

Schwingquarze als Hämostase-Sensoren



Eine neue Methode
zur hämostaseologischen
Diagnostik in Vollblut



Schwingquarze als Hämostase-Sensoren

Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut

Lothar Müller

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung
des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

durchgeführt am

Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
in Tübingen

unter Anleitung von

Prof. Dr. Ch. Ziegler

Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern

und

Prof. Dr. H. Northoff

Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET)
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Datum der wissenschaftlichen Aussprache:

01.07.2009

D386

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: (TU) Kaiserslautern, Univ., Diss., 2009

978-3-86955-050-3

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit vom 01.08.2006 - 31.07.2009 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Experimentelle und Klinische Transfusionsmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring. Die Begutachtung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ch. Ziegler, Technische Universität Kaiserslautern, und Prof. Dr. Northoff, Universität Tübingen, übernommen.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-050-3

Kurzfassung

Ein austariertes Hämostase-Gleichgewicht ist für viele physiologische Prozesse essentiell. Störungen dieses Gleichgewichts können erhebliche Komplikationen hervorrufen und sogar tödliche Folgen haben. Eine umfangreiche und schnelle Kontrolle des gesamten Hämostase-Systems zur frühzeitigen Erkennung und Charakterisierung drohender Störungen ist deshalb gerade hier zwingend notwendig. Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung hämostaseologischer Tests unter Verwendung akustischer Sensoren. Dabei wurden piezoelektrische Schwingquarze mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz zur Untersuchung der Gerinnung, der Fibrinolyse und der Funktionsfähigkeit von Thrombozyten in Vollblut eingesetzt.

Für die entsprechenden Tests wurden unterschiedlichste Beschichtungen der Schwingquarze realisiert, charakterisiert und auf ihre Tauglichkeit für den jeweiligen Test geprüft. Neben hydrophilen Beschichtungen mit Polyethylenglykolen und hydrophoben Kunststoffbeschichtungen mit Polystyrol bzw. Polyethylen kamen auch kovalent immobilisierte Protein-Oberflächen zum Einsatz. Auf Polyethylen-beschichteten Schwingquarzen konnten erstmals Gerinnungszeiten modifizierter Quick-Tests in Vollblut in sehr guter Übereinstimmung zur medizinischen Standardmethode Koagulometrie bestimmt werden. Zudem konnten auf derart beschichteten Oberflächen hyperfibrinolytische Auflösungsprozesse von Blutgerinnseln in Echtzeit nachgewiesen werden, wobei auch hier die Ergebnisse der Schwingquarzsensoren sehr gut mit denen etablierter Methoden korrelieren. Untersuchungen zur Aggregations- und Adhäsionsfähigkeit intakter Thrombozyten konnten auf der unbeschichteten Goldoberfläche der Schwingquarzelektrode, Polystyrol-beschichteten Oberflächen sowie Oberflächen mit kovalent gebundenem Fibrinogen in sehr guter Übereinstimmung mit der medizinischen Routinemethode durchgeführt werden. Ebenso konnte auf diesen drei Sensorbeschichtungen mittels Schwingquarzsensoren jeweils der schädigende Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Aggregation der Thrombozyten nachgewiesen werden. Alle in dieser Arbeit etablierten hämostaseologischen Tests konnten exemplarisch auf dem im Laufe des Projektes entwickelten mikrofluidischen Chip mit integriertem Schwingquarzsensoren erfolgreich ausgeführt werden.

Das enorme Potenzial der Schwingquarzsensoren im Bereich der hämostaseologischen Diagnostik wird anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deutlich. Sie stellen die Basis zur Bearbeitung weiterer interessanter Bereiche, wie zum Beispiel dem Nachweis einzelner Gerinnungsfaktoren oder von Fibrinogenspaltprodukten, dar.

Abstract

Many physiological processes require a well balanced haemostasis. Imbalances can cause severe complications and may even end fatally. Hence, a comprehensive and fast control of the haemostatic system is mandatory in order to detect and characterize imminent imbalances in time. The aim of the present dissertation was the development of haemostatic tests using acoustic sensors. Piezoelectric quartz crystal resonators with a resonance frequency of 10 MHz were applied for the investigation of coagulation, fibrinolysis and platelet function in whole blood samples.

Different sensor coatings of the quartz resonator were realized, characterized and tested with respect to their suitability for different haemostatic tests. In addition to hydrophilic coatings based on polyethylene glycol and hydrophobic polystyrene or polyethylene coatings, surfaces with covalently immobilised proteins were also applied. For the first time, coagulation times of a modified Quick-Test on polyethylene sensor surfaces could be measured and were found to be in very good accordance with the standard coagulometry as used in medical routine laboratories. Furthermore, hyperfibrinolytic lysis of blood clots could be monitored in real time on such coated surfaces. Also in this case, results obtained by the quartz crystal microbalance sensor were consistent with the results of the established method. Investigation of platelet aggregation and adhesion of platelets could also be performed in very good accordance to the established medical method. These tests succeeded using the blank gold surface of the quartz crystal electrode as well as polystyrene coated surfaces and surfaces with covalently bound fibrinogen. Likewise the inhibitory effect of acetylsalicylic acid on platelet aggregation could be detected by quartz crystal microbalance using these three sensor surfaces. Exemplarily all haemostatic tests established in this work could also be successfully performed using a microfluidic chip with integrated quartz crystal microbalance sensor, which was developed in the course of the project.

The results of the present work demonstrate an enormous potential of quartz crystal microbalance in diagnosis of haemostasis. They also provide the basis for further interesting assays like the detection of individual coagulation factors or fibrinogen degradation products.

Inhaltsverzeichnis

<i>Kurzfassung</i>	3
<i>Abstract</i>	4
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	7
1 Einleitung und Fragestellung	9
2 Theoretischer Hintergrund	13
2.1 Sensorische Grundlagen	13
2.1.1 Sensoren für biologisch-medizinische Anwendungen	13
2.1.2 Piezoelektrischer Effekt	17
2.1.3 Einteilung akustischer Sensoren	19
2.1.4 Schwingquarzsensoren	23
2.2 Beschichtungsstrategien an Goldoberflächen	34
2.2.1 Unspezifische Adsorption / Physisorption	34
2.2.2 Spezifische Adsorption und Self-Assembling	34
2.2.3 Gemischte Immobilisierungsstrategien	36
2.2.4 Strategien zur Minimierung der unspezifischen Adsorption	37
2.3 Biologisch-medizinische Grundlagen	41
2.3.1 Hämostase – Aufgaben und Überblick	41
2.3.2 Thrombozyten	43
2.3.3 Blutgerinnung	47
2.3.4 Fibrinolyse	50
2.4 Stand der diagnostischen Technik und Forschung	52
2.4.1 Messung thrombozytärer Funktionen	53
2.4.2 Tests zur Bestimmung der plasmatischen Gerinnung	56
2.4.3 Messung fibrinolytischer Prozesse	60
2.4.4 Schwingquarze als Hämostase-Sensoren - Arbeiten anderer Autoren	63
3 Experimenteller Teil	67
3.1 Materialien und Geräte	67
3.1.1 Chemikalien	67
3.1.2 Blutprobenvorbereitung	69
3.1.3 Schwingquarzsensoren	70
3.1.4 Geräte	72
3.2 Oberflächenmodifizierung der Schwingquarzsensoren	75
3.2.1 Reinigung und oxidative Aktivierung der Sensoroberfläche	75
3.2.2 Präparation hydrophiler Polyethylenglykol-Beschichtungen	76

3.2.3	Präparation hydrophober Kunststoffbeschichtungen _____	78
3.2.4	Kovalente Immobilisierung von Fibrinogen _____	78
3.2.5	Fluoreszenz-Markierung aktivierter Thrombozyten auf dem Schwingquarz _____	79
3.2.6	Präparation der Schwingquarzoberflächen für REM-Aufnahmen _____	79
4	Ergebnisse und Diskussion _____	81
4.1	Protein- und zellresistente Beschichtungen zur Gerinnungsuntersuchung _____	81
4.1.1	Vergleich der Proteinresistenz PEG-basierter Beschichtungen mittels Schwingquarzen ____	82
4.1.2	Charakterisierung von StarPEG-Oberflächen mittels AFM und REM _____	85
4.1.3	Charakterisierung der Thrombozyten-Resistenz von StarPEG-Oberflächen mittels REM __	87
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	89
4.2	Gerinnungsuntersuchungen in Vollblut mit Schwingquarzsensoren _____	89
4.2.1	Ablauf der Schwingquarzmessungen am Beispiel des modifizierten Quick-Tests auf StarPEG-beschichteten Schwingquarzen _____	90
4.2.2	Modifizierte Quick-Tests mit PE-beschichteten Schwingquarzen _____	92
4.2.3	Vergleich der mittels Schwingquarzen bzw. Koagulometer bestimmten Gerinnungszeiten __	98
4.2.4	Nachweis der gerinnungshemmenden Wirkung von Heparin _____	103
4.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	105
4.3	Nachweis hyperfibrinolytischer Prozesse mittels Schwingquarzsensoren _____	107
4.3.1	Untersuchung hyperfibrinolytischer Prozesse in Vollblut mittels Schwingquarzen _____	107
4.3.2	Vergleich der Schwingquarzsensoren mit Rotations-Thrombelastometrie _____	113
4.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	116
4.4	Thrombozyten-Diagnostik mittels Schwingquarzsensoren _____	117
4.4.1	Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Beschichtungen _____	118
4.4.2	Ablauf der Schwingquarzmessungen zur Thrombozytendiagnostik _____	122
4.4.3	Thrombozyten-Diagnostik mit funktionsfähigen Thrombozyten _____	124
4.4.4	Nachweis der medikamentösen Thrombozyten-Schädigung durch Acetylsalicylsäure ____	136
4.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	145
4.5	Mikrofluidische Plattform für die Hämostase-Diagnostik _____	146
4.5.1	Entwicklung eines mikrofluidischen Chips _____	147
4.5.2	Aufbau für mikrofluidische Hämostase-Messungen mittels Schwingquarzen _____	148
4.5.3	Ergebnisse der Schwingquarz-Messungen mit mikrofluidischem Chip _____	149
4.5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	155
5	Zusammenfassung und Ausblick _____	157
	<i>Literaturverzeichnis _____</i>	160
	<i>Danksagung _____</i>	169
	<i>Liste der Publikationen _____</i>	171
	<i>Lebenslauf _____</i>	173

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure, <i>arachidonic acid</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskopie, <i>atomic force microscopy</i>
APM	Akustische Plattenmode, <i>acoustic plate mode</i>
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit, <i>activated partial prothrombin time</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
BAW	Elastische Volumenwelle, <i>bulk acoustic wave</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
BVD	Butterworth-van-Dyke
COC	Cyclo-Olefin-Copolymer
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FIA	Fließinjektionsanlage
FPW	<i>flexural plate wave</i>
GP	Glykoprotein
IDT	Interdigitaler Wandler
INR	<i>international ratio</i>
ISI	Internationaler Sensitivitäts-Index
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MUA	Mercaptoundecansäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OEG	Oligoethylenglykol
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen

PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PL	Phospholipid
POC	<i>Point-of-care</i>
PPP	Plättchenarmes Plasma, <i>platelet poor plasma</i>
PRP	Plättchenreiches Plasma, <i>platelet rich plasma</i>
PS	Polystyrol
PT	Thromboplastinzeit, <i>prothrombin time</i>
QCM	<i>quartz crystal microbalance</i>
QCM-D	<i>quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RiFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RMS	<i>Root mean square</i>
ROTEM	Rotations-Thrombelastometrie
SAM	Selbstorganisierende Monolage, <i>self-assembling monolayer</i>
SAW	Akustische Oberflächenwelle, <i>surface acoustic wave</i>
SPR	Oberflächenplasmonen-Resonanz, <i>surface plasmon resonance</i>
TF	Gewebefaktor, <i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
THF	Tetrahydrofuran
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator
TPZ	Thromboplastinzeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSM	<i>thickness shear mode</i>
TX A ₂	Thromboxan
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>world health organization</i>

1 Einleitung und Fragestellung

Ein normal funktionierendes Blutstillungssystem (Hämostase) ist für den menschlichen Organismus lebensnotwendig, da sonst bereits kleinste Verletzungen zu schweren Blutungen führen würden. Ebenso gehen schwerwiegende Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall sowie Lungenembolien, welche an der Spitze der Gesamtmorbidität- und mortalität der Industrienationen stehen, mit einer erhöhten Gerinnungsneigung einher. Des Weiteren ist der perioperative Blutverlust bei herzklappenerhaltenden Operationen oder Operationen an den Herzkranzgefäßen immer noch eines der Hauptprobleme der Kardiochirurgie. Dies spiegelt sich unter anderem in einem hohen Verbrauch von Blutkonserven während kardialer Operationen wider. All dies legt die Notwendigkeit der ständigen Kontrolle des Hämostasestatus eines Patienten nahe und zwar sowohl vor, während als auch nach einer Operation, um Störungen des Hämostasegleichgewichts schnell erkennen und therapieren zu können. Da die Zeit bei hämostaseologischen Komplikationen jeder Art eine enorme Rolle spielt, ist es von größter Wichtigkeit, Zeitverluste durch Probentransport, komplizierte Infrastrukturen oder lange Analysendauern zu vermeiden. Deshalb haben in den letzten Jahren eine Reihe hämostaseologischer Point-of-Care-Testverfahren in die Klinik Einzug gehalten. Sie bieten den entscheidenden Vorteil der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse mit der Möglichkeit der unverzüglichen und zielgerichteten therapeutischen Intervention.

Zur Erfüllung der damit verbundenen Anforderungen einer robusten, einfachen und schnellen Erfassung von Messwerten bietet sich unter anderem die Verwendung von Biosensoren an, anhand derer biologische Prozesse in Echtzeit verfolgt werden können. Schwingquarzsensoren sind bereits seit langer Zeit als höchst sensitive Massendetektoren in den Bereichen der Umwelt- oder Prozessanalytik bekannt, doch erst elektronische Weiterentwicklungen ermöglichten vor 30 Jahren den Einstieg in die Biosensorik. Die große Anzahl der in den letzten Jahren publizierten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zeigt das enorme Interesse an Biosensoren, speziell an der für viele biologisch-medizinische Fragestellungen flexibel einsetzbaren Schwingquarzsensoren. Durch Anlegen einer Wechsellspannung lassen sich Schwingquarze zu Scherschwingungen mit definierter Resonanzfrequenz anregen. Der Sensor reagiert dabei auf eine Massenlagerung oder Viskositätsänderung mit einer Verschiebung der Resonanzfrequenz und/oder einer Änderung der Schwingungsdämpfung.

Die Kombination dieser innovativen Sensortechnik mit mikrosystemtechnischen Bauteilen ermöglicht neben der Verwendung als Point-of-Care-taugliches Gerät zur Anwendung im Operationssaal auch die Integration in größere medizinische Apparate wie zum Beispiel Herz-Lungen-Maschinen. Darüber hinaus ist aber auch die Entwicklung kleiner, transportabler Handgeräte für die patientennahe Diagnostik zuhause denkbar.

Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Zur Verwirklichung einer schnellen und einfachen Hämostase-Diagnostik mittels Schwingquarzen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Ziele angestrebt:

- Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Sensorbeschichtungen für die unkomplizierte sensorische Bestimmung von Gerinnungszeiten in Vollblut.
- Entwicklung von Sensorfunktionalisierungen für den Nachweis fibrinolytischer Prozesse in Vollblut.
- Entwicklung und Charakterisierung thrombogener biologischer und Kunststoff-basierter Beschichtungen zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit von Thrombozyten.
- Adaption der klinischen Routinetests an die Anforderungen der Schwingquarzensensorik unter Ermittlung der optimalen Parameter.
- Vergleich der erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen der jeweiligen Referenzmethode.
- Durchführung der entwickelten Hämostase-Tests unter Verwendung der im Laufe des Gesamtprojektes entwickelten mikrofluidischen Plattform mit integriertem Schwingquarzensensor.

Die zur Erfüllung der aufgelisteten Ziele notwendigen theoretischen Grundlagen der Schwingquarzensensorik werden in Kapitel 2 ebenso erläutert wie die verschiedensten Möglichkeiten zur Funktionalisierung der Goldoberflächen von Schwingquarzelektroden. Im dritten und vierten Abschnitt von Kapitel 2 wird ein Überblick über die biologisch-medizinischen Grundlagen und den heutigen Stand der diagnostischen Technik und Forschung gegeben.

In Kapitel 3 findet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräten sowie eine präzise Beschreibung der durchgeführten Prozessschritte zur Oberflächenmodifikation von Schwingquarzsensoren.

Die Ergebnisse zur Entwicklung und Charakterisierung protein- und zellabweisender Oberflächen sind im ersten Abschnitt von Kapitel 0 dargestellt. Kapitel 4.2 und 4.3 beschäftigen sich mit dem sensorischen Nachweis der bei Gerinnungs- bzw. Fibrinolyseprozessen stattfindenden Viskositätsänderungen in Vollblut. Die Entwicklung und die Ergebnisse diagnostischer Tests für die Beurteilung der Thrombozytenfunktion sind im vierten Abschnitt von Kapitel 0 beschrieben. Im letzten Abschnitt des Kapitels werden die für erste Eignungstests der mikrofluidischen Plattform nötigen Entwicklungsarbeiten und fluidischen Aufbauten sowie die damit erzielten Messergebnisse vorgestellt.

In Kapitel 5 werden die während der Forschungstätigkeit erzielten Ergebnisse zusammengefasst und ein Ausblick auf weitere interessante Themengebiete im Bereich der Hämostase-Diagnostik gegeben.

2 Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel werden die sensorischen und biologischen Grundlagen erläutert sowie ein Überblick über den Stand der Technik und Wissenschaft in der hämostaseologischen Diagnostik gegeben. Ausgehend von allgemeinen Betrachtungen über Sensoren für biologische Anwendungen werden im ersten Unterkapitel die Funktionsprinzipien und physikalischen Hintergründe akustischer Sensoren mit Schwerpunkt Schwingquarzsensoren erläutert. Im nachfolgenden Unterkapitel werden die für das Verständnis der Blutstillung relevanten physiologischen Grundlagen behandelt. Das dritte Unterkapitel beschäftigt sich mit unterschiedlichen Beschichtungsstrategien an Goldoberflächen. Im letzten Unterkapitel werden heutige Methoden und Geräte der hämostaseologischen Diagnostik sowie aktuelle wissenschaftliche Arbeiten anderer Autoren zur Hämostase-Untersuchung mittels Schwingquarzen vorgestellt.

2.1 Sensorische Grundlagen

2.1.1 Sensoren für biologisch-medizinische Anwendungen

Ein Sensor ist eine kompakte Einheit, bestehend aus einem Rezeptor (sensitive Schicht) und einem Signalwandler (Transducer), die sich in direktem räumlichem Kontakt befinden. Dem Transducer ist eine Elektronik zur Signalverstärkung und Signalauswertung nachgeschaltet. Wechselwirkungen zwischen Analyt und sensitiver Schicht führen zu reversiblen bzw. irreversiblen Änderungen der physikalischen Parameter, wie zum Beispiel Dielektrizitätskoeffizient, Masse oder Temperatur. Die Änderungen in der sensitiven Schicht werden durch den Transducer in ein physikalisches, elektrisch auswertbares Signal übersetzt, welches anschließend in der Datenverarbeitung als diskreter Wert angezeigt werden kann [1;2]. Die Funktionsweise eines Sensors ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Biosensoren sind eine spezielle Untergruppe von chemischen Sensoren, sie werden jedoch meist als eigenständige Klasse betrachtet. Man spricht von Biosensoren, wenn die sensitive Schicht biologischer Herkunft ist und ein biologischer Erkennungsprozess vorliegt. Laut eng gefasster IUPAC-Definition ist ein Biosensor ein in sich geschlossenes integriertes System, das eine spezifische quantitative oder halb-quantitative analytische Information liefert und das aus einem biologischem Erkennungselement (Rezeptor) und einem Signalwandler (Transducer) besteht, die sich in direktem räumlichen Kontakt befinden [3].

Zu den Biosensoren zählen die Affinitäts-Biosensoren, bei denen der Analyt durch eine Erkennungsreaktion gebunden wird, jedoch weitestgehend unverändert bleibt. Als Beschichtungselemente kommen dort Nukleinsäuren, Aptamere, Antikörper, Proteine, Enzyme, aber auch Gewebe sowie Mikroorganismen und andere biologische Komponenten zum Einsatz [4;5].

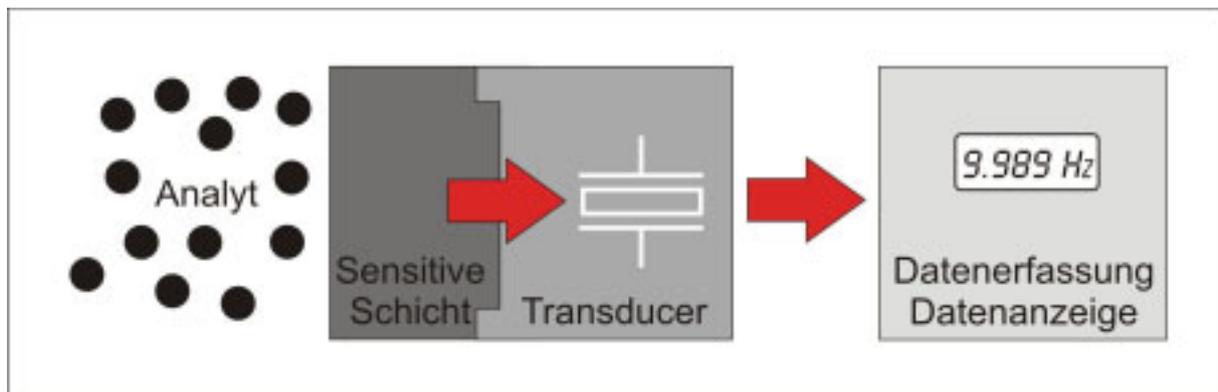


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Sensors.

Eine spezielle Art der Affinitäts-Biosensoren sind die Immunosensoren, bei denen die Bindung des Analyten an den Transducer durch eine antikörpervermittelte Affinitätsbindung zustande kommt. Immunosensoren finden ihre Anwendung in der Medizin, Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der Pharmazie und Biotechnologie [6].

Neben den Immunosensoren gewinnen andere Wechselwirkungsprinzipien zunehmend an Bedeutung. Ein weiteres Gebiet der aktuellen Forschung sind biomimetische Sensoren mit Aptamer-Beschichtungen oder molekular geprägten Polymeren (MIPS). Stand in den vergangenen Jahren auch die Forschung im Bereich von DNA-Chips im Fokus, so verlagert sich der Trend mittlerweile hin zu Sensoren mit immobilisierten Rezeptoren, Proteinen oder ganzen Zellen [7-9].

Um die Wechselwirkung der sensitiven Schicht mit einem chemischen oder biologischen Analyten erkennbar zu machen, bedarf es eines physikalischen Transducers. Dabei kommen neben den in dieser Arbeit verwendeten akustischen Signalwandlern viele weitere physikalische Messmethoden zum Einsatz [10-12].

Einen Überblick über die vier wichtigsten Detektionsprinzipien, die in der Sensorik biologischer Anwendungen zum Einsatz kommen, gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über Transducer, Methoden und deren Anwendungen.

Art des Transducers	Messprinzip / Methode	Anwendungen
Elektrochemisch	Potentiometrie Amperometrie Feldeffekttransistoren	Enzym-Elektroden, Ionendetektion, Immunsensoren, Gassensoren, Zellsensoren
Optisch	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Gitterkoppler Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) Ellipsometrie	Immunsensoren, Zellsensoren, Gassensoren, Enzymatische Sensoren
Thermisch	Kalorimetrie	Enzym-, Zell-, Gewebesensoren, Immunsensoren, Gassensoren
Piezoelektrisch	Schwingquarze (QCM) Akustische Oberflächenwelle (SAW)	Gassensoren, Immunsensoren, Zellsensoren, Viskositätssensoren

Elektrochemische Signalwandler finden hauptsächlich bei der Messung enzymatischer Elektrodenprozesse oder bei der pH-Messung Anwendung. Da sich elektrochemische Sensoren nicht so gut zur Untersuchung von Blutgerinnungsvorgängen eignen, soll auf diese Gruppe hier nicht weiter eingegangen werden.

Innerhalb der optischen Methoden dominiert die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR = Surface Plasmon Resonance), nicht zuletzt auch aufgrund der guten kommerziellen Verfügbarkeit. Der in Abbildung 2 gezeigte Kretschmann-Aufbau wird zur Messung der Oberflächenplasmonenresonanz verwendet. Die Methode beruht auf der Totalreflexion von parallel polarisiertem Licht an einer auf einem Prisma aufgetragenen Metallschicht. Die Lichtwelle koppelt unter dem Winkel der Totalreflexion resonant mit dem Elektronengas. Die damit angeregte kollektive Schwingung der Leitungsbandelektronen wird als Oberflächenplasmon bezeichnet. Wie bei allen physikalischen Prozessen muss auch bei der Anregung von Oberflächenplasmonen die Energie und der Impuls erhalten bleiben. Bei Verwendung von Licht einer festen Wellenlänge tritt daher in der Reflexionskurve bei einem

bestimmten Winkel ein scharfes Minimum auf, bei dem die gesamte Energie der Photonen im Metall dissipiert wird. Der Resonanzwinkel verschiebt sich in Abhängigkeit des effektiven Brechungsindex der sensitiven Schicht. Es sind zwei Messmodi möglich: Entweder wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bei veränderlichem Winkel gemessen oder es wird mit Weißlicht angeregt und die Messung bei konstantem Winkel durchgeführt (Abbildung 2) [4;13].

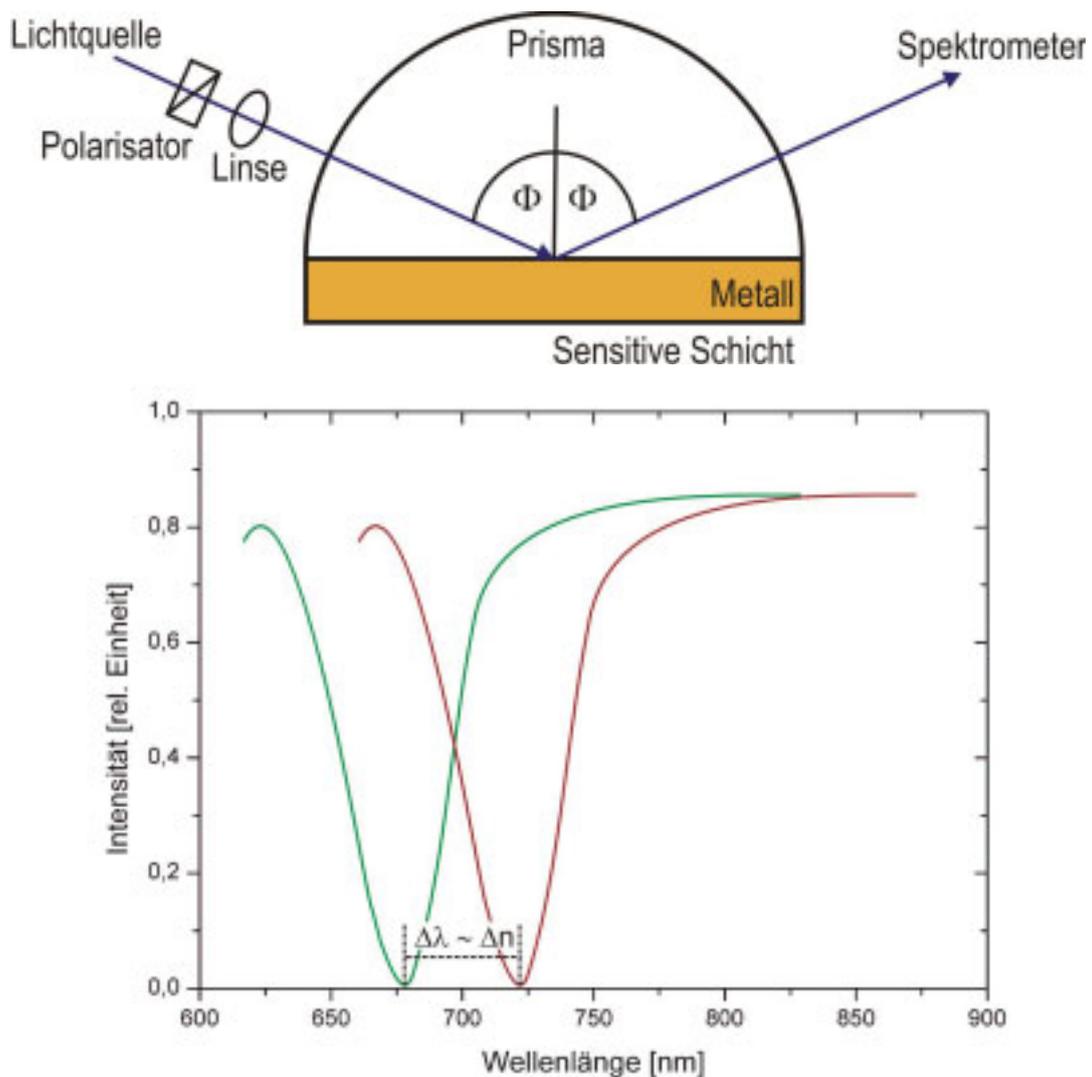


Abbildung 2: Oben: SPR-Aufbau in Kretschmann-Konfiguration. Unten: Verschiebung der Resonanzwellenlänge der Plasmonen vor (grün) und nach (rot) der Anlagerung einer zusätzlichen Schicht bei Messung unter konstantem Winkel (modifiziert nach [14]).

Als weitere optische Messverfahren kommen in biosensorischen Anwendungen hauptsächlich Gitterkoppler, Reflektometrische Interferenzspektroskopie und Mach-Zehnder-Interferometrie zum Einsatz [15].

Auf die Theorie der in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarze aus der Familie der piezoelektrischen, massensensitiven Sensoren wird ausführlich in den folgenden Unterkapiteln eingegangen.

2.1.2 Piezoelektrischer Effekt

Das physikalische Grundprinzip mechanisch-elektrischer Oszillationen beruht auf dem so genannten piezoelektrischen Effekt (griech.: piezo = ich drücke). Sowohl der piezoelektrische als auch der inverse piezoelektrische Effekt wurden 1880 bzw. 1881 von Pierre und Jaques Curie an α -Quarz, Rochelle-Salz und Turmalin entdeckt. Als Piezoelektrizität wird allgemein die Erzeugung elektrischer Ladungen an der Oberfläche eines Festkörpers durch Zug, Druck oder Torsion bezeichnet. Der inverse Effekt hingegen beruht auf der mechanischen Deformation der Kristalle durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes.

Voraussetzung für das Auftreten des piezoelektrischen Effekts ist das Fehlen eines Inversionszentrums und somit das Auftreten mindestens einer polaren Achse (x-Achse) in der Strukturzelle. Man spricht dann von polaren Achsen, wenn eine 180°-Rotation um eine zur polaren Achse senkrechte Achse die Strukturzelle nicht wieder auf sich selbst abbilden vermag. Somit können nur 20 der insgesamt 32 Kristallklassen Piezoelektrizität aufweisen.

Beim direkten piezoelektrischen Effekt führt das Einwirken einer mechanischen Spannung zu einer Verschiebung der Ladungsschwerpunkte innerhalb der Strukturzelle und somit zu mikroskopischen Dipolen. Makroskopisch messbare elektrische Spannungen resultieren aus der Aufsummierung aller Elementarzellen. Verläuft die einwirkende mechanische Spannung entlang der x-Achse und somit parallel zum resultierenden elektrischen Feld, so spricht man vom longitudinalen Piezoeffekt. Erfolgt die mechanische Deformation in y-Richtung, so entstehen die Ladungen an den zur y-Achse senkrechten Oberflächen (transversaler Effekt). Im Falle des inversen piezoelektrischen Effekts erfolgt je nach Polarität der angelegten Spannung in x-Richtung eine mechanische Kompression oder Dilatation (Abbildung 3).

Durch Anlegen einer Wechselspannung kann der piezoelektrische Kristall zu Schwingungen angeregt werden. Im Falle der Grundschiwingung stimmt dabei die Frequenz der Wechselspannung mit der mechanischen Resonanzfrequenz des piezoelektrischen Materials überein.

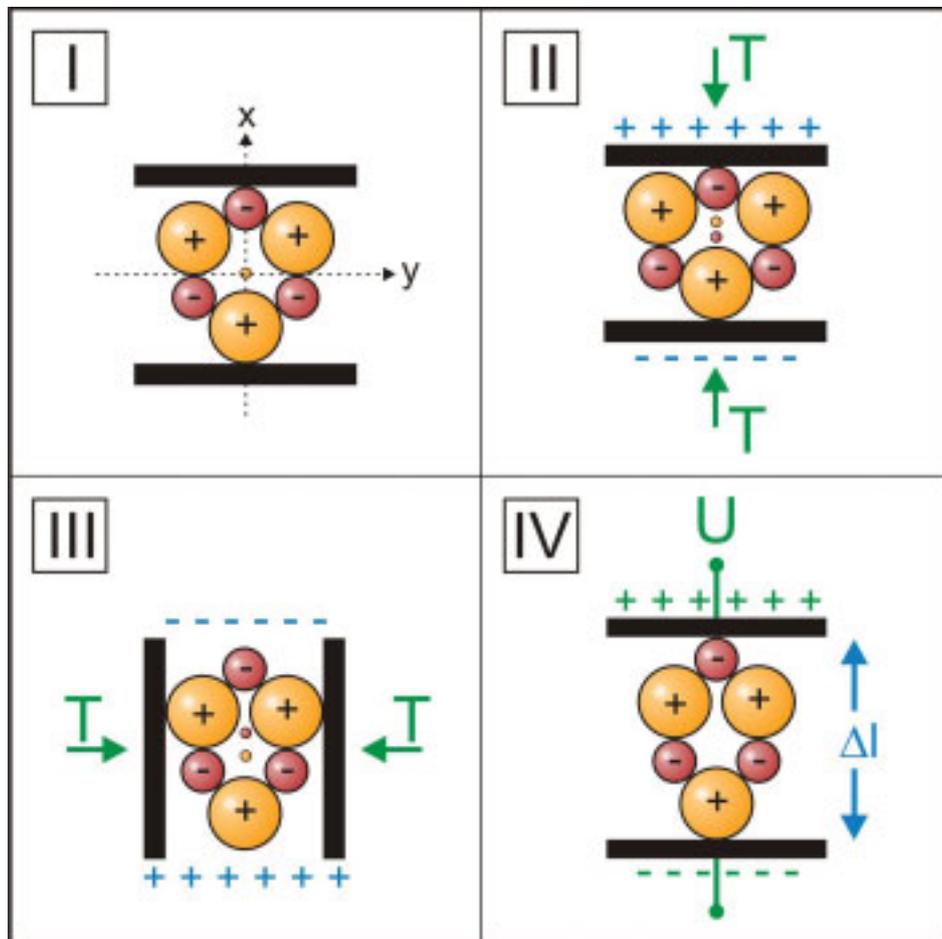


Abbildung 3: Schematische Darstellung des piezoelektrischen Effekts bei α -Quarz. Die positiven Ladungen stellen Siliziumatome, die negativen Ladungen Sauerstoffatome dar. Die Ladungsschwerpunkte sind in den entsprechenden Farben dargestellt. Die angreifende Manipulation (mechanische Spannung T bzw. elektrische Spannung U) ist in grün, die resultierende Veränderung in blau gezeigt. I: Strukturzelle in Ruhelage. II: Direkter longitudinaler Piezoeffekt. III: Direkter transversaler Piezoeffekt. IV: Inverser longitudinaler Piezoeffekt.

Praktische Anwendung fanden piezoelektrische Materialien erst 1921 durch CADY, der Quarzkristalle als stabilisierendes Element in Oszillatorschaltungen einsetzte. In den mehr als 80 Jahren Forschung und Entwicklung wurde eine Vielzahl von Anwendungsfeldern

erschlossen, wobei bevorzugt α -Quarz (SiO_2), Lithiumtantalat (LiTaO_3) oder Lithiumniobat (LiNbO_3) zum Einsatz kamen.

Grundlegende Betrachtungen zur physikalischen und mathematischen Beschreibung des piezoelektrischen Effektes und des Schwingquarzverhaltens finden sich in [4;16-19].

2.1.3 Einteilung akustischer Sensoren

Die Anregung akustischer Wellen in piezoelektrischen Substraten erfolgt durch eine elektrische Wechselspannung. Abhängig von Schnittwinkel, Schliff und Elektrodengeometrie lassen sich aus einem Quarzkristall eine Reihe unterschiedlichster Resonatortypen realisieren. Je nach Ausbreitungscharakteristik der akustischen Wellen lassen sich diese in unterschiedliche Kategorien gliedern. Man unterscheidet elastische Volumenwellen und oberflächengenerierte Wellen, wobei sich letztere wiederum in verschiedene Typen von Oberflächenwellen und so genannte Plattenmoden aufteilen lassen. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die sensorisch relevanten Wellentypen.

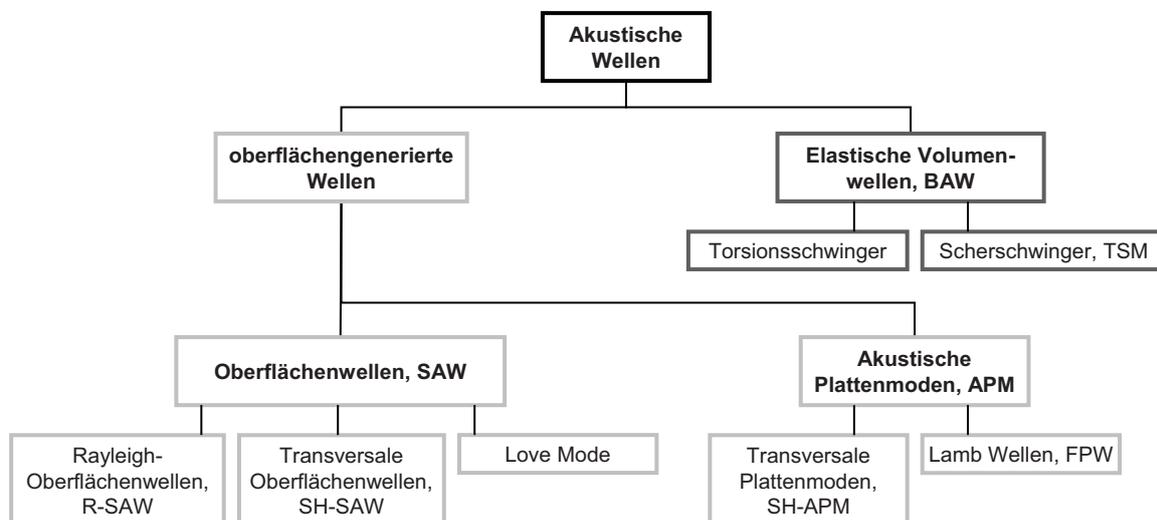


Abbildung 4: Für den sensorischen Einsatz bedeutende Typen akustischer Wellen [16].

Zur Erzeugung akustischer Wellen wird sowohl bei den Oberflächenwellen- als auch bei den Plattenmoden-Bauteilen ein hochfrequentes Signal an interdigitale Wandler (IDT), zwei planare, kammförmig ineinandergreifende Elektroden, angelegt. Diese sind auf einer Seite des piezoelektrischen Materials aufgebracht, wobei einer der IDT als Sender, der andere als

Empfänger und das dazwischenliegende Substrat als sensitive Schicht dient. Als Messgröße dient bei diesen akustischen Sensoren die Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle proportional zur Masseanlagerung an der sensitiven Schicht. In Abbildung 5 sind Beispiele von Oberflächenwellen-Sensoren und akustischen Plattenmoden-Sensoren mit ihrer Teilchenauslenkung und Ausbreitungsrichtung der entstehenden Welle schematisch dargestellt.

Oberflächenwellen-Sensoren. Die an der Oberfläche von SAW-Sensoren entstehenden elastischen Wellen (Rayleigh-Wellen, R-SAW) breiten sich als gekoppelte longitudinale und transversale Wellen aus und dringen ungefähr eine Wellenlänge tief in das piezoelektrische Material ein. Die Frequenzen der angeregten Schwingungen liegen im Bereich von 50 MHz bis zu einigen GHz [20]. Diese Sensoren eignen sich nicht für biologische Fragestellungen, da in Flüssigkeiten aufgrund der Partikelauslenkungen parallel zur Oberflächennormalen Kompressionswellen entstehen, die eine starke Dämpfung der sich im Sensor ausbreitenden Welle verursachen [4;20;21].

Durch die Wahl eines anderen Kristallschnitts und das Aufbringen eines Gitters zwischen den IDTs können auch ausschließlich horizontal polarisierte Partikelbewegungen und transversale Oberflächenscherswellen (SH-SAW) erzeugt werden. Es findet dann keine zur Oberfläche senkrechte Teilchenauslenkung statt, sondern es koppelt lediglich eine evaneszente Welle in die Flüssigkeit ein. Aufgrund dessen ist die Dämpfung minimal und somit ist die Voraussetzung für den Einsatz in flüssigen Medien gegeben.

Akustische Plattenmoden (APM). APM-Sensoren stellen einen akustischen Wellenleiter dar, da die Welle das gesamte Material durchdringt. Somit werden sowohl die Ober- als auch die Unterseite des Bauelementes in Schwingung versetzt, weshalb das sensorische Bauelement auch mit der den IDTs abgewandten Seite als sensitive Schicht in Flüssigkeiten verwendet werden kann. APM-Sensoren stellen einen Grenzfall zwischen den Bauelementen mit rein oberflächengenerierten Wellen und den Bauelementen mit generierten Volumenwellen dar.

Besonders erwähnenswert sind horizontal polarisierte Scherswellen (SH-APM), die bei piezoelektrischen Substraten mit Schichtdicken von wenigen Wellenlängen auftreten. Dabei verläuft die Teilchenauslenkung senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung der Welle und parallel zur Bauelement-Oberfläche.

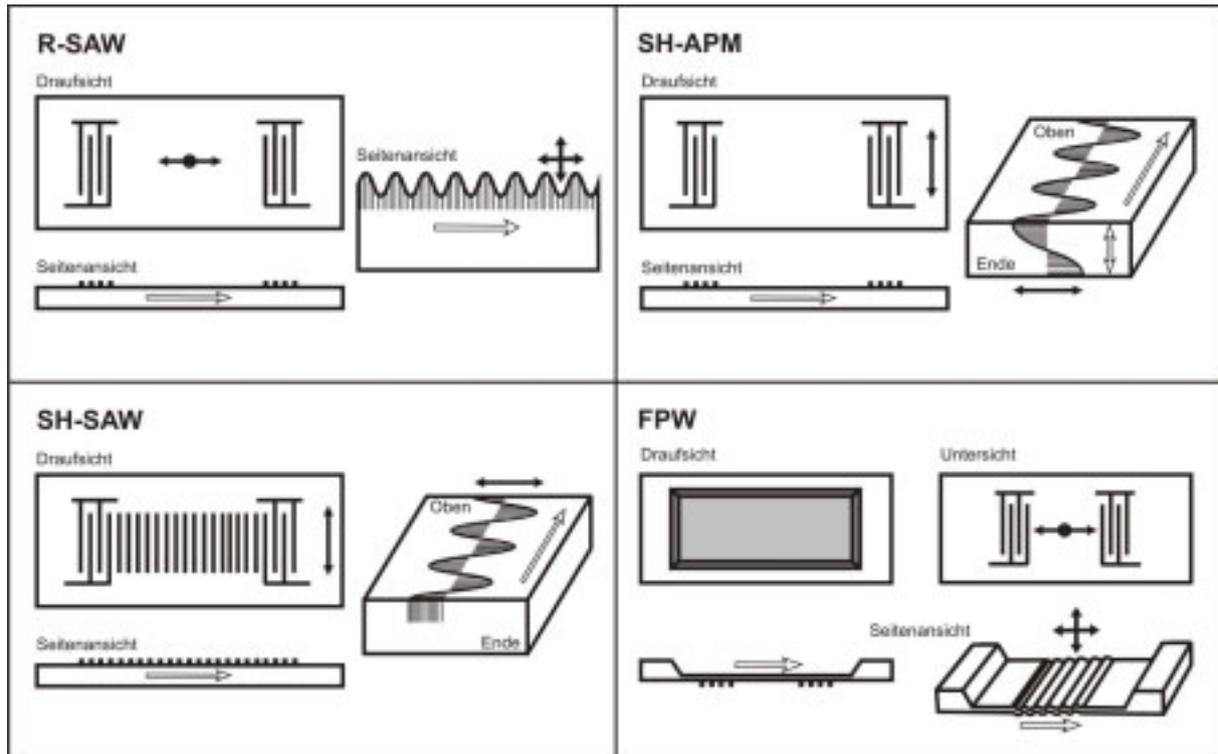


Abbildung 5: Schematische Darstellung ausgewählter akustischer Sensortypen. Schwarze Pfeile zeigen die Teilchenauslenkung, weiße Pfeile die Ausbreitungsrichtung der Welle (modifiziert nach [22;23]).

Besteht der Resonator aus einer dünnen, rechteckigen Membran aus Siliciumnitrid mit Substratdicken kleiner einer Wellenlänge, auf die eine piezoelektrische Schicht und IDTs aufgebracht sind, so treten so genannte Lamb-Wellen auf. Diese führen zu symmetrischen und antisymmetrischen Plattenmoden, wobei die Partikelauslenkung der der Rayleigh-Wellen entspricht. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der niedrigsten antisymmetrischen Mode wird als „flexural plate wave (FPW)“ bezeichnet. Trotz der hohen Amplitude dieser Schwingung von 100 nm ist die Energiedissipation gering, da die Phasengeschwindigkeit der FPW deutlich unter der der Kompressionswellen in Wasser liegt. Sie sind somit für den Einsatz in flüssigen Medien sehr gut geeignet und aufgrund ihrer hohen Sensitivität für biosensorische Anwendungen äußerst interessant. [4;16;24].

Elastische Volumenwellen (bulk acoustic wave, BAW). Schwingquarze sind dünne piezoelektrische Scheibchen aus α -Quarz im sog. AT-Schnitt (vgl. Kapitel 2.1.4), auf deren Ober- und Unterseite sich jeweils eine Goldelektrode befindet. Das Anlegen einer elektrischen Wechselspannung an die Elektroden eines Schwingquarzes führt im Resonanzfall zu einer

Teilchenauslenkung parallel zur Oberfläche. Dabei wird innerhalb des piezoelektrischen Materials eine stehende transversale Volumenwelle mit Wellenbäuchen an beiden Stirnflächen erzeugt (Abbildung 6). Als Randbedingungen zur Ausbildung einer stehenden Volumenwelle müssen erfüllt sein: Die Kristallflächen dürfen nur kleine externe Rückstellkräfte erfahren, müssen also fast spannungsfrei sein, und die Dicke des piezoelektrischen Materials muss ein ungerades, ganzzahliges Vielfaches der halben Wellenlänge sein [25]. Die an der Quarzoberfläche auftretenden horizontal polarisierten Scherwellen wechselwirken mit dem angrenzenden Medium. Die Belegung des Schwingquarzes mit einer starren Fremdmasse, wie zum Beispiel einer Metallschicht, führt aufgrund der nun größeren Wellenlänge der Volumenwelle zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz. Da ausschließlich zur Oberfläche horizontale Teilchenauslenkungen auftreten und Flüssigkeiten keine Rückstellkräfte für transversale Wellen besitzen, sind Schwingquarze für den Einsatz in Flüssigkeiten geeignet. Aufgrund der ausgeführten Scherbewegung werden Schwingquarze auch als Dickenschwinger (bulk acoustic wave, BAW; thickness shear mode, TSM) bezeichnet. Immer noch am gebräuchlichsten ist die synonyme Bezeichnung als Quarzmikrowaage (quartz crystal microbalance, QCM).

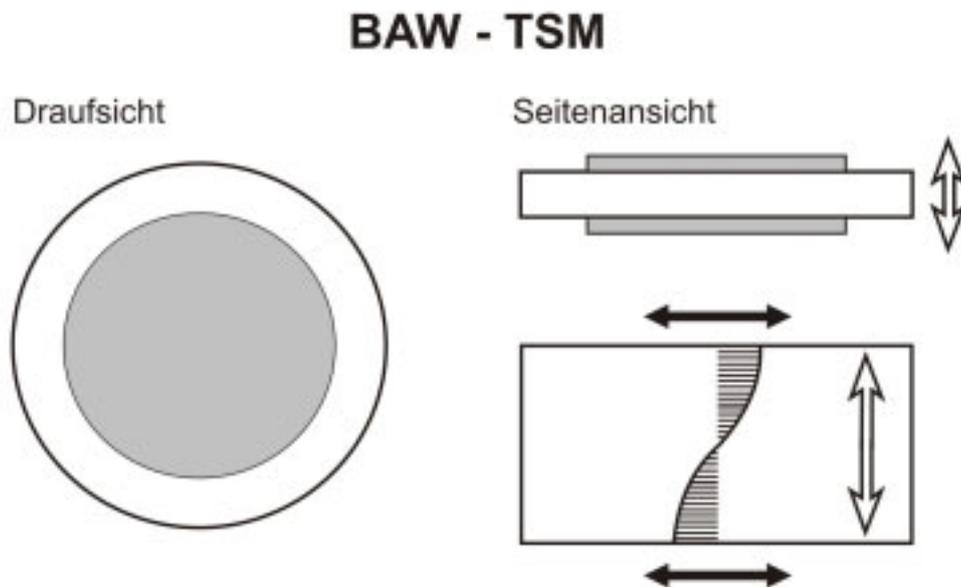


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Schwingquarzes in Aufsicht, Seitenansicht und Querschnitt (unten rechts). Die grauen Flächen stellen die Goldelektroden dar. Schwarze Pfeile zeigen die Teilchenauslenkung, weiße Pfeile die Ausbreitungsrichtung der Welle [22].

Obwohl TSM-Resonatoren deutlich weniger empfindlich sind als FPW- bzw. SAW-Sensoren, sind sie doch aufgrund ihrer robusten Bauweise, der hohen Frequenzstabilität bzw. Güte Q ($\Delta f/f_0 = 1/Q \approx 10^{-8}$), der einfachen Beschaltung und der niedrigen Herstellungskosten am weitesten verbreitet [26].

Als piezoelektrische Resonatoren wurden in dieser Arbeit ausschließlich die oben beschriebenen Schwingquarzsensoren verwendet. Im nächsten Kapitel werden deshalb die theoretischen Hintergründe der Schwingquarz-Sensorik eingehender behandelt.

2.1.4 Schwingquarzsensoren

Allgemeines. Wie in Kapitel 2.1.3 erläutert, wird in der Schwingquarzsensoren der inverse piezoelektrische Effekt von kristallinem SiO_2 zur Anregung einer stehenden Transversalwelle genutzt. Dabei zeigt nur die α -Modifikation des Quarzes, die sich unterhalb einer Temperatur von 573 °C ausbildet, piezoelektrische Eigenschaften. Sowohl Schwingungsmodus als auch Temperaturverhalten werden durch den entsprechenden Kristallschnitt festgelegt (Abbildung 7). Die für Schwingquarze genutzten AT-Schnitt-Quarze werden in einem Winkel von $35,25^\circ$ zur kristallographischen z-Achse herausgeschnitten. Sie lassen sich zu Scherschwingungen anregen und besitzen in einem Temperaturbereich von $0\text{-}50\text{ °C}$ eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit [27].

Messelektronik. Veränderungen an der Schwingquarz-Oberfläche wie Massenlagerung oder Viskositätsänderungen führen zu einer Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes. Die Resonanzfrequenzänderung kann dabei durch unterschiedlichste messtechnische Aufbauten ausgelesen werden.

Eine weit verbreitete Methode ist der aktive Betrieb des Schwingquarzsensors mit einer Oszillatorschaltung. Dabei ist der Resonator als frequenzbestimmender Teil eines gesamten Schwingkreises anzusehen. Diese Betriebsart wird als aktiv bezeichnet, da der Kristall in Resonanz schwingt und der Oszillatorschaltkreis nur die dissipierte Energie zurückführt. Für den Betrieb in wässrigen Medien zur Untersuchung biowissenschaftlicher Fragestellungen mussten aufgrund der höheren Dämpfung spezielle Oszillatorschaltungen entwickelt werden [28]. Die Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Oszillatorschaltungen erzielt wurden, ist stark eingeschränkt. Besonders bei erhöhten

Dämpfungswerten durch viskoelastische Beladungen können die erhaltenen Frequenzänderungen stark voneinander abweichen [20]. Großer Vorteil der aktiven Methode mittels Oszillatorschaltung sind die vergleichsweise geringen Kosten der Schaltungen und die direkte Ausgabe der elektrischen Frequenz mit einer hohen Auflösung [26;29].

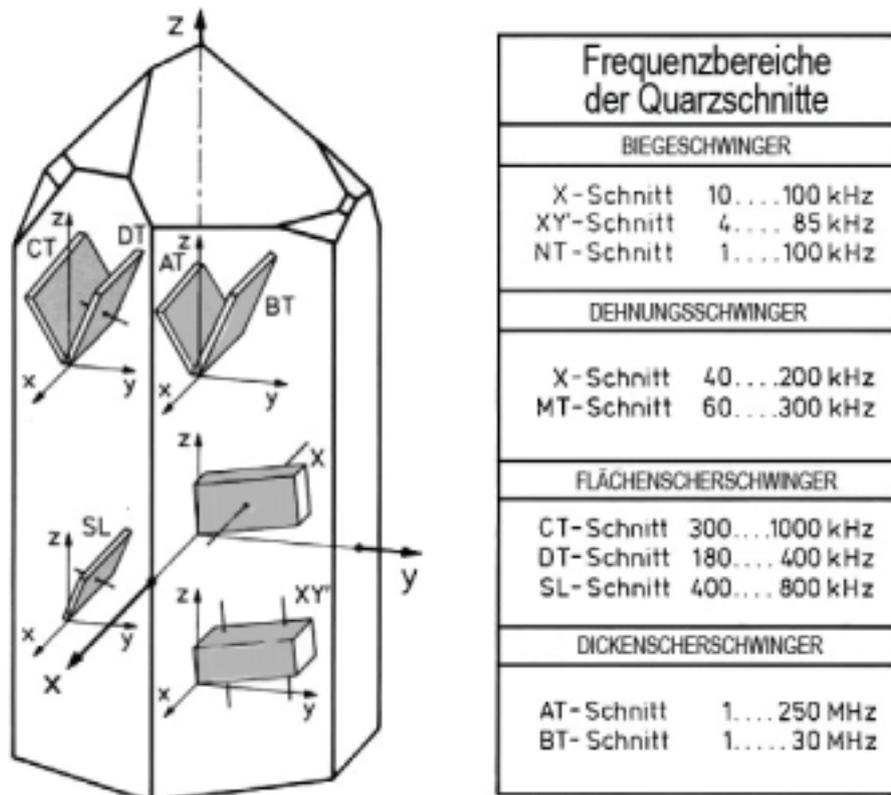


Abbildung 7: α -Quarz mit verschiedenen Kristallschnitten und deren Lage zu den Kristallachsen sowie den entsprechenden Resonanzfrequenz-Bereichen [30].

Beim sog. passiven Betriebsmodus eines Schwingquarzsensors wird ein Netzwerkanalysator eingesetzt um den Kristall zu einer erzwungenen Schwingung in der Nähe der mechanischen Resonanzfrequenz anzuregen. Hierbei wird der komplexe Wechselstromwiderstand (Impedanz bzw. Admittanz = $1/\text{Impedanz}$) des Quarzresonators über einen vorgegebenen diskreten Frequenzbereich gemessen. Aus den erhaltenen Daten können daraufhin die Resonanzfrequenz und die Dämpfung ermittelt werden. Diese Methode liefert aufgrund der Bestimmung der Dämpfung komplexere Informationen als dies allein aus der Betrachtung der Frequenzverschiebung möglich wäre. Durch Kalibrierung des Messaufbaus können parasitäre Effekte minimiert werden. Jedoch ist die Anschaffung eines Netzwerkanalysators im Vergleich zu einer Oszillatorschaltung mit hohen Kosten verbunden. Ein weiterer Nachteil

besteht in der notwendigen Messwertverarbeitung um charakteristische Werte der Impedanzkurve auszulesen [29].

Ein kommerzielles Gerät, das beide obige Prinzipien in eleganter Weise kombiniert, stellt das QCM-D System der Firma Q-Sense (Göteborg, Schweden) dar. Es werden 5 MHz-Quarze durch einen Frequenzgenerator periodisch zur Schwingung in Grundfrequenz sowie im dritten und fünften Oberton angeregt. Wird die antreibende Spannungsquelle abgeschaltet, kommt es zum freien Ausschwingen des Quarzes, wobei die auftretende, exponentiell abklingende Quarschwingung (free induction decay) detektiert wird. Diese Anregungs- und Ausschwingvorgänge werden jede Sekunde wiederholt. Die Auswertung des Abklingverhaltens ermöglicht die simultane Bestimmung von Resonanzfrequenz und Dämpfung. Die QCM-D-Methodik besitzt jedoch keine so große Informationstiefe wie der Betrieb im passiven Modus mittels Netzwerkanalysators, da bei QCM-D kein gesamtes Impedanzspektrum aufgezeichnet wird [31-33].

Physikalischer Messeffekt. In diesem Abschnitt soll der physikalische Messeffekt von Schwingquarzsensoren und das Transducerverhalten bei unterschiedlichen akustischen Lasten näher erläutert werden.

Schwingquarze bestehen aus piezoelektrischem Material, an dessen Stirnflächen Goldelektroden angebracht sind, über die eine elektrische Wechselspannung angelegt werden kann. Durch das angelegte elektrische Feld wird im Resonanzfall eine stehende transversale Volumenwelle erzeugt, die tangential in das angrenzende Medium einkoppelt. Die Eindringtiefe δ der einkoppelnden Welle ist dabei definiert als die Strecke von Elektrodenoberfläche bis zu dem Punkt, an dem die Wellenamplitude auf ein e-tel ($1/e$) ihres Ausgangswertes abgefallen ist. Aufgrund der Wechselwirkung der Welle mit dem angrenzenden Medium ist der Schwingquarz in der Lage auf Veränderungen des Mediums durch verändertes Schwingverhalten zu reagieren (Abbildung 8).

I. Schwingquarzverhalten im Vakuum. Durch Lösung der Wellengleichung in einem kreisförmigen AT-cut-Resonator der Dicke d_q unter Vernachlässigung äußerer Kräfte ergeben sich folgende Eigenschaften der Grundschwingung: Die Transversalwelle weist bei $y = 0$ eine Knotenebene und bei $y = \pm d_q/2$ einen Schwingungsbauch auf. Die Eigenfrequenz der Grundschwingung lautet:

$$f_0 = \frac{v_{sh}}{\lambda} = \frac{v_{sh}}{2d_q} = \frac{N}{d_q} \quad (2.1)$$

Dabei ist v_{sh} die Schallgeschwindigkeit in Quarz, λ die Wellenlänge, d_q die Quarzdicke und $N = v_{sh}/2$ die Frequenzkonstante. Man erkennt an Gleichung (2.1), dass die Grundfrequenz von Schwingquarzen mit zunehmender Dicke des piezoelektrischen Materials sinkt. Die in der Sensorik eingesetzten Quarze liegen aufgrund der praktischen Handhabung der dünnen Scheiben meist im Bereich von 4-10 MHz. Die Anregung von Oberschwingungen werden genutzt um höhere Resonanzfrequenzen als 15 MHz zu erzielen.

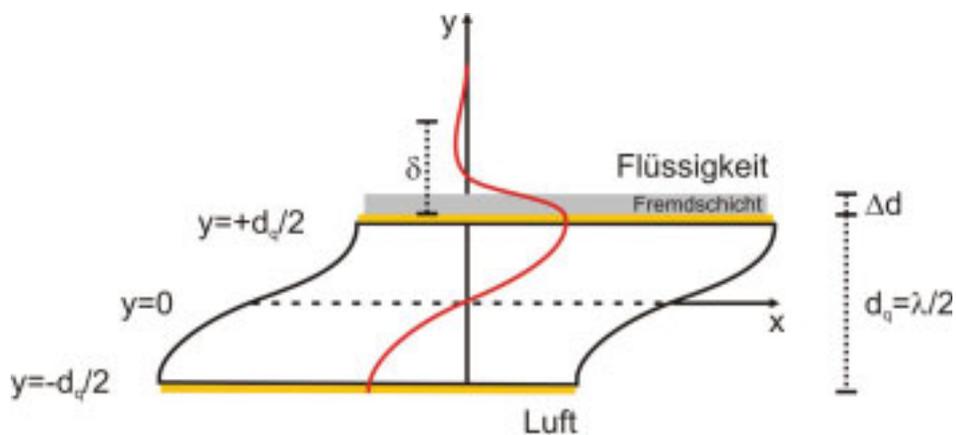


Abbildung 8: Querschnitt eines AT-cut Schwingquarzes mit einer Seite in Kontakt zu einer Flüssigkeit und einer angelagerten Fremdschicht der Dicke Δd . Die Eindringtiefe δ der eingezeichneten Scherwelle hängt von Dichte und Viskosität der Flüssigkeit ab (modifiziert nach [4;26]).

Bei vollständiger und homogener Belegung des Schwingquarzes mit einer dünnen, rigiden Schicht an Luft oder im Vakuum lässt sich aus Gleichung (2.1) die 1959 von SAUERBREY gefundene lineare Beziehung zwischen angelagerter Fremdmasse Δm und relativer Änderung der Resonanzfrequenz Δf ableiten (Gleichung (2.2)). Dabei wird die zusätzliche Masse mit der Dichte des Quarzmaterials angenommen und Phasenübergänge zwischen Quarz, Metallelektrode und Fremdschicht nicht berücksichtigt.

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta d}{d_q} = -\frac{\Delta m}{\rho_q \cdot A \cdot d_q} \quad (2.2)$$

mit Δm , ρ_q , A , d_q als Masse, Dichte, Fläche und Dicke der zusätzlichen Fremdschicht. Gebräuchlich ist die Einführung der Massenbelegung $\varphi = \Delta m/A$ und der Frequenzkonstante $N = f_0 \cdot d_q$, womit sich für die Frequenzänderung schließlich die SAUERBREY-Gleichung ergibt.:

$$\Delta f = -\frac{f_0 \cdot \varphi}{\rho_q \cdot d_q} = -\frac{f_0^2}{\rho_q \cdot N} \cdot \varphi = -C_f \cdot \varphi \quad (2.3)$$

$$\text{mit } C_f = \frac{f_0^2}{\rho_q \cdot N} \text{ als Schichtwägempefindlichkeit.} \quad (2.4)$$

Die negativen Vorzeichen in Gleichung (2.2) und (2.3) bedeuten ein Abnehmen der Resonanzfrequenz bei steigender Masse. Gleichung (2.3) verdeutlicht neben der linearen Abhängigkeit von Massenzuwachs und Resonanzfrequenz auch die quadratische Abhängigkeit zwischen Frequenz und Schichtwägempefindlichkeit. Allerdings sind der Maximierung der Schichtwägempefindlichkeit durch die entsprechend geringer ausfallende Quarzdicke Grenzen gesetzt. Bei orts aufgelöster Betrachtung der Schichtwägempefindlichkeit stellt man fest, dass diese aufgrund der radialen Verteilung der Schwingungsamplitude in der Quarzmitte am größten ist und zu den Elektrodenrändern hin absinkt (Abbildung 9) [26].

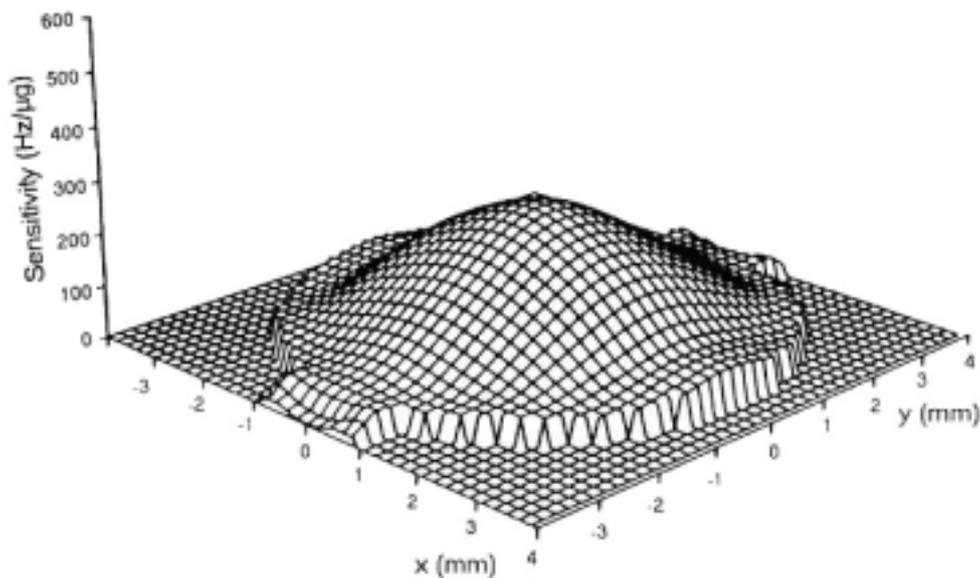


Abbildung 9: Schichtwägempefindlichkeit für einen 5 MHz-Quarz im AT-Schnitt [34].

Das von Sauerbrey entwickelte Modell für rigide, feste Schichten liefert nur sinnvolle Ergebnisse für geringe, homogene Massenlagerungen kleiner 2% der Schwingquarzmasse im Vakuum oder in der Gasphase. Zur Beschreibung des Schwingquarzverhaltens bei Beladung mit rein viskosen, newtonschen Flüssigkeiten oder mit viskoelastischen, maxwellschen Flüssigkeiten sind weiterführende Modelle notwendig.

II. Schwingquarzverhalten bei Beladung mit newtonschen Flüssigkeiten. Einfachster Fall der nicht durch die SAUERBREY-Gleichung zu beschreibenden Situation ist die einseitige Beladung des Schwingquarzes mit einer newtonschen Flüssigkeit. Diese Bedingungen erforderten neben neuen theoretischen Modellbildungen zur Beschreibung der auftretenden Frequenzänderungen und Impedanzspektren auch die elektronische Weiterentwicklung der Oszillatorschaltkreise, um die durch die Beladung mit einer Flüssigkeit auftretende hohe Dämpfung zu überwinden. Der Einsatz von Oszillatorschaltungen unter Flüssigkeitslast wurde maßgeblich durch Arbeiten von NOMURA und OKUHARA [28] 1982 vorangetrieben.

Das theoretische Modell nach KANAZAWA und GORDON [35-37] beschreibt den Einfluss von Dichte ρ_l und Viskosität η_l der umgebenden Flüssigkeit auf die Resonanzfrequenzänderung des piezoelektrischen Resonators und liefert folgende Beziehung:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_l \cdot \rho_l}{\pi \cdot c_{66}^D \cdot \rho_q}} = -C_l \cdot \sqrt{\eta_l \cdot \rho_l} \quad (2.5)$$

Hierbei ist c_{66}^D die Schersteifigkeit des Quarzes und C_l die Flüssigkeitsempfindlichkeit. Wie bereits beschrieben koppelt ein Teil der akustischen Welle in die angrenzende Flüssigkeit ein (Abbildung 8). Die Eindringtiefe δ der Volumenwelle lässt sich berechnen nach:

$$\delta = \sqrt{\frac{\eta_l}{\pi \cdot \rho_l \cdot f_0}} \quad (2.6)$$

Je größer also die kinematische Viskosität (η_l/ρ_l) der Flüssigkeit ist, desto weiter dringt die gedämpfte Scherwelle in das angrenzende Medium ein. Bei einem 10 MHz-Schwingquarz beträgt die Eindringtiefe in Wasser 179 nm. An dieser Stelle muss auch erwähnt werden, dass beim Einsatz der QCM-Technik in wässrigen Medien nun nicht mehr nur ausschließlich die direkte Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz durch den gewählten Kristallschnitt besteht. Auch Veränderungen der temperaturabhängigen Größen Viskosität

und Dichte beeinflussen die Resonanzfrequenz des Dickenschwingers erheblich. In wässriger Umgebung beträgt der Temperaturkoeffizient für einen 10 MHz-Schwingquarz 15 Hz/K in einem Temperaturbereich von 30 - 50 °C [38]. Daher ist eine hohe Temperaturkonstanz durch Thermostatisierung des gesamten Messsystems unerlässlich.

Bei obigem Ansatz von KANAZAWA und GORDON wurde jedoch die durch das viskose Medium bedingte Dämpfung noch nicht berücksichtigt. Zur exakten Beschreibung dieser Problemstellung sind tiefgreifendere elektromechanische Impedanzbetrachtungen notwendig [4].

III. Schwingquarzverhalten bei viskoelastischen Schichten. Viskoelastische Materialien vereinen elastische und viskose Eigenschaften und liegen somit zwischen den obig dargestellten Grenzfällen dünner starrer Schichten und rein viskoser Flüssigkeiten. Gerade in der chemischen und medizinisch-biologischen Sensorik kommen hauptsächlich makromolekulare Stoffe zum Einsatz, die viskoelastische Eigenschaften aufweisen. Erfahren viskoelastische Stoffe eine mechanische Spannung, so relaxiert das Material nach Entfernen der externen Kraft nicht vollständig, wobei die verbleibende Energie in Form von viskosen Fließvorgängen (Retardation) und Wärme abgebaut wird. Die Viskoelastizität beruht auf einer verzögerten Gleichgewichtseinstellung der Makromoleküle zueinander. Die in Schwingquarzen angeregte hochfrequente akustische Welle und die damit verbundenen Scherbewegungen führen zu einer Deformation des viskoelastischen Materials. Die viskoelastischen Eigenschaften lassen sich durch eine Proportionalitätsgröße zwischen einwirkender mechanischer Spannung und Deformation, dem komplexen Schermodul beschreiben:

$$\tilde{G} = G' + iG'' = G' + i\omega\eta \quad (2.7)$$

Dabei repräsentiert das Speichermodul (Realteil des Schermoduls) den phasengleichen Bezug von Spannung und Deformation. Der Imaginärteil repräsentiert die Komponente, bei der Spannung und Deformation um 90° phasenverschoben sind (Verlustmodul). Ziel geeigneter mathematischer Modellbildung und Impedanzanalysen des Schwingquarzverhaltens ist die Bestimmung materialspezifischer Parameter der interessierenden Beschichtungen. Da die mechanischen Interaktionen zwischen Resonator und angelagertem Fremdmaterial elektrisch gemessen werden, ist eine nähere Betrachtung der Umwandlung der mechanischen in

elektrische Parameter notwendig. Eine vollständige Beschreibung der Quarzoszillationen lässt sich für stehende Wellen durch mechanische sowie elektrische Ersatzschaltbilder entwickeln.

Das Modell nach MASON [39] verbindet akustische und elektrische Impedanzen, wobei als einzige Randbedingung die Eindimensionalität des Systems angenommen wird, also die lateral unendliche Ausdehnung des piezoelektrischen Resonators und der angelagerten Schichten [4]. Dieses Modell stellt die Basis zur Beschreibung komplexer Schichtsysteme dar, wie sie in den Biowissenschaften sehr häufig auftreten. In der Nähe der Resonanz kann das MASON-Modell für den Fall eines unbelasteten Quarzes mit geringer Dämpfung zum BUTTERWORTH-VAN-DYKE (BVD)-Ersatzschaltbild vereinfacht werden [4;40;41]. Dieses besteht dann aus in der Elektrotechnik bekannten diskreten Impedanzelementen (Abbildung 10).

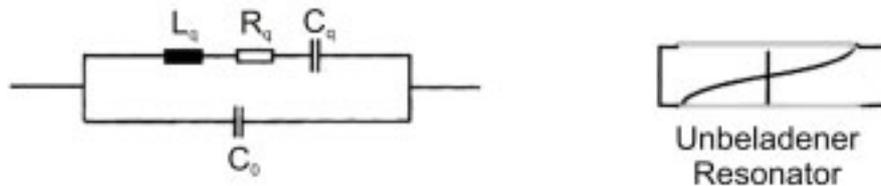


Abbildung 10: Butterworth-van-Dyke-Ersatzschaltbild mit Induktivität L_q , Verlustwiderstand R_q und Kapazität C_q sowie statischer Kapazität C_0 für einen unbelasteten Resonator in Vakuum [26].

Das BVD-Ersatzschaltbild lässt sich als Kombination eines seriellen und eines parallelen Schwingkreises betrachten. Die statische Kapazität C_0 beschreibt den durch die beidseitig aufgedampften Metallelektroden mit einer Quarzscheibe als Dielektrikum gebildeten Plattenkondensator. Der so genannte Bewegungsweig oder Serienschwingkreis mit Kapazität C_q , Induktivität L_q und Widerstand R_q beschreibt die piezoelektrischen Eigenschaften des Quarzes. Dabei entspricht die Masse des Quarzes der dynamischen Induktivität L_q . Die mechanische Elastizität des Quarzes wird durch die dynamische Kapazität C_q widergespiegelt und Energieverluste aufgrund von Viskositätseffekten oder interner Reibung werden durch den Verlustwiderstand R_q repräsentiert.

Durch Erweiterung des BVD-Ersatzschaltbildes und dessen Impedanzbetrachtungen lassen sich prinzipiell alle für die Sensorik biologischer Anwendungen typischen homogenen Oberflächenbeladungen berechnen [36;37;42-44]. Abbildung 11 zeigt einige Beispiele unterschiedlicher Beladungen und die entsprechenden Ersatzschaltbilder. Eine akustische Last

auf der Sensoroberfläche wird durch eine zusätzliche Impedanz berücksichtigt. Im Falle der starren Masse ist dies eine zusätzliche Induktivität und im Falle der Beladung mit viskosen Flüssigkeiten eine Induktivität und ein Widerstand.

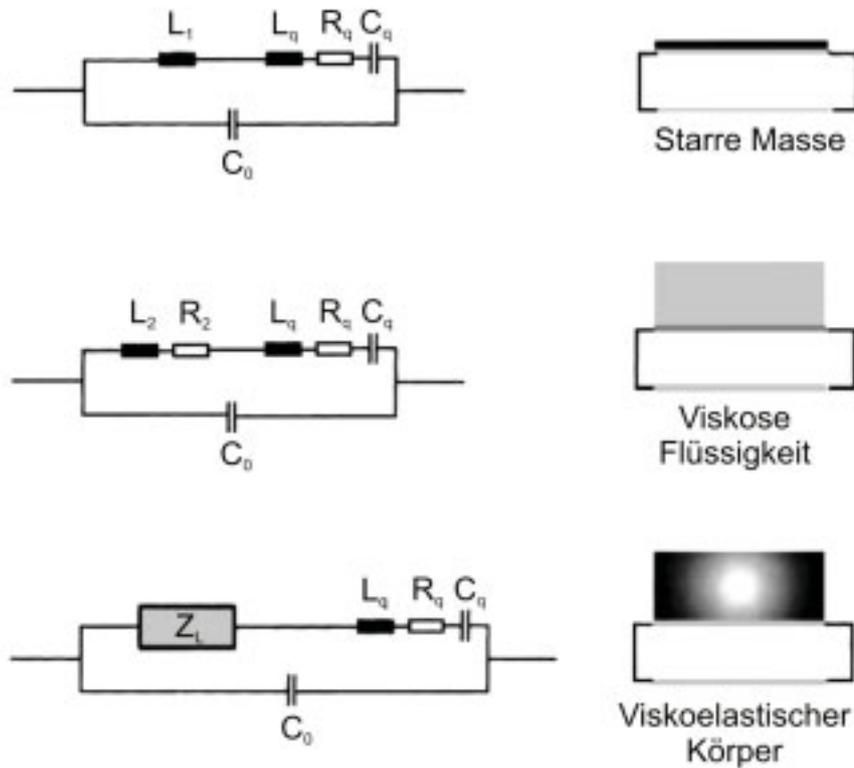


Abbildung 11: Erweiterte BVD-Ersatzschaltbilder für unterschiedliche Beladungen [26].

Ausgehend von den elektrischen Ersatzschaltbildern lassen sich die Spektren der Admittanz \tilde{Y} (Kehrwert der Impedanz \tilde{Z}) des Schwingquarzes berechnen. Die Admittanz ist als Kehrwert der komplexwertigen Impedanz selbst eine komplexe Größe und lässt sich für einen unbelasteten Schwingquarz formulieren als [16]:

$$\tilde{Y} = \frac{1}{\tilde{Z}} = G + i \cdot B = \frac{1}{R_q + i\omega L_q + \frac{1}{i\omega C_q}} + i \cdot \omega C_0 \quad (2.8)$$

Dabei wird der Realteil der Admittanz als Konduktanz G und der Imaginärteil als Suszeptanz B bezeichnet. Wie man an Gleichung (2.8) erkennt, wird der Realteil der Admittanz durch die elektrischen Größen des Bewegungszweiges bestimmt, weshalb die Konduktanz zur Analyse der Schwingquarzeigenschaften und dessen akustische Lasten herangezogen wird. Durch

Einsatz eines Netzwerkanalysators kann die Impedanz bzw. Admittanz des Schwingquarzes in Abhängigkeit der Frequenz experimentell ermittelt werden (Abbildung 12). Dabei fällt das Maximum der Konduktanzkurve mit der seriellen Resonanzfrequenz zusammen und über die Halbwertsbreite $\Delta\omega_{1/2}$ können Rückschlüsse auf die Dämpfung gezogen werden.

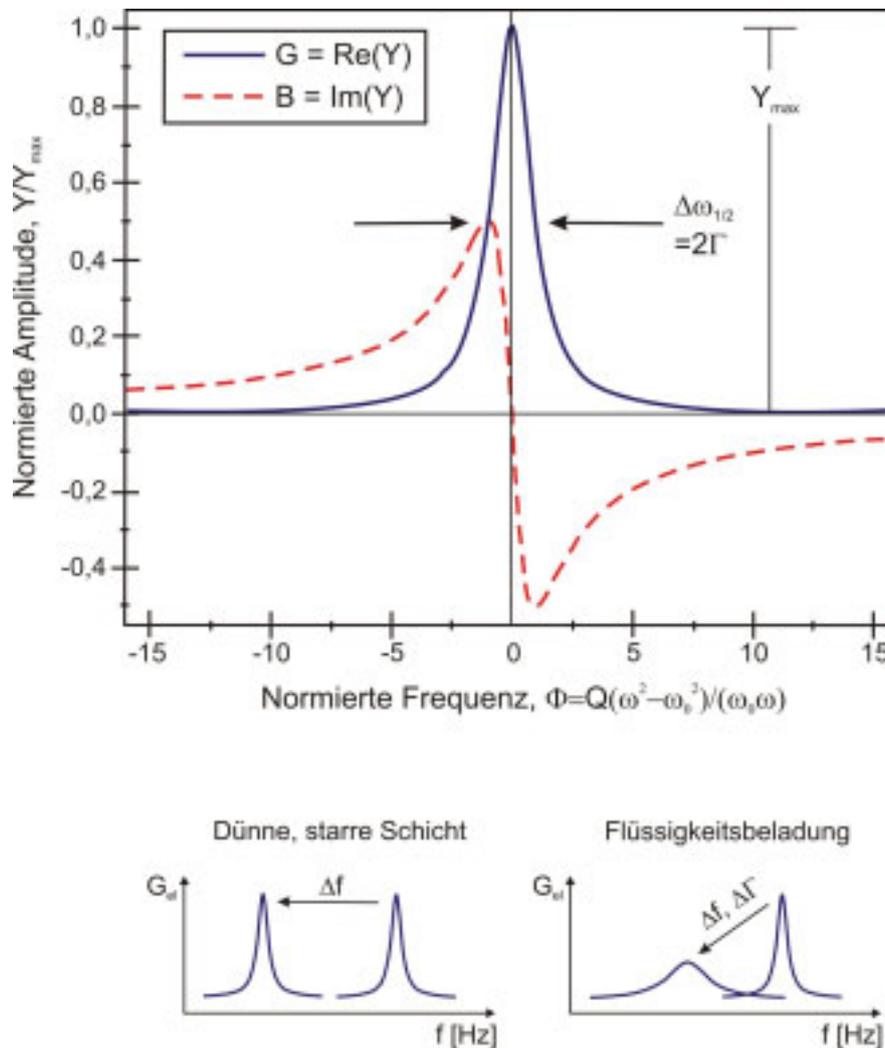


Abbildung 12: Oben: Real- und Imaginärteil des Admittanzspektrums. Unten links: Verschiebung des Konduktanzmaximums zu niederen Frequenzen durch Verhalten nach Sauerbrey bei Anlagerung einer dünnen, starren Schicht. Unten rechts: Abnahme von Frequenz und Dämpfung bei Beladung des Schwingquarzes mit einer viskosen Flüssigkeit (modifiziert nach [45]).

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung der Dämpfung die halbe Halbwertsbreite Γ („half-band-half-width“) verwendet. Eine weitere Möglichkeit zur Beschreibung der Dämpfung ist

die so genannte Güte Q , die sich aus dem Verhältnis von Resonanzfrequenz und Halbwertsbreite errechnet. Zwischen diesen zur Beschreibung der Dämpfung äquivalenten Größen bestehen folgende Zusammenhänge:

$$Q = \frac{1}{i\omega_0 C_q} = \frac{\omega_0}{\Delta\omega_{1/2}} = \frac{\omega_0}{2\Gamma} \quad (2.9)$$

Unter Verwendung eines Netzwerkanalysators zur Admittanzmessung lässt sich also neben der Verschiebung der Resonanzfrequenz auch eine Veränderung der Dämpfungseigenschaften des Schwingquarzes verfolgen. Ein Vergleich beider Messparameter lässt umfassende Rückschlüsse auf die an der Schwingquarzoberfläche stattfindenden Prozesse zu. Die Beziehung zwischen Resonanzfrequenz und Dämpfung lässt sich in Form von so genannten Frequenz-Dämpfungsdiagrammen (f/Γ -Diagramm) darstellen, wobei die Frequenz gegen die Dämpfung aufgetragen wird. Somit lassen sich bereits anhand der Kurvenverläufe unterschiedliche stattfindende Prozesse wie die Anlagerung rigider Schichten, die Anbindung viskoelastischer Filme oder Viskositätsänderungen der mit dem Quarz in Kontakt befindlichen Flüssigkeit unterscheiden [42]. Anhand der Impedanzanalyse von Schwingquarzen mit einer angrenzenden newtonschen Flüssigkeit lässt sich für die Änderung von Frequenz und Dämpfung formulieren [4]:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{1}{\pi \cdot c_{66}^D \cdot \rho_q}} \cdot \sqrt{\eta_l \cdot \rho_l} \quad (2.10)$$

$$\Delta \Gamma = \frac{\Delta R_q}{4\pi L_q} = f_0^{3/2} \sqrt{\frac{1}{\pi \cdot c_{66}^D \cdot \rho_q}} \cdot \sqrt{\eta_l \cdot \rho_l} \quad (2.11)$$

Viskositätsänderungen in newtonschen Flüssigkeiten zeichnen sich also durch eine betragsgleiche, aber im Vorzeichen unterschiedliche Veränderung in Frequenz und Dämpfung aus. Im f/Γ -Diagramm resultiert somit für eine reine Viskositätsänderung eine Ursprungsgerade mit Steigung 1 ($u(x) = x$).

2.2 Beschichtungsstrategien an Goldoberflächen

Schwingquarzsensoren reagieren, wie bereits beschrieben, sehr sensitiv auf Massenänderungen an deren Oberfläche. Zur Detektion der gewünschten Wechselwirkung zwischen sensitiver Schicht und Analyt müssen die Goldoberflächen der Schwingquarzelektroden meist entsprechend beschichtet werden. Die verschiedenen Beschichtungsstrategien werden in diesem Unterkapitel kurz vorgestellt.

2.2.1 Unspezifische Adsorption / Physisorption

Die einfachste Methode zur Beschichtung der Elektrodenoberfläche stellt die unspezifische Adsorption von Molekülen dar. Dazu werden die Moleküllösungen, meist wässrige Proteinlösungen, durch Aufpipettieren oder einfache Dip-Technik auf die Elektroden aufgebracht. Mit dieser Methode wurden schon eine Vielzahl an Proteinen, wie zum Beispiel Streptavidin/Neutravidin [46;47], Protein A [4;22;48], Antikörper [49-51] sowie biotinyliertes Rinderserumalbumin [52] erfolgreich und funktional auf Quarzsensoren immobilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der so genannte hydrophobe Effekt [53], also das Freisetzen der die Proteine umgebenden Wassermoleküle die entropisch treibende Kraft der Proteinadsorption auf hydrophoben Oberflächen darstellt [54].

Eine weitere Methode zur unspezifischen Adsorption auf Goldoberflächen stellt das Spin-Coating von Polymeren dar. Dabei werden die meist in organischen Lösungsmitteln gelösten Polymere auf das rotierende Substrat aufgebracht. Das Lösungsmittel verdampft während der Rotation mit hoher Geschwindigkeit und es resultieren sehr dünne, homogene Polymerfilme.

2.2.2 Spezifische Adsorption und Self-Assembling

Eine weitere Immobilisierungs-Methode auf Goldoberflächen stellt die Adsorption von Molekülen unter Ausnutzung der starken Schwefel-Gold-Affinität dar. Bei der Verwendung von langkettigen Molekülen kommt es dabei zur Ausbildung von selbstaggregierenden Monolagen (self assembling monolayer, SAM), das heißt der spontanen Adsorption der Moleküle zu einem monomolekularen, hochgeordneten Film. Die für die Bildung von SAMs verwendeten Moleküle besitzen allgemein eine reaktive Kopfgruppe, eine lange Molekülkette

und eine Endgruppe. Die Kopfgruppen der Moleküle reagieren mit dem Substrat, während die langen Molekülketten (Spacer) durch Maximierung der van-der-Waals-Wechselwirkungen für die hohe Ordnung des adsorbierten Films verantwortlich sind. Durch Variation der Endgruppen können die Eigenschaften der Oberfläche sehr gut kontrolliert werden. Ein SAM auf einer Goldoberfläche ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

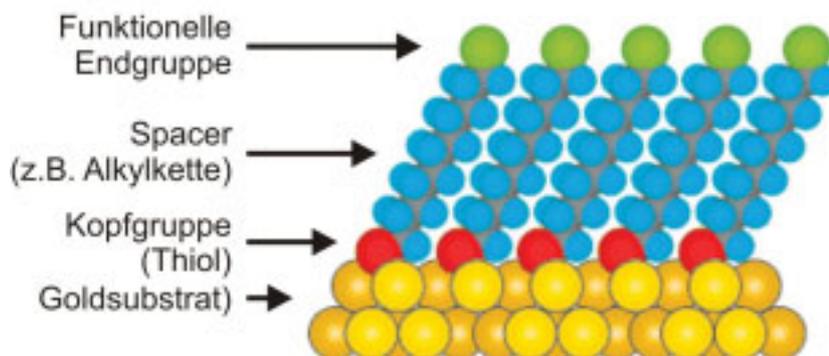


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines idealen Alkanthiol-SAMs auf einem Goldsubstrat [55].

Die Adsorption von Alkanthiolen an Goldoberflächen ist dabei sehr gut untersucht. Bei der Adsorption von Thiol- oder Disulfid-Gruppen an eine Goldoberfläche bilden sich unter Wasserstoffabspaltung Gold-Mercaptid-Bindungen aus. Diese Reaktion hat zum einen den Vorteil, dass Goldoberflächen chemisch sehr stabil sind und nicht zur Ausbildung einer Oxidschicht neigen und zum anderen ist die Adsorptionsreaktion so stark exotherm [56], dass auf festen Substraten eine nahezu vollständige Besetzung aller Adsorptionsplätze erzielt wird. Die Stärke der Au-S-Bindung reicht an die Bindungsstärke einer kovalenten Bindung heran ($\sim 40 \text{ kJ/mol}^{-1}$) [57]. Der Abstand der adsorbierten Schwefelatome beträgt dabei $4,97 \text{ \AA}$ [58] und bei der Verwendung von Alkanthiolen verkippen die Alkylketten um einen Winkel von 30° zur Oberflächennormalen [59]. Die Ausbildung des SAMs wird durch eine zweistufige Kinetik beschrieben. Im ersten, schnelleren Schritt werden 80 - 90% der noch ungeordneten Monolage auf der Goldoberfläche gebildet. Im mehrere Stunden andauernden zweiten Schritt kommt es zu Ordnungsprozessen mit Ausbildung einer dichtgepackten und geordneten Monolage [60]. Durch Wahl einer geeigneten Endgruppe können Oberflächenladungen exprimiert, weitere Moleküle chemisch angebunden oder hydrophile Eigenschaften der Oberfläche modifiziert werden [55;61;62].

2.2.3 Gemischte Immobilisierungsstrategien

Eine direkte kovalente Bindung von Molekülen an eine Goldoberfläche ist aufgrund der hohen chemischen Resistenz nur sehr schwer möglich. Anschließend an eine vorhergehende Funktionalisierung der Goldelektroden durch Chemisorption eines kopplungsfähigen SAMs oder durch unspezifische Adsorption eines reaktiven Polymers kann in einem zweiten Schritt die kovalente Fixierung von Molekülen erfolgen.

Als reaktives Polymer kommt dabei meist Polyethylenimin (PEI) zum Einsatz, welches auf der Goldoberfläche einen dünnen Film ausbildet. Die zahlreich vorhandenen Aminogruppen des PEIs können durch Verwendung bivalenter Crosslinker (Glutardialdehyd, Bernsteinsäureanhydrid, Glutarsäureanhydrid, usw.) mit freien Aminogruppen oder SH-Gruppen des Proteins kovalente Bindungen ausbilden.

Proteine können über ihre Aminofunktionen auch an carboxyfunktionalisierte Oberflächen gebunden werden. Diese Oberflächen lassen sich durch Self-Assembling von Thiocarbonsäuren erzielen, wobei sowohl kurzkettige Moleküle wie 3-Thiopropionsäure oder langkettige Moleküle wie 16-Mercaptohexadecansäure zum Einsatz kommen. Eine sehr simple Methode ist die Verwendung der bereits aktivierten N-Hydroxysulfosuccinimid-3-thiopropionsäure, an die Proteine direkt in wässriger Lösung angekoppelt werden können. Die Carboxyfunktionen des erzeugten SAMs können mittels wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) und dem ebenfalls wasserlöslichen N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) zum Aktivester umgesetzt werden. Dieser reagiert anschließend mit dem Protein über freie Aminofunktionen des Lysins unter Ausbildung kovalenter Bindungen.

Hochgeordnete Beschichtungen mit amphiphilen Stoffen lassen sich durch Anwendung der Langmuir-Blodgett-Technik [63] erzeugen. Diese Methode kann zur Beschichtung des Quarzsensors mit Lipidschichten, so genannten support-fixierten Membranen, benutzt werden. In solche Lipidmembranen lassen sich nachträglich zudem Liganden wie Biotin oder spezielle Membranproteine einbauen [64;65].

Eine in der Biosensorik häufig angewandte Funktionalisierung des Sensors nutzt die Wechselwirkung zwischen (Strept-/Neutr-)Avidin und Biotin, einer der stärksten biochemischen Wechselwirkungen. Hierbei wird zunächst (Strept-/Neutr-) Avidin entweder durch Physisorption oder kovalente Bindung an einen SAM auf der Sensoroberfläche immobilisiert. In einem zweiten Schritt wird dann das Biotin-markierte Molekül durch die

Affinitätsbindung mit dem (Strept-/Neutr-) Avidin an der Oberfläche verankert. Biotinylierungen sind nahezu für alle Biomoleküle (Proteine, Antikörper, DNA, Aptamere, Peptide, usw.) beschrieben und erhältlich [66;67].

Geladene Moleküle können durch elektrostatische Effekte an der Goldoberfläche immobilisiert werden. In einem ersten Schritt kann die Beschichtung entweder mit einem Alkanthiol mit geladener Endgruppe oder mit einem geladenen Polymer erfolgen. An dieser Oberfläche können anschließend entgegengesetzt geladene Moleküle durch einfaches Dip-Coating fixiert und somit Multischichten erzeugt werden [68]. Dabei kommen häufig Polyelektrolyte zum Einsatz, da sie eine hohe Ladungsdichte und ein relativ hohes Molekulargewicht besitzen. Polyelektrolyt-Multischichten eignen sich auch hervorragend zur Immobilisierung von Nanopartikeln [69;70].

2.2.4 Strategien zur Minimierung der unspezifischen Adsorption

Ein grundlegendes Problem einer erfolgreichen Detektion von Bindungsereignissen ist die unspezifische Adsorption von Proteinen: Makromoleküle binden nicht nur aufgrund spezifischer Wechselwirkungen an das Substrat, sondern auch infolge unspezifischer Wechselwirkungen an nicht belegte Sensorflächen. Somit wird das eigentliche Messsignal verfälscht. Aus diesem Grund müssen Oberflächen derart passiviert werden, dass die unspezifische Wechselwirkung zwischen Sensor und Analyt weitgehend zurückgedrängt wird. Die Eigenschaft von Oberflächen, der Adsorption von Proteinen zu widerstehen, wird Proteinresistenz genannt.

Ein gängiges Verfahren zur Reduktion unspezifischer Anlagerungsprozesse beruht auf einer Vorinkubation der Oberfläche mit stark adhärierenden Biomolekülen, wie z.B. Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA). Allerdings hängt der Erfolg der Methode stark vom jeweils gewählten Substrat bzw. biologischen System ab. Zudem ist es auch möglich, dass die voradsorbierten Proteine von anderen Molekülen verdrängt werden (Vroman-Effekt) [71].

Eine weitere Methode zur Passivierung der Sensoroberfläche ist die Erzeugung inerte Oberflächen mit nicht-reaktiven und vorzugsweise wasserlöslichen Materialien. Verwendet werden in dieser Hinsicht vor allem hydrophile und ungeladene Polymere, wie z.B. Polyethylenglykole (PEG) oder Polysaccharide (Dextrane, Zellulose-Derivate, Agarose)

sowie deren Derivate. Die Funktionalisierung mit Polyethylenglykolen stellt dabei die mit Abstand am häufigsten genutzte und in vieler Hinsicht zu bevorzugende Strategie zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption dar [72].

Polyethylenglykole oder bei kürzeren Kettenlängen auch als Oligoethylenglykole (OEG) bezeichnet sind ungeladene und wasserlösliche Polyether der Struktur $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Durch Einführung einer endständigen Thiol-Gruppe lassen sich PEGs sehr leicht an Goldoberflächen chemisorbieren. Die ausgeprägte Hydrathülle der PEGs sowie die hohe Flexibilität und Mobilität der PEG-Ketten in Wasser führen bei hoher Belegungsichte der Ketten zu einer gestreckten Anordnung und somit zur Ausbildung so genannter Polymerbürsten [73].

Eine sehr interessante Alternative zu den linearen Polyethylenglykolen stellen sternförmige Polyethylenglykole dar. Die als StarPEG bezeichneten Moleküle bestehen aus 6 Ketten eines Copolymers aus 80 % Ethylenoxid und 20 % Propylenoxid, deren Enden mit reaktiven Isocyanatgruppen funktionalisiert sind. Über diese Isocyanatgruppen ist in Anwesenheit von Wasser durch entstehende Harnstoffbindungen eine Quervernetzung der sternförmigen Moleküle untereinander möglich, was in einem dichten Polymernetzwerk mit hoher Oberflächenbelegung resultiert [74;75]. Die nicht an der Quervernetzung beteiligten Isocyanat-Gruppen reagieren mit Wasser zu Aminofunktionen, die neben den PEG-Ketten den hydrophilen Charakter der Beschichtung ausmachen (Abbildung 14).

StarPEG-funktionalisierte Oberflächen zeigen aufgrund ihrer Hydrophilie und ihrer hohen Oberflächenbelegung sehr gute Eigenschaften bezüglich Protein- [76] und Zellresistenz [77]. Zudem können die Aminofunktionen dieser StarPEG-Schichten zur weiteren Modifizierung mit biologisch relevanten Molekülen (Biotin, DNA, Proteinen, Rezeptoren, usw.) genutzt werden [78].

Bislang gibt es keine einheitliche Theorie, die das proteinabweisende Verhalten von PEGs eindeutig zu beschreiben vermag. Beim Modell der sterischen Repulsion wird angenommen, dass die sterische Abstoßung bei Annäherung eines Proteins an die Oberfläche die Hauptursache der Proteinresistenz ist [79]. Diese Annäherung bewirkt einen Druck auf die Oberfläche, was zur energetisch unvorteilhaften Dehydratisierung der PEG-Schicht führt. Zudem resultiert aus der Kompression eine Volumenminimierung der PEG-Schicht und somit eine Abnahme der Entropie der Makromoleküle, da die Beweglichkeit der Ketten

eingeschränkt wird. Da beide beschriebenen Effekte von der Kettenlänge abhängen, sind PEG-Schichten umso eher proteinresistent, je länger die PEG-Ketten sind und je dichter gepackt diese auf der Oberfläche vorliegen [62;73].

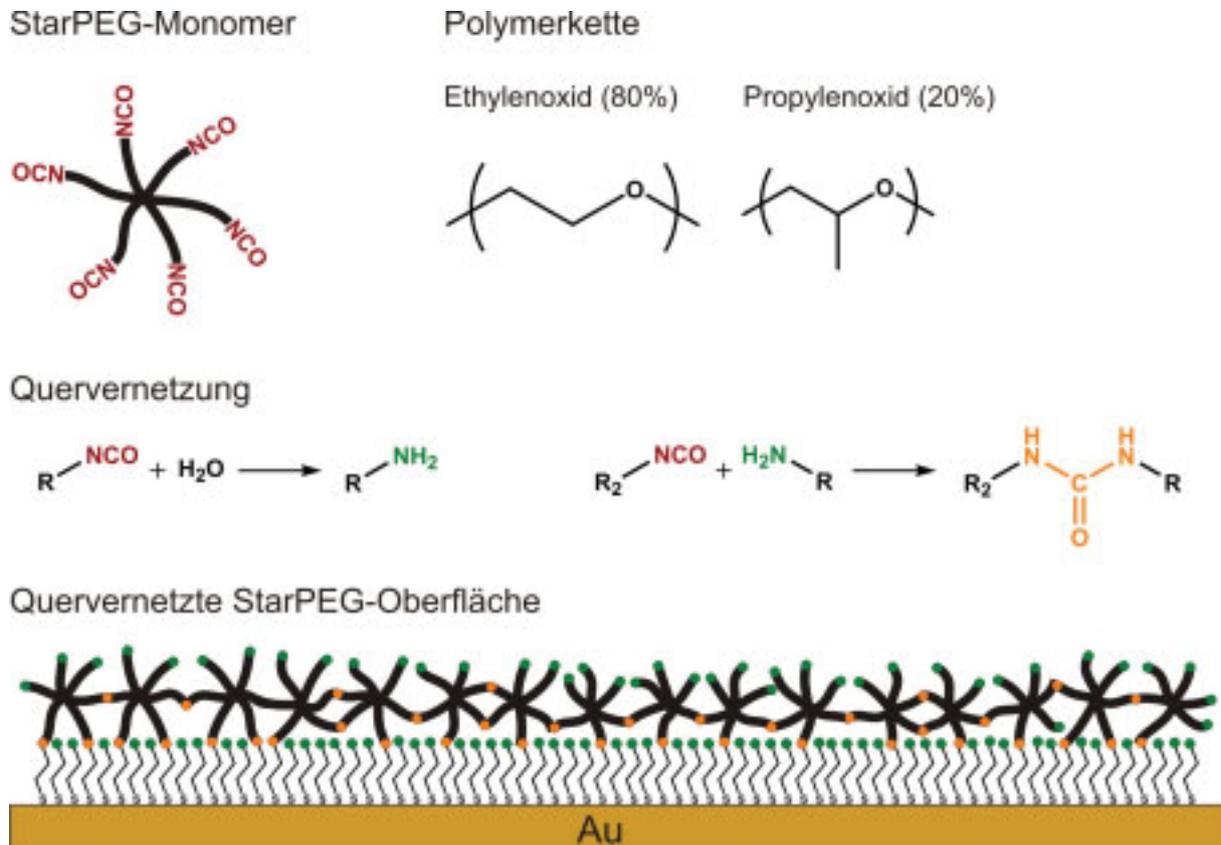


Abbildung 14: Schematische Darstellung der StarPEG-Monomere und ihrer Polymerkettenbausteine, der Vernetzungsreaktion des StarPEG-Systems sowie einer quervernetzten StarPEG-Oberfläche mit Harnstoffbrücken (orange) und freien Aminogruppen (grün).

Jedoch konnten bei Oligoethylglykol-terminierten Alkanthiolmonolagen mit nur 2-6 Ethylenglykol-Einheiten pro Molekül proteinresistente Eigenschaften beobachtet werden [80;81]. Das Modell der sterischen Repulsion kann auf diese Substanzen nicht angewendet werden, da sie nur einen geringen Hydratationsgrad und eine stark geordnete Struktur besitzen. Eine durch die Kompression hervorgerufene Entwässerung und Abnahme der Entropie sind somit zu vernachlässigen. Auch hier sind die Mechanismen der Proteinresistenz nicht abschließend geklärt. In der Literatur werden zwei unterschiedliche Modelle diskutiert. Zum einen soll die Ausbildung einer stabilen und hoch geordneten Wasserschicht zwischen OEG-Oberfläche und dem umgebenden Medium der Grund für die Proteinresistenz dieser

Verbindungen sein. Ein anderer Modellansatz begründet die Eigenschaften mit weitreichenden elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen OEG-SAM-Oberfläche und Protein [82-84].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wechselwirkungen der PEG/OEG-Beschichtung mit Wasser der zentrale Punkt zum Verständnis der proteinresistenten Eigenschaften solcher Beschichtungen ist.

2.3 Biologisch-medizinische Grundlagen

2.3.1 Hämostase – Aufgaben und Überblick

Basis für den reibungslosen Ablauf der vielfältigen Funktionen des Blutes wie Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, die Aufrechterhaltung des Säure-Base-Gleichgewichts und einer funktionierenden Immunabwehr ist die Unversehrtheit des Gefäßsystems. Dies wird durch das so genannte Hämostase- oder Blutstillungs-System erzielt. Die Aufgabe des Hämostase-Systems besteht nicht allein in der Ausbesserung von Gefäßdefekten (Gerinnungssystem), sondern es muss auch die Fließfähigkeit des Blutes gewährleistet sein (Fibrinolysesystem).

Die drei Grundpfeiler, auf denen das Hämostase-System beruht, sind das Gefäß-, das Gerinnungs- und das Fibrinolysesystem. Diese Systeme bestehen aus mehreren Einzelkomponenten, die miteinander verknüpft sind.

- **Gefäßsystem**
 - Anatomischer Aufbau
 - Gefäßwandfaktoren
 - Endothel-Zellschicht
- **Gerinnungssystem**
 - Thrombozyten (Blutplättchen)
 - Plasmatische Gerinnungsfaktoren
 - Plasmatische Gerinnungsinhibitoren
- **Fibrinolysesystem**
 - Plasmatische Fibrinolysefaktoren
 - Plasmatische Fibrinolyseinhibitoren

Bei einer Verletzung erfolgt die Blutstillung mithilfe dieser Systeme. Bereits wenige Sekunden nach einer Gefäßverletzung kommt es zu einem Zusammenziehen (reflektorische Kontraktion) des verletzten Gefäßes und der Nachbargefäße. Daraus resultiert ein verminderter Blutfluss durch das verletzte Gebiet. Zusätzlich besitzen die Endothelzellen der Gefäßinnenwände vielfältige antikoagulatorische sowie prokoagulatorische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Freilegung bzw. Synthese adhäsiver Proteine wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor und Fibronectin [85]. Die mit dem Blutstrom herangetragenen

Thrombozyten erkennen den durch die Verletzung entstandenen Endotheldefekt und binden an darunter liegendes Gewebe (Thrombozytenadhäsion). Unmittelbar nach der Anlagerung der Thrombozyten kommt es zu deren Aktivierung und einer Formveränderung („shape change“). Nach dieser morphologischen Veränderung aggregieren diese Thrombozyten zu einem ersten, noch sehr lockeren Plättchentrombus (Thrombozytenaggregation) [86]. Diese Vorgänge werden unter dem Begriff der *Primären Hämostase* zusammengefasst (Abbildung 15).

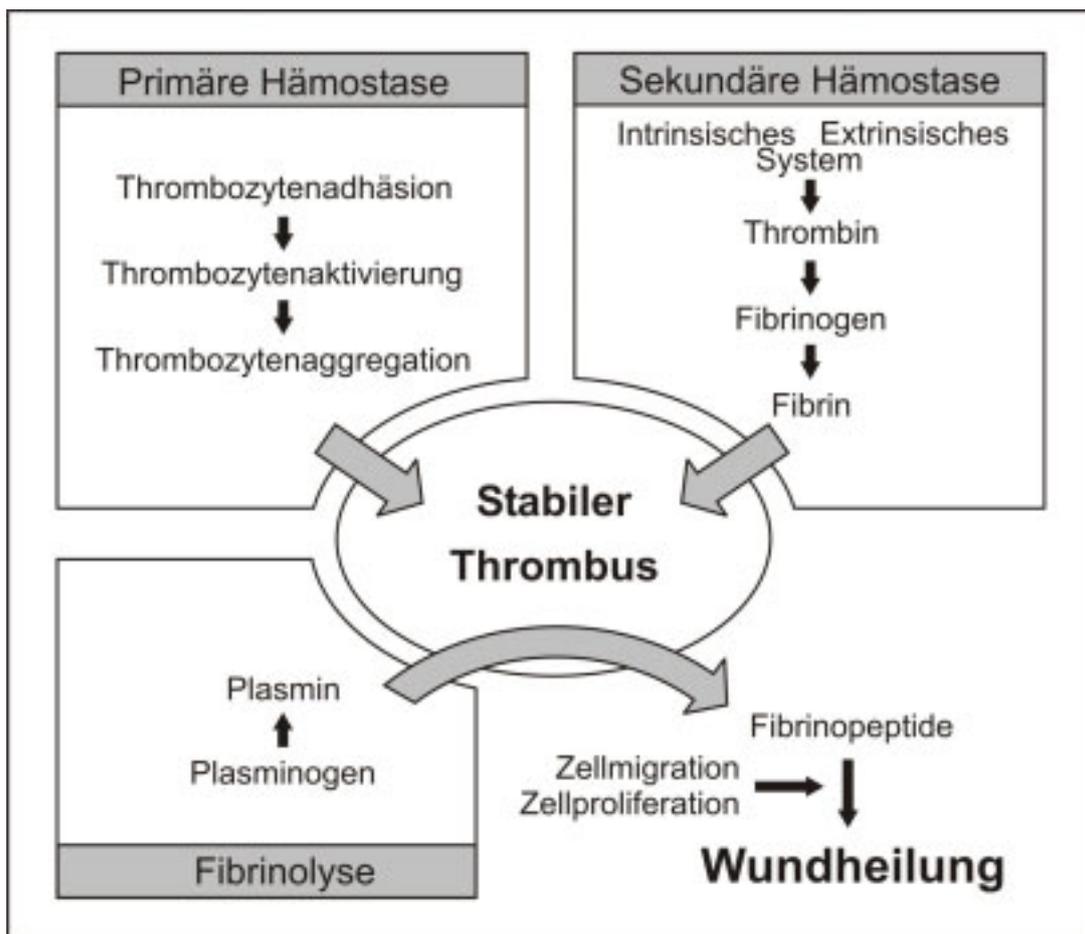


Abbildung 15: Übersicht über die Hämostase bis zur anschließenden Wundheilung.

Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems (*Sekundäre Hämostase*) führt dann zu einer Konsolidierung des Verschlusses durch das bei der Gerinnung über die Proteine Thrombin und Fibrinogen entstehende Fibrinnetzwerk. Dieses Fibringerinnsel zieht sich durch das zuvor gebildete Thrombozytenaggregat und führt so zur Ausbildung eines irreversiblen, stabilen Thrombus (Abbildung 15). Das Fibrinolyse-System ist für die Wiederauflösung eines Thrombus verantwortlich. Dabei nimmt Plasmin bei der Auflösung des

während des Gerinnungsvorgangs gebildeten Fibrins eine zentrale Rolle ein. Durch die Auflösung der Fibrinfäden in so genannte Fibrinopeptide kann es zur Wiedereröffnung verschlossener Gefäße kommen. Die Blutstillung geht in die Wundheilung, die Reparatur des verletzten Gewebes, über. Dabei werden die Fibrinspaltprodukte zur Leitschiene für die Einlagerung und Vermehrung (Proliferation) von Fibroblasten und anderen Zellen, die letztendlich zu einer Neubildung von Blutgefäßen und einer verstärkten Kollagenbildung führen (Abbildung 15) [86;87].

2.3.2 Thrombozyten

Allgemeine Daten. Blutplättchen (Thrombozyten) sind kernlose Fragmentierungen aus Megakaryozyten des Knochenmarks. Im peripheren Blut zirkulieren ca. $150-350 \times 10^3$ Thrombozyten pro μl Blut, wobei täglich etwa $1,5 \times 10^{11}$ Thrombozyten produziert werden. Nach einer Lebensdauer von 9-10 Tagen werden sie als gealtert erkannt, aus der Zirkulation entfernt und in der Milz abgebaut [88].

Die Thrombozyten haben einen Durchmesser von 2 - 4 μm und sind in ihrer Morphologie sehr heterogen bezüglich Form und Größe. Zirkulierende, nicht-aktivierete Thrombozyten besitzen die Form einer flachen, runden Scheibe (diskoide Form) und haben eine mittlere Oberfläche von $8 \mu\text{m}^2$. Eine Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie ADP führt zu einer Gestaltsveränderung („shape change“) mit der für die Aggregation notwendigen Ausbildung von Pseudopodien und somit zu einer Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche auf bis zu $13 \mu\text{m}^2$ [89]. Weitere allgemeine Informationen zu Thrombozyten finden sich unter [89;90].

Thrombusbildung. Thrombozyten haften aufgrund elektrostatischer Abstoßung und der endothelialen Synthese von Thrombozytenhemmstoffen (Prostacyclin, Stickstoffmonoxid) nicht an intakten Endothelzellen. Regionen mit defekter Endothelschicht jedoch präsentieren Bindungsstellen für die Adhäsionsproteine von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen und Fibronectin, die als Brücke zwischen dem Thrombozyten und dem subendothelialen Gewebe dienen (siehe Abbildung 16-I). Während bei höheren Scherraten der vWF als Adhäsionsmolekül via Thrombozytenrezeptor-Komplex GP Ib-V-IX dient, reichen bei niedrigeren Scherraten Fibrinogen oder Kollagen der Gefäßwand aus, um Thrombozyten zur Adhäsion zu bringen [90] Durch die bei einer Verletzung ausgelöste unwillkürliche

Gefäßkontraktion werden die Scherraten physiologisch erniedrigt. Die Bedeutung der Interaktion zwischen vWF und GP Ib-V-IX wird durch Patienten deutlich, welche einen funktional defekten bzw. fehlenden GP Ib-Rezeptor (Bernard-Soulier-Syndrom) oder vWF haben (von-Willenbrand-Jürgens-Syndrom) und somit an einer stark erhöhten Blutungsneigung leiden [91]. Sobald Thrombozyten am Subendothel anhaften, breiten sie sich unter Energieverbrauch auf der Oberfläche aus (*spreading*) (Abbildung 16-II).

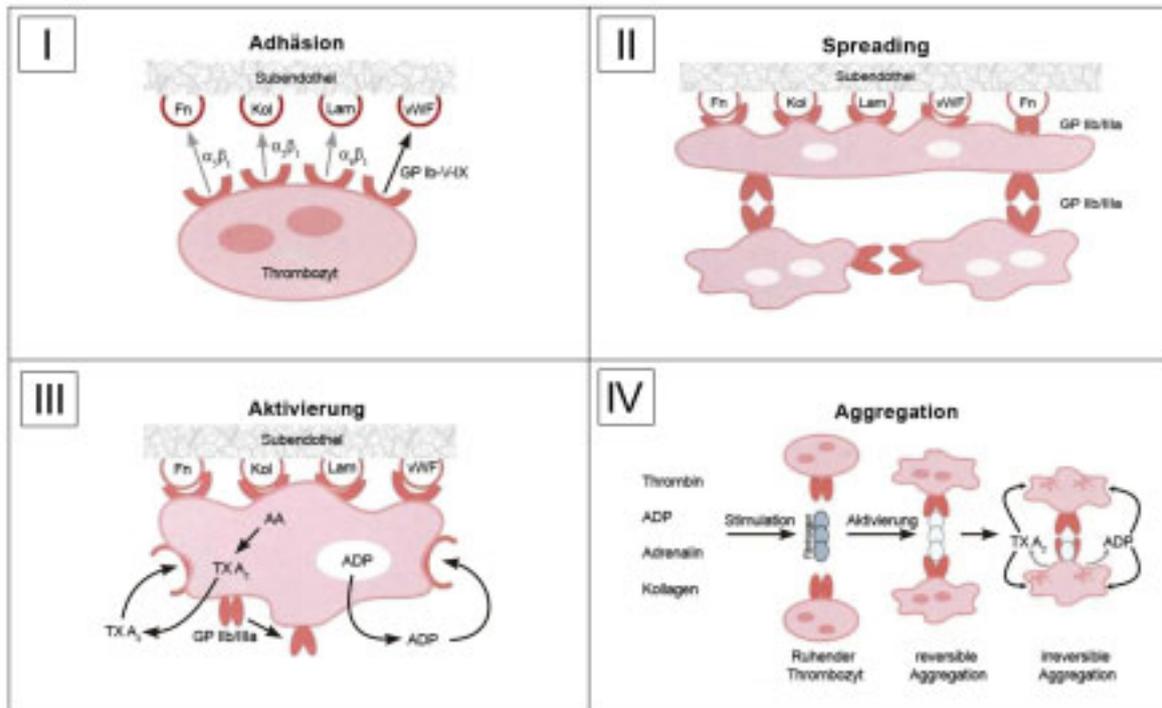


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgänge bei Ausbildung eines Thrombozytenthrombus (modifiziert nach [89]).

Unmittelbar nach der Anlagerung der Thrombozyten kommt es, hauptsächlich vermittelt durch Bindung des Kollagenrezeptors $\alpha_2\beta_1$ an freigelegtes Kollagen, zur Aktivierung der Thrombozyten. Diese Aktivierung führt einerseits zu einem Gestaltwandel, der sich in der Ausbildung von Pseudopodien äußert, und andererseits zur Freisetzung von in Granula gespeicherten Substanzen (Abbildung 16-III). Diese Substanzen lassen sich je nach ihrer Wirkung in vier Gruppen einteilen:

- **Wirkung auf Gefäße:**
Adrenalin, Serotonin, Thromboxan TX A₂

- **Wirkung auf Thrombozytenaktivierung, -aggregation**

ADP, Thromboglobulin, vWF, Thromboxan TX A₂, Fibrinogen

- **Wirkung auf Reparaturvorgänge**

diverse Wachstumsfaktoren

- **Wirkung auf plasmatische Gerinnungsvorgänge**

Fibrinogen, Faktor V, Faktor VIII

Die freigesetzten Substanzen, wie z.B. ADP, binden an die Plättchenrezeptoren und stimulieren damit weitere Thrombozyten, was zu einer positiven Verstärkerschleife führt. Erst durch die Aktivierungsprozesse erfährt der wichtigste Rezeptor der Thrombozytenaggregation, der GP IIb/IIIa-Rezeptor (80 000 Kopien pro Thrombozyt) eine Konformationsänderung und wird so bindungsfähig für Fibrinogen (Abbildung 16-III). Fibrinogen verbindet dann über seine bivalente Struktur jeweils einen GP IIb/IIIa-Rezeptor zweier benachbarter Thrombozyten miteinander, was zur Ausbildung der Thrombozytenaggregate führt (Abbildung 16-IV). Ein angeborener Mangel an GP IIb/IIIa-Rezeptoren führt somit ebenfalls zu sehr starken Blutungen (Thrombasthenie, Glanzmann-Naegli-Syndrom) [92;93]. Die Aggregation der Blutplättchen führt zusammen mit der Vasokonstriktion bei Verletzung kleinerer Gefäße zu einer vorläufigen Blutungsstillung innerhalb von 1-3 Minuten. Ein stabiler Gefäßverschluss erfordert die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems, in dessen Aktivierung die Thrombozyten über membranständige Lipoproteine ebenfalls eingreifen (siehe Kapitel 2.3.3).

Medikamentöse Beeinflussung der Thrombozytenaggregation. Insbesondere bei arteriellen Gefäßerkrankungen und thromboembolischen Komplikationen spielt die Thrombozytenaktivierung eine wesentliche Rolle. Basierend auf der Pathophysiologie der Thrombozyten wurden Hemmstoffe der Thrombozytenfunktion entwickelt. Je nach Mechanismus werden diese eingeteilt in:

- Cyclooxygenase-Hemmstoffe (Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels)
- Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorhemmer
- ADP-Rezeptorhemmer
- Phosphodiesterasehemmer
- Adenylatcyclase-Aktivatoren

An dieser Stelle soll nur knapp auf die Wirkmechanismen der ersten beiden Gruppen eingegangen werden. Weitere Informationen zu Plättchenfunktionshemmern finden sich in [90;93]. Eine Übersicht über die Wirkungsweise der verschiedenen Agonisten und Antagonisten gibt Abbildung 17.

Wichtigster und bekanntester Vertreter der Cyclooxygenase-Hemmstoffe ist die Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®). ASS bewirkt durch Acetylierung eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase (COX). Aufgrund dieser Blockade wird in den Thrombozyten die Bildung von Thromboxan (TX A₂) aus Arachidonsäure verhindert. TX A₂ ist eine der stärksten aggregationsfördernden Substanzen, indem es über Andocken an den Thromboxan-Rezeptor weitere Thrombozyten stimuliert. Eine Neusynthese des Cyclooxygenase-Enzyms ist nicht möglich, da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen. Aufgrund dessen stimmt die Wirkungsdauer von ASS mit der Thrombozytenüberlebenszeit von etwa 8 Tagen überein.

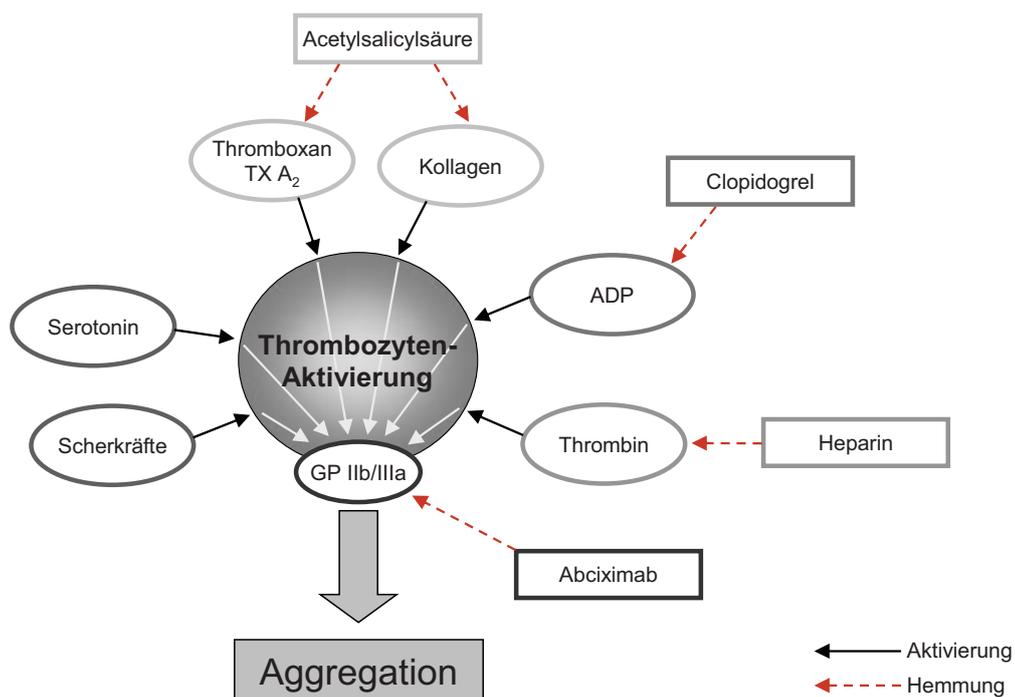


Abbildung 17: Übersicht über Agonisten und Antagonisten der Thrombozytenaktivierung (modifiziert nach [90]).

In Anbetracht der zahlreichen Agonisten der Thrombozytenaktivierung sind pharmakologische Interventionen, die die Endstrecke der Thrombozytenaktivierung, nämlich

den GP IIb/IIIa-Rezeptor blockieren, eine Erfolg versprechende Strategie. Daraus entstand eine neue Klasse antithrombozytärer Substanzen, die GP IIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab, ReoPro[®]) [94]. Abciximab ist ein chimäres Derivat eines monoklonalen Antikörpers und zeichnet sich durch eine sehr hohe Affinität zum GP IIb/IIIa-Komplex aus. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch Abciximab führt deshalb, unabhängig von der Art der Aktivierung, zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung an GP IIb/IIIa und somit zur Aggregationshemmung.

2.3.3 Blutgerinnung

Der nach der Gefäßverletzung initial gebildete Thrombozytenthrombus ist kein sehr stabiles Gebilde. Der Gefahr einer erneuten Blutung wird vorgebeugt durch die Bildung eines Maschenwerks aus Fibrinfäden, in das auch Erythrozyten eingelagert sind. Diese sekundäre Hämostase ist vor allem gekennzeichnet durch die Bildung von mechanisch stabilem Fibrin.

Kaskadentheorie. Nachdem die Gerinnung mehr als 100 Jahre im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen stand, ergab sich durch die Kaskadenhypothese von DAVIE, RATNOFF [95;96] und MACFARLANE [95;96] ein konzeptioneller Durchbruch. Diese beschreiben die Blutgerinnung als zwei Reihen von Proteinen, in denen jeweils jede Protease die in der Kaskade nächstfolgende Protease spaltet und somit aktiviert. Eine schematische Darstellung des kaskadenartigen Gerinnungsmodells zeigt Abbildung 18.

Die Gerinnungskaskade besteht aus zwei Hauptzweigen, dem intrinsischen (endogenen) und dem extrinsischen (exogenen) Weg, die nach einer Verletzung synchron ablaufen. Der Tenase-Komplex {IXa - VIIIa - Phospholipid (PL) - Ca²⁺} und der Komplex {VIIa - PL - Ca²⁺} aktivieren den Gerinnungsfaktor X. Faktor X nimmt somit die zentrale Stelle bei der Verbindung zwischen endogenem und exogenem System ein. Im weiteren Verlauf der Kaskade erfolgt die Aktivierung von Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa). Thrombin ist das für den Gerinnungsvorgang entscheidende Enzym, da es direkt am Fibrinogen (I) angreift und mit Hilfe des Faktors XIII die Bildung des unlöslichen Fibringerinnsels bewirkt.

Während sich *in vitro* Phänomene, wie zum Beispiel die Interpretation bestimmter klinischer Gerinnungstests, mit diesem Modell sehr gut erklären und vorhersagen lassen, zeigt es bei der Beschreibung oder Vorhersage klinischer Beobachtungen *in vivo* einige Schwachstellen.

Klinische Beobachtungen bei Patienten mit Mangel an bestimmten Gerinnungsfaktoren lassen sich mit dem Modell der Gerinnungskaskade nicht erklären [97].

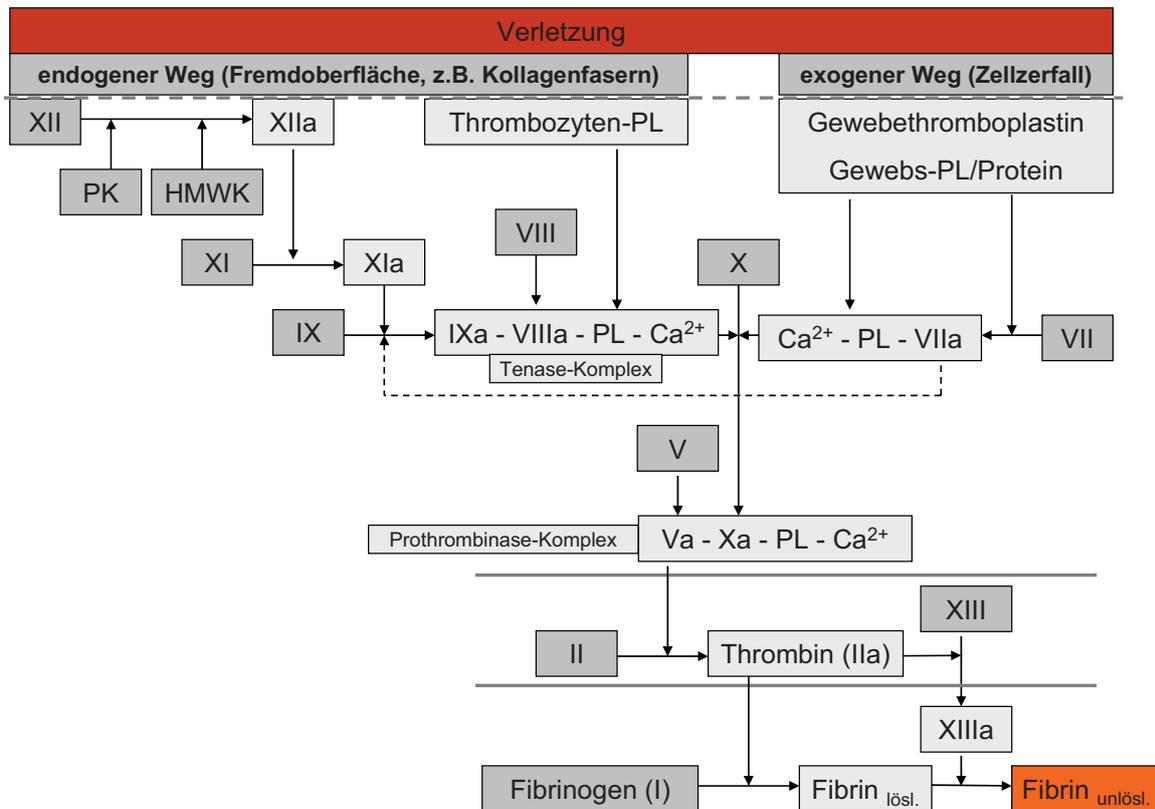


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Gerinnungssystems im Kaskadenmodell (modifiziert nach [85]).

Zell-basiertes Gerinnungsmodell. Neuere experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass bestimmte Zelltypen maßgeblich an der Steuerung der Hämostase beteiligt sind. Deshalb wurde ein zellbasiertes Modell der Gerinnung entwickelt, welches das klassische Modell der Gerinnungskaskade ablöst. In diesem Modell werden drei sich überlappende Abschnitte unterschieden:

- Initiierung (Phase der Auslösung)
- Amplifizierung (Phase der Verstärkung)
- Propagierung (Phase der Verbreitung)

Der Initiierung der Gerinnung findet an Zellen wie Monozyten und Fibroblasten statt, an die sich im Falle von Verletzungen Gewebefaktor (TF, tissue factor) binden kann. Der Komplex aus den Faktoren {VIIa - TF} aktiviert kleinere Mengen an Faktor IX und X. Sobald Faktor

Xa von der Zelloberfläche dissoziiert, wird er direkt entweder durch Antithrombin (AT III) oder *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) inaktiviert. Dennoch werden direkt an der Zelloberfläche durch Komplexbildung der Faktoren {Xa - Va} kleinste Mengen an Thrombin gebildet (Abbildung 19-A), die die Aktivierung der Thrombozyten und Faktor VIII in der Amplifizierungsphase gewährleisten. Da Faktor IXa nicht sofort durch AT abgefangen wird, ist er in der Lage an die Thrombozytenmembran zu binden.

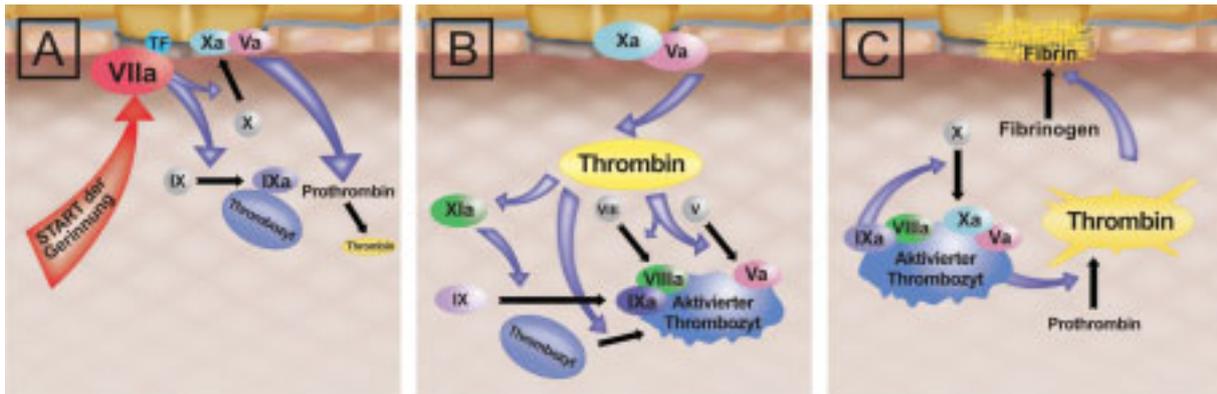


Abbildung 19: Ablauf der plasmatischen Gerinnung nach dem zell-basierten Gerinnungsmodell mit Initiierungs- (A), Amplifizierungs- (B) und Propagierungsphase (C) (modifiziert nach [98]).

Die Amplifizierung der Gerinnung (Abbildung 19-B) erfolgt durch kleine Mengen des in der Initialphase gebildeten Thrombins. Obwohl bereits adhärenzte Thrombozyten an der Verletzungstelle vorliegen, wird durch Thrombin ein höheres Level an prokoagulatorischer Aktivität erzielt. Weitere Funktion des Thrombins ist die Aktivierung der Co-Faktoren XI, V und VIII, wobei sich die letzteren beiden auf der Thrombozytenoberfläche befinden. In dieser Phase verlagert sich also der Gerinnungsvorgang von den TF-tragenden Zellen zu den Thrombozyten. Am Ende der Amplifizierungsphase sind alle Vorbereitungen abgeschlossen um in der Propagierungsphase große Mengen an Thrombin zu generieren.

Die Propagierung der Gerinnung (Abbildung 19-C) spielt sich an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten ab. Es kommt zur Anlagerung des in der Initialphase über den {TF - VIIa}-Komplex und in der Amplifizierungsphase über Faktor XIa-Aktivierung gebildeten Faktors IXa an die Thrombozytenoberfläche. Dort entsteht der Tenase-Komplex {IXa-VIIIa} (vgl. Kaskadentheorie), welcher zur Aktivierung weiteren Faktors X zu Xa direkt an der Thrombozytenoberfläche führt. Faktor Xa assoziiert sofort mit Faktor Va und bildet einen dem Prothrombinase-Komplex ähnlichen Aktivatorkomplex. Diese Komplexbildung resultiert

nun in der Bildung enormer Mengen an Thrombin, was zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels führt, da Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wird. Zusätzlich aktiviert Thrombin Faktor XIIIa, welcher die Vernetzung des Fibrins unterstützt [85;98;99].

Medikamentöse Beeinflussung der Blutgerinnung. Zur Prophylaxe einer Gerinnungskrankheit müssen Antikoagulantien (Hemmstoffe der Blutgerinnung) in der Lage sein, das thrombophile Risiko zu minimieren und die pathologisch aus dem Gleichgewicht geratenen Gerinnungsmechanismen zu normalisieren. Die therapeutisch eingesetzten Antikoagulantien lassen sich aufgrund ihrer Wirkung folgendermaßen einteilen:

- Direkte Antikoagulantien (Hemmstoffe der Wirkung von Gerinnungsfaktoren)
- Indirekte Antikoagulantien (Hemmung der Synthese von Gerinnungsfaktoren)
- Direkte Thrombininhibitoren (Hemmung des aktiven Zentrums von Thrombin)

Da in dieser Arbeit nur Substanzen der ersten Gruppe zum Einsatz kamen, soll an dieser Stelle nur auf die direkten Antikoagulantien eingegangen werden. Wichtigster Vertreter aus der Gruppe der direkten Antikoagulantien ist das Heparin (Heparin-Natrium, Liquemin[®]), ein Gemisch sulfatierter Glukosaminoglykane unterschiedlicher Kettenlänge. Heparin wirkt über eine Bindung an Antithrombin III (AT III), welches durch Bindung an Thrombin und Faktor Xa in der Lage ist, die Wirkung dieser aktivierten Gerinnungsfaktoren zu hemmen. Die Reaktion zwischen AT III und Thrombin wird durch Heparin mehr als 1000-fach beschleunigt. Heparine lösen also einen antithrombotischen Effekt aus und führen zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit.

Eine chemische Antagonisierung des Heparins ist aufgrund der polyanionischen Struktur der Heparine mit Hilfe von polykationischen Substanzen wie z.B. Protamin oder Hexadimethrinbromid (Polybrene[®]) möglich. Diese sind zur Aufhebung von Heparinwirkungen bei auftretenden Blutungen oder nach hoher therapeutischer Dosierung indiziert [90;100].

2.3.4 Fibrinolyse

Mit dem Einsetzen der Gerinnung wird gleichzeitig das physiologische fibrinolytische System aktiviert. Dessen Ziel ist es, eine Ausbreitung des Gerinnungsprozesses über das ganze Gefäßsystem hinweg zu verhindern und intravasale Fibrinablagerungen und damit

Thrombusbildung zu verhüten. Das Fibrin wird dort wieder aufgelöst, wo es keine physiologische Funktion ausübt.

Ablauf der Fibrinolyse. Der zentrale Schritt der Fibrinolyse ist die Umwandlung von Plasminogen in das proteolytische Enzym Plasmin. Plasmin ist das für den Fibrinolysevorgang entscheidende Enzym, vergleichbar mit der Bedeutung des Thrombins bei der Gerinnung. Die Umwandlung des im Plasma zirkulierenden Plasminogens in Plasmin erfolgt durch Aktivatoren: die Serinproteasen Urokinase (u-PA) und Gewebsplasminogenaktivator (t-PA = tissue plasminogen activator). Sowohl Plasminogen als auch Plasminogenaktivatoren besitzen eine sehr hohe Affinität zu polymerisiertem Fibrin und reichern sich selektiv im Thrombus an. Somit kann Plasmin nach seiner Aktivierung unmittelbar auf das Substrat Fibrin einwirken. Nach der Spaltung von Fibrin wird Plasmin freigesetzt und danach schnell und irreversibel durch α_2 -Antiplasmin inaktiviert. Die Neubildung von Fibrin wird dadurch verlangsamt, dass die entstehenden Fibrinspaltprodukte die Thrombinaktivität hemmen. Plasmin spaltet neben Fibrin auch andere Plasmaproteine wie Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII. Die Endprodukte der plasminkatalysierten Fibrinolyse sind Spaltprodukte aus Fibrinogen und Fibrin. Als Marker einer abgelaufenen Gerinnung und nachfolgender Fibrinolyse werden Bruchstücke aus quervernetztem Fibrin, die so genannten D-Dimere, genutzt. Plasma, Blutzellen und Gewebe enthalten eine Reihe physiologischer Hemmstoffe der Fibrinolyse. Abbildung 20 gibt einen schematischen Überblick über die fibrinolytischen Prozesse und deren physiologische bzw. medikamentöse Beeinflussung. Der physiologisch wichtigste Plasmininhibitor ist α_2 -Antiplasmin, das mit freiem Plasmin sehr schnell einen inaktiven Komplex bildet. Primärer Inhibitor der Plasminogenaktivierung ist Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), der t-PA und u-PA komplexiert und somit die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin unterbindet [86;101].

Therapeutische Beeinflussung der Fibrinolyse. Soll ein frischer Thrombus zum Beispiel in einer Koronararterie aufgelöst werden, so kann das Fibrinolyse-System auch medikamentös aktiviert werden. Dies geschieht entweder mit Streptokinase bzw. heutzutage eher mit rekombinantem t-PA (rt-PA, Actilyse®) [86]. Streptokinase aktiviert sowohl freies als auch an Fibrin gebundenes Plasminogen, während rt-PA selektiv an Fibrin bindet und somit die lokalen Thromben gezielter auflösen vermag.

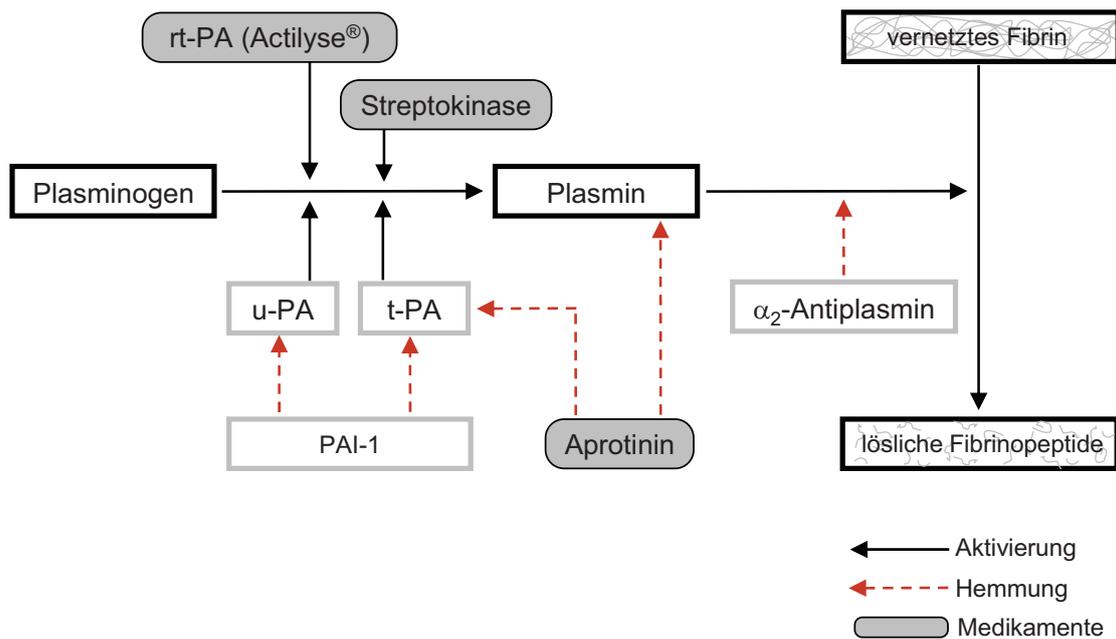


Abbildung 20: Schematische Übersicht der fibrinolytischen Prozesse und deren physiologische sowie medikamentöse Beeinflussung (modifiziert nach [102]).

Antifibrinolytika wiederum hemmen über verschiedene Ansatzpunkte das Fibrinolyse-System. Sie kommen meist bei Blutungen infolge einer Hyperfibrinolyse zum Einsatz. Aprotinin (Trasylo[®]) vermag sowohl t-PA als auch Plasmin direkt durch reversible Komplexbildung zu inaktivieren. Als Folge resultiert eine Hemmung der Bildung und Wirkung von Plasmin und somit eine deutlich verminderte Aktivität des fibrinolytischen Systems [101].

2.4 Stand der diagnostischen Technik und Forschung

Die Hämostase ist ein äußerst komplexes System, bei dem sich die Gerinnung und die Neigung zur Blutung die Waage halten müssen. Wird das Gleichgewicht gestört, führt dieses sehr schnell zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Neben vielen Erkrankungen wird auch bei medizinisch verwendeten extrakorporalen Verfahren (Dialyse, Herz-Lungen-Maschine) oder bei größeren chirurgischen Eingriffen dieses Gleichgewicht gestört. Dies führt zu einem stark erhöhten Risiko von Thromboembolien oder perioperativen Blutungskomplikationen. Deshalb ist eine umfassende, schnelle Diagnostik einer vorliegenden akuten Hämostasestörung ebenso erforderlich wie die Durchführung einer Verlaufskontrolle und eine Überwachung der Therapie. Untersuchungen und Tests bezüglich Thrombozytenfunktion,

Gerinnungsfaktoren und des Fibrinolyse-Systems im klinischen Zentrallabor gewährleisten unter anderem eine optimale Überwachung pharmakologischer oder auf Transfusionen basierender Therapien. Allerdings sind diese Labormethoden aufgrund der langsamen Verfügbarkeit der Ergebnisse und des nötigen Proben-Transports für ein simultanes Gerinnungsmanagement während der Operation von Patienten nicht praktikabel. Deshalb haben in den vergangenen Jahren zahlreiche diagnostische und therapeutische Neuerungen in der klinischen Versorgung von Patienten mit Hämostasestörungen Einzug gehalten. Besonders im anästhesiologisch-intensivmedizinischen Bereich gewinnen so genannte „point of care testing (POCT)“-Methoden, die patientennah, außerhalb der klassischen Laborumgebung, also auf Station bzw. direkt im Operationssaal durchgeführt werden können, immer mehr an Bedeutung. Hinsichtlich ihrer Handhabung kann man „echte“ POC-Verfahren von „POC-tauglichen“ Methoden unterscheiden. Echte POC-Methoden zeichnen sich durch eine extrem einfache Bedienung, wie zum Beispiel den Einsatz von Teststreifen (Schwangerschaftstest, Blutzuckermessung) aus. Im Unterschied dazu ist bei POC-tauglichen Methoden mehr Aufwand und Geschick und somit mehr Einarbeitung und Erfahrung des Anwenders notwendig. Im Folgenden werden vorrangig hämostaseologische POC-Verfahren sowie laboranalytische Methoden zur Diagnostik der Thrombozytenfunktion, der plasmatischen Gerinnung sowie der Erfassung fibrinolytischer Prozesse kurz vorgestellt.

2.4.1 Messung thrombozytärer Funktionen

In den letzten Jahren wuchs die Erkenntnis, dass eine strikte Trennung zwischen zellulären und plasmatischen Gerinnungsabläufen die In-vivo-Prozesse nicht adäquat widerspiegelt. Somit können die klassischen, koagulometrischen Gerinnungstests im zellfreien Plasma die Gesamtheit der Prozesse nicht erfassen. In der Folge wurde das „zellbasierte Gerinnungsmodell“ entwickelt, in dem die Thrombozyten eine zentrale Position im Verständnis der physiologischen Abläufe einnehmen. Das Monitoring der Thrombozytenfunktion gewinnt vor dem Hintergrund dieser neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse zunehmend an diagnostischer Bedeutung. Thrombozytenfunktionstests werden zur Erkennung einer angeborenen oder erworbenen Thrombozytenfunktionsstörung sowie zur Erfassung einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung, die mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen kann, verwendet. Thrombozytenfunktionstests werden aber

auch zur Überwachung der Behandlung mit Thrombozytenfunktionshemmern wie Acetylsalicylsäure, Clopidogrel oder Glykoprotein IIb/IIIa-Hemmern eingesetzt.

Thrombozytenaggregometrie nach Born. Bei der als POC-tauglich einzustufenden Thrombozytenaggregometrie nach BORN [103] wird die physiologische Thrombozytenfunktion mit Hilfe verschiedener Induktoren stimuliert und als Kurvenprofil dargestellt. Dabei dient der Kurvenverlauf sowohl der Diagnostik der zugrunde liegenden Erkrankung als auch der Einschätzung des Blutungsrisikos.

Das Prinzip der Messung besteht auf Veränderungen der Lichtdurchlässigkeit des plättchenreichen Plasmas (platelet rich plasma, PRP) im Verlauf der Thrombozytenaggregation (Abbildung 21). Bei dieser photometrischen Methode rotiert unter standardisierten Bedingungen ein Rührmagnet in einer Küvette mit PRP im Strahlengang eines Photometers mit monochromatischem Licht.

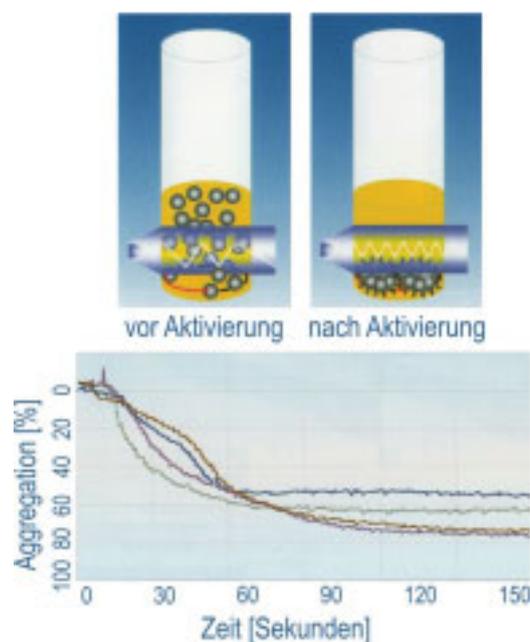


Abbildung 21: Oben: Detektionsprinzip der Aggregation nach Born mit Zunahme der Transmission nach abgelaufener Plättchenaggregation. Unten: Typische Kurvenverläufe nach Aktivierung der Aggregation mittels unterschiedlicher Aktivatoren [104].

PRP hat dabei aufgrund der auftretenden Lichtstreuung, Reflexion und Absorption einen hohen Extinktionskoeffizienten, was eine starke Abschwächung des Lichtstrahls zur Folge hat. Durch eine eintretende Plättchenaggregation sinken die schweren Aggregate auf den

Boden der Küvette. Der resultierende Überstand, das plättchenarme Plasma (platelet poor plasma, PPP), ist für die Lichtstrahlung um ein Vielfaches durchlässiger. Über diese Zunahme der Transmission ist es möglich, die Plättchenaggregation in Form einer Aggregationskurve in Abhängigkeit der Zeit darzustellen. Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips und einen typischen Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregometrie nach Born.

Dabei wird der Aggregationsgrad prozentual angegeben. Als Aktivatoren der Aggregation kommen dabei ADP, Kollagen, Arachidonsäure und Thrombin in Frage. Der Einsatz eines Rührmagneten soll zum einen den Scherstress im Gefäß simulieren und zum anderen ein schnelleres Absinken der Aggregate gewährleisten. Geräte zur turbidimetrischen Bestimmung der Thrombozytenfunktion sind zum Beispiel der PAP4 von MöLab GmbH (Langenfeld), der Chrono-log 700 von Chrono-log Corp. (USA) sowie der CARAT TX4 von Carat Diagnostics (Ungarn).

Nachteile dieser Methode, wie auch der meisten derzeit verfügbaren Thrombozytenfunktionstests, sind die schlechte Standardisierbarkeit, die aufwändige Durchführung sowie die vergleichsweise hohen Kosten [105].

Platelet function analyzer PFA-100. Ein weiteres Beispiel eines POC-tauglichen Geräts zur Erfassung der primären Hämostase ist der von Dade Behring Inc. entwickelte „Platelet function analyzer“ PFA-100 [106;107]. Er wird mittlerweile in vielen Kliniken anstelle des so genannten „Blutungszeit-Tests“ zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion in Vollblut eingesetzt. Der PFA-Test kann neben dem Aspirin-Effekt auch Hinweise auf das Vorliegen eines von-Willebrand-Syndroms liefern [108].

Das Prinzip des PFA-100 basiert auf der Simulation einer kapillären Blutstillung durch die Thrombozyten in-vitro. Antikoaguliertes Vollblut fließt über eine Kapillare durch eine kleine Öffnung in einer Membran, die mit thrombozytenaktivierenden Substanzen (Kollagen und ADP) beschichtet ist. Durch die stattfindende Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten kommt es langsam zum vollständigen Verschluss dieser Öffnung, was mittels Drucksensoren registriert wird. Als Messwert wird dann die Zeit zwischen Beginn der Messung und dem vollständigen Verschluss der Membranöffnung als so genannte Verschlusszeit ausgegeben [109]. Diese Methode ist aufgrund der Verwendung von Vollblut und der Simulation des physiologischen Blutflusses sehr nah an der Realisierung der in-vivo vorliegenden Verhältnisse.

Vollblutaggregometrie - Das Multiplate[®]-System. Von CARDINAL und FLOWER [110] wurde 1979 die Thrombozytenfunktion in Vollblut mittels Impedanz-Messungen vorgestellt. Dazu wird durch Induktoren wie ADP, Kollagen oder Arachidonsäure in verdünntem Vollblut eine Thrombozytenaggregation ausgelöst. Die aktivierten Thrombozyten adhäreren und aggregieren an den thrombogenen Metalloberflächen der Elektroden, was in einem Anstieg des elektrischen Widerstandes zwischen den Elektroden resultiert. Dies wird kontinuierlich aufgezeichnet und im Zeitverlauf aufgetragen.

In verschiedenen Studien wurde die Vollblutaggregometrie zum Nachweis von Veränderungen der Thrombozytenfunktion durch Erkrankungen und Thrombozytenhemmer eingesetzt [111-113].

POC-Thrombozytenaggregometer - VerifyNow[®]. Das VerifyNow[®]-System, entwickelt von Accumetrics (USA) ist das erste auf dem Markt befindliche Vollblutaggregometer mit optischer Detektion. Dabei werden mit Fibrinogen beschichtete Beads und ein Thrombozytenaktivator wie zum Beispiel ADP vorgelegt. Die aktivierten Plättchen adhäreren an den Beads und es kommt zur thrombozytenvermittelten Aggregation der Beads, was zu einer messbaren Zunahme der Transmission führt [114].

2.4.2 Tests zur Bestimmung der plasmatischen Gerinnung

Die Aufklärung von auftretenden Blutungsstörungen ist ein schwieriger Prozess, da Störungen der verschiedenen Gerinnungsfaktoren an unterschiedlichen Stellen der Gerinnungskaskade auftreten können. Zudem können verschiedene Störungen ähnliche Krankheitsbilder auslösen. Da die Identifizierung des jeweilig gestörten Gerinnungsfaktors jedoch nicht in adäquater Zeit und mit vertretbaren Kosten zu gewährleisten ist, werden beim Auftreten von spontanen Blutungen in der Regel zunächst allgemeine Untersuchungen des Gerinnungssystems, so genannte Globaltests, durchgeführt. Dazu zählen unter anderem die so genannte „Thromboplastinzeit“ (TPZ, oder Prothrombintime, PT), die auch als Quick-Test bekannt ist, und die „aktivierte partielle Thromboplastinzeit“ (activated partial prothrombin time, aPTT). Liefern die durchgeführten Globaltests pathologische Ergebnisse, so werden im Anschluss speziellere Untersuchungen einzelner Gerinnungsfaktoren zur Diagnose von Einzelfaktormängeln durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die für diese Arbeit relevanten Messverfahren und Gerinnungstests gegeben. Zudem werden neben POC-tauglichen Geräten zur Gerinnungszeitmessung auch echte POC-Systeme kurz vorgestellt.

Gerinnungsanalytische Messprinzipien. Lange Zeit wurden bei hämostaseologischen Blutgerinnungstests ausschließlich Methoden eingesetzt, bei denen die Gerinnungszeit nach Zugabe eines entsprechenden Aktivators gemessen wurde. Heute bedient man sich nahezu aller Messmethoden, die auch im klinisch-chemischen Labor zu den Standardverfahren zählen, was auf den Fortschritt der medizinischen Forschung und dem daraus resultierenden Bedarf an neuen Nachweismethoden zurückzuführen ist. Die in der modernen Gerinnungsanalytik eingesetzten Methoden lassen sich in drei Gruppen einteilen: Koagulometrische Gerinnungszeitmessungen, chromogene bzw. enzymatische Verfahren [115] sowie immunologische Messverfahren [116]. Da in dieser Arbeit ausschließlich koagulometrische Verfahren zur Anwendung kamen, soll auf die beiden anderen Methoden nicht näher eingegangen werden.

Koagulometrische Messverfahren finden sowohl bei den Globaltests als auch bei der Aktivitätsbestimmung von Einzelfaktoren und Inhibitoren Anwendung. Die durch bestimmte Aktivatoren ausgelöste Gerinnung endet in der Umwandlung von Fibrinogen zu polymerisierten Fibrinfäden, die zu einem makroskopisch erkennbaren Gerinnsel führen. Dabei verändern sich die physikalischen Eigenschaften des Reaktionsansatzes auf zwei unterschiedliche Arten: Zunahme der Viskosität sowie zunehmende Trübung der Probe. Alle Gerinnungszeitmessungen nutzen eine dieser beiden physikalischen Veränderungen.

Früher wurde der Endpunkt der bei der Gerinnung stattfindenden Viskositätszunahme manuell durch die so genannte Häkchenmethode bestimmt. Dabei wurde der Endpunkt durch wiederholtes Einführen eines Häkchens in die Probe bis zur Bildung eines anhaftenden Gerinnsels ermittelt. Heutzutage wird ausschließlich die mechanisierte Endpunktermittlung angewendet, wobei der Gerinnungseintritt entweder mit Hilfe von Häkchen, schwingenden Fähnchen oder der Auslenkung magnetischer Kügelchen ermittelt wird. Diese Methoden sind auch für Messungen in Vollblut geeignet und lassen sich gut automatisieren.

Beim koagulometrisch-optischen Prinzip wird der Gerinnungseintritt an der starken Zunahme der Lichtstreuung oder Trübung erkannt und photometrisch ausgewertet. Diese Methode ist jedoch sehr anfällig auf Störungen durch Zellen und eignet sich somit nicht für Messungen in Vollblut.

Thromboplastin-Zeit oder Quick-Test. Die Thromboplastin-Zeit (TPZ) oder auch nach dem Urheber A.J. QUICK als Quick-Test [117] benannt, ist ein Suchtest zur Erfassung von Störungen der Faktoren VII, X, V, II und Fibrinogen. Bei diesem Test wird nach Zugabe von Thromboplastin (tissue factor), Phospholipiden und Calcium zu Citratplasma die Gerinnungszeit gemessen [118;119]. Durch Anlegen einer Verdünnungsreihe eines so genannten Normalplasmapools lässt sich eine Bezugsgerade ermitteln. Die bei der zu untersuchenden Probe gemessene Gerinnungszeit wird dann als „% der Norm“ angegeben (Quick-Wert). Dieser Test ist aufgrund der Gewinnung des Thromboplastins aus unterschiedlichen Spezies und Organen, dem eventuellen Zusatz von Heparinantagonisten, unterschiedlichen Methoden der Endpunktbestimmung und uneinheitlicher Durchführung der Reaktion schlecht standardisierbar. Die beste Möglichkeit, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Labors zu gewährleisten, ist die Angabe als „International Normalized Ratio (INR)“. Die INR ist eine methodenunabhängige Größe, die auf einen WHO-Standard (WHO = World Health Organisation) bezogen ist. Dabei ist die Kenntnis des Internationalen Sensitivitätsindex (ISI) erforderlich, der für jedes Startreagenz vom Hersteller angegeben wird. Der INR-Wert berechnet sich dann wie folgt:

$$INR = \left(\frac{TPZ \text{ der Probe } (s)}{TPZ \text{ eines Normalplasmas } (s)} \right)^{ISI} \quad (2.12)$$

Der Normalwertbereich liegt im Allgemeinen zwischen 70 und 130 % [120]. Die Thromboplastinzeit wird bei Zugabe von Heparin im Sinne einer Verlängerung beeinflusst. Die diagnostische Relevanz dieses Tests basiert hauptsächlich auf der Überwachung der Therapie mit antikoagulatorischen Medikamenten, wie zum Beispiel Marcumar®.

Aktivierte partielle Thromboplastin-Zeit (aPTT). Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) beschreibt die Zeit von der Calciumzugabe bis zur Fibrinpolymerisation nach vorangegangener intrinsischer Aktivierung der Gerinnungsfaktoren durch einen Oberflächenaktivator, wie zum Beispiel Kaolin. Der Normalwertbereich ist abhängig vom eingesetzten aPTT-Reagenz und liegt meist im Bereich von 25 - 40 Sekunden [120]. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit umfasst das intrinsische System und wird bei Verminderung der Gerinnungsfaktoren II, V, VIII, IX, X, XI, XII und Fibrinogen verlängert gemessen. Ein Mangel der Faktoren VII und XIII werden durch die aPTT nicht

erfasst. Aufgrund seiner guten Empfindlichkeit auf Heparin gilt der aPTT-Test als der bevorzugte Test zur Überwachung einer Heparintherapie [121].

Geräte zur Messung der Blutgerinnung. Zur automatisierten Endpunktbestimmung des Gerinnungsprozesses stehen zahlreiche unterschiedliche Geräte zur Verfügung. Für geringen Probendurchsatz in kleineren Kliniken oder für den Einsatz in Forschungslabors eignet sich das mechanische Koagulometer Biomatic 2000 von Sarstedt (Nürnberg) oder das Kugelkoagulometer MC10plus der Firma ABW Medizin und Technik GmbH (Lemgo). Beim Biomatic 2000 wird der Endpunkt der Gerinnung durch die Abnahme der Schwingungsamplitude eines in die Probe tauchenden Stäbchens bestimmt. Beim MC10plus dreht sich eine schräg positionierte Messküvette mit inliegender kleiner Stahlkugel langsam um ihre Längsachse. Die Position der Kugel wird von einem Magnetsensor erfasst. Die Ausbildung des Fibringerinnsels führt zur Auslenkung der Kugel aus ihrer bisherigen Position und aus dem Erfassungsbereich des Sensors und somit zur Endpunktbestimmung. Beide Systeme eignen sich zur Durchführung von Quick-Tests, aPTT sowie allen Gerinnungstests, die eine Fibrinbildung als Endpunkt haben. In Verbindung mit geeigneten Reagenzien können sowohl Plasma als auch Vollblut als Probe verwendet werden.

Der STA-R Evolution[®] sowie der STA Compact[®] von Roche Diagnostics (Mannheim) sind probenselektive Gerinnungsanalytoren zur Bestimmung mittels koagulometrischen, chromogenen und immunologischen Methoden für den Einsatz in klinischen Hochdurchsatzlabors.

Wie bei anderen Blutparametern, zum Beispiel Glucose oder Lipiden, stehen mit dem CoaguChek[®] S von Roche Diagnostics (Mannheim), dem INRatio2[®] von Hemo-Sense (USA) und dem i-STAT[®] von Abbott Point-of-Care (USA) auch für die Blutgerinnung patientengerechte POC-Geräte zur Verfügung, die leicht und sicher zu handhaben sind. Mit einem Tropfen Kapillarblut auf dem Teststreifen wird in Minutenfrist die Gerinnungszeit gemessen, vom integrierten Computer in Quick-Wert und INR umgerechnet und im Display angezeigt. CoaguChek[®] S erfasst die Gerinnungszeit durch im Teststreifen vorhandene Eisenoxid-Partikel, die durch Magnetfelder ausgerichtet und bewegt werden. Eine einsetzende Gerinnung stoppt die Bewegung dieser Partikel, was photometrisch erfasst wird. Beim INRatio2-Gerät wird der Gerinnungszeitpunkt elektronisch über die Änderung der Impedanz durch die Gerinnselbildung bestimmt [122]. Der i-STAT[®] basiert auf einer anderen Methode: In der Kartusche befindet sich ein Substrat, das durch Thrombin in ein positiv geladenes

Substrat umgewandelt wird. Die Bildung dieser elektroaktiven Verbindung wird amperometrisch erkannt und die Nachweiszeit gemessen.

2.4.3 Messung fibrinolytischer Prozesse

Dem Grundprinzip der humanen Physiologie entsprechend befindet sich das Fibrinolyse-System durch Aktivatoren und Inhibitoren in einem ausbalancierten Zustand. Hyperfibrinolytische Störungen sind durch einen relativen Mangel an inhibierenden Substanzen (Antiplasmin, Plasminogenaktivator-Inhibitor-1) oder durch einen Überschuss an aktivierenden Substanzen (Plasminogenaktivatoren) bedingt. Im Gegensatz zu der Vielzahl der diagnostischen Parameter zur Erfassung von Störungen im Gerinnungssystem, gibt es nur wenige zur Erfassung von Fibrinolysestörungen. Zudem sind die meisten Tests auf Fibrinolysemarker nur mit hohem Aufwand mittels ELISA (t-PA-Aktivität, oder Plasminogenaktivator-Inhibitor-1) oder mittels chromogenen Methoden (Plasminogen-Aktivität, Plasmin-Antiplasmin-Komplex) durchführbar. Deshalb sollen in dieser Arbeit nur die beiden wichtigsten Methoden zur Erfassung hyperfibrinolytischer Prozesse, der D-Dimer-Test sowie die Thrombelastometrie erläutert werden.

D-Dimer-Test. Wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, entstehen erhöhte Konzentrationen an D-Dimeren wenn ein vorhandenes Fibringerinnsel durch fibrinolytische Prozesse abgebaut wird. Wichtigste Indikationen der Untersuchung auf D-Dimere sind der Ausschluss eines thromboembolischen Ereignisses und die Diagnose einer Verbrauchskoagulopathie [90]. Die Bestimmung der D-Dimere als Aktivierungsmarker der Fibrinolyse erfolgt durch Verwendung spezifischer Antikörper. Zur Konzentrationsbestimmung der D-Dimere werden entweder ELISA-Untersuchungen oder automatisierbare, partikelverstärkte Agglutinationstest durchgeführt. Beim Agglutinationstest werden mit Antikörpern gegen D-Dimere beschichtete Polystyrolpartikel eingesetzt, die beim Mischen mit einer D-Dimere enthaltenden Probe agglutinieren. Der Nachweis der entstandenen Immunkomplexe oder Partikelaggregate kann durch optische Absorption, fluorometrisch oder nephelometrisch erfolgen. Partikelunterstützte Agglutinationstests können vollautomatisch von den Systemen STA Compact[®] von Roche Diagnostics (Mannheim) oder Sysmex[®] CA-1500 von Siemens Healthcare Diagnostics abgearbeitet werden. Im POC-Bereich finden die CARDIAC[®] D-Dimer Teststreifen in

Verbindung mit dem Point-of-Care-Gerät cobas h 232 von Roche Diagnostics (Mannheim) Anwendung.

Die Rotations-Thrombelastometrie - das ROTEM[®]-System. Die Rotations-Thrombelastometrie ist eine Weiterentwicklung der von HARTERT 1948 etablierten Thrombelastometrie [123]. Die von CALATZIS und der Pentapharm GmbH (München) konzipierte POC-taugliche Rotations-Thrombelastometrie (ROTEM) macht sich Änderungen der Viskoelastizität von Vollblut bei der Gerinnelbildung und -Auflösung zunutze. Dazu wird die Vollblut-Probe zusammen mit den entsprechenden Reagenzien in eine zylindrische Küvette gegeben. In die Küvette taucht ein Stempel ein, der durch eine Feder periodisch um $4,75^\circ$ nach rechts und links ausgelenkt und durch ein Kugellager stabil geführt wird. Ein entstehendes Fibringerinnsel bremst die Bewegung des Stempels, was mittels einer Anordnung von Lichtquelle, Spiegel und CCD-Zeilenkamera optisch registriert und an einen Computer zur Auswertung weitergeleitet wird [124] (Abbildung 22).

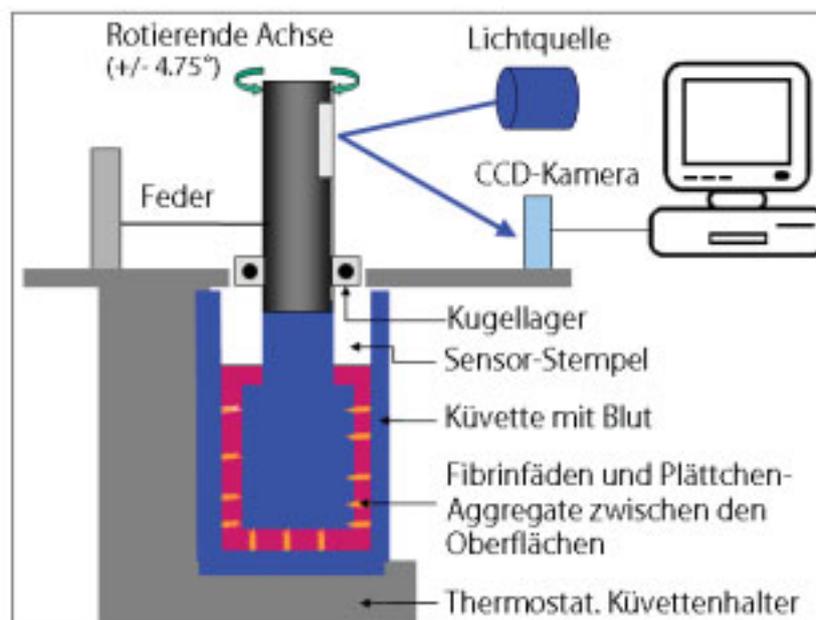


Abbildung 22: Prinzip der Rotations-Thrombelastometrie [125].

Die resultierende Kurve hat die Form einer Stimmgabel und kann bezüglich Gerinnungszeit, Geschwindigkeit der Clotbildung, maximaler Gerinnselfestigkeit und maximaler Lyse des entstandenen Gerinnsels interpretiert werden (Abbildung 23-A). Da anhand dieses Systems auch eine Abnahme der Gerinnselfestigkeit verfolgt werden kann, eignet sich dieses Verfahren prinzipiell als Globaltest hyperfibrinolytischer Prozesse [126;127].

Hyperfibrinolytische Vorgänge lassen sich anhand normaler oder leicht verlängerter Gerinnungszeiten und Gerinnselbildungszeiten sowie einem Rückgang der Amplitude identifizieren (Abbildung 23-B). Zur Untersuchung auf Gerinnungsstörungen und Fibrinolyse stehen unterschiedliche Testreagenzien zur Verfügung. Aufgrund der an die Geräteanforderungen angepassten Parameter wie Volumen an Probenmaterial sowie Konzentrationen und Volumen der Reagenzien können die resultierenden Gerinnungszeiten der entsprechenden Tests jedoch nicht direkt mit den Ergebnissen der klassischen Koagulometrie verglichen werden.

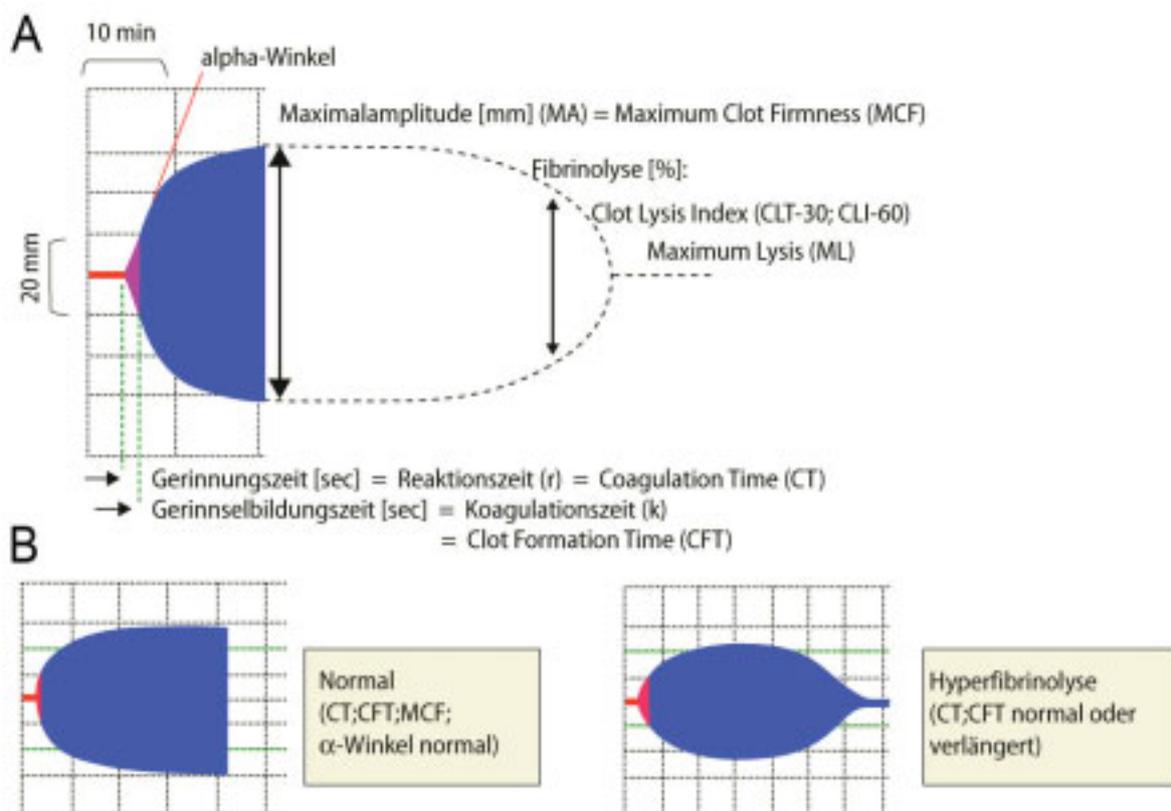


Abbildung 23: A: Typische Normkurve der ROTEM mit entsprechenden Parametern zur Interpretation. B: Kurvenverlauf bei normalen (links) und hyperfibrinolytischen (rechts) Proben [128].

2.4.4 Schwingquarze als Hämostase-Sensoren - Arbeiten anderer Autoren

Als massen- und viskositätssensitive Sensoren finden Schwingquarze bei der Untersuchung zahlreicher wissenschaftlicher und medizinischer Fragestellungen Anwendung. So wurden viele analytische Fragestellungen im Bereich der Gassensorik, Immunoassays, Protein- sowie Zelladsorption genauso wie Bakterien oder Viren mittels Schwingquarzen erforscht. Ebenso wurden Lipidfilme, Langmuir-Blodget-Filme, selbstorganisierte Monolagen (SAMs) und Schichten verschiedenster Polymere untersucht und charakterisiert [4;42;48;51;64;129-133]. Im Folgenden sollen die bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten anderer Autoren zu den Themen Thrombozytenfunktions-Diagnostik, Messung der Blutgerinnung sowie Untersuchung der Fibrinolyse unter Verwendung von Schwingquarzsensoren vorgestellt werden.

Von WEBER ET AL. [134] wurden Schwingquarze hauptsächlich zu dem Zweck eingesetzt, speziell entwickelte Beschichtungen auf ihre Adhäsionsresistenz gegenüber Thrombozyten zu untersuchen. Erste Untersuchungen des Adhäsionsprozesses von Blutplättchen mittels Schwingquarzen wurden 1992 von MATSUDA ET AL. [135] und ein Jahr später von KAWAKAMI ET AL. [136] unternommen. Dabei wurde die Adhäsion gewaschener Thrombozyten an die Goldoberfläche der Thrombozyten zum einen anhand des Frequenzverlaufes und zum andern anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Fluoreszenzmarkierung verfolgt. Sie stellten die Vermutung auf, dass die Frequenzänderung nicht nur allein auf der Adhäsion, sondern vielmehr auf dem Ausbreiten, dem *Spreading* der Thrombozyten auf der Fremdoberfläche beruht. Untersuchungen zur Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten nach ADP-Stimulus oder Inhibierung mittels Abciximab wurden von ERGEZEN ET AL. [137] an Kollagen-beschichteten Schwingquarzen durchgeführt. Sie konnten in plättchenreichem Plasma sowohl zwischen nicht-aktivierten und ADP-aktivierten als auch zwischen nicht-aktivierten und Abciximab-geblockten Thrombozyten anhand der gemessenen Schwingquarzgüte unterscheiden. Die Autoren beschreiben dabei einen dreistufigen Prozess bestehend aus einer Sedimentations- oder initialer Adhäsionsphase mit anschließender Aggregationsphase und einem abschließenden Zusammenziehen der Plättchenaggregate. Durch die Aktivierung mit ADP wurde eine deutlich früher einsetzende Aggregationsphase und somit eine frühere Abnahme der Güte beobachtet als bei der nicht-aktivierten

Kontrollprobe. Die Ergebnisse der erhaltenen Sensorsignale wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untermauert.

Die plasmatische Blutgerinnung ist das am besten mittels Schwingquarzen untersuchte Gebiet der Hämostase. Bereits in den 90er Jahren konnten MURAMATSU [138], SI [139] und CHENG ET AL. [140] zeigen, dass die plasmatische Blutgerinnung mittels Schwingquarzen messbar ist. Dabei löste jedoch jede Arbeitsgruppe die plasmatische Gerinnung durch unterschiedliche Aktivatoren in unterschiedlichen Konzentrationen aus. In den Arbeiten von SI wurde erstmals ein Netzwerkanalysator zur Messung der Blutgerinnung eingesetzt und die Übereinstimmung der Messwerte mit denen der Oszillatorschaltung bestätigt, obgleich die Abtastfrequenz des Netzwerkanalysators noch sehr gering war. Ein weiterer Fortschritt wurde durch die Forschungsarbeiten von VIKINGE ET AL. [141] erzielt, die neben der Gerinnung in Plasma auch die Gerinnung in Vollblut mittels QCM-D-Technik (5 MHz-Quarze) bzw. SPR verfolgen konnten. Ebenso wurde der Einfluss unterschiedlicher Dosen an Heparin (0.01 - 2.0 IU/ml) untersucht. Viskoelastische Parameter wurden anhand der Auftragung von Frequenzänderung und Dämpfung diskutiert. Der heparinempfindliche aPTT-Test mittels Schwingquarztechnik wurde von CHENG ET AL. [142] in Plasma und Vollblut etabliert. Es wurden therapeutische Mengen an Heparin (0 - 0.5 IU/ml) verwendet und die erhaltenen Gerinnungszeiten im Bereich von 50 - 250 Sekunden wurden mit denen eines optischen Koagulometers verglichen. Diese Vergleiche zeigten sowohl für Plasma als auch für Vollblut eine lineare Korrelation zwischen den beiden Methoden, aber keine übereinstimmenden Werte. Die mittels QCM erhaltenen Werte zeigten eine systematische Abweichung hin zu längeren Gerinnungszeiten. Der Einfluss unterschiedlicher Sensorbeschichtungen auf das Sensorsignal bei der Gerinnung von Plasma wurde von ANDERSSON ET AL. [143;144] mittels QCM-D umfangreich untersucht. Dabei zeigten mit Heparin beschichtete Schwingquarze keine, Titan-beschichtete Sensoren die schnellste und mit Polystyrol modifizierte Quarze die größte Frequenzänderung. Die Gerinnungsaktivierung durch Calcium wurde so schwach gewählt, dass die Kontaktaktivierung an der Fremdoberfläche einen großen Einfluss hatte, wodurch mit 10 - 60 Minuten sehr lange Gerinnungszeiten resultierten. Die Autoren beschreiben die oberflächenaktivierte Gerinnung mit vier Parametern: Der Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung (1), der Fibrinbildungsrate (2), der maximalen Frequenzänderung (3) und der Gerinnselfestigkeit (4), wobei letztere anhand der Betrachtung des Frequenz/Dämpfungs-Verhältnisses qualitativ bestimmen wurde.

Fibrinolytische Prozesse wurden von HAYWARD [145] sowie GHAZALI ET AL. [146] mittels Schwingquarzen detektiert. HAYWARD verwendete zur Gerinnelbildung eine Mischung aus Thrombin, Fibrinogen, Plasminogen sowie Calciumchlorid jeweils in physiologischem Puffer. Der auf dem Quarz gebildete Clot wurde durch Aufpipettieren unterschiedlicher Konzentrationen an Streptokinase bzw. t-PA unter ständiger Kontrolle des Frequenzsignals aufgelöst. Die Weiterentwicklung dieser Prozedur erfolgte durch GHAZALI, wobei zwei Lösungen aus Fibrinogen/Plasminogen sowie Thrombin/Streptokinase miteinander vermischt und anschließend auf den Quarz transferiert wurden. Aufgrund der schnelleren Kinetik der Koagulation im Vergleich zur Lyse konnte ein Frequenzabfall (Koagulation) mit anschließendem Frequenzanstieg (Lyse) im Sensorsignal beobachtet werden. Je höher dabei die Konzentration an eingesetztem Fibrinolyse-Aktivator Streptokinase war, desto schneller wurde der Wiederanstieg der Resonanzfrequenz des Quarzes beobachtet. In Plasma oder Vollblut durchgeführte Fibrinolysemessungen sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

3 Experimenteller Teil

Im ersten Unterkapitel werden die verwendeten Materialien und Geräte mit ausführlicher Beschreibung des Schwingquarzanalysegerät *FidgeType FgT1* aufgelistet. Des Weiteren werden im zweiten Unterkapitel die verschiedensten Schichtpräparationen für die jeweilige Anwendung vorgestellt.

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien

Abkürzung	Bezeichnung	Bezogen von
Aceton	Aceton	Sigma, Deisenhofen/D
Cystamin	Cystamin-Dihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen/D
Decalin	cis-trans-Decalin	Sigma, Deisenhofen/D
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	Pierce, Rockford/USA
EtOH	Ethanol	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid-Lösung, 30%ig	Merck, Darmstadt/D
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, rauchend	Merck, Darmstadt/D
HCl	Salzsäure	Sigma, Deisenhofen/D
KCl	Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen/D
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen/D
MUA	11-Mercaptoundecansäure	Sigma, Deisenhofen/D
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat	Sigma, Deisenhofen/D
NaCl	Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm/D
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen/D
NaOH	Natronlauge	Merck, Darmstadt/D
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid	Fluka, Neu-Ulm/D
THF	Tetrahydrofuran	Sigma, Deisenhofen/D
Toluol	Toluol	Sigma, Deisenhofen/D
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt/D

Proteine und Antikörper

Abkürzung	Bezeichnung	Bezogen von
anti-CD41	anti-human CD41 aus Maus	AbD Serotec, Düsseldorf/D
anti-Maus IgG	anti-Maus IgG aus Schaf, Phycoerythrin-konjugiert	Sigma, Deisenhofen/D
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion V	Fluka, Neu-Ulm/D
Fib	Fibrinogen aus humanem Plasma	Sigma, Deisenhofen/D

Aktivatoren/Inhibitoren der Hämostase

Abkürzung	Bezeichnung	Bezogen von
AA	Arachidonsäure, arachidonic acid	Mölab, Langenfeld/D
Actilyse	Rekomb. t-PA (rt-PA), Actilyse [®] (Konz. 1 mg/ml)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim/D
ADP	Adenosindiphosphat	Mölab, Langenfeld/D
AP-TEM	AP-TEM-Fertigreagenz	Pentapharm, München/D
ASS	Acetylsalicylsäure, ASS ratiopharm [®]	Ratiopharm, Ulm/D
EX-TEM	EX-TEM-Fertigreagenz	Pentapharm, München/D
Heparin	Heparin	Ratiopharm, Ulm/D
Polybrene	Hexadimethrinbromid, Polybrene [®]	Sigma, Deisenhofen/D
ReoPro	Abciximab, ReoPro [®]	Eli Lilly, Indianapolis/USA
STAR-TEM	STAR-TEM-Fertigreagenz	Pentapharm, München/D
Thromborel	Thromborel [®] S-Fertigreagenz	Dade Behring, Düdingen/CH
Trasylol	Aprotinin, Trasylol [®] (10 000 Kallikrein Inhibitor Einheiten pro ml)	Bayer, Leverkusen/D

Polymere

Abkürzung	Bezeichnung	Bezogen von
PE	Polyethylen, ~35 000 Da	Sigma, Deisenhofen/D
PS	Polystyrol, ~192 000 Da	Sigma, Deisenhofen/D
SH-EG6-OH	(1-Mercaptoundec-11-yl)hexa(ethylenglykol)	Sigma, Deisenhofen/D
SH-PEG-OH-3000	α -Hydroxy- ω -mercapto- Polyethylenglykol, ~3000 Da	Rapp Polymere, Tübingen/D
SH-PEG-OMe-2000	α -Methoxy- ω -mercapto- Polyethylenglykol, ~2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen/D
Star-PEG	Stern-förmiges Polyethylenglykol, ~12000 Da	Sustech, Darmstadt/D

Lösungen

Bezeichnung	Herstellung / Hersteller
„Piranha-Lösung“	30 ml H ₂ SO ₄ (rauchend) und 10 ml H ₂ O ₂ (30%ig)
Blockierungslösung	The Blocking Solution, Candor, Weißensberg/D
LowCross Puffer	LowCross Buffer von Candor, Weißensberg/D
Mikroskopier-Einschlussmittel	HICO-MIC von Hirtz, Köln/D
PBS-Puffer phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)	8,0 g (160 mmol) NaCl 0,2 g (3 mmol) KCl 1,15 g (8 mmol) Na ₂ HPO ₄ 0,2 g (1 mmol) KH ₂ PO ₄ in 1 Liter bidestilliertem Wasser, auf pH 7,4 titriert
TRIS/NaCl-Puffer	6,055 g (50 mmol) TRIS und 7,30 g (125 mmol) NaCl in 1 Liter bidestilliertem Wasser, auf pH 7,4 titriert
Waschpuffer	Washing Buffer PBS, Candor, Weißensberg/D

3.1.2 Blutprobenvorbereitung

Die Vollblutproben wurden freundlicherweise von gesunden Spendern des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT) des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt und direkt in Citrat-Monovetten der Sarstedt GmbH (Nümbrecht/D) abgenommen.

Für Gerinnungs- bzw. Fibrinolyse-Messungen wurden die Vollblutproben kurz vor der Messung auf 37 °C erwärmt und innerhalb von 8 Stunden verwendet.

Um plättchenreiches Citrat-Plasma (platelet rich plasma, PRP) zu erhalten wurden die Proben bei 150×g für 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert und das plättchenreiche Plasma abgenommen. Plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma, PPP) wurde durch erneute Zentrifugation der restlichen Probe für 10 Minuten bei 2500×g ohne Bremse erhalten. Für die Messungen der Thrombozytenfunktion wurde mittels Zellzähler die Thrombozytenzahl des PRP bestimmt und mit PPP auf eine endgültige Thrombozytenzahl von 300 000/μl (PRP^{300k}) eingestellt. Die Proben wurden innerhalb von 5 Stunden gemessen.

Die Gewinnung von Blutserum erfolgte durch Abnahme der Blutprobe in entsprechende Serum-Monovetten, aus denen nach 20 Minuten das Fibrinogen- und Thrombozyten-freie Serum durch Abpipettieren einfach abgetrennt werden kann.

Ebenso wie das PPP wurde auch das Blutserum zur Charakterisierung der Proteinresistenz der unterschiedlichen Sensorbeschichtungen verwendet. Um dabei Unterschiede zwischen den Spendern zu minimieren, wurden von 5 Spendern (Blutgruppe 0) jeweils PPP und Serumproben hergestellt und diese zu einem Plasma- und Serumpool vereinigt.

3.1.3 Schwingquarzsensoren

Die in dieser Arbeit verwendeten 10 MHz Schwingquarzsensoren im AT-Schnitt wurden von KVG (Neckarbischofsheim/D) bezogen. Die spezielle Elektrodengeometrie mit einer die gesamte Schwingquarzoberfläche bedeckenden oberen Elektrode wurde von GEHRING [4] entwickelt. Die Aufbringung der Elektroden erfolgte ebenfalls durch den Hersteller KVG.

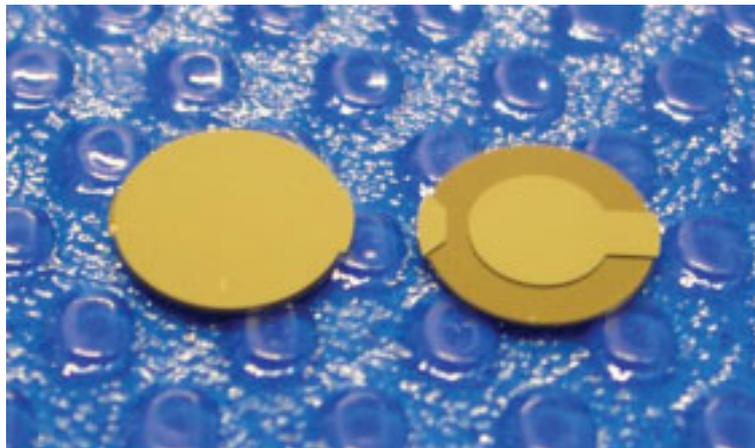


Abbildung 24: Elektrodengeometrie auf der Oberseite (links) und der Rückseite (rechts) der verwendeten Schwingquarze.

Typische Materialkonstanten bzw. charakteristische Größen der in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarze sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Charakteristische physikalische Parameter der verwendeten Schwingquarze [4].

Physikalischer Parameter	Symbol	Wert [Einheit]
Resonanzfrequenz	f_0	10 [MHz]
Quarzdurchmesser		8,5 [mm]
Durchmesser obere / untere Elektrode		8,5 / 5 [mm]
Quarzdicke	d_q	166 [μm]
Quarzdichte	ρ_q	2650 [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]
Ausbreitungsgeschwindigkeit	v_{sh}	3310 [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]
Akustische Impedanz	Z_q	$8,77 \cdot 10^{-6}$ [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]
Schersteifigkeit	c_{66}^D	$2,899 \cdot 10^{10}$ [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$]
Schichtwägempefindlichkeit	C_f	0,23 [$\text{Hz} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{ng}^{-1}$]
Eindringtiefe (H_2O)	δ	179 [nm]

Um die Schwingquarze fluidisch dicht und möglichst spannungsfrei in eine Fließ-Injektions-Anlage (FIA) integrieren zu können, wurden die Sensoren in eine Schwingquarzhalterung eingeklebt. Diese besteht aus einem äußeren Kunststoffring, in den über eine ringförmige Polyethylenfolie ein 10 MHz-Schwingquarz mittig eingeklebt ist (Abbildung 25) [4;147]. Ein weiterer Vorteil dieser Schwingquarzhalterung ist die leichte Handhabung des Schwingquarzes ohne direkte Berührung der beschichteten Schwingquarzoberfläche.



Abbildung 25: Schwingquarzsensoren in Haltevorrichtung im Größenvergleich zu einem 1 Cent Stück.

3.1.4 Geräte

Zellzähler. Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl im PRP wurde das Gerät *CellDyn 3500* von Abbott Laboratories (Illinois/USA) verwendet.

Thrombozyten-Aggregometrie. Als Referenzgerät für die Thrombozytentests diente das Born-Aggregometer *Platelet Aggregation Profiler PAP-4* von Mölab (Langenfeld/D). Die Messungen wurden bei 37 °C und einer Rotationsgeschwindigkeit des Magnetkerns von 1000 U/min durchgeführt. Die Ausdrücke der gemessenen Aggregationskurven wurden eingescannt und anhand der Software *Engauge Digitizer 4.1* digitalisiert.

Koagulometrie. Die Bestimmung der Gerinnungszeiten erfolgte sowohl mit dem mechanischen Föhnchen-Koagulometer *Biomatic 2000* von Sarstedt (Nümbrecht/D) sowie dem Kugelkoagulometer MC4 von ABW Medizin und Technik (Lemgo/D).

Rotations-Thrombelastometrie. Das *ROTEM[®] Gamma* von Pentapharm (München/D) wurde als Vergleichsgerät bei der Untersuchung und Messung fibrinolytischer Prozesse herangezogen.

Spin Coating. Die Herstellung dünner Kunststoffbeschichtungen wurde mit dem Spin-Coater *Spin 150-v3-NPP* von SPS Europe (Ingolstadt/D) durchgeführt.

Mikroskop. Lichtmikroskopische Auflichtaufnahmen wurden mit dem *Axioskop 2* von Zeiss (Jena/D) und Fluoreszenzaufnahmen mit dem *Jenalumar* von Zeiss (Jena/D) angefertigt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM). REM-Bilder der unterschiedlichen Oberflächen wurden mit dem Gerät *Stereoscan 250Mk2* von Cambridge Scientific Instruments (Cambridge/GB) aufgenommen. Die Kritisch-Punkt-Trocknung wurde ebenso wie die Anfertigung der REM-Bilder freundlichweise von Herrn Dr. rer. nat. K.-H. Hellmer, Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen, durchgeführt.

Rasterkraftmikroskopie (AFM). Mit dem *MultiMode Scanning Probe Microscope* von Digital Instruments/Veeco (New York/USA) und den Cantilevern *MFM Ultralever* (Typ B, Länge 180 µm, Kraftkonstante 0.4 N/m, Resonanzfrequenz 45 kHz) ebenfalls von Veeco wurden Schichtcharakterisierungen durchgeführt. Die AFM-Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. C. Müller an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Physik, AG Grenzflächen, Nanomaterialien und Biophysik, durchgeführt. Die

Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *Scanning Probe Image Processor SPIP* von Image Metrology (Horsholm, DK).

Null-Ellipsometrie. Die Schichtdicken der Sensorbeschichtungen wurden mit dem computergesteuerten Ellipsometer *Multiskop* von Optrel GbR (Berlin/D) bei einer Wellenlänge von 632,8 nm, einer Kompensatorstellung von -45° und einem Einfallswinkel von 70° gemessen. Die vom Hersteller mitgelieferte Software *Elli* diente zur Simulation der Schichtdicken. Zur Bestimmung der Dicke der Beschichtungen wurde ein 3-Schichten-Modell mit Gold als Substrat und Luft als Medium eingesetzt. Zur Berechnung wurde für die Beschichtungen (Polystyrol, Polyethylen, Fibrinogen) folgender komplexer Brechungsindex zugrunde gelegt: $n = 1,5$ und $k = 0$ [148].

Impedanzanalyse. Die Impedanzanalyse der Resonatorschwingungen wurde mit dem Netzwerkanalysator *R3765CG* von Advantest (Tokyo/JP) durchgeführt.

Mikrofluidischer Aufbau. Für den mikrofluidischen Aufbau wurden drei Pumpen des Typs *M6* von VICI Ag (Schenk/CH) verwendet. Das Schlauchquetschventil *Bio-Chem Valve* wurde von Bio-Chem Fluidics (New Jersey/USA) bezogen.

Schwingquarz-Plattform *FidgeType FgT1*. Sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten Schwingquarzmessungen wurden mit der von GEHRING entwickelten Analyseplattform *FidgeType FgT1* durchgeführt. Das zweiteilige Gerät setzt sich aus einer elektronischen Steuereinheit und einer Sensoreinheit zusammen (Abbildung 26). Herzstück der Sensoreinheit ist die mittels Peltier-Elementen bis auf $\pm 0,1$ K [4] genau thermostatisierbare Sensorplattform mit zwei integrierten Messkammern für je einen Schwingquarzsensoren. Das Messkammervolumen ist in einem Bereich von 30 - 70 μl variabel und betrug bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Messungen 30 μl . Durch ein transparentes Sichtfenster sind die Sensoren optisch zugänglich, was die Beobachtbarkeit der einströmenden Blutprobe oder die schnelle Identifikation eventueller Störparameter, wie zum Beispiel Luftblasen, ermöglicht. Der Probentransport zu den Messkammern kann durch eine Fließ-Injektions-Anlage (FIA), bestehend aus zwei Peristaltikpumpen, einem 8-Wege- und einem 2-Wege-Ventil erfolgen. Dabei ist die Fluidik derart konzipiert, dass ein Aufziehen der Probe aus einem der 7 thermostatisierbaren Probenreservoirs in die Probenschleife bei ungestörtem kontinuierlichem Pufferstrom durch die Messkammer möglich ist. Die Schwingquarze können sowohl im

aktiven Modus mittels einer SMD-Oszillatorschaltung auf Basis der Hauptmannschaltung [4] oder im passiven Modus mittels Netzwerkanalysator betrieben werden.

Die Ansteuerung der Mess- und Steuerungseinheiten sowie die Messdatenerfassung inklusive Temperatur-, Resonanzfrequenz-, Dämpfungs- und Pumpendaten erfolgt durch die von DRECHSEL entwickelte Software *QCMLab* [4;149]. Die Ansteuerung des Netzwerkanalysators sowie die notwendige Verarbeitung der ausgegebenen Admittanzdaten wurden von SCHEUFELE [51] in die bestehende Software implementiert.

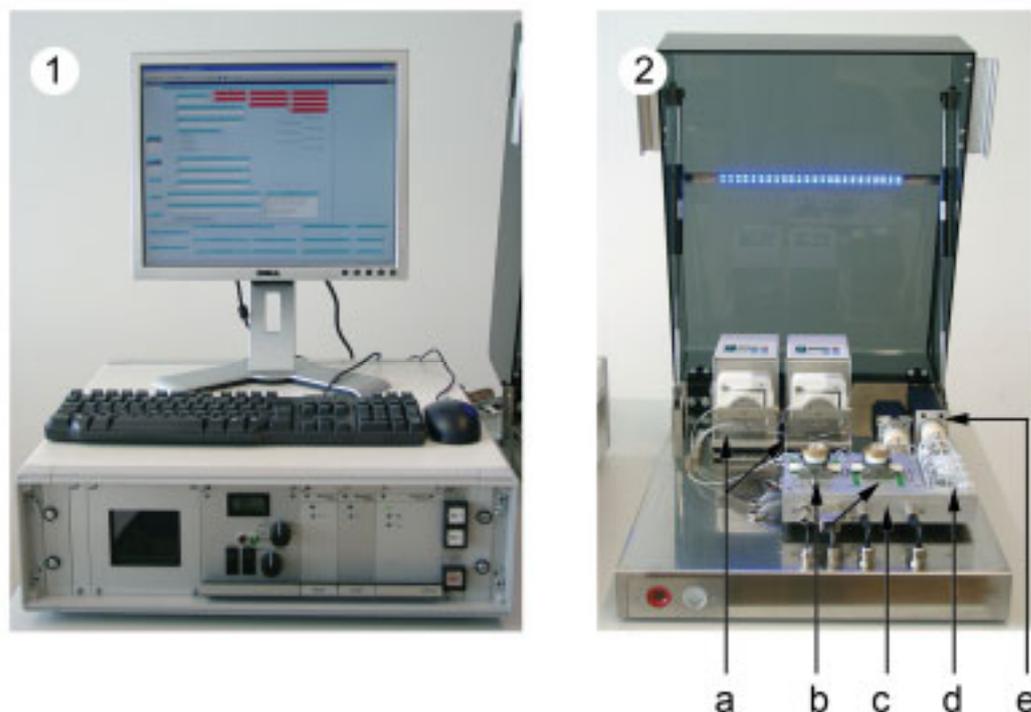


Abbildung 26: Schwingquarz-Plattform *FidgeType FgT1* mit Steuereinheit (1) und Sensorplattform (2) inklusive Pumpen (a), zwei Messkammern (b), thermostatisiertem Sensorblock (c), Aussparungen für Probengefäße (d) sowie zwei Mehrwegeventilen (e) [150].

Die vollständig über die Software ansteuerbare FIA ermöglicht die Durchführung vollautomatischer Messungen mit präziser Angabe der Probenabfolge, der Fließgeschwindigkeiten sowie der zu injizierenden Probenvolumina. Diese Möglichkeit wurde für die Messungen zur Proteinresistenz der hydrophilen Polyethylenglykol(PEG)-Beschichtungen wahrgenommen (vgl. Kapitel 4.1).

Für die Messungen zur Thrombozytenfunktion, Gerinnung und Hyperfibrinolyse war die Verwendung der gesamten FIA inklusive Probenschleife und Ventilen aus zweierlei Gründen nicht sinnvoll: Erstens musste die Probe nach dem Mischen mit dem jeweiligen Aktivator innerhalb weniger Sekunden auf den Sensor transferiert werden und zweitens wären sowohl die gesamten Schlauchleitungen als auch die Ventile durch die abgelaufene Gerinnung verstopft. Stattdessen wurde ein 10 cm kurzer Teflonschlauch als direkte Zuleitung zur Messkammer verwendet, welcher nach beendeter Messung leicht abgeschraubt und gereinigt werden konnte (Abbildung 27).

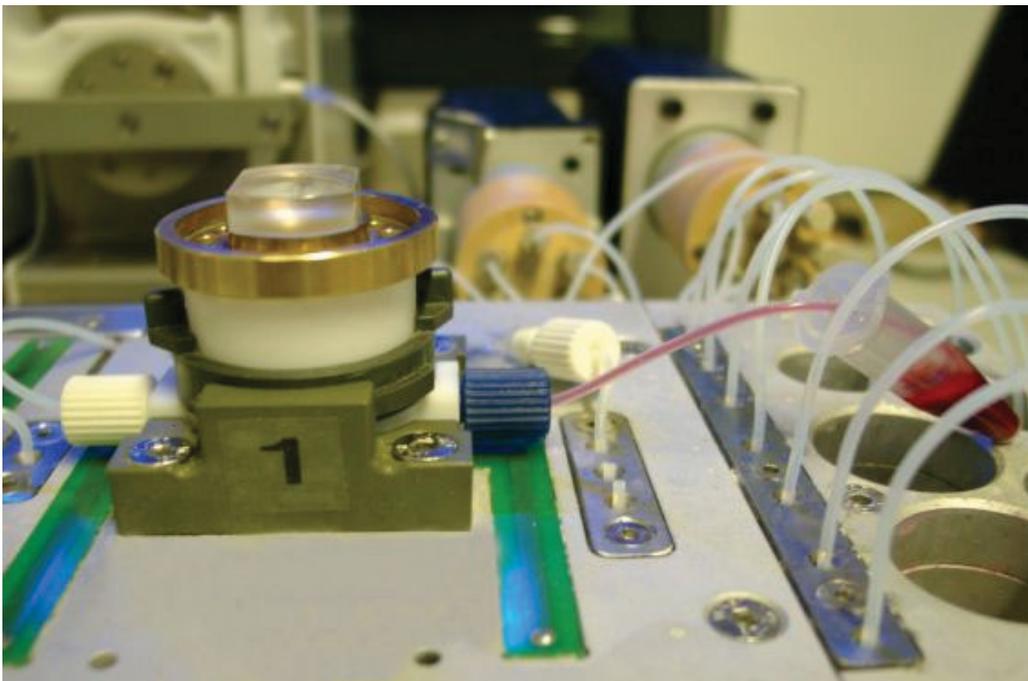


Abbildung 27: Messkammer mit Injektionsschlauch und Probengefäß. Aufbau zum schnellen Transfer der Probe auf den Sensor.

3.2 Oberflächenmodifizierung der Schwingquarzsensoren

3.2.1 Reinigung und oxidative Aktivierung der Sensoroberfläche

Zur Reinigung und Entfettung wurden die Schwingquarze 1 Minute in Aceton getaucht, anschließend mit bidestilliertem Wasser gründlich gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. In einem zweiten Reinigungsschritt wurden die Schwingquarze 1 Minute in einer frisch hergestellten „Piranha“-Lösung bei 70 °C behandelt und somit die Goldoberflächen hydrophilisiert. Im Anschluss wurden die Sensoren wieder gründlich mit bidestilliertem

Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die so gereinigten und aktivierten Schwingquarze wurden zügig weiterverarbeitet. Sensoren ohne weitere Beschichtung wurden in die in Kapitel 3.1.3 vorgestellte Schwingquarzhalterung eingeklebt.

3.2.2 Präparation hydrophiler Polyethylenglykol-Beschichtungen

Lineare Polyethylenglykole. Die Beschichtung der Goldelektroden der Schwingquarze erfolgte durch Verwendung mercaptofunktionalisierter, linearer Polyethylenglykole (PEG). Da für diese Beschichtung Ethanol als Lösungsmittel verwendet wurde, konnten die Schwingquarzsensoren vor der Beschichtung nicht in die Halterung eingeklebt werden. Als weiteres Problem stellte sich heraus, dass sich bei bereits mit PEG beschichteten Sensoren die Klebefolie anschließend zwar aufkleben ließ, sie sich bei Kontakt mit wässrigen Medien jedoch sofort wieder ablöste. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung einer Vorrichtung für die Beschichtung gelöst (Abbildung 28).

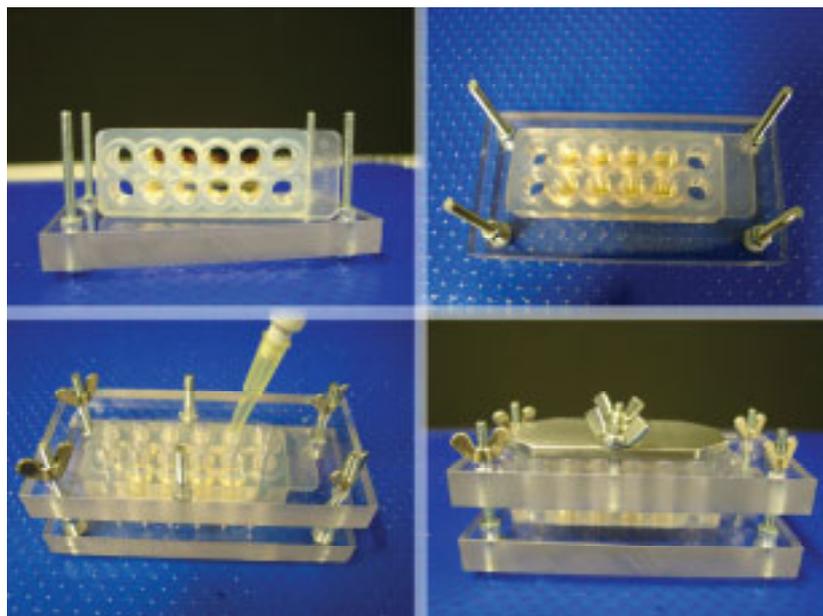


Abbildung 28: Vorrichtung für die Beschichtung von Schwingquarzen aus organischen Lösungsmitteln, bestehend aus FlexiPERM und Einspannvorrichtung sowie silikonbeschichtetem Deckel.

Dabei werden die Schwingquarze an der adhäsiven Unterseite eines wieder verwertbaren Zellkultureinsatzes aus Silicon (*FlexiPERM micro 12*, Greiner Bio-One, Frickenhausen/D) befestigt und in eine Haltevorrichtung gespannt. In die Kavitäten des Zellkultureinsatzes mit

einem Durchmesser von 6 mm wird die gewünschte Lösung eingefüllt und die Kavitäten durch einen silikonbeschichteten Deckel gut verschlossen.

Dadurch ist eine Beschichtung der Schwingquarze unter Verwendung organischer Lösungsmittel möglich. Aufgrund des um 2 mm geringeren Durchmessers der Kavitäten im Vergleich zum Durchmesser der Schwingquarze steht auch nach der Beschichtung ein nicht modifizierter Rand zum Einkleben des Sensors in die Schwingquarzhalterung zur Verfügung.

Zur Beschichtung wurden die gereinigten Schwingquarze in das Beschichtungs-Tool eingespannt und mit je 50 μl der entsprechenden PEG-Lösung (vgl. Tabelle 3) bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert.

Tabelle 3: Konzentrationen und Lösungsmittel der PEG-Lösungen

Polyethylenglykol	Konzentration	Lösungsmittel
SH-EG6-OH	2 mM	Ethanol
SH-PEG-OH-3000	2 mM	Ethanol
SH-PEG-OMe-2000	2 mM	Ethanol

Anschließend wurden die Sensoren aus dem Beschichtungs-Tool entnommen, gründlich mit Ethanol und bidestilliertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom trocken geblasen und dann in die Schwingquarzhalterung eingeklebt.

Sternförmiges Polyethylenglykol - StarPEG. Die gereinigten Schwingquarze wurden mit 50 μl einer 10 mM wässrigen Cystaminhydrochlorid-Lösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Quarze gründlich mit bidestilliertem Wasser abgespült und die Aminofunktionen des Cystamins mit 50 μl einer 0,5 M NaHCO_3 -Lösung deprotoniert. Danach wurden die Quarze wiederum mit bidestilliertem Wasser abgespült, mit Stickstoff getrocknet, in die Quarzhalterung eingeklebt und auf dem Spin-Coater befestigt. 5 μl einer StarPEG-Stammlösung (100 mg/ml in wasserfreiem THF) wurden mit 45 μl bidestilliertem Wasser gemischt und somit die Polymerisation des StarPEGs eingeleitet. Nach 5 Minuten wurden 40 μl der anpolymerisierten StarPEG-Lösung auf einen Cystamin-beschichteten Schwingquarz mittels Spin-Coating für 45 Sekunden bei 2500 U/min aufgeschleudert. Die so beschichteten Schwingquarze wurden mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur bis zur vollständig abgelaufenen Polymerisation gelagert.

3.2.3 Präparation hydrophober Kunststoffbeschichtungen

Dünne Schichten der hydrophoben Polymere Polyethylen (PE) und Polystyrol (PS) wurden auf den gereinigten Sensoren mittels Spin-Coating erzeugt. Die gewählten Parameter für die jeweilige Beschichtung sind in Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Parameter der hergestellten hydrophoben Kunststoffschichten

Polymer	Konzentration	Lösungsmittel	Volumen	Rotationsgeschw.	Zeit
Polyethylen	1 % m/m	Decalin	20 μ l	3000 U/min	180 s
Polystyrol	2 mg/ml	Toluol	20 μ l	3000 U/min	120 s

Nach dem Spin-Coating werden die beschichteten Schwingquarzsensoren in die Quarzhalterung eingeklebt. Die PE-beschichteten Schwingquarze wurden direkt vor der Messung mit 50 μ l Citrat-Vollblut des jeweiligen Spenders für 10 Minuten vorinkubiert, dann zuerst mit TRIS/NaCl-Puffer und abschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

3.2.4 Kovalente Immobilisierung von Fibrinogen

Zur Immobilisierung von Mercaptoundecansäure (MUA) wurden im Beschichtungs-Tool je 200 μ l einer frisch hergestellten MUA-Lösung (5 mM in Ethanol) auf die Schwingquarze aufgebracht. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Quarze ausgiebig mit bidestilliertem Wasser und Ethanol gespült, getrocknet und in die Quarzhalterung montiert. Zur Aktivierung der carboxyfunktionalisierten Oberfläche wurde eine frisch hergestellte 100 mM EDC-Lösung in PBS in gleichen Volumenanteilen mit einer ebenso frisch hergestellten 50 mM Sulfo-NHS-Lösung kurz gemischt und anschließend unverzüglich je 80 μ l auf die Schwingquarzsensoren pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wurden die Sensoren mit PBS-Puffer gespült. Zur kovalenten Immobilisierung von Fibrinogen wurden nun die aktivierten Oberflächen mit je 40 μ l einer Fibrinogenlösung der Konzentration 500 μ g/ml (in PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Schwingquarze für 15 Minuten mit TRIS/NaCl-Puffer bedeckt, um noch nicht abreagierte funktionelle Gruppen mit TRIS abreagieren zu lassen. Abschließend wurden die fertig beschichteten Sensoren mit bidestilliertem Wasser gespült und unter Stickstoff getrocknet.

3.2.5 Fluoreszenz-Markierung aktivierter Thrombozyten auf dem Schwingquarz

Im Anschluss an die Messungen zur Thrombozytenaggregation wurden die Schwingquarzsensoren aus der Anlage ausgebaut und vorsichtig mit Tris/NaCl-Puffer die nicht angebondenen Thrombozyten abgespült. Nach Fixierung der Quarze für 30 Minuten in Mikrotiterplatten mit 4%-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung in PBS bei pH 7,2 wurden die fixierten Quarze ausgiebig mit Waschpuffer gespült und eventuell nicht abreagierte Aldehydgruppen mit Glycin-Lösung (500 mM in Waschpuffer) 30 Minuten lang zur Reaktion gebracht. Anschließend an einen weiteren Waschschrift mit Waschpuffer erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen ein Inkubationsschritt mit Blockierungslösung für eine Stunde bei 37° C. Nach einem weiteren Waschschrift waren die Sensoren für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet.

Als Aktivierungsmarker für aktivierte Thrombozyten wurde der Rezeptor CD41 (=GP IIb/IIIa) gewählt.

Der Nachweis der CD41-Rezeptoren erfolgte mittels Primär- und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Dazu wurden die Proben mit dem in LowCross Puffer 1:100 verdünntem Primärantikörper anti-CD41 eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit fluoreszenzmarkiertem anti-Maus IgG als Sekundärantikörper für ebenfalls eine Stunde bei 37 °C. Abschließend wurden die Proben vorsichtig mit Waschpuffer gespült und in Mikroskopier-Einschlussmittel eingebettet.

3.2.6 Präparation der Schwingquarzoberflächen für REM-Aufnahmen

Zur Vorbereitung der Proben für REM-Aufnahmen nach beendeter Thrombozytenfunktions-Messung wurden die Quarze vorsichtig aus der Messkammer ausgebaut und vorsichtig mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurden die Proben mit 2%-iger Glutardialdehyd-Lösung (in PBS) eine Stunde lang fixiert, wobei nach 30 Minuten die Glutaraldehydlösung erneuert wurde. Die Entwässerung der fixierten Proben erfolgte durch Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, abs. Ethanol) für je 15 Minuten. Bis zur Durchführung der Critical-Point-Trocknung wurden die Proben in absolutem Ethanol gelagert.

4 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurden in humanen Blutproben hämostaseologische Tests mittels Schwingquarzen entwickelt. Dabei wurde der Nachweis erbracht, dass sich mittels Schwingquarzen Gerinnungszeiten bestimmen und fibrinolytische Prozesse verfolgen lassen. Darüber hinaus wurden geeignete Oberflächenbeschichtungen zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion anhand ihrer Aggregations- bzw. Adhäsionsfähigkeit entwickelt. Diese Nachweise bezüglich Gerinnung, Hyperfibrinolyse und Thrombozytenfunktion konnten auch in der im Rahmen des Projektes entwickelten mikrofluidischen Plattform erfolgreich durchgeführt werden.

In Kapitel 4.1 werden die Ergebnisse protein- und zellabweisender Sensorbeschichtungen gezeigt und im Anschluss in Kapitel 4.2 die Ergebnisse der durchgeführten Gerinnungsmessungen vorgestellt. In Kapitel 4.3 folgen die Resultate der Hyperfibrinolyse-Untersuchungen mittels Schwingquarzen und in Kapitel 4.4 die Ergebnisse der Analyse der Thrombozytenfunktion. Schließlich wird in Kapitel 4.5 der von den Projektpartnern entwickelte mikrofluidische Chip und die damit durchgeführten Messungen vorgestellt.

4.1 Protein- und zellresistente Beschichtungen zur Gerinnungsuntersuchung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die bei der Blutgerinnung stattfindende Viskositätsänderung isoliert von störenden Einflüssen nachgewiesen werden. Als Störparameter sind dabei unspezifische Anlagerungen von Proteinen oder Zellen aus humanem Vollblut an die Sensoroberfläche zu betrachten. Diese unspezifischen Bindungen führen ebenso wie die beim Gerinnungsprozess beobachtbare Viskositätszunahme zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz des Schwingquarzensensors und somit zu einer Verfälschung des Sensorsignals. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche PEG-basierte Beschichtungen auf ihre protein- bzw. zellabweisenden Eigenschaften hin getestet und charakterisiert.

4.1.1 Vergleich der Proteinresistenz PEG-basierter Beschichtungen mittels Schwingquarzen

Als biologisches Testmaterial wurde zur Untersuchung der Beschichtungen auf ihre proteinresistenten Eigenschaften der in Kapitel 3.1.2 beschriebene Plasma- bzw. Serum-Pool verwendet. Der Einfluss des nur im Plasma noch vorhandenen Proteins Fibrinogen auf das Sensorsignal bei der Proteinadsorption wurde durch Vergleichsmessungen von Plasma- und Serumproben untersucht. Um reproduzierbare Bedingungen bei der Durchführung der Messungen zu gewährleisten, wurde die Messplattform auf 25 °C thermostatisiert und eine Ablaufsequenz definiert, die von dem Messgerät FidgeType automatisiert abgearbeitet wurde (Abbildung 29).

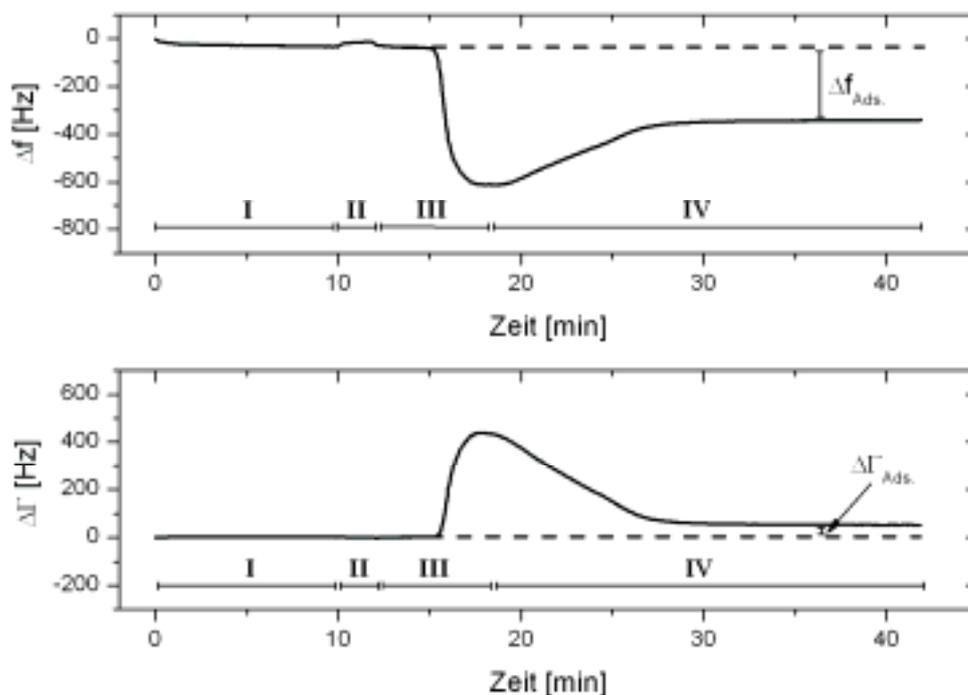


Abbildung 29: Beispielhafte, mit dem Netzwerkanalysator aufgenommene Messkurve mit Frequenz- und Dämpfungsverlauf bei unspezifischer Proteinanlagerung. Die Messsequenz setzt sich zusammen aus Aufnahme der Basislinie (I), Aufziehen der Probe in die Probenschleife (II), Injektionsphase der Probe auf den Sensor (III) und abschließendem Spülen (IV).

Durch einen 10-minütigen Spülschritt mit TRIS/NaCl-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min wurde eine vollständige Hydratation der PEG-Beschichtungen sowie die Aufnahme der Basislinie gewährleistet. Anschließend an das Aufziehen der Probe in die Probenschleife, bei dem der kontinuierliche Pufferfluss über den Sensor aus programmiertechnischen Gründen kurz gestoppt werden muss, wurde die Probe mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,1 ml/min in die Messkammer injiziert.

Anhand eines anschließenden Spülschrittes mit gleichbleibender Strömungsgeschwindigkeit wurde nicht adsorbiertes Probenmaterial aus der Messkammer entfernt. Abbildung 29 zeigt exemplarisch den mittels Netzwerkanalysator aufgezeichneten Frequenz- und Dämpfungsverlauf bei unspezifischer Proteinadsorption sowie die einzelnen Phasen (I-IV) der Messequenz. Die resultierende Differenz des Sensorsignals vor Injektion der Probe und nach abgeschlossenem Spülschritt wird als Indikator für die Menge an adsorbierten Proteinen herangezogen und mit $\Delta f_{\text{Ads.}}$ für die Frequenz und $\Delta \Gamma_{\text{Ads.}}$ für die Dämpfung bezeichnet.

Als Beschichtungen wurden neben thiolmodifizierten Polyethylenglykolen (SH-PEG-OMe-2000, SH-PEG-OH-3000) auch das zur Familie der Oligoethylenglykol-terminierten Alkanthiole gehörende SH-EG₆-OH sowie das in Kapitel 2.2.4 vorgestellte StarPEG getestet. Als Referenz diente die unbeschichtete Goldoberfläche der Schwingquarzelektroden.

Die Ergebnisse der Proteinresistenz-Analyse mittels Schwingquarzen sind in Abbildung 30 wiedergegeben. Eine erhöhte Proteinadsorption führt dabei sowohl zu einer stärkeren Frequenzabnahme als auch zu einer höheren Dämpfungszunahme. Die Beobachtung, dass die Dämpfungswerte nicht unabhängig von der Menge an adsorbierten Proteinen sind, zeigt, dass bei der Proteinanlagerung an Fremdoberflächen keine festen, rigiden Schichten, sondern viskoelastische Schichten entstehen. Die viskoelastischen Eigenschaften sind dabei auch auf die Einlagerung von Wasser in die entstehenden Schichten zurückzuführen. Bezüglich der Proteinresistenz zeigten sowohl mit SH-PEG-OH-3000 als auch mit SH-EG₆-OH beschichtete Oberflächen bei Verwendung von plättchenarmem Plasma (PPP) sowie bei Verwendung von Serum als Probenmaterial keine signifikant geringere Frequenzänderung als die frisch gereinigten, unbeschichteten Sensoroberflächen. Diese Oberflächen waren somit für die in dieser Dissertation angestrebten Gerinnungsmessungen nicht geeignet. An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass die als Referenz verwendeten Goldoberflächen durch die kurz vor der Messung erfolgte Reinigung mit Piranha-Lösung stark hydrophilisiert wurden und somit bereits gewisse proteinresistente Eigenschaften aufweisen. Die Beschichtungen der

Sensoroberflächen mit SH-PEG-OMe-2000 bzw. StarPEG zeigten jedoch sehr gute proteinabweisende Eigenschaften. Auch bei diesen Beschichtungen war im resultierenden Sensorsignal kein signifikanter Unterschied zwischen Plasma und Serum als Probenmaterial zu erkennen. Somit wurde die resultierende Signaländerung durch die Adsorption anderer Proteine als Fibrinogen hervorgerufen.

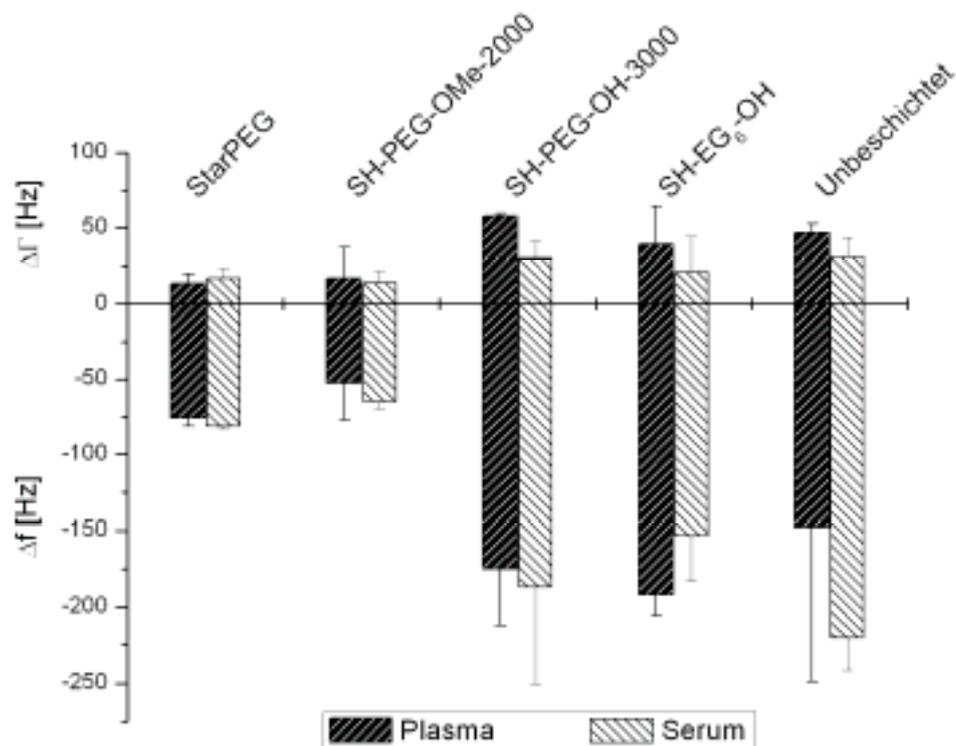


Abbildung 30: Frequenz- und Dämpfungsänderungen unterschiedlich beschichteter Schwingquarzoberflächen nach Inkubation mit Plasma bzw. Serum.

Trotz der minimal schlechteren Proteinresistenz gegenüber Beschichtungen mit SH-PEG-OMe-2000 wurden in dieser Dissertation StarPEG-Oberflächen favorisiert, da sie aufgrund ihrer einfach durchzuführenden chemischen Modifizierbarkeit und der damit verbundenen Möglichkeit spezifische Fängermoleküle anzubinden, prinzipiell flexibler und vielfältiger anwendbar sind (vgl. Kapitel 2.2.4).

4.1.2 Charakterisierung von StarPEG-Oberflächen mittels AFM und REM

Aufgrund ihrer sehr guten Eigenschaften bezüglich Proteinadsorption wurden die StarPEG-Oberflächen bezüglich ihrer Homogenität und Oberflächentopographie mittels AFM (Kontakt-Modus) und REM charakterisiert. Als Vergleich diente dabei die unbeschichtete Goldoberfläche der Schwingquarzelektroden.

Sowohl die REM-Bilder als auch die AFM-Aufnahmen zeigen dabei für StarPEG eine sehr homogene Oberfläche. Anhand der AFM-Daten wurde der RMS-Wert für $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ der StarPEG-Oberfläche zu $1,28 \pm 0,03 \text{ nm}$ bestimmt. In der Literatur finden sich Angaben für die RMS-Werte von 0,8 - 2,6 nm [151]. Von kleineren Verunreinigungen abgesehen stellen sich auch die unbeschichteten Goldoberflächen der Schwingquarzelektroden als sehr homogen heraus. Für die unbeschichteten Goldoberflächen der in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarzoberflächen wurde als RMS-Wert 1,33 ermittelt [4;48]. Die fast identischen RMS-Werte der Gold- und StarPEG-Oberfläche werfen die Frage auf, ob die StarPEG-Oberfläche bei den im Kontaktmodus durchgeführten AFM-Messungen abgekratzt wurde und somit die Goldoberfläche abgebildet wurde. Dies müsste durch erneute Messungen im Tapping-Modus überprüft werden.

Die REM-Aufnahmen zeigen im Falle der StarPEG-Beschichtung kleinere Krater von maximal $3 \mu\text{m}$ Durchmesser, die auf die hohe Viskosität des Polymers beim Spin-Coating-Prozess und auf so genannte Entnetzungs-Vorgänge zurückzuführen sind [74]. Für die Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten sind möglichst glatte Oberflächen wünschenswert, da es bei rauen, hydrophilen Oberflächen zum Einschluss kleinster Flüssigkeitsmengen in die Kavitäten der Oberfläche kommen kann (entrapped liquid) [20]. Diese eingeschlossenen Flüssigkeitsmengen führen zu einer nicht erwünschten Frequenzänderung. Bei den für die StarPEG- und die reine Gold-Oberfläche ermittelten RMS-Werten kann der Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf das Verhalten des Schwingquarzsensors jedoch vernachlässigt werden [4].

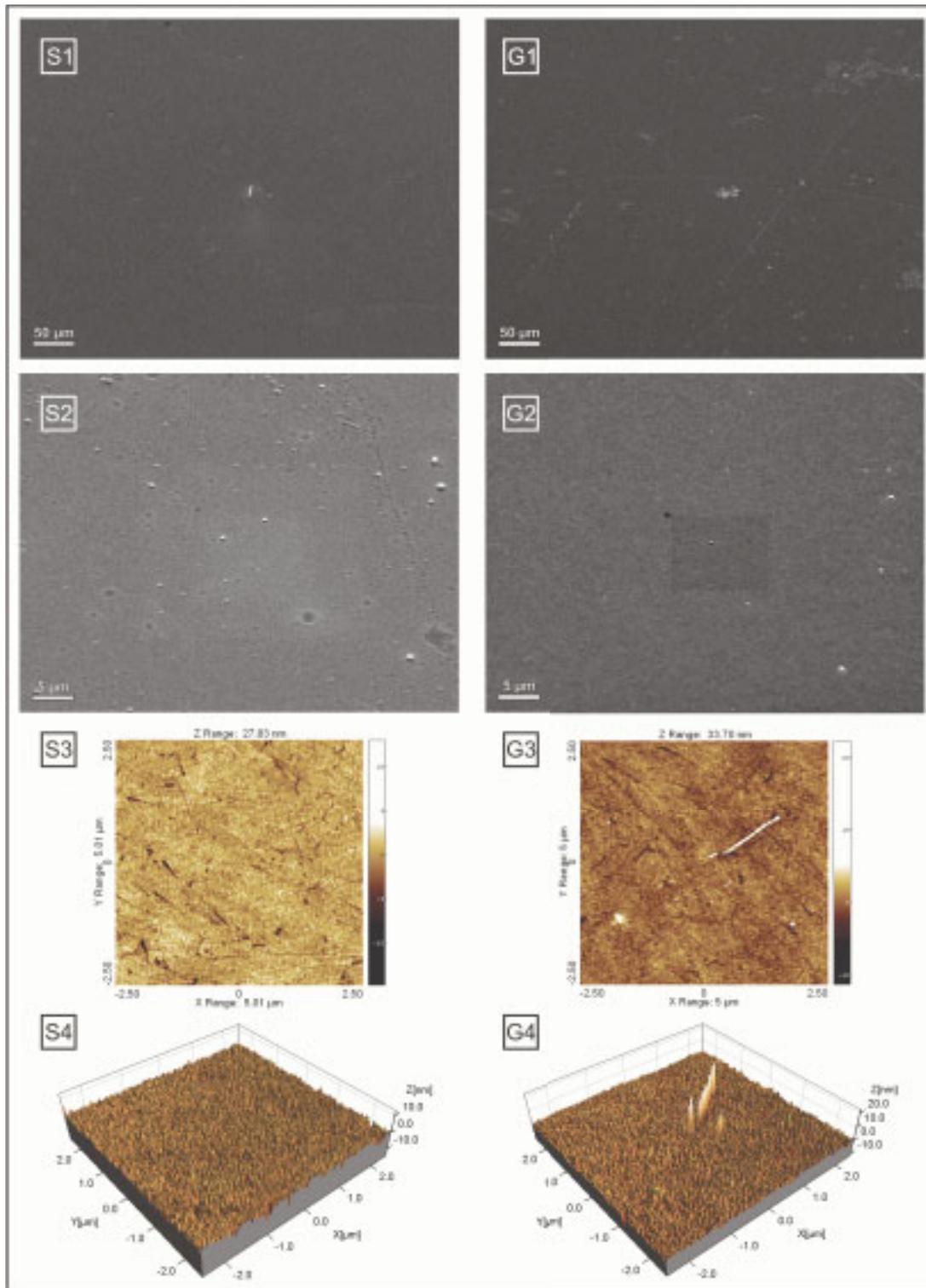


Abbildung 31: REM-Aufnahmen (S1, S2) und AFM-Aufnahmen (S3, S4) von StarPEG beschichteten Schwingquarzen im Vergleich zu REM- (G1, G2) und AFM-Aufnahmen (G3, G4) unbeschichteter Schwingquarzoberflächen.

4.1.3 Charakterisierung der Thrombozyten-Resistenz von StarPEG-Oberflächen mittels REM

Optimale Oberflächen zur isolierten Betrachtung der bei der Gerinnung stattfindenden Viskositätszunahme sollten neben sehr guten proteinabweisenden Eigenschaften auch zellresistente Eigenschaften besitzen. Hierbei sind vor allem die bei der Gerinnung in Vollblut aktivierten Thrombozyten zu betrachten, die sich durch eine starke Neigung zur Adhäsion an Fremdoberflächen auszeichnen.

Deshalb wurden die StarPEG-Oberflächen im Vergleich zu unbeschichteten Goldoberflächen bezüglich ihrer Thrombozytenresistenz mittels rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert.

Zur Untersuchung auf ihre Thrombozytenresistenz wurden die Schwingquarze in Wells von Suspensions-Zellkulturplatten gelegt und für 30 Minuten bei 37 °C mit je 1,5 ml heparinisierendem (3 IU/ml) plättchenreichem Plasma inkubiert. Anschließend wurde das PRP abgesaugt und die Schwingquarze in den Wells vorsichtig dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Vorbereitung der Proben für die REM-Aufnahmen wurden die Quarze mit 2%-iger Glutaraldehyd-Lösung (in PBS) eine Stunde lang fixiert, wobei nach 30 Minuten die Glutaraldehydlösung erneuert wurde. Die Entwässerung der fixierten Proben erfolgte durch Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, abs. Ethanol) für je 15 Minuten. Bis zur Durchführung der Critical-Point-Trocknung wurden die Proben in absolutem Ethanol gelagert.

Die REM-Ergebnisse der Thrombozyten-Tests auf beiden Oberflächen sind in Abbildung 32 dargestellt. Bei 200-facher Vergrößerung (Abbildung 32, S5 und G5) ist bei der StarPEG-Beschichtung eine deutlich geringere Oberflächenbedeckung mit Thrombozyten als im Fall der Goldoberfläche zu erkennen. Während man auf der StarPEG-Oberfläche nur vereinzelt kleinere Ansammlungen von Thrombozyten findet, sind auf der Goldoberfläche nur wenige freie Stellen zu erkennen, sie ist gleichmäßig und fast vollständig mit adhärenen Thrombozyten besetzt.

Durch Betrachtung mit 2000-facher Vergrößerung (Abbildung 32, S6 und G6) lassen sich weitere Unterschiede erkennen. Die Thrombozyten auf der StarPEG-Oberfläche besitzen noch ihre kugelförmige Gestalt und haben nur vereinzelt Pseudopodien ausgebildet. Weshalb sich die Thrombozyten auf der StarPEG-Oberfläche nur an vereinzelt Stellen als kleinere Inseln

befinden, lässt sich folgendermaßen erklären: Findet ein Thrombozyt eine Stelle, an die er adhären kann, wie zum Beispiel eine defekte Stelle in der Beschichtung, so wird er aktiviert und wird gleichzeitig zum Ankerpunkt für weitere Thrombozyten.

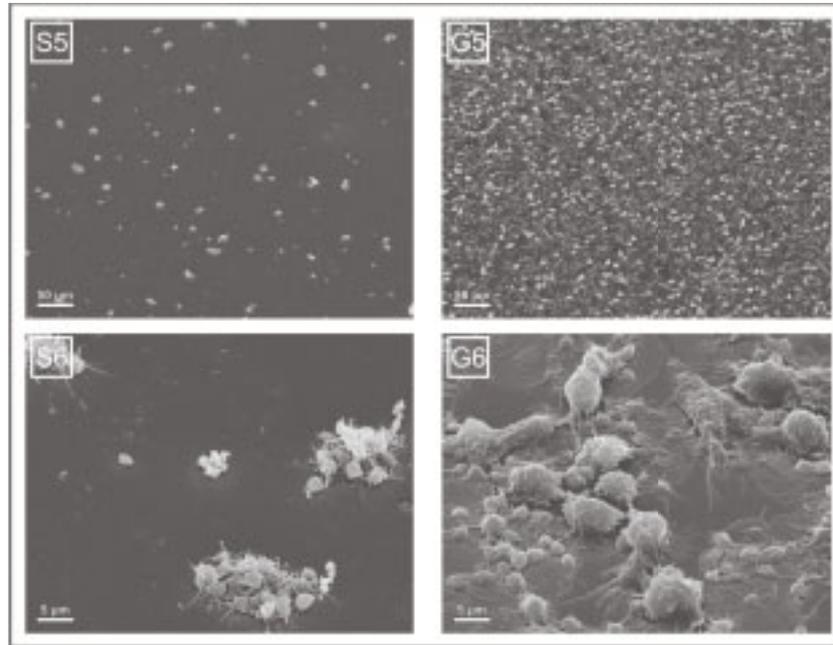


Abbildung 32: REM-Aufnahmen adhärenter Thrombozyten auf StarPEG-beschichteten Schwingquarzoberflächen (S5, S6) im Vergleich zu unbeschichteten Goldelektroden (G5, G6) der Schwingquarzsensoren.

Im Gegensatz zur StarPEG-Oberfläche sind auf der Goldoberfläche kaum Stellen, die nicht mit Thrombozyten besetzt sind, zu finden. Ebenso haben die meisten Thrombozyten ihre ursprünglich runde Gestalt verloren und haben einen deutlichen Gestaltswandel vollzogen und Pseudopodien ausgebildet. Sie sind nach vollzogenem Spreading als flache Scheiben auf der Oberfläche erkennbar. Zudem findet man enorme Thrombozytenaggregate, die sich durch das Anheften an bereits adhärenente Zellen ausbilden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die entwickelte StarPEG-Beschichtung neben guten proteinabweisenden auch sehr gute Thrombozyten abweisende Eigenschaften aufweist.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand von Schwingquarz-Messungen wurden die proteinabweisenden Eigenschaften unterschiedlicher PEG-basierter Beschichtungen untersucht. Dabei konnten nur das linear aufgebaute SH-PEG-OMe-2000 sowie das aus sternförmigen Monomeren bestehende StarPEG mit Frequenzänderungen von $\Delta f \leq -100 \text{ Hz}$ überzeugen. Zur kovalenten Immobilisierung von StarPEG an Goldoberflächen konnte das in Kapitel 3.2.2 beschriebene Beschichtungskonzept entwickelt werden. Als Konsequenz seiner chemisch flexibel modifizierbaren Oberfläche, auch im Hinblick auf weitere Anwendungen, wurde die StarPEG-Oberfläche favorisiert und eingehender betrachtet.

Schichtcharakterisierungen mittels AFM bzw. REM zeigen bei den StarPEG-Oberflächen eine sehr homogene Oberflächentopographie mit nur vereinzelt Löchern, die auf einen minimal auftretenden Entnetzungsprozess hindeuten.

StarPEG-Oberflächen zeichnen sich neben ihren proteinabweisenden Eigenschaften auch durch einen sehr guten zellabweisenden Effekt aus. An eine StarPEG-beschichtete Sensoroberfläche adhären deutlich weniger Thrombozyten als an einer nicht-modifizierten Goldoberfläche der Schwingquarzelektrode.

4.2 Gerinnungsuntersuchungen in Vollblut mit Schwingquarzsensoren

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Gerinnungsuntersuchungen mittels Schwingquarzen in humanem Vollblut vorgestellt, die in enger und konstruktiver Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Stefan Sinn (AG Wendel, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) sowie Petra Brozik entstanden. Zielsetzung war dabei anhand der Sensorsignale Gerinnungszeiten zu bestimmen und diese mit der medizinisch-klinischen Routinemethode der Koagulometrie zu korrelieren. Dazu wurden auf entsprechend beschichteten Sensoroberflächen Quick-Tests durchgeführt. Wie in Kapitel 2.4.2 erläutert, stellt die Gerinnungszeitbestimmung nach Quick (Quick-Test oder Thromboplastinzeit, TPZ) einen bedeutenden Globaltest zur Beurteilung der Gerinnungsfähigkeit der Blutprobe dar. Dabei wird dieser Test in der klinischen Routine mit plättchenarmem Plasma durchgeführt. Der notwendige Zentrifugationsschritt zur Herstellung

des Plasmas ist für die Zielsetzung einer schnellen und „Point-of-care“-tauglichen Durchführung nur beschränkt tolerierbar. Aus diesem Grund wurde für diese Anwendung der Quick-Test direkt in humanem Vollblut durchgeführt. Um verlängerte Gerinnungszeiten zu simulieren, wurden die Quick-Tests zudem aus mit physiologischem Puffer verdünnten Vollblutproben durchgeführt. Aufgrund dieser Abwandlungen des klassischen Quick-Tests werden die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche als „modifizierter Quicktest“ bezeichnet.

4.2.1 Ablauf der Schwingquarzmessungen am Beispiel des modifizierten Quick-Tests auf StarPEG-beschichteten Schwingquarzen

Ablauf der Schwingquarzmessungen. Für die modifizierten Quick-Tests wurde humanes Vollblut von gesunden Spendern verwendet. Zur Durchführung der Messungen wurden davon mit physiologischem TRIS/NaCl-Puffer Verdünnungen im Volumenverhältnis von 1:1, 1:2, 1:3 sowie 1:4 (Blut:Puffer) hergestellt. Die verdünnten Vollblutproben wurden direkt vor Durchführung der Messung für 3 Minuten bei 37 °C temperiert. Die Gerinnungsaktivierung der Probe erfolgte sowohl für die Koagulometer- als auch für die Schwingquarzmessungen anhand des Fertigreagenzes Thromborel, welches ebenfalls mit TRIS/NaCl-Puffer in demselben Verhältnis wie die Blutprobe verdünnt wurde. Durch Zugabe von 200 µl verdünntem Thromborel zu 200 µl der entsprechend verdünnten Vollblutprobe wurde der Gerinnungsvorgang gestartet. Abbildung 33 zeigt den Signalverlauf bei der Durchführung von Gerinnungsuntersuchungen auf mittels StarPEG-beschichteten Sensoroberflächen.

Anschließend an die Aufzeichnung einer stabilen Basislinie mit TRIS/NaCl-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min (Abbildung 33, I) wurde die Pumpe für 3 Sekunden gestoppt, um der Blutprobe den Gerinnungsaktivator Thromborel zuzumischen (Zeitpunkt t_{MIX}). Die aktivierte Probe wurde dann mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min auf den Sensor transferiert (Abbildung 33, II). Sobald die Sensoroberfläche vollständig von der Blutprobe bedeckt war, wurde die Pumpe gestoppt und die Bildung des Gerinnungsclots unter Stop-Flow-Bedingungen verfolgt (Abbildung 33, III).

Um alle nicht mit der Clotbildung zusammenhängenden Prozesse ausschließen zu können, wurde eine entsprechende Kontrollmessung mit 200 µl Puffer anstatt Aktivator durchgeführt. Parallel zu den Schwingquarzmessungen wurden unter identischen Parametern

Vergleichsmessungen mittels Koagulometer durchgeführt. Um eventuell vorhandene, mit der Gerinnung in Zusammenhang stehende, charakteristische Punkte im Sensorsignal identifizieren zu können, wurde die mittels Koagulometer bestimmte Gerinnungszeit in die Messkurve des Schwingquarzes eingezeichnet. Dazu wurde zum Zeitpunkt der Gerinnungsaktivierung t_{MIX} die Gerinnungszeit des Koagulometers addiert und in der Messkurve markiert (t_{Koag}).

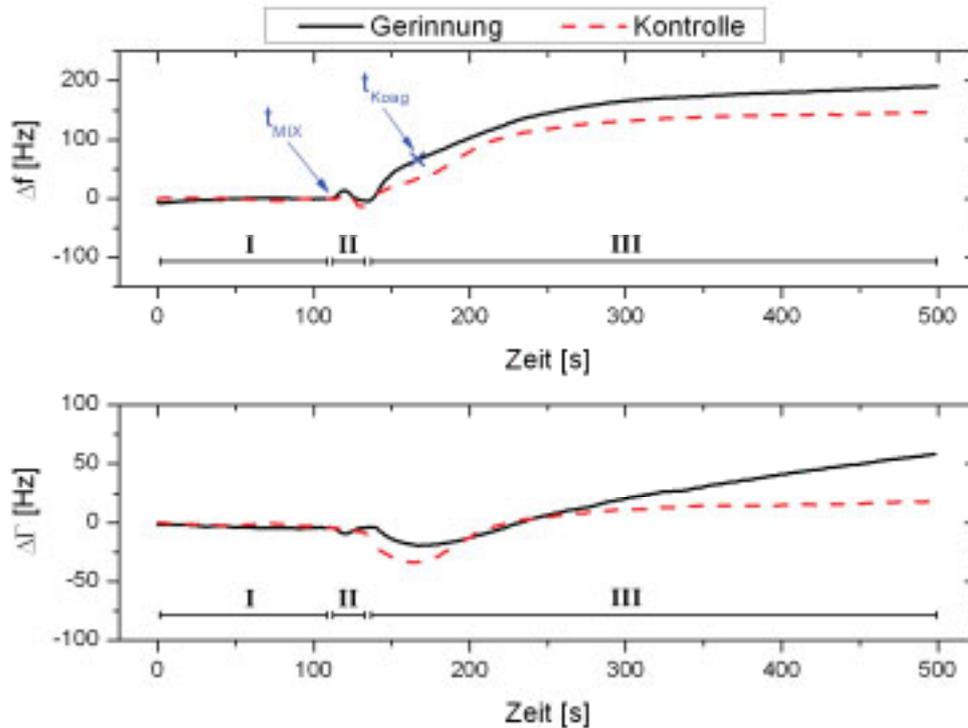


Abbildung 33: Mittels Netzwerkanalysator bestimmte zeitliche Änderung des Frequenz- und Dämpfungsverlaufs einer exemplarischen Gerinnungs- und Kontrollmessung mit StarPEG-beschichteten Schwingquarzen. Die Zeitpunkte der Gerinnungsaktivierung t_{MIX} und die korrespondierende Gerinnungszeit des Koagulometers t_{Koag} sind markiert.

Ergebnisse der modifizierten Quick-Tests mit StarPEG-beschichteten Schwingquarzen.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, wurden die protein- und zellresistenten Beschichtungen im Hinblick auf den Nachweis der bei der Blutgerinnung stattfindenden Viskositätsänderung ohne störende Einflüsse (Protein-, Zelladsorption) entwickelt. In Abbildung 33 sind exemplarisch Messkurven von modifizierten Quick-Tests auf StarPEG-Oberflächen dargestellt. Man erkennt, dass sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Gerinnungsmessung

nach Injektion der Probe ein Frequenz- und Dämpfungsanstieg resultiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Frequenzänderungen ist nicht auszumachen. Zudem ist in der Gerinnungsmessung kein charakteristischer Messpunkt zu der Zeit t_{Koag} festzustellen, zu der, laut Koagulometer, die Blutprobe bereits geronnen sein müsste. Im Anschluss an die Messungen wurde anhand des vorliegenden Gerinnungsclots deutlich, dass die Blutprobe tatsächlich geronnen war.

Ein ähnliches Sensorverhalten wie das oben beschriebene konnte bei allen Messungen mit hydrophilen, PEG-basierten Beschichtungen beobachtet werden. Dabei wurde eine Vielzahl an Parametern, wie zum Beispiel unterschiedliche Blutverdünnungen oder unterschiedliche Mischungsverhältnisse mit Thromborel, erfolglos getestet. Im Falle von StarPEG wurden zudem verschiedene Schichtdicken durch unterschiedlich konzentrierte Polymerlösungen realisiert, was jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf das Sensorverhalten zeigte.

Somit kann zusammengefasst werden, dass es mit den verwendeten hydrophilen Sensorbeschichtungen nicht möglich ist, eine ablaufende Blutgerinnung zu detektieren. Eine mögliche Begründung hierfür könnte die durch die hydrophile Beschichtung an der Sensoroberfläche auftretende Wasserschicht sein. Das entstehende Blutgerinnsel steht aufgrund der in und um die Schicht angelagerten Wassermoleküle nicht in direktem Kontakt zum Schwingquarz, sondern „schwimmt“ auf der Wasserschicht auf.

Aufgrund dessen wurden im weiteren Verlauf Polyethylen-beschichtete Schwingquarze mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften auf ihre Eignung als Gerinnungssensor hin untersucht.

4.2.2 Modifizierte Quick-Tests mit PE-beschichteten Schwingquarzen

Auf PE-beschichteten Schwingquarzsensoren wurden identisch zu dem im vorigen Kapitel geschilderten Messablauf modifizierte Quick-Tests durchgeführt. In Abbildung 34 sind exemplarisch die Signaländerungen einer Gerinnungsmessung und der entsprechenden Kontrollmessung ohne stattfindende Gerinnung auf PE-beschichteten Schwingquarzen dargestellt. Durch die veränderten Oberflächeneigenschaften der Beschichtung kann nun ein deutlich unterschiedlicher Verlauf der Sensorsignale von Kontroll- und Gerinnungsmessung beobachtet werden. Die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes steigt bei Beladung des Sensors mit nicht gerinnungsaktiviertem, verdünntem Vollblut geringfügig an. Bei der

Gerinnungsmessung konnte jedoch im Gegensatz zu den hydrophilen Beschichtungen (vgl. Abbildung 33) eine eindeutige Erniedrigung der Resonanzfrequenz beobachtet werden.

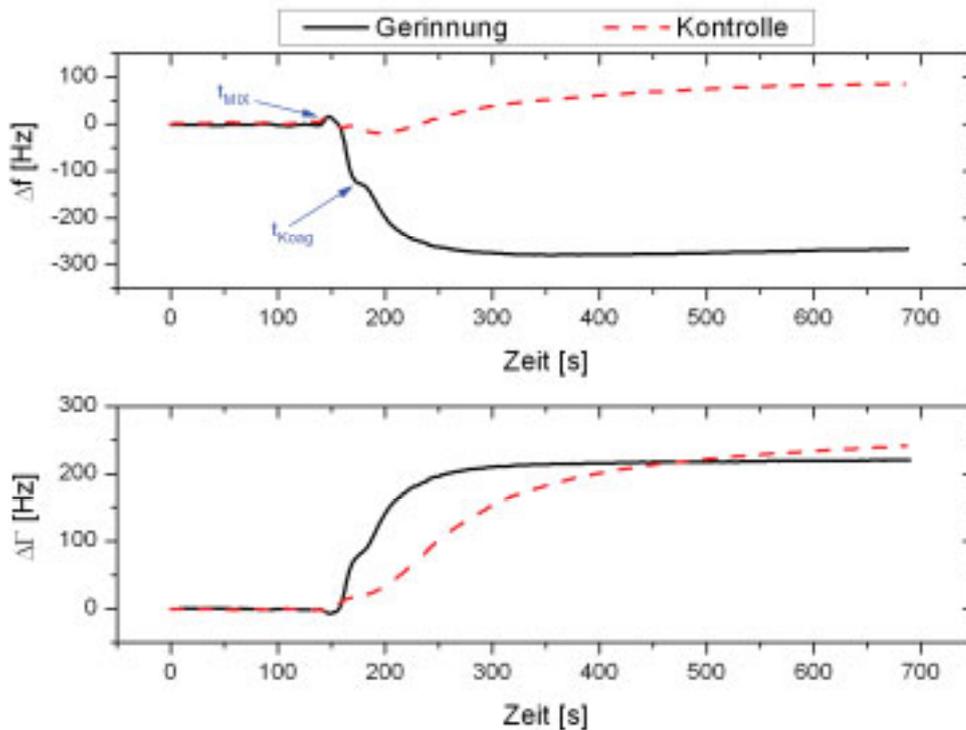


Abbildung 34: Zeitliche Änderung des Frequenz- und Dämpfungsverlaufs einer exemplarischen Gerinnungs- und Kontrollmessung mit 1:4 verdünntem Vollblut auf PE-beschichteten Schwingquarzen. Die Zeitpunkte der Gerinnungsaktivierung t_{MIX} und die korrespondierende Gerinnungszeit des Koagulometers t_{Koag} sind markiert.

Zudem ist sowohl im Frequenz- als auch im Dämpfungssignal reproduzierbar eine charakteristische Schulter zu erkennen. Wie in Abbildung 34 ersichtlich, tritt diese Signalschulter zum Zeitpunkt der mittels Koagulometer bestimmten Gerinnungszeit der Probe auf. Aufgrund dieser erfolgreichen Ergebnisse wurde eine Charakterisierung der PE-Beschichtung durchgeführt.

Charakterisierung der PE-Beschichtung mittels REM und AFM. Die PE-Oberflächen wurden mittels AFM und REM bezüglich ihrer Oberflächentopographie untersucht (Abbildung 35). Man erkennt, dass die Oberfläche nicht vollständig und homogen mit PE beschichtet ist. Die auftretenden, unbeschichteten Gebiete sind teilweise bis zu $15\ \mu\text{m}$ im Durchmesser. Das dargestellte Höhenprofil entlang der im AFM-Bild eingezeichneten Horizontalen zeigt Höhenunterschiede von $40\ \text{nm}$ zwischen unbeschichteten und PE-

beschichteten Stellen. Zudem zeichnen sich auch die mit PE beschichteten Stellen durch eine hohe Oberflächenrauigkeit aus, wie an dem Höhenprofil zu erkennen ist. Dies lässt darauf schließen, dass das Polyethylen in der zum Spin-Coating verwendeten Lösung nicht vollständig gelöst vorlag, sondern noch kleinste ungelöste Partikel enthielt. Man kann sich vorstellen, dass gerade diese Unebenheiten in der Sensorbeschichtung der Nachweisbarkeit einer stattfindenden Gerinnung zugute kommen: Eine raue, hydrophobe Sensoroberfläche bietet den bei der Blutgerinnung entstehenden Fibrinfäden eine hervorragende Möglichkeit zur direkten Anbindung an die Schwingquarzelektrode (Gold). Dies ist im Gegensatz dazu bei der hydrophilen Beschichtung mit StarPEG aufgrund dessen proteinresistenter Eigenschaften nicht möglich.

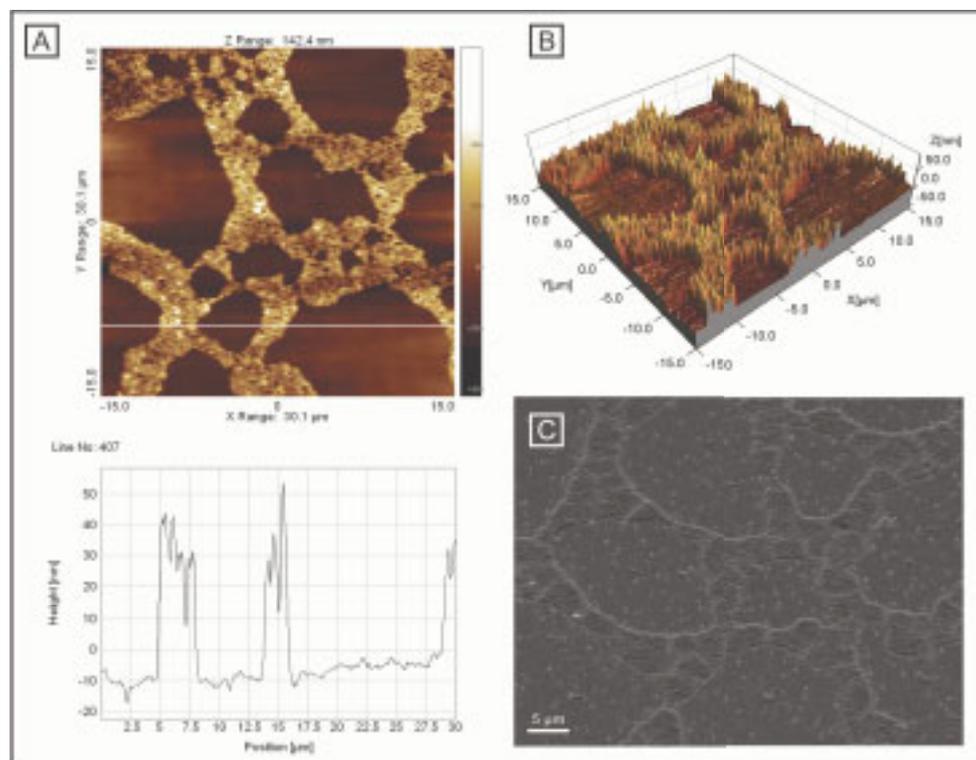


Abbildung 35: A,B: AFM-Aufnahme der PE-beschichteten Schwingquarzoberfläche im Kontakt-Modus in zweidimensionaler Darstellung mit entsprechendem Höhenprofil der eingezeichneten Horizontalen und in dreidimensionaler Darstellung. C: REM-Aufnahme der mit PE beschichteten Sensoroberfläche.

Optimierung des Sensorsignals durch Vorinkubation der Schwingquarzoberfläche. Die auf den ablaufenden Gerinnungsprozess hindeutende Schulter im Frequenzsignal der Schwingquarz-Messung (vgl. Abbildung 34) ist umso ausgeprägter, je stärker die Blutprobe verdünnt und je länger somit die Gerinnungszeit ist. Bei einer Blutverdünnung von 1:1 ist bereits keine Schulter mehr im Schwingquarzsinal zu erkennen. Eine einfache und unkomplizierte Bestimmung der Gerinnungszeit aus dem Frequenzsignal ist somit schwierig.

Wie in Kapitel 2.1.4 dargelegt, ist der Verlauf des Sensorsignals sehr stark von den sich an der Oberfläche befindlichen Schichten und deren Eigenschaften abhängig. Um das Sensorsignal der Gerinnungsmessungen derart zu beeinflussen, dass eine deutlichere Identifizierung des Gerinnungszeitpunktes möglich wird, wurde von Herrn Dr. Gehring angeregt, den PE-beschichteten Sensor vor der eigentlichen Messung mit der entsprechenden Vollblutprobe zu inkubieren [152]. Die so durch unspezifische Proteinanlagerung zusätzlich entstandene, viskoelastische Schicht führte zu einer beträchtlichen Veränderung des Sensorsignals. In Abbildung 36 sind die mittels Netzwerkanalysator bzw. Oszillatorschaltung aufgezeichneten Frequenz- und Dämpfungskurven von Gerinnungs- und Kontrollmessung auf mit Vollblut vorinkubierten PE-beschichteten Schwingquarzsensoren zu sehen.

Bei der Kontrollmessung ohne ablaufende Gerinnung wird ein exponentieller Anstieg der Frequenz um 200 Hz beobachtet, was einen um Faktor 2 höheren Anstieg als bei den nichtvorinkubierten PE-Schichten bedeutet (vgl. Abbildung 34). Bei der Gerinnungsmessung ist direkt nach Injektion der Probe auch für kurze Zeit ein Frequenzanstieg zu beobachten, der jedoch durch die fortschreitende Viskositätsänderung des Gerinnungsprozesses abrupt in eine exponentiell verlaufende Frequenzerniedrigung übergeht. Zeitgleich zum Abfall der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes steigt die Dämpfung aufgrund des Gerinnungsvorgangs exponentiell an. Wie in Abbildung 36 ersichtlich, tritt das lokale Maximum der Frequenzkurve genau zu der mittels Koagulometer bestimmten Gerinnungszeit auf. Deshalb wurde das lokale Maximum der Frequenzkurve mit $df/dt(t_0) = 0$ and $d^2f/dt^2(t_0) < 0$ als der mittels Schwingquarzen ermittelte Gerinnungszeitpunkt definiert und als t_{QCM} bezeichnet.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei den Netzwerkanalysator-Messungen lässt sich bei den mittels Oszillatorschaltung aufgezeichneten Messungen beobachten (Abbildung 36, rechts). Auch dort tritt im Frequenzsignal ein lokales Maximum auf, anhand dessen sich schnell und

ohne hohen mathematischen Aufwand die mittels Schwingquarzen gemessene Gerinnungszeit t_{QCM} ermitteln lässt.

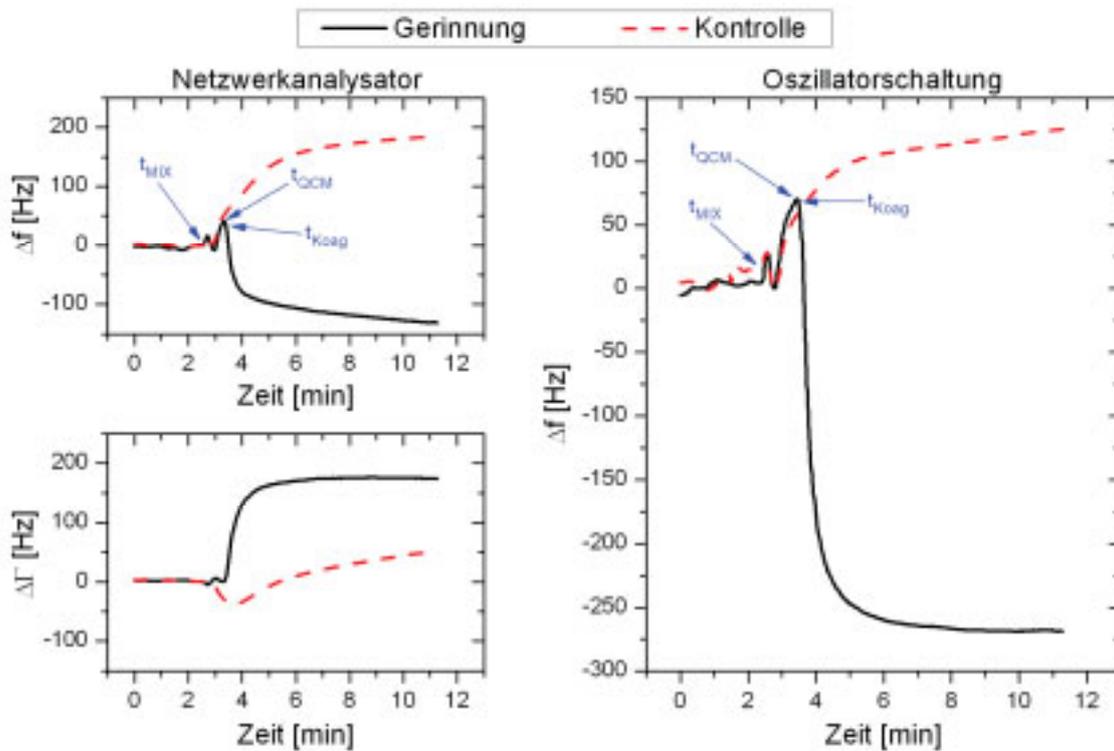


Abbildung 36: Mittels Netzwerkanalysator (links) und Oszillatorschaltung (rechts) aufgenommene Signaländerung bei Gerinnungs- und Kontrollmessung mit 1:4 verdünntem Vollblut auf vorinkubierten PE-beschichteten Schwingquarzen.

Die in Kapitel 3.2.3 beschriebene Vorinkubation des PE-beschichteten Sensors mit Vollblut resultiert in einer günstigen Modifikation des Sensorsignals, die sich anhand des folgenden Modells erklären lässt: Durch die Vorinkubation wird das Frequenzsignal derart modifiziert, dass die Frequenz ansteigt, sobald sich die aktivierte, jedoch noch nicht geronnene Probe auf dem Sensor befindet. Dieses Sensorverhalten lässt sich durch eine während des Inkubationsprozesses adsorbierte Proteinschicht nachvollziehen. Bereits in früheren Arbeiten konnte ein Frequenzanstieg beobachtet werden, wenn proteinbeschichtete Schwingquarze mit Vollblut bedeckt waren und keine Bindungsprozesse an den Sensor stattfanden [4;48]. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass während der Vorinkubation des Sensors mit Vollblut gerinnungsrelevante Proteine wie Fibrinogen oder Thrombin an die hydrophob beschichtete Sensoroberfläche gebunden haben. Somit liegt im Anschluss an die Vorinkubation eine raue PE-Oberfläche mit adsorbierten Fibrinogen-Molekülen vor, an

welche die während des Gerinnungsprozesses gebildeten Fibrinfäden binden können. Die beim Gerinnungsvorgang abrupt zunehmende Vernetzung von Fibrinogen zu Fibrinfäden und deren Anbindung an die Sensoroberfläche führt dann aufgrund der Massenzunahme und der steigenden Viskosität zu einer raschen Abnahme der bis dahin angestiegenen Resonanzfrequenz.

Die Endpunktbestimmung der beim Gerinnungsprozess aufgrund der Fibrinpolymerisation plötzlich ansteigenden Viskosität wird dabei beim Koagulometer durch Auslenkung der Kugel (vgl. Kapitel 2.4.2) und bei den Schwingquarzmessungen durch das Maximum der Frequenzkurve angezeigt. Der anschließend weiterhin zu beobachtende Frequenzabfall ist auf eine weitergehende Fibrin-Polymerisation und eine kontraktile Verdichtung des Gerinnungsclots zurückzuführen. Diese Veränderungen im Fibrinnetzwerk können aufgrund der Messmethodik mittels Koagulometer nicht verfolgt werden.

Zur Überprüfung des vorgestellten Modells ist in Abbildung 37 eine REM-Aufnahme der Schwingquarzoberfläche nach erfolgter Gerinnungsmessung zu sehen.

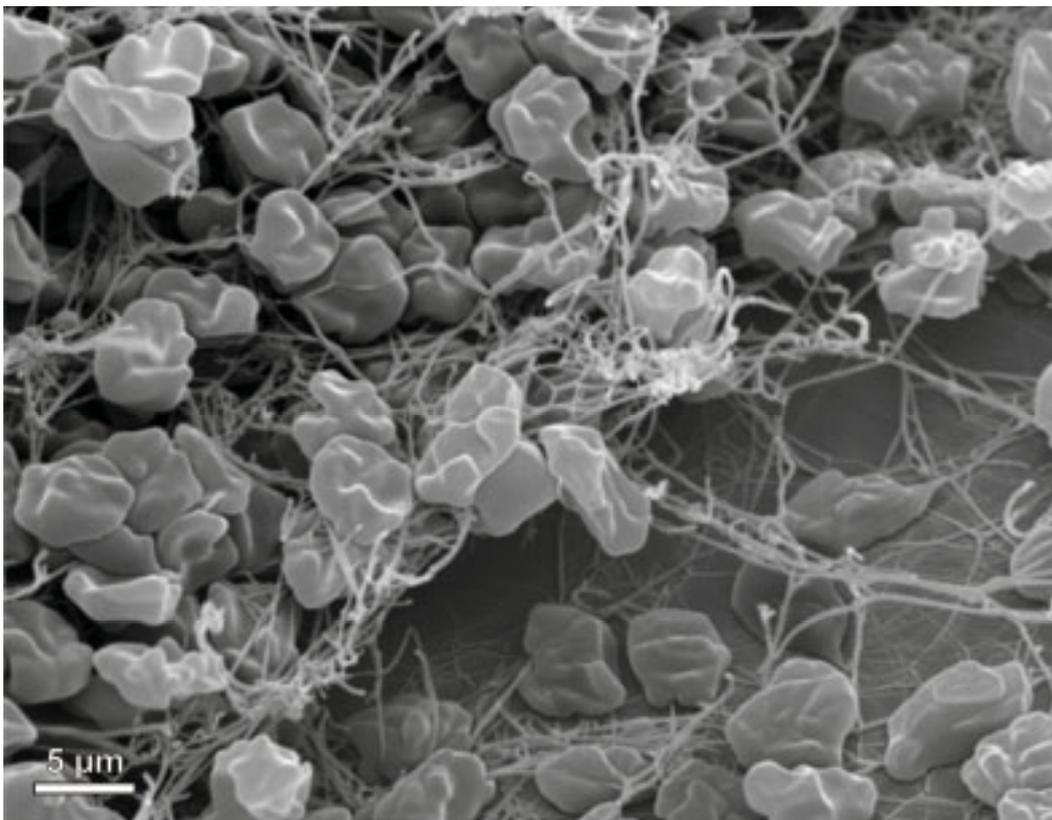


Abbildung 37: REM-Aufnahme eines Gerinnungsclots aus 1:10 verdünntem Vollblut auf einer vorinkubierten, PE-beschichteten Schwingquarzoberfläche.

Man erkennt im unteren rechten Bereich an die Schwingquarzoberfläche gebundene Fibrinfäden, die eine direkte Verbindung zwischen Gerinnungscot und Sensor herstellen. In der oberen linken Hälfte der Aufnahme ist ein von der Schwingquarzoberfläche abstehender Teil des dichten Fibringerinnsels mit eingeschlossenen, durch die Fibrinfäden stark deformierten, Erythrozyten zu erkennen.

Die REM-Aufnahme untermauert also das oben beschriebene Modell der für den Gerinnungsnachweis mittels Schwingquarzen notwendigen Anbindung von Fibrinfäden an die Sensoroberfläche. Eine endgültige Klärung der bei der Vorinkubation entscheidenden Prozesse sowie die Überprüfung des hier vorgestellten Modells zur Erklärung des Signalverlaufs sind weiterhin Gegenstand intensiver Forschung der Arbeitsgruppe.

4.2.3 Vergleich der mittels Schwingquarzen bzw. Koagulometer bestimmten Gerinnungszeiten

Durch Vorinkubation der PE-beschichteten Schwingquarzoberfläche mit Vollblut konnte anhand des Maximums der Frequenzkurve eine direkte Bestimmung der Gerinnungszeit t_{QCM} gewährleistet werden. Um die mittels Schwingquarzen gemessenen Gerinnungszeiten validieren zu können, wurden parallel die Gerinnungszeiten der identischen Blutproben mit dem Koagulometer bestimmt und die Ergebnisse verglichen. In Abbildung 38 A sind die anhand der beiden Methoden bestimmten Gerinnungszeiten der unterschiedlichen Blutverdünnungen gegeneinander aufgetragen. Die ideale Korrelation, also die exakte Übereinstimmung der Werte beider Methoden, ist durch die gestrichelte Winkelhalbierende dargestellt. Die lineare Regressionsgerade der Messwerte ist ebenfalls eingezeichnet. Um zu verdeutlichen, dass nicht nur mittels Netzwerkanalysator Gerinnungszeiten bestimmt werden können, wurden exemplarisch auch mittels Oszillatorschaltung Messungen durchgeführt.

Wie in Abbildung 38 A ersichtlich, steigen wie erwartet die Gerinnungszeiten beider Methoden mit zunehmender Blutverdünnung an. Ebenso ist eine sehr gute Übereinstimmung der Schwingquarz-Werte mit den Koagulometer-Werten zu erkennen ($R^2 = 0,955$). Die Regressionsgerade (vgl. Tabelle 5) weicht nur schwach von der idealen Korrelationsgeraden ab und schneidet diese bei $t = 35$ s. Daraus ist ersichtlich, dass bei kurzen Gerinnungszeiten die Werte der Schwingquarzensensorik im Vergleich zu den Werten des Koagulometers erhöht

sind. Umgekehrt weichen die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes über 35 Sekunden in Richtung kürzerer Zeiten ab.

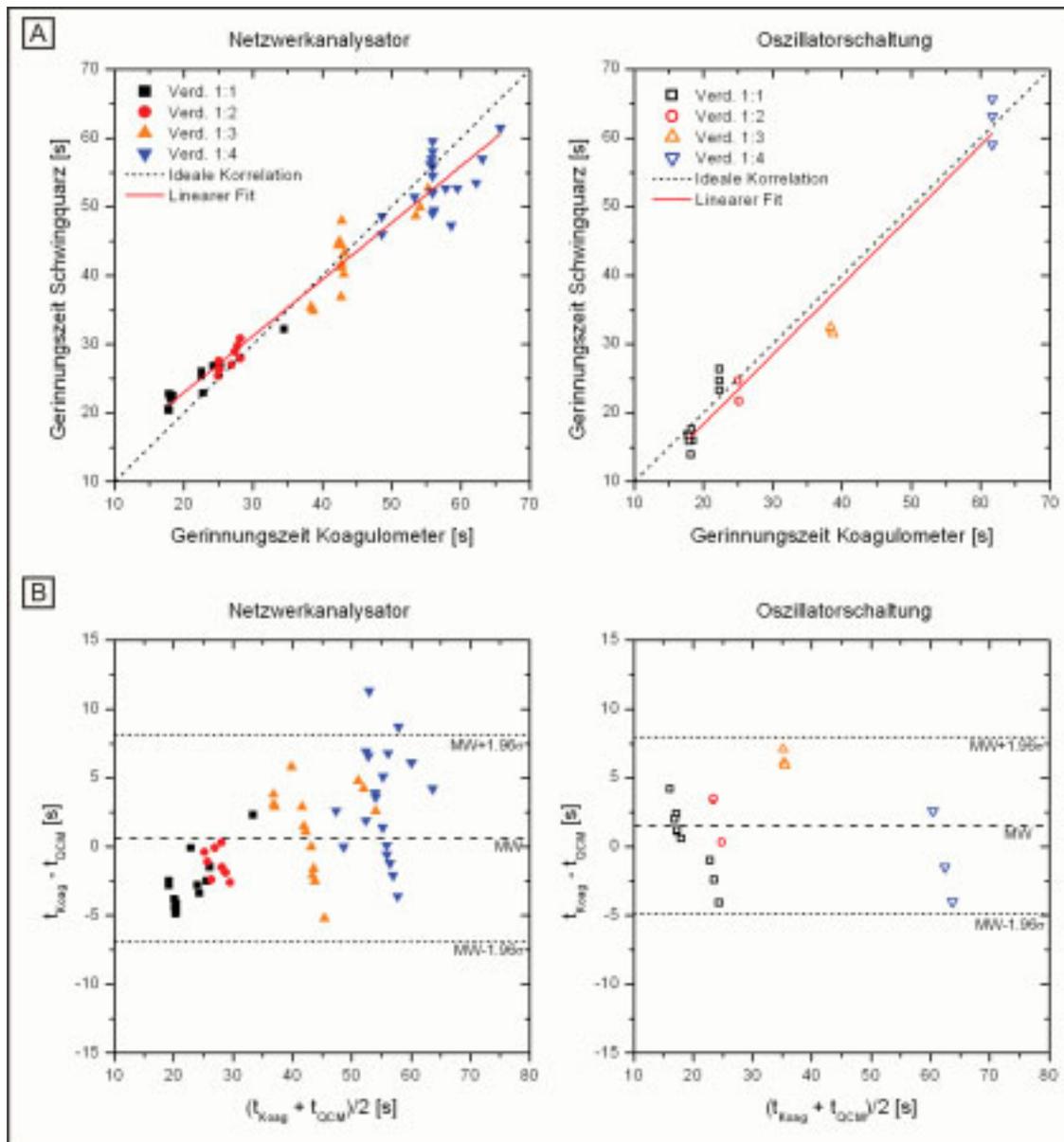


Abbildung 38: A: Gerinnungszeiten des Koagulometers im Vergleich zu den Gerinnungszeiten der Schwingquarzsensoren mittels Netzwerkanalysator (links) und Oszillatorschaltung (rechts). B: Bland-Altman-Plot der in A dargestellten Daten zur Visualisierung der Vergleichbarkeit der beiden Nachweismethoden.

Eine etablierte Methode zur vergleichenden Darstellung zweier unterschiedlicher Messtechniken ist die Auftragung nach Bland und Altman [153;154]. Dabei werden die Differenzen der Werte der beiden Methoden gegen deren Mittelwert aufgetragen. Der Bland-

Altman-Plot erlaubt eine optische Bewertung der Schwankungsbreite und ist hervorragend geeignet um systematische Fehler in einer der beiden verglichenen Methoden aufzudecken. Aus diesem Grund wird er häufig zum Vergleich einer neuen Messmethode mit einer etablierten Standardmethode verwendet. Zur leichteren Interpretation werden der Mittelwert (MW) und die 1,96-fache Standardabweichung, also das 95%-Intervall der Verteilung, als gestrichelte Linien eingezeichnet.

Tabelle 5: Lineare Regressionsgerade der mittels Netzwerkanalysator und Koagulometer bestimmten Wertepaare (vgl. Abbildung 38 A)

Parameter	Wert	Standardabweichung
Gleichung	$y = a + b \cdot x$	
Determinationskoeffizient R^2	0,955	
Ordinatenabschnitt	6,50	1,03
Steigung	0,82	0,02

Wie in Abbildung 38 B ersichtlich, liegen bis auf zwei Ausreißer alle mittels Netzwerkanalysator gemessenen Werte innerhalb des 95%-Intervalls der Verteilung. Die 1,96-fache Standardabweichung entspricht dabei einer Differenz der gemessenen Gerinnungszeiten von maximal $\Delta t = \pm 7,51 \text{ s}$. Der mit $\text{MW} = 0,60 \text{ s}$ nahe am Wert null liegende Mittelwert der Differenzen lässt ebenso auf eine sehr gute Korrelation der beiden Methoden schließen. Im Bland-Altman-Plot wird jedoch auch die systematische Abweichung der beiden Methoden in Abhängigkeit der Gerinnungszeit deutlich. Während bei kürzeren Gerinnungszeiten die Differenz der Methoden im negativen Bereich liegt und somit die mittels Schwingquarz bestimmte Zeit größer ist, tritt bei längeren Gerinnungszeiten der umgekehrte Fall auf. Zudem ist ersichtlich, dass die Streuung der Werte mit zunehmender Gerinnungszeit ebenfalls zunimmt. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Vollblutproben zur Realisierung längerer Gerinnungszeiten entsprechend stärker mit Puffer verdünnt wurden. Somit ist die bei der Gerinnung stattfindende Viskositätsänderung aufgrund eines weniger dichten Fibrinnetzwerks geringer und der Endpunkt der Gerinnung deshalb bei beiden Methoden undefinierter.

Die Korrelation der beiden Methoden kann vermutlich auch durch eine automatisierte Probenaufgabe verbessert werden. Die hier durchgeführte manuelle Mischung von Blutprobe und Aktivator ist als möglicher Grund sowohl für die negative Abweichung der Differenzen bei kurzen Gerinnungszeiten als auch für die Streuung der Messwerte im Allgemeinen

anzuführen. Bei der Diskussion der vorliegenden Messwerte darf ebenso nicht vergessen werden, dass in die Streuung auch die Individualität der verschiedenen Spender eingeht.

Als weitere Messtechnik kam neben dem Netzwerkanalysator auch die Oszillatorschaltung zur Aufzeichnung der Frequenzdaten zum Einsatz. Der Vorteil der Oszillatorschaltung besteht dabei in den geringeren Abmessungen und der somit besseren Verwendbarkeit zur Realisierung eines Point-of-Care-Gerätes. Die Überprüfung der Eignung der Oszillatorschaltung zur Gerinnungszeitbestimmung wurde im Vergleich zum Netzwerkanalysator an deutlich weniger Proben exemplarisch durchgeführt.

In Abbildung 38 A sind die mittels Oszillatorschaltung ermittelten Gerinnungszeiten gegen die Gerinnungszeiten des Koagulometers aufgetragen. Auch hier zeigt die Regressionsgerade aller Messwerte eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden (vgl. Tabelle 6). Allerdings müssten diese Werte aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten durch weitere Messungen noch bestätigt werden.

Tabelle 6: Lineare Regressionsgerade der mittels Oszillatorschaltung und Koagulometer bestimmten Wertepaare (vgl. Abbildung 38 A)

Parameter	Wert	Standardabweichung
Gleichung	$y = a + b \cdot x$	
Determinationskoeffizient R^2	0,958	
Ordinatenabschnitt	-1,95	1,76
Steigung	1,01	0,05

Die unterhalb der idealen Korrelationsgeraden liegende Regressionsgerade zeigt eine systematische Abweichung der mittels Oszillatorschaltung gemessenen Werte an. Dabei sind die gemessenen Zeiten der Oszillatorschaltung generell kürzer als die mittels Koagulometer bestimmten Gerinnungszeiten. Der Einfluss der unterschiedlichen Spender ist hier im Falle der 1:1 verdünnten Proben deutlich zu erkennen. Die entsprechenden Gerinnungszeiten des Koagulometers weichen hier um 5 Sekunden (ca. 20 %) voneinander ab.

Die Bland-Altman-Auftragung für die Oszillatorschaltung-Werte (Abbildung 38 B) zeigt, dass alle gemessenen Werte innerhalb des 95%-Intervalls der Verteilung liegen. Der Mittelwert der Differenz der Messdaten beträgt $MW = 1,50$ s. Die Abtastfrequenz der Oszillatorschaltung beträgt 1 Hz. Im Mittel weichen also die Werte zwischen Koagulometer und

Oszillatorschaltung nur um 1,5 Messpunkte voneinander ab. Weiterführende statistische Betrachtungen sind an dieser Stelle nicht sinnvoll, da dafür deutlich mehr Messwerte notwendig wären. Prinzipiell lässt sich zusammenfassen, dass auch die Oszillatorschaltung als Messtechnik geeignet ist, um Frequenzkurven aufzunehmen, aus denen Gerinnungszeiten direkt bestimmt werden können.

Um spenderbedingte Variationen ausschließen zu können, wurden Blutproben nur eines Spenders in den 4 unterschiedlichen Verdünnungen mit den drei Messmethoden Koagulometer, Schwingquarz im passiven Modus mit Netzwerkanalysator sowie Schwingquarz im aktiven Modus mit Oszillatorschaltung vermessen. In Abbildung 39 sind die Gerinnungszeiten der jeweiligen Methoden gegen die Verdünnung der Blutprobe aufgetragen.

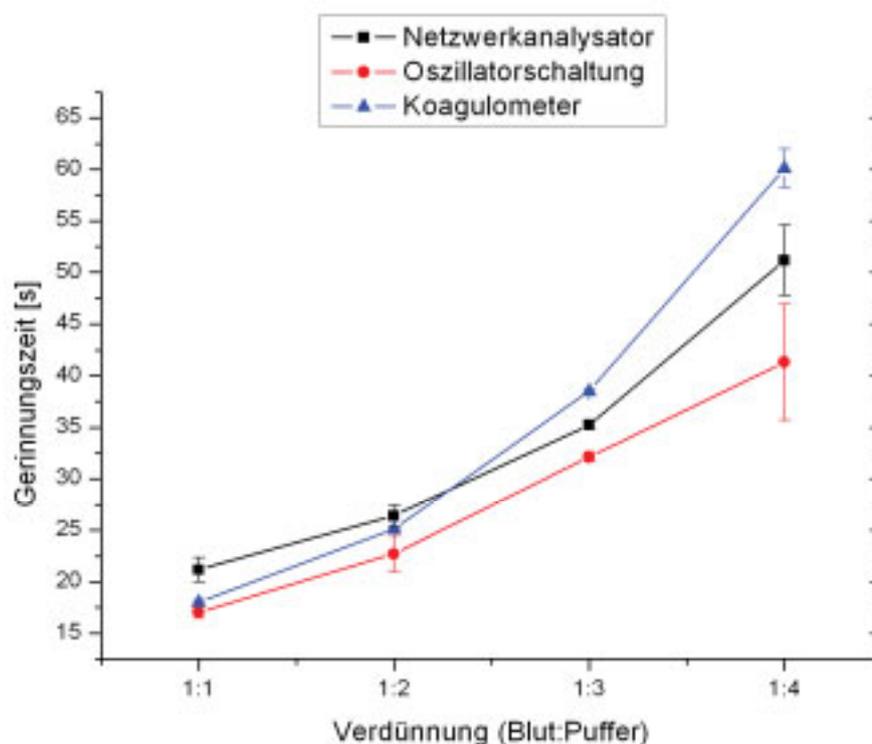


Abbildung 39: Gerinnungszeiten der Blutprobe eines Spenders in unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen, gemessen mittels Netzwerkanalysator, Oszillatorschaltung sowie Koagulometer als Referenzmethode (n = 3).

In dieser Auftragsung ist wiederum zu erkennen, dass sich mit zunehmender Blutverdünnung längere Gerinnungszeiten ergeben, was mit allen drei Messmethoden verfolgt werden kann.

Auch bei dieser einzelnen Blutprobe zeigt sich der bereits beschriebene Effekt, dass bei geringerer Blutverdünnung und somit kürzeren Gerinnungszeiten mittels Netzwerkanalysator im Vergleich zum Koagulometer zu lange Zeiten gemessen werden. Dieser Effekt dreht sich ab einer Blutverdünnung von 1:3 um, dort liefert dann der Netzwerkanalysator etwas zu geringe Werte für die Gerinnungszeiten. Wie auch zu Abbildung 38 A diskutiert, liegen die Gerinnungszeiten der Oszillatorschaltung für alle Verdünnungen unterhalb der mittels Koagulometer und auch unterhalb der mittels Netzwerkanalysator bestimmten Zeiten. In Abbildung 39 ist zudem mit zunehmender Blutverdünnung eine Zunahme der Standardabweichungen zu identifizieren. Dabei ist in diesem Fall die Standardabweichung bei den Messungen mittels Oszillatorschaltung am größten. Die Zunahme der Standardabweichung mit zunehmender Blutverdünnung wurde bereits diskutiert und lässt sich auf die geringere Viskositätsänderung bei der Gerinnung und die somit ungenauere Endpunktbestimmung zurückführen. Trotz der diskutierten Abweichungen ist die Vergleichbarkeit der Schwingquarzmethode und der etablierten Koagulometrie bei der Bestimmung von Gerinnungszeiten in Vollblut als sehr gut zu bewerten. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass beide Methoden dieselbe Messgröße verfolgen, nämlich die Viskositätsänderung während des Koagulationsprozesses. Zum andern können auch die Parameter der Routine-Messungen, wie Reagenzien, Verdünnungen und Temperatur, in identischer Weise für die Schwingquarzmessungen gewählt werden um eine direkte Vergleichbarkeit mit der Routinemethode zu gewährleisten.

4.2.4 Nachweis der gerinnungshemmenden Wirkung von Heparin

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Heparin und seines Antagonisten Polybrene auf die Gerinnungszeit nach Quick mittels Schwingquarz-Messungen nachweisbar ist, wurden exemplarisch 4 verschiedene Messungen, jeweils mittels Schwingquarzen und Koagulometer als Referenzmethode, durchgeführt. Die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien sowie die resultierenden Gerinnungszeiten sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Um spenderbedingte Variationen auszuschließen wurden für diese Messungen Vollblutproben nur eines gesunden Spenders verwendet. Vor der Durchführung der Messungen wurde die Blutprobe im Verhältnis 1:1 mit physiologischem TRIS/NaCl-Puffer verdünnt. In Abbildung 40 M1 sind die Gerinnungszeiten der 1:1 verdünnten Vollblutprobe mit ebenfalls 1:1

verdünntem Thromborel ohne Zugabe von Heparin gezeigt. Durch Zugabe von 1,25 IU/ml Heparin (Abbildung 40 M2) erhöht sich die mittels Koagulometer bzw. Schwingquarz gemessene Gerinnungszeit auf 34,5 s bzw. 32,2 s. Ebenso wird durch beide Messmethoden in guter Übereinstimmung angezeigt, dass die Zugabe eines Überschusses an Heparin-Antagonist Polybrene wiederum zu einer Erniedrigung der Gerinnungszeit (Abbildung 40 M3) auf den Ursprungswert ohne Zugabe von Heparin (M1) führt.

Tabelle 7: Übersicht der bei den in Abbildung 40 gezeigten Messungen verwendeten Reagenzien sowie der entsprechenden Gerinnungszeiten

Messung	Heparin	Polybrene	Gerinnungszeit Koagulometer	Gerinnungszeit Schwingquarz
M1	---	---	22,6 s	25,4 s
M2	1,25 IU/ml	---	34,5 s	32,2 s
M3	1,25 IU/ml	7,5 µg/ml	22,8 s	22,9 s
M4	4,00 IU/ml	---	---	---

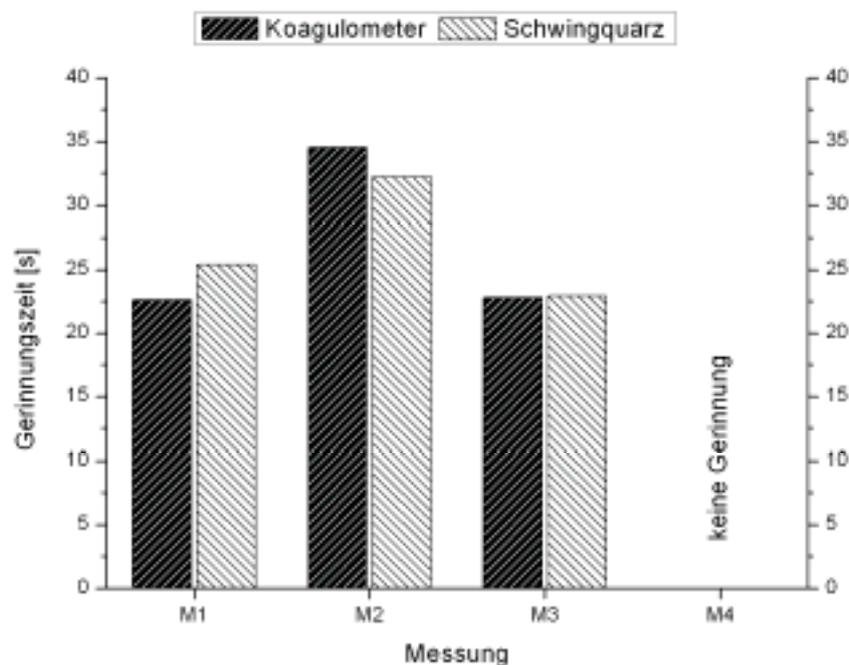


Abbildung 40: Nachweis der gerinnungshemmenden Wirkung von Heparin durch Messung der Gerinnungszeiten mittels Schwingquarzen und Koagulometer. Alle Messungen wurden in 1:1 verdünntem Vollblut durchgeführt. Die Parameter der Messungen M1 - M4 sind in Tabelle 7 ersichtlich.

Kontrollmessungen mit 4 IU/ml Heparin, also einem massiven Überschuss an Heparin, wurden ebenfalls durchgeführt. Mit beiden Messtechniken lässt sich in Übereinstimmung kein Gerinnungsprozess nachweisen (Abbildung 40 M4). Beide Messungen wurden nach jeweils 500 Sekunden abgebrochen.

Wie in Kapitel 2.3.3 erwähnt ist Heparin ein stark sulfatiertes Glukosaminoglykan, welches in der klinischen Routine als gerinnungshemmendes Medikament weit verbreitet ist. Durch Bindung von Heparin an Antithrombin wird dessen enzymatische Aktivität drastisch erhöht und als Folge dessen die Wirkung des Gerinnungsfaktors Xa erniedrigt. Dies führt schließlich zu einer Reduktion der Fibrinpolymerisation und somit zu einem Anstieg der Gerinnungszeiten (M2). Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bindet das quartäre Ammoniumsalz Polybrene an Heparin und antagonisiert so dessen gerinnungshemmenden Effekt, wodurch die Gerinnungszeit wieder abnimmt (M3).

Wie die in Abbildung 40 dargestellten Messergebnisse sehr gut zeigen, kann die Schwingquarzsensoren zum Nachweis der Heparin-Wirkung sowie deren Antagonisierung anhand der entsprechenden Gerinnungszeiten in Vollblut eingesetzt werden.

4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die erzielten Ergebnisse der Gerinnungsuntersuchungen mittels Schwingquarzsensoren vorgestellt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass eine eindeutige Identifizierung von Gerinnungsvorgängen mit StarPEG-beschichteten Schwingquarzen aufgrund ihrer stark hydrophilen und proteinresistenten Eigenschaften nicht möglich ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollmessung ohne stattfindende Gerinnung und einer Gerinnungsmessung konnte trotz Variation einiger Parameter nicht identifiziert werden.

Auf hydrophoben, PE-beschichteten Schwingquarzen wurden jedoch unterschiedliche Signalverläufe für Kontroll- und Gerinnungsmessungen beobachtet. Zudem konnte im Frequenzsignal zur vom Koagulometer bestimmten Gerinnungszeit eine charakteristische Schulter ausgemacht werden. Anhand dieser Schulter konnte jedoch kein exakter Gerinnungszeitpunkt abgelesen werden.

Durch Inkubation der PE-beschichteten Sensoren mit Vollblut vor Durchführung der Messungen wurde das Sensorsignal dahingehend verändert, dass anhand des auftretenden Frequenzmaximums eine Bestimmung der Gerinnungszeit einfach möglich war. Darüber hinaus konnte neben dem Netzwerkanalysator auch die Oszillatorschaltung als Messelektronik zur erfolgreichen Messung von Gerinnungszeiten eingesetzt werden.

Beim Vergleich der mittels Netzwerkanalysator bestimmten Gerinnungszeiten und den Zeiten des Koagulometers fiel auf, dass der Netzwerkanalysator für Gerinnungszeiten kleiner 35 Sekunden minimal zu hohe, für Zeiten oberhalb 35 Sekunden minimal zu niedrige Werte liefert. Insgesamt ist die Übereinstimmung der beiden Methoden Schwingquarz und Koagulometer bei der Bestimmung von Gerinnungszeiten in Vollblut als sehr gut zu betrachten. Mittels Oszillatorschaltung wurden ebenfalls Gerinnungszeiten bestimmt, anhand denen exemplarisch gezeigt werden konnte, dass sich auch Oszillatorschaltungen zur Bestimmung von Gerinnungszeiten eignen. Dabei lagen die Werte der Oszillatorschaltung unterhalb den mittels Netzwerkanalysator oder Koagulometer bestimmten Werten. Für weiterführende, statistische Betrachtungen müsste allerdings die Datenmenge deutlich erhöht werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Verdünnung der Blutprobe und somit längeren Gerinnungszeiten bei allen drei Methoden eine stärkere Streuung der Messwerte erfolgt.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse demonstrieren erstmals die Möglichkeit mittels Schwingquarzsensoren Gerinnungszeiten unterhalb einer Minute direkt in Vollblut zu bestimmen. Dabei eignen sich sowohl der passive Messmodus mit Netzwerkanalysator als auch der aktive Betrieb des Schwingquarzes mittels Oszillatorschaltung zur Durchführung modifizierter Quick-Tests und zur Bestimmung der Gerinnungszeiten. Die erhaltenen Gerinnungszeiten stehen dabei in sehr guter Korrelation zu den etablierten medizinischen Methoden.

4.3 Nachweis hyperfibrinolytischer Prozesse mittels Schwingquarzsensoren

Blutungskomplikationen können nicht nur in einem gestörten Gerinnungssystem, sondern ebenfalls in einem überschießenden Fibrinolyse-System begründet sein. Im Gegensatz zum Gerinnungssystem ist die Diagnostik fibrinolytischer Störungen noch nicht so weit fortgeschritten und umfangreich. Neben den als Fibrinolyse-Marker zur Verfügung stehenden D-Dimeren kommt derzeit verstärkt die Rotations-Thrombelastometrie zum Einsatz.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Fibrinolyseuntersuchungen mittels Schwingquarzen in humanem Vollblut vorgestellt, die in enger und konstruktiver Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Stefan Sinn (AG Wendel, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) sowie Petra Brozik entstanden. Als Zielsetzung sollte überprüft werden, ob fibrinolytische Prozesse mit Schwingquarzsensoren nachweisbar sind und inwiefern sich diese Ergebnisse mit denen der Rotations-Thrombelastometrie decken. Die durch Zugabe entsprechender Reagenzien induzierten, sehr starken fibrinolytischen Prozesse sind in ihrem Ausmaß mit den in vivo auftretenden Fibrinolyseprozessen bei gesunden Spendern nicht vergleichbar. Aufgrund dessen werden im Folgenden die medikamentös induzierten Fibrinolyseprozesse als Hyperfibrinolyse bezeichnet.

4.3.1 Untersuchung hyperfibrinolytischer Prozesse in Vollblut mittels Schwingquarzen

Probenvorbereitung und Messprozedur. Um hyperfibrinolytische Prozesse zu simulieren, wurden vor der Messung 500 µl der entsprechend verdünnten Vollblutprobe eines gesunden Spenders mit 10 µl des entsprechend verdünnten Fibrinolyse-Aktivators Actilyse versetzt. Zur Durchführung der Kontrollmessung wurde die zugegebene Actilyse durch zusätzliche Zugabe von 10 µl unverdünntem Trasylol antagonisiert. Alle Proben wurden vor der Messung auf 37 °C temperiert. Anschließend an diese Probenvorbereitung wurde die Gerinnung durch Mischen von 200 µl der entsprechenden Blutprobe und 200 µl des entsprechend verdünnten Thromborels ausgelöst. Die verschiedenen Kombinationen der verwendeten Reagenzien und die daraus resultierenden Prozesse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Übersicht über die Kombinationen der bei den Hyperfibrinolyse-Messungen verwendeten Reagenzien und die daraus resultierenden Prozesse.

Gerinnungs-Aktivator	Fibrinolyse-Aktivator	Fibrinolyse-Inhibitor	Resultierende Prozesse (Bezeichnung)
---	---	---	Keine Gerinnung (Kontrolle 2)
Thromborel	Actilyse	---	Gerinnung mit Hyperfibrinolyse (Hyperfibrinolyse)
Thromborel	Actilyse	Trasylol	Gerinnung ohne Hyperfibrinolyse (Kontrolle 1)

Die mittels Netzwerkanalysator durchgeführten Schwingquarzmessungen erfolgten analog zu den in Kapitel 4.2.1 dargelegten Gerinnungsmessungen. Anschließend an die Aufnahme der Basislinie mit physiologischem Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min (Abbildung 41, I) wurde die Blutprobe mit dem Gerinnungsaktivator gemischt und wiederum mit 0,8 ml/min auf den Schwingquarzsensoren gezogen (Abbildung 41, II). Als der Sensor vollständig mit der aktivierten Probe bedeckt war, wurde die Pumpe gestoppt und unter Stop-Flow-Bedingungen die Signaländerungen aufgezeichnet (Abbildung 41, III). Als Sensorbeschichtung wurde wie bei den Gerinnungsmessungen die mit der Blutprobe vorinkubierte PE-Schicht verwendet.

Ergebnisse der Schwingquarzmessungen. In Abbildung 41 sind exemplarisch die mittels Netzwerkanalysator gemessenen Frequenz- und Dämpfungsverläufe der Messung mit induzierter Hyperfibrinolyse sowie der beiden relevanten Kontrollmessungen gezeigt. Die Blutprobe wurde dabei im Verhältnis 1:2 und das Actilyse-Reagenz im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Die Antagonisierung der Actilyse wurde durch unverdünntes Trasylol vorgenommen.

Im Fall der Messung Kontrolle 2, bei der keine Gerinnung und somit auch keine Hyperfibrinolyse ausgelöst wurden, zeigt sich das bereits in Kapitel 4.2.2 beschriebene, leichte Ansteigen der Resonanzfrequenz. Bei der Hyperfibrinolyse-Messung wird ca. 3 Minuten nach erfolgter Gerinnung und dem damit verbundenen Abfall der Resonanzfrequenz ein Ansteigen des Frequenzsignals beobachtet. Dieser Anstieg setzt sich fort, bis sich das Frequenzsignal auf dem Niveau der Probe ohne stattgefundene Gerinnung stabilisiert. Durch zusätzliche Gabe von Trasylol als Fibrinolyse-Inhibitor (Messung

Kontrolle 1) findet im Anschluss an die gerinnungsbedingte Erniedrigung der Frequenz kein erneutes Ansteigen der Frequenz statt.

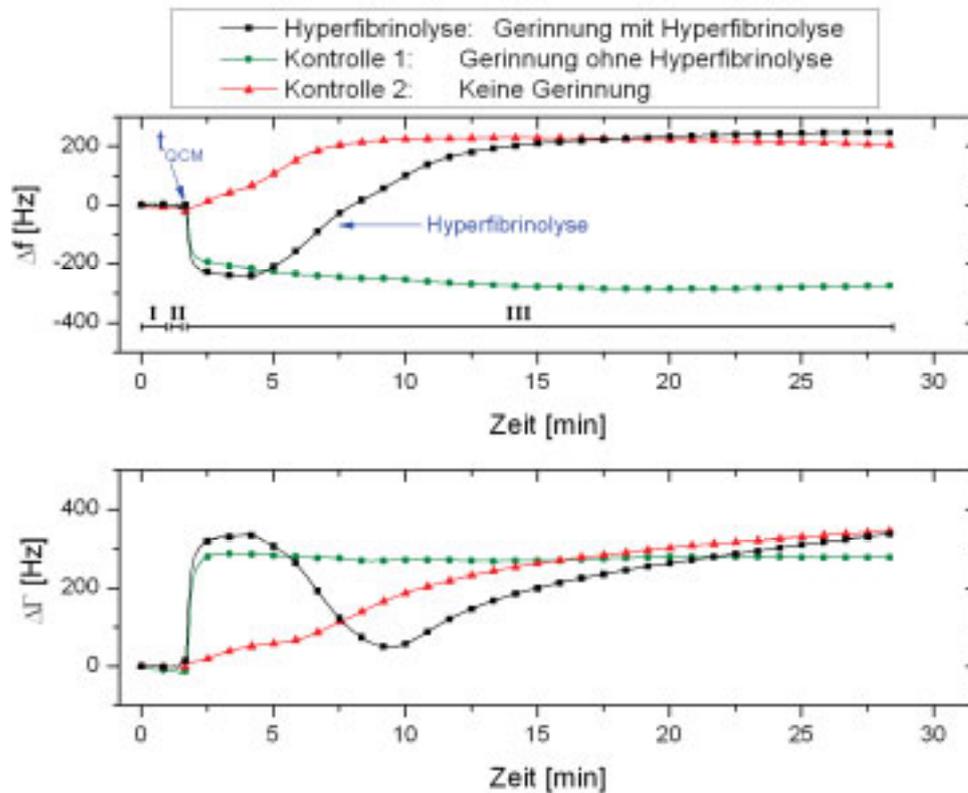


Abbildung 41: Mittels Netzwerkanalysator aufgenommene Signaländerungen bei Hyperfibrinolyse- und Kontrollmessungen mit 1:2 verdünntem Vollblut auf vorinkubierten PE-beschichteten Schwingquarzen. Die Hyperfibrinolyse wurde durch 1:10 verdünnte Actilyse ausgelöst und bei Kontrolle 1 durch unverdünntes Trasylool unterbunden.

Bei den Dämpfungskurven wird im Fall der Kontrolle 2 ohne Gerinnung ein fast linear ansteigender Verlauf beobachtet. Kontrolle 1 mit stattfindender Gerinnung zeigt anschließend an einen sprunghaften Anstieg gleichbleibende Dämpfungswerte. Dieser Anstieg der Dämpfungswerte tritt auch bei der Hyperfibrinolyse-Messung auf, jedoch fällt die Dämpfung nach ca. 7 Minuten wieder auf ein Minimum ab. Anschließend beginnt die Dämpfungskurve mit einer ähnlichen Kinetik wie die Dämpfungskurve von Kontrolle 2 langsam anzusteigen.

Diese Kurvenverläufe lassen sich unter Berücksichtigung der zugegebenen Reagenzien und des vorliegenden Schichtsystems aus einer viskoelastischen Schicht und einer viskosen Flüssigkeit anhand des folgenden Modells schlüssig erklären: Aufgrund der Zellsedimentation ist im Fall von Kontrolle 2 ein leichtes Ansteigen der Frequenz und der Dämpfung zu

beobachten. Die langsame Sedimentation der nicht zur Ankopplung an den Sensor befähigten Blutzellen und die damit verbundene Viskositätsänderung führen zu einer langsam ansteigenden Frequenz und Dämpfung der akustischen Welle des Schwingquarzes. Dieser Effekt wurde durch theoretische Betrachtungen von GEHRING beschrieben [4]. Die steigende Viskosität beim Gerinnungsvorgang führt im Falle der Hyperfibrinolyse-Messung und der Kontrolle 1 zu einem raschen Abfall der Resonanzfrequenz bzw. Anstieg der Dämpfung. Bei Kontrolle 1 bleibt der Gerinnungscot bestehen, da die Actilyse-Wirkung durch Trasylool inhibiert wird. Dies bestätigt sich durch die im Anschluss an die Gerinnung gleichbleibenden Frequenz- und Dämpfungswerte. Im Gegensatz dazu findet bei der Hyperfibrinolyse-Messung aufgrund der wirksamen Actilyse ein Auflösungsprozess des Gerinnsels statt. Diese Abnahme der Viskosität äußert sich in einem ansteigenden Frequenz- und abnehmenden Dämpfungssignal. Auf eine vollständige Auflösung des Clots lässt hierbei die Tatsache schließen, dass die Resonanzfrequenz bis auf das Niveau der nicht koagulierten Probe bei Kontrolle 2 steigt. Da die Dämpfung des Schwingquarzes nach Durchlaufen des Minimums einen ansteigenden Verlauf mit ähnlicher Kinetik und fast identischem Endwert zu Kontrolle 2 zeigt, lässt auch hier auf die Sedimentation von Erythrozyten schließen. Durch Auflösung des Gerinnungsclots sind die Zellen nun wieder bewegungsfähig und setzen sich aufgrund von Sedimentationsprozessen lose auf der Schwingquarzoberfläche ab, was mit einer Erhöhung der Dämpfungswerte einhergeht. Die vollständige Auflösung des Gerinnungsclots wurde nach Beendigung der Messung durch Betrachtung der auf dem Sensor befindlichen Blutprobe bestätigt.

Es ist also mittels Schwingquarzen möglich, hyperfibrinolytische Prozesse in Echtzeit zu verfolgen. Zudem sind aus einer Resonanzfrequenzkurve zwei Informationen zu entnehmen: Zum einen kann anhand des Frequenzmaximums die Gerinnungszeit t_{QCM} bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.2.2) und zum anderen kann aufgrund des weiteren Signalverlaufs (ansteigende oder stabile Frequenz) auf das Vorliegen hyperfibrinolytischer Störungen geschlossen werden.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse wurden mit Blutproben eines Spenders drei Messungen mit induzierter Hyperfibrinolyse durchgeführt (Abbildung 42). Die Hyperfibrinolyse wurde dabei anhand 1:10 verdünnter Actilyse ausgelöst. Bei der gezeigten Kontrollmessung wurde die 1:10 verdünnte Actilyse mittels unverdünntem Trasylool antagonisiert und somit eine Auflösung des Gerinnsels unterbunden.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen, sind die Frequenz- und Dämpfungskurven der Hyperfibrinolyse-Messungen reproduzierbar. Die Berechnung des Frequenzhubs zwischen der Frequenz bei vorliegendem Gerinnsel ($t = 7$ min) und am Ende der Messung ($t = 45$ min) liefert mit $\Delta f = 529,1 \pm 24,6$ Hz sehr gut übereinstimmende Werte. Das Zeitintervall zwischen Gerinnungspunkt t_{QCM} und Minimum der Dämpfungskurve wurde als Maß für die zum Auflösen des Gerinnsels benötigte Zeit herangezogen. Diese Lysezeit betrug bei den hier vorgestellten Messungen $\Delta t_{\text{Lyse}} = 623,2 \pm 17,7$ s. Ebenso liefert die Kontrolle 1-Messung den aufgrund der Viskositätserhöhung bei ablaufender Gerinnung erwarteten Signalverlauf.

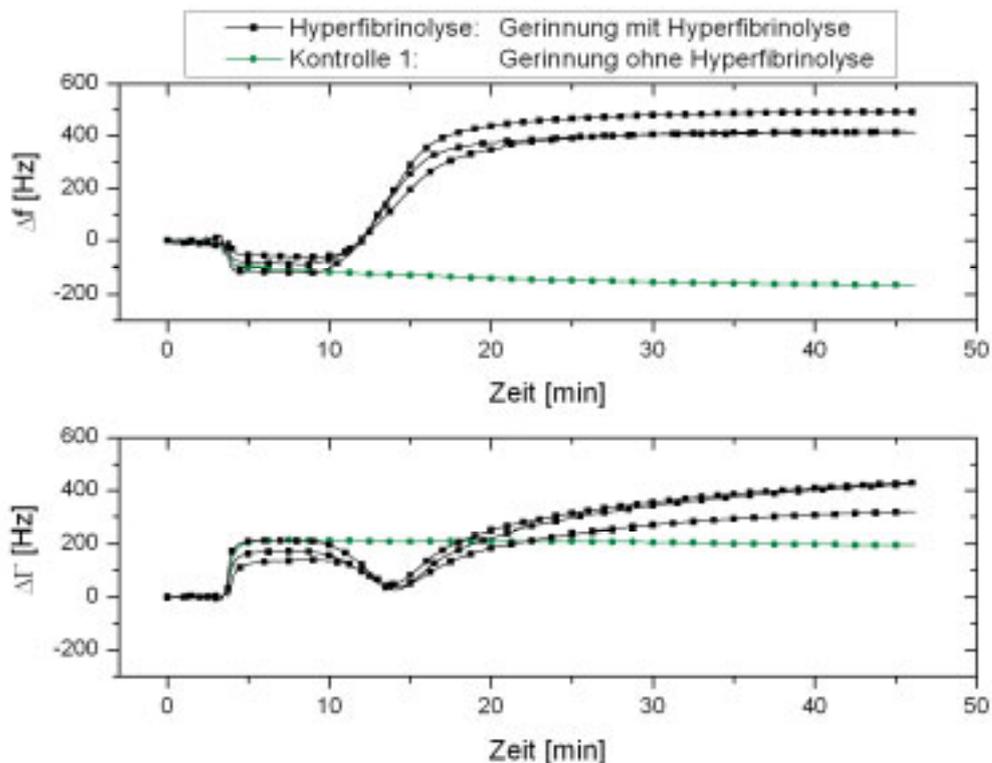


Abbildung 42: Mittels Netzwerkanalysator aufgenommene Signaländerungen bei Hyperfibrinolyse- und Kontrollmessungen mit 1:2 verdünntem Vollblut auf vorinkubierten PE-beschichteten Schwingquarzen. Die Hyperfibrinolyse wurde durch 1:10 verdünnte Actilyse ausgelöst und bei Kontrolle 1 durch unverdünntes Trasyolol unterbunden.

Um den Einfluss verschieden stark ausgeprägter hyperfibrinolytischer Prozesse zu untersuchen, wurden Messungen mit unterschiedlichen Actilyse-Verdünnungen durchgeführt. Wie in Abbildung 43 dargestellt, erhöht sich wie erwartet die Zeit bis zum Auflösungsprozess

des Gerinnsels mit zunehmender Verdünnung des Fibrinolyse-Aktivators Actilyse. Bei dem in diesen Messungen verwendeten unverdünnten Vollblut fällt ab einer Actilyse-Verdünnung von 1:10 auf, dass die aufgrund des Lyseprozesses beobachteten Frequenzanstiege deutlich geringer sind als im Falle von unverdünnter Actilyse. Daraus kann geschlossen werden, dass die gebildeten Blutgerinnsel nicht mehr vollständig aufgelöst wurden.

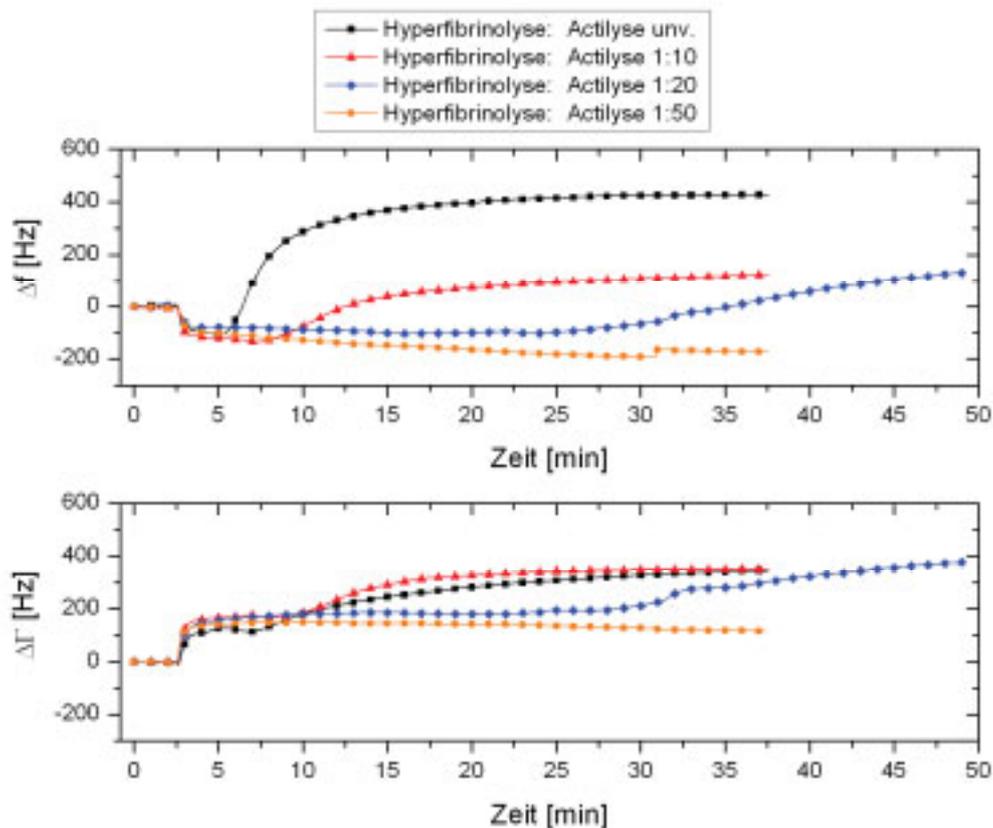


Abbildung 43: Mittels Netzwerkanalysator aufgenommene Signaländerungen bei Hyperfibrinolyse-Messungen mit unverdünntem Vollblut und unterschiedlichen Actilyse-Konzentrationen auf vorinkubierten PE-beschichteten Schwingquarzen.

Bei einer Actilyse-Verdünnung von 1:50 ist nach der Gerinnung keine Signalveränderung mehr zu erkennen. Die wirksame Actilyse-Konzentration ist zu gering um eine Clotauflösung zu bewirken. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass im Anschluss an diese Messung ein Blutgerinnsel an den Sensor gebunden war.

In diesem Kapitel konnte demonstriert werden, dass sich mittels Schwingquarzen hyperfibrinolytische Prozesse in Echtzeit beobachten und messen lassen.

4.3.2 Vergleich der Schwingquarzsensoren mit Rotations-Thrombelastometrie

Zum Vergleich der obig dargestellten Ergebnisse der Schwingquarz-Messungen steht derzeit lediglich die in Kapitel 2.4.3 vorgestellte Rotations-Thrombelastometrie (ROTEM) zur Verfügung.

Probenvorbereitung und Messprozedur. Analog zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen Hyperfibrinolyse-Messungen wurde auch hier durch Zugabe von 10 µl verdünnter Actilyse (1:20 bzw. 1:40) zu 500µl der unverdünnten Vollblutprobe eine hyperfibrinolytische Störung ausgelöst. Allerdings erfolgt die Durchführung der Messungen bei der ROTEM anhand speziell für die Leistungsfähigkeit dieses Gerätes optimierter Fertigreagenzien sowie Mischungs- und Konzentrationsverhältnissen. Ein direkter Vergleich mit den Gerinnungszeiten des klassisch durchgeführten Quick-Tests ist somit beispielsweise nicht möglich. Um die Vergleichbarkeit zwischen ROTEM und Schwingquarzsensoren zu gewährleisten, mussten also die Messparameter (unverdünntes Vollblut, Fertigreagenzien, Mischungsverhältnisse) des ROTEM-Geräts für die Schwingquarzmessungen übernommen werden. Die verwendeten ROTEM-Reagenzien sowie ihre Inhaltsstoffe und deren Wirkungsweise sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: ROTEM-Reagenzien mit Hauptinhaltsstoffen, deren Wirkung und Verwendung bei Hyperfibrinolyse-Messung oder Kontroll-Messung.

Reagenz	Hauptinhaltsstoffe	Wirkung	Benötigt für Messung	
			Hyperfibr.	Kontrolle
STAR-TEM	Calciumchlorid	Gerinnungsauslösung	×	
EX-TEM	Thromboplastin (Tissue factor)	Gerinnungsauslösung	×	×
AP-TEM	Calciumchlorid + Aprotinin	Gerinnungsauslösung + Fibrinolyse-Inhibition		×

Die Aktivierung der Gerinnung erfolgt im Falle der Hyperfibrinolyse-Messung mit wirksamer Actilyse durch Verwendung der Reagenzien STAR-TEM und EX-TEM. Bei der Kontrollmessung wird die Gerinnung durch das EX-TEM-Reagenz und das im AP-TEM-Reagenz enthaltene Calciumchlorid analog zur Hyperfibrinolyse-Messung ausgelöst. Allerdings wird die Actilyse-induzierte Hyperfibrinolyse durch das im AP-TEM zusätzlich

enthaltene Aprotinin unterdrückt. Da die Aufnahme und Mischung der Reagenzien beim ROTEM-Gerät anhand einer elektronischen Pipette erfolgt, stehen keine Informationen über die Volumina der verwendeten Reagenzien und der Blutprobe zur Verfügung.

Parallel zu den ROTEM-Messungen wurden mit der Blutprobe desselben Spenders Schwingquarzmessungen durchgeführt. Die Aufnahme der Basislinie mit physiologischem TRIS/NaCl-Puffer erfolgte dabei wiederum bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. Die mit Actilyse versetzte Blutprobe und die entsprechenden Reagenzien wurden, wie von der elektronischen Pipette des ROTEM-Geräts vorgegeben, gemischt und somit der Gerinnungsprozess gestartet. Die aktivierte Probe wurde dann mit 0,8 ml/min auf den PE-beschichteten, vorinkubierten Schwingquarzsensoren transferiert. Die unter Stop-Flow-Bedingungen ausgeführte Aufnahme der Frequenz- und Dämpfungsänderungen erfolgte mittels Netzwerkanalysator.

Vergleich der Schwingquarz-Messungen mit Rotations-Thrombelastometrie (ROTEM).

Zum Vergleich der beiden Methoden wurden, wie beschrieben, Messungen mit demselben Probenmaterial unter identischen Bedingungen durchgeführt. Da die Messkurven des ROTEM-Geräts lediglich im Grafikformat ausgegeben werden, wurden sie mithilfe der Software *Engauge Digitizer 4.1* digitalisiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wurde bei den Schwingquarzmessungen lediglich die Frequenzänderung und bei den ROTEM-Kurven lediglich der Bereich der negativen Ordinate dargestellt.

Die Ergebnisse der mittels 1:20 verdünnter Actilyse und unverdünntem Vollblut durchgeführten ROTEM- sowie Schwingquarz-Messungen sind in Abbildung 44 vergleichend dargestellt. Bei beiden Methoden ist im Falle der Hyperfibrinolyse-Messungen (STAR-TEM und EX-TEM) eine durch die stattfindende Gerinnung bedingte Abnahme des Mess-Signals zu beobachten. Die einsetzende Fibrinolyse führt sowohl bei der ROTEM- als auch bei der Schwingquarz-Messung zu einem Rückgang des Signals auf den ursprünglichen Wert. Dies ist auf eine vollständige Auflösung des Clots zurückzuführen. Allerdings beginnt der Hyperfibrinolyse-bedingte Anstieg des Sensorsignals beim ROTEM bereits 2,5 Minuten nach Einsetzen der Gerinnung und somit deutlich früher als bei der Schwingquarz-Messung (7 Minuten). Die Kontrollmessungen (EX-TEM und AP-TEM) zeigen wiederum eine durch die Viskositätsänderung bei der Gerinnung resultierende Änderung der Messsignale: Die erhöhte Viskosität führt zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes und zu einer Zunahme des Rotationswiderstands des ROTEM-Stempels. Eine Hyperfibrinolyse

wurde bei den Kontrollmessungen durch das im AP-TEM-Reagenz enthaltene Aprotinin verhindert. Das Messsignal bleibt aufgrund dessen stabil.

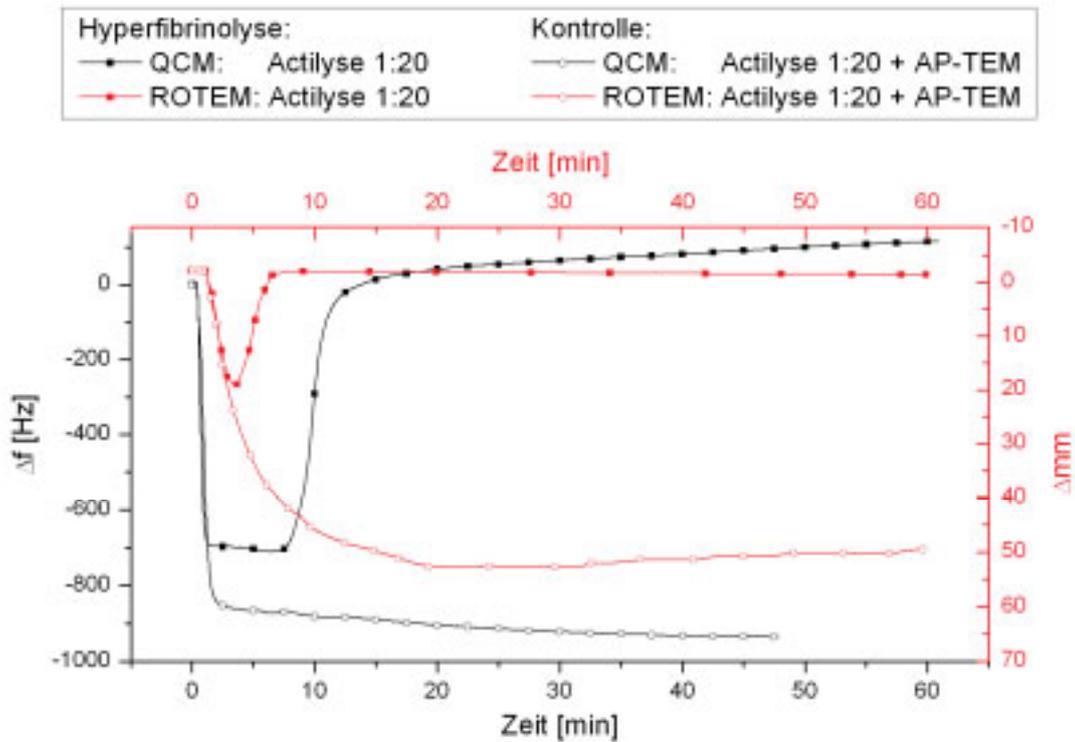


Abbildung 44: Mittels Schwingquarzen (schwarz) bzw. ROTEM (rot) mit Vollblut durchgeführte Hyperfibrinolyse-Messung und Kontroll-Messung unter Verwendung von AP-TEM zur Unterdrückung der Hyperfibrinolyse.

Ebenso wurde ein Vergleich der beiden Methoden bei einer Actilyse-Verdünnung im Verhältnis 1:40 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt. Die Ausbildung des Gerinnungsclots führt aufgrund der Viskositätszunahme wiederum zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes und beim ROTEM zu einer Zunahme des Rotationswiderstands. Auch hier zeigt das ROTEM durch Rückgang der Signaländerung das Einsetzen der Hyperfibrinolyse früher an als der Schwingquarz. Während die ROTEM-Kurve bereits nach 10 Minuten wieder rückläufig ist, ist die einsetzende Hyperfibrinolyse mittels Schwingquarz erst nach mehr als 15 Minuten zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Ergebnisse der Schwingquarzsensoren mit denen der Rotationsthrombelastometrie weitgehend decken. Allerdings kann eine

bestehende hyperfibrinolytische Störung durch Rückgang des Signals mittels Rotationsthrombelastometrie etwas früher nachgewiesen werden.

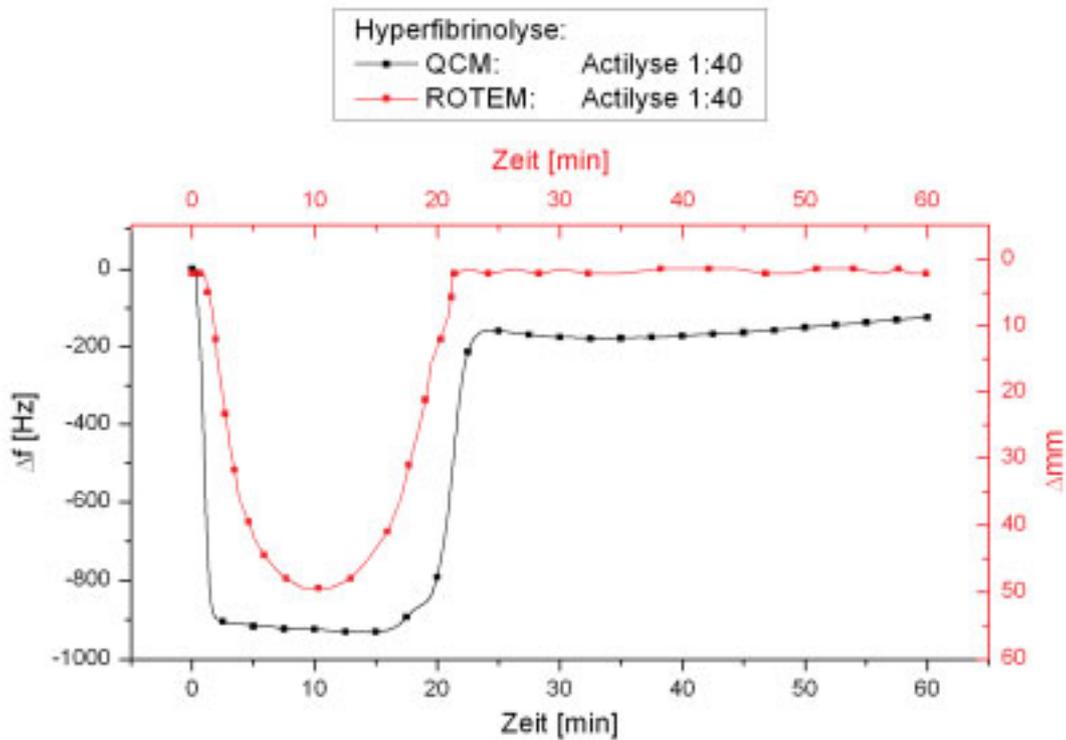


Abbildung 45: Mittels Schwingquarzen (schwarz) bzw. ROTEM (rot) mit Vollblut durchgeführte Hyperfibrinolyse-Messung bei einer Actilyse-Verdünnung von 1:40.

4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel konnte nachgewiesen werden, dass auf vorinkubierten, PE-beschichteten Schwingquarzen hyperfibrinolytische Prozesse messbar sind. Im Anschluss an die gerinnungsbedingte Frequenzerniedrigung und Dämpfungserhöhung ist bei Vorliegen einer hyperfibrinolytischen Störung und der damit verbundenen Auflösung des Gerinnsels ein ansteigendes Frequenzsignal und eine abnehmende Dämpfung zu beobachten. Ist eine solche Auflösung des Gerinnungsclots durch die Zugabe von Trasylol (Aprotinin) unterbunden, findet im Anschluss an die Frequenzerniedrigung und Dämpfungserhöhung keine weitere Signaländerung statt. Ebenso konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Hyperfibrinolysemessungen mittels Schwingquarzen festgestellt werden. Die Untersuchung unterschiedlicher Actilyse-Konzentrationen ergab den erwarteten Zusammenhang, dass mit

abnehmender Actilyse-Konzentration die durch den fibrinolytischen Prozess bedingte Signaländerung des Schwingquarzes später einsetzt.

Der direkte Vergleich zwischen der Schwingquarzsensoren und der Rotations-Thrombelastometrie ergab weitgehend übereinstimmende Signalverläufe. Allerdings konnte die durch die Fibrinolyse ausgelöste Signaländerung bei der Rotations-Thrombelastometrie reproduzierbar geringfügig früher als mittels Schwingquarzen festgestellt werden.

4.4 Thrombozyten-Diagnostik mittels Schwingquarzsensoren

Das Monitoring der Thrombozytenfunktion gewinnt im Rahmen der hämostaseologischen Diagnostik immer mehr an Bedeutung. Im Rahmen dieser Dissertation wurde in enger und konstruktiver Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Stefan Sinn (AG Wendel, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) sowie Petra Brozik und im Rahmen der von meiner Person betreuten medizinischen Doktorarbeiten von Joachim Koch und Steffen Schmidt ein Konzept für die Überprüfung der Thrombozytenfunktion mittels Schwingquarzen erarbeitet. Weiterhin wurden geeignete Beschichtungen der Sensoroberflächen entwickelt und die Ergebnisse der Schwingquarzmessungen mit denen der medizinischen Standardmethode, der Aggregometrie nach Born, verglichen.

Um Aussagen über die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten mittels Schwingquarzsensoren treffen zu können, sollte folgendes Prinzip umgesetzt werden: Funktionsfähige Thrombozyten binden nach ihrer Aktivierung durch entsprechende Agonisten wie zum Beispiel ADP an thrombogen beschichtete Schwingquarzsensoren. Aufgrund der damit verbundenen „Massenzunahme“ des Schwingquarzsensors hat dies eine Abnahme der Resonanzfrequenz zur Folge. Sind die Thrombozyten im umgekehrten Fall durch Blockade des für die Aggregation zentralen Rezeptors nicht mehr funktionsfähig, so findet keine Anlagerung der Thrombozyten an die Sensoroberfläche statt und die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes bleibt unverändert. Die Untersuchung reiner Adhäsionsprozesse kann durch Verwendung der Probe ohne aktivierende und ohne blockierende Substanzen verfolgt werden und muss von Aggregationsprozessen isoliert betrachtet werden.

4.4.1 Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Beschichtungen

Zur Umsetzung der obig beschriebenen Strategie wurden drei unterschiedliche Sensoroberflächen bezüglich ihrer Eignung zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion mittels Schwingquarzsensoren überprüft.

Dabei wurde Polystyrol als thrombogene Oberfläche auf die Schwingquarzoberfläche aufgebracht, da Polystyroloberflächen in Form von Zellkulturschalen oder -flaschen in der biologisch-medizinischen Laborroutine zur Kultivierung adhärenter Zellen eingesetzt werden. Aufgrund der in Kapitel 4.1.3 beobachteten starken unspezifischen Thrombozytenadhäsion an die unmodifizierten Goldoberflächen wurden diese ebenfalls auf ihre Anwendbarkeit in der Thrombozytendiagnostik überprüft. Als dritte Oberflächenbeschichtung wurde Fibrinogen kovalent an die Sensoroberfläche gebunden. Dies führte zu stark thrombogenen Oberflächen, da Fibrinogen in der Aggregation der Thrombozyten als Brückenmolekül zwischen zwei aktivierten Thrombozyten eine entscheidende Rolle spielt.

Die in Kapitel 3.2.4 beschriebene Immobilisierung von Fibrinogen an die Goldoberflächen der Schwingquarzelektroden wurde exemplarisch auch direkt in der Schwingquarzplattform durchgeführt (Abbildung 46). Da Mercaptoundecansäure aus ethanolischer Lösung aufgebracht werden musste, wurde diese erste Schicht außerhalb der Schwingquarzanlage, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, aufgebracht. Anschließend wurde der Schwingquarz im trockenen Zustand in die Messanlage eingebaut. Nach einer kurzen Aufnahme der Basislinie wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 15 Minuten eine frisch hergestellte Mischung aus 100 mM EDC-Lösung und 50 mM Sulfo-NHS-Lösung zur Aktivierung der Carboxyfunktionen des MUA-Monolayers injiziert. Nach Beendigung einer kurzen Spülphase mit PBS-Puffer wurde die Oberfläche mit der Fibrinogen-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von wiederum 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 45 Minuten inkubiert. Weitere Spülschritte mit PBS-Puffer dienten der Entfernung nicht abreagierten Fibrinogens aus der Messkammer. Die Ankopplung von Fibrinogen resultierte in einer Frequenzänderung von $\Delta f = -305 \text{ Hz}$.

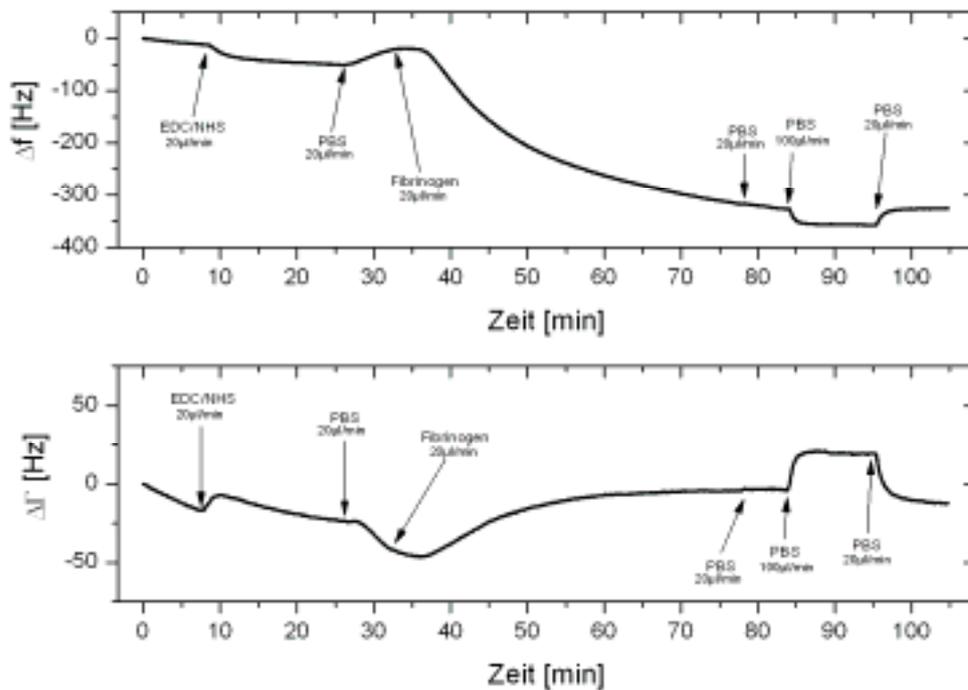


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der mittels Netzwerkanalysator bestimmten Resonanzfrequenz und Dämpfung des Schwingquarzes bei Injektion von EDC/NHS und Fibrinogen sowie anschließenden Spülschritten bei der kovalenten Immobilisierung von Fibrinogen.

Charakterisierung der Beschichtungen. Die drei unterschiedlichen Sensorbeschichtungen wurden mittels Ellipsometrie, AFM und REM charakterisiert. Die ellipsometrischen Messungen wurden auf vier Quarzen an je fünf unterschiedlichen Punkten der Beschichtung durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt. Es ergab sich für die Polystyrol (PS)-Beschichtung eine Schichtdicke von $7,1 \pm 0,8 \text{ nm}$. Für die Beschichtung mit Fibrinogen konnte eine gesamte Schichtdicke von $6,1 \pm 0,5 \text{ nm}$ ermittelt werden. Abzüglich der Schichtdicke des MUA-Monolayers von $1,6 \text{ nm}$ [155] resultiert für die reine Fibrinogenschicht eine Dicke von $4,5 \text{ nm}$. Zur Diskussion dieses Wertes müssen der strukturelle Aufbau und die Geometrie des Fibrinogen-Moleküls näher betrachtet werden. Die trinodale Struktur des Fibrinogenmoleküls ist zweiseitig symmetrisch mit einer zentralen globulären Domäne E (5 nm Durchmesser), die über zwei in sich verdrehte Polypeptidketten mit den terminalen globulären Domänen D (6 nm Durchmesser) verbunden ist [156-158].

Man kann sich also vorstellen, dass die Fibrinogenmoleküle sich mit ihren Polypeptidketten gegenseitig überlagern (Abbildung 47), womit eine homogene und dichte Oberflächenbelegung des Sensors mit Fibrinogen-Schichtdicken von ca. 5 nm resultiert.

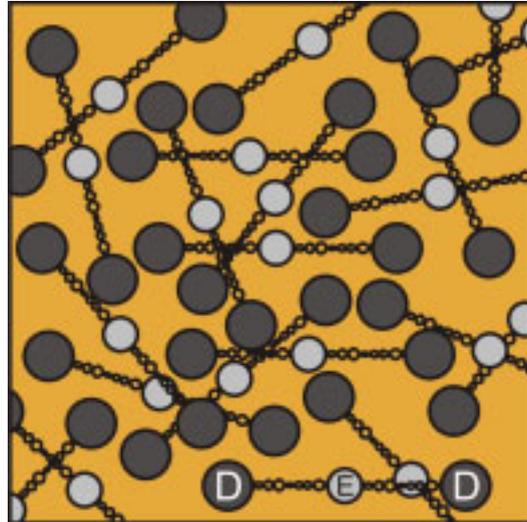


Abbildung 47: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Fibrinogenmolekülen mit den Domänen D und E auf der Schwingquarzoberfläche.

Die AFM- und REM-Aufnahmen der polymeren PS-Schicht und der Fibrinogenbeschichtung sind in Abbildung 48 zusammengestellt. Die Ergebnisse der Goldoberfläche wurden bereits in Abbildung 31 (G1 - G4) dargestellt. Die REM-Aufnahmen zeigen, von kleineren Verunreinigungen abgesehen, eine homogene Oberfläche. Die in 5000-facher Vergrößerung (P2, F2) erkennbaren Risse sind Folgen der Critical-Point-Trocknung. Auch die AFM-Daten lassen sowohl für die Polystyrol- als auch für die Fibrinogen-Beschichtungen auf homogene Oberflächen mit nur geringen Höhenschwankungen im Bereich weniger Nanometer schließen.

Durch die Charakterisierung der entwickelten Beschichtungen konnte gezeigt werden, dass für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion dünne und homogene Oberflächen zur Verfügung stehen. Die Durchführung der Thrombozytentests wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

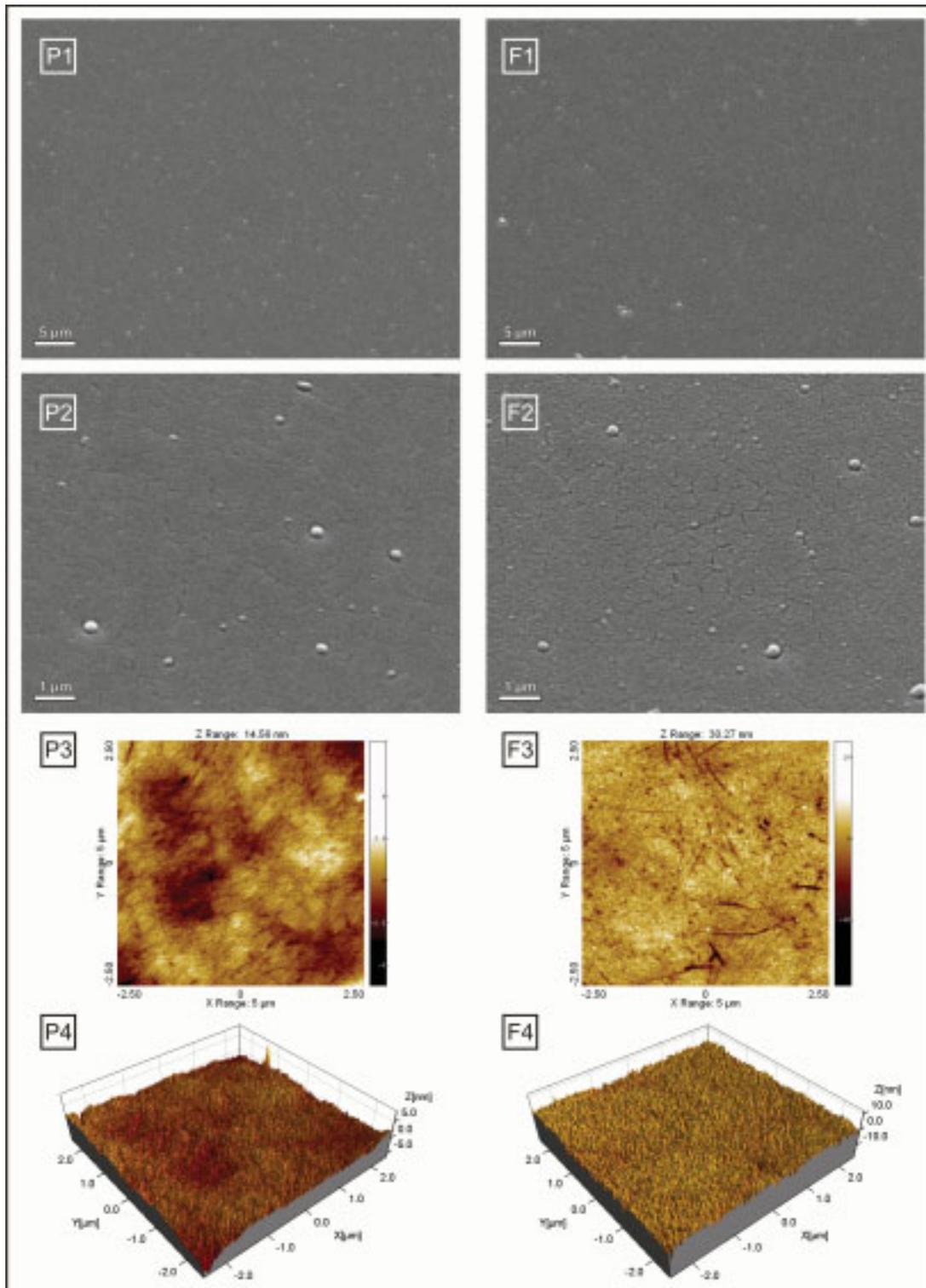


Abbildung 48: Schichtcharakterisierung von Polystyrol-Oberflächen (P) sowie Fibrinogen-beschichteten Oberflächen (F) mittels REM (1, 2) und AFM (3, 4).

4.4.2 Ablauf der Schwingquarzmessungen zur Thrombozytendiagnostik

Probenvorbereitung für Aggregometer- und Schwingquarzmessungen. Für die Messung der Thrombozytenfunktion wurden 500 μl plättchenarmes Plasma ($\text{PRP}^{300\text{k}}$) mit 10 μl TRIS/NaCl-Puffer versetzt und auf 37 °C erwärmt (vgl. Kapitel 3.1.2). Die Aktivierung der Thrombozyten wurde in den vom Hersteller der Aktivierungsreagenzien empfohlenen Verhältnissen durchgeführt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mischungsverhältnisse und Konzentrationen für die Thrombozyten-Aktivierung

Volumen $\text{PRP}^{300\text{k}}$	Aktivator	Aktivator- Volumen	Aktivator- Konzentration
180 μl	ADP	20 μl	$2,0 \cdot 10^{-4}$ M
225 μl	AA	25 μl	$1,6 \cdot 10^{-2}$ M

Bei den Kontrollmessungen wurde eine Aggregation der Thrombozyten durch den GP IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab (ReoPro) unterbunden. Dazu wurden 10 μl ReoPro zu 500 μl $\text{PRP}^{300\text{k}}$ zugegeben und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe wie in Tabelle 10 zusammengefasst, aktiviert.

Durchführung der Schwingquarzmessungen. Da die Aggregation der Thrombozyten nach deren Aktivierung sehr schnell abläuft, musste die aktivierte Probe rasch auf den Sensor transferiert werden. Nach Aufnahme einer Basislinie mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min wurde die Pumpe zur Aktivierung des vorgewärmten $\text{PRP}^{300\text{k}}$ für 5 Sekunden gestoppt. Die Aktivierung der Proben erfolgte durch Zugabe des $\text{PRP}^{300\text{k}}$ zu dem vorgelegten Aktivator und zur besseren Durchmischung wurde mittels silikonisiertem Magnetrührer für 2 Sekunden bei 1000 U/min gerührt. Anschließend wurde das nun aktivierte $\text{PRP}^{300\text{k}}$ (im Folgenden als $\text{aPRP}^{300\text{k}}$ bezeichnet) bei einer Fließgeschwindigkeit von ebenfalls 0,8 ml/min über einen Injektionsschlauch von 10 Zentimetern Länge innerhalb von 10 Sekunden auf den Sensor transferiert. Unter Stop-Flow-Bedingungen wurden die Messungen für 30 Minuten durchgeführt.

Beschreibung der resultierenden Messkurven. Eine Beispielkurve für den mittels Netzwerkanalysator gemessenen zeitlichen Verlauf von Frequenz und Dämpfung einer Thrombozytenfunktions-Messung ist in Abbildung 49 gezeigt. Im Anschluss an die Aufnahme

der Basislinie kommt es bei Injektion des αPRP^{300k} zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz sowie einem Anstieg der Dämpfung um 300 - 500 Hz. Dies ist auf die Viskositätsänderung beim Übergang von Puffer auf plättchenreiches Plasma zurückzuführen.

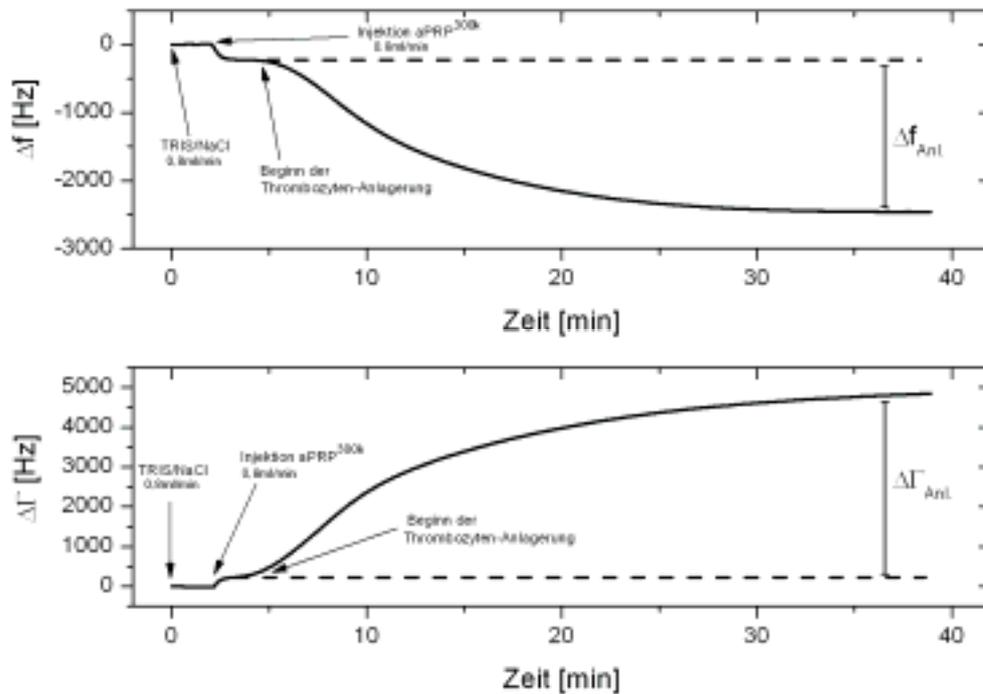


Abbildung 49: Frequenz- und Dämpfungsverlauf der exemplarischen Netzwerkanalysator-Messkurven zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion.

Nach wenigen Minuten setzt, durch die stattfindende Anlagerung der aktivierten Thrombozyten an die Schwingquarzoberfläche, eine weitere Erniedrigung der Frequenz bzw. ein weiteres Ansteigen der Dämpfungswerte ein. Die durch die Aggregation und Anlagerung der Thrombozyten an den Schwingquarz bedingte Frequenz- bzw. Dämpfungsänderung $\Delta f_{\text{Anl.}}$ bzw. $\Delta \Gamma_{\text{Anl.}}$ lässt sich also aus der Differenz von Gesamtsignaländerung ($\Delta f_{\text{Ges.}}$, $\Delta \Gamma_{\text{Ges.}}$) und viskositätsbedingter Signaländerung ($\Delta f_{\text{Visk.}}$, $\Delta \Gamma_{\text{Visk.}}$) bestimmen.

4.4.3 Thrombozyten-Diagnostik mit funktionsfähigen Thrombozyten

Thrombozytentests mittels unbeschichteter Schwingquarze im Vergleich zur Born-Aggregometrie. Auf den unbeschichteten Goldoberflächen der Schwingquarzelektroden wurden die in vorangegangenen Kapitel beschriebenen Messungen zur Thrombozytenfunktion mit unterschiedlichen Aktivatoren durchgeführt.

Als Referenz dienen die in Abbildung 50 B dargestellten Kurvenverläufe der Aggregationsmessungen nach Born. Die Zugabe des Aktivierungsreagenzes erfolgte dabei zum Zeitpunkt $t = 1 \text{ min}$. Die Aktivierung des PRP^{300k} mit den Aktivatoren AA bzw. ADP führt bei den Aggregometer-Messungen zu einer Aggregation von ca. 80%. Dabei ist anzumerken, dass laut Herstellerangaben des Born-Aggregometers Werte im Bereich von 70 - 110 % als physiologisch normal anzusehen sind. Wurden durch Zugabe des Medikaments ReoPro die Thrombozyten in ihrer Aggregationsfähigkeit gehemmt bzw. vollständig blockiert, so findet unabhängig vom Aktivatorreagenz nach Aktivierung keine Aggregation statt und das Aggregometer zeigt eine Aggregation von 0 % an. Um zu untersuchen ob es zu Spontanaggregationen der Thrombozyten kommen kann, wurden Messungen ohne Zugabe von ReoPro und ohne Zugabe eines Aktivierungsreagenzes durchgeführt. Es konnte bei diesen nicht aktivierten Proben keine Signaländerung des Born-Aggregometers und somit keine ablaufende Spontanaggregation beobachtet werden.

Die Schwingquarzmessungen wurden zeitnah zu den Aggregationsmessungen nach Born mit demselben Probenmaterial durchgeführt. In Abbildung 50 A sind exemplarisch die mittels Netzwerkanalysator gemessenen zeitlichen Frequenz- und Dämpfungsänderungen gezeigt. In Übereinstimmung mit den Aggregometer-Daten lassen sich bei den Schwingquarzmessungen bei stattfindender Thrombozyten-Aggregation durch Aktivierung mittels ADP oder AA Signaländerungen feststellen. Dabei treten Frequenzänderungen von $\Delta f_{\text{Anl.}} = -700 \text{ bis } -900 \text{ Hz}$ und Dämpfungsanstiege von bis zu $\Delta \Gamma_{\text{Anl.}} = 4000 \text{ Hz}$ auf. Bei Blockierung des Thrombozytenrezeptors GP IIb/IIIa mit ReoPro und anschließender Aktivierung der Thrombozyten (Kontrollmessung) wird keine Signaländerung hervorgerufen. Dies ist sowohl für die Aktivierung mit AA als auch mit ADP der Fall, weshalb aus Gründen der Übersichtlichkeit nur eine Messkurve gezeigt und mit „Kontrolle: ReoPro - AA/ADP“ bezeichnet wurde. Nicht funktions- bzw. aggregationsfähige Thrombozyten sind also nicht mehr in der Lage sich an die Goldoberflächen anzuheften. Ebenso wurde das Sensorverhalten

bei weder geblockten noch aktivierten Thrombozyten untersucht. Mit einer deutlich langsameren Kinetik stellte sich am Ende der Messung eine Frequenzänderung von $\Delta f_{\text{Anl.}} = -300 \text{ Hz}$ und eine Dämpfungsänderung von $\Delta \Gamma_{\text{Anl.}} = 820 \text{ Hz}$ ein. Da die Thrombozyten nicht durch ADP oder AA zur Aggregation aktiviert wurden, sind diese Signaländerungen durch die Adhäsion von Thrombozyten bedingt.

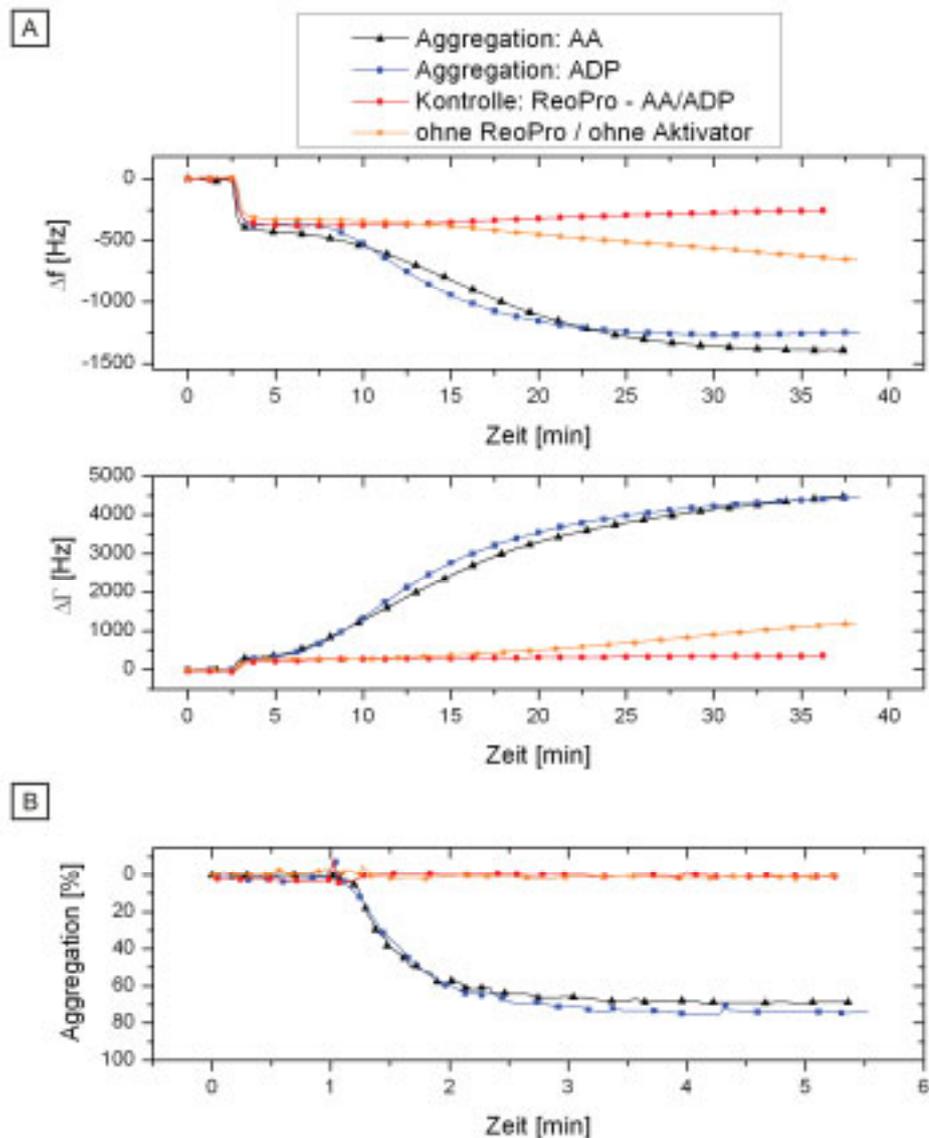


Abbildung 50: A: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktionsuntersuchungen auf den unbeschichteten Goldoberflächen der Schwingquarzelektroden. B: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen.

Eine Berechnung der angelagerten Zellmasse mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung ist aus verschiedenen Gründen nicht sinnvoll. Zum einen sind die Voraussetzungen für die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung nicht gegeben, da es sich bei anhaftenden Zellen nicht um rigide, dünne und gleichmäßig verteilte Adsorbatschichten handelt. Zum anderen wird die Viskosität und Dichte an der Sensoroberfläche dramatisch durch die adhärenzte Zellschicht verändert. Deshalb kann die beobachtete Frequenzänderung nicht ausschließlich auf eine reine Masseanlagerung zurückgeführt werden. Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist die begrenzte Eindringtiefe der akustischen Welle in das den Quarz umgebende Medium. Da die Dicken adhärerter Zellschichten generell oberhalb der Eindringtiefe der verwendeten 10 MHz-Sensoren liegen, kann die Resonanzfrequenz des Quarzsensors nur von einem Bruchteil der Zellmasse beeinflusst werden.

Zur Interpretation und Diskussion der gezeigten Ergebnisse müssen die entsprechenden Messkurven vergleichend betrachtet werden. Durch diesen Vergleich von Aggregationsmessungen mit der Kontrollmessung unter Verwendung von ReoPro lässt sich mittels Schwingquarzen sensorisch die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten beurteilen: Physiologisch intakte Thrombozyten führen nach ihrer Aktivierung zu einem Abfall der Resonanzfrequenz und einem Anstieg der Dämpfungswerte. Mittels ReoPro geblockte Thrombozyten hingegen führen zu keiner Signaländerung des Schwingquarzes. Desweiteren ist eine unterschiedliche Kinetik der Frequenzänderung nach Aktivierung mit AA bzw. mit ADP zu erkennen. Bei der ADP-aktivierten Probe fällt die Frequenz deutlich steiler ab als bei der AA-aktivierten Probe. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass AA zuerst in Thromboxan verstoffwechselt werden muss, um aktivierend auf die Thrombozyten zu wirken. ADP hingegen wirkt direkt aktivierend auf die Thrombozyten und führt somit zu einer stärkeren Aktivierung. Zudem lassen sich auf Goldoberflächen durch Vergleich der Aggregationsmessungen mit der Messung ohne ReoPro und ohne Aktivator Rückschlüsse auf die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten ziehen. Ist kein Inhibitor und kein Aktivator der thrombozytären Aggregation vorhanden, so kann eine Signaländerung des Schwingquarzes nur auf die Oberflächen-vermittelte Adhäsion der Thrombozyten hindeuten.

Ein Vergleich der Born-Aggregometrie mit der Schwingquarzensensorik zeigt eine sehr gute Korrelation. Nach Aktivierung der Thrombozytenaggregation sowohl mit ADP als auch mit AA resultieren bei beiden Methoden deutliche Signaländerungen. Das gemessene Signal der Kontrollmessungen bleibt bei beiden Methoden übereinstimmend konstant, da keine

Aggregation stattfinden kann. Ein Unterschied zwischen den Aggregometer-Messungen und den Schwingquarzmessungen liegt in der unterschiedlichen Messdauer. Während die Thrombozytenaggregation beim Aggregometer bereits nach zwei Minuten abgeschlossen ist, setzt bei den Schwingquarzmessungen der Frequenzabfall erst 5 Minuten nach Aktivierung ein und ist nach 30 Minuten vollständig abgeschlossen. Dieser Unterschied ist auf die verschiedenen Messprinzipien zurückzuführen. Bei den Aggregometer-Messungen sinken die entstandenen Thrombozyten-Aggregate innerhalb weniger Minuten auf den Boden der Reaktionsküvette und beeinflussen somit nicht mehr die Transmission des die Probe durchleuchtenden Lichtstrahls. Weitere Veränderungen oder Prozesse innerhalb dieser Aggregate werden durch das Messsystem dann also nicht mehr erfasst. Anders verhält es sich im Falle der Schwingquarzsensoren, die auch eine Beobachtung der Prozesse nach erfolgter Aggregation erlaubt. Um an die Schwingquarzoberfläche zu binden und somit eine Signalveränderung zu bewirken, müssen die Thrombozyten an die Schwingquarzoberfläche diffundieren. Nach Bindung der aktivierten und aggregierten Thrombozyten an die Oberfläche setzt das „Spreading“ der Zellen ein, welches eine noch dichtere Oberflächenbelegung und somit eine weitere Signaländerung zur Folge hat. REDEPENNING ET AL. [159] konnten am Beispiel von Osteoblasten zeigen, dass nicht nur die Anzahl der Zellen, sondern auch die Ausbreitung bereits adhärierter Zellen und der damit verbundene Anstieg des Bedeckungsgrades zu einem Frequenzabfall führen. Somit ist auch verständlich, weshalb die aktivierte Probe sehr schnell auf den Sensor gebracht werden muss: Haben sich durch zu langsame Probenaufgabe bereits größere Thrombozytenagglomerate gebildet, so binden diese nicht unter Ausbildung einer homogenen und dichten Belegung, sondern in Form vereinzelter Inseln an die Schwingquarzoberfläche. Dies hat keine signifikante Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes zur Folge. Kommt jedoch die Probe früher auf dem Sensor an, so binden die Thrombozyten über die gesamte Oberfläche verteilt an den Schwingquarz und bilden dort entsprechende Aggregate aus, was in Verbindung mit dem Zellspreading zu einer größeren Oberflächenbelegung und somit zu einer deutlichen Signaländerung führt.

Im Anschluss an die durchgeführten Messungen wurden die Sensoren mittels REM bzw. Fluoreszenzmarkierung (vgl. Kapitel 3.2.5) aktivierter Thrombozyten charakterisiert, um die Ergebnisse der Schwingquarzmessungen zu bestätigen. Wie in Abbildung 51 ersichtlich, befinden sich nach der Aggregationsmessung sehr viele Thrombozyten auf dem Quarz. Auf

der REM-Aufnahme sind bis auf zwei große Anhäufungen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilte Thrombozyten zu erkennen, wobei sich viele der Thrombozyten auf der Goldoberfläche ausgebreitet haben. Noch nicht vollständig flache Thrombozyten sind als kleine weiße Punkte erkennbar.

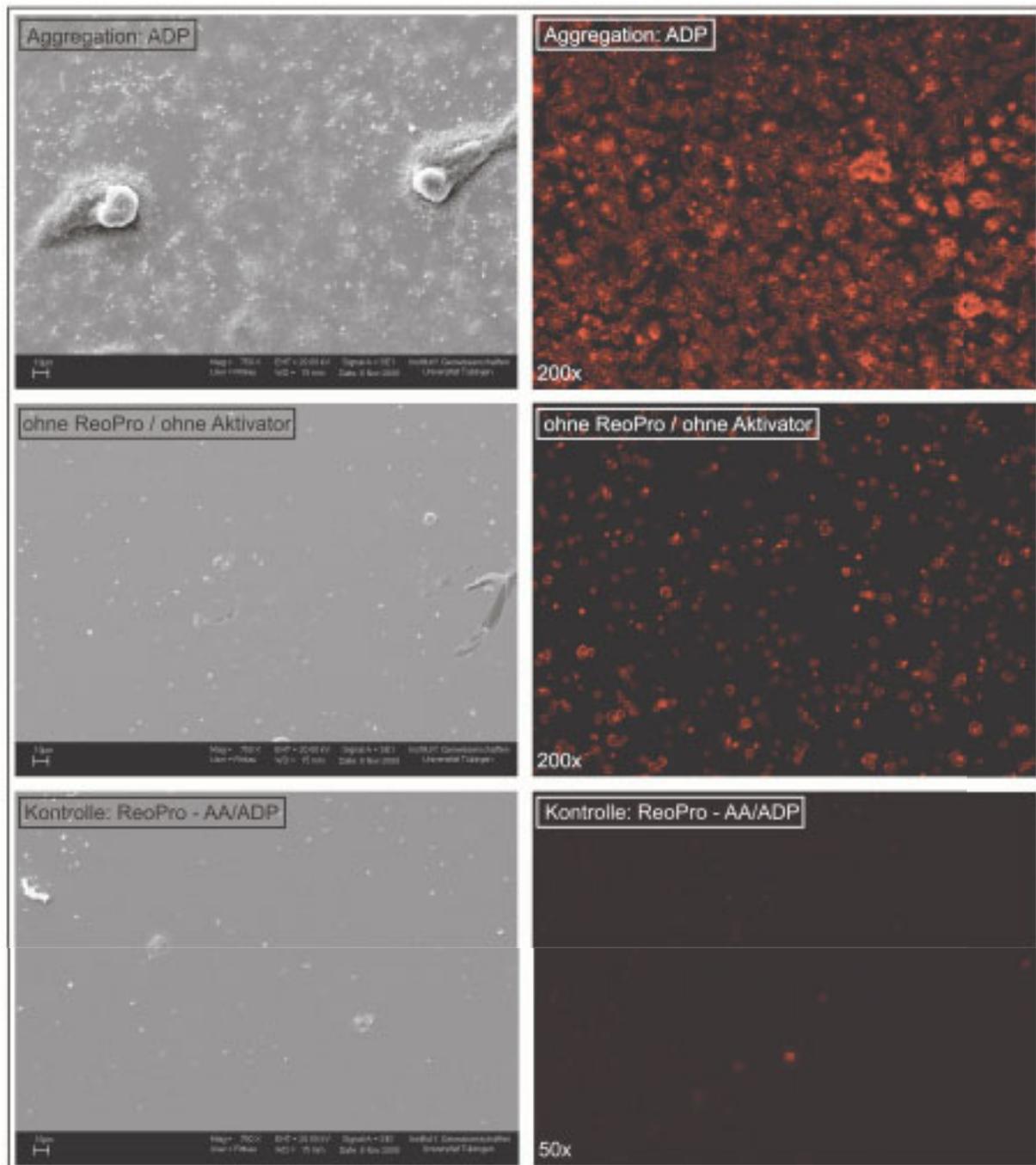


Abbildung 51: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (links) und Fluoreszenzmikroskopie (rechts) der auf den Goldoberflächen nach Durchführung der Schwingquarz-Messungen gebundenen Thrombozyten.

Die Fluoreszenzaufnahme bestätigt die gleichmäßige Verteilung der gebundenen Thrombozyten nach ADP-Aktivierung. Aufgrund der Aktivierung werden vermehrt GP IIb/IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, weshalb sich dieser Rezeptor als Aktivierungsmarker sehr gut eignet. Die hohe Intensität des Fluoreszenzsignals am Rand der flachen Thrombozyten lässt dort auf eine hohe Anzahl an Rezeptoren schließen und gewährleistet somit eine hervorragende Erkennbarkeit des Zellsreadings. Nach der Schwingquarzmessung ohne ReoPro und ohne Aktivatorzugabe sind, wie erwartet, sowohl auf der REM-Aufnahme als auch auf dem Fluoreszenzbild deutlich weniger Thrombozyten adhärirt. Da diese Thrombozyten nicht durch Zugabe eines Reagenzes aktiviert wurden, ist der Zell-Spreading-Prozess noch nicht so weit fortgeschritten. Dies stimmt mit der langsameren Kinetik des Frequenzabfalles der entsprechenden Schwingquarz-Messung überein. Desweiteren ist bei der Fluoreszenz-Aufnahme sehr gut zu sehen, dass die Thrombozyten einzeln adhärirt sind und nicht als Aggregate vorliegen. Nach der Kontrollmessung unter Verwendung des Thrombozyteninhibitors ReoPro ist sowohl auf der rasterelektronenmikroskopischen als auch auf der Fluoreszenz-Aufnahme kaum ein Thrombozyt identifizierbar. Die Ergebnisse der bildgebenden Methoden untermauern somit die Ergebnisse der Schwingquarz-Messungen: Eine große Signaländerung des Sensors nach Thrombozytenaktivierung geht mit einer starken Bedeckung der Oberfläche mit Thrombozyten einher. Die Thrombozytenadhäsion ist durch eine geringe Frequenzänderung langsamer Kinetik und nur weniger, einzeln vorliegender Thrombozyten auf der Quarzoberfläche korreliert. Findet durch Blockade des Rezeptors bei der Kontrollmessung keine Signaländerung statt, so sind auch anhand der Oberflächenuntersuchungen keine Thrombozyten zu identifizieren.

Thrombozytentests auf Polystyrol-beschichteten Schwingquarzen im Vergleich zur Born-Aggregometrie. Polystyrol-beschichtete Schwingquarze wurden ebenfalls bezüglich ihrer Eignung zur Messung der Thrombozytenfunktion überprüft. Parallel zu den Messungen mittels Schwingquarzsensoren wurden wiederum Messungen mit dem Born-Aggregometer durchgeführt, um die Ergebnisse der beiden Methoden zu korrelieren. Da sich die Ergebnisse der Born-Aggregometrie dabei nur unwesentlich von den in Abbildung 50 B bereits gezeigten Kurvenverläufen unterscheiden, wird auf eine erneute Darstellung verzichtet. Die mittels Schwingquarzsensoren erzielten Ergebnisse der Thrombozytenfunktions-Messungen sind in Abbildung 52 dargestellt.

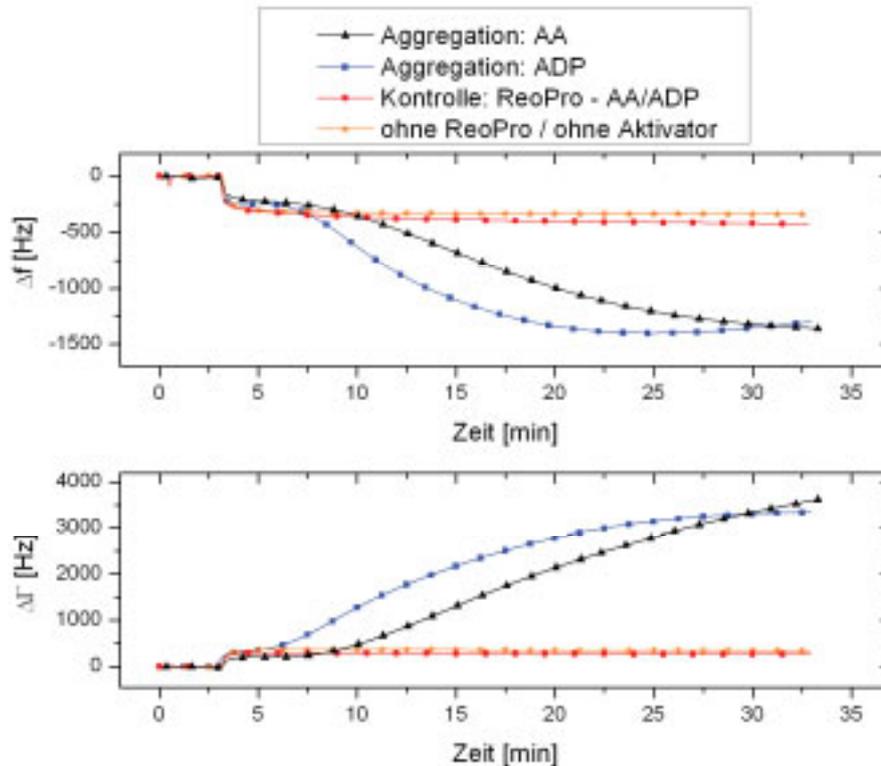


Abbildung 52: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktionsuntersuchungen auf PS-beschichteten Sensoroberflächen.

Man erkennt bei den Messungen mit aktivierten Thrombozyten wiederum deutliche Frequenzabfälle bzw. Dämpfungsanstiege von $\Delta f_{\text{Anl.}} = -1300 \text{ Hz}$ bzw. $\Delta \Gamma_{\text{Anl.}} = 3000 \text{ Hz}$. Diese deutlichen Signaländerungen sind in guter Übereinstimmung mit den Referenz-Kurven der Born-Aggregometrie. Auf den PS-beschichteten Schwingquarzoberflächen zeigt sich zudem der Effekt der unterschiedlichen Kinetik nach Aktivierung mit AA bzw. ADP noch deutlicher als auf den unbeschichteten Goldoberflächen. In guter Korrelation mit den Aggregometer-Messungen zeigen auch die Daten der Schwingquarzmessung bei Unterbindung der Thrombozytenaggregation mittels ReoPro keine Signaländerung. Ohne Zugabe von Aktivator bzw. Inhibitor kann bei der gezeigten Messung im Gegensatz zu den Goldoberflächen auf PS-Oberflächen keine Frequenz- bzw. Dämpfungsänderung festgestellt werden.

Nach den jeweiligen Schwingquarzmessungen wurden von den Oberflächen REM-Bilder aufgenommen um die Anzahl der adhärennten Thrombozyten beurteilen zu können und somit die Ergebnisse der Schwingquarzmessungen zu überprüfen (Abbildung 53).

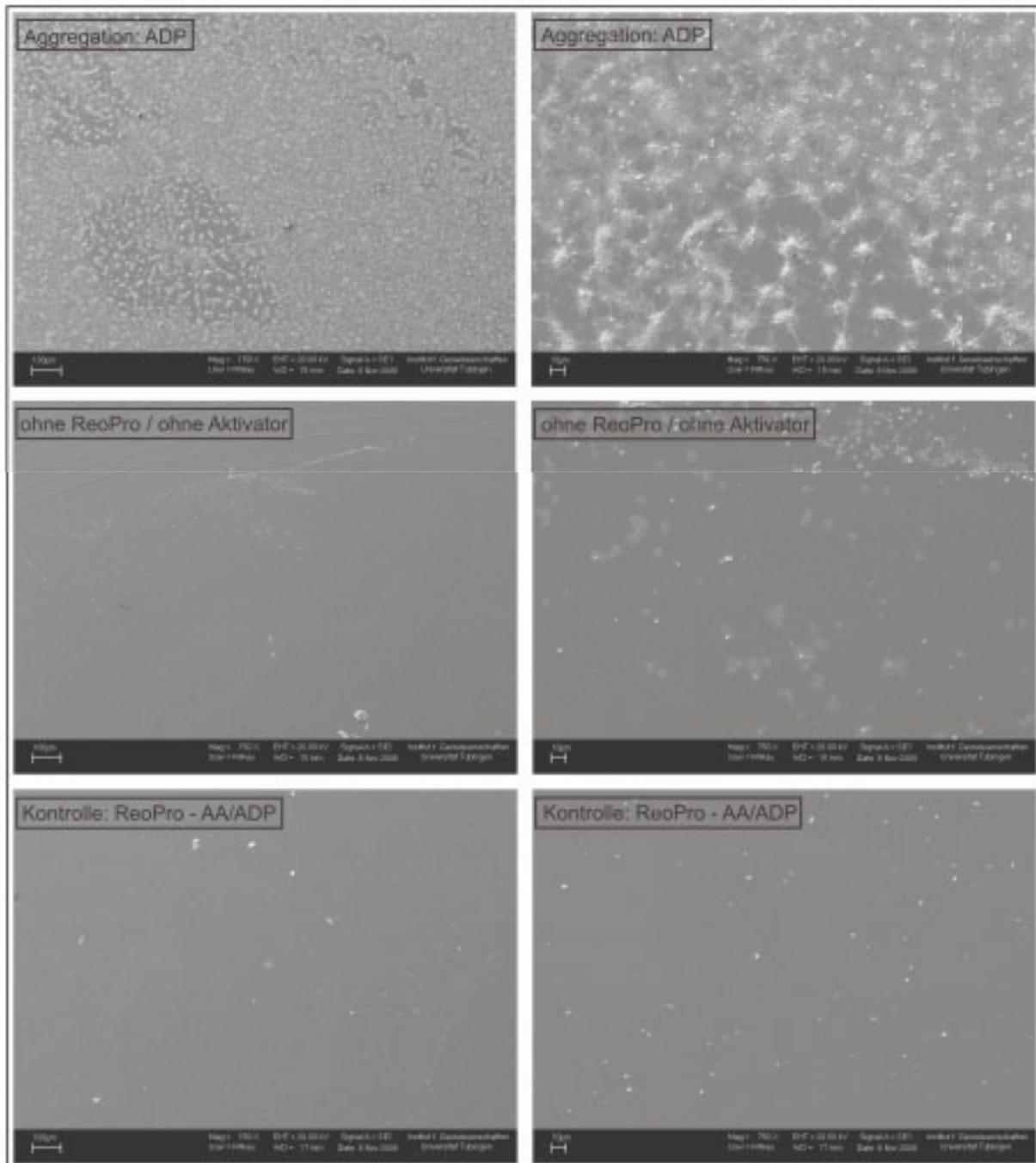


Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen der auf den PS-Oberflächen nach Durchführung von Schwingquarzmessungen adhärennten Thrombozyten.

Auf der Schwingquarzoberfläche einer Aggregationsmessung nach ADP-Aktivierung ist bis auf zwei kleinere Stellen ein dichter, homogener Teppich aus anhaftenden, kleinen Thrombozytenaggregaten zu erkennen. Auf den dünner besiedelten Flächen sind größere Thrombozytenaggregate zu sehen, die dann durch Spreading keine vollständige Bedeckung der Oberfläche bewirken. Die starke Signaländerung bei der Aggregations-Messung ist also auf eine sehr dichte Belegung der Schwingquarz-Oberfläche mit Thrombozyten zu erklären. Im Falle der Adhäsionsmessung ohne Zugabe von Aktivatoren bzw. ReoPro haben sich die Thrombozyten nur an vereinzelt Stellen am Rand des Sensors adhärirt. Dabei ist wiederum zu erkennen, dass die adhärirten Thrombozyten nahezu isoliert vorliegen und es nicht zur Ausbildung größerer Ansammlungen kommt. Die geringe Anzahl adhärirter Thrombozyten resultiert in keiner Änderung des Sensorsignals. Auf der Schwingquarzoberfläche der Kontrollmessung ist keine nennenswerte Anzahl an Thrombozyten zu finden. Auch dieses Ergebnis der Oberflächenbetrachtung stützt das sensorische Ergebnis, bei dem keine Signaländerung feststellbar war.

Thrombozytentests auf Fibrinogen-beschichteten Schwingquarzen im Vergleich mit Born-Aggregometrie. Als weitere Oberflächenbeschichtung zur Messung der Thrombozytenfunktion wurde kovalent an die Oberfläche gebundenes Fibrinogen verwendet (vgl. Kapitel 3.2.4). Da Fibrinogen in seiner physiologischen Funktion als Brückenmolekül zwischen zwei Thrombozyten dient, kann die entwickelte Fibrinogen-Oberfläche als äußerst thrombogen angesehen werden. Die Ergebnisse der verschiedenen Thrombozyten-Messungen sind in Abbildung 54 dargestellt. Bei beiden Aggregationsmessungen, egal ob die Thrombozyten mit AA oder ADP aktiviert wurden, sind Frequenzänderungen von bis zu $\Delta f_{\text{Anl.}} = -2500 \text{ Hz}$ und Dämpfungsänderungen von $\Delta \Gamma_{\text{Anl.}} = 4600 \text{ Hz}$ zu beobachten. Dies ist eine mehr als doppelt so große Frequenzänderung verglichen mit den entsprechenden Messungen auf Gold- bzw. Polystyrol-Schwingquarzen. Der stark thrombogene Charakter der Fibrinogenbeschichtung wird im Falle der Adhäsionsmessung ohne Zugabe von Aktivatoren und ohne ReoPro als Inhibitor besonders deutlich. Zwar fällt die Frequenzkurve im Vergleich zu den Aggregationsmessungen deutlich verzögert ab, nach 30 Minuten Messzeit resultiert jedoch eine ebenso starke Frequenzerniedrigung wie bei den Aggregationsmessungen. Die an die Oberfläche diffundierten Thrombozyten binden über ihren GP IIb/IIIa-Rezeptor an die Fibrinogen-Oberfläche und werden dadurch aktiviert, was zu einer weiteren Ausbreitung der Thrombozyten auf der Oberfläche führt. Allerdings laufen diese Prozesse bei der

ausschließlich Oberflächen-induzierten Aktivierung deutlich langsamer ab als bei Zugabe aktivierender Substanzen wie AA oder ADP. Bei der Kontrollmessung ändert sich das Sensorsignal nicht, da durch Vorinkubation des PRP mit ReoPro der Fibrinogen-Rezeptor der Thrombozyten geblockt wurde. Somit kann keine Aggregation und keine Anhaftung der Thrombozyten an die Fibrinogen-Oberfläche mehr stattfinden.

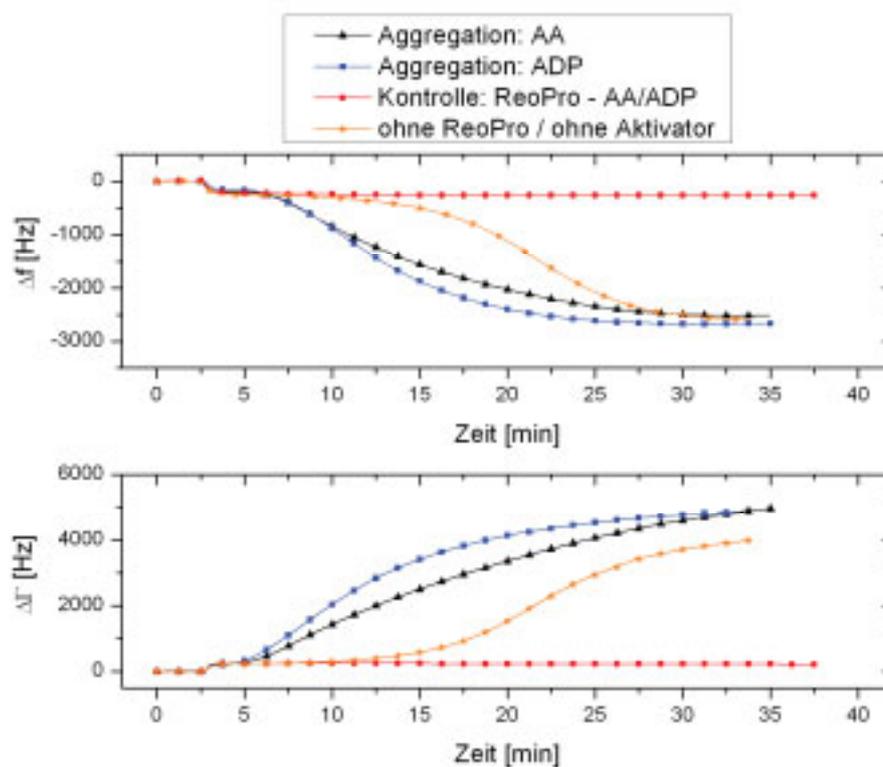


Abbildung 54: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktions-Untersuchungen auf Fibrinogen-beschichteten Sensoroberflächen.

Die in Abbildung 55 dargestellten REM-Aufnahmen zeigen die Bedeckung der Schwingquarzoberfläche mit Thrombozyten nach Abschluss der entsprechenden Messungen. Die Sensoroberfläche ist nach der ADP-aktivierten Aggregationsmessung gleichmäßig und homogen sowie fast vollständig mit kleineren Thrombozytenaggregaten bedeckt. Die direkt an der Oberfläche sitzenden Thrombozyten haben sich durch Spreading dabei flach auf der Oberfläche ausgebreitet. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch nach der Adhäsions-Messung ohne Aktivator und ohne ReoPro. Auch dort haben die Thrombozyten nahezu die gesamte Fläche bedeckt, wobei jedoch keine Anhäufungen, sondern einzelne Thrombozyten adhärirt sind. Da sowohl nach den Aggregations- als auch nach der Adhäsionsmessung die

Schwingquarzoberfläche nahezu vollständig mit flachen Thrombozyten bedeckt ist, erklärt die starke Frequenzerniedrigung von mehr als 2000 Hz, die mittels Schwingquarzsensoren bei allen drei Messungen beobachtet werden konnte.

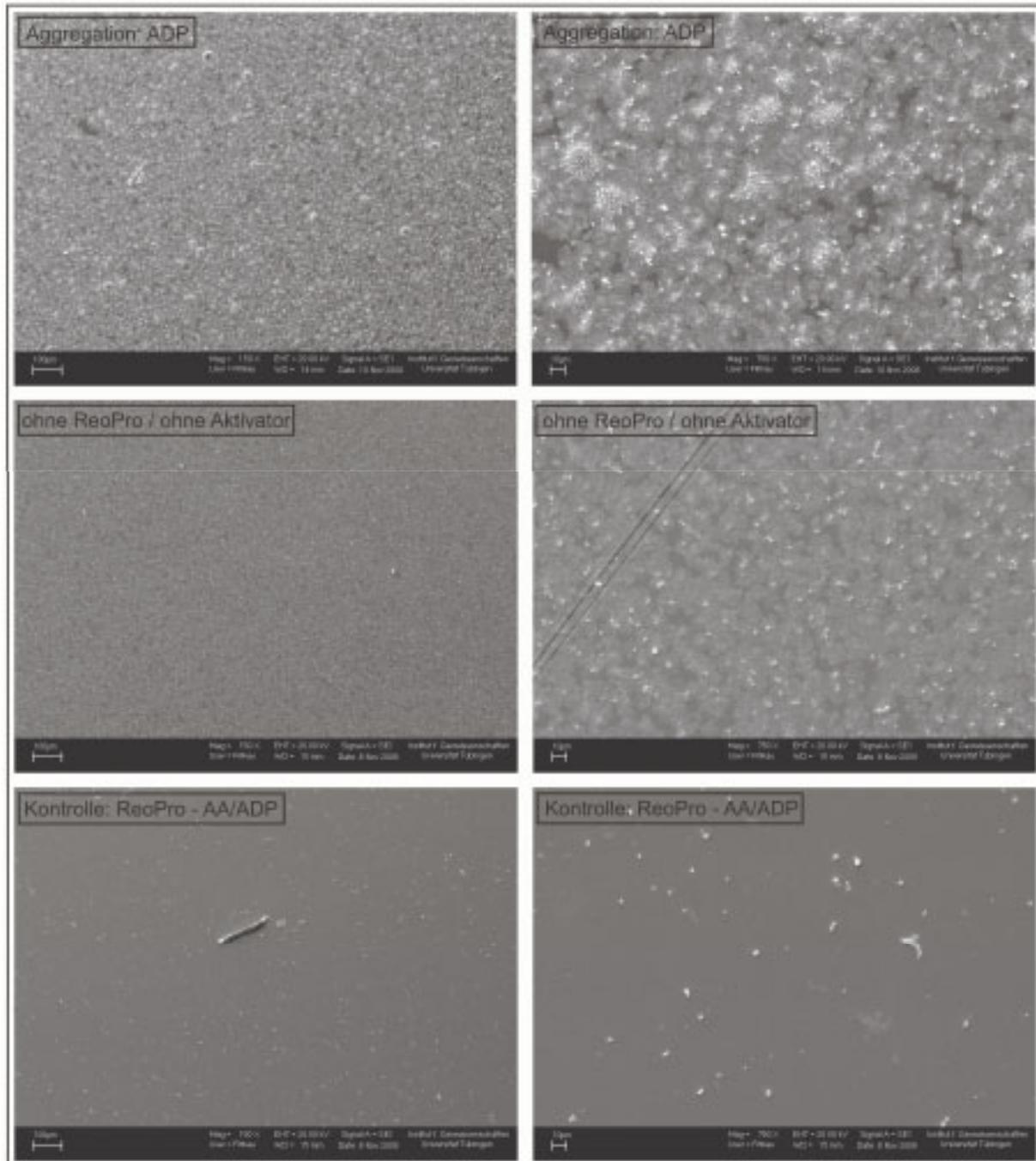


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen der auf den Fibrinogen-Oberflächen nach Durchführung von Schwingquarz-Messungen anhaftenden Thrombozyten.

Nach der Kontrollmessung sind neben kleineren Verunreinigungen nur ganz vereinzelt Thrombozyten auf der Oberfläche zu identifizieren. Durch Blockade des GP IIb/IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche kann keine Aggregation mehr stattfinden und es findet keine Anlagerung von Thrombozyten an die Fibrinogenoberfläche statt.

Vergleich der resultierenden Frequenzänderungen bei Thrombozytenaggregation auf den getesteten Sensoroberflächen. In diesem Abschnitt werden die Frequenzänderungen der Aggregationsmessungen auf unterschiedlichen Sensoroberflächen unter Verwendung funktionsfähiger Thrombozyten einander gegenübergestellt. In Abbildung 56 sind die resultierenden Frequenzänderungen jeweils nach ADP- bzw. AA-Aktivierung dargestellt. Da sich 100 Sekunden nach Aktivierung und Injektion der Probe kurzzeitig eine konstante Frequenz einstellt, wurde dieser Frequenzwert zur Berechnung der aggregationsbedingten Frequenzänderung herangezogen. Nach Ablauf von 30 Minuten wurde der zweite Frequenzwert bestimmt und die Differenz berechnet.

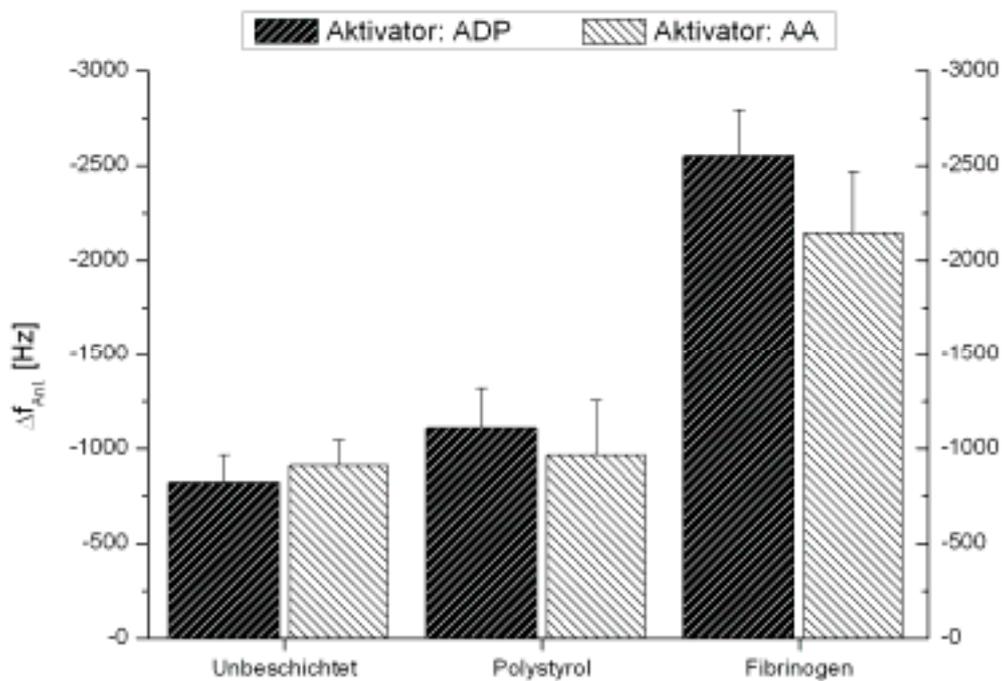


Abbildung 56: Vergleich der bei unterschiedlichen Sensoroberflächen resultierenden Frequenzänderungen nach Thrombozyten-Aggregationsmessungen ($n = 5$).

Man erkennt, dass bei den Messungen auf unbeschichteten Goldoberflächen für beide Aktivatoren die geringsten Frequenzänderungen resultieren. Auf Fibrinogenoberflächen ist die

Resonanzfrequenz-Änderung des Schwingquarzes bei stattfindender Aggregation 2,5 mal so groß wie auf Polystyrol-Oberflächen. Im Gegensatz zu den Goldoberflächen resultieren sowohl bei der PS-Beschichtung als auch bei der Fibrinogen-Beschichtung bei Verwendung von AA als Aktivator geringere Frequenzänderungen. Wie zu erwarten, ist die Standardabweichung bei den Goldoberflächen der Schwingquarze, ohne zusätzliche Beschichtung, am geringsten.

4.4.4 Nachweis der medikamentösen Thrombozyten-Schädigung durch Acetylsalicylsäure

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass mittels Schwingquarzsensoren die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten beurteilt werden kann. Es konnten deutliche Unterschiede in den Sensorsignalen aggregationsfähiger und durch die Zugabe von ReoPro nicht mehr aggregationsfähiger Thrombozyten ausgemacht werden. In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob sich mittels Schwingquarzsensoren die durch Acetylsalicylsäure (ASS) bedingte verminderte Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten nachweisen lässt. Wie in Kapitel 2.3.2 erläutert, führt die Einnahme von ASS zu einer irreversiblen Blockade der Cyclooxygenase (COX-1). Somit wird die thrombozytäre Umwandlung von Arachidonsäure in den potenten Aggregationsaktivator Thromboxan TX A₂ verhindert. Eine Aktivierung der Thrombozytenaggregation nach ASS-Einnahme ist somit durch Arachidonsäure kaum mehr möglich. Die Aggregation ist jedoch weiterhin mittels ADP aktivierbar, da ADP nicht von der COX-1 verstoffwechselt wird.

Um ASS-geschädigte Thrombozyten zu erhalten, wurden von den Spendern im Abstand von 8 Stunden drei mal eine Tablette Aspirin[®] 500 mg eingenommen. Mit der Einnahme wurde am Vortag der Messungen um 16 Uhr begonnen und Spendetermin war am Messtag um 9 Uhr, also eine Stunde nach Einnahme der letzten Tablette.

Um einen möglichst direkten Vergleich anstellen zu können, wurden sowohl intakte Thrombozyten eines Spenders als auch die ASS-geschädigten Thrombozyten eines weiteren Spenders jeweils nach Aktivierung mit ADP und Arachidonsäure gemessen.

Schwingquarzmessungen mit ASS-geschädigten Thrombozyten auf Gold-Oberflächen.

Um die Ergebnisse der auf unbeschichteten Gold-Oberflächen durchgeführten

Schwingquarzmessungen überprüfen und bewerten zu können, wurden parallel Referenzmessungen mittels Born-Aggregometrie angefertigt. Die Ergebnisse der Schwingquarz-Messungen sind in Abbildung 57 A, die der entsprechenden Messungen mit dem Born-Aggregometer in Abbildung 57 B dargestellt.

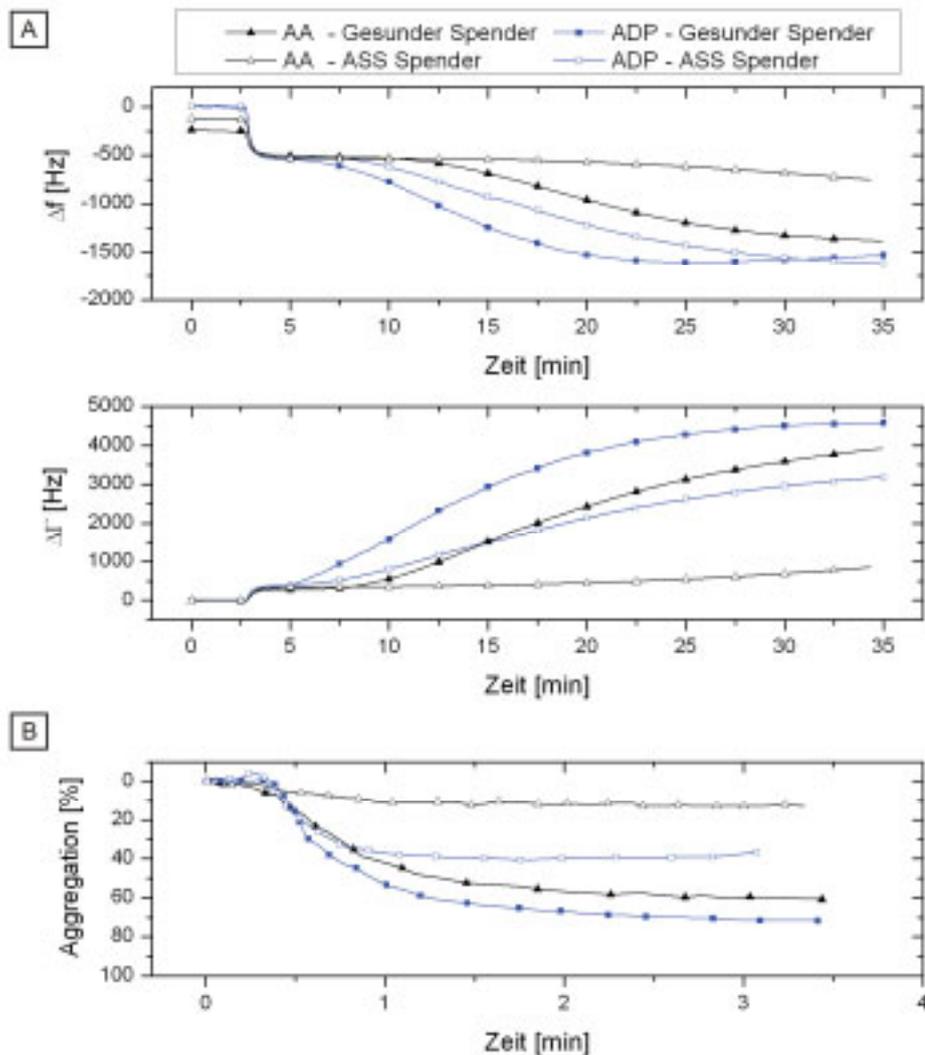


Abbildung 57: A: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktions-Untersuchungen auf unbeschichteten Goldoberflächen. B: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen [160;161].

Die Born-Methode liefert wie erwartet für die Thrombozyten des gesunden Spenders normale Aggregationswerte. Hingegen zeigen die Thrombozyten des ASS-Spenders nach Aktivierung mit ADP bereits einen deutlich erniedrigten Wert von 39 %. Die initiale Aktivierung von Thrombozyten mittels ADP führt bei intakten Thrombozyten zur Synthese und Ausschüttung

von Thromboxan und somit zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten. Da von ASS-geschädigten Thrombozyten kein Thromboxan mehr ausgeschüttet werden kann, fällt dieser wichtige Aktivierungsmechanismus weg, was sich in einer reduzierten Aggregation widerspiegelt. Der hier gemessene Wert von 39 % ist jedoch als sehr niedrig einzustufen (vgl. Abbildung 59 B und Abbildung 61 B).

Bei Durchführung der Messung mit AA als Aktivator wird eine Aggregation von nur 10 % angezeigt, was sich durch die fast vollständige Blockade der COX-1 erklären lässt. Die AA kann durch die blockierte COX-1 nicht mehr in Thromboxan umgesetzt werden und es findet somit nahezu keine Aggregation statt.

Die Schwingquarzmessungen korrelieren sehr gut mit den Resultaten der Born-Aggregometrie. Die Messungen mit den Thrombozyten des gesunden Spenders liefern nach Aktivierung mit AA bzw. ADP deutliche Frequenzänderungen von $\Delta f_{AA} = -870 \text{ Hz}$ bzw. $\Delta f_{ADP} = -990 \text{ Hz}$. Dabei ist wiederum die bereits in Kapitel 4.4.3 diskutierte unterschiedliche Kinetik zu beobachten. Die mittels ADP aktivierten, ASS-geschädigten Thrombozyten führen zu einem ähnlich großen Frequenzabfall ($\Delta f_{ASS,ADP} = -1117 \text{ Hz}$) wie die entsprechend aktivierten, intakten Thrombozyten. Anders verhält es sich nach Aktivierung der ASS-Probe mit AA: Hier ist nach 30 Minuten Messzeit nur ein Frequenzabfall von $\Delta f_{ASS,AA} = -217 \text{ Hz}$ zu verzeichnen, was auf eine geringe Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten schließen lässt. Auch hier führt der rein qualitative Vergleich der beiden Methoden zu einer guten Übereinstimmung: Ein geringer Aggregationswert nach Born korreliert mit einer nur geringen Signaländerung des Schwingquarzes.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Schwingquarze nach den entsprechenden Messungen mit ASS-Thrombozyten und ADP- bzw. AA-Aktivierung sind in Abbildung 58 zu sehen und sollen die Interpretation der Messkurven unterstützen. Wie aufgrund der starken Signaländerung erwartet, ist im Anschluss an die Messung mit ADP-aktivierten Thrombozyten unter dem Mikroskop eine sehr dichte Belegung der Oberfläche mit Thrombozytenaggregaten zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl aggregierter Thrombozyten nach AA-Aktivierung deutlich geringer, was in sehr guter Korrelation mit dem signifikant geringeren Sensorsignal der entsprechenden Schwingquarz-Messung steht.

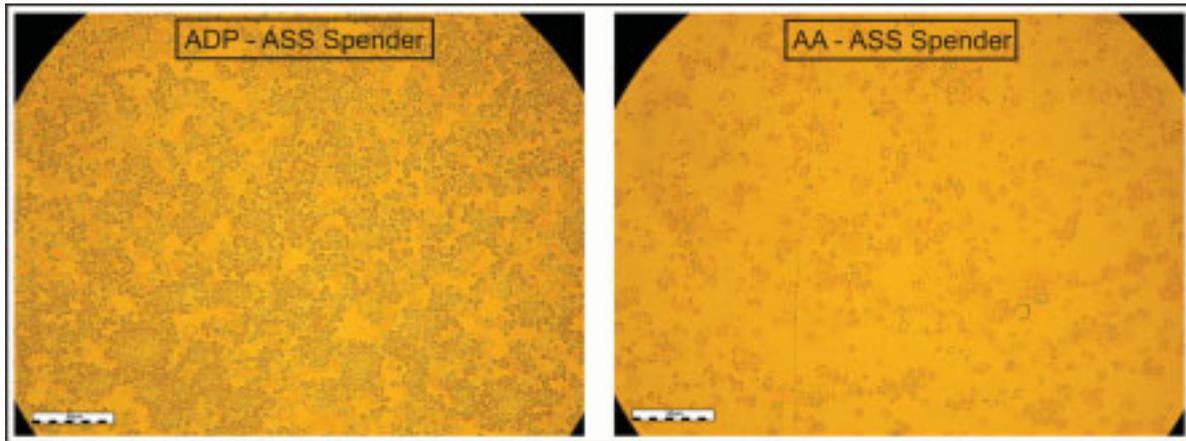


Abbildung 58: Lichtmikroskopische Aufnahmen (500-fache Vergrößerung) ASS-geschädigter Thrombozyten auf Schwingquarz-Oberflächen nach ADP-induzierter Aggregation (links) und adhärenenten, nicht aggregierten Thrombozyten nach AA-Aktivierung (rechts).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich mittels unbeschichteten Schwingquarzen anhand des Vergleichs der Frequenzsignale für ADP- bzw. AA-Aktivierung der aggregationsvermindernde Effekt von ASS auf die Thrombozyten messen lässt. In diesem Fall betrug die relative Differenz der Frequenzänderungen $\Delta f_{\text{Diff}} = \frac{\Delta f_{\text{ASS,ADP}} - \Delta f_{\text{ASS,AA}}}{\Delta f_{\text{ASS,ADP}}} \cdot 100\% = 80,6\%$.

Schwingquarzmessungen mit ASS-geschädigten Thrombozyten auf PS-Oberflächen. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Thrombozytentests mittels Schwingquarzsensoren auf PS-beschichteten Quarzen den Ergebnissen der Born-Aggregometrie vergleichend gegenübergestellt.

Die in Abbildung 59 B dargestellten Messkurven der Born-Aggregometrie zeigen im Falle des gesunden Spenders keine besonderen Auffälligkeiten, die resultierenden Aggregationswerte liegen im Normalbereich. Wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, führt die Aktivierung der ASS-geschädigten Thrombozyten mit ADP zu einer reduzierten Aggregationsfähigkeit von nur 61 %. Ein noch deutlicherer Effekt ergibt sich nach Aktivierung mit AA, hier werden aufgrund des Einflusses von ASS im Aggregometer nur 13 % Aggregation angezeigt. Die mit Thrombozyten des gesunden Spenders unter Aktivierung mittels ADP zw. AA durchgeführten Schwingquarzmessungen (Abbildung 59 A) weisen eine signifikante Signaländerung durch die stattfindende Aggregation von mehr als 1100 Hz auf.

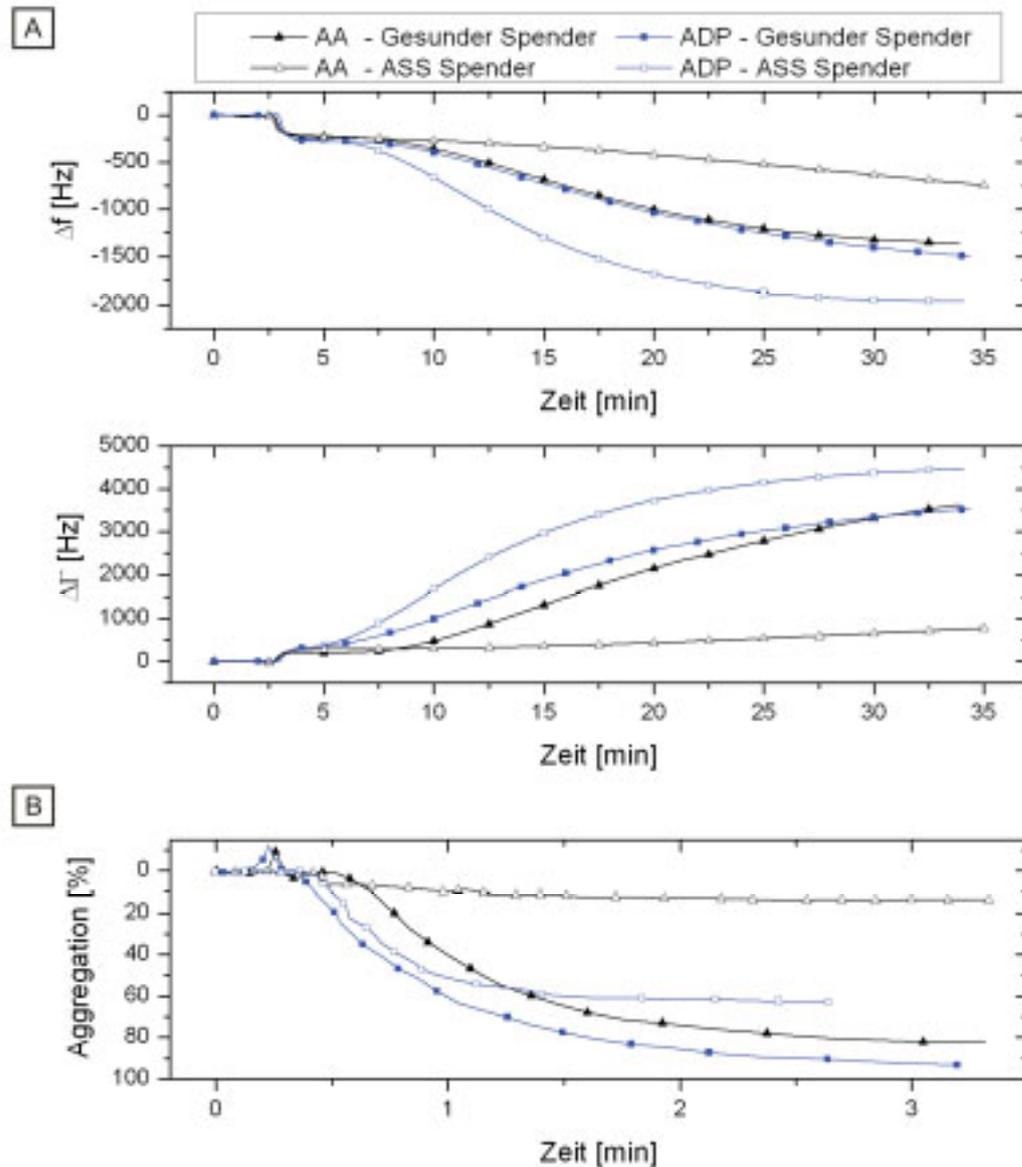


Abbildung 59: A: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktionsuntersuchungen auf PS-beschichteten Oberflächen. B: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen [160;161].

Ein deutlicher Signalunterschied ist zwischen den beiden unterschiedlich aktivierten Messungen des ASS-Spenders zu erkennen. Während die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes bei der Aggregation der Thrombozyten nach Aktivierung mittels ADP um $\Delta f_{\text{ASS,ADP}} = -1700 \text{ Hz}$ abnimmt, resultiert nach Aktivierung mittels AA nur eine Frequenzabnahme von $\Delta f_{\text{ASS,AA}} = -503 \text{ Hz}$. Dies entspricht für den Nachweis der ASS-

Wirkung auf die Thrombozyten-Aggregation einer relativen Signaldifferenz von

$$\Delta f_{\text{Diff}} = \frac{\Delta f_{\text{ASS,ADP}} - \Delta f_{\text{ASS,AA}}}{\Delta f_{\text{ASS,ADP}}} \cdot 100\% = 70,4\% .$$

Der deutliche Unterschied in den erhaltenen Frequenzsignalen wird durch die im Anschluss an die jeweiligen Messungen durchgeführten mikroskopischen Betrachtungen (Abbildung 60) untermauert. Während der Schwingquarz nach der ADP-aktivierten Aggregationsmessung sehr dicht mit flachen und aggregierten Thrombozyten belegt ist, sind auf der Oberfläche nach AA-Aktivierung deutlich weniger Thrombozyten zu erkennen. Zudem zeigen die durch Adhäsionsvorgänge gebundenen Thrombozyten nach Aktivierung mit AA aufgrund ihrer durch ASS beeinträchtigten Funktionsfähigkeit kein ausgeprägtes Zellspreading mehr.

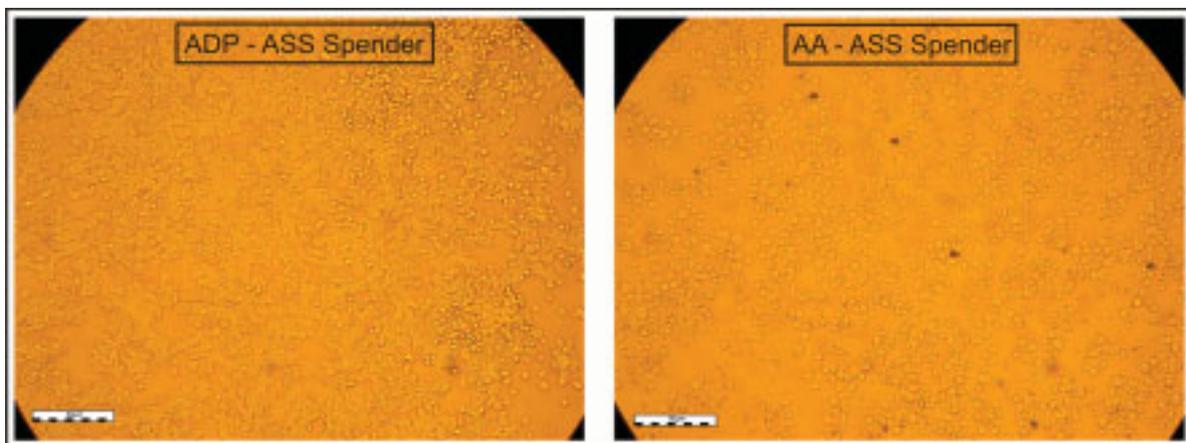


Abbildung 60: Lichtmikroskopische Aufnahmen (500-fache Vergrößerung) ASS-geschädigter Thrombozyten auf PS beschichteten Schwingquarz-Oberflächen nach ADP-induzierter Aggregation (links) und adhären, nicht aggregierten Thrombozyten nach AA-Aktivierung (rechts).

Da die Ergebnisse der Schwingquarzmessungen mit denen der Born-Aggregometrie sehr gut übereinstimmen, eignen sich mit Polystyrol beschichtete Schwingquarze sehr gut für den Nachweis der ASS-bedingten verminderten Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten.

Schwingquarzmessungen mit ASS-geschädigten Thrombozyten auf Fibrinogen-Oberflächen. Als dritte Oberfläche wurde die Tauglichkeit der Fibrinogen-Beschichtung zur sensorischen Bestimmung der verminderten Thrombozyten-Aggregationsfähigkeit untersucht. Die Ergebnisse mittels Schwingquarzsensoren und Born-Aggregometrie sind in Abbildung 61 A bzw. B dargestellt. In Analogie zu den in den vorherigen beiden Abschnitten gezeigten

Aggregometer-Messungen liegen die Aggregationswerte des gesunden Spenders nach Aktivierung mit ADP bzw. AA mit 83 % im Normbereich. Wie in Abbildung 61 B dargestellt, sind jedoch die Werte des ASS-Spenders nach Aktivierung mit ADP leicht erniedrigt (58 %) und nach Aktivierung mit AA wie erwartet stark erniedrigt (10 %).

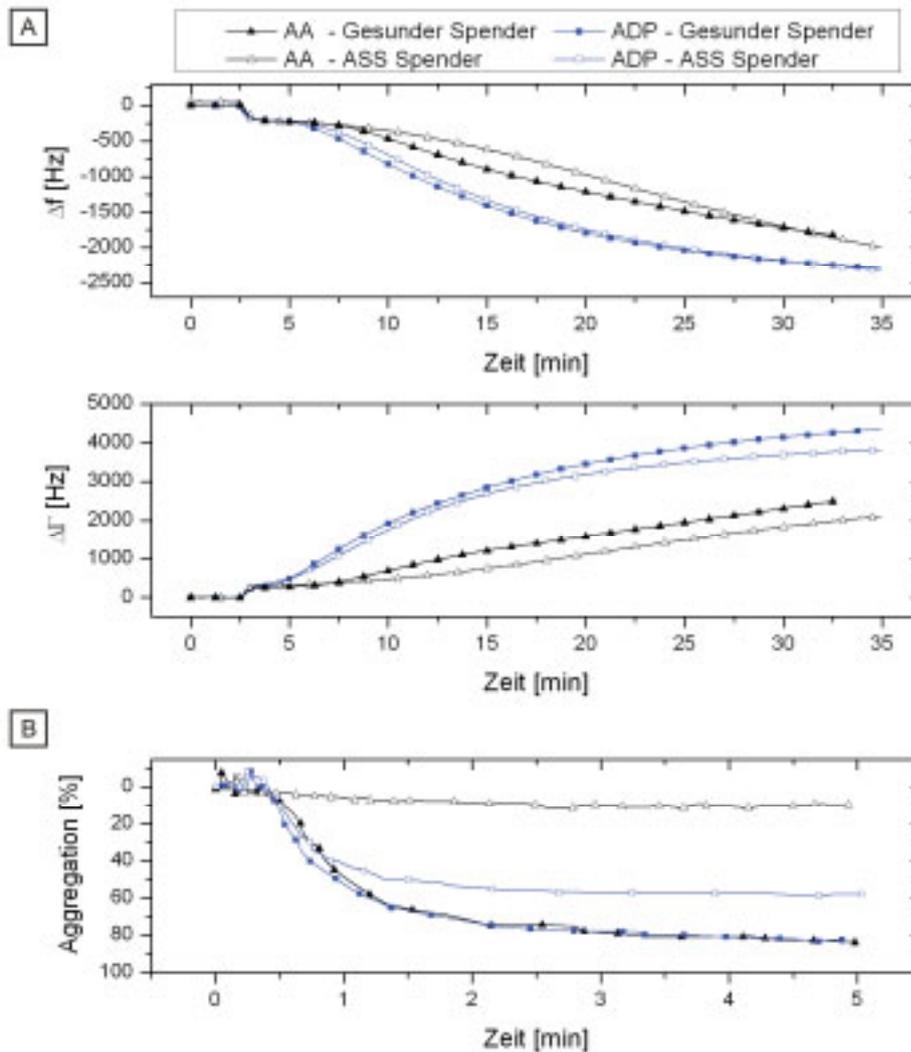


Abbildung 61: A: Zeitliche Änderungen der Resonanzfrequenz und Dämpfung der mittels Netzwerkanalysator betriebenen Schwingquarzsensoren bei Thrombozytenfunktions-Untersuchungen auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen. B: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen.

Der zeitliche Verlauf der Resonanzfrequenzen und der Dämpfung bei den Schwingquarzmessungen ist in Abbildung 61 A gezeigt. Man erkennt dabei für alle vier

Experimente einen deutlichen Frequenzabfall von mehr als 1700 Hz. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass die ASS-geschädigten Thrombozyten nach AA-Aktivierung eine ähnlich ausgeprägte Frequenzerniedrigung bewirken wie die Vergleichsmessung mit ADP-Aktivierung. Da die Thrombozyten kaum mehr zur AA-aktivierten Aggregation untereinander befähigt sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese Signaländerung des Schwingquarzes auf eine Adhäsion der Thrombozyten zurückzuführen ist. Da der GP IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten nicht direkt blockiert ist, kann eine Adhäsion nicht-aggregierter Thrombozyten an die Fibrinogen-Oberfläche weiterhin stattfinden. Eine Unterscheidung der beiden Kurven nach ADP- bzw. AA-Aktivierung ist lediglich aufgrund der unterschiedlichen Kinetik möglich: Beim Adhäsionsprozess findet die Frequenzerniedrigung deutlich langsamer statt als beim Aggregationsprozess. Die Thrombozyten sind, unabhängig vom Aggregations-Aktivator und unabhängig von ihrem funktionellen Zustand, über ihren Fibrinogen-Rezeptor in der Lage an das auf der Schwingquarzoberfläche immobilisierte Fibrinogen zu binden. Somit resultiert für all diese Untersuchungen mittels Schwingquarzen eine nahezu identische Signaländerung.

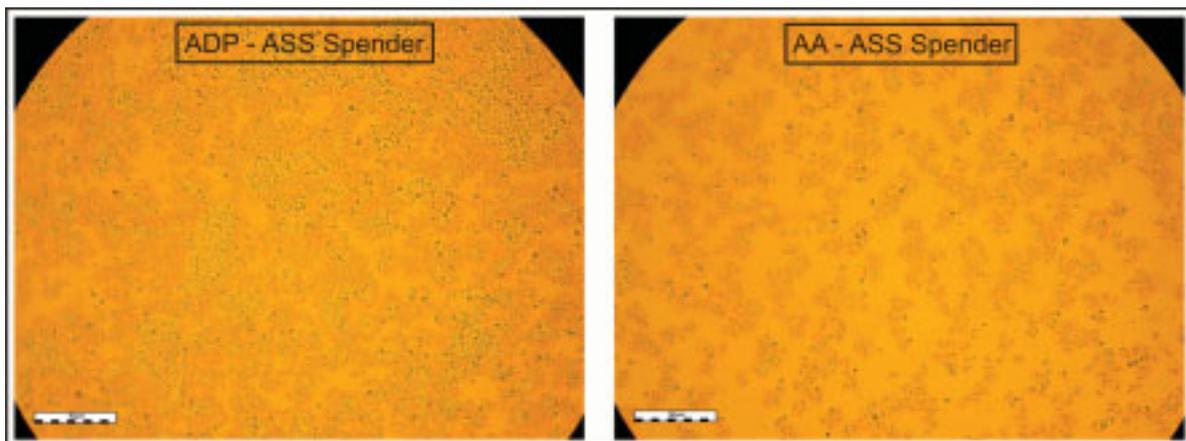


Abbildung 62: Lichtmikroskopische Aufnahmen (500-fache Vergrößerung) ASS-geschädigter Thrombozyten auf mittels Fibrinogen beschichteten Schwingquarz-Oberflächen nach ADP-induzierter Aggregation (links) und adhären, nicht aggregierten Thrombozyten nach AA-Aktivierung (rechts).

Diese Vermutung wird durch die nach den Messungen angefertigten Mikroskop-Aufnahmen der Schwingquarzoberfläche gestützt (Abbildung 62). Hier sind auf beiden Quarzoberflächen trotz ASS-Einwirkung sehr viele ausgebreitete Thrombozyten zu erkennen. Obwohl der Belegungsgrad im Falle der AA-aktivierten Messung etwas geringer ist, reicht dieser Unterschied nicht aus, um eine deutlich unterschiedliche Frequenzänderung im Vergleich zur

ADP-aktivierten Messung hervorzurufen. Zudem bestätigt das Vorliegen der einzeln und nicht als Agglomerat angelagerten Thrombozyten nach AA-Aktivierung die Vermutung, dass die Frequenzerniedrigung der entsprechenden Messung durch einen Adhäsionsprozess und nicht durch einen Aggregationsprozess hervorgerufen wurde. Um diese These weiter zu durchleuchten, wurden zusätzlich Fluoreszenzaufnahmen des markierten GP IIb/IIIa-Rezeptors angefertigt, der als Aktivierungsmarker dient (Abbildung 63).

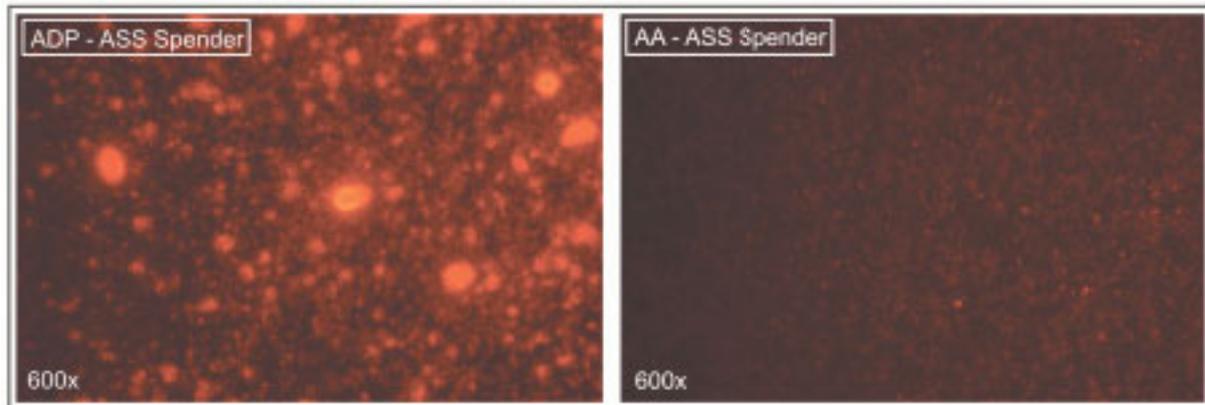


Abbildung 63: Fluoreszenzaufnahmen markierter GP IIb/IIIa-Rezeptoren von adhärenenten, ASS-geschädigten Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP bzw. AA.

Die Fluoreszenzbilder zeigen eine deutlich stärkere Aktivierung der ASS-Thrombozyten und größere Agglomerate im Falle der ADP-Aktivierung. Die Oberfläche nach AA-Aktivierung ist auch sehr dicht mit Thrombozyten besiedelt, doch sind diese einzeln und nicht als Agglomerate zu identifizieren und aufgrund ihrer geringeren Fluoreszenzintensität weniger stark aktiviert. All diese Beobachtungen belegen die Annahme, dass die mittels Schwingquarzen beobachtete Erniedrigung der Resonanzfrequenz bei AA-Aktivierung der pathologischen Thrombozyten die Folge eines Adhäsionsprozesses ist.

Aufgrund des geringen Signalunterschiedes zwischen ADP-aktivierter und AA-aktivierter ASS-Thrombozyten lässt sich zudem festhalten, dass sich Fibrinogen-beschichtete Schwingquarze aufgrund ihrer starken thrombogenen Eigenschaften nicht für den Nachweis der ASS-Wirkung auf Thrombozyten eignen.

4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde unter anderem eruiert, ob mittels Schwingquarzsensoren die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten gemessen und beurteilt werden kann.

Dazu wurden mit Gold, Polystyrol und Fibrinogen unterschiedliche Oberflächen-Beschichtungen realisiert und diese Oberflächen mittels REM, AFM und Ellipsometrie charakterisiert. Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, dass es sich bei den entwickelten Beschichtungen um sehr dünne und homogene Oberflächen handelt.

Mit diesen drei Oberflächen wurden mittels Netzwerkanalysator Schwingquarz-Messungen zur Funktionsuntersuchung intakter Thrombozyten durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der medizinischen Routinemethode, der Aggregometrie nach Born, verglichen. Hierbei konnte bei allen getesteten Oberflächen ein signifikanter Unterschied zwischen den Sensorsignalen der Aggregationsmessungen und der Kontrollmessung festgestellt werden, wobei anhand der Fibrinogen-Oberflächen die größten Signaländerungen erzielt wurden. Durch Blockade des für die Thrombozytenaggregation relevanten Rezeptors konnte ein vollständiger Funktionsverlust der Thrombozyten bezüglich ihrer Aggregation mittels Schwingquarzen nachgewiesen werden. Die erhaltenen Resultate der Schwingquarzmessungen korrelieren dementsprechend gut mit den Ergebnissen der Born-Aggregometrie. Jedoch benötigen die entsprechenden Tests mittels Schwingquarzen aufgrund der notwendigen Anlagerung der Thrombozytenaggregate an die Sensoroberfläche eine längere Messdauer. Zusätzlich konnte sensorisch die reine Thrombozytenadhäsion ohne Zugabe von Aktivierungs- oder Blockierungsreagenzien von der Thrombozytenaggregation unterschieden werden. Während dies bei Verwendung der Gold- und PS-Oberflächen anhand des Signalverlaufs und der resultierenden Frequenzänderung möglich war, konnte die Unterscheidung im Falle der Fibrinogenoberflächen nur anhand der unterschiedlichen Kinetik getroffen werden. Eine unterschiedliche Kinetik des Sensorsignals wurde ebenso auf Gold- und PS-Oberflächen bei den Aggregationsmessungen mittels unterschiedlicher Aktivatoren festgestellt. Die später einsetzende Frequenzänderung im Fall der AA-Aktivierung lässt auf die notwendige Umsetzung in das Thrombozyten-aktivierende Thromboxan schließen. Anhand von REM-Aufnahmen und Fluoreszenzmarkierungen wurden die Resultate der Schwingquarz-Analysen überprüft und untermauert.

Anschließend an die erfolgreichen Messungen mit physiologisch funktionsfähigen Thrombozyten wurden mittels Schwingquarzen auch Untersuchungen mit Thrombozyten nach ASS-Einnahme durchgeführt. Es konnte auch bei diesen pathologischen Proben auf Gold- und PS-beschichteten Schwingquarzen eine sehr gute Korrelation mit der medizinisch-klinischen Standardmethode erzielt werden. Wie auch bei den Aggregometer-Messungen zeigten die Schwingquarzmessungen der ASS-geschädigten Thrombozyten nach Aktivierung mittels AA eine signifikant geringere Signaländerung als nach ADP-Aktivierung. An die entwickelten Fibrinogen-Oberflächen können hingegen selbst die ASS-geschädigten Thrombozyten noch binden, so dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen AA bzw. ADP-aktivierter Messung nicht möglich ist. Mit Hilfe von mikroskopischen Betrachtungen im Anschluss an die Messungen konnte die Interpretation der Frequenzänderungen der Schwingquarze gestützt werden.

Schwingquarze stellen somit eine äußerst innovative und geeignete Methode zur Untersuchung und Bewertung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten dar.

4.5 Mikrofluidische Plattform für die Hämostase-Diagnostik

Im Rahmen des Gesamtprojektes HaemOrgUS wurde von den Projektpartnern Andreas Hettich GmbH & Co KG (Fa. Hettich, Tuttlingen), dem Institut für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickhard-Gesellschaft (HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen) und der Braunform GmbH (Fa. Braunform, Balingen) ein mikrofluidischer Chip für die Hämostase-Diagnostik in Vollblut entwickelt. Vorteile bei Verwendung mikrofluidischer Komponenten sind neben den deutlich geringeren Abmessungen die Reduktion des benötigten Probenvolumens. Zudem sind gerade für die medizinische Anwendung und den Kontakt mit Patientenblut die aufgrund der geringen Herstellungskosten als Einmal-Artikel eingesetzten Kunststoff-Chips äußerst attraktiv.

In den folgenden Unterkapiteln wird neben einer kurzen Darstellung des Herstellungsprozesses des mikrofluidischen Chips auch auf den realisierten Messaufbau sowie auf erste Messergebnisse unter Verwendung dieses Chips eingegangen.

4.5.1 Entwicklung eines mikrofluidischen Chips

Im Hinblick auf die sehr guten optischen Eigenschaften bezüglich Fluoreszenzmikroskopie sowie auf das am HSG-IMIT vorhandene technologische Know-How wurde als Material für den mikrofluidischen Chip Cyclo-Olefin-Copolymer (COC) verwendet. Die erforderlichen Kanalstrukturen wurden durch Heißprägen realisiert. Dazu wurde das COC knapp über die Glasübergangstemperatur erhitzt und mittels PDMS-Master die Strukturen in das heiße Material eingepreßt. Im Anschluss wurde der PDMS-Master aus dem erkalteten COC-Substrat entfernt. Um die hier vorgestellten Prototypen fluidisch kontaktieren zu können, wurden an der Oberseite des Chips Schraubgewinde eingefräst. Die Deckelung der an der Chipunterseite befindlichen mikrofluidischen Kanäle erfolgte durch Auflaminieren einer 100 µm dicken Deckelungsfolie mithilfe einer heißen Rolle. Zur Verstärkung der Deckelungsfolie wurde eine Supportfolie aus Polycarbonat mit einer Dicke von 500 µm mittels Epoxidkleber appliziert. Die Supportfolie wurde notwendig, da es durch die hohen Drücke zum Ablösen der Deckelungsfolie gekommen war.

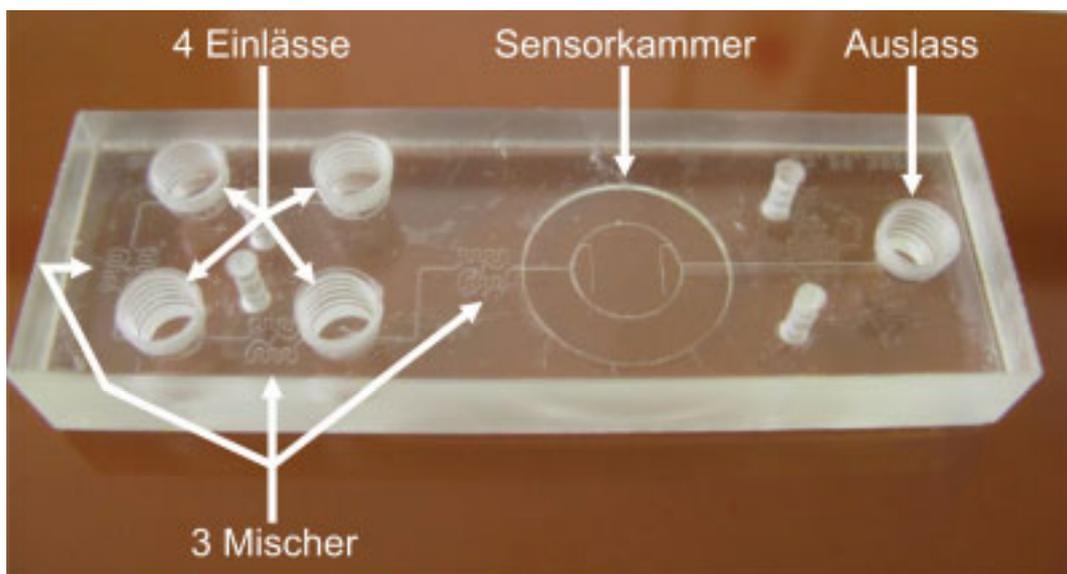


Abbildung 64: Mikrofluidischer Chip, bestehend aus vier separaten Einlässen mit Sheath-Flow-Struktur, drei Mischern, Sensorkammer zur Integration des Schwingquarzes sowie Auslass.

Der hergestellte Chip ist in Abbildung 64 dargestellt. Die Applikation der für die Messungen benötigten Reagenzien erfolgt über die vier Einlässe mit Schraubgewinde. Auf dem Chip werden die zugeführten Reagenzien vereinigt und in den entsprechenden Mischern

homogenisiert. Die homogenen Proben werden anschließend auf den in die Sensorkammer integrierten Schwingquarz transferiert und über den Auslass dem Abfall zugeführt. Die Integration des Sensors erfolgt dabei in Analogie zur makrofluidischen Anlage über die in Abbildung 25 abgebildete Schwingquarzhalterung [147].

Die Abmessungen des gesamten Chips sind mit $79 \times 11 \times 26 \text{ mm}^3$ an der Größe eines Objektträgers orientiert. Die mikrofluidischen Kanäle besitzen eine Tiefe von $100 \text{ }\mu\text{m}$, eine minimale Breite von $100 \text{ }\mu\text{m}$ und im Bereich des Auslasses eine maximale Breite von 1 mm . Das Messkammer-Volumen über dem Sensor beträgt lediglich $15 \text{ }\mu\text{l}$ im Gegensatz zu $30 \text{ }\mu\text{l}$ bei Verwendung der konventionellen Messkammer.

4.5.2 Aufbau für mikrofluidische Hämostase-Messungen mittels Schwingquarzen

Zur Durchführung erster Messungen mit dem mikrofluidischen Chip wurde der in Abbildung 65 schematisch dargestellte Aufbau verwendet. Die am weitesten vom Sensor entfernte fluidische Schnittstelle (1. Einlass) wurde zur Einleitung von Puffer mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von $200 \text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet.

Der 2. Einlass wurde bei diesem Messaufbau noch nicht benötigt und deshalb mit einem Stopfen dicht verschlossen. Unter Verwendung des Quetschventils wurde die Blutprobe aus dem Probengefäß in die Probenschleife und anschließend aus der Probenschleife über den 3. Einlass auf den Chip gebracht. Die 4. Zuleitung direkt vor dem Sensor diente der Applikation des entsprechenden Aktivatorreagenzes. Die Fließgeschwindigkeiten für die Aufgabe der Probe und des Aktivators betragen für die Gerinnungs- und Hyperfibrinolyse-Messungen jeweils $100 \text{ }\mu\text{l}/\text{min}$, um eine volumengleiche Mischung zu erhalten. Für die Thrombozytenfunktions-Messungen wurden, um dieselben Mischungsverhältnisse wie bei den Messungen ohne mikrofluidischen Chip zu erzielen, die Pumpen mit unterschiedlichen Fördergeschwindigkeiten ($180 \text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ bzw. $20 \text{ }\mu\text{l}/\text{min}$) betrieben. Je nach Fragestellung der entsprechenden Messung wurden die jeweilig beschichteten Schwingquarzsensoren in die mikrofluidische Plattform integriert. Um neben der etablierten elektronischen Sensorkontaktierung und der Thermostatisierung auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auch die Auswertelektronik und die vorhandene Software nutzen zu können, wurde der mikrofluidische Chip auf der FidgeType-Messplattform integriert und betrieben. Die vollautomatische Ansteuerung der

fluidischen Peripherie erfolgte durch die von M. WANDEL und H. DRECHSEL entwickelte Skript-Steuerung.

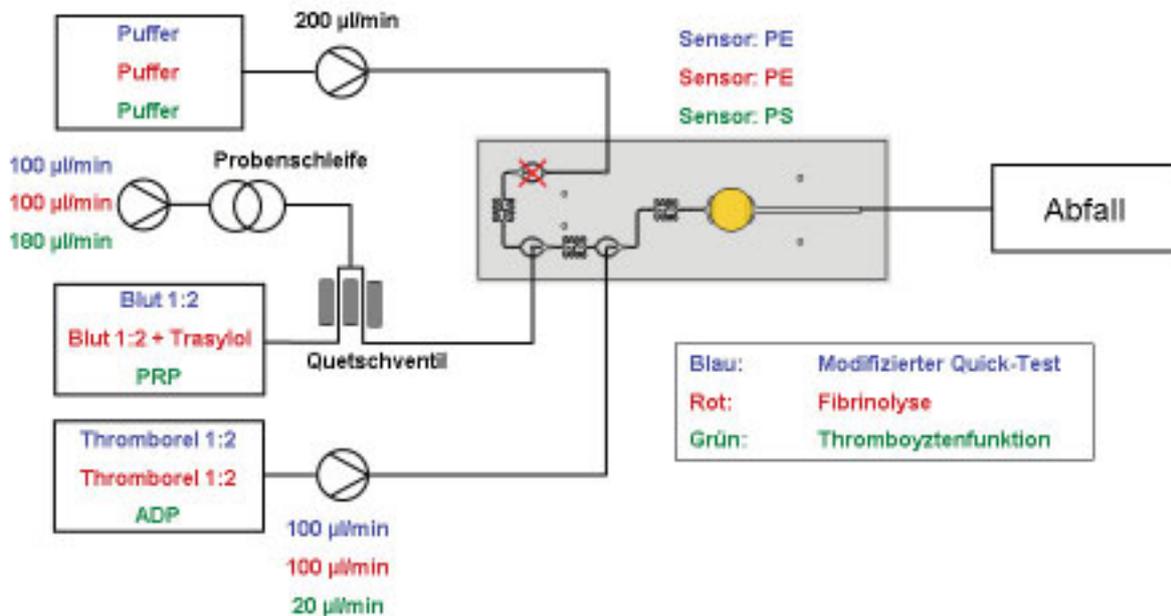


Abbildung 65: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Durchführung mikrofluidischer Messungen zur Hämostase-Untersuchung. Die für den jeweiligen Messtyp (modif. Quick-Test, Hyperfibrinolyse, Thrombozytenfunktion) verwendeten Reagenzien und Pumpraten sind entsprechend farblich dargestellt.

4.5.3 Ergebnisse der Schwingquarz-Messungen mit mikrofluidischem Chip

Mit dem in Kapitel 4.5.1 vorgestellten mikrofluidischen Chip mit automatisierter fluidischer Umgebung wurden erste Testmessungen bezüglich modifizierter Quick-Test, Hyperfibrinolyse nachweis sowie Thrombozytenfunktion durchgeführt.

Modifizierter Quick-Test. Zur Durchführung exemplarischer Gerinnungszeit-Bestimmungen bei modifizierten Quick-Tests wurde 1:2 verdünntes Vollblut sowie 1:2 verdünntes Thromborel vorgelegt (Abbildung 65). Bei der Kontrollmessung wurde das Thromborel entsprechend durch physiologischen TRIS/NaCl-Puffer ersetzt. Zu Beginn der Messung wurde ausschließlich die Pumpe zum Puffertransport betrieben, so dass eine stabile Basislinie aufgezeichnet werden konnte. Zu einem festgelegten Zeitpunkt wurde per Skriptsteuerung das

Schlauchquetschventil so geschaltet, dass die Blutprobe mit einer Fließgeschwindigkeit von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ auf den Chip strömen konnte. Zeitgleich wurde auch die Pumpe zum Thromborel-Transport mit derselben Fließgeschwindigkeit gestartet. Blutprobe und Gerinnungsaktivator werden dann im direkt vor der Sensorkammer platzierten mikrofluidischen Mischer durchmischt. Fünf Sekunden nach Start der Pumpen war der Sensor homogen mit der aktivierten Blutprobe bedeckt und nach weiteren 10 Sekunden wurden alle Pumpen gestoppt, damit der Gerinnungsprozess im Stop-Flow-Modus beobachtet werden konnte. In Abbildung 66 sind die mittels Netzwerkanalysator gemessenen Kurvenverläufe für eine Gerinnungs- und eine Kontrollmessung abgebildet.

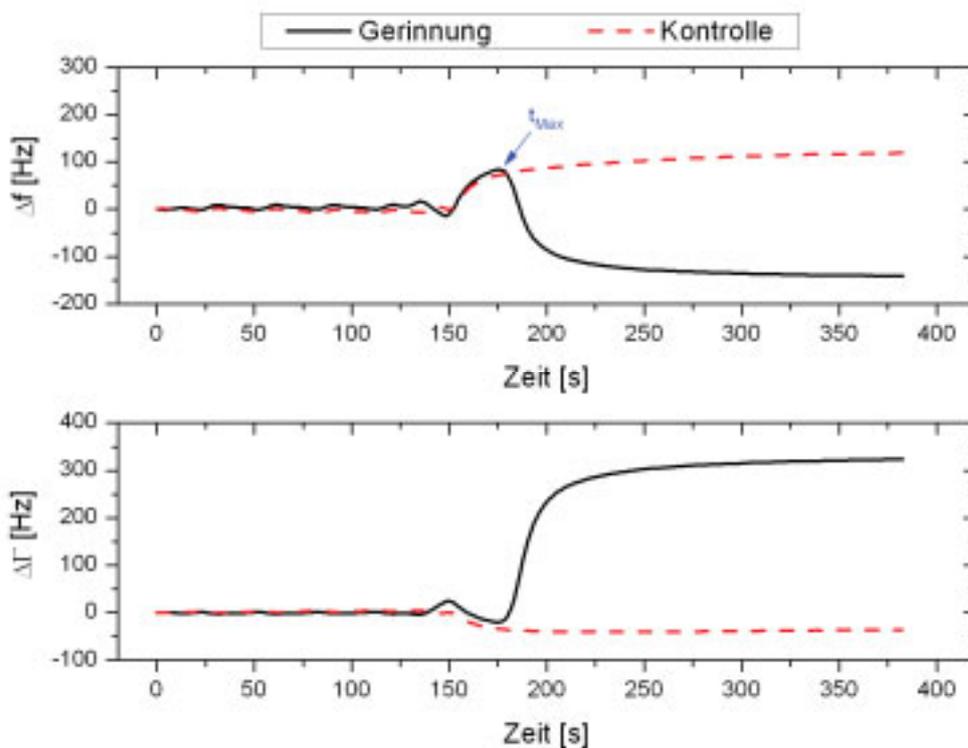


Abbildung 66: Mittels Netzwerkanalysator aufgezeichnete Signaländerung bei modifiziertem Quick-Test auf mikrofluidischem Chip mit integriertem PE-beschichteten Schwingquarz-Sensor.

Man erkennt bei der Kontrollmessung den typischen leichten Anstieg der Resonanzfrequenz, sobald sich die verdünnte Blutprobe auf dem Sensor befindet. Ebenso ist bei der Gerinnungsmessung für wenige Sekunden ein Anstieg der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes auszumachen, bis die durch den Gerinnungsprozess ausgelöste Frequenzerniedrigung einsetzt.

Etwas schwieriger gestaltet sich bei den mikrofluidischen Messungen die Bestimmung der Gerinnungszeit. Dabei liegt das Problem nicht in der Bestimmung des Endpunktes, also des Frequenzmaximums, sondern in der exakten Bestimmung des Startpunkts der Gerinnung. Man benötigt 5 Sekunden, bis der Sensor mit der aktivierten Blutprobe bedeckt ist. Unter der Annahme, dass die Verweildauer der Probe an jedem Punkt des Sensors identisch ist, kann man folgern, dass die sich zum Zeitpunkt des Pumpenstopps auf dem Sensor befindende Probe bereits 5 Sekunden zuvor gemischt worden und somit auch die Gerinnung 5 Sekunden zuvor gestartet worden war. Die mittels Schwingquarz bestimmte Gerinnungszeit unter Verwendung des mikrofluidischen Chips t_{QCM} berechnet sich also durch:

$$t_{\text{QCM}} = (t_{\text{Max}} - t_{\text{Pumpenstopp}}) + 5\text{s}$$

Für die in Abbildung 66 dargestellte Messung ergibt sich somit $t_{\text{QCM}} = 35\text{ s}$. Mit dem Koagulometer-Wert von $t_{\text{Koag}} = 23\text{ s}$ entspricht dies einer relativen Abweichung von 52,2 %. Als Erklärung für diese deutliche Abweichung kommt neben der eventuell nicht vollständig homogenen Sensorbedeckung vor allem die eventuell nicht exakt volumengleiche Mischung von Blut und Aktivator in Betracht. Ein nur minimal zu hoher Anteil an Blut im Vergleich zum Gerinnungsaktivator Thromborel führt bereits zu einer erheblichen Verlängerung der Gerinnungszeit.

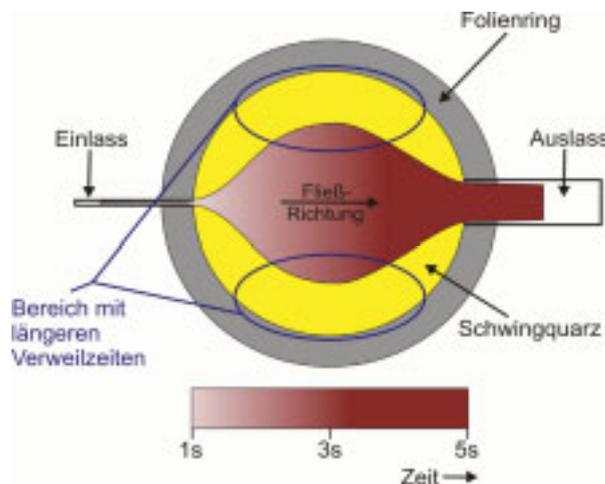


Abbildung 67: Schematische Darstellung der Verhältnisse auf dem Schwingquarzsensoren bei mikrofluidischen Gerinnungsmessungen. Die Bereiche mit längeren Verweilzeiten der aktivierten Blutprobe sind markiert. Der unterschiedliche Fortschritt des Gerinnungsprozesses soll durch den Farbverlauf der Blutprobe verdeutlicht werden.

Des Weiteren muss diskutiert werden, ob die Annahme der gleichen Verweilzeiten an allen Punkten der Sensoroberfläche gewährleistet ist. Man muss davon ausgehen, dass die Strömung im Bereich des Sensors zwischen Eingang und Auslass der Sensorkammer höher ist als an den Sensorrändern (Abbildung 67). Die daraus resultierende längere Verweilzeit der Probe an den Sensorrändern kann für einen ersten Ansatz jedoch vernachlässigt werden, da dort auch die Sensitivität des Sensors geringer ist. Ein weiterer Aspekt ist der in Strömungsrichtung unterschiedliche Aktivierungsgrad der Probe. Die sich bereits in der Nähe des Sensorkammer-Ausgangs befindliche Blutprobe wurde wenige Sekunden früher mit Aktivator gemischt und ist somit im Gerinnungsprozess weiter fortgeschritten als die sich noch am Eingang der Sensorkammer befindliche Probe (Abbildung 67).

Nachweis hyperfibrinolytischer Störungen. Der in Abbildung 65 dargestellte Messaufbau wurde ebenso für die Messungen zum Hyperfibrinolyse-Nachweis verwendet (Abbildung 68).

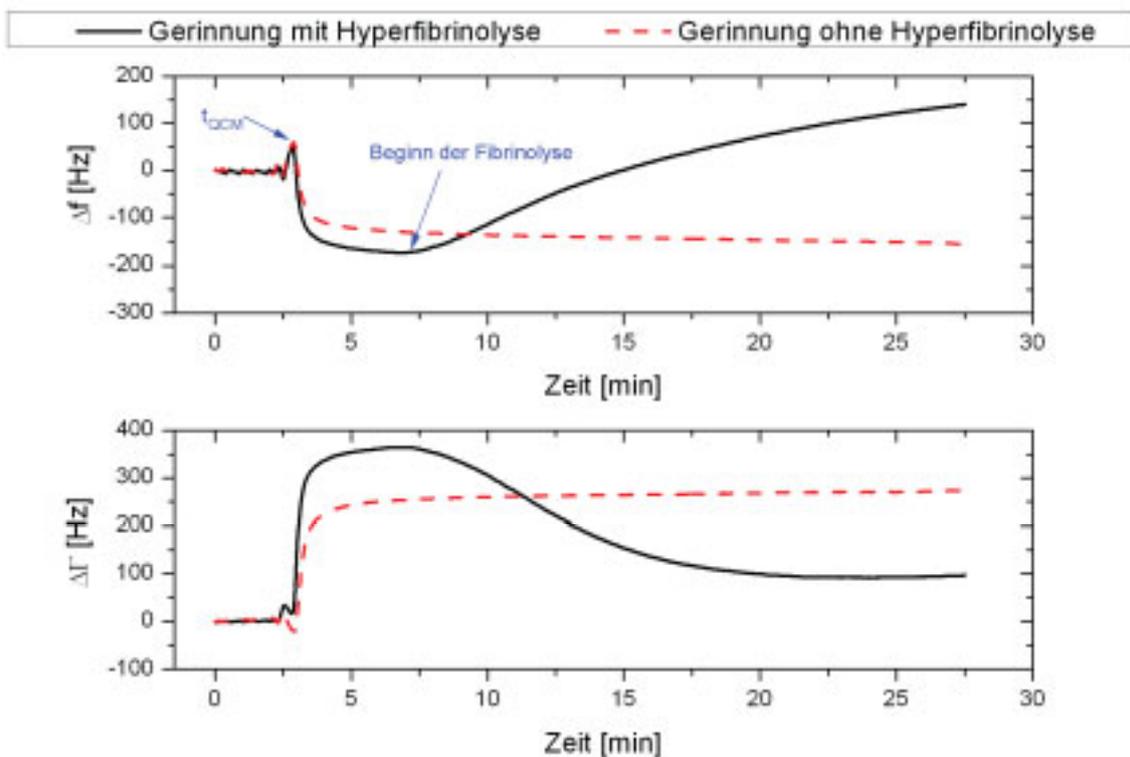


Abbildung 68: Mittels Netzwerkanalysator aufgezeichnete Signaländerung bei Messungen zum Nachweis induzierter hyperfibrinolytischer Störungen unter Verwendung des mikrofluidischen Chips mit integriertem PE-beschichteten Schwingquarz-Sensor.

Um eine Hyperfibrinolyse zu simulieren wurden vor der Messung 10 µl 1:10 verdünnte Actilyse zu 500 µl der 1:2 verdünnten Blutprobe zugegeben. Im Falle der Kontrollmessung ohne Hyperfibrinolyse wurde der Blutprobe zusätzlich 10 µl unverdünntes Trasylool zur Antagonisierung der Actilyse hinzugefügt. Nach Aufnahme der Basislinie mit Puffer wurden wie schon im vorigen Abschnitt beschrieben die Blutprobe und der Gerinnungsaktivator Thromborel zeitgleich auf den Chip gegeben und auf den Sensor transferiert.

Die resultierenden Frequenz- und Dämpfungswerte der Hyperfibrinolyse- und Kontrollmessung sind in Abbildung 68 abgebildet. Man erkennt bei beiden Messungen sehr schön den durch die stattfindende Gerinnung bedingten Abfall der Resonanzfrequenz. Im Unterschied zur Kontrollmessung, bei der fibrinolytische Aktivitäten aufgrund der Trasylool-Zugabe unterdrückt sind, erfolgt bei der Hyperfibrinolyse-Messung bereits ca. 5 Minuten nach stattgefundener Gerinnung ein Frequenzanstieg bzw. eine Dämpfungsabnahme. Diese Signaländerung ist auf die induzierte Hyperfibrinolyse und die damit verbundene Auflösung des gebildeten Gerinnungsclots zurückzuführen. Dies geht mit einer Erniedrigung der Viskosität der Probe auf dem Sensor einher und resultiert somit in einem Anstieg der Resonanzfrequenz bzw. einer Abnahme der Dämpfungswerte des Schwingquarzes.

Somit konnte exemplarisch gezeigt werden, dass auch unter Verwendung der mikrofluidischen Plattform ein Nachweis hyperfibrinolytischer Störungen mittels Schwingquarzen erbracht werden kann.

Überprüfung der Thrombozytenfunktion. Auf dem mikrofluidischen Chip wurde exemplarisch auch die Fragestellung nach der Thrombozytenfunktion untersucht. Als Probenmaterial wurde dabei PRP^{300k} funktionsfähiger Thrombozyten und als Aktivator ADP eingesetzt. Um anhand der automatischen Steuerung das erwünschte Mischungsverhältnis an PRP^{300k} und ADP (180 µl zu 20 µl) realisieren zu können, wurde zur Probenaufgabe die Pumpe für PRP^{300k} mit 180 µl/min und die Pumpe für ADP mit 20 µl/min betrieben. Anschließend an die homogene Befüllung der Sensorkammer wurden beide Pumpen nach 25 Sekunden abgeschaltet und die Thrombozytenaggregation im Stop-Flow gemessen. Im Falle der Kontrollmessung wurden die Thrombozyten 5 Minuten vor der Messung mit ReoPro inkubiert um eine Thrombozyten-Aggregation zu unterbinden. Die Ergebnisse der Schwingquarzmessungen mit der mikrofluidischen Plattform sind in Abbildung 69 dargestellt.

Analog zu den in Kapitel 4.4.3 vorgestellten Messungen mit der makrofluidischen Messkammer resultiert auch bei dem in den mikrofluidischen Chip integrierten PS-beschichteten Schwingquarz im Falle der Kontrollmessung keine Signaländerung. Die Thrombozyten werden durch den ReoPro-Antikörper an einer Aggregation gehindert und sind aufgrund dessen nicht in der Lage an den Schwingquarz zu binden. Dies wird auch anhand der im Anschluss an die Messung durchgeführte mikroskopische Betrachtung der Schwingquarzoberfläche deutlich.

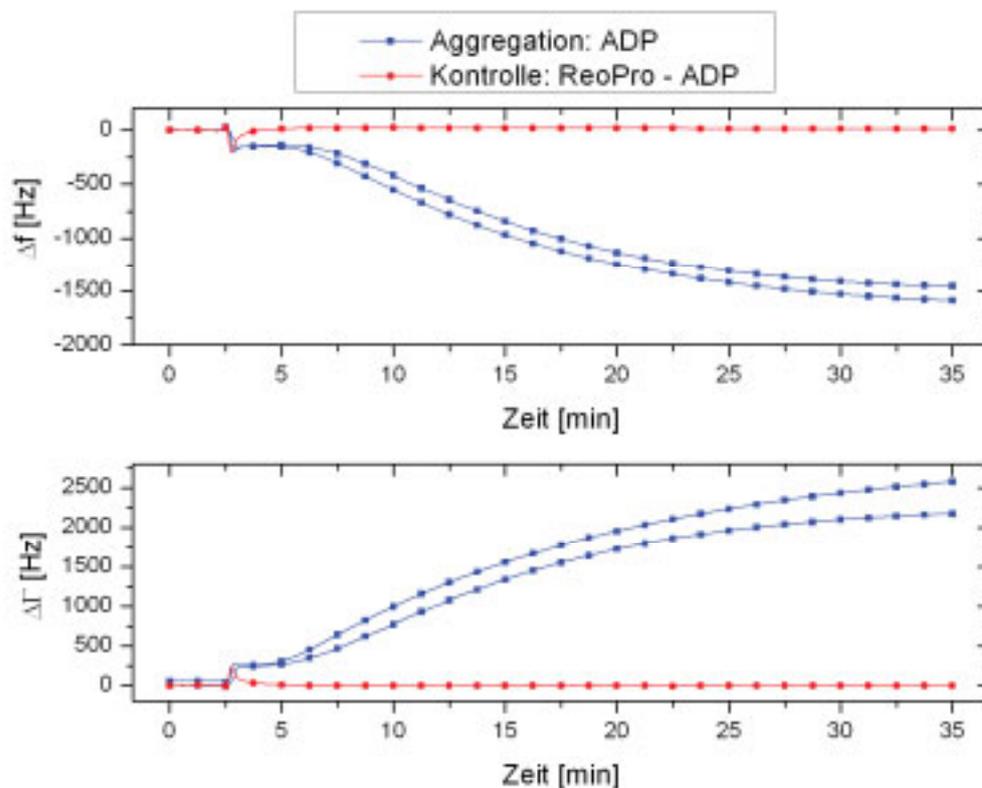


Abbildung 69: Mittels Netzwerkanalysator aufgezeichnete Signaländerung bei Messungen zur Thrombozytenfunktion unter Verwendung des mikrofluidischen Chips mit integriertem PS-beschichteten Schwingquarz-Sensor.

Im Gegensatz dazu werden bei den Aggregationsmessungen nach ADP-Aktivierung deutliche Signaländerung in Frequenz und Dämpfung beobachtet. Die in der mikrofluidischen Plattform auf PS-beschichteten Sensoren erzielten Frequenzänderungen liegen im Bereich der Frequenzänderungen ohne mikrofluidischen Chip (vgl. Abbildung 56). Auf der Schwingquarzoberfläche ist nach der Messung eine homogene und dichte Belegung mit Thrombozytenaggregaten zu erkennen.

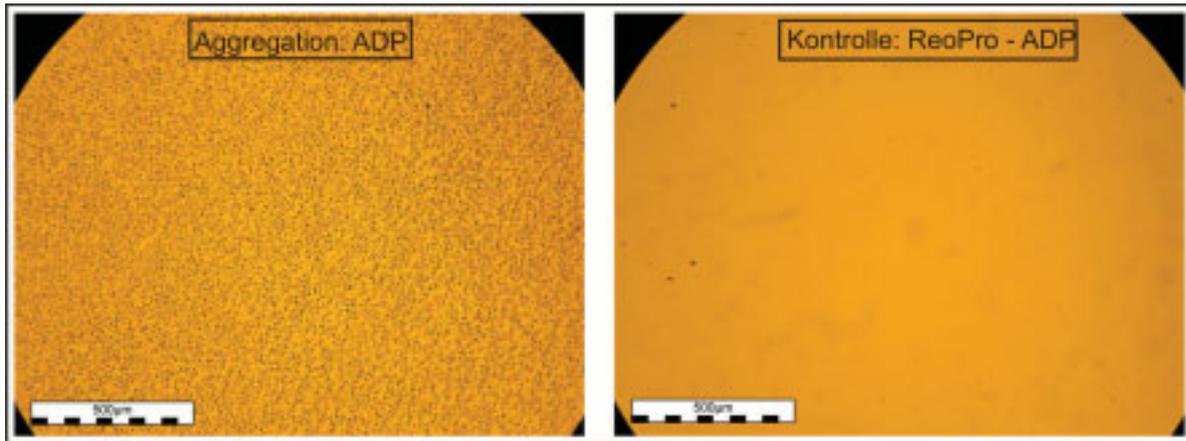


Abbildung 70: Lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der PS-beschichteten Schwingquarz-Oberflächen mit adhärenenten Thrombozyten nach ADP-Aktivierung (links) und ohne angelagerte Thrombozyten nach der Kontrollmessung mit ReoPro (rechts).

Die Verwendung des mikrofluidischen Chips hat also keinen negativen Einfluss auf die Durchführbarkeit sowie die Ergebnisse der Thrombozytenfunktions-Untersuchungen mittels Schwingquarzen.

4.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Verlauf des Forschungsprojektes wurde von den Projektpartnern Fa. Hettich, HSG-IMIT und Fa. Braunform eine mikrofluidische Plattform für Hämostase-Untersuchungen in Vollblut mittels Schwingquarzen entwickelt. Der Fa. Hettich gelang die Integration des mikrofluidischen Chips in die bereits vorhandene Schwingquarz-Anlage FidgeType. In Zusammenarbeit mit A. STERCK (Fa. Hettich) wurde ein fluidischer Aufbau zur vollautomatischen Durchführung erster Funktionstests des Chips realisiert.

Die Messungen modifizierter Quick-Tests zeigten keine signifikanten Veränderungen im Signalverlauf, verglichen mit Messungen ohne mikrofluidischen Chip. Lediglich die bestimmten Gerinnungszeiten weichen von denen der Koagulometrie stärker ab. Die genaue Korrelation zwischen Gerinnungszeiten unter Verwendung des Chips und denen der medizinischen Standardmethode müssen durch weitere Messdaten generiert werden.

Ebenso konnten auf dem mikrofluidischen Chip erfolgreich Messungen zur Identifikation hyperfibrinolytischer Störungen durchgeführt werden. Die im Anschluss an den

Gerinnungsprozess stattfindende Frequenzerhöhung sowie Dämpfungserniedrigung lässt auf Auflösungsvorgänge des gebildeten Gerinnungsclots schließen.

Unter Verwendung des mikrofluidischen Chips wurden auch erste Messungen zur Thrombozytenfunktion vorgenommen. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Messungen unter Verwendung der makrofluidischen Messkammer ein identischer Signalverlauf. Die Ergebnisse des Schwingquarzsensors konnten im Anschluss an die Messungen durch mikroskopische Betrachtungen der Sensoroberflächen untermauert werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Neben der Zielsetzung und den zentralen Ergebnissen dieser Dissertation wird im Folgenden auch ein Ausblick auf weitere relevante Forschungsfelder im Bereich der Hämostase-Diagnostik mittels Schwingquarzen gegeben.

Als Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sollten klinische Routinetests zur Untersuchung des hämostaseologischen Systems auf die Schwingquarzensensorik übertragen, durchgeführt und im Vergleich zu den medizinischen Standardmethoden bewertet werden. Dabei sollten die bei der Hämostase essentiellen Prozesse der Blutgerinnung und Fibrinolyse sowie die Funktion der Thrombozyten mittels Schwingquarzen erforscht werden.

Um die bei der Blutgerinnung stattfindende Viskositätsänderung isoliert von unspezifischen Massenlagerungen durch Protein- oder Zelladsorption nachweisen zu können, wurden verschiedene Oberflächen entwickelt und getestet. Zwar wurde mit der StarPEG-Oberfläche eine Beschichtung mit optimalen protein- und zellabweisenden Eigenschaften realisiert, doch war auf diesen stark hydrophilisierten Schwingquarzoberflächen keine eindeutige Identifizierung von Gerinnungsvorgängen möglich. Unterschiedliche Signalverläufe von Kontroll- und Gerinnungsmessungen konnten erst durch die Verwendung mittels Polyethylen hydrophob beschichteter Schwingquarze erzielt werden. Die Inkubation der Polyethylen-beschichteten Sensoren mit Vollblut resultierte in veränderten Sensorsignalen, aus denen Gerinnungszeiten direkt bestimmt werden konnten. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich sowohl mittels Netzwerkanalysator als auch mittels Oszillatorschaltung Gerinnungszeiten in Vollblut ermitteln lassen, die in sehr guter Korrelation zu der etablierten medizinischen Methode der Koagulometrie stehen. Auf vorinkubierten, Polyethylen-beschichteten Schwingquarzoberflächen ließ sich neben der Viskositätserhöhung bei der Gerinnungsbildung auch die Viskositätsabnahme bei der induzierten, hyperfibrinolytischen Auflösung des Gerinnsels nachweisen. Als Referenzmethode zu den Schwingquarzmessungen wurde bei den Hyperfibrinolyse-Untersuchungen die Rotations-Thrombelastometrie herangezogen, wobei sich zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden eine gute Übereinstimmung ergab. Die Massensensitivität der Schwingquarze wurde genutzt um die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten in plättchenreichem Plasma zu messen und zu beurteilen. Auf den entwickelten Gold-, Polystyrol- und Fibrinogen-Beschichtungen ließ sich aufgrund der angelagerten Thrombozytenaggregate im Falle der Positivprobe eine signifikante

Frequenzerniedrigung feststellen. Bei den Kontrollmessungen wurde durch Blockade des für die Thrombozytenaggregation relevanten Rezeptors ein vollständiger Funktionsverlust der Thrombozyten induziert, was keine Anlagerung von Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche und somit keine Frequenzerniedrigung zur Folge hatte. Diese Ergebnisse wurden durch den Vergleich mit der in medizinischen Labors etablierten Born-Aggregometrie und der Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen validiert. Des Weiteren konnte anhand des Sensorsignals die reine Thrombozytenadhäsion ohne Zugabe von Aktivierungs- oder Blockierungsreagenzien von der Thrombozytenaggregation unterschieden werden. Zudem wurden Untersuchungen mit durch Acetylsalicylsäure geschädigten Thrombozyten durchgeführt. Bei diesen Messungen konnten in guter Übereinstimmung mit der Born-Aggregometrie durch Verwendung der verschiedenen Aktivatoren Arachidonsäure und Adenosindiphosphat der schädigende Effekt von Acetylsalicylsäure auf Thrombozyten nachgewiesen werden. Um die Funktionalität der im Rahmen des Verbundprojektes HaemOrgUS entwickelten mikrofluidischen Plattform mit integriertem Schwingquarzsensoren zu überprüfen, wurden exemplarisch zu allen untersuchten Fragestellungen (Gerinnung, Fibrinolyse, Thrombozytenfunktion) Messungen vorgenommen. Dabei ergab sich für alle Testmessungen mit dem mikrofluidischen Chip ein identischer Signalverlauf wie unter Verwendung der makrofluidischen Messkammer.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse demonstrieren das enorme Potenzial der Schwingquarzsensoren im Bereich der hämostaseologischen Diagnostik. Denkbar ist für die Zukunft die Etablierung weiterer in Vollblut durchführbarer, wichtiger Gerinnungstests wie die „aktivierte partielle Thromboplastinzeit“ (aPTT) oder die „aktivierte Gerinnungszeit“ (ACT). Ein ebenso wichtiger, klinischer Parameter ist die in plättchenarmem Plasma durchgeführte „Fibrinogenbestimmung nach Clauss“. Dort wird die thrombinabhängige Fibrinbildung anhand der Zeit bis zur Bildung des Gerinnsels bestimmt und daraus die Konzentration an Fibrinogen bestimmt. Parallel zu diesem Test auf die Fibrinogen-Wirksamkeit wäre die Entwicklung eines Affinitätssensors für die Detektion der im Plasma vorhandenen Fibrinogenmenge ein innovativer Ansatz. Die Diagnostik fibrinolytischer Vorgänge könnte anhand Antikörper-basierter Immunosensoren zum Nachweis der nach der Fibrinolyse in hoher Konzentration im Plasma vorhandenen Fibrinogenspaltprodukte (vor allem D-Dimere) außerordentlich verbessert werden. Im Bereich der Thrombozytendiagnostik stehen mit dem Nachweis der medikamentösen Beeinflussung der Thrombozyten durch das

Medikament Clopidogrel[®] oder dem Screening nach Thrombozytendefekten wie dem Glanzmann-Naegli-Syndrom weitere diagnostisch enorm wichtige Themengebiete zur Bearbeitung.

Literaturverzeichnis

- [1] Göpel, W.; Schierbaum, K. D. *Sensors*, Göpel, W.; Hesse, J. Zemel, J. N., Eds.; Vol. 2 ed.; VCH: Weinheim, **1991**.
- [2] Geckeler, K. E.; Eckstein, H. *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*, Vieweg: **1998**.
- [3] Thévenot, D. *Biosensors and Bioelectronics* **1996**, *11*, i-vi.
- [4] Gehring, F. K. *Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. Entwicklung eines Blutanalysegerätes*, Cuvillier, E; **2005**.
- [5] Rogers, K. R. *Molecular Biotechnology* **2000**, *14*, 109-29.
- [6] Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. *Clinica Chimica Acta* **2001**, *314*, 1-26.
- [7] Ziegler, C.; Göpel, W. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, *2*, 585-91.
- [8] O'Connell, P.; Guilbault, G. *Analytical Letters* **2001**, *34*, 1063.
- [9] Scheller, F. W.; Wollenberger, U.; Warsinke, A.; Lisdat, F. *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, *12*, 35-40.
- [10] Göpel, W.; Heiduschka, P. *Biosensors and Bioelectronics* **1995**, *10*, 853-83.
- [11] Yang, V. C. *Biosensors and their application*, Kluwer Academic/Plenum Publisher: New York, **2000**.
- [12] Gorton, L. *Biosensors and modern biospecific analytical techniques*, Elsevier: Amsterdam, Heidelberg, **2005**.
- [13] Busche, S. *Polymere und molekular geprägte Polymere für den Einsatz auf Oberflächen und deren Anwendung in der Oberflächenplasmonenresonanz*, Dissertation, Universität Tübingen, **2006**.
- [14] Kasper, M.; Busche, S.; Dieterle, F.; Belge, G.; Gauglitz, G. *Measurement Science and Technology* **2004**, *15*, 540-48.
- [15] Gauglitz, G. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2005**, *381*, 141-55.
- [16] Uttenthaler, E. *Hochempfindliche akustische Sensorelemente für die Flüssigkeits- und Biosensorik*, Dissertation, Universität München, **2002**.
- [17] Arnau, A. *Piezoelectric Transducers and Applications*, Springer: **2004**.

- [18] Safari, A.; Akdogan, E. K. *Piezoelectric and Acoustic Materials for Transducer Applications*, Springer Verlag: **2008**.
- [19] Royer, D.; Dieulesaint, E. *Elastic Waves in Solids I*, Springer: **2000**.
- [20] Janshoff, A.; Galla, H. J.; Steinem, C. *Angewandte Chemie* **2000**, *112*, 4164-95.
- [21] Lucklum, R. *Habilitationschrift. Universität Magdeburg* **2002**.
- [22] Krapf, R. *Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen*, Dissertation, Universität Tübingen, **2001**.
- [23] Hierlemann, A. *Massensensitive Detektion flüchtiger organischer Substanzen mit modifizierten Polysiloxanen*, Medien Verlag Köhler: Tübingen, **1996**.
- [24] Ballantine, D. S. *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physico-chemical Applications*, Academic Press: **1997**.
- [25] Bastiaans, G. J. *Chemical Sensors*, Edmonds, T. E., Ed.; Blackie and Son: **1988**.
- [26] Janshoff, A.; Steinem, C. *Sensors Update* **2001**, *9*, 313-54.
- [27] Jones, T. A.; Kleitz, M.; Lundström, I.; Göpel, W. *Trends in Sensor Markets, VCH, Weinheim* **1995**.
- [28] Nomura, T.; Okuhara, M. *Analytica Chimica Acta* **1982**, *142*, 281-84.
- [29] Steinem, C.; Janshoff, A. *Piezoelectric Sensors*, Springer Verlag: **2007**.
- [30] Neubig, B.; Briese, W. *Das grosse Quarzkochbuch: Quarze, Quarzoszillatoren*, Franzis-Verlag GmbH, Feldkirchen: **1997**.
- [31] Rodahl, M.; Höök, F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B. *Faraday Discussions* **1997**, *107*, 229-46.
- [32] Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Review of Scientific Instruments* **1995**, *66*, 3924.
- [33] Rodahl, M., Höök, F., Krozer, A., and Kasemo, B. *A piezoelectric crystal microbalance device*, Patent, **1996**.
- [34] Hillier, A. C.; Ward, M. D. *Analytical chemistry* **1992**, *64*, 2539-54.
- [35] Kanazawa, K. K.; Gordon, J. G. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1770-71.
- [36] Martin, S. J.; Granstaff, V. E.; Frye, G. C. *Analytical chemistry* **1991**, *63*, 2272-81.

- [37] Bandey, H. L. *Analytical chemistry* **1999**, *71*, 2205-14.
- [38] Borngräber, R. Quarzresonanzsensoren für flüssige Medien-Systemdesign und Anwendung, Shaker: **2001**.
- [39] Mason, W. P. *Physical Acoustics*, Academic Press: **1965**.
- [40] Rosenbaum, J. F. *Bulk Acoustic Wave Theory*, Artechhouse: Boston, **1988**.
- [41] Cernosek, R. W.; Martin, S. J.; Hillman, A. R.; Bandey, H. L. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **1998**, *45*, 1399-407.
- [42] Muramatsu, H.; Kim, J. M.; Chang, S. M. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2002**, *372*, 314-21.
- [43] Muramatsu, H.; Tamiya, E.; Karube, I. *Analytical chemistry* **1988**, *60*, 2142-46.
- [44] Granstaff, V. E.; Martin, S. J. *Journal of Applied Physics* **1994**, *75*, 1319-29.
- [45] Stadler, H. Schwingquarze zur mechanischen Charakterisierung biologischer Adsorbate auf Oberflächen in Flüssigkeiten, Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, **2002**.
- [46] Kastl, K.; Ross, M.; Gerke, V.; Steinem, C. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10087-94.
- [47] Schoch, M. Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren, Medizinische Dissertation, Universitätsklinikum Tübingen, **2008**.
- [48] Claußen, J. Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren, Shaker: **2006**.
- [49] Uttenthaler, E.; Kößlinger, C.; Drost, S. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, *13*, 1279-86.
- [50] Schramm, W.; Paek, S. H.; Voss, G. *ImmunoMethods* **1993**, *3*, 93-103.
- [51] Scheufele, B. Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen - Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern in humanem Vollblut, Cuvellier, E: **2009**.
- [52] Rickert, J.; Brecht, A.; Göpel, W. *Anal. Chem* **1997**, *69*, 1441-48.
- [53] Czeslik, C. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2004**, *218*, 771-801.
- [54] Czeslik, C. *Chemie in Unserer Zeit* **2006**, *40*.
- [55] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem.Rev* **2005**, *105*, 1103-69.

- [56] Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 570-79.
- [57] Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2358-68.
- [58] Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 678.
- [59] Dannenberger, O.; Weiss, K.; Himmel, H. J.; Jäger, B.; Buck, M.; Wöll, C. *Thin Solid Films* **1997**, *307*, 183-91.
- [60] Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321-35.
- [61] Schreiber, F. *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16*, R881-R900.
- [62] Fick, D. C. J. Charakterisierung von biokompatiblen Oberflächen mittels Vibrations-Summenfrequenzspektroskopie und Neutronenreflektometrie, Dissertation, Universität Heidelberg, **2005**.
- [63] Blodgett, K. B.; Langmuir, I. *Physical review* **1937**, *51*, 964-82.
- [64] Höpfner, M. Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen, Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, **2005**.
- [65] Roberts, G. G. *Advances in Physics* **1985**, *34*, 475-512.
- [66] SU, X.; Wu, Y. J.; Robelek, R.; Knoll, W. *Langmuir* **2005**, *21*, 348-53.
- [67] Müller, L. Ein Aptamer-Biosensor für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2005**.
- [68] Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422-26.
- [69] Weber, A.; Borchers, K.; Schmucker, J.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **2005**, *50*, 49-53.
- [70] Borchers, K. Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln als dreidimensionale Affinitätsfläche zum Proteinnachweis auf Microarrays, Dissertation, Universität Stuttgart, **2007**.
- [71] Sweryda-Krawiec, B.; Devaraj, H.; Jacob, G.; Hickman, J. J. *Langmuir* **2004**, *20*, 2054-56.
- [72] Kingshott, P.; Thissen, H.; Griesser, H. J. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2043-56.
- [73] Bücken, P. Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen, Dissertation, Universität Heidelberg, **2008**.

- [74] Groll, J.; Ameringer, T.; Spatz, J. P.; Moeller, M. *Langmuir* **2005**, *21*, 1991-99.
- [75] Heyes, C. D.; Groll, J.; Möller, M.; Nienhaus, G. U. *Molecular BioSystems* **2007**.
- [76] Groll, J.; Amirgoulova, E. V.; Ameringer, T.; Heyes, C. D.; Rocker, C.; Nienhaus, G. U.; Moller, M. *J.Am.Chem.Soc* **2004**, *126*, 4234-39.
- [77] Hoffmann, J.; Groll, J.; Heuts, J.; Rong, H.; Klee, D.; Ziemer, G.; Moeller, M.; Wendel, H. P. *Journal of Biomaterials Science -- Polymer Edition* **2006**, *17*, 985-96.
- [78] Amirgoulova, E. V.; Groll, J.; Heyes, C. D.; Ameringer, T.; Roecker, C.; Moeller, M.; Nienhaus, G. U. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 552-55.
- [79] Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 149-58.
- [80] Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *Science* **1991**, *252*, 1164-67.
- [81] Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 10714-21.
- [82] Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E. *J.Phys.Chem.B* **1998**, *102*.
- [83] Schwendel, D.; Hayashi, T.; Dahint, R.; Pertsin, A.; Grunze, M.; Steitz, R.; Schreiber, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 2284-93.
- [84] Feldman, K.; Hahner, G.; Spencer, N. D.; Harder, P.; Grunze, M. *J.Am.Chem.Soc* **1999**, *121*, 10134-41.
- [85] Lutze, G.; Naumann, Ch.; Zawta, B. Wissenswertes zur Gerinnung, Roche Diagnostics GmbH: **2004**.
- [86] Klinke, R.; Pape, H. C.; Silbernagl, S. Physiologie, Thieme: **2005**.
- [87] Kemkes-Matthes, B.; Oehler, G. Blutgerinnung und Thrombose, Thieme: **2001**.
- [88] Neumann, H. A. Das Gerinnungssystem: Physiologie und Pathophysiologie. Eine Einführung, ABW Wissenschaftsverlag G: **2007**.
- [89] Gawaz, M. Blood Platelets, Thieme Verlag: **2001**.
- [90] Bruhn, H. D.; Schambeck, C. M.; Hach-Wunderle, V. Hämostaseologie für die Praxis: Sicher durch den klinischen Alltag, Schattauer Verlag: **2007**.
- [91] Morocutti, C.; Amabile, G.; Fattapposta, F.; Nicolosi, A.; Matteoli, S.; Trappolini, M.; Cataldo, G.; Milanesi, G.; Lavezzari, M.; Pamparana, F. *Stroke* **1997**, *28*, 1015-21.

- [92] Nurden, A. T. *Orphanet J Rare Dis* **2006**, *1*, 1750-172.
- [93] Barthels, M.; von Depka, M. *Das Gerinnungskompodium*, Thieme: **2003**.
- [94] Coller, B. S. *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 427-43.
- [95] Davie, E. W.; Ratnoff, O. D. *Science* **1964**, *145*, 1310-12.
- [96] Macfarlane, R. G. *Nature* **1964**, *202*, 498-99.
- [97] Veldman, A.; Hoffman, M.; Ehrenforth, S. *Current Medicinal Chemistry* **2003**, *10*, 797-811.
- [98] Hoffman, M.; MONROE, D. M. *Thrombosis and Haemostasis* **2001**, *85*, 958-65.
- [99] Hoffman, M. *Blood Reviews* **2003**, *17*, 1-5.
- [100] Kojda, G.; Hafner, D.; Behne, M.; Wilhelm, M. *Pharmakologie, Toxikologie systematisch*, 2. ed.; UNI-MED-Verl.: **2002**.
- [101] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. ed.; Urban & Fischer: **2005**.
- [102] Silbernagl, S.; Despopoulos, A. *Taschenatlas Physiologie*, Thieme: **2007**.
- [103] Born, G. V. R. *J Physiol* **1962**, *162*, 67-68.
- [104] Schürmann, M. *Thrombozytenfunktionsdiagnostik und therapeutisches Medikamentenmonitoring*, Mölab GmbH: **2008**.
- [105] Halwachs-Baumann, G. *Labormedizin: Klinik-Praxis-Fallbeispiele*, Springer: **2006**.
- [106] Kratzer, M. A.; Born, G. V. *Haemostasis* **1985**, *15*, 357-62.
- [107] Mammen, E. F.; Comp, P. C.; Gosselin, R.; Greenberg, C.; Hoots, W. K.; Kessler, C. M.; Larkin, E. C.; Liles, D.; Nugent, D. J. *Semin Thromb Hemost* **1998**, *24*, 195-202.
- [108] Favaloro, E. J. *Semin Thromb Hemost* **2006**, *32*, 537-45.
- [109] Calatzis, A. *J Lab Med* **2007**, *31*, 239-47.
- [110] Cardinal, D. C.; Flower, R. J. *J Pharmacol Methods* **1980**, *3*, 135-58.
- [111] Ivandic, B. T.; Giannitsis, E.; Schlick, P.; Staritz, P.; Katus, H. A.; Hohlfeld, T. *Clinical Chemistry* **2007**, *53*, 614.
- [112] Riess, H.; Braun, G.; Brehm, G.; Hiller, E. *Am J Clin Pathol* **1986**, *85*, 50-56.
-

- [113] Toth, O.; Calatzis, A.; Penz, S.; Losonczy, H.; Siess, W. *Thromb Haemost* **2006**, *96*, 781-88.
- [114] Steinhubl, S. R. *Platelets*, **2006**.
- [115] Kleinveld, H. A.; Andersson, N. E.; van Voorthuizen, H.; den Hartog, J.; de Groot, P. G. *Scand J Clin Lab Invest* **1999**, *59*, 335-41.
- [116] Ford, R. P.; Esnouf, M. P.; Burgess, A. I.; Saphie, A. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **1996**, *17*, 119-31.
- [117] Quick, A. J. *J Biol Chem* **1935**, *109*, 73-74.
- [118] Hiller, E.; Riess, H. *Hämorrhagische Diathese und Thrombose: Grundlagen, Klinik und Therapie*, **2002**.
- [119] Barthels, M.; Poliwoda, H.; Hemker, H. C. *Gerinnungsanalysen: Schnellorientierung, Befundinterpretation, Therapiekontrollen, klinische Konsequenzen*, Thieme, Stuttgart: **1998**.
- [120] Pötzsch, B.; Madlener, K. *Gerinnungskonsil*, Thieme: **2002**.
- [121] Bajaj, S. P.; Joist, J. H. *Semin Thromb Hemost* **1999**, *25*, 407-18.
- [122] Klar, H. G.; Leo-Grining, I. *Pharmazeutische Zeitung* **2004**, *149*, 18-24.
- [123] Hartert, H. *Klin Wochenschr* **1948**, *26*, 577-83.
- [124] Calatzis, A.; Heesen, M.; Spannagl, M. *Der Anaesthesist* **2003**, *52*, 229-37.
- [125] <http://www.rottem.de>, **2009**.
- [126] Spiel, A. O.; Mayr, F. B.; Firbas, C.; Quehenberger, P.; Jilma, B. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 411-16.
- [127] Vanek, T.; Jares, M.; Snircova, J.; Maly, M. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* **2007**, *6*, 700.
- [128] Spalding, G. J.; Hartrumpf, M.; Sierig, T.; Oesberg, N.; Kirschke, C. G.; Albes, J. M. *Der Anaesthesist* **2007**, *56*, 765-71.
- [129] Marx, K. A. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1099-120.
- [130] Cooper, M. A.; Singleton, V. T. *Journal of Molecular Recognition* **2007**, *20*, 154-84.
- [131] O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14*, 663-70.

-
- [132] Sheikh, S.; Blaszykowski, C.; Thompson, M. *Analytical Letters* **2008**, *41*, 2525-38.
- [133] Scheufele, B.; Gronmaier, R.; Haeberle, S.; Kohnle, J.; Ducree, J.; Zengerle, R.; Northoff, H.; Gehring, F. K. *1st Lab-on-a-Chip World Congress, Edinburgh* **2007**.
- [134] Weber, N.; Wendel, H. P.; Kohn, J. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *72*, 420-27.
- [135] Matsuda, T.; Kishida, A.; Ebato, H.; Okahata, Y. *ASAIO Journal* **1992**, *38*, M171.
- [136] KAWAKAMI, K.; HARADA, Y.; SAKASITA, M.; NAGAI, H.; HANDA, M.; IKEDA, Y. *ASAIO Journal* **1993**, *39*, M561.
- [137] Ergezen, E.; Appel, M.; Shah, P.; Kresh, J. Y.; Lec, R. M.; Wootton, D. M. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *23*, 575-82.
- [138] Muramatsu, H.; Kimura, K.; Ataka, T.; Homma, R.; Miura, Y.; Karube, I. *Biosensors and Bioelectronics* **1991**, *6*, 353-58.
- [139] Shi-Hui, S.; Yuan-Jin, X.; Li-Hua, N.; Shou-Zhuo, Y. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1996**, *31*, 135-43.
- [140] Cheng, T. J.; Chang, H. C.; Lin, T. M. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, *13*, 147-56.
- [141] Vikinge, T. P.; Hansson, K. M.; Sandstrom, P.; Liedberg, B.; Lindahl, T. L.; Lundstrom, I.; Tengvall, P.; Hook, F. *Biosens Bioelectron* **2000**, *15*, 605-13.
- [142] Cheng, T. J.; Lin, T. M.; Wu, T. H.; Chang, H. C. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *432*, 101-11.
- [143] Andersson, M.; Sellborn, A.; Fant, C.; Gretzer, C.; Elwing, H. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2002**, *13*, 907-17.
- [144] Andersson, M.; Andersson, J.; Sellborn, A.; Berglin, M.; Nilsson, B.; Elwing, H. *Biosens Bioelectron* **2005**, *21*, 79-86.
- [145] Hayward, G. L.; Scharer, J. M.; Dutton, R. L.; Zhang, Z.; Young, M. M. *Analytical Communications* **1998**, *35*, 25-28.
- [146] Ghazali, M.; Hayward, G. L. *The Analyst* **2008**, *133*, 910-13.
- [147] Gehring, F. K. Apparatus comprising a measurement chamber and a resonator, which can be integrated in the measurement chamber via a quick-action closure, for the liquid sensor system, Patent, Tübingen, **2008**.
- [148] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer handbook*, New York, **1989**.
-

- [149] Drechsel, H. Entwurf und Implementierung einer Software für einen QCM-Blutgruppensensor., Diplomarbeit, Fachhochschule Trier, **2004**.
- [150] Franken, H. Simulation eines Schwingquarzsensors zur Untersuchung mechanischer Eigenschaften von biologischen Materialien, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2007**.
- [151] Ameringer, T. Biocompatible Ultrathin Coatings from Isocyanate Terminated Star PEG Prepolymers, Dissertation, Technische Hochschule Aachen, **2006**.
- [152] Gehring, F. K. Patent in Vorbereitung, Patent, Tübingen, **2009**.
- [153] Bland, J. M.; Altman, D. G. *Lancet* **1986**, *1*, 307-10.
- [154] Bland, J. M.; Altman, D. G. *Statistical Methods in Medical Research* **1999**, *8*, 135.
- [155] Singh, B. K.; Hillier, A. C. *Anal. Chem* **2006**, *78*, 2009-18.
- [156] Hall, C. E.; Slayter, H. S. *The Journal of Cell Biology* **1959**, *5*, 11-27.
- [157] Green, R. J.; Davies, J.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B. *Biomaterials* **1997**, *18*, 405-13.
- [158] Doolittle, R. F. *Annual review of biochemistry* **1984**, *53*, 195-229.
- [159] Redepenning, J.; Schlesinger, T. K.; Mechalke, E. J.; Puleo, D. A.; Bizios, R. *Analytical chemistry* **1993**, *65*, 3378-81.
- [160] Schmidt, S. Bestimmung optimaler Parameter für Thrombozytenfunktionsmessungen mittels Schwingquarzen und deren Regeneration, Medizinische Dissertation, Universitätsklinikum Tübingen, **2009**.
- [161] Koch, J. Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Thrombozytenfunktionsmessung, Medizinische Dissertation, Universitätsklinikum Tübingen, **2009**.

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Ch. Ziegler der AG Grenzflächen, Nanomaterialien und Biophysik an der Technischen Universität Kaiserslautern für die Betreuung der Arbeit, die unkomplizierte Zusammenarbeit sowie für das lehrreiche Winterseminar und die angenehmen Weihnachtsfeiern.

Herrn Prof. Dr. H. Northoff, Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen danke ich für die Übernahme des Koreferats, die intensive Unterstützung meiner Arbeit und die ideenreichen Diskussionen.

Ich danke dem Gruppenleiter der Biosensorik-Gruppe Tübingen, Herrn Dr. F. K. Gehring, für die Bereitstellung des spannenden Themas, die hervorragende Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und dass ich in den unterschiedlichsten Bereichen sehr viel von ihm lernen durfte.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der Biosensorik-Gruppe in Tübingen für die stets fröhliche und freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Bernd Scheufele, Daniela Kömpf, Dr. rer. nat. Hartmut Drechsel und Dr. rer. nat. Michael Wandel für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und ihre andauernde Unterstützung und Freundschaft bedanken. Holger Franken danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Vorbereitungen zur Medica und die angenehme Zeit in und um Düsseldorf. Für die Durchführung zahlreicher Beschichtungen und Messungen und ihre freundschaftliche Art möchte ich mich bei Petra Brozik bedanken. Den von mir mitbetreuten medizinischen Doktorandinnen und Doktoranden Manuela Schoch, Steffen Schmidt, Joachim Koch und Katrin Goldammer möchte ich meinen Dank für die heitere und doch äußerst produktive Zusammenarbeit aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Stefan Sinn (AG Wendel, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) für die enge und produktive Zusammenarbeit und seine kompetente Unterstützung in biologischen Fragen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT) des Universitätsklinikums Tübingen für die reibungslose und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Meiner Kollegin Christine Müller (AG Grenzflächen, Nanomaterialen und Biophysik, TU Kaiserslautern) danke ich für die Durchführung der AFM-Messungen, die gemeinsamen Abfahrten und die gelegentlichen kurzweiligen Plaudereien.

Ich danke allen Projektpartnern des BMBF-Projektes „HämOrgUS“ und speziell den Mitarbeitern der Fa. Hettich in Tuttlingen für die gute Zusammenarbeit.

Meinen engsten Freunden Daniel, Judith, Moritz, Susanne und Sandra danke ich für ihren ständigen Rückhalt und ihre jahrelange Freundschaft.

Besonderer Dank gilt einem ganz besonderen Menschen: Michaela, vielen Dank für alles!

Meiner Familie bin ich unendlich dankbar für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Vertrauen und ihren unerschütterlichen Glauben an mich!

Liste der Publikationen

Vorträge

QCM-Biosensor für die perioperative Blutgerinnungsdiagnostik

L. Müller, S. Sinn, H.-P. Wendel, H. Northoff, F.K. Gehring,
14. Heiligenstädter Kolloquium, Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, Heilbad
Heiligenstadt, **2008**.

Microfluidic chip with integrated QCM sensor for perioperative bleeding monitoring

L. Müller
Institut für Mikrotechnik, Young scientists' workshop: Microfluidic systems and sensor
applications, Mainz, **2008**.

Poster

Untersuchungen zur Hämostaseologie mittels Schwingquarzsensoren

L. Müller, S. Sinn, H.-P. Wendel, H. Northoff, F.K. Gehring,
DRK-Forschungsseminar Sasbachwalden, P5, **2007**.

Quartz sensor based approach towards online haemostasis monitoring

L. Müller, S. Sinn, H.-P. Wendel, H. Northoff, F.K. Gehring,
52. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung e.V., Wiesbaden,
Hämostaseologie 1-2, S-11-4, **2008**.

Quartz sensor based approach towards online haemostasis monitoring

L. Müller, S. Sinn, H.-P. Wendel, H. Northoff, F.K. Gehring,
Lab Automation 2008, Palm Springs, California (USA), **2008**.

Microfluidic sensor device for online haemostasis monitoring

L. Müller, A. Sterck, R. Gronmaier, S. Sinn, D. Klar, S. Haeberle, R. Zengerle, H.-P. Wendel,
H. Northoff, F.K. Gehring,
2nd Lab-on-a-Chip World Congress, 136 (LOAC), Barcelona, **2008**.

Quartz Crystal Microbalance with sensitive surface coatings for perioperative bleeding monitoring

L. Müller, S. Sinn, H.-P. Wendel, H. Northoff, F.K. Gehring,
BioStar 2008 - 3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine, Stuttgart,
2008.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: **Lothar Müller**
Geburtstag: 09.11.1979
Geburtsort: Biberach an der Riß

Schulbildung

1986 – 1990 Grund- und Hauptschule Warthausen
1990 – 1999 Pestalozzi-Gymnasium Biberach
1999 Abitur

Studium

10/2000 – 10/2005 Chemie-Studium an der Universität Tübingen, Wahlpflichtfach „Pharmakologie und Toxikologie“
04/2005 – 10/2005 Diplomarbeit in Chemie am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (IPTC), Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Gauglitz.
Titel: „Ein Aptamer-Biosensor für die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie“

Praktikum

12/2005 – 04/2006 Fraunhofer IGB Stuttgart, AG Biomimetische Grenzflächen, unter Anleitung von PD Dr. G. Tovar.
Thema: Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Wellenleiter-Spektroskopie

Promotion

seit 08/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Gehring am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) des Universitätsklinikums Tübingen, unter der Leitung von Prof. H. Northoff. Anfertigung einer Dissertation in der AG Grenzflächen, Nanomaterialien und Biophysik, Fachbereichs Physik, Universität Kaiserslautern, unter Anleitung von Prof. Ch. Ziegler.
Titel: Schwingquarze als Hämostase-Sensoren – Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut

