

Aus der Laser-Immunologie-Forschungs-Einrichtung (LIFE-Zentrum)

Forschungseinrichtung der Universität München

Vorstand/Direktor: Prof. Dr. med. Christian Stief

SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON
HÄMOGLOBINFORMEN
IN BLUTPLASMA UND BIOLOGISCHEM GEWEBE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Heckl

aus

München

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ronald Sroka
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Humpe PD Dr. Johanna Tischer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Herbert Stepp Dr. Adrian Rühm
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	10.08.2022

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste.....	1
Abstract.....	4
Zusammenfassung.....	6
Spektroskopische Untersuchungen von Hämoglobinformen in Blutplasma und biologischem Gewebe.....	8
Spektroskopischen Untersuchung von Blut.....	8
Hämoglobin Zyklus.....	9
Absorptionseigenschaften der Häm-Moleküle.....	10
Absorptionsspektroskopie von humanem Blutplasma.....	12
Stand der Technik.....	12
Quantifizierung der freien Häm-Moleküle in Blutplasma.....	13
Photodynamische Therapie.....	16
Grundlagen.....	16
Interstitielle Photodynamische Therapie.....	17
Einfluss der Häm-Moleküle auf die Absorption des biologischen Gewebes während einer Photodynamischen Therapie.....	19
Originalmanuskripte.....	22
Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin and methemalbumin in presence of bilirubin.....	24
Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy.....	40
Literaturverzeichnis.....	52
Danksagung.....	58
Lebenslauf.....	59
Eidesstattliche Versicherung.....	62

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen in begutachteten Fachmagazinen:

- **Christian Heckl**, Alexander Lang, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Thomas Duffield, Michael Vogeser, Michael Paal “*Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin and methemalbumin in presence of bilirubin*”, J. Biophotonics, e202000461, doi: 10.1002/jbio.202000461 (2021), JIF: 3.207
- **Christian Heckl**, Maximilian Eisel, Alexander Lang, Christian Homann, Michael Paal, Michael Vogeser, Adrian Rühm, Ronald Sroka “*Spectroscopic methods to quantify molecules of the heme-biosynthesis pathway – a review of laboratory work and point-of-care approaches*”, Translational Biophotonics, 3:e202000026, doi: 10.1002/tbio.202000026 (2021)
- Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, Sebastian Siller, Maximilian Aumiller, **Christian Heckl**, Robert Forbrig, Karim-Maximilian Niyazi, Rupert Egensperger, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon “*Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences*”, Cancers, (2021), JIF: 6.639
- **Christian Heckl**, Maximilian Aumiller, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy*”, Photochem Photobiol., 96(2):388-396. doi: 10.1111/php.13203 (2020), JIF: 3.421
- Alexander Lang, **Christian Heckl**, Michael Vogeser, Thomas Stauch, Christian Homann, Georg Hennig, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Rapid Spectrophotometric Quantification of Urinary Porphyrins and Porphobilinogen as Screening Tool for Attacks of Acute Porphyria*”, J. Biomed. Opt., 23(5):1-12 doi: 10.1117/1.JBO.23.5.055006 (2018), JIF: 3.17
- Ronald Sroka, Nikolas Dominik, Maximilian Eisel, Anna Esipova, Christian Freymüller, **Christian Heckl**, Georg Hennig, Christian Homann, Nicolas Höhne, Robert Kammerer, Thomas Kellerer, Alexander Lang, Niklas Markwardt, Heike Pohla, Thomas Pongratz, Claus-Georg Schmedt, Herbert Stepp, Stephan Ströbl, Keerthanan Ulaganathan, Wolfgang Zimmermann, Adrian Rühm “*Research and developments of laser assisted methods for translation into clinical application*”; Frontiers of Optoelectronics 10(3):239-254 (2017), JIF: 0.92
- Maximilian Aumiller, **Christian Heckl**, Stefanie Quach, Herbert Stepp, Birgit Ertl-Wagner, Ronald Sroka, Nikolas Thon, Adrian Rühm “*Interrelation between Spectral Online Monitoring and postoperative T1-weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas*”, Cancers (Im Reviewprozess)

Veröffentlichungen in „Conference Proceedings“:

- Maximilian Aumiller, Birgit Ertl-Wagner, **Christian Heckl**, Stefanie Lietke, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm “*Investigation on Treatment Light Transmission Changes During IPDT in Comparison to T1 Hyperintensity in Early Post-Therapeutic T1-Weighted MRP*”, European Conferences on Biomedical Optics 2021, Paper EW1A.7. (June 2021)
- Maximilian Aumiller, Maximilian Eisel, **Christian Heckl**, Christian Freymüller, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Adrian Rühm “*Investigation of Changes of Optical Tissue Properties up to 50°C*”, Biophotonics Congress 2021, OSA Technical Digest, Paper JW1A.6. Optical Manipulation and Its Applications (April 2021)
- **Christian Heckl**, Maximilian Aumiller, Adrian Rühm, Herbert Stepp, Ronald Sroka “*Influence of oxy-, deoxy- and met-hemoglobin absorption in interstitial photodynamic therapy (Conference Presentation)*”, Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2020, Paper TW1B.8 (April 2020)
- Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Adrian Rühm, **Christian Heckl**, Maximilian Aumiller, Ronald Sroka, Friedrich-Wilhelm Kreth “*Stereotactic interstitial photodynamic treatment of glioblastoma recurrences*”, 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 9. Joint Meeting mit der Japanischen Gesellschaft für Neurochirurgie, DocV085, doi: 10.3205/20dgnc088 (Juni 2020)
- **Christian Heckl**, Alexander Lang, Michael Vogeser, Thomas Stauch, Christian Homann, Georg Hennig, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Rapid spectrophotometric quantification of urinary porphyrins and porphobilinogen as screening tool for attacks of acute porphyria (Conference Presentation)*”, Proc. SPIE 11079, 110790E, Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IX, and Advanced Biomedical Devices, European Conferences on Biomedical Optics, 11079 (July 2019)

weitere Konferenzbeiträge:

- Poster Präsentation: **Christian Heckl**, Maximilian Aumiller, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Hemoglobin absorption during interstitial photodynamic therapy*”, PDT & PDD Update e-Congress 2020, (November 2020)
- Mündlicher Vortrag: **Christian Heckl**, Adrian Rühm, Maximilian Aumiller, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Intra-operative measurement of optical tissue parameters to individualize treatment planning in stereotactic interstitial PDT of malignant glioma*”, Topical Problems of Biophotonics, (July 2019)
- Poster Präsentation: **Christian Heckl**, Alexander Lang, Michael Vogeser, Thomas Stauch, Christian Homann, Georg Hennig, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Rapid spectrophotometric quantification of urinary porphyrins and porphobilinogen as screening tool for attacks of acute porphyria*”, PDT & PDD Update 2018, (September 2018)



ABSTRACT

Blood plays an important role in the human body as a transport medium for gases and dissolved substances as well as for the distribution of oxygen, which is important for the cells. The main component of the cellular part of the blood is the hemoglobin bound in the erythrocytes. Hemoglobin binds oxygen, but also occurs in the molecular form without bound oxygen as de-oxygenated hemoglobin and in the oxidized form as methemoglobin. These different forms of hemoglobin show different absorption characteristics that can be measured and distinguished by absorption spectroscopy, which could allow a more accurate determination and diagnosis of disease progression. The aim of the present work is to determine and quantify unbound hemoglobin forms in blood plasma that occur during severe intravascular hemolysis. Furthermore, the change of optical properties of biological tissue during interstitial photodynamic therapy is investigated by means of absorption spectroscopy using a tissue model with blood.

For the diagnosis of hemoglobin anemia, blood plasma is spectroscopically analyzed for unbound hemoglobin. However, standard methods inadequately determine the concentration of hemoglobin when severe intravascular hemolysis results in the presence of other hemoglobin forms such as deoxygenated hemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin, as well as the hemoglobin degradation product bilirubin, because their absorption spectra overlay that of oxygenated hemoglobin, making differential determination difficult. In order to determine the concentration of unbound hemoglobin, a mathematical evaluation of the second derivative of the absorption spectra of blood plasma was developed. In addition, the spectral position of the maximum absorbance of oxygenated and de-oxygenated hemoglobin and methemoglobin was developed using a mathematical phenomenological equation so that more accurate quantification of the unbound hemoglobin forms in blood plasma is possible. A total of 1759 samples were measured, the evaluation algorithm was implemented in an Excel macro and attached to the online publication so that it can be integrated and used in clinical practice.

The changes in the optical properties of biological tissue during interstitial photodynamic therapy for the treatment of cancer were investigated using a tissue model. For this purpose, two light probes as well as a further measuring probe for the determination of hemoglobin absorption were placed in the artificial tissue model. During experimental simulation of a photodynamic therapy, light of 635 nm was emitted into the artificial tissue through a light probe for 60 minutes. The second light probe was used as a detector to measure the transmitted laser light as well as the induced fluorescent light of a photosensitizer located within the tissue model. At the same time, the absorption signal of the hemoglobin forms was recorded with the added measuring probe. Analysis of the measured signals showed a decrease in the signal of the transmitted laser light is accompanied by the formation of deoxygenated hemoglobin and methemoglobin. In particular, methemoglobin exhibits significantly higher absorption than oxygenated hemoglobin at 635 nm. The formation of deoxygenated hemoglobin and methemoglobin could be used as an explanation for the change in optical properties of biologic tissue during clinical photodynamic therapy. Monitoring of hemoglobin absorption signal but especially prevention of bleeding during photodynamic therapy may represent a positive influence on radiation planning as well as on the course of illumination treatment in cancer therapy.



ZUSAMMENFASSUNG

Blut spielt im menschlichen Körper als Transportmedium für Gase und gelöste Stoffe sowie für die Verteilung von dem für die Zellen wichtigen Sauerstoff eine wichtige Rolle. Hauptbestandteil des zellulären Teils des Blutes ist das in den Erythrozyten gebundene Hämoglobin. Hämoglobin bindet Sauerstoff, tritt aber auch in der molekularen Form ohne gebundenen Sauerstoff als deoxygeniertes Hämoglobin sowie in der oxidierten Form als Methämoglobin auf. Diese verschiedenen Hämoglobinformen zeigen unterschiedliche Absorptionscharakteristika, die mittels Absorptionsspektroskopie gemessen und unterschieden werden können, was eine genauere Bestimmung und Diagnose von Krankheitsverläufen ermöglichen könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung und Quantifizierung von ungebundenen Hämoglobinformen in Blutplasma, die bei starker intravaskulärer Hämolyse auftreten. Des Weiteren wird mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie die Änderung der optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe bei einer interstitiellen Photodynamischen Therapie anhand von einem Gewebe Modell mit Blut untersucht.

Für die Diagnose von Hämoglobinämie wird Blutplasma spektroskopisch auf ungebundenes Hämoglobin hin untersucht. Die Standardmethoden ermitteln jedoch die Konzentration von Hämoglobin unzureichend, wenn bei starker intravaskulärer Hämolyse weitere Hämoglobinformen wie deoxygeniertes Hämoglobin, Methämoglobin und Methämalbumin sowie das Hämoglobin Abbauprodukt Bilirubin auftreten, da deren Absorptionsspektren dasjenige von oxygeniertem Hämoglobin überlagern und somit eine differenzierte Bestimmung erschweren. Um die Konzentration von ungebundenem Hämoglobin bestimmen zu können, wurde eine mathematische Auswertung der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren von Blutplasma entwickelt. Außerdem wurde ein Formalismus zur Bestimmung der spektralen Position der maximalen Absorption von oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobin sowie Methämoglobin anhand einer mathematischen phänomenologischen Gleichung entwickelt, sodass eine genauere Quantifizierung der ungebundenen Hämoglobinformen im Blutplasma möglich ist. Insgesamt wurden 1759 Proben vermessen, der validierte Auswertalgorithmus in einem Excel-Makro implementiert und der online Veröffentlichung der Publikation angehängt, damit dieser bei Auswertungen in der klinischen Routine eingebunden und verwendet werden kann.

In einem weiteren Projekt wurde die Änderungen der optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe bei einer interstitiellen Photodynamischen Therapie zur Behandlung von Krebs anhand eines künstlichen Gewebe-Modells untersucht. Dazu wurden zwei Lichtsonden sowie eine weitere Messsonde, die zur Bestimmung der Hämoglobinabsorption verwendet wurde, in ein Gewebe-Modell platziert. Bei der experimentellen Simulation einer Photodynamischen Therapie wurde für 60 Minuten Licht der Wellenlänge 635 nm mit einer der beiden Lichtsonden in das Gewebe emittiert. Mit der zweiten Lichtsonde wurde das durch das Gewebe-Modell transmittierte Laserlicht sowie das induzierte Fluoreszenzlicht eines im Gewebe-Modell befindlichen Photosensibilisators gemessen. Gleichzeitig wurde mit der Messsonde das Absorptionssignal der Hämoglobinformen aufgezeichnet. Bei der Analyse der Messsignale konnte gezeigt werden, dass die Abnahme des Signals des transmittierten Laserlichts mit der Bildung von deoxygeniertem Hämoglobin und Methämoglobin einhergeht. Vor allem Methämoglobin weist bei 635 nm eine deutlich höhere Absorption als oxygeniertes Hämoglobin auf. Die Bildung von deoxygeniertem Hämoglobin und Methämoglobin könnte eine Erklärung für die Änderung der optischen Eigenschaften von biologischem

Gewebe während der klinischen Photodynamischen Therapie sein. Eine Überwachung des Hämoglobin Absorptionssignals, aber vor allem eine Vermeidung von Blutungen während einer Photodynamischen Therapie können einen positiven Einfluss auf die Bestrahlungsplanung sowie den Behandlungsverlauf bei der Lichtbestrahlung von Tumoren darstellen.

SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON HÄMOGLOBINFORMEN IN BLUTPLASMA UND BIOLOGISCHEM GEWEBE

Die vorliegende Arbeit wurde am Laser-Forschungslabor des LIFE-Zentrums der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München erstellt und wird als kumulative Arbeit, bestehend aus zwei veröffentlichten Originalmanuskripten, bei der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität eingereicht. Die Arbeit beleuchtet anhand von spektroskopischen Untersuchungen klinisch relevantes Auftreten von Hämoglobinformen in Blutplasma und biologischem Gewebe. Ein besonderes Augenmerk wird auf die verschiedenen Absorptionseigenschaften von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2), deoxygeniertem Hämoglobin (Hb), Methämoglobin (MetHb) und Methämalbumin (HALb) gelegt.

In dieser Arbeit wird zur Bewertung intravaskulärer Hämolyse ein Auswerteverfahren entwickelt, mit dem nicht nur freies HbO_2 , sondern auch freies MetHb und HALb durch Absorptionsspektrometrie an humanem Blutplasma trotz spektraler Überlagerung mit Bilirubin bestimmt werden kann [1]. Des Weiteren wird in einem zweiten Projekt der Einfluss der Absorptionseigenschaften von HbO_2 , Hb und MetHb bei einer interstitiellen Photodynamischen Therapie untersucht und deren Einfluss auf die Messsignale des Therapielichts und des Fluoreszenzlichts des verwendeten Photosensibilisators, welche als Monitoringsignale zur Überwachung der Therapie dienen können, bewertet [2].

SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON BLUT

Optische und spektroskopische Methoden sind in der medizinischen Diagnostik von großer Bedeutung. Neben der spektroskopischen Analyse von Körperflüssigkeiten und Gewebeproben werden auch Vitalparameter oder Krankheitsmarker *in vivo* am Patienten optisch überwacht [3], [4]. Die Untersuchung von Blut ist in der Medizin besonders wichtig, da Blut als flüssiges Organ Sauerstoff im Körper verteilt, mit Mineralien versorgt und auch für die Abwehr von Krankheiten und bei der Versorgung von Verletzungen eine wichtige Rolle spielt. Optische Methoden erweisen sich als geeignetes Mittel zur Untersuchung, da sich die Bestandteile von Blut auch spektroskopisch nachweisen und bestimmen lassen, sodass Veränderungen in den Blut-Spektren zur Diagnose und Beurteilung von Krankheiten, Krankheitsverläufen und Therapiemaßnahmen dienen können.

Die Vorteile spektroskopischer Methoden gegenüber chemischen Verfahren liegen darin, dass sie meist deutlich schneller ein Ergebnis liefern. In der Absorptionsspektroskopie werden oft weniger Chemikalien zur Probenpräparation benötigt. Spektroskopische Methoden können *in vitro* an Flüssigkeiten oder auch *in vivo* direkt am Patienten angewendet werden, da sie oft nur geringe Lichtleistungen benötigen. Bei *in vivo* Anwendungen sind zusätzlich die optischen Eigenschaften des biologischen Gewebes zu berücksichtigen. Als Beispiele für spektroskopische Anwendungen am Patienten sind die Pulsoxymetrie [5] oder die Ermittlung von Eisenmangel mittels einer spektroskopischen Messung an der Innenseite der unteren Lippe [6] zu nennen. Ein Nachteil optischer Methoden ist, dass spektrale Überlagerungen mehrerer Farbstoffe eine spezifische Auswertung der einzelnen Moleküle erschweren. Bei hohen Lichtleistungen kann es außerdem schnell zu einem

Ausbleichen der Moleküle kommen, sodass eine quantitative Bestimmung der Stoffe erschwert wird oder gar nicht mehr möglich sein kann [7]. Allerdings ermöglichen innovative Techniken aus Forschung und Entwicklung es zunehmend optische Methoden immer häufiger in der medizinischen Diagnostik und Therapie einzusetzen.

HÄMOGLOBIN ZYKLUS

Blut spielt als Transportmedium für Gase und gelöste Stoffe (Hormone, Vitamine und Mineralien) im Körper eine wichtige Rolle. Der zelluläre Bestandteil des Blutes setzt sich aus den Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zusammen, dessen gemeinsamer prozentualer Anteil am Gesamtvolumen des Blutes Hämatokrit genannt wird. Das Blutplasma ist eine wässrige Lösung, in der Elektrolyte gelöst sind. Einen Großteil des zellulären Bestandteils bilden die Erythrozyten (99 %), die für den Transport und die Verteilung von Sauerstoff im menschlichen Körper verantwortlich sind. Der Sauerstoff wird von dem in den Erythrozyten befindlichen Hämoglobin gebunden. Die häufigsten Hämoglobinformen in den Erythrozyten sind das oxygenierte und deoxygenierte Hämoglobin (97-98%) [8], [9]. Je nachdem ob es sich um venöses, arterielles oder kapillares Blut handelt, ändert sich das Mengenverhältnis von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin. Weitere Hämoglobinformen in den Erythrozyten sind das Methämoglobin (1 %), Carboxyhämoglobin (0.4 – 1.5 %) und das Sulfhämoglobin (0.2 %) [8], [9].

Das Hämoglobin tritt bei Erwachsenen in den Formen HbA₁ (97 %) und HbA₂ (3 %) auf, die sich jeweils aus vier Globinen (HbA₁: zwei α und zwei β Aminosäureketten; HbA₂: zwei α und zwei σ Aminosäureketten) zusammensetzen. In jeder der vier Globine ist ein Häm-Molekül gebunden [10]. Die Bildung des Hämoglobins findet bei Erwachsenen im Knochenmark statt [10].

Die Synthese des Häms erfolgt während der Häm-Biosynthese in den Mitochondrien und Zytoplasma der Zellen [11]. Ausgangspunkt der Synthese ist in dem Mitochondrium die Bildung von 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) aus Succinyl-CoA, das sich aus dem Zitronensäurezyklus speist, und Glycin, einer Aminosäure, durch das Enzym ALA-Synthase [12]–[14]. Anschließend wird das Molekül aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma geschleust, wo aus zwei 5-ALA Molekülen mit Hilfe des Enzyms ALA-Dehydrogenase das Molekül Porphobilinogen gebildet [12], [15], [16]. Im darauffolgenden Schritt wird das Molekül Hydroxymethylbilan (Pre-Uroporphyrinogen) durch das Enzym Porphobilinogendeaminase aus vier Porphobilinogen Molekülen gebildet, aus dem anschließend das Tetrapyrrolringsystem bei der Bildung von Uroporphyrinogen III durch das Enzym Uroporphyrinogen III Synthase entsteht [12], [17]–[19]. Darauf folgt die Bildung des Koproporphyrinogen III im Zytoplasma, aus dem anschließend mit Hilfe des Enzyms CPG-Oxidase im Mitochondrium das Protoporphyrinogen IX gebildet wird [12]. Aus diesem Molekül wird durch die Protoporphyrinogenoxydase Protoporphyrin IX gebildet, in das anschließend mithilfe des Enzyms Ferrochelatase ein zweiwertiges Eisenion (Fe^{2+}) eingebaut wird, wodurch Häm entsteht [12], [20]. Neben Hämoglobin kommt das Häm als prosthetische Gruppe auch in Myoglobin, Neuroglobin und Cytochrom-C vor [21], [22]. Die Bildung von Häm durch die Häm-Synthese wird durch Stimulierung des Enzyms ALA-Synthase durch Häm selbst reguliert [23], [24].

Die Hämoglobinsynthese aus Häm und Globin erfolgt während der Bildung der Erythrozyten (Erythropoese) in den Erythroblasten, die sich als Vorstufen der Erythrozyten aus hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark bilden [25]. Verlieren die Erythroblasten nach mehreren Vorstufen (basophiler, polychromatophiler und orthochromatischer Erythroblast) ihren Zellkern bilden sich Retikulozyten, die aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden [26], [27]. Aus den

Retikulozyten reifen durch das Abstoßen der Kernreste organellfreie Erythrozyten heran [28]. Während des Reifungsprozesses steigt der Gehalt des Hämoglobins an und erreicht in den Erythrozyten eine Konzentration von (34 ± 2) g/dL (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) [29]. Die Bildung der Erythrozyten wird durch Erythropoetin (Epo) geregelt, das in Abhängigkeit des Sauerstoff Partialdruckes im Gewebe vor allem in der Niere produziert wird [10]. Der durchschnittliche Lebenszyklus von Erythrozyten beträgt ca. 120 Tage. Sie werden von Makrophagen in Milz, Leber und Knochenmark (Retikulohistiozytäres System (RHS)) abgebaut [30]. Das Hämoglobin wird zu Häm und Globin aufgespalten. Die Globine werden in Aminosäuren zerlegt. Das Häm wird zu Biliverdin abgebaut, wodurch das Eisenion freigesetzt und zu einem großen Teil wiederverwertet wird. Biliverdin wird zu Bilirubin reduziert, das anschließend über Niere und Darm ausgeschieden wird [31].

Werden die Erythrozyten zerstört, bevor sie in den Makrophagen abgebaut werden konnten (Hämolyse), tritt das Hämoglobin in das Blutplasma aus [32]. Dieses freie Hämoglobin wird an das Transportprotein Haptoglobin gebunden und ebenfalls über das mononukleären Phagozytensystem in Milz und Leber abgebaut [31], [32]. Bei schweren Fällen von Hämolyse wird durch die große Anzahl an freiem Hämoglobin das zur Verfügung stehende Haptoglobin schnell aufgebraucht, wodurch sich freies Hämoglobin und Abbauprodukte (MetHb, Bilirubin) im Plasma anreichern können [31], [33]. Eine vorzeitige Zerstörung der Erythrozyten kann durch verschiedene hämatologische Krankheiten aber auch durch Infektionen wie Malaria oder mechanischen Stress (z.B. durch Herz-Lungen-Bypass oder künstlicher Herzklappen) hervorgerufen werden [31], [32]. Neben den bereits genannten Hämoglobinformen HbO_2 , Hb und MetHb, bei dem durch Oxidation oder Autooxidation von Hämoglobin das zweiwertige Eisenion (Fe^{2+}) unter Abgabe eines Elektrons zu einem dreiwertigen Eisenion (Fe^{3+}) oxidiert, kann auch MALb entstehen [34]. Dies erfolgt, wenn an das oxydierte Häm das Protein Albumin gebunden wird [33].

ABSORPTIONSEIGENSCHAFTEN DER HÄM-MOLEKÜLE

Hämoglobinmoleküle besitzen eine starke Absorption im Wellenlängenbereich um 400 – 435 nm (Soret-Bande) und weitere kleinere Absorptionsmaxima im Bereich von 500 – 650 nm (Q-Banden) wie sie in Abbildung 1 dargestellt sind [35]–[38]. Diese Absorptionsbanden sind auf die π - π^* Elektronenübergängen der konjugierten Doppelbindungen der Tetrapyrrolringe des Häms (gelb markierter Tetrapyrrolring in Abbildung 2 links) zurückzuführen [39]–[41]. Die Soret-Bande entsteht durch den Elektronenübergang aus den Grundzustand S_0 auf das höhere Energieniveau S_2 , während die Q-Banden den Elektronenübergang des Grundzustandes auf das Energieniveau S_1 widerspiegeln (siehe Abbildung 2 rechts) [41].

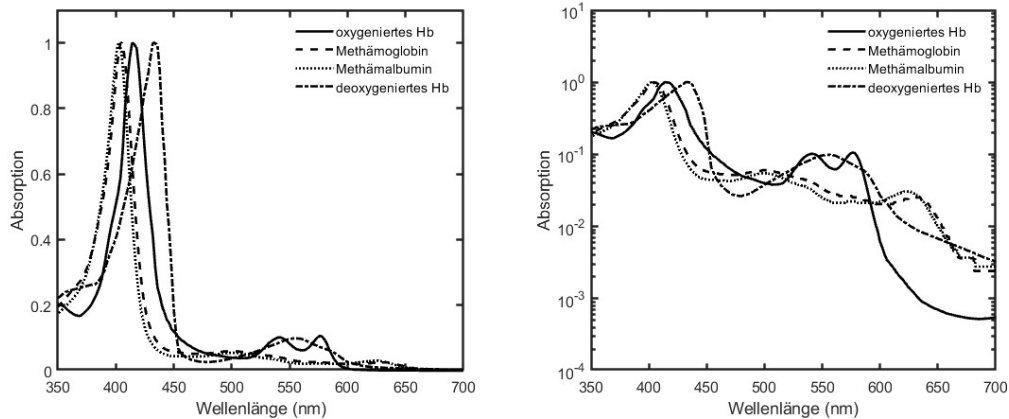


Abbildung 1: Normierte Absorption von oxygeniertem Hämoglobin (durchgezogene Linie), Methämoglobin (gestrichelte Linie), Methämalbumin (gepunktete Linie) und deoxygeniertem Hämoglobin (strichgepunktete Linie) in linearer (links) und logarithmischer (rechts) Darstellung im Wellenlängenbereich von 350 – 700 nm. Die maximale Absorption (Soret-Bande) der Häm-Formen befindet sich im Bereich von 400 – 435 nm. Oxygeniertes Hämoglobin hat zusätzlich bei 540 nm (Beta Bande) und 576 nm (Alpha Bande) zwei weitere lokale Absorptionsmaxima, während deoxygeniertes Hämoglobin nur ein weiteres lokales Absorptionsmaximum bei 556 nm zeigt. Methämoglobin und Methämalbumin besitzen eine sehr ähnliche Absorptionscharakteristik sowie weitere lokale Absorptionsmaxima bei 500 nm (MetHb, MAIb) und bei 632 nm (MetHb) bzw. 623 nm MAIb [1].

Das oxygenierte Hämoglobin bildet neben der Soret-Bande bei 415 nm zwei weitere Absorptionsmaxima bei 540 nm (Beta Bande) und 576 nm (Alpha Bande) [35]. Das deoxygenierte Hb unterscheidet sich zu der oxygenierten Form durch eine Verschiebung der Soret-Bande nach 435 nm und nur einem weiteren Absorptionsmaximum bei 556 nm [38]. Kommt es zu einer Oxidation der Hämoglobinmoleküle verschiebt sich beim MetHb die Absorption des Soret-Bandes nach 405 nm und es bilden sich zwei lokale Absorptionsmaxima bei 500 nm und 632 nm aus (siehe logarithmische Darstellung Abbildung 1 rechts) [38]. MAIb weist mit Absorptionsmaxima bei 403 nm, 500 nm und 623 nm eine sehr ähnliche spektrale Absorptionssignatur wie das MetHb auf [42], [43].

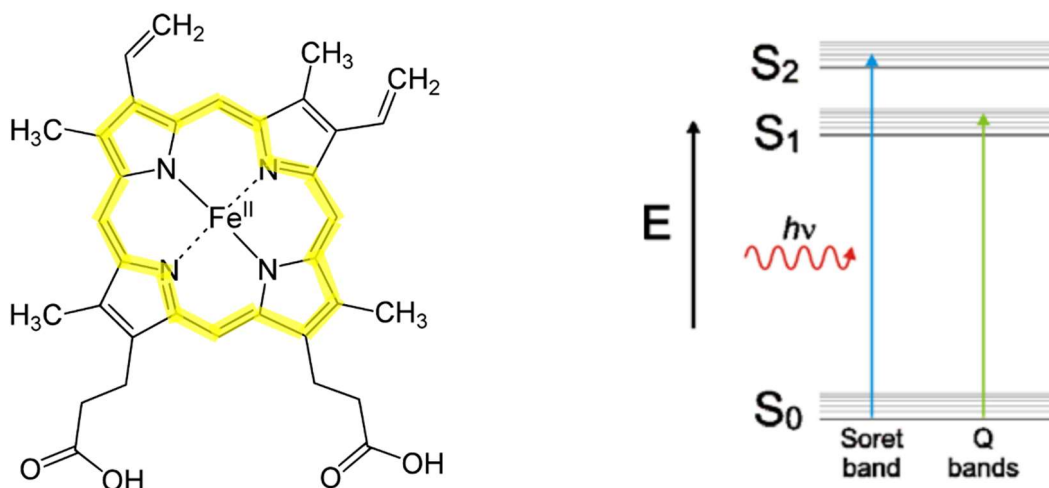


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Häm Moleküls (links [44]) und Darstellung des Absorptionsprozesses durch ein Model der molekularen Energieniveaus (rechts [41]). Das Häm Molekül besteht aus dem Tetrapyrrolring mit dem zweiwertigen Eisenion (Fe²⁺), das in der Mitte des Moleküls gebunden wird. Wenn ein Photon absorbiert wird, wird ein Elektron von dem Grundzustand S₀ auf ein energetisch höheres Energieniveau gehoben. Dabei stellt der Übergang S₀ nach S₁ die Absorption der Q Banden da und der Übergang S₀ nach S₂ die Absorption an der Soret-Bande.

ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE VON HUMANEM BLUTPLASMA

Bei dem Auftreten von krankheitsbedingter Hämolyse wird das Blutplasma des Patienten untersucht, da sich dort vermehrt freie Hämoglobinformen anreichern, die bei gesunden Patienten nicht oder in einem geringeren Maße auftreten [32]. Intravaskuläre Hämolyse kann verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel eine vererbliche Fehlbildung der Erythrozyten, mechanischer Stress (beispielsweise an künstlichen Herzklappen), Infektionskrankheiten (Malaria), immunvermittelte hämolytische Anämie oder thrombotische Mikroangiopathie [31], [32], [45]–[47]. Verschiedene Studien zeigen außerdem, dass intravaskuläre Hämolyse weitere Krankheiten begünstigen kann, wie beispielsweise Entzündungen, Gefäßerkrankungen, Nierenfunktionsstörungen oder Lungenerkrankungen [48]–[50]. Zusätzlich kann eine intravaskuläre Hämolyse als Indikator für eine schwere Sepsis dienen [51]. Durch die Bestimmung von freigesetztem Hämoglobin kann eine mechanisch bedingte Hämolyse, wie sie bei extrakorporalen Verfahren erzeugt wird, überwacht werden [52].

STAND DER TECHNIK

Neben optischen Nachweisverfahren werden biochemische Methoden zur Bewertung der intravaskulären Hämolyse eingesetzt. Möglichkeiten des chemischen Nachweises sind Immunonephelometrie, modifizierte Drabkin-Reaktion und Assays, die auf einer Peroxidase-ähnlichen Reaktion mit Benzidin oder Benzidin-Derivaten basieren [53]–[56].

Als optische Nachweisverfahren zur Bewertung intravaskulärer Hämolyse werden unter anderem spektroskopische Methoden mit Auswertung nach Harboe [57], Noe [58], Fairbanks [59] und Kahn [60] verwendet. Die Methoden nach Harboe, Noe und Fairbanks fokussieren sich bei der Auswertung der Spektren auf den Spektralbereich der Soret-Bande von HbO₂ bei 415 nm (380 – 470 nm) [57]–[59] während sich die Auswertemethode nach Kahn auf den Spektralbereich der Alpha-Bande von HbO₂ bei 576 nm (562 – 598 nm) fokussiert [60]. Die Bestimmung des freien Hämoglobins in Blutplasma wird nach den spektroskopischen Standardmethoden mittels einer linearen Untergrundkorrektur um die maximale Absorption der Soret- oder Alpha-Banden durchgeführt (siehe Abbildung 3) [57]–[60]. Für die Anwendung dieser Standardmethoden in den Laboren ist eine der Auswertemethoden nach Harboe, Noe, Fairbanks oder Kahn meistens in einer Excel-Makro Tabelle implementiert, sodass die Auswertung der Spektren einfach und schnell durchzuführen ist [61]. Diese Auswertemethoden bestimmen jedoch nur HbO₂ und berücksichtigen nur unzureichend spektrale Veränderungen, wie sie beispielsweise für die Position der maximalen Absorption bei den Hämoglobinformen MetHb und MAIb (vergleiche Abbildung 1) oder spektralen Störprodukten wie Bilirubin (siehe Abbildung 3 rechts) auftreten können [59], [62]. Bilirubin hat sein Absorptionsmaximum bei 480 nm und kann somit bei erhöhten Konzentrationen im Plasma die spektralen Absorptionsbanden von Hämoglobin Moleküle überlagern. Dadurch ist mit den vorhandenen Auswertemethoden die Bestimmung der Konzentration von freiem Hämoglobin in Blutplasma bei Vorhandensein der weiteren Hämoglobinformen und Bilirubin nur unzureichend möglich [59], [62].

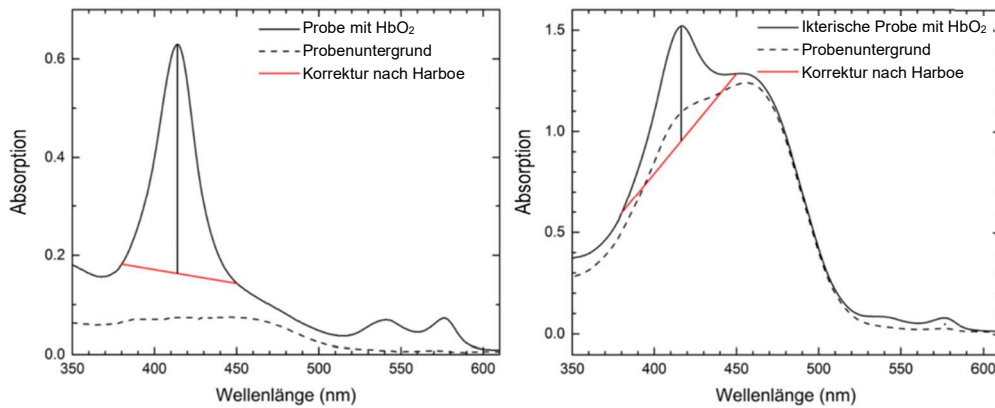


Abbildung 3: Spektroskopische Darstellung des Einflusses von Bilirubin auf die Auswertung von Blutplasma Absorptionsspektren mit (rechts) und ohne (links) Bilirubin. Auswertung nach Harboe mit linearer Untergrundkorrektur (rote Linie) an der Soret-Bande von HbO_2 bei linearer Interpolation zwischen 380 nm und 450 nm. Bei Plasmaproben mit erhöhten HbO_2 und Bilirubin (rechts) führt die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration aufgrund der Bilirubinabsorption zu einem erhöhten Hämoglobinkonzentrationswert [61].

QUANTIFIZIERUNG DER FREIEN HÄM-MOLEKÜLE IN BLUTPLASMA

Bei einer Auswertemethode zur Bestimmung von freiem HbO_2 in Blutplasma, die am Laser-Forschungslabor entwickelt wurde, wird ein Auswertalgorithmus für die Absorptionsspektren verwendet, der auf der Methode einer Minimierung der Fehlerquadrate der Zweiten-Ableitung des gemessenen Probenspektrums durch Subtraktion eines Reinspektrums von HbO_2 beruht [61], [62]. Bei dieser Methode wird die spektrale Signatur von reinem HbO_2 (gelöst in Zitratplasma) von dem gemessenen Absorptionsspektrum subtrahiert. Das Abbruchkriterium dieser Subtraktionsmethode ist das Minimum der Summe aller Fehlerquadrate aller Absorptionswerte der zweiten Ableitung des Differenzspektrums (Residuum). Anhand der Menge der subtrahierten spektralen Signatur des HbO_2 lässt sich anschließend unter Zuhilfenahme einer zuvor ermittelten Kalibrationsgerade die Konzentration des HbO_2 bestimmen. Die Umsetzung dieses Auswertalgorithmus erfolgt mittels des Savitzky-Golay-Filters [63], wie er bereits bei der Bestimmung von Zinkprotoporphyrin Konzentrationen in Blut zur Ermittlung von Eisenmangel und bei der Bestimmung von Porpyhrinmolekülen in Urin zur Ermittlung der Stoffwechselkrankheiten Porphyrie zur Anwendung kam [39–41].

Bei der spektroskopischen Bestimmung von freiem Hämoglobin in Blutplasma mit Hilfe des Auswertalgorithmus basierend auf der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums konnte gezeigt werden, dass auch mit diesem Auswertalgorithmus die Hämoglobinformen MetHb und MALb nicht ausreichend berücksichtigt werden, sodass es weiterhin zu einer Fehleinschätzung des tatsächlichen freien Hämoglobingehalts in Blutplasma kommen kann [61], [62]. Die Hämoglobinformen MetHb und MALb sowie Bilirubin treten vermehrt bei einer fortgeschrittenen intravaskulären Hämolyse im Blutplasma auf und müssen daher bei der Bestimmung des freien Hämoglobingehalts im Blutplasma berücksichtigt werden [65], [66]. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit ein einfaches und schnelles Nachweisverfahren für freies Hämoglobin (HbO_2 , MetHb und MALb) und dem Abbauprodukt Bilirubin in Blutplasma entwickelt werden.

Zur Validierung der in dieser Arbeit entwickelten Auswertemethode wurden Messreihen mit Blutplasma ohne freies Hämoglobin, mit freiem HbO_2 sowie MetHb und MALb sowohl an ikterischen als auch nicht ikterischen Proben durchgeführt. Die Messreihen zur Validierung der Methode ori-

entieren sich an den Vorgaben der „European Medical Agency“ (EMA) zur Validierung biochemischer Methoden [67]. Zur Bestimmung von freiem Hämoglobin im Blutplasma wird das Blut zentrifugiert, bis sich die festen Bestandteile am Boden abgesetzt haben. Das Blutplasma wird von den festen Bestandteilen getrennt und verdünnt. Anschließend wird die Absorption des verdünnten Blutplasmas mit einem Absorptionsspektrometer im Spektralbereich von 350 - 700 nm (Auflösung 0,5 nm) aufgezeichnet. Neben der spektralen Signatur von HbO₂ wurde zusätzlich die spektrale Signatur von MetHb und MALb verwendet, um auch diese Hämoglobinformen aus dem gemessenen Absorptionsspektrum bestimmen zu können [1]. Insgesamt wurden 1759 Plasmaproben in den Kalibrationsmessreihen für HbO₂ und MetHb (insgesamt 384 Proben) sowie in drei unabhängigen Messreihen vermessen. Die ersten beiden unabhängigen Messreihen (jeweils 630 Proben) dienten zur Anpassung und Optimierung des Auswertalgorithmus. Bei der Optimierung wurden der Wellenlängenbereich und die Fitparameter (Polynomgrad und Framelänge) des Savitzky-Golay-Filters angepasst, bis die kleinste Summe aller Fehlerquadrate und somit die geringste Abweichung der gemessenen Konzentration von der Referenzkonzentration erreicht wurde. Mit der dritten unabhängigen Messreihe wurde der Algorithmus der entwickelten Auswertmethode getestet (115 Proben). Mithilfe des so optimierten Auswertalgorithmus ist eine Bestimmung der freien Hämoglobinkonzentration mit einer Genauigkeit von $\leq 20\%$ bei Bilirubinkonzentrationen $\leq 4,9$ mg/dL möglich, während die Genauigkeit der Standardmethoden nach Harboe mit $\leq 83\%$, Noe $\leq 171\%$ und Fairbanks $\leq 104\%$ weit davon entfernt sind [1]. Die EMA-Guidelines zur Validierung von biochemischen Methoden gibt eine zulässige Abweichung der ermittelten Konzentrationen von der Zielkonzentration von $< 15\%$ für den gesamten Konzentrationsbereich und $< 20\%$ für die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantification) an [67]. Bei der Validierung der Auswertmethode liegt die untere Quantifizierungsgrenze von freiem Hämoglobin bei 25 mg/L [1].

Zur Differenzierung der Hämoglobinformen wird zusätzlich die Position der maximalen Absorption (Soret-Bande) von HbO₂, MetHb und MALb berücksichtigt. Spektroskopische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine Unterscheidung zwischen HbO₂ und den beiden Molekülen MetHb und MALb mit dem optimierten Auswertalgorithmus möglich ist, nicht aber zwischen MetHb und MALb, da deren spektralen Absorptionssignaturen zu ähnlich sind [1]. Auch eine Unterscheidung der beiden Moleküle anhand der Q-Banden (632 nm für MetHb und 623 nm für MALb, vergleiche Abbildung 1) war aufgrund der geringen Signalstärke in diesem Wellenlängenbereich nicht möglich. Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurde daher das vorhandene MetHb und MALb immer als Kombination aus MetHb und MALb zusammengefasst [1].

Je nach Anteil der Hämoglobinformen HbO₂ sowie MetHb und MALb an der Gesamtkonzentration des freien Hämoglobins, verschiebt sich die Position der maximalen Absorption von 415 nm (für 100 % HbO₂) zu 405 nm (für 100 % MetHb und MALb) (siehe Abbildung 1). Die beobachtete spektrale Verschiebung der maximalen Absorption wurde mit einer phänomenologischen mathematischen Gleichung mit zwei variablen Parametern beschrieben. Durch diesen neuen Parametersatz lässt sich anhand der Position der maximalen Absorption das Verhältnis zwischen HbO₂ sowie MetHb und MALb mit einer Genauigkeit von $\leq 21\%$ angeben.

Die in dieser Arbeit entwickelte Auswertmethode ist in eine Microsoft Excel-Tabelle als Makro implementiert, wurde als „Supplementary Data“ mit der Publikation veröffentlicht und lässt sich online herunterladen [1]. Dem Interessierten steht die Software somit für die Auswertung seiner Spektren zur Verfügung. In die Excel-Tabelle sind die Absorptionswerte des aufgezeichneten Spektrums zu kopieren und der Verdünnungsfaktor der Probe einzutragen. Der neue implemen-

tierte Auswertalgorithmus wird daraus die gesamte Menge des freien Hämoglobins, die Konzentrationsverhältnisse zwischen HbO₂ sowie MetHb und MALb und die Vergleichswerte von Harboe und Kahn ermitteln und angeben. Zusätzlich wird eine graphische Darstellung der Ergebnisse angezeigt.

In der ersten Publikation dieser Arbeit, wird anhand von Blutplasmaspektren ein Auswertalgorithmus entwickelt, mit dem eine Quantifizierung der freien Hämoglobinformen (oxygeniertes Hämoglobin sowie Methämoglobin und Methämalbumin) trotz einer vorhandenen spektralen Überlagerung von Bilirubin möglich ist.

PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

Erste Indizien für die Photodynamische Therapie (PDT) wurde von dem Medizinstudenten Oscar Raab und dem Mediziner Hermann von Tappeiner in München beobachtet und dokumentiert [68], [69]. Raab untersuchte in seiner Doktorarbeit verschiedene Medikamente zur Behandlung von Malaria [68]. Bei einigen Versuchen machte er die Beobachtung, dass für eine positive Reaktion der Medikamente der Einfluss von Licht eine entscheidende Rolle spielt. Von Tappeiner prägte nach weiteren ausführlichen Untersuchungen 1904 den Begriff der „photodynamischen Wirkung“ [69]. Zur gleichen Zeit wurden die ersten Patienten mit Hautkarzinomen und Lupus Erkrankungen erfolgreich behandelt [70].

Heute wird die PDT in der Krebstherapie in verschiedenen medizinischen Fachrichtungen wie der Dermatologie [71]–[73], Urologie (Blase [23], Prostata [74]) und Gastroenterologie (Gallengang [75]) angewendet. Außerdem werden Ansätze zur Behandlung nicht maligner Erkrankungen wie Akne [76], [77] oder als antimikrobielle PDT zum Abtöten von Bakterien bei Infektionen [23], [78] erforscht.

GRUNDLAGEN

Bei der PDT wird die phototoxische Wirkung einer photosensitiven Substanz (dem Photosensibilisator, PS) und zellulärem Sauerstoff ausgenutzt, indem durch die Bestrahlung des photosensibilisierten Gewebes mit Licht über den PS als Katalysator stark reaktive Sauerstoffradikale ($^1\text{O}_2$ und ROS) erzeugt werden [79]. Das Licht wird von dem Photosensibilisator absorbiert, wodurch Elektronen des Photosensibilisators von ihrem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gebracht werden. Die Abregung der Elektronen kann durch die Abgabe von Licht (Fluoreszenz) oder strahlungslos durch ein Intersystem-Crossing (Übergang durch Änderung des Elektronenspins) von einem Singulett-Niveau (Valenzelektronen besitzen antiparallelen Spin) auf einem Triplett-Niveau (Valenzelektronen besitzen parallelen Spin) erfolgen [23]. Mit den Elektronen in dem Triplett-Zustand kann der Photosensibilisator mit einem Energieübertrag auf zellulärem Sauerstoff, dessen Elektronen im Grundzustand befinden sich ebenfalls in einem Triplett-Zustand, mit diesem in Reaktion treten [23]. Dadurch entsteht kurzlebiger reaktiver Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ und ROS, welche wiederum die Zellbestandteile des Gewebes durch Oxidation schädigen können [79]. Durch die Oxidationsprozesse der Sauerstoffformen werden Proteine und Lipidperoxidation inaktiviert, wodurch wichtige Funktionen und Strukturen der Zellen irreversibel geschädigt werden und die Zelle abstirbt (Nekrose) oder der Zelltod eingeleitet wird (Apoptose) [23]. Aktuelle Forschungsrichtungen weisen darauf hin, dass durch die PDT zudem eine gesteigerte Immunantwort hervorgerufen werden kann [79]–[81].

In der vorliegenden Arbeit wird die 5-ALA-PDT betrachtet, die bei der Behandlung von malignen Gehirntumoren Anwendung findet [79]. Bei dieser PDT wird dem Patienten 5-ALA (5-Aminolevo-linsäure) oral verabreicht, welches dann über den Blutkreislauf im Körper verteilt wird. Für die Anreicherung des 5-ALA und die erhöhte Bildung des Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PpIX) in Tumorzellen sind eine geschädigte Blut-Hirn Schranke, eine gesteigerte Aktivität von Transportmolekülen (GABA, pep^T1 und pep^T2), eine gesteigerte Aktivität der enzymatischen Reaktionen im Rahmen der Hämsynthese (ALA-D, PBG-D), eine Verringerung der Aktivität des Enzyms Ferrochelatase (Einbau von Fe^{2+} in Protoporphyrin IX wodurch Häm entsteht) sowie die reduzierte Verfügbarkeit von Fe^{2+} verantwortlich [79], [82]. Durch diese Mechanismen wird

eine erhöhte Konzentration von PpIX in Tumorzellen im Vergleich zum umliegenden gesunden Gewebe erreicht.

Als Lichtquellen bieten sich sowohl Laser, die durch ihre schmale Bandbreite des Lichts genau auf die Absorption eines Photosensibilisator abgestimmt werden können, sowie Weißlicht oder Tageslicht-PDT an [83], [84].

Eine Therapieform der PDT, mit der sich ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt, ist die interstitielle PDT (iPDT) zur Behandlung von nicht oberflächlichen, tiefliegenden Tumoren. Bei dieser Anwendungsform werden Lichtsonden direkt in dem Tumorumfang platziert, worauf dann die Bestrahlung erfolgt. Anwendung findet die iPDT bei der Behandlung von malignen Gliomen [85], [86] aber auch bei der Behandlung von Prostatakrebs in der Urologie [74].

INTERSTITIELLE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der iPDT von Gehirntumoren (Glioblastoma multiforme). Derzeit gibt es zwei Ansätze zur Behandlung von Glioblastomen mit Photodynamischer Therapie; Bestrahlung der Resektionshöhle nach der Resektion des tumorösen Gewebes, um verbliebene Tumorzellen in der Infiltrationszone am Resektionshöhlenrand zu therapieren [87]–[89] und die Bestrahlung des Tumors mit Lichtsonden, die über kleine Bohrungen in der Schädeldecke in das tiefliegende Tumorumfang eingeführt werden und so eine Bestrahlung ermöglichen [79], [85], [86]. Am distalen Ende der Lichtsonde befindet sich ein zylindrisch diffus streuender Bereich, mit welchem über eine Länge von 1 bis 5 cm das Licht radial in das umliegende Gewebe Licht abgegeben werden kann [85], [90], [91]. Ziel ist es, die Lichtdiffusoren so zu platzieren, dass sich der diffus abstrahlende Bereich im Tumorumfang befindet.

Das Glioblastom wird nach der WHO Klassifizierung für Gehirntumore als Grade 4 definiert und gilt dadurch als das bösartigste und zugleich häufigste Gliom [92], [93]. Die Häufigkeit für diese Form einer Krebserkrankung liegt bei 3-5 Fällen pro 100 000 Patienten [94]. Die mittlere Überlebensrate nach einer Glioblastom-Standardtherapie beträgt 15 Monate (5 Jahre Überleben <7%) [95]. Die Standardtherapie beinhaltet Resektion des Tumors mit nachfolgender Chemotherapie (Temozolomid) und Strahlentherapie (Stupp-Protokoll) [95]. Ein innovativer Ansatz zur Behandlung von Glioblastomen kann die Photodynamische Therapie, für tiefliegende Tumore die iPDT, werden.

Vor der Behandlung eines Patienten mittels iPDT erfolgt die Bestrahlungsplanung, bei welcher das stereotaktische Positionieren und Setzen der Lichtsonden am Computer vorbereitet wird. Dabei wird die Positionierung der Lichtsonden anhand der individuellen CT, MRT und PET Aufnahmen unter Berücksichtigung der Zugangsmöglichkeiten und dem Vorhandensein von Blutgefäßen durchgeführt und so die exakten Positionen und Koordinaten der Lichtsonden relativ zu einem Stereotaxie-Rahmen ermittelt [85], [96], [97].

Für die optimale Ausleuchtung eines Tumorumfangs ist auf die richtige Lichtdosis im Tumorgewebe zu achten. Die Lichtdosis wird durch die Anzahl der Lichtsonden, deren jeweilige Länge des diffus abstrahlenden Bereichs, deren Position zueinander im Tumorumfang und die Dauer der Bestrahlung für jeden individuellen Fall abgestimmt. Der Abstand der Fasern muss so gewählt werden, dass zum einen die angestrebte Lichtdosis erreicht werden kann und dass es zum anderen zu keiner Überhitzung des Gewebes (Hyperthermie) aufgrund eines zu geringen Abstandes der Lichtsonden kommen kann [85]. Ein Abstand von 9 – 12 mm bei einer Leistung von 200 mW/cm (Länge des diffus abstrahlenden Areals einer Lichtsonde) der Lichtsonden zueinander wurde in

einer vorangegangenen Studie als geeignet ermittelt [85]. Zusätzlich sollte ein Abstand von 3 mm zwischen Lichtsonde und Tumorrand sichergestellt werden [85], damit benachbartes gesundes Gewebe keiner gefährdenden Lichtdosis ausgesetzt wird. Diese Bestrahlungsstrategie wird derzeit manuell in eine Planungssoftware (@target 1.19, Brainlab, Deutschland) eingegeben und als Abschluss der Bestrahlungsplanung werden die benötigten Winkel und Koordinaten jeder einzelnen Lichtsonde für den stereotaktischen Rahmen für die Übertragung in die reale OP-Situation ausgegeben.

Bei der OP werden gemäß der Strahlungsplanung an die definierten Schädelpositionen nacheinander Löcher gebohrt, durch die dann eine Lichtsonde in vordefinierter Tiefe positioniert und platziert wird. Eine Positionskontrolle der Sonden erfolgt über eine Röntgenaufnahme mittels eines C-Bogens. Zwei Röntgenmarker, die den diffuse-abstrahlenden Bereich der Lichtsonden begrenzen, ermöglichen deren Lokalisation in der Röntgenaufnahme. Das proximale Ende der Lichtsonden wird an einen Laser angeschlossen, der die für den Photosensibilisator geeignete Wellenlänge emittiert. Dieser Vorgang wird für alle Lichtsonden wiederholt. Die Bestrahlung erfolgt, wenn alle Lichtsonden im Tumolvolumen platziert sind, durch Einschalten des Lasers für eine Bestrahlungsdauer von 60 Minuten [79], [85]. Nach Abschluss der Bestrahlung werden die Lichtsonden entfernt und die Wunden des Patienten verschlossen.

Ebenso wichtig wie die Bestrahlung selbst ist die Überwachung der Therapie und des Bestrahlungsverlaufs. Bei der iPDT an Tumoren im Gehirn ist eine gleichmäßige und zugleich ausreichende Bestrahlung des Tumolvolumens essenziell, damit die Lichtdosis überall im tumorösen Gewebe erreicht wird. Eine spektrale Überwachung der Lichtverteilung unter Nutzung von Intensitätsänderungen des Therapielichtes oder auch der bei der Bestrahlung entstehenden Fluoreszenz (ist keinerlei Fluoreszenz feststellbar, ist das Vorhandensein eines PS fraglich) des Photosensibilisators während der Bestrahlung, kann zusätzliche Information erhalten, die ggf. für prospektive Aussagen über den Therapieausgang genutzt werden könnten. Technisch kann bei der iPDT diese Überwachung der Lichtverteilung mit der eingebrachten Lichtsonden selbst erfolgen [96], [97]. Nachdem alle Lichtsonden, die für die Bestrahlung eines Tumors notwendig sind, gesetzt wurden, wird das proximale Ende einer Lichtsonde als Detektionssonde genutzt und mit einem Spektrometer als Detektionseinheit verbunden, während die anderen Lichtsonden mit dem Laser verbunden bleiben. Bei eingeschaltetem Laser dienen diese Lichtsonden als Emitter. Die Detektionssonde nimmt das im umliegenden Gewebe befindliche Licht auf und leitet es zum Spektrometer weiter, wo es anschließend spektral nachgewiesen wird. Der spektrale Nachweis ermöglicht die Unterscheidung von Laserwellenlänge und Fluoreszenzlicht (Laserwellenlänge: 635 nm, Fluoreszenzwellenlänge des Photosensibilisators: 700 nm). Durch das wechselnde Anschließen aller Lichtsonden am Spektrometer und Laser und das Auswerten der aufgenommenen Lichtsignale, wird ein Muster von jedem Lichtsondenpärchen erstellt und so eine Aussage über die Lichtverteilung im Tumorgewebe ermöglicht. Wenn vor, während und nach der Therapie Messungen durchgeführt werden, können außerdem Informationen über den Therapieverlauf gewonnen werden. Das durch das Therapielicht angeregte Fluoreszenzsignal des Photosensibilisators ermöglicht zusätzlich Informationen über die Verteilung des Photosensibilisators im Tumorgewebe und durch das Ausbleichen des Fluoreszenzsignals über den Therapieverlauf zu gewinnen [96], [97].

EINFLUSS DER HÄM-MOLEKÜLE AUF DIE ABSORPTION DES BIOLOGISCHEN GEWEBES WÄHREND EINER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE

Bei der Behandlung von Glioblastomen mittels interstitieller Photodynamischer Therapie, bei denen jeweils Transmissions- und Fluoreszenzmessungen zwischen den Lichtsonden vor, nach und während der Bestrahlung (spektrales on-line Monitoring) unternommen wurden, wurde in einigen Fällen eine Abnahme des Signals des transmittierten Laserlichts festgestellt [96], [98]. Durch die Abnahme des transmittierten Lasersignals ist anzunehmen, dass die geplante Lichtdosis bzw. Lichtdosisverteilung im Tumolvolumen verändert bzw. nicht erreicht wird, wodurch der gewünschte Therapie-Effekt bzw. das Therapie-Ziel gefährdet wird. Das Messen des Transmissionssignals des Laserlichts und des Fluoreszenzsignals des Photosensibilisators bietet die Möglichkeit, die Therapie zu monitoren bzw. zu überwachen. Ein tiefergehendes Verständnis dieser Signale und die Erforschung der Gründe für die Änderung der Signale bieten die Möglichkeit, Optimierungen für die Bestrahlungsparameter abzuleiten und dadurch die Behandlung mittels iPDT zu verbessern.

Als mögliche Ursache für eine Änderung der Signale könnte eine Erhöhung der Blutkonzentration im Tumolvolumen bzw. zwischen dem Sondenpäarchen sein, beispielsweise durch Blutungen während der Therapie im Bestrahlungsvolumen. Außerdem könnte bereits bei dem Positionieren der Lichtsonden Gefäße beschädigt werden, wodurch sich Blut im Bestrahlungsvolumen ansammeln kann. Des Weiteren haben Untersuchungen an therapiertem Gewebe gezeigt, dass nach einer Photodynamischen Therapie höhere Konzentrationen von MetHb als vor der Bestrahlung gemessen wurden [99]–[102]. MetHb weist eine höhere Absorption als HbO₂ (bis zu einem Faktor von 27 [2]) bei der Therapiewellenlänge von 635 nm auf (siehe Abbildung 1), wodurch die Entstehung von MetHb während einer PDT ebenfalls eine Änderung der Transmissions- und Fluoreszenzsignale hervorrufen könnte.

Für die experimentelle Untersuchung von Signaländerungen während einer interstitiellen Photodynamischen Therapie wurde die iPDT an Gewebe-Modellen nachgestellt. Typische und gut reproduzierbare artifizielle flüssige Gewebe-Modelle, die die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe sehr gut nachstellen, bestehen aus Wasser, Lipovenös (Ernährungs-Fettemulsion, eingesetzt als Streumedium) und Tusche oder Blut (Absorptionsmedium). Diese Komponenten werden in unterschiedlichen Verhältnissen so an gemischt, dass die optischen Eigenschaften (Absorption, Streuung) von unterschiedlichem biologischem Gewebe simuliert bzw. nachgestellt werden können [103]. Gehirngewebe hat bei der iPDT-Therapiewellenlänge von 635 nm eine Absorption von 0.02 mm⁻¹ und eine Streuung von 2 mm⁻¹ [103]. Die Zugabe photosensitiver Substanzen wie Protoporphyrin IX in ein Gewebe-Modell ermöglicht es eine klinische iPDT-Situation nachzustellen. In der vorliegenden Arbeit werden typische Werte für normales Gehirn, Glioblastom inkl. des angereicherten Photosensibilisator PPIX verwendet [85].

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Abhängigkeiten der Signale hinsichtlich des geometrischen Positionierens zweier Lichtsonden mit zylindrischer Abstrahlung bzw. Detektion zueinander (Abstand, Orientierung und relative Höhe zweier Lichtsonden zueinander auf das transmittierte Laserlicht in einem flüssigen Gewebe-Modell (Eigenschaften Glioblastom oder Gehirn)) untersucht. Als Absorptionsmedium wurde hier Tusche verwendet, da dadurch gleichbleibende optische Eigenschaften über einen längeren Zeitraum erreicht werden konnten. Eine der Sonden wurde an einen Laser angeschlossen und die zweite Sonde wurde mit einem Spektrometer verbunden und

diente als Detektor. Untersucht wurde das Verhalten des transmittierten Laserlichts sowie der Protoporphyrin IX Fluoreszenz in Abhängigkeit der relativen Positionen und Orientierungen der beiden Sonden zueinander.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss der Absorption der Gewebemodell-Komponenten auf das transmittierte Licht untersucht. Dafür wurden Gewebemodelle angefertigt, die die optischen Eigenschaften von Gehirngewebe nachbilden. Als Absorptionsmedium wurde nun sowohl Vollblut (intakte Erythrozyten) als auch lysiertes Blut verwendet. Unmittelbar bevor das Licht des Lasers eingeschaltet wurde, wurde noch der Photosensibilisator PpIX hinzugegeben, um die Einwirkzeit ohne Licht möglichst gering zu halten. Anschließend wurde das Laserlicht eingeschaltet und eine einstündige PDT simuliert. Währenddessen wurde alle zwei Minuten mit der Detektorsonde ein Spektrum des transmittierten Laserlichts sowie der Fluoreszenz des Photosensibilisators aufgezeichnet. Zusätzlich zu den beiden Lichtsonden wurde eine weitere Sonde in das Gewebemodell eingeführt, mit der die Absorption des Modells durch das Messen eines Absorptionsspektrums überwacht werden konnte. Mit diesem Versuchsaufbau lässt sich zeitgleich die Veränderung des transmittierten Laserlichts und des Fluoreszenzlichts des Photosensibilisators sowie die Änderungen der Absorptionseigenschaften des Blutes beobachten. Mit der Auswertung der Absorptionsspektren ist es möglich, zeitaufgelöst die Anteile von HbO₂, Hb und MetHb zu untersuchen und diese Ergebnisse mit den Aufzeichnungen des transmittierten Laserlichts und Fluoreszenzlichts zu vergleichen.

Diese Untersuchungen am Gewebemodell zeigten, dass infolge der Bestrahlung eine Umformung von HbO₂ in Hb und MetHb stattfinden kann. Es gibt Hinweise, dass diese Umwandlungsgeschwindigkeit vom Grad der Hämolyse abhängt. Bei den Messreihen in denen lysiertes Blut als Absorptionsmedium verwendet wurde, begann die Deoxygenierung und MetHb Bildung unmittelbar mit Beginn der Bestrahlung. Wenn das Hämoglobin in den Erythrozyten eingeschlossen war, begann die Deoxygenierung und zeitgleiche Bildung von MetHb erst nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 40 Minuten.

In der zweiten Publikation dieser Arbeit, wird der Signalverlust des transmittierten Therapielichts und des Fluoreszenzlichts des Photosensibilisators während einer experimentellen iPDT untersucht. Hierbei war insbesondere der Einfluss der geometrischen Lage und Position der Lichtsonden zueinander, sowie der Einfluss einer Änderung der optischen Eigenschaften (Blutung, Umwandlung von Hämoglobin) des Gewebes Gegenstand der Forschungsarbeiten und bilden die Grundlage für die Interpretation gemessener Signaländerungen während einer iPDT.



ORIGINALMANUSKRIPTE

Christian Heckl, Alexander Lang, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Thomas Duffield, Michael Vogeser, Michael Paal “*Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxy-hemoglobin, methemoglobin and methemalbumin in presence of bilirubin*“, J. Biophotonics, e202000461, doi: 10.1002/jbio.202000461 (2021), **JIF**: 3.207

Christian Heckl, Maximilian Aumiller, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy*“, Photochem Photobiol., 96(2):388-396. doi: 10.1111/php.13203 (2020), **JIF**: 3.421



SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION OF HEMOLYSIS IN PLASMA BY QUANTIFICATION OF FREE OXYHEMOGLOBIN, METHEMOGLOBIN AND METHEMALBUMIN IN PRESENCE OF BILIRUBIN

Christian Heckl, Alexander Lang, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Thomas Duffield, Michael Vogeser, Michael Paal “*Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin and methemalbumin in presence of bilirubin*“, J. Biophotonics, e202000461, doi: 10.1002/jbio.202000461 (2021) JIF: 3.207

Kurzfassung: Zur Beurteilung von intravaskulärer Hämolyse, die durch verschiedene hämatologische und nicht-hämatologische Erkrankungen verursacht werden kann, wird freies Hämoglobin in Blutplasma bei kranken Patienten häufig mittels UV/VIS-Spektrophotometrie quantifiziert. Die Standardmethoden zur Quantifizierung des freien Hämoglobins verwenden die gemessenen Werte diskreter Wellenlängen der Soret-, Alpha- und Beta-Bande des oxygenierten Hämoglobinmoleküls [57]–[60]. Diese Methoden berücksichtigen jedoch bei krankhafter Hyperbilirubinämie das freie Hämoglobin unzureichend [62]. Bei diesem Krankheitsbild reichert sich vermehrt Bilirubin im Blutplasma an. Die spektrale Signatur von Bilirubin überlagert sich dabei mit derjenigen von Hämoglobin zum Teil. Außerdem wird bei den Standardverfahren das Vorhandensein von Methämoglobin und Methämalbumin, die bei schwerer intravaskulärer Hämolyse oder hämorrhagischen Störungen auftreten, nur unzureichend berücksichtigt. Aufgrund der Defizite bei den Standard-Auswertemethoden wurde eine neue Auswertemethode entwickelt, die Methämoglobin und Methämalbumin in Anwesenheit von Bilirubin berücksichtigt und auf einen Zweite-Ableitung Algorithmus basiert.

Zur Evaluierung der Methode wurden verdünnte Plasmaproben, mit und ohne Bilirubin, mit unterschiedlichen Konzentrationen von oxygeniertem Hämoglobin und Methämoglobin versetzt. Die bei der Spektrometermessung erhaltenen Spektren wurden mit dem entwickelten Zweite-Ableitung Algorithmus und mit den drei Standard-Auswertemethoden nach Harboe, Noe und Fairbanks ausgewertet und miteinander verglichen. Der Auswertalgorithmus konnte Methämoglobin und Methämalbumin aufgrund geringer spektraler Absorptionsunterschiede nicht voneinander trennen. Aus diesem Grund wurde nur ein Reinspektrum von Methämoglobin für die Auswertung der gemessenen Spektren verwendet. Im Rahmen des Auswerteprozesses mit dem Zweite-Ableitung Algorithmus werden die Referenzspektren der einzelnen Hämoglobinformen von dem gemessenen Eingangsspektrum abgezogen. Das Abbruchkriterium dieser Subtraktionsmethode der zweiten Ableitungen ist das Minimum der Summe aller Fehlerquadrate aller Absorptionswerte der zweiten Ableitung des Differenzspektrums (Residuum) (Least Square Methode) [63]. Anhand der Menge der subtrahierten spektralen Signatur der Hämoglobin Moleküle lässt sich anschließend unter Zuhilfenahme einer zuvor ermittelten Kalibrationsgeraden die Konzentrationen der Hämoglobinformen bestimmen. Des Weiteren wurde die Position der maximalen Absorption des freien Hämoglobins im Bereich der Soret-Bande (405 – 415 nm) betrachtet. Bei einem Anteil von 100 % oxygeniertem Hämoglobin liegt die Position der maximalen Absorption bei 415 nm während die Position bei 100 % Methämoglobin bei 405 nm liegt. Je nach dem Anteil der beiden Hämoglobinformen verschiebt sich die Position der maximalen Absorption des Spektrums. Es wird untersucht, ob durch die Bestimmung der Position der maximalen Absorption des freien Hämoglobins im Blutplasma auf die Anteile der Hämoglobin Formen geschlossen werden kann. Mit der entwickelten Auswertemethode wurde nach den Richtlinien der Europäischen Arzneimittelagentur zur Validierung bioanalytischer Methoden (EMA Guideline) eine maximale Ungenauigkeit der Quantifizierung von $\leq 20\%$ angestrebt [67]. Die Ergebnisse der Quantifizierung mit dem Zweite-Ableitung Algorithmus zeigen, dass eine gleichzeitige Bestimmung von Oxyhämoglobin



und Methämoglobin in Proben mit einer Bilirubinkonzentration von $\leq 4,9$ mg/L ($83,3$ $\mu\text{mol/L}$) bei einer Genauigkeit von ≤ 20 % erreicht werden kann, während die Auswertungen der Spektren nach den Standardmethoden dieser Anforderung nicht entsprachen. Die Betrachtung der Position der maximalen Absorption erlaubt die Bestimmung der Anteile des oxygenierten Hämoglobins sowie von Methämoglobin mit einer Unsicherheit ≤ 21 %.

Unter Beibehaltung der Probenvorbereitung durch definierte, einfache Verdünnung ermöglicht die Auswertung der Absorptionsspektren mit dem vorgestellten Zweite-Ableitung Algorithmus eine automatisierte und detaillierte Bewertung des Gehalts an freien Häm-Molekülen, bestehend aus oxygeniertem Hämoglobin, Methämoglobin und Methämalbumin in Blutplasma, die mit den Standard-Auswertemethoden nicht möglich ist.

Der Anteil von Christian Heckl an dieser Arbeit war die Weiterentwicklung und Optimierung des mathematischen Auswertalgorithmus zur Bestimmung von freiem oxygeniertem Hämoglobin in humanem Plasma, die Ergänzung des Auswertalgorithmus um die Bestimmung von Methämoglobin und Methämalbumin, das Auswerten aller Messungen und der Vergleich der Ergebnisse mit den spektroskopischen Standardmethoden, die Anpassung und Erweiterung des Microsoft Excel Macros, sowie das Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren.

FULL ARTICLE

Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin

Christian Heckl^{1,2*}  | Alexander Lang^{1,2} | Adrian Rühm^{1,2} | Ronald Sroka^{1,2} | Thomas Duffield^{3,4} | Michael Vogeser⁴ | Michael Paal⁴ 

¹Laser-Forschungslabor, LIFE-Center, University Hospital, LMU Munich, Germany

²Department of Urology, University Hospital, LMU Munich, Germany

³Institute of Ageing and Chronic Disease, University of Liverpool, Liverpool, UK

⁴Institute of Laboratory Medicine, University Hospital, LMU Munich, Germany

*Correspondence

Christian Heckl, Laser-Forschungslabor, LIFE-Center, University Hospital, LMU Munich, Fraunhoferstraße 20, 82152 Planegg, Germany.

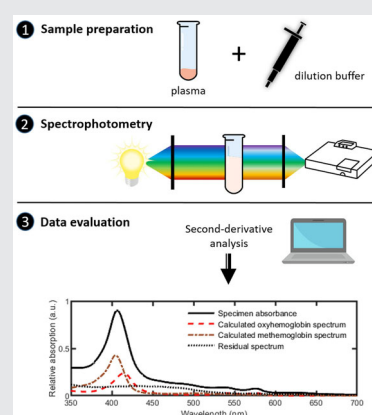
Email: christian.heckl@med.uni-muenchen.de

Funding information

DFG Graduiertenkolleg GRK 2274; Hans-Fischer-Gesellschaft e.v.

Abstract

Severe intravascular hemolysis leads to the simultaneous presence of free heme pigments (oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin) and bilirubin in human plasma. Standard spectrophotometric methods used to assess in vivo hemolysis inadequately address this complex analytical situation. Thus, we propose a novel quantification algorithm to ensure the highest analytical specificity. A corresponding second-derivative fitting algorithm was validated according to the guideline of bioanalytical method validation from the European Medicines Agency using plasma specimens (n = 1759) spiked with different concentrations of oxyhemoglobin and methemoglobin. The results were compared to standard spectrophotometric quantification methods described by Harboe, Noe, and Fairbanks. Based on the second-derivative method, simultaneous quantification of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin in samples with total bilirubin concentrations ≤ 4.9 mg/dL (83.8 $\mu\text{mol/L}$) provided robust results (inaccuracy $\leq 20\%$, imprecision $\leq 16\%$). Analyzing UV/VIS spectra of plasma from patients with confirmed severe intravascular hemolysis evidenced an underestimation of up to 33% for the combined free heme pigment content. The employed second-derivative algorithm allows for automated and highly specific quantification of the free heme pigment content in diluted human plasma, which cannot be realized with standard spectrophotometric evaluation methods. An Excel-based tool readily applicable to clinical datasets accompanies this manuscript.



Abbreviations: EMA, European Medicines Agency; LLOQ, lower limit of quantification.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Journal of Biophotonics* published by Wiley-VCH GmbH.

KEYWORDS

derivative spectrophotometry, free hemoglobin, hemolysis, methemalbumin, methemoglobin, oxyhemoglobin

1 | INTRODUCTION

Various hematological and non-hematological diseases may cause hemolysis *in vivo*. Intravascular hemolysis is defined by the premature destruction of red blood cells and the release of their contents into the bloodstream, with adverse clinical consequences. Numerous medical conditions can cause intravascular hemolysis, including immune-mediated hemolytic anemia, thrombotic microangiopathy, osmotic and mechanical hemolysis. Free heme pigments and bilirubin that are present in the plasma upon hemolysis can be used for diagnostic purposes. In circulation, free hemoglobin is immediately captured by the scavenger protein haptoglobin and delivered to the reticuloendothelial system for degradation [1]. However, in the case of pronounced hemolysis, the available haptoglobin is rapidly depleted and, consequently, the “naked” free hemoglobin in circulation is exposed to oxidative

conditions and transformed into methemoglobin [2]. This process reduces the binding affinity of heme to globin, which is why free heme is increasingly bound by albumin, resulting in the formation of methemalbumin [3]. The entire process results in a brownish discoloration of the plasma (see Figure 1).

In clinical practice, one primarily attempts to quantify free hemoglobin in human plasma to diagnose and assess the course of acute and chronic hemolysis, especially when serum haptoglobin is depleted or an acute phase response (with a reactive increase of haptoglobin) may obscure intravascular hemolysis. In recent reports, it was highlighted that free heme pigments (including oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin) act as a disease-driving compound, with the sequela of adverse pathophysiological reactions, including inflammation, vascular disease, renal impairment, and lung injury [4–6]. Given that free heme pigments are an independent

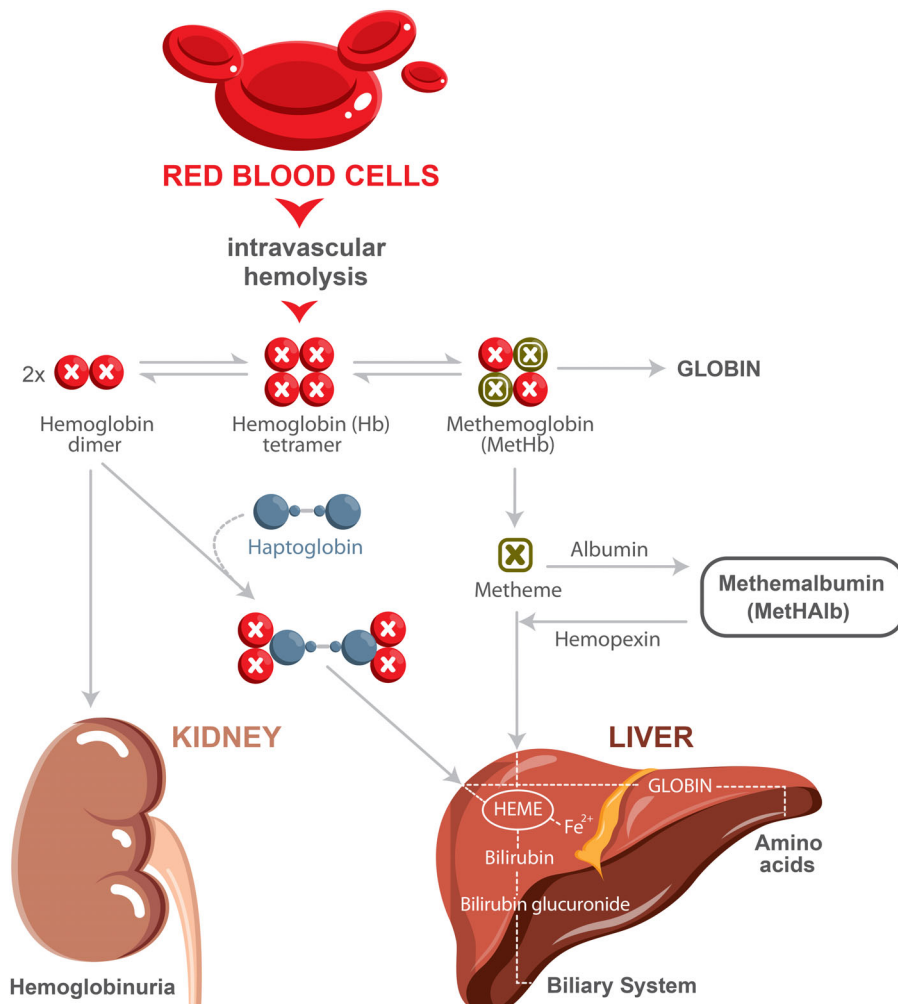


FIGURE 1 Catabolism of intravascular hemoglobin. Free dimeric hemoglobin is bound to haptoglobin and the complex carried to the liver for degradation. For hemoglobin that is not scavenged by haptoglobin during severe hemolysis or hemorrhagia, the iron becomes oxidized, forming methemoglobin. Dissociating metheme binds increasingly to albumin when hemopexin is depleted or saturated, forming methemalbumin

predictor of outcome, free hemoglobin is increasingly quantified in critical illness, for example, in patients with severe sepsis and extracorporeal support [7, 8]. Besides, free hemoglobin serves as a routine quality control marker of packed erythrocytes for transfusion to assess storage-related hemolysis [9].

As confirmed by proficiency testing (also termed external quality assessment) results in 2020, most clinical laboratories use spectrophotometric evaluation procedures for free hemoglobin quantification [10]. These methods are intended to quantify oxyhemoglobin using discrete wavelengths in the Soret, alpha, and beta bands of heme. Various spectrophotometric multi-wavelength methods are described in the literature, including those of Harboe [11], Noe [12], Fairbanks [13], and Kahn [14]. Blood plasma analysis can also be performed by Raman spectroscopy, using an excitation wavelength in the near-infrared region to record the Raman spectra [15, 16]. All these methods are susceptible to interferences introduced by hyperbilirubinemia and hypertriglyceridemia of varying degrees; moreover, they all have in common that they do not adequately address the presence of methemoglobin and methemalbumin that contribute to the total free heme pigment content.

Previously, we have described a mathematical approach to process primary UV/VIS-spectrometric data by second-derivative fitting for oxyhemoglobin quantification [17]. While interference by bilirubin – which must systematically be expected in patients with *in vivo* hemolysis – was overcome, the presence of methemoglobin or methemalbumin was not reported in the analysis. Knowledge about the presence of methemoglobin or methemalbumin in the specimens provides an added clinical value, given that severe intravascular hemolysis must be assumed in this case. Consequently, a further improvement of this data processing approach becomes necessary to provide accurate analysis for the latter compounds too.

The main objective of this continued optimization work was, therefore, to develop and validate a robust second-derivative spectrophotometry evaluation method for the simultaneous quantification of free total heme pigment content in different redox states in human plasma, comprising oxyhemoglobin, methemoglobin, methemalbumin, and bilirubin. As with standard spectrophotometric methods, the corresponding assay should be as simple as possible and provide a test result within minutes.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals and reagents

Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), hemin chloride, dimethyl sulfoxide (DMSO), and Pur-A-Lyzer™ maxi

dialysis tubes (MCWO 12–14 kDa) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MI, USA). Buffered scattering-free solution for spectrophotometric analysis (Bioanalytic, Umkirch, Germany) and disposable 10 mm transmission polystyrene semi-micro cuvettes were used (Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

2.2 | Sample preparation

In the following paragraphs, the preparation of the measured samples and the measurement device used is described in detail. Besides, an explanation of the data analysis including the developed second-derivative fitting method, and the method validation protocol are described.

For method validation, leftover anonymized icteric citrate plasmas from routine patient care were used. Non-icteric citrate plasma pools with minimal free hemoglobin contents were prepared from carefully freshly drawn citrate plasmas from three healthy volunteers who signed a declaration of consent. Until spiking, all specimens were stored at -80°C protected from light to avoid degradation.

For the preparation of stock solutions, EDTA-whole blood was sampled from a healthy donor who signed a consent form. Free hemoglobin was isolated from whole blood by an osmotic shock [18]. Methemoglobin was formed from fresh hemolysate by incubation with a four-fold molar excess of potassium ferricyanide at 22°C for 15 minutes, followed by removal of the oxidant by equilibrium dialysis. Total hemoglobin was quantified with the XN-1000™ hematology analyzer (Sysmex, Kōbe, Japan). Evaluation with molar extinction coefficients [19, 20] revealed $\geq 95\%$ oxyhemoglobin content for the fresh hemolysate and $\geq 96\%$ for the methemoglobin dialysate, which is why the fresh hemolysate is referred to as oxyhemoglobin and the dialysate as methemoglobin.

Serial dilution with distilled water yielded 10x concentrated oxyhemoglobin and methemoglobin stock solutions (up to 20 000 mg/L). These stock solutions were prepared independently for calibrators and quality controls. Hemin, representing a spectral surrogate for methemalbumin [21, 22], was diluted in nitrogen-purged DMSO-water (80:20, %/%), and immediately subjected to spectrophotometric analysis.

To prepare spiked calibrator sets for oxyhemoglobin and methemoglobin and corresponding quality control sets, one volume of the hemoglobin stock solutions was mixed with nine volumes of citrate plasma thus obtaining a total hemoglobin concentration ranging from 25, 50, 100, 250, 500, 1500, and 2000 mg/L. Total bilirubin was quantified using the colorimetric diazo-method (Roche Cobas 8000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) from a control sample prepared with distilled water.

2.3 | Spectrophotometry

Spiked citrate plasmas (including control samples) were diluted 1:11 with buffered, scattering-free solution and UV/VIS absorption spectra of 350 to 700 nm were recorded with the U-1900 spectral photometer (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) using semi-micro cuvettes and the following photometer settings: step size 0.5 nm, scan speed 200 nm/min, spectral bandpass 4 nm. The spectrometer used, has a wavelength accuracy of ± 0.5 nm and photometric accuracy of ± 0.004 of the absorbance value. Spectral data sets were evaluated with the second-derivative fitting method and its refinements as described in this article and with the multi-wavelength evaluation methods of Harboe [11], Noe [12], and Fairbanks (evaluation A2) [13] for diluted samples.

2.4 | Data analysis

2.4.1 | Second-derivative fitting algorithm for quantification of total free heme pigments

The total free heme pigment content was determined with a second-derivative fitting algorithm, as previously described for oxyhemoglobin quantification [17]. For this purpose, reference absorption spectra were recorded for pure oxyhemoglobin and pure methemoglobin in distilled water and normalized to the maximum absorbance at the Soret band at 415 and 405 nm, respectively (see Figure 2). Reference absorption spectra were also recorded for pure hemin in nitrogen-purged DMSO-water (80:20, %/%), where hemin served as a spectral surrogate for

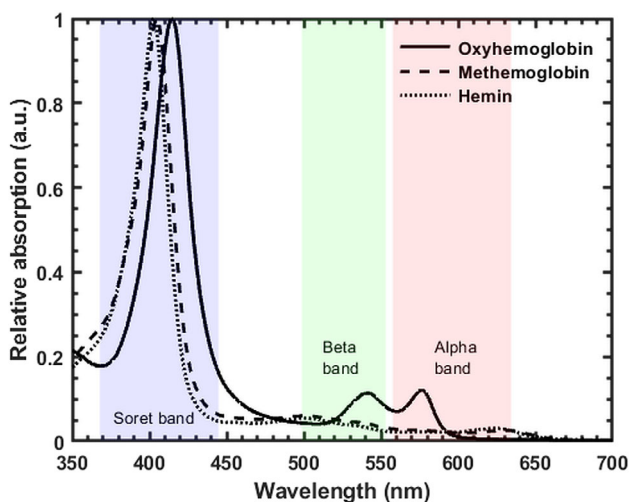


FIGURE 2 Reference absorption spectra, used for the second-derivative fitting algorithm reported in this study. Normalized spectra are shown for equimolar solutions of oxyhemoglobin (solid line), methemoglobin (dashed line), and hemin (dotted line) that serves as a surrogate for methemalbumin

methemalbumin [21, 22]. However, due to equivalent spectral signatures, equimolar solutions of methemoglobin and hemin were not distinguishable by the fitting algorithm. Therefore, all spiking experiments in plasma were done exclusively with oxyhemoglobin and methemoglobin.

To perform the fitting algorithm, a suitable wavelength range must be defined which includes the relevant discriminating features in the absorption spectra of the heme pigments to be distinguished. It was set to 380 to 650 nm to cover the heme specific spectral information in the Soret, alpha, and beta bands. The quantitative amounts of the free heme pigment oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin were determined by minimizing the mean square of the second derivative of the residual spectrum obtained after simultaneous subtraction of the reference spectra $A_{\text{oxyHb}}(\lambda)$ and $A_{\text{metHb}}(\lambda)$ of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin from the input specimen spectrum with iteratively adjusted parameters a_{oxyHb} and a_{metHb} (see Equation (1) and Figure 3).

$$\int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \left| \frac{d^2}{d\lambda^2} (A_{\text{raw}}(\lambda) - a_{\text{oxyHb}} A_{\text{oxyHb}}(\lambda) - a_{\text{metHb}} A_{\text{metHb}}(\lambda)) \right|^2 d\lambda \rightarrow \text{minimum} \quad (1)$$

To calculate the second derivative spectrum, a Savitzky-Golay filter [23] with a window size of 7 nm was applied to the measured spectrum, and the second derivative was then calculated from a third-order polynomial approximation of the resulting filtered spectrum.

Finally, the absolute concentrations of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin were derived from the spectral amplitudes a_{oxyHb} and a_{metHb} by comparison with the reference absorption spectra previously obtained on pure solutions of each heme species with known molarity. The absolute concentration of bilirubin was subsequently calculated from the final residual spectrum using the spectral value at 460 nm (± 1.5 nm) after suitable background correction (by subtracting the absorption value at 700 nm multiplied by a factor of 4.03). The resulting value is then divided by a conversion factor of 6.61×10^{-2} to obtain the absolute bilirubin concentration in mg/dL. Both factors were derived from a bilirubin calibration method previously established with the same equipment [17].

2.4.2 | Spectral analysis for refined determination of free heme pigment portions

The second-derivative fitting algorithm described in the preceding section provided reliable results for the

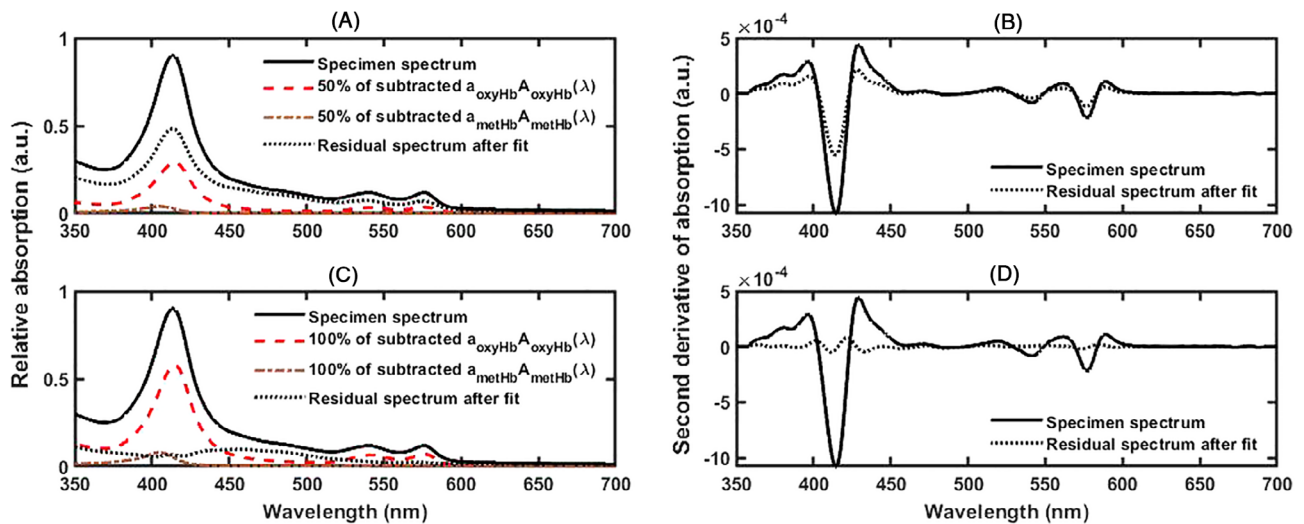


FIGURE 3 The operating mechanism of the second-derivative fitting algorithm. Reference spectral signatures with iteratively adjusted weights are subtracted from an input spectrum (A, C) such that the mean of the second derivative of the corresponding residual spectrum is minimized (B, D). Raw input spectrum (solid line), extracted oxyhemoglobin fit fraction (red dashed line), extracted methemoglobin/methemalbumin fit fraction (brown dot-dashed line), and final residual spectrum (dotted line)

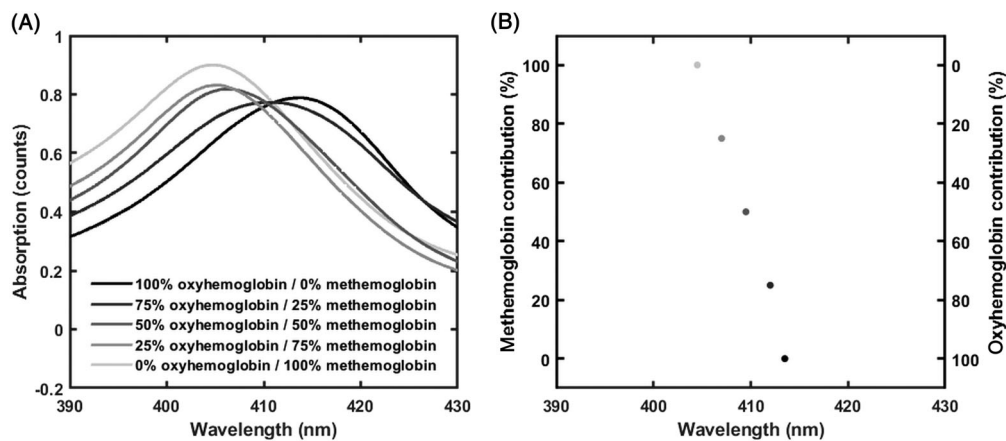


FIGURE 4 Wavelength shift of the absorption maximum in the Soret band for different heme pigment mixtures. A, The position of the maximum shifts from 415 nm for pure oxyhemoglobin (thick black line) to 405 nm with increasing methemoglobin contribution (fading gray color). B, Plot of the two hemoglobin contributions (weight-%) against the wavelength position of the absorption maximum

combined free heme pigment concentration (oxyhemoglobin plus methemoglobin/methemalbumin) in plasma, but only approximate results for the two individual constituents. To determine the contributions separately with satisfactory precision, the ratio of the two concentrations must be determined in addition to the total free heme pigment concentration. For this purpose, the precise position of the absorption maximum in the Soret band region was analyzed. The rationale for this approach is that, depending on the proportion of the two spectral constituents, the position of the effective absorption maximum in the Soret band region varies from 415 nm (for 100% oxyhemoglobin) to 405 nm (for 100% methemoglobin/methemalbumin) (see Figure 4A).

In principle, the position of the absorption maximum can be determined directly from the recorded raw spectra, but the short-wavelength background absorption and the bilirubin absorption (peaking at 460 nm) must be sufficiently weak compared to the absorption of the heme pigments in the Soret band region to avoid false results. Therefore, this analysis was additionally performed on the sum of the two spectral contributions of the heme pigments obtained from the second-derivative fitting as described in section 2.4.1.

The dependence of the methemoglobin/methemalbumin fraction f_{metHb} on the wavelength position λ of the absorption maximum (see Figure 4B) can be approximately described by the custom

phenomenological relationship defined by Equation (2). The model parameters a and b were adjusted for optimal agreement with experimental data obtained on controlled mixtures of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin.

$$f_{\text{metHb}}(\lambda) = c \cdot \ln\left(\frac{1}{a \cdot (\lambda - b)} - 1\right) + d \quad (2)$$

with:

$$c = \left(\ln\left(\frac{1}{a \cdot (\lambda_{\min} - b)} - 1\right) \right)^{-1}, \quad (3)$$

$$d = \left(1 - \frac{\ln\left(\frac{1}{a \cdot (\lambda_{\min} - b)}\right)}{\ln\left(\frac{1}{a \cdot (\lambda_{\max} - b)}\right)} \right)^{-1}. \quad (4)$$

The parameters c in Equation (3) and d in Equation (4) were chosen such that the fit-function $f_{\text{metHb}}(\lambda)$ yields 1, i. e. a methemoglobin fraction of 100%, when the maximum of the absorbance spectrum is located at 405 nm (represented by λ_{\min}) and 0, that is, an oxyhemoglobin fraction of 100%, when the maximum is located at 415 nm (represented by λ_{\max}). Positions of intensity maxima at wavelengths shorter than 405 nm and longer than 415 nm determined from the absorption spectra are assigned to 100% methemoglobin and 100% oxyhemoglobin, respectively.

2.5 | Method validation

The quantification method described in this article was validated following the current *guideline of bioanalytical method validation* from the European Medicines Agency (EMA) [24] concerning the calibration curve, limits of quantification, inaccuracy, and imprecision. The EMA guideline requires that back-calculated concentrations of standards and quality controls should be within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the lower limit of quantification (LLOQ) where it should be within $\pm 20\%$ [24]. Before spiking of patient control plasma samples with oxyhemoglobin and methemoglobin, the pre-existing total free heme pigment concentration in the samples was determined as background from 1:11 diluted specimens using the second-derivative method described in section 2.4.1. This pre-existing free heme pigment concentration was subtracted from all corresponding results, those derived with the second-derivative method described in this article and those obtained with the standard methods of Harboe [11], Noe [12], and Fairbanks [13].

Independent sample sets were used to validate the fitting algorithm as follows: The first two sample sets were used to calibrate and test the fitting algorithm on a carefully drawn blood plasma set with minimized endogenous heme pigment background and no spectral interference from bilirubin. Subsequently, the fitting algorithm was expanded on a training set with icteric specimens and finally cross-validated with an independent quality control test set. Thus, a total of 1759 samples were measured comprising the calibration data sets for oxyhemoglobin and methemoglobin and the independent quality control data sets, as described in detail below.

2.5.1 | Oxyhemoglobin and methemoglobin calibration

Calibration sets of pure oxyhemoglobin and methemoglobin for the determination of the conversion factors were prepared by spiking a non-icteric citrate plasma pool on four separate days with six replicates each, giving final concentrations of 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, and 2000 mg/L (384 samples in total).

2.5.2 | Non-icteric plasma pool – quality controls

A separate non-icteric plasma pool was spiked simultaneously with oxyhemoglobin and methemoglobin at seven mixing ratios (0:100, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 100:0; %/%) to obtain six final concentrations of total hemoglobin (25, 50, 100, 250, 500, 1000 mg/L) on three separate days with five replicates each (630 samples in total). The sample-set without the spectral interference of bilirubin was used to establish the second-derivative fitting algorithm for determining absolute pigment concentrations of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin.

2.5.3 | Native patient samples – quality control training set

Native patient citrate plasmas with ascending total bilirubin concentrations of 0.2 to 42.2 mg/dL (3.4–721.8 $\mu\text{mol/L}$) were individually spiked with oxyhemoglobin and methemoglobin at seven mixing ratios (0:100, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 100:0; %/%). Samples with six different concentration levels of total hemoglobin (25, 50, 100, 250, 500, 1000 mg/L) were prepared in each case. This preparation and subsequent characterization were performed on three separate days with five replicates each (630 samples in total). Samples were grouped into

the following categories: non-icteric (total bilirubin <1.0 mg/dL, $n = 230$), mildly icteric (total bilirubin ≥ 1.0 to 4.9 mg/dL, $n = 205$), and strongly icteric (total bilirubin ≥ 5.0 mg/dL, $n = 195$). The sample-set was used as a training set to optimize the second-derivative fit and the analysis of the free heme pigment portion described in sections 2.4.1 and 2.4.2.

2.5.4 | Native patient samples – quality control test set

Native patient citrate plasmas with ascending total bilirubin concentrations of 0.3 to 22.7 mg/dL (5.1–388.3 $\mu\text{mol/L}$) were individually spiked with oxyhemoglobin and methemoglobin at seven mixing ratios (0:100, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 100:0; %/%). Samples with five different concentrations of total hemoglobin (25, 50, 100, 250, 500 mg/L) (non-icteric $n = 15$, mildly icteric $n = 71$, strongly icteric $n = 29$) were prepared in each case. This sample set was used for testing and therefore used blinded concerning total bilirubin and the spiking concentrations of oxyhemoglobin and methemoglobin.

2.6 | Assessment of hemolysis in patient care

UV/VIS spectra from native patient care plasma samples ($n = 16$) with elevated free hemoglobin concentrations ≥ 50 mg/L as determined with the standard multi-wavelength evaluation method of Harboe [11] were screened for distinct spectral blue shifts of the heme Soret band position and crosschecked with clinical history and laboratory results demonstrating intravascular hemolysis. These spectra were evaluated using the second-derivative method described in section 2.4.1, a previously described oxyhemoglobin second-derivative fitting method [17], and also with the spectrophotometric method of Noe [12] and Fairbanks [13]. The results of the different methods were evaluated by comparing the average inaccuracy of all patient samples from all methods.

2.7 | Statistical evaluation

All obtained results are presented as inaccuracy (Equation (5)) and imprecision (Equation (6)) according to the specification of the EMA guidelines [24].

$$\text{Inaccuracy} = \frac{\text{mean result} - \text{reference}}{\text{reference}} \quad (5)$$

$$\text{Imprecision} = \frac{\text{standard deviation}}{\text{reference}} \quad (6)$$

Data analysis of all recorded UV/VIS-spectra and statistical analysis were done with Matlab (R2018b, MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). The results of the three quality control data sets are presented in boxplots. The box shows the middle 50% of the data points and the line inside the box represents the median values. Data points that lie outside the box up to a maximum of 1.5 times the box length (2.7σ) are shown as whiskers, whereas data points with a larger distance are shown as outliers by crosses.

3 | RESULTS

3.1 | Method validation

3.1.1 | Oxyhemoglobin and methemoglobin calibration

Using the methods described in section 2.2, the calibration range of 25 to 2000 mg/L for oxyhemoglobin and 25 to 1000 mg/L for methemoglobin gave an $R^2 \geq 0.99$ for linear regression fitting for both analytes. Intra- and inter-day imprecision and inaccuracy were $\leq 1.8\%$. Conversion factors of 7.03×10^{-4} per mg/L at 415 nm and 8.80×10^{-4} per mg/L at 405 nm were obtained for oxyhemoglobin and methemoglobin, respectively.

3.1.2 | Non-icteric plasma pool – quality controls

Combined oxyhemoglobin and methemoglobin quality controls prepared by spiking a non-icteric plasma pool (see section 2.5.2) resulted in within- and between-run inaccuracy and imprecision values $\leq 14\%$ for the quantification of total hemoglobin (sum of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin) using the second-derivative method described in section 2.4.1 (see Table 1 and, for comparison with Harboe, Figure 5). In contrast, the evaluation algorithms of Harboe, Noe, and Fairbanks showed a deviation of up to 35% for the total hemoglobin content, depending on the methemoglobin proportion.

3.1.3 | Native patient samples – quality control training set

When investigating the samples described in section 2.5.3, for total bilirubin concentrations of up to 4.9 mg/dL

Total hemoglobin (mg/L)	Inaccuracy (%)/Imprecision (%)			
	Fitting algorithm	Harboe	Noe	Fairbanks
25	14/3.0	-35/2.9	-22/3.7	-32/6.9
50	5.4/2.4	-32/1.9	-26/2.3	-28/3.2
100	3.1/1.9	-30/1.6	-27/1.8	-22/3.0
250	0.9/2.7	-29/2.1	-29/2.2	-19/2.3
500	0.8/2.1	-28/1.2	-29/1.1	-18/1.4
1000	-6.4/2.5	-30/1.2	-32/1.1	-21/1.5

Note: Mean values for within-run inaccuracy and imprecision of the total hemoglobin concentration (oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin) measured on three different days on quality control samples with different mixing ratios of oxyhemoglobin and methemoglobin (see section 2.5.2) are displayed for the refined second-derivative fitting method described in this article and the evaluation procedures of Harboe, Noe, and Fairbanks.

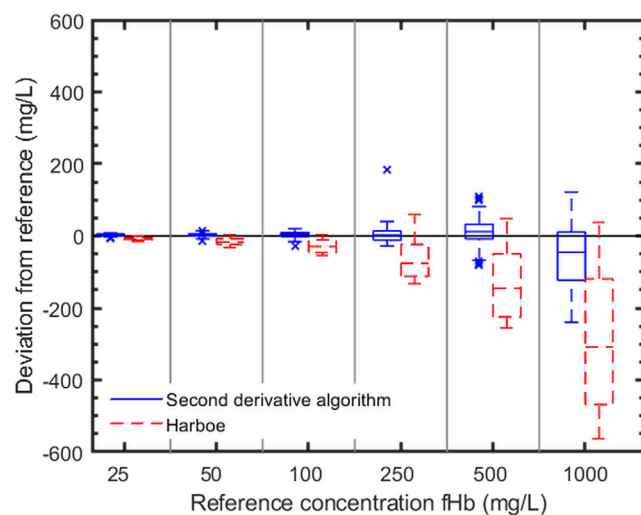


FIGURE 5 Results of the total free heme concentrations in Table 1 from the known values as boxplots, according to the second-derivative fitting algorithm (blue) and the evaluation method of Harboe (red). The control plasma set had no spectral interferences of bilirubin

(83.8 $\mu\text{mol/L}$), the second-derivative method described in section 2.4.1 yielded inaccuracy and imprecision values $\leq 20\%$ for the quantification of total hemoglobin, whereas the standard methods of Harboe, Noe, and Fairbanks over- and underestimated the total hemoglobin content by up to 138% (see Table 2 and Figure 6 for the comparison with Harboe). For samples with bilirubin concentrations of > 5 mg/dL inaccuracy and imprecision values for the second-derivative fit were found to exceed the specifications of $\leq 20\%$ for the LLOQ and $\leq 15\%$ as proposed by the EMA guideline [24].

It was also examined whether the position of the maximum absorption in the Soret band region is consistent with the determined proportion of oxyhemoglobin and

TABLE 1 Non-icteric plasma pool – quality controls, comparative analysis

methemoglobin/methemalbumin, or whether that proportion could be refined, that is, determined more precisely, by a detailed analysis of this spectral position. For this purpose, the two constituent proportions were plotted against the wavelength position of the absorption maximum in the Soret band (see Figure 7). The maximum position was determined in two ways: once directly from the UV/VIS raw spectra (blue dataset) and once from the weighted sum of the reference spectra of the two constituents as derived from the second-derivative method described in section 2.4.1 (red dataset). The model parameters a and b in Equation (2) were iteratively determined to obtain the best fit of each dataset as follows: For the analysis based on the reference spectra of the two constituents derived from the second-derivative fitting (red dataset): $a_1 = 1.81 \times 10^{-7} \text{ nm}^{-1}$, $b_1 = 404.23 \text{ nm}$ ($R^2 = 0.90$). For the direct analysis of the UV/VIS raw spectra (blue dataset): $a_2 = 4.83 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ and $b_2 = 404.26 \text{ nm}$ ($R^2 = 0.81$). Based on the resulting two calibration curves, the contributions of oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin were determined with inaccuracy and imprecision of $\leq 16\%$ and $\leq 30\%$, respectively.

3.1.4 | Native patient samples – quality control test set

In agreement with the results of quantifying total hemoglobin from the training specimen set described in section 2.5.3, inaccuracy and imprecision values $\leq 16\%$ were obtained with the second-derivative method for all samples described in section 2.5.4 with total bilirubin concentrations ≤ 4.9 mg/dL (83.8 $\mu\text{mol/L}$), while total hemoglobin was over-/underestimated by up to $\leq 171\%$ when using the formulas of Harboe, Noe, and Fairbanks (see Table 3 and, for comparison with Harboe, Figure 8A).

TABLE 2 Native patient samples – quality control training set, comparative analysis

Total bilirubin (mg/dL; $\mu\text{mol/L}$)	Total hemoglobin (mg/L)	Inaccuracy (%) / Imprecision (%)			
		Fitting algorithm	Harboe	Noe	Fairbanks
Non-icteric <1 ; <17.1 (n = 230)	25	-8.7/9.4	-40/20	-26/24	-3.3/21
	50	-5.5/10	-35/19	-30/21	-11/16
	100	-3.0/11	-32/20	-30/21	-15/16
	250	4.4/6.9	-26/19	-26/21	-12/12
	500	4.8/5.3	-26/18	-27/20	-14/11
	1000	1.7/7.1	-27/17	-28/18	-15/9.7
Mildly icteric ≥ 1.0 – 4.9 ; ≥ 17.1 – 83.3 (n = 205)	25	-20/14	52/66	138/112	-37/41
	50	-9.9/13	-4.4/46	26/68	-26/34
	100	-8.7/9.9	-12/23	7.4/31	-19/14
	250	-0.2/11	-8.9/44	1.5/61	-10/17
	500	-5.5/13	-10/29	0.7/40	-20/17
	1000	-4.0/9.8	-26/20	-26/22	-17/12
Strongly icteric ≥ 5.0 ; ≥ 85 (n = 195)	25	-306/327	266/448	654/554	-235/444
	50	-21/72	228/158	409/225	-36/103
	100	-14/64	121/137	218/176	-3.2/70
	250	-3.4/22	77/47	130/58	-18/25
	500	-28/14	-22/28	-4.1/38	-37/17
	1000	-23/13	-25/20	-17/23	-27/14

Note: Mean values for within-run inaccuracy and imprecision of the total hemoglobin concentration (oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin) of blended oxyhemoglobin and methemoglobin quality controls are displayed for the refined second-derivative fitting method described in this article and the evaluation procedures of Harboe, Noe, and Fairbanks for three independent measurement series on samples grouped into three bilirubin concentration ranges.

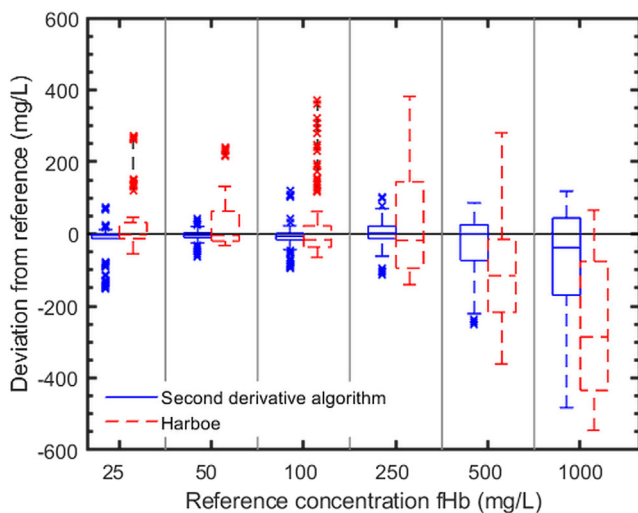


FIGURE 6 Calculated deviations of the total free heme concentrations in Table 2 from the known values as boxplots, according to the second-derivative fitting algorithm (blue) and the evaluation method of Harboe (red). Evaluation of the quality control training set with varying concentrations of bilirubin

By evaluating the maximum position in the Soret band region, based on the weighted reference spectra of the two constituents derived from the second-derivative

method and the UV/VIS raw spectra, respectively, the oxyhemoglobin and methemoglobin content of the samples could be derived separately with inaccuracy and imprecision $\leq 21\%$ and $\leq 47\%$.

The evaluation of total bilirubin based on the second-derivative method as described in section 2.4.1, in comparison with reference measurements using a clinical chemistry analyzer, yielded inaccuracy and imprecision values of $\leq 13\%$ and $\leq 17\%$ for all samples tested with bilirubin concentrations ≥ 1.5 mg/dL ($25.7 \mu\text{mol/L}$), respectively, (see Figure 8B).

3.2 | Assessment of hemolysis in patient care

Applying the optimized second-derivative method in this project to raw UV/VIS spectrophotometric data obtained from routine native patient care samples with confirmed severe intravascular hemolysis (n = 16) revealed spectral signatures of methemoglobin/methemalbumin (see Figure 9 showing the evaluation of a non-icteric (A) and an icteric (B) sample). The residual spectrum resulting during the second-derivative fitting, however, showed no

prominent signatures at the oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin Soret band maxima, confirming adequate subtraction of the heme pigment

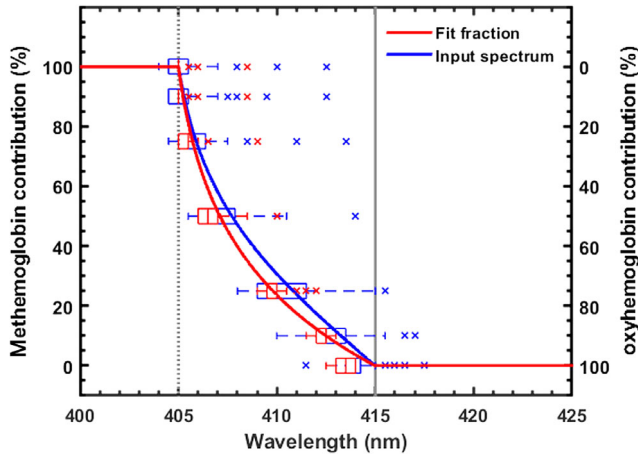


FIGURE 7 Determination of the hemoglobin ratio from the wavelength position of the absorption maximum in the Soret band region. Depicted are the maximum positions determined from the weighted sum of the two spectral constituents derived by the second-derivative fitting method (red data points) and from the measured raw spectrum (blue data points) as boxplots. The Soret band maximum position of pure oxyhemoglobin at 415 nm (solid gray line) and that of pure methemoglobin/methemalbumin at 405 nm (dotted gray line) are also indicated as vertical lines ($n = 420$)

fractions determined by the fitting algorithm. In comparison, when using the previously described oxyhemoglobin fitting algorithm [17] and the standard spectrophotometric method of Harboe [11], Noe [12], and Fairbanks [13], the total heme pigment content of these samples was underestimated by at least 33% compared to the algorithm presented in this study.

4 | DISCUSSION

In the present study, we developed and validated a refined spectrophotometric second-derivative fitting method to quantify the total free heme pigment content in human plasma comprising oxyhemoglobin on the one hand and (the spectrally indistinguishable) methemoglobin and methemalbumin on the other hand. Compared to the standard spectrophotometric evaluation methods, the presented method enables a far more detailed assessment of hemolysis with a reliable and fully automated procedure. An Excel-based quantification tool for direct evaluation of UV/VIS raw spectra accompanies this manuscript for rapid method implementation.

Standard spectrophotometric methods based on the evaluation of signals at discrete wavelengths are inadequate concerning the determination of methemoglobin and methemalbumin. For example, methods designed to specifically quantify oxyhemoglobin using the spectral

TABLE 3 Native patient samples – quality control test set, blinded comparative analysis

Total bilirubin (mg/dL; $\mu\text{mol/L}$)	Total hemoglobin (mg/L)	Inaccuracy (%)/Imprecision (%)			
		Fitting algorithm	Harboe	Noe	Fairbanks
Non-icteric <1 ; <17.1 ($n = 15$)	25	-12/16	-39/38	-19/44	-8.0/104
	50	10/9.9	-12/23	-1.4/25	2.2/41
	100	4.4/3.8	-20/17	-15/21	2.7/29
	250	4.6/3.5	-39/4.1	-40/4.7	-23/4.4
	500	7.8/5.9	-26/14	-27/16	-12/11
Mildly icteric ≥ 1.0 –4.9; ≥ 17.1 –83.3 ($n = 71$)	25	0.4/14	78/83	171/144	13/91
	50	8.8/8.4	44/58	96/89	15/48
	100	8.0/8.8	5.0/27	25/39	-5.5/26
	250	7.6/8.5	-13/21	-6.1/25	-11/15
	500	9.0/7.7	-14/18	-10/19	-7.1/11
Strongly icteric ≥ 5.0 ; ≥ 85 ($n = 29$)	25	15/13	611/289	1004/451	-96/154
	50	3.1/5.8	237/141	407/218	-22/54
	100	4.3/11	109/42	195/71	-32/45
	250	6.3/2.0	42/29	83/40	-21/13
	500	2.4/7.1	2.1/19	20/24	-17/14

Note: Mean values for within-run inaccuracy and imprecision of the total hemoglobin concentration (oxyhemoglobin and methemoglobin/methemalbumin) of blended oxyhemoglobin and methemoglobin quality controls are displayed for the refined second-derivative fitting method described in this article and the evaluation procedures of Harboe, Noe, and Fairbanks for three measurement series on samples grouped into three bilirubin concentration ranges.

FIGURE 8 Observed deviations of the total free heme concentrations in Table 3 from the known values as boxplots, A; according to the second-derivative fitting algorithm (blue) and to the evaluation method of Harboe (red) and calculated bilirubin concentrations, B; at native patients samples compared to reference concentrations

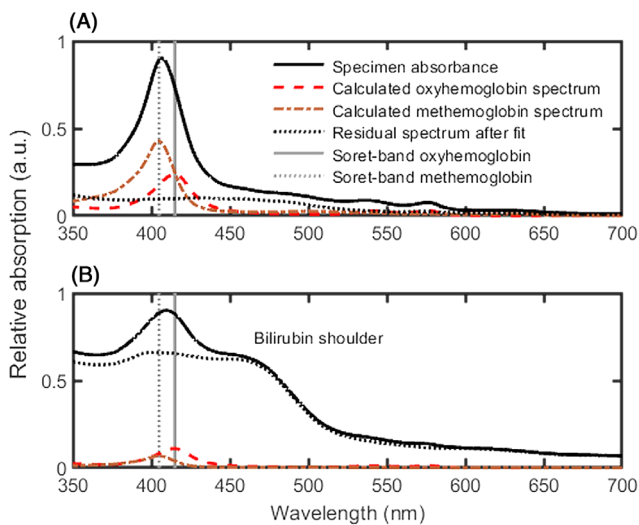
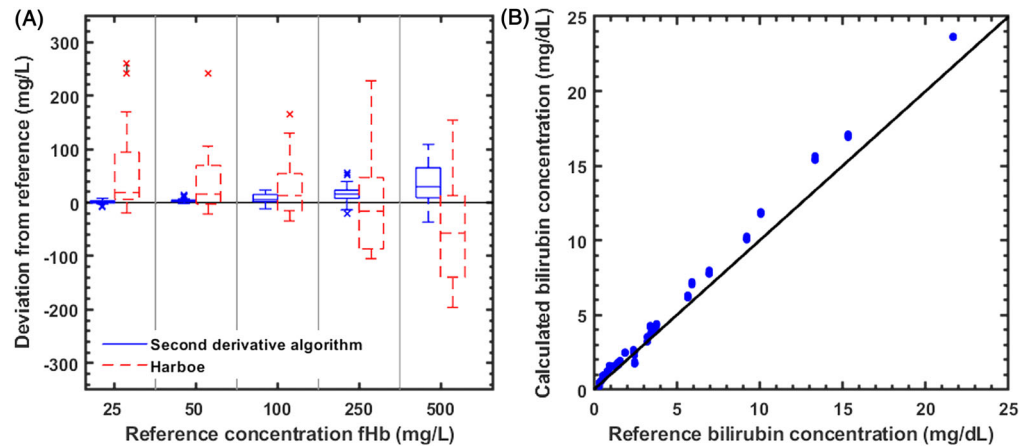


FIGURE 9 Second-derivative spectrophotometric analysis of a non-icteric, A; and an icteric, B; patient care plasma sample with confirmed severe intravascular hemolysis. Raw input spectrum (solid line) with extracted oxyhemoglobin fit fraction (red dashed line), extracted methemoglobin/methemalbumin fit fraction (brown dot-dashed line), and residuum spectrum (dotted line). Vertical lines at 415 and 405 nm indicate the wavelength position of the maxima in the Soret band of pure oxyhemoglobin (solid gray line) and pure methemoglobin/methemalbumin (dotted gray line), respectively

absorption signal at the alpha and beta band of oxyhemoglobin, such as the method of Kahn [14], do not provide any information about the presence of methemoglobin or methemalbumin. Even methods that utilize the strong molecular absorption of the three heme molecules at the Soret band (410–415 nm), e.g. Harboe [11], Noe [12], Fairbanks [13], lead to incomplete characterization of the free heme pigment content because the contributions of oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin contained in the spectral signal cannot be separated by distinct wavelength evaluation due to their spectral

overlap. Based on the standard multi-wavelength spectrophotometric methods, methemoglobin and methemalbumin can only be determined separately from oxyhemoglobin by a combination of non-equivalent methods, e.g. by combined evaluation with the methods of Kahn and Harboe. However, such an analytical approach would pose several pitfalls. Samples must be examined multiple times, precise quantitative results can, thus, not be obtained, and a strong background absorption from bilirubin, as caused by hyperbilirubinemia, is known to falsify spectral evaluations based on the Soret band [25]. In contrast, continuous spectral absorbance scans combined with derivative evaluations can solve such analytical challenges [26].

The second-derivative method described here was established and optimized with normalized pure spectra of oxyhemoglobin and methemoglobin. During the fit procedure, these pre-determined oxyhemoglobin and methemoglobin reference spectra were simultaneously subtracted with iteratively adjusted weights from a raw UV/VIS spectrum in the spectral range 380 to 650 nm until the mean squared second derivative of the residual spectrum was minimized. For methemalbumin, the spectral signature of molecular heme was used as a spectral surrogate [21, 22]. Based on that, however, methemoglobin and methemalbumin were not distinguishable in diluted samples. Therefore, only the sum of both analytes can be reported.

The method was comprehensively validated according to the specifications proposed by the EMA guideline of bioanalytical method validation [24]. In blending experiments, up to a bilirubin concentration of 4.9 mg/dL (83.8 $\mu\text{mol/L}$), the second-derivative method complied with the EMA guideline, while the standard methods of Harboe, Noe, and Fairbanks violated the EMA specifications.

In a second refinement step, the analysis of the position of the absorption maximum in the Soret band region provided an average deviation of the individual heme

pigment fractions of $\leq 21\%$. This additional analysis provided more accurate results when evaluating the maximum position of the weighted sum of the reference spectra of the two constituents as derived from the second-derivative fitting, as opposed to evaluating the raw UV/VIS spectra. Heme pigment differentiation is of added value in direct comparison to a previously described oxyhemoglobin fitting algorithm that also complied with the specifications proposed by the current EMA guidelines [17].

The performance of the second-derivative fitting method was evaluated by examining raw UV/VIS spectra of native patient care samples with confirmed severe intravascular hemolysis and a blue-shift of the Soret band. The analysis revealed the spectral signature of methemoglobin and methemalbumin in addition to that of oxyhemoglobin, indicating that the total heme pigment content (oxyhemoglobin plus methemoglobin and methemalbumin) was underestimated by up to 33% when using standard evaluation methods. Precise quantification of the different circulating free heme pigments can be valuable for clinical assessment. The presence of methemalbumin is indicative of rapid erythrocyte breakdown and thus provides further information about the severity and dynamic of hemolysis, regardless of its etiology. Although methemalbumin cannot be distinguished from methemoglobin with the second-derivative method presented in this article, the quantitative determination of the sum concentration of these two heme pigments is still valuable for diagnostic purposes.

Besides the evaluation of intravascular hemolysis or hemorrhage, further applications for the presented method are conceivable. The analysis method used in this project could be used for a more comprehensive evaluation of the quality of packed red blood cell units, where standard spectrophotometric methods may systematically under-report the degree of hemolysis due to storage-related in vitro methemoglobin formation [27]. Another potential application for the second-derivative method described in this article is spectrophotometric cerebrospinal fluid analysis for the diagnosis of subarachnoid hemorrhage [28]. Spectral contributions of oxyhemoglobin and methemoglobin will be eliminated by subtracting an optimized weighted sum of reference spectra, such that the contribution of the target measurand bilirubin that is produced solely in vivo remains for further analysis.

In conclusion, we propose a refined second-derivative fitting method for the simultaneous quantification of oxyhemoglobin, methemoglobin/methemalbumin, and bilirubin. Using a Microsoft Excel macro that accompanies this manuscript, the method can directly be applied in clinical practice. Raw UV/VIS spectra are readily evaluated and results are immediately reported. The

present method allows for highly reliable quantification of the total free heme pigment content in plasma, along with the separate quantification of oxyhemoglobin, methemoglobin/methemalbumin, even in case of a spectral interference from bilirubin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Hans-Fischer-Gesellschaft e.v. (Munich, Germany) and the DFG Graduiertenkolleg GRK 2274. We thank Regina Scherer-Burić for her scientific contribution. This manuscript is part of the inaugural thesis of C. Heckl to be submitted at the Medical Faculty of the LMU Munich, Germany. Open Access funding enabled and organized by ProjektDEAL.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data are not shared.

ETHICS STATEMENT

According to the local Institutional Review Board guidelines the study is exempt from review.

ORCID

Christian Heckl  <https://orcid.org/0000-0002-7418-7176>

Michael Paal  <https://orcid.org/0000-0001-8831-0238>

REFERENCES

- [1] D. J. Schaer, P. W. Buehler, A. I. Alayash, J. D. Belcher, G. M. Vercellotti, *Blood* **2013**, *121*, 1276.
- [2] B. Faivre, P. Menu, P. Labrude, C. Vigneron, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1998**, *26*, 17.
- [3] T. R. Kelly, R. L. Klein, J. M. Porquez, G. M. Homer, *Ann. Surg.* **1972**, *175*, 15.
- [4] M. T. Gladwin, T. Kanas, D. B. Kim-Shapiro, *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1205.
- [5] D. R. Janz, L. B. Ware, *J. Intensive Care* **2015**, *3*, 20.
- [6] M. Frimat, I. Boudhabhay, L. T. Roumenina, *Toxins (Basel)* **2019**, *11*, 660.
- [7] M. Adamzik, T. Hamburger, F. Petrat, J. Peters, H. de Groot, M. Hartmann, *Crit. Care* **2012**, *16*, R125.
- [8] J. R. Neal, E. Quintana, R. B. Pike, J. D. Hoyer, L. D. Joyce, G. Schears, *J. Extra Corpor. Technol.* **2015**, *47*, 103.
- [9] S. O. Sowemimo-Coker, *Transfus. Med. Rev.* **2002**, *16*, 46.
- [10] Instand: Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V. Ringversuch: Hämatologie 16 - Freies Hämoglobin (236), **2020**.

- [11] M. Harboe, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1959**, *11*, 66.
- [12] D. A. Noe, V. Weedn, W. R. Bell, *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 627.
- [13] V. F. Fairbanks, S. C. Ziesmer, P. C. O'Brien, *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 132.
- [14] S. E. Kahn, B. F. Watkins, E. W. Bermes Jr., *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1981**, *11*, 126.
- [15] M. Matthiae, X. Zhu, R. Marie, A. Kristensen, *Analyst* **2019**, *144*, 602.
- [16] D. K. R. Medipally, D. Cullen, V. Untereiner, J. Bryant, G. D. Sockalingum, T. N. Q. Nguyen, E. Noone, S. Bradshaw, M. Finn, M. Dunne, A. M. Shannon, J. Armstrong, A. D. Meade, F. M. Lyng, *J. Biophotonics* **2020**, *13*, e201960173.
- [17] M. Paal, A. Lang, G. Hennig, M. L. Buchholtz, R. Sroka, M. Vogeser, *Clin. Biochem.* **2018**, *56*, 62.
- [18] A. Taulier, P. Levillain, A. Lemonnier, *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1767.
- [19] C. C. Winterbourn, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 265.
- [20] F. Meng, A. I. Alayash, *Anal. Biochem.* **2017**, *521*, 11.
- [21] M. Rosenfeld, D. M. Surgenor, *J. Biol. Chem.* **1950**, *183*, 663.
- [22] C. A. Daniels, C. Wagner, R. C. Hartmann, D. E. Jenkins Jr., *Am. J. Clin. Pathol.* **1967**, *47*, 631.
- [23] A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627.
- [24] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London, UK: Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP), **2011**.
- [25] R. B. Bednar, *Laboratoriumsmedizin* **1994**, *18*, 196.
- [26] A. Lang, C. Heckl, M. Vogeser, T. Stauch, C. Homann, G. Hennig, R. Sroka, H. Stepp, *J. Biomed. Opt.* **2018**, *23*, 1.
- [27] J. P. Acker, I. M. Croteau, Q. L. Yi, *Clin. Chem. Acta* **2012**, *413*, 1746.
- [28] K. Nagy, I. Skagervik, H. Tumani, A. Petzold, M. Wick, H. J. Kuhn, M. Uhr, A. Regeniter, J. Brettschneider, M. Otto, J. Kraus, F. Deisenhammer, R. Lautner, K. Blennow, L. Shaw, H. Zetterberg, N. Mattsson, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2013**, *51*, 2073.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Heckl C, Lang A, Rühm A, et al. Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin. *J. Biophotonics*. 2021;14:e202000461. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000461>



FLUORESCENCE AND TREATMENT LIGHT MONITORING FOR INTERSTITIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Christian Heckl, Maximilian Aumiller, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp “*Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy*“, *Photochem Photobiol.*, 96(2):388-396. doi: 10.1111/php.13203 (2020), **JIF**: 3.421

Kurzfassung: Die Photodynamische Therapie wird als alternative Therapiemethode zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Bei der Therapie wird dem Patienten eine photosensitive Substanz verabreicht, die sich anschließend selektiv in dem Tumorgewebe anreichert. Durch Bestrahlung des Gewebes mit Licht einer geeigneten Wellenlänge reagiert der Photosensibilisator mit zellulärem Sauerstoff und erzeugt Sauerstoffradikale, die einen phototoxischen Effekt verursachen, wodurch die Tumorzellen zerstört werden. Bei interstitieller Photodynamischer Therapie wird der Tumor über Lichtsonden, die direkt im Tumorgewebe platziert werden, bestrahlt [85]. Die Lichtsonden haben an ihrem distalen Ende einen zylindrischen, diffus abstrahlenden Bereich, wodurch das Licht in das umliegende Gewebe abgegeben wird [85]. Die Lichtdosis und der damit verbundene phototoxische Effekt, der im Zielvolumen erreicht wird, hängen entscheidend von der Absorption und Streuung des Gewebes und der Positionierung der Lichtsonden ab. Bei der Verwendung von mehr als einer Sonde kann eine der Sonden dazu verwendet werden, das Licht in das Gewebe zu bringen während eine andere Sonde als Detektor verwendet wird [96]. Dadurch lässt sich das zwischen den Sonden transmittierte Laserlicht sowie die zwischen den Sonden erzeugte Fluoreszenz der photosensitiven Substanz messen. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die auftretenden gemessenen Signale zu verstehen und daraus mögliche Anpassungen für die Behandlungsplanung sowie für die Bestrahlung selbst abzuleiten.

Mit Hilfe von flüssigen Gewebemodellen, bestehend aus in phosphatgepufferter Salzlösung gelöstem Blut (intakte und lysierte Erythrozyten) als Absorbermedium und Lipovenös als Streumedium, wurden die Abhängigkeiten der Laserlicht Transmission (635 nm, 200 mW/cm) und der Fluoreszenz der photosensitiven Substanz Protoporphyrin IX (PpIX) von der Absorption und Streuung des Gewebes sowie der Positionierung der Sonden über die Bestrahlungsdauer von einer Stunde untersucht. Die Konzentrationen des Absorber- und Streumediums wurden so gewählt, dass die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe nachgebildet werden konnten. Zusätzlich wurde mit einer weiteren Sonde, bestehend aus sechs Emitter-Fasern, die eine Detektor-Faser umringen, interstitielle Rückstreuungsmessungen mit definiertem weißem Licht durchgeführt, um mögliche spektrale Veränderungen der Gewebemodellkomponenten nachzuweisen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Blutfarbstoff Hämoglobin gelegt.

Ausgehend von zwei parallelen zylindrischen Diffusoren mit 10 mm radialem Abstand ist das Signal des transmittierten Laserlichts zwischen den Fasern weitgehend durch den Abstand zwischen den Diffusoren bestimmt, aber eher unempfindlich gegenüber einer zusätzlichen axialen Verschiebung oder Verkippung der Fasern zueinander.

Bei der zeitlichen Betrachtung der Absorption von Hämoglobin zeigt sich, dass für Hämoglobin innerhalb intakter Erythrozyten durch die Bestrahlung zunächst keine merkliche Veränderung der Hämoglobin-Oxygenierung sichtbar ist. Zeitgleich ist ein Abnehmen des Fluoreszenzsignals der photosensitiven Substanz PpIX messbar, was für einen funktionierenden phototoxischen Effekt spricht. Die simultane Absorptionsmessung belegt nach etwa 40 min Bestrahlungsdauer eine beginnende Veränderung des Hämoglobinspektrums. Hämoglobin wird deoxygeniert und Methämoglobin gebildet, was zu einem dramatischen Anstieg der Absorption bei der Wellenlänge 635 nm führt. Wird lysiertes Blut als Komponente statt intakter Erythrozyten in das Gewebephantom eingebracht, setzen diese Effekte der Deoxygenierung von Hämoglobin und die Bildung von Methämoglobin unmittelbar nach Beginn der Bestrahlung ein.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die Intensität des transmittierten Laserlicht weitgehend vom Abstand der Sonden bestimmt ist und dass bei der interstitiellen Photodynamischen Therapie deoxygeniertes Hämoglobin und Methämoglobin gebildet werden kann, was zu einer erhöhten Absorption bei 635 nm führt. Diese Erhöhung der Absorption könnte eine Erklärung für den Abfall des gemessenen Transmissionssignals sein. Durch eine Erhöhung der Absorption im Bestrahlungsvolumen nimmt die Bestrahlungsdosis ab, wodurch das Tumorgewebe unzureichend therapiert wird.

Der Anteil von Christian Heckl an dieser Arbeit war die Planung der Versuchsreihen und der Messaufbauten zur Bestimmung der Positionierungs-, Abstrahl- und Detektionsabhängigkeit der Lichtsonden und der optischen Eigenschaften von Hämoglobinformen in den Gewebemodellen, die Herstellung und Vermessung der Gewebemodelle, die Auswertung der Ergebnisse sowie das Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren.

Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy^{†,‡}

Christian Heckl^{*1,2} , Maximilian Aumiller^{1,2}, Adrian Rühm^{1,2}, Ronald Sroka^{1,2} and Herbert Stepp^{1,2}

¹Laser-Forschungslabor, LIFE Center, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany

²Department of Urology, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany

Received 30 September 2019, revised 12 November 2019, accepted 21 November 2019, DOI: 10.1111/php.13203

ABSTRACT

In interstitial photodynamic therapy, light is distributed to the tumor via light diffusers. The light dose and the related phototoxic effect achieved throughout the target volume critically depend on absorption, scattering and diffuser positioning. Using liquid tissue phantoms, we investigated the dependencies of treatment light transmission and protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence on these parameters. This enabled monitoring hemoglobin oxygenation and methemoglobin formation during irradiation (635 nm, 200 mW cm⁻¹ diffuser length). Starting with two parallel cylindrical diffusers at 10 mm radial separation, the light transmitted between the fibers was largely determined by the minimal distance between the diffusers, but rather insensitive to an additional axial displacement or tilting of one fiber with respect to the other. For fixed distance between the diffuser centers, however, tilting up to direct contact resulted in a 10-fold signal increase. For hemoglobin within erythrocytes, irradiation leads to photobleaching of PpIX without marked change in hemoglobin oxygenation until hemolysis occurs. Afterward, hemoglobin is rapidly deoxygenized and methemoglobin is formed, leading to a dramatic increase in absorption. For lysed blood, these effects start immediately. A comparison of intraoperative monitoring of the signals with the experimental results might help prevent insufficient treatment by reconsidering treatment planning or prolonging irradiation.

INTRODUCTION

The 5-aminolevulinic acid (5-ALA) has obtained worldwide clinical approval as a prodrug of protoporphyrin IX (PpIX) for fluorescence-guided surgery (FGS) of malignant glioma—most recently by the FDA in USA (1). Numerous studies have shown that PpIX accumulation upon oral delivery of 5-ALA at a dose of 20 mg kg⁻¹ bw 3–4 h prior to surgery is highly tumor-selective, summarized and discussed in (2,3). Especially,

the positive predictive value (PPV) of visible PpIX fluorescence proved to be very high, reaching up to 100% in some clinical studies (4,5). A high PPV is of essential importance in brain tumor surgery because it excludes resection or treatment of the normal, functional brain. In other words: whatever brain tissue does show strong PpIX fluorescence contains tumor and can usually be resected without risking functional deficits. The Normal brain accumulates no or only minute amounts of PpIX (6).

The proven high tumor selectivity of PpIX accumulation stimulated a revival of experimental and clinical studies on photodynamic therapy (PDT) for malignant glioma (2,7–9). One of the two main approaches relies on performing fluorescence-guided surgery first and then irradiating the surgical cavity (9), whereas the other concept addresses predominantly inoperable or recurrent tumors by stereotactic interstitial irradiation (8). In this latter case, cylindrical diffuser fibers are inserted into the tumor after careful planning of appropriate trajectories, which exclude injuries of blood vessels and other critical structures but allow for distribution of a sufficient amount of light to the entire tumor volume.

A favorable feature of PpIX in this context is its fast photobleaching. Due to the irregular shape of malignant glioma, there is always a high probability that normal brain tissue receives rather high light doses even with very careful pretreatment planning. Fortunately, it was reported that the accumulation of PpIX in normal brain tissue, gray and white matter, is very low compared to the target brain tumor (10). Furthermore, it can be assumed that during illumination the little amount of PpIX accumulated in normal brain cells will be photobleached before a lethal amount of reactive oxygen species (ROS) is produced (8). This is an important inherent safety feature of 5-ALA-based interstitial PDT of malignant glioma, strongly relaxing light dosimetry considerations of this approach (8). However, a deeper clinical investigation on whether the potential therapeutic advantage is compromised by the observation that gray matter appears to be more sensitive to PDT-induced damage than tumor tissue would be desirable (10).

In order to monitor photobleaching during interstitial PDT, spectral online monitoring (SOM) was established to assess the average PpIX fluorescence in the tumor volume between adjacent treatment fibers at least prior to and after PDT irradiation (11,12). In addition to PpIX fluorescence, the treatment light transmission (at 635 nm) could be monitored between adjacent fibers. Only one of the cylindrical diffuser fibers was connected

*Corresponding author email: Christian.Heckl@med.lmu.de (Christian Heckl)

[†]This article is part of a Special Issue dedicated to Dr. Jarod Finlay.

[‡]This manuscript is part of the inaugural thesis of Christian Heckl to be submitted at the Medical Faculty of the Ludwig-Maximilians-Universität, Munich.

© 2019 The Authors. *Photochemistry and Photobiology* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of American Society for Photobiology

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

to the laser output port at a time for these measurements, while the other fibers were sequentially connected to a spectrometer and thus served as light detectors. The recorded spectra showed an intensity maximum at 635 nm and another one at 700 nm, corresponding to treatment light transmission and PpIX fluorescence, respectively. In order to account for the huge intensity differences of both signals, a long-pass filter was included in the detection beam path, rejecting most of the laser light.

Because tissue optical properties at the excitation wavelength of 635 nm and the emission wavelength of PpIX at around 700 nm are not identical, the interpretation of the acquired SOM-spectra is unfortunately not straightforward. However, it would be good, if one could at least roughly draw immediate conclusions from the acquired spectra: Whether the laser light transmission is in an acceptable range, or whether there is enough PpIX between fibers, where proliferating tumor tissue is expected. As the absolute intensities are strongly dependent on the distance, this may also be the case for the ratio of 700 nm PpIX fluorescence intensity *versus* 635 nm laser light transmission also. The primary aim of the present investigation is to experimentally assess the dependence of light signals measured between one pair of cylindrical diffuser fibers on the relative position and orientation of the fibers with respect to each other.

The intraoperative SOM measurements performed in (11,12) resulted in interesting and unexpected observations regarding the intensity and/or dynamics of the recorded transmitted laser light. For example, occasionally, the transmitted intensity dropped to undetectable levels after PDT. Such strong PDT-induced changes in optical tissue properties have only been reported a few other times: In a proceedings paper, Andrade *et al.* (13) reported about white light remission spectroscopy they had performed on 5-ALA treated normal mouse skin. In their investigation, PDT was more efficient in reducing oxygen saturation and generating methemoglobin (met-Hb) than radiotherapy. As deoxygenated hemoglobin (deoxy-Hb) and met-Hb have a significantly higher molar absorption at 635 nm than oxygenated hemoglobin (oxy-Hb), this observation translates into an increase of tissue absorption. Hamada *et al.* (14) had irradiated red blood cells dissolved in photosensitizer (talaporfin) solution and monitored absorption spectra during irradiation at a wavelength of 664 nm. Other than some hemolysis, they found the expected reduction in oxygen saturation and the formation of met-Hb. In an earlier investigation, Larsen *et al.* (15) had found met-Hb formation in a rat bladder tumor model, in which some of the animals the relative contribution to overall oxy-Hb was up to 40% after 5-ALA-based PDT. Interestingly, met-Hb has a broad absorption peak at ca. 630 nm, where oxy-Hb is far less absorbing (27 times less) and even deoxy-Hb absorbs about 3.5 times less (Fig. 3C). It is well known that ROS, for example, produced by photosensitizers, is able to oxidize hemoglobin to met-Hb (16) as is also with heating to above 60°C (17). If relevant amounts of deoxy-Hb and met-Hb were produced within the PDT treatment volume, this has consequences for light dosimetry because of spectral changes in absorption. Especially, for interstitial PDT, the formation of met-Hb during PDT may have a significant influence on overall tissue absorption and spatial light distribution at the treatment wavelength of 635 nm. If cylindrical diffuser fibers are several optical penetration depths apart from each other, the light transmission losses due to even moderate increase in absorption potentiate accordingly. It can be hypothesized that the occasionally observed loss of treatment

light transmission between fibers after interstitial PDT with glioma patients (11) may therefore at least partly be caused by the ROS-induced formation of deoxy- and met-Hb. Therefore, it was the second aim of the present investigation to experimentally assess the dynamics of laser light transmission between one pair of cylindrical diffuser fibers while recording the spectral changes of white light transmission indicating changes in hemoglobin (oxy- *versus* deoxy- and met-Hb).

MATERIALS AND METHODS

Phantom preparation. To simulate the optical properties of biological tissue, liquid phantoms with India ink (29770, Rohrer & Klingner Leipzig-Co., Zella-Mehlis, Germany) or blood (see details below) as absorber, Lipovenös® (Lipovenös MCT 20%, Fresenius, Bad Homburg, Germany) as scatterer, Tween® 20 (P1379, Sigmar Aldrich, St. Louis, Missouri), Protoporphyrin IX (PpIX) (Protoporphyrin IX, Sigmar Aldrich) as fluorochrome and phosphate-buffered saline (PBS) (P5493, Sigmar Aldrich) as medium were prepared. The concentrations of the absorption medium and scattering medium were chosen to represent physiological absorption and scattering coefficients of the normal brain or brain tumor tissue at 635 nm (18–20). As base values, absorption and scattering coefficients $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ and $\mu_s' = 2 \text{ mm}^{-1}$, respectively, were used. These values were previously measured intraoperatively for brain adjacent tumor tissue (20,21). Phantoms of varying absorber (India ink) concentrations from 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.15% and 0.2% were created to represent a range of physiologically expected absorption coefficients μ_a of (0.02, 0.04, 0.07, 0.10, 0.14) mm^{-1} , respectively. By using India ink as absorber, a slightly lower absorption coefficient occurs at 700 nm of about 10% in comparison to the one at 635 nm. Additionally, different reduced scattering coefficients were simulated by different concentrations of Lipovenös®, varied from 1%, 1.5%, 2%, 2.5% and 3% representing μ_s' of (1.2, 1.8, 2.3, 3.5, 4.6) mm^{-1} , respectively. The optical properties of the phantoms were measured using the integrating sphere technique as described by others (22). As a fluorochrome, PpIX powder was dissolved in DMSO at a concentration of 1 g L^{-1} to prepare a stock solution and further diluted with PBS to final sample concentrations of 10 or 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, which are reported as being physiological concentrations found in glioblastoma tissue after oral application of 20 mg kg^{-1} bw of 5-ALA (6). A concentration of 5% Tween20 prevents aggregation of PpIX molecules, which would influence the measured transmission and fluorescence signals (23). The phantom was replenished with PBS.

For investigating the potential PDT-induced effects on hemoglobin, similar liquid phantoms, but with blood as absorber were prepared. Venous blood was taken from healthy volunteers (University Hospital LMU Munich ethics protocol: 18–144). The blood was either used immediately or stored in a refrigerator. Prior to adding blood to the liquid phantoms, it was centrifuged at 2500 rpm for 5 min (121 g) and the supernatant (plasma) was removed. The sedimented erythrocytes were then either diluted the original volume with PBS to obtain a blood-equivalent with intact, but “washed” erythrocytes or with distilled water to obtain lysed blood. To remove all residual constituents except hemoglobin from the lysed blood sample, it was freeze-thawed, centrifuged and only the supernatant was used for further preparation. Scattering was adjusted to $\mu_s' = 2.3 \text{ mm}^{-1}$ at 635 nm by adjusting Lipovenös® to 2% final concentration. A blood concentration of 4% (corresponding to a μ_a of 0.03 mm^{-1} at 80% blood oxygenation) was chosen, and the PpIX concentration used was 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Measurement setup and fibers. A diode laser at 635 nm (Ceralas, Biolitec® AG, Vienna, Austria) was calibrated to emit 200 mW cm^{-1} from a 2 cm cylindrical light diffuser fiber (CD-4L3-20, LifePhotonics GmbH, Bonn, Germany). A second similar fiber was used as a detection fiber, which was connected to a spectrometer (USB2000+, OceanOptics, Largo, FL) which incorporates a 657 nm long-pass filter. The long-pass filter did not completely block the transmitted laser light, thus enabled the recording of transmitted laser light and PpIX fluorescence simultaneously as is done during clinical iPDT (11).

Fluorescence and treatment light detection at different optical properties and fiber orientations. Clinically, the perfect fiber positioning is challenging, thus different orientations of the fibers with respect to

each other were investigated as shown in Fig. 1 which might support the interpretation of the measured transmitted treatment light and PpIX fluorescence signals. The fiber positions were investigated with respect to the distance between two parallel fibers (Fig. 1A), their relative axial positions (Fig. 1B), their angular deviation to the y -axis at the y - z -plane at the center of the diffuser tip (Fig. 1C) and the angular deviation to the y -axis at the y - x -plane (Fig. 1D) until the tips of the two fibers were in contact. To also evaluate the geometric dependence of the transmission and fluorescence signals on variable optical tissue properties, different concentrations of absorber and scatterer were investigated.

The distance between fibers in Fig. 1A was adjusted to 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 mm from fiber center to fiber center. The axial displacement in Fig. 1B was investigated in 5 mm steps to a total displacement of 40 mm. Investigated angles were 0° , 5° , 10° , 20° , 45° and 90° in the configuration of Fig. 1C and 0° , 5° , 10° , 20° and 30° in the configuration of Fig. 1D. In the setups C and D, the distance d between the fibers in the middle of the light-emitting diffuser region area was kept at 10 mm.

Influence of blood absorption during PDT. The experimental setup as depicted in Fig. 1A with a constant interfiber distance of 10 mm was used. The volume of the liquid phantoms was 50 mL only, in order to limit the interaction volume between light and hemoglobin and the available content of PpIX in this volume, in an attempt to mimic the clinical situation. The phantom was stirred during the measurement at 200 min^{-1} .

During irradiation, white light transmission spectra were collected in regular intervals with a device, comprising a white light LED, a fiber bundle probe immersed into the phantom and a spectrometer (AvaSpec-Mini2048(CL), Avantes, Apeldoorn, The Netherlands). The fiber bundle consists of six excitation fibers surrounding a single detection fiber, all fibers having $400 \mu\text{m}$ cores. Before measuring the phantoms, a reference spectrum was collected from a phantom with all constituents except blood. Each measured spectrum was divided by the reference spectrum prior to storage.

During one of the experiments with washed erythrocytes, 2 mL of the liquid phantom were withdrawn prior to and at 15 min intervals after the start of irradiation. These samples were centrifuged (121 g, 5 min) and 20 μL of the supernatant in the central fraction, containing the lowest concentration of sedimented erythrocytes (bottom fraction) and scattering lipid (top fraction) were extracted with a 10 μL pipette, diluted 1:100 with PBS and then measured in a cuvette absorption spectrometer (Lambda40, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). No further measurements were performed to determine the degree of hemolysis of every single 20 μL sample derived in this way.

Data evaluation. The recorded spectra were evaluated using Matlab (R2018b, MathWorks, Natick, Massachusetts) and SigmaPlot (v11.0, Systat Software, Erkrath, Germany). Raw data spectra were averaged over wavelength intervals of 2 nm. All phantoms were prepared and measured in at least three independent replicates.

For the evaluation of the influence of blood absorption during iPDT, the spectra recorded from the detection fiber were evaluated as follows: a four pixel (2 nm interval) average was calculated for the intensities $I(\lambda)$ at wavelengths λ of 635 nm (laser light transmission), 674 nm (photoproduct (PP) fluorescence peak) and 700 nm (second PpIX fluorescence peak). As the fluorescence spectra $I_{\text{PP}}(\lambda)$ and $I_{\text{PpIX}}(\lambda)$ of PP and PpIX overlap, the pure signal contributions $I_{\text{PP}}(674 \text{ nm})$ of PP at 674 nm and $I_{\text{PpIX}}(700 \text{ nm})$ of PpIX at 700 nm were separated using Eqs. (1) and (2):

$$I_{\text{PP}}(674 \text{ nm}) = (I(674 \text{ nm}) - x_{\text{PpIX}} \cdot I(700 \text{ nm})) / (1 - x_{\text{PP}} \cdot x_{\text{PpIX}}) \quad (1)$$

$$I_{\text{PpIX}}(700 \text{ nm}) = (I(700 \text{ nm}) - x_{\text{PP}} \cdot I(674 \text{ nm})) / (1 - x_{\text{PP}} \cdot x_{\text{PpIX}}) \quad (2)$$

where $I_{\text{PP}}(674 \text{ nm})$ and $I_{\text{PpIX}}(700 \text{ nm})$ are the signal intensities in counts per second that would have been recorded at 674 and 700 nm due to the fluorescence emission intensities of PP and PpIX without overlap, $I(674 \text{ nm})$ and $I(700 \text{ nm})$ are the counts per second actually measured on the examined phantoms at the respective wavelengths, and x_{PP} and x_{PpIX} are the ratios of the intensities emitted by pure PpIX at 674 and 700 nm and by pure PP at 700 and 674 nm, respectively. The values for x_{PP} and x_{PpIX} had been determined to $x_{\text{PP}} = 0.65$ and $x_{\text{PpIX}} = 0.281$ for the spectrometer in use.

The recorded white light transmission spectra were fitted with pure spectra of oxy-Hb, deoxy-Hb and met-Hb (as depicted in the results Fig. 3C) according to Eq (3). This equation calculates the relative contributions of oxy-Hb, deoxy-Hb and met-Hb to the measured spectrum.

$$I(\lambda) = I_0 \cdot \exp(-(a \cdot A_{\text{oxy}}(\lambda) + b \cdot A_{\text{deoxy}}(\lambda) + c \cdot A_{\text{met}}(\lambda))) \quad (3)$$

where $I(\lambda)$ is the model function with fit parameters a , b and c representing the contributions of the absorption spectra of oxy-Hb (A_{oxy}), deoxy-Hb (A_{deoxy}) and met-Hb (A_{met}) to the measured spectrum. I_0 is another fit parameter, which is expected to be close to 1 because the measured spectra were scaled to the reference signal obtained on a phantom without absorber. Spectral ranges with the characteristic shapes of oxyhemoglobin (530–580 nm) and met-Hb (590–650 nm) were given higher weights (up to $30\times$) to obtain good fits (compare Fig. 3B). The weighing reduced the residuals of the difference of measured and fitted spectra, thus improving

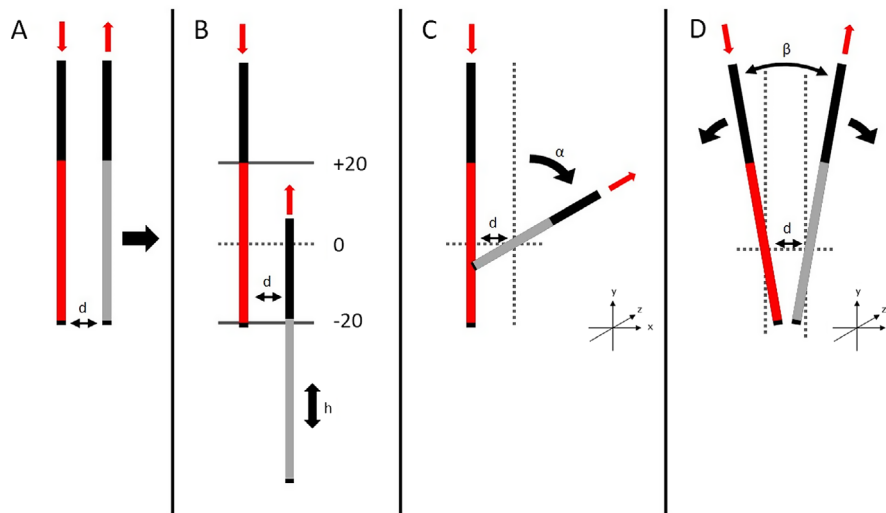


Figure 1. Positioning of the emitting and detecting fiber. The graph shows the light-guiding fibers in black, with the diffuser regions in red for the emitting fiber and gray as detecting fiber, respectively. The emitting and detecting fibers were placed parallel to each other at several distances (A) and in different relative axial positions (B), as indicated by the black arrows. A relative angular deviation within the y - z -plane (C) as well as within the common y - x -plane (until the tips of the fibers are in contact) (D) were applied to investigate the corresponding signal dependencies for nonparallel fiber pairs. The x -distances d of the centers of the diffuser regions in the experimental setups B, C and D were fixed at 10 mm.

the determination of the relative contributions of oxy-Hb, deoxy-Hb and met-Hb.

RESULTS

Fluorescence and treatment light detection at different optical properties and fiber orientations

Figure 2 shows the results of the experimental measurements of the assessment of light penetration at several fiber orientations at different optical properties. Each graph shows the mean value with a standard deviation of three measurements independently taken.

The transmission and fluorescence intensities in graph 2A and 2B are normalized to the measured intensities at 10 mm with an absorption coefficient of $\mu_a = 0.07 \text{ mm}^{-1}$ and a reduced scattering coefficient of $\mu_s' = 2.3 \text{ mm}^{-1}$ (blue line). As expected, the detected treatment light decreases roughly exponentially with increasing (radial) fiber distance. The decay becomes faster with increasing scattering (B) and in particular with increasing absorption (A). The detected fluorescence signals behavior similarly to the transmission signals, albeit with a generally slower decay.

The comparison of the fluorescence intensity and the transmission intensity is shown in Fig. 2C, where the fluorescence signals divided by the transmission signals are plotted at different distances between the emission and the detection fibers at an absorption coefficient of $\mu_a = 0.07 \text{ mm}^{-1}$ and a reduced scattering coefficient of $\mu_s' = 2.3 \text{ mm}^{-1}$. With shorter distances between the two fibers, the fluorescence signal reaches 38% and 70.8% of the transmission intensity value at 5 and 8 mm, respectively.

The results of the investigation of two fibers at different relative axial positions are shown in Fig. 2D, geometry Fig. 1B. This measurement was implemented with one fixed absorption coefficient ($\mu_a = 0.07 \text{ mm}^{-1}$) and one fixed scattering coefficient ($\mu_s' = 2.3 \text{ mm}^{-1}$). The intensity increases while the detection fiber is pulled from below the emission fiber until the two fibers are parallel at the same height. Then, when the detection fiber is moved until its tip is at the level of the beginning of the diffused emission area of the emission fiber, the intensity decreases. The measured intensities are at the same level when the detection fiber is located above or below the light-emitting diffuser region of the emission fiber. In the region -10 mm to 10 mm , the deviation of the transmission intensity is less than 25%.

Fig. 2E shows the results where the detection fiber is tilted with respect to a y-axis in the y-z-plane, geometry Fig. 1C. It can be seen that with increasing the angular deviation the measured transmission intensity decreases by up to 39%. At small angular deviations at about 10° , however, an intensity decrease of only 2.3% occurs.

In case, the fiber geometry was adjusted such that both fibers were tilted until their tips get in contact, geometry Fig. 1D, the results are shown in Fig. 2F. As the angular deviation increases, as the fiber tips approach, the measured transmission intensity increases by a factor of up to 14.3. At an angular deviation of 10° , an intensity increase occurs by a factor of 2.

Influence of blood absorption during PDT

Liquid phantom measurements with lysed blood or washed erythrocytes were performed to detect any PDT-induced changes in

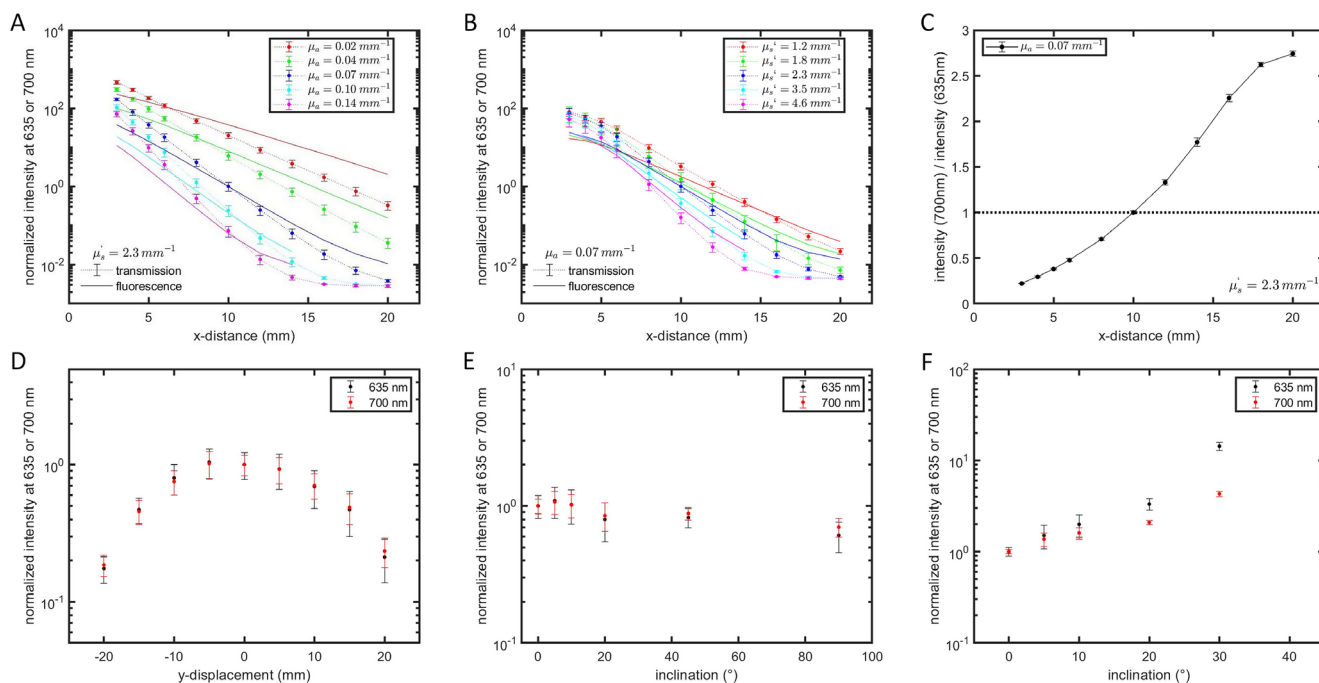


Figure 2. Results of interfiber light transmission and PpIX fluorescence measurements at different optical properties and different relative fiber positions. Each graph shows the normalized mean value at 635 nm for transmission and 700 nm for fluorescence at 10 mm fiber distance and at μ_a of 0.07 mm^{-1} and μ_s' of 2.3 mm^{-1} with a standard deviation of three independent measurements. Graph A and B show the decrease of treatment light transmission (dotted line) and fluorescence (solid line) intensities between two parallel fibers with increasing distance and with increasing absorption or reduced scattering coefficients, respectively. The distance-dependent ratio of the fluorescence and transmission signals is shown in graph C. Graph D shows the treatment light and fluorescence intensities at different relative axial positions of parallel fibers. The influence of out-of-common-plane and within-common-plane angular deviations (until the tips are in contact) are shown in graphs E and F, respectively.

absorption at the irradiation wavelength (635 nm), PpIX fluorescence (700 nm photobleaching), PP fluorescence (at 674 nm), oxy-, deoxy- and met-Hb. Spectra, as recorded by the cylindrical diffuser fiber serving as a detector, are shown in Fig. 3A. At the start of irradiation (black line), strong signals are observed, both for the laser light transmitted from the emission fiber to the detection fiber (635 nm) and the characteristic PpIX fluorescence generated within the tissue (peaking at 700 nm). During irradiation, an additional local maximum at 674 nm appears, while the PpIX fluorescence signal at 700 nm decreases. Interestingly, the transmitted laser light detected at 635 nm decreases as well, indicating increasing light absorption at 635 nm within the tissue, as the output of laser light from the irradiating diffuser remained constant throughout the experiment. The source of this increase in absorption becomes obvious from Fig. 3B: At the start of irradiation (black line), the white light transmission spectra show the imprint of mostly oxy-Hb. During irradiation, the contributions of deoxy-Hb and potentially met-Hb were detected (indicated by the additional minimum at around 635 nm after 60 min and verified by the local absorption maximum of met-Hb shown in Fig. 3C).

Figures 4 and 5 depict, the time-dependent signals of laser light transmission, PpIX and PP fluorescence (graph A), as well as the fit contributions (fit parameters a , b and c Eq. (3)) of oxy-, deoxy- and met-Hb (graph B). Figure 4 shows the results obtained for samples with lysed blood, while Fig. 5 shows the results for samples, where washed erythrocytes were added to the same final blood volume. In both cases, the absorption at 635 nm at the end of irradiation was much higher than at start, leading to a signal reduction by two orders of magnitude (black lines in the graphs A). The PpIX fluorescence signal was also decreasing with time. The signal decrease detected at 700 nm could be caused by an increase of absorption at the excitation and/or the emission wavelengths and/or by PpIX-photobleaching. Since the absorption changes could be caused by a variety of substances with different spectral characteristics, for example, different hemoglobin species, absorption and photobleaching effects could not be quantitatively separated from each other within our experimental approach. As visible in the green curve, photoproduct (PP) was formed shortly after the onset of irradiation. The related

signal then decreased, potentially also due to photobleaching, together with the PpIX signal. In Figures 4 and 5, Graphs B show almost the same contributions of the different hemoglobin species at the start of irradiation. Also, in both cases deoxy-Hb increases at the cost of oxy-Hb, while fitted met-Hb was formed at a slower rate, but finally continues to increase at the cost of deoxy-Hb, leading to a maximum of the deoxy-Hb signal as soon as oxy-Hb had disappeared almost completely. The most striking differences between lysed blood (Fig. 4) and washed erythrocytes (Fig. 5) are threefold:

- 1 With lysed blood, there is an immediate onset of treatment light transmission reduction and deoxygenation of hemoglobin, while these signals stay relatively constant for a while in the case of washed erythrocytes, although PpIX is clearly photobleaching.
- 2 Less overall PP formation in the case of lysed blood.
- 3 An obviously steeper decrease of laser light transmission and related signals in the case of washed erythrocytes as soon as the initial “lag-phase” has passed.

Figure 6 indicates that when irradiating washed erythrocytes in the phantom experiment, the erythrocytes are destroyed at least partially, as evident by the characteristic hemoglobin absorption observed in the supernatant of centrifuged phantoms, which gets more and more pronounced with increasing irradiation time beforehand. Hemolysis seems to be largely completed already at 15 min after the start of irradiation, which is earlier than the onset of the fast absorption increase at 30–40 min as shown in Fig. 5A. However, the centrifugation did not separate the layers very clearly and withdrawing a clear layer without scattering was not possible. A quantitative interpretation of the absorption spectra is therefore not possible.

DISCUSSION

Fluorescence and treatment light detection at different optical properties and fiber orientations

The investigations of different fiber arrangements demonstrated a moderate dependence on axial displacements and angular

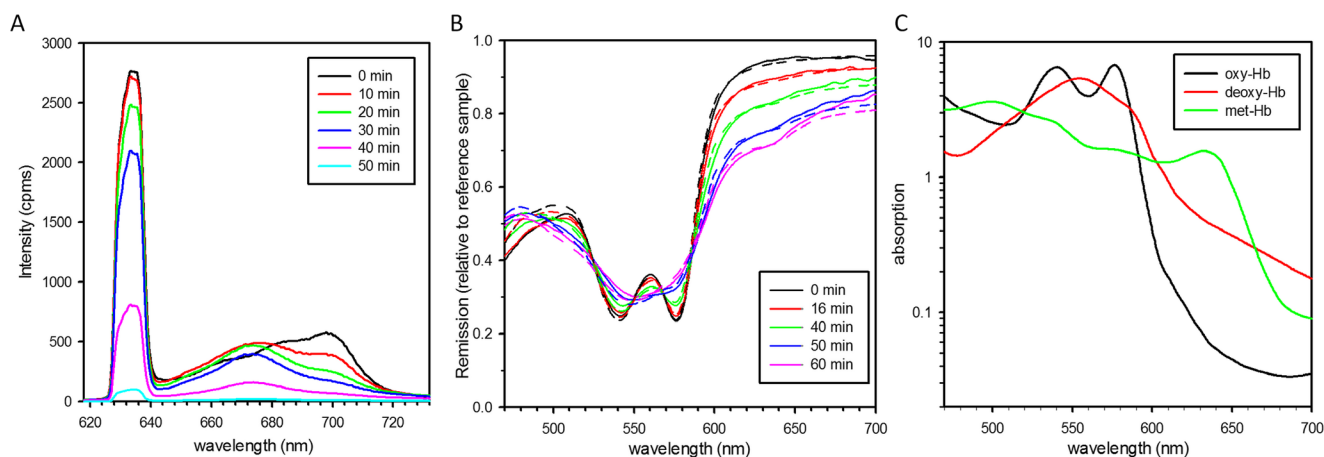


Figure 3. Graph A: Time-dependent spectral changes as measured with a spectrometer connected to the detecting fiber after low pass filter. Sample with washed erythrocytes. The Peak at 635 nm: treatment light transmission, peak at 700 nm: PpIX fluorescence, peak at 674 nm: PP fluorescence. Graph B: Time-dependent white light transmission spectra with respect to a nonabsorbing reference sample (solid lines). Sample with lysed blood. Dashed lines: the result of curve fit according to Eq. (3). Graph C: Blood absorption spectra used for fitting.

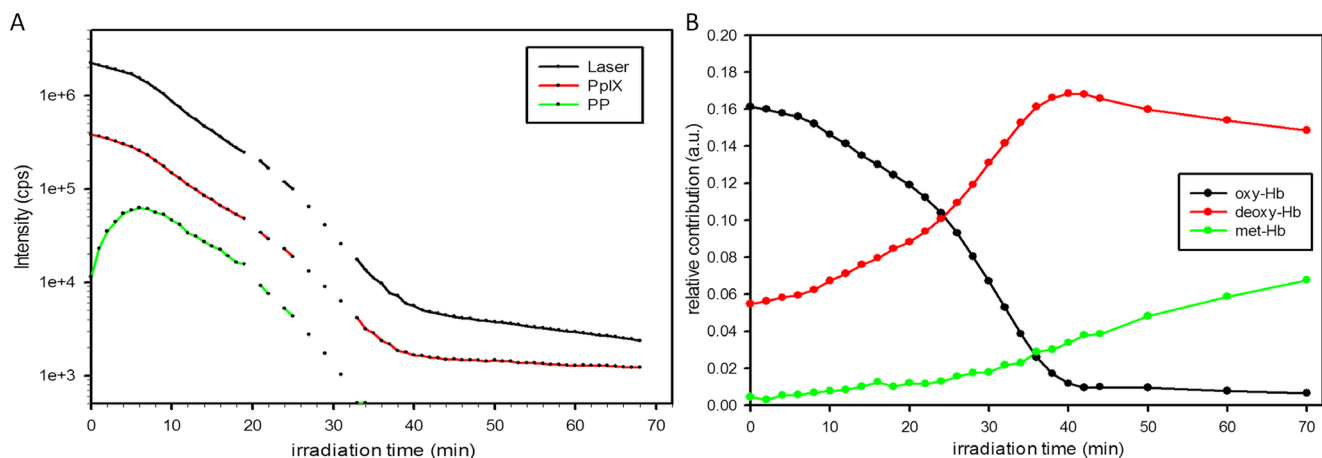


Figure 4. Results of experiments with lysed blood. Graph A: Time-dependent signals of transmitted treatment light (black line), PpIX fluorescence (red line) and PP fluorescence (green line). Graph B: Time-dependent fit parameters for the contributions of oxy-Hb (black line), deoxy-Hb (red line) and met-Hb (green line).

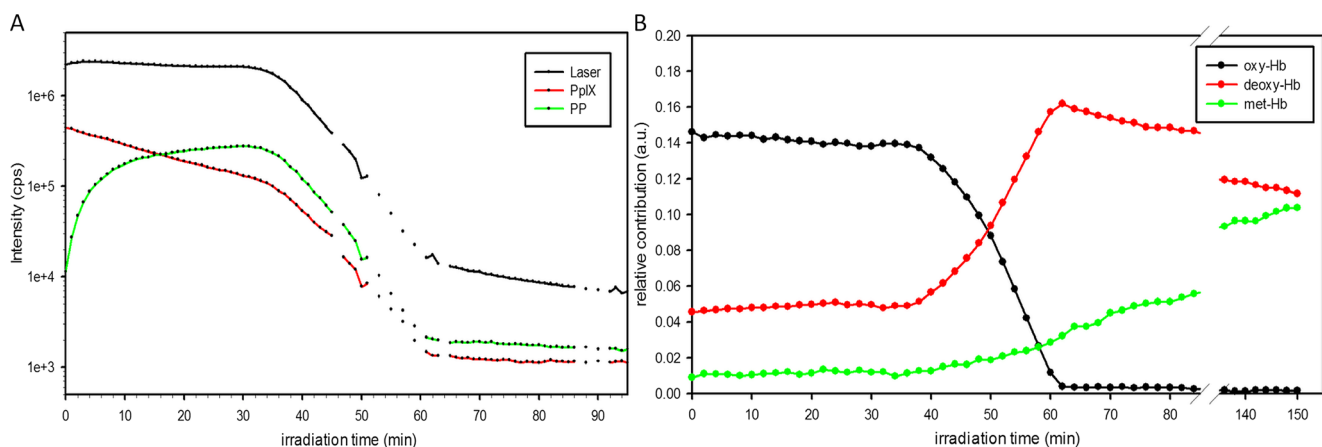


Figure 5. Results of experiments with washed erythrocytes. Graph A: Time-dependent signals of transmitted treatment light (black line), PpIX fluorescence (red line) and PP fluorescence (green line). Graph B: Time-dependent fit parameters for the contributions of oxy-Hb (black line), deoxy-Hb (red line) and met-Hb (green line).

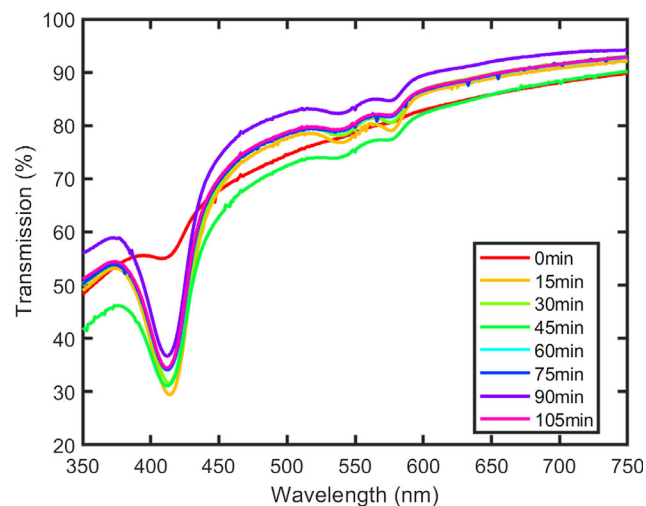


Figure 6. Transmission spectra of the transparent component of centrifuged samples from phantoms with washed erythrocytes prior to and at different times after the start of irradiation.

deviations within the y - z -plane, while the signal increases more than 10-fold if the fiber tips get in contact due to angular deviation within the y - x -plane. This should be kept in mind during treatment planning. Of course, it will always be intended to plan the fiber trajectories as parallel to each other as possible, but the location of vulnerable structures and larger blood vessels frequently require some deviation from this strategy. It becomes obvious that unavoidable angular deviations should be implemented under careful consideration of the relative positions of adjacent fibers. Fortunately, none of these deviations from the treatment plan lead to a signal decrease by more than a factor of 2, as long as the shortest distance between the fibers is close to 10 mm. The strong signal increase resulting from angular deviations within the y - x -plane (Fig. 2F) would not impede PDT as long as dose-volume histograms indicate sufficient tumor coverage, but it could produce undue tissue heating and should, therefore, be avoided.

The slopes of the distance-dependent fluorescence signals (Fig. 2A,B) are considerably less steep than the slopes of the corresponding treatment light transmission signals. This is due to

the somewhat lower absorption and scattering at the emission wavelength compared to the excitation wavelength. As a consequence, both signals decrease with increasing distance, but the fluorescence intensity less so than the transmitted treatment light. Fig. 2C, clearly indicates the ratio of the corresponding peak heights detected for parallel diffusers and the parameter combination μ_a of 0.07 mm^{-1} and μ_s' of 2.3 mm^{-1} , normalized to 1 for the used “standard conditions” at 10 mm separation.

A closer look at the μ_s' variations of the distance-dependent signals in Fig. 2B (at a fixed absorption) shows converging curves at a shorter distance and even crossovers. This is to be expected, as multiple scatter may return light from larger distances, an effect which also leads to increased light intensities underneath the tissue surface if scatter dominates absorption (24).

Provided the fiber-based signal detection is carefully calibrated, Fig. 2A,B allow deducing the expected absolute signal intensities for a given interfiber distance for both the laser light transmission and the PpIX fluorescence. As the curves are rather steep, the interfiber distance has to be known precisely to draw quantitative conclusions: an uncertainty of 1 mm can lead to a 2-fold higher or lower intensity. On the other hand, a significantly higher absorption than planned has an even stronger influence on the measured signals. If the treatment planning was done with assuming $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ for instance, but in fact was $\mu_a = 0.07 \text{ mm}^{-1}$, fluorescence and treatment light signals are reduced by a factor of 20–40 (at 10 mm fiber distance). If the transmission signal is significantly (about 10-fold) lower than expected, the suspicion of having induced some capillary bleeding may be justified. Lilge *et al.* (10,25) reported to local changes in the tissue optical properties following iPDT for intracranial VX2 tumors, referring to local hemorrhage around fiber tips, vasodilatation, vasoconstriction and small changes in blood content in the tissue as possible explanations. The fibers concerned should then be given treatment light as soon as possible to minimize the loss of PDT efficiency by blood absorption and hemoglobin transformation. A final judgment of the relevance of such assumptions will be possible, as soon as sufficient clinical data are available.

In interstitial photodynamic therapy of brain tumors, several cylindrical diffuser fibers are placed into the tumor (11). For all fiber pairs, transmission and fluorescence measurements can be performed and the average optical tissue parameters and PpIX fluorescence can be calculated. For this evaluation, knowledge of the 3D coordinates of the fiber trajectories are required. If such spectral measurements are performed before the start of irradiation, the information can be used to adjust light dosimetry and thus to perform a patient individualized therapy. A similar approach has previously been described by Finlay *et al.* (26) for iPDT of the prostate, where isotropic emitters and detectors are moved along the trajectories within transparent catheters. The authors could measure the photosensitizer concentration by recording absorption spectra because the photosensitizer used has a higher absorption at longer wavelengths (MLu absorbs at 735 nm). This is not a realistic option for PpIX, but the fluorescence at 700 nm can easily be detected and when the tolerable range of signal intensities prior to and after PDT (then reduced via photobleaching) is known, appropriate conclusions may be drawn, for example, to prolong irradiation, if photobleaching is not achieved to a sufficient degree.

Influence of blood absorption during PDT

During interstitial PDT of malignant glioma, it was previously observed that the transmission of laser light at 635 nm between adjacent cylindrical diffuser fibers (ca. 10 mm apart) usually stays constant over the 1 h irradiation time with 200 mW cm^{-1} diffuser length (11). But there are also cases, where a gradual decrease in laser light transmission between fibers could be observed. Sometimes there was hardly any signal detectable after PDT. One may speculate that during insertion of the diffuser fibers into the tumor, some capillaries may be ruptured and cause some bleeding around the fiber tips. However, a continuous whole blood layer would have to become more than $300 \mu\text{m}$ thick in order to explain a 90% loss of transmission (27). An equivalent signal loss would be induced by an increase in blood volume-fraction in the entire tissue, for example, from 4% to about 11%, as obtained from calculations for a point source, diffusion approximation and $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ and $\mu_s' = 2 \text{ mm}^{-1}$, which corresponds reasonably well with Fig. 2A. A similar trend could be induced by an oxygenation of hemoglobin within the treated volume. Such an effect has, in fact, been claimed as indicated in the introduction (14,15) and attributed to the interaction of a photosensitizer with hemoglobin, which leads to the formation of deoxy-Hb and met-Hb at the cost of initially dominating oxy-Hb. Finlay *et al.* also (26) reported on a PDT-induced increase of deoxy-Hb detected by white light absorption spectroscopy. Met-Hb can also be induced by heating to above 60°C . We could exclude thermal met-Hb formation in our experimental conditions by detecting no changes in Hb signals at all if PpIX was not added to the phantom (data not shown).

Under “regular” conditions during PpIX-based iPDT, the photosensitizer PpIX inside the tumor cells is well separated from the hemoglobin inside erythrocytes traveling in blood vessels. In addition, as long as there is perfusion, there will always be new, well-oxygenated, hemoglobin continuously replacing any deoxy-Hb. If there is some interstitial bleeding, however, such erythrocytes might potentially remain in the treatment region and some extracellular PpIX might then interact with these erythrocytes. Our experiments with washed erythrocytes are in accordance with the assumption that as long as the hemoglobin is well packed in erythrocytes, there is little to no access of singlet oxygen to the hemoglobin in the erythrocytes. Transmission stays rather stable. Meanwhile, PpIX is clearly undergoing some photobleaching, obviously consuming oxygen dissolved in the surrounding. It takes considerable time (at least 20 min under our experimental conditions) to allow the photosensitizer sufficient access to the hemoglobin. Extracts of the sample clearly show ongoing hemolysis at this time (Fig. 6). Interestingly, once the erythrocytes are destroyed, the hemoglobin deoxygenation occurs at a rate at least as fast as in the case of lysed blood. This is astonishing because the PpIX has already been photobleached to below 20% at this time. The only plausible explanation for this observation we can think of is that most of the dissolved oxygen has been used up at this time, and the further generation of singlet oxygen is then restricted to the conversion of oxygen bound in hemoglobin, seeing a steeper O_2 gradient. In two other independent experiments on hemoglobin samples using the same procedure, the obtained composition parameters showed a very similar behavior in each case (see Supporting Information, Figs. S1 and S2). Only the time after which singlet oxygen

in the erythrocytes receives access to hemoglobin varies between 20 and 40 min among the experiments.

The observation of PDT-induced formation of deoxy-Hb and met-Hb in optical tissue phantoms with blood may have very relevant clinical implications. If the mechanical insult on the brain tumor tissue during insertion of the light diffuser fibers induces some hemorrhage, tissue absorption may not only increase due to the increased blood volume fraction but also by the formation of much stronger absorbing deoxy-Hb and met-Hb during the subsequent irradiation. As a consequence, one should aim for minimizing the time delay between fiber insertion and the start of irradiation. This minimizes both effects. Monitoring of the laser light transmission between light diffusers before and after irradiation provides valuable information on whether and how severely tissue absorption may have increased. A systematic recording of such events for multiple patients should finally clarify the relative contributions of an increase in blood volume fraction and PDT-induced effects to increases in tissue absorption. If an intracavity PDT is to be performed after tumor resection, it must be ensured before starting the irradiation that as little blood as possible is present on the cavity walls because potentially similar conversion processes can be induced during irradiation. One should mention that tissue hypoxia might also lead to increased absorption due to an increased proportion of deoxy-Hb with implications for treatment efficacy (28).

The fits of pure hemoglobin spectra to the measured white light transmission spectra were of limited quality. One possible reason is the probe geometry, which does not allow for recording well-controlled, plain absorption or transmission spectra. The average light path length will vary with absorption, underestimating stronger absorption due to a reduction in effective path length. This deficit might be minimized by applying a more elaborate analysis, for example, as presented by Finlay and Foster in (29). However, the qualitative differences between lysed blood and intact erythrocytes would not change. Here, we were not interested in quantifying blood oxygen saturation in untreated tissue, but in identifying any PDT-induced changes in hemoglobin absorption at 635 nm. Another reason is the relatively restricted emission bandwidth of the white light LED with rather limited intensities at short and long wavelengths. The absolute values of the contributions of the different hemoglobin species should therefore not be overinterpreted in a quantitative manner.

The validity of the phantom experiments is limited, as vital biological tissue may be discussed as follows: In vital tissue, photosensitizer and hemoglobin are well separated, which was also the case in half of the comparative phantom experiments. The liquid phantom samples were prepared in 50 ml containers and were gently stirred continuously. This volume is considerably larger than the typically irradiated tissue volume during iPDT (4–8 mL per fiber). On the other hand, in vital tissue, the blood fraction within the tissue is connected to blood vessels and is therefore continuously exchanged, which means that it will not take part in the dynamic PDT-induced effects. Only hemorrhage will lead to amounts of blood resting in a certain tissue region, starting from very low blood volume fractions, while in the phantoms the blood volume fraction is constant and recruited from the same 50 ml volume over the full observation time. These differences may partly compensate each other in terms of the time-dependent signal evolution. Another difference is the exposure to PpIX. In our experiments, PpIX was added shortly before the start of irradiation. Still, there were a few minutes of

“drug light interval” and may have led to the different lag times of erythrocyte destruction observed in Fig. 5. If PpIX had some time to diffuse into erythrocytes, the time to onset of hemoglobin transformation may be shorter. It is unknown, how much of extracellular PpIX is present in viable glioblastoma tissue. In any case, the sooner irradiation starts after insertion of the fibers, the less the risk of early hemoglobin transformation, absorption increase and insufficient treatment.

We are confident that the phantom experiments are realistic enough to point out a possibly important phenomenon to be considered for iPDT. The details of the kinetics of the onset and speed of hemoglobin deoxygenation and met-Hb formation may be different, but that it can occur in case of hemorrhage and that it can vary significantly alter the light distribution and thus affect the therapeutic irradiation should be well considered, and the effect should be monitored intraoperatively.

In summary, this manuscript shows:

- 1 Light transmission between cylindrical diffuser fibers as investigated in this work did not strongly depend on relative fiber positions or orientations as long as the minimal distance between the diffuser regions remained unchanged.
- 2 As fluorescence light undergoes less absorption and scattering than treatment light, the relative intensity of the PpIX fluorescence signal increases with increasing distance.
- 3 PDT can induce deoxygenation and met-Hb formation in immobilized blood (after hemorrhage for example), which strongly increases the absorption at 635 nm. This may contribute to the clinically observed occasional loss of treatment light transmission between adjacent diffuser fibers during PDT.

Acknowledgement—We would like to thank Ahmed Saleh (German University Cairo) for his support in carrying out the experimental measurements. Financial support from photodynamic GmbH & Co. KG and support from DFG Graduiertenkolleg GRK 2274 are gratefully acknowledged.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article:

Figure S1. Results of independent replicates with lysed erythrocytes to the results of Figure 4 of the main publication. In the two left graphs, the time-dependent signals of transmitted treatment light (black lines), PpIX fluorescence (red line) and PP fluorescence (green line) are depicted. The right graphs show the time-dependent fit parameters for the contributions of oxy-Hb (black line), deoxy-Hb (red line) and met-Hb (green line).

Figure S2. Results of independent replicates with washed erythrocytes to the results of Figure 5 of the main publication. In the two left graphs, the time-dependent signals of transmitted treatment light (black lines), PpIX fluorescence (red line) and PP fluorescence (green line) are depicted. The right graphs show the time-dependent fit parameters for the contributions of oxy-Hb (black line), deoxy-Hb (red line) and met-Hb (green line).

REFERENCES

1. FDA. Aminolevulinic acid hydrochloride, known as ALA HCl (Gleolan, NX Development Corp.) as an optical imaging agent indicated

- in patients with gliomas. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm562645.htm> 2017.
2. Stepp, H. and W. Stummer (2018) 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg. Med.* **50**(5), 399–419.
 3. Lakomkin, N. and C. G. Hadjipanayis (2018) Fluorescence-guided surgery for high-grade gliomas. *J. Surg. Oncol.* **118**(2), 356–361.
 4. Stummer, W., J. C. Tonn, C. Goetz, W. Ullrich, H. Stepp, A. Bink, T. Pietsch and U. Pichlmeier (2014) 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurgery* **74**(3), 310–319.
 5. Diez, Valle R., S. Tejada Solis, M. A. Idoate Gastarena, R. Garcia de Eulate, P. Dominguez Echavari and J. Aristu Mendiroz (2011) Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience. *J. Neurooncol.* **102**(1), 105–113.
 6. Johansson, A., G. Palte, O. Schnell, J. C. Tonn, J. Herms and H. Stepp (2010) 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol.* **86**(6), 1373–1378.
 7. Mahmoudi, K., K. L. Garvey, A. Bouras, G. Cramer, H. Stepp, J. G. Jesu Raj, D. Bozec, T. M. Busch and C. G. Hadjipanayis (2019) 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J. Neurooncol.* **141**(3), 595–607.
 8. Johansson, A., F. W. Kreth, W. Stummer and H. Stepp (2010) Interstitial photodynamic therapy of brain tumors. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**(4), 841–853.
 9. Dupont, C., M. Vermandel, H. A. Leroy, M. Quidet, F. Lecomte, N. Delhem, S. Mordon and N. Reyns (2019) INtraoperative photoDYNAMIC Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery* **84**(6), E414–E419.
 10. Lilge, L. and B. C. Wilson (1998) Photodynamic therapy of intracranial tissues: a preclinical comparative study of four different photosensitizers. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **16**(2), 81–91.
 11. Rühm, A., H. Stepp, W. Beyer, G. Hennig, T. Pongratz, R. Sroka, O. Schnell, J. C. Tonn and F. W. Kreth (2014) 5-ALA based photodynamic management of glioblastoma. *Proc. SPIE* **8928**, 89280E.
 12. Johansson, A., F. Faber, G. Kniebuhler, H. Stepp, R. Sroka, R. Egensperger, W. Beyer and F. W. Kreth (2013) Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg. Med.* **45**(4), 225–234.
 13. Andrade, C. T., M. S. Nogueira, S. C. Kanick, K. Marra, J. Gunn, J. Andreozzi, K. Samkoe, C. Kurachi and B. W. Pogue (2016) Optical spectroscopy of radiotherapy and photodynamic therapy responses in normal rat skin shows vascular breakdown products. Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy XXV. *Proc. SPIE* **9694**, 969410.
 14. Hamada, R., E. Ogawa and T. Arai (2019) Continuous optical monitoring of red blood cells during a photosensitization reaction. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.* **37**(2), 110–116.
 15. Larsen, E. L., L. L. Randeberg, O. A. Gederaas, C. J. Arum, A. Hjelde, C. M. Zhao, D. Chen, H. E. Krokan and L. O. Svaasand (2008) Monitoring of hexyl 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy in rat bladder cancer by optical spectroscopy. *J. Biomed Opt.* **13**(4), 044031.
 16. Hasselbalch, K. A. (1909) Untersuchungen ueber die Wirkung des Lichtes auf Blutfarbstoffe und rote Blutkoerperchen wie auch ueber optische Sensibilisation fuer die Lichtwirkung. *Biochem. Zeitschr.* **xix**, 435.
 17. Randeberg, L. L., J. H. Bonesronning, M. Dalaker, J. S. Nelson and L. O. Svaasand (2004) Methemoglobin formation during laser induced photothermolysis of vascular skin lesions. *Lasers Surg. Med.* **34**(5), 414–419.
 18. Gebhart, S. C., W. C. Lin and A. Mahadevan-Jansen (2006) In vitro determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling. *Phys. Med. Biol.* **51**(8), 2011–2027.
 19. Yaroslavsky, A. N., P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich and H. J. Schwarzmaier (2002) Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Phys. Med. Biol.* **47**(12), 2059–2073.
 20. Beck, T. J., W. Beyer, T. Pongratz, W. Stummer, R. Waidelich, H. Stepp, S. Wagner and R. Baumgartner (2003) Clinical determination of tissue optical properties in vivo by spatially resolved reflectance measurements. *Photon Migration Diffuse Light Imag.* **5138**, 96–105.
 21. Beck, T. J., F. W. Kreth, W. Beyer, J. H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, W. Stummer and R. Baumgartner (2007) Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.* **39**(5), 386–393.
 22. Eisel, M., S. Ströbl, T. Pongratz, H. Stepp, A. Rühm and R. Sroka (2018) Investigation of optical properties of dissected and homogenized biological tissue. *J. Biomed. Opt.* **23**(9), 1–9.
 23. Marois, M., J. Bravo, S. C. Davis and S. C. Kanick (2016) Characterization and standardization of tissue-simulating protoporphyrin IX optical phantoms. *J. Biomed. Opt.* **21**(3), 35003.
 24. Jacques, S. L. (2010) How tissue optics affect dosimetry of photodynamic therapy. *J. Biomed. Opt.* **15**(5), 051608.
 25. Lilge, L., M. Sepers, J. Park, C. O'Carroll, P. Pournazari, J. Prosser and B. C. Wilson (1997) Preclinical studies of photodynamic therapy of intracranial tissues. *Proc. SPIE* **2972**, 64–73.
 26. Finlay, J. C., T. C. Zhu, A. Dimofte, D. Stripp, S. B. Malkowicz, R. Whittington, J. Miles, E. Glatstein and S. M. Hahn (2014) In vivo determination of the absorption and scattering spectra of the human prostate during photodynamic therapy. *Proc. SPIE* **5315**, 132–142.
 27. Markwardt, N. A., N. Haj-Hosseini, B. Hollnburger, H. Stepp, P. Zelenkov and A. Rühm (2016) 405 nm versus 633 nm for protoporphyrin IX excitation in fluorescence-guided stereotactic biopsy of brain tumors. *J. Biophotonics* **9**(9), 901–912.
 28. Ahn, P. H., J. C. Finlay, S. M. Gallagher-Colombo, H. Quon, B. W. Jr O'Malley, G. S. Weinstein, A. Chalian, K. Malloy, T. Sollecito, M. Greenberg, C. B. 2nd Simone, S. McNulty, A. Lin, T. C. Zhu, V. Livolsi, M. Feldman, R. Mick, K. A. Cengel and T. M. Busch (2018) Lesion oxygenation associates with clinical outcomes in pre-malignant and early stage head and neck tumors treated on a phase I trial of photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **21**, 28–35.
 29. Finlay, J. C. and T. H. Foster (2004) Hemoglobin oxygen saturations in phantoms and in vivo from measurements of steady-state diffuse reflectance at a single, short source-detector separation. *Med. Phys.* **31**(7), 1949–1959.



LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. Heckl *et al.*, ‘Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin’, *J. Biophotonics*, p. e202000461, 2021, doi: 10.1002/jbio.202000461.
- [2] C. Heckl, M. Aumiller, A. Rühm, R. Sroka, and H. Stepp, ‘Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy’, *Photochem. Photobiol.*, vol. 96, no. 2, pp. 388–396, 2020, doi: 10.1111/php.13203.
- [3] K.-Z. Liu, M.-H. Shi, and H. H. Mantsch, ‘Molecular and chemical characterization of blood cells by infrared spectroscopy: A new optical tool in hematology’, *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 404–412, Nov. 2005, doi: 10.1016/j.bcnd.2005.06.009.
- [4] C. Heckl *et al.*, ‘Spectroscopic methods to quantify molecules of the heme–biosynthesis pathway: A review of laboratory work and point-of-care approaches’, *Transl. Biophotonics*, 2021, doi: 10.1002/tbio.202000026.
- [5] A. Jurban, ‘Pulse oximetry’, *Crit Care*, vol. 19, no. 1, pp. 272–278, 2015.
- [6] G. Hennig *et al.*, ‘Non-invasive detection of iron deficiency by fluorescence measurement of erythrocyte zinc protoporphyrin in the lip’, *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10776, 2016, doi: 10.1038/ncomms10776.
- [7] H. Zeng, C. MacAulay, B. Palcic, and D. I. McLean, ‘Laser-induced changes in autofluorescence of in vivo skin’, *SPIE Proc Laser-Tissue Interact. IV*, vol. 1882, pp. 278–290, 1993.
- [8] J. Dybas, M. J. Bokamper, K. M. Marzec, and P. J. Mak, ‘Probing the structure-function relationship of hemoglobin in living human red blood cells’, *Spectrochim. Acta Part A*, vol. Molecular and Biomolecular Spectroscopy, no. 239, pp. 1386–1425.
- [9] A. M. M. Attia, F. A. A. Ibrahim, N. A. Abd El-Latif, S. W. Aziz, S. A. Abdelmottaleb Moussa, and M. S. Elalfy, ‘Determination of Human Hemoglobin Derivatives’, *Hemoglobin*, vol. 39, no. 5, pp. 371–374, 2015.
- [10] P. S. Klinken, ‘Red Blood Cells’, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 34, pp. 1513–1518, 2001.
- [11] M. Balwani *et al.*, ‘Acute hepatic porphyrias: Recommendations for evaluation and long-term management’, *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 66, no. 4, pp. 1314–1322, 2017, doi: 10.1002/hep.29313.
- [12] G. Layer, J. Reichelt, D. Jahn, and D. W. Heinz, ‘Structure and function of enzymes in heme biosynthesis’, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 19, no. 6, pp. 1137–1161, 2010, doi: 10.1002/pro.405.
- [13] D. Shemin and D. Rittenberg, ‘The Utilization of Glycine for the Synthesis of a Porphyrin’, *J. Biol. Chem.*, vol. 159, no. 2, pp. 567–568, 1945, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52819-8.
- [14] D. Shemin and S. Kumin, ‘The Mechanism of Porphyrin Formation’, *J. Biol. Chem.*, vol. 198, no. 2, pp. 827–837, 1952, doi: 10.1016/S0021-9258(18)55541-1.
- [15] D. Shemin and C. S. Russell, ‘d-Aminolevulinic Acid, its Role in the Bio-Synthesis of Porphyrins and Purins’, *J. Am. Chem. Soc.*, no. 75, pp. 4873–4874, 1953.
- [16] R. Schmid and D. Shemin, ‘The enzymatic formation of porphobilinogen from d-aminolevulinic acid and its conversion to protoporphyrin’, *J Am Chem Soc*, vol. 77, pp. 506–507, 1955.
- [17] G. Burton, P. E. Fagerness, S. Hosozawa, P. M. Jordan, and A. I. Scott, ‘¹³C n.m.r. evidence for a new intermediate, pre-uroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and III’, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 5, pp. 202–204, 1979.
- [18] J. H. Mathewson and A. H. Corwin, ‘Biosynthesis of Pyrrole Pigments : A Mechanism for Porphobilinogen Polymerization’, *J Am Chem Soc*, vol. 83, no. 1, pp. 135–137, 1961.

-
- [19] P. M. Shoolingin-Jordan, 'Porphobilinogen Deaminase and Uroporphyrinogen III Synthase: Structure, Molecular Biology, and Mechanism', *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 27, no. 2, pp. 181–195, 1995.
- [20] A. Goldberg, H. Ashenbrucker, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe, 'Studies on the Biosynthesis of Heme In Vitro by Avian Erythrocytes', *Blood*, vol. 11, no. 9, pp. 821–833, 1956.
- [21] Y.-W. Lin and J. Wang, 'Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review', *J. Inorg. Biochem.*, vol. 129, pp. 162–171, 2013.
- [22] I. Hamza and H. A. Dailey, 'One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans', *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1823, no. 9, pp. 1617–1632, 2012.
- [23] R. Pottier, B. Krammer, H. Stepp, and R. Baumgartner, *Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006.
- [24] G. Hennig, 'Fluoreszenz von Porphyrinen zur klinischen Anwendung in Diagnostik und Therapie', Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2014.
- [25] M. Balwani and R. J. Desnick, 'The porphyrias: advances in diagnosis and treatment', *Blood*, vol. 120, no. 23, pp. 4496–4504, 2012.
- [26] J. F. Koepke and J. A. Koepke, 'Reticulocytes', *Clin. Lab. Haematol.*, vol. 8, pp. 169–179, 1986.
- [27] E. Daugas, C. Cande, and G. Kroemer, 'Erythrocytes: Death of a mummy', *Cell Death Differ.*, vol. 8, pp. 1131–1133, 2001.
- [28] Z.-W. Zhang *et al.*, 'Red Blood Cell Extrudes Nucleus and Mitochondria Against Oxidative Stress', *IUBMB Life*, vol. 63, no. 7, pp. 560–565, 2011.
- [29] R. P. Sarma, 'Red Cell Indices', in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 3rd edition., Boston: Butterworth Publishers, 1990, pp. 720–723.
- [30] L. Kaestner and A. Bogdanova, *The red cell life-cycle from erythropoiesis to clearance*. Lausanne: Frontiers Media, 2019.
- [31] J. D. Blecher, J. D. Beckman, G. Balla, J. Balla, and G. Vercellotti, 'Heme Degradation and Vascular Injury', *Antioxid. REDOX Signal.*, vol. 12, no. 2, pp. 233–248, 2010.
- [32] R. P. Rother, L. Bell, P. Hillmen, and M. T. Gladwin, 'The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin', *JAMA*, vol. 293, no. 13, pp. 1653–1662, 2005.
- [33] F. F. Bun and J. H. Jandl, 'Exchange of Heme among Hemoglobins and between Hemoglobin and Albumin', *J. Biol. Chem.*, vol. 243, no. 3, pp. 465–475, 1968.
- [34] B. Faivre, P. Menu, P. Labrude, and C. Vigneron, 'Hemoglobin Autooxidation/Oxidation Mechanisms and Methemoglobin Prevention or Reduction Processes in the Bloodstream Literature review and outline of autooxidation reaction', *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, vol. 26, no. 1, pp. 17–26, 1998.
- [35] M. R. Waterman, 'Spectral Characterization of Human Hemoglobin and its Derivatives', *Methods Enzymol.*, vol. 52, pp. 456–463, 1978.
- [36] R. Benesch, R. E. Benesch, and G. MacDuff, 'Spectra of Deoxyhemoglobin in the Soret Region', *Science*, vol. 144, pp. 68–69, 1964.
- [37] L. H. Gray, M. R. Lemberg, D. C. Nicholson, and T. K. With, '26. Pyrrole Pigments and Related Compounds', in *Handbook of Biological Data*, W. S. Spector, Ed. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company, 1956, pp. 32–36.
- [38] W. G. Zijlstra, A. Buursma, and Meeuwssen-van der Roest, W. P., 'Absorption Spectra of Human Fetal and Adult Oxyhemoglobin, De-Oxyhemoglobin, Carboxyhemoglobin, and Methemoglobin', *Clin Chem*, vol. 37, no. 9, pp. 1633–1638, 1991.
- [39] M. Gouterman, 'Spectra of Porphyrins', *J. Mol. Spectrosc.*, vol. 6, pp. 138–163, 1961.
- [40] M. R. Dayer, A. A. Moosavi-Movahedi, and M. S. Dayer, 'Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four-Orbital Model of Gouterman', *Protein Pept. Lett.*, vol. 17, no. 473–479, 2010.

-
- [41] M. Uttamlal and A. Sheila Holmes-Smith, 'The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins', *Chem. Phys. Lett.*, vol. 454, no. 4–6, pp. 223–228, 2008, doi: 10.1016/j.cplett.2008.02.012.
- [42] M. Rosenfeld and D. M. Surgenor, 'Methemalbumin Interaction Between Human Serum Albumin and Ferriprotophyrin IX', *J. Biol. Chem.*, vol. 183, pp. 663–677, 1950.
- [43] C. A. Daniels, C. Wagner, R. C. Hartmann, and Jenkins, D. E., Jr., 'Spectral absorption characteristics of human methemalbumin', *Am J Clin Pathol*, vol. 47, no. 5, pp. 631–637, 1967.
- [44] 'https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.svg'. Jul. 04, 2021.
- [45] V. Jeney, G. Balla, and J. Balla, 'Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis', *Front Physiol*, vol. 5, p. 379, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00379.
- [46] J. J. Robertson, E. Brem, and A. Koyfman, 'The Acute Hemolytic Anemias: The Importance of Emergency Diagnosis and Management', *J Emerg Med*, vol. 53, no. 2, pp. 202–211, 2017, doi: 10.1016/j.jemermed.2017.02.018.
- [47] I. A. Tabbara, 'Hemolytic anemias. Diagnosis and management', *Med Clin North Am*, vol. 76, no. 3, pp. 649–668, 1992.
- [48] M. T. Gladwin, T. Kanas, and D. B. Kim-Shapiro, 'Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease', *J Clin Invest*, vol. 122, no. 4, pp. 1205–1208, 2012, doi: 10.1172/JCI62972.
- [49] D. R. Janz and L. B. Ware, 'The role of red blood cells and cell-free hemoglobin in the pathogenesis of ARDS', *J Intensive Care*, vol. 3, p. 20, 2015, doi: 10.1186/s40560-015-0086-3.
- [50] M. Frimat, I. Boudhabhay, and L. T. Roumenina, 'Hemolysis Derived Products Toxicity and Endothelium: Model of the Second Hit', *Toxins Basel*, vol. 11, no. 11, 2019, doi: 10.3390/toxins11110660.
- [51] M. Adamzik, T. Hamburger, F. Petrat, J. Peters, H. de Groot, and M. Hartmann, 'Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome', *Crit Care*, vol. 16, no. 4, p. R125, 2012, doi: 10.1186/cc11425.
- [52] J. R. Neal, E. Quintana, R. B. Pike, J. D. Hoyer, L. D. Joyce, and G. Schears, 'Using Daily Plasma-Free Hemoglobin Levels for Diagnosis of Critical Pump Thrombus in Patients Undergoing ECMO or VAD Support', *J. Extra Corpor. Technol.*, vol. 47, pp. 103–108, 2015.
- [53] G. E. Hanks, M. Cassell, R. N. Ray, and Chaplin, H., Jr., 'Further modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma; definition of a new range of normal values', *J Lab Clin Med*, vol. 56, pp. 486–498, 1960.
- [54] M. Lammers and A. M. Gressner, 'Immunonephelometric quantification of free haemoglobin', *J Clin Chem Clin Biochem*, vol. 25, no. 6, pp. 363–367, 1987.
- [55] E. C. Elson, L. Ivor, and N. Gochman, 'Substitution of a non-hazardous chromogen for benzidine in the measurement of plasma hemoglobin', *Am J Clin Pathol*, vol. 69, no. 3, pp. 354–355, 1978.
- [56] G. L. Moore, M. E. Ledford, and A. Merydith, 'A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl', *Biochem Med*, vol. 26, no. 2, pp. 167–173, 1981.
- [57] M. Harboe, 'A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry', *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 11, no. 1, pp. 66–70, 1959, doi: 10.3109/00365515909060410.
- [58] D. A. Noe, V. Weedn, and W. R. Bell, 'Direct spectrophotometry of serum hemoglobin: an Allen correction compared with a three-wavelength polychromatic analysis', *Clin Chem*, vol. 30, no. 5, pp. 627–630, 1984.
- [59] V. F. Fairbanks, S. C. Ziesmer, and P. C. O'Brien, 'Methods for Measuring Plasma Hemoglobin in Micromolar Concentration Compared', *Clin Chem*, vol. 38, no. 1, pp. 132–140, 1992.

-
- [60] S. E. Kahn, B. F. Watkins, and E. W. Bermes, 'An Evaluation of A Spectrophotometric Scanning Technique for Measurement of Plasma Hemoglobin', *Ann. Clin Lab Sci*, vol. 11, no. 2, pp. 126–131, 1981.
- [61] A. Lang, 'Spektroskopische Quantifizierung von Molekülen des Humanen Häm-Metabolismus', PhD Thesis, München, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2018.
- [62] M. Paal, A. Lang, G. Hennig, M. L. Buchholz, R. Sroka, and M. Vogeser, 'A second derivative fitting algorithm for the quantification of free hemoglobin in human plasma', *Clin. Biochem.*, vol. 56, pp. 62–69, 2018, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.04.007.
- [63] A. Savitzky and M. J. E. Golay, 'Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures', *Anal. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1627–1639, 1964.
- [64] A. Lang *et al.*, 'Rapid spectrophotometric quantification of urinary porphyrins and porphobilinogen as screening tool for attacks of acute porphyria', *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 5, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1117/1.JBO.23.5.055006.
- [65] Z. Friedman-Mor, J. Chalon, F. Gorstein, H. Turndorf, J. V. Chuba, and L. R. Orkin, 'Abnormal Heme-Protein Patterns in Hemorrhagic Shock', *J. Trauma*, vol. 16, no. 2, pp. 104–107, 1978.
- [66] J. Phillips and A. C. Henderson, 'Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis', *Am. Fam. Physician*, vol. 98, no. 6, pp. 354–361, 2018.
- [67] 'European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. London, UK: Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP), 2011.'
- [68] O. Raab, 'Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien', *Z. Für Biol.*, vol. 39, pp. 524–526, 1900.
- [69] H. v. Tappeiner and A. Jodlbauer, 'Über die Wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme', *Dtsch Arch Klin Med*, vol. 80, pp. 427–487, 1904.
- [70] H. v. Tappeiner and A. Jesionek, 'Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen', *Muench Med Wochensbr*, vol. 47, pp. 2042–2044, 1903.
- [71] P. Babilas, S. Schreml, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, 'Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art', *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 26, pp. 118–132, 2010.
- [72] C. Fritsch, G. Goerz, and T. Ruzicka, 'Photodynamic Therapy In Dermatology', *Arch Dermatol*, vol. 134, no. 2, pp. 207–214, 1998, doi: 10.1001/archderm.134.2.207.
- [73] C. Queiros, P. M. Garrido, J. Maia Silva, and P. Filipe, 'Photodynamic therapy in dermatology: Beyond current indications', *Dermatol Ther*, p. e13997, 2020, doi: 10.1111/dth.13997.
- [74] A. R. Azzouzi *et al.*, 'TOOKAD((R)) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer', *BJU Int*, vol. 112, no. 6, pp. 766–774, 2013, doi: 10.1111/bju.12265.
- [75] T. Y. Lee, Y. K. Cheon, and C. S. Shim, 'Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer', *Clin Endosc*, vol. 46, no. 1, pp. 38–44, 2013, doi: 10.5946/ce.2013.46.1.38.
- [76] M. Boen, J. Brownell, P. Patel, and M. M. Tsoukas, 'The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review', *Am J Clin Dermatol*, vol. 18, no. 3, pp. 311–321, 2017, doi: 10.1007/s40257-017-0255-3.
- [77] D. M. Ozog *et al.*, 'Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide', *Dermatol Surg*, vol. 42, no. 7, pp. 804–827, 2016, doi: 10.1097/DSS.0000000000000800.
- [78] F. Cieplik *et al.*, 'Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't', *Crit Rev Microbiol*, vol. 44, no. 5, pp. 571–589, 2018, doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
- [79] H. Stepp and W. Stummer, '5-ALA in the management of malignant glioma', *Lasers Surg Med*, vol. 50, no. 5, pp. 399–419, 2018, doi: 10.1002/lsm.22933.
- [80] M. Korbelik, 'Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy', *J. Clin. Laser Med. Surg.*, vol. 14, no. 5, pp. 329–334, 1996.
- [81] S. O. Gollnick, 'Photodynamic Therapy and Antitumor Immunity', *JNCCN*, vol. 10, no. 2, pp. 40–43, 2012.

-
- [82] S. R. Ennis *et al.*, ‘Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain’, *Brain Res.*, vol. 959, pp. 226–234, 2003, doi: 10.1016/s0006-8993(02)03749-6.
- [83] P. Agostinis *et al.*, ‘Photodynamic Therapy of Cancer: An Update’, *Ca Cancer J Clin*, vol. 61, pp. 250–281, 2011.
- [84] C. Gutiérrez García-Rodrigo, C. Pellegrini, A. Piccioni, M. Maini, and M. C. Fargnol, ‘Long-term efficacy data for daylight-PDT’, *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, vol. 153, no. 6, pp. 800–805, 2018, doi: 10.23736/S0392-0488.18.05998-9.
- [85] T. J. Beck *et al.*, ‘Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX’, *Lasers Surg Med*, vol. 39, no. 5, pp. 386–393, 2007, doi: 10.1002/lsm.20507.
- [86] W. Stummer *et al.*, ‘Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report’, *J Neurooncol*, vol. 87, no. 1, pp. 103–109, 2008, doi: 10.1007/s11060-007-9497-x.
- [87] C. Dupont *et al.*, ‘INtraoperative photoDYnamic Therapy for GliOblastomas (INDYGO): study protocol for a phase I clinical trial’, 2019.
- [88] C. Dupont, S. Mordon, P. Deleporte, N. Reyns, and M. Vermandel, ‘A novel device for intraoperative photodynamic therapy dedicated to glioblastoma treatment’, *Future Oncol.*, 2017, doi: 10.2217/fo-2017-0261.
- [89] C. Dupont, N. Betrouni, S. R. Mordon, N. Reyns, and M. Vermandel, ‘5-ALA Photodynamic Therapy in Neurosurgery, Towards the Design of a Treatment Planning System: A Proof of Concept’, *Irbm*, vol. 38, no. 1, pp. 34–41, 2017, doi: 10.1016/j.irbm.2016.11.002.
- [90] S. Ströbl, ‘Untersuchungen zu optischen Glasfaserdiffusoren für medizinische Anwendungen’, PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2021.
- [91] S. Ströbl, M. Domke, A. Rühm, and R. Sroka, ‘Investigation of non-uniformly emitting optical fiber diffusers on the light distribution in tissue’, *Biomed Opt Exp*, vol. 11, no. 7, pp. 3601–3617, 2020.
- [92] G. S. Stoyanov, D. Dzhenkov, P. Ghenev, B. Iliev, Y. Enchev, and A. B. Tonchev, ‘Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment’, *Med. Oncol.*, vol. 35, no. 27, 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>.
- [93] D. Louis *et al.*, ‘The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary’, *Acta Neuropathol*, vol. 131, pp. 803–820, 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [94] R. Batash, N. Asna, P. Schaffer, N. Francis, and M. Schaffer, ‘Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review’, *Curr. Med. Chem.*, vol. 24, no. 27, pp. 3002–3009, 2017, doi: 10.2174/0929867324666170516123206.
- [95] R. Stupp *et al.*, ‘Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma’, *N Engl J Med*, vol. 352, pp. 987–996, 2005.
- [96] A. Rühm *et al.*, ‘5-ALA based photodynamic management of glioblastoma’, vol. 8928, p. 89280E, 2014, doi: 10.1117/12.2040268.
- [97] A. Johansson *et al.*, ‘Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis’, *Lasers Surg Med*, vol. 45, no. 4, pp. 225–234, 2013, doi: 10.1002/lsm.22126.
- [98] M. S. Thompson *et al.*, ‘Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements’, *Appl Opt*, vol. 44, no. 19, pp. 4023–4031, 2005, doi: 10.1364/ao.44.004023.
- [99] L. L. Randeberg, J. H. Bonesronning, M. Dalaker, J. S. Nelson, and L. O. Svaasand, ‘Methemoglobin formation during laser induced photothermolysis of vascular skin lesions’, *Lasers Surg Med*, vol. 34, no. 5, pp. 414–419, 2004, doi: 10.1002/lsm.20042.
- [100] E. L. P. Larsen *et al.*, ‘Monitoring of hexyl 5-aminolevulinate-induced photodynamic therapy in rat bladder cancer by optical spectroscopy’, *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 4, pp. 1–9, 2008, doi: 10.1117/1.2967909.

-
- [101] C. Teles de Andrade *et al.*, 'Optical spectroscopy of radiotherapy and photodynamic therapy responses in normal rat skin shows vascular breakdown products', vol. 9694, p. 969410, 2016, doi: 10.1117/12.2210988.
- [102] R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, 'Continuous Optical Monitoring of Red Blood Cells During a Photosensitization Reaction', *Photobiomodulation Photomed. Laser Surg.*, vol. 37, no. 2, 2005, doi: 10.1089/photob.2018.4513.
- [103] N. A. Markwardt *et al.*, 'Remission spectrometry for blood vessel detection during stereotactic biopsy of brain tumors', *J Biophotonics*, vol. 10, no. 8, pp. 1080–1094, 2017, doi: 10.1002/jbio.201600193.

DANKSAGUNG

Da mich bei meinen Projekten viele unterstützt haben, möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Ronald Sroka und meinen Betreuern Herbert Stepp und Adrian Rühm bedanken. Sie haben in mich das Vertrauen gesetzt, das für die Durchführung einer wissenschaftlichen Arbeit unabdingbar ist. Außerdem haben sie mich in unendlichen Diskussionen und Gesprächen mit ihrem Rat unterstützt und hin und wieder auf den richtigen Weg gebracht.

Auch den LFL-Doktoranden Alexander Lang, Max Eisel, Stephan Ströbl, Max Aumiller und Christian Freymüller möchte ich für ihre Unterstützung danken. Bei Alexander Lang möchte ich mich besonders bedanken, da er mich als Betreuer meiner Masterarbeit immer gefördert und unterstützt hat und mich letztendlich motiviert hat, der Forschung treu zu bleiben. Max Eisel und Max Aumiller möchte ich für jede Hilfe, die gemeinsame Zeit im gleichen Bürozimmer und die stets gute Radioplaylist danken. Für die langen und motivierenden Telefonate aus dem fernen Vorarlberg bedanke ich mich bei Stephan Ströbl, sowie für die gemeinsame unvergessliche Zeit bei der Bootsfahrt auf der Wolga. Außerdem danke ich Christian Freymüller, der mit mir den gleichen Weg aus der Fachhochschule München in die Forschung gegangen ist und mir in vielen Diskussionen viele neue Blickwinkel aufgezeigt hat.

Bei den Kollegen aus dem Laser-Forschungslabor Christian Homann, Thomas Pongratz und Cornelia Eberle möchte ich mich ebenfalls dafür bedanken, dass sie mich bei allen wissenschaftlichen, technischen und administrativen Problemen stets unterstützt und mir immer geduldig geholfen haben.

Mein Dank gilt auch Michael Paal und Michael Vogeser aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München, Großhadern. Vor allem bei Michael Paal möchte ich mich für das unermüdliche Messen von Proben und die unendlichen Diskussionen über die Ergebnisse, durch die ich unglaublich viel lernen konnte, bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Stefanie Quach und Niklas Thon aus der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums der Universität München, Großhadern, für ihre fachliche Unterstützung bedanken.

Und zu guter Letzt möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken. Ihr wart in den letzten Jahren immer geduldig mit mir und habt mich stets auf meinem Weg durch das Studium und im Leben unterstützt und begleitet. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft!

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Heckl, Christian
Geburtsdatum und Ort: 25.07.1991 in München

Berufserfahrung

10/2017 – 03/2021 Promotion (Dr. rer. biol. hum.) am Laser-Forschungslabor, Klinikum der Universität München („Spektroskopische Untersuchungen von Hämoglobin Formen in Blutplasma und biologischen Gewebe“)

08/2016 – 09/2017 Masterarbeit am Laser-Forschungslabor, Klinikum der Universität München („Evaluation einer spektroskopischen Nachweismethode für Porphyrine und Porphobilinogen in Urin“)

03/2015 – 06/2015 Bachelorarbeit bei Ketek GmbH, Modulentwicklung; („Charakterisierung von Silizium-Feldemitterspitzen als Elektronenquelle für eine miniaturisierte Röntgenquelle“). Anschließend Werksstudententätigkeit mit ähnlichem Betätigungsfeld bis 09/2015

03/2014 – 02/2015 Werkstudent an der OTH Regensburg im Labor für Mikrosensorik und Optoelektronik

09/2013 – 02/2014 Praxissemester bei Ketek GmbH, Modulentwicklung für Silizium-Drift Detektoren

09/2010 – 07/2011 Zivildienstleistender an der Friedel-Eder-Schule München

Schule & Studium

10/2015 – 09/2017 Master of Science | Photonik
Hochschule München

10/2011 – 09/2015 Bachelor of Science | Mikrosystemtechnik
Ostbayerische Technische Hochschule Regensburg

09/1997 – 07/2010 Grundschule, Realschule und Technische Fachoberschule
Fachhochschulreife in München

Wissenschaftliche Lehre

Betreuung wissenschaftlicher Arbeiten

Masterarbeit:

Fabian Bichl (Hochschule München, Masterstudiengang Photonik, Abgabe: 29.11.2019)
“*Untersuchung der Emissions- und Detektionscharakteristik zylindrischer Lichtapplikatoren*“

Bachelorarbeit:

Johanna Albrecht (Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Physik, Abgabe: 13.07.2020) „*Untersuchungen zu spektroskopischen Änderungen von Hämoglobin während künstlicher PDT*“

Praktikant:

Fabian Bichl (Hochschule München, Masterstudiengang Photonik, Projektstudie, Abgabe: 21.05.2019) “*Untersuchung der Wärmeentwicklung zylindrischer Lichtapplikatoren im Gewebe*“

Vorlesungsaktivität

09/2019	Organisator des Sommer-Seminars des LIFE-Zentrums (3-tägiges Labor Off-Site); Softskill – Vortrag über „How to give a presentation“
07/2018	Organisator des Sommer-Seminars des LIFE-Zentrums (3-tägiges Labor Off-Site)
Halbjährlich:	Vortragender in der Vorlesungsreihe „Physikalische und biomolekulare Methoden in der medizinischen Forschung“ über Photodynamische Therapie

Weitere Beteiligungen

Assoziiertes Mitglied im Graduierten Kolleg 2274 („Advanced Medical Physics for Image-Guided Cancer Therapy“), Projekt C6 - Interstitial photodynamic therapy

Mitglied bei der Deutschen Gesellschaft für Biophotonik und Lasermedizin (DGLM)

Beteiligung an der Organisation einer klinischen Studie (NCT03897491)



EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Spektroskopische Untersuchungen von Hämoglobinformen in Blutplasma und biologischem Gewebe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.08.2022

Ort, Datum

Christian Heckl

Unterschrift Doktorand