

Berührungslose Messung der Steifigkeit: Anwendung einer Methode aus der Maschinendynamik auf eine Fragestellung aus dem „Tissue Engineering“

M. Kaspar¹, M. Hönicka^{2,3}, S. Schrammel¹

¹ Hochschule Regensburg, FK Maschinenbau, Regensburg

² Klinikum der Universität Regensburg, Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie, Regensburg

³ Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Ulm

Einleitung

Kann bei einem Patienten nach einem Herzinfarkt kein körpereigenes Gefäß als Bypass eingesetzt werden, z.B. durch Varikosis (Krampfadern), soll dieser als Ersatz eine biokompatible Gefäßprothese erhalten. Hier hat sich das Projekt „DFG-Viskograft“ das Ziel gesetzt, die biomechanischen Eigenschaften einer Nabelschnurvene so zu verändern, dass diese als geeigneter Bypass dienen kann. Das Projekt ist eine Zusammenarbeit der Hochschule Regensburg, der Klinik für Herz- und Thorax- und herznahen Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg und der Technischen Universität München. Der grundlegende Gedankengang ist die Nabelschnurvene als extrazelluläre Matrix einzusetzen. Auf dieses Grundgerüst werden mit Hilfe des „Tissue Engineering“ (Gewebezüchtung) autologe Zellen angesiedelt. Somit wird eine nicht immunogene, biokompatible Gefäßprothese erzeugt, und Abstoßungsreaktionen des Körpers auf diesem Wege vermieden. Vor allem, bietet sich die Nabelschnurvene an, da sie ein Abfallprodukt nach der Geburt darstellt, und bisher in den meisten Fällen keine weitere Verwendung nach der Geburt findet. Außerdem besitzt sie auf Grund ihres geringen Alters ein hohes Entwicklungspotenzial.¹

Der fetale Blutdruck am Ende der Schwangerschaft, ist in etwa ein Fünftel des Blutdrucks eines Erwachsenen. Deshalb ist es notwendig, die Steifigkeit der Nabelschnurvene so zu erhöhen, dass diese den Anforderungen als Bypass am Herzen gewachsen ist. Dazu soll die Vene in einer Art „Trainingsstation“ unter natürlichen Bedingungen mit dem Schlagrhythmus eines Herzens angeregt, und somit „trainiert“ werden. Dadurch erhofft man sich eine deutliche Steifigkeitssteigerung im Vergleich zum Ausgangswert.

Bislang war es üblich diese „Trainingsphase“ aufgrund von Erfahrungswerten nach einer gewissen Zeit zu beenden und anschließend die Produkteigenschaften zu analysieren. Es wäre aber wünschenswert, den Trainingsfortschritt permanent ermitteln zu können, um Kenntnis über den Fortschritt der Steifigkeitsänderung zu erhalten. Dies muss zerstörungs- und keimfrei geschehen, da sich die Nabelschnurvene nicht ohne weiteres aus dem sterilen Bioreaktor entfernen lässt. Bislang ist hier nur ein Ansatz bekannt, bei dem anhand der Densität im Ultraschall als Surrogatparameter auf die Materialeigenschaften zurückgeschlossen wird. Ziel muss jedoch die direkte Messung der mechanischen Eigenschaften sein. Um das optimale berührungslose Messverfahren zu testen, wurde ein Versuchsaufbau realisiert, an dem mit Hilfe der Proteolyse die Steifigkeit von dezellularisierten- und nativen Nabelschnurvenen herabgesetzt wird. Auf diese Weise war die Etablierung des Messverfahrens einfacher und schneller möglich als in realen Tissue-Engineering-Versuchen.

Methoden, Wirkstoffe, und Materialien

Während der Versuchszeit von 120-Minuten, wird die Nabelschnurvene in Schwingung versetzt. Mit einem Laser wird die Schwingung erfasst, und die Übertragungsfunktion ermittelt. Durch den Einsatz

von Enzymen, werden spezielle Proteine in der Vene abgebaut, was dazu führt, dass sich die Steifigkeit c der Venen reduziert. Nach einer Nullmessung werden alle 10-Minuten die Messdaten erfasst und abgespeichert. Dadurch lässt sich später die prozentuale Frequenzverschiebung berechnen.

Obwohl eine Nabelschnurvene kein lineares Verhalten aufweist, wird ein linearer Ansatz mehrerer Differenzialgleichungen zweiter Ordnung angesetzt. Mit dieser Vereinfachung, dass sich die Vene wie ein Feder-Masse-Dämpfer-System verhält, kann diese durch die Eigenkreisfrequenz ω_0 sowie den Dämpfungsgrad D charakterisiert wird. Mit diesen Systemparametern, ist es möglich, eine Vorhersage über die Ergebnisse des Frequenzverlaufes zu treffen. Zieht man die Gleichung für die Eigenkreisfrequenz

$$\omega_0 = \frac{\overline{c}}{m}$$

heran, ist folgendes zu erwarten. Da die Steifigkeit c reduziert, und die Masse m als konstant angesehen wird, sollte sich die Ausgangseigenkreisfrequenz bis zum Versuchsende zu kleineren Bereichen verschieben.

Anregung

Angeregt wird die Nabelschnurvene mit dem Linearmotor PS01-48-240F-C der Firma LinMot, basierend auf einen elektromagnetischen Direktantrieb.

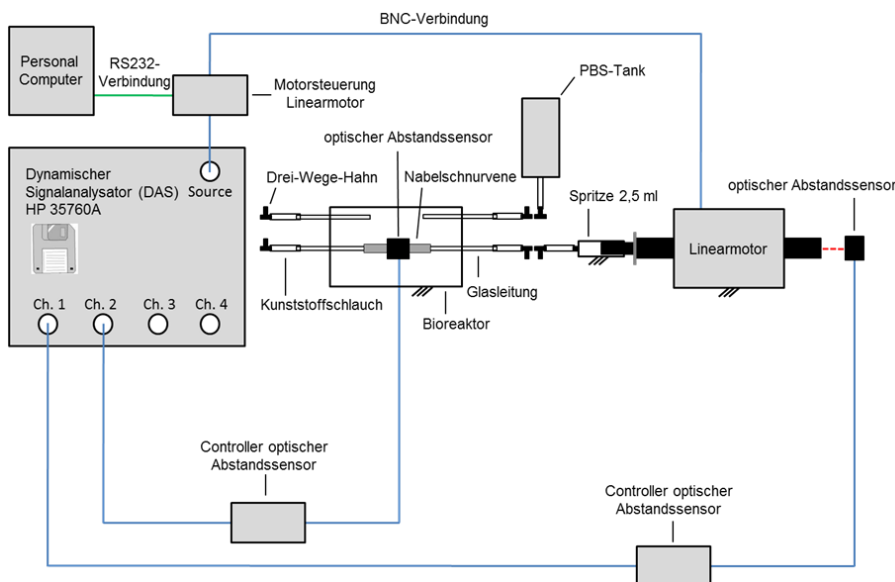


Illustration 1: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage zur berührungslosen Bestimmung der Steifigkeit

Ein dynamischer Signalanalysator gibt dem Motor ein spezielles Erregersignal vor. Getestet wurden der hochlaufende Sinus, Rauschen und das Erteilen von Handimpulsen. Als besonders geeignetes Signal erwies sich bei den Vorversuchen ein bandbegrenzttes weißes Rauschen. Dieses Signal ist am schonendsten für die Nabelschnurvene, da sie nicht dauerhaft in ihrer Eigenfrequenz schwingt, und somit nicht übermäßig beansprucht wird.¹

Über die Motorsteuerung wird das Erregersignal auf den Läufer des Linearmotors übertragen. Das Leitungssystem aus Kunststoffschläuchen, Nabelschnurvene, Glasleitungen, und einer Hamilton-Spritze, ist mit dem Läufer verbunden. Es befindet sich ein Fluid im Leitungssystem, das vom Läufer des Linearmotors in Bewegung versetzt wird, und die Vene zum Schwingen anregt.

Optischer Abstandssensor

Zu Beginn, wurden zwei Wege verfolgt, wie die Oberflächenschwingung der Nabelschnurvene berührungslos aufgenommen werden kann. Sowohl ein Laser Doppler Vibrometer, als auch ein optischer Abstandssensor wurden gleichzeitig bei den Versuchen eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass die Ergebnisse beider Methoden vergleichbar waren. Deshalb setzte man bei den darauffolgenden Proben nur noch auf den optischen Abstandssensor M5L/10 der Firma MEL. Gründe dafür sind die einfachere Handhabung bei der Fokussierung, der wesentlich günstigere Preis, und der kleinere Bauraum. Dieser Sensortyp arbeitet nach dem Prinzip der Lasertriangulation.

Dynamischer Signalanalysator

Der dynamische Signalanalysator HP 35670A gibt nicht nur das Erregersignal aus, sondern verarbeitet auch das von der Zeit abhängige Geschwindigkeitssignal des optischen Abstandssensors. Ein Sensor wird eingesetzt um die Läuferbewegung des Linearmotors, der zweite um die Schwingung der Nabelschnurvene aufzunehmen. Mit einem integrierten FFT-Algorithmus im Signalanalysator werden dann die Geschwindigkeitssignale vom Zeitbereich in den Frequenzbereich transformiert und im Power Spectrum dargestellt. Um auch aussagekräftige Amplituden zu erhalten, die das Erregersignal berücksichtigen, wird zusätzlich eine Frequency Responce erstellt. Da die Eigenfrequenzen durch Erfahrung bei niedrigen Frequenzen (0-30Hz) zu erwarten sind, wurde der Messbereich auf 0-50Hz festgelegt. Damit ergibt sich eine Auflösung am dynamischen Signalanalysator von 0,125Hz.



Illustration 2: Messaufbau der Versuchsanlage an der HS.R im Labor für Maschinendynamik

Proteolyse

Hätte man sofort die Fortschritte bei einer Steifigkeitserhöhung messen wollen, wäre ein enormer Aufwand entstanden. Anstelle einer einfachen Salzlösung wäre eine spezielle Nährlösung notwendig gewesen, um die Nabelschnurvene zu versorgen. Weiterhin wäre ein vollständig steriler Betrieb der Messanlage notwendig gewesen. Außerdem dauert eine Steifigkeitszunahme sehr lange, was

bedeutet, dass sich die Eigenfrequenzen nur sehr langsam verschieben. Eine Probenreihe in einer vernünftigen Zeit zu bearbeiten, wäre nicht zu realisieren gewesen. Da eine Steifigkeitsreduzierung leichter durchzuführen ist, setzte man auf das Verfahren der Proteolyse. Dieses wurde schon erfolgreich zur Analyse der biomechanischen Funktion der unterschiedlichen Strukturproteine in Blutgefäßen angewendet. Besteht die Möglichkeit, eine Verschlechterung der Steifigkeit mit diesem Versuchsaufbau zu erfassen, kann auch mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, eine Steifigkeitserhöhung festhalten zu können.

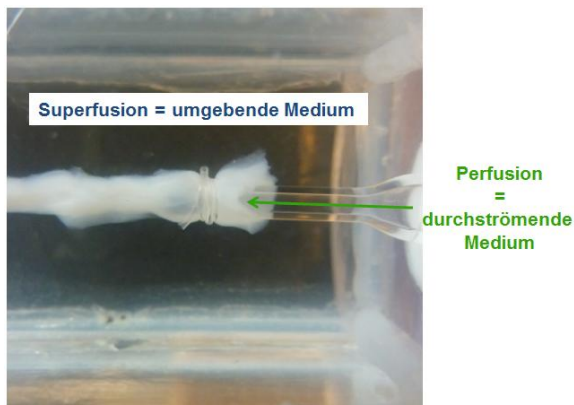


Illustration 3: Superfusion und Perfusion im Bioreaktor

Proteolyse ist ganz allgemein die hydrolytische Spaltung von Proteinen.² Die beiden Strukturproteine Kollagen und Elastin sollen in getrennten Versuchsreihen mit Hilfe von Enzymen abgebaut werden. Die Enzyme werden in das Lumen der Nabelschnurvene eingespritzt. Immer mehr Proteine werden gespalten, und die Steifigkeit reduziert sich, je länger die Versuchszeit andauert.

Enzyme

Die Wand von Blutgefäßen besteht im Wesentlichen aus zwei lasttragenden Proteinen. Kollagen ist entscheidend für die Zugfestigkeit des „Materials“ Gefäßwand, während Elastin die elastischen Eigenschaften vor allem bei niedrigen Belastungen bestimmt. In der ersten Messreihe wurde das Kollagen in der extrazellulären Matrix der Nabelschnurvene mit dem Enzym Kollagenase gespalten. Bei der zweiten Messreihe kam das Enzym Elastase zum Einsatz. Dies ist für die Spaltung des Elastins verantwortlich. Die Enzymkonzentrationen wurden in Vorversuchen so festgelegt, das innerhalb der geplanten Messzeit von 120 Minuten eine deutliche Änderung der mechanischen Eigenschaften zu verzeichnen war.

Nabelschnurvene

Für die Messungen wurden sowohl dezellularisierte, als auch native Nabelschnurvenen verwendet. Dezellularisiert bedeutet, dass alle zellulären Bestandteile der Nabelschnurvene komplett entfernt wurden, bis lediglich noch die extrazelluläre Matrix übrigbleibt. Es kamen drei verschiedene Verfahren der Dezellularisierung zur Anwendung die die Zellen mit unterschiedlichen chemischen bzw. physikalischen Prinzipien zerstören. Methode 1 verwendete eine Mischung aus Detergenzien um die Zellmembranen aufzulösen. Methode 2 verwendete einen mehrfachen Wechsel der Osmolarität durch Inkubationen in einer hochmolaren NaCl-Lösung und in destilliertem Wasser.

Methode 3 setzte eine Peroxyessigsäurelösung ein, um die Zellen durch Oxidation zu schädigen. Native Nabelschnüre wurden kurz nach der Geburt in eine physiologische Salzlösung eingelegt. Spätestens am nächsten Tag, also wenige Stunden nach der Geburt, wurde die Vene herauspräpariert, und in den Versuchsaufbau integriert. Dadurch ist sichergestellt, dass die Zellen bei Beginn der Messung noch intakt sind. Die Anzahl der Venen wurde so gewählt, um ein optimales Verhältnis zwischen Aussagekräftigkeit der Ergebnisse, und Arbeitsaufwand zu erhalten. Die Venenlänge, sollte zwischen 5,0 cm und 7,0 cm liegen. Darauf wurde geachtet, da sich bei Vorversuchen mit kürzeren Venen gezeigt hat, dass diese nicht optimal in Schwingung versetzt werden.²

Ergebnisse

Die Verarbeitung der gewonnenen Daten aus einem Versuch wird anhand einer Beispielvene gezeigt. Die Messdaten wurden am dynamischen Signalanalysator abgespeichert, und in das Programm MATLAB konvertiert. Dort nutzte man die Stärken dieses Programmes im Graphikbereich. Mit einem Skript werden die Messwerte in MATLAB zuerst geglättet, dann in eine Matrix geschrieben und anschließend als 3D-Plot (Abbildung 4) ausgegeben. Auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten, auf der y-Achse die Frequenz in Hertz, und auf der z-Achse die Amplitude in Mikrometer aufgetragen. Zur besseren Auswertung des Frequenzabfalles ist die Betrachtung der xy-Achse (Abbildung 5) sinnvoll. Der Einfluss der Perspektive wird ausgeschlossen. Die Amplitude als Farbbalken ist zusätzlich seitlich eingeblendet.

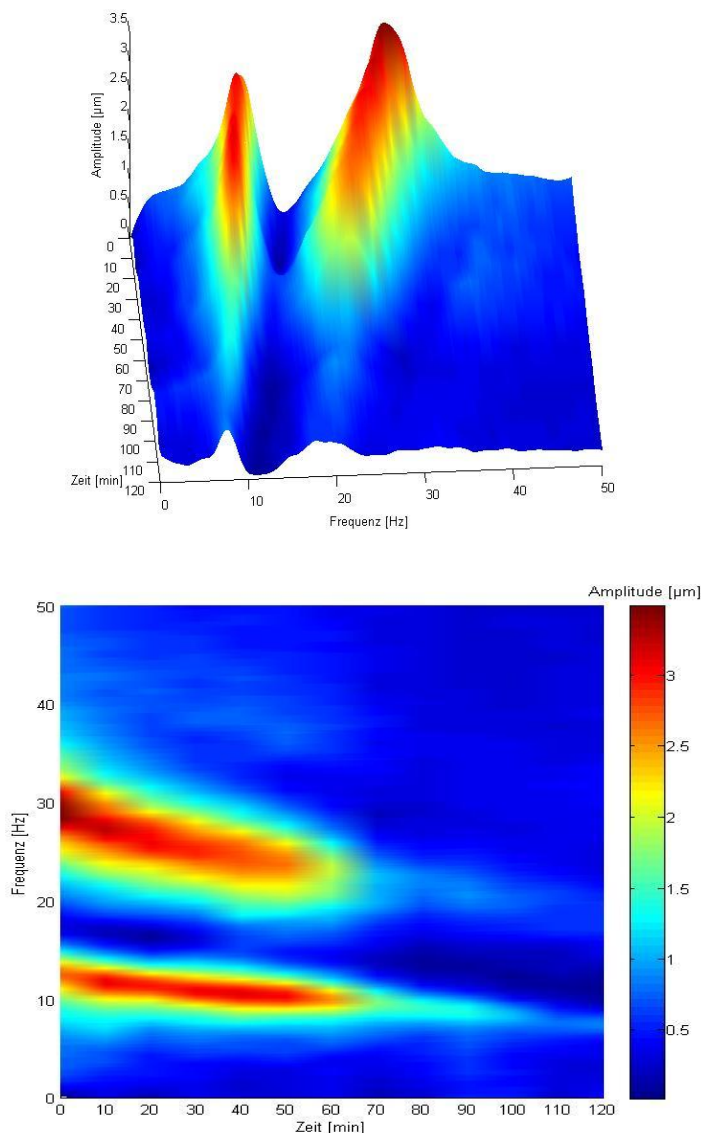


Illustration 4:
Darstellung der
Frequenzverschiebung
der Vene 4391

Zu jeder Nabelschnurvene wurde zusätzlich der prozentuale Frequenzverlauf mit dem Programm EXCEL ermittelt.

Die Frequenzwerte zu den einzelnen Messzeiten, importiert in eine Tabelle, ergaben den gewünschten Diagrammtyp. Um eine Aussage über die Ähnlichkeit der Frequenzverläufe der zu einer Messreihe gehörenden Nabelschnurvenen treffen zu können, sind die prozentualen Frequenzen gemittelt, und die Standardabweichung bestimmt worden. Das Ergebnis einer solchen Vorgehensweise, ist in Abbildung 6 als Beispiel für alle nativen Nabelschnurvenen dargestellt.

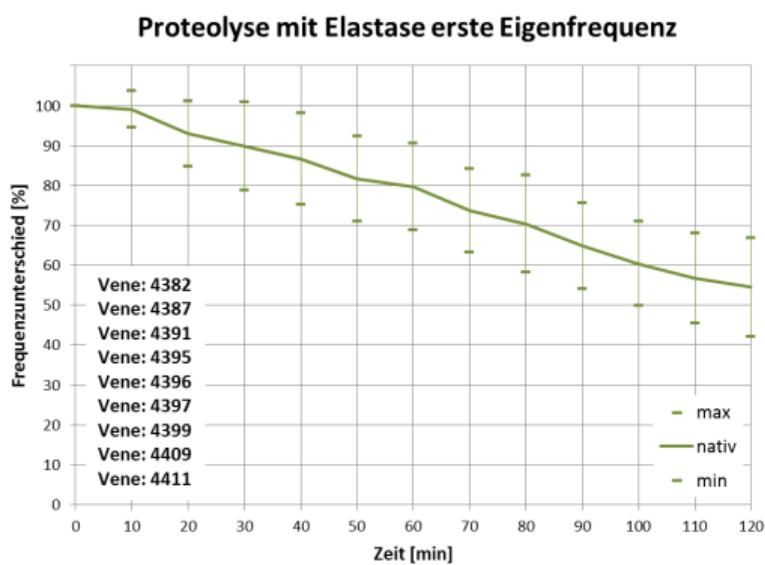


Illustration 5: Prozentualer Frequenzverlauf aller nativen Nabelschnurvenen (Elastase)

Diskussion

Nach der Auswertung aller Ergebnisse hat es sich gezeigt, dass bei 94% der untersuchten Nabelschnurvenen eine Verschiebung der Eigenfrequenz aufgezeichnet werden konnte. Die nicht veränderte Ausgangsfrequenz bei den restlichen Venen kann folgendermaßen erklärt werden. Während der Versuchszeit war es aus biologischen Gründen dem Enzym nicht möglich, seine volle Wirkung zu entfalten. Würden die gemessenen Eigenfrequenzen vom Versuchsaufbau stammen, z.B. Schwingung des Bioreaktors, dann müssten diese Frequenzen sehr wahrscheinlich auch bei anderen Venen zu finden sein. Da dies aber nicht der Fall ist, kann festgehalten werden, dass das berührungslose Messverfahren mit einem optischen Abstandssensor funktioniert, und sehr gute Ergebnisse geliefert hat.

Eine Herausforderung für das rote Laserlicht war es, drei unterschiedliche Medien zu durchdringen, bis es auf die Oberfläche der Vene trifft. Luft, Glas des Bioreaktors, und die Superfusion beeinträchtigten laut den Ergebnissen aber nicht die Funktion des Sensors. Weiter wurde auch genügend Licht von der Oberfläche der Vene reflektiert, so dass sich das rote Laserlicht in den Versuchen bewährte.

Die Frequenzverläufe der Ergebnisse aus MATLAB stimmen grundlegend mit den Erwartungen der Systemtheorie überein. Trotzdem bleibt anzumerken, dass die Resultate an manchen Stellen nur damit erklärt werden können, indem es sich bei der Nabelschnurvene um ein nichtlineares System handelt. Das bestätigt die bereits vor den Versuchen getroffene Annahme einer Nichtlinearität. Deutlich wird dieses Verhalten bei Vene 4391 in Abbildung 5. Die erste Eigenfrequenz besitzt einen linearen-, die zweite einen nichtlinearen Verlauf.

Anhand der Abbildungen 7 und 8 können die Erfolge der Steifigkeitsreduzierung mit Kollagenase und Elastase verglichen werden.

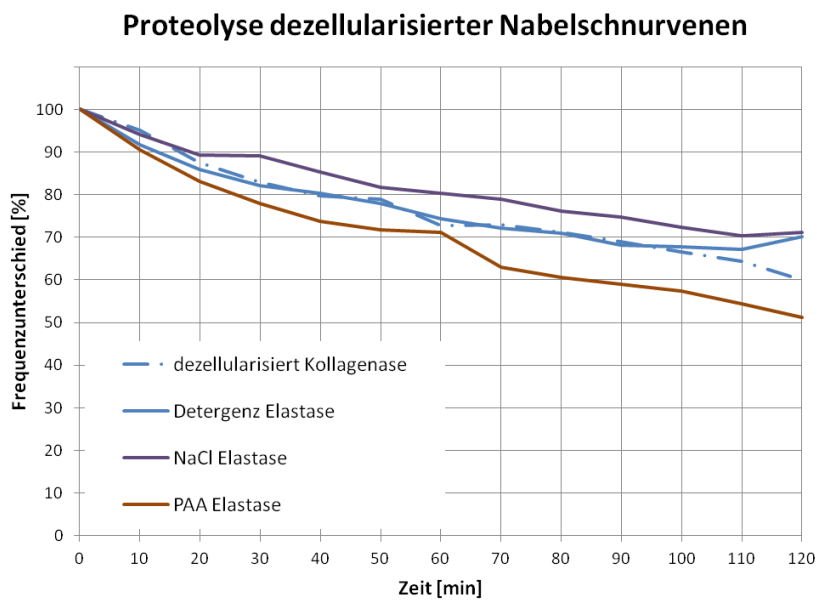


Illustration 6: Übersicht Kollagenase und Elastase bei dezellularisierten Nabelschnurvenen

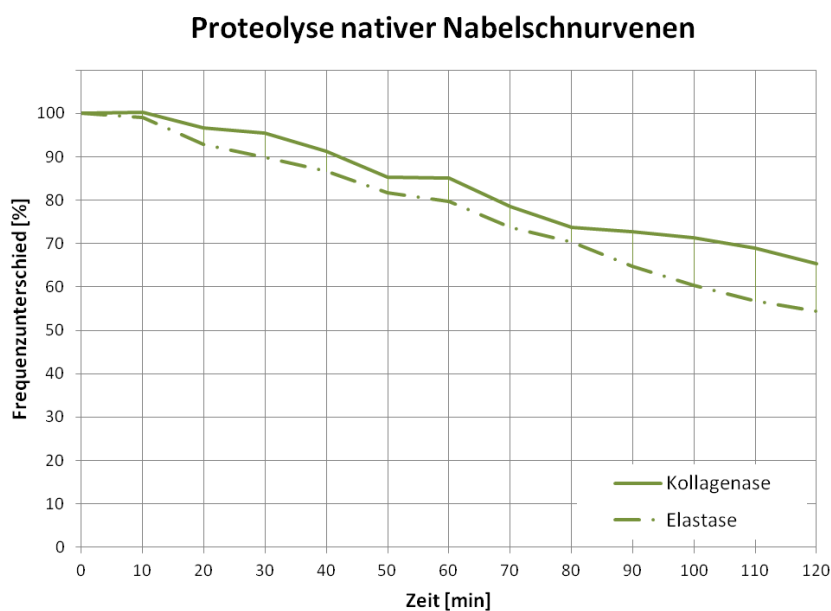


Illustration 7: Übersicht Kollagenase und Elastase bei nativen Nabelschnurvenen

Die Venen, denen die zellulären Bestandteile komplett entfernt wurden, zeigen bereits nach der ersten Messung einen Frequenzabfall auf. Kollagenase dezellularisiert (Abbildung 7) wurde in einem Verlauf zusammengefasst, da hier nur insgesamt sechs Venen mit den drei Dezellularisierungsverfahren vermessen werden konnten. Native Nabelschnurvenen haben sich so verhalten, dass erst nach einer gewissen Einwirkzeit des Enzyms eine Eigenfrequenzverschiebung auszumachen war. Die Ursache hierfür dürfte die unterschiedliche Zugänglichkeit der extrazellulären Matrix für die Enzyme sein: bei nativen Gefäßen behindern die noch vorhandenen Zellen den Zugang der Enzyme zu den lasttragenden Proteinen, wodurch der Verdau initial verlangsamt wird. Die Verläufe der verschiedenen Dezellularisierungsverfahren sind zu ähnlich und weisen kein eindeutiges Merkmal auf, um sie anhand der Messdaten zu unterscheiden. Dies liegt daran, dass sich die Verfahren zwar methodisch unterscheiden, jedoch führen sie jeweils zu einem Endprodukt mit nahezu identischen Eigenschaften. Der Unterschied zwischen Kollagenase und Elastase ist auch zu gering, um eines davon exakt zu kennzeichnen. Hier wäre eventuell eine weitergehende Datenanalyse notwendig, um neben der Eigenfrequenz den Dämpfungsgrad zu erfassen. Dies wäre für die spätere Anwendung interessant, da so die Änderungen in der Gefäßwand während der „Trainingsphase“ besser dahingehend beurteilt werden können, ob eine Kollagen- oder Elastinsynthese (oder beides) stattfindet.

Am Ende hat sich aber die Vorgehensweise der Steifigkeitsreduzierung mit dem Verfahren der Proteolyse als gewinnbringend erwiesen. Eine deutliche Verschiebung des Frequenzverlaufes konnte durch den Einsatz des optischen Abstandssensors sowohl bei Elastase, als auch bei Kollagenase festgehalten werden.

Aufgrund der Erkenntnisse der Versuchsdurchführung wurde eine Automatisierung des Versuches durchgeführt. Mithilfe der Software LabView wurde ein PC-gestütztes Messsystem zur Aufnahme und Analyse der Messdaten entwickelt.

Hierdurch wurde es ermöglicht, nicht nur in dem kleinen Zeitfenster von 2 Stunden, sondern über Tage und Wochen ununterbrochen aufzunehmen. Dies war ein wichtiger Schritt, um dieses Verfahren in die Viskograft-Anlage einzubinden und somit den aktuellen Zustand der Staffolds zu bestimmen. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen der biomechanischen Parameter kann eine aktuelle und individuelle Anpassung der regelungstechnischen Parameter für die Prozessregelung ermittelt werden. Weiterhin besteht jetzt die Möglichkeit die mechanischen Stimulationssignale individuell auf den Fortschritt des Zellenwachstums anzupassen.

Literatur

1. P. Kirsch, Messtechnische Bestimmung der Steifigkeit einer Nabelschnur-vene, Hochschule Regensburg 2010
2. M. Kaspar, Biomechanische Parametrisierung bei der Proteolyse von Nabelschnurvenen, Hochschule Regensburg 2011
3. S. Kreitz, G. Dohmen, M.D., S. Hasken, T. Schmitz-Rode, M.D., Dipl.-Ing., P. Mela, Dr.-Ing., S. Jockenhoevel, M.D., Nondestructive Method of Evaluate the Collagen Content of Fibrin-Based Tissue Engineered Structures via Ultrasound, Part C Volume 17, Number 10, 2011