MAGNETOPHORESE ZUR TRENNUNG DER BLUTBESTANDTEILE FÜR DIE OPTISCHE BESTIMMUNG VON LAKTAT

FELIX FIEDLER , CHRISTIAN STARK, STEFAN MÜLLER

1 Optische Laktat-Sensorik

Ziel des Forschungsprojektes „OpLaSens“ ist die Entwicklung eines optischen Sensors zur Bestimmung der Laktatkonzentration in Vollblutproben. Die entwickelte Messtechnik soll im Anschluss an das Projekt in einem Blutgasanalysegerät verwendet werden. Die spektrale Bestimmung der Laktatkonzentration stellt die aktuelle optische Messtechnik vor verschiedene Herausforderungen. Laktat ist im Blutplasma nur in geringen Konzentrationen vorhanden und das Spektrum wird von Stoffen wie Glukose oder Harnstoff stark überlagert. Weiterhin verursachen die Erythrozyten im Blut eine starke optische Streuung, wodurch die spektrale Untersuchung der Laktatkonzentration erschwert wird. Eine Fragestellung im Projekt „OpLaSens“ ist dabei die Entwicklung eines physikalischen Verfahrens zur Trennung der Blutbestandteile. [1]

2 Zielstellung

Das Teilprojekt zur Blutseparation hat das Ziel, ein physikalisches Verfahren zur kontinuierlichen Trennung der festen von den flüssigen Blutbestandteilen für die Vereinfachung der spektralen Analyse zu entwickeln. Aufgrund der späteren Verwendung in einem Blutgasanalysegerät ist es notwendig, aus der geringen Blutmenge von ca. 65 µl Blut eine ausreichende Menge an Plasma für die spektrale Analyse zu erhalten. Die Blutseparation soll ohne Verbrauchsmaterialien durchgeführt werden, wodurch eine chemische Separation ausgeschlossen wird. [2]

3 Bluteigenschaften

In der Regel beträgt die Blutmenge 8 % des Körpergewichtes. Das entspricht bei einer 50 kg – 70 kg schweren Person 4 l – 6 l Blut, welches sich zu 55 % aus Blutplasma und 45 % aus festen Blutbestandteilen, dem Hämatokrit, zusammensetzt. [3]

3.1 Erythrozyten

Den Hauptbestandteil der festen Blutbestandteile bilden die Erythrozyten. Im Schnitt besitzt ein Mann ca. 5,2 Mio/mm^3 und eine Frau 4,6 Mio/mm^3 Erythrozyten. Die roten Blutkörperchen sind kernlose, bikonkave Scheiben mit einem Durchmesser von ca. 7,5 µm. Dabei beträgt die Dicke am Rand ca. 2 µm und im Zentrum ca. 1 µm. Ein Bestandteil der Erythrozyten ist das Hämoglobin, welches für die rote Farbe des Blutes verantwortlich ist. Hämoglobin ist ein Proteinkomplex und kann in vier Untereinheiten unterteilt werden. Im Allgemeinen handelt es sich bei Hämoglobin um ein Häm-Molekül, das an eine Polypetidkette gekoppelt ist. Das Häm-Molekül wird von einem Porphyrinring gebildet, in dessen Zentrum sich ein zweiwertiges Eisenatom (Fe2+) befindet. In 100 ml Blut befinden sich ca. 15 g Hämoglobin. [3, 4]

3.2 Blutplasma

Blutplasma ist eine fast farblose, klare Flüssigkeit und umfasst sieben bis neun Prozent des Gesamtkörperwassers. Den Hauptbestandteil bilden mit einem Anteil von sechs bis acht Gramm auf 100 ml Proteine. Die bekanntesten sind Fibrinogen, Albumin und verschiedene Globuline. Weitere Bestandteile des Blutplasmas sind Enzyme, die durch den fortlaufenden Prozess der Zellumwandlung ins Blut gelangen. [3]

Im Vergleich zu den Albuminen und Lipiden, welche in hohen Konzentrationen im Blut vorhanden sind, gibt es weitere Blutbestandteile, die in geringeren Konzentrationen vorkommen, aber eine wichtige physiologische Funktion ausüben. Darunter fallen z.B. Glukose und Laktat. Der Glukosespiegel liegt zwischen 3,33 mmol/l – 7,15 mmol/l. Laktat ist ein im Blut vorkommender Metabolit, dessen Konzentration mit der Verstoffwechselung von Glukose korreliert und damit einen Marker für den Energieverbrauch des Organismus darstellt. Der Normalwert für Laktat liegt zwischen 0,55 mmol/l und 2,2 mmol/l , kann jedoch in Abhängigkeit von der körperlichen Belastung bis auf 35 mmol/l ansteigen. Die Laktatbestimmung gehört im klinischen Alltag zur Standarddiagnostik. Ein großes Anwendungsgebiet liegt in der Intensivmedizin, bei der Laktat als Marker für eine vorliegende Sauerstoffunterversorgung des Gewebes verwendet wird. Ursachen hierfür können beispielsweise Schockzustände, Entzündungen oder ein beginnendes Multiorganversagen sein. Eine engmaschige Kontrolle des Laktatspiegels senkt die Mortalität von Intensivpatienten signifikant. Die Bestimmung der Laktatkonzentration wird ebenfalls in der Sportmedizin für die Ermittlung der anaeroben Schwelle als Standardmethode angewendet. Hiermit lässt sich zuverlässig eine Aussage über den Trainingszustand eines Sportlers treffen. [3, 6, 7, 8]

4 Lösungsansatz

Bei der optischen Bestimmung der Laktatkonzentration sind Streuprozesse an den Erythrozyten eine große messtechnische Einschränkung, da sie die zugrundeliegende Transmissionsmessung überlagern. Durch die Trennung der

festen von den flüssigen Blutbestandteilen kann die spektrale Analyse verbessert werden. Aktuell beschäftigen sich verschiedene Forschungsgruppen mit der kontinuierlichen Separation von Blut in Mikrokanälen, einem Teil der sogenannten Lab-on-a-Chip Technologie. Generell sollen mit einem möglichst geringen Blutvolumen die festen Blutbestandteile vom Blutplasma getrennt werden. Ein Ansatz um dieses Ziel zu erreichen ist die Magnetophorese. Hierbei werden die paramagnetischen Eigenschaften der Erythrozyten ausgenutzt, die durch das Eisen innerhalb des Häm-Moleküls entstehen. Bei paramagnetischen Stoffen richtet sich ein Teil der Atome beim Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes aus. Die magnetischen Dipole, die normalerweise zufällig orientiert sind, orientieren sich in Feldrichtung. Paramagnetische Stoffe besitzen eine sehr kleine Suszeptibilität, die die Magnetisierbarkeit von Stoffen in einem externen Magnetfeld angibt. Bei einem starken äußeren magnetischen Feld haben die paramagnetischen Teilchen die Tendenz, in das magnetische Feld hineingezogen zu werden. Das Grundprinzip der Magnetophorese besteht darin, mit Hilfe eines ferromagnetischen Drahtes innerhalb eines Mikrokanals ein starkes Magnetfeld zu erzeugen.

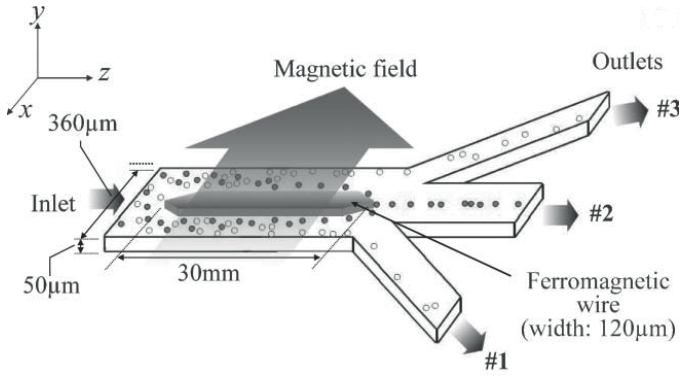

Abbildung 1. Grundsätzlicher Aufbau für die Durchführung der Magnetophorese [10]

Bei der Magnetophorese wird ein Mikrokanal mit einem Einlass und drei Auslässen verwendet (Abbildung 1). In der Mitte des Hauptkanals befindet sich ein ferromagnetischer Draht, an dem sich das magnetische Feld konzentriert. Die paramagnetischen Erythrozyten bewegen sich auf den Draht und können daher am mittleren Auslass abgeleitet werden. Durch die äußeren Kanäle wird das zellfreie Blutplasma aufgefangen. [9, 10]

5 Theorie der Magnetophorese

Für die Separation der Blutbestandteile soll im Rahmen des Forschungsprojektes „OpLaSens“ das Verfahren der Magnetophorese näher untersucht werden. Im ersten Ansatz ist es notwendig, die bekannten Ergebnisse aus der Literatur zu überprüfen.

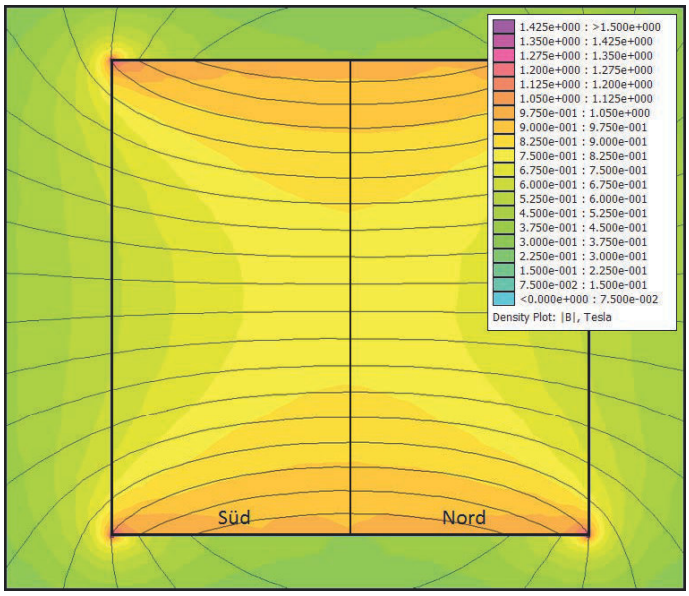

Abbildung 2. Magnetische Flussdichte |B| eines Neodym-Magneten N48

In Abbildung 2 ist die simulierte magnetische Flussdichte eines Neodym-Magneten dargestellt. Der Magnet hat die Maße 50×15×15 mm und die Magnetisierungsgüte N48. Für die Simulation wurde der Querschnitt des Magneten von 15×15 mm nachgebildet.

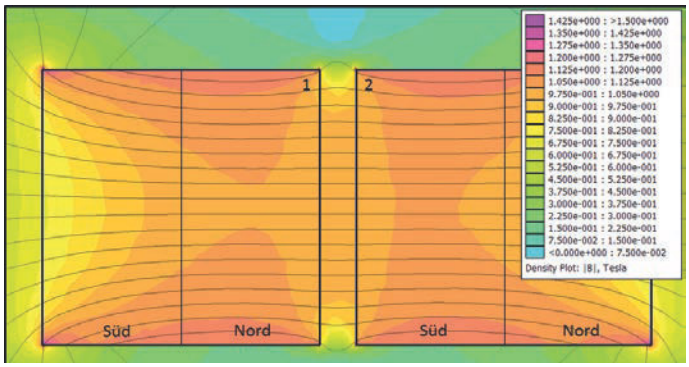

Abbildung 3. Magnetische Flussdichte |B| zweier Neodym-Magnete N48 (1 und 2) mit dem Abstand 2 mm

Für die Magnetophorese werden starke Magnetfelder benötigt. Bei den simulierten Magneten in Abbildung 3 stehen sich Nord- und Südpol gegenüber, wodurch sich die magnetische Flussdichte an den Stirnseiten zwischen ihnen verstärkt.

Die Erythrozyten habe einen Durchmesser von ca. 7,5 µm. Demzufolge ist es ausreichend, ein starkes magnetisches Feld in nur einem kleinen Bereich zu generieren. Dafür wird für die Magnetophorese ein ferromagnetischer Draht (3) zwischen zwei Magnete (1 und 2) wie in Abbildung 4 gebracht, wodurch sich das Magnetfeld im Draht konzentriert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die magnetische Flussdichte weiter verstärkt, wenn ein rechteckiger ferromagnetischer Draht anstelle eines Runddrahts verwendet

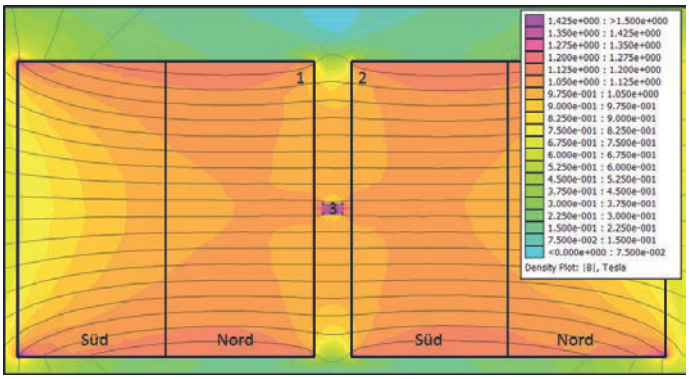

Abbildung 4. Magnetische Flussdichte |B| von zwei Neodym-Magneten N48 (1 und 2), Abstand 2 mm, ferromagnetischer Draht (3) mittig zwischen den Stirnseiten

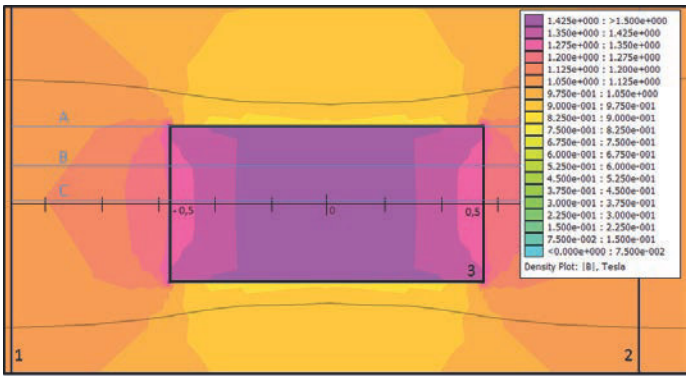

Abbildung 5. Magnetische Flussdichte |B| eines ferromagnetischen Drahtes (3) (0,5 mm ×1 mm) mittig zwischen zwei Neodym-Magneten N48 (1 und 2), Abstand der Magnete: 2 mm

wird. Abbildung 5 zeigt den simulierten magnetisch gesättigten Draht mittig zwischen zwei Neodym-Magneten N48 im Abstand von 2 mm.

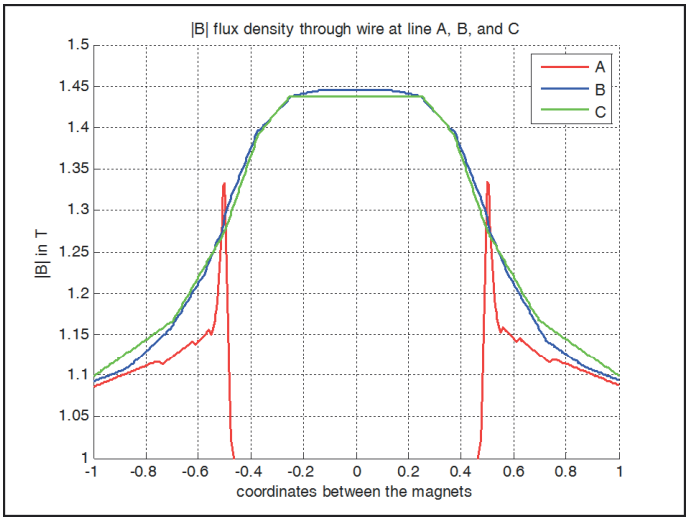

Abbildung 6. Magnetische Flussdichte |B| eines ferromagnetischen Drahtes (0,5 mm ×1 mm) verschiedener Querschnitt mittig zwischen zwei Neodym-Magneten N48, Abstand der Magneten 2 mm

Bei der Betrachtung verschiedener Querschnitte des ferromagnetischen Drahtes hat sich gezeigt, dass die magnetische Flussdichte innerhalb des Drahtes bis auf 1,45 T ansteigt. In Abbildung 6 wird das Ergebnis der Simulation eines ferromagnetischen Drahtes zwischen zwei Neodym-Magneten dargestellt. Die magnetischen Flussdichten der Querschnitte A, B und C aus Abbildung 5 zeigen, dass an den Kanten des Drahtes ein magnetisches Feld von ca. 1,3 T zu erwarten ist.

6 Versuchsaufbau

Im ersten Versuch wurde ein Mikrokanal (1 mm x 0,5 mm) mit destilliertem Wasser und ferromagnetischen Partikeln gefüllt. Die ferromagnetischen Partikel hatten einen Durchmesser von 45 µm – 165 µm. [11]

7 Ergebnisse

In ersten Versuchen wurden die Ergebnisse der theoretischen Simulationen mit ferromagnetischen Partikeln untersucht. Im Gegensatz zu den Simulationen wurde Runddraht verwendet, da dieser leichter zu beschaffen ist.

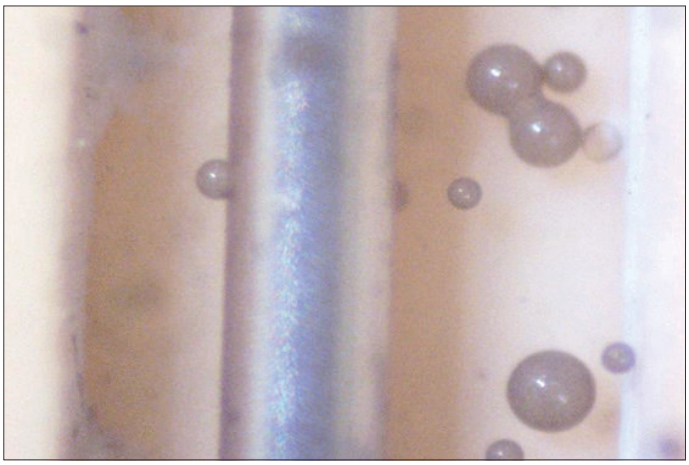

Abbildung 7. Ungeordnete magnetische Partikel in destilliertem Wasser in Mikrokanal (250 µm×50 µm) ohne äußeres magnetisches Feld

Abbildung 8. Geordnete magnetische Partikel in destilliertem Wasser im Mikrokanal (250 µm×50 µm) mit äußerem magnetischen Feld

Abbildung 7 zeigt die in destilliertem Wasser gelösten magnetischen Partikel im Mikrokanal ohne den Einfluss eines äußeren magnetischen Feldes.

Nach der Befüllung des Kanals mit den magnetischen Partikeln wurde ein äußeres magnetisches Feld mit Hilfe zweier Neodym-Magneten N48 angelegt. Die ferromagnetischen Partikel haben sich am Draht gesammelt (Abbildung 8), was den Erwartungen aus der Literatur und der Simulation entspricht.

8 Ausblick

Im weiteren Verlauf des Projektes soll der Mikrokanal noch einmal überarbeitet werden. Dabei wird die Möglichkeit geprüft, transparentes Material für den 3D-Druck zu verwenden, um den Mikrokanal komplett zu verschließen. Der neue Mikrokanal wird so konstruiert, dass es möglich ist, die Magneten mit einem möglichst geringen Abstand zum Kanal zu positionieren. Mit dem neuen Kanal sollen erste Versuche mit Vollblut durchgeführt werden.

Danksagung

Diese Publikation ist ein Ergebnis der laufenden Arbeiten im vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekt „OpLaSens“ (Förderkennzeichen: 03FH024PX4) in Kooperation mit der Firma Eschweiler, Kiel.

Literatur

[1] Denis Lafrance, “Near Infrared Determination of Lactate in Biological Fluids and Tissues“; January 2003, Department of Chemistry, McGill University; Montreal, Quebec; Canada

[2] ABL90 Flex Compact technology; Radiometer; Training material and pointing sheets

[3] Udo M. Spornitz, “Anatomie und Physiologie für Pflegeberufe”, Springer Verlag 1993,

[4] Lubert Stryer, “Biochemie”, 7. Auflage, Springer Verlag 2014

[5] Wolfgang Piper, „Innere Medizin“, 2. Auflage, Springer Verlag 2013

[6] Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, Goyal M, Fuchs BD, Shah CV, Bellamy SL, Christie JD. ”Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock.” Crit Care Med. 2009 May; 37(5):1670-7.

[7] del Portal DA, Shofer F, Mikkelsen ME, Dorsey PJ Jr, Gaieski DF, Goyal M, Synnestvedt M, Weiner MG, Pines JM. ”Emergency department lactate is associated with mortality in older adults admitted with and without infections” Acad Emerg Med. 2010 Mar; 17(3):260-8.

[8] Nathan I. Shapiro, Michael D. Howell, Daniel Talmor, Larry A. Nathanson, Alan Lisbon, Richard E. Wolfe, J. Woodrow Weiss “Serum Lactate as a Predictor of Mortality in Emergency Department Patients with Infection” Annals of Emergency Medicine, Volume 45, Issue 5, Pages 524-528, May 2005

[9] Paul A. Tipler, “Physik“, Springer Verlag 2014

[10] Ki-Ho Han, A. Bruno Frazier; “Paramagnetic capture mode magnetophoretic mocroseparation for high efficiency blood cell separations“, published 19th December 2005

[11] AffiAmino UltraRapid Agarose; lab on a bead AB; Beadsurface Biotechnologie; Product no. 1003; Toftebergsvagen 7, SE-44275 Lycke, Sweden; info@labonabead.se

Autoren

Felix Fiedler, M.Sc.
Fachhochschule Lübeck
Medizinische Sensor- und Gerätetechnik
(korrespondierender Autor)

Mönkhofer Weg 239
23562 Lübeck

E-Mail: felix.fiedler@fh-luebeck.de

Christian Stark ,M.Sc.
Fachhochschule Lübeck
Medizinische Sensor- und Gerätetechnik

Prof. Dr.-Ing. Stefan Müller
Fachhochschule Lübeck
Medizinische Sensor- und Gerätetechnik

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