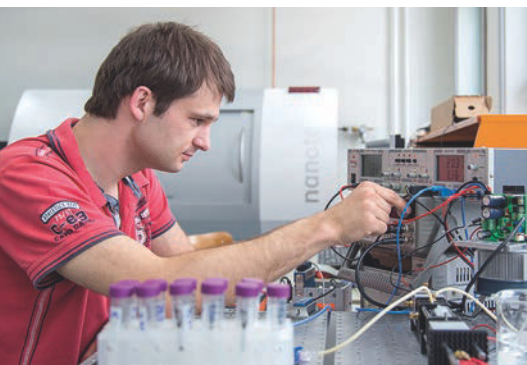


Sonderheft Medizintechnik

Hinrich Habeck Vorwort	Seite 3	Christian Stark, Felix Fiedler, Stefan Müller Optische Konzentrationsbestimmung von Laktat in Blutplasma mittels NIR-Spektroskopie	Seite 41
Henrik Botterweck, Stefan Fischer Der BioMedTec Wissenschaftscampus Lübeck - mehr als Bio, Med und Tec?	Seite 4	Benjamin Weber, Bodo Nestler Kalibration von Pulsoxymetern durch direkte Spektralmodulation	Seite 45
Christian Buj, Jens Horstmann, Ralf Brinkmann Kontaktfreie Photoakustische Tomographie	Seite 7	Matthias Weber, Klaas Bente, Anselm v. Gladiß, Matthias Graeser, Thorsten M. Buzug Magnetische Partikelbildgebung mit einer feldfreien Linie	Seite 50
Felix Fiedler, Christian Stark, Stefan Müller Magnetophorese zur Trennung der Blutbestandteile für die optische Bestimmung von Laktat	Seite 10	Christian Bollmeyer, Martin Mackenberg, Hartmut Gehring, Horst Hellbrück Entwicklung einer kompakten Sensorplattform für den prototypischen Einsatz in der Medizintechnik	Seite 53
Jens Hagenah, Michael Scharfschwerdt, Achim Schweikard Von Herzchirurgie und Support Vector Maschinen: Wie ein lernender Algorithmus helfen kann, Herzklappenprothesen zu individualisieren	Seite 14	Jürgen Grein, Mathias Beyerlein Ophthalmotechnologie in der Biomedizintechnik – „Sehen“ meets „Technik“	Seite 58
Stephan Klein, Lutz Wunsch, Sean Luenz, Hala El-Shaffey, Franziska Hainer Eine neue Repositionshilfe für die Kinderchirurgie	Seite 19	Bodo Nestler Horizontenerweiterung: Ein Forschungssemester am Technion in Haifa	Seite 60
Tobias Klepsch, Henrik Botterweck Gefäß-Gewebe-Transport von Wirkstoffen beschichteter Implantate: Modellierung der Transportvorgänge	Seite 22	Stephan Klein, Farina Steinert, Wen-Huang Wang, Stefanie Wichmann, Heike Wachenhausen, Folker Spitzenberger, Rolf Granow Online-Lehre für die Medizintechnik im Bereich Regulatory Affairs	Seite 63
Jan Krieger, Christian Damiani, Christian Hübner, Stephan Klein Gefäß-Gewebe-Transport von Wirkstoffen beschichteter Implantate: Phänomenologische Modellierung	Seite 26	Jürgen Tchorz, Markus Kallinger Der Studiengang Hörakustik an der FH Lübeck	Seite 66
Lars Kreutzburg, Vit Dolezal, Christian Hübner Dynamik nanoskaliger Partikel an Gefäßwänden	Seite 30	Silke Venker, Thorsten M. Buzug, Stephan Klein Der gemeinsame internationale Master-Studiengang Biomedical Engineering in Lübeck	Seite 69
Roma Kusche, Steffen Kaufmann, Ankit Malhotra, Paula Klimach, Martin Ryschka Wearable zur Langzeitbestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit	Seite 34	Ullrich Wenkebach Kurz zurücklehnen und dann weiter... vorgestellt von Henning Schwarz Neuerscheinungen	Seite 71 Seite 74
Benjamin Redmer, Bodo Nestler Optische Messung von Hämoglobinderivaten in nicht-hämolyisiertem humanem Vollblut	Seite 38	Impressum	Seite 78



20. Jahrgang - März 2017

ISSN: 1618-5528

impulse

Aus Forschung und Lehre



FACH
HOCHSCHULE
LÜBECK

University of Applied Sciences

www.fh-luebeck.de

DYNAMIK NANOSKALIGER PARTIKEL AN GEFÄSSWÄNDEN

LARS KREITZBURG, VIT DOLEZAL, CHRISTIAN HÜBNER

Einführung

Der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe findet an den Wänden der kleinsten Blutgefäße, den Kapillaren statt. Sie haben einen Durchmesser von nur wenigen Mikrometern und bestehen aus einer einfachen Schicht Endothelzellen. An ihrer Zellwand bilden diese Endothelzellen eine Struktur aus Zuckern und Proteinen, die Glykokalyx, welche zusammen mit Teilen des Blutplasmas die Endotheliale Oberflächenschicht (engl. ESL) bildet [1, 2, 3]. Bei ihrem Übergang vom Blut in das Gewebe müssen einzelne Partikel - insbesondere Wirkstoffe - diese Struktur passieren. Obgleich die Zusammensetzung und Eigenschaften, z.B. Mechanik und Permeabilität gut erforscht sind, gibt es kaum Messungen zur Dynamik einzelner Moleküle in diesem Bereich des Blutkreislaufs.

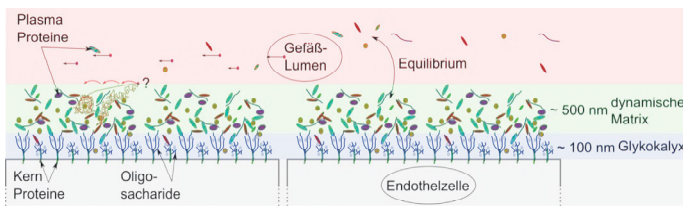


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Endotheliale Oberflächenschicht

Das Teilprojekt C des Forschungskollegs LUMEN untersucht in diesem Zusammenhang zwei grundsätzliche Fragen: Wie bewegen sich einzelne Moleküle direkt auf der Endotheliale Oberflächenschicht? Denkbar wären hier etwa rollende Bewegungen oder ein ‚Hüpfen‘ als Übergang vom konvektiven Transport im Blutstrom zur Diffusion im Gewebe. Und: Wie bewegen sich die Teilchen schließlich in der ESL? Hier ist davon auszugehen, dass die Diffusion der Teilchen durch die ESL eingeschränkt und dadurch möglicherweise auch anisotrop ist.

Zur Klärung dieser Fragestellungen eignet sich die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. FCS) besonders gut. Sie erlaubt die Messung von Diffusionskoeffizienten, Geschwindigkeiten durch Strömungsbewegung (Blutstrom) sowie der Konzentration von fluoreszierenden Farbstoffen bzw. fluoreszenzmarkierten Molekülen in Lösung. Ihr Prinzip beruht auf der Messung lokaler Konzentrationsfluktuationen, deren Ursache in der Bewegung der Teilchen selbst liegt und die zu Fluktuationen der Fluoreszenzintensität führen (Abbildung 2). Dazu wird ein Laserstrahl in den Probenraum fokussiert, sodass ein Messvolumen von nur wenigen Femtolitern Größe entsteht. Der Fokus des Laserstrahls kann durch eine dreidimensionale Gaussverteilung der Intensität (3D-Gauss) mit einer typischen Halbachsenlänge w ($1/e^2$ -Abfall der Intensität) von 200 - 400 nm

in xy - und 800 - 1200 nm in z -Richtung angenähert werden. Durchquert nun ein Farbstoffmolekül dieses Volumen, wird es zur Fluoreszenz angeregt (Abbildung 2 (a)) – es kommt zu einem temporären Anstieg der Fluoreszenzintensität, einem sogenannten „Photonen-burst“. Die Breite eines solchen ‚burst‘ gibt in etwa den Zeitraum wieder, während dem sich das Teilchen im konfokalen Volumen befunden hat (Abbildung 2 (b)). Der Zeitverlauf der Intensität $I(t)$, der auch als Intensitäts-Zeitspur bezeichnet wird, wird über einen ausreichend langen Zeitraum aufgenommen, die dann mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ analysiert wird:

$$G(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle$$

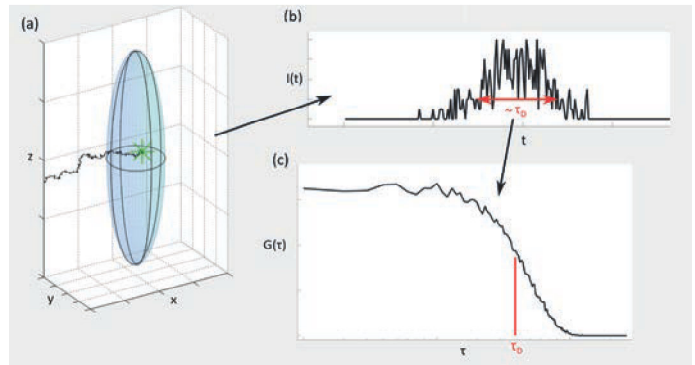


Abbildung 2. (a) Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Farbstoffe werden in einem sehr kleinen Volumen zur Fluoreszenz angeregt. (b) Die Passage des Farbstoffs führt zu Photonen-‚bursts‘ deren Breite die Aufenthaltsdauer im Volumen wiedergibt. (c) Die Autokorrelation der gesamten Fluoreszenz-Zeitspur liefert eine mittlere Aufenthaltsdauer oder Diffusionszeit τ_D , die mit dem Diffusionskoeffizienten verknüpft ist.

Im Fall freier Brownscher Molekularbewegung erhält man als Korrelationsfunktion:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2} \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2}$$

wobei τ_D , die so genannte Diffusionszeit, ein Maß für die Aufenthaltszeit der Moleküle im Fokus ist, während der Strukturfaktor S das Verhältnis aus Breite und Länge des Fokus' ist. Bei bekannter Größe des konfokalen Volumens lässt sich dann der Diffusionskoeffizient und, falls zusätzlich gerichtete Bewegung vorliegt, die Translationsgeschwindigkeit (Konvektion) bestimmen. Die Zahl der Moleküle im konfokalen Volumen N und damit die Konzentration der Fluorophore ist reziprok proportional zur Amplitude der Korrelationsfunktion $G(0)-1=1/N$.

Die Bewegung von Teilchen in der Nähe und an der Oberfläche von Gefäßwänden ist anisotrop, und der Blutfluss im Gefäß führt zu einem zusätzlich gerichteten Transport. Zur Erfassung der Anisotropie der Diffusion sowie der gerichteten Bewegung schlagen wir eine neue Form der FCS vor, die Multifokus-FCS, bei der bis zu vier konfokale Volumina simultan beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil der Multifokus-FCS ist, dass Abweichungen der Form des konfokalen Volumens von der Modellannahme eines 3D-Gauss, z.B. durch die Fokussierung des Laserstrahls durch biologische Strukturen hindurch, das Messergebnis nicht signifikant beeinflussen. Die Fluktuationen der Fluoreszenz in den verschiedenen konfokalen Volumina kann jetzt nicht nur mit einer jeweiligen Autokorrelationsfunktion erfolgen, sondern zusätzlich durch entsprechende Kreuzkorrelationen

$$G_{m,n}(\tau) = \langle I_m(t) \cdot I_n(t + \tau) \rangle$$

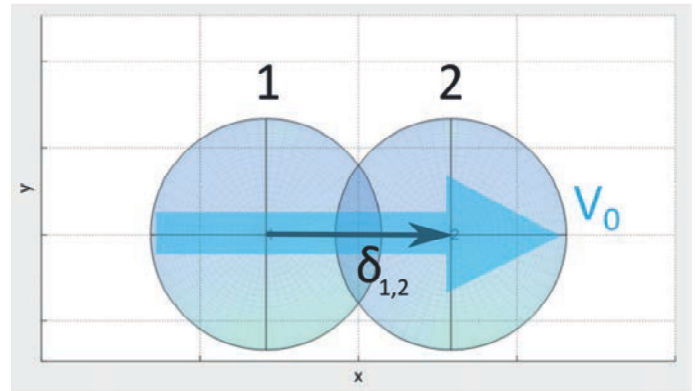
von je zwei Fluoreszenz-Zeitspuren I_m und I_n aus jeweils unterschiedlichen Fokussen. Diese Kreuzkorrelationen hängen nun nicht mehr nur von der Größe und Form der konfokalen Volumen ab sondern insbesondere von der relativen Position der beiden Fokusse. Diese Kreuzkorrelation ist besonders empfindlich auf eine gerichtete Komponente in der Bewegung der Teilchen.

Wir demonstrieren die Multifokus-FCS zunächst anhand zweier konfokaler Volumina 1 und 2 mit Abstand $\delta_{1,2}$ (Abbildung 2 a). Eine gerichtete Bewegung mit der Geschwindigkeit V_0 in Richtung von $\delta_{1,2}$ realisieren wir, indem wir beide Fokusse simultan mit dieser Geschwindigkeit mit Hilfe eines Scan-Spiegels in der Probe bewegen. Diese Bewegung führt in der Vorwärts-Kreuzkorrelation CC12 zu einem erhöhten Wert bei $\tau = \tau_F$ (Abbildung 1 c), der mittleren Flusszeit, die analog zur Diffusionszeit angibt, wie lange ein Teilchen im Mittel per Konvektion gebraucht hat, um von dem ersten Volumen zum zweiten zu gelangen. Man kann diesen erhöhten Wert der Kreuzkorrelationsfunktion so interpretieren, dass nach einer Zeitspanne von $\Delta t = \tau_F$ die Wahrscheinlichkeit steigt, im Kanal 2 ein Photon zu detektieren, wenn zuvor ein Photon in Kanal 1 detektiert wurde - ein Ereignis, das eben durch eine gerichtete Bewegung der Fluorophore zu erklären ist. In der Rückwärts-Korrelation CC21 findet man entsprechend bei $\tau = \tau_F$ einen erniedrigten Wert der Kreuzkorrelation. Eine Differenz beider Kreuzkorrelationen zeigt also einen Teilchenstrom in Richtung der Verbindung beider Volumina an. Eine Anpassung der aus der Messung erhaltenen Auto/Kreuz-Korrelationsfunktionen mit den entsprechenden Modellfunktionen (aufgrund der Komplexität hier nicht gezeigt) liefert als Parameter die Fließgeschwindigkeit, die im Rahmen der Messgenauigkeit mit der eingestellten Scan-Geschwindigkeit übereinstimmt.

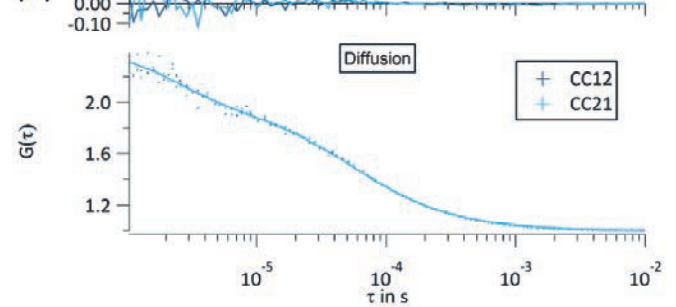
Wäre die Fließgeschwindigkeit orthogonal zum Verbindungsvektor der beiden Volumen, gäbe es keine Differenz in den

beiden Kreuzkorrelationen (Abbildung 2 b), da die Fluorophore in diesem Fall ausschließlich aufgrund der ungerichteten Diffusion vom ersten Volumen in das zweite gelangen. Für den allgemeinen dreidimensionalen Fall sind insgesamt vier Fokusse nötig, um einen beliebig orientierten Fluss eindeutig zu bestimmen.

(a)



(b)



(c)

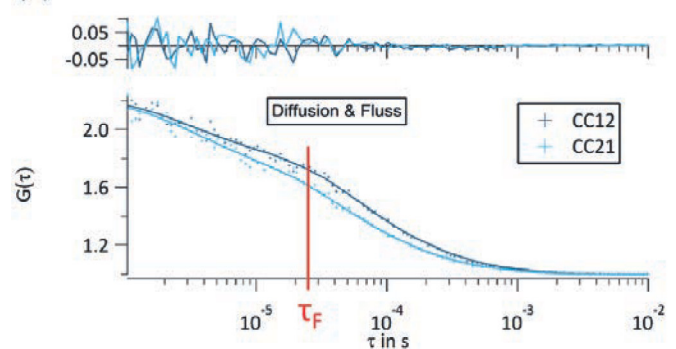


Abbildung 3. Multi-Fokus-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. (a) Zwei Messvolumen 1 und 2 mit Abstand $\delta_{1,2}$ ermöglichen die Bestimmung der Richtung des Flusses V_0 . (b) Messung ohne gerichtete Bewegung, beide Kreuzkorrelationen sind identisch. (c): Der Fluss führt zu einer Differenz zwischen der Vorwärts- bzw. Rückwärtskorrelation CC12 und CC21. Das Vorzeichen dieser Differenz gibt die Richtung des Flusses an. Zur eindeutigen Bestimmung einer zweidimensionalen Geschwindigkeit sind allerdings drei Fokusse nötig. Punkte: Korrelationsdaten, durchgezogene Linien: Anpassungsfunktionen mit Diffusionskoeffizient und Fließgeschwindigkeit als Anpassungsparameter.

Da eine in-vivo Messung direkt an einer Kapillarwand mit extremem Aufwand und vielen möglichen Schwierigkeiten verbunden ist, haben wir uns zunächst für ein in-vitro Modell der Kapillarwand entschieden (Abbildung 4). Dieses

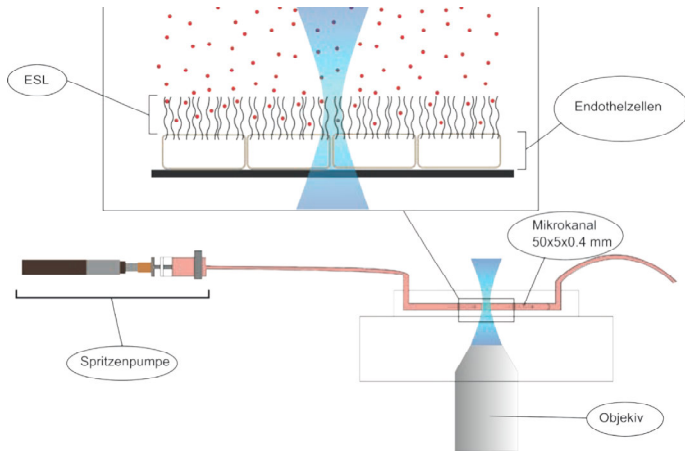


Abbildung 4. Messzelle / Kapillarmodell. Das Modell besteht aus einem optischen Mikrofluidik-Kanal, in dem Endothelzellen angesiedelt werden. Eine Spritzenpumpe erlaubt die Messung unter Strömungsbedingungen.

Modell besteht aus Endothelzellen die in einem speziell dafür angefertigten Mikrofluidik-Kanal herangezogen werden. Über zwei Zugänge lässt sich die Probenlösung mit den Farbstoffen zuführen. Außerdem kann mithilfe einer Spritzenpumpe der Blutfluss simuliert werden.

Um zunächst dieses Modellsystem zu testen, haben wir in unseren ersten Messungen den Farbstoff Alexa 488 genutzt

und mit nur einem Fokus gemessen. Da die Position und Ausdehnung der ESL nicht ohne weiteres genau bestimmbar ist, kommt zunächst ein z-Scan zum Einsatz: Der Fokus wird über mehrere Mikrometer entlang der optischen Achse mit konstanter Geschwindigkeit verschoben. Die Geschwindigkeit wird dabei so gewählt, dass sie sich nicht auf den Zeitbereich der Korrelationsfunktion auswirkt, in dem die Dynamik der zu untersuchenden Prozesse stattfindet. Die aufgezeichneten Daten werden nach der Messung einzelnen Schichten zugeordnet und getrennt voneinander ausgewertet.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse einer solchen Messung dargestellt. Der Scanbereich geht über eine Länge von sechs Mikrometern und ist in sechs Schichten L0 bis L5 eingeteilt. Für jede Schicht wurde jeweils die Autokorrelationsfunktion berechnet (Abbildung 5 b). Ihre Amplituden nehmen von 0,7 für L5 bis 0 für L0 ab. Dabei sind drei Gruppen aus je zwei Korrelationskurven erkennbar: L5 und L4 können als Ergebnisse für die freie Diffusion des Farbstoffs oberhalb der ESL betrachtet werden. Für L3 und L2 ist die Korrelationsamplitude reduziert, was auf eine erhöhte Farbstoffkonzentration in der ESL hindeuten kann. Eine alternative Erklärung könnte ein erhöhtes Hintergrundsignal an der ESL bzw. auch die teilweise Abdeckung des konfokalen Volumens im Deckglas sein. Für L2 ist eine Schwingung für größere τ erkennbar, die der Frequenz der Fokusbewegung entspricht, und so auf Intensitätsänderungen durch die auf- und ab-Bewegungen des Fokus hindeutet. Ab L2 sind die Korrelationen mit dem Modell nicht mehr sinnvoll auszuwerten, was dadurch zu erklären ist, dass der Fokus

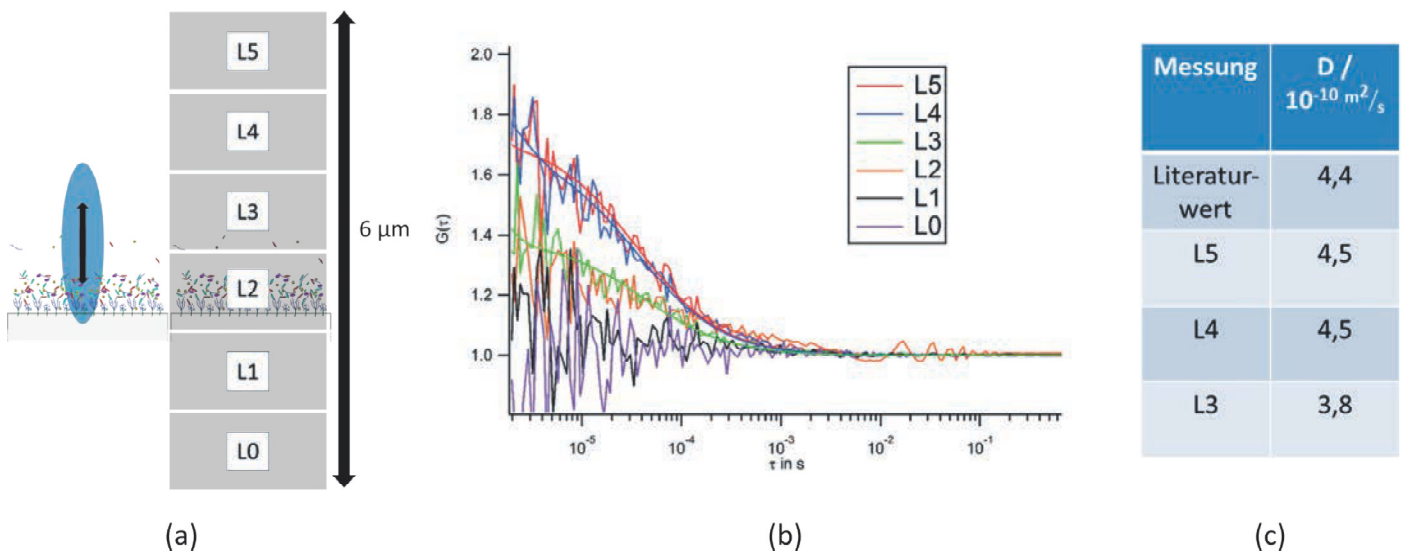


Abbildung 5. Erste Messungen der Dynamik von Farbstoffen mit einem Fokus am Kapillarmodell. (a): Ein z-Scan wurde durchgeführt, da die Lage und Ausdehnung der ESL nur schwer zu bestimmen sind. Die so erhaltenen Fluoreszenz-Zeitspuren aus sechs Schichten L5 bis L0 entlang der optischen Achse wurden getrennt ausgewertet. (b): Die Amplitude der Autokorrelation nimmt mit Annäherung an die ESL ab (L5 - L2) und verschwindet schließlich für Schichten unterhalb der ESL (L2 - L0). (c): Der Diffusionskoeffizient des Farbstoffs entspricht für die ersten beiden Schichten L5 und L4 dem Literaturwert für freie Diffusion. Für die Schicht L3 nahe der ESL wurde ein reduzierter Diffusionskoeffizient gefunden, der eine Beschränkung der Diffusion durch die ESL vermuten lässt. Die Messdaten der Schichten L2-L0 ließen sich mit dem hier genutzten Modell nicht sinnvoll auswerten.

vollständig im Deckglas bleibt und somit keine Fluoreszenz der sich bewegenden Fluorophore mehr zu detektieren ist. Die Diffusionskoeffizienten, die sich aus den Ausgleichsrechnungen für die Schichten L5 bis L3 ergeben, entsprechen für L5 und L4 dem Literaturwert des Farbstoffs für freie Diffusion. Für L3 ist der Diffusionskoeffizient hingegen reduziert, was auf eine durch die ESL beschränkte Diffusion des Farbstoffs hindeutet, aber auch durch ein Vergrößern des Fokusvolumens aufgrund von Abbildungsfehlern in der Nähe des Deckglases hervorgerufen sein kann. Hier sind Kontrollmessungen notwendig.

Wir haben mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie eine Methode, die uns das genaue Messen von Diffusion, Konvektion und Konzentration von Blutbestandteilen auf Einzelmolekül-Ebene erlaubt. Durch unsere Variante der Multi-Fokus-FCS können wir auch gerichtete Bewegungen auflösen und steigern die Robustheit des Messaufbaus gegenüber optischen Unregelmäßigkeiten. Erste Messungen an Endothelzellen bestätigen die Anwendbarkeit der Methode auf unser Modellsystem.

In den nächsten Schritten werden wir das Kapillarmodell weiter verfeinern und einen Konzentrationgradienten des Blutplasmas bzw. der zu untersuchenden Moleküle über die Endothelzellschicht mithilfe eines Zwei-Kammer-Systems einführen. Anschließend sollen auch Bestandteile des Blutplasmas sowie Wirkstoffe in ihrem Bewegungsverhalten an der ESL, auch bei imitiertem Blutstrom, untersucht werden.

Danksagung

Die vorliegende Publikation entstand im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungskollegs LUMEN (FKZ 13EZ1140A/B). LUMEN ist ein gemeinsames Forschungsprojekt der Fachhochschule Lübeck und der Universität zu Lübeck und ist ein eigener Forschungszweig der Graduiertenschule für Informatik in Medizin und Lebenswissenschaften der Universität zu Lübeck.

Literatur

[1] D. Chappell, M. Jacob, B. F. Becker, K. Hofmann-Kiefer, P. Conzen and M. Rehm: Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef", *Anaesthesist*, vol. 57, no. 10, pp. 959-969, Oct. 2008

[2] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, Marc A. M. J. van Zandvoort and Mirjam G. A. oude Egbrink: The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization, *Pflugers Arch.*, vol. 454, no. 3, pp. 345-359, Jun. 2007

[3] A. R. Pries, T. W. Secomb and P. Gaehtgens: The endothelial surface layer, *Pflugers Arch.*, vol. 440, no. 5, pp. 653-666, Sep. 2000

Autoren

Lars Kreutzburg, M.Sc.

Universität zu Lübeck, Institut für Physik
(korrespondierender Autor)

Universität zu Lübeck

Graduate School for Computing in Medicine and Life Sciences

Ratzeburger Allee 160

23562 Lübeck

E-Mail: kreutzburg@physik.uni-luebeck.de

Vit Dolezal, M.Sc.

Universität zu Lübeck
Institut für Physik

Prof. Dr. rer. nat. Christian Hübner

Universität zu Lübeck
Institut für Physik

bildlich gesprochen, vom Kopf zu den Füßen, indem sie nach Kopfverletzungen und Verletzungen der Wirbelsäure, nach Thoraxverletzungen und solchen des Abdomens schließlich mit Verletzungen der Extremitäten enden. Jedes Kapitel ist zudem in sich strukturiert. Stets folgt einer Beschreibung der jeweiligen Anatomie eine Analyse der Verletzungen und, wo möglich, ein Abschnitt zur Prävention. Den Schluß bilden jeweils eine Zusammenfassung mit Aufgaben und ein zumeist umfangreiches Literaturverzeichnis. Am Ende des Buches finden sich die Lösungen der gestellten Aufgaben sowie ein vergleichsweise kurz gehaltenes Sachverzeichnis. Der untadelige Text wird, fast überflüssig zu betonen, durch eine Vielzahl sehr anschaulicher Bilder und Graphiken unterstützt. Selbst der Einband unterscheidet sich wohltuend von so mancher heute leider immer öfter anzutreffenden Seitenverpackung. Fest, robust und dauerhaft tritt dieser Band dem Leser entgegen, der ihn getrost nach Hause tragen kann in der Gewißheit, eine Fülle an Inhalt schwarz auf weiß zu besitzen.

IMPRESSUM

HERAUSGEBER

Präsidium der Fachhochschule Lübeck
Mönkhofer Weg 239
23562 Lübeck
www.fh-luebeck.de

REDAKTION

Autoren/-innen
Schlussredaktion:

Prof. Dr.-Ing. Stephan Klein
Labor für Medizinische Sensor- und Gerätetechnik
Fachhochschule Lübeck
www.msgt.fh-luebeck.de

Frank Mindt, M.A.
Pressestelle
Fachhochschule Lübeck
Telefon: 0451 300 - 5305
Fax: 0451 300 - 5470
E-mail: presse@fh-luebeck.de

SATZ UND LAYOUT

Thowo - Thorben Wolkowski
E-mail: info@thowo.de
www.thowo.de

FOTOS

Autoren/-innen, Pressestelle

ISSN 1618 5528

AUFLAGE
600 Exemplare