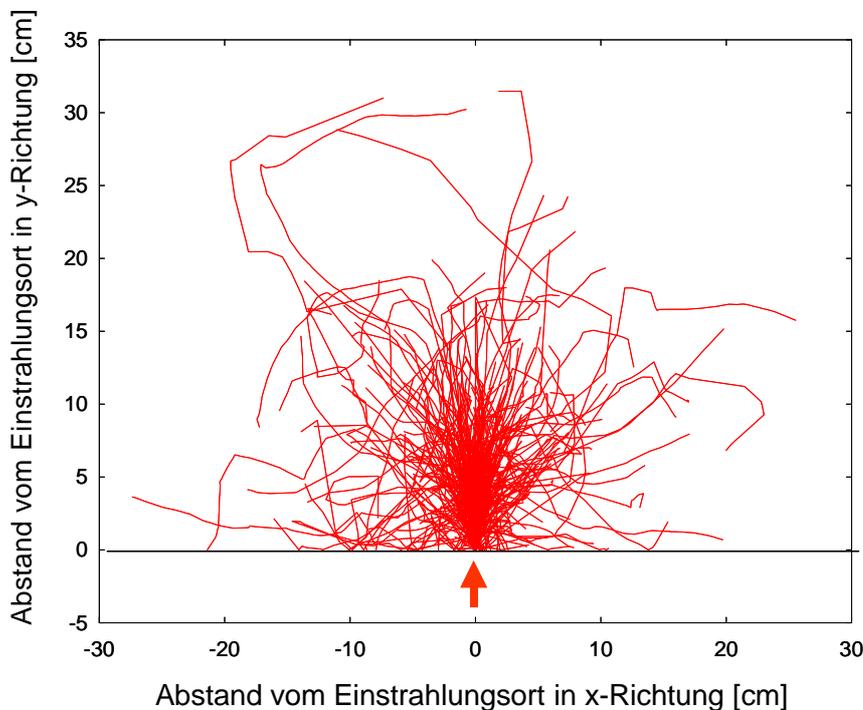


Abbildung 6: Beispiel zur Berechnung der Lichtverteilung nach der Monte-Carlo-Methode bei punktförmiger Einstrahlung

Für die experimentelle Bestimmung der unbekanntenen optischen Parameter μ_a , μ_s und g einer Probe können mit einer geeigneten Messapparatur die bei definierter Bestrahlung der Probe erzeugten Strahlungsfelder außerhalb der Probe gemessen werden. Im Allgemeinen werden hierzu die diffuse Remission sowie die totale und kollimierte Transmission bestimmt. Ein Variationsverfahren, das die drei Parameter μ_a , μ_s und g systematisch verändert und die mittels MCS daraus ermittelten Remissions- und Transmissionsintensitäten mit den gemessenen vergleicht, liefert die gesuchten Parameter. Die Anwendung dieses Verfahrens setzt voraus, dass der zugrundeliegende Zusammenhang zwischen den drei mikrooptischen Parametern und der makroskopischen Strahlungsverteilung eine eindeutige Funktion ist.

Dieses Verfahren zur Ermittlung der mikroskopischen optischen Parameter wird als *inverse Monte-Carlo-Simulation* bezeichnet [Roggan1994].

Der große Vorteil der Monte-Carlo Simulation besteht in der Möglichkeit, Photonenquellen, Phasenfunktionen und eine beliebige Verteilung der optischen Eigenschaften des Mediums wie Probengröße und -geometrie, Brechungsindizes von Grenzflächen u.a. unter Benutzung verschiedener theoretischer Ansätze vorzugeben. Die Genauigkeit der Methode hängt wesentlich von der Anzahl N der berechneten Photonen ab und ergibt sich zu $N^{-1/2}$. Eine hohe Präzision bei der Berechnung der Photonverteilung erfordert daher relativ lange Rechenzeiten.

3.3 Kalibrierung von Sensoren mittels multivariater Regression

Eine direkte Bestimmung physiologischer Größen aus spektroskopischen Daten ist mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen zu zeitaufwendig und nicht immer möglich. Sind die Abhängigkeiten der gemessenen Spektren von den Blutparametern aus den Grundlagenuntersuchungen bekannt, können dafür neuronale Netze und multivariate statistische Verfahren verwendet werden. Diese erlauben durch das Einlesen einer Vielzahl von Daten Vorhersagen der gefragten Parameter auch für komplexe Systeme. Die multivariate Kalibration wird genutzt, um teure oder aufwendige Verfahren durch preiswerte einfache Verfahren zu ersetzen [Martens1989, Brown1993, Sundberg1999]. Für die Auswertung spektroskopischer Daten werden chemometrische Bewertungsalgorithmen wie Principal Component Regression (PCR) und die Methode der Partial Least Squares (PLS) vielfach eingesetzt [Haarland1988, Zhang1998, Soller2003, Pomerleau2005]. Sie zählen zu den multivariaten statistischen Verfahren. Im Gegensatz zu einfachen (univariaten) Regressionsansätzen, die Bandenmaxima der Spektren oder Flächen unter Banden verwenden, lassen sich mit PCR und PLS auch Messungen auswerten, bei denen nichtlineare Effekte in den Spektren vorhanden sind [Næs2002]. Weiterhin kann durch z.B. Logarithmierung oder Quadrierung der Spektren oder der Blutparameter (x zu $\ln(x)$ oder x^2) eine Linearisierung zwischen Spektren und Blutparameter erreicht werden, welches die Genauigkeit des Verfahrens erhöht [Meinke2005].

Für die Anwendung von PCR und PLS wurden beide Methoden in einem im Hause entwickelten Programm implementiert, um eine flexible Verarbeitung der spektroskopischen Daten zu ermöglichen. Die oben genannten Transformationen (Logarithmieren oder Quadrieren) können einfach implementiert werden. Weiterhin müssen das Reflexionsspektrum und mögliche weitere Spektren wie die Transmissionsspektren vor der Anwendung von PCR oder PLS zu einem Datensatz zusammengefasst werden [Otto1999].

In den linearen multivariaten Regressionsmethoden wird der gesuchte Parameter Y als Linearkombination der spektroskopischen Messwerte $T(\lambda)$ dargestellt:

$$Y = Y_0 + \int T(\lambda) b_Y(\lambda) d\lambda \quad (10)$$

Da in der Regel Messungen bei einer endlichen Anzahl von Wellenlängen λ_i vorliegen, wird statt des Integrals die Summe bestimmt.

$$Y = Y_0 + \Delta \sum_i T(\lambda_i) b_{Y,i} \quad b_{Y,i} \approx b_Y(\lambda_i) \quad (11)$$

Die Summe kann sich über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich erstrecken, es können aber auch Teilbereiche ausgewählt werden. Der Regressionsvektor b_Y wird durch Kalibrierung mit einer Messreihe ermittelt. Y_0 ist der Mittelwert der Blutparameter einer Kalibrierreihe.

In beiden Methoden werden die zur Kalibrierung verwendeten Spektren mit Hilfe so genannter Prinzipalkomponenten auf einen niedrigdimensionalen Funktionsraum projiziert. Die anschließende lineare Regression wird in diesem Funktionsraum durchgeführt. PCR und PLS unterscheiden sich nur in der Konstruktion der Prinzipalkomponenten: Die PCR verwendet Komponenten der Principal Component Analysis (PCA), während in der PLS Korrelationskoeffizienten zwischen den Messwerten ($T(\lambda)$) und dem Parameter Y gebildet werden [Martens1989].

3.4 Laser-Doppler-Effekt

Für die Bestimmung von Teilchengeschwindigkeiten kann die Laser-Doppler-Technik - benannt nach dem Naturwissenschaftler Johann Christian Doppler [Doppler1842] - eingesetzt werden. Trifft Licht auf bewegte Teilchen, wird die Frequenz entsprechend der Geschwindigkeit des Teilchens verschoben. Hierbei kann die Frequenz erhöht oder erniedrigt werden, je nachdem, ob das Teilchen sich zur Lichtquelle hinbewegt oder entfernt. Bei der klassischen Laser-Doppler-Theorie für Einzelstreuung wird die Dopplerfrequenz ω_D wie folgt berechnet:

$$\omega_D = \frac{4\pi}{\lambda_t} \sin\left(\frac{\alpha_D}{2}\right) v \cos(\varphi) \quad (12)$$

Hierbei ist α der Winkel zwischen der eingestrahnten (\mathbf{k}_i) und gestreuten Photonenwelle \mathbf{k}_s mit der Wellenlänge λ_t im Gewebe. φ ist der Winkel zwischen dem Vektor $\mathbf{q} = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i$ und der Geschwindigkeit \mathbf{v} .

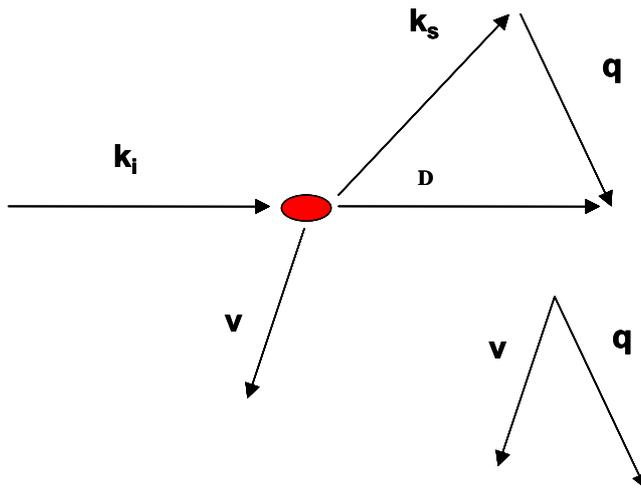


Abbildung 7: Vektordarstellung der Doppler-Verschiebung an einem bewegten Teilchen

Erste Messungen der Mikrozirkulation mit Hilfe der Doppler-Frequenzverschiebung von monochromatischem Licht wurden von Riva et al. und Stern [Riva1972, Stern1975] berichtet. Wenn ein Laserstrahl auf der Haut auftrifft, verteilen sich die einzelnen Photonen im Gewebe in Abhängigkeit von den optischen Parametern der Haut. Dieser Migrationprozess erfolgt durch viele einzelne Streueignisse mit und ohne Frequenzverschiebung. Ein Teil aller eingestrahnten Photonen gelangt zur Hautoberfläche zurück und steht dort für die Detektion zur Verfügung. Es ist zu bedenken, dass die Blutgefäße ungeordnet nebeneinander und übereinander liegen, die Fließrichtung nicht definiert ist und auch innerhalb der Gefäße die Geschwindigkeit einer radialen Verteilung unterliegt, mit einem Maximum in der Mitte der Gefäße [Chien1998]. Bei Laser-Doppler-Messungen an der Haut geht daher die Information der Streurichtungen durch Mehrfachstreuung verloren und es werden über die verschiedenen Blutgefäße gemittelte Geschwindigkeiten bestimmt [Holloway1977, Shepherd1990, Nilson2003]. Dabei wird von einer isotropen Verteilung der Fließrichtungen ausgegangen. Für *eine* Geschwindigkeit würde statt *einer* Dopplerfrequenz eine Verteilung von Dopplerfrequenzen auftreten, je nach den Winkeln α_D und φ . Für mehrere bzw. mittlere Geschwindigkeiten überlappen sich die jeweiligen Dopplerfrequenzverteilungen. Schließt man mehrfache Streuungen an bewegten Teilchen aus, gibt es eine maximale Frequenzverschiebung (mit $\alpha_D = 90$ und $\varphi = 0^\circ$) für jede mittlere Geschwindigkeit (siehe Tabelle 2). Demnach liefern hohe Geschwindigkeiten einen Beitrag bei niedrigen Frequenzen, aber nicht umgekehrt. Durch die Begrenzung des Frequenzbereiches bei der Messung sollte es möglich sein, auf eine bestimmte Art von Blutgefäßen zu fokussieren [Dörschel1996]. Inwieweit die Durchblutung in den Kapillaren von der in den Artriolen und Venolen zu unterscheiden ist, wurde von Meinke et al. [Meinke2007] untersucht und wird in dieser Arbeit vorgestellt (Kapitel 5.3).

Tabelle 2: Mittlere Geschwindigkeiten und maximale Dopplerfrequenzverschiebungen für die verschiedenen Blutgefäßtypen

Blutgefäße	Mittlere Geschwindigkeit [mm/s]	ω_D max [kHz]
Aorta	200	33
mittlere Arterien	100-50	17-8
sehr kleine Arterien	20	3,3
Arteriolen	3-2	0,5
Kapillaren	0,3	0,05
sehr kleine Venen	5-10	0,8-1,7
kleine bis mittlere Venen	10-50	1,7-8
große Venen	50-100	8-17
Venae Cavae (Hohlvenen)	100-160	17-27

Für die Beurteilung der Laser-Doppler-Spektren muss für die Messungen an der Haut die Verteilung der Blutgefäße berücksichtigt werden (siehe Kapitel 2.3). Mittels Laser-Doppler - Messungen bei unterschiedlichen Frequenzbereichen konnte z.B. die Penetration von durchblutungsfördernden Substanzen durch die Haut erfolgreich untersucht werden [Jacobi2006].

4 Ergebnisse - Optische Eigenschaften von Blut

In diesem Kapitel werden die optischen Eigenschaften von Blut und seiner Bestandteile vorgestellt. Die Erythrozyten prägen die optischen Eigenschaften von Blut, denn sie beinhalten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin, der starke Absorptionseigenschaften im blauen bis grünen Spektralbereich aufweist. Weiterhin liegt durch die hohe Konzentration des Hämoglobins in den Zellen ein hoher Brechungsindex in den Erythrozyten vor, der wesentlich die Streueigenschaften des Blutes bestimmt. Die Bestimmung des Brechungsindex von Hämoglobin ist demnach eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit (Kapitel 4.1). Obwohl die Erythrozyten die optischen Eigenschaften des Blutes dominieren, sind die optischen Eigenschaften der Thrombozyten und insbesondere die des Plasmas durch den höheren Brechungsindex im Vergleich zu Wasser zu beachten (Kapitel 4.3). Für die Methodenentwicklung in der Qualitätskontrolle bei Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten und Blutplasmen werden Daten über deren optischen Eigenschaften benötigt.

Um die optischen Eigenschaften der Erythrozyten in unverdünntem Blut im Bereich der hohen Absorption des Hämoglobins zu bestimmen, wurde ein Verfahren etabliert, welches die blutspezifischen Probleme berücksichtigt (Kapitel 4.3). Die Auswahl der richtigen Phasenfunktion, wie sie schon von Hammer [Hammer2001] und Yaroslavsky [Yaroslavsky1999] untersucht wurde, konnte durch die Einführung einer Methode zur Evaluierung einer effektiven Phasenfunktion erleichtert werden [Friebel2006]. Diese effektive Phasenfunktion muss an die jeweilige Situation angepasst werden. Die optischen Eigenschaften der Erythrozyten wurden in Abhängigkeit verschiedener Blutparameter wie Hämatokrit, Sauerstoffsättigung, Osmolarität, Hämolyse und Scherrate untersucht. Nicht alle Arbeiten werden in dieser Schrift dargestellt. Die Änderung der optischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Hämolyse, der Sauerstoffsättigung und zum Hämatokrit wurde in Meinke et al. [Meinke2006] veröffentlicht. Die quantitative Bestimmung der optischen Parameter in Abhängigkeit vom Hämatokrit in Meinke et al. [MeinkeAO2007] beschrieben und eine Veröffentlichung zur Abhängigkeit von der Scherrate ist eingereicht [Friebelsub].

Vier ausgewählte Arbeiten zu den optischen Eigenschaften von Blut mit den grundlegenden Verfahren werden im Folgenden dargestellt.

4.1 Brechungsindex von Hämoglobinlösungen

Der komplexe Brechungsindex von Hämoglobin ist von der Wellenlänge und von der Konzentration abhängig. In der Literatur sind sehr wenige Werte für Weißlicht oder einzelne Wellenlänge zu finden, sowie eine Formel, die den Brechungsindex in Abhängigkeit von der Konzentration bei 589 nm berechnet [Stoddard1923, Barer1956]. Neuere Arbeiten nutzen u.a. die Kramers-Kronig-Näherung um den Brechungsindex, basierend auf Messungen bei einer Wellenlänge, über einen Wellenlängenbereich abzuschätzen [Faber2004]. Da die Kramers-

Kronig-Relation exakt nur für unendlich ausgedehnte Wellenlängenbereiche gilt, die spektroskopischen Daten aber nur endlich vorliegen, sind die Ergebnisse z.B. durch die nicht berücksichtigten starken Absorptionsbanden im UV-Bereich verfälscht. Nachfolgend werden zwei Arbeiten vorgestellt, die es ermöglichen, den komplexen Brechungsindex von Hämoglobin für einen weiten Wellenlängen- **und** Konzentrationsbereich zu berechnen. In der ersten Arbeit wird der komplexe Brechungsindex in Abhängigkeit von der Wellenlänge bestimmt, wobei die Linearität des Absorptionskoeffizienten bis zu einer sehr hohen Konzentration - wie sie auch in den Erythrozyten vorkommt - nachgewiesen wird. Mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten ist der komplexe Anteil des Brechungsindex zu berechnen (siehe Gl. 8 und 9). In der zweiten Arbeit wird eine empirische Funktion hergeleitet, die es ermöglicht den Realteil über den genannten Wellenlängen- und Konzentrationsbereich zu berechnen.

Publikation

M. Friebel, M. Meinke: **Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solution using transmittance and reflectance measurements**, J. Biomed. Optics, 10(6), 064019, (2005)

Zusammenfassung

Die Bestimmung des komplexen Brechungsindex einer hochkonzentrierten Hämoglobinlösung (bis 32 g/dL), wie sie in den Erythrozyten vorliegt, ist Bestandteil dieser Arbeit. Der komplexe Brechungsindex wurde mit Hilfe von Transmissions- und Reflexionsmessungen im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 1100 nm bestimmt. Die Linearität von μ_a bis zu diesen sehr hohen Hämoglobinkonzentrationen konnte durch Transmissionsmessungen bei verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen werden. Damit ist es möglich, den imaginären Anteil des Brechungsindex für jede Wellenlänge, für die Absorptionsdaten vorliegen und für jede Hämoglobinkonzentration bis 32 g/dL zu berechnen. Die Untersuchungen wurden für die sauerstoffgesättigte Form des Hämoglobins durchgeführt. Der Realteil wurde über Messungen des Fresnel-Reflexes ermittelt und die Daten wurden mit Messungen an Wasser validiert. Damit wurden erstmals Daten im Bereich der anomalen Dispersion (355-500 nm) durch direkte Messungen erlangt, da bisher solche Daten nur mit Hilfe der Kramers-Kronig-Näherung berechnet werden konnten. Die Ergebnisse liegen im Mittel höher als die in der Literatur zu findenden Werte, die an aufgereinigten Hämoglobinlösungen bzw. -derivaten gemessen wurden oder bei denen die Daten durch Näherungsrechnungen erhalten wurden.

Publikation

M. Friebe, M. Meinke: **Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250 -1100 nm dependent on concentration**, Appl. Opt. 45(12), 2838-2842 (2006)

Zusammenfassung

Für die Berechnung des Realteils des Brechungsindex in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration wurde für den spektralen Bereich von 250 bis 1100 nm eine empirische Funktion mittels linearer Regression hergeleitet. Hierzu wurde der Brechungsindex von verschiedenen Hämoglobinlösungen durch Reflexionsmessungen bestimmt, wobei es sich wie in der vorherigen Arbeit um unverändertes natives Hämoglobin handelt, welches aus physikalisch hämolysierten Zellen gewonnen wurde. Die Formel beinhaltet als Steigung der linearen Regression einen Faktor β , der je nach Wellenlänge variiert. Dieser Faktor kann einer Tabelle entnommen werden und der Brechungsindex für verschiedene Konzentrationen und Wellenlängen berechnet werden. Für die normale Dispersion von 319 - 355 und 500 - 1100 nm kann β näherungsweise als konstant angesehen werden. Die aus der Literatur bekannte Formel von Barer et al. für 589 nm ergibt Werte, die sich um den Brechungsindex von Wasser zu den hier ermittelten unterscheiden.

4.2 Optische Eigenschaften von Erythrozyten

Publikation

M. Friebel, A. Roggan, G. Müller, and M. Meinke: **Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250-1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions**, J. Biomed. Opt. 11(3), 031021 1-10 (2006)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren vorgestellt, das es erlaubt, die optischen Eigenschaften von Erythrozyten auch bei hoher Konzentration und im Wellenlängenbereich der hohen Absorption des Hämoglobins zu bestimmen. Hierbei wurden mit einem Ulbrichtkugelspektrometer die totale Transmission, die diffuse Transmission und die diffuse Remission von Erythrozytensuspensionen in starker Verdünnung und in physiologischer Konzentration im Wellenlängenbereich von 250 bis 1100 nm gemessen. Mit Hilfe einer räumlich hochauflösenden inversen Monte-Carlo-Simulation wurden die optischen Parameter Absorptionskoeffizient, Streukoeffizient und die Streuphasenfunktion bzw. der Anisotropiefaktor berechnet, nachdem geeignete effektive Phasenfunktionen mittels der inversen Monte-Carlo-Simulation ausgewählt wurden. Dies beinhaltet erstmalig den spektralen Bereich, in dem die hohe Absorption des Hämoglobins liegt, auch bei hoher physiologischer Erythrozytenkonzentration.

Die Reynolds-McCormick-Phasenfunktion mit einem Alpha-Faktor von 1,2 erwies sich für den niedrigen Hämatokrit als geeignet. Für die hohe Konzentration wurde ein Alpha von 1,7 ermittelt. Mit diesen Phasenfunktionen ist es möglich, für den gesamten betrachteten Wellenlängenbereich alle Simulationen innerhalb des gesetzten Fehlers von 0,1 % erfolgreich durchzuführen. Die Ergebnisse werden speziell mit Berechnungen gemäß der Mie-Theorie sowie Werten aus der Literatur verglichen.

4.3 Optische Eigenschaften von Thrombozyten und Blutplasma

Publikation

M. Meinke, G. Müller, J. Helfmann, and M. Friebe: **Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behaviour of whole blood in the VIS-NIR wavelength range**, J. Biomed. Opt. 12(1) in press, 2007

Zusammenfassung

Die optischen Eigenschaften der Blutbestandteile Thrombozyten und Blutplasma wurden in dieser Arbeit mit der gleichen Methode bestimmt, wie die der Erythrozyten in Kapitel 4.2. Die vorgestellten Ergebnisse dienen einerseits als Grundlage für spektroskopische oder andere optische Untersuchungen an Thrombozytenkonzentraten und Plasmaprodukten und ermöglichen andererseits, den Einfluss dieser Blutbestandteile auf das optische Verhalten von Vollblut zu ermitteln. Dazu wurden die optischen Eigenschaften von zwei verschiedenen aufbereiteten Plasmen und von Thrombozyten bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Zur Bestimmung des Einflusses des Mediums auf die optischen Eigenschaften von Blut wurden Erythrozyten sowohl in Kochsalzlösung als auch in Plasma untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass Plasma je nach enthaltenen Chromophoren verschiedene Absorptionsbanden aufweist und einen höheren Streukoeffizienten besitzt, als Berechnungen für ein Streumedium mit reiner Rayleighstreuung ergeben. Der wesentliche Einfluss des Plasmas besteht aber in seiner Verwendung als Medium, da sein Brechungsindex wesentlich höher ist als der von physiologischer Kochsalzlösung.

Die Thrombozyten zeigen keine wesentlichen eigenen Absorptionseigenschaften, und der Streukoeffizient steigt linear mit zunehmender Konzentration. Die Zugabe von Leukozyten in physiologischer Konzentration zu physiologisch konzentrierten Thrombozytensuspensionen zeigt keine signifikanten Änderungen in den optischen Eigenschaften. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die optischen Parameter der Erythrozyten zwei bis drei Größenordnungen über denen der anderen Blutbestandteile liegen, dass aber das zellumgebende Medium einen hohen Einfluss auf deren Streuparameter besitzt.

5 Ergebnisse - Neue spektroskopische Verfahren zur Bestimmung von Blutparametern

Der Weg, über die optischen Parameter Blut zu charakterisieren, ist für schnelle und unkomplizierte Messungen nur sehr begrenzt geeignet. Vielmehr ist für die Anwendung vor Ort eine direkte Bestimmung der Blutparameter wie Hämatokrit und Sauerstoffsättigung aus den spektroskopischen Daten das Ziel. Durch die komplexe Optik von Blut ist die Bestimmung der gesuchten Blutparameter nur mit nachgeschalteten mathematischen Algorithmen und Methoden möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass die Messungen teilweise an Oberflächen durchgeführt werden, die nicht für optische Messungen ausgelegt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der Hämatokrit und die Sauerstoffsättigung auf die optischen Parameter von Blut einen eindeutigen Einfluss haben [Meinke2006, MeinkeJBOang]. Die Bestimmung des Hämatokrits und der Sauerstoffsättigung durch direkte spektroskopische Messungen an Vollblut verlangt bei der Kalibrierung die Anwendung von chemometrischen Verfahren, um Störgrößen in dieser komplexen Matrix zu kompensieren (Kapitel 5.1). Zunächst wurde die Methode grundlegend an einem hochempfindlichen Laborspektrometer entwickelt und getestet und in einer weiteren Arbeit in Form zweier Sensoren umgesetzt, die Messungen an klinischen extrakorporalen Blutkreisläufen erlauben, wie z.B. bei Herz-Lungen-Maschinen.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden [Meinke2006], dass die Bestimmung der Hämolyse in Vollblut durch die Varianz der anderen optisch relevanten Blutparameter mit einem Fehler von ca. 1% behaftet ist. Dagegen kann das freie Hämoglobin in einem stark zellreduzierten Bereich wesentlich genauer bestimmt werden (Kapitel 5.2). Daher wurde für die Qualitätssicherung von Blutprodukten ein Verfahren entwickelt, welches das freie Hämoglobin nach Sedimentation der Erythrozyten bestimmt. Dies wird erreicht durch Transmissionsmessungen bei zwei Wellenlängen, deren Kalibrierung mit Hilfe von Standardlösungen erfolgt. Die zweite Wellenlänge wird für die Korrektur der Streueigenschaften des Kunststoffschlauches genutzt, an dem die Messung durchgeführt wird.

Obwohl die Blutströmung Einfluss auf die optischen Parameter von Blut zeigt [Friebelsub], sind die Effekte zu gering, um diese in der klinischen Routine mittels Spektroskopie zu bestimmen. Bei der Messung durch die Haut kommen zur biologischen Varianz des Blutes noch die individuellen Streueffekte der Haut hinzu. Die Laser-Doppler-Technik bietet für die nicht-invasive Flussbestimmung an strömendem Blut in Kreisläufen optimale Voraussetzungen. Bei der Blutflussmessung der Mikrozirkulation in der Haut wird dagegen auch das Laser-Doppler-Signal durch die Vielfachstreuung des Lichtes in der Haut soweit beeinflusst, dass die quantitative Korrelation zu den Geschwindigkeiten nicht mehr möglich ist. Es fehlt hierbei die Information, welche Gefäße bei der Flussmessung erfasst werden. Mit Hilfe von frequenz aufgelösten Laser-Doppler-Messungen wurden hier Fortschritte erreicht

[Meinke2007] (Kapitel 5.3).

5.1 Spektralaufgelöste Messungen zur Bestimmung des Hämatokrits, der Sauerstoffsättigung und der Hämolyse

Publikation

M. Meinke, I.Gersonde, M.Friebel, J.Helfmann and G.Müller: **Chemometric determination of blood parameters using VIS-NIR-spectra**. Appl. Spectros. 59(6), 826-835 (2005)

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur direkten spektroskopischen Messung von Blutparametern an fließendem Blut. Dies ist z.B. beim Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen notwendig, da die Entnahme von Proben aus dem Kreislauf zeit- und kostenaufwendig ist und zusätzlich das Risiko einer Kontamination birgt. Bereits routinemäßig eingesetzte Sensoren sind zu ungenau und bieten nur Trendmessungen. Zur Entwicklung der Methode erfolgten Messungen an einem miniaturisierten Blutkreislauf. Es wurden Transmissions- und Remissionsmessungen an einem Ulbrichtkugel-Messplatz durchgeführt. Mit Hilfe von chemometrischen Verfahren wurden verschiedene Kalibrierungen durchgeführt, die die Bestimmung von Sauerstoffsättigung und Hämatokrit ermöglichen. Es wurden vier Versuchsreihen mit Blut von jeweils anderen Spendern durchgeführt, wobei die Sauerstoffsättigung und der Hämatokrit unabhängig von einander variiert wurden. Für die Versuchsreihen, in denen auch Transmissionsmessungen durchgeführt wurden, wurde aufgrund der hohen optischen Dichte des Blutes eine Schichtdicke von 0,1 mm gewählt.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Wellenlängen unter 500 nm keine Bedeutung für die Auswertung haben. Die Bestimmung von Hämatokrit und Sauerstoffsättigung gelang mit einer Genauigkeit von 1,4 % bzw. 2,5 %, wenn Transmissions- und Remissionsmessungen zur Auswertung herangezogen wurden. Bei Nutzung reiner Remissionsdaten wurde eine Genauigkeit von 1,9 % (Hämatokrit) und 2,8 % (Sauerstoffsättigung) erreicht. Die Vorhersage der Hämolyse gelang mit 0,8 % und konnte auf 0,03 % gesenkt werden, wenn der Hämatokrit und die Sauerstoffsättigung konstant gehalten wurden.

Damit konnte die Bestimmung absoluter Hämatokrit- und Sauerstoffsättigungswerte mit absoluten Fehlern unter 3 % prinzipiell nachgewiesen werden.

Publikation

M. Meinke, G. Müller, I. Gersonde, M. Friebel: Determination of oxygen saturation and hematocrit of flowing human blood using spectral resolving sensors, Biomed. Technik. 51 (1/2), 347-354 (2006)

Zusammenfassung

Das in der vorherigen Arbeit dargestellte Verfahren sollte nun in Form eines klinisch einsetzbaren Sensors realisiert werden. Dabei wurde untersucht, ob die Ulbrichtkugel wesentliche Vorteile für die Methode bietet. Die Blutparameter Sauerstoffsättigung und Hämatokrit wurden über Reflexionsmessungen im Bereich von 550 bis 900 nm und teilweise über Transmissionsmessungen bei 660 nm mit Hilfe von zwei verschiedenen Sensoren bestimmt. Bei dem einem Sensor wird das rückgestreute Licht in einer Miniatur-Ulbrichtkugel, beim anderen direkt in einer Glasfaser aufgenommen. Für die Erstellung beider Sensoren wurden die optischen Parameter aus den vorherigen Arbeiten eingesetzt. Zur Kalibrierung wurde die *Partial Least Squares*-Methode benutzt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Geometrie der Sensoren und die verschiedenen Blutflüsse keinen Einfluss auf die spektrale Auswertung haben. Unabhängig von der Sensorgeometrie konnte die Methode auf die beiden Sensoren ohne wesentliche Genauigkeitsverluste übertragen werden, sodass beide Blutparameter mit einem mittleren absoluten Fehler von weniger als 3 % bestimmt werden können. Die Hinzunahme von Transmissionsspektren verbessert die Hämatokritbestimmung, nicht aber die Ergebnisse der Sauerstoffmessungen. Die Auswertung hat gezeigt, dass für die Hämatokritbestimmung 8 Wellenlängen notwendig sind, wenn ausschließlich Reflexionsmessungen durchgeführt werden. Für die Sauerstoffmessung sind 4 Wellenlängen erforderlich. Dies zeigt, dass bei Reflexionsmessungen das gesamte Spektrum im oben genannten Bereich für die Bestimmung beider Blutparameter aufgenommen werden sollte.

5.2 Qualitätssicherung von Blutprodukten

Publikation

M. Meinke, M. Friebe, J. Helfmann, M. Notter: **A novel device for the non-invasive measurement of free hemoglobin in blood bags**. Biomed. Technik, 50, 2-7 (2005)

Zusammenfassung

Die Gewinnung von humanen Erythrozytenkonzentraten für Transfusionszwecke ist ein sehr aufwendiges und teures Verfahren; die Verfügbarkeit der Konzentrate ist begrenzt. Unter idealen Lagerbedingungen bei Temperaturen von 4 °C beträgt die Haltbarkeit der Konserven max. 49 Tage. Die Qualitätsprüfung der Blutkonserve erfolgt, von Laborkontrollen an Stichproben abgesehen, allein durch Sichtkontrolle eines Facharztes. Da bei Rücknahme der Konserven bei Nichtbenutzung im OP-Betrieb eine Unterbrechung der Kühlkette in vielen Fällen nicht ausgeschlossen werden kann, werden diese Konserven oft aus Sicherheitsgründen vorzeitig verworfen. Derzeit ist keine Methode bekannt, die eine Überprüfung einer geschlossenen Blutkonserve auf deren Eignung zur Transfusion gestattet. Der hier beschriebene optische Sensor dient der Qualitätssicherung von Erythrozytenkonzentraten am ungeöffneten, nicht modifizierten Standard-Blutbeutel. Die Messung wird an dem mit dem Beutel verbundenen Schlauch nach Sedimentation der Erythrozyten durchgeführt. Die optische Messung wurde an Standard-Hämoglobin-Lösungen mit einer Genauigkeit von 0,005g/dL validiert. Diese Untersuchungen zeigen, dass eine solche Qualitätssicherung in Zukunft routinemäßig bei jeder Blutkonserve möglich ist, sodass nur solche Konserven verworfen werden müssen, die den Qualitätsansprüchen nicht mehr genügen.

5.3 Frequenz aufgelöste Laser-Doppler-Blutflussmessungen an der Haut

Publikation

M. Meinke, M. Schröder, R. Schütz, U. Netz, J. Helfmann, A. Pries, G. Müller: **Frequency weighted Laser-Doppler blood perfusion measurements in skin**, Laser Phys. Lett. 4 (1), 66-71 (2007)

Zusammenfassung

Die Laser-Doppler (LD) -Technik bietet eine nicht-invasive und empfindliche Echtzeitmethode, die vielfältig in der Klinik zur Untersuchung der Blutzirkulation eingesetzt wird. Aber nach wie vor ist eine direkte Zuordnung der relativen Blutflüsse zur Art der Gefäße nicht möglich. Wellenlängen im roten Spektralbereich mit höherer Eindringtiefe geben im Vergleich zu blauen verstärkt den Fluss der tiefer liegenden Gefäße wieder. Auch der Abstand von Lichtquelle und Detektor hat einen Einfluss auf die Auswahl des betrachteten Gewebavolumens und damit auf die Art der Gefäße.

Neben der Thermoregulation, die in den etwas tieferen Gefäßen mit höheren Blutgeschwindigkeiten stattfindet, ist die kapillare Durchblutung von größtem Interesse, da diese für die nutritive Versorgung des Gewebes verantwortlich ist. Dies ist z.B. bei Transplantaten zur Beurteilung der Vitalität wichtig.

Die Kapillaren haben die geringste Blutströmungsgeschwindigkeit und liegen in der Haut sehr oberflächlich. Mit Hilfe einer speziellen Methode, die die LD-Verschiebung frequenz aufgelöst auswerten kann, wurde in dieser Arbeit überprüft, inwieweit die verschiedenen Frequenzbereiche den Geschwindigkeiten und damit der Art der Blutgefäße zugeordnet werden können. Dazu wurden am inneren Handgelenk an der LD-Messstelle a) gezielt die Kapillaren unter mikroskopischer Sichtkontrolle durch Druck verschlossen, b) weitere größere Gefäße mit abgedrückt und c) der komplette Blutfluss am Unterarm unterbrochen und die gemessenen LD-Spektren im Vergleich zu unbeeinflussten Messungen ausgewertet.

Es hat sich gezeigt, dass die Frequenzen von 50 bis 400 Hz die kapillare Durchblutung am besten wiedergeben. Die besten Frequenzen zur Bewertung der kapillaren Durchblutung konnten in den Untersuchungen mit Hilfe der Methode der 'Receiver operating characteristic (ROC)' abgeschätzt werden. Der Quotient von zwei Frequenzbändern (0,1 kHz-0,3 kHz)/(45 kHz -47 kHz) hat die beste Sensitivität und Spezifität ergeben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Grundstein für die optische Charakterisierung von Blut und dessen Bestandteilen gelegt, die für optische Verfahren in der Diagnostik und Therapie von Nutzen sind. Sie dienen zur Dosisberechnung von Wechselwirkung von Licht und Gewebe und ermöglichen die Entwicklung von optischen Messmethoden, Verfahren und Geräten. Damit konnten neue Verfahren zum nicht-invasiven Blutmonitoring mit hoher klinischer Relevanz entwickelt werden, wie sie im zweiten Teil der Ergebnisse dargestellt wurden.

Die Ermittlung optischer Daten von Blut und seinen Bestandteilen ist durch die speziellen biologischen und physikalischen Eigenschaften des Blutes aufwendig und kompliziert, sodass bisher nur begrenzt Literaturdaten zur Verfügung standen [Yaroslavsky1996, Hammer1998, Roggan1999, Enejder2003, Faber2004]. Analytische Modelle und Näherungsrechnungen sind zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von unverdünntem Blut im Bereich der hohen Hämoglobinabsorption nicht geeignet. Es wurde eine Methodik entwickelt, die es erlaubt, Blut oder Blutbestandteile unter Fließbedingungen sicher zu handhaben und reproduzierbar zu messen. Es wurde eine exakt auf den geometrischen Aufbau abgestimmte inverse Monte-Carlo-Simulation eingesetzt, die es zulässt, die optischen Parameter von Blut selbst bei hohen Absorptionen des Hämoglobins zu bestimmen. Nur mit dieser verfeinerten Methode, bei der geeignete Streuphasenfunktionen mittels der Simulation ausgewählt werden können, sind Berechnungen für hohe Zellkonzentrationen möglich. Damit stehen erstmals Daten für unverdünntes Blut für einen weiten spektralen Bereich, vom Ultraviolett bis hin zum Infrarot, zur Verfügung.

Bisherige Arbeiten beschränken sich auf wenige Wellenlängen, die den Bereich der hohen Absorption nicht erfassen. Es konnte gezeigt werden, dass Berechnungen nach der Mie-Theorie, die häufig für Blut angewendet wurden, nur in den spektralen Bereichen, in denen die Absorption gering ist und bei niedrigen Erythrozytenkonzentrationen zulässig sind. Die hier gezeigten Arbeiten zum Brechungsindex in Abhängigkeit von der Wellenlänge bieten erstmalig die Möglichkeit, für Kugeln mit einem Brechungsindex von Erythrozyten solche Näherungsrechnungen in dem erlaubten Wellenlängen- und Konzentrationsbereich anzustellen.

Die ausgewählten Arbeiten haben gezeigt, wie die jeweiligen Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten, Plasma) und die verschiedenen Blutparameter wie der Hämatokrit das optische Verhalten von Blut bestimmen bzw. beeinflussen. Zusätzlich zu den hier präsentierten Arbeiten wurde die Abhängigkeit vom Hämatokrit quantitativ untersucht, sodass die optischen Parameter für einen weiten Hämatokrit- und Wellenlängenbereich berechnet werden können [MeinkeAO2007]. Untersuchungen zur Abhängigkeit der optischen Bluteigenschaften von physiologischen Parametern wie Scherrate, Hämolyse, Osmolarität und Sauerstoffsättigung zeigten unterschiedliche Einflüsse auf die optischen Parameter [Meinke2006, Friebelsub], (nicht in der Arbeit vorgestellt). Hierbei kann kurz

zusammengefasst werden, dass die Erythrozyten bestimmend für die optischen Eigenschaften von Blut sind und der Hämatokrit den am stärksten beeinflussenden Parameter darstellt. Die biologische Varianz der Blutproben stellt die größte Fehlerquelle dar, sodass z.B. der Einfluss der Scherrate oder der Blutströmung zwar sehr genau und signifikant bei dem Blut eines Spenders bestimmt werden kann, aber keine Absolutmessungen an Bluten verschiedener Spender möglich sind. Der Blutfluss sollte demnach in der klinischen Anwendung besser unter Verwendung des Laser-Doppler-Verfahrens als mit spektroskopischen Methoden gemessen werden.

Wie das letzte Beispiel zeigt, können die optischen Daten genutzt werden, um Messverfahren und -geräte zu entwickeln, die direkte optische Messungen ohne Blutkontakt ermöglichen und Informationen über den Zustand des Blutes geben. Drei verschiedene Verfahren wurden ausgewählt und in vier Arbeiten präsentiert. Das erste Verfahren ermöglicht erstmalig die Bestimmung absoluter Werte von Hämatokrit und Sauerstoffsättigung an extrakorporalen Blutkreisläufen mit Fehlern $< 3\%$. Das Verfahren wurde realisiert mit der Entwicklung zweier Sensoren, die an einem klinischen Blutkreislauf angeschlossen werden können. Erste klinische Testmessungen des fasergestützten Sensors während einer Bypassoperation bestätigen die Machbarkeit des Verfahrens [Veröffentlichung in Vorbereitung].

Für die Qualitätssicherung von Blutkonserven wurde mit Hilfe der ermittelten Datenbibliothek der optischen Parameter von Blut ein spezieller Sensor und ein dazugehöriges Messverfahren entwickelt, welches erstmalig eine Qualitätssicherung bei Lagerung von Erythrozytenkonzentraten ermöglicht, ohne die Konserve zu öffnen. Das Hämoglobin kann sehr empfindlich vor Ort direkt an den zurzeit auf dem Markt befindlichen unveränderten Blutbeuteln bestimmt werden. Die mehrfache Anwendung des Verfahrens an einer Probe ist möglich, ohne die Qualität zu beeinflussen. Somit können erstmalig Verlaufsmessungen an einer Konserve zu Forschungs- oder Verfahrenszwecken erfolgen.

Die Untersuchungen mit dem Laser-Doppler-Blutflussmessgerät haben gezeigt, dass eine Auswahl der Frequenzbereiche der Laser-Doppler-Frequenzverschiebungen eine Korrelation zu bestimmten Gefäßtypen zulässt. Niedrige Frequenzen bis zu 400 Hz geben bevorzugt die kapillare Durchblutung wieder, die für die Versorgung des Gewebes verantwortlich ist. Wählt man höhere Frequenzbereiche, so kann das Gewicht auf die Arteriolen und Venolen verschoben werden, die bei der Thermoregulation eine wichtige Rolle spielen. Erstmals wird hiermit die Möglichkeit geboten, ein vorhandenes Laser-Doppler-Gerät durch die Wahl der Frequenzbereiche auf verschiedene Anwendungen auszurichten und damit die Diagnostik auf den konkreten Fall zu konzentrieren.

6.1 Ergänzende und weiterführende Untersuchungen /Projekte

Der Sensor für die Bestimmung des Hämatokrits und der Sauerstoffsättigung an geschlossenen Blutkreisläufen wird zusammen mit der Laser- und Medizin-Technologie GmbH, Berlin (LMTB) weiterentwickelt. Solche Art von Messungen stoßen auch auf Interesse bei Herstellern von Herzunterstützungspumpen.

Da für die Messung des freien Hämoglobins an Erythrozytenkonzentraten ein weitgehend erythrozytenfreier Bereich erforderlich ist, wurden Arbeiten zur Beschleunigung der Sedimentation mittels Ultraschall und Zentrifugation durchgeführt [Veröffentlichung in Vorbereitung], die die Grundlage für ein kombiniertes automatisiertes Verfahren bilden, um die Methode im Klinikalltag zeit- und kosteneffektiv einzusetzen.

Der Hämoglobin-Sensor wird zurzeit auch an Thrombozytenkonzentraten und Plasmaproben in verschiedenen Blutbanken eingesetzt, um entweder freies Hämoglobin oder nicht abgetrennte Erythrozyten zu detektieren. Dies ist u.a. für den Herstellungsprozess als interne Qualitätskontrolle wichtig. Weiterhin bietet er Unterstützung bei der Entwicklung von neuen photochemischen Verfahren zur Bekämpfung von Viren, bei denen Hämoglobin als starker Absorber nur begrenzt vorliegen darf.

Die erhaltenen Daten der optischen Parameter von Blut werden für weitere Projekte aktiv genutzt und sind durch die zahlreichen Publikationen öffentlich zugänglich.

7 Literaturverzeichnis

- [Appelblad1994] M Appelblad, S Svenmarker, S Haggmark, E Jansson, R Lindholm: Continuous venous oximetry: a comparative study between the CDI 100 and the Bently OxySat II, *J. Extra Corpo. Technol.* 26, 186 (1994).
- [Barajas1997] O Barajas, AM Ballangrud, GG Miller, RB Moore, J Tulip: Monte Carlo modelling of angular radiance in tissue phantoms and human prostate: PDT light dosimetry, *Phys. Med. Biol.* 42 (9), 1675 (1997).
- [Barer1953] R Barer: Spectrophotometry of Red Cell Suspensions. *J. Physiol.* (London) 119, 52 (1953)
- [Barer1956] R Barer and S Joseph: Refractometry and interferometry of living cells, *J. Opt. Soc. Amer.* 47, 545 (1956)
- [Brown1993] PJ Brown: *Measurements, regression and calibration*, Clarendo Press, Oxford, UK, (1992)
- [BundesÄK 1995] Bundesärztekammer (Hrsg.), *Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten.*, Dt. Ärzte-Verlag, Köln, (1995)
- [Cerussi2005] A Cerussi, R Van Woerkom, F Wallarn, B Tromberg: Noninvasive monitoring of red blood cell transfusion in very low birthweight infants using diffuse optical spectroscopy, *J. Biomed. Opt.* 10(5), 051401 (2005)
- [Chambers1944] R Chambers, BW Zweifach,: Topography and function of the mesenteric capillary circulation. *Am. J. Anat.* 75, 173 (1944)
- [Cheong1990] WF Cheong, SA Prael, AJ Welch: A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quant. El.* 26(12), 2166 (1990)
- [Chien1975] S Chien: Biophysical behavior of red blood cells in suspension. In: *The red blood cell* (2nd ed.), DM Surgenor Ed., Academic press, New York, 1975 vol. 2 , p. 1031
- [Dörschel1996] K Dörschel G Müller, Velocity resolved laser Doppler blood flow measurements in skin, *Flow. Meas. Instrum.* 7, 257 (1996)
- [Doppler1842] JC Doppler: Über das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels, *Abh. Königl. Böhmischen Ges. Wiss.* 5, 465 (1842)
- [Enejder2003] AMK Enejder, J Swartling, P Aruna, and S Andersson-Engels: Influence of cell shape and aggregate formation on the optical properties of flowing whole blood, *Appl. Opt.* 42(7), 1384 (2003)

- [Faber2004]. DJ Faber, MCG Alders, EG Mik, BA Hooper, MJC van Gemert, TG van Leeuwen: Oxygen saturation-dependent absorption and scattering of blood, *Phys. Rev. Letters* 93, 028102 (2004)
- [Flock1989] ST Flock, MS Patterson, BC Wilson, DR Wyman: Monte-Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissue- 1. Model prediction and comparison with diffusion theory, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 36 (12) (1989)
- [Friebel2006] M Friebel, A Roggan, G Müller, and M Meinke: Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250-1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions, *J. Biomed. Opt.* 11(3), 031021 (2006)
- [Friebelsub] M Friebel, G Müller, M Meinke: Influence of shear rate on the optical properties of human blood in the spectral range 250 – 1100 nm, *J. Biomed. Opt.* eingereicht
- [Goethe1828] JW Goethe: Faust erster Teil, In: *Goethe's Werke*, Vollständige Ausgabe letzter Hand, in der J.G. Cotta'schen Buchhandlung, Band 12, S. 88
- [Hammer1998] M. Hammer, D. Schweitzer, B. Michel, E. Thamm and A. Kolb: Single scattering by red blood cells, *Appl. Opt.* 37 (31), 7410-18 (1998)
- [Hammer2001] M Hammer, AN Yaroslavsky and D Schweitzer: A scattering phase function for blood with physiological haematocrit, *Phys. Med. Biol.* 46, N65 (2001)
- [Haaland1988] DM Haaland, EV Thomas: Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60, 1193 (1988)
- [Hemington2005] SJ Hemington-Gorse, A comparison of laser Doppler imaging with other measurement techniques to assess burn depth, *J. Wound Care.* 14, 151 (2005)
- [Henyey1941] LG Henyey and JL Greenstein: Diffuse radiation in the galaxy, *Astrophysical J.* 93, 70 (1941)
- [Holloway1977] GA Holloway, DW Watkins: Laser Doppler measurements of cutaneous blood flow, *J. Invest. Dermatol.* 69(3), 306 (1977)
- [Hovius1995] S.E. Hovius, L.N. van Adrichem, H.D. Mulder, R. van Strik, J.C. van der Meulen, Comparison of laser Doppler flowmetry and thermometry in the postoperative monitoring of replantations, *J. Hand. Surg.* 20, 88-93 (1995)

- [Humeau2004] A. Humeau, A. Koitka, P. Abraham, JL Saumet, JP L'Huillier: Spectral components of laser Doppler flowmetry signals recorded in healthy and type 1 diabetic subjects at rest and during a local and progressive cutaneous pressure application: scalogram analyses, *Phys. Med. Biol.* 49 (17) 3957 (2004)
- [Ishimaru1978] A Ishimaru: Wave propagation and scattering in random media. Academic Press: New York, (1978); Vol. 1+2.
- [Irvine1964] WM Irvine: The formation of absorption bands and the distribution of photon optical paths in a scattering atmosphere, *Bull Astron Inst Neth*, 17, 266 (1964)
- [Jacques1992] SL Jacque: Simple optical theory for light dosimetry during PDT, in: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy*, Thomas J. Dougherty; Ed, Proc. SPIE Vol. 1645, 155, (1992)
- [Jacobi2006] U Jacobi, M Kaiser, J Koscielny, R Schütz, M Meinke, W Sterry, J Lademann: Comparison of the blood flow to the cutaneous surface temperature and redness after topical application of benzyl nicotinate. *J. Biomed. Opt.* 11(1), 014025 (2006)
- [Kerker1969] M Kerker: Scattering of light and other electromagnetic radiation, Academic Press, New York (1969)
- [Kienle 1996] A Kienle, L Lilge, IAViktin, MS Patterson, BC Wilson, R Hibst, R Steiner: Why do veins appear blue? A new look at an old question, *Appl. Optics* 35(7) 1151 (1996)
- [Kiesewetter1989] H Kiesewetter, F Jung, S Spitzer, E Wenzel: Die Fließeigenschaften des Blutes und ihre klinische Bedeutung beim arteriellen Gefäßpatienten. *Internist* 30, 420 (1989).
- [Kramer1935] K Kramer: Ein Verfahren zur fortlaufenden Messung des Sauerstoffgehaltes im strömenden Blute an uneröffneten Gefäßen, *Biologie* 96, 61 (1935)
- [Kubelka1948] P Kubelka: New contributions to the optics of intensely light scattering materials, Part I. *J. Opt. Soc. Am.* 38; 448 (1948)
- [Leahy1999] MJ Leahy, FFM de Mul, GE Nilsson and R Maniewski: Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique, *Tech. Health Care* 7, 143 (1999)
- [Lerche1993] D Lerche, B Koch, G Vlastos: Das Fließverhalten des Stoffsystems Blut, *Rheology* 93, 105 (1993)

- [Lima2005] A Lima, J Bakker: Noninvasive monitoring of peripheral perfusion, *Intensive Care Med* 31, 1316 (2005)
- [Lindberg1993] LG Lindberg, and PA Öberg: Optical properties of blood in motion, *Opt. Eng.* 32(2), 253 (1993)
- [Malinauskas1997] RA Malinauskas: Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial Organs* 21(12), 1255 (1997)
- [Martens1989] H Martens, T Naes: *Multivariate Calibration*, (John Wiley & Sons, 1989)
- [Meinke2005] M Meinke, I Gersonde, M Friebel, J Helfmann and G Müller: Chemometric determination of blood parameters using VIS-NIR-spectra. *Appl. Spectros.* 59(6), 826-835 (2005)
- [Meinke2006] M Meinke, G Müller, M Friebel, I Gersonde, J Helfmann, M Notter: Optical evaluation of hemolysis, in *Trends in Blood Transfusion Research*, Nova Science Publishers, Inc, ISBN:1-60021-288-3, 2006
- [Meinke2007] M Meinke, M Schröder, R Schütz, U Netz, J Helfmann, A Pries, G Müller: Frequency weighted Laser-Doppler blood perfusion measurements in skin, *Laser Phys. Lett.* 4 (1), 66-71 (2007)
- [MeinkeAO2007] M Meinke, G Müller, J Helfmann, M Friebel: Model functions to calculate the optical properties of human blood in the spectral range 250 – 1100 nm dependent on Hematocrit, *Appl. Opt.*, angenommen
- [MeinkeJBO2007] M Meinke, G Müller, J Helfmann, and M Friebel: Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behaviour of whole blood in the VIS-NIR wavelength range, *J. Biomed. Opt.*, angenommen
- [Mie1908] G Mie: Pioneering mathematical description of scattering by spheres, *Ann. Physik* 25, 337 (1908)
- [Næs2002] T Næs, T Isaksson, T Fearn, T Davies: *Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications Chichester, UK, 2002
- [Nilsson2003] GE Nilsson, LG Salerud, NNT. Strömberg, and K Wardell: *Biomedical Photonics Handbook*. Editor-in-Chief Vo-Dinh, T., CRC Press LLC, FL, USA, (2003) p.15
- [Otto1999] M Otto, *Chemometrics*, Wiley-VCH, Weinheim, (1999), 100ff.
- [Patterson1989] MS Patterson, B Chance and BC Wilson: Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties, *Appl. Opt.* 28, 2331 (1989)

- [Patterson1991] MS Patterson, BC Wilson, DR Wyman: The propagation of optical radiation in tissue 1. Models of radiation transport and their application. *Lasers Med. Sci.* 6, 155 (1991)
- [Riva1972] C Riva, B Ross, GB Benedek: Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries, *Invest. Ophthalmol.* 11(11), 936 (1972)
- [Pomerleau2005] N Pomerleau-Dalcourt, R Weersink, L Lilge: Partial least squares based decomposition of five spectrally overlapping factors, *Appl. Spectros.* 59(11), 1406 (2005)
- [Prahl1989] SA Prahl, M Keijzer, SL Jacques, AJ Welch: A Monte Carlo model of light transport in tissue. *SPIE Institute Series Vol. IS5*, 102 (1989)
- [Reynolds1980] L Reynolds, N McCormick: Approximate two-parameter phase function for light scattering, *J. Opt. Soc. Am.* 70, 1206 (1980)
- [Roggan1994] A Roggan, H Albrecht, K Dörschel, O Minet, G Müller: Experimental set-up and Monte-Carlo model for the determination of optical tissue properties in the wavelengths range 330-1100 nm. *Proceedings SPIE Vol. 2323*, 21 (1994)
- [Roggan1997] A Roggan: Dosimetrie thermischer Laseranwendungen in der Medizin. In: *Fortschritte in der Lasermedizin*, GJ Müller, H-P Berlin (Hg.) Ecomed, Landsberg/Lech 1997
- [Roggan1999] A Roggan, M Friebel, K Dörschel, A Hahn, G Müller: Optical Properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm, *J. Biomed. Opt.* 4 (1) 36 (1999)
- [Sams1990] WM Sams Jr, Structure and Function of the Skin, in WM Sams Jr, P.J Lynch (Ed.), *Principles and Practice of Dermatology*, Churchill Livingstone, New York (1990)
- [Selb2005] J Selb, JJ Stott, MA Franceschini, AG Sorensen, DA Boas: Improved sensitivity to cerebral hemodynamics during brain activation with a time-gated optical system: analytical model and experimental validation, *J. Biomed. Opt.* 10(1), 011013 (2005)
- [Sem'yanov2000] KA Sem'yanov, PA Tarasov, JT Soini, AK Oetrov, VP Maltsev: Calibration-free method to determine the size and hemoglobin concentration of individual red blood cells from light scattering, *Appl. Opt.* 39(31), 5884 (2000)

-
- [Shepherd1990] AP Shepherd, PA Öberg, Eds.: Laser-Doppler Blood Flowmetry, Kluwer Academic, Bosten, (1990)
- [Soddard1923] JL Stoddard and GS Adair, "The refractometric determination of hemoglobin", *J. Chem. Biol.* 57, 437 (1923)
- [Soller2003] BR Soller, J Favreau, PO Idwasi: Investigation of electrolyte measurement in diluted whole blood using spectroscopic and chemometric methods, *Appl. Spectros.* 57(2), 146 (2003)
- [Southworth1998] R Southworth, R Sutton, S Mize, AH Stammers, LW Fristoe, D Cook, D Hostetler, WE Richenbacher: Clinical evaluation of a new in-line continuous blood gas monitor, *J. Extra Corpo. Technol.* 30, 166 (1998).
- [Stefanovska1999] A Stefanovska, P Leger, M Bracic, T Bracic, P Bendayan, and H. Boccalon: Linear and nonlinear analysis of blood flow in healthy subjects and in subjects with Raynauld's phenomenon, *Tech. Health Care* 7, 225 (1999)
- [Steinke1988] JM Steinke, AP Shepherd: Diffusion model of the optical absorbance of whole blood, *J Opt. Soc. Am. A* 5(6), 813 (1988)
- [Stern1974] MD Stern: In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering, *Nature* 254, 56 (1975)
- [Sundberg1999] R Sundberg: Multivariate calibration - Direct and indirect regression methodology, *Scand. J. Statist.* 26, 161 (1999)
- [Thompson2005] MS Thompson, A Johansson, T Johansson, S Andersson-Engels, S Svanberg, N Bendsoe, K Svanberg: Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements, *Appl. Opt.* 44(19), pp.4023-4031 (2005)
- [Tomita1983] M Tomita, F Gotoh, M Yamamoto, N Tanahashi, M Kobari: Effects of hemolysis, hematocrit, RBC swelling, and flow rate on light scattering by blood in a 0.26 cm ID transparent tube, *Biorheology* 20(5), 485 (1983)
- [Tuchin1993] VV Tuchin: Light interaction with biological tissues: overview, *Proceedings SPIE Vol. 1884*, 234 (1993)
- [van de Hulst1957] HC Van de Hulst: Light scattering by small particles. John Wiley & Sons, New York (1957)
- [Van de Hulst1980] HC Van de Hulst: Multiple light scattering. Vol.1+2, Academic Press, New York (1980)
- [Van Gemert1989] MJC Van Gemert, SL Jacques, HJCN Sterenberg, WM Star: Skin optics, *IEEE Transaction on Biomedical Engineering* 36 (12), 1146 (1989)

-
- [Welch1987] AJ Welch, G Yoon, MJC van Gemert: Practical models for light distribution in laser irradiated tissue, *Laser Surg. Med.* 6, 488 (1987)
- [Wever1954] R Wever: Untersuchungen zur Extinktion von strömendem Blut, *Pflüg. Arch.* 259, 97 (1954)
- [Wilson1990] B C Wilson, S L Jacques: Optical reflectance and transmittance of tissues: Principles and Applications, *IEEE J Quantum Electronics* 26(12) 2186 (1990)
- [Witzleb1990] E Witzleb: Funktionen des Gefäßsystems. In: Schmidt, R.F. / Thews, G. (Hg.): *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin 1990
- [Yaroslavsky1996] A N Yaroslavsky, I V Yaroslavsky, T Goldbach, H J. Schwarzmaier: The optical properties of blood in the near infrared spectral range, in *Optical Diagnostics of Living Cells and biofluids*, Proc. SPIE, Int. Soc. Opt. Eng. 2678, 314 (1996).
- [Yaroslavsky1999] AN Yaroslavesky, IV Yaroslavsky, T Goldbach, HJ Schwarzmaier: Influence of the scattering phase function approximation on the optical properties of blood determined from the integrating sphere measurements, *J. Biomed. Opt.* 4(1), 47-53 (1999)
- [Zhang1998] S Thang, BR Soller, RH Micheels: Partial least-squares modeling of near-infrared reflectance data for non-invasive in vivo determination of deep-tissue pH, *Appl. Spectrosc.* 52(83), 400 (1998)
- [Zweifach1961] BW Zweifach: *Functional behaviour of the microcirculation*, Thomas, Springfield, Illinois (1961)

8 Abkürzungsverzeichnis

b_Y	Regressionsvektor für den jeweiligen Blutparameter
c_a	Absorberkonzentration
c_s	Streuzentrenkonzentration
CO_2	Kohlendioxid
g	Anisotropiefaktor
\hat{g}	Fitparameter, aus dem g numerisch ermittelt werden kann.
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
i	Imaginäre Zahl
k	Imaginärteil des Brechungsindex
\mathbf{k}_i	eingestrahlte Photonenwelle
\mathbf{k}_s	gestreute Photonenwelle
$L(\mathbf{r},\mathbf{s})$	Strahlungsdichte am Ort \mathbf{r} in Richtung \mathbf{s}
MCH	mittlerer Hämoglobingehalt (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	mittlere Hämoglobinkonzentration innerhalb des Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
n	komplexer Brechungsindex
n	Realteil des Brechungsindex
O_2	Sauerstoff
$p(\mathbf{s},\mathbf{s}')$	Streuphasenfunktion
PCA	Principal Component Analysis
PLS	Partial Least Square
PLT	Thrombozyten (platelets)
\mathbf{q}	Vektor zwischen $\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i$
\mathbf{r}	Ortsvektor
RBC	Rote Blutkörperchen (red blood cells)
\mathbf{s}	Ortsvektor in Richtung \mathbf{s}
$S(\mathbf{r},\mathbf{s})$	Quellterm
SatO ₂	Sauerstoffsättigung
$T(\lambda)$	Spektroskopischer Messwert in Abhängigkeit von der Wellenlänge
\mathbf{v}	Geschwindigkeit

Vol-%	Volumenprozent
WBC	Leukozyten (white blood cells)
Y	gesuchter Blutparameter in einer Linearkombination
Y_0	Mittelwert der Blutparameter Y, die in der Kalibrierung verwendet wurden

Griechische Symbole

α	Fitfaktor in der Reynold-McCormick-Streuphasenfunktion
α_D	Winkel zwischen eingestrahelter Photonenwelle und gestreuter Photonenwelle
λ	Wellenlänge
λ_t	Wellenlänge im Gewebe
μ_a	Absorptionskoeffizient
μ_s	Streukoeffizient
μ_s'	effektiver Streukoeffizient
σ_a	Absorptionsquerschnitt
σ_s	Streuquerschnitt
ω_D	Dopplerfrequenz
Φ	Azimutalwinkel
Θ	Streuwinkel
φ	Winkel zwischen dem Vektor \mathbf{q} und der Geschwindigkeit \mathbf{v}
Ω	Raumwinkel

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Pof. h.c. Dr. h.c. mult. Gerhard Müller für die Bereitstellung der experimentellen Möglichkeiten, die großzügige Unterstützung meiner Arbeiten und für die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Beuthan danke ich für Unterstützung in der Lehre und für seinen freundlichen Rat, mit dem er mir jederzeit während der Arbeit zur Seite stand.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Moritz Friebel, der an den Experimenten von Beginn an mitgewirkt und mit seiner medizinischen und physikalischen Sachkenntnis wesentlich zu den Ergebnissen, besonders bei der Bestimmung der optischen Parameter, beigetragen hat. Dem Kollegen Dr. Ingo Gersonde danke ich in besonderer Weise für die Unterstützung in der Chemometrie und zusammen mit Dr. Jürgen Helfmann für die zahlreichen kritischen wissenschaftlichen Diskussionen und konstruktiven Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Lesley Hirst möchte ich mich für den Einsatz als 'Native-Speaker' bei der Korrektur der zahlreichen Veröffentlichungen und für die Durchführung der verschiedensten Laboruntersuchungen sehr herzlich bedanken. Frau Dipl.-Ing. Melanie Schröder danke ich für die experimentellen Arbeiten zu den Laser-Doppler-Untersuchungen. Für den engagierten Einsatz bei der Konstruktion und dem Bau der Sensoren danke ich Norbert Müller, Reinhard Dietrich, Lutz Krebs, Rijk Schütz und Richard Klein.

Für die Bereitstellung experimenteller Möglichkeiten und der fruchtbaren Kooperation danke ich Herrn Dr. Hansjörg Albrecht von der Laser- und Medizin-Technologie GmbH Berlin. Bei den Herren Prof. Dr. Dr. Holger Kiesewetter und Dr. Michel Notter von den transfusionsmedizinischen Instituten der Charité bedanke ich mich für die Bereitstellung der Blutkonserven, für die Durchführungen von Testmessungen in Ihren Arbeitsgruppen und für die wichtigen Insider-Informationen aus der Routine der Blutproduktherstellung. Herrn Prof. Dr. Axel R. Pries vom Institut für Physiologie danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen zu den Laser-Doppler-Untersuchungen und für die Bereitstellung des Kapillarmikroskops. Herrn Dr. Andreas Hahn von der Firma Sorin Group danke ich für Bereitstellung der technischen Geräte zum Aufbau eines extrakorporalen Kreislaufes.

Ausgangspunkt dieser Arbeiten war ein vom BMBF-gefördertes Projekt, und weitergehende Messungen wurden vom Senat von Berlin unterstützt. Hierfür meinen Dank.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 12.01.2006

.....

Dr. rer. nat. M. Meinke