

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

**Bestimmung optimaler Parameter und
Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von
Schwingquarzen zur Thrombozytenfunktionsmessung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Joachim Koch

aus Esslingen am Neckar

2011

Dekan:	Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Northoff
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. S. Lindemann

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit vom 05.12.2007 bis 05.12.2009 innerhalb der Biosensorik Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Experimentelle und Klinische Transfusionsmedizin der Universität Tübingen unter der Anleitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring.

Die Begutachtung wurde von Prof. Dr. Northoff, Universität Tübingen und Privatdozent Dr. Lindemann, Universität Tübingen übernommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Blut – Zusammensetzung und Funktion	2
1.2.1	Erythrozyten	2
1.2.2	Leukozyten.....	3
1.2.3	Thrombozyten	3
1.2.4	Hämostase	5
1.2.5	Einfluss der Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Hämostase	11
1.3	Thrombozytenfunktionsmessung – Stand der Technik	11
1.3.1	Thrombozyten-Aggregometrie	11
1.3.2	Thrombelastographie	12
1.3.3	Vollblut-Impedanz-Aggregometrie.....	13
1.4	Thrombozytenfunktionsmessung mit Schwingquarzsensoren	14
1.4.1	Massensensitive Sensoren	14
1.4.2	Schwingquarze (QCM).....	15
1.4.3	Schwingquarze als Thrombozytensensor	15
1.5	Analysegerät zur Thrombozytenfunktionsmessung.....	16
1.6	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Messmethode.....	19
2.1	Material	19
2.1.1	Labormaterialien und Geräte	19
2.1.2	Chemikalien / Reagenzien	20
2.1.3	Blut und Plasma	21
2.1.4	QCM–Sensor	21
2.1.5	Messanlage.....	22
2.2	Messmethode	22
2.2.1	Quarzpräparation	22
2.2.2	Herstellung des Platelette Rich Plasma	23
2.2.3	Thrombozytenfunktionsmessung in der Anlage.....	24
2.3	Regenerationsmedien	26
2.4	Quarzregeneration.....	27
2.5	Quarzregeneration im Dummy	27

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	29
3.1	Polystyrol beschichtete Quarze	29
3.1.1	Vergleich verschiedener PS-Konzentrationen	29
3.1.2	Vergleich verschiedener Umdrehungsgeschwindigkeiten.....	36
3.1.3	Vergleich verschiedener Thrombozyten-Zahlen und deren Verhältnis zum Frequenzabfall.....	40
3.1.4	Optimierung des Mischvorganges der Reagenzien	45
3.1.5	Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf unterschiedliche Arten von Blutproben und deren Vergleich.....	49
3.2	Unbeschichtete Quarze	57
3.2.1	Beibehaltung der Versuchsparameter für unbeschichtete Quarze	57
3.2.2	Vergleich der Thrombozytenaktivierung durch ADP oder Arachidonsäure	59
3.2.3	Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf unterschiedliche Arten von Blutproben und deren Vergleich.....	67
4	Diskussion und Zusammenfassung	72
4.1	Vergleich mit dem Stand der Technik.....	72
4.2	Diskussion der Beschichtung	74
4.2.1	Polystyrolbeschichtete Schwingquarze.....	74
4.2.2	Unbeschichtete Goldquarze.....	75
4.2.3	Übertragbarkeit auf vollautomatische Anlage	75
4.3	Diskussion der Regeneration	75
4.3.1	Messungen auf unbenutzten Quarzen	76
4.3.2	Messungen auf regenerierten Quarzen	76
4.4	Diskussion der Thrombozytenfunktionsmessungen	76
4.4.1	Polystyrol beschichtete Quarze.....	76
4.4.2	Unbeschichtete Gold Quarze	77
4.4.3	Vergleich der Thrombozytenfunktionsmessung auf PS und Gold	77
4.5	Verhältnis von Thrombozyten-Zahl und initialem Frequenzabfall.....	78
4.6	Diskussion der Ergebnisse von unterschiedlichen Aktivatoren	79
4.6.1	Aktivierung mittels ADP.....	79
4.6.2	Aktivierung mittels Arachidonsäure.....	80
4.6.3	Vergleich der Aktivatoren ADP und Arachidonsäure	80

Inhaltsverzeichnis

4.7	Diskussion der Ergebnisse: Einflusses von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktionsmessung.....	82
4.7.1	Unterscheidung auf Grund des Aktivators	82
4.8	Diskussion über die Interpretation der Messwerte	82
4.8.1	Interpretation der Kurvenverläufe.....	82
4.8.2	Interpretation der lichtmikroskopischen Bilder	83
4.9	Zusammenfassung	84
5	Abkürzungen	85
6	Abbildungen	86
7	Tabellen	88
8	Literaturverzeichnis	89
9	Danksagung	91
10	Lebenslauf.....	92

1 Einleitung

Seit dem Beginn des 19. Jahrhunderts haben Blutplättchen (Thrombozyten) bei Naturwissenschaftlern für Faszination gesorgt. Zu Beginn der Forschung bezeichnete man die Thrombozyten als seltsame kleine Kügelchen (Hermann Nasse 1807 – 1892). Sie wurden nicht als eigenständige Blutbestandteile, sondern als ausgestoßene Zellkerne betrachtet. Die Eigenständigkeit der Thrombozyten und den Zusammenhang mit der Blutgerinnung erkannte erst Giulio Bizzozero (1846 – 1901) im Jahre 1882 und beschrieb dies in seinem Aufsatz „Über einen neuen Formbestand des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung“. Der Plättchenursprung wurde aber erst durch James H. Wright (1869 – 1928) geklärt. Dieser erkannte die Thrombozyten als Abschnürungen der Plasmamembran der Megakaryozyten im Knochenmark. Seit diesen ersten Beschreibungen der Thrombozyten wurde das Wissen über die Physiologie und die Pathophysiologie sehr erweitert. Der Thrombozyt entwickelte sich zu einem großen wissenschaftlichem Forschungsgebiet, dem wir heute die Vielzahl an Informationen, insbesondere auf dem Gebiet vaskulärer Krankheitsbilder, verdanken [21].

1.1 Einführung

Ein einziger Thrombozyt hat einen Durchmesser von ca. 1,4 µm und ist damit der kleinste zelluläre Bestandteil des Blutes. Um eine suffiziente Hämostase mit anschließender Blutgerinnung gewährleisten zu können benötigt der menschliche Körper zwischen 150.000 und 450.000 Thrombozyten.

Kann der Körper die benötigte Anzahl der Blutplättchen nicht bereitstellen oder nachproduzieren, oder sind gar die Thrombozyten in ihrer Funktion gestört können zum Teil lebensbedrohliche Zustände resultieren.

So treten Thrombozytopenien (Mangel an Thrombozyten), zum Beispiel bei Leukämien, Leberzirrhose, Infektionskrankheiten wie Malaria aber auch iatrogen verursacht bei Therapie mit Heparin (Heparin-induzierte-Thrombozytopenie), in vielfältiger Weise auf. Die Funktion des einzelnen Thrombozyten ist intakt, nur kann keine suffiziente Hämostase und Blutgerinnung erreicht werden, da zu wenige Blutplättchen zur Verfügung stehen.

Funktionsstörungen in Form von Thrombozytopathien treten hauptsächlich durch Medikamente (Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Heparin, Penicillin,

Chemotherapeutika, u.v.a.), Vergiftungen und erblich bedingte Syndrome (z.B. von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) auf. In diesen Fällen sind die Thrombozyten zwar in ihrer Zahl normal jedoch liegt eine Einschränkung oder gar ein Defekt in deren Funktion vor.

Im Rahmen des seit 2006 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) zum thematischen Schwerpunkt: "Integrierte Mikrosysteme für biotechnologische Anwendungen (bioMST)" geförderten Forschungsprojektes wird in dieser Arbeit die Messung der Thrombozytenfunktion mittels Beschichtungen von Schwingquarzen untersucht.

Im Ersten Teil der Arbeit werden die biologischen und technischen Grundlagen der Thrombozytenfunktionsmessung sowie verschiedene Methoden zu ihrer Messung vorgestellt.

Im Zweiten Teil folgt die Beschreibung der neu entwickelten Technik zur Beschichtung der Quarze und anschließende Thrombozytenfunktionsmessung über ein Schwingquarzanalysesystem.

1.2 Blut – Zusammensetzung und Funktion

Ein erwachsener Mensch besitzt ungefähr sechs Liter Blutvolumen, dies entspricht etwa 8 % seines Körpergewichts.

Die Hauptaufgabe des Blutes ist der Transport von Gasen (Sauerstoff und Kohlendioxid), Nährstoffen, Botenstoffen (Hormone) und Abbauprodukten. Neben dieser Aufgabe ist das Blut für die Regelung des Säure-Basen-Gleichgewichts und die Körpertemperatur verantwortlich. Es beteiligt sich an der Konstanthaltung der Elektrolytkonzentrationen sowie an der körpereigenen Abwehrfunktion. Darüber hinaus ist das Blut für Blutgerinnung und Blutstillung verantwortlich.

Blut besteht aus Zellen beziehungsweise zellähnlichen Körperchen und aus Blutplasma. Der Anteil des Plasmas am Blutvolumen beträgt 55 %. Die zellulären (korpuskulären) Bestandteile des Blutes sind Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten [12].

1.2.1 Erythrozyten

Erythrozyten (gr. erythros = rot) werden im Knochenmark, aus kernhaltigen Vorstufen gebildet, verlieren jedoch auf ihrem Weg zum fertigen Erythrozyten ihren Zellkern und sind daher nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Ein erwachsener Mensch

besitzt in der Regel 5 Millionen Erythrozyten pro μl Blut, deren Lebensdauer ungefähr 120 Tage beträgt. Da die Erythrozyten im Laufe der Zeit ihre Elastizität und Verformbarkeit verlieren werden die alten, steiferen roten Blutkörperchen in der Milz und der Leber durch Makrophagen erkannt und phagozytiert. Dieser Vorgang wird Blutmauserung genannt.

Die Rotfärbung des Blutes wird durch das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin verursacht. Es ist auch das Hämoglobin, dem wir es verdanken, dass der Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Lunge bzw. im Gewebe von statten geht [11].

1.2.2 Leukozyten

Leukozyten (gr. leukos = weiß) werden über mehrere Vorstufen aus Stammzellen im Knochenmark gebildet, besitzen jedoch im Gegensatz zu den Erythrozyten einen Zellkern. Nicht alle Leukozyten haben eine feste äußere Gestalt, einige sind amöboid beweglich. Dies bedeutet sie sind in der Lage ihre Gestalt auf Grund äußerer Reize (Chemotaxis) zu verändern und sich in Richtung eines Stoffkonzentrationsgradienten zu bewegen. Man unterscheidet zwei Hauptdifferenzierungswege. Zum einen die Zellen der lymphatischen Reihe, zu der die Zellen der spezifischen Abwehr (Lymphozyten) und die natürlichen Killerzellen gezählt werden. Zum anderen die Zellen der myeloischen Reihe, zu welcher die Zellen der unspezifischen Abwehr (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen) sowie die Erythrozyten und die Thrombozyten gehören.

Ein gesunder erwachsener Mensch hat im Schnitt zwischen 4000 und 9500 Leukozyten pro μl Blut. Die wesentliche Aufgabe dieser weißen Blutzellen sind zum einen die Abwehr von krankheitserregenden Mikroorganismen wie z.B. Bakterien, Viren und Parasiten und zum anderen schützen sie den Körper vor eigenen oder auch fremden Stoffen und beseitigen diese durch Phagozytose.

Abgebaut werden Leukozyten wie auch die Erythrozyten zum größten Teil in der Milz, zu Teilen auch im Knochenmark und der Leber.

1.2.3 Thrombozyten

Thrombozyten haben einen Durchmesser von ca. $1,4 \mu\text{m}$ und sind damit die kleinsten korpuskulären Anteile des Blutes. Sie sind farblos und von flacher unregelmäßiger scheiben- bis spindelförmiger Gestalt.

Ebenso wie die Erythrozyten gehen auch die Thrombozyten aus kernhaltigen Stammzellen des Knochenmarks hervor, besitzen jedoch selbst keinen Kern und sind folglich nicht in der Lage sich selbst zu teilen. Diese Differenzierung von der Stammzelle über den Megakaryozyten bis zum fertigen Thrombozyten geht unter dem Einfluss von Thrombopoetin vonstatten. Dieses wird in der Niere, der Leber sowie den Stromazellen des Knochenmarks gebildet.

Die Bildung der Thrombozyten wird als Thrombopoese bezeichnet und läuft wie folgt ab. Aus der hämatopoetischen Stammzelle entwickelt sich zunächst durch Differenzierung der Megakaryoblast. Durch mehrere synchrone Kernverdoppelungen mit gleichzeitiger Zunahme des Zytoplasmavolumens reift der Megakaryoblast heran. Hat er schließlich einen Durchmesser von ca. 100 μm erreicht und befinden sich in ihm ca. 8 Zellkerne, kommt es zum Teilungsstillstand. Es entsteht der Megakaryozyt. Er ist mit einem Durchmesser von bis zu 160 μm die größte Zelle im Knochenmark. Durch Plasmaabschnürung entstehen pro Megakaryozyt 6-8 Problättchen, die sich dann wiederum jedes in bis zu 1000 Thrombozyten aufteilt. Dies bedeutet, dass im Schnitt aus jedem Megakaryoblasten bis zu 8000 Thrombozyten entstehen können. Ein gesunder Erwachsener besitzt im Schnitt zwischen 150–450 Tausend Thrombozyten pro μl Blut. Die Überlebenszeit von Thrombozyten beträgt 8-12 Tagen. Nach dieser Zeit werden sie zum größten Teil in der Milz, aber auch in der Lunge und der Leber abgebaut.

Thrombozyten enthalten zahllose Granula, die wichtige Substanzen für die Blutgerinnung enthalten (siehe Tabelle 1-1). Dies sind z.B. ADP, Kalzium, Serotonin, Thromboxan, verschiedene Wachstumsfaktoren und diverse Gerinnungsfaktoren.

Thrombozyten haben an ihrer Oberfläche diverse Rezeptoren, welche in Adhäsionsrezeptoren und Aktivierungsrezeptoren unterteilt werden können.

Zu den Adhäsionsrezeptoren zählt u.a. der GPIa/II–Rezeptor (auch Kollagenrezeptor) sowie der GPIIb/IIIa–Rezeptor. Da der GPIIb/IIIa–Rezeptor in erster Linie Fibrinogen bindet wird er auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet.

Eine zentrale Rolle bei der Adhäsion spielt auch der von-Willebrand-Faktor (vWF), ein Protein das u.a. von Endothelzellen der Gefäßwand produziert wird und auch im Thrombozyten vorkommt. Der von-Willebrand-Faktor bindet hauptsächlich über den vWF–Rezeptor (GPIb/IX–Komplex), ebenfalls ein Adhäsionsrezeptor.

Zu den Aktivierungsrezeptoren zählt u.a. der ADP–Rezeptor, welcher den Ca^{2+} -Einstrom, die intrathrombozytäre Ca^{2+} -Freisetzung sowie die Formveränderung und die Aggregation der Thrombozyten vermittelt.

Thrombozyten werden physiologischer Weise nur durch verletztes Endothel aktiviert, niemals jedoch bei intakt vorliegender Endothelschicht. Dies ist den Eigenschaften der Glykokalix der Endothelzellmembran zu verdanken. Thrombozyten besitzen für diese Membranen keine Rezeptoren. Hinzu kommt, dass Endothelzellen Faktoren (Prostacyclin, Stickstoffmonoxid und Heparin) in das Gefäßlumen abgeben, die einer Aktivierung der Thrombozyten entgegenwirken.

Die Hauptfunktion der Thrombozyten besteht darin, zu jeder Zeit einen ordnungsgemäßen Blutfluss im Gefäßsystem zu gewährleisten und einer Vermeidung von Blutverlust durch Bildung eines Thrombus entgegen zu wirken.

Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten z.B. über ADP oder Arachidonsäure, so reagieren diese mit der Aktivierung der Adhäsionsrezeptoren, Schwellung und Ausbildung von Pseudopodien (Faden- und dornförmige Fortsätze zur Vernetzung). Dies zieht eine Aggregation der Thrombozyten untereinander (im Wesentlichen durch den GPIIb/IIIa – Rezeptor und Fibrinogen) nach sich. Des Weiteren werden durch die Aktivierung der Thrombozyten verschiedene Freisetzungsreaktionen in Gang gesetzt. Hierzu zählen u.a. die Freisetzung von ADP (zur Aktivierung des GPIIb/IIIa – Rezeptors) und Thromboxan (zur Aktivierung weiterer Thrombozyten und zur Gefäßkontraktion) [13].

1.2.4 Hämostase

Verletzungen im Blutgefäßsystem müssen schnell abgedichtet werden, um Blutverluste so gering wie möglich zu halten. Die Hämostase umfasst Wechselwirkungen zwischen dem Gefäßendothel und Thrombozyten sowie Gerinnungsfaktoren, die aus dem Blutplasma und aus verletztem Gewebe stammen. Man kann die Hämostase in zwei Phasen einteilen. Eine sofortige Thrombozytenaggregation zusammen mit einer Gefäßkontraktion bildet die primäre Hämostase; die Gerinnungsfaktoren, die über eine Gerinnungskaskade letztlich zu mechanisch stabilem Fibringerüst führen bilden später die sekundäre Hämostase [13].

Primäre und sekundäre Hämostase laufen in vivo parallel ab; zum besseren Verständnis werden sie hier aber getrennt betrachtet.

1.2.4.1 Primäre Hämostase

Unter der primären Hämostase versteht man eine nur Sekunden bis Minuten dauernde Reaktion auf eine Zerstörung der innersten Schicht der Gefäßwand. Die primäre Hämostase ist wiederum in eine vaskuläre und eine thrombozytäre Phasen aufgeteilt. Die vaskuläre Phase, die durch eine Vasokonstriktion gekennzeichnet ist, entsteht zum einen reaktiv durch die Freilegung von Kollagenfasern in der verletzten Gefäßwand, zum andern durch Mediatoren (Serotonin, Thromboxan A_2), welche aktivierte Thrombozyten an der Verletzungsstelle freisetzen. Damit sich die Blutstillung nur auf den Bereich der Verletzung beschränkt, liegen die Thrombozyten bei intaktem Endothel in einer Art Ruheform vor. Dies ist einerseits dadurch möglich, da Thrombozyten keine Rezeptoren für gesundes Endothel besitzen und daher nicht aktiviert werden können, andererseits setzen gesunde Endothelzellen Prostazyklin (Prostaglandin I) und Stickstoffmonoxid (NO) frei. Diese Mediatoren wirken ihrerseits wiederum der Aktivierung und Anhaftung der Thrombozyten entgegen.

In der thrombozytären Phase wird dann abschließend der Gefäßdefekt durch einen so genannten weißen Thrombus verschlossen.

Die bei der Gefäßwandverletzung freigelegten endothelialen Kollagenfasern, dienen den Thrombozyten als Bindungsstelle, an denen sie sich sofort anheften. Diese Bindung wird über den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, der subendothelial lokalisiert ist. Der vWF wird von den Endothelzellen, von Thrombozyten aber auch von Megakaryozyten gebildet. Geringe Mengen des vWF lassen sich selbst im Plasma, an den Gerinnungsfaktor VIII gebunden, nachweisen.

Da die Thrombozyten über einen speziellen vWF-Rezeptor, den so genannten GPIb/IX-Rezeptor verfügen, binden die einzelnen Thrombozyten an die Verletzungsstelle. Durch diese Anheftung werden die Thrombozyten aktiviert und geben den Inhalt ihre Granula frei. Aus diesen Granula werden verschiedene Substanzen freigesetzt, deren Funktion aus folgender Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 1-1: Einige Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula und ihre Funktion [12]

Stoff	Funktion
ADP	Thrombozytenaktivierung, Aktivierung der Aggregation
Arachidonsäure	Thrombozytenaktivierung, Aktivierung der Aggregation
Serotonin	Thrombozytenaktivierung, Vasokonstriktion
Fibrinogen	Thrombozytenaktivierung über GPIIb/IIIa, plasmatische Gerinnung
Faktoren V+VIII	Plasmatische Gerinnung
vWF	Plättchenadhäsion
Fibronektin	Zellhaftung
Wachstumsfaktoren	Förderung der Wundheilung
Kalzium	Kofaktor für Thrombozytenaktivierung und plasmatische Gerinnung

Gleichzeitig verändern die Thrombozyten ihre flache Form zu einer kugeligen und bilden Pseudopodien aus, mit denen sie einen engen Kontakt zu ihrem Nachbar erreichen.

Neben dem Kollagenkontakt werden die Thrombozyten noch durch den Plättchenaktivierenden-Faktor (PAF), der von Leukozyten sezerniert wird zur Aggregation aktiviert. Weitere Kofaktoren sind ADP, Adrenalin, Kalzium und Serotonin.

Die Thrombozyten bilden ebenso Stoffe, die die Aggregation und die Vasokonstriktion fördern. Dies sind PAF und Thromboxan A₂.

Die Thrombozytenmembran verfügt nicht nur über den oben erwähnten GPIIb-Rezeptor, sondern unter anderen, noch über einen so genannten GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplex, über den sich die Blutplättchen untereinander mittels Fibrinogenfäden vernetzen.

Die Cyclooxygenase ist das wichtigste Enzym bei der Bildung von Prostaglandinen, Thromboxanen und anderen Eikosanoiden aus Arachidonsäure. Dieses wichtige Enzym kann medikamentös durch Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®) gehemmt werden.

Durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure bzw. acetylsalicylsäurehaltigen Medikamenten wird die Aggregation der Thrombozyten durch die Hemmung der Cyclooxygenase blockiert und dadurch die Thromboxan A₂-Synthese vermindert.

Bei thrombembolischen Erkrankungen wie z.B. Herzinfarkt oder Schlaganfall spielt die Aggregation von Thrombozyten pathophysiologisch eine entscheidende Rolle. Deshalb erhalten Patienten nach solch einem Ereignis oder auch Patienten, die zur Risikogruppe solcher Erkrankungen zählen, prophylaktisch einen Aggregationshemmer, um diesen Erkrankungen vorzubeugen oder ein Rezidiv zu verhindern. Kann einem Patienten aus medizinischen Gründen keine Acetylsalicylsäure gegeben werden, stehen alternative Medikamente zur Verfügung. Bei der irreversiblen Blockierung des auf der Thrombozytenmembran sitzenden P2Y₁₂-Rezeptors durch Clopidogrel kann die ADP-abhängige Thrombozytenaktivierung gehemmt werden. Eine weitere Alternative stellt der monoklonale Antikörper Abciximab dar, der gegen den Rezeptorkomplex GPIIb/IIIa gerichtet ist und so die Quervernetzung der Thrombozyten untereinander verhindert wird [12].

1.2.4.2 Sekundäre Hämostase

Um den durch die primäre Hämostase gebildeten Thrombozytenthrombus zu stabilisieren, wird in der sekundären Hämostase ein roter Thrombus aus einem Fibrinmaschenwerk gebildet, in das auch Erythrozyten eingelagert sind. Diese Erythrozyten sind für die namensgebende Rotfärbung verantwortlich. Die sekundäre Hämostase verläuft in drei Phasen: Die Aktivierungsphase, in der aus Prothrombin Thrombin entsteht, die Koagulationsphase, in der durch Abspaltung von Fibrinopeptiden aus Fibrinogen lösliche Fibrinmonomere entstehen, welche zu unlöslichem Fibrin polymerisieren. In der Retraktionsphase kommt es schließlich zu einer Volumenverminderung und Verfestigung des Blutgerinnsels. Die Retraktion wird durch die Kontraktion der Thrombozyten ausgelöst. Am besten lässt sich die sekundäre Hämostase anhand der Gerinnungskaskade (siehe Abbildung 1-1) verstehen. Hierbei sind die in folgender Tabelle aufgelisteten Gerinnungsfaktoren beteiligt.

Tabelle 1-2: Gerinnungsfaktoren [12]

Faktor Nr.	Name
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebethromboplastin
IV	ionisiertes Ca ²⁺
V	Akzeleratorglobulin
VI	entspricht aktiviertem Faktor V
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 (Fitzgerald-Faktor)
PL	Phospholipide
Fibrin s	lösliches Fibrin
Fibrin i	unlösliches Fibrin
Fibrin a	aktiviertes Fibrin

Über den prinzipiellen Ablauf der Kaskade besteht heute eine einheitliche Meinung. Allerdings sind noch viele Details unbekannt oder werden unterschiedlich interpretiert. Der folgende Abschnitt beschreibt die groben Zusammenhänge.

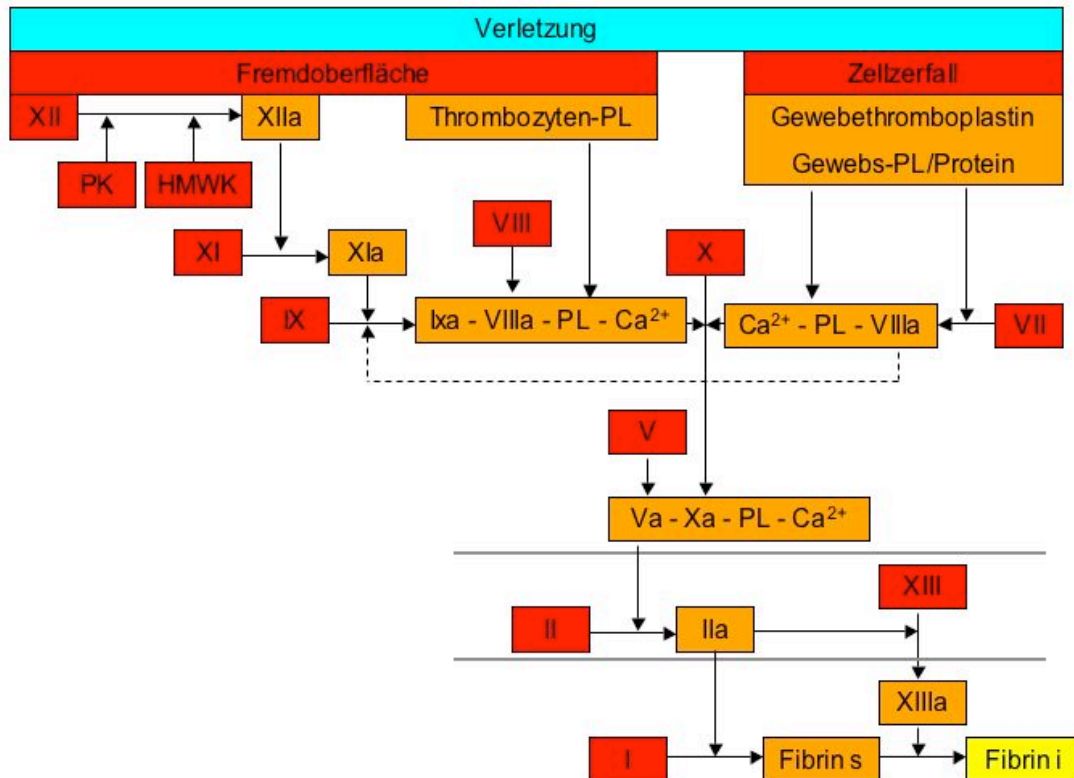


Abbildung 1-1: Gerinnungskaskade [16]

Prinzipiell kann der Gerinnungsvorgang über einen exogenen oder einen endogenen Aktivierungsmechanismus ausgelöst werden. In vivo werden normalerweise im Falle einer Verletzung beide Mechanismen gestartet. Diese lassen sich in vitro durch die Verwendung spezifischer Aktivatoren getrennt voneinander betrachten.

An der intrinsischen (=endogenen) Aktivierung sind die Faktoren XII, XI, PK und HMWK beteiligt. Für eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist die Bindung an Phospholipide der Thrombozytenmembran und die Einbeziehung des aktivierten Faktors Va in den sog. Tenase-Komplex (IXa-VIIIa-PL-Ca²⁺) erforderlich, wobei die Bindung über Ca²⁺-Ionen vermittelt wird.

Die extrinsische (=exogene) Aktivierung durch Gewebsthromboplastin führt zu dem Komplex (VIIa-PL-Ca²⁺). Eine Querverbindung zwischen exogenem und endogenem Weg besteht über die Möglichkeit der Aktivierung von Faktor IX durch Faktor VIIa und weiterer hier nicht aufgezeigter Querverbindungen.

Der Tenasekomplex (IXa-VIIIa-PL-Ca²⁺) und der Komplex (VIIa-PL-Ca²⁺) aktivieren den Faktor X. Dieser Faktor X ist die zentrale Stelle bei der Verbindung zwischen endogenem und exogenem System. Ab dann laufen die Aktivierungsschritte in der sog. gemeinsamen Endstrecke gleich ab.

Der Prothrombinas-Komplex (Xa–Va–PL–Ca²⁺) bewirkt die Aktivierung von Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa). Durch den Faktor Va wird die Reaktionsgeschwindigkeit um ein Vielfaches erhöht. Thrombin ist das für den Gerinnungsvorgang entscheidende Enzym. Es greift direkt am Fibrinogen an und bewirkt mit Hilfe des Faktors XIII (fibrinstabilisierender-Faktor) die Bildung des unlöslichen Fibringerinnsels (Fibrin i) [16].

1.2.5 Einfluss der Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Hämostase

Die Acetylsalicylsäure wird heute standardmäßig als Dauermedikation zur Thromboseprophylaxe z.B. als Infarktprophylaxe bei absoluter Arrhythmie eingesetzt. Die Wirkung der ASS basiert auf der Hemmung der Cyclooxygenase (COX). ASS hemmt die COX der Thrombozyten irreversibel. Somit sind diese nicht mehr in der Lage aus Arachidonsäure Thromboxan zu produzieren. Thromboxan ist ein hochpotenter thrombozytenaktivierender Agonist am TP-Rezeptor (Thromboxan A₂-Rezeptor). Wird dieser Rezeptor nicht aktiviert, weil kein Thromboxan gebildet und ausgeschüttet wird sind die Thrombozyten effektiv geblockt.

Der Stellenwert des TP-Rezeptors wird anhand von Mäusen, die keinen TP-Rezeptor exprimieren, deutlich. Hier ist die Blutungszeit deutlich verlängert, während die ADP-induzierte Aggregation normal bleibt [29].

Dieser Unterschied in der Aktivierung durch ADP oder Arachidonsäure (folglich Thromboxan) wird in dieser Arbeit ausgenutzt um zu zeigen, dass mittels Schwingquarzsensoren zwischen durch ASS gehemmten und nicht gehemmten Thrombozyten unterschieden werden kann.

1.3 Thrombozytenfunktionsmessung – Stand der Technik

Die aktuellen Methoden der Thrombozytenfunktionsmessung beruhen auf unterschiedlichen Prinzipien die in den folgenden Kapiteln mit entsprechenden Geräten beispielhaft vorgestellt werden. Einsatz finden diese u.a. zur Diagnose von Thrombophilien und im therapeutischen Drug-Monitoring.

1.3.1 Thrombozyten-Aggregometrie

Das Prinzip der Thrombozyten-Aggregometrie wurde ursprünglich von Kratzer und Born beschrieben (siehe Abbildung 1-2) [14] [15].

Nach Stimulation der Aggregation im thrombozytenreichen Plasma mit ADP, Kollagen, Arachidonsäure, Epinephrin oder Ristocetin wird die Differenz der Intensität der Lichttransmission zwischen dem thrombozytenarmen Plasma (PPP) und dem thrombozytenreichen Plasma (PRP) einer Blutprobe registriert und prozentual berechnet.

Das Ergebnis stellt somit eine unmittelbare Proportionalität zu der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten dar.

Das möLAB® Gerät PAP (Platelet Aggregation Profiler, möLAB GmbH, Langenfeld) basiert auf dieser Methode. Neben der Plasmaprobe benötigt das System einen Aktivator für die Thrombozyten-Aggregation und Küvetten als Einmalartikel.

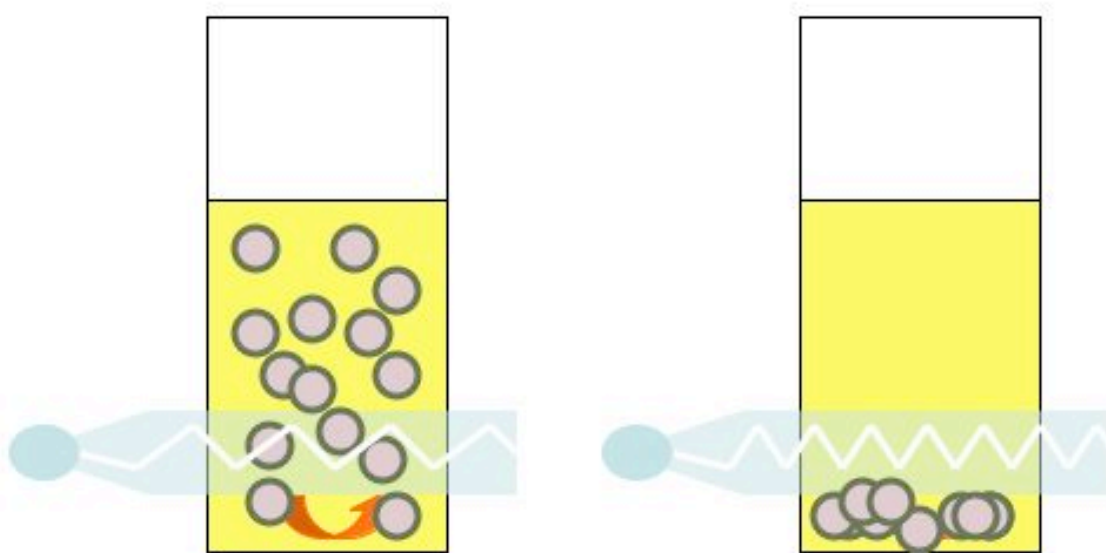


Abbildung 1-2: Prinzip der Thrombozyten-Aggregometrie nach Born [17]

1.3.2 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie ist eine bereits 1948 von Hartert [10] in Heidelberg entwickelte Methode zur Vollblut-Gerinnungsanalyse. Sie basiert auf der Messung der Viskosität des Blutes und der kontinuierlichen grafischen Aufzeichnung der Gerinnselfestigkeit während der Gerinnung (Erfassung der Gerinnungsfaktoren und –inhibitoren, Thrombozyten, der Fibrinbildung) und der folgenden Fibrinolyse.

In Harterts System oszilliert eine Stahlküvette (Cup) gefüllt mit nativem Vollblut um einen kleinen Winkel. In den Cup taucht ein Pendel (Pin) ein, der mit einem Schreiber verbunden ist. Dieser überträgt die Winkelbewegung auf einen Streifenschreiber [10].

Das mit moderner Computertechnik ausgestattete ROTEM-System [24] (Rotations-Thrombelastographie, siehe Abbildung 1-3) ist eine Weiterentwicklung des klassischen Thrombelastographie-Systems. Die Drehbewegung des Stempels wird optisch mittels Spiegel und Sensor erfasst und durch ein Computersystem verrechnet. Neben der Vollblutprobe benötigt das System spezielle Reagenzien zur Aktivierung der Thrombozyten-Aggregation sowie Einmalartikel (Stempel und Küvette).

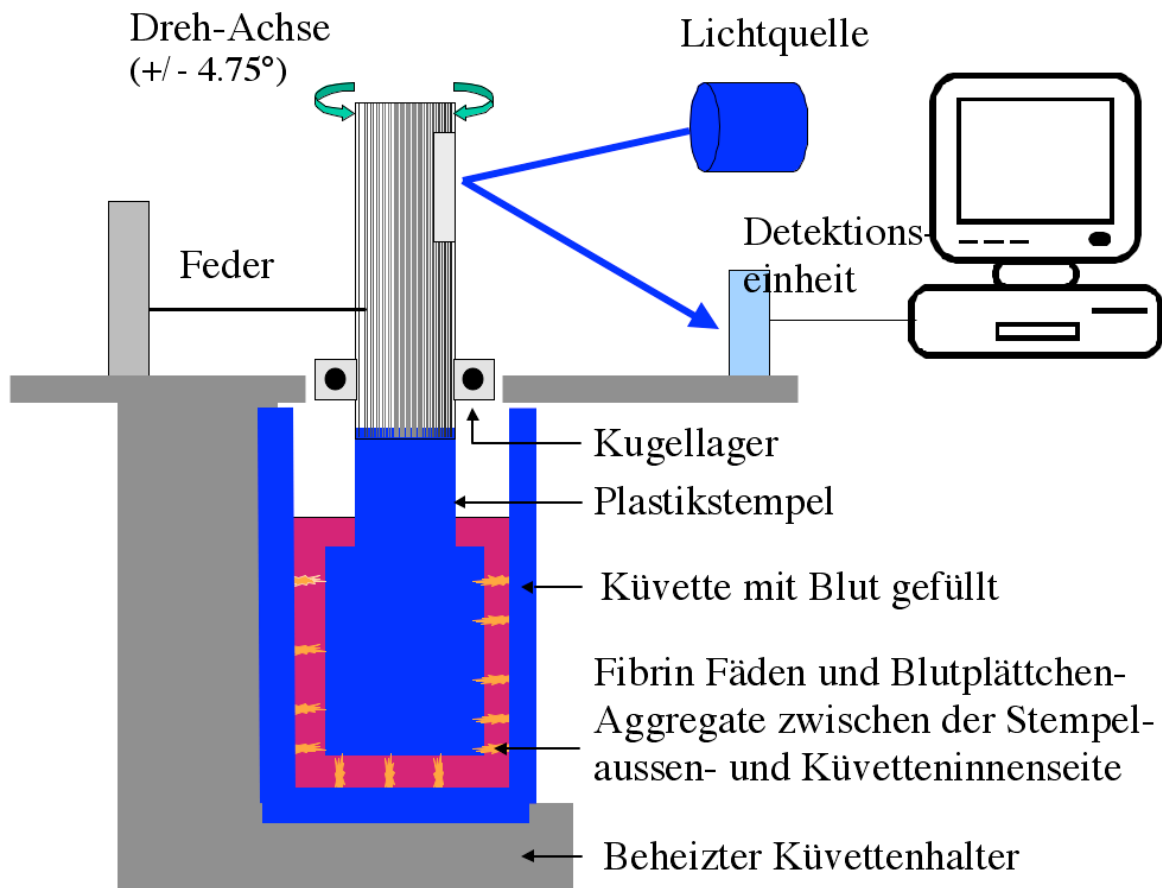


Abbildung 1-3: Prinzip der (Rotations-)Thrombelastometrie (ROTEM®) [24]

1.3.3 Vollblut-Impedanz-Aggregometrie

Die Impedanz-Aggregometrie wurde zu Beginn der achtziger Jahre von Cardinal et al. vorgestellt [3].

Dabei werden in die Blutprobe zwei parallel positionierte Drähte, die als Elektroden dienen, eingetaucht (siehe Abbildung 1-4). Während des initialen Kontaktes mit Vollblut werden die Elektroden mit einer Schicht Thrombozyten bedeckt. Ohne aggregationsfördernde Reagenzien bleibt die Leitfähigkeit konstant. Mit der Zugabe von Aggregationsstimulantien (z.B. ADP, Arachidonsäure, Prostaglandine, Ristocetin, Thrombin) kommt es zur Thrombozyten-Aggregation. Dadurch vermindert

sich die Leitfähigkeit bzw. erhöht sich der Widerstand der Probe proportional zur Thrombozyten-Aggregation.

Der Multiplate Platelet Function Analyser [19] (Multiplate®, Dynabyte GmbH, München) basiert auf diesem Prinzip.

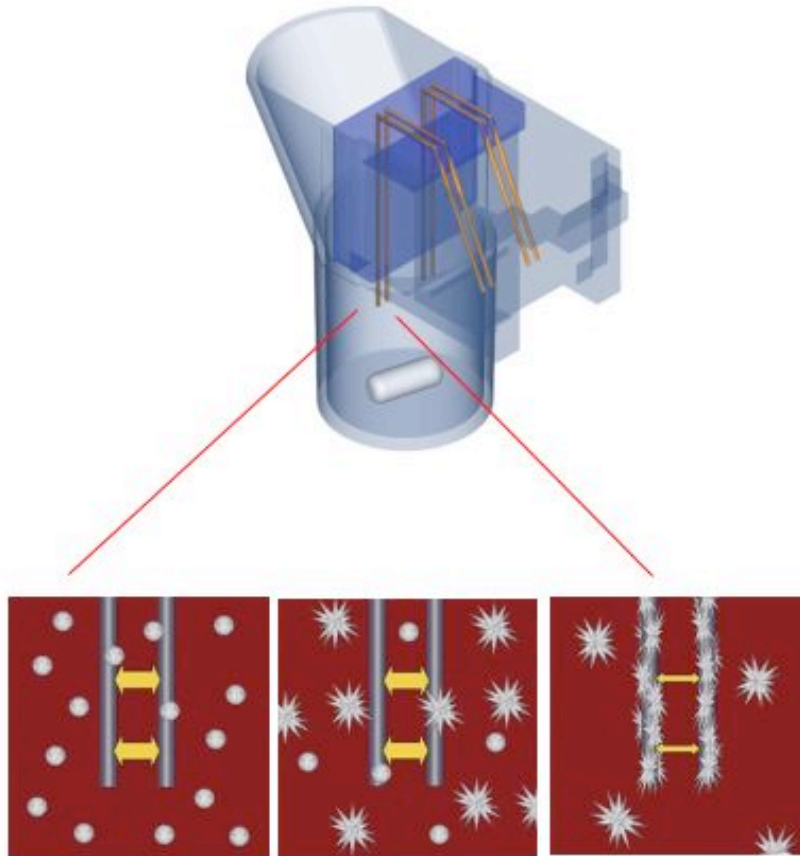


Abbildung 1-4: Prinzip der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie (Multiplate®) [19]

Neben der Vollblutprobe benötigt das System einen Aktivator für die Thrombozyten-Aggregation sowie Einmalartikel (Messzelle).

1.4 Thrombozytenfunktionsmessung mit Schwingquarzsensoren

Das in dieser Arbeit zugrunde liegende Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung basiert auf der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten auf akustischen Sensoren.

1.4.1 Massensensitive Sensoren

Massensensitive Sensoren können überall dort eingesetzt werden, wo die Detektion von Analyten mit einer Massenänderung an der Oberfläche einhergeht. Dies ist bei

dem hier angewandten Verfahren der Fall. Thrombozyten adhären und aggregieren auf der Sensoroberfläche und es kommt somit zu einer Änderung der akustischen Eigenschaften in Folge der Massenänderung.

1.4.2 Schwingquarze (QCM)

Ein Schwingquarz besteht aus einem Quarzkristallscheibchen, mit einer bestimmten Geometrie und einem speziellen Kristallschnitt. Wird an die aufgedampfte Goldelektrode eine elektrische Wechselspannung angelegt, entsteht dadurch im Inneren der Quarzscheibe eine transversale Scherwelle. Diese dringt evaneszent, in Medien ein, die der Schwingquarzoberfläche angrenzen. Ein Schwingquarz besitzt eine sehr hohe Frequenzkonstanz. Die sensorischen Eigenschaften kommen durch die Wechselwirkung der akustischen Wellen, an der Grenzfläche zwischen Kristalloberfläche und dem anliegenden Medium, zu Stande. Eine Massenänderung auf der Quarzoberfläche, bewirkt eine negative Resonanzfrequenzänderung proportional zur Masse der Fremdschicht. Dadurch wird es möglich, Massen im ng-Bereich zu „wiegen“.

Messwertumsetzer auf der Basis akustischer Sensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Substrat, dem eigentlichen Schwingquarz. Auf diesen Schwingquarz sind Metallelektroden aufgebracht. Legt man eine elektrische Wechselspannung an, so kann der Quarz zu akustischen Schwingungen angeregt werden. Dies ist durch den, 1880 von Pierre und Jacques Curie entdeckten piezoelektrischen Effekt möglich. Er besteht darin, dass bei Ausübung von mechanischer Spannung auf eine Oberfläche eines speziellen Festkörpers (wie z.B. α -Quarze) elektrische Oberflächenladungen erzeugt werden. Diese Ladungen sind mittels eines Elektrometer, welches an der Kristalloberfläche angebracht ist zu messen. Da der Piezoeffekt reversibel ist, kann man durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung den Quarz zu einer mechanischen Schwingung anregen [1, 7, 8, 9, 20, 22, 23, 28].

1.4.3 Schwingquarze als Thrombozytensensor

Die Messmethode mittels Schwingquarzen wurde bereits als Immunosensoren zur Blutgruppenanalytik genutzt [4, 5, 6, 7, 25, 27]. Hierbei wurden von Cluss [5] die Schwingquarze mit Protein A belegt. Mittles IgG-Monolayer-Beschichtung, IgM-Monolayer-Beschichtung, sowie mit diversen Sandwichbeschichtungen Blutgruppenantigene nachzuweisen.

Die Thrombozyten-Aggregometrie mit einem Schwingquarz-Biosensor basiert auf einem Schwingquarz, dessen Oberfläche thrombophilisiert wurde, um aktivierte Thrombozyten darauf adhären lassen zu können. Die dünne Quarzscheibe ist mit einer Goldschicht (Elektroden) überzogen, die als Reaktionspartner für die Beschichtung oder die Thrombozyten direkt dient. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wird der Quarz zum Schwingen bei einer konstanten Frequenz von ca. 10 MHz angeregt. Die Thrombozyten werden durch ADP, oder eine andere Substanz, aktiviert und binden daraufhin an die Oberfläche des Schwingquarzes. Die Veränderung auf der Quarzoberfläche verursacht eine messbare Resonanzfrequenzänderung.

Einer der wichtigsten Faktoren für eine erfolgreiche Biosensorik ist die Wahl der Oberflächenbeschichtung, die so thrombophil wie möglich sein sollte.

1.5 Analysegerät zur Thrombozytenfunktionsmessung

Die von Gehring entwickelte Fidget Type Fg T1 (Messanlage) arbeitet nach dem Prinzip der Schwingquarz-Technik. Sie besteht aus einer Sensoreinheit mit zwei Messzellen, die eine parallele Bestimmung von zwei Analyten ermöglicht. Diese Messzellen beinhalten die Quarze, die über eine Elektronik zum Schwingen angeregt werden. Die Goldquarzelektroden werden bei Bedarf mit Polystyrol beschichtet und können ohne großen Aufwand in der speziellen Halterung der Messzelle fixiert werden. An die Messstation sind ein Steuergerät und ein PC angeschlossen, der mittels eines speziell entwickelten Computerprogrammes Frequenzänderungen des Schwingquarzes registriert und diese graphisch darstellt. Die Fluidik des Systems ist so aufgebaut, dass minimale Analytmengen ausreichen um detektierbare Ergebnisse zu erhalten. Alle verwendeten Materialien sind biokompatibel und weitestgehend inert, so dass Wechselwirkungen minimiert werden. Sämtliche Einstellungen der Pumpe sowie die Ansteuerung und Thermostatisierung des Schwingquarzes in der Messzelle, werden automatisch durch das Computerprogramm gesteuert. Folgende Abbildungen zeigen einen Überblick über die Anlage und die Quarzhalterung im Detail [7].

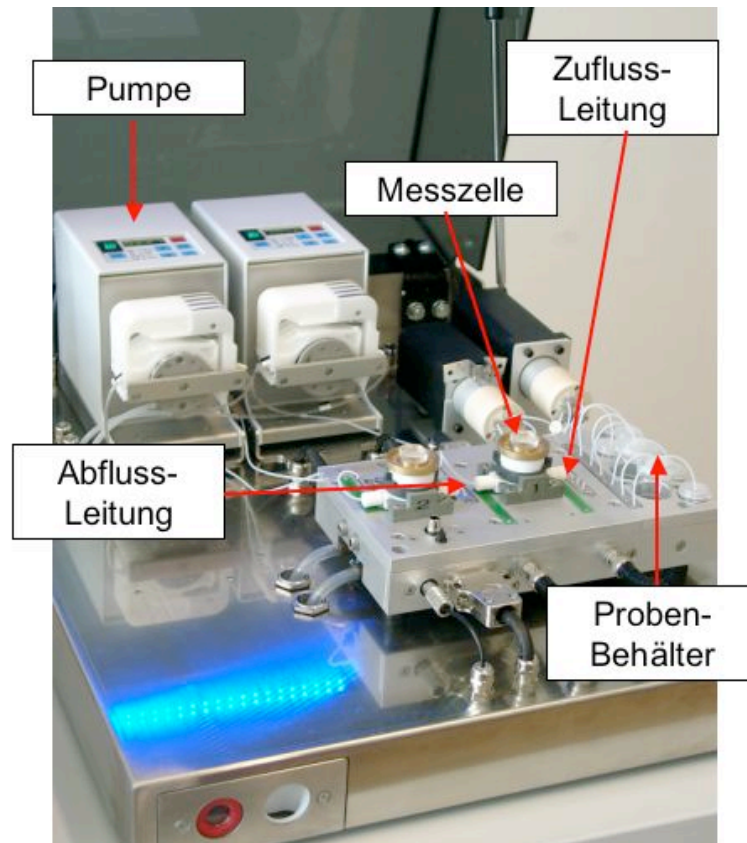


Abbildung 1-5: Fidget Type Fg T1-Anlage im Überblick

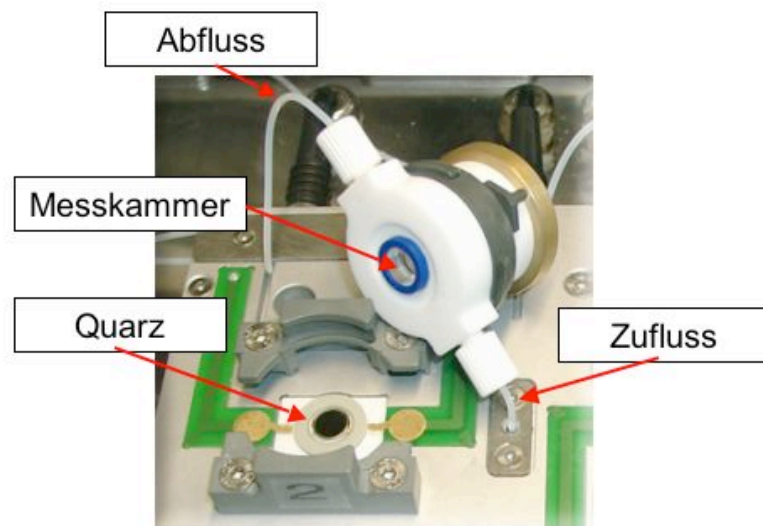


Abbildung 1-6: Quarzhalterung mit Quarz und Messkammer im geöffneten Zustand

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe des Blutanalysegerätes Fidget Type Fg T1 selektiv Thrombozyten auf dem speziell dafür beschichteten Schwingquarz zu binden und resultierend daraus ein messbares Signal der Frequenzänderung zu detektieren. Es musste also eine Beschichtung gefunden werden, die dieser Vorgabe gerecht wurde. Für die Nachfolgenden Experimente wurden unterschiedliche Polystyrolschichten hergestellt und mit einander verglichen.

Um ein langes und teures Beschichten der Quarze zu verhindern wurden im letzten Teil der Versuchsreihen unbeschichtete, also mit einer blanken Goldoberfläche belassene Quarze in der Anlage verwendet.

Da das verwendete Blutanalysegerät in der Routinediagnostik eingesetzt werden soll, wurde besonderes Augenmerk auf die Wirtschaftlichkeit gelegt. Die Schichten sollten schnell und günstig herzustellen sein, lange aktiv bleiben, homogene reproduzierbare Messergebnisse erzielen und gut zu regenerieren sein.

Auf die Regeneration wird in dieser Arbeit nur am Rande eingegangen und an gegebener Stelle auf die von Schmidt [26] parallel verfasste Arbeit verwiesen.

Im weiteren Verlauf der Messungen wurden Blutproben von gesunden mit denen von Patienten, die regelmäßig Acetylsalicylsäure einnahmen verglichen.

Hiermit soll gezeigt werden, dass das System in der Lage ist Thrombozytopenie von gesunden Thrombozyten zu unterscheiden aber auch, dass auf der Anlage mit beiden Arten von Blut gemessen werden kann.

2 Material und Messmethode

2.1 Material

2.1.1 Labormaterialien und Geräte

2.1.1.1 Aggregometer

- Platelet Aggregation Profiler, Model PAP-4, Mölab, Hilden

2.1.1.2 Blutbildbestimmung

- Cell-Dyn 3500, Abbott GmbH, Ludwigshafen

2.1.1.3 Digitalkamera

- Casio QV 5700, 5.0 Megapixel, vierfach optischer Zoom, Casio Europe GmbH, Hamburg

2.1.1.4 Magnetrührer

- Vario MAG Electronicrührer, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

2.1.1.5 Rührfisch

- Platelet Aggregation Profiler, Model PAP-4, Mölab, Hilden Länge: 4 mm, Durchmesser: 1,7 mm, silikonisiert

2.1.1.6 Mikroskop

- Auflichtmikroskop Axiostar 2 MAT, mit 50-, 100- und 500-facher Vergrößerung, Aufsatz für Digitalkamera Carl Zeiss AG, Jena

2.1.1.7 Spincoater

- Spin 150, APT GmbH, Bienenbüttel

2.1.1.8 Zentrifuge

- Multifuge 3 S-R, Heraeus, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm

2.1.2 Chemikalien / Reagenzien

2.1.2.1 Abciximab (ReoPro®)

- Antikörper gegen GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, Eli Lilly and Company, Indianapolis

2.1.2.2 Adenosindiphosphat (ADP)

- ADP 1,0 ml, Mölab GmbH, Langenfeld

2.1.2.3 Aceton

- HPLC grade, 99,9 %, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.1.2.4 Aqua bidest.

- 18,2 Mega–Ohm x cm Leitfähigkeit, stationäre Laborversorgung

2.1.2.5 Arachidonsäure

- Arachidonsäure 1,0 ml, Mölab GmbH, Langenfeld

2.1.2.6 2-Propanol

- 2-Propanol, Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.7 N₂–Gas

- Stickstoff (N₂), stationäre Laborversorgung

2.1.2.8 Natriumchloridlösung (NaCl)

- Natriumchloridlösung 0,9 %, pH 5,0 bis 7,0, Fresenius AG, Bad Homburg

2.1.2.9 Piranha

- Schwefelsäure (H₂SO₄) 98 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, Merck GmbH, Darmstadt
- Mischverhältnis H₂SO₄ : H₂O₂ = 3 : 1

2.1.2.10 Polystyrollösung (PS-Lösung)

- Polystyrene, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim
- in Toluol 2 mg/ml oder 10 mg/ml

2.1.2.11 Toluol

- Toluol 99.5+%, A.C.S Reagenz Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.1.2.12 TRIS-NaCl-Puffer (Tris-NaCl)

- Aqua bidest., stationäre Laborversorgung
- Natriumchlorid (NaCl) 99,5 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) 99,8 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Standard-pH bei 7,4

2.1.3 Blut und Plasma

2.1.3.1 Unbehandeltes Vollblut

- unbehandeltes Vollblut, im Citrat-Röhrchen, aus anonymisierten Blutspenden des Blutspendedienstes der Universitätsklinik Tübingen.

2.1.3.2 Platelette Rich Plasma (PRP)

- aus unbehandeltem Vollblut mittels Zentrifugation bei 150 G für 10 Min., das PRP wurde oben abpipettiert. Um die gewünschte Thrombozytenkonzentration einzustellen wurde mittels PPP verdünnt. Wenn nicht anders erwähnt enthielt das PRP 300.000 TZ/ μ l.

2.1.3.3 Platelette Pour Plasma (PPP)

- nach der oben beschriebenen PRP-Gewinnung wurde die verbleibende Probe bei 1500 G für 10 Min. zentrifugiert, das PPP wurde als Überstand abpipettiert.

2.1.4 QCM–Sensor

2.1.4.1 Quarz

- polierte Quarzscheibe, AT–Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektrode über die ganze Scheibe, Frequenz 10 MHz, Konstruktion: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen, Herstellung: Vectron International KVG, Neckarbischofsheim

2.1.4.2 Quarzhalterung

- Haltering aus Teflon, Innendurchmesser: 9 mm, Außendurchmesser: 16 mm
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen
- selbstklebende Kunststoffolie aus Polypropylen, Innendurchmesser: 6 mm, Außendurchmesser: 13 mm
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank K. Gehring, Tübingen

2.1.5 Messanlage

- Fidget Type Fg T1, vollautomatische Forschungs- und Entwicklungsplattform für die Diagnostik, Flüssigkeitsanalytik und Biokompatibilitätsanalyse mittels Schwingquarzsensoren.
- Entwicklung und Herstellung: Biosensorik-Gruppe, Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin, Universität Tübingen, Dr. rer. nat. Frank K. Gehring, Tübingen

2.2 Messmethode

2.2.1 Quarzpräparation

Die mit Gold beschichteten Quarze wurden vor der Messung nach den in folgenden Abschnitten aufgeführten Protokollen behandelt.

2.2.1.1 Reinigung der Quarze

- 1 Min im Acetonbad zur Entfettung
- Spülen mit Aqua bidest.
- Trocknen im Stickstoffstrom
- 1 Min. im Piranhabad zur Anätzung der Oberfläche
- Spülen mit Aqua bidest.
- Trocknen im Stickstoffstrom

Anschließend wurden die Quarze entweder direkt in die Haltevorrichtung eingeklebt oder mit Polystyrol beschichtet (s.u.) und danach eingeklebt.

2.2.1.2 Einkleben in den Haltering

Um den Quarz in der Anlage zentriert, fixiert und optimal kontaktiert zu halten wurde er nach der Beschichtung mittels einer selbstklebenden Folie in einen Haltering eingeklebt. Dieser dichtet die Messzelle beim Einbau vollständig ab.

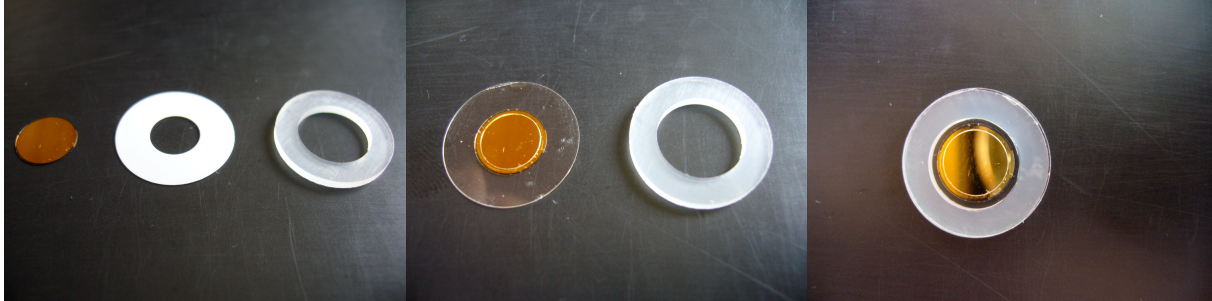


Abbildung 2-1: Arbeitsschritte beim Einkleben des Quarzes in den Haltering

2.2.1.3 Gold – Beschichtung

Der Quarz wurde wie oben beschrieben gereinigt, in den Haltering eingeklebt und war somit nach Arretierung in der Bajonett Haltevorrichtung für die Messung bereit

2.2.1.4 Polystyrol (PS) – Beschichtung

Der Quarz wurde wie oben beschrieben gereinigt und anschließend folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Zentrieren des Quarzes im Spincoater
- Haltung des Quarzes durch Vakuum
- Beschleunigen auf 3000 U/min
- Aufbringen von 30 μ l PS-Lösung (2 mg/ml oder 10 mg/ml)
- Spinning bei 3000 U/min für 2 Min.
- Ausbauen und Einkleben des Quarzes in den Haltering

Etwaige Verschmutzungen und Reste von PS auf der Unterseite des Quarzes wurden nach abgeschlossener Klebung durch einen mit Isopropanol getränkten Wattestab gereinigt.

2.2.2 Herstellung des Platelette Rich Plasma

Zur Probenvorbereitung wurde unbehandeltes Citratblut verwendet. Dies wurde mittels Zentrifugation zu Platelette Rich Plasma (PRP) und Platelette Pour Plasma (PPP) aufbereitet. Dazu wurde das Citratblutröhrchen bei 150 G für 10 Min. zentrifugiert. Das oben liegende PRP wurde abpipettiert und die verbleibende Probe

bei 1500 G erneut für 10 Min. zentrifugiert. Das nun oben liegende PPP wurde ebenfalls abpipettiert. In einem Zellcounter wurde die Thrombozytenzahl der gewonnenen Proben bestimmt. Zur Messung wurde das PRP mittels des PPP auf 300.000 TZ/ μ l eingestellt.

2.2.3 Thrombozytenfunktionsmessung in der Anlage

Der Quarz wurde auf die Zentrierung am Boden der Messeinheit aufgelegt und anschließend das Gehäuse aufgeschraubt. Zum Befüllen des zu- und abführenden Schlauches sowie der Messkammer wurde Tris-NaCl mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min aus dem entsprechenden Vorratsbehälter angesaugt, bis die gesamte Messkammer blasenfrei befüllt war. Anschließend wurde die Pumpe auf Flow 0,8 ml/min hochgesetzt um einen zügigen Transport der später aktivierten PRP-Probe auf den Quarz zu ermöglichen. Parallel dazu wurde das PRP mit einem silikonierten Rührfisch in ein Eppendorf-Cup gegeben. Der Rührer wurde mit $U = 1000$ 1/min gestartet und bei Zugabe des Aktivators (ADP oder ARA) für 5s gerührt. Die Pumpen wurden kurz gestopt, um den zuführenden Schlauch in die aktivierte PRP-Probe zu stecken. Nach erneutem Starten der Pumpen (Flow 0,8 ml/min) wurde die Probe für 10s auf den Quarz gesaugt.

Im Anschluss an die Thrombozytenfunktionsmessung wurde der Quarz unter dem Mikroskop betrachtet, fotografiert und dokumentiert. Anschließend stand er für Regenerationsversuche von Schmidt [26] zur Verfügung.

Die optimale Methode wurde für die hier beschriebenen Versuche angewandt.

Der Ablauf einer Messung ist im Folgenden beschrieben.

- Quarz in die Anlage einbauen
- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeinstellung: Flow 0,4 ml/min für 1min)
- Pumpeneinstellung auf Flow 0,8 ml/min ändern (damit die PRP-Probe nach der Aktivierung schnell genug die Messkammer erreicht, bevor die Gerinnung bereits im Schlauchsystem statt findet)
- Mischen des PRP (180 μ l) mit ADP(Aktivator) (20 μ l) durch silikonierten Rührer (5 s) in einem Eppendorf-Cup
- Kurzer Stop der Pumpe zum Umstecken des Schlauchs in die Blutprobe

- Probe (PRP+Aktivator) ansaugen 0,8 ml/min für 10 s
- Stop Flow (stehende Pumpen) für 30 Min.

Frequenz und Dämpfung wurden während des gesamten Vorgangs aufgezeichnet und grafisch dargestellt.

Die Messung, die Bezeichnung des Quarzes, die Konzentration der Beschichtung, die Art des Mischvorganges und die Versuchsergebnisse mit Angabe des Frequenzabfalls und der Dämpfungsänderung sind im jeweiligen Kapitel in folgender Form angegeben.

Tabelle 2-1: Beispiel Messprotokoll

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
Beispiel	PS X	10 mg/ml	Pipette 15 s	-1000 Hz	-500 Hz	+1200 Hz

Hierbei bezeichnet Δf_{gesamt} den Frequenzabfall über die gesamte Versuchszeit, Δf_{TZ} den Frequenzabfall der durch die Anbindung der Thrombozyten am Quarz verursacht wird und $\Delta \Gamma$ die Dämpfungsänderung über die gesamte Versuchszeit.

Neben den absoluten Werten sind die Kurvenverläufe an sich ebenfalls aussagekräftig. Zum Zeitpunkt "Stop+Mix" wird der Aktivator mit dem PRP gemischt. Der darauf folgende steile Frequenzabfall resultiert aus der Viskositätsänderung des Mediums in der Messkammer (Puffer vs. Plasma) und wird als initialer Frequenzabfall bezeichnet. Der sich daran anschließende Frequenzabfall spiegelt die Thrombozyten-Aggregation auf dem Quarz wieder.

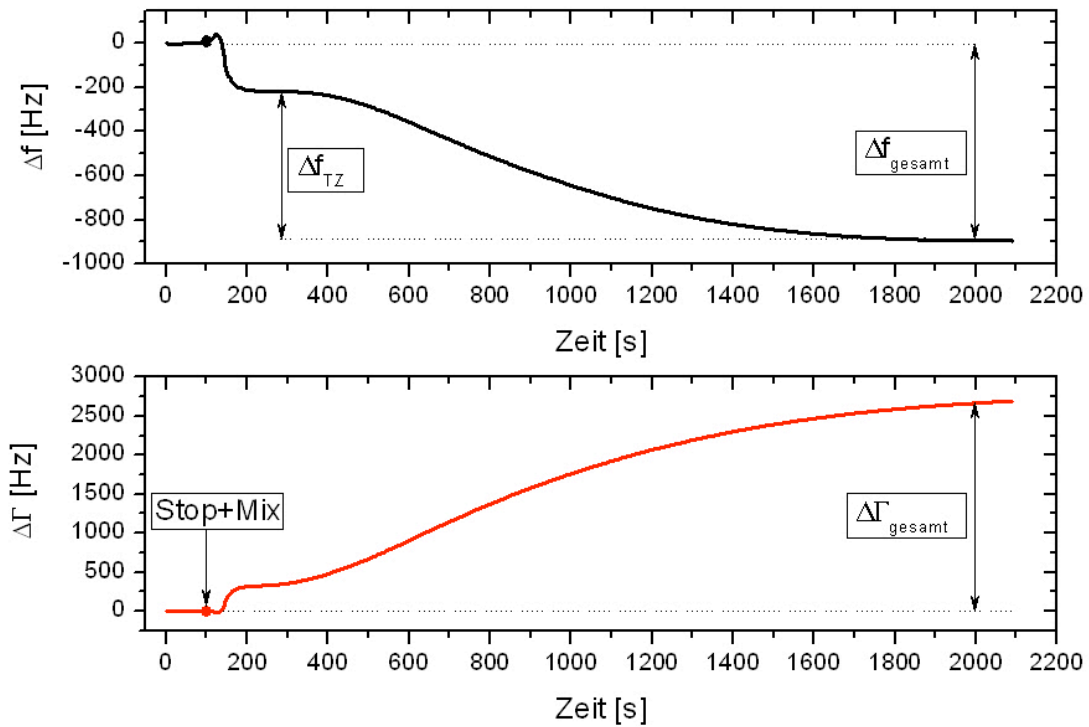


Abbildung 2-2: Darstellung der einzelnen Kurvenverläufe der Messwertaufzeichnung

2.3 Regenerationsmedien

Auf die von Schmidt [26] in seiner Arbeit verwendeten Regenerationsmedien wird nicht näher eingegangen. Regeneriert wurden die bereits mit Thrombozyten belegten Quarze mit

- Trypsin-EDTA
- Natronlauge
- Natrium-Dodecyl-Sulfat
- Salzsäure

Die regenerierten Quarze wurden anschließend sofort unter dem Mikroskop betrachtet, photographiert, dokumentiert und standen dann Messungen zur Überprüfung der Regeneration zur Verfügung.

2.4 Quarzregeneration

Die Regeneration wurde von Schmidt [26] am Dummy erprobt und an Messungen an der Anlage bestätigt. Der Dummy verfügt über dieselben Maße wie die Fg T1. Es können dieselben Quarze verwendet werden. Sie werden jedoch nicht zum Schwingen angeregt, so dass keine Elektronik benötigt wird. Auch die Fluidik ist identisch mit derjenigen der Fidge Type Anlage. Sie besteht ebenfalls aus biokompatiblen Materialien, wie z.B. Teflon. Ein Schlauchsystem fördert das durch eine Pumpe angetriebene Analysat in die Messzelle. Der Durchmesser des Schlauchsystems ist der Viskosität des Blutes angepasst, so dass ein störungsfreier Fluss möglich ist. Steuergerät und PC, wie sie bei der automatisierten QCM-Anlage eingesetzt werden, sind nicht erforderlich. Das Versuchsergebnis wurde beim Dummy optisch, mittels Mikroskop ermittelt. Notwendige Versuchsserien zur Optimierung und Weiterentwicklung der Regeneration wurden mit Hilfe dieses Dummy Systems und der Messanlage von Schmidt [26] durchgeführt.

2.5 Quarzregeneration im Dummy

Die von Schmidt [26] verwendeten Quarze stammten aus Messungen zur Thrombozytenfunktion aus dieser Arbeit. Der Quarz wurde auf die Zentrierung am Boden des Dummy aufgelegt und anschließend das Gehäuse darüber fixiert. Beim Befüllen des Dummy Systems wurde nach gleichem Protokoll wie beim arbeiten mit der Fidget Type Fg T1 vorgegangen. Im Anschluss an den Regenerationsvorgang wurde der Quarz unter dem Mikroskop betrachtet und photographiert. Danach stand er zu weiteren Kontrollmessungen zur Verfügung.

Die Regeneration verlief nach folgendem Protokoll.

- Kontrolle unter dem Mikroskop und Beurteilung der Thrombozytendichte
- Einsetzen des Quarzes in die Messzelle (Quarzhalterung)
- Tris-NaCl zum Entlüften des Systems (Pumpeneinstellung: Flow 0,4 ml/min für 1 Min.)
- Regenerationsreagenz für den ersten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4 ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen (Pumpeneinstellung: 0,4 ml/min für 1 Min.)
- Regenerationsreagenz für den zweiten Regenerationsschritt (falls erforderlich) (Pumpeneinstellung: 0,4 ml/min für 5 Min.)

- Tris-NaCl zum Spülen 0,4 ml/min
- Ausbau des Quarzes
- Kontrolle unter dem Mikroskop
- Photographische Dokumentation

3 Ergebnisse

3.1 Polystyrol beschichtete Quarze

Für eine gute Reproduzierbarkeit der experimentellen Reihen ist es äußerst wichtig die verschiedenen Parameter der Messungen so gut wie möglich konstant zu halten. Die ersten Versuche dienen der Findung zur optimalen Beschichtung des Quarzes. Polystyrol wird aufgrund seiner speziellen Eigenschaften häufig in der Labormedizin eingesetzt. So sind z. B. Gewebezuchtschalen aus oberflächenbeschichtetem Polystyrol hergestellt, an denen nahezu alle Zellen haften und sogar proliferieren können. Wie sich im täglichen Umgang mit den Schalen zeigt, haften auch Thrombozyten stark an deren Oberfläche. Deshalb wurden die Quarze mit Polystyrol beschichtet.

3.1.1 Vergleich verschiedener PS-Konzentrationen

3.1.1.1 Polystyrol-Schicht-Konzentration 10 mg/ml

Für die Herstellung der ersten Polystyrol beschichteten Quarze wurden 10 mg Polystyrol in 1 ml Toluol gelöst und nach oben beschriebenem Protokoll beschichtet.

Tabelle 3-1: Messprotokoll 3.1.1.1

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.1.1	PS 1	10 mg/ml	Pipette 15 s	-890 Hz	-680 Hz	+2630 Hz

Messung: 3.1.1.1

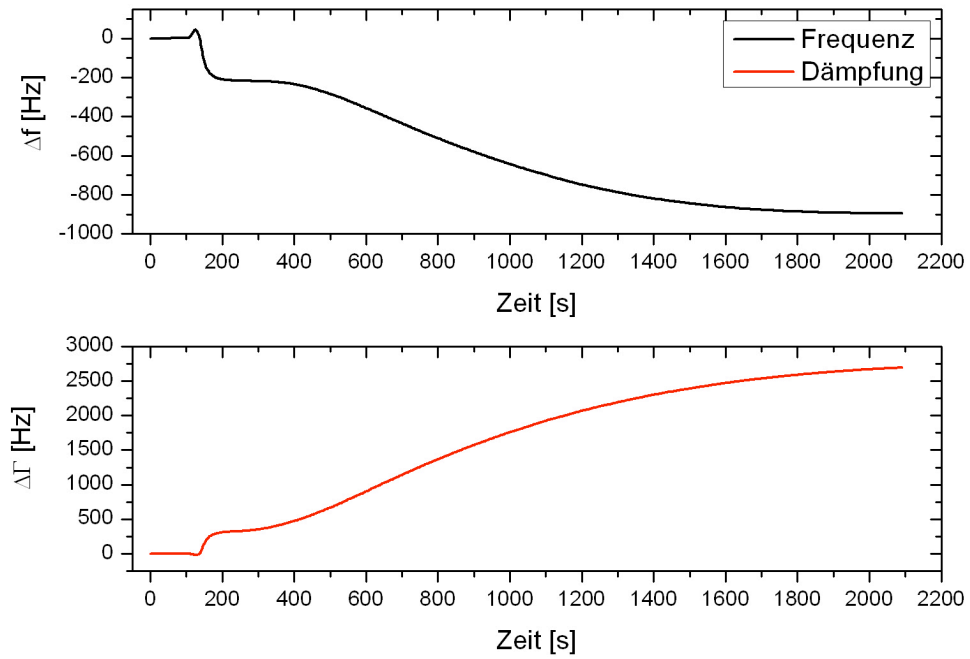


Abbildung 3-1: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.1, Quarz PS 1

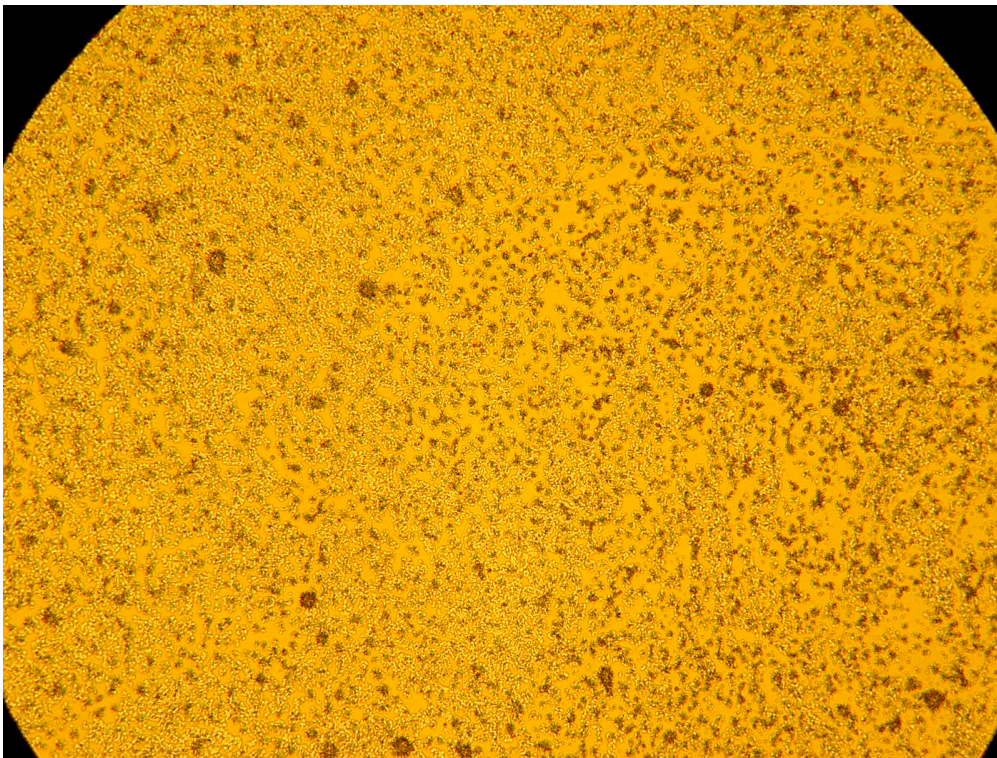


Abbildung 3-2: QCM nach Messung 3.1.1.1, Quarz PS 1, Vergrößerung 50x

Der deutliche Frequenzabfall von -890 Hz lässt erahnen, dass bei der ersten Messung Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche adhärirt haben. Der Blick durch das Lichtmikroskop bestätigt den Kurvenverlauf des Frequenzabfalles. Der Quarz ist gleichmäßig dicht und flächig mit Thrombozyten belegt.

Zusammenfassung: Die Thrombozytenadhäsion mit der PS-10 mg/ml-Beschichtung funktioniert, wie Bild und Kurve zeigen zufriedenstellend.

Bei der Herstellung der Beschichtung fiel auf, dass beim Spinnvorgang Polystyrol von der Oberseite auf die Unterseite des Quarzes gelangt war, so dass die Kontakte teils mitbeschichtet wurden. Dies führte zu anfänglichen Kontaktschwierigkeiten, die den Abbruch der Messung nach sich zogen. Behoben wurde das Problem dadurch, dass der unbeschichtete Quarz von unten mit selbstklebender Folie beklebt und nach dem Beschichtungsvorgang wieder entfernt wurde. Folglich blieben die Kontakte unbeschichtet und die elektrische Leitfähigkeit war gewährleistet.

Aufgrund des Zeitaufwandes durch die zusätzlichen Arbeitsschritte wurde die Unterseite alternativ mit einem, in Isopropanol getauchten, Wattestab gereinigt. Es ergab sich derselbe Erfolg wie beim Abkleben mit Folie. Im weiteren Verlauf der Messungen wurden die fertigen PS-Quarze immer nach dem Spinnvorgang mit Isopropanol auf der Unterseite gereinigt. Folglich kam es nicht mehr zu Kontaktschwierigkeiten.

3.1.1.2 Negativkontrolle unter Zugabe von Abciximab

Wie vermutet konnte mit der vorangegangenen Messung gezeigt werden, dass die Polystyrolbeschichtung die Eigenschaft hat Thrombozyten zu binden. Um dies genauer zu verifizieren, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt.

Hierbei werden durch monoklonale Antikörper die auf der Thrombozytenmembran befindlichen Rezeptoren, die für die Thrombozyten-Aggregation aber auch für die Thrombozyten-Adhäsion verantwortlich sind, selektiv besetzt und so geblockt. Sind Thrombozyten wirklich für den oben beschriebenen Frequenzabfall verantwortlich darf die Negativprobe keinen oder nur einen geringen Frequenzabfall hervorrufen. Im Idealfall sollte der Quarz im Blick durchs Mikroskop unbelegt sein.

Tabelle 3-2: Messprotokoll 3.1.1.2

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.1.2	PS 2	10 mg/ml	Pipette 15 s	-320 Hz	---	+270 Hz

Der Ablauf einer Negativkontrolle ist im Folgenden beschrieben.

- Quarz in die Anlage einbauen
- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeinstellung: Flow 0,4 ml/min für 1 Min.)
- Pumpeneinstellung auf Flow 0,8 ml/min ändern (damit die PRP-Probe nach der Aktivierung schnell genug die Messkammer erreicht, bevor die Gerinnung bereits im Schlauchsystem abläuft)
- 500 μl des PRP mit 10 μl Abciximab vermischen
- Zugabe von 20 μl ADP (Aktivator) zu 180 μl der PRP-Abciximab-Mischung und rühren (Pipette 15 s) in einem Eppendorf-Cup
- Kurzer Stop der Pumpe zum Umstecken des Schlauches in die Blutprobe
- Probe (PRP+Aktivator) ansaugen (Pumpeinstellung: Flow 0,8 ml/min für 10 s)
- Stop Flow (stehende Pumpen) für 30 Min.

Messung: 3.1.1.2

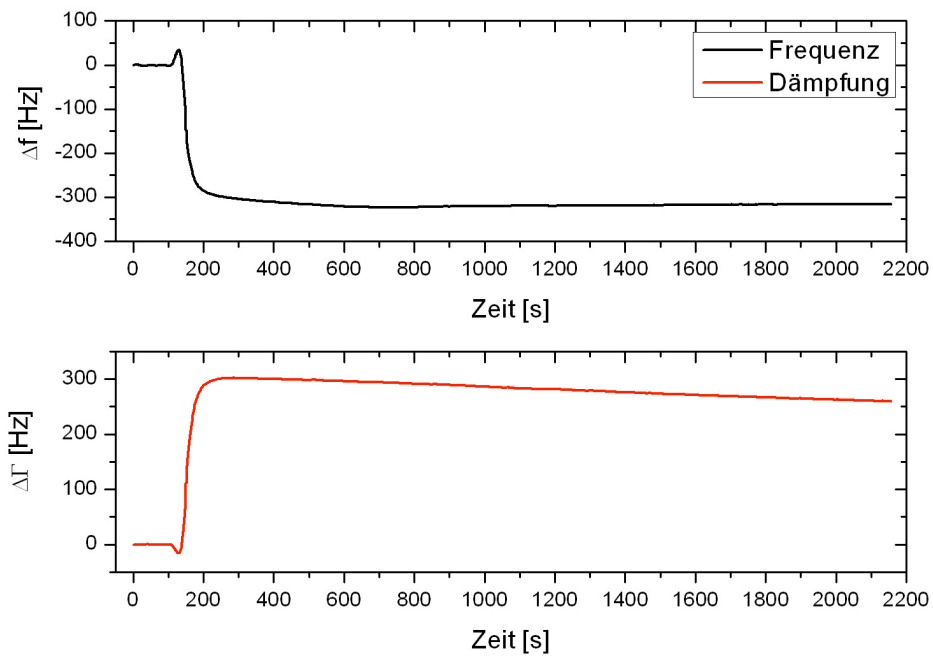


Abbildung 3-3: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.2, Quarz PS 2



Abbildung 3-4: QCM nach Messung 3.1.1.2, Quarz PS 2, Vergrößerung 50x

Das Bild durch ein Lichtmikroskop bei 50-facher Vergrößerung zeigt eine unbelegte Quarzoberfläche und auch die Messkurve zeigt keinen signifikanten Abfall und damit kein Zeichen für eine Thrombozyten-Anbindung. Der gesamte Frequenzabfall von -320 Hz kann auf die Viskositätsänderung der benetzenden Flüssigkeiten und auf unspezifische Proteinanbindung auf dem Quarz zurückgeführt werden.

3.1.1.3 Polystyrol-Schicht-Konzentration 2 mg/ml

Da die Vermutung aufkam, dass zu dicke Schichten dazu führen könnten, dass unabhängig davon, ob Thrombozyten auf der Quarzoberfläche binden oder nicht, kein Unterschied in den Messergebnissen detektiert werden kann, wurde versucht mit geringeren Polystyrol Konzentrationen zu arbeiten.

Es sollte verhindert werden, dass durch eine zu dick aufgebraachte PS-Schicht, Massenlagerungen, die an der Schichtoberfläche von statten gingen möglicherweise abgeschwächt oder gar nicht detektiert werden können.

Die nachfolgenden Schichten wurden aus diesem Grund mit einer Konzentration von 2 mg/ml präpariert.

Tabelle 3-3: Messprotokoll 3.1.1.3

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.1.3	PS 3	2 mg/ml	Pipette 15 s	-640 Hz	-430 Hz	+1780 Hz

Messung: 3.1.1.3

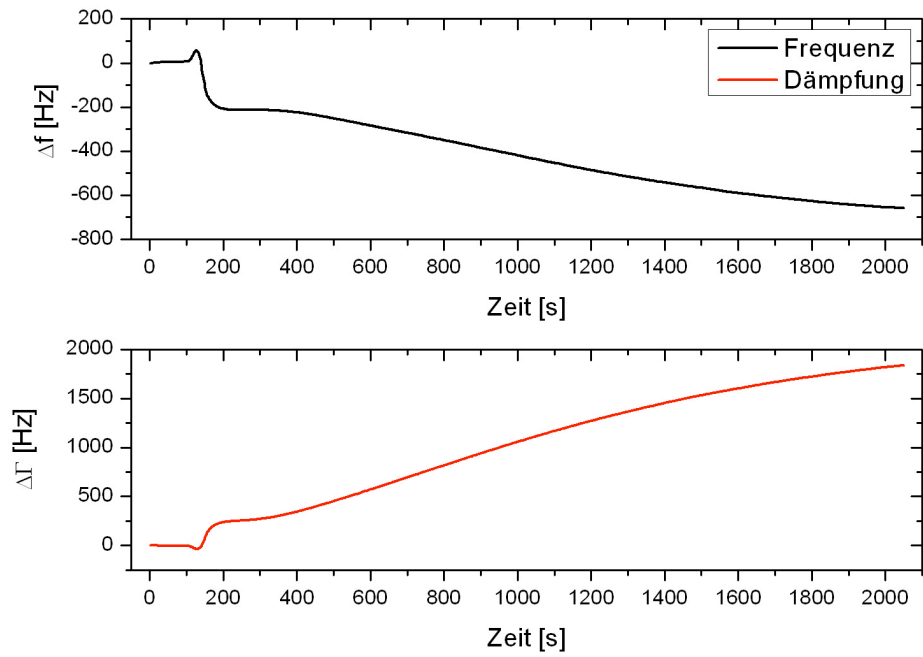


Abbildung 3-5: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.3, Quarz PS 3

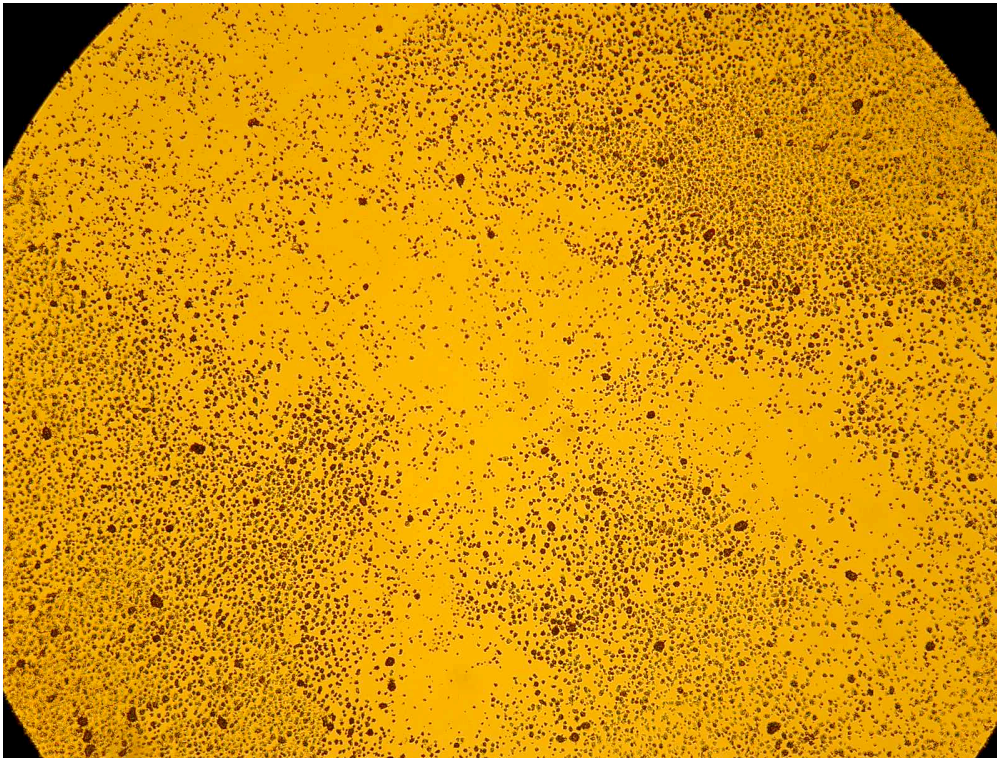


Abbildung 3-6: QCM nach Messung 3.1.1.3, Quarz PS 3, Vergrößerung 50x

Auf dem Quarz sind die Thrombozyten reichlich jedoch recht unregelmäßig und nicht flächendeckend gebunden. Es zeigt sich am Rand des Schwingquarzes eine höhere Dichte der angebondenen Thrombozyten als in der Mitte. Dies ist lichtmikroskopisch als Ringstruktur zu erkennen.

Es wird vermutet, dass keine homogene Polystyrolschicht die Quarzoberfläche belegt, wodurch es zur Beschriebenen Ringbildung kommt. Durch das Aufbringen der Polystyrolschicht im Spin Coater ergibt sich, zwar durch die Zentripedalkräfte bedingt, eine plane Schicht auf der Quarzmitte, jedoch fließt die Polystyrollösung nicht ungestört nach außen ab, sondern staut sich an der Schwingquarzkante auf. Folglich kommt nach dem Verdunsten des Lösungsmittels mehr Polystyrol am äußeren Teil des Quarzes zum liegen als in der Mitte. Das Resultat sind Schichten, die in der Mitte des Quarzes eine sehr geringe und am Rand eine sehr hohe Konzentration von Polystyrol aufweisen. Da jedoch der Quarz seine sensitivste Stelle in der Mitte hat, musste dem Abhilfe geleistet werden.

Um diesem Effekt vorzubeugen wurde davon abgesehen mit Konzentrationen von 10 mg/ml weiterzumessen, da hier mehr PS in der Lösung gelöst war und so vermutlich auch mehr nach Außen fließen konnte. Ziel war es eine homogene, plane Schicht über die ganze Quarzoberfläche bis hin zum Rand zu erzeugen.

Für die nachfolgenden Messungen wurden ausschließlich PS-Lösungen mit der Konzentration von 2 mg/ml verwendet

3.1.2 Vergleich verschiedener Umdrehungsgeschwindigkeiten

Die Idee war nun die passende Umdrehungsgeschwindigkeit des Spin Coater zu finden, um den Randwall hoher PS-Konzentration, so gering wie möglich zu gestalten um so eine homogene Adhäsion der Thrombozyten erreichen zu können.

3.1.2.1 Umdrehungsgeschwindigkeit bei Spin Coating: U=2000 1/min

Tabelle 3-4: Messprotokoll 3.1.2.1

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.2.1	PS 4	2 mg/ml	Pipette 15 s	-900 Hz	-680 Hz	+3170 Hz

Ergebnisse

3.1.2.2 Umdrehungsgeschwindigkeit bei Spin Coating: $U=2500$ 1/min

Tabelle 3-5: Messprotokoll 3.1.2.2

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.2.2	PS 5	2 mg/ml	Pipette 15 s	-790 Hz	-570 Hz	+2230 Hz

3.1.2.3 Umdrehungsgeschwindigkeit bei Spin Coating: $U=3000$ 1/min

Tabelle 3-6: Messprotokoll 3.1.2.3

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.2.3	PS 6	2 mg/ml	Pipette 15 s	-1070 Hz	-770 Hz	+3570 Hz

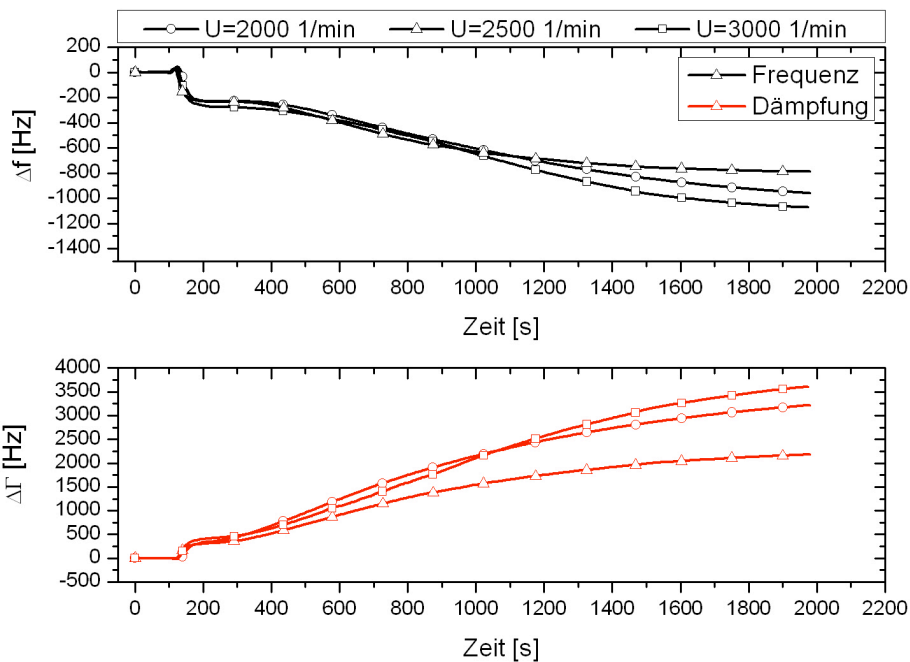


Abbildung 3-7: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.2

Die Messungen 3.1.2 machen deutlich, dass durch eine Beschichtung des Quarzes mit niedriger PS-Konzentration (PS 2 mg/ml) und eine hohe Umlaufgeschwindigkeit ($U=3000$ 1/min) sehr homogene Schichten hergestellt werden können und so auch eine homogene, flächendeckende Adhäsion von Thrombozyten auf dem Schwingquarz erreicht werden kann. Die Frequenzabfälle sind markant und zeigen einen konstanten Verlauf. Bei den vorangegangenen Messungen wurde das

Ergebnisse

Augenmerk nicht auf den größten absoluten Frequenzabfall sondern auf die homogenste Thrombozyten-Dichte des Quarzes gelegt. Dies wurde lichtmikroskopisch verglichen.

Um die nachfolgenden Messvoraussetzungen so konstant wie möglich zu halten werden alle nachfolgenden Messungen bei denen eine PS Beschichtung präpariert wird: mit einer Polystyrol Konzentration von 2 mg/ml und einer Umlaufgeschwindigkeit von 3000 1/min hergestellt.

3.1.2.4 Bestätigung der optimalen Polystyrol Konzentrationen und Umdrehungsgeschwindigkeiten

In den nächsten 4 Experimenten bei denen die Polystyrol Konzentrationen und die Umdrehungsgeschwindigkeiten verglichen werden, sollte die obige Theorie, dass die besten Ergebnisse mit einer geringen PS Konzentration und hoher Umlaufgeschwindigkeit erreicht werden, bestätigt werden.

Umdrehungsgeschwindigkeit beim Beschichten: 2000 1/min

Tabelle 3-7: Messprotokoll 3.1.2.4-1

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.2.4a	PS 7	2 mg/ml	Pipette 15 s	-1100 Hz	-810 Hz	+3020 Hz
3.1.2.4b	PS 8	10 mg/ml	Pipette 15 s	-1300 Hz	-1080 Hz	+3290 Hz

Umdrehungsgeschwindigkeit beim Beschichten: 3000 1/min

Tabelle 3-8: Messprotokoll 3.1.2.4-2

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.2.4c	PS 9	10mg/ml	Pipette 15 s	-1250 Hz	-960 Hz	+3240 Hz
3.1.2.4d	PS 10	2mg/ml	Pipette 15 s	-1470 Hz	-1170 Hz	+3490 Hz

Ergebnisse

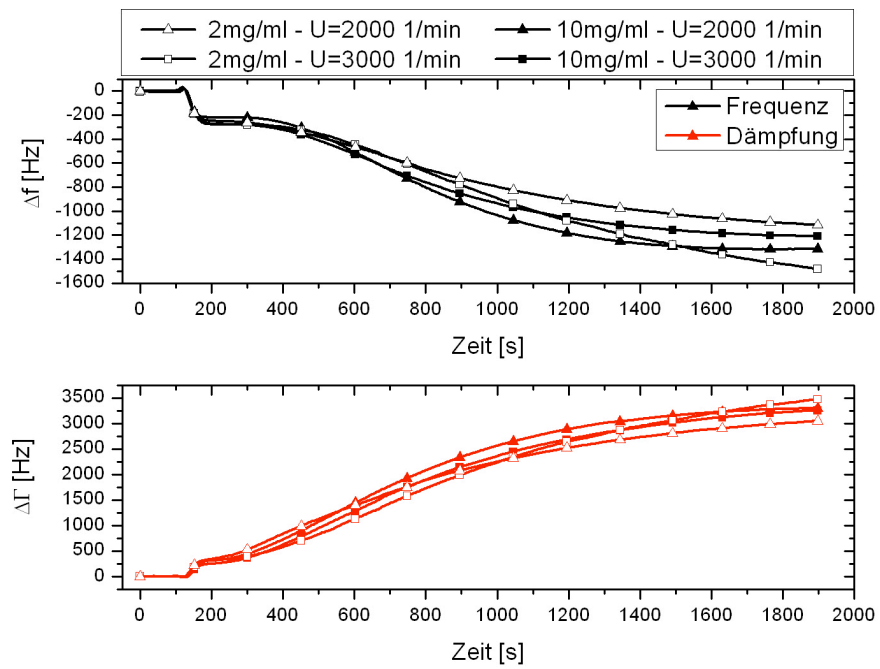


Abbildung 3-8: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.2.4

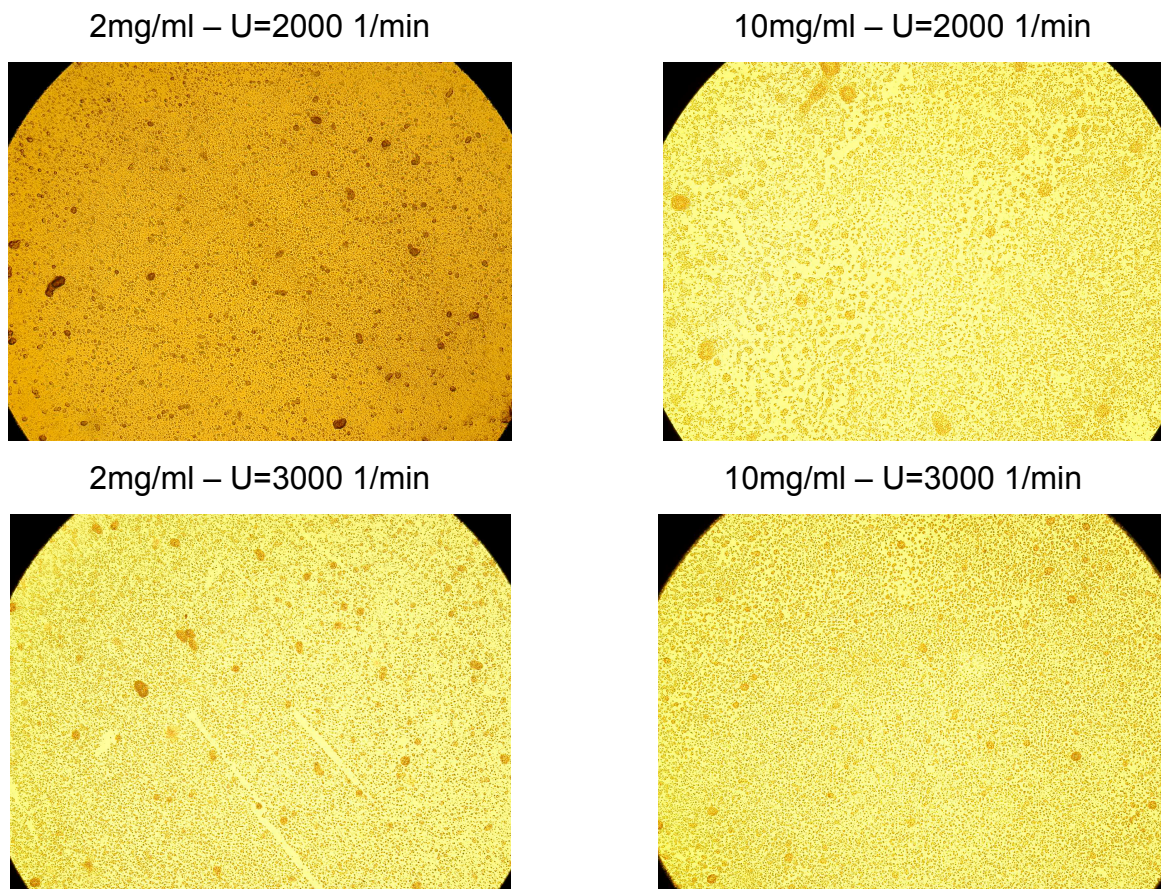


Abbildung 3-9: Lichtmikroskopischer Vergleich der Messungen 3.1.2.4, Vergrößerung 50-fach

Zusammenfassung:

Bei diesen Messungen zur Bestätigung der optimalen Polystyrol Konzentrationen und Umdrehungsgeschwindigkeiten konnte zum Einen gezeigt werden, dass die verschiedenen Kurvenverläufe der einzelnen Messungen bis zu einem Zeitpunkt von ca. 600 s nahezu deckungsgleich verlaufen. Erst nach diesem Zeitpunkt fangen die Frequenzabfälle an zu streuen und weisen nach weiteren ca. 1300 s einen absoluten Unterschied von ca. 400 Hz auf. Die Messungen 3.1.2.4a-c weisen einen nahezu deckungsgleichen Verlauf auf und unterscheiden sich deutlich von der letzten Messung 3.1.2.4d. Die Kurve dieser Frequenzänderung verläuft im Vergleich zu den 3 vorangegangenen deutlich steiler, was darauf zurück zu führen ist, dass sich in gleicher Zeit mehr Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche adhäreren, als bei den Anderen. Dies spricht dafür, dass die Quarzbeschichtung mit einer Polystyrol Konzentration von 2 mg/ml und einer Umlaufgeschwindigkeit von $U=3000$ 1/min die thrombophilsten Eigenschaften besitzt.

Zum Anderen zeigt der lichtmikroskopische Vergleich der einzelnen Messungen in Abbildung 3-9, dass im Vergleich zu einer Umlaufgeschwindigkeit von $U=2000$ 1/min die Quarzoberfläche bei einer Umlaufgeschwindigkeit von $U=3000$ 1/min dichter und homogener belegt erscheint.

Um die nachfolgenden Messvoraussetzungen so konstant wie möglich zu halten werden alle nachfolgenden Messungen bei denen eine PS Beschichtung präpariert wird: mit einer Polystyrol Konzentration von 2 mg/ml und einer Umlaufgeschwindigkeit von 3000 1/min hergestellt.

3.1.3 Vergleich verschiedener Thrombozyten-Zahlen und deren Verhältnis zum Frequenzabfall

Die Viskositätsänderung bei Einstrom von aktiviertem PRP in die Messkammer ergibt im Vergleich zu bestehender Viskosität des Tris-NaCl-Puffers einen messbaren Frequenzabfall. Dieser initiale Frequenzabfall ($\Delta f_{\text{initial}}$) wird in den Kurven ab dem Zeitpunkt Stop+Mix sichtbar und endet in einer kleinen Plateauphase. Der erneut stattfindende, jedoch nun stärker ausfallende Frequenzabfall wird in dieser Arbeit als

Δf_{TZ} bezeichnet und detektiert die eigentliche Adhäsion der Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche. Als Δf_{gesamt} wird die Summe aus initialem Frequenzabfall ($\Delta f_{\text{initial}}$) und Δf_{TZ} bezeichnet. Die Dämpfung $\Delta \Gamma$ wird aufgrund anderer Messungen, die an der Anlage durchgeführt werden mit aufgezeichnet, aber bisher nicht ausgewertet. $\Delta \Gamma$ wird hier immer parallel zur Frequenzänderung dargestellt und kann in späteren Arbeiten Verwendung finden.

Anhand folgender Messungen sollte untersucht werden, ob der initiale Frequenzabfall mit der im Plasma enthaltenen Thrombozytenkonzentration korreliert. Bei einem Erfolg könnte im späteren Einsatz vom detektierten initialen Frequenzabfall auf die vorliegende Thrombozytenkonzentration geschlossen werden. Hierzu wird nach bekanntem Protokoll (siehe Kapitel: 2.2.2) Vollblut zu PRP aufbereitet und in einem weiteren Schritt, drei verschiedenen PRP-Verdünnungen hergestellt. Die Anzahl der Thrombozyten im PRP wird mittels Verdünnung durch PPP auf 100, 200 und 300 Tausend Thrombozyten pro μl eingestellt. Den Verdünnungen wird jeweils 10 μl Abciximab zugegeben um eine Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Es wurde nicht wie bei den vorangegangenen Messungen mit ADP aktiviert. Die Aktivierung der Thrombozyten soll verhindert werden, da es nicht zu einer Adhäsion von aktivierten Thrombozyten kommen soll. Es soll nicht wie bei den vorangegangenen Messungen gemessen werden, ob die Thrombozyten auf dem Schwingquarz adhären, sondern ausschließlich welcher Einfluss die Thrombozyten Zahl durch die Viskositätsänderung auf den Frequenzabfall hat.

Wie den Messprotokollen 3.1.3.1–3.1.3.3 zu entnehmen ist, wurden die unterschiedlichen Messungen derselben Thrombozytenzahlgruppe auf jeweils einem Quarz durchgeführt. Nach jeder Messung wurde der Quarz nicht ausgebaut, sondern in der Anlage belassen und mit Tris-NaCl gespült. Da die Thrombozyten nicht aktiviert waren, sollten sie sich auch nicht auf dem Schwingquarz adhären und sollten folglich durch Tris-NaCl-Puffer abspülbar sein. Im Idealfall sollte keinerlei Anbindung der Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche stattfinden. Die Arbeitsschritte der Regeneration und Reinigung von Schwingquarzen wurden von Schmidt [26] durchgeführt.

Schaut man sich nun die Messprotokolle der Messungen von 100.000 TZ/ μl , 200.000 TZ/ μl und 300.000 TZ/ μl im Vergleich an, stellt man fest, dass jeweils die erste Messung den höchsten initialen Frequenzabfall hat. Die folgenden $\Delta f_{\text{initial}}$ fallen alle

Ergebnisse

kleiner aus als der erste. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass der Quarz bei der ersten Messung noch mit einer „neuen“ Polystyrolbeschichtung versehen ist und es dadurch zu einer stärkeren unspezifischen Proteinanbindung kommt als bei den Nachfolgenden. Es ist also denkbar, dass sich die Quarzoberfläche im Laufe der verschiedenen Messungen trotz der Reinigungsschritte verändert und keine gleichbleibenden Parameter mehr vorhanden sind. Die Schwingquarzoberfläche wird in einer Weise verändert, dass auch das Viskositätsverhalten auf dem Quarz verändert wird und so die einzelnen Messungen nicht vergleichbar bleiben. Bei weiteren Messungen muss darauf geachtet werden, dass jede der einzelnen Vergleichsmessungen der jeweiligen Thrombozytenzahlgruppe auf einem „neu“ beschichteten Quarz durchgeführt wird.

3.1.3.1 Thrombozytenzahl: 100.000 TZ/ μ l

Tabelle 3-9: Messprotokoll 3.1.3.1

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	$\Delta f_{\text{initial}}$	$\Delta \Gamma$
3.1.3.1a	PS 11	2 mg/ml	Pipette 15 s	-320 Hz	+320 Hz
3.1.3.1b	PS 11	2 mg/ml	Pipette 15 s	-260 Hz	+310 Hz
3.1.3.1c	PS 11	2 mg/ml	Pipette 15 s	-230 Hz	+270 Hz
3.1.3.1d	PS 11	2 mg/ml	Pipette 15 s	-230 Hz	+320 Hz

3.1.3.2 Thrombozytenzahl: 200.000 TZ/ μ l

Tabelle 3-10: Messprotokoll 3.1.3.2

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	$\Delta f_{\text{initial}}$	$\Delta \Gamma$
3.1.3.2a	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-330 Hz	+300 Hz
3.1.3.2b	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-200 Hz	+310 Hz
3.1.3.2c	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-200 Hz	+310 Hz
3.1.3.2d	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-210 Hz	+310 Hz

Die Messungen 3.1.3.3 mit einer Thrombozyten Zahl von 300.000 TZ/ μ l sollten mit einem eigenen „neuen“ Quarz (PS 13) durchgeführt werden. Da dieser jedoch beim Einbau in die Messanlage kein Messsignal zeigte, wurde mit dem vorhandenen Quarz PS 12 der vorangegangenen Messung 3.1.3.2 weiter gemessen. In der

Abbildung 3-10 sieht man deutlich, dass dieser Quarz schon die oben erwähnte unspezifische Proteinanbindung erfahren hat, da die Messung 3.1.3.3a im Vergleich zu den Messungen 3.1.3.1a und 3.1.3.2a kleiner ausfällt und am ehesten mit den Messungen 3.1.3.2b, 3.1.3.2c und 3.1.3.2d verglichen werden kann. Es zeichnet sich eine Tendenz ab, dass der initiale Frequenzabfall ($\Delta f_{\text{initial}}$) stetig abnimmt, je mehr Messungen durchgeführt werden und folglich auch mehr Protein unspezifisch auf dem Quarz gebunden ist.

3.1.3.3 Thrombozytenzahl: 300.000 TZ/ μl

Tabelle 3-11: Messprotokoll 3.1.3.3

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	$\Delta f_{\text{initial}}$	$\Delta \Gamma$
3.1.3.3a	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-200 Hz	+320 Hz
3.1.3.3b	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-200 Hz	+330 Hz
3.1.3.3c	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-180 Hz	+320 Hz
3.1.3.3d	PS 12	2 mg/ml	Pipette 15 s	-180 Hz	+330 Hz

Zur Genauigkeit der Messungen:

Die initialen Frequenzabfälle ($\Delta f_{\text{initial}}$) die in Abbildung 3-10 gezeigt werden, wurden aus den Messprotokollen der einzelnen Messungen herausgelesen und zwischen den Punkten Stop+Mix und Stop+Mix+300 s (fünf Minuten nach Stop+Mix) ermittelt. Die Frequenz vor der eigentlichen Messung schwankt auch nach längerem „Einschwingen“ des Quarzes bis zu + - 5 Hz, so dass sich der absolute Fehler beim Vergleich zweier Messwerte auf bis zu 10 Hz addiert. Diese Frequenzschwankungen kommen dadurch zustande, dass die verwendete Schlauchpumpe, die die Reagenzien auf den Quarz zieht mit einer relativ hohen Förderrate von 0,8 ml/min arbeitet und so eine peristaltische Förderung entsteht. Die Flüssigkeitssäule im Schlauch überträgt die Peristaltik auf den Quarz und wird als Frequenzänderung detektiert.

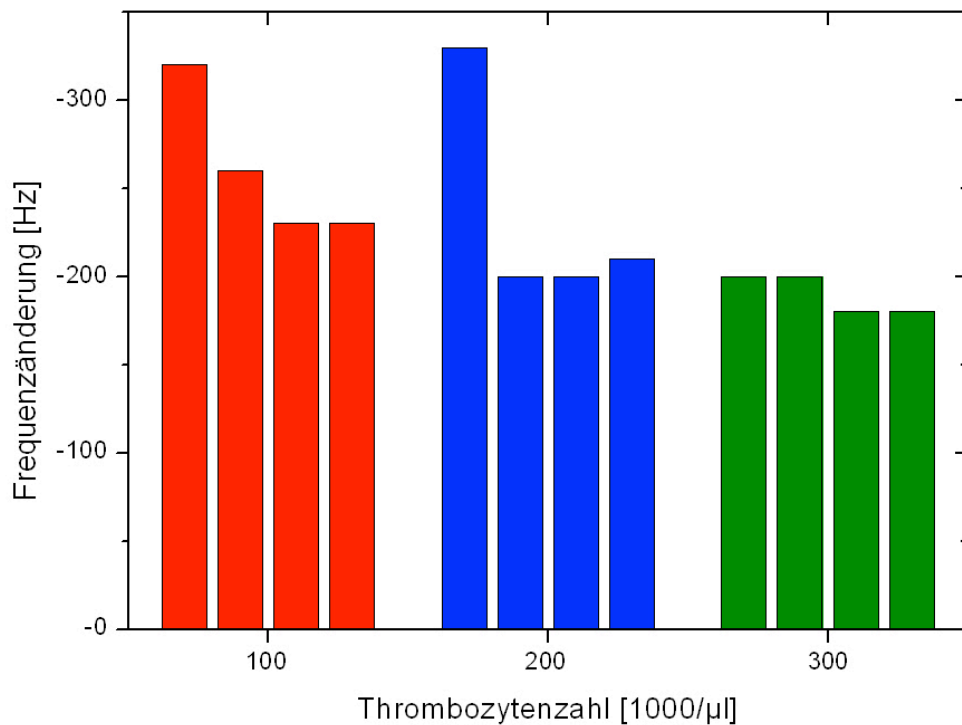


Abbildung 3-10: $\Delta f_{\text{initial}}$ bei verschiedenen Thrombozyten-Konzentrationen

Zusammenfassung:

Die Werte der initialen Frequenzänderung ($\Delta f_{\text{initial}}$) bei Messungen mit 100.000, 200.000 und 300.000 Thrombozyten pro μl streuen sehr stark und lassen daher keine exakte Definition der Werte zu. Jedoch bei genauerer Betrachtung und mit dem Wissen, dass die Messung 3.1.3.3a nicht mit einem „neuen“ Quarz sondern mit dem bereits „gebrauchten“ Quarz PS 12 der Messungen 3.1.3.2 durchgeführt wurde, lässt sich doch eine Tendenz erahnen.

Die erste der jeweils 4 Messungen hat den stärksten Frequenzabfall und deutet darauf hin, dass etwas auf der Schwingquarzoberfläche adhäriert. Bei den 3 folgenden Messungen nimmt der initiale Frequenzabfall, sowie vermutlich auch die unspezifische Proteinanlagerung stetig ab. Dies kommt bei diesen Messungen noch nicht sehr deutlich zum Ausdruck und muss daher in späteren Arbeiten bestätigt werden.

Bei weiteren Messungen sollte stets darauf geachtet werden, dass jede Messung mit einem „neuen“ Quarz durchgeführt wird. Damit soll verhindert werden, dass es Unterschiede in unspezifisch gebundenen Proteinen gibt

Anhand der Dämpfung lässt sich kein großer Unterschied der einzelnen Messungen detektieren. Die Dämpfung bleibt, bis auf die oben beschriebene Frequenzänderung durch die Schlauchpumpe, bei ca. 310 Hz konstant. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde davon abgesehen die Daten der Dämpfung mit in der Abbildung 3-10 darzustellen.

Obwohl bei diesen Messungen keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten, lässt sich eine Tendenz erkennen, die darauf hinweist, über die Thrombozyten Zahl eine entsprechende Frequenzänderung feststellen zu können.

Da momentan noch zu viele Ungenauigkeiten in den einzelnen Parametern existieren ist es abschließend schwer eine Prognose abzugeben.

3.1.4 Optimierung des Mischvorganges der Reagenzien

Bei den bisherigen Messungen wurden die Reagenzien, also PRP und Aktivator, mit der Pipette gemischt, was folgendermaßen vor sich ging.

Vor jeder Messung wurden 180 µl PRP mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß gegeben. Beim eigentlichen Mischvorgang wurden dann 20 µl ADP mittels einer Pipette hinzugegeben und mit dieser Pipette das ganze Gemisch angesaugt und wieder ausgespritzt. Nach dieser „manuellen“ Durchmischung wurde der Zufluss zur Anlage in die Flüssigkeit gehängt und innerhalb 10 s über den Quarz geführt. Nach diesen 10 s wurden die Pumpe abgestellt und das PRP-ADP-Gemisch für 30 Min. auf dem Quarz belassen.

Im Messprotokoll wurde dies folgendermaßen beschrieben.

- TrisNaCl-Puffer 2 Min: Flow 0,4 ml/min
- Stop+Mix (PRP+ADP) 10 s
- Vermischung der Reagenzien mit Pipette
- Flow 10 s Befüllen der Messkammer
- Stop Flow 30 Min.

Da die manuelle Durchmischung sehr inhomogen war und dies im späteren automatisierten Routineeinsatz schwer zu realisieren ist, war die Aufgabe eine Alternative zu finden.

Es bot sich ein laborüblicher silikonierter Rührfisch an, der mittels eines Magnetrührers bewegt wurde. Die Umlaufgeschwindigkeit wurde auf $U=1000$ 1/min konstant gehalten, die beheizbare Platte auf 37°C vorgeheizt.

Der weitere Ablauf war wie folgt.

Auch nach der Optimierung des Mischvorganges wurde zuerst das System befüllt und dann vor jeder Messung 180 µl PRP mit einer Pipette in ein Eppendorfgesäß gegeben. Nun wurde als nächster Schritt der Rührfisch dazugegeben und auf den Magnetrührer gestellt. Beim eigentlichen Mischvorgang wurde dann der Magnetrührer in Betrieb genommen und die 20 µl ADP mittels einer Pipette dazugespritzt. Auch hier wurde für 10 s die Anlage gestopt und die Reagenzien gemischt. Dann wurde die Flüssigkeit 10 s lange eingezogen und die Pumpen abgeschaltet. Die Messung wurde nach 30 Min. abgebrochen.

Im Messprotokoll wurde dies folgendermaßen beschrieben.

- TrisNaCl-Puffer 2 Min: Flow 0,4 ml/min
- Stop+Mix (PRP+ADP) 10 s
- Vermischung der Reagenzien mit Rührfisch (U=1000 1/min)
- Flow 10 s Befüllen der Messkammer
- Stop Flow 30 Min.

Der Mischvorgang von PRP und Aktivator konnte unter Verwendung des Rührfisches sauberer, einfacher und reproduzierbarer durchgeführt werden als mit der Pipette und stellt dadurch auch im Hinblick auf eine spätere Automatisierung der Anlage einen großen Vorteil dar.

Da nun das PRP mit dem Aktivator, besser durch den Rührfisch als mit der Pipette vermischt werden kann werden alle folgenden Mischungen von PRP und Aktivator mit einem Rührfisch durchgeführt. Um die Mischung mit dem Rührfisch weiter zu optimieren, wurde im Weiteren mit unterschiedlichen Rührdauern experimentiert.

3.1.4.1 Rührdauer: 10 s

Tabelle 3-12: Messprotokoll 3.1.4.1

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.4.1	PS 14	2 mg/ml	Rührer 10 s	-530 Hz	-100 Hz	+1050 Hz

Messung: 3.1.4.1

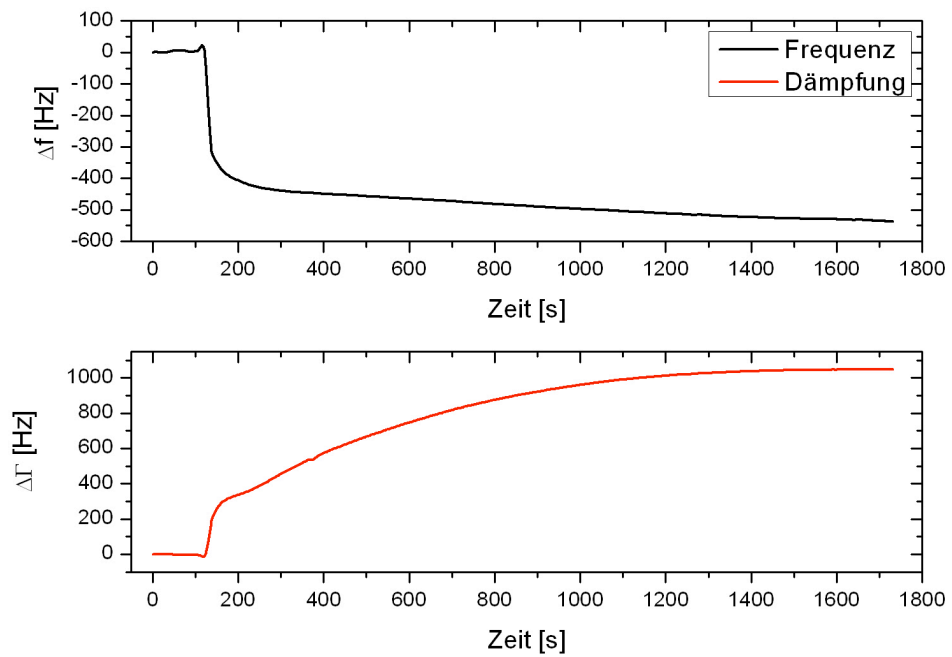


Abbildung 3-11: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.4.1, Quarz PS 14

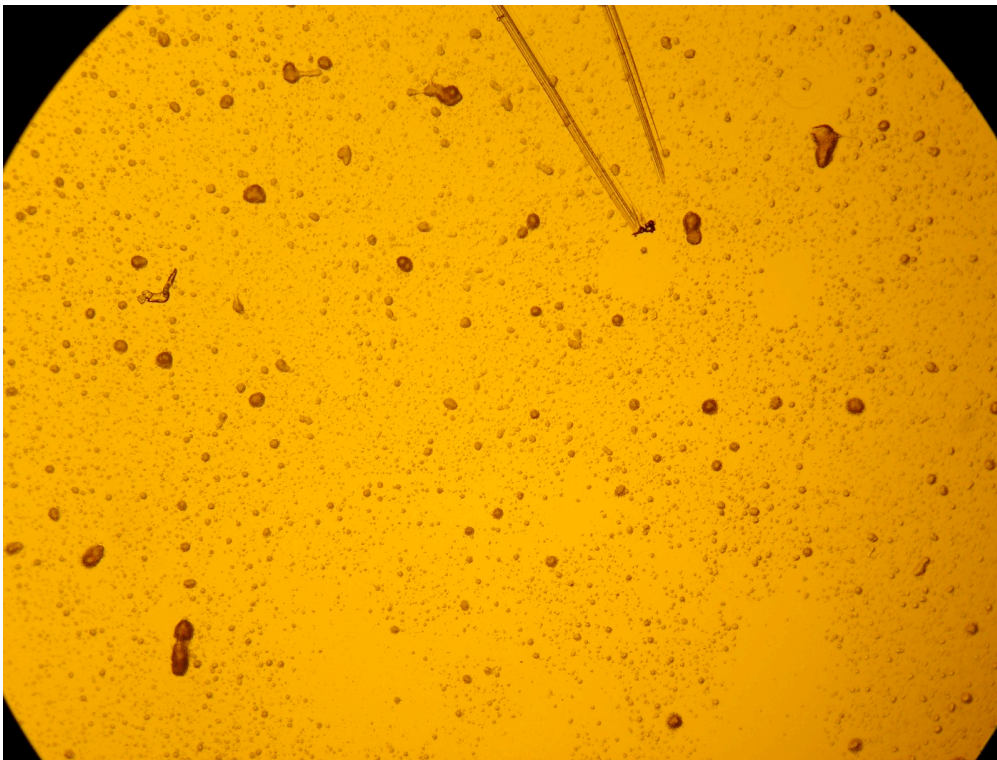


Abbildung 3-12: QCM nach Messung 3.1.4.1, Quarz PS 14, Vergrößerung 100x

Ergebnisse

Da die Thrombozyten bereits beim Einstrom aggregiert sind, ist nur ein geringer Frequenzabfall messbar. Mikroskopisch sind in Abbildung 3-12 sowohl Thrombozyten-Aggregate als auch einzelne Thrombozyten zu erkennen.

Durch den sich in der Flüssigkeit drehenden Rührfisch werden die Thrombozyten höheren Scherkräften ausgesetzt, als beim Mischen mit der Pipette und erhalten so einen höheren Anreiz sich zu aktivieren. Deshalb wurde in der folgenden Messung die Mischzeit auf 5 s halbiert.

3.1.4.2 Rührdauer: 5 s

Tabelle 3-13: Messprotokoll 3.1.4.2

Messung	Quarz	Konz.	Mischung	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.4.2	PS 15	2 mg/ml	Rührer 5 s	-1040 Hz	-620 Hz	+1330 Hz

Messung: 3.1.4.2

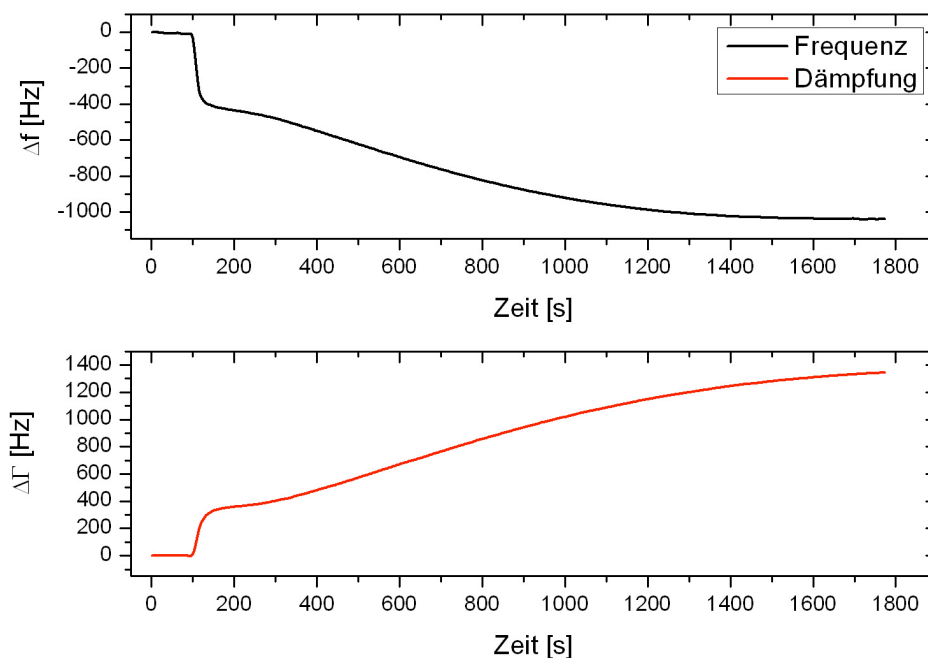


Abbildung 3-13: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.4.2, Quarz PS 15

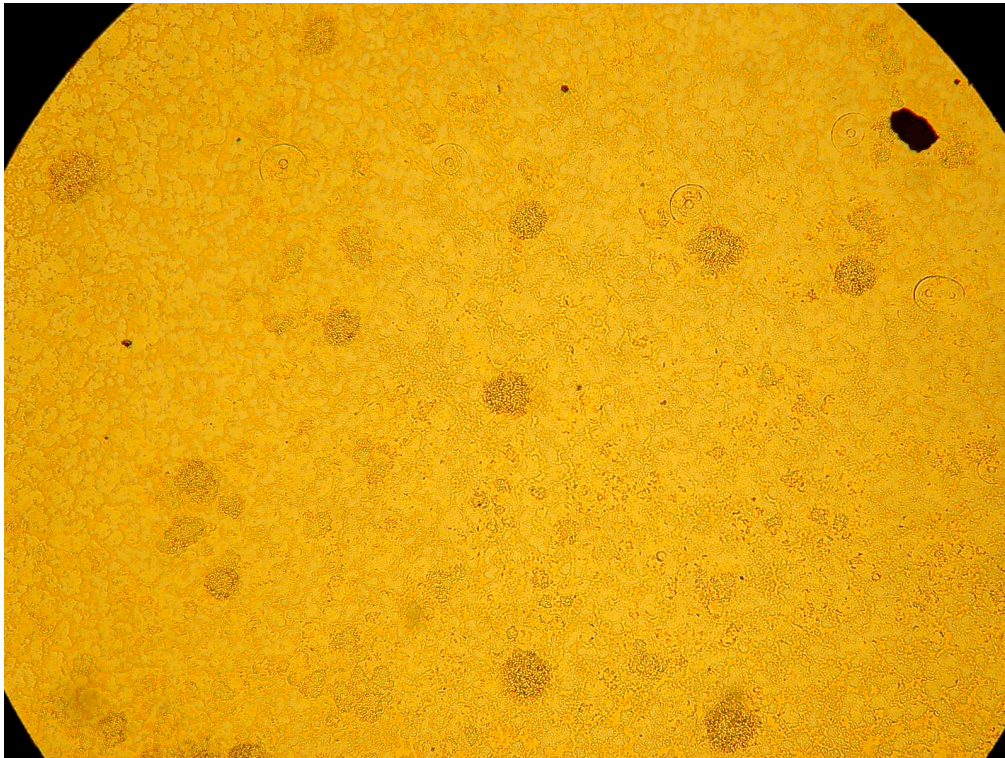


Abbildung 3-14: QCM nach Messung 3.1.4.2, Quarz PS 15, Vergrößerung 100x

Trotz der Verkürzung des Mischintervalles reichte die Zeit aus um suffizient zu mischen und die Reagenzien in die Messkammer zu saugen. Die Zeit war kurz genug, um vor einer Aggregation die Reagenzien auf den Schwingquarz zu ziehen. In Abbildung 3-14 ist deutlich zu erkennen, dass es hier beim Aktivieren und Einsaugen der Reagenzien nicht zur Aggregation kam. Die Thrombozyten belegen die Schwingquarzoberfläche gleichmäßig dicht. Um im späteren Routinebetrieb die Mischzeiten so kurz als irgend möglich zu halten, wurde bei allen weiteren Messungen das Mischen der Reagenzien mit dem Magnetrührer durchgeführt und die Mischzeit bei 5 s konstant gehalten.

3.1.5 Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf unterschiedliche Arten von Blutproben und deren Vergleich

In diesem Teil der Arbeit wurden Blutproben von gesunden Probanden (PRP) mit denen von Patienten, die regelmäßig Acetylsalicylsäure (ASS) einnahmen verglichen. Beide Proben wurden jeweils mit ADP oder Arachidonsäure aktiviert. Verlässt man sich auf den theoretischen Hintergrund, darf die acetylsalicylsäurehaltige Blutprobe nicht durch Arachidonsäure aktivierbar sein.

Ergebnisse

Durch die Einnahme von acetylsalicylsäurehaltigen Produkten, wird die Cyclooxygenase, ein Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Arachidonsäure irreversibel gehemmt.

Ist die Cyclooxygenase gehemmt, ist zu erwarten, dass auch die Thrombozyten-Aggregation geblockt ist und es so zu keinem Frequenzabfall durch Thrombozyten Anlagerung kommen kann. Die Thrombozyten Adhäsion hingegen sollte nicht beeinflusst werden.

Mit ADP sollten die Thrombozyten der acetylsalicylsäurehaltigen Blutprobe jedoch uneingeschränkt aktivierbar sein.

3.1.5.1 Aktivierung mit ADP

Tabelle 3-14: Messprotokoll 3.1.5.1

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.5.1a	PS 16	ADP	PRP	-1320 Hz	-1090 Hz	+3250 Hz
3.1.5.1b	PS 17	ADP	PRP/ASS	-1950 Hz	-1700 Hz	+4440 Hz

3.1.5.2 Aktivierung mit Arachidonsäure

Tabelle 3-15: Messprotokoll 3.1.5.2

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.1.5.2a	PS 18	ARA	PRP	-1340 Hz	-1140 Hz	+3600 Hz
3.1.5.2b	PS 19	ARA	PRP/ASS	-710 Hz	-490 Hz	+750 Hz

Ergebnisse

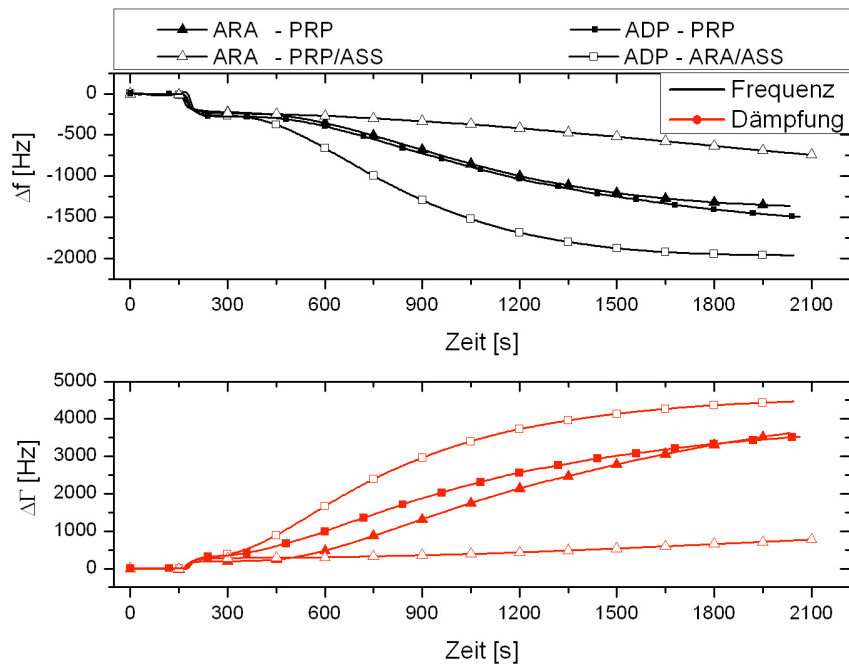


Abbildung 3-15: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.5 [18]

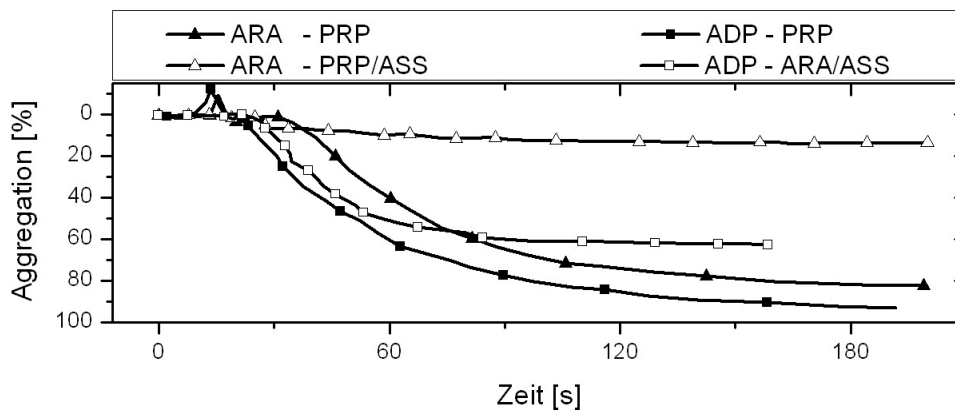


Abbildung 3-16: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen [18]

Bei einer Aktivierung der verschiedenen Blutproben durch ADP spielt es wie zu erwarten war keine Rolle, ob Acetylsalicylsäure in der Blutprobe enthalten ist oder nicht.

Beide mikroskopische Bilder (3.1.5.1a und 3.1.5.1b) zeigen eine deutliche Belegung des Quarzes mit Thrombozyten. Auch die Kurven der Frequenzänderung von 3.1.5.1a und 3.1.5.1b zeigen das typische Bild einer regelrechten Adhäsion und können annäherungsweise zur Deckung gebracht werden.

Die in Abbildung 3-16 dargestellten Messkurven der Aggregometrie nach Born, zeigen im Falle des gesunden Spenders keine besonderen Auffälligkeiten. Die abgelesenen Aggregationswerte liegen im Normbereich d.h. über 70%.

Die Aktivierung der durch Acetylsalicylsäure geschädigten Thrombozyten mit ADP führt zu einer reduzierten Aggregationsfähigkeit von nur 61%.

Ein noch deutlicher Effekt ergibt sich nach Aktivierung mit Arachidonsäure (ARA). Hier werden aufgrund des Einflusses von Acetylsalicylsäure im Aggregometer nur 13% angezeigt.

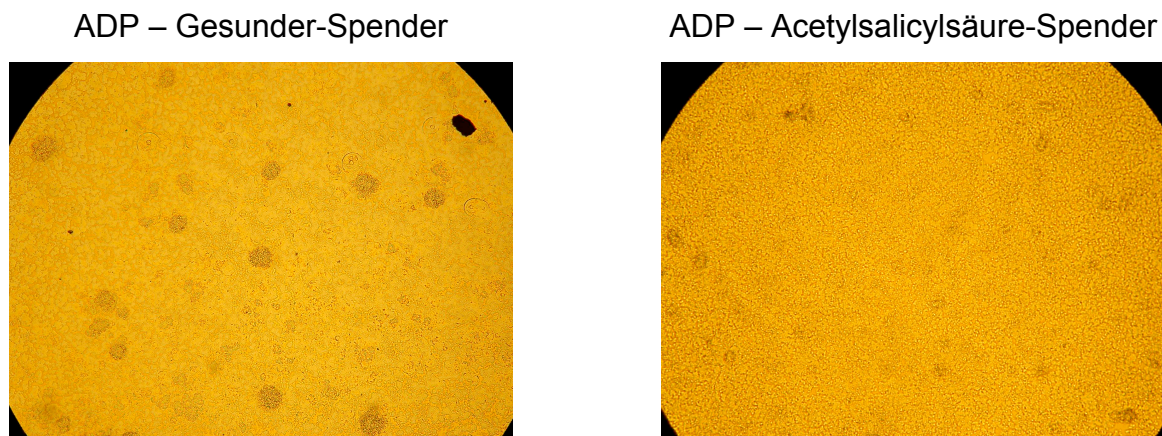


Abbildung 3-17: Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach): Vergleich der ADP-induzierten Aktivierbarkeit von PRP eines gesunden Spenders im Vergleich zu einem Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure.

Wie durch die Abbildung 3-17 deutlich zu sehen ist, hat die Einnahme von Acetylsalicylsäure auf die ADP-induzierte Aktivierbarkeit keinen Einfluss. Auf beiden Bildern ist der Schwingquarz dicht und gleichmäßig mit Thrombozyten belegt.

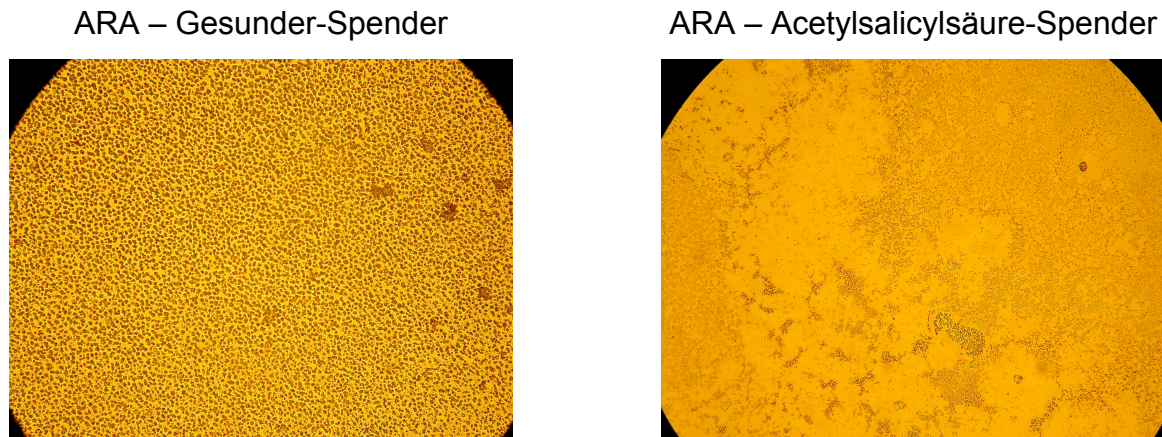


Abbildung 3-18: Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach): Vergleich der Arachidonsäure-induzierten Aktivierbarkeit von PRP eines gesunden Spenders im Vergleich zu einem Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure.

Wurden nun die Proben mit Arachidonsäure aktiviert, zeigte der Blick durchs Mikroskop (Abbildung 3-18) bei der unbehandelten Blutprobe eine regelrechte und gleichmäßig gute Belegung des Quarzes mit Thrombozyten.

Wurden jedoch die mit Acetylsalicylsäure behandelte Blutprobe mit Arachidonsäure aktiviert, fiel die $\Delta f_{\text{gesamt}} = -710$ Hz deutlich schwächer aus als bei der Vergleichsmessung mit unbehandeltem PRP und Aktivierung mittels ARA. Auch im mikroskopischen Bild fällt eine unregelmäßige Belegung auf. Der Quarz wurde nach der Messung mittels Tris-NaCl-Puffer gespült und anschließend noch einmal unter dem Mikroskop angeschaut. Es war dasselbe Bild zu sehen als vor der Spülung mit Puffer. Dies deutet darauf hin, dass durch die Blockung der Cyclooxygenase zwar die Aggregation der Thrombozyten untereinander und die Ausbildung von Pseudopodien verhindert werden, nicht aber die Adhäsion der Thrombozyten auf dem Quarz selbst. Würde die Wirkung der Acetylsalicylsäure auch die Adhäsion blockieren, könnten die Thrombozyten die durch das Lichtmikroskop erkannt werden durch die Spülung mit Puffer abgewaschen werden. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden.

3.1.5.3 Vergleich der unterschiedlichen Aktivatoren

Vergleich der mikroskopischen Bilder von PS-Quarzen, auf die eine acetylsalicylsäurehaltige Blutprobe gezogen wurde, die zum einen mit ADP und zum anderen mit Arachidonsäure aktiviert wurden.

ADP – Acetylsalicylsäure-Spender



ARA – Acetylsalicylsäure-Spender

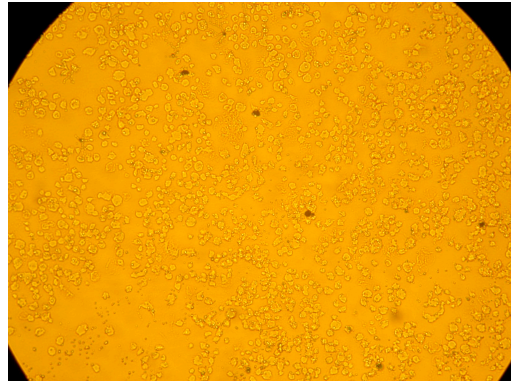


Abbildung 3-19: links: QCM nach Messung 3.1.5.1b, Quarz PS 17, Vergrößerung 500x. rechts: QCM nach Messung 3.1.5.2b, Quarz PS 19, Vergrößerung 500x.

Wie in Abbildung 3-19 links zu erkennen ist, legen sich die Thrombozyten, nach einer Aktivierung mit ADP, flach auf den Quarz und es haben sich Pseudopodien ausgebildet. Die äußeren Grenzen der einzelnen Thrombozyten scheinen ineinander über zu gehen und zu zerfließen. Es besteht teilweise eine flächendeckende Schicht aus adhärenierten Thrombozyten-Aggregaten.

In Abbildung 3-19 rechts, sind die Thrombozyten hingegen noch in plättchenartiger Form erkennbar was zeigt, dass die Einnahme von Acetylsalicylsäure und somit die Blockierung der Cyclooxygenase zu einer insuffizienten Thrombozyten-Aggregation führt, wenn mit Arachidonsäure aktiviert wird.

Da sich die Thrombozyten nicht durch eine Spülung mit Tris-NaCl-Puffer abwaschen lassen, deutet dies darauf hin, dass Acetylsalicylsäure keinen Einfluss auf die Adhäsion hat. Sie adhären weiterhin auf der Schwingquarzoberfläche.

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

Bei gesundem PRP zeigt der Blick durchs Rasterelektronenmikroskop in Abbildung 3-20 und 3-21, dass kein Unterschied besteht ob mit ADP oder ARA aktiviert wird. Die Fähigkeit zur Bildung von Aggregaten sowie die Adhäsion auf der Schwingquarzoberfläche sind deutlich zu erkennen.

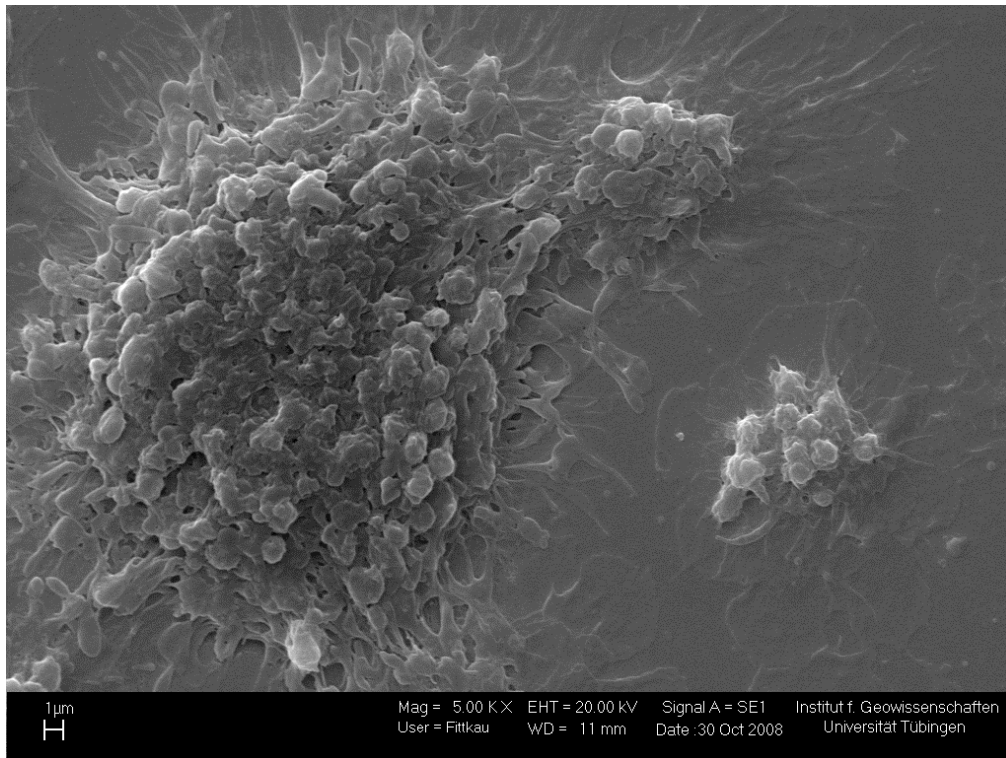


Abbildung 3-20: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP auf PS

Im REM-Bild zeigt sich, dass sich die Thrombozyten zu Aggregaten formieren und vernetzen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Blutplättchen ihre Form verändern, Pseudopodien ausbilden und auf der Polystyrol beschichteten Quarzoberfläche ineinander zerfließen.

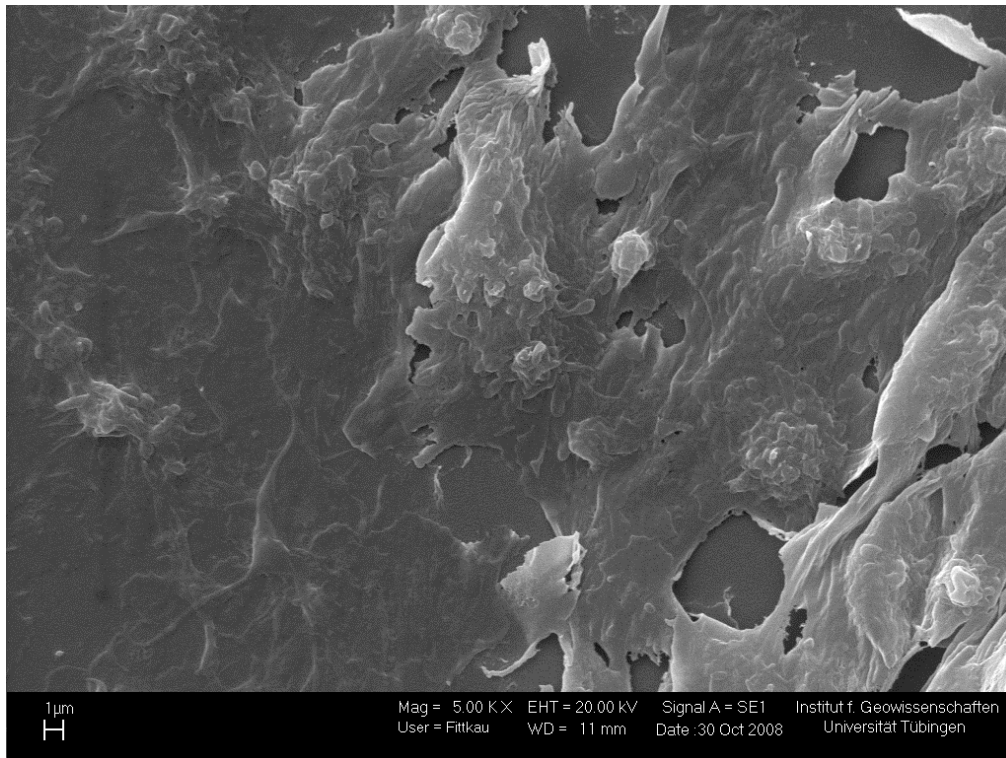


Abbildung 3-21: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ARA auf PS

Auch mit einer Aktivierung des gesunden PRP durch Arachidonsäure wurde eine hervorragende flächendeckende Adhäsion der Thrombozyten auf dem Schwingquarz erreicht. Das REM-Bild zeigt hier deutlich, dass die Thrombozyten nach der Aggregation und Adhäsion einen regelrechten Verband aus vielen Thrombozyten bilden und eine oberflächendeckende Schicht bilden.

3.2 Unbeschichtete Quarze

Wenn in dieser Arbeit von unbeschichteten Quarzen die Rede ist, ist damit immer der von Werk gelieferte, mit einer Goldelektrode belegte Quarz gemeint. Dieser wurde nach oben beschriebenem Reinigungsprotokoll gereinigt und nicht weiter behandelt oder beschichtet.

Um im späteren Routinebetrieb kostendeckend und effizient zu arbeiten wurde in den nächsten Messungen gezeigt, dass auch ohne aufwendige und somit kostenintensive Beschichtung eine aussagekräftige Thrombozytenfunktionsmessung möglich ist.

3.2.1 Beibehaltung der Versuchsparameter für unbeschichtete Quarze

Bei den Messungen mit unbeschichteten Quarzen wurde das Vermischen der Reagenzien ebenso wie bei den Messungen mit Polystyrol beschichteten Quarzen mittels eines Magnetrührers und eines silikonierten Rührfisches durchgeführt. Das Mischintervall wurde bei 5 s konstant gehalten. Sämtliche anderen Parameter wurden ebenfalls nicht verändert.

3.2.1.1 Versuchsmessung zu unbeschichteten Quarzen

Tabelle 3-16: Messprotokoll 3.2.1.1

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.1.1	Gold 1	ADP	PRP	-1510 Hz	-1000 Hz	+4560 Hz

Messung 3.2.1.1

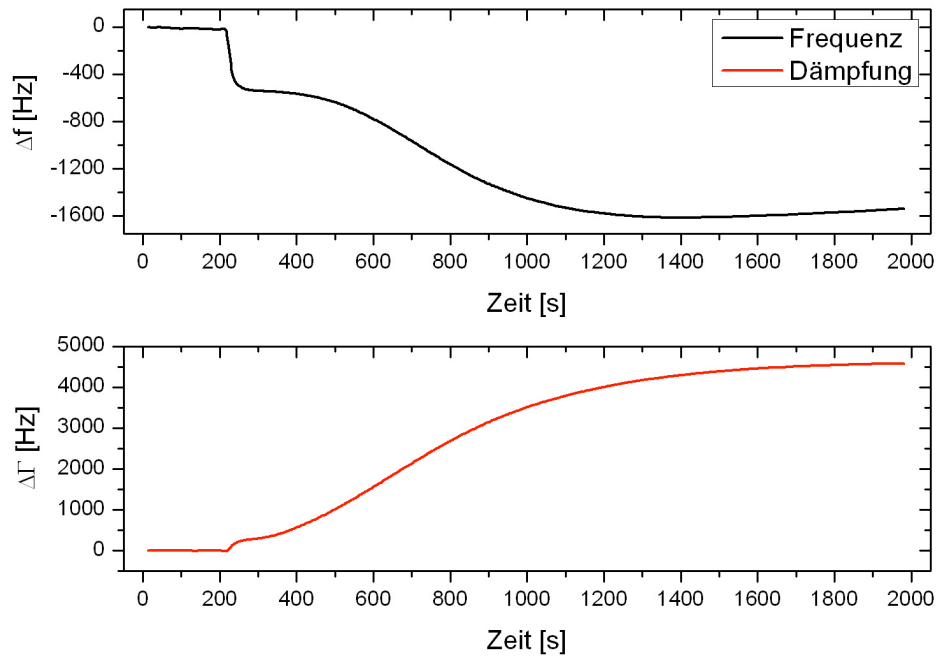


Abbildung 3-22: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.1.1, Quarz Gold 1

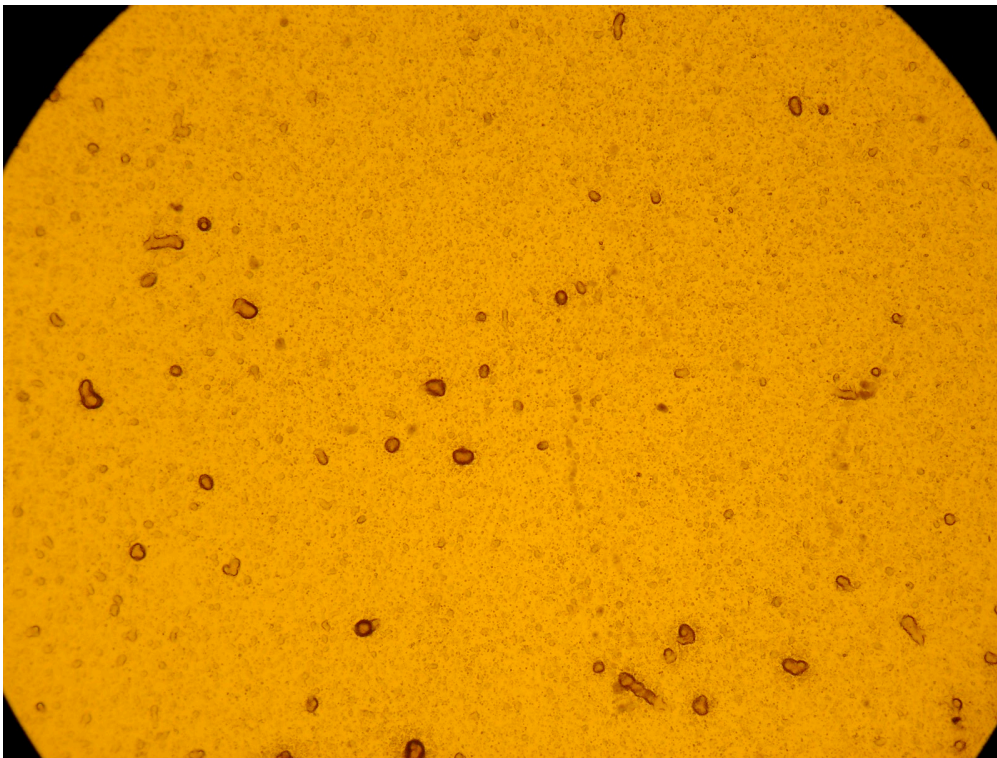


Abbildung 3-23: QCM nach Messung 3.2.1.1, Quarz Gold 1, Vergrößerung 50x

Ein Frequenzabfall von 1510 Hz und das lichtmikroskopische Bild, auf dem eine dichte und flächendeckende Belegung mit Thrombozyten auf dem Schwingquarz zu sehen ist, deuten darauf hin, dass auch eine unbeschichtete Goldoberfläche sehr gute thrombophile Eigenschaften besitzt und für weitere Messungen geeignet ist.

Auf Grund der ausgesprochen guten Ergebnisse mit diesem unbeschichteten Quarz wurden weitere Messungen durchgeführt!

3.2.2 Vergleich der Thrombozytenaktivierung durch ADP oder Arachidonsäure

Bei den nachfolgenden Messungen wurde die Aktivierung von Thrombozyten durch ADP oder Arachidonsäure auf Gold verglichen.

3.2.2.1 Aktivierung mit ADP

Tabelle 3-17: Messprotokoll 3.2.2.1

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.2.1	Gold 2	ADP	PRP	-930 Hz	-730 Hz	+2960 Hz

Messung 3.2.2.1

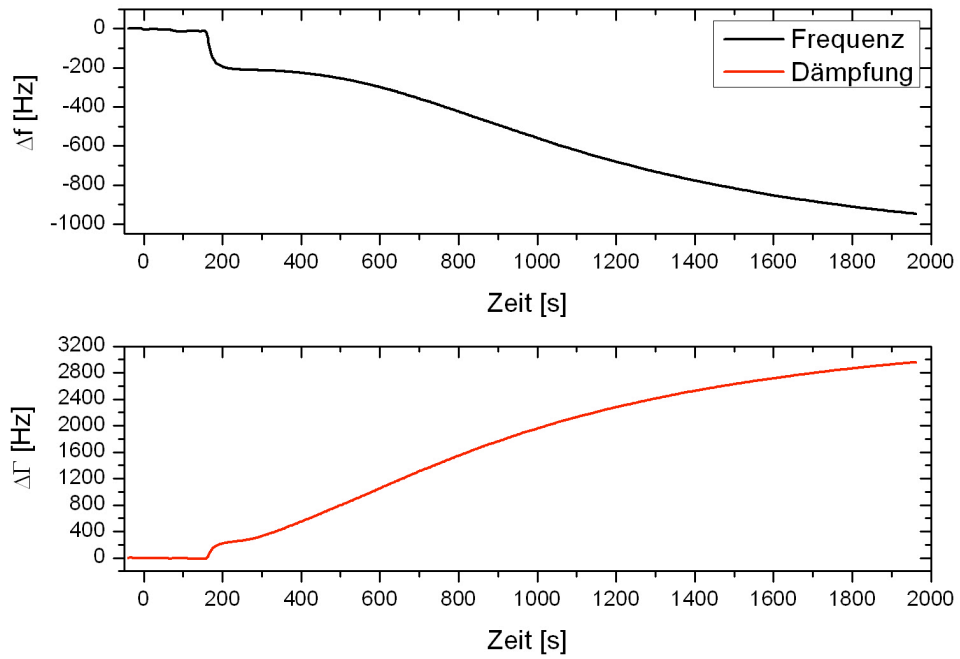


Abbildung 3-24: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.1, Quarz Gold 2

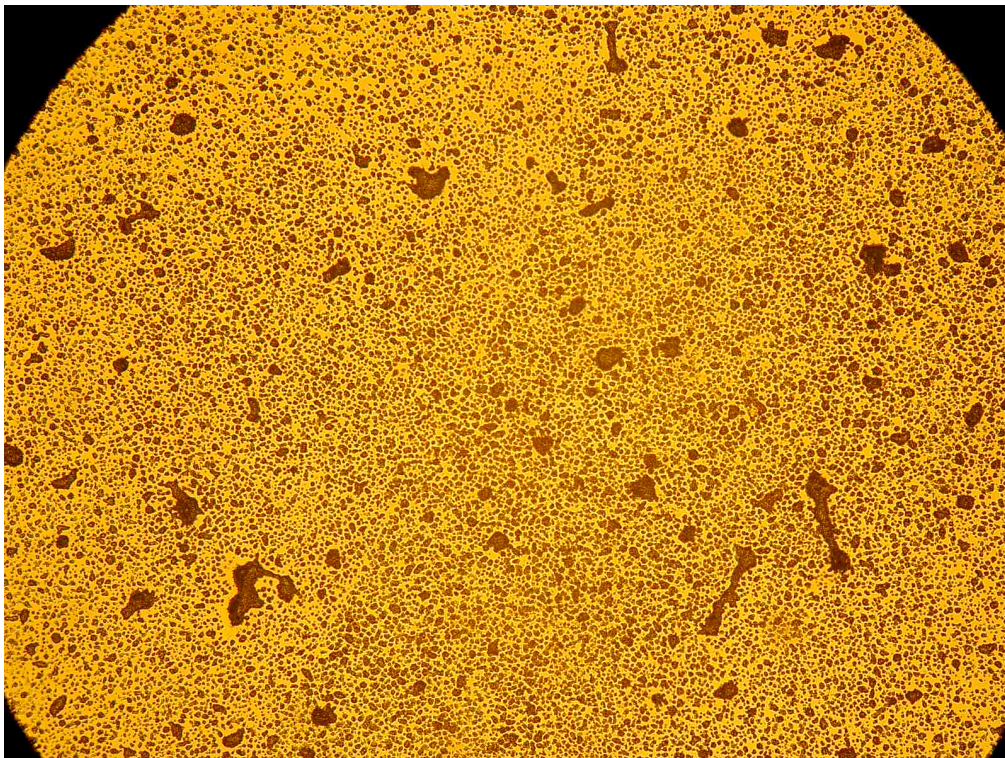


Abbildung 3-25: QCM nach Messung 3.2.2.1, Quarz Gold 2, Vergrößerung 50x

Der Kurvenverlauf erinnert an die Messungen ADP-aktivierter Thrombozyten auf polystyrolbeschichteten Schwingquarzen und zeigt hier ebenso an, dass es zu einer suffizienten Aggregation sowie Adhäsion der Thrombozyten auf dem Goldquarz gekommen ist.

Das lichtmikroskopische Bild zeigt eine flächendeckende und dichte Belegung der Quarzoberfläche mit Thrombozyten, jedoch sind deutliche Aggregate zu erkennen.

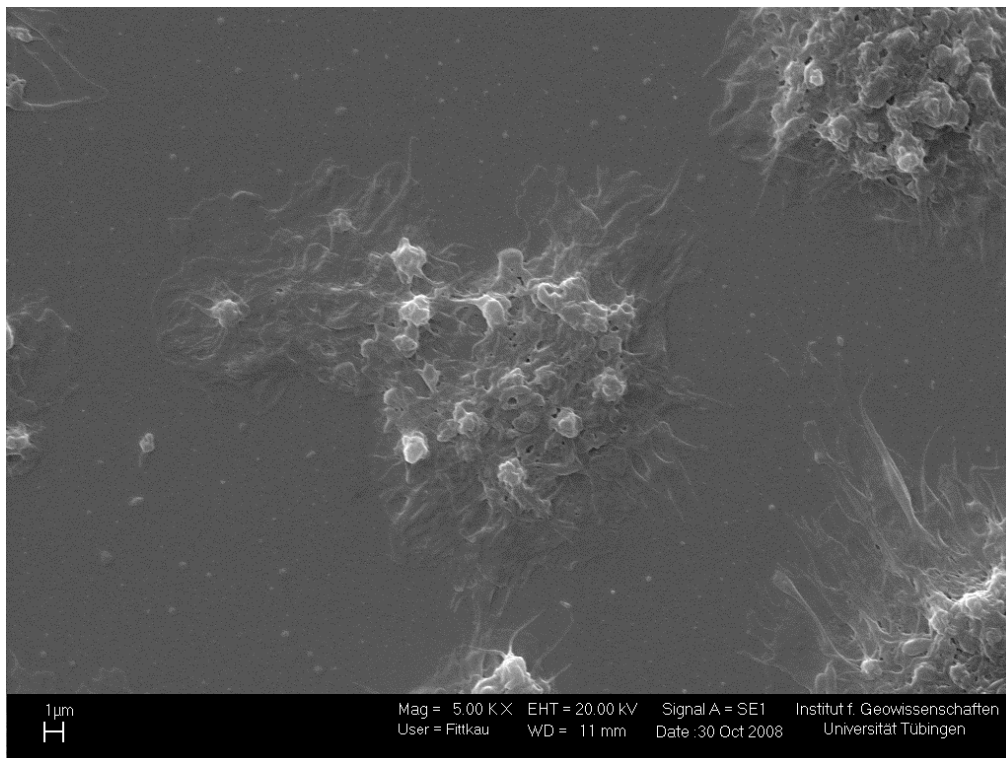


Abbildung 3-26: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP auf Gold

Auch das rasterelektronenmikroskopische Bild zeigt viele Thrombozyten die regelrecht aggregiert und adhärirt haben. Durch ADP aktivierte Thrombozyten sind also in der Lage neben einer Aggregation auch durch eine Adhäsion auf dem unbeschichteten Goldquarz zu haften.

Da die Aktivierung mit ADP problemlos möglich war wurde in einem nächsten Schritt Arachidonsäure für eine Aktivierung verwendet.

3.2.2.2 Aktivierung mit Arachidonsäure

Tabelle 3-18: Messprotokoll 3.2.2.2

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.2.2	Gold 3	ARA	PRP	-1110 Hz	-860 Hz	+3800 Hz

Messung 3.2.2.2

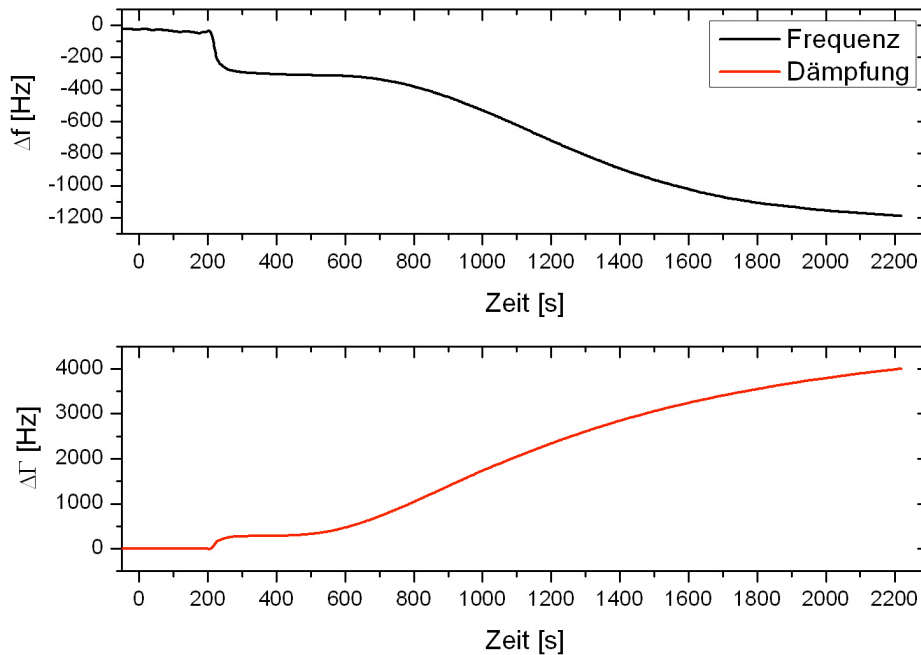


Abbildung 3-27: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.2, Quarz Gold 3

Auch bei dieser Messung kann man bei ausschließlicher Betrachtung des Kurvenverlaufes schon darauf schließen, dass der Quarz gut mit Thrombozyten belegt sein muss, da der Verlauf der Frequenzänderung dem der vergleichbaren Messung auf Polystyrol beschichteten Schwingquarzen ähnelt. Die absolute Höhe des Frequenzabfalles von 1110 Hz deutet auf eine Aggregation und Adhäsion hin.

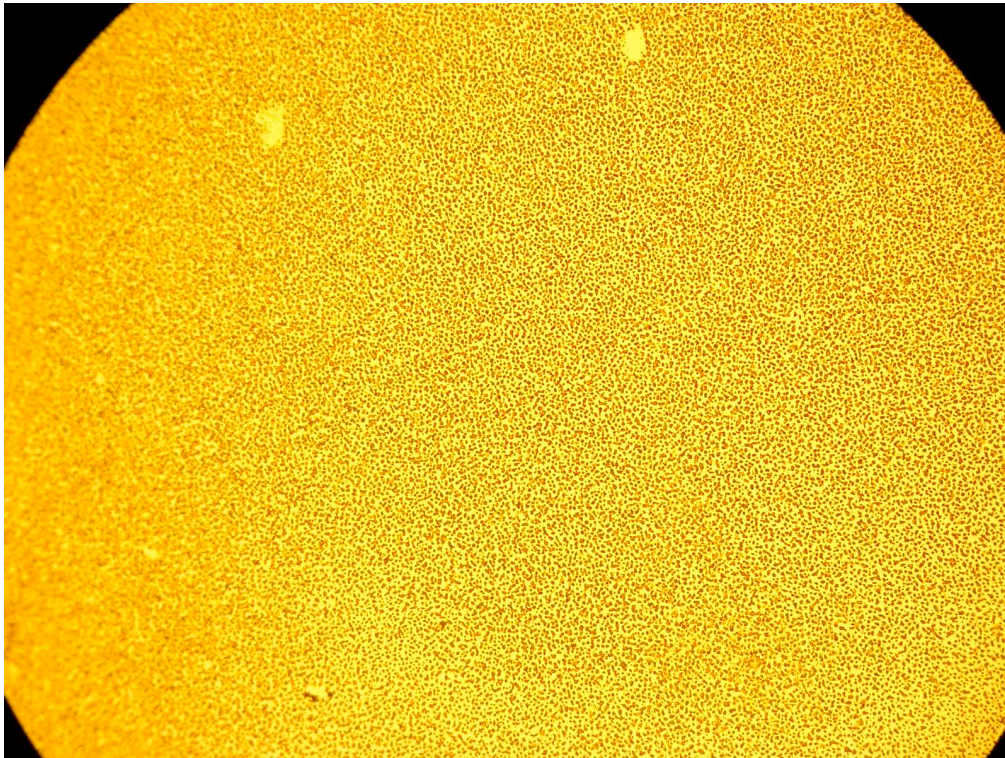


Abbildung 3-28: QCM nach Messung 3.2.2.2, Quarz Gold 3, Vergrößerung 50x

Auch das lichtmikroskopische Bild deutet auf eine gelungene Aktivierung mit Arachidonsäure hin. Die Schwingquarzoberfläche scheint vollständig und dicht mit Thrombozyten belegt zu sein.

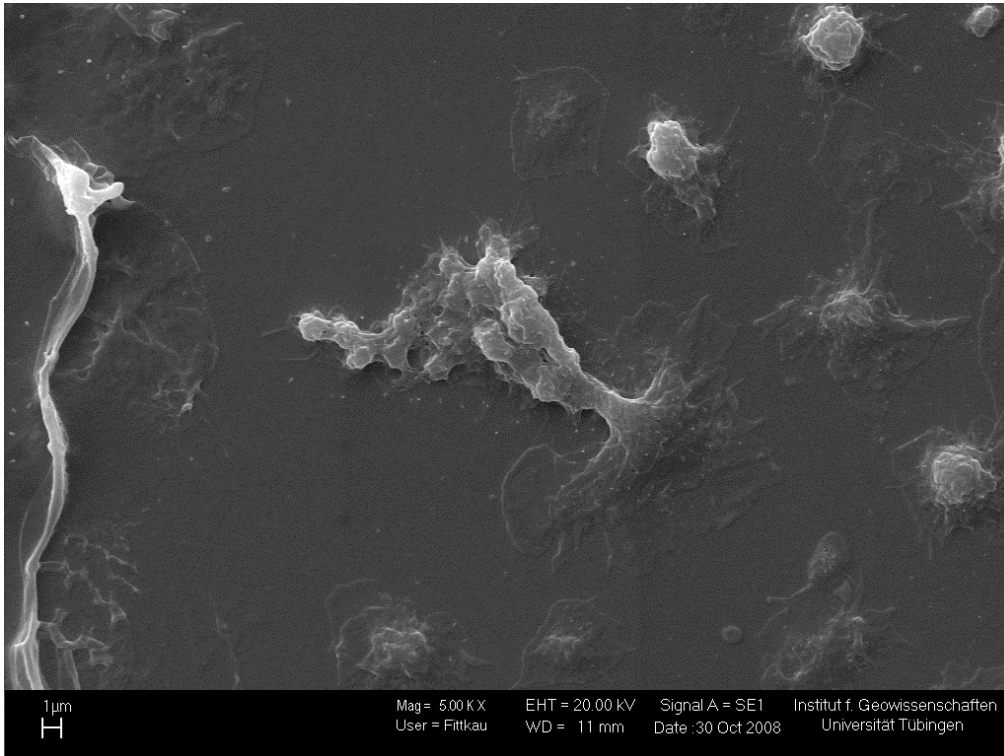


Abbildung 3-29: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ARA auf Gold

Das lichtmikroskopische sowie das rasterelektronenmikroskopische Bild zeigen auch bei Aktivierung mit Arachidonsäure, dass es zu einer guten Anbindung der Thrombozyten auf der Quarzoberfläche kommt. Das rasterelektronenmikroskopische Bild lässt sehr gut die ausgebildeten Pseudopodien erkennen.

Im Vergleich zur Aktivierung mit ADP waren die Quarze, die mit Arachidonsäure aktiviert wurden, viel dichter und gleichmäßiger mit Thrombozyten belegt. Auch die Frequenzabfälle waren deutlicher.

Die verwendeten Aktivatoren ADP und Arachidonsäure sind jedoch beide in der Lage bei gesundem PRP Thrombozyten suffizient zu aktivieren, wobei Arachidonsäure die bessern optischen Ergebnisse lieferte.

3.2.2.3 Negativkontrolle unter Zugabe von Abciximab

Um zu verifizieren, ob für die registrierten Frequenzabfälle wirklich eine Bindung und Aggregation von Thrombozyten auf dem QCM verantwortlich war, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurden, wie schon bei den Negativkontrollen

auf PS beschichteten Quarzen, durch monoklonale Antikörper die Thrombozyten daran gehindert sich untereinander zu aggregieren. Waren Thrombozyten wirklich für den oben beschriebenen Frequenzabfall verantwortlich darf die Negativprobe keinen oder nur einen geringen Frequenzabfall hervorrufen. Im Idealfall sollte der Quarz im Blick durchs Mikroskop unbelegt erscheinen.

Der Ablauf einer Negativkontrolle ist im Kapitel 3.1.1.2 beschrieben und unterscheidet sich hier nur in sofern, dass anstelle von ADP als Aktivator Arachidonsäure verwendet wurde.

Tabelle 3-19: Messprotokoll 3.2.2.3

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.2.3	Gold 4	ARA	PRP	-340 Hz	-80 Hz	310 Hz

Messung 3.2.2.3

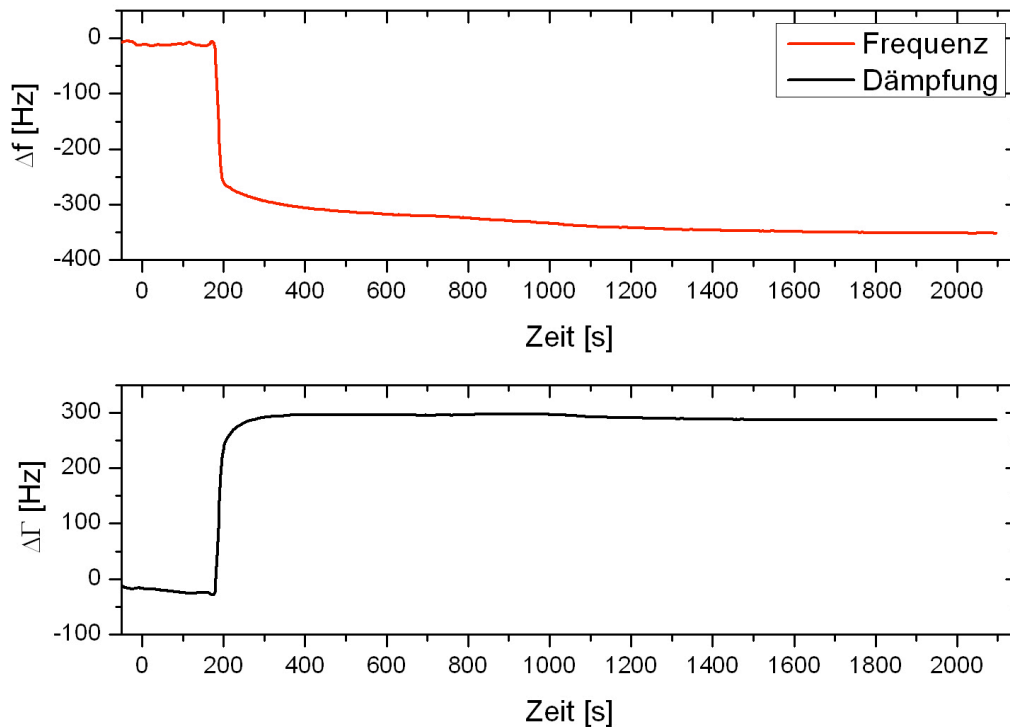


Abbildung 3-30: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.3, Quarz Gold 4

Schon der Kurvenverlauf macht deutlich, dass hier keine Thrombozyten-Adhäsion stattgefunden hat. Es kam zwar zu einem Frequenzabfall von 340 Hz, jedoch deutet

dies auf die Viskositätsänderung und nicht auf eine direkte Bindung hin. Im Vergleich zu anderen Messungen fehlt hier der eigentliche Frequenzabfall, der durch die Thrombozyten-Adhäsion verursacht wird.



Abbildung 3-31: QCM nach Messung 3.2.2.3, Quarz Gold 4, Vergrößerung 50x

Bei einer 50-fachen Vergrößerung kann man beim Blick durch das Lichtmikroskop nur vereinzelt schwarze Flecken erkennen, was als Artefakt gedeutet wird, ansonsten ist die Schwingquarzoberfläche deutlich sauber.

Die Negativkontrolle stellt klar dar, dass Thrombozyten für den Frequenzabfall der Messungen 3.2.2.1 und 3.2.2.2 verantwortlich waren. Da bei einer Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper Abciximab (ReoPro®), wie in Messung 3.2.2.3 verwendet, keine Thrombozyten Anbindung mehr möglich ist. Wie zu erwarten war, konnte kein signifikanter Frequenzabfall detektiert werden.

3.2.3 Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf unterschiedliche Arten von Blutproben und deren Vergleich

Im weiteren Verlauf wurden, wie auch schon im Kapitel 3.1.5 beschrieben, zwei unterschiedliche Blutproben miteinander verglichen:

Gesunde Probanden (PRP), und solche, die auf Grund einer Erkrankung als Dauermedikation Acetylsalicylsäure von ihrem Hausarzt verordnet bekamen (PRP/ASS).

Bei der letzten Gruppe wurde auf Grund vermeintlicher Wechselwirkung darauf geachtet, dass der jeweilige Proband ausschließlich Acetylsalicylsäure als Medikation einnahm.

3.2.3.1 Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf Platelette Rich Plasma

Tabelle 3-20: Messprotokoll 3.2.3.1

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.3.1a	Gold 1	ADP	PRP	-1510 Hz	-1000 Hz	+4560 Hz
3.2.3.1b	Gold 5	ARA	PRP	-1090 Hz	-1070 Hz	+4270 Hz

3.2.3.2 Verhalten unterschiedlicher Aktivatoren auf Platelette Rich Plasma unter Dauermedikation Acetylsalicylsäure

Tabelle 3-21: Messprotokoll 3.2.3.2

Messung	Quarz	Aktivator	Blut	Δf_{gesamt}	Δf_{TZ}	$\Delta \Gamma$
3.2.3.2a	Gold 6	ADP	PRP/ASS	-1610 Hz	-1110 Hz	+3130 Hz
3.2.3.2b	Gold 7	ARA	PRP/ASS	-600 Hz	-200 Hz	+800 Hz

Ergebnisse

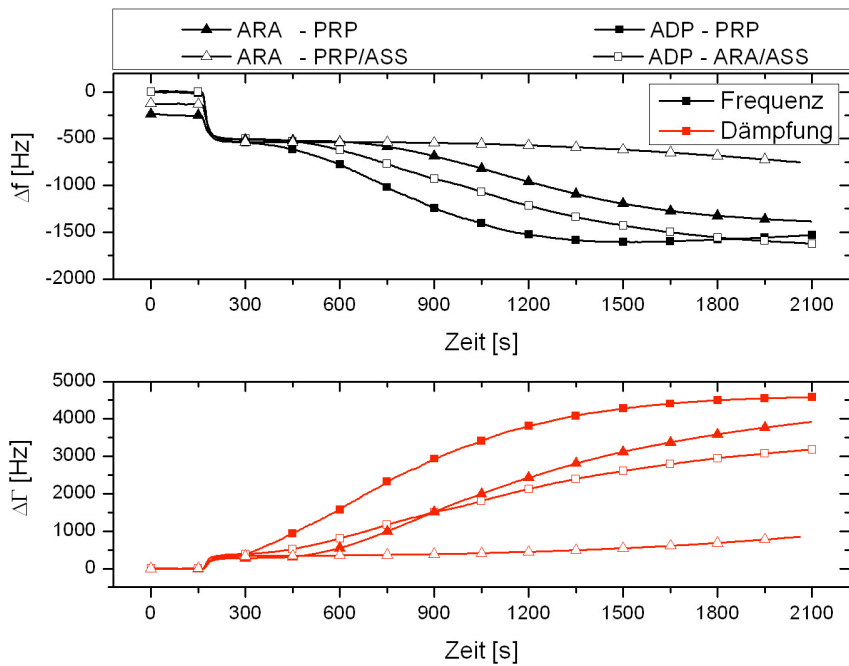


Abbildung 3-32: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.2.3 [18]

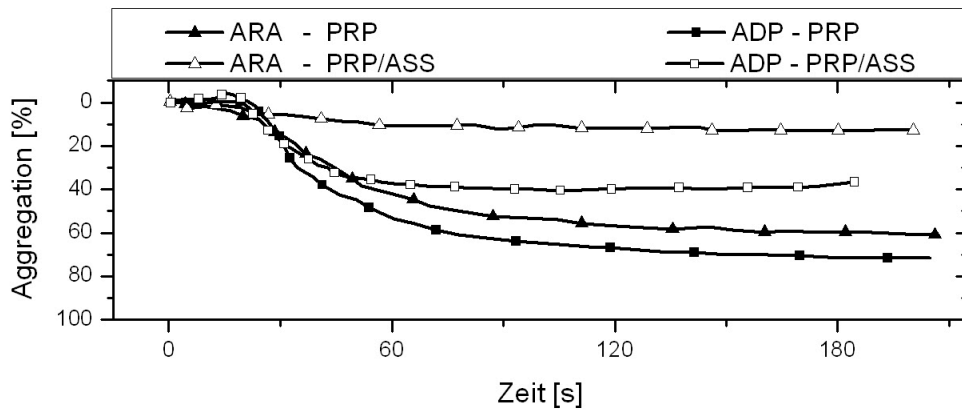


Abbildung 3-33: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen 3.2.3 [18]

Die Aggregometrie nach Born zeigt 40% Aktivität bei Einnahme von Acetylsalicylsäure und Aktivierung mit ADP. Vom theoretischen Hintergrund hätte man keine deutliche Verminderung der Thrombozyten-Aktivität erwartet.

Nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure zeigt die Aggregometrie nach Born nur noch eine Thrombozyten-Aktivität von 10 %. Dies war zu erwarten. Bei den Referenzmessungen ohne Acetylsalicylsäure im PRP wurden zwischen 60% und 70% erreicht, was im unteren physiologischen Bereich (70-100%) liegt.

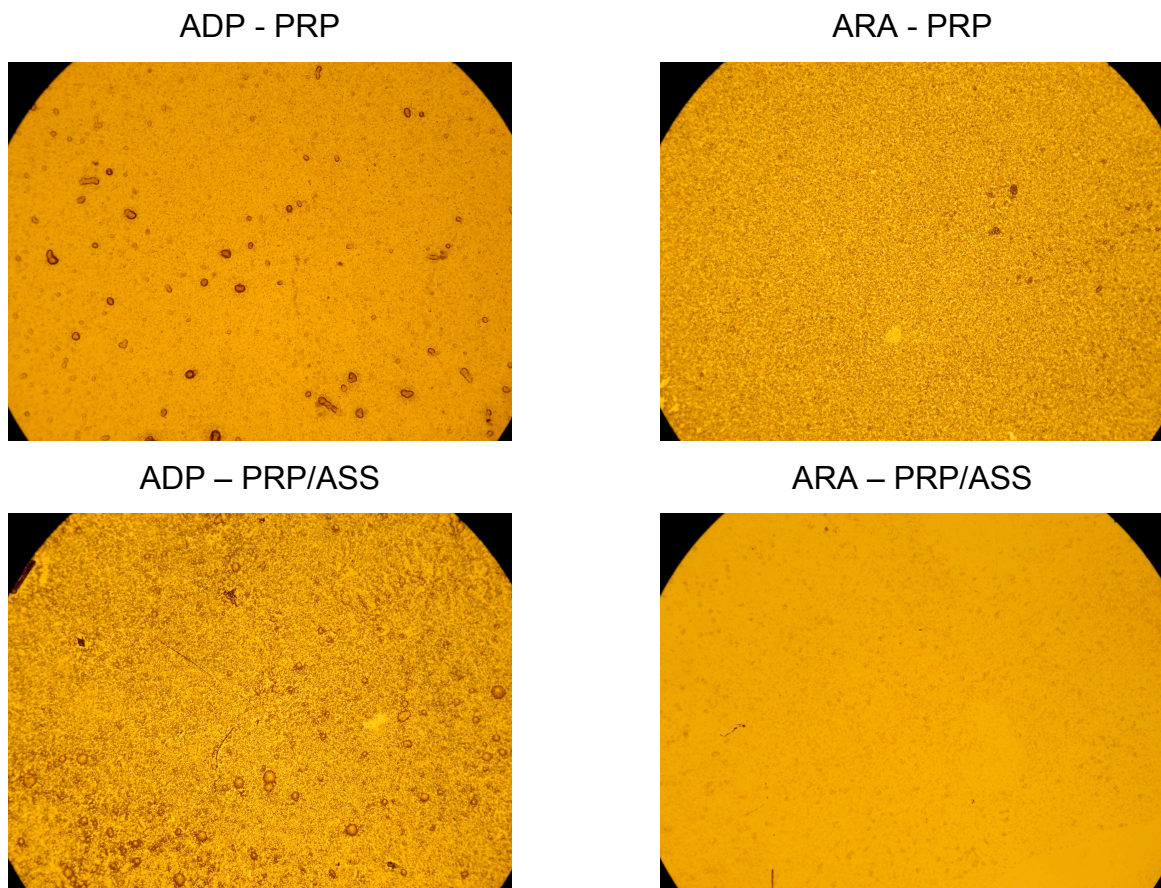


Abbildung 3-34: Lichtmikroskopischer Vergleich der Messungen 3.2.3, Vergrößerung 50-fach

Wie zu erwarten war zeigen die Messungen als Reproduzierung der vorangegangenen Versuche aus Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2, dass Thrombozyten sowohl mit ADP als auch mit Arachidonsäure aktiviert werden konnten. Auf der einen Seite zeigte sich bei der Aktivierung mit Arachidonsäure zwar ein geringerer Frequenzabfall, jedoch konnte durch das Mikroskop ein sehr dicht und gleichmäßig belegter Schwingquarz gesehen werden.

In Abbildung 3-34 wird deutlich sichtbar, dass bei acetylsalicylsäurehaltigem PRP nur mit ADP nicht aber mit Arachidonsäure aktiviert werden kann.

Der Verlauf der Kurve des Frequenzabfalles zeigt deutlich, dass es sich zwar um eine initiale Frequenzverminderung durch die oben beschriebene Viskositätsänderung handelt, es aber nicht zu einer Aggregation oder Adhäsion und somit auch nicht zu einem zweiten Abfall der Frequenzkurve kommt.

Der Schwingquarz Gold 1, der in Messung 3.2.3.1a zum Einsatz kam, wurde schon im Kapitel 3.2.1.1 zur Messung verwendet und nach erfolgreicher Regeneration von Schmidt [26] hier wieder zum Einsatz gebracht.

Die Regeneration wurde wie folgt durchgeführt.

- Quarz in die Dummy-Anlage einbauen
- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeinstellung: Flow 0,4 ml/min für 1 Min.)
- Kurzer Stop der Pumpe zum Umstecken des Schlauchs in die Regenerationslösung NaOH 6 Mol
- Erneuter Betrieb der Pumpe und Spülung der Quarzoberfläche für 5 Min.
- Kurzer Stop um Schlauch wieder in Tris-NaCl zu stecken und 1 Min. zu spülen
- Erneuter Stop und Füllung der Messkammer mit SDS-Lösung (0,5 Mol in H₂O pH 2), Spülung für 5 Min.
- Letzter Wechsel der Reagenzien und ein letztes Spülen mit Tris-NaCl für 1 Min.
- Ausbau des Quarzes und Dokumentation durch Fotografieren



Abbildung 3-35: QCM nach Regeneration, Quarz Gold 1, Vergrößerung 50x

Der QCM erschien unter dem Mikroskop vollständig sauber und wurde deshalb hier wieder für eine erneute Messung verwendet.

Anhand dieser letzten Messungen wurden die Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen bestätigt und gezeigt, dass sowohl ADP als auch Arachidonsäure in gleichem Maß für die Thrombozyten Aktivierung geeignet sind. Des Weiteren wird deutlich, dass bei einer acetylsalicylsäurehaltigen Blutprobe zwar mit ADP aktiviert werden konnte, jedoch durch die Blockierung der Cyclooxygenase keine Aktivierung mit Arachidonsäure zu erreichen war.

In weiteren Messungen und Vergleichen sollte untersucht werden, in wie weit der Einnahmezeitraum von Acetylsalicylsäure einen Einfluss auf die Aktivierung und das Verhalten von Thrombozyten hat und welche anderen Aktivatoren noch suffizient verwendet werden könnten.

4 Diskussion und Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Beschichtungen zur Thrombozytenfunktionsmessung auf Schwingquarzen zu generieren. Es sollten selektiv Thrombozyten auf einer thrombophilen Schwingquarzoberfläche so zur Aggregation sowie zur Adhäsion gebracht werden, um einen messbaren Frequenzabfall detektieren zu können. Versuche wurden mit Polystyrol beschichteten Quarzen, sowie mit Quarzen, die eine unbeschichtete Goldelektrode aufwiesen durchgeführt.

4.1 Vergleich mit dem Stand der Technik

Der folgende Abschnitt soll die Einordnung der Thrombozytenfunktionsmessung mittels Schwingquarzesensorik und deren potentielle Anwendungsgebiete aufzeigen. Dazu wird das neue Verfahren der Schwingquarzesensorik mit denen im Kapitel 1.3 beschriebenen Verfahren kurz verglichen.

Das hier beschriebene Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung konkurriert mit bereits auf dem Markt etablierten Methoden, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

Tabelle 4-1: Vergleich der Messverfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung [2]

	Thrombozyten-Aggregometrie nach Born	Thromb-elastographie	Vollblut-Impedanz-Aggregometrie	Schwingquarzmethode
Messeinheit	Küvette	Stempel und Küvette	Messzelle	Schwingquarzeinheit
Probe	PRP und PPP	Vollblut	Vollblut	PRP
Aktivierung	ADP, ARA u.a.	ADP, ARA u.a.	spezielle Reagenzien des Herstellers	ADP, ARA u.a. denkbar (bisher nicht untersucht)
Messgröße	Lichttransmission	Viskosität	Elektrischer Widerstand	Frequenz akustischer Wellen
Kosten/Test	< 2€	25 – 50€	5 - 7€	ca. 5€

Jedes der aufgezeigten Verfahren ist auf seine Weise mehr oder weniger aufwändig. Die Vor- und Nachteile werden erst bei genauer Betrachtung offenbar.

Gemeinsam ist allen Verfahren, dass die Thrombozyten durch einen Aktivator aktiviert werden müssen. Je nach Wahl des Aktivators, können über den Wirkmechanismus Rückschlüsse über die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten getroffen werden. Liegen dem Untersucher genügend Vergleichsmessungen vor, ist bei allen Verfahren denkbar, dass auf die zugrunde liegende Funktionsstörung anhand der charakteristischen Kurvenverläufe der jeweiligen Messgröße zurück geschlossen werden kann.

Ebenfalls allen Verfahren gemein ist die Abhängigkeit der Messwerte von der Thrombozytenzahl, welche keines der Verfahren zuverlässig ermitteln kann. Die Anzahl muss aber in vom Hersteller angegebenen Bereichen liegen, damit die Methode zuverlässig funktioniert.

Wesentliche Unterschiede bestehen in der zum Einsatz kommenden Blutprobe. Es werden PRP oder Vollblut verwendet.

Außerdem ist bei jedem dieser Verfahren die Messgröße eine andere. Allen Messverfahren liegt jedoch die Eigenschaft der Thrombozyten zu Grunde sich zu adhären und zu aggregieren.

Schließlich unterscheiden sich die Verfahren noch im Aufbau der für das Messverfahren spezifischen Messkammer. Bei der Aggregometrie nach Born wird lediglich eine Küvette benutzt, bei der Elastographie wird eine Küvette mit einem zugehörigen Stempel verwendet und bei der Vollblutimpedanzaggregometrie wird eine Messzelle mit Elektroden und Anschlüssen benötigt. Alle diese Messvorrichtung sind zum Teil teure Einmalartikel.

Bei allen am Markt befindlichen Geräten werden die Proben Mittels Pipette in die Messvorrichtung eingebracht.

Bei der neuen, hier untersuchten Schwingquarzmethode wird die Probe durch eine Pumpe in die Messkammer gefördert. Es ist generell denkbar, dass der Messkammer ein Zellcounter vorgeschaltet wird. Es könnte somit in einem Gerät, neben der Funktionsfähigkeit auch die Zahl der Thrombozyten ermittelt werden. Allerdings ist zu bedenken, dass bisher nur Messungen in PRP erfolgreich durchgeführt werden konnten, so dass die Thrombozytenzahl nur indirekt bestimmt werden kann. Sollte es gelingen die Thrombozytenfunktion auf Schwingquarzen mit Vollblut anzuwenden,

wäre dies eine wesentliche Vereinfachung des Verfahrens und böte weitere Möglichkeiten.

Die Komplexität der einzelnen Verfahren lässt schließen, dass sich die Wahl des einzusetzenden Verfahrens nach den Rahmenbedingungen der Untersuchung (wissenschaftliche Studie, klinische Diagnostik), der zugrunde liegenden Fragestellung (globale Untersuchung der primären Hämostase, Monitoring von Plättchenhemmern oder vWF-Diagnostik), sowie logistischen Erwägungen (Analyse im Labor oder patientennah, Aufwand der Analyse, Kosten) richtet [2].

Die Thrombozytenfunktionsmessung mittels Schwingquarz-Point-of-Care-Testing könnte zukünftig patientennah und kostengünstig eingesetzt werden. Dafür sprechen die Miniaturisierbarkeit des Messgerätes (zur Blutgruppenbestimmung wird hierzu von Gehring et. al. bereits ein Prototyp entwickelt), die mögliche Mehrfachmessung durch Regeneration wie von Schmidt [26] beschrieben und die Sensitivität auf eine häufige Fragestellung, der Thrombozytenfunktion im Rahmen der Acetylsalicylsäuretherapie.

4.2 Diskussion der Beschichtung

Sinn der Beschichtung liegt darin, die Oberfläche der Schwingquarze so thrombophil wie irgend möglich zu wählen, um resultierend ein optimales Messsignal detektieren zu können. In der Labormedizin findet Polystyrol auf Grund seiner thrombophilen Eigenschaften schon lange Verwendung. Neben Polystyrol beschichteten Schwingquarzen wurden weitere Messungen mit blanken Goldelektroden durchgeführt.

4.2.1 Polystyrolbeschichtete Schwingquarze

Die Polystyrolbeschichtung sollte einfach, schnell und billig herzustellen sein und die Eigenschaften aufweisen, den Quarz flächendeckend, homogen und dünn mit Thrombozyten zu belegen. In mehreren Messreihen wurde die für diesen Zweck beste Beschichtung eines Schwingquarzes mit Polystyrol gefunden. Die Oberflächenbeschichtung mit einer Konzentration von 2 mg/ml Polystyrol führte hier zu den besten Ergebnissen.

4.2.2 Unbeschichtete Goldquarze

Um die Messanlage im späteren Routineeinsatz noch kostenneutraler betreiben zu können wurde versucht, ob auch Schwingquarze mit einer blanken Goldoberfläche thrombophile Eigenschaften besitzen und es zu einer suffizienten Adhäsion von Thrombozyten, sowie einem guten Messsignal kommt.

Ebenso wie die mit Polystyrol beschichteten Schwingquarze hatten auch die unbeschichteten Goldquarze die Eigenschaft aktivierte Thrombozyten auf ihrer Oberfläche adhären zu lassen. Es konnte ebenso wie bei Polystyrol beschichteten Quarzen ein sehr gutes Messsignal detektiert werden.

4.2.3 Übertragbarkeit auf vollautomatische Anlage

Da die Fidge Type Fg T1 im späteren vollautomatischen Routineeinsatz so störungsfrei wie möglich betrieben werden soll, ist es ratsam auf unbeschichteten Goldoberflächen die Thrombozytenfunktionsmessungen durchzuführen. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Faktor ist die Kosten- und Zeitersparnis und auch die unbegrenzte Lagerungsfähigkeit der Goldquarze stellt im Vergleich zu beschichteten Quarzen einen großen Vorteil dar.

4.3 Diskussion der Regeneration

Wird auf einem Schwingquarz eine Messung zur Thrombozytenfunktion durchgeführt sind auf dessen Oberfläche Thrombozyten fest angehaftet. Um Kosten zu sparen ist es wünschenswert, denselben Quarz für einen Patienten bei erneuten Messungen wieder verwenden zu können.

Durch die Regeneration soll ermöglicht werden, ohne den Messaufbau zu verändern mehrere Messungen in Folge durchführen zu können. Dies wäre beispielsweise beim online Monitoring der Thrombozytenfunktion im Laufe einer Operation wünschenswert.

Aus diesem Grund wurde von Schmidt [26] die Regeneration der schon mit Thrombozyten belegten Schwingquarzoberflächen parallel zu dieser Arbeit untersucht. Dabei wurde versucht die adhärenierten Thrombozyten von der Quarzoberfläche abzulösen und einen Zustand zu erreichen, der dem eines noch unbenutzten Quarzes sehr nahe kommt. Ob der Zustand eines neuwertigen

Schwingquarzes wieder erreicht werden kann, muss in weiteren Messungen und ggf. rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden.

4.3.1 Messungen auf unbenutzten Quarzen

Messungen auf fabrikneuen Quarzen bieten den Vorteil gleichbleibender hoher Qualität mit sehr reiner Oberfläche. Nach einer Entfettung mit Aceton und Reinigung der Oberfläche mittels Piranha, stehen diese Quarze binnen kürzester Zeit der Thrombozytfunktionsmessung zur Verfügung. Werden bei einem Patienten während eines Klinikaufenthalts mehrere hintereinander folgende Messungen durchgeführt, muss immer ein neuer Quarz verwendet werden, welche die Kosten schnell in die Höhe steigen lässt. Um dies zu verhindern, untersuchte Schmidt [26] die Regeneration schon gemessener Quarze.

4.3.2 Messungen auf regenerierten Quarzen

Demgegenüber stehen Messungen bei denen der verwendete Quarz in der Anlage im eingebauten Zustand regeneriert wird und dann erneut zur Messung bereit steht. Hier liegen die Vorteile klar in den niedrigeren Kosten. Jedoch ist die Regeneration zeitaufwändig und es können in dieser Zeit keine neuen Messungen an der Anlage durchgeführt werden. Des Weiteren kann momentan noch nicht zweifelsfrei verifiziert werden, in wie weit der Urzustand eines Schwingquarzes erreicht werden kann, oder ob die vorangegangenen Messungen die Nachfolgenden beeinflusst.

4.4 Diskussion der Thrombozytenfunktionsmessungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen deutlich dar, dass eine Thrombozytenfunktionsmessung auf Schwingquarzen zu sehr guten detektierbaren Ergebnissen führt. Auf beiden hier verwendeten Oberflächen konnten lichtmikroskopisch, sowie rasterelektronenmikroskopisch Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Kurvenverläufe deuten jeweils auch auf eine sehr gut messbare Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten hin.

4.4.1 Polystyrol beschichtete Quarze

Die absoluten Werte der Frequenzabfälle sowie auch die einzelnen lichtmikroskopischen Bilder zeigen alle, dass eine sehr gute Thrombozyten Adhäsion

auf der Schwingquarzoberfläche stattgefunden hat. Jedoch zeigen die absoluten Werte des Frequenzabfalles keine Konstanz, sondern streuen von Werten um -650 Hz bis zu Werten von -1500 Hz. Es wurde zwar auf gleichbleibende Versuchsbedingungen und Messparameter geachtet, trotzdem konnte kein konstanter Wert für die absoluten Frequenzabfälle gefunden werden.

Etwaige Ungenauigkeiten bei Reinigung und Beschichtung der Quarze, sowie bei der Mischung von PRP und Aktivator, können durch eine Automatisierung dieser Schritte verringert oder gar beseitigt werden. Des Weiteren kann, durch eine Automatisierung dieser manuellen Arbeitsschritte ein genauerer Vergleich unterschiedlicher Beschichtungsarten der Schwingquarzoberflächen ermöglicht werden.

4.4.2 Unbeschichtete Gold Quarze

Ebenso wie bei den Messungen mit Polystyrol beschichteten Quarzoberflächen, zeigen auch Quarze mit einer unbeschichteten Goldelektrode keine gleichen absoluten Frequenzabfälle.

Unbeschichtete Goldquarze verfügen ebenso wie die mit Polystyrol beschichteten Schwingquarze über sehr gute thrombophile Eigenschaften. Die Anbindung der Thrombozyten konnte licht- und rasterelektronenmikroskopisch bewiesen werden. Auch über die detektierten Kurvenverläufe konnte jeweils eine sehr gut messbare Aggregation und Adhäsion nachgewiesen werden.

4.4.3 Vergleich der Thrombozytenfunktionsmessung auf PS und Gold

Sowohl Polystyrol-, als auch Goldoberflächen sind durch ihre sehr guten thrombophilen Eigenschaften hervorragend geeignet Messungen bezüglich der Thrombozytenfunktion durchzuführen.

Die Qualität der einzelnen Frequenzabfälle, also die Art der Kurvenverläufe ist bei beiden Gruppen, bei denen im lichtmikroskopischen Bild Thrombozyten nachgewiesen werden konnten sehr ähnlich. Diese Kurvenverläufe können alle annäherungsweise zur Deckung gebracht werden.

Der charakteristische Kurvenverlauf beginnt immer mit einem initialen Frequenzabfall, der den Einstrom des PRP widerspiegelt. Nach einem kurzen Plateau, das die Zeit (ca. 200 s) bis zum Beginn der Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten darstellt, schließt sich immer der eigentliche Frequenzabfall (Δf_{TZ}) an. Der Frequenzabfall (Δf_{TZ}) stellt somit den eigentlichen Vorgang der Aggregation und

Adhäsion der aktivierten Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche dar. Nach jeweils 30 Min. wurde die Messung beendet.

Es wurde zum einen sehr deutlich gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten auf den beiden Oberflächen adhären, zum anderen wurde bewiesen, dass die Schwingquarzmethode bei beiden verwendeten Oberflächen sehr gut detektierbare Frequenzabfälle zeigt.

Da ein späterer Routinebetrieb der Anlage angestrebt wird, muss auch bei der Generierung der optimalen Schicht auf Ökonomie geachtet werden. Aus diesem Grund ist zu empfehlen, dass Überlegungen über weiterführende Messungen vorzugsweise auf Quarzen mit blanker Goldelektrode durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der blanken Goldoberfläche ist die nahezu unbegrenzte Lagerfähigkeit dieser Quarze.

4.5 Verhältnis von Thrombozyten-Zahl und initialem Frequenzabfall

Die Motivation für diese Messreihe war dadurch gegeben, dass untersucht werden sollte, ob es im späteren Routineablauf möglich ist, über den detektierten initialen Frequenzabfall, die in der Blutprobe enthaltene Thrombozytenzahl zu bestimmen.

Es wurden jeweils 4 Messungen mit der entsprechenden gleichen Thrombozyten Zahl auf ein und demselben Quarz durchgeführt. Da die Thrombozyten durch Abciximab geblockt waren und auch nicht aktiviert wurden, konnte der Quarz nach einer Spülung mit Tris-NaCl-Puffer erneut zur nächsten Messung verwendet werden. Es wurde hier nicht die Anbindung der Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche detektiert, sondern nur die Viskositätsänderung der unterschiedlichen Thrombozyten Konzentrationen verglichen.

In Abbildung 3-10 sieht man die initialen Frequenzabfälle der einzelnen Messungen. Die Messungen sind chronologisch von links nach rechts sortiert und lassen deutlich erkennen, dass jeweils die erste Messung einer bestimmten Thrombozytenkonzentrationsgruppe einen starken Frequenzabfall besitzt.

Bei der Messgruppe mit 300.000 Thrombozyten/ μ l, wurde nicht wie bei den zuvor durchgeführten Messungen, ein neuer Quarz verwendet. Auf Grund von Kontaktschwierigkeiten wurde mit dem zuvor verwendeten Quarz PS 12 weitergemessen. Aus diesem Grund, fehlt bei der ersten Messung dieser Reihe der oben beschriebene starke Frequenzabfall. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass

eine Tendenz besteht, die durch unselektive Anbindung von Proteinen oder anderen Blutbestandteilen die Frequenzabfälle immer schwächer werden lässt.

Diese Tendenz kommt dadurch zu Stande, dass der Quarz bei der ersten Messung noch mit einer „neuen“ Polystyrolbeschichtung versehen ist und es dadurch zu einer, vergleichbar höheren unspezifischen Proteinanbindungen kommt, als bei den Folgemessungen. Durch diese Messungen wird deutlich, dass sich die Quarzoberfläche im Laufe der verschiedenen Messungen trotz der Reinigungsschritte mit Tris-NaCl-Puffer verändert und keine gleichbleibenden Parameter mehr vorhanden sind. Die Schwingquarzoberfläche wird in einer Weise verändert, die auch das Viskositätsverhalten auf dem Quarz verändert und so die einzelnen Messungen nicht vergleichbar bleiben.

Bei weiterführenden Messungen muss darauf geachtet werden, dass jede der einzelnen Vergleichsmessungen auf einem frisch beschichteten Quarz durchgeführt wird. Nur so kann der Einfluss der unspezifischen Proteinanlagerungen minimiert werden und wirklich die ausschließliche Thrombozyten Zahl zu einer detektierbaren Frequenzänderung führen.

Des Weiteren sollten bei zukünftigen Untersuchungen Thrombozyten Konzentrationsmessungen auch auf Goldquarzen durchgeführt werden. Hier gilt ebenso, wie bei Polystyrol Oberflächen, dass jede Messung auf einem neuen Quarz durchzuführen ist um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können.

4.6 Diskussion der Ergebnisse von unterschiedlichen Aktivatoren

Thrombozyten können physiologisch von einer Unzahl von Stoffen aktiviert werden. Dazu gehören ADP und Arachidonsäure, die in dieser Arbeit auf die Thrombozyten Aktivierung hin untersucht und verglichen wurden.

4.6.1 Aktivierung mittels ADP

ADP ist, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sehr gut geeignet, gesunde Thrombozyten zu aktivieren.

Sowohl auf Polystyrol- als auch auf Goldoberflächen ist bei einer Aktivierung mittels ADP sehr gut nachzuweisen, ob es sich um gesunde, funktionsfähige Thrombozyten handelt, oder ob die Thrombozyten eine gestörte Funktion haben. In dieser Arbeit wird eine Störung der Thrombozytenfunktion durch den monoklonalen Antikörper Abciximab verursacht. Nach einer Aktivierung mittels ADP entspricht der detektierte

Kurvenverlauf dann nicht dem von gesunden Thrombozyten, sondern endet nach einem initialen Frequenzabfall bei ca. 320 Hz. Es lässt sich also nach Aktivierung mit ADP, sowohl über den absoluten Frequenzabfall, wie auch über den Kurvenverlauf erkennen, ob es sich um gesunde Thrombozyten oder um Thrombozyten mit gestörter Funktion handelt.

Die Wirkung von Abciximab auf die Thrombozyten Funktion wurde in dieser Arbeit als Negativkontrolle verwendet.

4.6.2 Aktivierung mittels Arachidonsäure

Auch nach einer Aktivierung mit Arachidonsäure kann sehr gut zwischen gesunden Thrombozyten und solchen die mit Abciximab vorbehandelt wurden unterschieden werden. Es zeigt sich dies sowohl im absoluten Frequenzabfall als auch im Verlauf der Kurve der Frequenzänderung. Hier zeigen sich fast deckungsgleiche Kurvenverläufe wie bei einer Aktivierung mit ADP und auch der absolute Wert der Frequenzänderung liegt hier bei geblockten Thrombozyten um 320 Hz.

Ein weiterer großer Vorteil der Aktivierung mittels Arachidonsäure ist es, dass detektiert werden kann, ob der Patient Acetylsalicylsäure eingenommen hatte oder nicht. Über die bekannte Blockierung der Cyclooxygenase durch Acetylsalicylsäure kommt die Arachidonsäure nicht zur Wirkung und die Thrombozyten aggregieren nicht untereinander, was sich im absoluten Frequenzabfall aber auch im Kurvenverlauf deutlich zeigt.

Es ist also sehr gut mit dieser Methode möglich nachzuweisen, ob Thrombozyten eines Patienten gesund und funktionsfähig sind und ob der Patient acetylsalicylsäurehaltige Medikamente eingenommen hat oder nicht. In der späteren Praxis kann mit einem Schnelltest binnen Minuten eruiert werden, ob ein Patient gesunde funktionsfähige Thrombozyten besitzt oder auf Grund seiner geschädigten Thrombozyten nicht in der Lage ist operiert zu werden.

4.6.3 Vergleich der Aktivatoren ADP und Arachidonsäure

Beide hier untersuchte Aktivatoren erfüllen ihren Zweck schnell und effizient und die Kurvenverläufe zeigen kaum Unterschiede.

Bei der zeitlichen Abfolge der Messkurven hingegen, kann man sowohl auf Polystyrol-, als auch auf Goldoberflächen, kleine Abweichungen erkennen.

Arachidonsäure führt im Vergleich zu ADP, zu einem verzögerten Frequenzabfall. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Arachidonsäure zuerst enzymatisch in

den eigentlich wirksamen Aktivator umgewandelt werden muss. Dieser Vorgang benötigt Zeit und die Thrombozyten werden später aktiviert, was sich im Kurvenverlauf mit einer längeren Plateauphase und einem später einsetzenden Frequenzabfall deutlich macht.

Die Nachfolgenden Bilder zeigen im Vergleich den Unterschied der jeweiligen Aktivatoren bei Messungen, die mit acetylsalicylsäurehaltigem PRP durchgeführt wurden.

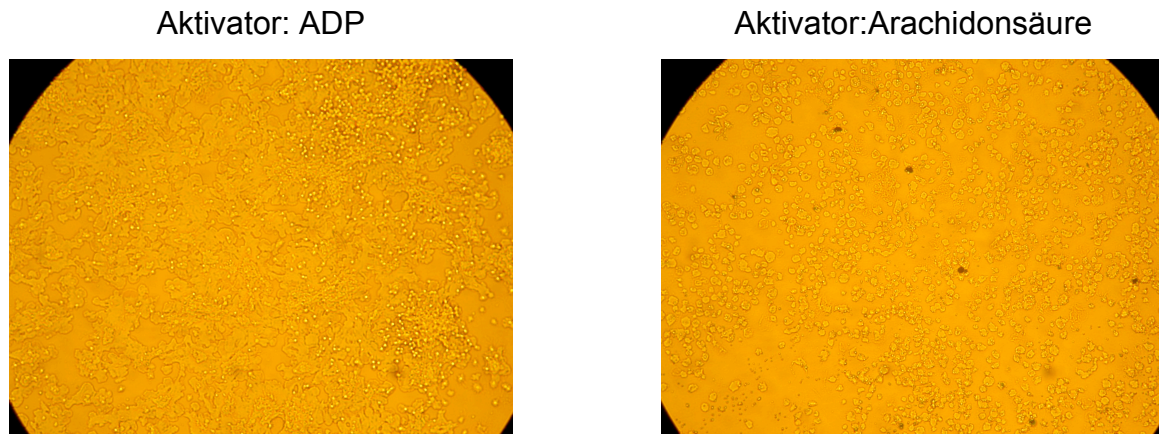


Abbildung 4-1: Vergleich von acetylsalicylsäurehaltigem PRP mit unterschiedlichen Aktivatoren, Vergrößerung 500-fach

Im linken Bild erkennt man, dass sich die Thrombozyten flach auf die Quarzoberfläche legen und sich Pseudopodien ausgebildet haben. Dies beweist, dass nach einer Aktivierung durch ADP eine Aggregation sowie eine Adhäsion der Thrombozyten auf der Quarzoberfläche erfolgt sind.

Im rechten Bild wurden die Thrombozyten mit Arachidonsäure aktiviert. Es lassen sich zwar einzelne adhärenzte Thrombozyten erkennen, jedoch fehlen in diesem lichtmikroskopischen Bild die Aggregation und die dadurch resultierende Ausbildung von Pseudopodien. Es wird der Einfluss von Acetylsalicylsäure auf den Verlauf der Aktivierung deutlich.

Je nach Fragestellung ist zu empfehlen mit ADP oder Arachidonsäure zu aktivieren. Beide Aktivatoren führen bei gesundem Blut binnen Sekunden zu einer suffizienten Aktivierung von Thrombozyten und sind zudem einfach zu handhaben.

4.7 Diskussion der Ergebnisse: Einflusses von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktionsmessung

Ischämische kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in industrialisierten Ländern dar. Thrombozyten spielen dabei, insbesondere im Rahmen akuter ischämischer Komplikationen, eine zentrale Rolle. Viele Patienten werden prophylaktisch mit acetylsalicylsäurehaltigen Medikamenten versorgt, um einem Rezidiv vorzubeugen.

Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob die Messanlage Fidge Type Fg T1 zwischen gesunden unbehandelten und kranken mit Acetylsalicylsäure behandelten Thrombozyten unterscheiden kann.

4.7.1 Unterscheidung auf Grund des Aktivators

Wie schon in Kapitel 4.6.3 beschrieben, zeigt eine acetylsalicylsäurehaltige Blutprobe, nach Aktivierung mit Arachidonsäure einen anderen Kurvenverlauf als bei gesundem Spender und auch die absoluten Werte der Frequenzänderung fallen im Schnitt 400 Hz geringer aus. Dies zeigt deutlich, dass die Anlage in der Lage ist, zwischen normalen, funktionierenden Thrombozyten und solchen mit geschädigter Funktion zu unterscheiden.

4.8 Diskussion über die Interpretation der Messwerte

Die Interpretation der Messwerte kann, obwohl sie alle auf Grundlage des gleichen Messprotokolles entstanden sind, nicht ausschließlich durch die absoluten Frequenzabfälle, als Einzelwerte passieren.

Allerdings gelingt in Zusammenschau der Frequenzänderung (des Kurvenverlaufs) mit unterschiedlich eingesetzten Aktivatoren, sehr wohl eine zuverlässige Aussage über die Thrombozytenfunktion. Diese wird durch den Vergleich der licht-, sowie der rasterelektronenmikroskopischen Bilder noch weiter gefestigt.

4.8.1 Interpretation der Kurvenverläufe

Zur Bestätigung der Messergebnisse und zur Verifizierung der Kurvenverläufe wurden Negativkontrollen durchgeführt. Die einzelnen Messungen wurden unter dem Lichtmikroskop und dem Rasterelektronenmikroskop begutachtet, um die Belegung

der Schwingquarzesoberfläche in Zusammenhang mit dem Kurvenverlauf und der absoluten Frequenzänderung zu interpretieren.

Wie auch bei anderen etablierten Analysegeräten, wie z.B. Thrombozytenaggregometrie, Thrombelastographie und Vollblutimpedanzaggregometrie, so wird auch bei dieser Messanlage für die Interpretation der Messergebnisse hauptsächlich der Kurvenverlauf herangezogen.

4.8.2 Interpretation der lichtmikroskopischen Bilder

Die lichtmikroskopischen Bilder wurden bei einer 50-500 fachen Vergrößerung beurteilt und miteinander verglichen. Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, ob die Quarzoberfläche homogen und dicht belegt war. Des Weiteren wurde, wie in Abbildung 4-1 zu sehen ist, bei der 500.fachen Vergrößerung darauf geachtet, ob die Thrombozyten Pseudopodien ausgebildet hatten und es zu einem Spreading, also einer Art Zerfließen des Thrombozyten auf der Schwingquarzoberfläche gekommen war.

4.9 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es Schwingquarzoberflächen so zu generieren, dass darauf Thrombozyten selektiv zur Adhäsion kamen und dies zu einem detektierbaren Ergebnis führte. Dadurch sollte eine Möglichkeit gefunden werden, Thrombozytenfunktionsmessungen auf Schwingquarzen durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde mit zwei Arten von Beschichtungen experimentiert. Zum einen wurden polystyrolbeschichtete Quarzoberflächen verwendet, zum anderen Quarze, die eine unbeschichtete Goldelektrode aufwiesen.

Da beide Beschichtungen vergleichbare Ergebnisse liefern, ist es im Blick auf die Ökonomie und Ökologie sinnvoll, im Routinebetrieb, auf eine zusätzliche Beschichtung zu verzichten und folglich auf der unbeschichteten Goldelektrode eines Schwingquarzes zu messen.

Bei der Thrombozytenfunktionsmessung konnte auf beiden Oberflächen sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Durch Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, mittels monoklonalen Antikörper Abciximab, wurde zum einen gezeigt, dass die Aggregation der Thrombozyten gehemmt wird. Zum anderen, dass die Schwingquarzmethode in der Lage ist, zwischen funktionsfähigen und pathologisch veränderten Thrombozyten deutlich zu unterscheiden

Eine weitere Fähigkeit der Fidge Type Anlage ist es, bei Aktivierung mit Arachidonsäure, zu unterscheiden, ob der Spender acetylsalicylsäurehaltige Medikamente eingenommen hat oder nicht.

In weiteren Messungen wurde versucht, über den detektierten initialen Frequenzabfall, die in der Blutprobe enthaltene Thrombozytenzahl zu bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Messreihe konnten zwar nicht eindeutig beweisen, dass ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten-Zahl und initialem Frequenzabfall besteht, jedoch zeichnet sich eine Tendenz ab, die darauf hindeutet, dass ein Zusammenhang besteht und, dass dieser Zusammenhang mittels der Schwingquarzsensoren dargestellt werden kann.

5 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ARA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
bidest.	Bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
COX	Cyclooxygenase
d.h.	das heißt
Δf	Frequenzänderung
Ggf.	gegebenenfalls
GP	Glykoprotein
$\Delta \Gamma$	Dämpfungsänderung
Min.	Minuten
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
PPP	Platelette Pour Plasma
PRP	Platelette Rich Plasma
PRP/ASS	Platelette Rich Plasma bei Einnahme von Acetylsalicylsäure
PS	Polystyrol
QCM	Quartz–Crystal–Microbalance
s	Sekunde / Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sog.	so genannt
s.u.	siehe unten
Tris-NaCl	Tris-NaCl-Puffer
TZ	Thrombozyt / Thrombozyten
TZ/ μ l	Thrombozyten pro Mikroliter
u.a.	unter anderem
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel

6 Abbildungen

Abbildung 1-1: Gerinnungskaskade [16].....	10
Abbildung 1-2: Prinzip der Thrombozyten-Aggregometrie nach Born [17]	12
Abbildung 1-3: Prinzip der (Rotations-)Thrombelastometrie (ROTEM®) [24].....	13
Abbildung 1-5: Prinzip der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie (Multiplate®) [19]	14
Abbildung 1-6: Fidget Type Fg T1-Anlage im Überblick	17
Abbildung 1-7: Quarzhalterung mit Quarz und Messkammer im geöffneten Zustand	17
Abbildung 2-1: Arbeitsschritte beim Einkleben des Quarzes in den Haltering.....	23
Abbildung 2-2: Darstellung der einzelnen Kurvenverläufe der Messwertaufzeichnung	26
Abbildung 3-1: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.1, Quarz PS 1	30
Abbildung 3-2: QCM nach Messung 3.1.1.1, Quarz PS 1, Vergrößerung 50x	30
Abbildung 3-3: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.2, Quarz PS 2	33
Abbildung 3-4: QCM nach Messung 3.1.1.2, Quarz PS 2, Vergrößerung 50x	33
Abbildung 3-5: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.1.3, Quarz PS 3	35
Abbildung 3-6: QCM nach Messung 3.1.1.3, Quarz PS 3, Vergrößerung 50x	35
Abbildung 3-7: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.2	37
Abbildung 3-8: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.2.4	39
Abbildung 3-9: Lichtmikroskopischer Vergleich der Messungen 3.1.2.4, Vergrößerung 50-fach	40
Abbildung 3-10: $\Delta f_{\text{initial}}$ bei verschiedenen Thrombozyten-Konzentrationen	44
Abbildung 3-11: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.4.1, Quarz PS 14	47
Abbildung 3-12: QCM nach Messung 3.1.4.1, Quarz PS 14, Vergrößerung 100x	47
Abbildung 3-13: Kurvenverlauf nach Messung 3.1.4.2, Quarz PS 15	48
Abbildung 3-14: QCM nach Messung 3.1.4.2, Quarz PS 15, Vergrößerung 100x	49
Abbildung 3-15: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.1.5 [18] ..	51
Abbildung 3-16: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen [18]	51
Abbildung 3-17: Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach): Vergleich der ADP-induzierten Aktivierbarkeit von PRP eines gesunden Spenders im Vergleich zu einem Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure.....	52

Abbildung 3-18: Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 100-fach): Vergleich der Arachidonsäure-induzierten Aktivierbarkeit von PRP eines gesunden Spenders im Vergleich zu einem Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure.	53
Abbildung 3-19: links: QCM nach Messung 3.1.5.1b, Quarz PS 17, Vergrößerung 500x. rechts: QCM nach Messung 3.1.5.2b, Quarz PS 19, Vergrößerung 500x.	54
Abbildung 3-20: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP auf PS.....	55
Abbildung 3-21: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ARA auf PS.....	56
Abbildung 3-22: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.1.1, Quarz Gold 1	58
Abbildung 3-23: QCM nach Messung 3.2.1.1, Quarz Gold 1, Vergrößerung 50x	58
Abbildung 3-24: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.1, Quarz Gold 2.....	60
Abbildung 3-25: QCM nach Messung 3.2.2.1, Quarz Gold 2, Vergrößerung 50x	60
Abbildung 3-26: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP auf Gold.....	61
Abbildung 3-27: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.2, Quarz Gold 3.....	62
Abbildung 3-28: QCM nach Messung 3.2.2.2, Quarz Gold 3, Vergrößerung 50x	63
Abbildung 3-29: REM-Aufnahme: gesunde Thrombozyten nach Aktivierung mit ARA auf Gold.....	64
Abbildung 3-30: Kurvenverlauf nach Messung 3.2.2.3, Quarz Gold 4.....	65
Abbildung 3-31: QCM nach Messung 3.2.2.3, Quarz Gold 4, Vergrößerung 50x	66
Abbildung 3-32: Zusammenfassung der Kurvenverläufe nach Messung 3.2.3 [18] ..	68
Abbildung 3-33: Zeitlicher Verlauf der Aggregationskurven nach Born als Referenz zu den Schwingquarzmessungen 3.2.3 [18]	68
Abbildung 3-34: Lichtmikroskopischer Vergleich der Messungen 3.2.3, Vergrößerung 50-fach	69
Abbildung 3-35: QCM nach Regeneration, Quarz Gold 1, Vergrößerung 50x	71
Abbildung 4-1: Vergleich von acetylsalicylsäurehaltigem PRP mit unterschiedlichen Aktivatoren, Vergrößerung 500-fach	81

7 Tabellen

Tabelle 1-1: Einige Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula und ihre Funktion [12]	7
Tabelle 1-2: Gerinnungsfaktoren [12]	9
Tabelle 2-1: Beispiel Messprotokoll	25
Tabelle 3-1: Messprotokoll 3.1.1.1	29
Tabelle 3-2: Messprotokoll 3.1.1.2	32
Tabelle 3-3: Messprotokoll 3.1.1.3	34
Tabelle 3-4: Messprotokoll 3.1.2.1	36
Tabelle 3-5: Messprotokoll 3.1.2.2	37
Tabelle 3-6: Messprotokoll 3.1.2.3	37
Tabelle 3-7: Messprotokoll 3.1.2.4-1	38
Tabelle 3-8: Messprotokoll 3.1.2.4-2	38
Tabelle 3-9: Messprotokoll 3.1.3.1	42
Tabelle 3-10: Messprotokoll 3.1.3.2	42
Tabelle 3-11: Messprotokoll 3.1.3.3	43
Tabelle 3-12: Messprotokoll 3.1.4.1	46
Tabelle 3-13: Messprotokoll 3.1.4.2	48
Tabelle 3-14: Messprotokoll 3.1.5.1	50
Tabelle 3-15: Messprotokoll 3.1.5.2	50
Tabelle 3-16: Messprotokoll 3.2.1.1	57
Tabelle 3-17: Messprotokoll 3.2.2.1	59
Tabelle 3-18: Messprotokoll 3.2.2.2	62
Tabelle 3-19: Messprotokoll 3.2.2.3	65
Tabelle 3-20: Messprotokoll 3.2.3.1	67
Tabelle 3-21: Messprotokoll 3.2.3.2	67
Tabelle 4-1: Vergleich der Messverfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung [2].	72

8 Literaturverzeichnis

- [1] Ballantine D WR, Martin S (1997). Acoustic Wave Sensors. Academic Press, San Diego
- [2] Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase. J Lab Med 2007;31(6):239–247
- [3] Cardinal DC, Flower RJ (1980). The electronic aggregometer: A novel device for assess-ing platelet behavior in blood. J Pharmacol Methods 3 135-158
- [4] Claußen J: Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren. Med. Diss. Tübingen 2008
- [5] Cluss S: Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten. Med. Diss. Tübingen 2006
- [6] Döring J: Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor. Med. Diss. Tübingen 2008
- [7] Gehring FK (2005). Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. Göttingen: Cuvillier Verlag
- [8] Grate J, Frye G (1992). Acoustic wave sensors, update. Weinheim
- [9] Grate J, Martin S, White R (1993). Acoustic wave microsensors: part I. Anal Chem 65: 940-5
- [10] Hartert H (1948) Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin Wochenschr 26 577-583
- [11] Horn F, Moc I, Schneider N, Gillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G (2005). Biochemie des Menschen. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag
- [12] Huppelsberg J, Walter K (2005). Kurzlehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [13] Klinker R, Pape H, Silbernagl S (2005). Lehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [14] Kratzer MAA, Bellucci S, Caen JP (1985) Detection of abnormal platelet functions with an in vitro model of primary haemostasis. Haemostasis 15: 363-370
- [15] Kratzer MAA, Born GVR (1985) Simulation of haemostasis in vitro. Haemostasis 15: 357-362
- [16] Lutze G (2006). Wissenswertes zur Gerinnung. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH
- [17] möLAB® Thrombozytenfunktionsdiagnostik und therapeutischen Medikamentenmonitoring, möLAB GmbH, Langenfeld, S.11
- [18] Müller L: Schwingquarze als Hämostase-Sensoren – Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut. Med. Diss. Tübingen 2009
- [19] Multiplate® Umfassende Thrombozytendiagnostik, Dynabyte GmbH, München
- [20] Neubig B, Briese W (1997). Das große Quarzkochbuch. Poing: Franzis Verlag, Poing
- [21] Neumann HA (2007). Das Gerinnungssystem, Physiologie und Pathophysiologie. Eine Einführung. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag
- [22] O’Sullivan C, Gibault G (1999). Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications. Biosens Bioelectron 14: 663-70

- [23] Rickert J, Hayward G, Cavic B, Thopson M, Göpel W (1999). Biosensor based on acoustic wave devices. Weinheim: Wiley VCH, Weinheim
- [24] Rotem Manual, Bediener Handbuch, Vollblut-Gerinnungsanalyse basierend auf der Thromboelastometrie. 2006-04 Pentapharm GmbH
- [25] Scheufele B (2008). Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen. Göttingen: Cuvillier Verlag
- [26] Schmidt S: Bestimmung optimaler Parameter für Thrombozytenfunktionsmessungen mittels Schwingquarzen und deren Regeneration. Med. Diss. Tübingen 2009
- [27] Schoch M: Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren. Med. Diss. Tübingen 2008
- [28] Schumacher R (1999). Die Schwingquarzmethode - ein sensibles Messprinzip mit breitem Anwendungsspektrum. Chemie in unserer Zeit 33: 268-78
- [29] Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, Latour A, Oliver JA, Hoffman M, Smithies O, Koller BH, Coffman TM (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. J Clin Invest 102 1994-2001

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Durchführung und Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff danke ich, für die Möglichkeit im Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin meine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Herrn Dr. rer. nat. Frank K. Gehring danke ich, für die anspruchsvolle und interessante Thematik der Dissertation, seine stete Hilfsbereitschaft und die intensiven Diskussionen.

Cand. med. Steffen Schmidt danke ich sehr, für die direkte und unkomplizierte Zusammenarbeit, die vielen fachlichen Gespräche und kontinuierliche gegenseitige Motivation, sowie die Freundschaft, die sich im Laufe dieses Studiums entwickelt und durch die Dissertation gefestigt hat.

Dipl.-Chem. Lothar Müller danke ich, für die Einweisung an der Anlage und die schnelle, unkomplizierte und effektive Hilfe bei technischen sowie fachlichen Problemen.

Meiner ganzen Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken. Besonders Dr. Hartmut Drechsel für die kompetente Lösung aller EDV-Probleme und Dipl.-Biol. Daniela Kömpf für die moralische Unterstützung.

Den Mitarbeiterinnen des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin danke ich, für die unkomplizierte Organisation der Blutproben.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich meinem Kommilitonen Robert Exner.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Freundin Paula, die meiner Arbeit zu jeder Zeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Koch
Vorname: Joachim
Geburtsdatum: 10. 03. 1977
Geburtsort: Esslingen am Neckar
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1987 Grundschule Zizishausen
1987 – 1993 Neckar Realschule Nürtingen
1996 – 1998 Philipp-Matthäus-Hahn Schule (Technische Oberschule)

beruflicher Werdegang:

1993 – 1996 Schreiner Ausbildung
1998 – 1999 Zivildienst im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Nürtingen
2000 Schreiner Geselle
2001 Theoretische Ausbildung zum Rettungsassistenten in der Landesschule des Deutschen Roten Kreuzes Pfalzgrafenweiler
2001 – 2002 Anerkennungspraktikum zum Rettungsassistenten beim Deutschen Roten Kreuz Nürtingen
2002 – 2005 Rettungsassistent beim Deutschen Roten Kreuz Nürtingen
Ab 2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
28.03.2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.05.2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung