

IR-Spektroskopische Diagnostik

Abstrakt

Hintergrund

Die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT)-Gefäßerkrankung wird durch Mutationen in den TGF- β /BMP-Rezeptoren Endoglin oder ALK1 oder in seltenen Fällen durch Mutationen des TGF- β -Signaltransduktorproteins Smad4 verursacht, die zur Kombination führen: Syndrom der juvenilen Polyposis und HHT. HHT ist gekennzeichnet durch mehrere klinische Symptome, wie spontane und rezidivierende Epistaxis, multiple Teleangiektasien an Stellen wie Lippen, Mundhöhle, Fingern, Nase und viszerale Läsionen wie gastrointestinale Teleangiektasien, pulmonale, hepatische, zerebrale oder spinale arteriovenöse Missbildungen. Die Krankheit zeigt eine inter- und intrafamiliäre Variabilität in der Penetranz sowie Symptome von leicht bis lebensbedrohlich. Die Penetranz ist auch altersabhängig. Die Diagnose der Krankheit basiert auf dem Vorhandensein einiger der aufgeführten Symptome oder durch Gentests. Die HHT-Diagnose ist mühsam, zeitaufwändig, kostspielig und manchmal unsicher. Insbesondere in jüngeren Jahren können nicht alle typischen Symptome vorhanden sein, und Gentests identifizieren nicht immer die krankheitsverursachende Mutation.

Methoden

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie wurde als mögliche Alternative zu den derzeitigen diagnostischen Methoden untersucht. IR-Spektren wurden durch Fourier-Transformations-Mid-IR-Spektroskopie aus Blutplasma von HHT-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe erhalten. Die Spektraldaten wurden mathematisch verarbeitet und anschließend klassifiziert und durch Analysen künstlicher neuronaler Netze (KNN) und durch visuelle Analyse von Streudiagrammen der dominanten Hauptkomponenten analysiert.

Ergebnisse

Die Analysen zeigten, dass für HHT ein krankheitsspezifisches IR-Spektrum existiert, das sich signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet. Darüber hinaus kann mit den hier verwendeten Methoden zum jetzigen Zeitpunkt eine HHT diagnostiziert werden mit IR-Spektroskopie in Kombination mit ANN-Analyse mit einer Sensitivität und Spezifität von mindestens 95 %. Die visuelle Analyse der PCA-Streudiagramme ergab eine Variation zwischen den Klassen der HHT-Gruppe.

Schlussfolgerung

Die IR-Spektroskopie in Kombination mit der ANN-Analyse kann als ernsthafte alternative diagnostische Methode im Vergleich zu klinischen und genetisch basierten Methoden angesehen werden. Blutplasma ist ein idealer Kandidat für diagnostische Zwecke, es ist kostengünstig, einfach zu isolieren und es werden nur minimale Mengen benötigt. Darüber hinaus sind die IR-Spektroskopie-Messzeiten kurz, weniger als eine Minute, und die Diagnose basiert nicht auf der Interpretation möglicherweise unsicherer klinischer Daten. Und nicht zuletzt ist die Methode kostengünstig.

Schlüsselwörter

ALK1, künstliches neuronales Netzwerk, Diagnose, Krankheit, Endoglin, erbliche hämorrhagische Teleangiektasie, Mittelinfrarot-Spektroskopie, Mutation

...

Projektbeschreibung

„IR-spektroskopische Diagnostik des Morbus Osler: effizient, ökonomisch und patientenfreundlich“

Projektträger

- Morbus Osler-Stiftung vertreten durch den stellvertr. Vorsitzenden des Kuratoriums Volker Reiche
- Q-bios GmbH, Paul-Wittsack-Str.10, 68163 Mannheim vertreten durch den Geschäftsführer Dr. Andreas Lux

Projektziel

Die Projektträger vereinbaren die gemeinsame Weiterentwicklung der IR-Spektroskopie für die HHT-Diagnostik bis zur weitestgehenden Anerkennung als etablierte Diagnostik-Test in der Medizin.

Daran anschließend ist an eine kommerzielle Nutzung gedacht, sowie eine Ausdehnung der Anwendung auf die Diagnose anderer Krankheiten. Es ist deshalb zu prüfen, ob das Proben-Material von Prof. Backhaus vor dessen Emeritierung für spätere Untersuchungen genutzt werden kann.

Vertragliche Grundlagen

Die Kooperation soll auf der Basis einer vertraglichen Vereinbarung, in der Ziele, Pflichten und Rechte der Partner definiert sind, erfolgen. Dabei wird sich die Stiftung im Wesentlichen auf die Finanzierung sowie die Unterstützung bei der Probenbeschaffung und der Publikation und die Q-bios GmbH sich auf die durchzuführenden Laborarbeiten, die Probenbeschaffung und die Publikation konzentrieren.

Schutzrechte

Die Patente von Herrn Prof. Backhaus laufen demnächst aus. Die Möglichkeiten eines Anwendungspatentes oder Gebrauchsmusterschutzes für den Morbus Osler sollen untersucht werden.

Durchzuführende Maßnahmen

1. Erhöhung der untersuchten Patientenproben (bis jetzt ca. 220) auf 300 mit einem höheren Anteil an betroffenen Kindern. Lt. Prof. Backhaus ist eine statistische Absicherung hier kaum möglich. Erfahrungsgemäß geht er von mindestens 200 Proben aus, so dass wir uns mit 300 Proben auf der sicheren Seite befinden.
2. Gentyppisierung weiterer 50 Proben, vorzugsweise von Kindern, bei denen noch keine eindeutigen Curacao-Kriterien auf eine MO-Beteiligung schließen lassen.
3. Neuer Antrag bei der Ethik-Kommission, da der alte Antrag Kinder nicht einschließt
4. Publikationen in führenden med. Journalen, auf med. Kongressen (speziell mit dem Thema Diagnostik)
5. Einwerbung der erforderlichen finanziellen Mittel

Projekt-Laufzeit

Es wird mit einer Gesamt-Laufzeit von 2 Jahren gerechnet. Die Beschaffung neuer Proben bis zu einer Gesamt-Menge von mindestens 50 bis 100 wird ca. 12 Monate beanspruchen. Daran anschließend erfolgt die IR-Spektroskopie, Sequenzierung von mindestens 50 Proben, die Analyse der Daten sowie die abschließende Evaluation der Methode für den Routine-Einsatz. Daran sich anschließend auch mögliche weitere publizistischen Maßnahmen.

...



Jahr 1

Sammeln von 50 -100 Blutproben von HHT-Angehörigen, die bisher noch keine eindeutigen Symptome zeigen. Hier bevorzugt Kinder, Jugendliche und Erwachsene bis 40 Jahre.

Jahr 2

Analyse der Proben: IR-Messungen, Sequenzierungen
Auswertung und Zusammenfassung der Daten.

Finanzbedarf

Folgende Mittel werden im Zeitablauf von zwei Jahren benötigt:

1. Spektro-Meter (Perkin Eimer), (altes Backhaus-Gerät übernehmen ist nicht zielführend)
ca. 50.000 €
2. Probenanalyse durch Studenten gleich zu Beginn der Arbeiten (auf 400-€-Basis), ca. 18 Monate; oder Halbtagskraft, je nachdem, wie sich eine weitere Kommerzialisierung der Methode gestalten lässt
ca. 10.000 €
3. Genotypisierung für 50 -100 Proben
ca. 25.000 €
4. Publikationen, Kongresse (nach Abschluss der Proben-Analysen)
ca. 5.000 €
5. Nebenkosten
ca. 5.000 €

Mannheim/Waldkirch, den

gez. Dr. Lux

gez. Reiche

...



Projekt

IR-Spektroskopie für die HHT-Diagnostik

Stand

- Anzahl an Patienten: 221
- Mehrzahl der Patienten aufgrund der Curacao-Kriterien als HHT-Patienten diagnostiziert.
- Davon 57 genetisch.

Aufteilung

- 20 deutsche Endoglin-Patienten
- 2 spanische Endoglin-Patienten
- 31 deutsche ALK1-Patienten
- 2 spanische ALK1-Patienten
- 2 deutsche Smad4-Patienten, JP-HHT-Syndrom
- 3 Proben von nicht HHT-Personen Verhältnis Endoglin zu ALK1: 40 % zu 60 %

Frauen/Männer

- Anteil an Frauen: 135
- Anteil an Männern: 80

Ergebnisse

- PAVM = 46
(21 %)
- GI = 46
(21 %)
- HAVM = 32 (davon Ix/LTX)
(14,5 %)
- PH = 9 (Ix vor LTX)
(4 %)
- CAVM = 3
(1,4 %)
- Milz = 1
(0,45 %)
- Niere = 1
(0,45 %)
- Spinal = 1
(0,45 %)

Anteil Unbekannt: 6

...



Anzahl an Patienten mit:

Für die IR-Spektroskopie wurden ca. 180 Blutspender-Proben als gesunde Referenzgruppe genommen. Deren Spektrum wurde gegen das Spektrum der HHT-Patienten verglichen. Es konnte ganz klar ein HHT-spezifisches Spektrum etabliert werden. Gesunde und HHT-Patienten werden mit einer Sensitivität und Spezifität von ca. 98 % richtig erkannt.

Das heißt, die Methode funktioniert hervorragend. Diese Werte sind für viele Mediziner zu schön, um wahr zu sein. Daher auch immer wieder die Skepsis.

2 ALK1-Patienten wurden als gesund eingestuft. 2 weitere Patienten, diagnostiziert nach den Curacao-Kriterien, wurden ebenfalls als gesund eingestuft. Eine Person, bei der keine Mutation in Endoglin oder ALK1 nach Sequenzierung gefunden wurde, wird als krank eingestuft und dies bei der Messung von zwei zeitlich unabhängigen Proben (2 Jahre Abstand). Mutter hat HHT. Diese Person hat außer einigen wenigen Teleangiectasien keinerlei Anzeichen für HHT.

...



Weitere Schritte

Für eine korrekte Evaluierung der Methode wäre es wissenschaftlich notwendig/wünschenswert, alle bisher nicht sequenzierten Patienten (derzeit ca. 150) zu sequenzieren, um die Sequenzdaten mit den IR-Daten abzugleichen und um sicher zu sein, dass die Patienten, die wir mit dieser Methode untersuchen, auch wirklich HHT/Osler-Patienten sind. Die Kosten hierfür würden sich nach dem derzeitigen Stand hier in Deutschland auf ca. 75.000 € belaufen. In den USA – für 300 \$ pro Patient – macht es ca. 40.000 €.

Weiterhin wäre es wünschenswert, zu den bisherigen Patienten (ca. 220) weitere Proben zu messen. Insgesamt bis zu 600. Weitere Rekrutierung von Proben erweist sich aber momentan hier in Deutschland als schwierig. Es gehen keine Proben mehr ein. Kollegen aus dem Ausland (Italien, Spanien, eventuell Norwegen oder Israel) sind bereit, Proben zu schicken. Dies hat den Vorteil, dass diese Patienten genetisch charakterisiert sind.

Für eine weitere Evaluierung ist es notwendig, die HHT Spektren nicht nur mit „gesunden“ Blutspendern zu vergleichen, sondern auch mit den Spektren anderer Erkrankungen zu „cross-validieren“. Insbesondere für Erkrankungen bei denen entzündliche Prozesse eine Rolle spielen. Derzeit stehen uns hierfür aber nur Proben von Prostatakrebs Patienten und Prostatahyperplasien zur Verfügung. Diese Untersuchungen laufen gerade. Für eine intensive Cross-Validierung wären wir auf die Hilfe der Ärzte angewiesen, um genügend Proben zu sammeln. Am besten und einfachsten Ärzte, die wir bereits aus dem HHT-Umfeld her kennen. Hierfür müssen allerdings dann auch wieder Studienanträge geschrieben werden.

Wozu dient die Methode und wo wollen wir damit hin?

1. Eine schnelle Diagnose. Ergebnisse könnten innerhalb von 2 Stunden vorliegen.
2. Eine sichere Diagnose ohne großen klinischen Aufwand
3. Eine kostengünstige Diagnose (ca. 100 €)
4. Eine schnelle und sichere Diagnose, die vielen Patienten einen langwierigen, möglicherweise jahrelangen Hürdenlauf von Arzt zu Arzt erspart, bevor die richtige Diagnose gestellt wird. Insbesondere bei den Fällen, bei denen die HHT-Symptome eben nicht eindeutig sind. Dies setzt allerdings voraus, dass erstens wesentlich mehr Ärzte über die Krankheit informiert werden und zweitens, dass die Ärzte darüber informiert werden, dass bei Verdachtsfällen es einen sicheren, kostengünstigen Schnelltest gibt. Es muss Werbung betrieben werden.
5. Bezugnehmend auf Punkt 4: Wichtig wäre es natürlich, nun die Personen aus HHT-Familien zu testen, die bisher noch keine Anzeichen für die Krankheit zeigen bzw. noch keine eindeutigen Symptome. Gleichzeitig müssen diese Personen aber auch genetisch untersucht werden. Dies bedeutet Überzeugungsarbeit und weitere Kosten. Sollte genetische Diagnose und IR-Spektrum übereinstimmen, dann wäre dies der eindeutige Beweis für die Tauglichkeit der IR-Spektroskopie in der Früherkennung und auch als Screening Methode. Hieran ist auch die Gesundheitsökonomie sehr interessiert.
6. Da es sich bei dieser Diagnostikmethode um eine neue und wahrscheinlich erst einmal skeptisch gesehene Methode handelt, ist nicht zu erwarten, dass dieser Service von den Krankenkassen in naher Zukunft gezahlt wird. Wäre also von Privat zu zahlen sein.
7. Wer führt bzw. bietet diesen Service routinemäßig an? Die Stiftung? Oder ich als Service im Rahmen meiner Firma?

...



8. Wenn es das Ziel ist, diese Diagnostikmethode routinemäßig anzubieten (unter Gewinnbeteiligung der Morbus Osler Stiftung?), dann muss in ein neues Gerät investiert werden. Herr Backhaus geht zum Oktober dieses Jahres in Pension und inwieweit uns dann noch das Gerät zur Verfügung steht, ist fraglich. Des Weiteren ist das derzeitige Gerät veraltet und für einen Routineeinsatz nicht geeignet. Kosten ca. 50.000 €. Zweitens: Wer führt die Tests, die dann international angeboten werden können, durch? Hierfür müsste eine Person, in welchem Setting auch immer, verantwortlich sein. Das heißt, es muss in Personal investiert werden (Personaleinstellung). Dieses Personal ist auch generell nötig für die weitere Austestung und Etablierung der Methode.

Zusammenfassung finanzielle Mittel

Zusammenfassend werden für die Fortsetzung und Abschluss der Studie folgende geldliche Mittel benötigt. Geordnet nach Priorität:

Geräteanschaffung: ca. 50.000 €
Personal: ca. 25.000 €/Jahr
Sequenzierungen: ca. 40.000-75.000 €

