

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

**Bestimmung optimaler Parameter für  
Thrombozytenfunktionsmessungen mittels  
Schwingquarzen und deren Regeneration**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Steffen Schmidt**

**aus Freiburg**

**2011**

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

**Bestimmung optimaler Parameter für  
Thrombozytenfunktionsmessungen mittels  
Schwingquarzen und deren Regeneration**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Steffen Schmidt**

**aus Freiburg**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichtstatter: Professor D. M. Keusgen



Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit vom 05.12.2007 bis 06.07.2009 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 Prof. Dr. Keusgen, Universität Marburg übernommen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung.....	1
2.2	Blut – Zusammensetzung und Funktion.....	2
1.1.1	Erythrozyten.....	2
1.1.2	Leukozyten.....	2
1.1.3	Thrombozyten.....	3
1.1.4	Hämostase.....	4
1.1.5	Einfluss der Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Hämostase.....	8
1.2	Thrombozytenfunktionsmessung – Stand der Technik.....	8
1.2.1	Thrombozyten-Aggregometrie.....	8
1.2.2	Thrombelastographie.....	9
1.2.3	Vollblut-Impedanz-Aggregometrie.....	10
1.3	Thrombozytenfunktionsmessung mit Schwingquarzsensoren.....	11
1.3.1	Massensensitive Sensoren.....	11
1.3.2	Schwingquarze (QCM).....	12
1.3.3	Schwingquarze als Thrombozytensensor.....	12
1.4	Analysegerät zur Thrombozytenfunktionsmessung.....	13
1.5	Dummy – System.....	15
1.6	Ziel der Arbeit.....	16
2	Material und Messmethode.....	17
3.1	Material.....	17
2.1.1	Labormaterialien und Geräte.....	17
2.1.2	Chemikalien / Reagenzien.....	17
2.1.3	Blut und Plasma.....	19
2.1.4	Schwingquarz.....	19
2.1.5	Dummy–Messzelle.....	20
2.1.6	Messanlage.....	20
2.2	Messmethode.....	21
2.2.1	Quarzpräparation.....	21
2.2.2	Herstellung des Platelette Rich Plasma.....	22
2.2.3	Thrombozytenfunktionsmessung in der Anlage.....	22
2.3	Regenerationsmedien.....	24
2.3.1	Trypsin-EDTA zur Regeneration.....	24

## Inhalt

2.3.2	Natronlauge zur Regeneration .....	24
2.3.3	Sodium-Dodecyl-Sulfat zur Regeneration.....	24
2.3.4	Salzsäure zur Regeneration .....	25
2.4	Quarzregeneration im Dummy .....	25
2.5	Quarzregeneration in der Anlage .....	26
3	Ergebnisse .....	28
3.1	Polystyrol beschichtete Quarze.....	28
3.1.1	Regeneration PS beschichteter Quarze im Dummy .....	28
3.1.2	Regeneration PS beschichteter Quarze in der Anlage .....	41
3.2	Unbeschichtete Quarze.....	44
3.2.1	Regeneration unbeschichteter Quarze im Dummy .....	44
3.2.2	Regeneration unbeschichteter Quarze in der Anlage .....	48
3.3	Thrombozytenfunktionsmessung .....	50
3.3.1	Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold .....	51
3.3.2	Thrombozytenfunktionsmessungen auf PS .....	56
4	Zusammenfassung und Diskussion .....	64
4.1	Vergleich mit dem Stand der Technik .....	64
4.2	Beschichtung.....	66
4.3	Regeneration.....	66
4.3.1	Regeneration im Dummy .....	67
4.3.2	Regeneration in der Anlage .....	68
4.3.3	Übertragbarkeit auf ein automatisches Messgerät .....	72
4.4	Thrombozytenfunktionsmessung .....	72
4.4.1	Thrombozytenfunktionsmessung auf Gold .....	72
4.4.2	Thrombozytenfunktionsmessung auf PS .....	73
4.4.3	Vergleich von PS beschichteten und unbeschichteten Quarzen .....	74
4.5	Interpretation der Messwerte .....	75
4.6	Zusammenfassung.....	76
5	Abkürzungen .....	77
6	Abbildungen und Tabellen.....	78
7	Literaturverzeichnis .....	81
8	Danksagung .....	84
9	Lebenslauf.....	85

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Giulio Bizzozero (1846 – 1901) beschreibt in seinem Aufsatz über einen „Neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung“ 1882 zum ersten Mal die Bedeutung der Blutplättchen für die Blutgerinnung. [2]

Blutplättchen (Thrombozyten) sind Abschnürungen von Megakaryozyten des Knochenmarks. Sie sind die kleinsten Blutkörperchen (etwa 1,4  $\mu\text{m}$  Durchmesser), ihre Zahl in  $1\text{mm}^3$  beträgt 150000 – 450000.

Anzahl und Funktion der Blutplättchen spielen heute in vielen Bereichen der Medizin eine wichtige Rolle.

So treten Thrombozytopenien (Mangel an Thrombozyten), zum Beispiel bei Leukämien, Leberzirrhose, Infektionskrankheiten wie Malaria aber auch bei Therapie mit Heparin (Heparin-induzierte-Thrombozytopenie), in vielfältiger Weise auf.

Funktionsstörungen in Form von Thrombozytopathien treten durch Medikamente (Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Heparin, Penicillin, Chemotherapeutika, u.v.a.), Vergiftungen und erblich bedingte Syndrome (z.B. von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) auf.

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 Schwingquarzen, sowie die Wiederverwendbarkeit des zur Messung eingesetzten Schwingquarzes untersucht.

Zunächst werden die biologischen und technischen Grundlagen der Thrombozytenfunktionsmessung sowie verschiedene Methoden zu ihrer Messung vorgestellt. Darauf folgt die Beschreibung der neu entwickelten Technik zur Thrombozytenfunktionsmessung über ein Schwingquarzanalysesystem und die Darstellung der Technik des sog. Dummy-Systems. Mit Hilfe des Dummy-Systems kann die Regeneration der Quarzbeschichtung, auch ohne den Einsatz des umfangreichen Schwingquarzanalysesystems, getestet und optimiert werden. Die

Versuche mit dem Schwingquarzanalysesystem sollen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Einsatz im neuen Messverfahren darstellen.

### **1.2 Blut – Zusammensetzung und Funktion**

Ein erwachsener Mensch besitzt etwa 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 pH – Wertes und der 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.

#### **1.2.1 Erythrozyten**

Erythrozyten (gr. erythros = rot) werden im Knochenmark, aus kernhaltigen Vorstufen gebildet. Sie verlieren 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  $\mu\text{l}$  Blut. Ihre Lebensdauer beträgt ca. 120 Tage, dann werden sie vor allem in der roten Pulpa der Milz im Rahmen der so genannten Blutmauserung abgebaut. [14]

#### **1.2.2 Leukozyten**

Die Leukozyten (weiße Blutzellen) werden über mehrere Vorstufen aus Stammzellen im Knochenmark gebildet. Man unterscheidet zwei Hauptdifferenzierungswege. Einerseits die Zellen der lymphatischen Reihe, dazu gehören die Zellen der spezifischen Abwehr (Lymphozyten) und die natürlichen Killerzellen. Andererseits die Zellen der myeloischen Reihe, dazu gehören die Zellen der unspezifischen Abwehr (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen) sowie die Erythrozyten und die Thrombozyten.

Ein gesunder Erwachsener hat zwischen 4000 und 9500 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut. Die wesentlichen Aufgaben der 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.

### 1.2.3 Thrombozyten

Thrombozyten, oder auch Blutplättchen sind die kleinsten korpuskulären Anteile des Blutes, die man unter dem Lichtmikroskop gerade noch erkennen kann.

Thrombozyten haben einen Durchmesser von ca. 1,4  $\mu\text{m}$ , sind farblos und von flacher, unregelmäßiger, scheiben- bis spindelförmiger Gestalt.

Thrombozyten gehen aus kernhaltigen Stammzellen des Knochenmarks hervor, besitzen jedoch selbst keinen Kern. Die Differenzierung von der Stammzelle über den Megakaryozyten bis zum fertigen Thrombozyten geht unter dem Einfluss von Thrombopoetin vonstatten. Thrombopoetin wird in der Niere der Leber und dem Knochenmark gebildet.

Ein gesunder Erwachsener besitzt zwischen 150 – 450 Tausend Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut. Wobei die im Blut kreisenden Thrombozyten nur etwa zwei Drittel der tatsächlich vorhandenen Thrombozyten ausmachen. Ein Drittel wird in der Milz gespeichert und steht mit den plasmatischen Thrombozyten im Austausch. Die Überlebenszeit der Thrombozyten beträgt 8 - 12 Tage, abgebaut werden sie zum größten Teil in der Milz.

Sie enthalten Granula, die wichtige Substanzen der Blutgerinnung enthalten. 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/IIa – Rezeptor (auch Kollagenrezeptor) sowie der GPIIb/IIIa – Rezeptor. Da der GPIIb/IIIa – Rezeptor in erster Linie Fibrinogen bindet wird er auch Fibrinogenrezeptor genannt. Eine zentrale Rolle bei der Adhäsion spielt auch der von-Willebrand-Faktor, 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  $\text{Ca}^{2+}$  - Einstrom, die intrathrombozytäre  $\text{Ca}^{2+}$  - Freisetzung sowie die Formveränderung und die Aggregation der Thrombozyten vermittelt.

## Einleitung

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist die Gewährleistung eines ordnungsgemäßen Blutflusses, bzw. die Vermeidung größerer Blutverluste durch Bildung eines Thrombus.

Kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten z.B. über ADP so reagieren diese mit der Aktivierung der Adhäsionsrezeptoren, Schwellung und Ausbildung von Pseudopodien (Faden- und dornförmige Fortsätze zur Vernetzung) und Aggregation untereinander (im Wesentlichen durch den GPIIb/IIIa – Rezeptor und Fibrinogen). 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).

Thrombozyten werden durch unverletztes Endothel nicht aktiviert. 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. [16]

### 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. Die Gefäßkontraktion und die Thrombozytenaggregation bilden die primäre Hämostase, die Gerinnungsfaktoren, die über eine Gerinnungskaskade letztlich zu einem mechanisch stabilem Fibringerüst führen bilden die sekundäre Hämostase. [16]

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 in eine vaskuläre und eine thrombozytäre Phase aufgeteilt.

Die vaskuläre Phase, also die Vasokonstriktion entsteht zum einen reaktiv durch die Freilegung von Kollagenfasern in der verletzten Gefäßwand, zum andern durch

## Einleitung

Mediatoren (Serotonin, Thromboxan  $A_2$ ), die aktivierte Thrombozyten an der Verletzungsstelle freisetzen. [15]

In der thrombozytären Phase wird als weiterführende Maßnahme nach der Vasokonstriktion der Gefäßdefekt durch einen so genannten weißen Thrombus verschlossen.

Die bei der Gefäßwandverletzung freigelegten endothelialen Kollagenfasern, dienen den Thrombozyten als Bindungsstellen, an denen Sie sich sofort anheften. Die Anheftung erfolgt mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors und dem GPIIb/IIIa – Komplex. Durch diese Anheftung werden die Thrombozyten selbst aktiviert und geben den Inhalt ihrer Granula frei. Gleichzeitig verändern sie ihre ehemalige Scheibenform zu einer kugeligen und bilden Pseudopodien aus, die es den aggregierten Thrombozyten ermöglichen, in einen verzahnten Kontakt zu treten.

### 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. 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 verstehen. Hierbei sind die in folgender Tabelle aufgelisteten Gerinnungsfaktoren beteiligt.

**Tabelle 1-1:Gerinnungsfaktoren**

<b>Faktor Nr.</b>	<b>Name</b>
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebethromboplastin
IV	ionisiertes Ca <sup>2+</sup>
V	Akzeleratorglobulin
VI	entspricht aktiviertem Faktor V
VII	Proconvertin
VIII	Antihämophiles Globulin A
IX	Antihämophiles Globulin B (Christmas-Faktor)
X	Stuart-Prower-Faktor
XI	Plasma-Thromboplastin-Antecedent (PTA)
XII	Hageman-Faktor
XIII	Fibrinstabilisierender-Faktor (FSF)
PK	Präkallikrein (Flethcer-Faktor)
HMWK	High Molecular Weight Kininogen (Fitzgerald-Faktor)
PL	Phospolipide
Fibrin s	lösliches Fibrin
Fibrin i	unlösliches Fibrin
a	aktiviert

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.

Prinzipiell kann der Gerinnungsvorgang über einen exogenen oder einen endogenen Aktivierungsmechanismus ausgelöst werden. In vivo werden im Regelfall beide Mechanismen gestartet, allerdings lassen sich in vitro die beiden Systeme über spezifische Aktivatoren trennen.

## Einleitung

In die intrinsische Aktivierung sind die Faktoren XII, XI, PK und HMWK einbezogen. 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 – Ca<sup>2+</sup>) erforderlich, wobei die Bindung über Ca<sup>2+</sup>-Ionen vermittelt wird.

Die extrinsische Aktivierung durch Gewebsthromboplastin führt zu dem Komplex (VIIa – PL – Ca<sup>2+</sup>). 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 – Ca<sup>2+</sup>) und der Komplex (VIIa – PL – Ca<sup>2+</sup>) aktivieren den Faktor X. Faktor X ist die zentrale Stelle bei der Verbindung zwischen endogenem und exogenem System, die darauf folgenden Reaktionen sind bei beiden Wegen gleich.

Der Prothrombinase-Komplex (Xa – Va – PL – Ca<sup>2+</sup>) 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 die Bildung des unlöslichen Fibringerinnsels (Fibrin i). [21]

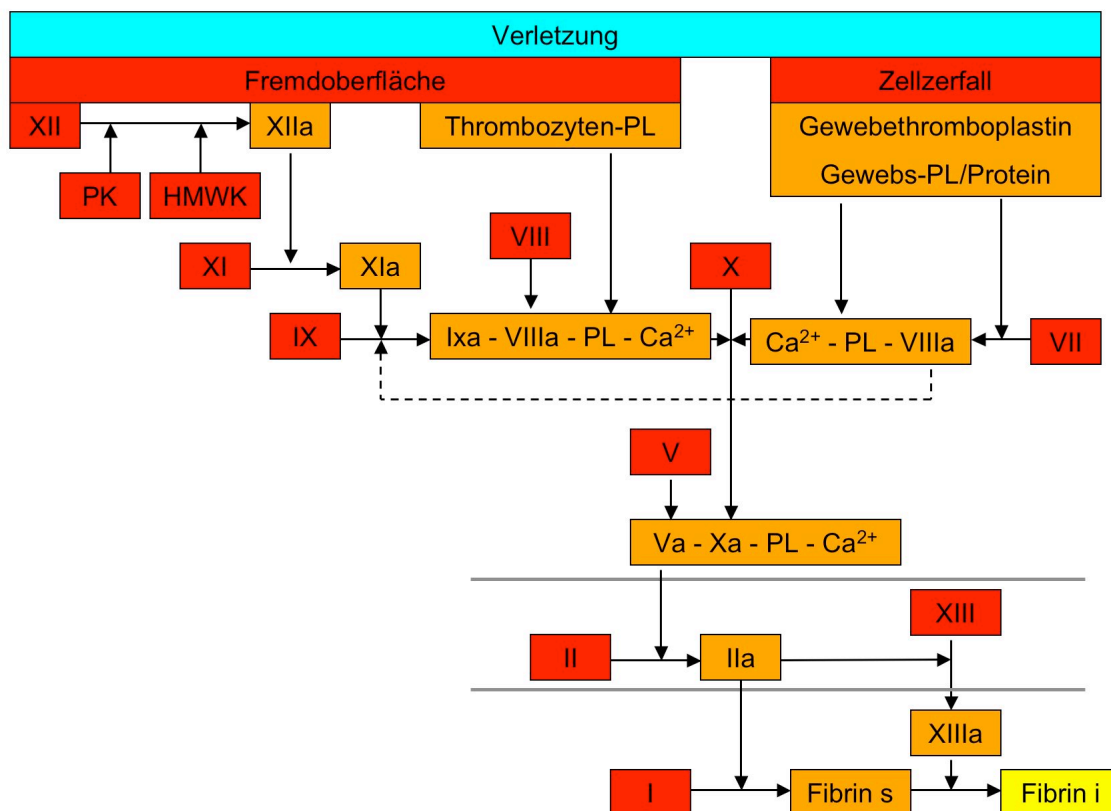


Abbildung 1-1: Gerinnungskaskade [21]

### **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 A<sub>2</sub>-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. [32]

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 wurde ursprünglich von Kratzer und Born beschrieben (siehe Abb. 2-2). [19, 20]

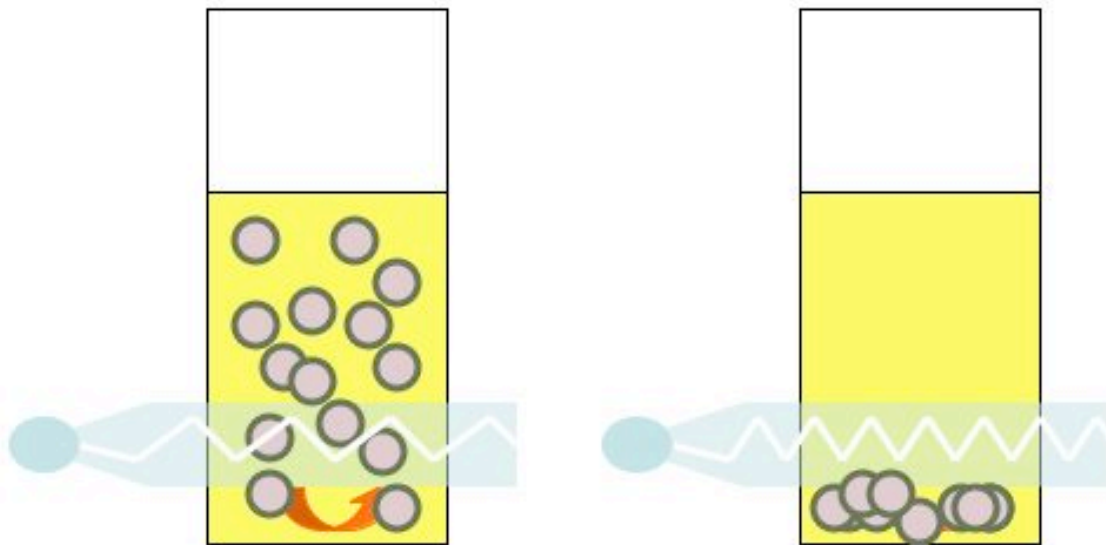
Nach Stimulation der Aggregation im thrombozytenreichen Plasma (PRP) mit ADP, Collagen, Arachidonsäure, Epinephrin oder Ristocetin wird die Differenz der Intensität der Lichttransmission zwischen dem thrombozytenarmen Plasma (PPP) und dem PRP einer Blutprobe registriert und prozentual berechnet.

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

## Einleitung

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.

Folgende Abbildung zeigt das Prinzip der Messung. Links sind die Thrombozyten noch nicht aktiviert. Rechts bilden die aktivierten Thrombozyten Aggregate. Die unterschiedliche Lichttransmission in Abhängigkeit der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten dient als Messsignal.



**Abbildung 1-2: Prinzip der Thrombozyten-Aggregometrie nach Born [22]**

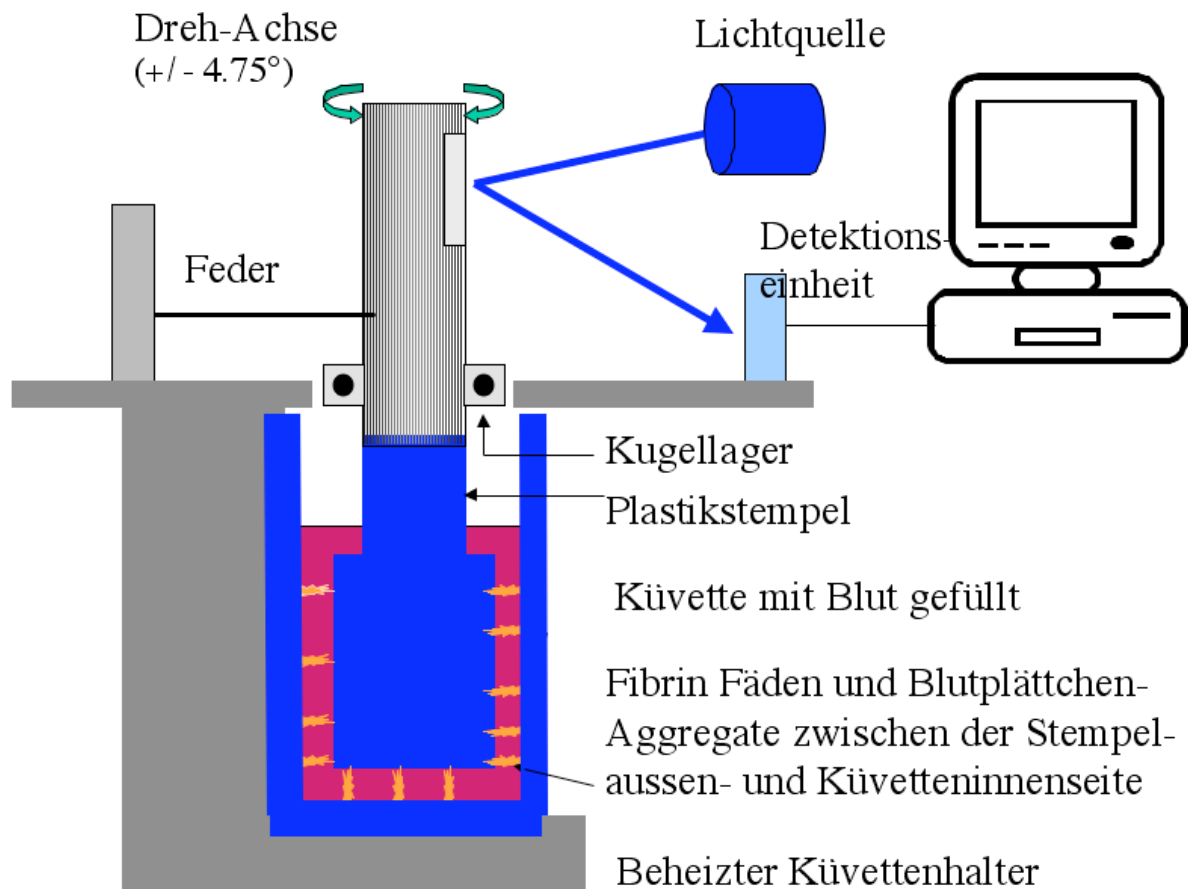
### 1.3.2 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie ist eine bereits 1948 von Hartert 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, der 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. [12]

Das RoTEM-System (Rotations-Thrombelastographie, Pentapharm GmbH, München, Abb. 2-3) ist eine Weiterentwicklung des klassischen Thrombelastographie-Systems mit moderner Computertechnik. 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).



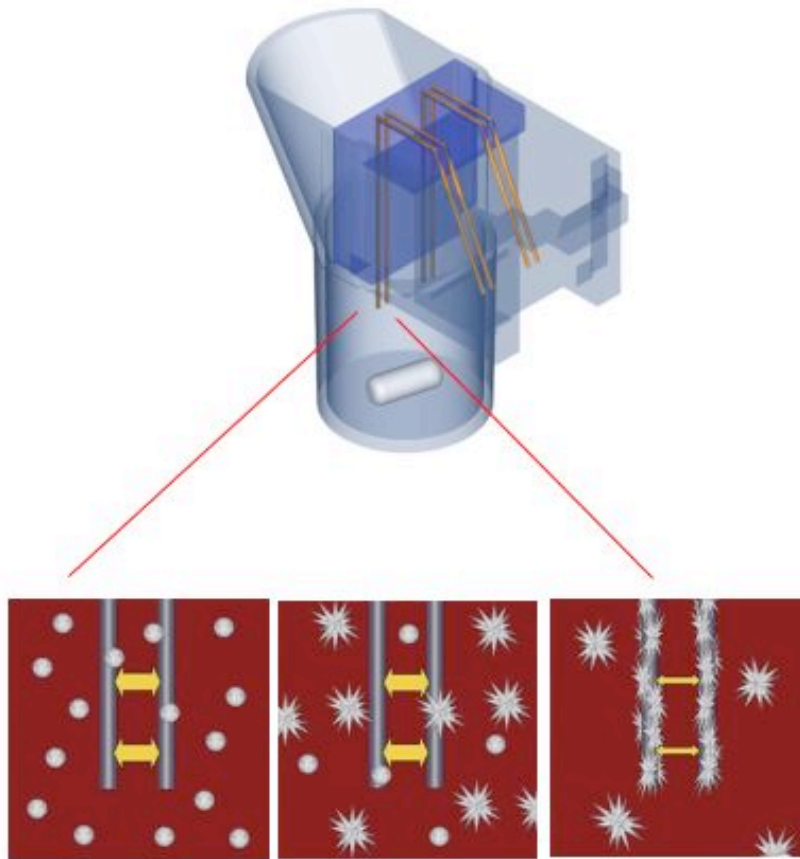
**Abbildung 1-3: Prinzip der (Rotations-)Thromboelastometrie (ROTEM®) [28]**

### 1.3.3 Vollblut-Impedanz-Aggregometrie

Die Impedanz-Aggregometrie wurde zu Beginn der achtziger Jahre von Cardinal et al. vorgestellt. [5]

Dabei werden in die Blutprobe zwei parallel positionierte Drähte, die als Elektroden dienen, eingetaucht (siehe Abb. 2-4). 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. Adenosindiphosphat (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 Analyzer (Multiplate®, Dynabyte GmbH, München) basiert auf diesem Prinzip.



**Abbildung 1-4: Prinzip der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie (Multiplate®) [24]**

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)

Messwertumsetzer auf Basis akustischer Sensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Substrat, dem eigentlichen Schwingquarz, auf das Metallelektroden aufgebracht sind. 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. Dieser besteht darin, dass bei Ausübung von mechanischer Spannung auf eine Oberfläche eines speziellen Festkörpers (wie z.B.  $\alpha$ -Quarze) elektrische Oberflächenladungen erzeugt werden. Diese Ladungen kann man mit einem Elektrometer, das an der Kristalloberfläche angebracht ist messen. Da der Piezoeffekt reversibel ist, kann man durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung den Quarz mechanisch zum Schwingen anregen.

Ein Schwingquarz ist ein Quarzkristallscheibchen, das eine bestimmte Geometrie und einen speziellen Kristallschnitt besitzt. An die aufgedampften Goldelektroden wird eine elektrische Wechselspannung angelegt. Dadurch entsteht im Inneren der Quarzscheibe eine transversale Scherwelle, die auch in an die Oberflächen angrenzende Medien evaneszent eindringt. Ein Schwingquarz besitzt eine 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“. [1, 9, 10, 11, 25, 26, 27, 31]

### 1.4.3 Schwingquarze als Thrombozytensensor

Die Messmethode mittels Schwingquarzen wurde bereits als Immunosensoren zur Blutgruppenanalytik genutzt. [6, 7, 8, 9, 29, 30]

Die Thrombozyten-Aggregometrie mit einem Schwingquarz-Biosensor basiert auf einem Schwingquarz, dessen Oberfläche thrombophilisiert wird, 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 einen anderen Aktivator, aktiviert und binden an die Oberfläche des Schwingquarzes. Die Veränderung auf der Quarzoberfläche verursacht eine messbare Resonanzfrequenzänderung.

Einer der wichtigsten Faktoren für eine erfolgreiche Biosensorik ist die Beschichtung. Die Erprobung einer Schicht für einen Biosensor zur Thrombozytenfunktionsmessung, wurde durch Koch beschrieben. Das Anbinden von Thrombozyten gelingt demnach auf Gold- und Polystyrolbeschichtungen mit gut verwertbaren Messsignalen. [17]

### **1.5 Analysegerät zur Thrombozytenfunktionsmessung**

Die von Gehring entwickelte Fidget-Type Fg T1 (Mess – Anlage) 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. Ein speziell entwickeltes Computerprogramm registriert die Frequenzänderungen des Schwingquarzes und stellt diese graphisch dar. Die Fluidik des Systems ist so aufgebaut, dass minimale Analytmengen ausreichen. 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. [9]

## Einleitung

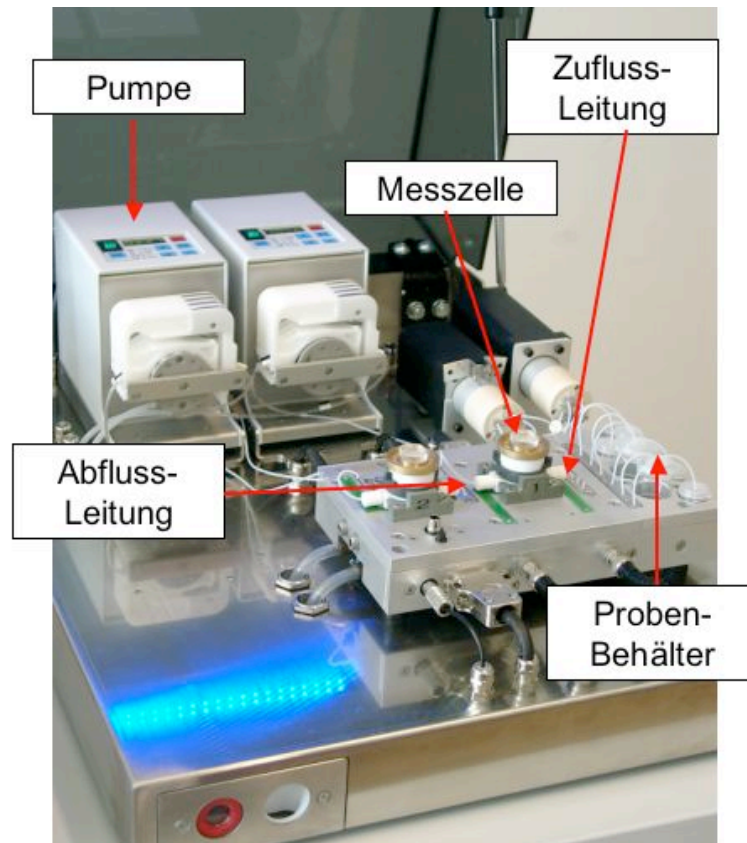


Abbildung 1-5: Fidget-Type Fg T1 (Anlage im Überblick)

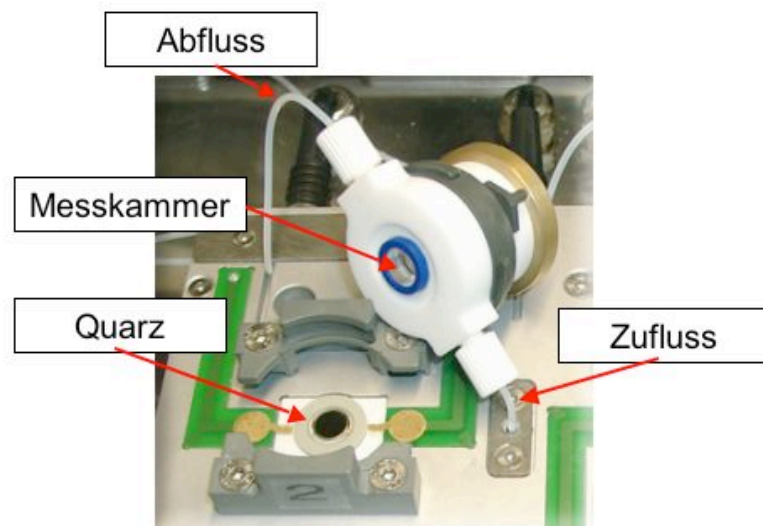


Abbildung 1-6: Quarzhalterung mit Quarz und Messkammer

## 1.6 Dummy – System

Das Dummy-System besteht aus einer Messzelle, in die ein Schwingquarz eingebaut wird. Die Konstruktion und die Maße dieser Zelle sind identisch mit denen der 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 des Fg T1. Sie besteht ebenfalls aus biokompatiblen Materialien, wie z.B. Teflon. Ein Schlauchsystem fördert über eine Pumpe den Analyt 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 wird beim Dummy optisch bzw. visuell, mittels Mikroskop ermittelt. Notwendige Versuchsserien zur Optimierung und Weiterentwicklung von Beschichtungen und deren Regeneration können mit seiner Hilfe durchgeführt werden.

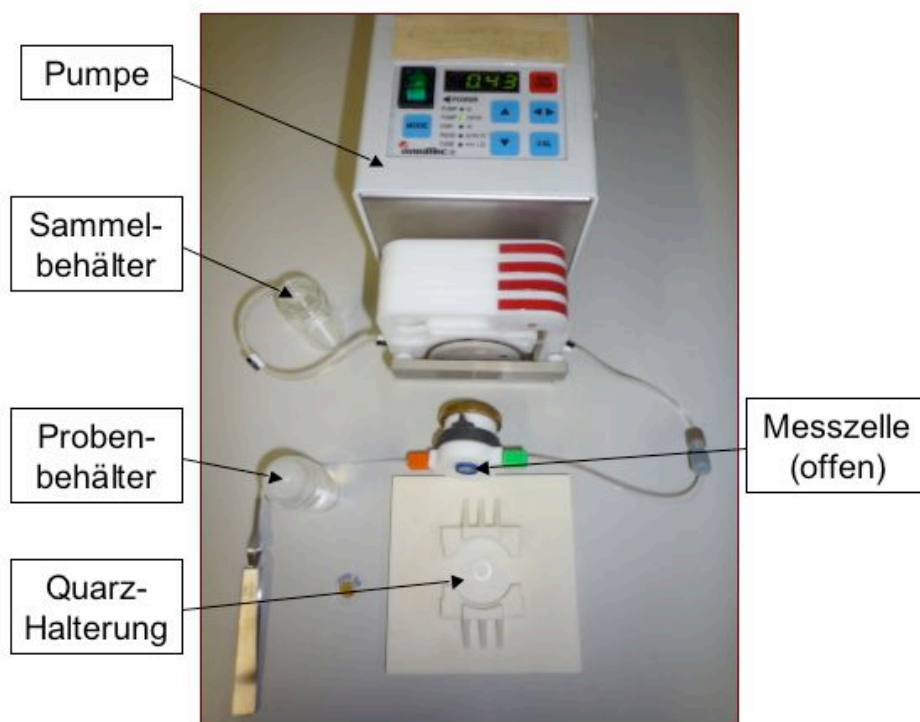


Abbildung 1-7: Dummy-System

### **1.7 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe des Dummy-Systems eine Reihe von Möglichkeiten und Wege zur Entfernung von Thrombozyten von der Quarzoberfläche zu entwickeln bzw. aufzuzeigen. Die Quarze sollen dadurch für eine Wiederverwendung zur Thrombozytenfunktionsmessung zur Verfügung stehen.

Als weitere Fragestellung soll die Regeneration der Quarze in der Anlage verifiziert und nachvollzogen werden. Hierbei soll auch gezeigt werden, dass mehrere Messungen auf einem Quarz, sowohl in einer Serie von Messungen am Stück als auch in Einzelmessungen möglich sind.

Diese Versuchsreihen wurden so weit als möglich unter identischen Bedingungen wiederholt. Hierzu wurde wo immer möglich, Blut vom selben Spender entnommen.

In Bezug auf einen späteren Einsatz in der Routinediagnostik muss neben der Ökologie zudem auf Ökonomie geachtet werden. Aus diesem Grund spielt bei der Regeneration der benötigte Aufwand, vor allem die Zeit der „Blockierung“ der Anlage bis zur nächst möglichen Messung eine wesentliche Rolle. Es werden mehrere Varianten zur Regeneration getestet. Hierzu zählt die Regeneration mit Natronlauge, wie von Döring beschrieben. [8]

Des Weiteren wurden zur Regeneration Trypsin-EDTA, Salzsäure und Natrium Dodecyl Sulfat getestet.

Darüber hinaus wurden Messungen an Blutproben durchgeführt, welche von mit ASS therapierten Probanden stammten. Hiermit soll gezeigt werden, dass das System in der Lage ist, Thrombozytopathien von gesunden Thrombozyten zu unterscheiden.

## **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 Mikroskop

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

##### 2.1.1.6 Spincoater

- Spin 150, APT GmbH, Bienenbüttel

##### 2.1.1.7 Zentrifugation

- 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

## Material und Messmethode

### 2.1.2.2 Adenosindiphosphat (ADP)

- ADP 1,0ml, 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 1,0ml, Mölab GmbH, Langenfeld

### 2.1.2.6 Salzsäure (HCl)

- Salzsäure HCl 12,3%, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

### 2.1.2.7 Natronlauge (NaOH)

- Natriumhydrogencarbonat Plättchen, rein, in Aqua bidest., 0,1molar, 1molar, 6molar und 10molar, Merck KGaA, Darmstadt

### 2.1.2.8 N<sub>2</sub>–Gas

- Stickstoff (N<sub>2</sub>), stationäre Laborversorgung

### 2.1.2.9 Natriumchloridlösung (NaCl)

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

### 2.1.2.10 Piranha

- Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 98 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 %, Merck GmbH, Darmstadt
- Mischverhältnis H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 3 : 1

### 2.1.2.11 Polystyrollösung (PS-Lösung)

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

### 2.1.2.12 Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)

- Sodium Dodecyl Sulfat Pulver, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH , Steinheim

## Material und Messmethode

- in Aqua bidest., 0,5molar
- Wenn nicht anders erwähnt ist der pH-Wert mittels HCl auf pH 2 eingestellt

### 2.1.2.13 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

### 2.1.2.14 Trypsin-EDTA

- 0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

## 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 150G für 10 Min, das PRP wird oben abpipettiert. Um die gewünschte Thrombozytenkonzentration einzustellen wird mittels PPP verdünnt. Wenn nicht anders erwähnt enthält das PRP 300.000 TZ/ $\mu$ l.

### 2.1.3.3 Platelette Pour Plasma (PPP)

- nach PRP-Gewinnung. Die verbleibende Probe wird bei 1500G für 10 Min zentrifugiert, das PPP wird oben abpipettiert.

## 2.1.4 Schwingquarz

### 2.1.4.1 Quarz

- polierte Quarzscheibe, AT–Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektrode über ganze Scheibe, Frequenz 10 MHz, Konstruktion: 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. Frank Gehring, Tübingen
- selbstklebende Kunststoffolie aus Polypropylen, Innendurchmesser: 6 mm, Außendurchmesser: 13 mm  
Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

### 2.1.5 Dummy-Messzelle

#### 2.1.5.1 Flusszelle

- Kunststoffummantelung mit Dichtring, Volumen: 14  $\mu\text{l}$   
Entwicklung und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

#### 2.1.5.2 Flussleitungen

- aus Teflon, Durchmesser 1 mm, 1/16“, Volumen 16  $\mu\text{l}$ , Ismatec, Wertheim

#### 2.1.5.3 Peristaltikpumpe

- Reglo-Digital MS-4/8-100, Pumpenschläuche TYGON, Ismatec, Wertheim

### 2.1.6 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. Frank Gehring, Tübingen

## 2.2 Messmethode

### 2.2.1 Quarzpräparation

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

#### 2.2.1.1 Reinigung der Quarze

- 1 Min. im Acetonbad
- Spülen mit Aqua bidest.
- Trocknen im Stickstoffstrom
- 1 Min. im Piranhabad
- Spülen mit Aqua bidest.
- Trocknen im Stickstoffstrom
- Anschließend werden die Quarze entweder direkt in die Haltevorrichtung eingeklebt oder mit Polystyrol bzw. Kupfer beschichtet (s.u.) und danach eingeklebt.

#### 2.2.1.2 Einkleben in die Haltevorrichtung

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

#### 2.2.1.3 Gold – Beschichtung

Der Quarz wird wie oben beschrieben gereinigt und in die Haltevorrichtung eingeklebt und ist somit für die Messung bereit.

#### 2.2.1.4 Polystyrol (PS) – Beschichtung

Der Quarz wird wie oben beschrieben gereinigt, anschließend werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Zentrieren des Quarzes im Spincoater
- Beschleunigen auf 3000 U/min
- Aufbringen von 30µl PS-Lösung (2mg/ml)
- 2 Min. bei 3000 U/min
- Ausbauen und Einkleben des Quarzes in die Haltevorrichtung

### **2.2.2 Herstellung des Platelette Rich Plasma**

Zur Probenvorbereitung wird unbehandeltes Citratblut verwendet. Dies wird mittels Zentrifugation zu Platelette Rich Plasma (PRP) und Platelette Pour Plasma (PPP) aufbereitet. Dazu wird das Citratblutröhrchen bei 150G 10Min zentrifugiert. Das oben liegende PRP wird abpipettiert und die verbleibende Probe bei 1500G erneut 10Min zentrifugiert. Das nun oben liegende PPP wird ebenfalls abpipettiert. In einem Zellcounter wird die Thrombozytenzahl der gewonnenen Proben bestimmt. Zur Messung wird das PRP mittels des PPP auf 300.000/ $\mu$ l eingestellt.

### **2.2.3 Thrombozytenfunktionsmessung in der Anlage**

Die Thrombozytenfunktionsmessung in der Anlage wurde von Koch erprobt und optimiert. Es werden Quarze mit PS-Beschichtung (2mg/ml, bei 3000U/Min) oder unbeschichtete Quarze (Goldoberfläche) eingesetzt. [17]

Der optimierte Versuchsablauf wird für die hier beschriebenen Versuche angewendet. Der Ablauf einer Messung ist im Folgenden beschrieben.

Ablauf einer Messung in der Anlage:

- Quarz in die Anlage einbauen
- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeneinstellung: Flow 0,4ml/min für 1 Min.)
- Pumpeneinstellung auf Flow 0,8ml/min ändern (damit die PRP-Probe nach der Aktivierung schnell genug die Messkammer erreicht, bevor die Gerinnung bereits im Schlauchsystem abläuft)
- Mischen des PRP mit ADP (Aktivator) durch Rührer (5 Sek.) in einem Eppendorf-Cup
- Kurzer Stopp der Pumpe zum Umstecken des Schlauches in die Blutprobe
- Probe (PRP+Aktivator) ansaugen 0,8ml/min für 10 Sek.
- Stop Flow für 30 Min.

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

Die Versuche, die Bezeichnungen der Quarze und die Versuchsergebnisse mit Angabe des Frequenzabfalls und der Dämpfungsänderung sind im jeweiligen Kapitel in folgender Form angegeben.

Messung: „fortlaufende Nummer“, Quarz: „Beschichtung“ „fortlaufende Nummer“

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1040 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -620 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +1330 Hz

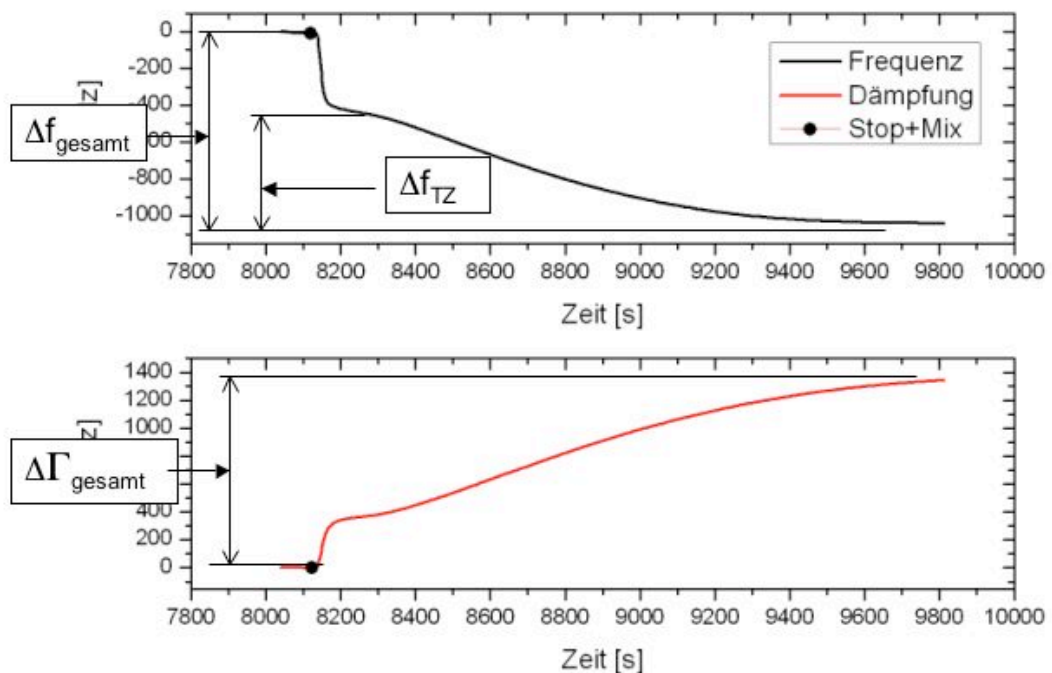
**Tabelle 2-1: Darstellung der Messergebnisse**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
Beispiel	PS	ADP	-1040 Hz	-620 Hz	+1330 Hz	TZ-Anbindung

Hierbei bezeichnet  $\Delta f_{\text{gesamt}}$  den Frequenzabfall über die gesamte Versuchszeit,  $\Delta f_{\text{TZ}}$  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“, der im Graphen markiert ist, wird der Aktivator mit dem PRP gemischt. Der darauf folgende steile Frequenzabfall resultiert aus der Viskositätsänderung des Mediums in der Messkammer (Puffer vs. Plasma). Daraufhin folgt ein über die gesamte Veruchszeit ausgedehnter Frequenzabfall. Dieser spiegelt die Thrombusbildung auf dem Quarz wieder.

Die Dämpfungsänderung wird im Folgenden nicht näher betrachtet, der Vollständigkeit halber zum Teil aber mit angegeben.



**Abbildung 2-1: Kurvenverläufe der Messwertaufzeichnung**

## **2.3 Regenerationsmedien**

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Regenerationsmedien vorgestellt. Diese wurden in den Versuchen einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Bei den Versuchen wurde versucht die Bedingungen so zu wählen, dass der Versuch auf eine serienmäßige Anwendung übertragbar ist. So wurde als Versuchstemperatur grundsätzlich die Raumtemperatur gewählt. Lange Versuchzeiten wurden nicht untersucht, da dies für eine Anwendung nicht tauglich wäre.

### **2.3.1 Trypsin-EDTA zur Regeneration**

Während sich manche Zellen buchstäblich schon ablösen, sobald man eine Flasche mit Trypsin auch nur in ihre Nähe stellt, zeigen sich andere völlig unbeeindruckt und verharren selbst nach längerer Einwirkzeit hartnäckig an Ort und Stelle. [3]

Trypsin-EDTA wird standardmäßig zur Ablösung adhärenter Zellen im Rahmen von Zellkultur Experimenten eingesetzt. Das Temperaturoptimum für die Aktivität von Trypsin liegt bei 37°C, was wie oben beschrieben, hier nicht berücksichtigt wurde.

Trypsin eignet sich grundsätzlich um Zellen, ohne diese dabei zu zerstören, voneinander und von Oberflächen zu lösen. Es stellt möglicherweise eine relativ „milde“ Möglichkeit dar, adhärente und aggregierte Thrombozyten von der Oberfläche des Schwingquarzes lösen.

### **2.3.2 Natronlauge zur Regeneration**

Döring, Claußen, Cluss, Gehring und Krapf gelang es mit Protein A beschichtete Schwingquarze mittels Natronlauge von Erythrozyten so zu reinigen, dass mehrere Messungen mit einem Quarz möglich waren.

### **2.3.3 Sodium Dodecyl Sulfat zur Regeneration**

SDS wird als Denaturierungsmittel für Proteine in der Biotechnologie angewandt. Die Wirkung auf Proteine basiert darauf, dass nichtkovalente Bindungen der Proteine unterbrochen und so deren Quartär- und Tertiärstruktur zerstört werden. [13]

Außerdem dient es als Emulgator und wird als Reinigungsmittel angewandt.

### **2.3.4 Salzsäure zur Regeneration**

Cluss gelang es mit Protein A beschichtete Schwingquarze mittels Salzsäure von Erythrozyten so zu reinigen, dass mehrere Messungen mit einem Quarz möglich waren.

## **2.4 Quarzregeneration im Dummy**

Der Quarz stammt aus Messungen zur Thrombozytenfunktion, das zugehörige Versuchsergebnis wird mit angegeben. Der Quarz wird auf die Zentrierung am Boden des Dummies aufgelegt und anschließend das Gehäuse aufgeschraubt. Zum Befüllen des Systems, bestehend aus zu- und abführendem Schlauch sowie der Messkammer, wird Tris-NaCl mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4ml/min aus dem entsprechenden Vorratsbehälter solange angesaugt, bis die gesamte Messkammer blasenfrei befüllt ist. Anschließend wird das Regenerationsreagenz für 5 Minuten bei gleicher Pumpeneinstellung (Flow 0,4ml/min) durch die Messkammer gesaugt. Danach wird für 1 Minute mit Tris-NaCl gespült. Je nach Regenerationsprotokoll wird nun ein weiteres Regenerationsreagenz verwendet und im Anschluss daran erneut gespült. Zum Umstecken des zuführenden Schlauches vom jeweiligen Vorratsbehälter wird die Pumpe kurz gestoppt. Im Anschluss an den Regenerationsvorgang wird der Quarz unter dem Mikroskop betrachtet und photographiert. Schließlich steht er zu weiteren Messungen zur Verfügung. Die Regeneration verläuft nach folgendem Protokoll.

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

Die Angaben zum Regenerationsprotokoll mit Angabe der Reagenzien sind im jeweiligen Kapitel in folgender Form dargestellt.

**Tabelle 2-2: Ablauf der Regeneration im Dummy**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	

## 2.5 Quarzregeneration in der Anlage

Im Anschluss an eine Messung in der Anlage wird der Quarz, ohne diesen auszubauen, in der Anlage regeneriert (vergleiche Kapitel Quarzregeneration im Dummy). Die Regeneration in der Anlage verläuft nach folgendem Protokoll:

- Durchführen der Messung
- Tris-NaCl zum Spülen (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 1 Min.) und Entfernen von Plasma und losem Gerinnsel
- Regenerationsreagenz für den ersten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 1 Min.)
- Regenerationsreagenz für den zweiten Regenerationsschritt (falls erforderlich) (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min

Die Angaben zum Regenerationsprotokoll mit Angabe der Reagenzien sind im jeweiligen Kapitel in folgender Form dargestellt.

**Tabelle 2-3: Ablauf der Regeneration in der Anlage**

	Spülen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	

## Material und Messmethode

Die Regeneration in der Anlage bietet die Möglichkeit den Versuch unter Anwender-Bedingungen ohne weitere Manipulationen durchzuführen. Der Nachteil des Verfahrens ist, dass der Quarz nur makroskopisch im Schauglas der Messkammer beurteilt werden kann. Von Vorteil ist, dass der Effekt auf Frequenz und Dämpfung mit aufgezeichnet werden kann. Außerdem kann eine erneute Messung ohne zusätzliche Spül- oder Trockenschritte direkt gestartet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Polystyrol beschichtete Quarze

In Vorversuchen wurde zunächst untersucht inwiefern die Polystyrolbeschichtung gegen die eingesetzten Reagenzien beständig ist. Hierzu wurden alle im Folgenden angeführten Reagenzien einzeln auf PS beschichtete Quarze aufgebracht und die Oberfläche unter dem Mikroskop auf Veränderungen untersucht.

Die Oberfläche zeigte bei keinem der eingesetzten Reagenzien mikroskopisch nachweisbare Veränderungen.

##### 3.1.1 Regeneration PS beschichteter Quarze im Dummy

3.1.1.1 Reg. PS besch. Quarze mittels Trypsin-EDTA im Dummy

Messung: 3.1.1.1, Quarz: PS 1

$\Delta f$ : -890 Hz,  $\Delta f_{TZ}$ : -720 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3160 Hz

Bei der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration des Quarzes wurde der Referenzwert festgelegt.

**Tabelle 3-1: Messung vor Regeneration mit Trypsin-EDTA**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{TZ}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-890 Hz	-720 Hz	+3160 Hz	TZ-Anbindung siehe Abbildung

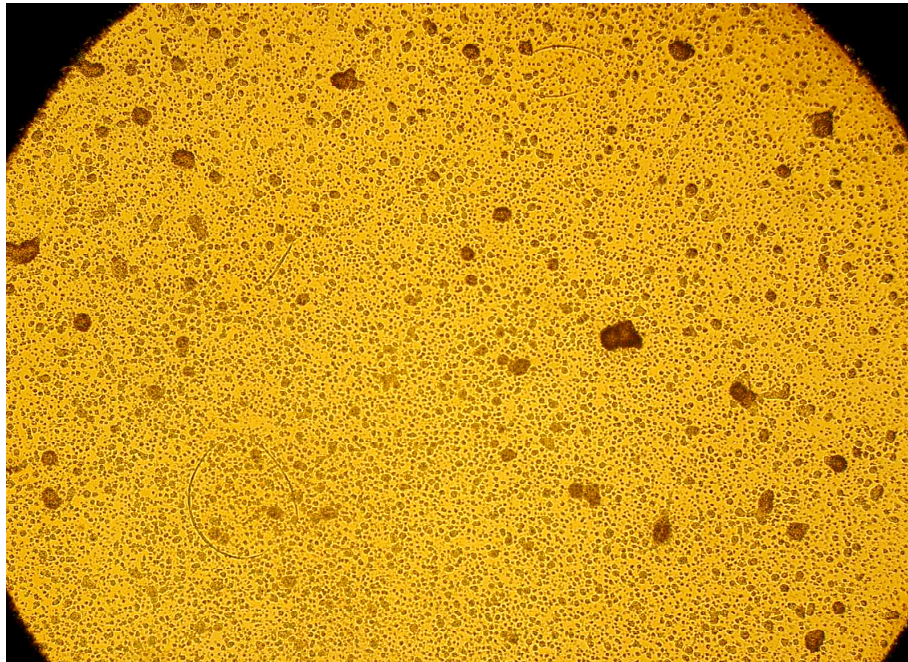
Die Regeneration erfolgte mit Trypsin-EDTA, welches 30 Minuten auf dem Quarz verblieb.

**Tabelle 3-2: Regenerationsablauf mit Trypsin-EDTA**

	Befüllen	1. Reagenz	Reaktionszeit	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	Stop	0,4ml/min	viele TZ auf dem Quarz
Dauer	1 Min.	5 Min.	30 Min.	1 Min.	

## Ergebnisse

Die folgende Abbildung zeigt den Quarz nach der Thrombozytenfunktionsmessung. Man kann viele Thrombozytenaggregate auf dem Quarz erkennen. Nach der Regeneration war der Quarz unverändert mit Thrombozyten belegt (hier nicht abgebildet).



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

Die Oberfläche des Quarzes wurde durch Trypsin-EDTA unter den Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, Reaktionszeit 30 Minuten) nicht gereinigt. Somit ist Trypsin-EDTA zur Regeneration von PS beschichteten Quarzen für diesen Zweck schlecht geeignet.

## Ergebnisse

### 3.1.1.2 Reg. PS besch. Quarze mittels NaOH 1M im Dummy

Messung: 3.1.1.2a, Quarz: PS 2

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1100 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -880 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3020 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-3: Messung vor Regeneration mit NaOH 1M**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-1100 Hz	-880 Hz	+3020 Hz	TZ-Anbindung

Die Regeneration erfolgte mit 1 molarer Natronlauge.

**Tabelle 3-4: Regenerationsablauf mit NaOH 1M**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH 1M	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	2 Min.	5 Min.	1 Min.	

Da der Quarz nach der Regeneration unter dem Mikroskop vollständig gereinigt erschien, wurde eine erneute Messung in der Anlage versucht.

**Tabelle 3-5: Messung nach Regeneration mit NaOH 1M**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach Reg.	PS	ADP	-150 Hz	-0 Hz	+270 Hz	keine TZ-Anbindung

Messung: 3.1.1.2b, Quarz: PS 2

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -150 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : 0 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +270 Hz

In der Messung vor der Regeneration zeigte sich sowohl unter dem Mikroskop als auch im Frequenzabfall eine deutliche Thrombozytenanbindung. Nach der

## Ergebnisse

Regeneration zeigte sich unter dem Mikroskop ein bis auf wenige Reste blanker Quarz. Die erneute Messung zeigte sowohl unter dem Mikroskop, als auch im Frequenzverlauf keine Thrombozytenanbindung. Somit ist davon auszugehen, dass die nach der Regeneration verbliebenen, mikroskopisch nicht sichtbaren Reste auf dem Quarz eine erneute Thrombozytenanbindung verhindern.

Somit eignet sich 1 molare NaOH als einziges Medium nur bedingt oder nicht zur Regeneration.

### 3.1.1.3 Reg. PS besch. Quarze mittels NaOH 6M im Dummy

Messung: 3.1.1.3a, Quarz: PS 3

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -780 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -520 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +2230 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-6: Messung vor Regeneration mit NaOH 6M**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-780 Hz	-520 Hz	+2230 Hz	TZ-Anbindung

Die Regeneration erfolgte mit 6 molarer Natronlauge.

**Tabelle 3-7: Regenerationsablauf mit NaOH 6M**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH 1M	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	2 Min.	5 Min.	2 Min.	siehe Abbildung

## Ergebnisse

Da der Quarz nach der Regeneration unter dem Mikroskop vollständig gereinigt erschien, wurde eine erneute Messung in der Anlage versucht.

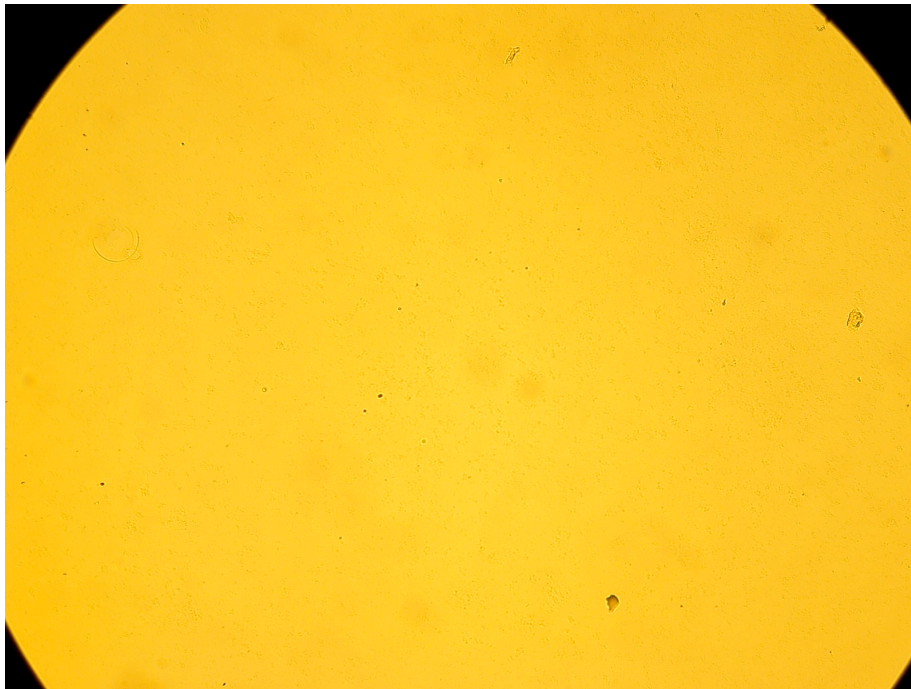
**Tabelle 3-8: Messung nach Regeneration mit NaOH 6M**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach Reg.	PS	ADP	-170 Hz	-15 Hz	+640 Hz	keine TZ-Anbindung

Messung: 3.1.1.3b, Quarz: PS 3

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -170 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -15 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +640 Hz

Folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Regeneration mittels 6 molarer NaOH.



**Abbildung 3-2: Quarz PS 3 nach Messung 3.1.1.3b nach Regeneration mit NaOH 6M, 100x Vergrößerung**

Man kann erkennen, dass der Quarz nach der Behandlung mit NaOH nahezu vollständig von den Thrombozytenaggregaten frei ist. Bei 500facher Vergrößerung kann man kleine punktförmige Verunreinigungen über den gesamten Quarz verteilt ausmachen.

Die erneute Messung nach Regeneration ergab keine Thrombozytenanbindung.

## Ergebnisse

Zusammenfassung: Mittels NaOH können Thrombozytenaggregate vom Quarz entfernt werden. Allerdings nicht vollständig, so dass im Anschluss keine erneute Thrombozytenanbindung an den Quarz erfolgen kann.

### 3.1.1.4 Regeneration PS besch. Quarze mittels SDS im Dummy

Messung: 3.1.1.4, Quarz: PS 4

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -2000 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -1530 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3760 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-9: Messung vor Regeneration mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-2000 Hz	-1530 Hz	+3760Hz	TZ-Anbindung

Die Regeneration erfolgte mit Sodium Dodecyl Sulfat Lösung (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)).

**Tabelle 3-10: Regenerationsablauf mit SDS**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	Reste auf dem Quarz siehe Abbildung
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	

## Ergebnisse



**Abbildung 3-3: Quarz PS 4 nach Messung 3.1.1.4 nach Regeneration mit SDS-Lsg, 100x Vergrößerung**

Mittels SDS-Lösung erfolgte eine teilweise Ablösung der Thrombozyten vom Quarz. Im Vergleich zur Regeneration mit NaOH verbleiben wesentlich mehr Reste auf dem Quarz.

Somit ist SDS als alleiniges Regenerationsmedium nicht geeignet.

### 3.1.1.5 Regeneration PS besch. Quarze mittels HCl im Dummy

Messung: 3.1.1.5, Quarz: PS 5

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1690 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -1260 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3960 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-11: Messung vor Regeneration mit HCl**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-1690 Hz	-1260 Hz	+3960 Hz	TZ-Anbindung

Die Regeneration erfolgte mit Salzsäure (12,3%), der Ablauf der Regeneration ist in folgender Tabelle dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 3-12: Regenerationsablauf mit HCl**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	HCl	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine Ablösung von TZ
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	

Die Kontrolle unter dem Mikroskop zeigte, dass nach der Regeneration gleich viele Thrombozyten auf dem Quarz waren wie zuvor. Deshalb ist HCl alleine nicht zur Regeneration geeignet.

### 3.1.1.6 Regeneration PS besch. Quarze mittels NaOH und SDS im Dummy

Messung: 3.1.1.6a , Quarz: PS 6

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1040 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -620 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +1330 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-13: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-1040Hz	-620Hz	+1330Hz	TZ-Anbindung

Die Regeneration erfolgte mit Natronlauge und Sodium Dodecyl Sulfat (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)).

**Tabelle 3-14: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH 6M	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	

Da der Quarz nach der Regeneration vollständig gereinigt erschien, wurde eine neue Messung in der Anlage durchgeführt.

## Ergebnisse

**Tabelle 3-15: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach Reg.	PS	ADP	-2000 Hz	-1530 Hz	+3760 Hz	TZ-Anbindung

Messung: 3.1.1.6b, Quarz: PS 6

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -2000 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -1530 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3760 Hz

Vor der Regeneration war der Quarz deutlich mit Thrombozyten belegt. Nach der Regeneration waren mikroskopisch keine Reste auf dem Quarz erkennbar. Die erneute Messung nach der Regeneration zeigte eine deutliche Thrombozytenanbindung.

Die Regeneration mit 6 molarer NaOH und SDS-Lsg. erlaubte eine Wiederverwendung des Quarzes für eine zweite Messung, die qualitativ das gleiche Ergebnis lieferte wie ein neuer Quarz.

### 3.1.1.7 Mehrfache Regeneration PS besch. Quarze mittels NaOH und SDS im Dummy

Messung: 3.1.1.7a, Quarz: PS 7

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -600Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -210Hz,  $\Delta \Gamma$ : +970Hz

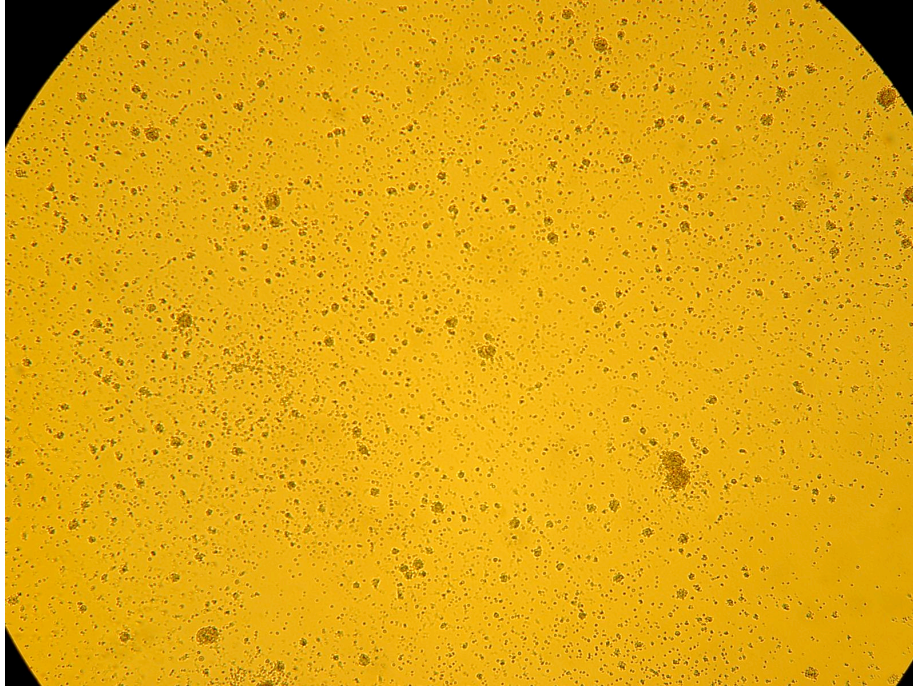
In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-16: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	PS	ADP	-600 Hz	-210 Hz	+970 Hz	TZ-Anbindung siehe Abbildung

Die Kontrolle unter dem Mikroskop zeigte, dass der Quarz dicht mit Thrombozytenaggregaten belegt war.

## Ergebnisse



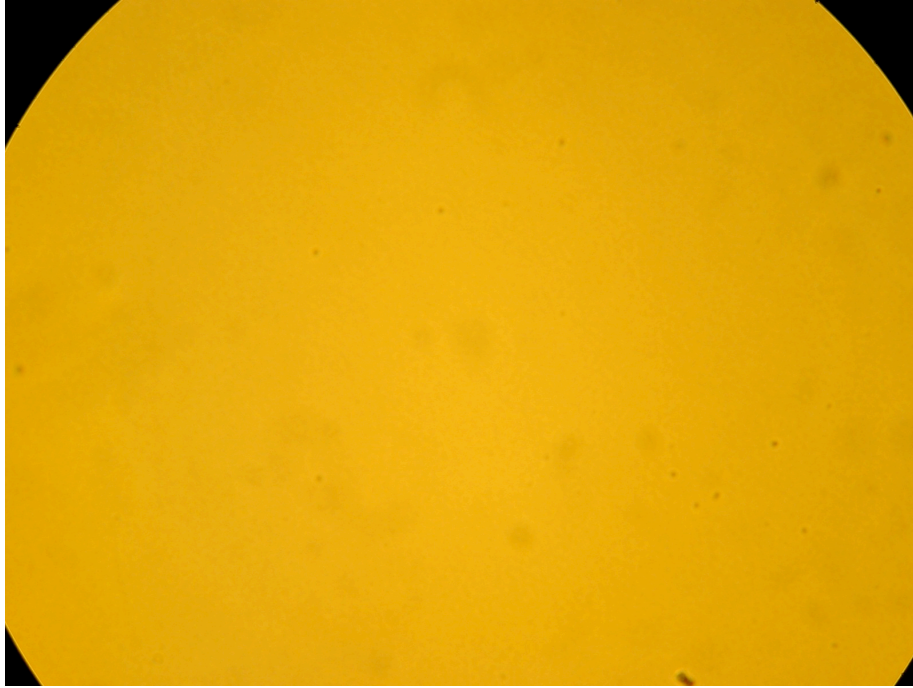
**Abbildung 3-4: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7a, 100x Vergrößerung**

Die Regeneration erfolgte mit 6 molarer Natronlauge und Sodium Dodecyl Sulfat (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)).

**Tabelle 3-17: erste Regeneration mit NaOH und SDS**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches
Medium	Tris-NaCl	NaOH 6M	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	Ergebnis
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	dem Quarz siehe Abbildung

## Ergebnisse



**Abbildung 3-5: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7a nach Regeneration mit NaOH und SDS-Lsg, 100x Vergrößerung**

Messung: 3.1.1.7b, Quarz: PS 7

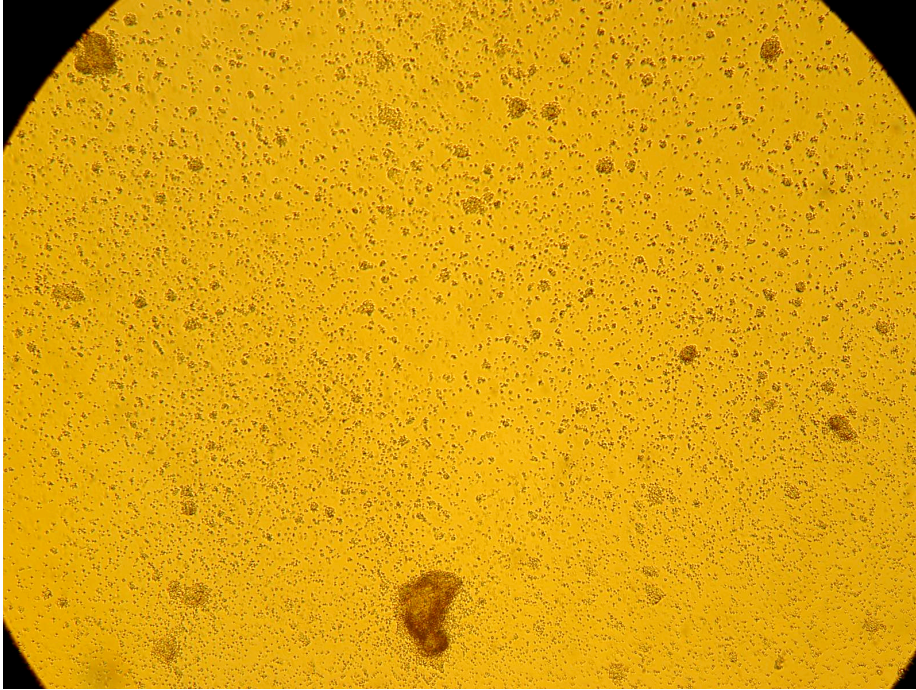
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -530Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -190 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +1160Hz

Da der Quarz nach der Regeneration vollständig gereinigt erschien, wurde eine neue Messung in der Anlage durchgeführt.

**Tabelle 3-18: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach 1. Reg.	PS	ADP	-530 Hz	-190 Hz	+1160 Hz	TZ-Anbindung siehe Abbildung

## Ergebnisse



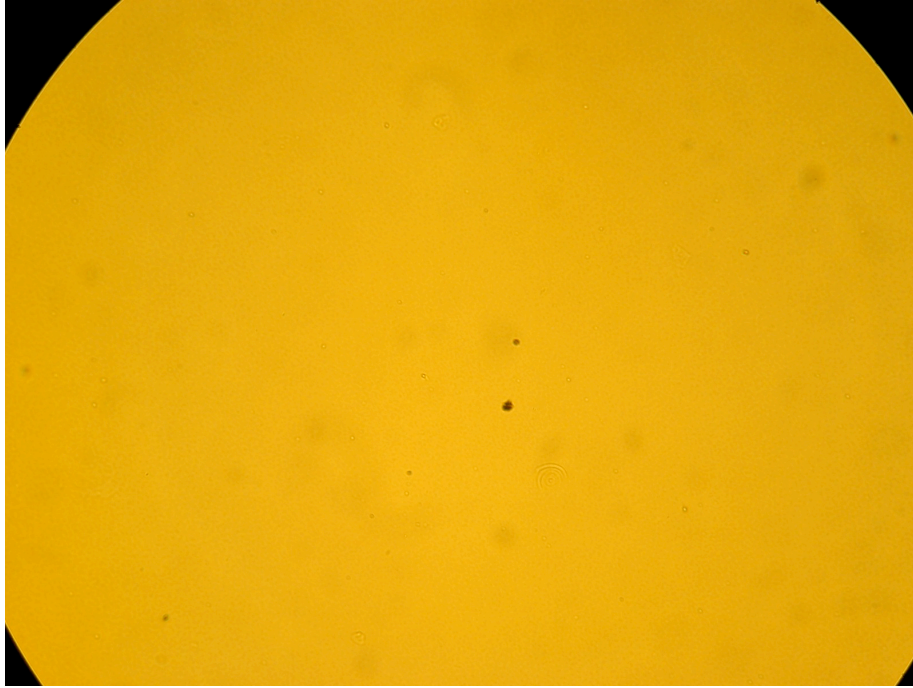
**Abbildung 3-6: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7b, 100x Vergrößerung**

Die erneute Regeneration erfolgte mit Natronlauge und Sodium Dodecyl Sulfat (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)).

**Tabelle 3-19: zweite Regeneration mit NaOH und SDS**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches
Medium	Tris-NaCl	NaOH 6M	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	Ergebnis
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	dem Quarz siehe Abbildung

## Ergebnisse



**Abbildung 3-7: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7b nach Regeneration mit NaOH und SDS-Lsg., 100x Vergrößerung**

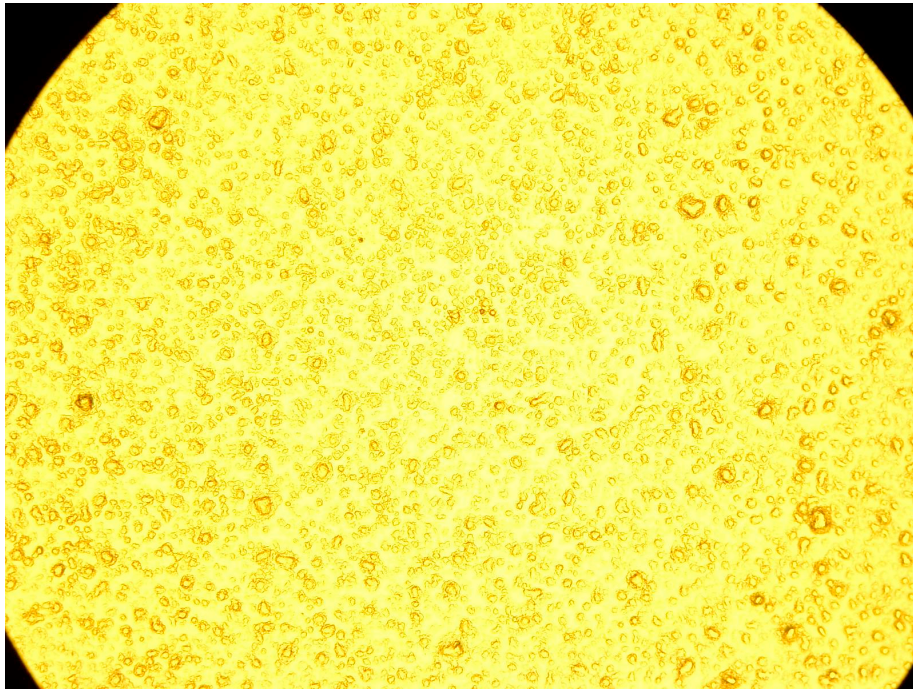
Messung: 3.1.1.7c, Quarz: PS 7

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -550 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -305 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +1750 Hz

Da der Quarz auch nach der zweiten Regeneration vollständig gereinigt erschien, wurde eine neue Messung in der Anlage durchgeführt.

**Tabelle 3-20: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach 2. Reg.	PS	ADP	-550 Hz	-305 Hz	+1750 Hz	TZ-Anbindung siehe Abbildung



**Abbildung 3-8: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7c, 100x Vergrößerung**

Mittels der Regeneration durch NaOH und SDS-Lösung gelang es den Quarz mehrfach für eine erfolgreiche Thrombozytenfunktionsmessung zu verwenden. Die Frequenzabfälle und Kurvenverläufe zeigten jeweils deutlich die Anbindung an. Die Kontrollen unter dem Mikroskop zeigten ebenfalls deutlich den Erfolg der Regeneration und der Thrombozytenanbindung.

### **3.1.2 Regeneration PS beschichteter Quarze in der Anlage**

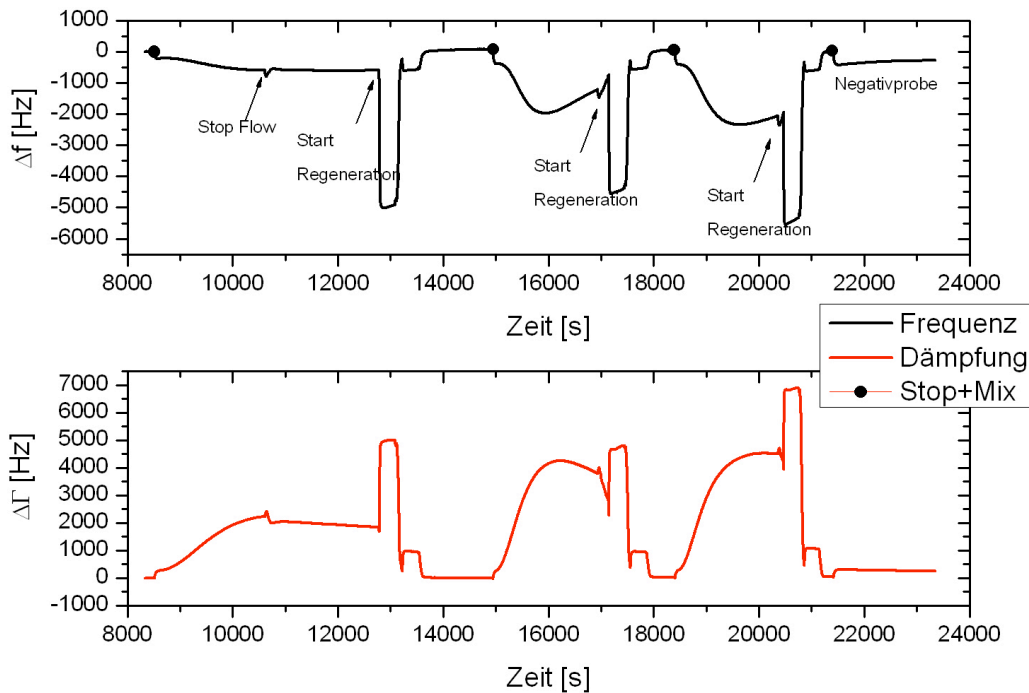
#### **3.1.2.1 Reg. PS besch. Quarze mittels NaOH und SDS in der Anlage**

Im folgenden Versuch wurden vier aufeinander folgende Messungen auf dem selben Quarz durchgeführt, ohne diesen aus der Anlage auszubauen. Die folgenden Schritte wurden vier Mal durchgeführt.

Messung: 3.1.2.1a, Quarz: PS 8

- Durchführung der Messung
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- NaOH 6M 0,4ml/min für 5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- SDS-Lsg. (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) 0,4ml/min für 5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- Wiederholen der vorangehenden Schritte

## Ergebnisse



**Abbildung 3-9: Messkurven der Messung 3.1.2.1a**

**Tabelle 3-21: Messwerte der Messung 3.1.2.1a**

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Kontrollmessung
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ [Hz]	-580	-1460	-2200	-290
$\Delta f_{\text{TZ}}$ [Hz]	-360	-990	-1730	0
$\Delta \Gamma$ [Hz]	2130	4000	4520	210

Die Messungen 1 bis 3 zeigten jeweils deutliche Thrombozytenanbindung auf dem Quarz an. In der Kontrollmessung waren die Thrombozyten durch Abciximab blockiert, es erfolgte keine Thrombozytenanbindung.

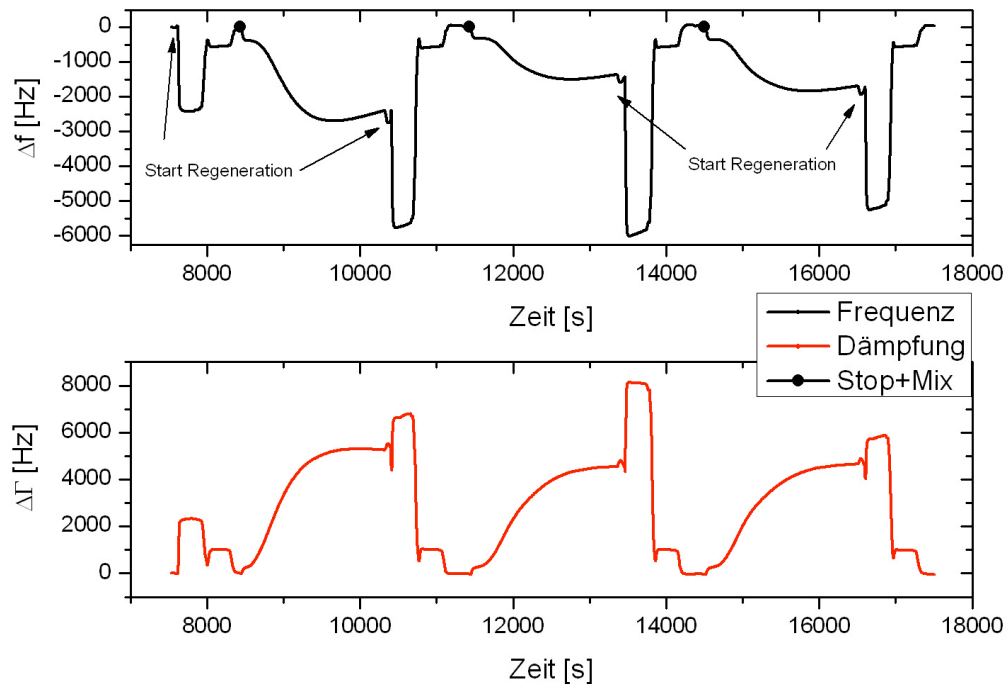
Im folgenden Versuch wurden drei aufeinander folgende Messungen auf dem selben Quarz durchgeführt, ohne diesen aus der Anlage auszubauen. Die folgenden Schritte wurden drei Mal durchgeführt.

Messung: 3.1.2.1b, Quarz: PS 9

- Durchführung der Messung
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- NaOH 6M 0,4ml/min für 5 Min.

## Ergebnisse

- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- SDS-Lsg. (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) 0,4ml/min für 5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- Wiederholen der vorangehenden Schritte



**Abbildung 3-10: Messkurven der Messung 3.1.2.1b**

**Tabelle 3-22: Messwerte der Messung 3.1.2.1b**

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ [Hz]	- 2460	- 1440	- 1800
$\Delta f_{\text{TZ}}$ [Hz]	- 2060	- 1070	- 1380
$\Delta \Gamma$ [Hz]	5270	4560	4640

Die Messungen 1 bis 3 zeigen jeweils deutliche Thrombozytenanbindung auf dem Quarz an.

Zusammenfassung: Die beiden Versuche zeigten, dass ein PS beschichteter Quarz mittels NaOH und SDS so regenerierbar ist, dass er anschließend für mehrere Messungen am Stück verwendet werden kann.

## 3.2 Unbeschichtete Quarze

### 3.2.1 Regeneration unbeschichteter Quarze im Dummy

3.2.1.1 Reg. unbesch. Quarze mittels NaOH und SDS im Dummy

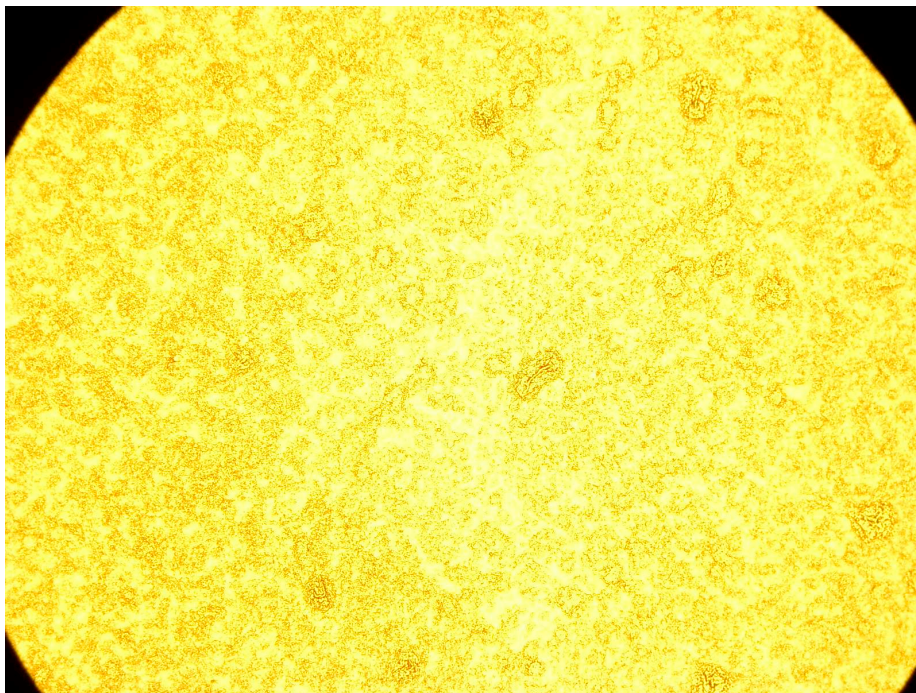
Messung: 3.2.1.1, Quarz: Gold 1

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1510 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -1000 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +4560 Hz

In der Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration konnte mit dem eingesetzten Quarz die Thrombozytenfunktion gemessen werden.

**Tabelle 3-23: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	Gold	ADP	-1510 Hz	-1000 Hz	+4560 Hz	TZ-Anbindung siehe Abbildung



**Abbildung 3-11: Quarz Gold 1 nach Messung 3.2.1.1, 100x Vergrößerung**

## Ergebnisse

**Tabelle 3-24: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches
Medium	Tris-NaCl	NaOH 6M	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	Ergebnis
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	dem Quarz siehe Abbildung



**Abbildung 3-12: Quarz Gold 1 nach Messung 3.2.2.1 nach Regeneration mit NaOH und SDS, 50x Vergrößerung**

Der Quarz war nach der Messung in der Anlage deutlich mit Thrombozyten belegt. Nach der Regeneration war er blank und ohne mikroskopisch sichtbare Rückstände.

3.2.1.2 Reg. unbesch. Quarze mittels NaOH und SDS (ohne HCl) im Dummy

Messung: 3.2.1.2a, Quarz: Gold 2

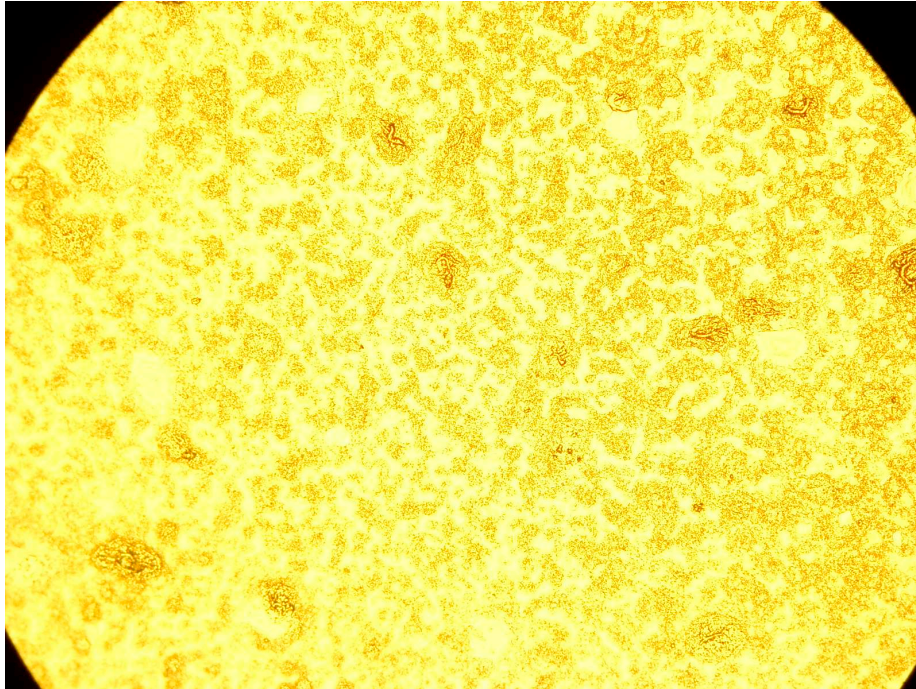
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -680Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -330 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +2400Hz

Die Thrombozytenfunktionsmessung vor der Regeneration zeigte folgendes Ergebnis.

## Ergebnisse

**Tabelle 3-25: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl)**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
vor Reg.	Gold	ADP	-680 Hz	-330 Hz	+2400 Hz	TZ-Anbindung



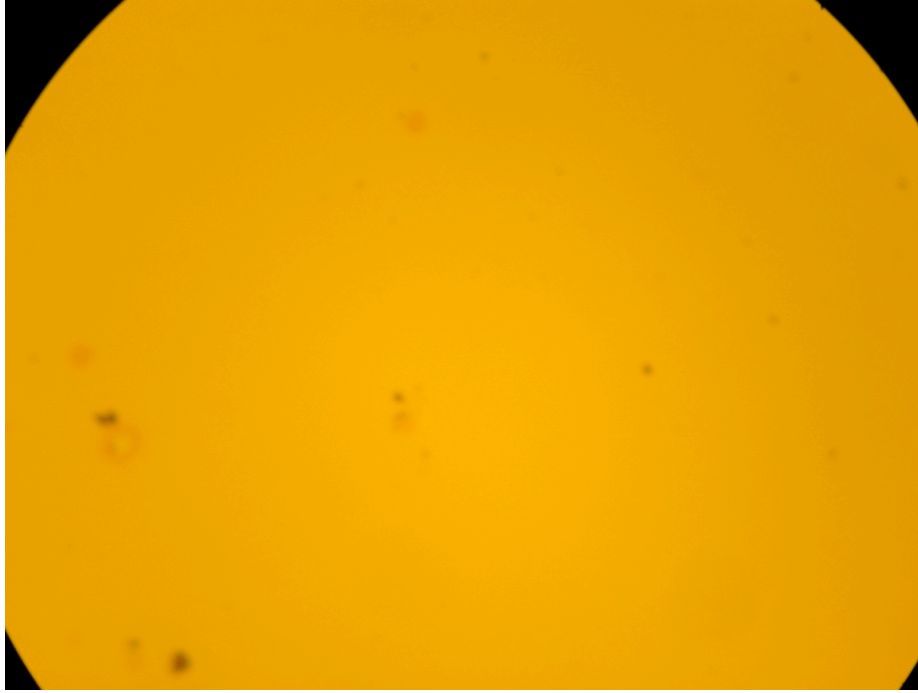
**Abbildung 3-13: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2a, 100x Vergrößerung**

Die Regeneration wurde mit einer anderen SDS-Lsg. durchgeführt. Zur Vereinfachung des Verfahrens war die SDS-Lsg. hier nicht wie in allen anderen Versuchen mit HCl angesäuert.

**Tabelle 3-26: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS (ohne HCl)**

	Befüllen	1. Reagenz	Spülen	2. Reagenz	Spülen	mikroskopisches Ergebnis
Medium	Tris-NaCl	NaOH 6M	Tris-NaCl	SDS	Tris-NaCl	Ergebnis
Flow	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	0,4ml/min	keine TZ auf dem Quarz
Dauer	1 Min.	5 Min.	1 Min.	5 Min.	1 Min.	siehe Abbildung

## Ergebnisse



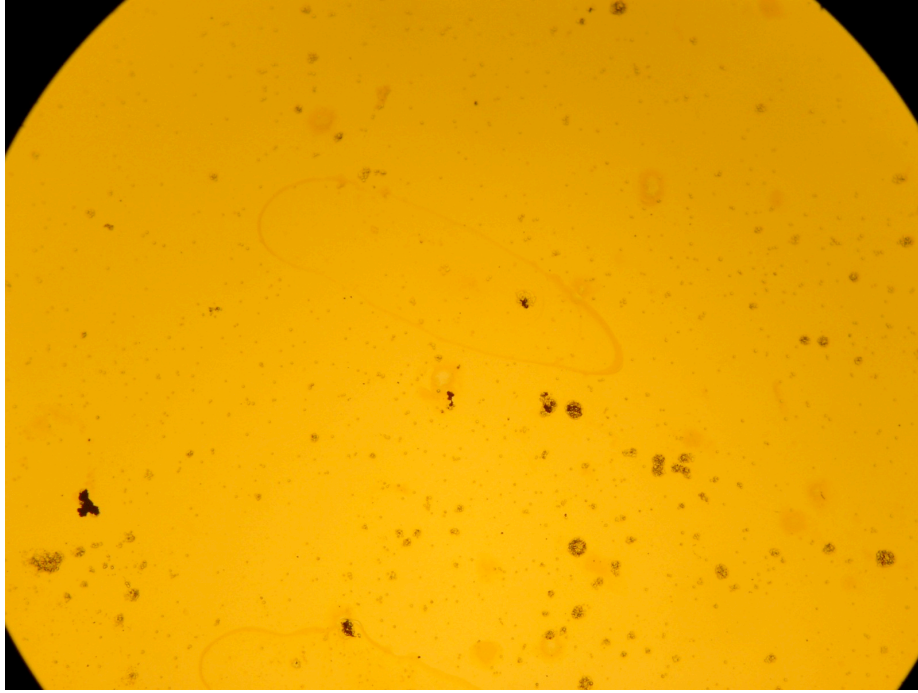
**Abbildung 3-14: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2a nach Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl), 100x Vergrößerung**

Messung: 3.2.1.2b, Quarz: Gold 2

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -270 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : -30 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +270 Hz

**Tabelle 3-27: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl)**

Messung	Beschichtung	Aktivator	$\Delta f_{\text{gesamt}}$	$\Delta f_{\text{TZ}}$	$\Delta \Gamma$	mikroskopisches Ergebnis
nach Reg.	Gold	ADP	-270 Hz	-30 Hz	+270 Hz	kaum TZ-Anbindung siehe Abbildung



**Abbildung 3-15: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2b, 100x Vergrößerung**

Der Quarz war vor der Regeneration reichlich mit Thrombozyten belegt. Nach der Regeneration waren mikroskopisch Reste auf dem Quarz zu erkennen. Die erneute Messung ergab kaum Thrombozytenanbindung.

Die Regeneration ohne Zusatz von HCl in die SDS-Lsg. ist nicht geeignet den Quarz erneut zu verwenden.

### **3.2.2 Regeneration unbeschichteter Quarze in der Anlage**

#### **3.2.2.1 Reg. unbesch. Quarze mittels NaOH und SDS in der Anlage, verkürzte Regenerationszeit**

Messung: 3.2.2.1, Quarz: Gold 3

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -470 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 170 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +2600 Hz

- Durchführung der Messung
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- NaOH 6M 0,4ml/min für 2,5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- SDS-Lsg. (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) 0,4ml/min für 2,5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- Erneute Messung

## Ergebnisse

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -300 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 40 Hz,  $\Delta \Gamma$ : + 390 Hz

Kontrolle unter dem Mikroskop.

Die Messung vor der Regeneration zeigte einen deutlichen Frequenzabfall. Die Messung nach der Regeneration zeigte praktisch keinen Frequenzabfall.

Die verkürzte Regenerationszeit führte zu keiner Wiederverwendbarkeit des Quarzes.

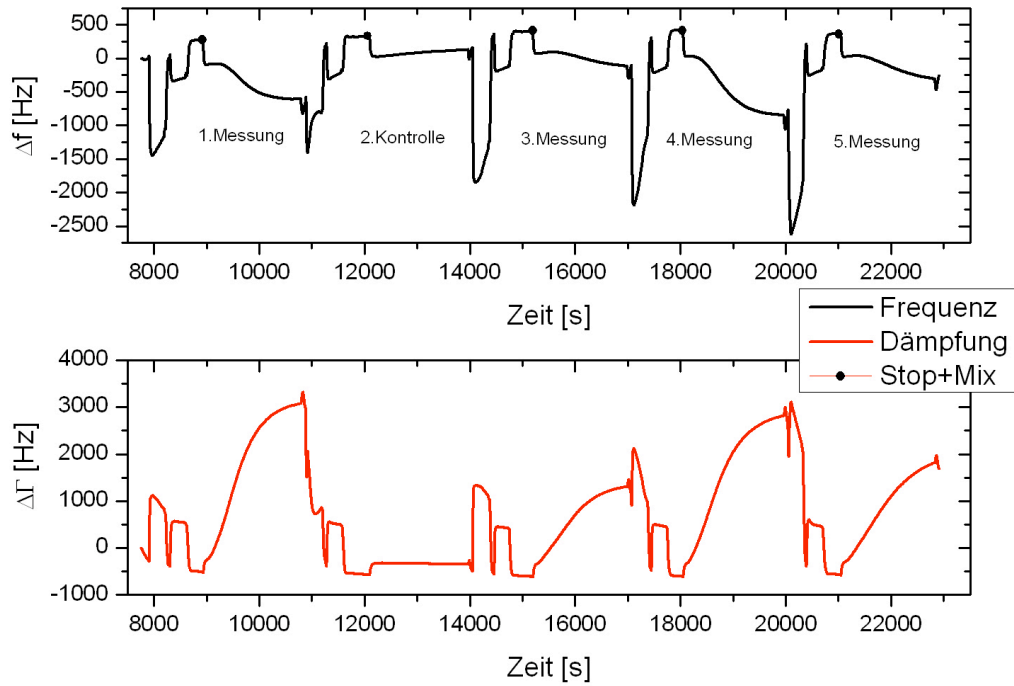
### 3.2.2.2 Reg. unbesch. Quarze mittels NaOH und SDS in der Anlage, mehrere Messungen in Folge

Im folgenden Versuch wurden fünf aufeinander folgende Messungen auf dem selben Quarz durchgeführt, ohne diesen aus der Anlage auszubauen. Die folgenden Schritte wurden fünf Mal durchgeführt.

Messung: 3.2.2.2, Quarz: Gold 4

- Durchführung der Messung
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- NaOH 6M 0,4ml/min für 5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- SDS-Lsg. (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) 0,4ml/min für 5 Min.
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min für 1 Min.
- Wiederholen der vorangehenden Schritte

## Ergebnisse



**Abbildung 3-16: Messkurven der Messung 3.2.2.2**

**Tabelle 3-28: Messwerte der Messung 3.2.2.2**

	Messung 1	Kontrolle 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ [Hz]	- 900	- 210	-520	- 1250	- 680
$\Delta f_{\text{TZ}}$ [Hz]	- 510	0	-180	-870	-330
$\Delta \Gamma$ [Hz]	3560	230	1910	3380	2390

Die Messungen im Vergleich zur Kontrolle zeigten, dass Thrombozyten auf dem Quarz gebunden werden. Eine Kontrolle unter dem Mikroskop nach Messung 4 zeigte reichlich Thrombozyten auf dem Quarz.

### 3.3 Thrombozytenfunktionsmessung

Im folgenden Kapitel werden Thrombozytenfunktionsmessungen mittels der Anlage vorgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Messverfahren in der Lage ist zwischen funktionstüchtigen und pathologischen Thrombozyten zu unterscheiden. Hierzu wurden Blutproben von gesunden Spendern und von Spendern die unter Dauermedikation mit Acetylsalicylsäure (ASS 100) stehen untersucht.

### 3.3.1 Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold

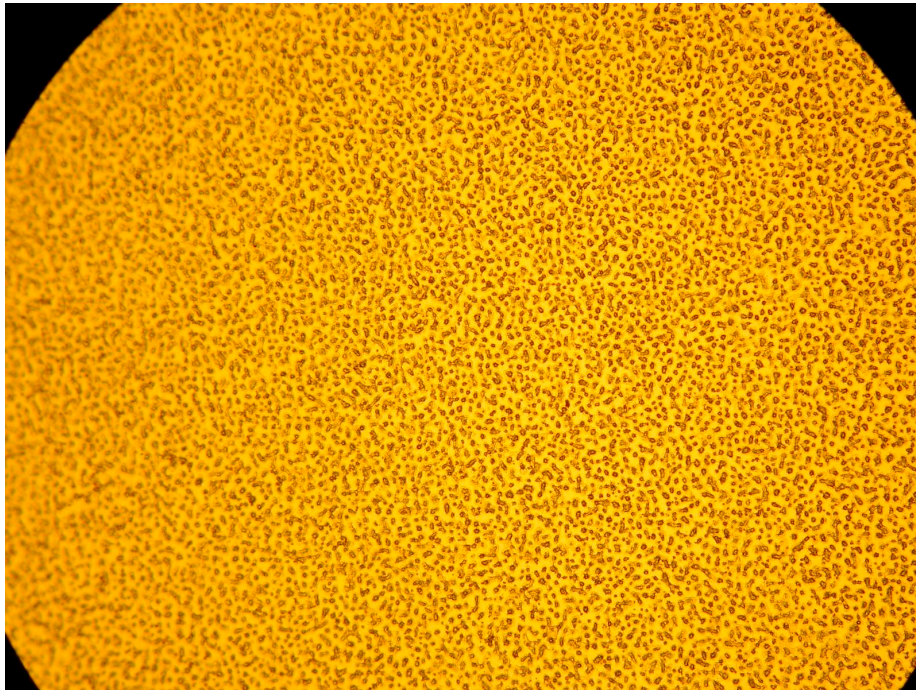
3.3.1.1 Thrombozytenfunktion – gesunder Spender, Aktivierung mit Arachidonsäure

Aktivierung mit Arachidonsäure, gesunder Spender.

Messung: 3.3.1.1, Quarz: Gold 5

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1110 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 860 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3800 Hz

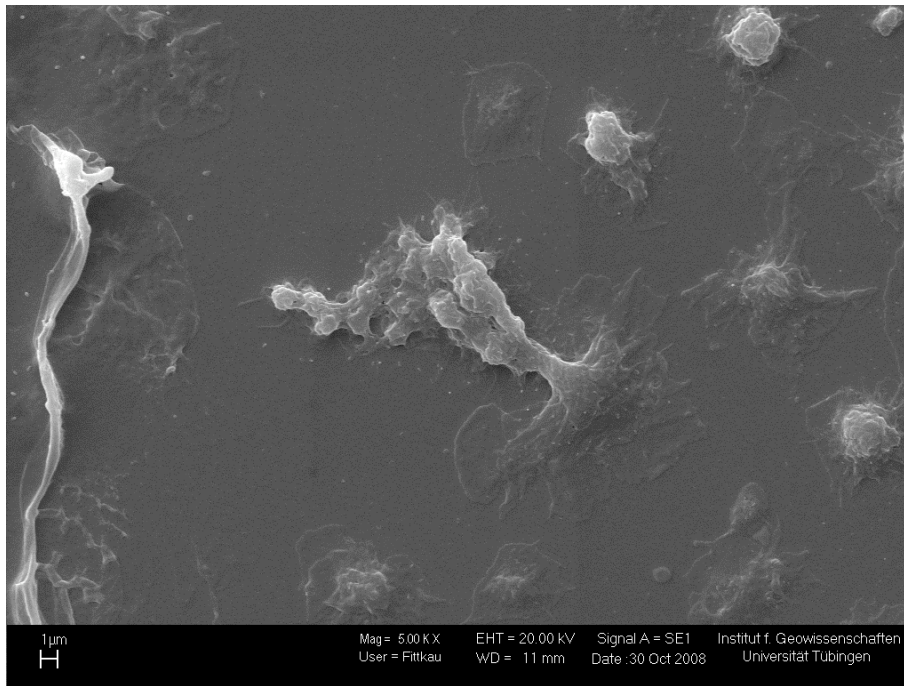
Frequenzabfall, Kurvenverlauf und mikroskopisches Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.



**Abbildung 3-17: Quarz Gold 5 nach Messung 3.3.1.1, gesunder Spender, Aktivierung mit Arachidonsäure, 100x Vergrößerung**

Folgende elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Thrombozyten auf dem Quarz. Deutlich erkennbar sind dabei die flach über die Oberfläche ausgestreckten Pseudopodien.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-18: REM-Aufnahme von TZ nach Aktivierung mit ARA auf Gold 5**

### 3.3.1.2 Thrombozytenfunktion – gesunder Spender Aktivierung mit ADP

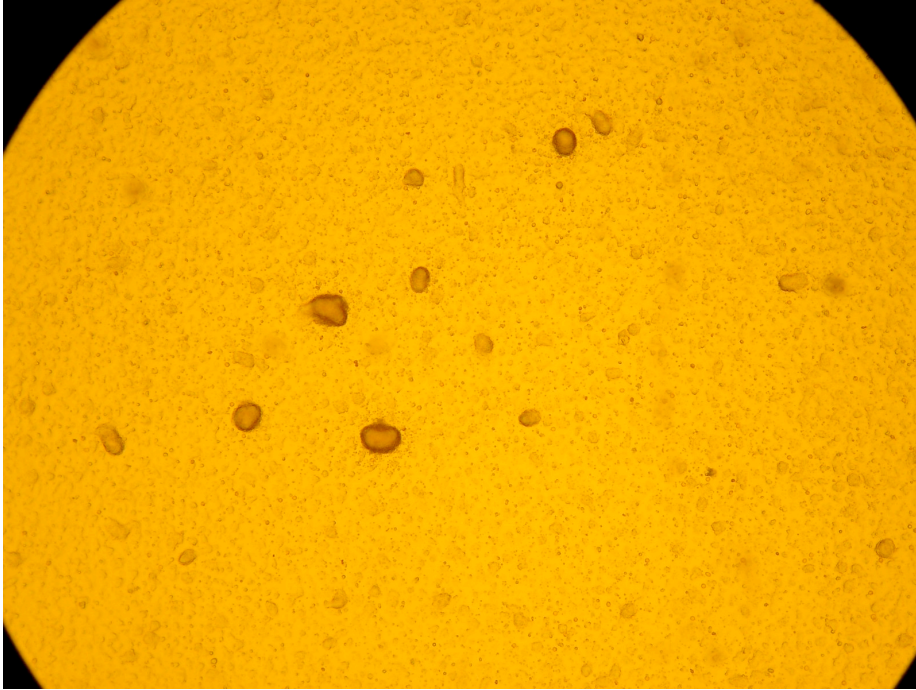
Aktivierung mit ADP, gesunder Spender.

Messung: 3.3.1.2, Quarz: Gold 6

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : -1510 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 1000 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +4560 Hz

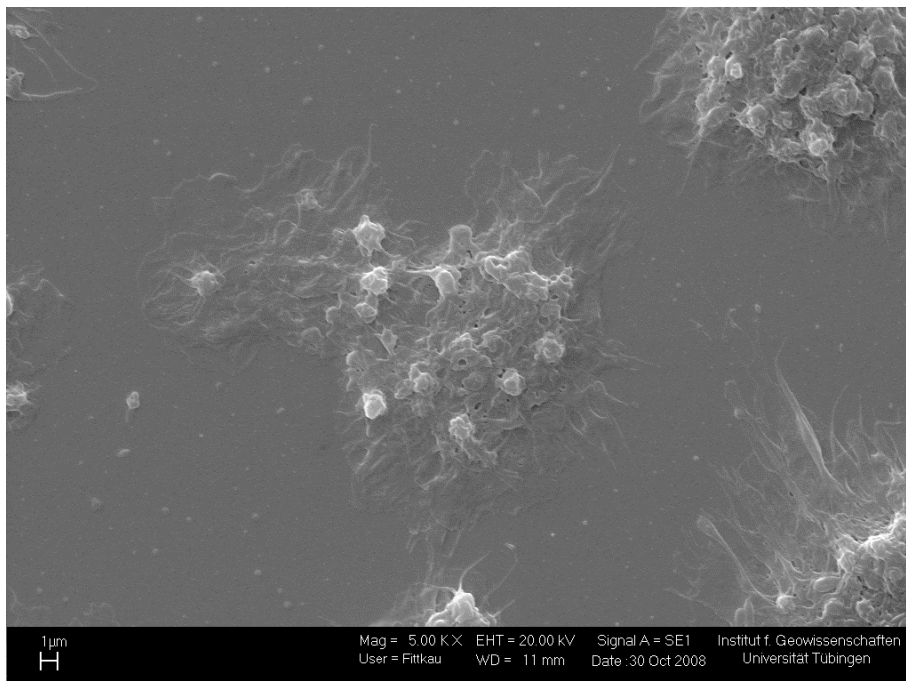
Frequenzabfall und mikroskopisches Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-19: Quarz Gold 6 nach Messung 3.3.1.2, 100x Vergrößerung**

Folgende elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Thrombozyten auf dem Quarz. Deutlich erkennbar sind dabei die flach über die Oberfläche ausgestreckten Pseudopodien.



**Abbildung 3-20: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ADP auf Gold 6**

## Ergebnisse

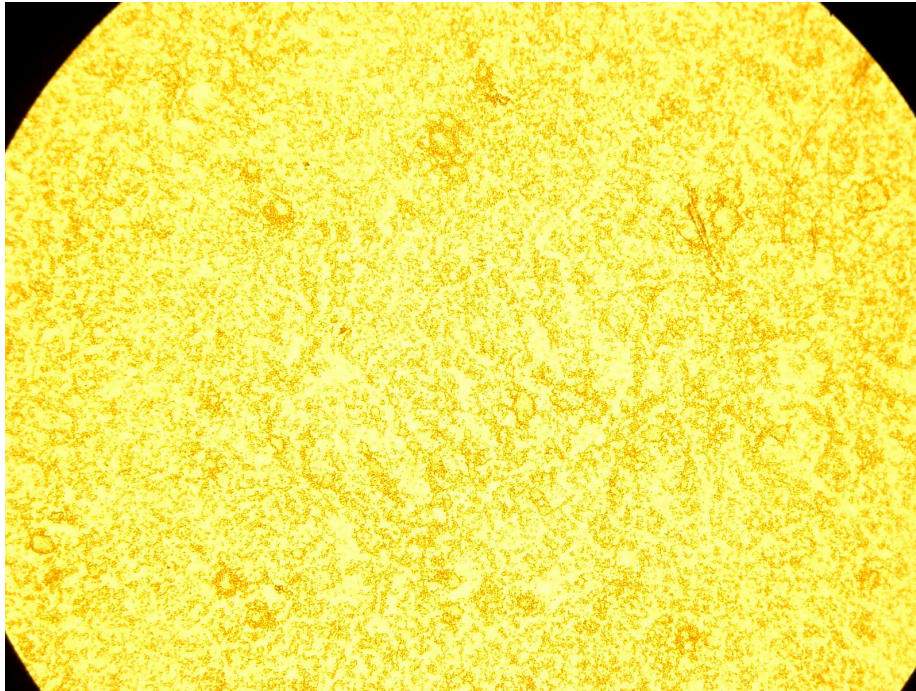
### 3.3.1.3 Thrombozytenfunktion – Spender nimmt ASS Aktivierung mit ADP

Aktivierung mit ADP, Spender nimmt ASS 100

Messung: 3.3.1.3, Quarz: Gold 7

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 1610 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 1110 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3130 Hz

Frequenzabfall und mikroskopisches Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.



**Abbildung 3-21: Quarz Gold 7 nach Messung 3.3.1.3, 100x Vergrößerung**

### 3.3.1.4 Thrombozytenfunktion – Spender nimmt ASS Aktivierung mit Arachidonsäure

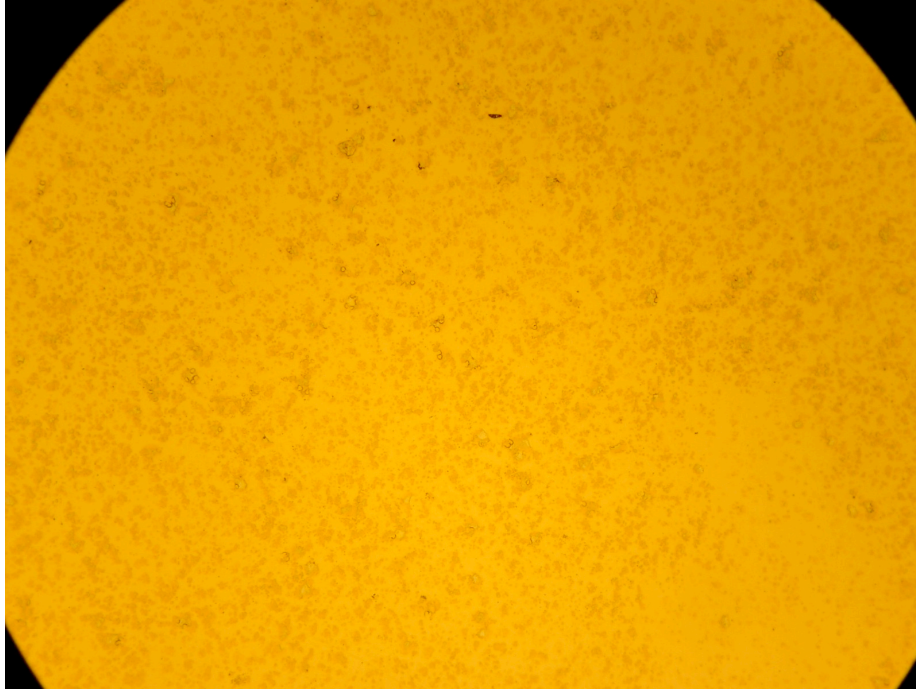
Aktivierung mit Arachidonsäure, Spender nimmt ASS 100

Messung: 3.3.1.4, Quarz: Gold 8

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 600 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 200 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +800 Hz

Der nur geringe Frequenzabfall und der Verlauf der Kurve lassen erwarten, dass nur wenige Thrombozyten auf dem Quarz gebunden haben. Das mikroskopische Bild zeigte nur wenige Thrombozyten auf dem Quarz.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-22: Quarz Gold 8 nach Messung 3.3.1.4, 100x Vergrößerung**

### 3.3.1.5 Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold – Zusammenfassung

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessung auf Goldoberflächen in absoluten Werten zusammengefasst.

**Tabelle 3-29: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern**

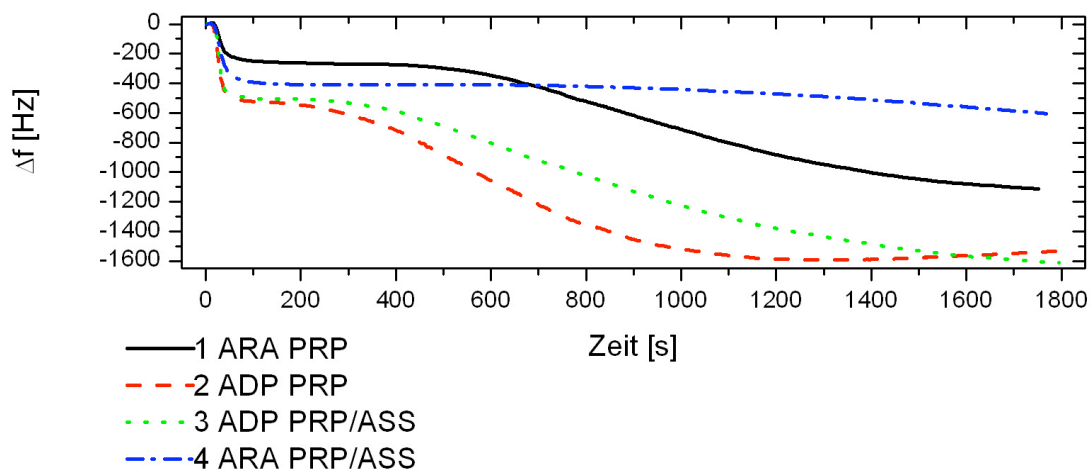
	1 Arachidonsäure Normale TZ	2 ADP Normale TZ	3 ADP ASS	4 Arachidonsäure ASS
$\Delta f_{\text{gesamt}}$	- 1110Hz	- 1510Hz	- 1610Hz	- 600Hz
$\Delta f_{\text{TZ}}$	- 860Hz	- 1000Hz	- 1110Hz	- 200Hz

Die folgende Abbildung zeigt, dass durch ASS gehemmte Thrombozyten, welche durch Arachidonsäure aktiviert wurden, nur sehr spät und wenig am Quarz anbinden. Anhand des Kurvenverlaufes lässt sich die Messung deutlich von Messungen mit „funktionierenden“ Thrombozyten bzw. Aktivierung mit ADP unterscheiden. So zeigen alle Messungen nach dem initialen Frequenzabfall (0-100s) (Einstrom des PRP in die Messkammer) direkt im Anschluss eine schwach fallende Frequenz. Der

## Ergebnisse

Abfall verstärkt sich im Verlauf stark und führt so zu einem deutlichen Frequenzabfall. Der zweite deutliche Frequenzabfall nach dem Einstrom wird durch die Thrombozytenanbindung (je nach Messung bei 200-1000s) verursacht. Wartet man lange genug, so erreicht die Messkurve einen Tiefpunkt (nicht bei allen Messungen mit aufgezeichnet).

Die 4. Kurve (mit ASS behandelte Thrombozyten, Aktivierung mit Arachidonsäure) zeigt im Gegensatz zu den anderen nach dem Einstrom zunächst einen leichten Anstieg der Frequenz. Der Frequenzabfall setzt nur schwach bei ca. 900s ein und erreicht bei weitem nicht die gleiche Steigung wie die anderen Messungen. Näheres zur Interpretation im Kapitel Diskussion.



**Abbildung 3-23: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern, Aktivierung mit Arachidonsäure oder ADP, auf Gold.**

### 3.3.2 Thrombozytenfunktionsmessungen auf PS

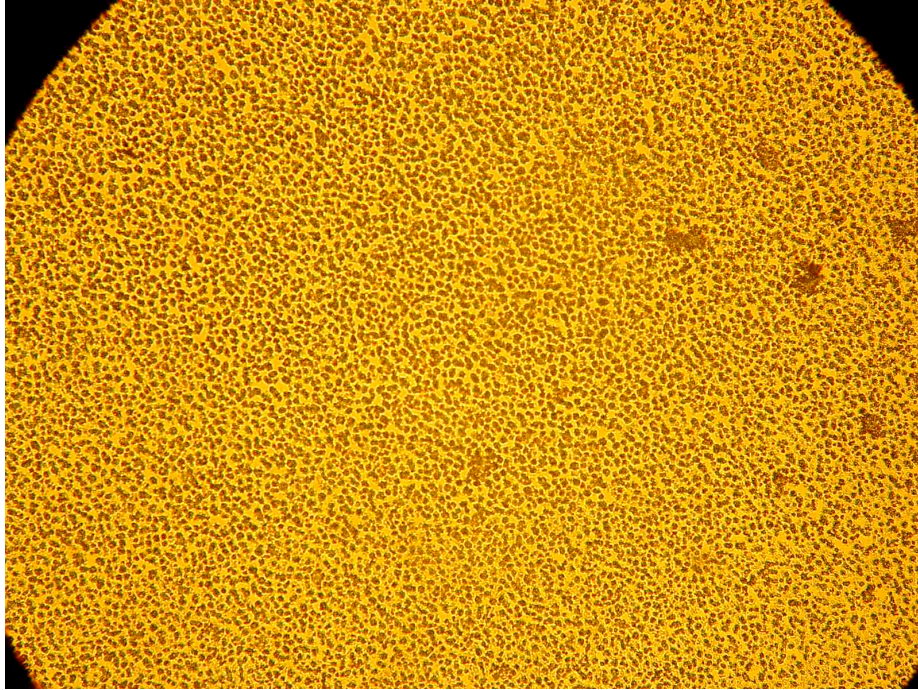
3.3.2.1 Thrombozytenfunktion – gesunder Spender, Aktivierung mit Arachidonsäure

Messung: 3.3.2.1, Quarz: PS 10

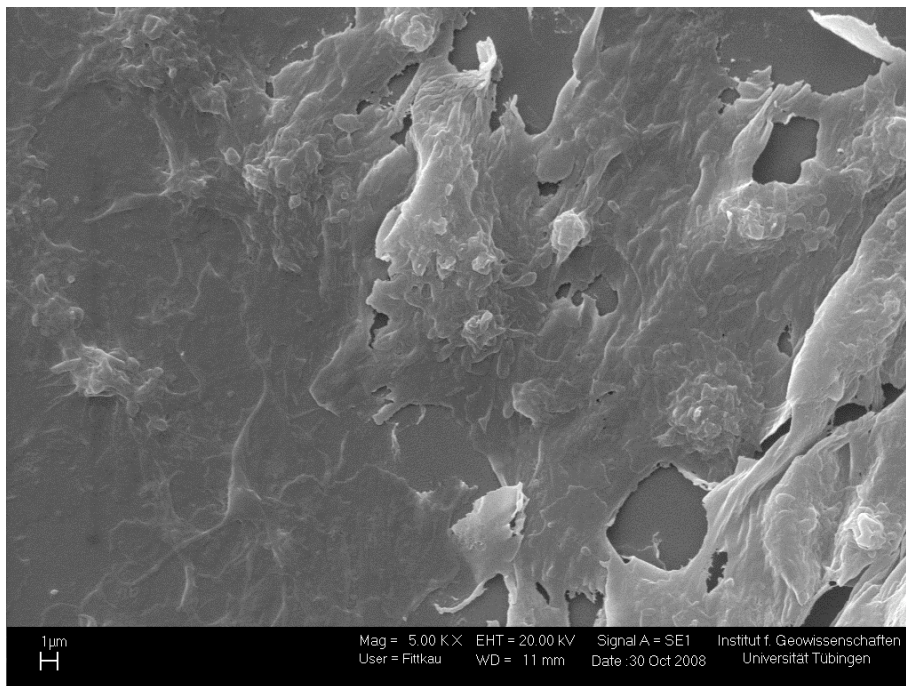
$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 1340 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 1140 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3590 Hz

Der Frequenzabfall und -verlauf sowie das mikroskopische Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-24: Quarz PS 10 nach Messung 3.3.2.1, 100x Vergrößerung**



**Abbildung 3-25: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ARA auf PS 10**

3.3.2.2 Thrombozytenfunktion – gesunder Spender, Aktivierung mit ADP

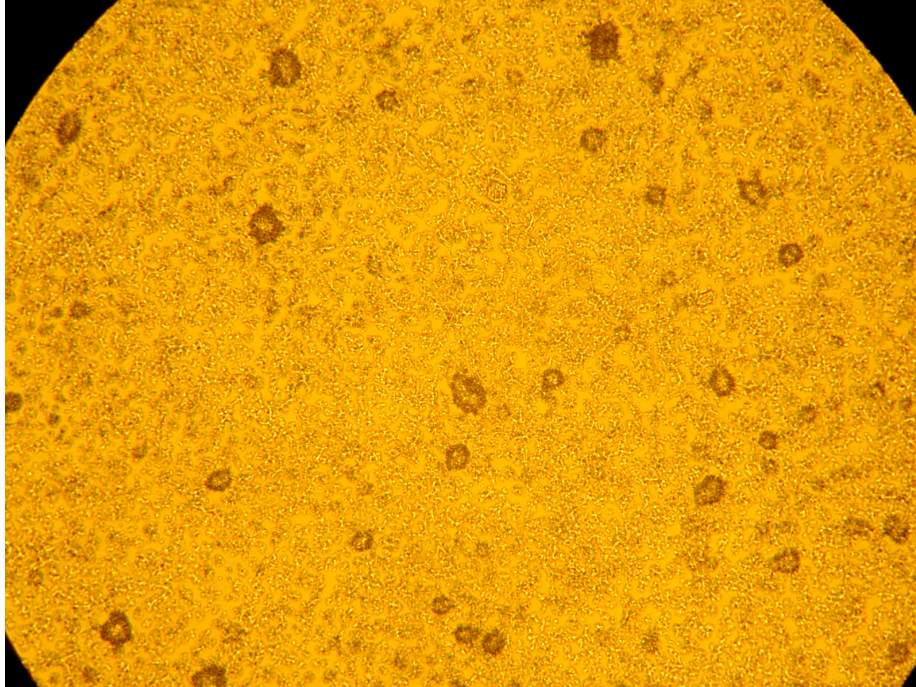
Aktivierung mit ADP, gesunder Spender.

Messung: 3.3.2.2, Quarz: PS 11

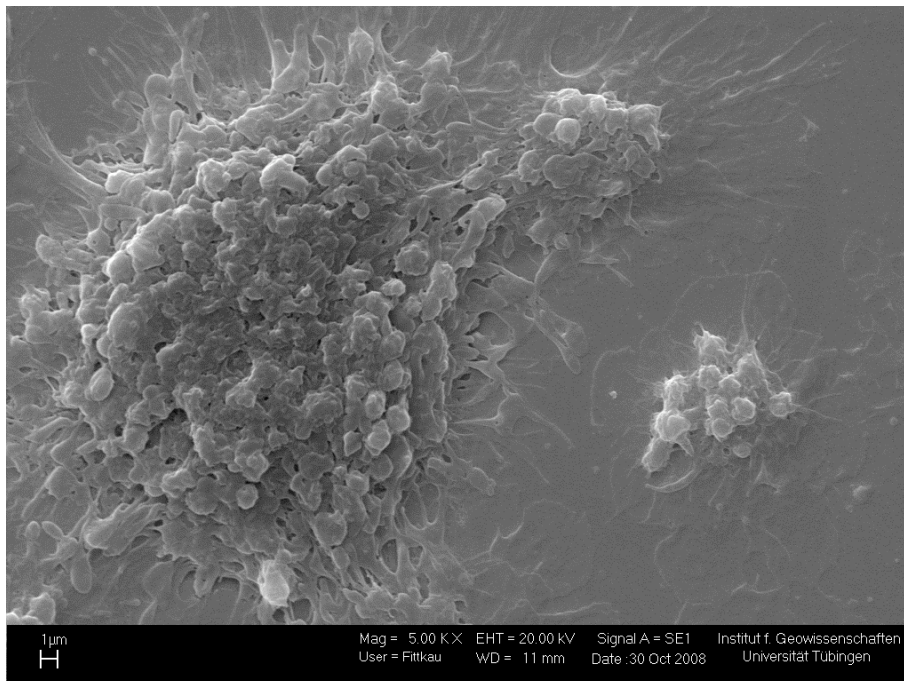
## Ergebnisse

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 890 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 640 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +3030 Hz

Der Frequenzabfall und -verlauf sowie das mikroskopische Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.



**Abbildung 3-26: Quarz PS 11 nach Messung 3.3.2.2, 100x Vergrößerung**



**Abbildung 3-27: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ADP auf PS 11**

## Ergebnisse

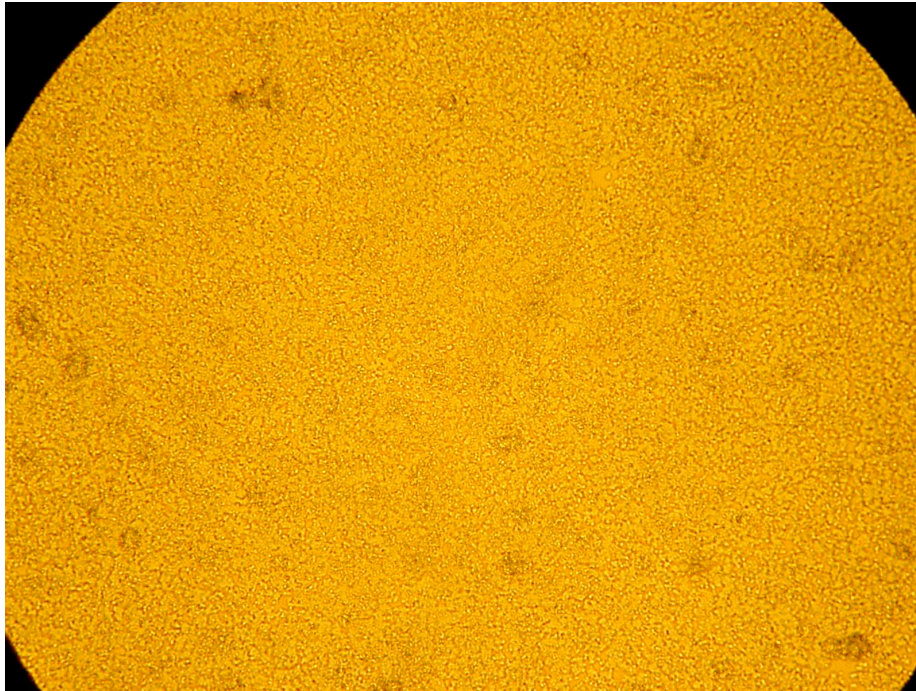
### 3.3.2.3 Thrombozytenfunktion – Spender nimmt ASS, Aktivierung mit ADP

Aktivierung mit ADP, Spender nimmt ASS 100.

Messung: 3.3.2.3a, Quarz: PS 12

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 1940 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 1700 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +4440 Hz

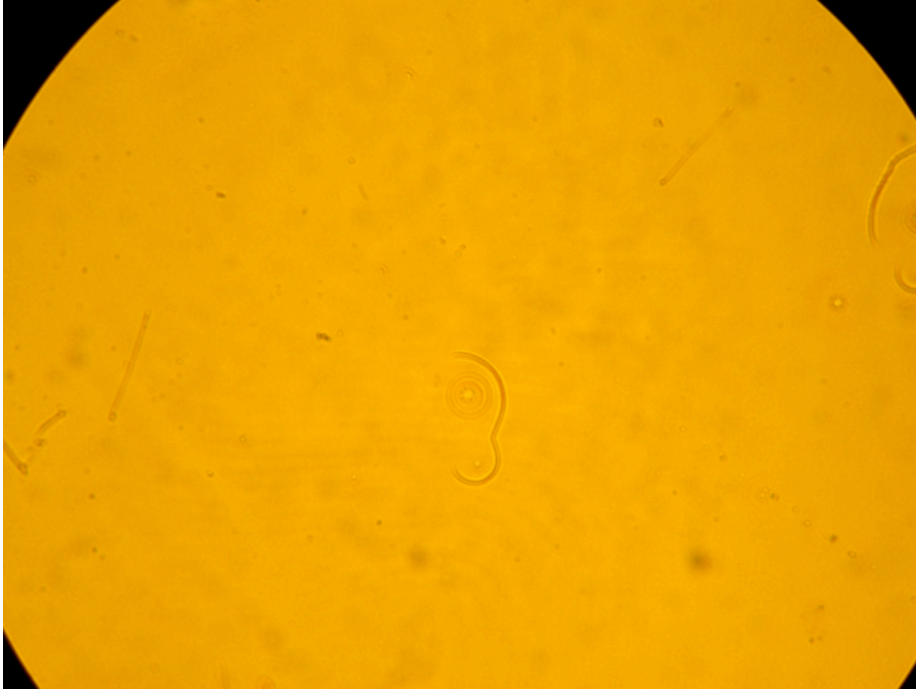
Der Frequenzabfall und -verlauf sowie das mikroskopische Bild zeigten eine deutliche Thrombozytenanbindung an.



**Abbildung 3-28: Quarz PS 12 nach Messung 3.3.2.3a, 100x Vergrößerung**

Der Quarz wurde nach der Messung mittels NaOH und SDS-Lsg., wie in den Kapiteln zur Regeneration beschrieben, regeneriert. Das mikroskopische Bild zeigte eine saubere Oberfläche (zu erkennende Schlieren sind Artefakte, der Quarz wurde zum Fotografieren mit Puffer feucht gehalten).

## Ergebnisse



**Abbildung 3-29: Quarz PS 12 nach Regeneration mit NaOH und SDS, 100x Vergrößerung**

Erneute Messung.

Aktivierung mit ADP, Spender nimmt ASS 100.

Messung: 3.3.2.3b, Quarz: PS 12

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 700 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 410 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +2200 Hz

Der Frequenzabfall und -verlauf sowie das mikroskopische Bild zeigten erneut eine deutliche Thrombozytenanbindung an.



**Abbildung 3-30: Quarz PS 12 nach Messung 3.3.2.3b, 100x Vergrößerung**

Mehrfache Messungen auf einem Quarz funktionieren auch mit durch ASS gehemmten Thrombozyten welche mit ADP aktiviert werden.

3.3.2.4 Thrombozytenfunktion – Spender nimmt ASS Aktivierung mit Arachidonsäure  
Aktivierung mit Arachidonsäure, Spender nimmt ASS 100.

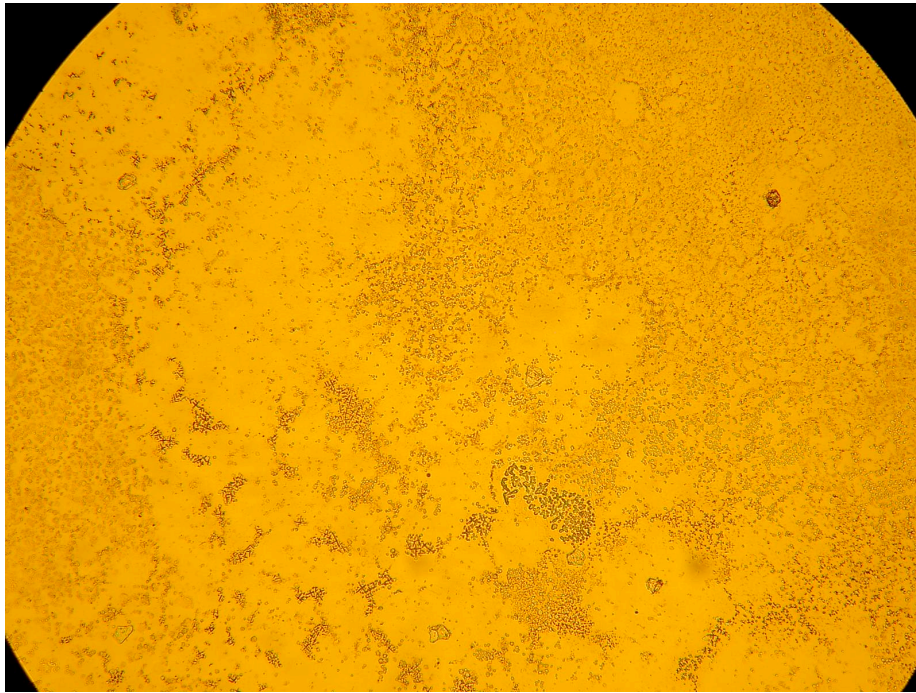
Messung: 3.3.2.4, Quarz: PS 13

$\Delta f_{\text{gesamt}}$ : - 700 Hz,  $\Delta f_{\text{TZ}}$ : - 490 Hz,  $\Delta \Gamma$ : +750 Hz

Der Frequenzabfall und -verlauf (siehe Zusammenfassung) zeigten nur eine geringe Thrombozytenanbindung.

Die reichlichen Thrombozytenaggregate auf dem mikroskopischen Bild sind bei gehemmten Thrombozyten eigentlich nicht zu erwarten. Es fällt jedoch auf, dass die Thrombozyten anders als bei Aktivierung mit ADP nicht den ganzen Quarz bedecken. Näheres siehe Diskussion.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-31: Quarz PS 13 nach Messung 3.3.2.4, 100x Vergrößerung**

### 3.3.2.5 Thrombozytenfunktionsmessungen auf PS – Zusammenfassung

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessung auf Goldoberflächen in absoluten Werten zusammengefasst.

**Tabelle 3-30: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern**

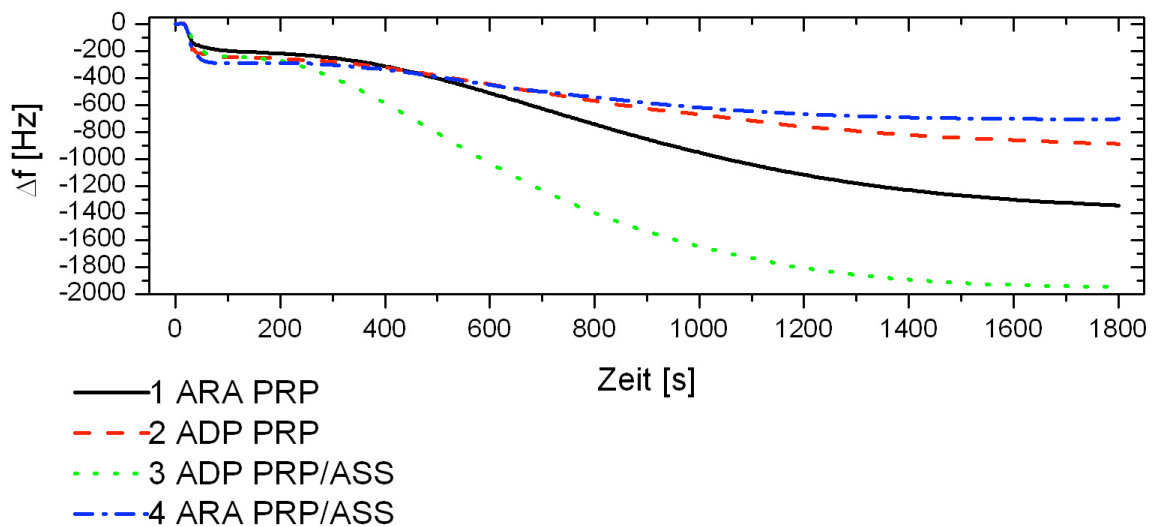
	1 Arachidonsäure Normale TZ	2 ADP Normale TZ	3 ADP ASS	4 Arachidonsäure ASS
$\Delta f_{\text{gesamt}}$	- 1340Hz	- 890Hz	- 1940Hz	- 700Hz
$\Delta f_{\text{TZ}}$	- 1140Hz	- 640Hz	- 1700Hz	- 490Hz

Die folgende Abbildung zeigt, dass durch ASS gehemmte Thrombozyten, welche durch Arachidonsäure aktiviert wurden, nur sehr spät und wenig am Quarz anbinden. Anhand des Kurvenverlaufes lässt sich die Messung deutlich von Messungen mit „funktionierenden“ Thrombozyten bzw. Aktivierung mit ADP unterscheiden. So zeigen alle Messungen nach dem initialen Frequenzabfall (0-100s) (Einstrom des PRP in die Messkammer) direkt im Anschluss eine schwach fallende Frequenz. Der

## Ergebnisse

Abfall verstärkt sich im Verlauf stark und führt so zu einem deutlichen Frequenzabfall. Der zweite deutliche Frequenzabfall nach dem Einstrom wird durch die Thrombozytenanbindung (je nach Messung bei 200-500s) verursacht. Wartet man lange genug, so erreicht die Messkurve einen Tiefpunkt (nicht bei allen Messungen mit aufgezeichnet).

Bei der 4. Kurve (mit ASS behandelte Thrombozyten, Aktivierung mit Arachidonsäure) setzt der Frequenzabfall nur schwach bei ca. 400s ein und erreicht bei weitem nicht die gleiche Steigung wie die Messung 3 (Aktivierung mit ADP, PRP/ASS). Näheres zur Interpretation im Kapitel Diskussion.



**Abbildung 3-32: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern, Aktivierung mit Arachidonsäure oder ADP, auf PS.**

## 4 Zusammenfassung und Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Grundlagen für die Regeneration von Schwingquarzsensoren zur Thrombozytenfunktionsmessung zu schaffen.

Dazu wurden Vorversuche mit dem Dummy-System durchgeführt, um ein Regenerationsverfahren zu etablieren. Diese Ergebnisse wurden auf die Fidget-Type Anlage übertragen.

Zum Schluss erfolgte die Betrachtung spezieller Fragestellungen der Thrombozytenfunktionsmessung.

### 4.1 Vergleich mit dem Stand der Technik

Der folgende Abschnitt soll die Einordnung der Thrombozytenfunktionsmessung mittels Schwingquarzen und deren potentiellen Anwendungsgebiete aufzeigen. Dazu wird das neue Verfahren mit den im Kapitel „Thrombozytenfunktionsmessung – Stand der Technik“ beschriebenen Verfahren kurz verglichen. Aufgrund der Fülle an Messmethoden und Geräten ist eine umfassende Auflistung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und zweckmäßig. Die Datenlage zur neuen Schwingquarzmethode ist, im Vergleich zu den zum Teil seit Jahrzehnten bestehenden Methoden nur prognostisch zu bewerten. Wie gut die im Laborversuch gewonnenen Erkenntnisse letztendlich auf breite Anwendungen übertragbar sein werden, ist im Moment noch nicht absehbar.

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 Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung [4]**

	Thrombozyten-Aggregometrie nach Born	Thromb-elastographie	Vollblut-Impedanz-Aggregometrie	Schwingquarz-methode
Messeinheit	Küvette	Stempel und Küvette	Messzelle	Schwingquarzeinheit
Probe	PRP und PPP	Vollblut	Vollblut	PRP
Aktivierung	ADP,	ADP,	spezielle	ADP,

## Diskussion

	Arachidonsäure u.a.	Arachidonsäure u.a.	Reagenzien des Herstellers	Arachidonsäure u.a. denkbar (bisher nicht untersucht)
Messgröße	Licht- transmission	Viskosität	Elektrischer Widerstand	Frequenz akustischer Wellen
Kosten (ca.) Euro/Test	< 2	25 - 50	5 - 7	

Jedes der aufgezeigten Verfahren ist auf seine Weise relativ 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 (näheres hierzu in den folgenden Kapiteln).

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

Wesentliche Unterschiede bestehen in der zum Einsatz kommenden Probe. Es werden Plasma oder Vollblut verwendet.

Außerdem ist bei jedem der Verfahren die Messgröße eine andere, wobei sich jeweils auf seine Art die Eigenschaft der Thrombozyten, zu adhären und zu aggregieren, zunutze gemacht wird. Keines der Verfahren kann zuverlässig zwischen Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation unterscheiden.

Schließlich unterscheiden sich die Verfahren noch in der eigentlichen Messeinheit. Bei der Aggregometrie nach Born wird lediglich eine Küvette benötigt, bei der Elastographie wird eine Küvette mit einem zugehörigen Stempel benötigt und bei der Vollblutimpedanzaggregometrie wird eine Messzelle mit Elektroden und Anschlüssen benötigt. Alle diese Messeinheiten sind z.T. teure Einmalartikel.

Darüber hinaus werden bei allen am Markt befindlichen Geräten die Proben mittels Pipette in die Messeinheit eingebracht.

Bei der neuen Schwingquarmethode wird die Probe durch eine Pumpe in die Messkammer gefördert. So ist beispielsweise denkbar, dass der Messkammer ein Zellcounter vorgeschaltet wird. So könnte in einem Gerät neben der Funktion 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 mit Schwingquarzen mit Vollblut anzuwenden, wäre dies eine wesentliche Vereinfachung des Verfahrens und böte weitere Möglichkeiten.

Die Komplexität der einzelnen Verfahren lässt darauf 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. [4]

Die Thrombozytenfunktionsmessung mittels Schwingquarzsensoren könnte zukünftig patientennah und kostengünstig eingesetzt werden. Dafür sprechen die mögliche Miniaturisierung des Messgerätes (zur Blutgruppenbestimmung wird hierzu von Gehring et. al. bereits ein Prototyp entwickelt), die mögliche Mehrfachmessung durch Regeneration, wie in dieser Arbeit beschrieben und die Sensitivität auf eine häufige Fragestellung, der Thrombozytenfunktion im Rahmen der Acetylsalicylsäuretherapie (auch in dieser Arbeit beschrieben).

### **4.2 Beschichtung**

Eine für die Thrombozytenfunktionsmessung geeignete Oberfläche auf Schwingquarzen muss genügend thrombophil sein, damit aktivierte Thrombozyten daran adhärieren. Sowohl die blanke Goldoberfläche als auch die hier beschriebene Polystyrol Beschichtung zeigen diese Eigenschaften. Zur Ermittlung der am besten geeigneten Polystyrol Beschichtung hat Koch in seiner Arbeit umfangreiche Testreihen durchgeführt. [17]

Die Beständigkeit der Oberfläche gegen Reaktionsmedien zur Regeneration des Quarzes wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und bestätigt.

### **4.3 Regeneration**

Die Regeneration soll dazu dienen, den Schwingquarz für mehrere Messungen in Folge zur Verfügung zu stellen. Somit soll einerseits gewährleistet werden, dass der

aufwändige Herstellungs- und Präparationsprozess und die damit verbundenen Kosten pro Messung gesenkt werden. Andererseits 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.

### 4.3.1 Regeneration im Dummy

Die einzelnen Regenerationsschritte wurden zunächst auf ihre generelle Eigenschaft, Thrombozyten von Schwingquarzoberflächen zu lösen untersucht. Es wurden initiale Tests durchgeführt, die eine Lösung von Thrombozyten von der Oberfläche der Schwingquarze zeigen sollten. Für diese ersten Versuche eignete sich das Dummy-System sehr gut, da der Aufbau dieser Versuchskonstruktion einfach war und so viele verschiedene Methoden mit relativ geringem Aufwand untersucht werden konnten.

Die Untersuchungen im Dummy-System umfassten als erstes die Suche nach den geeigneten Regenerationslösungen, deren Anwendung (Reihenfolge, Reaktionsdauer) dann für alle weiteren Messungen optimiert wurden.

#### 4.3.1.1 Regeneration PS beschichteter Quarze im Dummy

In Experimenten mit dem Dummy-System konnte gezeigt werden, dass PS-beschichtete Quarze mittels dem folgenden Protokoll am besten regeneriert werden können.

- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeneinstellung: Flow 0,4ml/min für 1 Min.)
- 6 molare Natronlauge für den ersten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 1 Min.)
- Sodium Dodecyl Sulfat (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) für den zweiten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min

Mit diesem Regenerationsverfahren gelang es den Quarz PS 6 für zwei Messungen zu verwenden (ein Mal regeneriert) und den Quarz PS 7 für drei Messungen zu verwenden (zwei Mal regeneriert).

Versuche mit Trypsin-EDTA, ein molarer Natronlauge, sechs molarer Natronlauge (als alleiniges Reagenz), SDS-Lösung (als alleiniges Reagenz) und Salzsäure führten zu keinem zufrieden stellendem Ergebnis.

### 4.3.1.2 Regeneration unbeschichteter Quarze im Dummy

In Experimenten mit dem Dummy-System konnte gezeigt werden, dass PS-beschichtete Quarze mittels dem oben beschriebenen Protokoll am besten regeneriert werden können. Dieses Regenerationsprotokoll zeigte auch auf unbeschichteten Quarzen eine gute Regeneration. Zur Vereinfachung des Verfahrens wurde versucht eine nicht durch HCl angesäuerte SDS-Lösung zu verwenden. Dies führte zu keiner erfolgreichen Regeneration, so dass folgendes Protokoll auch für unbeschichtete Quarze verwendet wurde.

- Tris-NaCl zum Befüllen des Systems (Pumpeneinstellung: Flow 0,4ml/min für 1 Min.)
- 6 molare Natronlauge für den ersten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 1 Min.)
- Sodium Dodecyl Sulfat (0,5M in H<sub>2</sub>O pH2 (mit HCl eingestellt)) für den zweiten Regenerationsschritt (Pumpeneinstellung: 0,4ml/min für 5 Min.)
- Tris-NaCl zum Spülen 0,4ml/min

### 4.3.2 Regeneration in der Anlage

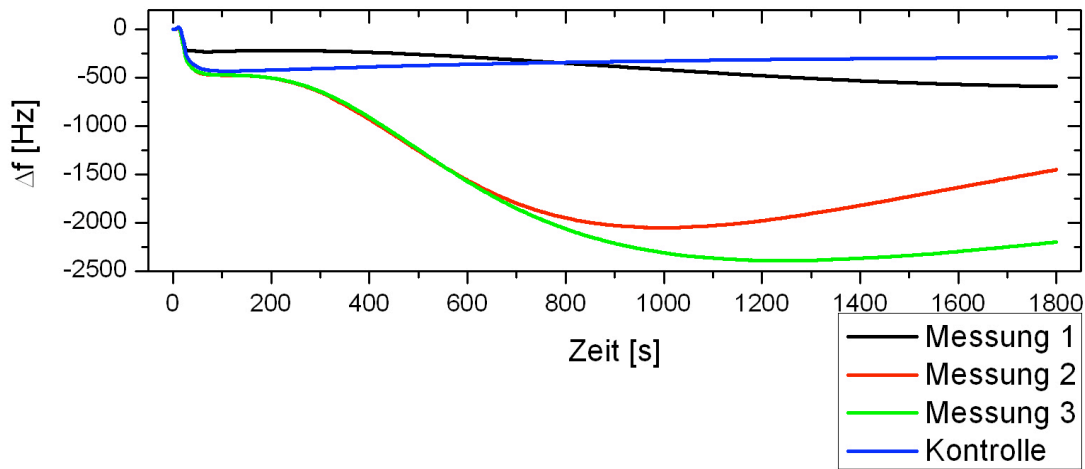
Nachdem mit Hilfe des Dummy-Systems ein Regenerationsverfahren gefunden wurde, dass sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch erfolgreiche Regenerationen lieferte, welche erneute Thrombozytenfunktionsmessungen mit dem selben Quarz zuließen, wurde nun versucht eine Messung, die anschließende Regeneration und die erneute Messung in der Anlage zu reproduzieren.

#### 4.3.2.1 Regeneration PS beschichteter Quarze in der Anlage

Nachdem es bereits gelungen war die Quarze PS 6 und PS 7 im Dummy-System so zu regenerieren, dass sie mehrfach benutzt werden konnten, wurden in der Anlage die Quarze PS 8 und PS 9 mehrfach regeneriert.

## Diskussion

Mit dem Quarz PS 8 gelang es drei aufeinander folgende Messungen und eine anschließende Kontrollmessung durchzuführen. In folgender Abbildung und Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abbildung 4-1: Messungen auf PS 8**

**Tabelle 4-2: Messungen auf PS 8**

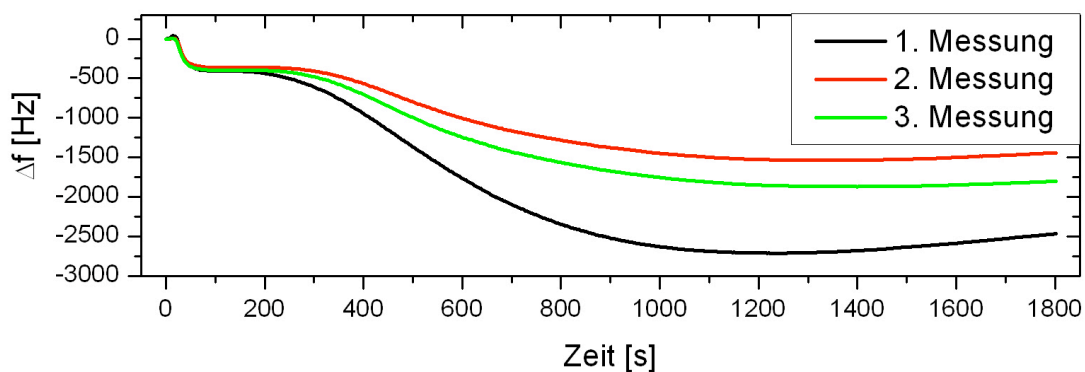
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Kontrollmessung
$\Delta f_{TZ}$ [Hz]	-360	-990	-1730	0

Betrachtet man in Abbildung 4-1 zunächst die Frequenzabfälle als Einzelwerte fällt auf, dass der Frequenzabfall von Messung zu Messung steigt, so dass man einen Verstärkungseffekt annehmen könnte. Dies wird jedoch durch die Ergebnisse der Messungen auf dem Quarz PS 9 (siehe Abbildung 4-2) nicht bestätigt. Bei Betrachtung vieler verschiedener Messungen fällt auf, dass nicht der absolute Frequenzabfall, sondern der Kurvenverlauf der Frequenzänderung eine zuverlässigere Aussage über die Thrombozytenfunktion liefert. So kann man auch bei dem groben Maßstab des obigen Graphen deutliche Unterschiede der Kurvenverläufe Messung zu Kontrolle erkennen. Es fällt auch auf, dass bei Messung 1 erst bei ca. 400s die Frequenz abfällt, was anzeigt, dass die Aktivierung der Thrombozyten hier erst relativ spät einsetzt. Hingegen bei den Messungen 2 und 3 schon bei ca. 200s der Frequenzabfall einsetzt. Die Kontrollmessung hingegen weist gar keinen Frequenzabfall auf, im Gegenteil die Frequenz steigt an. Ebenfalls fällt auf, dass der initiale Frequenzabfall der Messung 1 von denen der Messungen 2, 3 und Kontrolle abweicht (siehe Abbildung 4-1). Dies wiederum spricht dafür, dass die

## Diskussion

Viskosität des einströmenden PRP-ADP-Gemisches schon zu Beginn des Versuches unterschiedlich zu den folgenden Messungen war. Dies könnte auf Ungenauigkeiten der Mischzeit zurückzuführen zu sein, wodurch bei einer schlechteren Mischung des Aktivators mit dem ADP die Aktivierung und damit die Adhäsion/Aggregation der Thrombozyten und die damit verbundene Frequenzänderung erst später einsetzen würde. Näheres dazu auch im Kapitel Interpretation der Messwerte.

Mit dem Quarz PS 9 gelang es ebenfalls drei aufeinander folgende Messungen durchzuführen. In folgender Abbildung und Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abbildung 4-2: Messungen auf PS 9**

**Tabelle 4-3: Messungen auf PS 9**

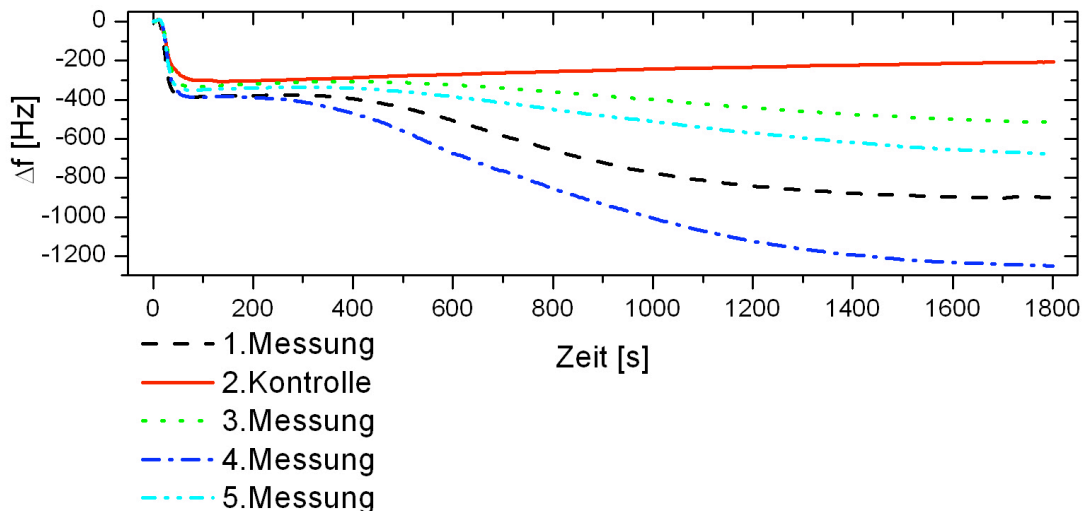
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
$\Delta f_{TZ}$ [Hz]	- 2060	- 1070	- 1380

In Abbildung 4-2 fällt ebenfalls auf, dass die absoluten Frequenzabfälle von Messung zu Messung unterschiedlich ausfallen. Betrachtet man jedoch die Kurvenverläufe, wird deutlich, dass der Thrombozytenfunktion bei ausreichender Durchmischung mit dem Aktivator ein charakteristischer Kurvenverlauf zugeordnet werden kann. Dieser besteht aus initialem Frequenzabfall (Einstrom des PRP), kurzes Plateau (Zeit bis zum Beginn der Adhäsion/Aggregation der Thrombozyten) und anschließendem Frequenzabfall (Adhäsion/Aggregation der Thrombozyten) bis zu einem Tiefpunkt (bzw. Abbruch der Messung nach 30 Minuten). Näheres dazu auch im Kapitel Interpretation der Messwerte.

#### 4.3.2.2 Regeneration unbeschichteter Quarze in der Anlage

Die erfolgreichen Versuche auf PS beschichteten Quarzen sollten auf unbeschichteten Quarzen ebenfalls durchgeführt werden. Außerdem wurde versucht die Regenerationszeit kürzer zu halten, allerdings ohne Erfolg.

Die Messungen auf dem Quarz Gold 4 ermöglichten 5 Messungen auf dem selben Quarz, wovon eine als Kontrollmessung diente. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung und Tabelle dargestellt.



**Abbildung 4-3: Messungen auf Gold 4**

**Tabelle 4-4: Messungen auf Gold 4**

	Messung 1	Kontrolle 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
$\Delta f_{TZ}$ [Hz]	- 510	0	-180	-870	-330

Anhand der Kurvenverläufe ist zu erkennen, dass die Kontrollmessung im Gegensatz zu den anderen Messungen einen Frequenzanstieg zeigt. Die Messungen 1 und 3 bis 5 zeigen wie bei den PS Quarzen bereits beschrieben unterschiedliche Frequenzabfälle, allerdings vom Bild her gleiche Kurvenverläufe. Von einer Verstärkung wie bei Quarz PS 8 zunächst zu vermuten war, kann hier nun nicht mehr ausgegangen werden, da die Absolutwerte beliebig streuen. Näheres dazu auch im Kapitel Interpretation der Messwerte.

### 4.3.3 Übertragbarkeit auf ein automatisches Messgerät

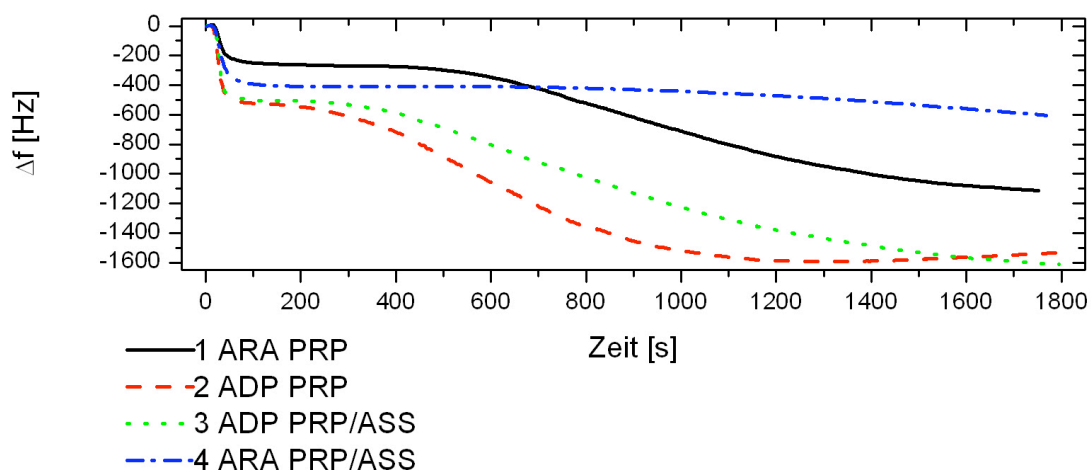
Überträgt man die gewonnenen Erkenntnisse aus den Regenerationsversuchen gedanklich auf ein zu entwickelndes automatisches Messgerät, kann man festhalten, dass eine Regeneration mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens durchführbar ist. Zu klären bleibt die Interpretation der Messwerte/kurven. Dazu muss geprüft werden, ob anhand der Kurvenverläufe zwischen pathologischen und gesunden Thrombozytenfunktionen unterschieden werden kann. Näheres dazu im Kapitel Interpretation der Messwerte.

## 4.4 Thrombozytenfunktionsmessung

Wie durch die Kontrollmessungen mit durch Antikörper (Abciximab) gehemmten Thrombozyten bereits gezeigt wurde, kann das Verfahren prinzipiell zwischen funktionstüchtigen und pathologischen Thrombozyten unterscheiden. Mit den Ergebnissen der Versuche zur Thrombozytenfunktionsmessung sollte nun gezeigt werden, dass das Verfahren in der Lage ist anwendungsspezifisch Thrombozyten von Probanden, welche Acetylsalicylsäure einnehmen von gesunden Probanden zu unterscheiden.

### 4.4.1 Thrombozytenfunktionsmessung auf Gold

In folgender Abbildung sind die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessung auf Goldoberflächen zusammengefasst.



**Abbildung 4-4: Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold.**

Zur Interpretation muss berücksichtigt werden, dass nur die Messung 1 und 2 sowie die Messung 3 und 4 direkt miteinander verglichen werden können, da nur sie

Plasma des gleichen Spenders (unter gleichen Bedingungen, zu zeitlich nah aufeinander folgenden Messungen) repräsentieren.

Trotzdem ist zu erkennen, dass die beiden Messungen 2 und 3, welche ADP als Aktivator hatten, den bereits bekannten Kurvenverlauf für eine normale Thrombozytenfunktion aufweisen (initialer Frequenzabfall – Plateau – Frequenzabfall bei ca. 200s). Da die Acetylsalicylsäure (ASS) die Aktivierung durch ADP über den ADP-Rezeptor und dessen Signalkaskade nicht hemmt, ist dies nicht anders zu erwarten.

Die Messung 1, welche Arachidonsäure (ARA) als Aktivator in gesundem PRP hatte, zeigt ebenfalls den charakteristischen Kurvenverlauf funktionierender Thrombozyten. Allerdings wie beim Quarz PS 8 bereits aufgetreten mit verzögertem Beginn der Thrombozytenadhäsion und Aggregation. Dies kann entweder auf die langsamere Aktivierung durch Arachidonsäure zurückzuführen sein oder auf, wie bereits beschrieben, Abweichungen in der Mischzeit von PRP und Aktivator.

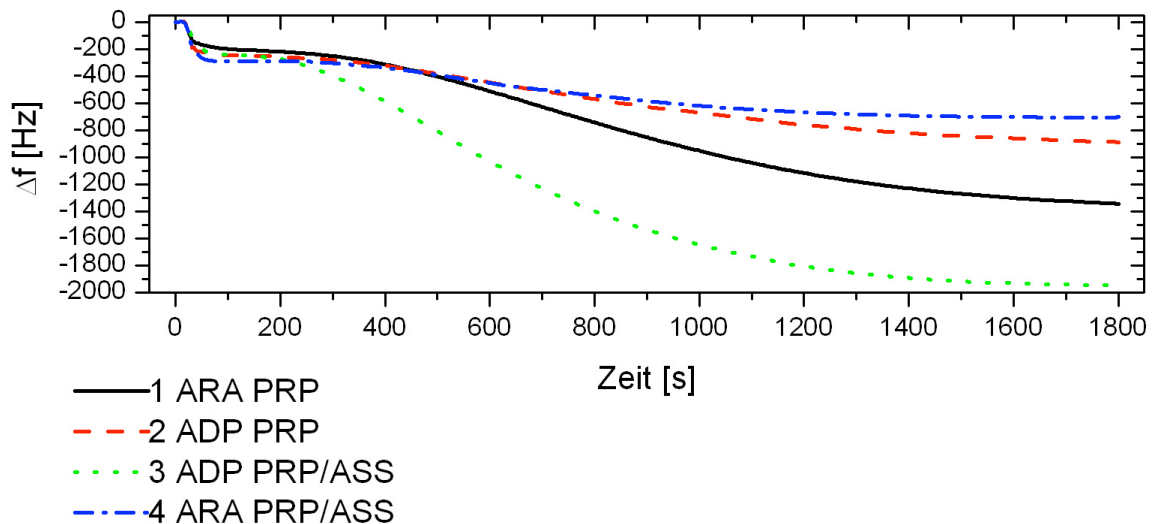
Die Messung 4 schließlich zeigt bei durch ASS gehemmten Thrombozyten und Aktivierung mittels Arachidonsäure nach dem initialen Frequenzabfall ein sehr ausgedehntes Plateau mit anschließendem sehr zögerlich einsetzendem Frequenzabfall bei ca. 900s. Die Aktivierung der Thrombozyten über Arachidonsäure, welches durch die Cyclooxygenase (COX) in den Aktivator Thromboxan umgebaut würde ist durch ASS, welches die COX hemmt zumindest zu großen Teilen unterbunden.

Betrachtet man nun nur die Messungen 3 und 4 im Vergleich so kann nur anhand der Kurvenverläufe das PRP mit gehemmter COX identifiziert werden.

### **4.4.2 Thrombozytenfunktionsmessung auf PS**

In folgender Abbildung sind die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessung auf PS-Oberflächen zusammengefasst.

## Diskussion



**Abbildung 4-5: Thrombozytenfunktionsmessungen auf PS.**

Wie im vorangehenden Kapitel Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold ist hier auch zu berücksichtigen, dass der Vergleich zwischen Aktivierung mit ADP und Arachidonsäure (Messung 1 und 2 bzw. 3 und 4) entscheidend für die Identifizierung des Probanden mit ASS-Einnahme ist.

Vergleicht man die Messungen 1 und 2 miteinander stellt man fest, dass beide Kurven den bereits bekannten Verlauf für funktionsfähige Thrombozyten aufweisen. Wie auf Gold ist auch hier festzustellen, dass die Aktivierung mittels Arachidonsäure zu einem verzögerten Frequenzabfall führt. Dies könnte mit der Signalkaskade zusammenhängen, da die Arachidonsäure zunächst enzymatisch in Thromboxan umgebaut werden muss, bevor sie die Thrombozyten aktiviert. Daher ist eine Zeitverzögerung durchaus erklärbar.

Vergleicht man die Kurven 3 und 4 miteinander ist festzustellen, dass die Kurvenverläufe deutlich voneinander abweichen. Während die Aktivierung mit ADP zu einem zügigen Frequenzabfall führt, kommt die Aktivierung mittels Arachidonsäure nur zögerlich in Gang.

### 4.4.3 Vergleich von PS beschichteten und unbeschichteten Quarzen

Sowohl mit PS beschichteten als auch mit unbeschichteten Quarzen gelingt es zuverlässig funktionsfähige und aktivierte Thrombozyten von durch Antikörper oder Medikamente gehemmten Thrombozyten zu unterscheiden. Klarer Vorteil der

Goldoberfläche ist die einfachere Herstellung, es entfallen die Arbeitsschritte zur Beschichtung der Oberfläche.

In wie weit die Unterschiede zwischen den PS-beschichteten und den unbeschichteten Oberflächen tatsächlich von der Oberfläche abhängen, ist momentan nur schlecht zu sagen. Da nur relativ wenige Ergebnisse vorliegen, können die Unterschiede auch die natürliche Streuung oder gar Abweichungen durch kaum zu kontrollierende Störgrößen wie, unterschiedliche Compliance der Probanden bezüglich der ASS-Einnahme, zeitliche Unterschiede beim Mischen der Proben (PRP und Aktivator) usw. darstellen.

Vom momentanen Erkenntnisstand ausgehend sollten in weiteren Untersuchungen beide Oberflächen Berücksichtigung finden.

### **4.5 Interpretation der Messwerte**

Wie in dieser Arbeit beschrieben und wie zahlreiche weitere Versuche mit unterschiedlichen Beschichtungen zeigen, gelingt es in Zusammenschau der Frequenzänderung (des Kurvenverlaufs) mit unterschiedlich eingesetzten Aktivatoren eine zuverlässige Aussage über die Thrombozytenfunktion zu treffen.

Anhand des Frequenzabfalls als Einzelwert, gelingt es derzeit nicht die Thrombozytenfunktion quantitativ zu bestimmen (siehe auch Arbeiten von Koch und Müller [17, 23]).

In dieser Arbeit konnten Negativexperimente, Kontrollen unter dem Mikroskop und REM-Aufnahmen die Beurteilung der Kurvenverläufe untermauern, so dass in Zukunft alleine anhand der Kurvenverläufe mittels der Schwingquarzmethode Aussagen über die Thrombozytenfunktion getroffen werden können.

Die bereits beschriebenen Verfahren Thrombozytenaggregometrie, Thrombelastographie und Vollblutimpedanzaggregometrie bedienen sich ebenfalls der Auswertung anhand ihrer charakteristischen Messwertverläufe.

## 4.6 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe des Dummy-Systems eine Möglichkeit zur Regeneration von Quarzoberflächen zu entwickeln. Die Quarze sollten dadurch für eine Wiederverwendung zur Thrombozytenfunktionsmessung zur Verfügung stehen. Als weitere Fragestellung sollte die Regeneration der Quarze in der Anlage verifiziert und nachvollzogen werden. Hierbei sollte auch gezeigt werden, dass mehrere Messungen auf einem Quarz, sowohl in einer Serie von Messungen am Stück, als auch in Einzelmessungen möglich sind.

Darüber hinaus wurden Messungen an Blutproben durchgeführt, welche von mit ASS therapierten Probanden stammten. Hiermit sollte gezeigt werden, dass das System in der Lage ist, Thrombozytopathien von gesunden Thrombozyten zu unterscheiden.

Für die Regeneration konnte ein Verfahren gefunden werden mit dessen Hilfe innerhalb von ca. 10 Minuten ein bereits verwendeter Quarz mittels Natronlauge und einer Sodium Dodecyl Sulfat Lösung regeneriert werden kann.

Diese Regeneration ermöglichte es, sowohl Polystyrol beschichtete als auch unbeschichtete Quarze mehrfach für Thrombozytenfunktionsmessungen zu verwenden.

Mittels Aktivierung der Thrombozyten durch ADP oder Arachidonsäure konnte gezeigt werden, dass die Schwingquarzmethode zwischen mit Acetylsalicylsäure behandelten und gesunden Probanden unterscheiden kann.

Neben der Auswertung der aufgezeichneten Frequenzverläufe, in Anlehnung an die Auswertung der Thrombozytenaggregometrie nach Born, konnten die Versuchsergebnisse mittels mikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen untermauert werden. Des Weiteren konnte mittels Antikörpern gegen den IIb/IIIa-Rezeptor die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten untereinander gehemmt werden und somit Kontrollmessungen durchgeführt werden.

In Bezug auf einen späteren Einsatz in der Routinediagnostik musste neben der Ökologie zudem auf Ökonomie geachtet werden. Es wurden Versuche durchgeführt, um den geringsten materiellen und zeitlichen Aufwand der Regeneration bei gleichzeitig gutem Ergebnis erzielen zu können.

## 5 Abkürzungen

ARA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
besch.	beschichtet
bideest.	bidestilliert
COX	Cyclooxygenase
$\Delta f$	Frequenzänderung
$\Delta \Gamma$	Dämpfungsänderung
HCl	Salzsäure
Min.	Minuten
NaOH	Natronlauge
PPP	Platelette Pour Plasma
PRP	Platelette Rich Plasma
PS	Polystyrol
QCM	Quartz–Crystal–Microbalance
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Tris-NaCl	Tris-NaCl-Puffer
unbesch.	unbeschichtet

## 6 Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1-1: Gerinnungskaskade [21] .....	7
Abbildung 1-2: Prinzip der Thrombozyten-Aggregometrie nach Born [22] .....	9
Abbildung 1-3: Prinzip der (Rotations-)Thromboelastometrie (ROTEM®) [28] .....	10
Abbildung 1-4: Prinzip der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie (Multiplate®) [24] ....	11
Abbildung 1-5: Fidget–Type Fg T1 (Anlage im Überblick).....	14
Abbildung 1-6: Quarzhalterung mit Quarz und Messkammer .....	14
Abbildung 1-7: Dummy-System.....	15
Abbildung 2-1: Kurvenverläufe der Messwertaufzeichnung .....	23
Abbildung 3-1: Quarz PS 1 nach Messung 3.1.1.1, 50x Vergrößerung .....	29
Abbildung 3-2: Quarz PS 3 nach Messung 3.1.1.3b nach Regeneration mit NaOH 6M, 100x Vergrößerung .....	32
Abbildung 3-3: Quarz PS 4 nach Messung 3.1.1.4 nach Regeneration mit SDS-Lsg, 100x Vergrößerung .....	34
Abbildung 3-4: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7a, 100x Vergrößerung .....	37
Abbildung 3-5: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7a nach Regeneration mit NaOH und SDS-Lsg, 100x Vergrößerung .....	38
Abbildung 3-6: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7b, 100x Vergrößerung .....	39
Abbildung 3-7: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7b nach Regeneration mit NaOH und SDS-Lsg., 100x Vergrößerung .....	40
Abbildung 3-8: Quarz PS 7 nach Messung 3.1.1.7c, 100x Vergrößerung.....	41
Abbildung 3-9: Messkurven der Messung 3.1.2.1a .....	42
Abbildung 3-10: Messkurven der Messung 3.1.2.1b .....	43
Abbildung 3-11: Quarz Gold 1 nach Messung 3.2.1.1, 100x Vergrößerung.....	44
Abbildung 3-12: Quarz Gold 1 nach Messung 3.2.2.1 nach Regeneration mit NaOH und SDS, 50x Vergrößerung .....	45
Abbildung 3-13: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2a, 100x Vergrößerung.....	46
Abbildung 3-14: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2a nach Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl), 100x Vergrößerung.....	47
Abbildung 3-15: Quarz Gold 2 nach Messung 3.2.1.2b, 100x Vergrößerung.....	48
Abbildung 3-16: Messkurven der Messung 3.2.2.2 .....	50

## Abbildungen und Tabellen

Abbildung 3-17: Quarz Gold 5 nach Messung 3.3.1.1, gesunder Spender, Aktivierung mit Arachidonsäure, 100x Vergrößerung .....	51
Abbildung 3-18: REM-Aufnahme von TZ nach Aktivierung mit ARA auf Gold 5 .....	52
Abbildung 3-19: Quarz Gold 6 nach Messung 3.3.1.2, 100x Vergrößerung.....	53
Abbildung 3-20: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ADP auf Gold 6 .....	53
Abbildung 3-21: Quarz Gold 7 nach Messung 3.3.1.3, 100x Vergrößerung.....	54
Abbildung 3-22: Quarz Gold 8 nach Messung 3.3.1.4, 100x Vergrößerung.....	55
Abbildung 3-23: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern, Aktivierung mit Arachidonsäure oder ADP, auf Gold...	56
Abbildung 3-24: Quarz PS 10 nach Messung 3.3.2.1, 100x Vergrößerung .....	57
Abbildung 3-25: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ARA auf PS 10.....	57
Abbildung 3-26: Quarz PS 11 nach Messung 3.3.2.2, 100x Vergrößerung .....	58
Abbildung 3-27: REM-Aufnahme TZ nach Aktivierung mit ADP auf PS 11 .....	58
Abbildung 3-28: Quarz PS 12 nach Messung 3.3.2.3a, 100x Vergrößerung .....	59
Abbildung 3-29: Quarz PS 12 nach Regeneration mit NaOH und SDS, 100x Vergrößerung .....	60
Abbildung 3-30: Quarz PS 12 nach Messung 3.3.2.3b, 100x Vergrößerung .....	61
Abbildung 3-31: Quarz PS 13 nach Messung 3.3.2.4, 100x Vergrößerung .....	62
Abbildung 3-32: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern, Aktivierung mit Arachidonsäure oder ADP, auf PS.....	63
Abbildung 4-1: Messungen auf PS 8 .....	69
Abbildung 4-2: Messungen auf PS 9 .....	70
Abbildung 4-3: Messungen auf Gold 4 .....	71
Abbildung 4-4: Thrombozytenfunktionsmessungen auf Gold.....	72
Abbildung 4-5: Thrombozytenfunktionsmessungen auf PS.....	74
Tabelle 1-1:Gerinnungsfaktoren .....	6
Tabelle 2-1: Darstellung der Messergebnisse .....	23
Tabelle 2-2: Ablauf der Regeneration im Dummy .....	26
Tabelle 2-3: Ablauf der Regeneration in der Anlage .....	26
Tabelle 3-1: Messung vor Regeneration mit Trypsin-EDTA.....	28
Tabelle 3-2: Regenerationsablauf mit Trypsin-EDTA .....	28
Tabelle 3-3: Messung vor Regeneration mit NaOH 1M.....	30
Tabelle 3-4: Regenerationsablauf mit NaOH 1M.....	30

## Abbildungen und Tabellen

Tabelle 3-5: Messung nach Regeneration mit NaOH 1M.....	30
Tabelle 3-6: Messung vor Regeneration mit NaOH 6M.....	31
Tabelle 3-7: Regenerationsablauf mit NaOH 6M.....	31
Tabelle 3-8: Messung nach Regeneration mit NaOH 6M.....	32
Tabelle 3-9: Messung vor Regeneration mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) .....	33
Tabelle 3-10: Regenerationsablauf mit SDS .....	33
Tabelle 3-11: Messung vor Regeneration mit HCl.....	34
Tabelle 3-12: Regenerationsablauf mit HCl.....	35
Tabelle 3-13: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS .....	35
Tabelle 3-14: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS .....	35
Tabelle 3-15: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS .....	36
Tabelle 3-16: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS .....	36
Tabelle 3-17: erste Regeneration mit NaOH und SDS.....	37
Tabelle 3-18: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS .....	38
Tabelle 3-19: zweite Regeneration mit NaOH und SDS.....	39
Tabelle 3-20: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS .....	40
Tabelle 3-21: Messwerte der Messung 3.1.2.1a .....	42
Tabelle 3-22: Messwerte der Messung 3.1.2.1b .....	43
Tabelle 3-23: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS .....	44
Tabelle 3-24: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS .....	45
Tabelle 3-25: Messung vor Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl).....	46
Tabelle 3-26: Regenerationsablauf mit NaOH und SDS (ohne HCl).....	46
Tabelle 3-27: Messung nach Regeneration mit NaOH und SDS (ohne HCl) .....	47
Tabelle 3-28: Messwerte der Messung 3.2.2.2 .....	50
Tabelle 3-29: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern .....	55
Tabelle 3-30: Thrombozytenfunktionsmessungen mit gesunden und mit ASS behandelten Spendern .....	62
Tabelle 4-1: Vergleich der Verfahren zur Thrombozytenfunktionsmessung [4].....	64
Tabelle 4-2: Messungen auf PS 8 .....	69
Tabelle 4-3: Messungen auf PS 9 .....	70
Tabelle 4-4: Messungen auf Gold 4 .....	71

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Ballantine D WR, Martin S. 1997. Acoustic Wave Sensors. Academic Press, San Diego
- [2] Bauer W, Mall K. 1995. HÄMOSTASE, THROMBOSE UND EMBOLIE Historische Konzepte zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. Haemostaseologie 15: 92-9
- [3] Boxberger H. 2006. Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken. Wiley-VCH
- [4] Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase. J Lab Med 2007;31(6):239–247
- [5] Cardinal DC, Flower RJ. 1980. The electronic aggregometer: A novel device for assess-ing platelet behavior in blood. J Pharmacol Methods; 3:135-158
- [6] Claußen J. 2008. Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren. Dissertation, Universität Tübingen
- [7] Cluss S. 2006. Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten. Dissertation, Universität Tübingen
- [8] Döring J. 2008. Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor. Dissertation, Universität Tübingen
- [9] Gehring FK. 2005. Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. Göttingen: Cuvillier Verlag
- [10] Grate J, Frye G. 1992. Acoustic wave sensors, update. Weinheim
- [11] Grate J, Martin S, White R. 1993. Acoustic wave microsensors: part I. Anal Chem 65: 940-5
- [12] Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin Wochenschr 1948; 26:577-583
- [13] Henderson L. E., Oroszlan S., Konigsberg W. 1979. A Micromethod for Complete Removal of Dodecyl Sulfate from Proteins by Ion-Pair Extraction. Analytical Biochemistry 93:153-157
- [14] Horn F., Moc I., Schneider N., Gillhösl C., Berghold S., Lindenmeier G. 2005. Biochemie des Menschen. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag

## Literatur

- [15] Huppelsberg J., Walter K. 2005. Kurzlehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [16] Klinke R., Pape, H., Silbernagl S. 2005. Lehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [17] Koch J. 2009. Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Thrombozytenfunktionsmessung. Dissertation, Universität Tübingen
- [18] Krapf R. 2001. Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen. Dissertation, Universität Tübingen
- [19] Kratzer MAA, Bellucci S, Caen JP. Detection of abnormal platelet function with an in vitro model of primary haemostasis. Haemostasis 1985; 15:363-370
- [20] Kratzer MAA, Born GVR. Simulation of haemostasis in vitro. Haemostasis 1985; 15:357-362
- [21] Lutze G. 2006. Wissenswertes zur Gerinnung. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH
- [22] möLAB® Thrombozytenfunktionsdiagnostik und therapeutischen Medikamentenmonitoring, möLAB GmbH, Langenfeld, S.11
- [23] Müller L. 2009. Schwingquarze als Hämostase-Sensoren – Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut. Dissertation, Universität Tübingen
- [24] Multiplate® Umfassende Thrombozytendiagnostik, Dynabyte GmbH, München
- [25] Neubig B, Briese W. 1997. Das große Quarzkochbuch. Poing: Franzis Verlag, Poing
- [26] O'Sullivan C, Gibault G. 1999. Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. Biosens Bioelectron 14: 663-70
- [27] Rickert J, Hayward G, Cavic B, Thopson M, Göpel W. 1999. Biosensor based on acoustic wave devices. Weinheim: Wiley VCH, Weinheim
- [28] Rotem Manual, Bediener Handbuch, Vollblut-Gerinnungsanalyse basierend auf der Thromboelastometire. 2006-04 Pentapharm GmbH
- [29] Scheufele B. 2008. Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen. Göttingen: Cuvillier Verlag

## Literatur

- [30] Schoch M. 2008. Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren, Dissertation, Universität Tübingen
- [31] Schumacher R. 1999. Die Schwingquarzmethode - ein sensibles Messprinzip mit breitem Anwendungsspektrum. Chemie in unserer Zeit 33: 268-78
- [32] Thomas D W, Mannon R B, Mannon P J, Latour A, Oliver J A, Hoffman M, Smithies O, Koller B H, Coffman T M: Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. J Clin Invest 102 (1998) 1994-2001

## 8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen an dieser Arbeit beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin an der Universität Tübingen.

Herrn Prof. Northoff für die Annahme als Doktortand und die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Gehring für die intensive Betreuung und Anleitung.

Den Herren Dr. Müller und Dr. Drechsel für die Einarbeitung im Labor und stete Hilfsbereitschaft bei Problemen. Für Ihre zahlreichen Anregungen und die gute Zusammenarbeit.

Meinem Freund und Weggefährten Joachim Koch, ohne dessen Unterstützung die zahlreichen Experimente nicht hätten durchgeführt werden können.

Außerdem danke ich allen Probanden für ihre Blutspende, sowie den Mitarbeitern des Blutspendedienstes für die Bereitstellung der Proben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

---

Name: Schmidt  
Vorname: Steffen  
Geburtsdatum: 25.03.1981  
Geburtsort: Freiburg i.Br.  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

---

1987 – 1991: Wilhelm-August-Lay Schule Bötzingen  
1991 – 2000: Kepler-Gymnasium Freiburg

### beruflicher Werdegang:

---

2000 – 2001: Zivildienst beim Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuz Freiburg  
2001 – 2004: Ingenieursstudium an der Berufsakademie Mannheim und im Forschungszentrum Karlsruhe, erworbener Abschluss: Dipl.-Ing. (BA) Fachrichtung Verfahrenstechnik  
2004 – 2005: Ingenieur im Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
2005 – 2011: Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
29. März 2007: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12. Mai 2011: Ärztliche Prüfung