

**Aus dem  
Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin  
der Universität Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Gerinnungsmessungen auf Schwingquarzen und deren  
Regeneration**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Katrin Goldammer  
aus  
Oschatz  
2012**

**Aus dem  
Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin  
der Universität Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Gerinnungsmessungen auf Schwingquarzen und deren  
Regeneration**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Katrin Goldammer  
aus  
Oschatz  
2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2.Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel



Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit im Institut für Experimentelle und Klinische Transfusionsmedizin der Universität Tübingen (Leiter Prof. H. Northoff), innerhalb der Biosensorik Gruppe (AG Gehring), vom 17.04.2009 bis 16.12.2010 unter der Anleitung von Dr. rer. Nat. Frank K. Gehring.

Die Begutachtung wurde von Prof. Dr. Northoff, Universität Tübingen und Prof. Dr. H. P. Wendel, Universität Tübingen übernommen.

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einführung

1.1 Einführung	1
1.2 Blut: Zusammensetzung und Funktion	2
1.2.1 Erythrozyten	2
1.2.2 Thrombozyten	3
1.2.3 Leukozyten	4
1.2.4 Blutplasma	4
1.2.5 Fibrinogen	5
1.3 Hämostase	6
1.3.1 Gefäßsystem	6
1.3.2 primäre Hämostase	7
1.3.3 sekundäre Hämostase	7
1.3.4 Fibrinolysesystem	11
1.4 Labormethoden zur Gerinnungsfunktionsprüfung	12
1.4.1 Gerinnungszeit	12
1.5 Biosensoren	14
1.5.1 Massensensitive Sensoren	15
1.5.2 Quartz-Crystal-Microbalance (QCM)	15
1.6 Sensorbeschichtung	16
1.7 Sensorregeneration	17
1.8 Ziel der Arbeit	18

### 2. Material und Methoden

2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Gerinnungsreagenzien	19
2.1.4 Blutproben	20
2.1.5 Labormaterialien und Geräte	20

2.1.6 QCM-Sensor	20
2.1.7 Dummy-Messanlage	21
2.1.8 FidgeType Fg T1 Anlage	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Schwingquarzpräparation	23
2.2.2 Clot-lysis-Versuche	24
2.2.3 Dummy System	24
2.2.4 Coomassiefärbung von Proteinen	25
2.2.5 Gerinnungsmessungen	25
2.2.6 Regeneration der Quarze	26
2.2.7 Quarzvorinkubation innerhalb der Messkammer	26
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Clot-lysis-Versuche	27
3.2 Messungen mit dem Dummysystem	29
3.3 Coomassiefärbung von Proteinen	30
3.4 Messungen mit der FidgeType Anlage	34
3.4.1 Übertragung des Dummy-Regenerationsablaufes	34
3.4.2 Quarzvorinkubation innerhalb der Messkammer	35
3.4.3 Verwendung von Hellmanex	36
3.4.4 Verwendung von SDS/HCl und Erwärmung auf 50°C	36
3.4.5 Gerinnungsmessungen auf Gold	41
3.4.6 Verkürzung der Koagulationszeit	42
3.4.7 Verwendung von Actilyse	44
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Stand der Technik	51
4.2 Clot-lysis-Versuche	52
4.3 Dummy Versuche	54
4.4 Coomassiefärbung von Proteinen	55

4.5 Messungen mit der Fidge Type Anlage	55
4.5.1 Übertragung des Dummy-Regenerationsablaufes	55
4.5.2 Verwendung von SDS/HCl	56
4.5.3 Erwärmen der Reagenzien	57
4.5.4 Regeneration mit Actilyse	57
4.6 Vergleich Messungen auf PE- und Goldoberfläche	58
4.7 Übertragbarkeit auf ein automatisiertes Gerät	59
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>6. Anhang</b>	
6.1 Tabellenverzeichnis	61
6.2 Abbildungsverzeichnis	61
6.3 Abkürzungsverzeichnis	63
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>69</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Die Furcht vor einer Blutung ist ein im Menschen tief verwurzelter Automatismus, da jede größere Blutung eine Gefährdung des Lebens bedeuten kann. Aus diesem Grund ist das Gerinnungssystem ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen Gesundheit. Es zählt zu den ältesten Abwehr- und Reparatursystemen des Menschen bzw. aller Wirbeltiere [1].

Nur ein fein abgestimmtes Zusammenspiel zellulärer und plasmatischer Blutbestandteile mit der Gefäßwand gewährleistet die Bildung eines Blutgerinnsels. Kommt es zu Störungen dieses Systems, können erhöhte Blutungs- oder Thromboseneigungen auftreten [2,3]. Um die korrekte Funktionsweise der Blutgerinnung zu kontrollieren gibt es verschiedene Untersuchungsmethoden wie die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) oder den Quicktest. Zusammengefasst werden diese Verfahrensweisen unter dem Begriff Globaltests. Der Nachteil dieser Tests besteht jedoch in der geringen Sensitivität, so dass sie erst bei ausgeprägten Störungen pathologisch ausfallen. Auch über den Grund einer Störung sind sie nur in geringem Maße aussagekräftig [4].

In der Medizin ist es wichtig, eine zeitnahe sowie automatisierbare Überwachung des Gerinnungsverhaltens zu bekommen, um bei Störungen des Systems so früh als möglich eine geeignete Therapie einleiten zu können. Eine Möglichkeit hierfür bieten Biosensoren, zu welchen u. a. Schwingquarzsensoren zählen. Diese werden durch Anlegen einer Wechselspannung in Schwingung versetzt und reagieren auf eine Massen- oder Viskositätsänderung mit einer Resonanzfrequenzänderung.

Mit einem von Dr. Gehring entwickelten Blutanalysegerät wurden bereits verschiedenste Untersuchungen durchgeführt, darunter Blutgruppen-Antigen-Nachweise, Blutgruppen-Antikörper-Bestimmungen oder auch Versuche in der Malaria-Forschung [5-8].

## 1.2 Blut: Zusammensetzung und Funktion

Blut besteht größtenteils aus Wasser. Darin gelöst finden sich Elektrolyte, wasserlösliche Nährstoffe, Vitamine und Gase. Zelluläre Bestandteile sind Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

Die Erythrozyten haben einen großen Anteil am Sauerstofftransport und der pH-Pufferung des Blutes, wohingegen die Leukozyten die Immunabwehr kontrollieren. Der Aufgabenbereich der Thrombozyten liegt in der Blutstillung. Wird antikoaguliertes Blut zentrifugiert, ist das Ergebnis Blutplasma, das die Gerinnungsfaktoren enthält.

Der Anteil des Blutvolumens ist abhängig vom Körpergewicht. Es beträgt 6-8% der fettfreien Körpermasse, entsprechend 6-8 l [9,10].

### 1.2.1 Erythrozyten

Den größten Teil der Blutzellen bilden die Erythrozyten. Ein Mikroliter Blut enthält ca. 5 Millionen rote Blutkörperchen. Sie sind kernlose bikonkave Scheibchen mit einem Durchmesser von 7,5  $\mu\text{m}$  und 2  $\mu\text{m}$  Randdicke. Durch diese Form ergeben sich ein hohes Oberflächen/Volumen-Verhältnis sowie eine hohe Verformbarkeit. Der prozentuale Anteil der roten Blutkörperchen am Gesamtblutvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet, wobei der Normwert bei Männern 40-54% und bei Frauen 37-47% beträgt.

Nach der Bildung im Knochenmark ist die Lebensdauer eines Erythrozyten auf durchschnittlich 120 Tage begrenzt. Einige Komponenten der Erythrozyten finden nach deren Absterben weitere Verwendung. So werden die Aminosäuren in neue Proteine eingebaut und ein Teil des Eisens wird wieder zur Hämgruppen-Synthese verwendet. Ein weiteres Abbauprodukt ist Bilirubin, das vom Körper ausgeschieden wird.

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht darin, Atemgase gebunden an Hämoglobin zu transportieren [10,11].

### 1.2.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Blutbestandteile, die im Knochenmark aus Megakaryozyten entstehen und entscheidend zur Blutgerinnung beitragen. Mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  sowie einer Dicke von 0,5-1  $\mu\text{m}$  zirkulieren sie 7-10 Tage im Blut [2,12].

Der Normwert der Thrombozytenzahl liegt zwischen 150.000 und 400.000/ $\mu\text{l}$ . Diese Blutbestandteile haben einen eigenen Stoffwechsel. Dementsprechend konnten Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphatweges, des Zitronensäurezyklus und der Atemkette nachgewiesen werden. Auf der Thrombozytenoberfläche können u. a. Rezeptoren für Fibrin und den vWF gefunden werden [13].

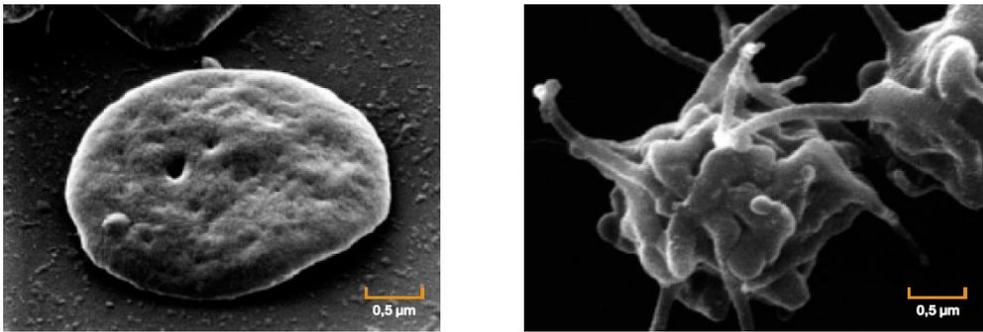
Beim Aufbau der Thrombozyten können vier Hauptzonen unterschieden werden: periphere Zone, Sol-Gel-Zone (Hyalomer), Organellenzone und Membransysteme.

Während sich die periphere Zone aus der Thrombozytenmembran, Außenzone und dem submembranösen Bezirk zusammensetzt, stellt das Zytoplasma die Sol-Gel-Zone dar. Sie enthält Mikrotubuli, Mikrofilamente und Glykogen, die für den Gestaltwandel nach Aktivierung der Thrombozyten benötigt werden.

In der Organellenzone sind zum einen die  $\alpha$ -Granula eingelagert. Sie enthalten die adhäsiven Proteine (z.B. von Willebrandfaktor, Fibrinogen), Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren (z.B. Plättchenfaktor 4, Faktor V, XI) sowie Wachstumsfaktoren [4]. Die enthaltenen Proteine werden größtenteils durch Endozytose aus dem Blut aufgenommen und nach Thrombozytenaktivierung sezerniert [2].

Zum anderen weist die Organellenzone  $\delta$ -Granula („dense bodies“), ADP, ATP und Serotonin auf. Weiterhin sind Mitochondrien und Lysosomen in diesem Bereich zu finden. Durch das Membransystem wird den Thrombozyten der Stoffaustausch mit der Umgebung ermöglicht [4,14].

Während nicht aktivierte Blutplättchen passiv im Blut zirkulieren, wird bei deren Aktivierung die primäre Hämostase in Gang gesetzt (Abbildung 1) [4].



**Abb. 1:** Links: Ruhender Thrombozyt, Rechts: Aktivierter Thrombozyt [10]

### 1.2.3 Leukozyten

Leukozyten sind weiße Blutkörperchen und mit etwa 5000 Zellen/ $\mu\text{l}$  im Blut repräsentiert.

Sie entstehen aus den pluripotenten Stammzellen. Es bilden sich aus lymphoiden Vorläuferzellen Lymphozyten und aus myeloiden Vorläuferzellen Granulozyten sowie Monozyten. Alle Typen der Leukozyten dienen der Immunabwehr, spezifisch oder unspezifisch. Diese Abwehr richtet sich beispielsweise gegen pathogene Mikroorganismen oder auch abgestorbene körpereigene Zellen [10,15].

### 1.2.4 Blutplasma

Wird antikoaguliertes Blut zentrifugiert, erfolgt eine Auftrennung in die zellulären Bestandteile und das Blutplasma. Beim Plasma handelt es sich um eine klare, goldgelbe Flüssigkeit, die die Gerinnungsfaktoren enthält und zu 90% aus Wasser besteht, in dem Proteine, ungeladene Stoffe und Ionen gelöst sind. Plasmaproteine sind u. a. Albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline. In seiner Zusammensetzung ist es bis auf den Anteil an Plasmaproteinen identisch mit der interstitiellen Flüssigkeit. Zu den Aufgaben der Plasmaproteine zählen z. B. die humorale Immunabwehr oder auch der Transport wasserunlöslicher Stoffe [9,11]. Die meisten Plasmafaktoren der Gerinnung und Fibrinolyse sind ebenfalls Proteine, wobei die Charakterisierung dieser durch eine Serumelektrophorese möglich ist. Durch einige Krankheiten kann es zu einer typischen Veränderung der Elektrophorese kommen. Ein Beispiel ist die

Vermehrung der  $\gamma$ -Globuline bei einer chronischen Entzündung, da der überwiegende Teil der Immunglobuline zu den  $\gamma$ -Globulinen zählt [9,16].

Wird Blut erst nach dem Gerinnungsvorgang zentrifugiert, ist das Resultat Blutserum, das sich vom Blutplasma lediglich durch das Fehlen der Gerinnungsfaktoren, hauptsächlich Fibrinogen, unterscheidet [9].

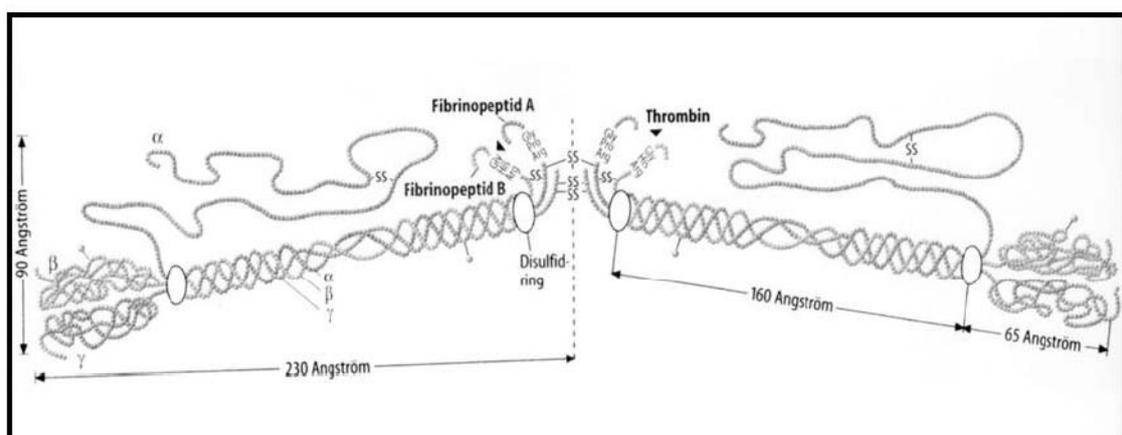
### 1.2.5 Fibrinogen

Fibrinogen wurde von Denis de Commercy und Olaf Hammersten entdeckt.

Humanes Fibrinogen hat ein Molekulargewicht von 340 kDa und eine biologische Halbwertszeit von etwa 5 Tagen bei einer Plasmakonzentration von 160-350 mg/dl. Dieses Akut-Phase-Protein zirkuliert als fadenförmiges Molekül im Plasma und wird in der Leber synthetisiert.

Fibrinogen besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die jeweils aus 3 Polypeptidketten bestehen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), deren Zusammenhalt über Disulfidbrücken erfolgt (Abbildung 2). An den aminoterminalen Enden der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten befinden sich die Fibrinogenpeptide A und B. Diese Fibrinogenpeptide werden durch Thrombin von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten abgespalten und polymerisieren zu Fibrin.

Zur Blutstillung wird eine Mindestaktivität von 50 mg/dl benötigt [1,4,13,17-19].



**Abb. 2:** Darstellung eines Fibrinogenmoleküls [19]

### 1.3 Hämostase

Als Hämostase wird die Blutstillung bezeichnet. Oftmals wird der Begriff mit Blutgerinnung gleichgesetzt, wobei diese nur einen Teilabschnitt der Hämostase bildet.

Es gibt drei Systeme aus denen sich die Blutstillung zusammensetzt:

1. Das Gefäßsystem
2. Das Gerinnungssystem
3. Das Fibrinolysesystem [4,13]

#### 1.3.1 Das Gefäßsystem

Das Gefäßsystem stellt die Gesamtheit der arteriellen, venösen und kapillaren Blutgefäße dar.

Das Endothel ist für einen reibungslosen Ablauf des Blutflusses verantwortlich, was durch eine leicht negative Ladung möglich ist. Bekanntermaßen sind auch Thrombozyten und Erythrozyten leicht negativ geladen, worauf eine elektromagnetische Abstoßung und somit ein reibungsloser Blutfluss folgt. Bei einer Verletzung reagiert zunächst das Gefäßsystem durch Kontraktion des Gefäßes sowie Einrollen der offenen Enden.

Bei Kapillaren kommt es aufgrund des geringen Durchmessers zu einem Zusammenfall. Eine Regulation des Gefäßsystems erfolgt u. a. durch Stickstoffmonoxid (NO). Jenes bewirkt zusammen mit Acetylcholin eine Gefäßrelaxation und gemeinsam mit Prostaglandin wirkt es Gefäßspasmen entgegen. Des Weiteren wird eine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten durch Prostacyclin und NO verhindert [4,10,13].

Bei der Blutgerinnung erfolgt eine Unterscheidung in primäre und sekundäre Hämostase.

### 1.3.2 Die primäre Hämostase

Die primäre Hämostase besteht aus der Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten.

Ist intaktes Endothel vorhanden, liegen die Thrombozyten in Ruheform vor. Kommt es jedoch zu einer Verletzung, werden sie aktiviert und haften an der verletzen Stelle. Dabei kommt es für ca. 10 s zu einer Verlangsamung des Blutflusses durch einen Vasospasmus, der mittels einer Vasokonstriktion durch Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) hervorgerufen wird [14]. Die Folge ist eine Stimulation der Thrombozytenadhäsion an den von-Willebrand-Faktor. Bei einem Defekt bindet der vWF an das freigelegte Kollagen und wird von den Thrombozyten über den GPIb-Rezeptor gebunden. Infolgedessen entsteht eine molekulare Brücke. Nach der Aktivierung der Thrombozyten entleeren diese ihr Granula und bilden Pseudopodien zur Oberflächenvergrößerung sowie Darstellung der Zelladhäsionsrezeptoren.

Eine weitere Förderung der Aggregation erfolgt durch Leukozyten, die den plättchenaktivierenden Faktor ausschütten.

Thrombozyten bilden ebenfalls den Plättchenfaktor 3, der die plasmatische Gerinnung und den GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplex aktiviert. Über diesen kommt es zur Ausbildung einzelner Fibrinbrücken zwischen zwei benachbarten Thrombozyten und folglich zur Bildung eines weißen Thrombus. Ist die primäre Hämostase abgeschlossen, beginnt die sekundäre Hämostase zum abschließenden Verschluss des Defektes [4,9,10,13].

### 1.3.3 Die sekundäre Hämostase

Im Fall der sekundären Hämostase gibt es verschiedene Theorien zu deren Ablauf. Dabei haben sich zwei durchgesetzt. Zum einen die klassische oder Vier-Faktoren-Theorie nach Morawitz (1904), die im Prinzip korrekt ist und das Grundgerüst für einen Teil des Gerinnungsablaufs stellt.

Durch die Entdeckung weiterer Gerinnungsfaktoren gilt diese Theorie jedoch als überholt. Zum anderen gibt es die heute gebräuchliche Kaskadentheorie, mit

welcher der Ablauf einer Gerinnung erklärt wird. Dabei ist wichtig, dass die Kaskade durch zwei Mechanismen ausgelöst werden kann, intrinsisch oder extrinsisch (siehe Abb. 3). In vivo wird der Mechanismus in der Regel über beide Wege gestartet, da bei einer Verletzung sowohl ein Gefäß als auch Gewebe betroffen ist.

Damit ein fester Thrombus entstehen kann, gibt es eine Vielzahl von nacheinander ablaufenden Reaktionen von Gerinnungsfaktoren, die als inaktive Vorstufen im Blut zirkulieren, um aus Fibrinogen Fibrin entstehen zu lassen (Tabelle 1) [4].

Faktornummer	Faktorname
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebethromboplastin
IV	Ionisiertes $\text{Ca}^{2+}$
V	Proakzelerin
VII	Proconvertin
VIII	Antihämophiles Globulin A
IX	Antihämophiles Globulin B (Christmas Faktor)
X	Stuart Power Faktor
XI	Plasma-Thromboplastin-Antecedent (PTA)
XII	Hageman Faktor
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor (FSF)
PK	Präkallikrein (Fletcher-Faktor)
HMWK	High Molecular Weight Kininogen

**Tab. 1:** Gerinnungsfaktoren [4]

Bei der extrinsischen Aktivierung kommt es nach der Gewebeerletzung zu einer Freisetzung von Faktor III ins Blut.

Der Faktor III aktiviert, zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, Faktor VII. Zusätzlich zum Gewebefaktor erfolgt die Aktivierung des Faktors VII durch eine den

Faktor VII-aktivierende Protease. Das Proconvertin wiederum bildet mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Plättchenfaktor 3 einen Komplex, der Faktor X (Stuart-Power-Faktor) aktiviert.

Der Faktor X gehört zur gemeinsamen Endstrecke des extrinsischen und des intrinsischen Gerinnungssystems [4,9,10].

Die intrinsische Aktivierung erfolgt durch die Aktivierung des Faktors XII, und zwar durch Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche. Da diese Reaktion eher langsam abläuft, erfolgt eine positive Rückkopplung zu deren Beschleunigung.

Diese positive Rückkopplung kommt zustande, indem Faktor XIIa Präkallikrein zu Kallikrein aktiviert, das wiederum zu einer Beschleunigung der Aktivierung von Faktor XII führt. Nun erfolgt eine Aktivierung der Faktoren XI, IX und VIII. Faktor X wird über einen Komplex aus Phospholipiden,  $\text{Ca}^{2+}$ , VIIIa und IXa aktiviert.

Ab dem Faktor X folgt die gemeinsame Endstrecke der Gerinnung (Abbildung 4) [4,9,10].

Faktor Xa, Va,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipide bilden den Prothrombin-Aktivator Komplex, durch welchen Faktor II zu Thrombin umgewandelt wird. Dieses wiederum spaltet Fibrinogen zu Fibrin. Die Fibrinbildung erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden zwei Fibrinopeptide A durch Thrombin abgespalten und es entsteht ein Fibrinmonomer, was Voraussetzung für die Entstehung eines Fibrinnetzwerkes ist. Im nächsten Schritt polymerisieren die Fibrinmonomere spontan zu Fibrinsträngen. Nach der Abspaltung von zwei Fibrinopeptiden B kommt es zum Wachstum unter Bildung von Fibrin s (soluble, stellt ein äußerliches Gerinnsel dar). Dieses ist jedoch instabil und unterliegt der Fibrinolyse. Es muss also eine Verfestigung stattfinden, die durch Faktor XIIIa erreicht wird. Dadurch kann Fibrin i (insoluble) entstehen [4,9].

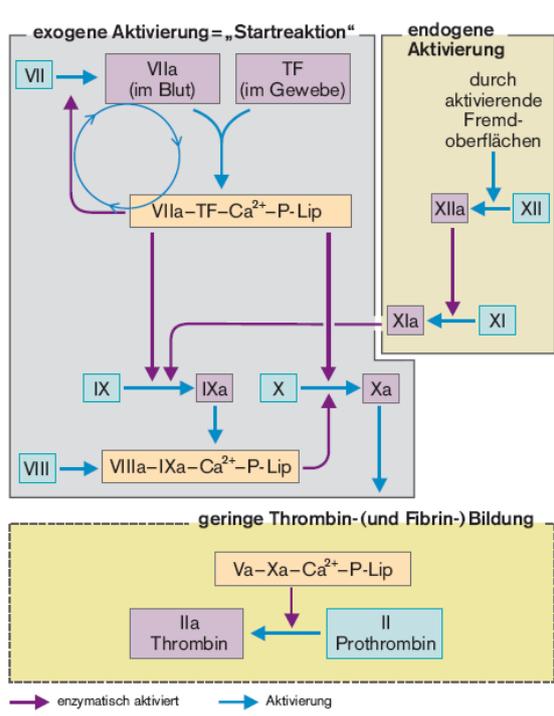


Abb. 3: Extrinsische und intrinsische Aktivierung der Blutgerinnung [10]

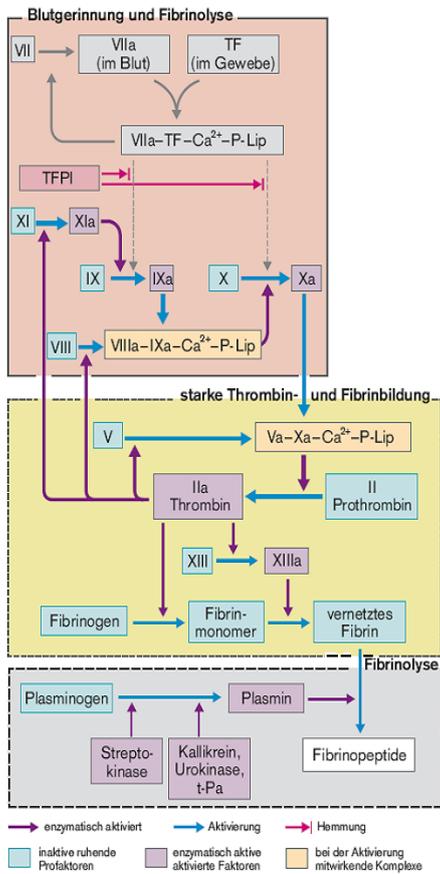


Abb. 4: Blutgerinnung und Fibrinolyse [10]

#### 1.3.4 Das Fibrinolyse-System

Damit sich Gewebe wieder neu bilden kann und dennoch nicht das gesamte Gefäßsystem verstopft wird, muss der gebildete Thrombus wieder aufgelöst werden. Diese Aufgabe übernimmt das Fibrinolyse-System, das aus inaktivem Plasminogen und seinen Aktivatoren (t-PA, Urokinase, Kallikrein) besteht (Abbildung 4) [13].

Mit Einsetzen der Gerinnung wird das Fibrinolyse-System aktiviert, was über die Faktoren am Verletzungsort erfolgt, sobald eine Bindung von Fibrin und t-PA stattgefunden hat. Im nächsten Schritt spaltet Faktor XIIa HMWK, wodurch Bradykinin entsteht. In der Folge kommt es zur Freisetzung vom gewebespezifischen Plasminogenaktivator (t-PA).

Durch die erfolgte Aktivierung entsteht die Serinprotease Plasmin, die Fibrinogen, Fibrin sowie die Faktoren V und VIII spaltet [9]. Plasminogen und Plasminogenaktivatoren haben eine hohe Affinität zu polymerisiertem Fibrin, was die Aufspaltung des Thrombus zur Folge hat. Durch den proteolytischen Fibrinabbau entstehen Fibrinolyseprodukte, die im Blut nachweisbar sind. Die Abbauprodukte sind die Fragmente X, A, B und C. Aus Fragment X entsteht über Zwischenprodukte ein D-Fragment oder auch D-Dimer, dem große klinische Bedeutung zukommt. Ist ein Anstieg davon im Blut messbar, beweist dies einen gesteigerten Gerinnungsablauf. Der Nachweis erfolgt mittels ELISA. Da die Spaltprodukte auch die Thrombinwirkung hemmen, kommt es zu keinem gleichzeitigen Auf- und Abbau des Thrombus.

Plasmin wiederum aktiviert Faktor XII und es erfolgt eine Rückkopplung. Dieses Plasminogen-Plasmin-System wird durch Inhibitoren gebremst und kontrolliert. Eine weitere Erfassung der Fibrinolyseaktivität erfolgt durch Prothrombinfragmente 1+2 und den Thrombin-Antithrombin-Komplex.

Auch beim Fibrinolyse-System muss eine negative Rückkopplung vermieden werden. Dies erfolgt physiologisch durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin.

Die Hauptregulation der Fibrinolyse stellt jedoch die Verfügbarkeit von Plasminogenaktivatoren dar [9,10,13].

## 1.4 Labormethoden zur Gerinnungsfunktionsprüfung

### 1.4.1 Gerinnungszeit

Die Gerinnungszeit bezeichnet die Zeit zwischen Blutentnahme und der Blutgerinnung im Probenröhrchen.

Erzielt wird dies z. B. mit Hilfe der Globaltests. Diese prüfen primär die plasmatischen Gerinnungsfaktoren, ausgenommen Faktor XIII.

Zu diesen Globaltests zählen der Quicktest (Thromboplastinzeit) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) [10,12,20].

Durch den Quick-Test wird das exogene plasmatische System überprüft. Hierzu wird Citratplasma mit einer optimalen Menge an Thromboplastin und Calcium inkubiert und damit ein Gerinnungsvorgang ausgelöst. Die zur Gerinnung benötigte Zeit wird mit Verdünnungsreihen normaler Plasmen verglichen und in Prozent angegeben, wobei der Normbereich zwischen 75-125% liegt.

Orale Antikoagulantien wie z. B. Marcumar wirken sich hauptsächlich auf die verfügbare Menge funktionstüchtiger Faktoren aus diesem Bereich aus.

Deshalb ist die Thromboplastinzeit der Standard-Laborparameter für die Einstellung und Überwachung der oralen Antikoagulantientherapie.

Der Quick-Wert wurde jedoch durch die „International Normalized Ratio“ (INR, Norm ca. 1,0) abgelöst, da beim INR auf Standardreagenzien Bezug genommen wird. Folglich wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Laboratorien deutlich verbessert.

Ein INR-Wert von 1,0 entspricht einem Quick-Wert von 100% [10,12,20].

Mit dem Quick erfasste Faktoren sind: II und VII.

Weniger genau erfasst werden die Faktoren X, V sowie Fibrinogen [13].

Es stehen verschiedene Analysetechniken zur Verfügung um den Quick-Wert zu ermitteln. Möglich sind die manuelle Methode (Häkchenmethode), Schnittger-Gross-Koagulometer, Kugelkoagulometrie oder auch optische Methoden [20].

Die aPTT erfasst das endogene plasmatische System. Der Blutprobe wird partielles Thromboplastin (entsprechend PF3) und Aktivatorsubstanz (anorganische oder organische Substanzen, die Kontaktoberfläche für beschleunigte Aktivierung bieten) zugegeben. Liegt die Gerinnungszeit zwischen 25-38 s, entspricht sie der Norm [4,9,10,12].

Fehlerhafte Funktionen folgender Faktoren können bestimmt werden: XII, XI, VIII, X, V, II, I. Der Faktor VII sowie leichte Formen der Hämophilie werden jedoch nicht registriert [13].

Die Thrombinzeit ist ein weiterer Funktionstest, der die Fibrinbildungsfähigkeit erfasst, aber nicht zu den Globaltests zählt. Dabei wird die Umwandlung von Fibrin in Fibrinogen verfolgt, was mittels Zugabe reinen Thrombins unter Ausschaltung aller weiteren Plasmafaktoren geschieht. Gemessen wird die Gerinnungszeit, wobei der Normalwert zwischen 16-20 s liegt [12,13].

Indikationen für eine Thrombinzeitmessung können sein:

- Überwachung fibrinolytischer Wirkung einer Lysetherapie
- Überprüfung gerinnungshemmender Wirkung einer Heparintherapie
- Nachweis Fibrinbildungsstörung bei ausgeprägtem Fibrinogenmangel [20]

## 1.5 Biosensoren

Biosensoren sind eine Untergruppe der Chemosensoren und finden heute in verschiedenen Bereichen Anwendung. Unter anderem in der klinischen Analytik, Umweltanalytik, Lebensmittel- und Bioprozesskontrollen sowie in der Blutanalytik (Abbildung 5) [5].

Ein Biosensor kann als miniaturisierter Messwertaufnehmer bezeichnet werden, der aus einem Transducer und einer selektiven Erkennungskomponente (extrinsische Sensoren) besteht. Diese Erkennungskomponente wird durch eine chemische oder biologische Beschichtung realisiert, mit der eine selektive Stofferkennung möglich ist. Es gibt verschiedene Arten von Transducern. So können elektrochemische, optische, thermische und piezoelektrische unterschieden werden.

Kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem jeweiligen Analyt und der Erkennungskomponente, wird diese durch den Transducer in ein elektrisch auswertbares Signal umgewandelt.

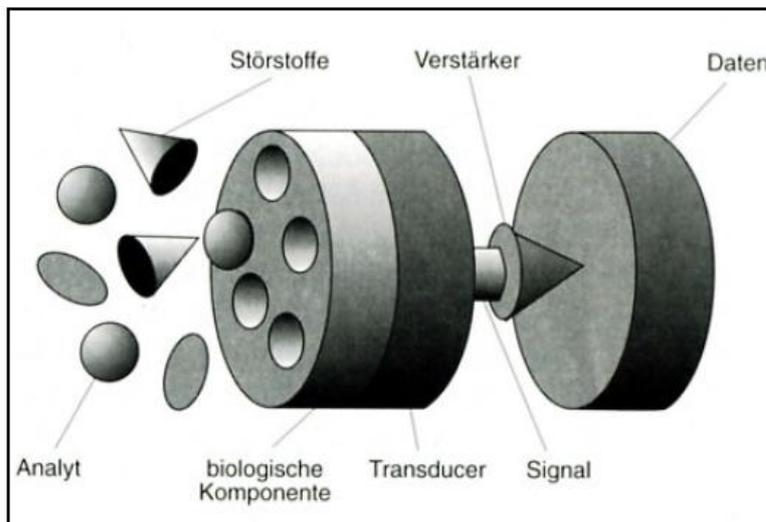
Die Analyterkennung geht mit einer Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Reaktionspartners einher.

Dabei können Metabolismus und Affinitätssensoren unterschieden werden.

Bei Letzteren findet kein Stoffumsatz statt. Vielmehr erzeugt die Änderung der physikalischen Eigenschaften ein Signal.

So reagieren Schwingquarze auf eine Massenänderung und optische Biosensoren auf eine Änderung des Brechungsindex sensibel.

Auch bei Immunsensoren kommt es zu einer affinen Bindung über das Schlüssel-Schloss-Prinzip. Sie sind ein Spezialfall der Affinitätssensoren, bei denen z.B. Antikörper zum Einsatz kommen [5,21].



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau eines Biosensors [5]

### 1.5.1 Massensensitive Sensoren

Kommt es zu einer Massenänderung auf der Sensoroberfläche, kann diese zur Detektion von Analyten genutzt werden.

Nach diesem Prinzip funktionieren massensensitive Immunsensoren, bei denen die Antikörper auf der Oberfläche mit dem korrespondierenden Antigen reagieren, woraus eine Massenzunahme erfolgt [22,23].

### 1.5.2 Quartz-Crystal-Microbalance (QCM)

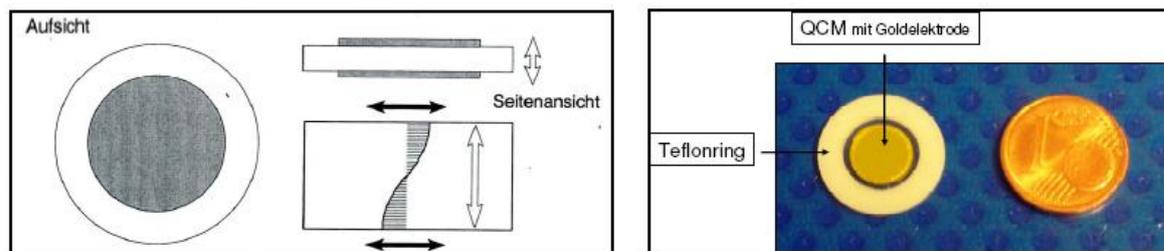
Unter QCM wird ein Messwertumsetzer auf Basis akustischer Sensoren verstanden. Diese bestehen aus piezoelektrischem Substrat, auf dessen Stirnflächen Metallelektroden aufgebracht sind.

Wird ein elektrisches Wechselfeld angelegt, kommt es zu Schwingungen im Ultraschallbereich. Dies wird durch den 1880 von Pierre und Jaque Curie entdeckten piezoelektrischen Effekt ermöglicht [23]. Dabei entsteht bei piezoelektrischen Kristallen durch Anlegen von mechanischen Spannungen an deren Oberfläche eine elektrische Ladung. Umgekehrt wird durch eine elektrische Wechselspannung eine mechanische Spannung erzeugt. Diese

Piezoelektrizität zeigen nur Kristalle, die kein Inversionszentrum (d. h. Symmetriezentrum [24]) besitzen [5].

Unter einer QCM wird eine als Schwingquarz bezeichnete Quarzkristallscheibe verstanden, die eine bestimmte Geometrie, einen speziellen Kristallschnitt sowie eine hohe Frequenzkonstanz aufweist (Abbildung 6). Durch die innerhalb des Schwingquarzes erzeugte transversale Scherwelle kommt es zu Wechselwirkungen mit denen an der Schwingquarzoberfläche angrenzenden Medien. Kommt es nun zu einer Massenänderung, fällt die Resonanzfrequenz proportional zur Masse der Fremdschicht ab.

Mit QCM-Sensoren kann eine abgeschiedene Masse mit Hilfe der Schwingquarzmethode im weitesten Sinne „gewogen“ werden, wobei im Zentrum des Quarzes die Schichtwäageempfindlichkeit am größten ist [5,25-30].



**Abb. 6:** Links: Schwingquarz schematisch mit Scherwellenausbreitung

Rechts: Schwingquarz in Halterung, zum Größenvergleich Cent-Stück [31]

## 1.6 Sensorbeschichtung

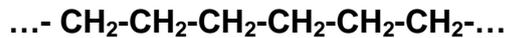
Die Beschichtung ist einer der wichtigsten Faktoren in der Biosensorik. Von ihr ist der Erfolg des Nachweises abhängig.

Für die folgenden Experimente wurde Polyethylen (PE, Abbildung 7) verwendet. Mittels dieser Beschichtung konnten erstmals Gerinnungszeiten in Vollblut gemessen werden, die mit der klinischen Standardmethode Koagulometrie übereinstimmten [21].

PE wurde 1933 bei der Fa. ICI entdeckt und kann nach zwei Verfahren, dem Hoch- oder Niederdruckverfahren, hergestellt werden. Gewonnen wird Polyethylen durch die Polymerisation einfacher Alkene [32,33].

Ungelöst ist Polyethylen ein relativ weicher, biegsamer, zäher und wachsähnlicher Kunststoff mit zahllosen Anwendungsmöglichkeiten [34].

Die kristalline Struktur gleicht im Wesentlichen der von linearen Alkanen mit 20-40 Kohlenstoffatomen [35].



**Abb. 7:** Strukturformel Polyethylen

### 1.7 Sensorregeneration

In der Schwingquarzsensoren spielt auch die Regeneration des Sensors eine wichtige Rolle. Die Regeneration bietet die Möglichkeit mit demselben Quarz mehrere Messungen durchführen zu können. Dabei ist es wichtig, dass die Sensorbeschichtung durch den Regenerationsvorgang nicht beschädigt wird und der gesamte Ablauf der Regeneration einfach und schnell durchführbar ist.

Es wurden bereits verschiedene Untersuchungen zu Sensorregenerationen durchgeführt. Beispielsweise gelang es mit Natronlauge Protein A beschichtete Schwingquarze von Erythrozyten zu reinigen und somit denselben Quarz über mehrere Versuche hinweg zu verwenden. Dies wurde u. a. in Versuchen von Döring, Gehring oder Krapf gezeigt. Cluss wiederum erreichte diesen Effekt, indem er Salzsäure verwendete.

Ein weiteres Reagenz, das zur Regeneration eingesetzt werden kann, ist SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat). Es wird in der Biotechnologie als Protein-Denaturierungsmittel eingesetzt. Die Wirkung auf Proteine rührt daher, dass nicht-kovalente Bindungen der Proteine unterbrochen werden. Somit wird die Tertiär- und Quartärstruktur zerstört [36].

### 1.8 Ziel der Arbeit

In vorangegangenen Untersuchungen sind Gerinnungsversuche mittels Schwingquarzsensoren durchgeführt worden, bei denen der modifizierte Quick-Test etabliert werden konnte [21].

Im Anschluss an diese Versuche soll nun eine Möglichkeit gefunden werden, die Schwingquarzsensoren vollständig von koaguliertem Blut zu reinigen, damit diese für eine Wiederverwendung zur Gerinnungsmessung zur Verfügung stehen. Zunächst werden dazu Versuche am Dummy-System (keine elektrische Kopplung des Sensors) durchgeführt, um Reagenzien zu finden, die in der Lage sind, das Gerinnsel aufzulösen. Bei der Übertragung auf die FidgeType Anlage besteht das Ziel darin, die im Dummysystem gewonnenen Erkenntnisse auf Anwendbarkeit zu prüfen und soweit zu optimieren, dass ein standardisierbarer Regenerationsvorgang erreicht werden kann. Soweit als möglich sollen die Versuche unter identischen Randbedingungen durchgeführt werden.

Da das Verfahren in der Routinediagnostik der Blutgerinnung angewandt werden soll, sollte die entwickelte Regenerationsprozedur auch von wirtschaftlich von Interesse sein.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

- Aceton: HPLC grade, 99,9%, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
- Aqua bidest: 18,2 Mega-Ohm x cm Leitfähigkeit, stationäre Laborversorgung
- Hellmanex II: Helma GmbH, Müllheim
- NaOH: Natriumhydroxid, rein, Plättchen, Merck KGaA, Darmstadt
- NaCl: Natriumchlorid, Fluka, Neu-Ulm
- N<sub>2</sub>-Gas: Stickstoff, 4.0, stationäre Laborversorgung
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Schwefelsäure, 98%, Merck KGaA, Darmstadt
- SDS: Sodium Dodecyl Sulfat, Pulver, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim, in Aqua bidest., 0,5 molar  
pH-Wert mittels HCl (Salzsäure) eingestellt
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid, 30%, Merck KGaA, Darmstadt
- TRIS: Trishydroxymethylaminomethan, Merck KGaA, Darmstadt
- Decalin: cis-trans-Decalin, Sigma, Deisenhofen
- Coomassie Brilliant Blue: Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

- Tris-NaCl-Puffer, pH 7,4: 1000 ml Ansatz: 1000 ml Aqua bidest, 7,3 g NaCl, 6,05 g Trishydroxymethylaminomethan
- Piranha-Lösung: 15 ml Schwefelsäure, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
5 ml Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%

#### 2.1.3 Gerinnungsreagenzien

- Thromborel S: Fertigreagenz, Dade Behring, Düdingen
- Actilyse: Rekomb. t-PA (rt-PA) Actilyse (Konz. 1mg/ml), Böhlinger Ingelheim

#### 2.1.4 Blutproben

- Es wurden anonymisierte Proben unbehandelten Vollblutes freiwilliger Spender verwendet.
- Die Abnahme erfolgte in Citratröhrchen der Firma Sarstedt.
- Lagerung der Blutprobe bei Raumtemperatur.
- Für die Versuche wurde das Blut in unterschiedlichen Verdünnungen (1:2, 1:4) verwendet.
- Die Verdünnung erfolgte mit TRIS/NaCl.
- Das zur Aktivierung des Gerinnungsvorganges verwendete Thromborel wurde bei einer Blutverdünnung von 1:2 unverdünnt und bei einer Blutkonzentration von 1:4 mit einer Verdünnung von 1:4 angewendet.

#### 2.1.5 Labormaterialien und Geräte

- Digitalkamera: Casio QV 5700, 5.0 Megapixel, vierfach optischer und dreifach digitaler Zoom, Casio Europe GmbH, Hamburg
- Lötkolben: WS 80, Weller GmbH, Besigheim
- Mikroskop: Auflichtmikroskop Axiostar 2 MAT, Carl Zeiss AG, Jena
- Mischschüttler: Relax top, Heidolph GmbH, Kelheim
- Wärmeschrank: Galaxy S, RS Biotech Laboratory Equipment Ltd, Ayrshire (UK)
- Biomatic 2000 Coagulometer: Sarstedt, Nümbrecht
- Spincoater: Spin 150-V3-NPP, SPS Europe, Ingolstadt

#### 2.1.6 QCM-Sensor

- Quarz: polierte Quarzscheibe, AT-Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektrode zur Kontaktierung, Frequenz 10 MHz  
Konstruktion: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen,  
Herstellung: Vectron International KVG, Neckarbischofsheim
- Quarzhalterung: Haltering aus Teflon, Innendurchmesser 9 mm, Außendurchmesser 16 mm  
Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

- Nicht-Selbstklebende Kunststoffolie aus Polypropylen:  
Innendurchmesser 6 mm, Außendurchmesser 13 mm  
Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

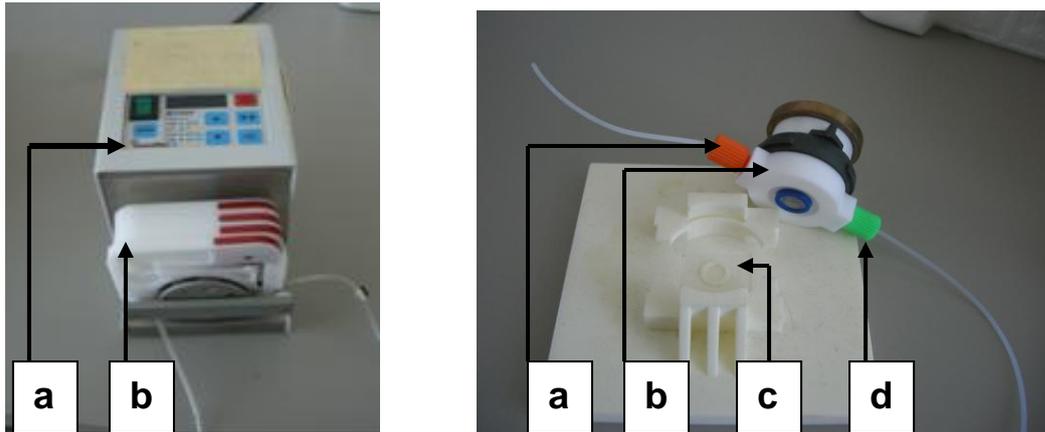
### 2.1.7 Dummy-Messanlage

Die Dummy-Messanlage kann als Vereinfachung der FidgeType Anlage betrachtet werden (Abbildung 8). Es können dieselben Quarze verwendet werden, die jedoch nicht zum Schwingen angeregt werden können, da auf eine elektronische Vorkontaktierung der Schwingquarze verzichtet wurde.

Mit der Anlage kann somit lediglich eine optische Auswertung vorgenommen werden, z.B. mit Hilfe eines Mikroskops.

Ebenfalls identisch zur FidgeType ist die Fluidik. Dies ist sinnvoll und notwendig, um eine Übertragbarkeit der Experimente auf die FidgeType Anlage vornehmen zu können. Auch beim Dummy besteht die Fluidik aus biokompatiblen Materialien wie beispielsweise Teflon. Die Flussleitung hat einen Durchmesser von 1mm, 1/16" und ein Volumen von 16  $\mu$ l (Ismatec Wertheim). Das Reagenz wird über ein Schlauchsystem in die Messzelle gepumpt, wobei es sich um die Peristaltikpumpe Reglo-Digital MS 4/8-100 mit Pumpenschläuchen TYGON (Ismatec Wertheim) handelt.

Die Flusszelle besteht aus einer Kunststoffummantelung mit Dichtring und hat ein Volumen von 14  $\mu$ l (Konstruktion und Herstellung Dr. Frank Gehring, Tübingen). Die Dummy-Messanlage wurde für Vorexperimente genutzt, um grundlegende Mechanismen zu testen bzw. zu verbessern [5].



**Abb. 8:** Links: Dummy-Anlage mit: (a) Bedienfeld der Pumpe und (b) Pumpe;  
Rechts: (a) Zufluss zur Messzelle (b) sowie die Halterung zur Aufnahme des Schwingquarzes (c) und Abfluss (d)

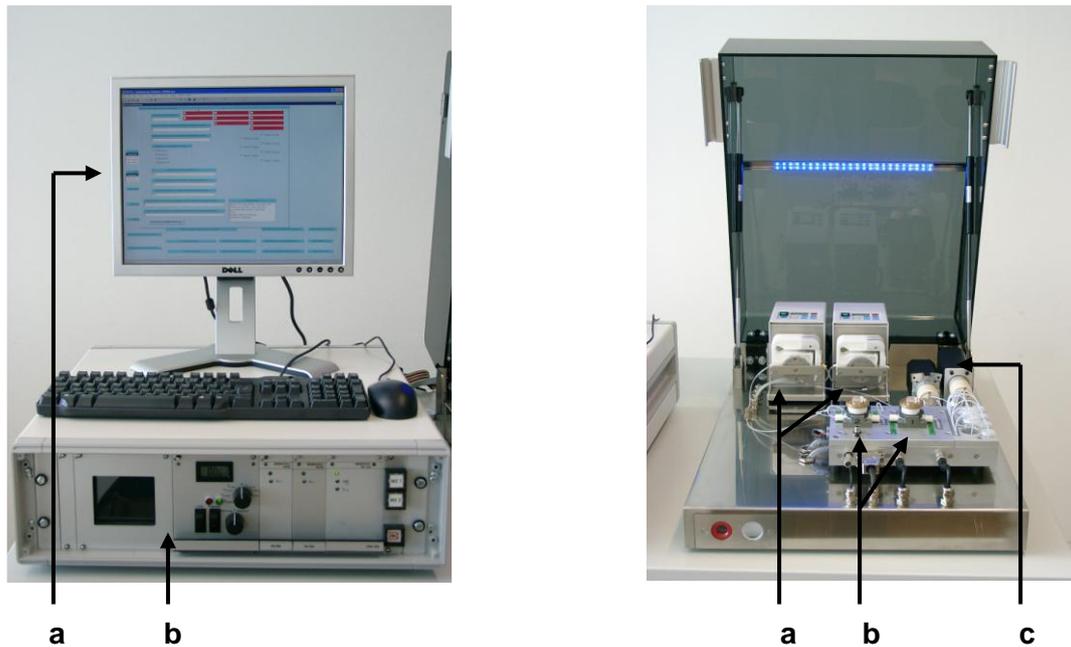
### 2.1.8 FidgeType Fg T1 Anlage

Von Dr. F. K. Gehring wurde ein vollautomatisiertes Blutanalysegerät entwickelt, das aus einer Sensorplattform sowie einem Steuergerät besteht und nach dem Prinzip der QCM-Technik arbeitet (Abbildung 9).

Die Sensorplattform beinhaltet zwei Messkammern, in der die Schwingquarze über eine spezielle Halterung fixiert sind und mit Hilfe der Elektronik zum Schwingen angeregt werden können.

Das Reagenz kann über eine Fließ-Injektions-Anlage mit Probenschleife in die Messkammer und damit auf den Quarz gebracht werden.

Die Beschichtung der Quarze erfolgt je nach Aufgabenstellung innerhalb oder außerhalb der Messkammer. An die Messstation sind das Steuergerät und ein PC angeschlossen. Mit der speziell entwickelten Software Agilent-Vee Umgebung können  $\Delta f$  (Frequenz) und  $\Delta \Gamma$  (Dämpfung) erfasst und graphisch dargestellt werden. Die Dämpfung wird im Folgenden nicht näher betrachtet. Die Entwicklung dieser Software erfolgte durch Dr. Frank Gehring und Dr. Hartmut Drechsel (Tübingen). Ferner werden Temperatur, Fließgeschwindigkeit und Ventilpositionen aufgezeichnet. Auch auf die Pumpen und den Peltier-Controller kann zugegriffen werden [5].



**Abb. 9:** Links FidgeType-Anlage mit PC (a) und Steuergerät (b); Rechts: Messanlage mit Pumpen (a), Messkammern (b) und den Ventilen (c)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Schwingquarzpräparation

#### Quarzeinigung

Zunächst erfolgte eine Entfettung des Quarzes durch einminütiges Eintauchen in Aceton. Es folgte eine Spülung mit Bidest und Trocknung durch  $N_2$ . Nun wurde der Quarz 60 s in frische Piranha-Lösung getaucht und wieder mit Bidest gespült und  $N_2$  getrocknet.

#### Quarzbeschichtung

Der gereinigte Quarz wurde in den Spin coater eingebaut und bei 3000 U/min für 180 s mit 20 ml der PE-Lösung beschichtet.

Damit das restliche Lösungsmittel verdampfte, wurde der Quarz für 20 min bei 70°C in den Wärmeschrank gelegt.

### 2.2.2 Clot-lysis-Versuche

Um zu untersuchen, welche Reagenzien den Clot auflösen, wurden Verdünnungsreihen von NaOCl, NaOH und Hellmanex hergestellt.

Es wurden 3x6 Einheiten mit Vollblut (25  $\mu$ l, Verdünnung 1:2) in einer Mikrotiterplatte vorbereitet. Diese wurden mit 50  $\mu$ l Thromborel (unverdünnt) versetzt, resuspendiert und 5 min stehen gelassen, damit sich der Clot ausbildet. Nun wurden je 80  $\mu$ l NaOCl, NaOH und Hellmanex in absteigender Konzentration zugegeben und bei 200 U/min auf den Rüttler gestellt. Nach 25 min wurde dann das endgültige Ergebnis optisch ausgewertet.

### 2.2.3 Dummy-System

Mit Hilfe des Dummy-Systems (Messkammer und PE beschichteter Quarz ohne elektrische Kopplung) wurde zunächst unter optischer Kontrolle die Auflösung des Clots untersucht. Dazu wurde die Messzelle mit Puffer befüllt. Im nächsten Schritt wurden 100  $\mu$ l Vollblut (1:2 Verdünnung mit Tris-NaCl) mit 200  $\mu$ l Thromborel (unverdünnt) vermischt und in die Messzelle gezogen.

Das aktivierte Blut verblieb nun 5 min in der Messzelle.

Nach dieser Zeit erfolgte die Befüllung der Kammer mit 1 M NaOH und die Reaktion in der Messkammer wurde beobachtet sowie mit Fotos dokumentiert.

Dieser Versuch ist ebenfalls mit einer NaOH-Konzentration von 0,5 M durchgeführt worden. Bei der Blutkonzentration wurde zwischen 1:2 und 1:4 variiert. Schließlich wurde versucht ein Regenerationsverfahren zu finden, das den Clot zumindest optisch vollständig vom Quarz entfernt.

Nach der Gerinnungszeit von 5 min innerhalb der Messkammer folgte die Befüllung mit NaOH (0,5 M oder 1 M, Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min). War die Kammer befüllt, wurde der Fluss auf 0,8 ml/min erhöht, bis der größte Anteil des Gerinnsels entfernt war. Anschließend wurde die Pumpe auf 0,07 ml/min für 1,5 min herunter reguliert.

Bei späteren Versuchen folgte nach diesem Schritt ein Wechsel der Pumprichtung, um die letzten Clotreste vom Quarz zu entfernen. Auch dies geschah bei einem Flow von 0,8 ml/min.

Nachdem der Quarz rein optisch gereinigt war, wurde er mit Puffer gespült.

#### 2.2.4 Coomassiefärbung von Proteinen

Auf den Quarz wurde aktiviertes Vollblut (1:2) aufgebracht. Nach 5-minütiger Koagulationszeit erfolgte die Regeneration mit NaOH 1 M. Nun wurde der Quarz ausgebaut und mit Puffer gespült. Anschließend ist die Quarzoberfläche 20 min lang mit Coomassie Brillant Blue versetzt worden. Danach erfolgten die Reinigung mit Entfärber und Puffer sowie eine Behandlung der Oberfläche mit Coomassie-Fixierlösung.

Dieser Vorgang diente dazu, die Quarzoberfläche unter dem Mikroskop zu betrachten, um evtl. verbliebene Proteine durch den Anfärbeprozess mit Coomassie sichtbar zu machen.

#### 2.2.5 Gerinnungsmessungen

Bevor die Quarze in die Messkammer eingebaut wurden, erfolgte eine Vorinkubation mit Vollblut, da sich in vorhergehenden Experimenten gezeigt hatte, dass daraufhin eine bessere Ankopplung des Gerinnsels an die Schwingquarzoberfläche erreicht werden konnte [21]. Für diesen Schritt wurden 50 µl Citrat-Vollblut für 10 min auf den Quarz gebracht. Nach dieser Zeit erfolgten eine Reinigung mit Tris/NaCl-Puffer sowie eine abschließende Reinigung mit bidestilliertem Wasser. Anschließend wurde der vorinkubierte Quarz mit Stickstoff getrocknet.

Die Messungen sind nach folgendem Schema durchgeführt worden:

Bei einer Blutkonzentration von 1:2

100 µl Vollblut gemischt mit 200 µl unverdünntem Thromborel wurden mit einer Flussrate von 0,8 ml/min in die Messkammer gezogen. War die Sensoroberfläche vollständig bedeckt, wurde die Pumpe gestoppt und die Blutgerinnung verfolgt. Vor Start des Regenerationsvorganges verblieb der Clot 5 min auf dem Quarz. Später ist diese Zeit auf 90 s herabgesetzt worden.

Bei einer Blutkonzentration von 1:4

100 µl Vollblut gemischt mit 100 µl Thromborel (ebenfalls 1:4 verdünnt mit Tris/NaCl) wurden bei einer Flussrate von 0,4 ml/min in die Messkammer gezogen. Das weitere Vorgehen glich dem obigen.

#### 2.2.6 Regeneration der Quarze

Der allgemeine Regenerationsprozess:

Die mit aktiviertem Vollblut gefüllte Messkammer wurde zunächst mit NaOH, bei einer Pumpeneinstellung von 0,5 ml/min, befüllt. War die Kammer gefüllt, folgte eine Änderung der Pumpeneinstellung für 20 s auf 0,8 ml/min.

Die einzelnen Prozessschritte sowie die Variation der unterschiedlichen Parameter der Regenerationsschritte werden im Ergebnisteil näher beschrieben.

#### 2.2.7 Quarzvorinkubation innerhalb der Messkammer

Bei einigen Versuchen sollte die Vorinkubation am eingebauten Quarz vorgenommen werden. Dabei wurde die Messkammer mit dem entsprechend verwendeten Vollblut befüllt und anschließend 10 min auf dem Quarz belassen. Nach dieser Zeit folgte der Versuch, das Blut mit Puffer vom eingebauten Quarz zu spülen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Clot-lysis-Versuche

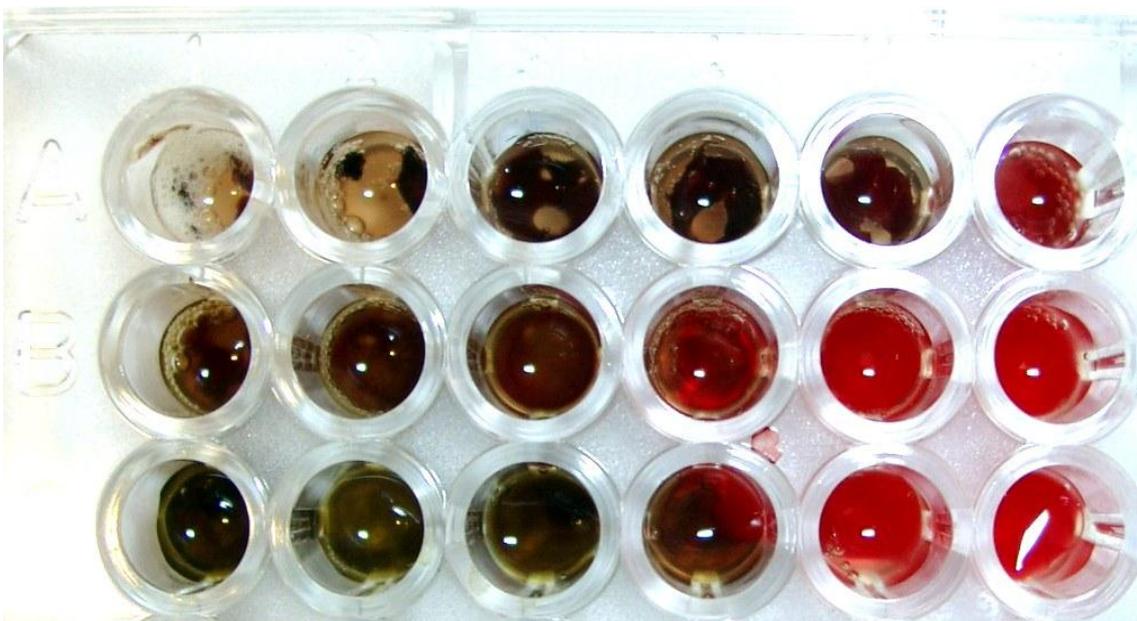
Um herauszufinden, welche Reagenzien für eine schnelle Auflösung eines Gerinnungsclots geeignet sind, wurden folgende Reagenzien herangezogen (Abbildungen 10 und 11):

- NaOCl: Dieses Reagenz konnte keine vollständige Gerinnseauflösung bewirken und es kam zur Gas- bzw. Bläschenbildung. Die Gasbildung war besonders gut in den Kammern A1 und A2 der Abbildung 11 zu erkennen.
- Hellmanex: Mit Hellmanex konnte nach rein optischen Kriterien eine Reaktion vermutet werden, da es in Abbildung 11 B1-B3 den Anschein hat, dass der Clot sich zusammengezogen und eine Auflösung stattgefunden hat. Jedoch zeigte die Probe mit einem Häkchen keine vollständige Clotauflösung.
- NaOH: Von den hier genutzten Reagenzien erbrachte NaOH die besten Ergebnisse. Bis zu einer Verdünnung von 0,125 M war eine Reaktion zu beobachten (Abbildung 11 C4), jedoch kam es zu keiner vollständigen Auflösung mehr. Dies konnte schon rein optisch vermutet werden, da noch rote Clotanteile sichtbar waren, während dies in den Kammern C1-C3 nicht der Fall war. Diese Vermutung wurde durch den Häkchentest betätigt.

Die Prozessbeschreibung der Versuche findet sich im Abschnitt Material und Methoden Kapitel 2.2.3.



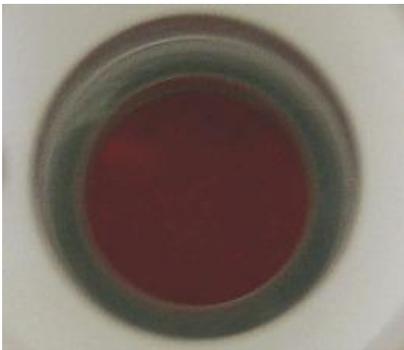
**Abb. 10:** Mikrotiterplatte mit Vollblut 1:1 vor Zugabe der Reagenzien



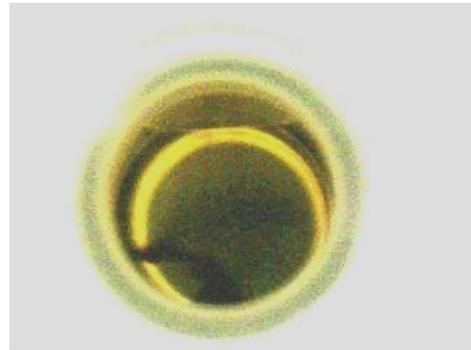
**Abb. 11:** Mikrotiterplatte 25 min nach Zugabe der Reagenzien,  
von oben nach unten: NaOCl, Hellmanex, NaOH  
von links nach rechts: in jeweils absteigender Konzentration

### 3.2 Messungen mit dem Dummysystem

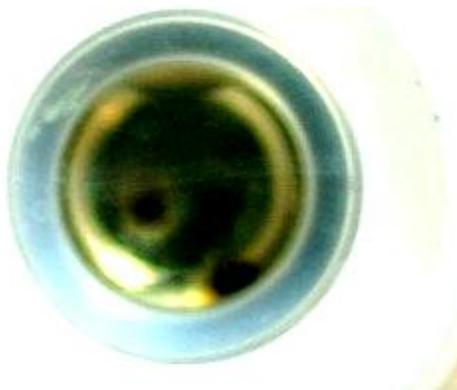
Die Auflösungsexperimente wurden in einer Nachbildung der Schwingquarz-anlage (ohne Schwingungsgenerator) durchgeführt, um die Auflösung des Clots in der fluidischen Peripherie der Schwingquarz-anlage zu untersuchen. Die Durchführung der Experimente ist in Kapitel 2.2.3 aufgeführt. Die Beobachtung des Auflösungsprozesses ergab, dass sich der Clot zunächst zusammenzog und am Ende ein Rest verblieb, der sich in den ersten Versuchsaufbauten nicht entfernen ließ (Abbildung 12-14). Wurde 0,5 M NaOH verwendet, nahm die Auflösung des Gerinnsels in etwa die gleiche Zeit in Anspruch.



**Abb. 12:** Clotauflösung auf Schwingquarz:  
Aktiviertes Vollblut vor NaOH-Zugabe



**Abb. 13:** Aktiviertes Vollblut 1 min  
nach NaOH-Zugabe



**Abb. 14:** Aktiviertes Vollblut 30 min nach NaOH-Zugabe

Anschließend erfolgte der Versuch, den restlichen Clot zu entfernen. Dies gelang, indem Luft und anschließend Puffer nachgezogen wurde. Diese Luft-Puffer-Phasengrenze führte dazu, dass der restliche Clot aus der Kammer geschoben wurde.

Das Problem bei dieser Methode war jedoch die Schwierigkeit der darauf folgenden Messkammerbefüllung aufgrund der in der Messkammer verbliebenen Luftblase.

Bei den nächsten Regenerationsversuchen wurden deshalb wechselnde Pumprichtungen durchgeführt. Diese Pumprichtungswechsel geschahen bei einem Fluss von 0,8 ml/min. Je nachdem, wie viel vom Clot bereits am Anfang entfernt werden konnte, benötigte der Schritt zwischen 30 und 60 s.

Um nun die Zeit einzusparen, die benötigt wurde, um NaOH aufzuziehen, sollte eine Phasengrenze zwischen NaOH und dem Blut Anwendung finden. Diese Grenze sollte mit Glycerol gebildet werden. Um NaOH und Glycerol optisch voneinander unterscheiden zu können, wurde NaOH mit Tinte eingefärbt.

Diese Phasengrenze funktionierte nur teilweise, da es zu einer deutlichen Durchmischung des Blutes mit Glycerol kam, was nicht wünschenswert ist, da keine eindeutige Trennung der Reagenzien mehr vorlag (Abbildung 15).



**Abb. 15:** Phasengrenze zwischen NaOH und Blut. Zur Besseren Darstellung wurde NaOH mit Tinte eingefärbt.

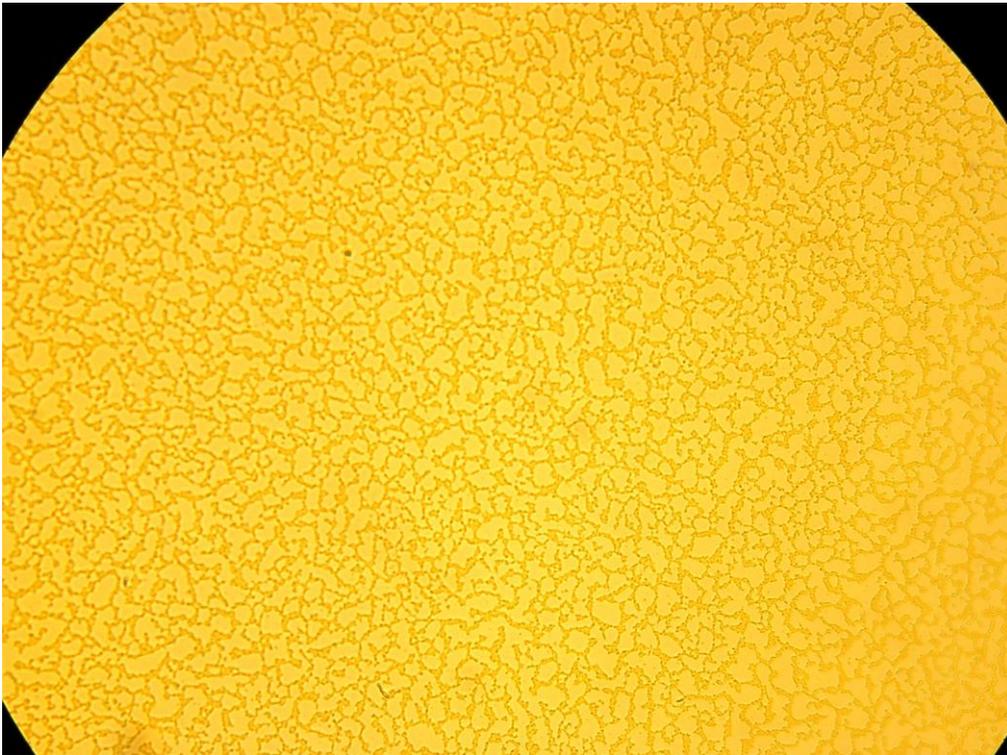
Ein weiteres Problem ergab sich aus den Pumpschritten, die während der Koagulationszeit durchgeführt werden mussten. Diese führten zu einer veränderten Situation auf dem Quarz und somit zur Verfälschung der Messwerte.

### 3.3 Coomassiefärbung von Proteinen

Die Durchführung der Coomassiefärbung findet sich in Kapitel 2.2.4.

Als Negativprobe wurde der mit PE beschichtete Quarz mit Coomassie eingefärbt. Mit Hilfe dieser Probe konnten Quarze, auf denen eine Gerinnung stattgefunden hat, auf Proteinreste untersucht werden. Sind viele Ablagerungen auf dem Quarz verblieben, kann darauf geschlossen werden, dass der Clot nicht vollständig entfernt werden konnte (Abbildung 16).

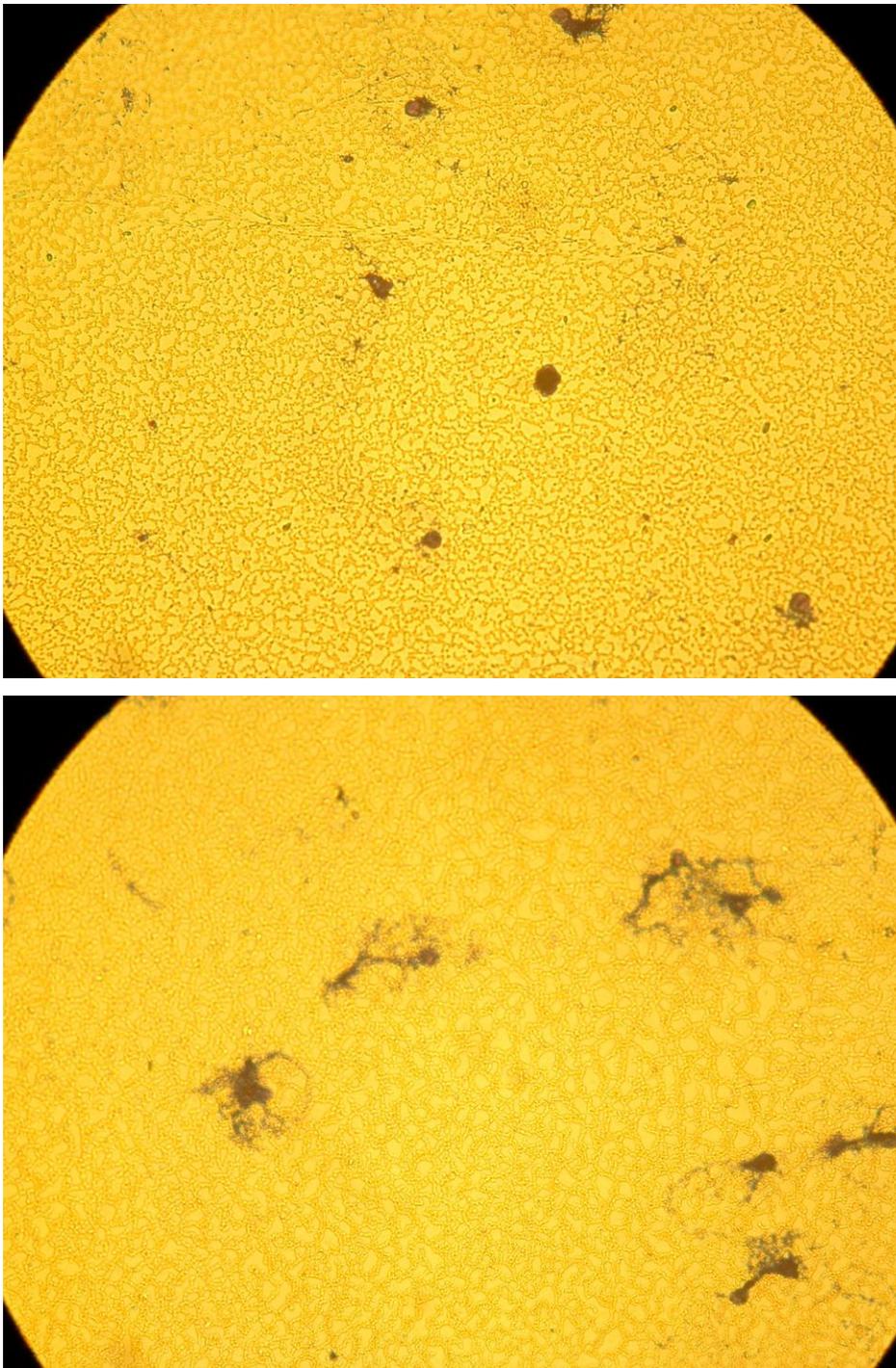
Im Ergebnis konnten vereinzelt „Klumpchen“ auf der Oberfläche dargestellt werden, was jedoch auch auf ein unvollständiges Abspülen des Coomassie-Farbstoffes zurückgeführt werden könnte.



**Abb. 16:** Quarzfärbung: PE beschichtete Oberfläche, 10 fache Vergrößerung, Negativprobe

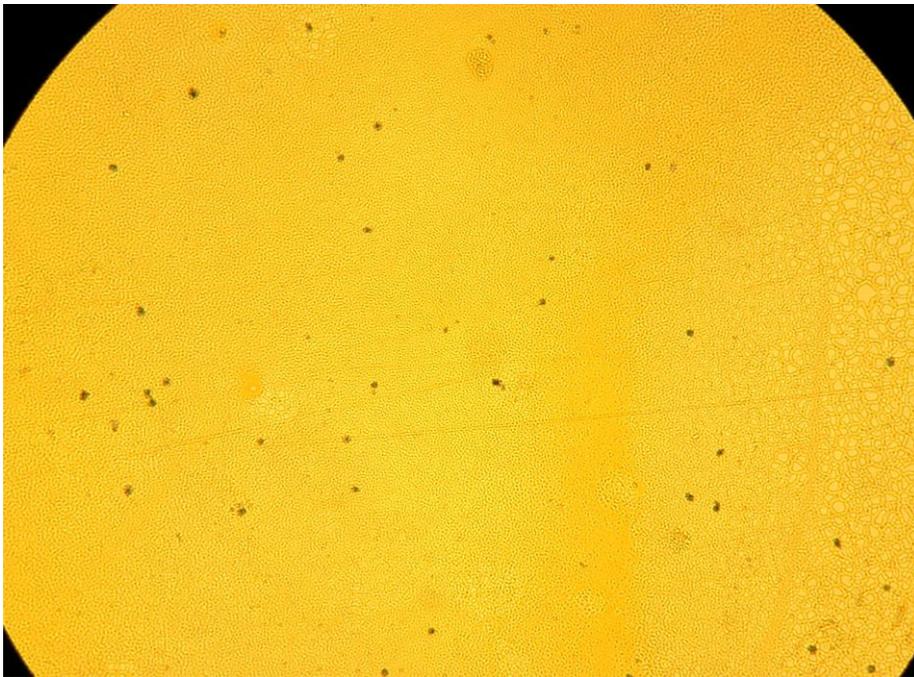
Zunächst wurde eine Koagulation durchgeführt, und der Quarz lediglich mit Puffer abgespült, ohne eine Regeneration durchzuführen. Dadurch sollte ein Vergleich mit einem Quarz ermöglicht werden, der einen oder mehrere Regenerationszyklen durchlaufen hatte.

Unter dem Lichtmikroskop konnte angefärbtes Protein sichtbar gemacht werden (Abbildung 17).



**Abb. 17:** Oben: 50 fache Vergrößerung, PE-beschichtete Quarzoberfläche  
Unten: 50 fache Vergrößerung, PE-beschichtete Quarzoberfläche,  
anderer Quarzausschnitt

Wurde die Regeneration mit NaOH durchgeführt, blieben weniger Proteine auf der Quarzoberfläche zurück (Abbildung 18).

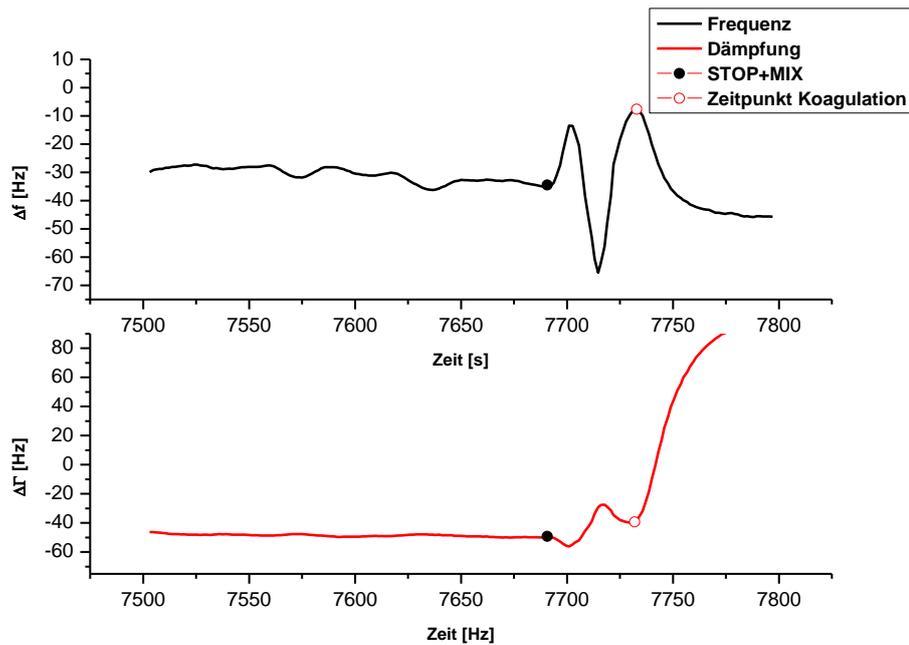


**Abb. 18:** Quarzfärbung Oben: 10 fache Vergrößerung, PE-beschichtete Quarzoberfläche;  
Unten: 50 fache Vergrößerung, PE beschichtete Quarzoberfläche

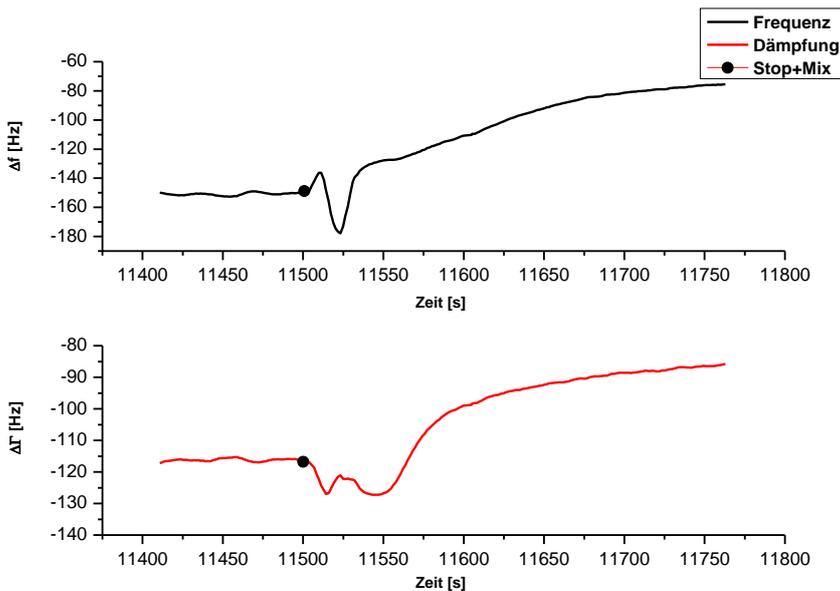
### 3.4 Messungen mit der FidgeType Anlage

#### 3.4.1 Übertragung des Dummy-Regenerationsablaufes

In den folgenden zwei Abbildungen wird beispielhaft der zeitliche Frequenz- und Dämpfungsverlauf einer Gerinnungsmessung dargestellt (Abbildung 19 und 20).



**Abb. 19:** Messkurvenverlauf eines erkannten Gerinnungsvorganges



**Abb. 20:** Messkurvenverlauf eines nicht erkannten Gerinnungsvorganges

Die ersten Gerinnungsmessungen erfolgten wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Nach den in Kapitel 2.2.6 genannten Regenerationsschritten wurde mit wechselnder Pumprichtung gearbeitet, bis der Clot komplett entfernt war.

Die Regeneration der Quarze wurde zunächst lediglich mit NaOH 1 M durchgeführt, wobei auch eine optische Kontrolle erfolgte, um zu sehen, ob eine Reinigung wie im Dummy erzielt werden konnte.

Nach der Regeneration konnte die Anfangsfrequenz, die vor der Koagulation vorherrschte, nicht mehr erreicht werden und sank mit jeder Messung weiter ab. Nach der Regeneration wurden keine weiteren Gerinnungen auf diesem Sensor erkannt.

#### 3.4.2 Quarzvorinkubation innerhalb der Messkammer

Da zwischen den einzelnen Gerinnungsmessungen der Quarz zur erneuten Vorinkubation ausgebaut werden musste, wurde für Aus- und Einbau jeweils zusätzliche Zeit benötigt. Um dies zu umgehen, ist die Möglichkeit einer Vorinkubation direkt in der Messkammer untersucht worden.

Diese Vorinkubation erfolgte wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Jedoch konnte das Blut nach 10-minütiger Inkubationszeit nicht bzw. nur schlecht vom Quarz entfernt werden. Es kam zu einer Stauung des Blutes am Abfluss der Messkammer.

Um eine Hämolyse zu erreichen und damit das Blut besser aus der Messkammer entfernen zu können, ist mit Bidest gespült worden. Eine langsame, aber nicht vollständige Entfernung des Blutes war möglich. Vor einer erneuten Zugabe mit aktiviertem Blut wurde Pufferlösung zur Spülung in die Messkammer gegeben. Aber auch nach dieser Maßnahme kam es zu keiner erneuten Gerinnungserkennung.

### 3.4.3 Verwendung von Hellmanex

In einem neuen Ansatz wurde ein weiteres Reagenz hinzugezogen, um den Quarz vollständig zu reinigen. Dazu wurde Hellmanex verwendet, da bei den Clot-lysis-Versuchen eine Reaktion beobachtet werden konnte und in Wechselwirkung mit NaOH eventuell eine vollständige Auflösung des Clots möglich erschien (Tabelle 2).

Reagenz	Fließgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s
NaOH 2 M	0,5	Bis Messkammer befüllt
	0,8	20
	0,8	Pumprichtungswechsel bis Großteil Clot entfernt
Bidest	0,4	30
Hellmanex	0,5	Bis Messkammer befüllt
	Stop Flow	1800
Puffer	0,5	Bis stabile Frequenz erreicht

**Tab. 2:** Regenerationsablauf mit NaOH und Hellmanex

Nachdem eine Gerinnung auf dem Quarz erfolgt war, wurde NaOH in die Messkammer gepumpt und konnte darin kurz einwirken, bevor eine Zwischenspülung mit Bidest erfolgte. Nun kam das neue Reagenz Hellmanex in die Messkammer. Nach der in Tabelle 2 angegebenen Einwirkzeit ist der Quarz mit Pufferlösung gespült worden. Auch bei dieser Vorgehensweise konnte keine weitere Gerinnung auf diesem Sensor durch die Messanlage erfasst werden.

### 3.4.4 Verwendung von SDS/HCl und externe Erwärmung auf 50°C

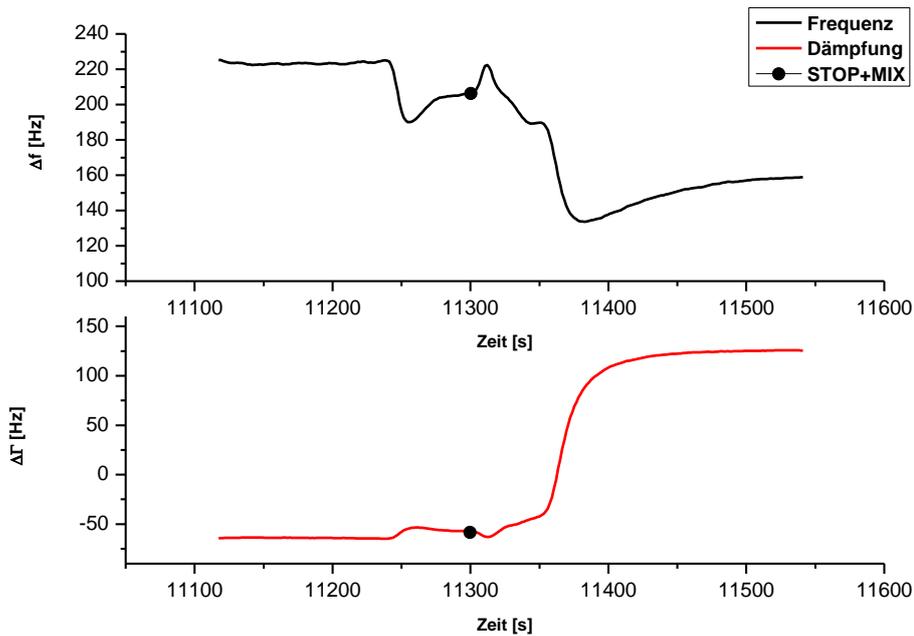
Da Hellmanex in Kombination mit NaOH nicht die gewünschten Ergebnisse erzielte, wurde nun stattdessen eine 0,5 M SDS/HCl-Mischung verwendet (Tabelle 3).

Die verwendeten Reagenzien wurden durch eine Heizplatte extern auf 50°C erhitzt, um die Reaktionsgeschwindigkeit der Auflösungsreaktion positiv zu beeinflussen.

Reagenz	Fließgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s	Gerinnung erkannt?
NaOH 2 M	0,5	Bis Messkammer Befüllt	
	0,8	20-30	
	0,1	30	
	0,8	Pumprichtungswechsel bis Großteil Koagel entfernt	
Bidest	0,3	30	
SDS/HCl	0,4	30	
	0,1	600	
Puffer	0,4	Bis stabile Frequenz erreicht	
Gerinnungsmessung			Ja Koagulometer: 51,1 s QCM: 51,0 s

**Tab. 3:** Regenerationsschritte unter Verwendung NaOH und SDS/HCl

Die entstandene Messkurve weist allerdings einen untypischen Verlauf auf (Abbildung 21).



**Abb. 21:** Messkurve nach erster Gerinnungserkennung

Der Frequenzabfall sollte bei einer erkannten Gerinnung eindeutig erkennbar sein (Abb. 19), während eine nicht erkannte Gerinnung einen kontinuierlichen Anstieg der Frequenz zur Folge hatte (Abb. 20). In diesem Fall dagegen folgte dem ersten Frequenzabfall ein Frequenzanstieg, der dann erneut abrupt abfiel. Somit konnte das Resultat dieser Gerinnungsmessung nicht eindeutig als erkannt gewertet werden.

Diese Regenerationsschritte wurden bei anderen Versuchen wiederholt. Bei den Messungen wurden Gerinnungen nach erfolgter Regeneration zunächst erkannt.

Nach der dritten Regeneration zeigte die Messung jedoch keine weitere erkannte Gerinnung. Die Auswertung war durch den geringen Frequenzabfall erschwert. Die Gerinnungsmessungen nach erfolgter Regeneration zeigen die folgenden Abbildungen 22-25.

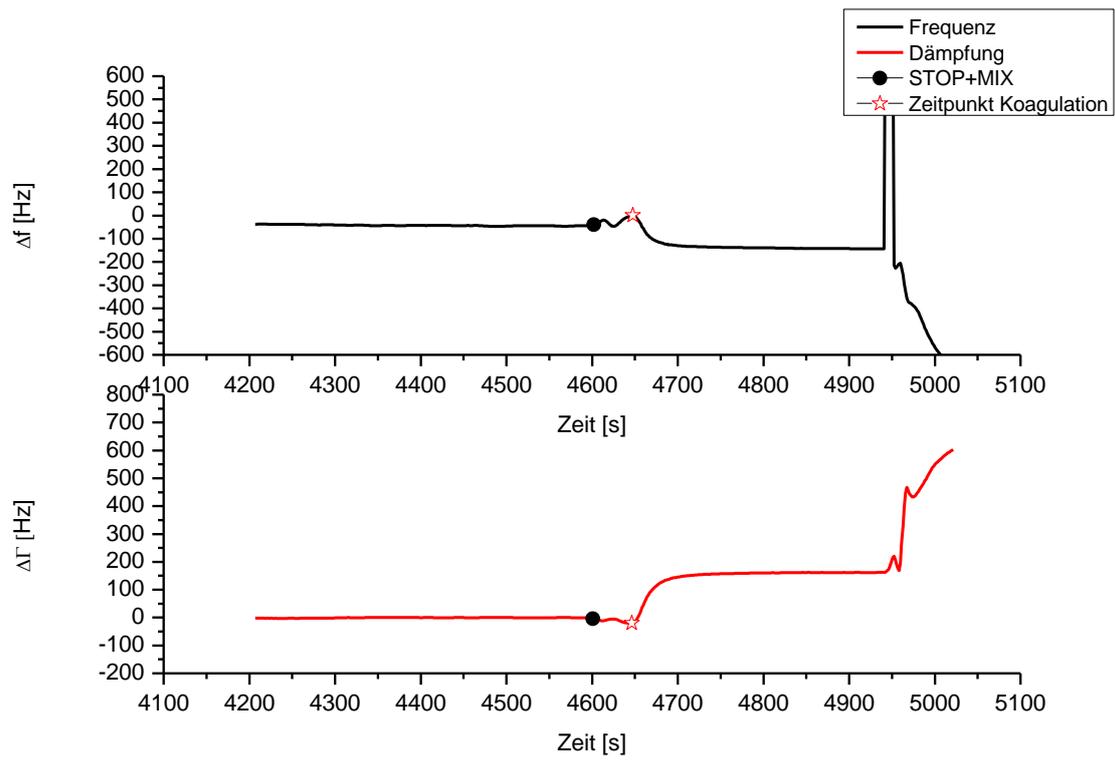


Abb. 22: Kurvenverlauf erster Gerinnungsvorgang

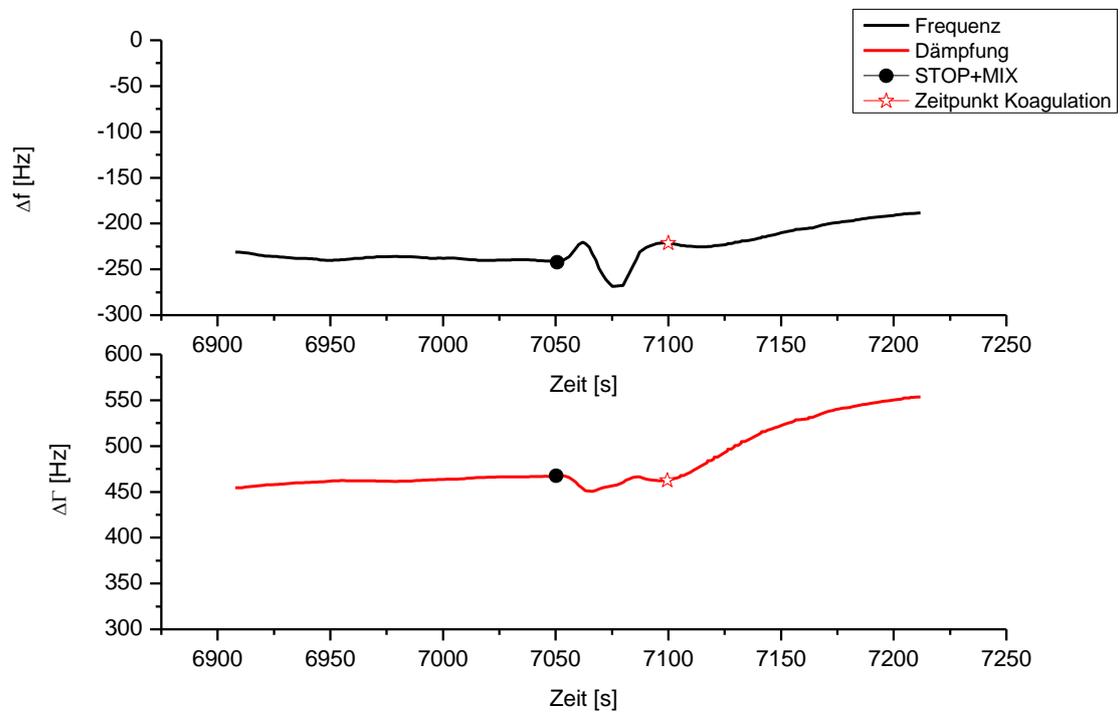


Abb. 23: Kurvenverlauf zweiter Gerinnungsvorgang nach erster Regeneration

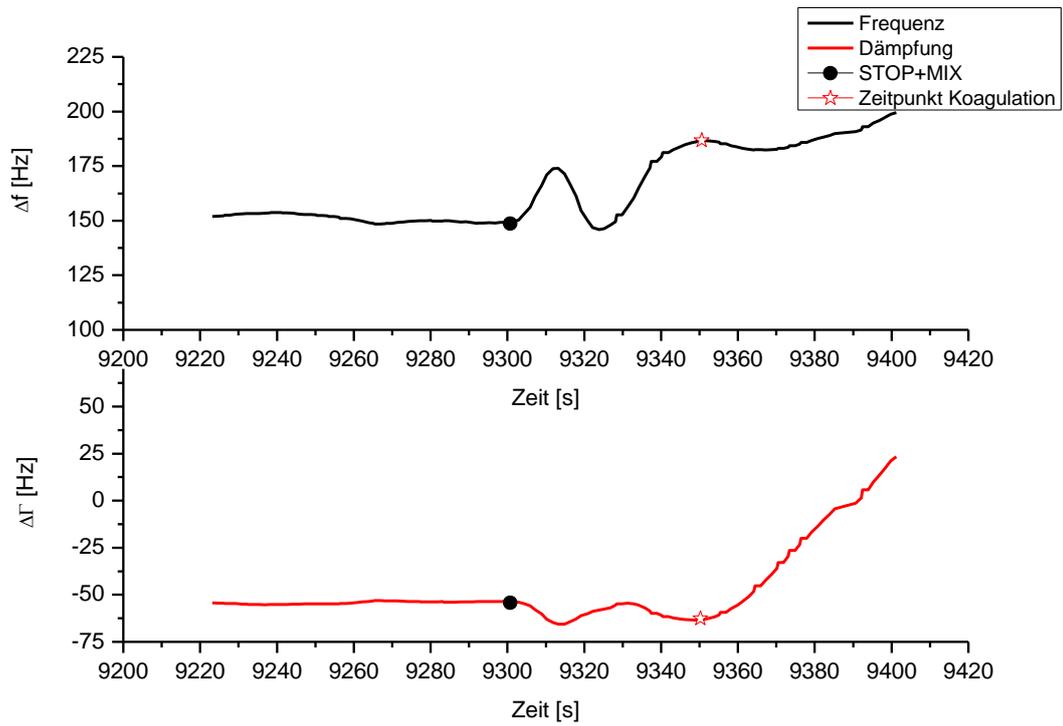


Abb. 24: Kurvenverlauf dritter Gerinnungsvorgang nach zweiter Regeneration

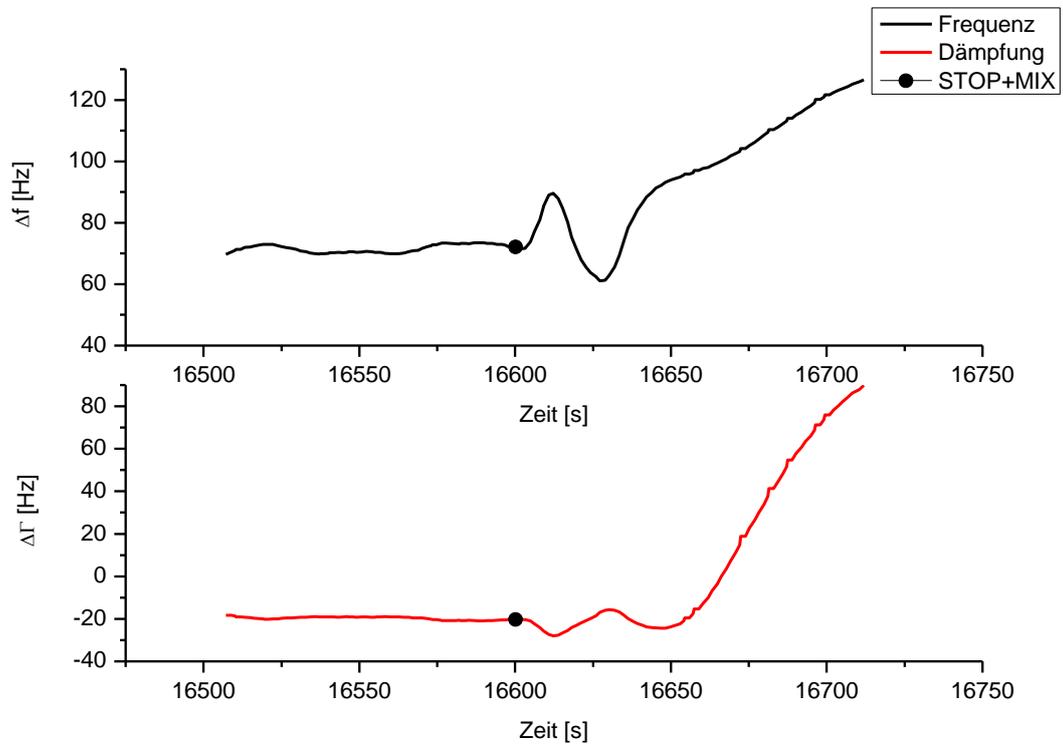


Abb. 25: Kurvenverlauf vierter Gerinnungsvorgang nach dritter Regeneration

Die Zeiten der FidgeType Anlage stimmten weitestgehend mit denen des Koagulometers überein. Auffallend war, dass die durch die FidgeType Anlage gemessene Gerinnungszeit nach jeder Regeneration zunahm (Tabelle 4).

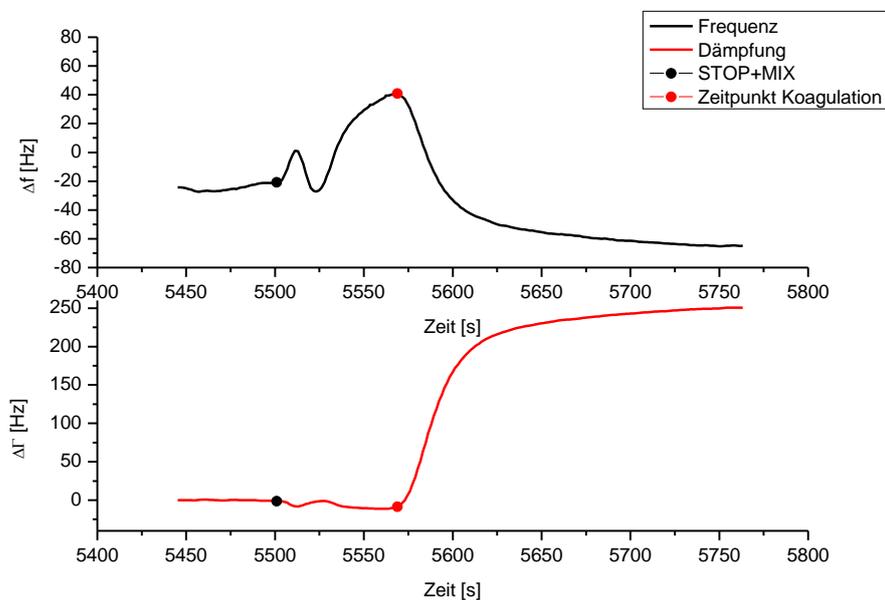
Messung	Zeit Koagulometer in s	Zeit FidgeType in s
1	48,8	47
2	47,9	49
3	47,9	50

**Tab. 4:** Gerinnungszeiten nach Regeneration

### 3.4.5 Gerinnungsmessungen auf Gold

In einem weiteren Versuch wurden die Gerinnungsmessung und die Regeneration auf einem unbeschichteten Quarz durchgeführt.

Die Gerinnung wurde zwar erkannt, aber die Zeit wich stark von der des Koagulometers ab (Abbildung 26 und Tabelle 5).

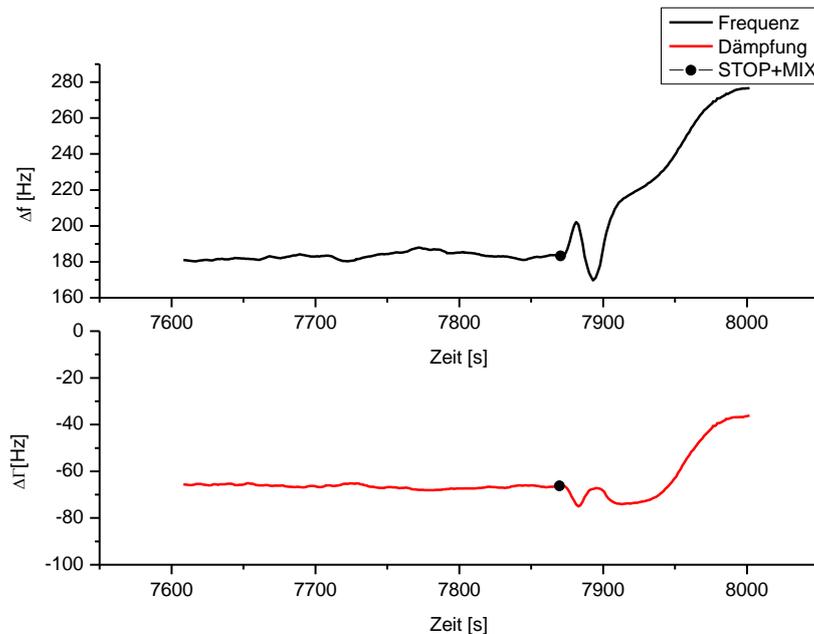


**Abb. 26:** Kurvenverlauf der Gerinnung auf unbeschichtetem Schwingquarz

Messung	Zeit Koagulometer in s	Zeit FidgeType in s
2	58,8	68

**Tab. 5:** Gerinnungsmessung nach Regeneration

Nach der Regeneration wurde keine weitere Gerinnung erkannt (Abbildung 27).



**Abb. 27:** Kurvenverlauf nach Regeneration auf unbeschichtetem Quarz

### 3.4.6 Verkürzung der Koagulationszeit

In den folgenden Experimenten wurde die Koagulationszeit des aktivierten Blutes durch weitere Verdünnung auf 90 s herabgesetzt (Tabelle 6).

Reagenz	Flussgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s	Gerinnung erkannt?
Zeiten erste Gerinnung: Koagulometer: 58,6 s QCM: 48 s			
NaOH 2 M	0,5	30	
	0,8	20	

	0,1	60	
Bidest	0,4	30	
SDS/HCl	0,5	30	
	0,1		
Tris/NaCl	0,4	Bis stabile Frequenz	
Gerinnungs- messung			Ja Koagulo- meter: 58,6 s QCM: 57,0 s
Regeneration			
Gerinnungs- messung			Ja Koagulo- meter: 58,6 s QCM: 54,0 s

Tab. 6: Regenerationsschritte und Gerinnungsmessungen

Es wurden zwei Regenerationszyklen durchgeführt, nach denen jeweils eine Gerinnung erkannt wurde. Allerdings war die Auswertung aufgrund des schwachen Frequenzabfalls und somit flachen Kurvenverlaufes erschwert (Abbildung 28).

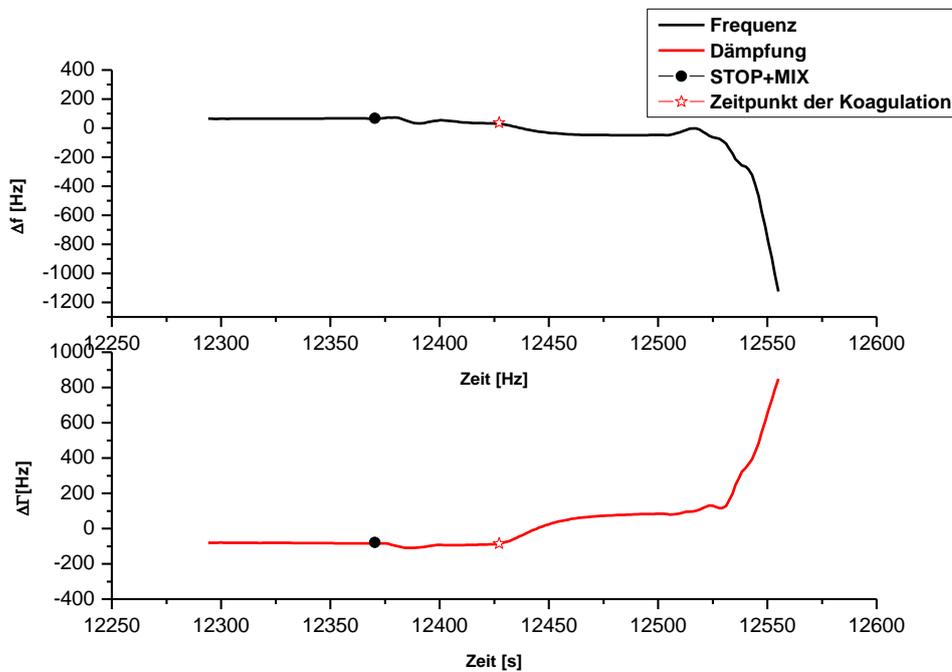


Abb. 28: Messkurve nach der zweiten Regeneration

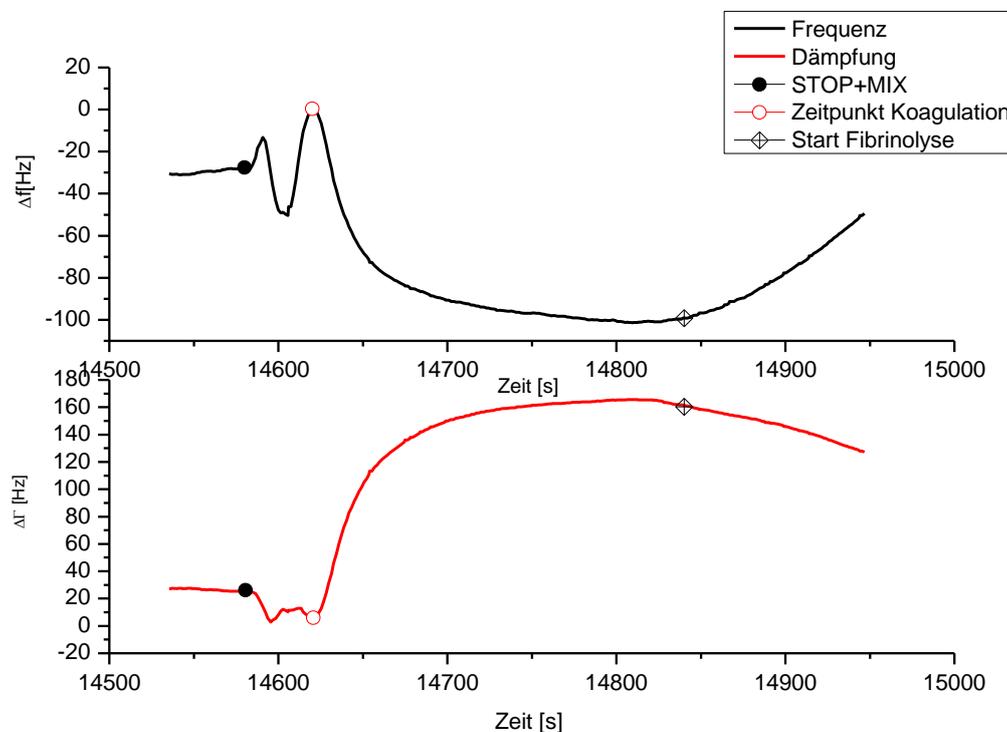
### 3.4.7 Verwendung von Actilyse

Für die weiteren Experimente wurde das Enzym Actilyse hinzugezogen. Mit diesem Reagenz sollte der Clot schon vor dem Einsatz von NaOH auf- bzw. angelöst werden, damit die Regeneration leichter zum gewünschten Erfolg führen konnte.

Zunächst wurde getestet, wie viel Zeit nötig ist, bis der Clot sich infolge der Enzymwirkung aufzulösen beginnt.

In den Messkurven verdeutlicht dies der Frequenzanstieg (Abbildung 29).

Es wurden etwa 5 Minuten benötigt, bis die Wirkung des Enzyms einsetzte.



**Abb. 29:** Eintritt der Actilysewirkung nach einem Gerinnungsvorgang

Es folgte die Einarbeitung von Actilyse in den Regenerationsablauf. Dabei wurden 500  $\mu\text{l}$  1:4 verdünnten Blutes mit 10  $\mu\text{l}$  1:10 verdünnter Actilyse versetzt. Von dieser Mischung wurden 100  $\mu\text{l}$  mit 100  $\mu\text{l}$  Thromborel aktiviert und in die Messkammer gegeben. In dieser ruhte die Mischung 10 min lang, damit das Koagel durch das Enzym aufgelöst werden konnte.

Zur Regeneration fand nur NaOH 2 M Verwendung, das für 60 s bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min über den Quarz geleitet wurde.

Jedoch konnte keine optimale Reinigung erzielt werden.

Es erfolgten weitere Messungen mit Actilyse versetztem Blut, wobei der Regenerationsvorgang wie in Tab.6 durchgeführt wurde.

Der pH-Wert von SDS/HCl wurde allerdings auf 0,6 herabgesetzt (Tabelle 7).

Reagenz	Flussgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s	Gerinnung erkannt?
NaOH 2 M	0,5	30	
	0,8	20	
	0,1	30	
Bidest	0,4	30	
SDS/HCl	0,4	30	
	0,1	600	
Puffer	0,4	Bis stabile Frequenz erreicht	
Gerinnungsmessung			Ja Koagulo- meter: 36,1 s QCM: 42,0 s

**Tab. 7:** Regenerationsschritte und Gerinnungszeiten bei mit Actilyse versetztem Blut

Mit dieser Verfahrensweise konnten weitere Gerinnungen erkannt werden.

Derselbe Versuchsablauf wurde auch mit einer Blutverdünnung von 1:2 durchgeführt. Hier mussten die Einwirkzeiten jedoch angepasst werden (Tabelle 8).

Reagenz	Flussgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s	Gerinnung erkannt?
NaOH 2 M	0,5	20	
	0,8	40	
	0,1	120	
	0,8	20	
Bidest	0,4	20	
	0,4	60	

SDS/HCl	0,4	20	
	0,1	1200	
Puffer	0,4	20	
	0,1	Bis stabile Frequenz erreicht	
Gerinnungsmessung			Ja Koagulo- meter: 28,7 s QCM: 29,0 s
Regeneration			
Gerinnungsmessung			Ja Koagulo- meter: 30,3 s QCM: 26,0 s
Regeneration			
Gerinnungsmessung			Ja Koagulo- meter: 32,2 s QCM: 27,0 s
Regeneration			
Gerinnungsmessung			Ja Koagulo- meter: 31 s QCM: 26 s

**Tab. 8:** Regenerationsschritte und Gerinnungszeiten bei Vollblutverdünnung 1:2

In weiteren Experimenten kam die Actilyse erst nachträglich in die Messkammer, wobei der Regenerationsablauf abgeändert wurde (Tabelle 9).

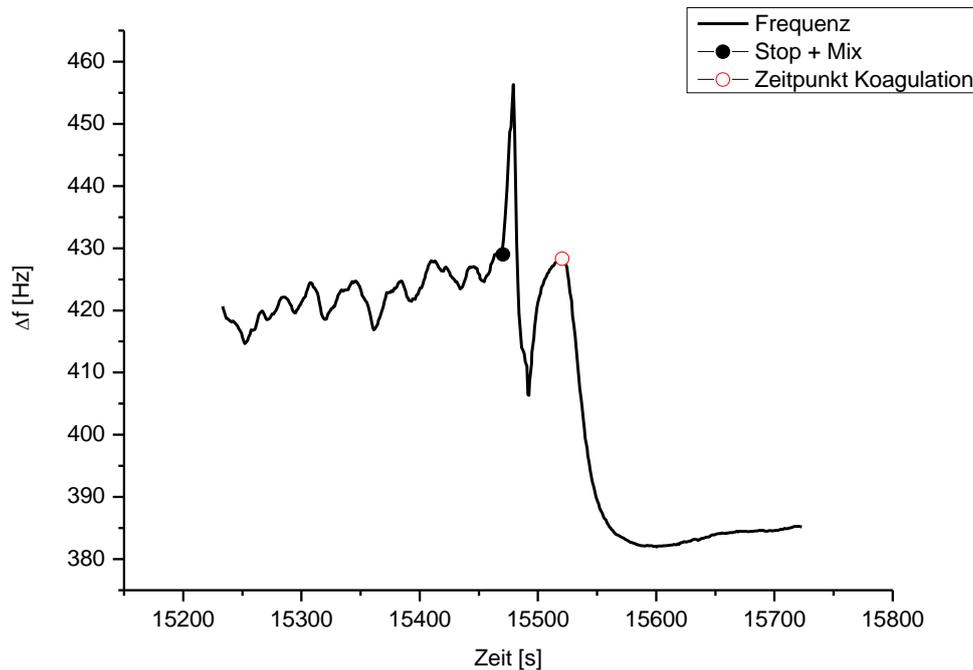
Die Versuche wurden wieder mit 1:4 verdünntem Vollblut vorgenommen und der Clot vor Regenerationsbeginn 1,5 min in der Messkammer belassen.

Reagenz	Flussgeschwindigkeit in ml/min	Einwirkzeit in s
Zeiten erste Gerinnung: Koagulometer: 46,3 s QCM: 48,0 s		
Actilyse	0,4	1200
NaOH 2 M	0,5	20

	0,8	20
	0,056	300
	0,8	20
Bidest	0,4	60
SDS/HCl	0,5	20
	0,056	300
Bidest	0,4	60
Dieser Prozess wurde insgesamt viermal wiederholt		
Puffer	0,4	60
Ausbau des Quarzes zur erneuten Inkubation mit Vollblut für 10min		
Einbau des vorinkubierten, mit Bidest gespülten und N <sub>2</sub> getrockneten Quarzes		
Gerinnungsmessung: Koagulometer: 47,9 s QCM: 47,0 s		
Regeneration wie oben		
Ausbau des Quarzes zur erneuten Inkubation mit Vollblut für 10 min		
Einbau des vorinkubierten, mit Bidest gespülten und N <sub>2</sub> getrockneten Quarzes		
Gerinnungsmessung: Koagulometer: 47,3 s QCM: 50,0 s		

**Tab. 9:** Regenerationsschritte und Gerinnungszeiten bei nachträglicher Zugabe von Actilyse

Auch bei der dritten Gerinnungsmessung war ein deutlicher Frequenzabfall zu verzeichnen (Abbildung 30).



**Abb. 30:** Messkurvenverlauf des dritten Gerinnungsvorganges

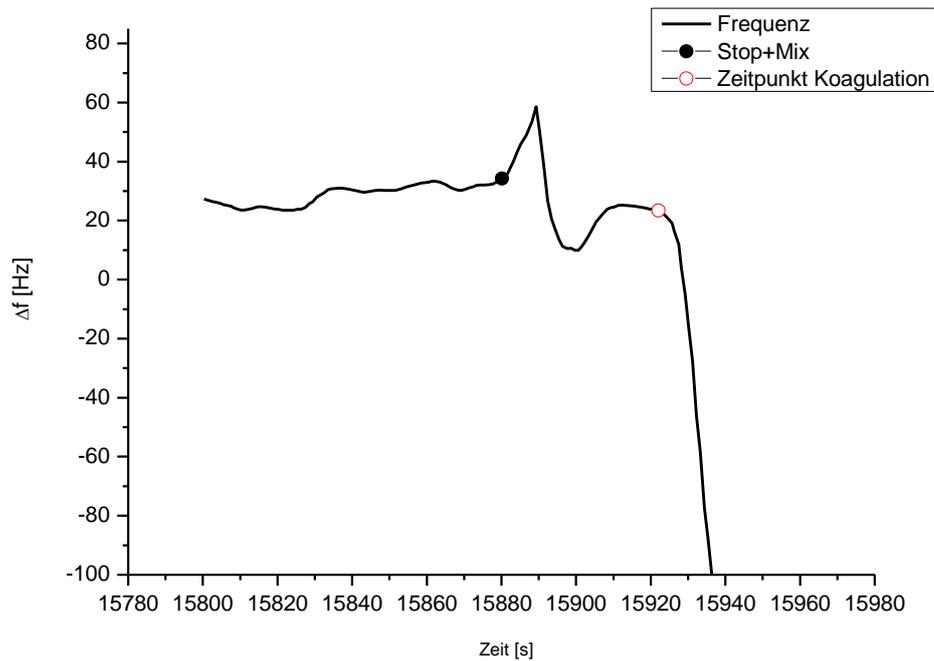
Dieser Regenerationsablauf wurde in einer weiteren Messung mit der Änderung wiederholt, dass auf Actilyse verzichtet wurde.

Nach Regeneration kam es zur Erkennung weiterer Gerinnungen, jedoch waren weder die Zeiten noch die Messkurven optimal. Als Beispiel ist in Abbildung 31 der Messkurvenverlauf des dritten Gerinnungsvorganges dargestellt.

Die Zeiten des Koagulometers im Vergleich zur FidgeType Anlage sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Messung	Zeit Koagulometer in s	Zeit FidgeType in s
1	47	49
2	53,2	46
3	53,6	42

**Tab. 10:** Zeiten der Gerinnungsmessung vor und nach Regeneration



**Abb. 31:** Messkurvenverlauf des dritten Gerinnungsvorganges

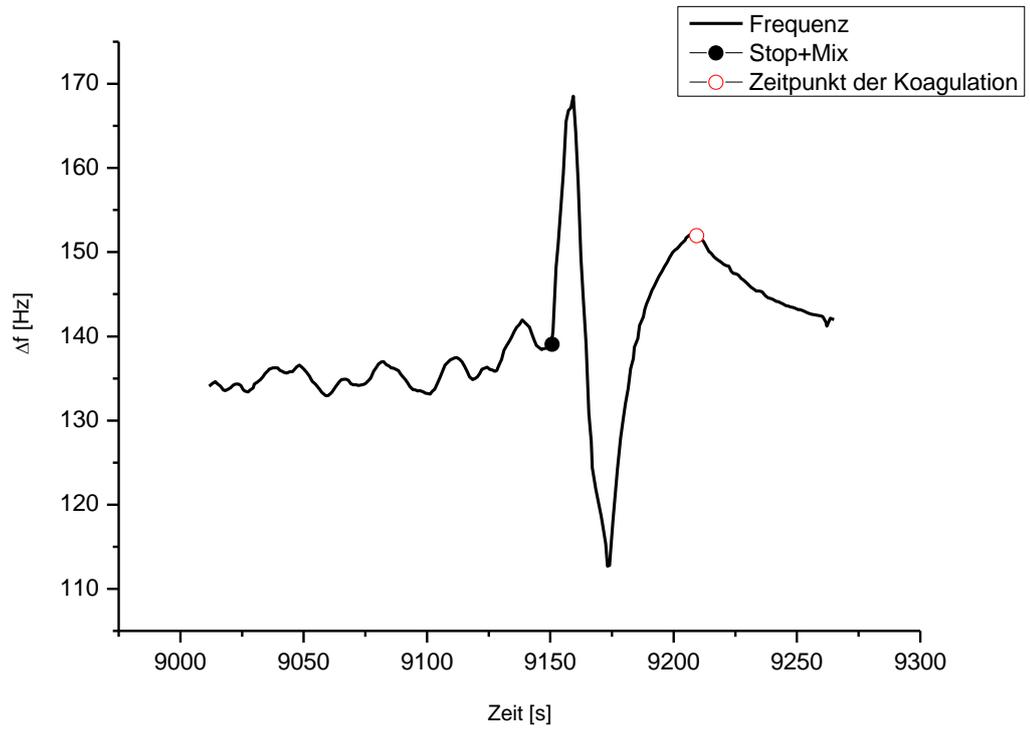
In einem weiteren Experiment wurde die Einwirkzeit von Actilyse auf 10 min und die Einwirkzeiten von NaOH sowie SDS/HCl auf 2,5 min reduziert.

Bei dieser Vorgehensweise ist eine weitere Gerinnung erkannt worden, doch der Frequenzabfall war schwieriger auszuwerten (Abbildung 32).

Ferner wich die von der FidgeType ermittelte Gerinnungszeit um 8,8 s von der des Koagulometers ab (Tabelle 11)

Messung	Zeit Koagulometer in s	Zeit FidgeType in s
2	57,8	49

**Tab. 11:** Zeit Gerinnungsmessung nach einmaliger Regeneration



**Abb. 32:** Messkurvenverlauf des zweiten Gerinnungsvorganges

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Grundlagen für die Regeneration von Schwingquarzen zur Gerinnungsmessung zu schaffen. Dies sollte unter möglichst ökonomischen Gesichtspunkten geschehen.

Weiterhin sollte der gesamte Regenerationsablauf automatisierbar und standardisierbar sein.

### 4.1. Stand der Technik

In der Gerinnungsanalytik werden Koagulometrie, chromogene sowie immunologische Verfahren angewandt.

Das in dieser Dissertation beschriebene Verfahren zur Gerinnungsmessung konkurriert mit anderen auf dem Markt bereits etablierten Methoden zur Quick-Wert-Messung. Der Quick-Wert kann über optische oder mechanische sowie elektrochemische Koagulometrieverfahren ermittelt werden [1].

Chromogene und immunologische Messverfahren sollen nur kurz aufgezeigt werden, da sie im Rahmen dieser Arbeit nicht zum Einsatz gekommen sind. Beim chromogenen Verfahren wird ein farbstoffbildendes Substrat (meist para-Nitroanilin) durch Thrombin hydrolysiert. Dadurch wird der Farbstoff freigesetzt und kann photometrisch gemessen werden.

Bei den Immunologischen Messungen kommt die ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Methode zum Einsatz. Hierbei bindet das zu bestimmende Antigen an den entsprechenden Antikörper, mit dem das Reagenzgefäß beschichtet ist. In einer weiteren Reaktion kommt es zu einer Farbreaktion, indem Peroxydase an den Antigen-Antikörper-Komplex ankoppelt. Die Farbreaktion kann wiederum photometrisch gemessen werden. Das Verfahren kommt bei Konzentrationsmessungen von z. B. Protein C und D-Dimeren zum Einsatz [12,13].

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Gerinnungszeit mittels eines Biomatic 2000 Coagulometer der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bestimmt. Wie die meisten Koagulometer maß auch dieses die Gerinnungszeit von Plasma anhand einer Viskositätsänderung, die durch die Schwingungsamplitude eines

Kunststoffstäbchens erfasst wurde, das in der Probe schwang. Das Koagulometer war mit einer Wärmequelle ausgestattet, sodass eine konstante Temperatur von 37°C vorherrschte. Die Angabe der Gerinnungszeit erfolgte in Sekunden. Beim modifizierten Quick-Test mittels Schwingquarz erfolgte die Reaktion über eine Änderung der Frequenz der akustischen Welle. Nach Injektion der aktivierten Probe kam es zu einem Anstieg der Frequenz. Durch die Vernetzung von Fibrinogen zu Fibrin und die Anbindung an die Sensoroberfläche folgte, durch die steigende Viskosität und Massenzunahme, eine Abnahme der Resonanzfrequenz. Am Ende des Gerinnungsprozesses stand die Fibrinpolymerisation mit einer plötzlichen Viskositätszunahme. Dies zeigte sich bei Schwingquarzmessungen als Maximum der Frequenzkurve [21]. Beim konventionellen als auch beim modifizierten Quick-Test war eine Aktivierung des Gerinnungsvorganges nötig. Denkbar ist, dass sich der modifizierte Quick-Test durchsetzen und kostengünstig sowie patientennah eingesetzt werden kann. Voraussetzung dafür ist unter anderem eine Miniaturisierung des Geräts und Übereinstimmung der Gerinnungszeiten mit denen des Koagulometers. Mehrfachmessungen durch Regeneration des Sensors waren ebenfalls möglich, jedoch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, besonders zeitintensiv.

## 4.2 Clot-lysis-Versuche

Mit diesem Versuch wurde zunächst untersucht, welche Reagenzien als geeignet erschienen, um das Blutgerinnsel zu lösen.

- Natriumhypochlorid (NaOCl):
  - Diese Säure war nicht in der Lage das Blutgerinnsel vollständig aufzulösen. Ein weiterer kritischer Punkt ergab sich durch die Blasenbildung. Diese Blasen können sich vor den Zufluss der Messkammer legen und somit ein weiteres gleichmäßiges Befüllen erschweren oder unmöglich machen. Darüber hinaus können diese Blasen zu einer drastischen

Veränderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes führen. Aus diesen Gründen und der Tatsache, dass der Clot auch bei höher konzentriertem NaOCl nicht aufgelöst werden konnte, wurde von einer weiteren Anwendung abgesehen.

- Hellmanex:
  - Hellmanex ist ein flüssiges alkalisches Konzentrat, das als Spezialreinigungsmittel für Glasküvetten eingesetzt wird. Es setzt sich aus Trikalium-Orthophosphat, Trinatrium-Nitrilotriacetat, anionischen und nichtionischen Tensiden zusammen [37]. Die Verwendung dieses Reagenzes ließ nach rein optischen Aspekten eine Reaktion vermuten, jedoch zeigte sich nach Durchführung des Häkchentests keine vollständige Clotauflösung. Aus diesem Grund fand auch diese Substanz keine erneute Anwendung.
  
- Natriumhydroxid (NaOH):
  - Da es mit dieser Base zu einer vollständigen Auflösung des Clots kam, lag eine weitere Verwendung für weitere Versuche nahe. Erst bei einer Verdünnung von 0,125 M kam es zu keiner vollständigen Auflösung des Gerinnsels mehr. Somit erschien NaOH das geeignetste dieser drei Reagenzien zu sein.

Auch die Kombination von Hellmanex mit NaOH führte zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen (Kapitel 3.4.3), weshalb von dieser Möglichkeit zur Regeneration abgesehen wurde. Eine Kombination eines der Reagenzien mit NaOCl wurde von vornherein ausgeschlossen, da die Blasenbildung dagegen sprach.

### 4.3 Dummy-Versuche

Es wurden bei diesen Versuchen zunächst mögliche Regenerationsabfolgen gesucht, die zu einem späteren Zeitpunkt auf die FidgeType Anlage übertragen werden sollten. Dabei erwies sich die Dummy-Messanlage mit dem einfachen Aufbau (keine elektrische Kopplung des Schwingquarzes) als geeignet, da ohne viel Aufwand verschiedene Methoden getestet werden konnten. Es gab unterschiedliche Ansätze, um das Gerinnsel vom Quarz zu entfernen. Ein erster Ansatz war, Luft in die Messkammer zu ziehen und im Anschluss Tris/NaCl einfließen zu lassen. Die weitere Befüllung der Messkammer gestaltete sich jedoch als schwierig, da der Zufluss oft durch eine Luftblase versperrt und somit keine gleichmäßige Befüllung möglich war. Zur Zeitersparnis sollte eine Phasengrenze zwischen Blut und NaOH gebracht werden. Das gelang teilweise mit Glycerol. Dieses weist eine eindeutige Phasengrenze zu NaOH auf, jedoch nicht zu Blut. Hier kam es zu Durchmischungen. Ein weiterer Grund, weshalb diese Methode nicht zur Anwendung gekommen ist, lag darin, dass mehrere Pumpschritte während der Gerinnungszeit nötig waren, wodurch sich die Situation auf dem Quarz veränderte. Somit kam eine Übertragung dieser Vorgehensweise auf die FidgeType Anlage nicht infrage, da die gesamten Messergebnisse durch die Pumpschritte während der Gerinnungsphase verfälscht worden wären.

Es wurde schließlich eine akzeptable Lösung gefunden, um den Clot von der Quarzoberfläche bzw. der Messkammer zu entfernen. Bei dieser Prozedur wurde das Blut verdünnt und mit Thromborel aktiviert. Anschließend ist diese Mischung in die Messkammer gepumpt worden, wo sie 5 min auf dem Sensor verblieb. Zur Regeneration wurde die Messkammer mit NaOH befüllt. Nach vollständiger Befüllung erfolgte eine Änderung der Pumpeneinstellung bis der größte Teil des Clots entfernt war. Danach wurde die Fließgeschwindigkeit zunächst herabgesetzt, um das Reagenz einige Zeit auf dem Quarz wirken zu lassen. Schließlich erfolgte wieder ein Anstieg der Fließgeschwindigkeit in Kombination mit wechselnder Pumprichtung bis der Sensor optisch vollständig gereinigt war.

Eine Schwierigkeit die sich daraus ergab, war der unterschiedliche zeitliche Aufwand, den die Regeneration in Anspruch nahm. Die Zeit, die benötigt wurde, um den Clot zum größten Teil zu entfernen, hatte eine Spannweite von wenigen Sekunden bis zu 1 min. Bei dem Schritt der wechselnden Pumprichtung lag die Zeit zwischen 30 s und 60 s. Somit war die Methode für einen standardisierten und automatisierten Vorgang nicht geeignet. Jedoch konnte darauf aufgebaut werden.

Um überprüfen zu können, inwieweit die Quarze vom Gerinnsel befreit wurden, ist versucht worden, diese anzufärben.

#### **4.4 Coomassiefärbung von Proteinen**

Coomassie Brilliant Blue ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der zum Anfärben von Proteinen genutzt werden kann. Der Analyt lagert sich an den basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt Proteine unspezifisch an [38,39].

In den hier getätigten Versuchen wurde der Quarz nach erfolgter Gerinnung und vor dem Anfärben mittels Coomassie mit Puffer gespült, um zu sehen, wie viel Proteine letztendlich auf dem Quarz verblieben. Dies wurde nach einem Regenerationsvorgang erneut durchgeführt. Die Auswertung wurde durch die Lichtreflexe der Goldoberfläche erschwert. Die Rückstände auf den Schwingquarzen sind nur als Orientierung zu sehen.

Es bleibt zukünftiger Forschung in diesem Bereich vorbehalten, ein schnelles und aussagekräftiges Verfahren zur Überprüfung verbliebener Proteinreste zu entwickeln. Denkbar wäre beispielsweise verbliebene Zellreste mittels Rasterelektronenmikroskopie sichtbar zu machen.

#### **4.5 Messungen mit der FidgeType Anlage**

##### **4.5.1 Übertragung des Dummy-Regenerationsablaufes**

Da es im Dummy (keine elektrische Kopplung des Quarzes) gelang, das Blutgerinnsel vom Schwingquarz zu entfernen und auch die Anfärbeversuche zeigten, dass der Quarz, soweit beurteilbar gereinigt war, wurde nun versucht,

die bisherigen Erkenntnisse auf die FidgeType Anlage zu übertragen. Dabei zeigte sich bereits bei den ersten Versuchen, dass nach einem Regenerationsvorgang wie im Dummy die Anfangsfrequenz nicht mehr erreicht werden konnte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich noch Reste auf der Quarzoberfläche befanden, die auch mit der Coomassiefärbung nicht gezeigt werden konnten. Diese These wurde durch die Tatsache gestützt, dass keine erneute Gerinnung erkannt werden konnte.

#### 4.5.2 Verwendung von SDS/HCl

Wie bereits in Kapitel 1.7 erwähnt kommt SDS in der Biotechnologie eine Rolle als Protein-Denaturierungsmittel zu. In den vorangegangenen Versuchen wurde der pH-Wert von SDS mit Hilfe von Salzsäure herabgesetzt, um so eine stärkere Wirkung zu erzielen. Zunächst wurde der pH-Wert auf 2 gesenkt. Da die erhoffte Wirkung nicht eintrat, ist der pH-Wert weiter auf 0,6 herabgesetzt worden. Anschließend zeigte sich eine erheblich verbesserte Wirkung. Auch Salzsäure, die zu den starken Säuren zählt, führt zu einer Denaturierung von Proteinen, die verhältnismäßig einfach ist, da die Bindungen innerhalb der Tertiärstruktur schwach sind. Durch eine starke Änderung des pH-Werts oder Hitzeeinwirkung kommt es beispielsweise zur Denaturierung von Proteinen [40]. Aus diesen Gründen erschienen die Reagenzien SDS und HCl in Kombination als geeignet, um das Gerinnsel aufzulösen. Die Versuche haben dies anschaulich gezeigt. Nach Regeneration des Sensors konnten weitere Gerinnungen erkannt werden. Jedoch waren auch diese Reagenzien nicht ausreichend, um die gesamten Blutbestandteile vom Sensor zu lösen. Dies wurde durch den Verlauf der Resonanzfrequenz deutlich. Der Abfall der Frequenz war weniger ausgeprägt bzw. untypisch. Mit jeder Gerinnungsmessung nach Regeneration fiel der Abfall der Frequenz geringer aus, was dafür spricht, dass Reste auf dem Sensor zurückgeblieben waren. Ein weiteres Argument, dass der Sensor nicht vollständig gereinigt war, ist die Tatsache, dass nach drei Regenerationsvorgängen keine weitere Gerinnung erkannt worden ist. Die entsprechenden Grafiken sind in Kapitel 3.4.3 zu finden.

#### 4.5.3 Erwärmen der Reagenzien

Zeitgleich mit dem Zuführen von SDS/HCl wurden alle zur Regeneration benötigten Reagenzien extern auf 50°C erhitzt. Mit diesem Schritt sollte eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden. Bei einer Temperaturerhöhung um 10°C nimmt, nach van 't Hoff, die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2-3 fache zu. Da sich Moleküle bei höherer Temperatur schneller bewegen und somit häufiger zusammenstoßen, besitzen sie eine höhere Energie [41]. Das Ziel dieses Schrittes bestand darin, die Einwirkzeiten der Reagenzien und damit den Regenerationsvorgang zu verkürzen.

Nachdem SDS/HCl verwendet und die Reagenzien auf 50°C erhitzt wurden, war es erstmals möglich, mehrere Regenerationszyklen nacheinander durchzuführen, in deren Anschluss eine weitere Gerinnung erkannt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Erhitzung eine gewisse Verbesserung im Regenerationsablauf brachte und Einfluss auf Erfolg oder Misserfolg der Prozedur hatte.

#### 4.5.4 Regeneration mit Actilyse

Actilyse, bzw. Alteplase (rt-PA) ist ein physiologischer Plasminogenaktivator und wird gentechnologisch hergestellt. Des Weiteren wirkt es fibrinspezifisch, d. h. es wird überwiegend das Fibrin gebundene Plasminogen aktiviert und der systemische Effekt ist gering. Die Aktivität ist somit auf die Fibrinoberfläche am Thrombus beschränkt [42,43]. Ein wichtiger Faktor bei Enzymen ist, dass sie erst nach einiger Zeit wirken. Wie in einem Versuch in Kapitel 3.4.6 gezeigt, begann die Wirkung der Actilyse nach etwa 5 min einzusetzen. Durch die Zugabe von Actilyse ist es gelungen, einen Schwingquarz mehrfach zu regenerieren und dabei den Abfall der Resonanzfrequenz zum Zeitpunkt der Gerinnung beizubehalten, d. h. weitere Gerinnungen zu erkennen. In ersten Versuchen wurde die Actilyse direkt ins Blut gegeben, bevor dieses durch Thromborel aktiviert wurde. Weitere Gerinnungen wurden erkannt. In späteren Versuchen wurde das Enzym erst nachträglich auf den Sensor gegeben. Auch

dabei kam es zur Gerinnungserkennung, jedoch war der Verlauf des Sensorsignals weniger aussagekräftig als in den Fällen, in denen die Actilyse bereits mit dem Blut auf den Sensor gebracht wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es das Enzym nicht geschafft hat, das gesamte Gerinnsel zu durchdringen bzw. dass dafür mehr Zeit nötig gewesen wäre. Um ein besseres Sensorsignal zu erhalten, wurde die Regeneration dahingehend geändert, dass, nach erfolgter Regeneration, nochmals mit Pufferlösung gespült wurde. Dann erfolgte ein Ausbau des Quarzes, um extern erneut eine Vorinkubation mit Blut durchzuführen. Die Ausführung erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben. Die Vorinkubation erfolgte extern, da die Versuche aus Kapitel 3.4.2 zeigten, dass eine interne Inkubation durch die Stauung des Blutes am Abfluss der Messkammer schwer zu verwirklichen war. Nach diesem zusätzlichen Schritt war der Verlauf des Sensorsignals verbessert bzw. optimiert. Jedoch war der Zeitaufwand aufgrund des zusätzlichen Quarzeinbaus und -ausbaus immens. Zudem würde es ein automatisierbares Vorgehen verkomplizieren.

Wenn Actilyse dem Blut direkt zugegeben wurde, betrug die Zeit bis zum Abschluss eines Regeationsvorganges ca. 20 min. Nach dieser Zeit war der Quarz für eine weitere Messung vorbereitet. Dieses Vorgehen sparte Zeit im Vergleich zu der nachträglichen Zugabe des Enzyms, wobei die Zeit zwischen zwei Messungen ca. 60 min betrug. Nicht geklärt wurde, inwiefern die direkte Zugabe der Actilyse zum aktivierten Blut die Gerinnungszeit beeinflusst.

#### **4.6 Vergleich Messungen auf PE- und Goldoberfläche**

Der Großteil der Messungen wurde auf mit PE beschichteten Sensoren durchgeführt, bei denen die Gerinnungszeit nach Regeneration mit denen des Koagulometers weitgehend übereinstimmten (Abweichungen bis zu 7,6%). In anderen Versuchen wurden unbeschichtete Sensoren verwendet, bei denen ebenfalls eine abgelaufene Gerinnung erkannt werden konnte. Die Zeit wich jedoch stärker von der des Koagulometers ab (etwa 14,3%). Nach einem Regenerationsvorgang mit NaOH und SDS/HCl wurde keine weitere Gerinnung erkannt. Dies war bei PE beschichteten Sensoren und gleicher

Regenerationsabfolge jedoch der Fall, auch wenn die Sensorfrequenzabfälle relativ schwach ausfielen. L. Müller hat die mit PE beschichtete Oberfläche mit REM und AFM untersucht und herausgefunden, dass eine Inhomogenität sowie eine Oberflächenrauigkeit bestehen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die bei der Gerinnung entstehenden Fibrinfäden eine gute Möglichkeit der Verankerung fanden [21]. Diese Eigenschaften kamen der Gerinnungserkennung zu Gute und könnten eine Erklärung sein, weshalb die Zeiten weitgehend mit denen des Koagulometers übereinstimmten. Bei einem unbeschichteten Sensor fanden die sich bildenden Fibrinfäden prinzipiell mehr Halt, die gemessenen Gerinnungszeiten fielen jedoch länger aus. Die Ursache kann in der unspezifischen Adsorption von Proteinen liegen. Denn auch diese Bindungen führen zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz des Sensors mit der Folge verfälschter Messergebnisse. Aus diesem Grund sollten Oberflächen mithilfe spezieller Beschichtungen inaktiviert werden, um unspezifische Wechselwirkungen zu unterdrücken [21].

#### **4.7 Übertragbarkeit auf ein automatisiertes Messgerät**

Wie die Versuche zeigten, ist eine Regeneration möglich und könnte prinzipiell auch in der Routinediagnostik Anwendung finden. Denn die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass eine schnellere Regeneration möglich war, wenn Actilyse direkt zu Blut gegeben wurde. Es wäre also eine Überlegung, zwischen Blut und Thromborel ein Behältnis mit Actilyse zu schalten, damit auf einen Ausbau des Quarzes verzichtet werden kann, wodurch die Zeit einer Regeneration entscheidend verkürzt werden könnte. Eine weitere Überlegung wäre die Anbringung einer Vorrichtung, um die zur Regeneration benötigten Reagenzien aufzuwärmen bzw. auf Temperatur halten zu können, damit die Reaktion beschleunigt wird. Somit könnte die Regeneration automatisiert und standardisiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Grundlagen zur Regeneration von Sensoroberflächen nach Gerinnungsmessungen zu schaffen.

Dadurch sollten die Sensoren für weitere Gerinnungsmessungen zur Verfügung stehen und mehrere Messungen auf einem Quarz ermöglicht werden. Dabei sollte ein Regenerationsablauf gefunden werden, der sowohl eine Automatisierung als auch eine Standardisierung erlaubt.

Um das gewünschte Ergebnis zu erreichen, wurden zunächst einfache Clotlysis-Versuche durchgeführt, um Reagenzien zu finden, die in der Lage sind ein Blutgerinnsel aufzulösen. Nach diesem Schritt wurden zunächst an einer Dummy-Messanlage (Anlage ohne elektrische Kopplung) erste Regenerationsabfolgen entwickelt. Jene dienten als Ansatz an der FidgeType Anlage. Hier ergab sich durch Messung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes jeweils eine positive oder negative Rückmeldung über das Gelingen eines Regenerationsvorganges. Es stellte sich heraus, dass Chemikalien allein nicht ausreichten, um einen Sensor derart zu reinigen, dass eine weitere Gerinnungserkennung erreicht werden konnte. Deshalb wurde der Plasminogenaktivator Actilyse hinzugezogen.

Schließlich gelang die Entwicklung eines Verfahrens, das es ermöglichte, einen bereits gebrauchten Sensor im Laufe von etwa 20 min zu regenerieren. Dazu erforderlich waren Natronlauge, SDS/HCl und Actilyse.

Dieses Regenerationsprinzip ermöglichte Mehrfachmessungen auf einem PE beschichteten Quarz.

Somit konnte die Regeneration nach erfolgter Gerinnungsmessung mittels Schwingquarzen entwickelt werden.

Inwieweit sich diese Regenerationsprozedur als wirtschaftlich und zeitlich akzeptabel erweist, werden weitere Untersuchungen bzw. die Marktstrategie für ein entsprechendes Gerät zeigen müssen.

## 6. Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gerinnungsfaktoren	8
Tabelle 2: Regenerationsablauf mit NaOH und Hellmanex	36
Tabelle 3: Regenerationsschritte unter Verwendung von NaOH und SDS/HCl	37
Tabelle 4: Gerinnungszeiten nach Regeneration	41
Tabelle 5: Gerinnungszeiten nach Regeneration	42
Tabelle 6: Regenerationsschritte und Gerinnungsmessungen	42/43
Tabelle 7: Regenerationsschritte und Gerinnungsmessungen mit Actilyse versetztem Blut	45
Tabelle 8: Regenerationsschritte und Gerinnungsmessungen bei einer Vollblutverdünnung von 1:2	45/46
Tabelle 9: Regenerationsschritte und Gerinnungsmessungen bei nachträglicher Zugabe von Actilyse	46/47
Tabelle 10: Zeiten der Gerinnungsmessungen vor und nach Regeneration	48
Tabelle 11: Zeiten der Gerinnungsmessung nach einmaliger Regeneration	49

### 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ruhender und aktivierter Thrombozyt	4
Abbildung 2: Darstellung eines Fibrinmoleküls	5
Abbildung 3: extrinsische u. intrinsische Aktivierung der Blutgerinnung	10
Abbildung 4: Blutgerinnung und Fibrinolyse	10
Abbildung 5: schematischer Aufbau eines Biosensors	15
Abbildung 6: Schwingquarz schematisch mit Scherwellen- ausbreitung und Schwingquarz in Halterung	16
Abbildung 7: Strukturformel Polyethylen	17
Abbildung 8: Dummy-Messanlage	22

Abbildung 9: FidgeType Anlage	23
Abbildung 10: Mikrotiterplatte mit Vollblut 1:1	28
Abbildung 11: Mikrotiterplatte 25 min nach Reagenzienzugabe	28
Abbildung 12: Clotauflösung auf Schwingquarz vor NaOH-Zugabe	29
Abbildung 13: aktiviertes Vollblut auf Schwingquarz 1 min nach NaOH-Zugabe	29
Abbildung 14: aktiviertes Vollblut auf Schwingquarz 30 min nach NaOH-Zugabe	29
Abbildung 15: Phasengrenze zwischen NaOH und Blut	30
Abbildung 16: Quarzfärbung PE beschichtete Oberfläche Negativprobe 10 fache Vergrößerung	31
Abbildung 17: Quarzfärbung 50 fache Vergrößerung	32
Abbildung 18: Quarzfärbung 10 fache und 50 fache Vergrößerung	33
Abbildung 19: Messkurvenverlauf eines erkannten Gerinnungsvorganges	34
Abbildung 20: Negativprobe, Messkurvenverlauf eines nicht erkannten Gerinnungsvorganges	34
Abbildung 21: Messkurve nach erster Gerinnungserkennung	38
Abbildung 22: Messkurve erster Gerinnungsvorgang	39
Abbildung 23: Messkurvenverlauf zweiter Gerinnungsvorgang nach erster Regeneration	39
Abbildung 24: Messkurvenverlauf dritter Gerinnungsvorgang nach zweiter Regeneration	40
Abbildung 25: Messkurvenverlauf vierter Gerinnungsvorgang nach dritter Regeneration	40
Abbildung 26: Kurvenverlauf der Gerinnung auf unbeschichtetem Schwingquarz	42
Abbildung 27: Kurvenverlauf nach Regeneration auf einem unbeschichteten Quarz	42
Abbildung 28: Messkurve nach der zweiten Regeneration	43
Abbildung 29: Eintritt der Actilysewirkung nach Gerinnungsvorgang	44

Abbildung 30: Messkurvenverlauf des dritten Gerinnungsvorganges	48
Abbildung 31: Messkurvenverlauf des dritten Gerinnungsvorganges	49
Abbildung 32: Messkurvenverlauf des zweiten Gerinnungsvorganges	50

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	Bidestilat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FSF	Fibrinstabilisierender Faktor
GP	Glykoprotein
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
HPLC	High-performance liquid chromatography
INR	International Normalized Ratio
KDa	kilo Dalton
NO	Stickstoffmonoxid
PE	Polyethylen
PF3	Plättchenfaktor 3
pH	potentia Hydrogenii
PTA	Plasma-Thromboplastin-Antecedent
QCM	Quartz Cristal Microbalance
REM	Rasterelektronenmikroskopie
scu-PA	single chain urokinase-type plasminogen activator
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat

Tab.	Tabelle
Tcu-PA	two chain urokinase plasminogen activator
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
vWF	von-Willebrand-Faktor
µm	Mikrometer

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] M. Barthels, H. Poliwoda, H. C. Hemker (1998). Gerinnungsanalysen: Schnellorientierung, Befundinterpretation, Therapiekontrollen, klinische Konsequenzen, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [2] H.Renz (2003). Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Berlin: Walter de Gruyter
- [3] W.G.Guder, J.Nolte (2005). Das Laborbuch für Klinik und Praxis, München: Elsevier Urban&Fischer
- [4] Prof.Dr.G.Lutze (2004). Wissenswertes zur Gerinnung, Mannheim: Roche Diagnostic GmbH
- [5] F. K. Gehring (2005). Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. Entwicklung eines Blutanalysegerätes, Göttingen: Cuvillier Verlag
- [6] B. Scheufele (2009). Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen - Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern in humanem Vollblut, Göttingen: Cuvillier Verlag
- [7] D.Kömpf (2011). Entwicklung eines Schwingquarz-basierten Assays zur Detektion der PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion von Plasmodium falciparum, Göttingen: Cuvillier Verlag
- [8] J. Claußen (2006). Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren, Shaker, Dissertation, Universität Tübingen
- [9] K. Walter, J.Huppelsberg (2005). Kurzlehrbuch der Physiologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [10] R.Klinke, H.-C.Pape, S.Silbernagl (2005). Physiologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [11] D.U.Silverthorn (2009). Physiologie, München: Pearson Education
- [12] B.Kemkes-Matthes, G.Oehler (2001). Blutgerinnung und Thrombose, Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [13] H. A. Neumann (2007). Das Gerinnungssystem: Physiologie und Pathophysiologie. Eine Einführung, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag G
- [14] A.Jöckel (2004). Die Rolle von Kortisol bei stressbedingten Veränderungen der Thrombozyten, Dissertation, Universität Gießen
- [15] R.Lüllmann-Rauch (2006). Taschenlehrbuch Histologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG

- [16] A. Despopoulos, S. Silbernagel (2007). Taschenatlas Physiologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [17] B. Müschenborn (2004). Effekte von Fibrinogen auf Mitogenese und Signaltransduktion humaner glatter Muskelzellen, Dissertation, Universität Düsseldorf
- [18] J.G. Meyer (1993). Blutgerinnung und Fibrinolyse, Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- [19] H.J.M. Brunner (2006). D-Dimere und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit bei Myokardpatienten, Dissertation, Universität Münster
- [20] J. Hallbach (2006). Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [21] L. Müller (2009). Schwingquarze als Hämostasesensoren, Göttingen: Cuvillier Verlag
- [22] Manuela Schoch (2008). Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren, Dissertation, Universität Tübingen
- [23] J.S. Döring (2008). Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarzbeschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor, Dissertation, Universität Tübingen
- [24] U. Müller (2008). Anorganische Strukturchemie, Wiesbaden: Vieweg + Teubner
- [25] D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, A. J. Ricco, E. T. Zellers, G. C. Frye, H. Wohltjen (1997). Acoustic wave sensors: Theory, Design and Physico-chemical Applications, San Diego: Academic Press
- [26] J. W. Grate, S. J. Martin, R. M. White (1993). Acoustic wave microsensors: part I, Anal. Chem. 65: 940-5
- [27] B. Neubig, W. Briese (1997). Das grosse Quarzkochbuch: Quarze, Quarzoszillatoren, Feldkirchen: Franzis-Verlag GmbH
- [28] C. O'Sullivan, G. Guilbault (1999). Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications, Biosens. Bioelectron 14: 663-670
- [29] J. Rickert, G. Hayward, B. Cavic, M. Thompson, W. Göpel (1999). in Sensors Update: Sensor Technology-Applications-Markets, ed. H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse, Weinheim: Wiley-VCH Verlag, vol. 5: 105-139

- [30] R. Schumacher (1999). Die Schwingquarzmethode: Ein sensibles Meßprinzip mit breitem Anwendungsspektrum, Chemie in Unserer Zeit, 33. Jahrg./ Nr. 5: 268-278 Weinheim: Wiley-VCH Verlag
- [31] S. Cluss (2006). Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten, Dissertation, Universität Tübingen
- [32] M.Brahm (2009). Polymerchemie kompakt, Stuttgart: Hirzel Verlag
- [33] Zeeck (2005). Chemie für Mediziner, München: Elsevier/Urban&Fischer
- [34] C.E.Mortimer and U.Müller (2007). Chemie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
- [35] P.C.Hiemenz, T.P.Lodge (2007). Polymer Chemistry, Boca Raton: CRC Press Taylor&Francis Group
- [36] S. Schmidt (2011). Bestimmung optimaler Parameter für Thrombozytenfunktionsmessungen mittels Schwingquarzen und deren Regeneration, Dissertation, Universität Tübingen
- [37] [www.hellma-worldwide.com](http://www.hellma-worldwide.com), letzter Zugriff: 10.04.2010.
- [38] [www.chemie.uni-hamburg.de/bc/praktika/skripte/index\\_/Proteinchemie%201%20V%201\\_6.pdf](http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/praktika/skripte/index_/Proteinchemie%201%20V%201_6.pdf), letzter Zugriff: 12.01.2012
- [39] [www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02051005](http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02051005), letzter Zugriff: 12.01.2012.
- [40] P.Y.Bruice (2007). organische Chemie, München: Pearson Studium
- [41] T.L.Brown, H.E.LeMay, B.E.Bursten (2007). Chemie Die zentrale Wissenschaft, München: Pearson Studium
- [42] T.Karow, R.Lang-Roth (2008). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Pulheim: Eigenverlag
- [43] C.Kastner (2001). Fibrinspezifität und paradoxe Gerinnungsaktivierung: Reteplase im Vergleich mit Alteplase in einer prospektiven Untersuchung bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, Dissertation, Universität Tübingen

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt allen an dieser Arbeit beteiligten Personen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff, für die Möglichkeit eine Doktorarbeit im Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin anfertigen zu können.

Herrn Dr. rer. nat. Frank K. Gehring für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, die Hilfe und Betreuung während der gesamten Arbeit.

Dr. L. Müller für die Einarbeitung im Labor, die Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und Unklarheiten sowie die Aufmunterungen an schlechten Tagen.

Dr. D. Kömpf für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Drechsel für die Lösung sämtlicher EDV-Probleme und Einarbeitung an der Anlage.

Den Mitarbeitern der Transfusionsmedizin Tübingen, die immer Blutproben bereitstellten und natürlich den Spendern, ohne die es keine Proben gegeben hätte.

Meiner Familie, die mir alles ermöglicht hat und mich in allen Lebenslagen unterstützt.

Meinem Freund Stefan möchte ich für seine Geduld, Unterstützung und das immer offene Ohr danken.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Goldammer  
Vorname: Katrin  
Geburtsdatum: 09/02/1984  
Geburtsort: Oschatz

### Schulbildung:

1990 – 1994 Grundschule Wermsdorf  
1994 – 2002 Thomas–Mann–Gymnasium Oschatz

### Beruflicher Werdegang:

08/2002-01/2005 Ausbildung zur Zahnmedizinischen  
Fachangestellten (ZFA) am ZZMK Tübingen  
01/2005 –04/2005 Tätigkeit als ZFA am ZZMK Tübingen  
04/2005 bis 11/2010 Studium der Zahnmedizin an der Eberhard  
Karls Universität Tübingen  
10/2007 Zahnärztliche Vorprüfung  
26/11/2010 Staatsexamen  
Seit 01/2011 Assistenz Zahnärztin am ZZMK Tübingen