

Direkte Messung des Heparinspiegels beim Blutgerinnungsmanagement

Eine Lichtstreu-Messmethode im *point-of-care* Einsatz erhöht die Sicherheit für die Patienten

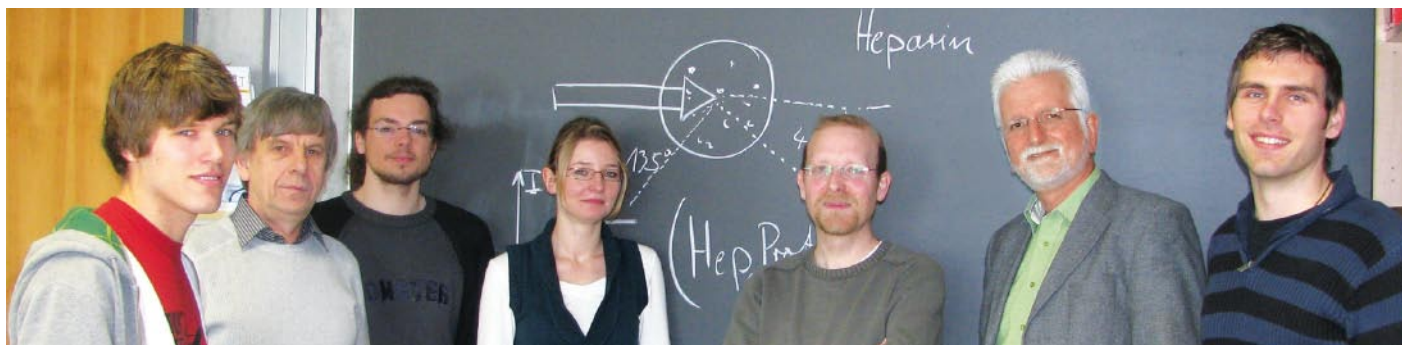
Heparine, natürliche Mucopolysaccharide aus dem Schweinedarm, sind die meistverwendeten Medikamente zur Kontrolle der Blutgerinnung. Sie werden in hoher Dosierung zur Verhinderung von Blutgerinnseln bei operativen Eingriffen eingesetzt. In niedrigerer Dosierung dienen sie zur Thromboseprophylaxe, beispielsweise bei längeren Liegezeiten oder während der Schwangerschaft. Viele injizieren sie auch bei Langstreckenflügen, um die Thrombosegefahr zu reduzieren.

Mit den höchsten Dosierungen von Heparin findet man in der Herzchirurgie, vor allem dann, wenn bei Bypass-Operationen die Herz-Lungen-Maschine (HLM) zum Einsatz kommt. Die Heparinisierung des Blutes wird dabei so eingestellt, dass die normale Gerinnungszeit von ca. 2 Minuten auf ca. 5–8 Minuten ansteigt. Mit dieser Maßnahme wird das Risiko der Bildung von Blutgerinnseln während des Eingriffs reduziert. Am Ende eines Eingriffs muss das normale Gerinnungsvermögen des Blutes wiederhergestellt werden. Man verwendet dazu Protamin,



ein basisches Peptid aus 31 Aminosäuren. Es ist wegen seiner 21 Argininreste unter physiologischen Bedingungen stark positiv geladen und bindet spezifisch an Heparin, so dass dessen Wirkung in der Gerinnungskaskade aufgehoben wird.

Derzeit erfolgt die Dosierung von Heparin über eine Faustregel auf der Basis des Körpergewichts (ca. 300–350 I.E. /kg Körpergewicht). Die Kontrolle der Heparinisierung mit Hilfe von Gerinnungstests wie ACT (activated clotting time) oder Hepcon stellt jedoch nur eine grobe Schät-



► V.l.n.r.: Christian Seiler, Dr. Vitali Vogel, Viktor Gesiarz, Stephanie Haselbach, Dr. Oliver Klein, Prof. Dr. Werner Mäntele, Jürgen Maurer, Goethe-Universität Frankfurt am Main

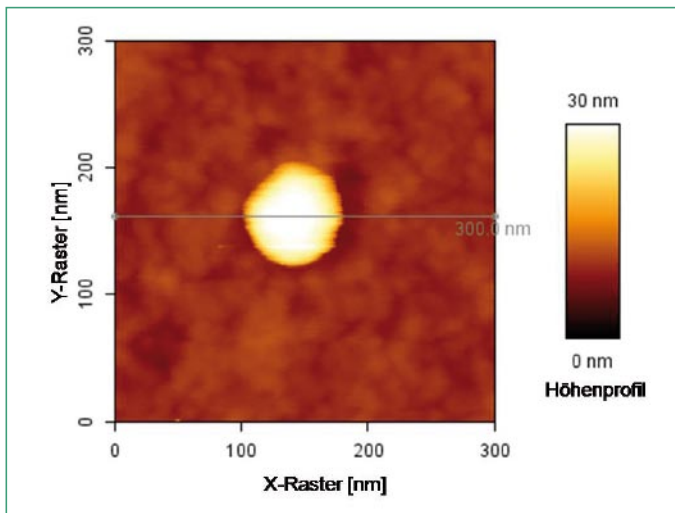


Abb. 1: Heparin-Protamin-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 80 nm (aufgenommen mit dem Atomkraftmikroskop)

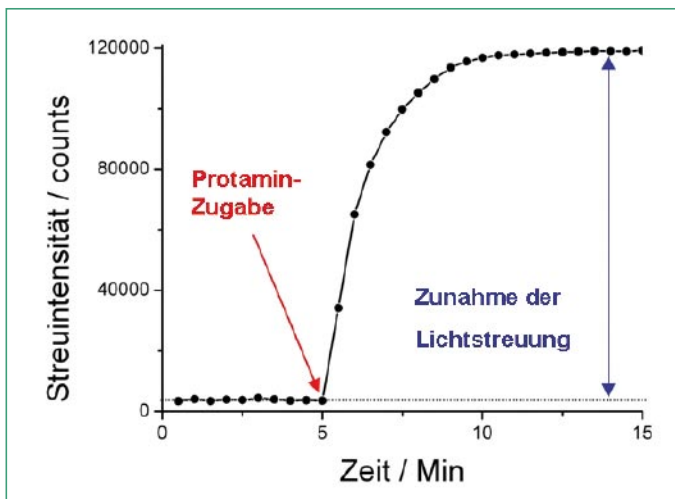


Abb. 2: Lichtstreuung von Plasma aus heparinisiertem Blut bei Protaminzugabe

zung dar; sie wird ausserdem bei beiden Methoden stark von der Körpertemperatur und der Blutverdünnung beeinflusst. Gerade beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine stellt dies ein Problem dar. Auch die Dosierung von Protamin erfolgt aufgrund dieser Schätzung. Eine direkte Bestimmung des Heparinspiegels ist bislang nur im Labor möglich und viel zu zeitaufwendig, um sie als *point-of-care*-Methode zu implementieren.

Eine neue Messmethode zur Heparinbestimmung mit Lichtstreuung

Wir haben bereits in früheren Beiträgen (GIT Special Separation 1/2007) über eine von uns entwickelte Methode zu direkten Heparinbestimmung berichtet, die auf

der Komplexierung von Heparin durch Protamin beruht und so schnell und einfach durchgeführt werden kann, dass sie als *point-of-care* Methode in Frage kommt. Diese Methode nutzt die Lichtstreuung der Nanopartikel, die sich aus Heparin-Protamin-Komplexen spontan bilden, für die quantitative Bestimmung. Sie zeigen einen Durchmesser von ca. 60–100 nm und können beispielsweise mit dem Atomkraftmikroskop sichtbar gemacht werden (Abb. 1).

Für eine Heparinbestimmung mit dieser Methode wird dem Patienten eine kleine (ca. 3. ml) Blutprobe entnommen. Das Blutplasma, das man durch eine kurze Zentrifugation erhält, wird mit einem Überschuss an Protamin versetzt. Abb. 2 zeigt den Verlauf der Lichtstreuung für eine Plasmaprobe

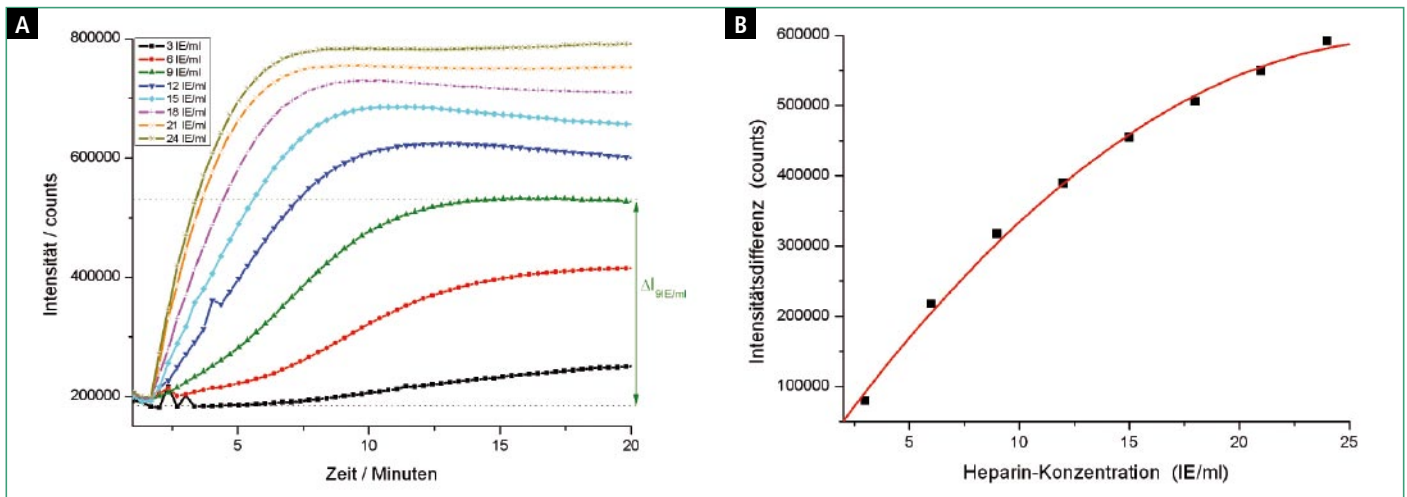


Abb. 3: (a) Änderung der Lichtstreuung bei Blutplasma mit unterschiedlichem Heparin Gehalt, (b) Lichtstreuung als Funktion des Heparinspiegels

aus Vollblut. Nach der Zugabe von Protamin bilden sich innerhalb von wenigen Minuten die Nanopartikel, was an der Zunahme der Lichtstreuung verfolgt werden kann.

Mit zunehmendem Heparin Gehalt steigt die Lichtstreuintensität stark an (Abb. 3a). Der Zeitverlauf ändert sich von kleinen zu großen Heparinkonzentrationen. Aus ihm

können Rückschlüsse auf den Mechanismus gezogen werden, mit dem sich die Nanopartikel aus den Heparin-Protamin-Komplexen bilden. Mit einer Kalibrierung, die im Labor erstellt wurde, kann aus der Differenz der Lichtstreuung zwischen dem Startwert vor Protaminzugabe und dem Endwert nach ca. 10 Minuten quantitativ der

Heparinspiegel der Blutprobe bestimmt werden (Abb. 3b).

Der Zusammenhang zwischen Heparinmenge und Lichtstreuung ist nicht notwendigerweise linear. Dies liegt vor allem daran, dass mit zunehmender Partikelzahl Mehrfachstreuung auftritt, d.h. bereits gestreutes Licht in einem weiteren Streuprozess abgelenkt wird.

Farbstoffs gelöscht. Abb. 4b zeigt die Fluoreszenz von rhodamin-modifiziertem Protamin für verschiedene Heparinkonzentrationen. Auch hier kann durch eine Kalibrierung der Heparinspiegel quantitativ bestimmt werden. Beide Verfahren – Lichtstreuung und Fluoreszenzmessung – decken verschiedene Dosierungsbereiche von Heparin ab und ergänzen sich hervorragend.

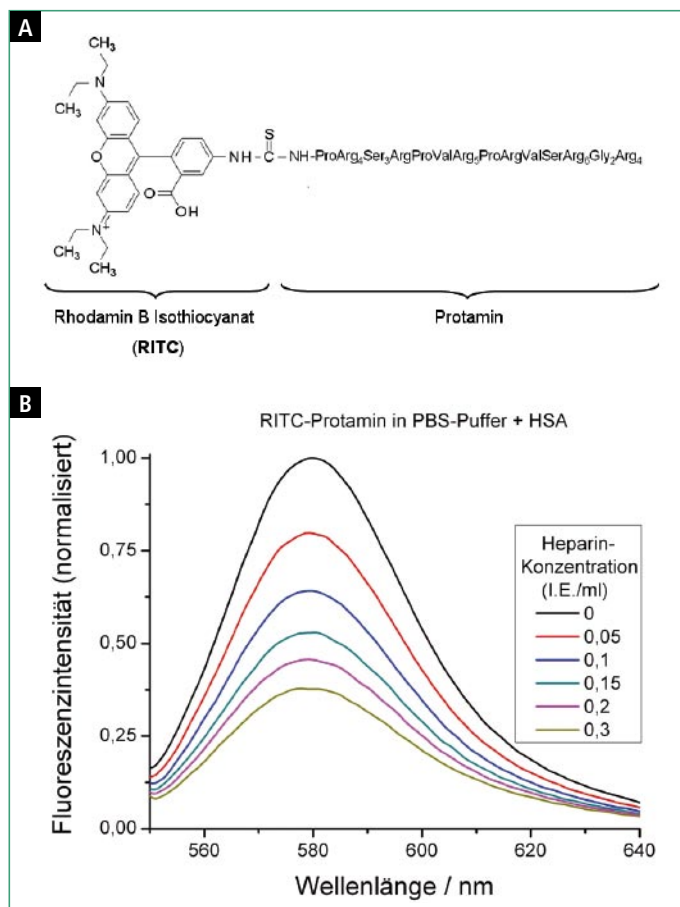


Abb. 4: (a) Protamin mit dem Farbstoff Rhodamin B Isothiocyanat
(b) Fluoreszenz von Plasmaproben mit unterschiedlichem Heparin Gehalt nach Zugabe des modifizierten Protamins

Fluoreszenzlöschung zur Heparinbestimmung

Eine zweite Methode, die allerdings noch im Laborstadium ist, scheint ebenso gut für die quantitative Bestimmung von Heparin in der Klinik geeignet. Diese Methode nutzt die Löschung der Fluoreszenz von Farbstoffen, wenn sie an anderen Molekülen gebunden sind. Da Heparin und Protamin nur wenig Eigenfluoreszenz zeigen und Heparin als Medikament nicht einfach verändert werden kann, verwenden wir ein Protamin, das wir mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt haben. Abbildung 4a zeigt als Beispiel die Struktur des Protaminmoleküls mit dem an das aminotermale Ende gekoppelten Farbstoff Rhodamin B Isothiocyanat. Auch andere Farbstoffe können angekoppelt werden.

Für die quantitative Bestimmung des Heparins wird zu diesem Plasma farbstoffmodifiziertes Protamin gegeben und die Fluoreszenz gemessen.

Durch die Heparin-Protamin-Bindung wird die Fluoreszenz des

Vom Laborverfahren zum Prototyp für die point-of-care-Diagnostik

Die Messung der Lichtstreuung kann besonders einfach mit Leuchtdioden (LEDs) als Lichtquellen und mit Photodioden als Detektoren umgesetzt werden. Wir haben dazu einen Prototypen eines Streulichtphotometers entwickelt, der jetzt in der klinischen Validierung der Methode eingesetzt wird. Bei diesem Prototyp wird als Lichtquelle eine intensitätsmodulierte rote LED mit einer Emissionsbande um 635 nm verwendet, vor allem um eine störende Absorption in der Probe durch Spuren von freiem Hämoglobin im Plasma zu vermeiden (es sind die gleichen roten LEDs, die auch bei Rückleuchten und Bremsleuchten von Kraftfahrzeugen eingesetzt werden). Als Detektoren werden Photodioden bei 45° und bei 135° verwendet, um die Vorwärtsstreuung und die Rückstreuung separat zu messen. Die Intensität der Vorwärtsstreuung liefert



Abb. 5: Prototyp des Messgeräts für die direkte Heparinbestimmung in klinischen Test

Informationen über die Menge der lichtstreuenden Partikel; aus dem Quotienten der Intensitäten bei 45° und bei 135° kann die Partikelgröße abgeschätzt werden, beispielsweise um die Entwicklung der Partikelbildung zu verfolgen. Ein Laptop mit einer von uns entwickelten Software steuert den Meßablauf, liefert die Pulse für die Steuerung der LED und analysiert die Streulichtintensitäten bei 45° und 135° . In diesem Programm können Kalibrierkurven, beispielsweise für nieder- oder hochmolekulare Heparine, abgelegt werden. Mit dieser Kalibrierung liegt die Heparinkonzentration der Blutprobe etwa 15 Minuten nach der Blutentnahme quantitativ vor.

Klinische Validierung der direkten Heparinbestimmung in der Herzchirurgie

Derzeit wird die direkte Heparinbestimmung in einer klinischen Studie bei Bypass-Operationen an der Herz-Lungen-Maschine in der Universitätsklinik Frankfurt validiert (Abb. 5). Bei diesen

Operationen wird zunächst der Patient heparinisiert, um den externen Blutkreislauf ohne Gefährdung durch Koagulationen betreiben zu können. In festen Zeitintervallen wird dann Heparin nachdosiert, um eine ausreichende Heparinisierung zu sichern.

Bei der Validierung werden die Daten für die Blutgerinnung aus der ACT- bzw. Hepcon-Methode, die Menge des anfangs dosierten und zu bestimmten Zeiten nachdosierten Heparins, sowie die Dosierung des Protamins am Ende des Eingriffs erfasst. Parallel dazu wird bei jeder Blutentnahme der aktuelle Heparinspiegel nach der neuen Methode direkt bestimmt.

Wir sind zuversichtlich, dass diese neue Methode nach ihrer Einführung eine rationale Dosierung von Heparin ermöglicht, die weitaus präziser sein wird als die bisherigen Verfahren. Ein Blutgerinnungsmanagement auf der Basis einer als *point-of-care*-Methode durchgeführten, direkt und nicht von Randbedingungen des chirurgischen Eingriffs verfälschten Meßmethode für den Heparinspiegel bedeutet ein geringeres Risiko für postoperative Blutungen oder Blutgerinnsel und damit eine erhöhte Sicherheit für die Patienten.

Danksagung

Die Autoren danken Dr. C.F. Weber, PD Dr. Meininger, Prof. Dr. A. Moritz (Klinikum der Goethe-Universität) und PD. Dr. Poan Baykut für die gute Zusammenarbeit. Für die atomkraftmikroskopischen Aufnahmen der Partikel danken wir Herrn Helge Großmann (Institut für Biochemie der Goethe-Universität).

Autoren

Dipl.-Phys. Jürgen Maurer, Doktorand, Institut für Biophysik

Stephanie Haselbach, Medizinstudentin und Doktorandin, Institut für Biophysik

Dr. Vitali Vogel, Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biophysik

Dr. Oliver Klein, Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biophysik

Viktor Gesiarz, Christian Seiler, Bachelorstudenten, Fachbereich Physik

Prof. Dr. Werner Mäntele, Professor für Biophysik, Fachbereich Physik, Direktor des Instituts für Biophysik

Goethe-Universität Frankfurt am Main

► KONTAKT

Prof. Dr. Werner Mäntele

Institut für Biophysik
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Tel.: 069/798-46411
Fax: 069/798-46423
maentele@biophysik.uni-frankfurt.de
www.biophys.uni-frankfurt.de