



Lothar Müller (Autor)

## **Schwingquarze als Hämostase-Sensoren**

Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1049>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## 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.

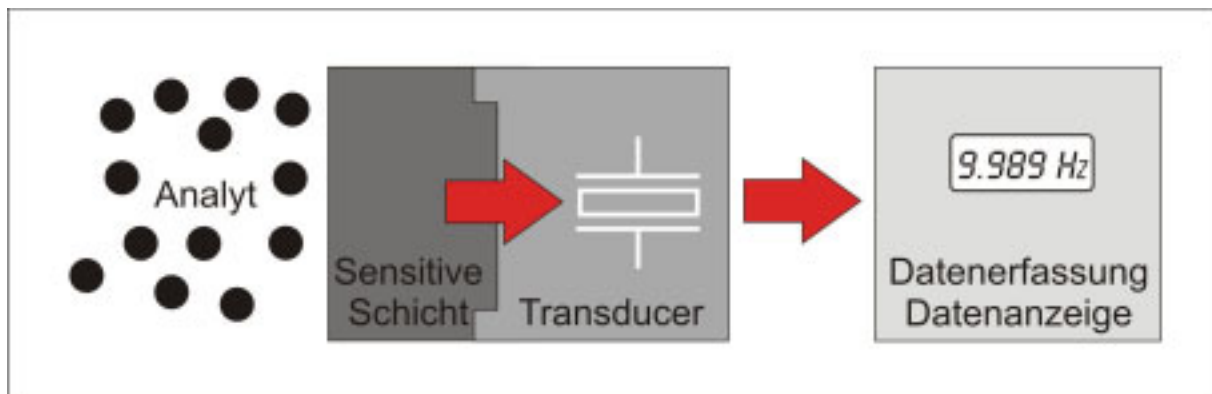
### 2.1 Sensorische Grundlagen

#### 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, Immunosensoren, Gassensoren, Zellsensoren
Optisch	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) Gitterkoppler Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) Ellipsometrie	Immunosensoren, Zellsensoren, Gassensoren, Enzymatische Sensoren
Thermisch	Kalorimetrie	Enzym-, Zell-, Gewebesensoren, Immunosensoren, Gassensoren
Piezoelektrisch	Schwingquarze (QCM) Akustische Oberflächenwelle (SAW)	Gassensoren, Immunosensoren, 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